

Zum Wirkungsmechanismus von 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin bei der Mutationsauslösung

## I. Wirkung von 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin auf die Matrizenaktivität der Polynucleotide bei der zellfreien Proteinsynthese \* \* \*

P. CHANDRA und A. WACKER

Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt (Main),

R. SÜSSMUTH und F. LINGENS

Chemisches Institut der Universität Tübingen, Biochemische Abteilung

(Z. Naturforschg. **22 b**, 512—517 [1967]; eingegangen am 24. November 1966)

The effect of NNMG on the template activities of different polynucleotides (polyuridylic acid, polycytidylic acid, polyadenylic acid and copolymer of adenylic and guanylic acid 5,5:1) and t-RNS was studied. The maximum inhibition of the messenger activity was found for poly-C, followed by poly-A and poly-U. The acceptor activity of t-RNA was found to be inhibited by NNMG: maximum for proline, followed by serine, leucine, phenylalanine and lysine. The mechanism of these inhibitions was studied using NNMG radioactively labelled on the methyl group. Different amounts of radioactivity were found in the various polynucleotides and t-RNS.

1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin wirkt mutagen<sup>1-5</sup>, cancerogen<sup>6,7</sup> und cytostatisch<sup>8-10</sup>. Für die Mutationsauslösung ist bei *Escherichia coli* ein Wirkungsoptimum bei  $p_H$  5,5 – 6,0<sup>11,12</sup> festgestellt worden. Chemische Untersuchungen ergaben, daß NNMG im alkalischen Bereich Diazomethan<sup>13</sup> und unter sauren Bedingungen salpetrige Säure bildet<sup>14,24</sup>. Es bleibt dabei schwierig, das Mutationsoptimum bei  $p_H$  5,5 – 6,0 zu deuten, wenn man annimmt, daß diese beiden Verbindungen für die Auslösung der Mutation verantwortlich sind.

NIRENBERG und MATTHAEI<sup>15</sup> stellten fest, daß synthetische Polynucleotide als Messenger-RNS bei der zellfreien Proteinsynthese dienen können. Ein solches System schien uns als Modell ge-

eignet zu sein, um die mutagene Wirkung von NNMG näher zu studieren. Da bestimmte Nucleotid-Triplets bestimmte Aminosäuren codieren, war damit zu rechnen, daß sich eine Veränderung der Nucleobasen in einer Änderung der Aminosäuren-Zusammensetzung des Proteins auswirken würde.

In der vorliegenden Arbeit wird die Einwirkung von NNMG auf die Matrizenaktivität von Poly-U, Poly-C, Poly-A und Poly-AG beschrieben. Nach dem bekannten Schema der Proteinbiosynthese<sup>15</sup> ist die Bildung von Aminoacyl-transfer-RNS von der Spezifität der t-RNS abhängig. Demnach ist es auch von Interesse, die Einwirkung von NNMG auf die Akzeptoraktivität der t-RNS zu untersuchen.

\* Verwendete Abkürzungen: Adenin: A, Adenosintriphosphat: ATP, 1,4-Bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzol: POPOP, 2,5-Diphenyloxazol: PPO, Cytosin: C, Guanin: G, Guanosintriphosphat: GTP, Messenger-Ribonucleinsäure: m-RNS, Mischpolymerisat von Adenyl- und Guanylsäure: Poly-AG, Mischpolymerisat von Uridyl- und Guanylsäure: Poly-UG, 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin: NNMG, Phosphoenolpyruvat: PEP, Polyadenylsäure: Poly-A, Polycytidylsäure: Poly-C, Polyuridylsäure: Poly-U, Transfer-Ribonucleinsäure: t-RNS, Uracil: U.

\*\* Die Ergebnisse wurden von einem von uns (R. S.) am 13. Oktober 1966 auf der Tagung der Gesellschaft für physiologische Chemie in Marburg vorgetragen.

<sup>1</sup> J. D. MANDELL u. J. GREENBERG, Biochem. biophysic. Res. Commun. **3**, 575 [1960].

<sup>2</sup> J. D. MANDELL, P. L. WOODY u. J. GREENBERG, J. Bacteriol. **81**, 419 [1961].

<sup>3</sup> A. J. MÜLLER u. T. GICHNER, Nature [London] **201**, 1149 [1964].

<sup>4</sup> R. SCHWAIER, Z. Vererbgslehre **97**, 55 [1965].

<sup>5</sup> F. LINGENS u. O. OLTMANN, Z. Naturforschg. **21 b**, 660 [1966].

<sup>6</sup> H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN u. S. IVANKOVIC, B. T. So, CH. SCHMIDT u. J. BÜCHELER, Z. Krebsforsch. **68**, 87 [1966].

<sup>7</sup> T. SUGIMURA, M. NAGAO u. Y. OKADA, Nature [London] **210**, 962 [1966].

<sup>8</sup> A. GOLDIN, J. M. VENDITTI u. I. KLINE, Cancer Res. **19**, 429 [1959].

<sup>9</sup> O. M. GREEN u. J. GREENBERG, Cancer Res. **20**, 1166 [1960].

<sup>10</sup> W. A. SKINNER, H. F. GRAM, O. M. GREEN, J. GREENBERG u. B. BAKER, J. med. pharmac. Chem. **2**, 299 [1960].

<sup>11</sup> J. D. MANDELL u. J. GREENBERG, Biochem. biophysic. Res. Commun. **3**, 575 [1960].

<sup>12</sup> E. A. ADELBERG, M. MANDEL u. G. CHEIN CHING CHEN, Biochem. biophysic. Res. Commun. **18**, 788 [1965].

<sup>13</sup> A. F. MCKAY, J. Amer. chem. Soc. **70**, 1974 [1948].

<sup>14</sup> F. K. ZIMMERMANN, R. SCHWAIER u. U. v. LAEHR, Z. Vererbgslehre **97**, 68 [1965].

<sup>15</sup> M. W. NIRENBERG u. J. MATTHAEI, Proc. nat. Acad. Sci. USA **47**, 1588 [1961].

## Material und Methoden

**Chemikalien:** ATP, Phosphoenolpyruvat (PEP) und PEP-Kinase bezogen wir von der Fa. C. F. Boehringer und Söhne GmbH, Mannheim, GTP von der Fa. Calbiochem, Luzern, Poly-U, Poly-C, Poly-A von der Fa. Miles Chemical Co., Indiana, USA, Phenylalanin-(1-<sup>14</sup>C) 4,2  $\mu\text{c}/\mu\text{Mol}$ , Lysin-(1-<sup>14</sup>C) 8,1  $\mu\text{c}/\mu\text{Mol}$ , Prolin-(U-<sup>14</sup>C) 5  $\mu\text{c}/\mu\text{Mol}$ , Glutaminsäure-(U-<sup>14</sup>C) 5  $\mu\text{c}/\mu\text{Mol}$ , Arginin-(U-<sup>14</sup>C) 5  $\mu\text{c}/\mu\text{Mol}$ , Leucin-(U-<sup>14</sup>C) 6  $\mu\text{c}/\mu\text{Mol}$ , Serin-(U-<sup>14</sup>C) 5,6  $\mu\text{c}/\mu\text{Mol}$  von Radiochemical Centre, Amersham, England, Methylamin-<sup>3</sup>H-Hydrochlorid in Methanol, 30 mc/mMol von der New England Nuclear Corp., Boston.

**Herstellung der Ribosomen- und S-100-Fractionen:** Die Bakterien wurden wie früher beschrieben<sup>16</sup> kultiviert, während der log-Phase abzentrifugiert und zweimal mit 0,01-m-Trispuffer ( $p_{\text{H}}$  7,8), der zusätzlich 0,01 mMol Magnesiumacetat und 0,06 mMol Kaliumchlorid pro ml enthielt, gewaschen. Sie wurden dann nochmals mit der gleichen Pufferlösung gewaschen, die jetzt außerdem 0,006 mMol/ml Mercaptoäthanol enthielt. Danach suspendierte man die Bakterien im 2,5-fachen Volumen des zuletzt benutzten Puffers und fügte die 1,5-fache Gewichtsmenge Glasperlen hinzu, bezogen auf die Bakterienmasse. Diese Suspension wurde 2 Min. im Zellhomogenisator (Modell MSK, B. Braun, Melsungen) bei 0 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zelltrümmer und Glasperlen 20 Min. bei 30 000 g und 2 °C abzentrifugiert, die überstehende Lösung dekantiert, mit 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNase versetzt und nochmals 20 Min. bei 30 000 g zentrifugiert. Die erhaltene sogenannte S-30-Fraktion wurde für die Herstellung der Ribosomen verwendet. Dazu wurde die S-30-Fraktion bei 100 000 g 2 Stdn. zentrifugiert. Zwei Drittel des Überstandes wurden abpipettiert: S-100-Fraktion. Der Rückstand wurde in Extraktionslösung (vgl. l. c.<sup>15</sup>) suspendiert und nochmals bei 100 000 g für 2 Stdn. zentrifugiert. Das so erhaltene Sediment wurde in Extraktionslösung resuspendiert aufbewahrt.

**Aminosäureneinbau:** In Anlehnung an das Einbausystem von NIRENBERG und MATTHAEI enthielt

das Reaktionsgemisch in  $\mu\text{Mol}/\text{ml}$ : Tris 100, Magnesiumacetat 10, Kaliumchlorid 50, Mercaptoäthanol 6, PEP 5, ATP 5, Aminosäuren 0,02, Fraktion S-100 0,05 ml, Ribosomenfraktion 0,05 ml (ca. 500  $\gamma$  Protein), PEP-kinase 20  $\gamma$ , Poly-U 80  $\gamma/\text{ml}$  oder Poly-C 350  $\gamma/\text{ml}$  oder Poly-A 120  $\gamma/\text{ml}$ , t-RNS 200–500  $\gamma/\text{ml}$ : Gesamtvolumen 0,25 ml. Das Reaktionsgemisch wurde 20 Min. bei 37 °C inkubiert, 0,1 ml auf ein Filterblättchen aufgetragen und nach MANS und NOVELLI<sup>17</sup> weiter bearbeitet.

**Bestimmung der Akzeptoraktivität:** Transfer-RNS gewannen wir durch Phenolextraktion der S-100-Fraktion und Reinigung des Extraktes nach der Methode von ZUBAY<sup>18</sup>. Poly-AG (5,5 : 1) wurde mit Hilfe von Polynucleotidphosphorylase aus *Micrococcus lysodeikticus* polymerisiert<sup>19</sup>. Die Akzeptoraktivität der t-RNS wurde nach einer Methode von v. EHRENSTEIN und DAIS<sup>20</sup> untersucht. Die Versuche führten wir so durch, daß die t-RNS erst mit NNMG behandelt, dann dialysiert und unter denselben Bedingungen wie bei der m-RNS die Akzeptoraktivität gemessen wurde.

**Behandlung der Nucleinsäuren mit NNMG:** Die Behandlung der Polynucleotide und der t-RNS mit NNMG erfolgte in *m*/15-Phosphatpuffer ( $p_{\text{H}}$  5,5). Die Endkonzentration von NNMG betrug  $10^{-3}$  Mol/Liter. Die Proben wurden ebenso wie Vergleichsproben ohne NNMG 18 Stdn. bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und danach 3–4 Stdn. gegen dest. Wasser dialysiert. Die Nucleinsäuren sind dann mit Alkohol ausgefällt und lyophilisiert worden.

**Herstellung von radioaktiv Methyl-<sup>3</sup>H-markiertem NNMG\*:** In Anlehnung an MCKAY<sup>21</sup> ließ man zu methanolischer Methylamin-<sup>3</sup>H-Hydrochlorid-Lösung (Aktivität 30 mc/mMol) 2,5 g (0,017 Mol) NNMG, in Methanol gelöst, unter Eiskühlung zutropfen. Zur Reaktionslösung wurden 0,4 g (0,013 Mol) Methylamin als 40-proz. methanolische Lösung tropfenweise zugegeben. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurden die Kristalle von 3-Nitro-1-Methylguanidin abfiltriert, in 1,8 ml konzentrierter Salpetersäure (*d* 1,42) gelöst, 8 ml Wasser zugegeben und die Lösung im Eisbad gekühlt. Dann wurde eine Lösung von 0,8 g Natriumnitrit in 1,25 ml Wasser

<sup>16</sup> A. WACKER, M. EBERT u. H. KOLM, Z. Naturforschg. **13b**, 141 [1958].

<sup>17</sup> R. J. MANS u. G. D. NOVELLI, Biochem. biophysic. Res. Commun. **3**, 540 [1960].

<sup>18</sup> G. ZUBAY, J. molecular Biol. **4**, 347 [1962].

<sup>19</sup> R. S. STEINER u. R. F. BEERS, Polynucleotides, Elsevier, Amsterdam 1961.

<sup>20</sup> G. VON EHRENSTEIN u. D. DAIS, Proc. nat. Acad. Sci. USA **50**, 81 [1963].

\* Synthese ausgeführt von R. SÜSSMUTH u. J. RAU.

<sup>21</sup> A. F. MCKAY, J. Amer. chem. Soc. **71**, 1968 [1949].

während 5 Min. zugegeben, nach 20 Min. Rühren wurden die Kristalle von 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin abfiltriert und aus Methanol umkristallisiert. Spezifische Aktivität 180  $\mu\text{C}/\text{mMol}$ .

Behandlung der mit radioaktivem NNMG umgesetzten Nucleinsäuren: Auf 1 mg/ml Nucleinsäure (Poly-U, Poly-C, Poly-A und t-RNS) ließ man  $10^{-3}$  Mol/l radioaktives NNMG in *m*/15-Citratpuffer ( $p_{\text{H}}$  6) bei 37 °C 18 Std. lang einwirken. Die behandelten Nucleinsäuren wurden an Sephadex G 100 bzw. G 25 in Trispuffer ( $p_{\text{H}}$  7,2) getrennt.

*Messung der Radioaktivität:* Bei der zellfreien Proteinsynthese wurde die Radioaktivität in Toluol-Szintillator (4 g PPO u. 100 mg POPOP auf 1000 ml Toluol), bei den übrigen Versuchen in Dioxan-Szintillator (4 g PPO, 75 mg POPOP und 120 g Naphthalin auf 1000 ml Dioxan) im Packard-Tricarb-Liquid-Scintillation-Spektrometer, Modell 3003, gemessen.

### Ergebnisse und Diskussion

Der Einbau markierter Aminosäuren mit Hilfe des Proteinsynthese-Systems ist in Gegenwart verschiedener Konzentrationen normaler bzw. mit NNMG behandelter Polynucleotide in Abb. 1 dargestellt.

Wie aus dem Verlauf der Kurve hervorgeht, findet die stärkste Hemmung des Einbaus bei Prolin (Poly-C) 70% statt, eine geringere bei Lysin (Poly-A) 36%, gefolgt von Phenylalanin (Poly-U) 25 Prozent.

Um festzustellen, ob sich durch eine eventuell erfolgte Desaminierung oder Alkylierung die Codeigenschaften verändert haben, haben wir die Matrizenaktivität der NNMG-behandelten Polynucleotide auf die Einbauraten verschiedener Aminosäuren hin untersucht.

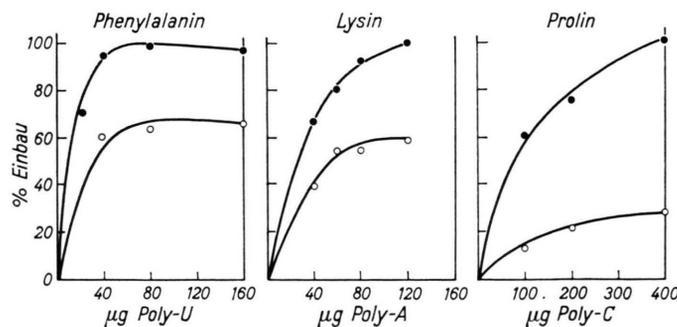


Abb. 1. Einwirkung von NNMG auf die Messenger-Aktivität verschiedener Polynucleotide beim Einbau einer Aminosäure in ein Homopolypeptid.

Die Einwirkung von NNMG auf die Matrizenaktivität der Polyuridylnsäure beim Einbau verschiedener Aminosäuren ist aus der Tab. 1 ersichtlich.

Aminosäure	Code-wort	Einbau der Aminosäuren in IpM/mg ribosomales Protein		
		ohne Poly-U	mit Poly-U (Kontrolle)	mit Poly-U (+ NNMG)
Phenylalanin	UU <sup>U</sup> <sub>C</sub>	99	4067	3400
Leucin	CU <sup>U</sup> <sub>C</sub> AG	185	352	464
Serin	UU <sup>A</sup> <sub>G</sub> UC <sup>C</sup> <sub>A</sub> AG <sup>U</sup> <sub>C</sub>	35	25	17
Lysin	AA <sup>A</sup> <sub>G</sub>	162	139	128

Tab. 1. Die Einwirkung von NNMG auf die Matrizenpezifität der Polyuridylnsäure.

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, hat die Behandlung der Polyuridylnsäure mit NNMG keinen Einfluß auf den Einbau von Lysin und Serin. Dagegen wird Leucin in mit NNMG behandelte Polyuridylnsäure vermehrt eingebaut. Es ist bekannt, daß alkylierte Polyuridylnsäure eine Erhöhung des Leucineinbaus verursacht<sup>22</sup>.

Findet bei der Einwirkung von NNMG auf Polynucleotide eine Desaminierung statt, so ist bei der Polyadenylnsäure und der Polycytidylnsäure eine Veränderung des Codes zu erwarten.

Wie die Tab. 2 zeigt, bleibt die Matrizenpezifität von Polycytidylnsäure nach Behandlung mit NNMG

<sup>22</sup> C. W. ABELL, L. A. ROSINE u. M. R. RAMSEUR, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 608 [1965].

Aminosäure	Codewort	Einbau der Aminosäure in IpM/mg ribosomales Protein	
		Poly-C (Kontrolle)	Poly-C (+ NNMG)
Prolin	U CC <sub>A</sub> <sup>C</sup> G	1320	420
Serin	U UC <sub>A</sub> <sup>C</sup> G	130	132
	AG <sub>C</sub> <sup>U</sup>		
Leucin	U CU <sub>A</sub> <sup>C</sup> G	55	60
Phenylalanin	UU <sub>C</sub> <sup>U</sup>	40	41

Tab. 2. Der Aminosäureeinbau bei Einwirkung von NNMG auf die Matrizenaktivität der Polycytidylsäure.

unverändert. Die Versuche deuten darauf hin, daß der Basenbaustein Cytosin unter den gewählten Bedingungen nicht desaminiert wird. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der chemischen Einwirkung von NNMG auf Cytosin und Cytidin gefunden<sup>23</sup>.

Untersucht man die Matrizenaktivität der Polyadenylsäure nach Behandlung mit NNMG, so findet man (Tab. 3), daß eine kleine Menge Glutaminsäure eingebaut wird. Da das Codewort für Glutaminsäure GA<sub>G</sub><sup>A</sup> lautet, ist eine Desaminierung des

Aminosäure	Codewort	Einbau der Aminosäuren in IpM/mg ribosomales Protein		
		ohne Poly-A	mit Poly-A (Kontrolle)	mit Poly-A (+ NNMG)
Lysin	AA <sub>G</sub> <sup>A</sup>	376	3014	1011
Glutaminsäure	GA <sub>G</sub> <sup>A</sup>	1157	981	1644
Arginin	AG <sub>G</sub> <sup>A</sup>	1575	1054	715
	U CG <sub>A</sub> <sup>C</sup> G			

Tab. 3. Die Änderung des Aminosäureeinbaus bei der Einwirkung von NNMG auf die Polyadenylsäure.

<sup>23</sup> F. LINGENS u. J. RAU, unveröffentlicht.

<sup>24</sup> F. LINGENS u. J. RAU, unveröffentlicht.

Adenins zu vermuten, wie bereits gefunden wurde<sup>24</sup>. Es ist aber nicht verständlich, weshalb Arginin mit dem Code AG<sub>G</sub><sup>A</sup> bzw. CGX (X = U, C, A, G) nicht eingebaut wird. Vielleicht hängt dieser Effekt vom Grad der Desaminierung ab.

Die Empfindlichkeit der G-haltigen Polynucleotide gegenüber NNMG haben wir mit einem Mischpolymerisat aus Adenylsäure und Guanylsäure (5,5 : 1) untersucht.

Aminosäure	Codewort	Einbau der Aminosäure in IpM/mg ribosomales Protein		
		ohne Poly-AG	mit Poly-AG (Kontrolle)	mit Poly-AG (+ NNMG)
Lysin	AA <sub>G</sub> <sup>A</sup>	75	1296	860
Glutaminsäure	GA <sub>G</sub> <sup>A</sup>	216	581	291
Arginin	AG <sub>G</sub> <sup>A</sup>	240	612	221
	U CG <sub>A</sub> <sup>C</sup> G			

Tab. 4. Der Einbau der Aminosäuren bei Einwirkung von NNMG auf Poly-AG (5,5 : 1).

Die Versuche in Tab. 4 zeigen für die Aminosäuren in der Folge Lysin, Glutaminsäure und Arginin eine sinkende Einbautendenz entsprechend dem zunehmenden Anteil an Guanosin im Codewort der Aminosäuren.

Um die Beeinflussung der Akzeptoraktivität der Transfer-RNS durch NNMG zu prüfen, haben wir Untersuchungen mit den Aminosäuren Phenylalanin, Leucin, Serin, Prolin und Lysin durchgeführt. Der Tab. 5 läßt sich entnehmen, daß die stärkste Inaktivierung bei C-haltigen Polynucleotid-Codewörtern auftritt. Mehrere Hinweise lassen auf einen Anticodon in der Transfer-RNS zu dem Messenger-RNS-Code schließen. Für C im Codewort ist G im Anticodon anzunehmen. Untersuchungen<sup>25</sup> haben zu der Vermutung geführt, daß auch das Anticodon an der Akzeptorfunktion beteiligt ist. Wie die Einbauversuche von Aminosäuren nach Einwirkung von NNMG auf Poly-A (Tab. 4) gezeigt haben, sind G-haltige Polynucleotide gegenüber NNMG sehr empfindlich, so daß die Hemmungen, wie sie die

<sup>25</sup> P. CHANDRA u. A. WACKER, Biophysik 3, 224 [1966].

Einbauversuche der Aminosäuren in die Transfer-RNS ergeben, erwartet werden konnten.

Die bisher beschriebenen Versuche zeigen, daß die Polynucleotide, die als m-RNS bei der Proteinsynthese dienen und die t-RNS, nach Behandlung mit NNMG eine unterschiedliche Einbauhemmung für

Aminosäure	Code-wort	Einbau der Aminosäure in die t-RNS in IpM/mg		% Hemmung
		t-RNS (Kontrolle)	t-RNS (+NNMG)	
Phenylalanin	UU <sup>U</sup> <sub>C</sub>	765	285	63
Leucin	UU <sup>A</sup> <sub>G</sub>	1260	370	70
	CU <sup>C</sup> <sub>A</sub> AG			
Serin	UC <sup>C</sup> <sub>A</sub> AG	850	160	81
	AG <sup>U</sup> <sub>C</sub>			
Prolin	CC <sup>C</sup> <sub>A</sub> AG	2050	310	85
Lysin	AA <sup>A</sup> <sub>G</sub>	2500	1000	60

Tab. 5. Die Einwirkung von NNMG auf die Akzeptoraktivität der Transfer-RNS.

verschiedene Aminosäuren aufweisen. Ob zur Deutung dieser Effekte u. a. eine Methylierung in Betracht zu ziehen ist, läßt sich nach den bisherigen Versuchen nicht entscheiden. Daher haben wir die Nucleinsäuren mit Methyl-<sup>3</sup>H-markiertem NNMG unter ähnlichen Bedingungen wie bei den Untersuchungen mit Hilfe des Proteinsynthese-Systems behandelt, säulenchromatographisch getrennt und die Radioaktivität gemessen. Dieses Verfahren ermöglichte eine saubere Trennung der Polynucleotide von freiem NNMG, so daß eine Kontamination der Polynucleotidfraktion nicht in Frage kommt. In den Versuchen ließ sich eine Markierung feststellen, die nur durch eine Methylierung erklärt werden kann.

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, ist der Methylierungsgrad am stärksten bei der Transfer-RNS, gefolgt von Poly-C, Poly-A und Poly-U. Dies läßt sich im Zusammenhang mit den Ergebnissen bei Versuchen mit dem Proteinsynthese-System erklären; denn auch dort wurde die stärkste Hemmung bei der Polymerisierung von Prolin durch Polycytidylsäure gefunden. Die besonders starke Methylierung bei Transfer-RNS dürfte auf deren Guaningehalt zurückzuführen sein.

Die Hemmung des Prolin-Einbaus nach Behandlung der Polycytidylsäure mit NNMG kann durch eine Methylierung erklärt werden, da keine Codierungsänderung gefunden werden konnte, die auf eine Desaminierung deutet. Auch ist eine Desaminierung weder des Cytosins noch des Cytidins be-

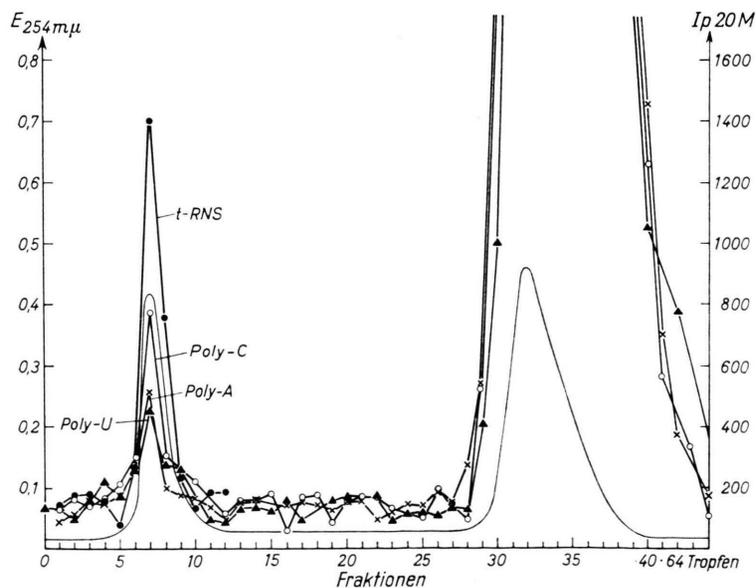


Abb. 2. Säulenchromatographische Trennung der Nucleinsäuren von NNMG. Die ausgezogene Linie gibt die Extinktion bei 254 nm an.

kannt<sup>23</sup>. Die starke Markierung des Poly-C mit Methyl-<sup>3</sup>H-markiertem NNMG bestätigt die Methylierung.

Beim Phenylalanin-Einbau mit Polyuridylsäure als m-RNS wird nach Behandlung von Poly-U mit NNMG eine Verringerung der Einbauraten beobachtet. Dieser Effekt kann ebenfalls mit einer Methylierung erklärt werden, wie sich aus dem erhöhten Leucineinbau, der bei Alkylierung bekannt ist<sup>22</sup>, und der geringen Markierung des Poly-U nach Behandlung mit radioaktivem NNMG schließen läßt.

Die durch Einwirkung des NNMG auf die Polyadenylsäure verursachte Hemmung des Lysin-Einbaus und die Codierungsänderung im Sinne eines vermehrten Einbaus der Glutaminsäure lassen sich auf eine Desaminierung zurückführen, die sich auch bei der freien Base nachweisen ließ<sup>24</sup>. Außerdem kann noch eine Methylierung als Ursache für die Einbauhemmung diskutiert werden (Abb. 2).

Die sinkende Einbautendenz der Aminosäure bei mit NNMG behandeltem Poly-AG, entsprechend dem zunehmenden Anteil an Guanin im Codon, und die auffallend starke Methylierung der t-RNS sprechen dafür, daß NNMG in erster Linie methylierend auf das Guanin wirkt. Dies wird durch jüngste Untersuchungen<sup>26</sup> mit einem Mischpolymerisat aus Uridylsäure und 7-Methylguanylsäure bestätigt: Der Aminosäureeinbau wird im Gegensatz zu nicht methyliertem Poly-UG allgemein gehemmt. In diesem Sinne könnte auch die wachsende Hemmung der Akzeptoraktivität mit zunehmendem Gehalt an Guanin im Anticodon (Tab. 5) bei der t-RNS gedeutet werden.

Dem Ministerium für Wissenschaftliche Forschung, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für Unterstützung dieser Arbeit.

<sup>26</sup> R. C. WILHELM u. D. B. LUDLUM, Science [Washington] 153, 1403 [1966].