

AN ANNUAL PUBLICATION

VOLUME 2 / JUNE 1973

HACETTEPE BULLETIN OF
NATURAL SCIENCES AND ENGINEERING



A BULLETIN PUBLISHED BY HACETTEPE UNIVERSITY PRESS

HACETTEPE BULLETIN OF NATURAL SCIENCES AND ENGINEERING

AN ANNUAL PUBLICATION

VOLUME 2 / JUNE 1973

EDITOR / ALÂETTİN KUTSAL

EDITORIAL BOARD (HACETTEPE BULLETIN OF NATURAL SCIENCES AND ENGINEERING)

BAYSAL BATMAN / ALTAN GÜNALP / ALÂETTİN KUTSAL
(CHAIRMAN OF EDITORIAL BOARD) / OKYAY ALPAUT / ACAR İŞİN

MANAGING EDITOR & ART DIRECTOR / VURAL TÜRKER

PUBLISHED BY HACETTEPE UNIVERSITY PRESS



SUBSCRIPTION RATES

<i>TURKEY</i>	: Annual subscription (including postage)	7.50 TL.
	Single issue (not including postage)	12.50 TL.
<i>FOREIGN</i>	: Annual subscription (including postage)	\$ 1.25
	Single issue (not including postage)	\$ 17.5

Inquiries concerning articles, reprints or subscriptions should be forwarded to:

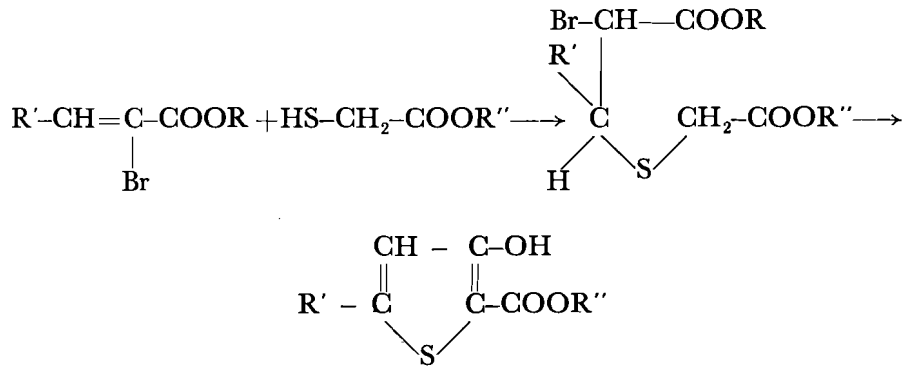
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ BASIM VE YAYIM MERKEZİ, ANKARA, TURKEY

Printed by
Hacettepe University Press
Printing Division

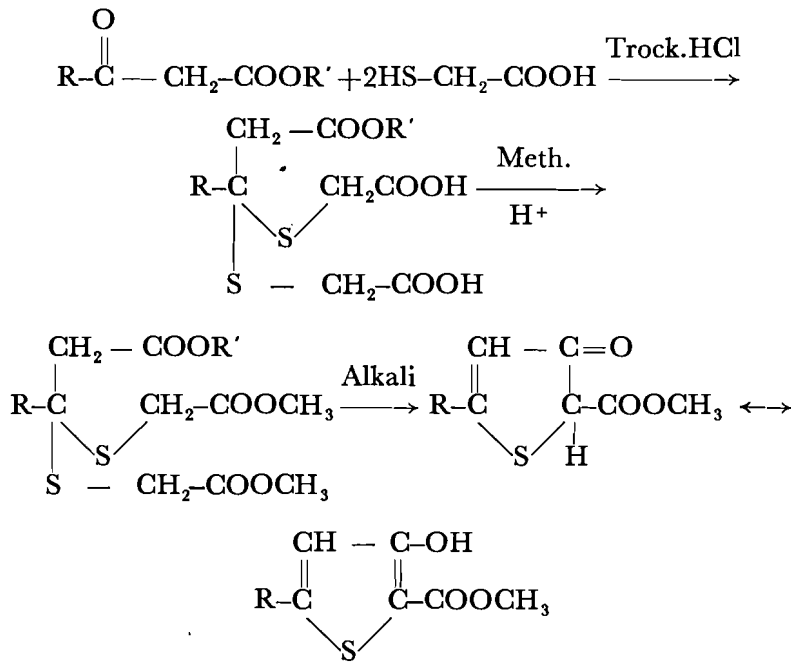
HACETTEPE BULLETIN OF NATURAL SCIENCES AND ENGINEERING

CONTENTS

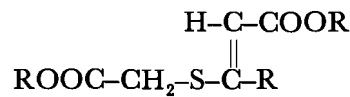
- 1 *Estimation Methods for a Simple Exponential Model*
SÜLEYMAN GÜNAY
- 10 *The Case That the Variances of the Error Terms in Linear Regression are to be Proportional to X_i*
ALÂETTİN KUTSAL / CEYHAN İNAL
- 16 *Über 3-Hydroxy-Thiophen-Dicarbonsäure-(2, 4)-Diester*
ENİS OSKAY
- 25 *Preparation of E. Coli Minicells Containing RNA Polymerase Genes*
ŞÜKRÜYE BAYKAN
- 31 *Extensions of Nevanlinna's Second Fundamental Theorem*
ALİ DÖNMEZ
- 50 *Some Problems in Statistical Estimation from Probability Samples of a Finite Universe*
HAYRİYE ÖZDEN
- 65 *On 1 - Row g - Circulant Matrices*
EŞREF KAYA
- 69 *Predictive Validity of University Entrance Examinations*
HAYRİYE ÖZDEN
- 79 *Monotonically Uniformisable Spaces*
LAWRENCE M. BROWN
- 92 *On Starlike Functions of Order α*
LEMAN ÇELİKKANAT



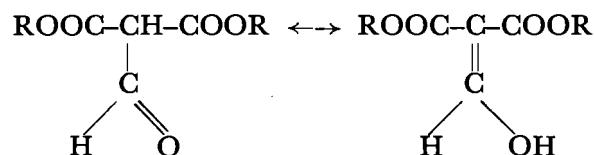
Nach H. Fiesselman und F. Thoma⁴ kommt man zu ähnlichen bzw. denselben Hydroxy-thiophenderivaten, wenn man von β -Ketocarbonsäureestern ausgeht.



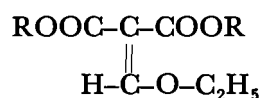
Versucht man gleich den Ester der Thioglykolsäure anzulagern, so erhält man lediglich das ungesättigte Sulfid, das wegen der wahrscheinlich vorliegenden Trans-Form nur schlecht ringschliesst.



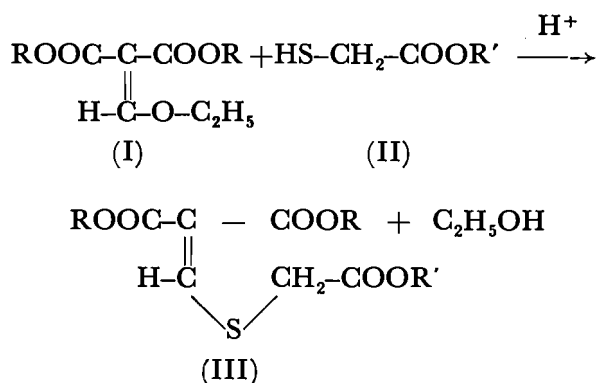
Hat man nun aber anstelle des Wasserstoffs in α -Stellung zur Carboxylgruppe des β -Ketoesters ebenfalls eine Estergruppe stehen, so muss der Ringabschluss auch bei diesen ungesättigten Sulfiden erreichbar sein. Als geeignete Verbindung bietet sich hier der formylierte Malonsäureester an,



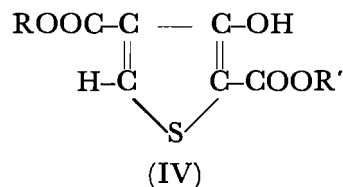
bei dem am besten die Äthoxymethylenverbindung zu erhalten war.



Dadurch hat man den Vorteil, dass man nicht mit grösseren Mengen gasförmiger Salzsäure den Umsatz mit Thioglykolsäureester erzwingen musste, sondern einfach mit katalytischen Mengen konz. Salzsäure eine Umazetalisierung erreichten, wobei entsprechend früheren Arbeiten von H. Fiesselmann⁵ lediglich der niedriger siedende Alkohol abdestilliert zu werden brauchte. In diesem Fall siedete Äthanol (78°C) um 72°C tiefer als Thioglykolsäureäthylester, so dass die Umazetalisierung, zumal die SH-Gruppe viel saurer als die OH-Gruppe ist, kein Problem war.



Als einen weiteren Vorteil musste man dabei die stets freie α -stellung im entstehenden Thiophenring ansehen, an der noch Substitutionsreaktionen möglich sind.



Experimenteller Teil

α -Carbäthxoy- β -(carbomethoxy-methylmercapto)-acrylsäureäthylester:

(III, R = - C₂H₅, R' = - CH₃).

Man vermischt molare Mengen von Äthoxymethylen Malonsäureäthylester (I, R = - C₂H₅) und Thioglykolsäuremethylester (II, R = - CH₃) erhitzt nach Zusatz von einigen Tropfen konz. Salzsäure fünf Stunden am Rückfluss. Nach dieser Reaktion wurde das Äthanol bis 100°C/12 mm abgezogen und dann der Kolbeninhalt der Destillation unterworfen, wobei das ungesättigte Sulfid als farbloses Öl vom Sdp. 162-163°C/0,4 mm. in iener Ausbeute von 64 % erhalten wurde.

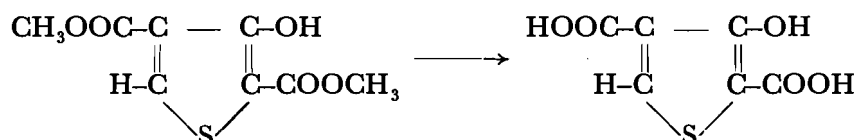
Wurde statt Thioglykolsäuremethylester der Äthylester (II, R = - C₂H₅) verwendet, so erhielt man in 66 % iger Ausbeute die entsprechende Äthylverbindung (III, R = - C₂H₅, R' = - C₂H₅) als farbloses Öl vom Sdp. 173 C/0,1 mm. Bei Verwendung von dimethylester der Äthoxymethylenmalonsäure wurden sowohl mit Thioglykolsäuremethyl- als auch mit Thioglykolsäureäthylester destillierbare Öle (III, R = - CH₃, R' = - CH₃, III, R = - CH₃, R' = - C₂H₅) erhalten, die nachher Kristallin wurden (Schmp. 54°C und Schmp. 56°C).

Darstellung der 3-Hydroxy-thiophen-dicarbonsaure-(2, 4)-diester:

Man mischte 0,2 Mol des ungesättigten Sulfids (III, R = - C₂H₅, R' = - CH₃) mit etwa derselben Menge Methanol und liess diese Mischung innerhalb einer Viertelstunde zu einer methanolischen Kalilauge Lösung (0,4 Mol) zutropfen. Dabei bildete sich sofort ein gelber Niederschlag. Das Kaliumsalz wurde in Wasser aufgeschlämmt und mit Verd. Salzsäure angesäuert. Dabei fiel der freie 3-Hydroxy-thiophen-dicarbonsaure-(2, 4)-2-methyl-4-äthyl-ester (IV, R = - C₂H₅, R' = - CH₃) Schmp. 90°C (aus Methanol) aus. Die Ausbeute betrug 61 % d. Th.

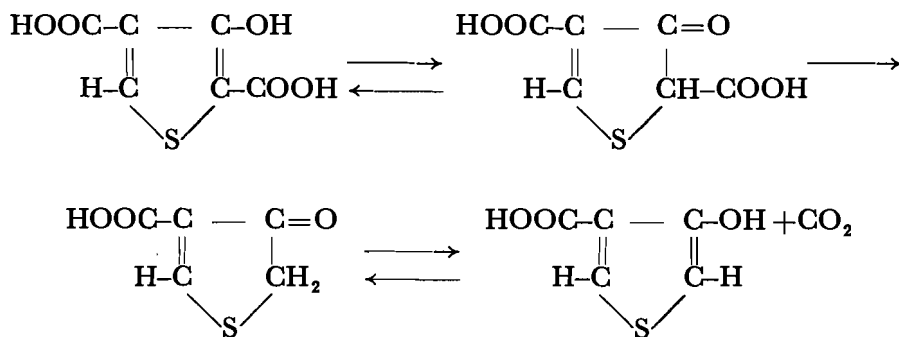
Verseifung der 3-Hydroxy-thiophen-dicarbonsäure-(2,4)-diester zu 3-Hydroxy-thiophen-dicarbonsäure-(2,4):

Da bekannt war, dass die 3-Hydroxy-thiophen-carbonsäuren-(2) leicht decarboxylieren, wurde hier mit besonderer Vorsicht vorgegangen. Allerdings erhielt man in der Kälte mit wässriger Lauge selbst bei 96 stündigem Stehen keine Verseifung. Gut dagegen bewährte sich hier 2 stündiges Kochen mit 2n wässriger Natronlauge (88 % Ausbeute). Allerdings musste das Ansäuern in Eiskochsalz Kältemischung vorgenommen werden, da bereits bei 30°C in Wasser langsam Decarboxylierung einsetzte.



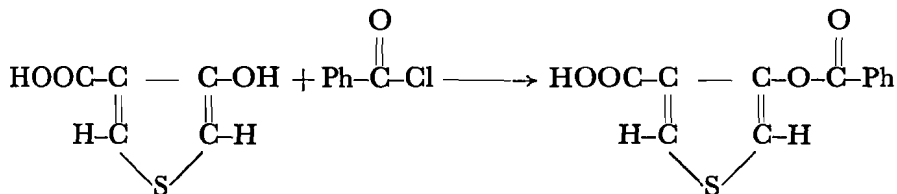
3-Hydroxy-thiophen-carbonsäure-(4):

3-Hydroxy-thiophen-dicarbonsäure-(2, 4) ist in 2-stellung leicht decarboxylierbar. Wenn man sie im Hochvakuum vorsichtig erwärmt, geht eine Carboxylgruppe heraus und es entsteht 3-hydroxy-thiophen-carbonsäure-(4) (Schmp. 124-125°C). Ein Beweis für die Annahme, dass nicht 3-Hydroxy-thiophen-carbonsäure-(2), sondern 3-Hydroxy-thiophen-carbonsäure-(4) entsteht, liegt darin, dass die erhaltene Verbindung mit Aldehyden kondensierbar und mit Eisen (III) chlorid zu dem Bis- [4-carboxy-thiophen (2)] -indigo oxydierbar ist. Das kommt daher, dass 3-Hydroxy-thiophen-carbonsäure -(4) in zwei tautomeren Formen vorliegen kann. Die Enolform gibt sich durch eine ultramarin blau Eisen (III) chlorid Reaktion und durch die Benzoylierbarkeit nach Schotten-Baumann zu erkennen.

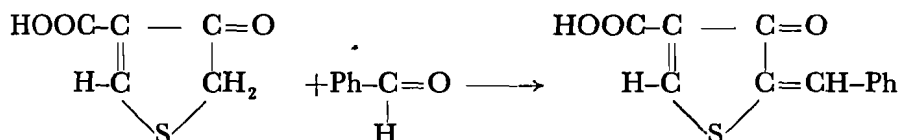


Benzoyl-Verbindung der 3-Hydroxy-thiophen-carbonsäure-(4):

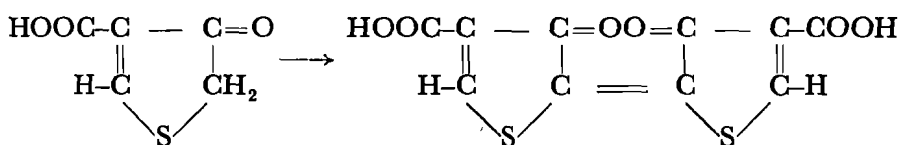
Nach der Methode von Schotten-Baumann in getrocknetem Pyridin erhielt man den Benzosäureester mit einem Schmelzpunkt von 37-38°C in 72 % iger Ausbeute.

**Benzyliden-Verbindung der 3-Hydroxy-thiophen-carbonsäure-(4):**

3-Hydroxy-thiophen-carbonsäure-(4) ist in wässr. Laugen mit Aldehyden kondensierbar. Mit benzaldehyd erhielt man in 63 % Ausbeute gelbe Nadeln mit einem Schmelzpunkt von 150°C. Um die Cannizaro-Reaktion zu vermeiden, darf die Temp. während der Kondensation 2°C nicht überschreiten. Die Ausbeute ist 63 % d. Th.

**Bis- [4-carboxy-thiophen-(2)-] Indigo:**

Um diesen blauen und oberflächlich goldglänzenden Farbstoff zu gewinnen, wird 3-Hydroxy-thiophen-carbonsäure-(4) bei gewöhnlicher Temperatur mit überschüssigem Eisen (III) chlorid oxydiert. Der Farbstoff ist sehr schwer löslich, weshalb er zur Reinigung in verd. Sodalösung aufgenommen und mit verd. Salzsäure ausgefällt werden musste.

**Zusammenfassung**

Die Thioglykolsäureester lagern sich beim Kochen an Äthoxymethylenmalonester unter der katalytischen Wirkung von H⁺ unter Abspaltung von Äthanol an. Diese Reaktion wurde mit Äthoxymethylenmalon-

säure-diäthylester + Thioglykolsäure-äthylester, Äthoxymethylen-malonsäure-diäthylester + Thioglykolsäure-methylester, Äthoxymethylen-malonsäure-dimethylester + Thioglykolsäureäthylester durchgeführt und die jeweils entsprechenden Verbindungen erhalten.

Diese Verbindungen neigen mit alkoholischen Laugen sehr leicht zu Ringbildungen. Dabei gehen sie in die entsprechenden 3-Hydroxythiophen-dicarbonensäure-(2, 4)-diester über.

Der 3-Hydroxythiophen-dicarbonensäure-(2,4)-dimethyl-ester wurde durch Derivate an der Hydroxylgruppe charakterisiert. So wurden nach der Methode von Schotten-Baumann die Acetyl- und Benzoylderivate dargestellt. 3-Hydroxythiophen-dicarbonensäure-(2, 4)-diester methylieren sich mit Diazomethanlösung und ergeben 3-Methoxythiophen-dicarbonensäure-(2, 4)-diester. Diese Methoxy-Verbindungen sind leicht verseifbar und gehen in 3-methoxythiophen-dicarbonensäure-(2, 4)-über. Beim Erhitzen unter Hinzufügung von Kupferpulver gehen aus dieser Verbindung zwei Carboxylgruppen heraus und es entsteht 3-methoxythiophen. Die 3-Hydroxythiophen-dicarbonensäure-(2, 4)-diester sind ebenfalls verseifbar. Die entsprechende 3-Hydroxythiophen-dicarbonensäure gibt mit Eisen (III) chlorid eine kirschrote Farbe, ist leicht decarboxylierbar und geht in 3-Hydroxythiophen-carbonsäure-(4) über. Diese Verbindung ist ziemlich unbeständig. Ein Beweis für die Annahme, dass nicht 3-Hydroxythiophen-carbonsäure-(2), sondern 3-Hydroxythiophen-carbonsäure -(4) entsteht, liegt darin, dass die erhaltene Verbindung mit Aldehyden kondensierbar und mit Eisen (III) chlorid zum Bis- [4-carboxy-thiophen-(2)] -indigo oxydierbar ist. Das kommt daher, dass 3-Hydroxythiophen-carbonsäure-(4) in zwei tautomeren Formen vorliegen kann. Die Enolform gibt sich durch eine ultramarinblaue Eisen (III) chloridreaktion und durch die Benzoylierbarkeit nach Schotten-Baumann zu erkennen, die Ketoform durch die oben genannte Kondensations- bzw. Oxydationsreaktion.

Manuscript received in April, 1973

LITERATUR

1. Th. Posner, *Ber.*, 1907, 40, (4791).
H. Nicolet, *J.A.C.S.* 1907, 57, (1098).
2. H. Fiesselmann, P. Schipprak und F. Memmel, *Ber.*, 1954, 87, 887.
3. W. Dieckmann, *Ann.*, 1901, 51, 93, 317.
4. H. Fiesselmann und F. Thoma, *Ber.*, 1956, 89, 1907.
5. H. Fiesselmann und F. Hörndler, *Ber.*, 1954, 87, 906.

Preparation of E. Coli Minicells Containing RNA Polymerase Genes

Şükrüye Baykan*

Introduction

An F⁻ strain of E. coli K-12 which produces DNA deficient minicells by an improper cell division has been used in developing methods to isolate plasmid DNA.^{1 2} By using sucrose gradient sedimentation, minicells can be easily separated from the parental cells that produce them. This E. coli mutant has a defect which is unable to synchronize DNA replication and cell division. Cell division occurs before DNA synthesis is finished, and consequently one of the daughter cells does not receive any DNA. These small and DNA-less cells are called minicells.¹ They are not viable cells, but they do maintain their biological activities for approximately 48 hrs. It is possible to prepare plasmids which contain any region of the bacterial chromosome, and these can be easily placed in minicells.³

Since minicells can be easily separated from large cells, this system offers a great advantage for the isolation of a pure, genetically homogeneous region of the bacterial chromosome. In this work, a method for preparation of the minicells, carrying RNA polymerase genes is proposed.

Materials and Methods

The minicells producing a strain of E. coli K-12 (P₆₇₈₅₄, F⁻, thr⁻, leu⁻, Mal⁺ Rif^r) was used as recipient bacteria, and several markers were introduced by transduction and conjugation.

E. coli CGSC₄₂₈₅ which has episom F 111, was used as donor. Episome F 111 carries RNA polymerase gene(s), which is rifampicine sensitive, and confer to the host cell rifampicin sensitivity.

* Inst. of Biology, Faculty of Science, Hacettepe University, Ankara, Turkey.

Isolation of minicells

An overnight culture of *E. coli* K-12 (at starvation phase) was spun for 5 min. at 1500 rpm to obtain crude minicells fraction. The supernatant was then spun down at 10,000 rpm 15 min. to pellet the minicells. Minicells then were resuspended in a phosphate buffer and layered onto a 30 ml of 5-20 % linear sucrose gradient, and spun at 5,000 rpm for 15 min. at 4°C. After centrifugation, fractions were collected and assayed for TCA insoluble radioactivity, or the minicells band was removed and pelleted, the minicells fraction was re-suspended in the appropriate growth medium at an absorbancy of 0.2 at 620 nm and assayed for biological activities and the contaminating cells.

Incorporation of radioactive precursors

F⁻ and F⁺ strains of *E. coli* K-12 were grown in minimal medium containing 5 μ C/ml ³H-TdR and 0.1 μ C/ml ¹⁴C-leu and minicells were isolated and tested for radioactivity. All the radioactive samples were placed on Whatman 3MM filter discs and precipitated with a 10% cold TCA. The filters were washed twice with a 5% cold TCA, and twice with 100% ethonal then dried and placed into vials. Approximately 3ml of toluen, phosphorus was then added to the vials and the samples were counted.

Bacterial conjugations

Overnight cultures of donor and recipient bacteria were diluted to O.D. 100 Klet units. Then they were mixed and shaken gently for an hour on the rotatory shaker, And, the conjugation mixture was plated on the seletective media which is permissive only for recombinants.

Results

Minicells can be easily separated from large cells, by differential centrifugation and the sucrose gradient sedimentation as described in materials and methods (Figure 1).

There are some differences in the ability of plasmid containing minicells to synthesize macromolecules, depending on the method of isolation. As indicated (materials and methods) the, minicells are routinely isolated by a series of sucrose gradient sedimentation, in linear 5-20% gradients. This method has an obvious disadvantage of exposing the minicells to an osmotic change resulting plasmolysis. The reduced

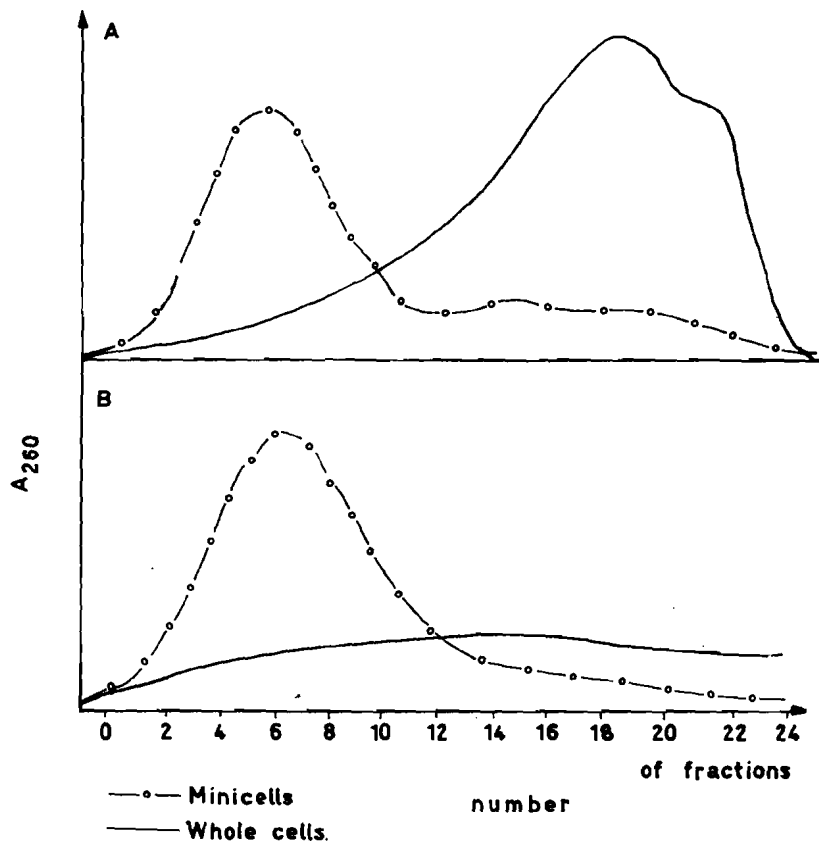


Figure 1

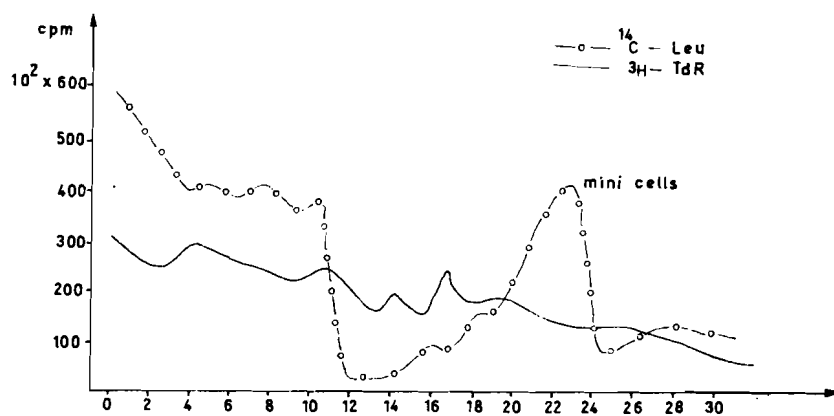
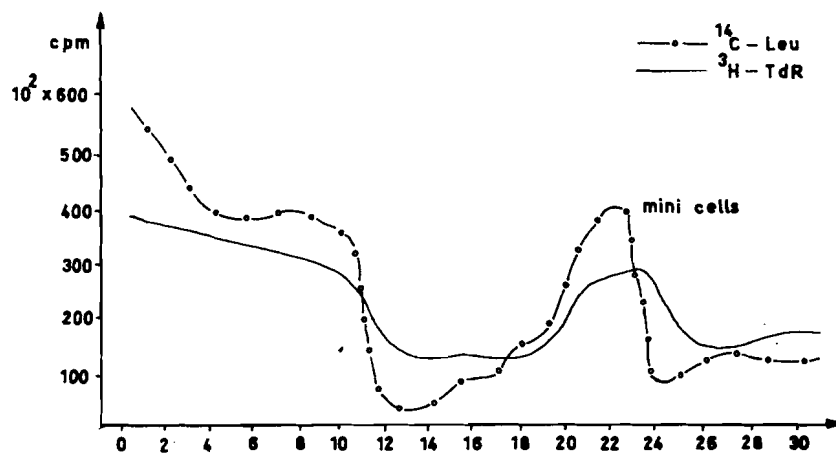
A₂₆₀ Profiles for sucrose gradient of minicells producing strain of *E. coli*. a) First sucrose gradient, b) Second sucrose gradient

synthetic capacities of plasmolyzed cells of *E. coli* have been reported by Rubenstein et al.⁴ Therefore ficol gradient has been tried for isolation of minicells. Another method of the isolation of minicells has been suggested by Levy.⁵ Bacteriocidal agents, like penicillin that acts only on dividing cells is used to lyse cells in culture containing normal cells and minicells. On the other hand, protein synthesis in minicells which are treated with this antibiotic is reduced by about 60 %. The use of such treatment, therefore, may not be useful.

Preparation of *E. coli* minicells carrying RNA polymerase genes

RNA polymerase genes can be placed into the minicells with the help of a plasmid or a sex factor which contains the structural genes for

RNA polymerase. A trick which makes the use of the Rifampicin sensitivity for detecting the presence of RNA polymerase genes in a cell was used. Rifampicin and its semi-synthetic derivatives like Rifampicin inhibits the RNA polymerase of *E. coli*. They act on the RNA polymerase itself instead of interacting with DNA.⁶ Rifampicin prevents the formation of the initiation complex on the DNA-directed RNA polymerase reaction. It is possible to isolate RNA polymerase mutants by selecting for Rif. resistant mutants.



Figures 2 a, b

Radioactivity profiles for sucrose gradients of minicells producing strains a) with and b) without plasmids. A culture of *E. coli* K-12 was growing overnight at 37°C on a rotatory shaker in the presence of 5 μ C/ml ³P-TdR and 0.1 μ C/ml of ¹⁴C-leu.

There are three isogenic merodiploids which differs only in the state of their Rif. genes.⁷

<u>Genotypes</u>	<u>Phenotypes</u>
Rif ^r /Rif ^r	Resistant
Rif ^s /Rif ^s	Sensitive
Rif/Rif	Sensitive

Heterodiploids are always phenotypically Rif. sensitive, even though they have resistant genes. Then episome F 111, which has Rifampicin sensitive RNA polymerase genes on it, has been transferred into Rif. resistant F⁻ minicell-producing cells, and phenotypically Rif. sensitive ones were selected. Since recipient bacteria were Rif. resistant, Rifampicin sensitivity was taken as evidence of the transfer of episome F 111 to these cells. Five percent of the conjugation products were Rif. sensitive.

Radioactive experiments showed that, minicells, isolated from this stage had episomal DNA in them (Figures 2 a, b).

Discussion

The minicell is a potentially useful system for studying a variety of cellular processes. The ability of these minicells to produce viable bacteriophages after infection, is taken as indication that their synthetic activities are of biological interest. Minicells have the same cell wall and membrane properties as their parental cells. Therefore, several bacteriophages can infect the minicells as well as parental cell. Roozen, Fenwich and Curtis have shown that minicells are capable of producing viable T₄ phages.³

A variety of control problems has been studied by using lambda phage. It is known, that lambda phage has several control genes and proteins, but they have not yet been separated from other host proteins and characterized.⁸

Lambda phage can also infect the minicells, but since it must be supported by host RNA polymerase, it will not grow in the F⁻ minicells.

However, it is possible to put RNA polymerase genes into minicells, and then infect them with phage. Since minicells do not have their own DNA (even plasmid containing ones have a very small portion of DNA), it should be easier to isolate lambda phage gene products from minicells, rather than from normal host cells.

In conclusion then, plasmid containing minicells are capable of synthesizing DNA, RNA and protein will therefore provide a valuable system for studying replication, transcription or translation problems.

Acknowledgments

I would like to thank to Dr. E. C. Cox for his valuable suggestions during the experiments and also wish to thank Dr. A. Günalp for his careful review of this manuscript.

Manuscript received in April, 1973

REFERENCES

1. Adler, H. I., Fischer, W. D., Cohen. A.. et al.: Miniature Escherichia coli cells deficient in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57 (1967), 321-326.
2. Inselburg, J.: Segregation into and replication of plasmid deoxyribonucleic into acid in chromosomeless segregants of Escherichia coli, *J. Bacteriol.* 102 (1970), 642-647.
3. Roozen, K. J., Fenwick. R. G., Jr., and Curtiss, R., 3d.: Synthesis of ribonucleic acid and protein in plasmid-containing minicells of Escherichia coli K-12, *J. Bacteriol.* 107 (1971), 21-33.
4. Rubenstein, K. E., Nass, M. M. and Cohen S. S.: Synthetic capabilities of plasmolyzed cells and spheroplasts of Escherichia coli, *J. Bacteriol.* 104 (1970), 443-452.
5. Levy, S. B.: Resistance of minicells to penicillin lysis: a method of obtaining large quantities of purified minicells, *J. Bacteriol.* 103 (1970), 836-839.
6. Sippel A., and Hartman, G.: Mode of action of rifamycin on the DNA polymerase reaction, *Biochim. Biophys. Acta* 157 (1968), 218-129.
7. Austin, S. J., Tittawella, I. P., Hayward, R. S., et al.: Amber mutations of Escherichia coli RNA polymerase, *Nature (New Biol.)* 232 (1971), 133-136.
8. Reichardt L., and Kaiser, A. D.: Control of lambda repressor synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68 (1971), 2185-2189).