

# Katabole Eigenschaften 5',5''-verknüpfter Dinucleosidphosphate in Nuclei aus Rattenleber

Catabolic Properties of 5',5''-Linked Dinucleosidephosphates in Rat Liver Nuclei

Siegmar Bornemann und Eckhard Schlimme

Laboratorium für Biologische Chemie im Fachgebiet Organische Chemie der Universität-GH-Paderborn, Warburger Straße 100, D-4790 Paderborn

Z. Naturforsch. **37 c**, 818–823 (1982); received February 8/April 28, 1982

Nuclei, Dinucleosidephosphates, 5',5''-Linked Dinucleotides, Cap Analogs, Cap Catabolism

We report on the enzymatic degradation of  $^{14}\text{C}$ -labelled 5',5''-linked dinucleoside triphosphates  $\text{Gp}_3\text{A}$ , 2'-O-m $\text{Gp}_3\text{A}$ , 2'd $\text{Gp}_3\text{A}$ , 2',3''dd $\text{Gp}_3\text{A}$  and m' $\text{Gp}_3\text{A}$  in rat liver nuclei. The 2'-desoxy- and 2',3'-didesoxy compounds are poorer substrates than the other cap-structured dinucleotides investigated.

## 1. Einleitung

Die eukaryotische Zelle ist für die Bildung kappentypischer Dinucleosidtriphosphate enzymatisch ausgestattet [1–9]. Ebenso besitzt die lebende Zelle die grundsätzliche Eigenschaft, Biomoleküle wie z. B. kappengeschützte mRNA abzubauen [10]. Die Abbauprodukte werden je nach Stoffwechsellage aus dem Organismus eliminiert oder als Synthesevorstufen – im Sinne eines „Biologischen Recycling“ – wieder in den Zellstoffwechsel eingeschleust.

Untersuchungen mit Extrakten aus Weizenkeimen, Maus-L-Zellen und Hefe haben u. a. gezeigt, daß kappengeschützte mRNA im Gegensatz zu mRNA mit freien 5'-terminalen Phosphatgruppen von 5'-Exonucleasen nicht hydrolysiert werden [12–17]. Für diese Schutzfunktion ist aufgrund von Abbaubefunden mit Reoviren-mRNA gegenüber Weizenkeimextrakten eine Methylierung der Kappe nicht erforderlich [12].

Wie in Versuchen mit der rohen Zellkernfraktion und anderen subzellulären Fraktionen der Rattenleberzelle gezeigt werden konnte, liegen derartige nucleolytische Aktivitäten offenbar im Bereich des

Zellkerns vor [11]. Mit reinen Zellkernen wurde diesem Hinweis nachgegangen und radioaktiv markierte Kappenanaloga, die wie  $\text{Gp}_3\text{A}$  das Strukturmerkmal des 5'-Terminus von mRNA enthalten, auf ihr Abbauverhalten untersucht. Darüber hinaus wurde der Bedeutung des Ribofuranosidsystems und der 2',3'-cis-Diolgruppe mit Analoga nachgegangen, die Ribosemodifizierungen im Guanosinteil der Kappe trugen.

## 2. Experimentelles

### 2.1. Material

5'-Nucleotidase wurde von Sigma-Chemie, München, alle anderen Enzyme wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen. Die Nucleotide 2'dGDP, 2',3''ddGDP, 2'-O-mGDP und m'GDP stammen von PL-Biochemicals, St. Goar, sämtliche anderen Nucleotide von Boehringer, Mannheim.  $^{14}\text{C}$ -5'AMP, New England Nuclear, Boston, USA Tiermaterial: Ratten, männlich, 130 bis 160 g, vom Stamm Bor: WISW (SPF TNO), F. Winkelmann, Borcheln.

### 2.2. Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC):

(a) Polyethylenimin (PEI)-imprägnierte Celluloseplatten (Macherey und Nagel, Düren); (b) Celluloseplatten F 1440 LS 254 (Schleicher und Schüll, Dassel). Als Lösungsmittelsysteme (LS) dienten: LS I = 0,5 M  $\text{KNO}_3$  (pH 5,7); LS II = 0,8 M  $\text{KNO}_3$  (pH 5,5); LS III = Ethanol/1 M Ammoniumacetat (7 : 3, v/v) (pH 6,8); LS IV = 0,4 M TBK (pH 7,5, bei 4 °C).

**Abkürzungen:**  $\text{Gp}_3[^{14}\text{C}]\text{A}$ ,  $\text{P}^1, \text{P}^3$ -(5'-Guanosyl-5''-[ $^{14}\text{C}$ ]adenosyl triphosphat; 2'd $\text{Gp}_3[^{14}\text{C}]\text{A}$ ,  $\text{P}^1, \text{P}^3$ -(2'-Desoxy-5'-guanosyl-5''-[ $^{14}\text{C}$ ]adenosyl triphosphat; 2',3''dd $\text{Gp}_3[^{14}\text{C}]\text{A}$ ,  $\text{P}^1, \text{P}^3$ -(2',3'-Didesoxy-5'-guanosyl-5''-[ $^{14}\text{C}$ ]adenosyl triphosphat; 2'-O-m $\text{Gp}_3[^{14}\text{C}]\text{A}$ ,  $\text{P}^1, \text{P}^3$ -(2'-O-Methyl-5'-guanosyl-5''-[ $^{14}\text{C}$ ]adenosyl triphosphat; rro $\text{Gp}_3$ rro[ $^{14}\text{C}]\text{A}$ ,  $\text{P}^1, \text{P}^3$ -(5'-rro-Guanosyl-5''-rro[ $^{14}\text{C}$ ]adenosyl triphosphat; m' $\text{Gp}_3[^{14}\text{C}]\text{A}$ ,  $\text{P}^1, \text{P}^3$ -(7-Methyl-5'-guanosyl-5''-[ $^{14}\text{C}$ ]adenosyl triphosphat; rro, riboseringoffen.

Reprint requests to Dr. Siegmar Bornemann und Prof. Dr. Dr. Eckhard Schlimme.

0341-0382/82/0900-0818 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

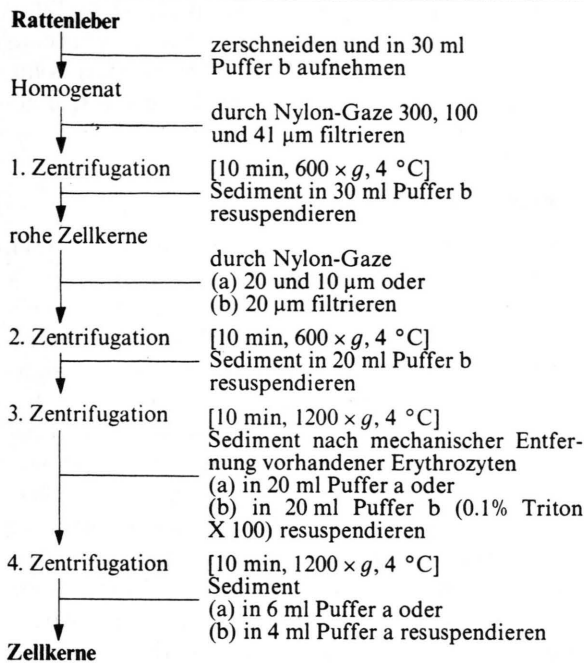


Abb. 1. Fließbild der Zellkernisolierung.

Radioaktivitätsmessungen erfolgten in einem Tri-carb-Scintillationsspektrometer, Modell 3385 (Packard Instrument Comp., Illinois, USA). Die Dünnschichtchromatogramme wurden mit einem TLC-Linear-Analyser LB 2821 (Berthold, Wildbad) ausgewertet. Die weitere Charakterisierung der Dinucleotide erfolgte wie beschrieben [18, 19].

Mitochondrien und die Fraktion roher Zellkerne wurden wie beschrieben isoliert [20]. Die Präparation der Rattenleber-Zellkerne erfolgte nach einer von Jungblut zur Isolierung von Nuclei aus Schweineuteri entwickelten Methode [21]. Das Isolierungsschema zeigt Abb. 1.

Die Aufreinigung der Zellkerne erfolgte in: (1) Puffer a: 0,01 M  $K_2HPO_4$ , 0,003 M  $MgCl_2$ , 0,005 M  $NaN_3$ ; (2) Puffer b: 0,01 M  $K_2HPO_4$ , 0,003 M  $MgCl_2$ , 0,005 M  $NaN_3$ , 0,44 M Sucrose; (3) Puffer b mit 0,1% Triton X 100. Zur Zentrifugation des Homogenates wurde eine Tischzentrifuge (Heraeus Christ, Osterode) benutzt. Für die Filtrationsschritte wurden Nylon-Monofilament-Gewebe (Babendererde, Hamburg) eingesetzt. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der BIURET-Methode.

Die DNA-Bestimmung erfolgte gemäß [22, 23]. Probenvorbereitung: 10, 30 und 50 µl der tiefgefrore-

nen Nuclei jeder Versuchsreihe wurden mit 500 µl 5 mM NaOH und 500 µl 1 M  $HClO_4$  versetzt und 15 min bei 70 °C hydrolysiert. Test: Die Proben wurden mit 2 ml Farbreagens versetzt, 13 Std. bei 35 °C im Dunkeln inkubiert, die Extinktion bei  $\lambda = 578$  nm ( $\lambda_{max} = 595$  nm) bestimmt und mit Hilfe einer Eichgeraden ausgewertet.

Die RNA-Bestimmung erfolgte entsprechend [23, 24]. Test: 100 und 500 µl der Nuclei jeder Versuchsreihe wurden mit Farbreagens zu 8 ml ergänzt und 40 min in kochendem Wasser inkubiert. Nach Abkühlung der Proben wurde ebenfalls die Extinktion bei  $\lambda = 691$  nm ( $\lambda_{max} = 675$  nm) bestimmt und mit Hilfe einer Eichgeraden ausgewertet.

Bei der Zellkernpräparation wurde von jeweils 5–6 g blutfrei gespülter Rattenleber ausgegangen und die isolierten Zellkerne in 6 ml Puffer a resuspendiert. Die Charakterisierung der Rattenleberzellkerne ergab folgendes Ergebnis (Durchschnittswerte aus 7 Präparationen): Protein 8,7 mg × ml<sup>-1</sup>; RNA 335 µg × ml<sup>-1</sup>, DNA 640 µg × ml<sup>-1</sup>; die Gewichtsverhältnisse ergaben für: Protein/RNA = 27 (±8,2); Protein/DNA = 13 (±4,2).

Enzymatische Abbauprobversuche mit Nuclei: Die enzymatischen Abbauprobversuche mit den <sup>14</sup>C-markierten Dinucleosidphosphaten wurden (a) unter hypotonischen Bedingungen in 0,001 bzw. 0,05 M Triethanolamin · HCl-Puffer (Tra-HCl), pH 7,2 und (b) unter isotonischen Bedingungen in 0,44 M Sucrose-Puffer bei 25 °C über eine maximale Inkubationszeit von 30 Minuten ausgeführt. Alle Abbauprobversuche wurden unter Bedingungen der Substratsättigung ausgeführt. Dieser Meßbereich wurde durch Abbauprobversuche von Dinucleotiden in Abhängigkeit der eingesetzten Nuclei ermittelt [25]. Inkubationsansatz: Gesamtvolumen 150 µl; die in die jeweiligen Abbauprobversuche eingesetzten Nuclei enthielten zwischen 0,14 bis 0,18 mg Protein; die Abbauprobversuche der verschiedenen Dinucleotide waren aber normierbar, da zu jeder Versuchsreihe ein Parallelversuch mit der Kappenmutterverbindung Gp<sub>3</sub>A durchgeführt wurde. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden Aliquots des Ansatzes entnommen und zunächst in 5 µl 15-prozentiger Perchlorsäure denaturiert, vom ausgefallenen Protein abzentrifugiert und mit 0,1 M NaOH alkalisiert (pH 11). Die dünnschichtchromatographische Auswertung erfolgte (1) auf Platte a in LS I bzw. LS II sowie (2) auf Platte b in LS III (siehe Abschnitt 2.2). Die Zuordnung der <sup>14</sup>C-markierten Spaltungs- und Abbauprobprodukte 5'ADP,

Tab. I. Spezifische Aktivität der eingesetzten [ $^{14}\text{C}$ ]Dinucleosidtriphosphate.

Eingesetzte $^{14}\text{C}$ -Dinucleosidtriphosphate	spezifische Aktivität [cpm $\times$ nmol $^{-1}$ ]	eingesetzte Menge [nmol]
Gp $_3$ A	1024	32
2'dGp $_3$ A	562	31
2',3'ddGp $_3$ A	837	30
2'-O-mGp $_3$ A	604	33
rroGp $_3$ rroA	567	24
m $^7$ Gp $_3$ A	909	6

5'AMP und Adenosin gelang mit authentischen radioaktiven Vergleichssubstanzen. Der Befund, daß kein [ $^{14}\text{C}$ ]Inosin mehr nachzuweisen war, zeigte, daß – im Vergleich zu der rohen Zellkernfraktion – die aufgereinigten Nuclei frei von Adenosindesaminase waren. In Abbaupersonen mit Zellkernen, die zusätzlich in Triton X 100 (0,1%)-haltigem Puffer b resuspendiert und zentrifugiert worden waren (Abb. 1), entstand neben 5'ADP und 5'AMP nur wenig Adenosin, so daß eine Phosphataseaktivität offenbar von noch nicht vollständig entfernten cytoplasmatischen Membranteilen herrührte.

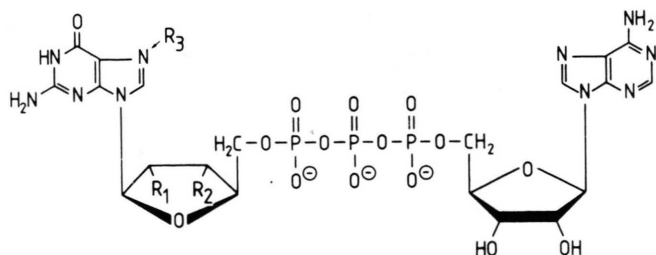
Sämtliche Ergebnisse sind Doppelbestimmungen aus 7 Versuchsreihen, sie wurden auf nmol  $\times$  mg Protein $^{-1}$  umgerechnet und in Form von Abbaukurven, bzw. deren Reziprokform (Linearisierung) dargestellt. Angaben über die eingesetzten Dinucleotide finden sich in Tabelle I.

Chemische Synthesen: Die Synthesen der  $^{14}\text{C}$ -markierten Kappenmutterverbindung Gp $_3$ [ $^{14}\text{C}$ ]A sowie der ribosomodifizierten Analoga 2'dGp $_3$ [ $^{14}\text{C}$ ]A und 2',3'ddGp $_3$ [ $^{14}\text{C}$ ]A erfolgte wie bereits beschrieben [19]. Auf gleiche Weise wurde das Analogon P $^1$ ,P $^3$ -(2'-O-Methyl-5'-guanosyl-5''-[ $^{14}\text{C}$ ]adenosyl) triphosphat (2'-O-mGp $_3$ [ $^{14}\text{C}$ ]A) und die Kappe P $^1$ ,P $^3$ -(7-Methyl-5'-guanosyl-5''-[ $^{14}\text{C}$ ] adenosyl)triphosphat (m $^7$ Gp $_3$ [ $^{14}\text{C}$ ]A; cap 0) synthetisiert. Die säulenchromatographische Aufreinigung von 2'-O-mGp $_3$ [ $^{14}\text{C}$ ]A erfolgte wie beschrieben [19], während das basenme-

thylierte Analogon m $^7$ Gp $_3$ [ $^{14}\text{C}$ ]A an DEAE-Cellulose, Acetat-Form, mit einem linearen Natriumacetat-Gradienten (0–0,4 M, pH 5,8) isoliert werden konnte. Die Charakterisierung der Produkte erfolgte gemäß [18, 19].

### 3. Ergebnisse und Diskussion

In die Abbaupersonen mit Rattenleberzellkernen wurden neben der Kappenmuttersubstanz Gp $_3$ [ $^{14}\text{C}$ ]A folgende ribosomodifizierte Kappenanaloga eingesetzt: 2'dGp $_3$ [ $^{14}\text{C}$ ]A, 2',3'ddGp $_3$ [ $^{14}\text{C}$ ]A, 2'-O-mGp $_3$ [ $^{14}\text{C}$ ]A sowie das riboseringoffene Analogon rroGp $_3$ rroA (Abb. 2). Die experimentellen Befunde sind in den Abbaukurven (Abb. 3 a–c) zusammengefaßt. Die Reziprokdarstellung der Abbaukurven (Abb. 4) erlaubt den enzymatischen Abbau der Kappenanaloga mit einer Geradengleichung zu beschreiben. Damit ist die Prüfung signifikanter Unterschiede im Abbauverhalten verschiedener kappenstrukturierter Dinucleotide erleichtert. Abb. 5 zeigt, daß sämtliche Meßwerte des Abbaus von 2'-O-mGp $_3$ A innerhalb des 95-prozentigen Vertrauensbereichs (gestrichelte Linien) der Regressionsgeraden von Gp $_3$ A liegen. Beide Verbindungen verhalten sich gegenüber Nucleasen des Zellkerns somit bioisoster; das trifft dagegen nicht für die Dinucleotide 2'dGp $_3$ A, 2',3'ddGp $_3$ A und rroGp $_3$ rroA zu. Das in der rohen Zellkernfraktion nachgewiesene nicht bioisostere nucleolytische Abbauverhalten von Gp $_3$ A und rroGp $_3$ rroA [11] konnte mit den in dieser Arbeit eingesetzten aufgereinigten Zellkernen somit voll bestätigt werden. In gleicher Weise wurden frühere Befunde [11] mit den kappenuntypischen Dinucleosiddiphosphaten Gp $_2$ A und Ap $_2$ A erhärtet, nach denen Dinucleosidphosphate mit 5',5''-ständiger intramolekularer Triphosphatbrücke ein bevorzugtes Substrat für Nucleasen des Zellkerns darstellen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß neben dieser Triphosphatbrücke ein intaktes Ribofuranosidsystem vorliegen muß, wobei die 2',3'-*cis*-Diolgruppe



Kappenanalogon	R $_1$	R $_2$	R $_3$
Gp $_3$ A	–OH	–OH	–
2'dGp $_3$ A	–H	–OH	–
2',3'ddGp $_3$ A	–H	–H	–
2'-O-mGp $_3$ A	–OCH $_3$	–OH	–
m $^7$ Gp $_3$ A	–OH	–OH	–CH $_3$

Abb. 2. Eingesetzte Kappenanaloga.

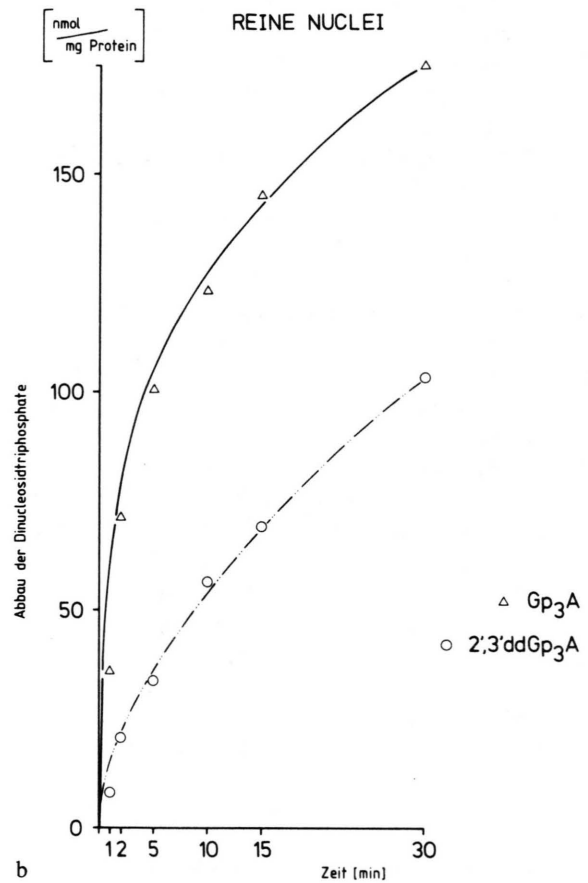
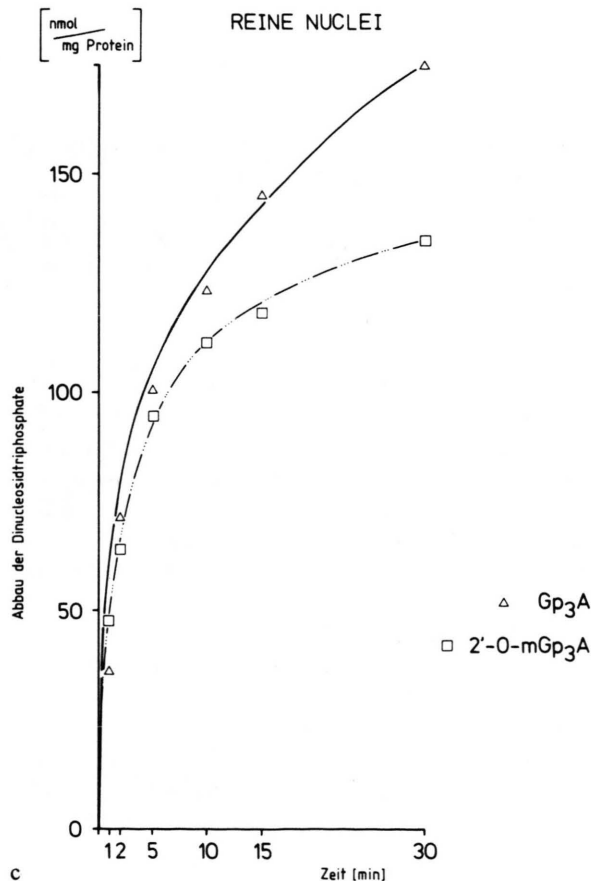
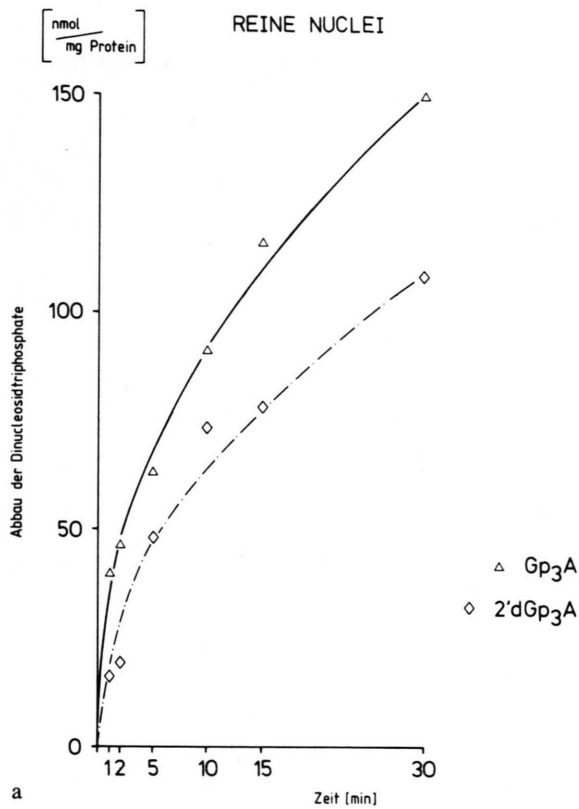


Abb. 3a. Abbaukurve von 2'dGp<sub>3</sub>A ( $\diamond$ ) im Vergleich zu Gp<sub>3</sub>A ( $\triangle$ ). b. Abbaukurve von 2',3'ddGp<sub>3</sub>A ( $\circ$ ) im Vergleich zu Gp<sub>3</sub>A ( $\triangle$ ). c. Abbaukurve von 2'-O-mGp<sub>3</sub>A ( $\square$ ) im Vergleich zu Gp<sub>3</sub>A ( $\triangle$ ).

zumindest in der 2'-Position ohne Einschränkung der Substratspezifität methyliert sein kann. Es ist bekannt, daß die spezifische Methylierung der Kappe – vor allem in N7-Position – die Effizienz der Translation von kappentragender mRNA erhöht [26–28]. So konnte auch nach Zugabe von m<sup>7</sup>GTP wie von 2'-O-mGTP eine Steigerung der viralen Proteinsynthese in Encephalomyocarditis-Virus infizierten Mäusezellen beobachtet werden [28]. Dagegen ist für die Schutzwirkung aufgrund von Abbaubefunden mit Reoviren-mRNA gegenüber zellulären Nucleasen aus Weizenkeimextrakten die Methylierung der Kappe nicht erforderlich [12]. In dieses Bild paßt sowohl das bioisotere Abbauverhalten von 2'-O-mGp<sub>3</sub>A und Gp<sub>3</sub>A als auch die Beobachtung, daß gegenüber Gp<sub>3</sub>A keine signifikant schnellere Spaltung der Cap o-Verbindung m<sup>7</sup>Gp<sub>3</sub>A nachweisbar



war. Dagegen zeigen die Experimente mit dem 2'-Desoxy- und insbesondere dem 2',3'-Didesoxyguanin-Derivat des Gp<sub>3</sub>A, daß zumindest die *cis*-Diolgruppe im Guanosinteil die Substratspezifität gegenüber kappenspaltenden Nucleasen signifikant erhöht (Abb. 4).

Aus vergleichenden Untersuchungen mit dem Homogenat, der rohen Zellkernfraktion und den Zellkernen kann eine Lokalisierung der kappenspaltenden Nucleasen im Zellkern abgeleitet werden (Abb. 5). Die Zellkerne enthielten keine auf der Aufreinigungsstufe der rohen Zellkernfraktion noch vorhandene Adenosindesaminase-Aktivität. Ferner konnte gezeigt werden, daß nach 30 minütiger Inkubation der Zellkerne unter isotonischen Bedingungen nur 7%, unter hypotonischen dagegen 18% der nucleolytischen Aktivität im Medium nachweisbar war, d. h. unter isotonischen *in vitro*-Bedingungen erfolgt der Abbau der Dinucleosidtriphosphate im Zellkern. Bestätigt wurden diese Befunde durch Abbaupexperimente mit zerstörten Zellkernen, die durch wiederholtes Tieffrieren (–20 °C) und Auftauen zu erhalten waren. In diesen Untersuchungen trat ein 50-prozentiger Gp<sub>3</sub>A-Abbau mit Zellkernen im isotonischen Medium nach 30 min, im hypotonischen nach 15 min und mit zerstörten Zellkernen bereits nach 7 min ein.

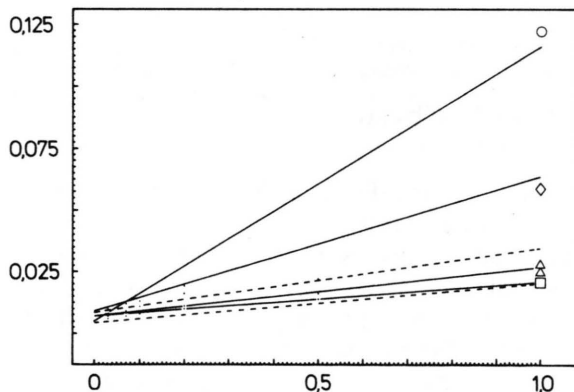


Abb. 4. Linearisierung. Ordinate: Reziproke Auftragung des Abbaus der Dinucleosidphosphate in [mg Protein  $\times$  nmol<sup>-1</sup>]. Abszisse: Reziproke Zeit [min<sup>-1</sup>]. Folgende Geradengleichungen wurden erhalten: (Die Grenzen des 95%igen Vertrauensbereiches sind durch die gestrichelten Geraden gekennzeichnet). (1) für Gp<sub>3</sub>A ( $\Delta$ ):  $y = 0.020 (\pm 0.005) x + 0.007 (\pm 0.002)$  mit  $r = 0.930$  bei  $n = 12$ ; (2) für 2'dGp<sub>3</sub>A ( $\diamond$ ):  $y = 0.055 x + 0.009$  mit  $r = 0.963$  bei  $n = 6$ ; (3) für 2',3'ddGp<sub>3</sub>A ( $\circ$ ):  $y = 0.112 x + 0.005$  mit  $r = 0.989$  bei  $n = 6$ ; (4) für 2'-O-mGp<sub>3</sub>A ( $\square$ ):  $y = 0.014 x + 0.007$  mit  $r = 0.986$  bei  $n = 6$ .

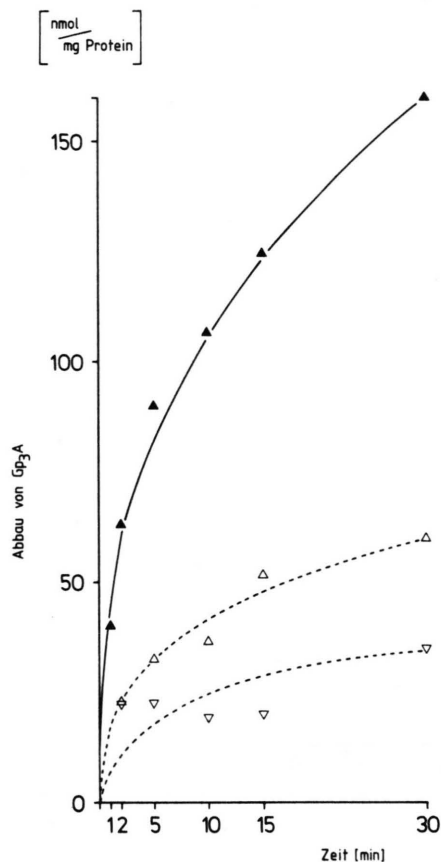


Abb. 5. Anreicherung der nucleolytischen Aktivität in Nuclei. Abbau von Gp<sub>3</sub>A im Homogenat ( $\nabla$ --- $\nabla$ ), in der rohen Zellkernfraktion ( $\Delta$ --- $\Delta$ ) und in aufgereinigten Zellkernen ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ); keine signifikanten Unterschiede im Abbauverhalten mit und ohne Triton X 100-Zentrifugation. In allen Abbaupexperimenten wurden eingesetzt: 32 nmol Gp<sub>3</sub>A [<sup>14</sup>C]A.

Bisher in der Literatur beschriebene kappenabbauende Enzymaktivitäten aus Tabak [29], Kartoffel [30], HeLa-Tumorzelle [31] und Hefe [17] sprechen aufgrund der entstehenden Spaltungsprodukte von m<sup>7</sup>GMP [29–31] beziehungsweise m<sup>7</sup>GDP [17] für den Spaltungsmechanismus einer Dinucleosid-triphosphatase bzw. (bei Gp<sub>2</sub>A) Dinucleosid-diphosphatase (EC 3.6.1.x). Eine aus Tabak isolierte „Phosphodiesterase“ [29] wird zum Beispiel zur Abspaltung von m<sup>7</sup>GMP aus kappentragender mRNA eingesetzt [29, 32].

Außer der Phosphodiesterase aus Tabak spalten ebenfalls Nucleasen aus HeLa-Zellen sowohl reine Kappenstrukturen vom Typ m<sup>7</sup>Gp<sub>3</sub>N als auch kappentragende mRNA, dagegen sind die Enzyme aus

Kartoffel und Hefe offenbar nur gegenüber gekappter mRNA aktiv. Abbauprodukte von kappentragender und von mRNA mit 5'-terminaler Phosphatgruppe mit verschiedenen Zellextrakten haben gezeigt, daß die Fähigkeit zum Abbau gekappter mRNA offenbar mit dem Differenzierungsgrad der jeweiligen Zellen zusammenhängt [32].

Danach enthalten wenig differenzierte Zellen wie Erythroblasten oder Weizenkeimzellen im Gegensatz zu hochdifferenzierten Leber- und Muskelzellen keine Nucleasen zur Spaltung kappengeschützter mRNA. Diese Befunde unterstützen die vorliegenden Ergebnisse, nach denen kappenspezifische Nucleasen in Rattenleberzellkernen nachgewiesen werden konnten.

Bei den Abbauprodukten der vorliegenden Arbeit traten 5'Mono- und Diphosphate folgender Nucleoside als Abbauprodukte auf: Guo, 2'dGuo, 2',3'ddGuo, 2'-O-mGuo, rroGuo, m'Guo sowie Ado und rroAdo. Es waren auch nach sehr kurzen Inkubationszeiten (30 sec) keine Triphosphate als Spaltungsprodukte nachweisbar. Beim Abbau von Gp<sub>2</sub>A und Ap<sub>2</sub>A wurden nur 5'Monophosphate als Spalt-

produkte gefunden. Diese Befunde sprechen ebenfalls für einen Abbau der 5',5''-phosphatverknüpften Dinucleotide durch eine Dinucleosid-triphosphatase bzw. -diphosphatase. Da die Bildung der Kappen unter Freisetzung von anorganischem Phosphat bzw. Pyrophosphat stattfindet [33–35], ist eine Umkehrung der Bildungsreaktion, d.h. ein Phosphorylase- oder Pyrophosphorylase-Mechanismus, beim Abbau der Kappen grundsätzlich nicht auszuschließen. Gegen eine Pyrophosphorylase spricht allerdings der schon genannte Befund, daß auch nach sehr kurzen Inkubationszeiten keine Nucleosidtriphosphate als Spaltprodukte nachzuweisen waren.

### Dank

Wir danken Professor Jungblut, MPI für Experimentelle Endokrinologie, Hannover, für viele Ratschläge zur Präparation von Zellkernen, Dr. Boos für wertvolle Diskussionen und dem Land Nordrhein-Westfalen sowie dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

- [1] F. Rottman, A. J. Shatkin und R. P. Perry, *Cell* **3**, 197 (1974).
- [2] J. M. Adams und S. Cory, *Nature* **255**, 28 (1975).
- [3] A. J. Shatkin, *Cell* **9**, 645 (1976).
- [4] A. J. Shatkin, Y. Furuichi, M. Kozak und N. Sonnenberg, in "Gene Function" (eds. S. Rosenthal *et al.*) S. 297, Verlag Pergamon Press, New York, 1979.
- [5] a) S. A. Martin, E. Paoletti und B. Moss, *J. Biol. Chem.* **250**, 9322 (1975).  
b) S. A. Martin und B. Moss, *J. Biol. Chem.* **250**, 9330 (1975).
- [6] a) Y. Furuichi, S. Muthukrishnan, J. Tomasz und A. J. Shatkin, *Prog. Nucl. Acid Res. Molec. Biol.* **19**, 3 (1976).  
b) *J. Biol. Chem.* **251**, 5043 (1976).
- [7] G. C. Lavers, *Molec. Biol. Reports* **3**, 275 (1977).
- [8] a) M. J. Ensinger und B. Moss, *J. Biol. Chem.* **251**, 5283 (1976).  
b) C.-M. Wei und B. Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3758 (1977).
- [9] K. Mizumoto und F. Lipmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4961 (1979).
- [10] A. K. Banerjee, *Microbiol. Rev.* **44**, 175 (1980).
- [11] S. Bornemann und E. Schlimme, *Z. Naturforsch.* **35 c**, 57 (1980).
- [12] Y. Furuichi, A. La Fiandra und A. J. Shatkin, *Nature* **266**, 235 (1977).
- [13] K. Shimotohno, Y. Kodama, J. Hashimoto und K. Miura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2734 (1977).
- [14] D. L. Nuss und Y. Furuichi, *J. Biol. Chem.* **282**, 2815 (1977).
- [15] A. Wodnar-Filipowicz, E. Szczesna, M. Zan-Kowalczewska, S. Muthukrishnan, U. Szybiak, A. B. Le-gocki und W. Filipowicz, *Eur. J. Biochem.* **92**, 69 (1978).
- [16] G. C. Lavers, *Molec. Biol. Reports* **3**, 413 (1977).
- [17] A. Stevens,  
a) *J. Biol. Chem.* **255**, 3080 (1980).  
b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 1150 (1980).
- [18] E. Hagemeier, S. Bornemann, K. S. Boos und E. Schlimme, *J. Chromatogr.*, **237**, 174 (1982).
- [19] S. Bornemann und E. Schlimme, *Z. Naturforsch.* **36 c**, 135 (1981).
- [20] B. Hagihara, *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 134 (1950).
- [21] P. W. Jungblut, E. Kallweit, W. Sierralta, A. J. Truitt und R. K. Wagner, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 1259 (1978).
- [22] K. Burton, *Biochem. J.* **62**, 315 (1956).
- [23] E. Weiss, Dissertation, Universität Tübingen (1979).
- [24] G. Ceriotti, *J. Biol. Chem.* **214**, 59 (1955).
- [25] S. Bornemann, Dissertation, Universität (GH) Paderborn (1981).
- [26] G. W. Both, Y. Furuichi, S. Muthukrishnan und A. J. Shatkin, *Cell* **6**, 185 (1975).
- [27] W. Filipowicz, *FEBS Lett.* **96**, 1 (1978).
- [28] B. L. Adams, M. Morgan, S. Muthukrishnan, S. M. Hecht und A. J. Shatkin, *J. Biol. Chem.* **253**, 2589 (1978).
- [29] H. Shinshi, M. Miwa, T. Sugimura, K. Shimotohno und K. Miura, *FEBS Lett.* **65**, 254 (1976).
- [30] R. Kole, H. Sierakowska und D. Shugar, *Biochim. Biophys. Acta* **438**, 540 (1976).
- [31] D. L. Nuss, Y. Furuichi, G. Koch und A. J. Shatkin, *Cell* **6**, 21 (1975).
- [32] K. Yamaguchi, Y. Miura und K. Miura, *FEBS-Lett.* **139**, 197 (1982).
- [33] U. Schibler und R. P. Perry, *Cell* **9**, 121 (1976).
- [34] K. Shimotohno und K. Miura, *FEBS Lett.* **64**, 204 (1976).
- [35] G. Monroy, E. Spencer und J. Hurwitz, *J. Biol. Chem.* **253**, 4490 (1978).