

mediat in zwei Moleküle: (a) das ringförmige „Herz“ mit dem alten komplementären und dem viralen Tochterstrang und (b) den partiell doppelsträngigen „Schwanz“ mit dem alten viralen Strang und dem noch inkompletten komplementären Tochterstrang. Der „Schwanz“ reift zu einem kompletten RF-Molekül durch Zirkularisierung des viralen Strangs und Fertigstellung des neuen komplementären Strangs.

Dieser Replikationsmechanismus entspricht dem von Dressler und Wolfson<sup>[1]</sup> vorgeschlagenen „rolling circle“-Modell für die Vermehrung der  $\Phi$ X-RF. Die geforderte Asynchronie des Tochterstrangwachstums entspricht Erfahrungen mit den replikativen Intermediaten anderer DNA-Species.

<sup>1</sup> Dressler, D. & Wolfson, J. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **67**, 456–463.

Adresse: Claus H. Schröder, Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Abteilung Molekulare Biologie, D-69 Heidelberg, Jahnstraße 29.

#### D. Schubert, J. Poensgen und G. Werner

##### Rekombination von Proteinen und Lipiden der Erythrozytenmembran

Zur Untersuchung der Protein-Lipid-Wechselwirkungen in menschlichen Erythrozytenmembranen wurde eine neue Methode der Proteinpräparation entwickelt. Zuerst wird die Hälfte der Membranproteine durch 10proz. Essigsäure aus der Membran entfernt. Der zurückbleibende Lipoproteinkomplex wird durch 90proz. Essigsäure depolymerisiert, Protein und Lipid werden durch Gelfiltration voneinander getrennt, und die Proteinfraction wird in wäßrige Puffer überführt. Die Proteinfraction bildet mit durch Ultraschall dispergiertem Gesamtlipid menschlicher Erythrozytenmembranen in wäßrigen Puffern Lipoproteine. pH-Wert, Ionenstärke sowie Protein- und Lipidkonzentration können dabei einen weiten Bereich überstreichen; dieser Bereich schließt die physiologischen Bedingungen von pH-Wert und Ionenstärke ein. Nach Gleichgewichtszentrifugation im Dichtegradienten bilden die Lipoproteine gut sichtbare, schmale Banden. Die Dichte dieser Banden hängt nicht wesentlich von pH-Wert und Pufferzusammensetzung ab. Sie ist jedoch stark abhängig vom Gewichtsverhältnis von Protein und Lipid im Rekombinationsansatz. – Im Elektronenmikroskop zeigen die Lipoprotein-Aggregate die typische trilaminare Struktur von Membranen, wobei die meisten der Aggregate die Form geschlossener Bläschen haben. Das gleiche Erscheinungsbild liefern die dispergierten proteinfreien Lipide.

Die biologische Relevanz der Resultate ist noch unklar. Die Ergebnisse demonstrieren jedoch die prinzipielle Möglichkeit

1. des „Self-Assembly“ membranähnlicher Lipoprotein-

strukturen aus den Komponenten der Erythrozytenmembran in vivo,

2. der weitgehenden Steuerung der Membranzusammensetzung nicht durch strukturelle Prinzipien, sondern durch Regulation der Syntheseraten der Membranbausteine.

Adresse: Dr. D. Schubert, Max-Planck-Institut für Biophysik, D-6 Frankfurt/Main, Kennedyallee 70.

#### H.-U. Schulze, J. M. Pönnighaus und Hj. Staudinger

##### Untersuchungen über die Verteilung von Enzymproteinen in den endoplasmatischen Membranen der Leberzelle. Immunologische Fraktionierung von Schweinelebermikrosomen

Antikörper, die durch Immunisierung von Kaninchen mit isolierter und gereinigter NADH: Ferricytochrom-*b*<sub>5</sub>-Oxidoreduktase (EC 1.6.2.2) aus Schweinelebermikrosomen gewonnen wurden, hemmen auch die enzymatische Aktivität der homologen membrangebundenen NADH: Ferricytochrom-*b*<sub>5</sub>-Oxidoreduktase. Diese Immunreaktion haben wir zur Trennung mikrosomaler Subfraktionen ausgenutzt. Dazu wurden Schweinelebermikrosomen mit  $\gamma$ -Globulinen immunisierter Kaninchen inkubiert und anschließend sowohl durch Differentialzentrifugation als auch durch Immunosorption fraktioniert.

Wir haben gefunden, daß die Antikörper mit nahezu allen Partikeln einer Präparation „großer Mikrosomen“, aber nur mit einem sehr kleinen Teil der Partikeln ultrabeschallter Mikrosomen reagieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben wir mit morphometrischen und biochemischen Meßwerten korreliert. Danach gelingt die Trennung mikrosomaler Enzymaktivitäten erst dann, wenn die Anzahl der zerkleinerten Mikrosomen sehr viel größer als die Anzahl der Moleküle der NADH: Ferricytochrom-*b*<sub>5</sub>-Oxidoreduktase ist.

Wir schließen daraus, daß die NADH: Ferricytochrom-*b*<sub>5</sub>-Oxidoreduktase nicht in spezialisierten Abschnitten des endoplasmatischen Retikulums der Leberzelle räumlich eng begrenzt vorkommt, sondern daß sich dieses Enzym gleichmäßig über das gesamte Membransystem verteilt.

Adresse: Dr. Hans-Ulrich Schulze, Biochemisches Institut der Universität, D-63 Gießen, Friedrichstr. 24.

#### A. J. Schwab, W. Sebald und H. Weiss

##### Schnelle Markierung eines mitochondrial synthetisierten Polypeptids einer Cytochromoxidasen-Präparation aus *Neurospora*

Es konnte vor kurzem in unserem Laboratorium gezeigt

werden, daß eine Cytochromoxidasen-Präparation, die chromatographisch aus *Neurospora crassa* gewonnen wurde, aus mehreren Polypeptiden besteht, von denen mindestens eins mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 18000 an den mitochondrialen Ribosomen synthetisiert wird<sup>[1]</sup>. Im folgenden werden Versuche beschrieben, die aufzeigen, daß die Kinetik der *In-vivo*-Markierung für die einzelnen Peptide verschieden ist. In exponentiell wachsenden *Neurospora*-Zellen wird durch Zugabe einer kleinen Menge hochmarkierten Leucins eine Pulsmarkierung erzielt. Die Radioaktivität befindet sich nach einigen Minuten vollständig im Protein. In der verwendeten Wachstumphase ist kein Protein-Abbau nachweisbar. Wird eine Kultur mit [<sup>14</sup>C]Leucin und nach einer gewissen Zeit mit [<sup>3</sup>H]Leucin markiert, so wird das <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C-Verhältnis für alle Proteine nach einer genügend langen Zeit das gleiche sein. Einige Proteine werden Vorstufen für andere Proteine darstellen. In diesem Fall wird die Markierung des Produkts eine Verzögerung aufweisen. Das <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C-Verhältnis wird unmittelbar nach Zugabe der [<sup>3</sup>H]Aminosäure niedrig sein und dann allmählich den Wert der anderen Proteine erreichen.

In unseren Versuchen wurde eine exponentiell wachsende *Neurospora*-Kultur mit [<sup>14</sup>C]Leucin und nach 45 min mit [<sup>3</sup>H]Leucin pulsmarkiert. Die eine Hälfte der Kultur wurde 4 min und die andere 90 min nach der <sup>3</sup>H-Zugabe geerntet und auf 0°C abgekühlt. In dem länger markierten Anteil war das <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C-Verhältnis der mitochondrialen Membranproteine 2,1, das der Cytochromoxidasen-Präparation 1,9. Die einzelnen Banden nach elektrophoretischer Auftrennung der Polypeptide zeigten Werte zwischen 1,8 und 2,1.

In dem Anteil der Kultur, der 4 min nach <sup>3</sup>H-Zugabe geerntet wurde, war das <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C-Verhältnis in den mitochondrialen Membranen 1,56, in der Cytochromoxidase dagegen nur 0,36. Die Cytochromoxidase wird also aus Vorstufen gebildet, was auf Grund der Tatsache, daß zwei Proteinsynthesysteme an ihrem Aufbau beteiligt sind, zu erwarten ist. Trennt man die Peptide dieser Präparation elektrophoretisch, so zeigt sich, daß die Radioaktivität hauptsächlich in der Bande mit dem scheinbaren Molekulargewicht 18000 zu finden ist. Das entsprechende Polypeptid wird also besonders schnell markiert, der Pool der entsprechenden Vorstufe hat einen schnellen Turnover, und muß also klein sein.

Wir vermuten, daß die Synthese dieses Polypeptides an den mitochondrialen Ribosomen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für den Zusammenbau des Cytochromoxidasen-Proteins darstellt.

<sup>1</sup> Weiss, H., Sebald, W. & Bücher, Th. (1971) *Eur. J. Biochem.* **22**, 19–26.

Adresse: Dipl.-Chem. Andreas J. Schwab, Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München, D-8 München 2, Goethestr. 33.

#### W. Sebald, H. Weiss und G. Jackl

##### Über die Abhängigkeit des Zusammenbaus der Cytochromoxidase von der Anwesenheit der Produkte der mitochondrialen Proteinsynthese

Cytochromoxidase wurde aus *Neurospora crassa* mit Hilfe einer Chromatographie an Oleoyl-polymethacrylsäure-Harz präpariert<sup>[1]</sup> und auf einer Polyacrylamid-Elektrophorese in Natriumdodecylsulfat in sieben Polypeptide aufgetrennt<sup>[2]</sup>. Nach einer Pulsmarkierung durch Zugabe von radioaktiven Aminosäuren in Tracer-mengen wurde die Markierung der einzelnen Polypeptide in Abwesenheit und in Anwesenheit von Chloramphenicol und nach Auswaschen des Inhibitors untersucht.

Chloramphenicol hemmt in einer Konzentration von 4 mg/ml den Aminosäureeinbau in alle Polypeptide zu 90–95%. Nach Auswaschen des Chloramphenicols aus den Zellen und weiterem Wachstum steigt die Markierung der vier Polypeptide mit kleinerem Molekulargewicht auf das fünf- bis zehnfache, während die anderen Polypeptide nur einen kleinen Anstieg in der Markierung zeigen. Demnach werden unter der Wirkung von Chloramphenicol die vier kleinen Polypeptide zwar synthetisiert, aber nicht zu einem fertigen Enzym zusammengebaut.

Chloramphenicol hemmt die mitochondriale, nicht aber die extramitochondriale Proteinsynthese<sup>[3]</sup>. Es wird daher gefolgert, daß mindestens ein Produkt der mitochondrialen Proteinsynthese für den Zusammenbau der Cytochromoxidase nötig ist.

Es ist sehr unwahrscheinlich, daß dieses Produkt eine *katalytische* Funktion beim Zusammenbau ausübt, z. B. durch Beteiligung an der Häm- oder Phospholipid-Synthese. Ein solches postuliertes *katalytisches* Protein müßte einen extrem schnellen Turnover aufweisen, da bereits 10 min nach der Zugabe von Chloramphenicol die radioaktiven Aminosäuren in Protein eingebaut sind.

Es wird daher angenommen, daß wenigstens ein Produkt der mitochondrialen Proteinsynthese *stöchiometrisch* am Aufbau der Cytochromoxidase beteiligt ist. Die in Gegenwart von Cycloheximid eingebauten Aminosäuren repräsentieren dieses Produkt<sup>[2]</sup>.

<sup>1</sup> Weiss, H. & Bücher, Th. (1970) *Eur. J. Biochem.* **17**, 561–567.

<sup>2</sup> Weiss, H., Sebald, W. & Bücher, Th. (1971) *Eur. J. Biochem.* **22**, 19–26.

<sup>3</sup> Lamb, A. J., Clark-Walker, G. D. & Linnane, A. W. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 415–427.

Adresse: Dr. Walter Sebald, Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München, D-8 München 2, Goethestraße 33.