

Brand das chemische Element Phosphor geworden war. Das Verdienst, diesen Stoff entdeckt zu haben, bleibt ihm jedoch ungenommen; denn eine Wissenschaft entwickelt sich zwar dadurch, daß sie ihrem Objekt stets neue Deutungen abringt, doch ist die Möglichkeit dazu erst durch das in der Geschichte ge-

wachsene Fundament gegeben. Zu diesem hat *Brand* einen nicht unbedeutenden Stein geliefert. Daß er nicht hat ahnen können, daß sein Beitrag sich als ein wesentlicher Teil dieses Fundamentes einmal erweisen sollte, können wir ihm nicht zum Vorwurf machen.

Eingegangen am 4. Juli 1969 [A 716]

Zur Struktur und Funktion von Transfer-Ribonucleinsäuren^[1]

Von H. G. Zachau^[*]

Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNAs)^[2] kommen in allen lebenden Organismen vor. In der biologischen Proteinsynthese akzeptieren sie aktivierte Aminosäuren, die sie auf die wachsenden Peptidketten übertragen. Mit Molekulargewichten von 25000 bis 30000 liegen die tRNAs in einem Bereich, der der Bearbeitung mit heutigen physikalischen, chemischen und biochemischen Methoden gut zugänglich ist. Die Primärstruktur mehrerer tRNAs und einige Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion wurden aufgeklärt. Raumstruktur, Spezifität und Wirkungsweise sind zur Zeit Gegenstand der Forschung.

1. Einleitung

Die Erforschung der Transfer-Ribonucleinsäuren begann mit theoretischen Überlegungen. Aus der „Ein Gen – ein Enzym“-Hypothese hatte sich in den 50iger Jahren die Sequenz-Hypothese entwickelt: Die Reihenfolge der Nucleotide in der Desoxyribonucleinsäure bestimmt die Reihenfolge der Aminosäuren im Protein; die Nucleotidschrift wird „colinear“ in die Aminosäureschrift übersetzt. Über den Ablauf der biologischen Proteinsynthese wußte man damals praktisch noch nichts, aber man mußte annehmen, daß die Aminosäuren in spezifischer Weise mit Nucleotidsequenzen in Wechselwirkung treten, an ihnen aufgereiht und schließlich zum Protein verknüpft werden.

Erhält die Bindung der Aminosäuren an die Nucleinsäure-Matrize durch bestimmte Ladungsmuster oder durch hydrophobe Regionen der Nu-

cleotide ihre Spezifität? Betrachtet man die Struktur und die chemischen Eigenschaften der Moleküle, so sind beide Möglichkeiten nicht recht vorstellbar. Nucleinsäuren besitzen aber spezifische Muster von Wasserstoffbrücken. Crick postulierte daher 1955 20 kleine „Adaptor“-Moleküle, mit denen die 20 Aminosäuren durch 20 verschiedene Enzyme kovalent und energiereich verknüpft werden; die aminosäuretragenen Adaptor-moleküle sollten dann über Wasserstoffbrücken an bestimmte Nucleotidsequenzen der Matrize gebunden werden^[3]. Nach einigen indirekten Hinweisen^[4, 5] wurden in den folgenden Jahren RNA-Fraktionen gefunden^[6, 7], die Aminosäuren kovalent binden und auch alle anderen Eigenschaften der von Crick postulierten Adaptor-moleküle haben. Die Fraktionen wurden zunächst sRNA (soluble RNA) genannt, bis sich später der Name tRNA = Transfer-RNA durchsetzte. Nach der Aufklärung des genetischen Codes und der Struktur einiger tRNAs hat Crick die Adaptor-Hypothese weiter präzisiert (Abb. 1). Sie ist heute zumindest im Prinzip gesichert und bewiesen.

tRNA wurde aus tierischen und pflanzlichen Geweben sowie aus zahlreichen Mikroorganismen isoliert. Es handelt sich immer um Nucleinsäuren im Molekulargewichtsbereich 25000–30000; das entspricht einer Kettenlänge von 75–85 Nucleotiden. Aus dem Ge-

[*] Prof. Dr. H. G. Zachau
Institut für Physiologische Chemie und
Physikalische Biochemie der Universität
8 München 15, Goethestraße 33

[1] Teile dieses Aufsatzes liegen der Richard-Kuhn-Gedächtnisvorlesung zugrunde, die auf der Hauptversammlung der Gesellschaft Deutscher Chemiker im September 1969 in Hamburg gehalten wird.

[2] Abkürzungen nach den Vorschlägen der IUPAC-IUB: tRNA = Transfer-Ribonucleinsäure; tRNA_{Hefe} = Gemisch der tRNAs aus Hefe; tRNA_{Phe} = phenylalanin-spezifische tRNA; Phe-tRNA = mit Phe veresterte („beladene“) tRNA; mRNA = Matrizen-RNA; DNA = Desoxyribonucleinsäure; U = Uridin; A = Adenosin; C = Cytidin; G = Guanosin; pA = 5'-Adenylsäure; Ap oder A- = 3'-Adenylsäure; m²G = 2'-O-Methylguanosin; m⁷G = 7-Methylguanosin; m²G = N(2)-Dimethylguanosin; andere methylierte Nucleoside werden analog abgekürzt; Abkürzungen weiterer seltener Nucleoside siehe in Abb. 2; p oder - bezeichnen Phosphat; RNase = Ribonuclease; DEAE = Diäthylaminoäthyl, fMet = N-Formyl-methionin.

[3] F. H. C. Crick: A note for the RNA tie club. 1955; abgedruckt bei M. B. Hoagland in E. Chargaff u. J. N. Davidson: The Nucleic Acids. Academic Press, New York 1960, Bd. III, S. 400.

[4] T. Hultin u. G. Beskow, Exp. Cell Res. 11, 664 (1956).

[5] R. W. Holley, J. Amer. chem. Soc. 79, 658 (1957).

[6] M. B. Hoagland, P. C. Zamecnik u. M. L. Stephenson, Biochim. biophysica Acta 24, 215 (1957).

[7] K. Ogata u. H. Nohara, Biochim. biophysica Acta 25, 659 (1957).

mischi der tRNAs eines Organismus, z. B. tRNA_{Hefe}, wurden einzelne tRNAs isoliert, wie tRNA_{Hefe}^{Ala} oder tRNA_{Hefe}^{Ser}, die sich in ihrer Struktur voneinander und von den entsprechenden tRNAs anderer Organismen (tRNA_{Coli}^{Ala}, tRNA_{Coli}^{Ser}) unterscheiden. Auch die von

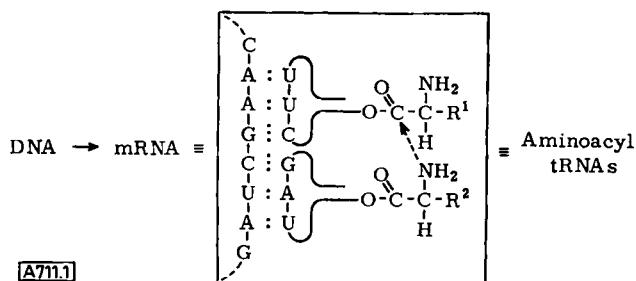
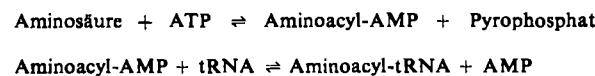


Abb. 1. Schematische Darstellung der Adaptor-Hypothese. Die Aminoacyl-tRNAs werden an der mRNA so aufgereiht, daß die Aminosäuren in der von der mRNA und letztlich von der DNA bestimmten Folge miteinander verknüpft werden können.

Crick postulierten Enzyme wurden gefunden. Es sind die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, die die Reaktionen



katalysieren. Mehrere Synthetasen wurden in reiner Form isoliert. Die tRNA-gebundenen Aminosäuren werden am Matrizen-RNA/Ribosomen-Komplex auf die wachsenden Peptidketten übertragen. (Literatur über Proteinbiosynthese und genetischen Code^[8,9]; Überblick^[10].)

Da die Literatur über Struktur und Funktion von tRNAs in diesem Aufsatz nur zum kleineren Teil zitiert werden kann, sei auf zusammenfassende Aufsätze hingewiesen: Isolierung und Fraktionierung von tRNA siehe^[11, 12]; neuere Sammelwerke mit den wichtigsten Methoden siehe^[13-15]; physikalische Eigenschaften siehe^[16]; biologische Spezifität siehe^[17, 18]; Sequenzanalyse und Primärstruktur siehe^[19-23]; enzymatische Methylierung siehe^[24]; seltene Nucleotide siehe^[25]. Aminosäureester der tRNA siehe^[26]. Einen Überblick über laufende tRNA-Arbeiten geben zwei Symposiumsbände^[9, 27]. – Wenn zu einem Problem mehrere Veröffentlichungen vorliegen, wird in diesem Aufsatz im allgemeinen nur die letzte zitiert.

- [8] H. Matthaei, G. Sander, D. Swan, T. Kreuzer, H. Caffier u. A. Parmeggiani, Naturwissenschaften 55, 281 (1968); F. Lipmann, Science (Washington) 164, 1024 (1969).
- [9] The Genetic Code, 31. Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 1966.
- [10] H. G. Zachau, Münchener med. Wschr. 111, 1513 (1969).
- [11] G. L. Brown, Progr. Nucleic Acid Res. 2, 259 (1963).
- [12] K. S. Kirby, Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular Biology 3, 1 (1964).
- [13] L. Grossman u. K. Moldave, Methods in Enzymol. 12, Part A (1967); Part B (1968).
- [14] G. L. Cantoni u. D. R. Davies: Procedures in Nucleic Acid Research. Harper & Row, New York 1966.
- [15] H. U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, 2. Aufl., im Druck.
- [16] G. Felsenfeld u. H. T. Miles, Annu. Rev. Biochem. 36, 407 (1967).
- [17] K. Miura, Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular Biology 6, 39 (1967).
- [18] G. D. Novelli, Annu. Rev. Biochem. 36, 449 (1967).
- [19] K. Burton, Essays in Biochemistry 1, 57 (1965).

2. Isolierung reiner tRNAs

Für viele chemische und biochemische Untersuchungen an tRNAs braucht man reine, molekulareinheitliche Substanzen. Die Fraktion der „löslichen RNA“, die man aus den Zellen isoliert, enthält mehr als 20 tRNAs und einige andere niedermolekulare RNA-Spezies. Einige wenige tRNAs lassen sich aus dem Ge-

mischi leicht isolieren; die Reindarstellung der meisten tRNAs ist jedoch recht aufwendig. In den Anfangsstadien der tRNA-Forschung war die Gegenstromverteilung die einzige wirksame Trennmethode^[28-30]. Sie ist immer noch die Methode der Wahl, wenn größere Mengen tRNA fraktioniert werden sollen. Verteilungs-, Austauscher- und Adsorptions-Chromatographie sowie verschiedene Kombinationen dieser Methoden haben sich in den letzten Jahren bei der Reindarstellung spezifischer tRNAs bewährt.

Bei keinem der Fraktionierungsverfahren ist das Trennprinzip völlig klar; man weiß nicht, aufgrund welcher struktureller Eigentümlichkeiten die tRNAs voneinander getrennt werden. Kettenlänge und Nucleotidzusammensetzung der in der Gegenstromverteilung langsam wandernden tRNA_{Hefe}^{Ala} sind von denen der schnell, d. h. mit der organischen Phase wandernden tRNA_{Hefe}^{Tyr} oder tRNA_{Hefe}^{Ser} nur wenig verschieden. Man kann diskutieren, daß Reste an definierter Raumstruktur, die die tRNAs im organischen Lösungsmittel vielleicht noch besitzen, für die Trennung verantwortlich sind. Experimentelle Daten dazu liegen nicht vor. Sicher spielt die Raumstruktur der tRNAs bei der Chromatographie an basischen Austauschern eine Rolle. Bei erhöhter Temperatur werden tRNAs später, d. h. mit höherer Salzkonzentration, eluiert als bei Raumtemperatur^[31]. Das ist am einfachsten dadurch zu erklären, daß bei höherer Temperatur die tRNA-Moleküle teilweise entfaltet sind

- [20] U. L. RajBhandary u. A. Stuart, Annu. Rev. Biochem. 35, 759 (1966).
- [21] J. T. Madison, Annu. Rev. Biochem. 37, 131 (1968).
- [22] R. W. Holley, Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular Biology 8, 37 (1968).
- [23] D. Dütting, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 26, 356 (1968).
- [24] E. Borek u. P. R. Srinivasan, Annu. Rev. Biochem. 35, 275 (1966); J. L. Starr u. B. H. Sells, Physiol. Rev. 49, 623 (1969).
- [25] D. B. Dunn u. R. H. Hall in H. A. Sober: Handbook of Biochemistry. The Chemical Rubber Co, Cleveland, Ohio, 1968, S. G-3.
- [26] H. G. Zachau and H. Feldmann, Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular Biology 4, 217 (1965).
- [27] FEBS Symposium 1967: Structure and Function of Transfer RNA and 5S RNA. Universitetsforlaget, Oslo, und Academic Press, New York 1968.
- [28] R. W. Holley u. S. H. Merrill, J. Amer. chem. Soc. 81, 753 (1959).
- [29] H. G. Zachau, M. Tada, W. B. Lawson u. M. Schweiger, Biochim. biophysica Acta 53, 221 (1961).
- [30] B. P. Doctor u. C. M. Connelly, Biochem. biophysic. Res. Commun. 6, 201 (1961).
- [31] D. A. Goldthwait u. D. S. Kerr, Biochim. biophysica Acta 61, 930 (1962).

und damit mehr Phosphatgruppen für die Wechselwirkung mit dem Austauscher zur Verfügung stehen. Da säulenchromatographische Trennungen in Gegenwart von Harnstoff oder von anderen Agentien, die den Internucleotidwechselwirkungen entgegenwirken, besonders gut gelingen^[32], dürfte nicht die ursprünglich vorhandene Raumstruktur der tRNAs das Trennprinzip sein. Wahrscheinlich ist die von tRNA zu tRNA verschiedene Stabilität der Raumstruktur unter den Bedingungen der Gegenstromverteilung sowie der Chromatographie ein wichtiges Trennprinzip; bei einigen tRNAs bleiben größere Teile der Raumstruktur erhalten als bei anderen.

Hydrophobe Seitenketten an einem Nucleotid einer tRNA, z.B. die Isopentenylgruppen in tRNA_{Hefe}^{Ser}^[33], tRNA_{Hefe}^{Tyr}^[21, 34] oder auch tRNA_{Coli}^{Tyr}^[35], tragen dazu bei, daß diese tRNAs in Verteilungsverfahren bevorzugt mit der Oberphase wandern. In gleicher Weise wirkt in tRNA_{Hefe}^{Phe} die hydrophobe Nucleinbase Y⁺, deren Struktur noch nicht bekannt ist. Der Effekt läßt sich hier besonders eindeutig demonstrieren, weil Y⁺ mit Säure aus der tRNA entfernt werden kann, ohne daß dabei die Kette gespalten oder die Raumstruktur der Nucleinsäure wesentlich verändert wird^[36]. Das Umwandlungsprodukt (tRNA_{HCl}^{Phe}) verbleibt bei der Gegenstromverteilung überwiegend in der wäßrigen Phase. Auch bei der Chromatographie an benzoylierter DEAE-Cellulose^[37], deren Trennwirkung zu einem guten Teil auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht, wird tRNA_{HCl}^{Phe} weniger fest gehalten als tRNA^{Phe}.

Es ist überraschend, daß Gruppen, die im Vergleich zum ganzen Molekül sehr klein sind, einen wesentlichen Einfluß auf die Eigenschaften der tRNAs ausüben. Die Befunde können dadurch erklärt werden, daß die hydrophoben Reste an einer exponierten Stelle eines sonst recht kompakten Moleküls lokalisiert sind. Sowohl Y⁺ als auch die Isopentenylgruppen befinden sich in den Anticodonregionen der genannten tRNAs. Auch die 3'-terminale -C-C-A-Sequenz und die tRNA-gebundenen Aminosäuren, die sicher an der Oberfläche des Moleküls liegen, beeinflussen die Eigenschaften. tRNA_{Hefe}^{Ser} mit 3'-terminalem -C-C-A wandert in der Gegenstromverteilung deutlich weiter als die gleiche tRNA mit terminalem -C-C^[38]. Tyr-tRNA^{Tyr} läßt sich durch Chromatographie von der aminosäure-freien tRNA^{Tyr} abtrennen^[39], und

- [32] R. V. Tomlinson u. G. M. Tener, *Biochemistry* 2, 697 (1963).
 [33] H. G. Zachau, D. Dütting u. H. Feldmann, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 347, 212 (1966).
 [34] J. T. Madison, G. A. Everett u. H. Kung, *Science (Washington)* 153, 531 (1966).
 [35] M. L. Gefter u. R. L. Russell, *J. molecular Biol.* 39, 145 (1969).
 [36] R. Thiebe u. H. G. Zachau, *Europ. J. Biochem.* 5, 546 (1968).
 [37] I. Gillam, S. Millward, D. Blew, M. von Tigerstrom, E. Wimmer u. G. M. Tener, *Biochemistry* 6, 3043 (1967).
 [38] P. Lebowitz, P. L. Ipata, M. H. Makman, H. H. Richards u. G. L. Cantoni, *Biochemistry* 5, 3617 (1966).
 [39] I. H. Maxwell, E. Winnier u. G. M. Tener, *Biochemistry* 7, 2629 (1968).

die Substitution einer tRNA-gebundenen Aminosäure mit aromatischen Resten, z.B. der Phenoxyacetylgruppe, erleichtert die Trennung^[40] der beladenen tRNA von den – unbeladenen – tRNAs.

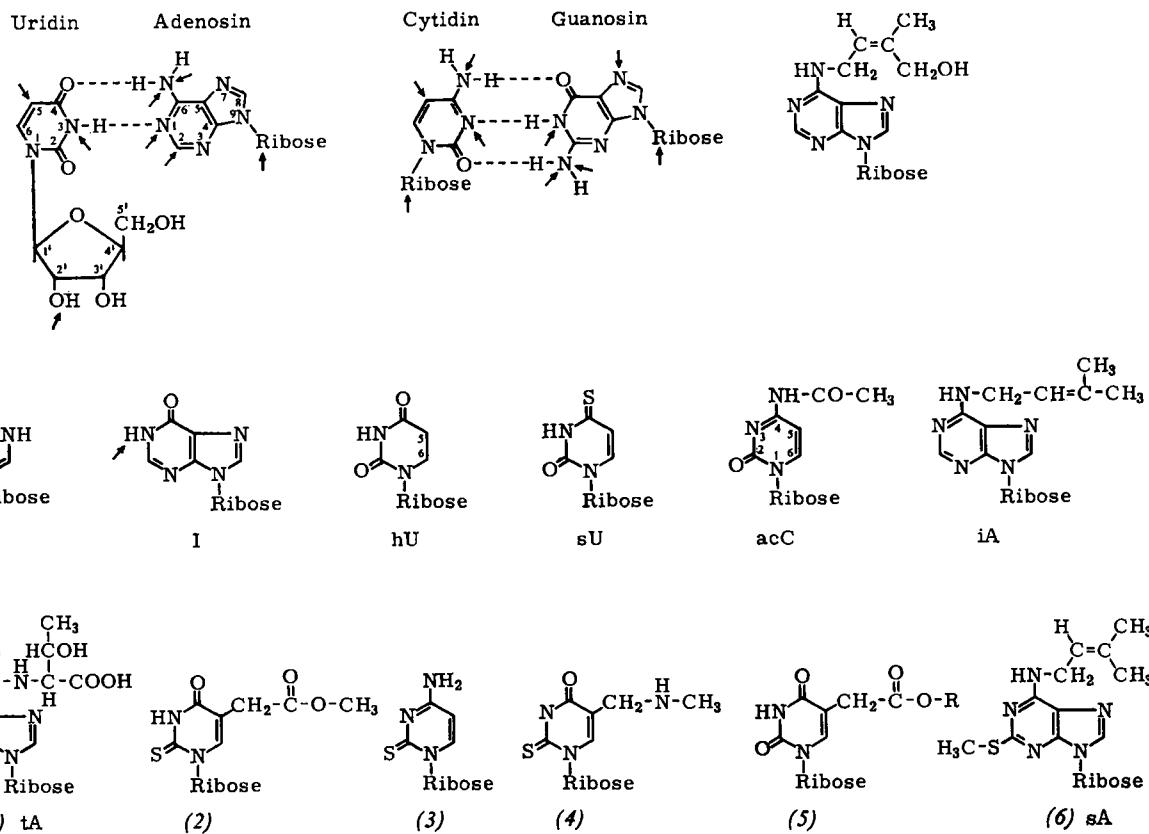
3. Seltene Nucleoside und Biosynthese der tRNA

Außer den in allen RNAs vorkommenden Nucleosiden A, G, U und C enthalten die tRNAs mehr als 30 verschiedene seltene Nucleoside; einige wenige davon wurden auch in der RNA der Ribosomen gefunden. In Abbildung 2 sind die bis Frühjahr 1969 in ihrer Struktur aufgeklärten seltenen Nucleoside zusammengestellt. Zehn bis zwölf weitere seltene Nucleotide wurden gefunden, deren Struktur noch nicht bekannt ist.

Die meisten seltenen Nucleoside leiten sich von den vier Haupt-Nucleosiden durch Methylierung an C, O oder N ab. Dabei wurde eine Methylierung der Base und des Zuckeranteils (2'-O-Methylribose) beobachtet; es konnten Mono- und Dimethyllderivate gefunden werden. In einigen methylierten Nucleosiden ist die Fähigkeit, Wasserstoffbrücken zu bilden, herabgesetzt, in anderen nicht (Abb. 2). Hervorgehoben sei das 5-Ribosyluracil oder Pseudouridin (Y), das statt der N-glykosidischen Bindung eine C-C-Verknüpfung zwischen Base und Ribose besitzt und in allen bisher untersuchten tRNAs vorkommt. Nicht gesondert aufgeführt ist in Abbildung 2 das ebenfalls weit verbreitete Ribo thymidin (T).

tRNAs werden, wie auch die anderen RNAs der Zelle, an bestimmten Cistrons der DNA synthetisiert^[47]. Da man keine Nucleotide in der DNA kennt, die den Einbau seltener Nucleotide an bestimmten Stellen der tRNA-Ketten steuern könnten, nimmt man an, daß zunächst eine völlig unmodifizierte, „jungfräuliche“ tRNA gebildet wird, und die seltenen Nucleotide durch nachträgliche Modifikationen der Kette entstehen. In der neu synthetisierten tRNA fehlen möglicherweise auch die drei bei allen tRNAs gleichen 3'-terminalen Nucleotide C-C-A; in tierischen Zellen und in Mikroorganismen hat man nämlich eine CCA-Pyrophosphorylase gefunden, die die drei Nucleotide in einer DNA-unabhängigen Reaktion an tRNA anhängt.

- [40] I. Gillam, D. Blew, R. C. Warrington, M. v. Tigerstrom u. G. M. Tener, *Biochemistry* 7, 3459 (1968).
 [41] M. P. Schweizer, G. B. Chheda, L. Baczynskyj u. R. H. Hall, *Biochemistry*, 8, 3283 (1969).
 [42] L. Baczynskyj, K. Biemann u. R. H. Hall, *Science (Washington)* 159, 1481 (1968).
 [43] J. Carbon, H. David u. M. H. Studier, *Science (Washington)* 161, 1146 (1968).
 [44] M. W. Gray u. B. G. Lane, *Biochemistry* 7, 3441 (1968).
 [45] W. J. Burrows, D. J. Armstrong, F. Skoog, S. M. Hecht, J. T. A. Boyle, N. J. Leonard u. J. Occolowitz, *Science (Washington)* 161, 691 (1968).
 [46] F. Harada, H. J. Gross, F. Kimura, S. H. Chang, S. Nishimura u. U. L. RajBhandary, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 33, 299 (1968).
 [47] E. Schweizer, C. MacKchnie u. H. O. Halvorson, *J. molecular Biol.* 40, 261 (1969); T. Seno u. S. Nishimura, *Biochim. biophys. Acta* 157, 87 (1968).



A711.2

Abb. 2. In RNA gefundene seltene Nucleoside. Die Pfeile bezeichnen Positionen, an denen Substitution durch Methylgruppen beobachtet wurde. Die Strukturen der in der unteren Reihe aufgeführten Nucleoside wurden 1968 aufgeklärt [(1) [41], (2) [42], (3) und (4) [43], (5) [44], (6) [45, 46]] (Literaturzitate für die anderen Nucleoside s. [25]).

Versuche, tRNA-Vorstufen zu isolieren, befinden sich noch in den Anfängen [48].

Die Bildung einiger seltener Nucleotide hat man genau untersuchen können. Bestimmte Mutanten von Mikroorganismen produzieren in Abwesenheit des Methylgruppen-Donors Methionin eine „untermethylierte“ tRNA, die *in vitro* durch spezifische Methylasen in die vollständig methylierte Form überführt werden kann [24]. Auch Isopentenyl- [49] und Thiogruppen [50, 51] werden in fertige tRNA-Ketten eingeführt. Bei tRNA_{Hefe}^{Ala} enthält ein Teil der Moleküle in Position 48 ein U, ein anderer Teil ein hU [52]. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß hU nach Fertigstellung der tRNA-Kette durch Hydrierung von U entsteht. Andererseits kommt auch C als Muttersubstanz des hU (oder eines während der Aufarbeitung aus Dihydro-C entstandenen hU) infrage, da mehrere tRNAs aus *E. coli* A-G-C anstelle der in tRNAs aus Hefe verbreiteten Sequenz A-G-hU enthalten; auch besitzen die valin-spezifischen tRNAs aus zwei Hefestämmen in

[48] R. H. Burdon u. A. E. Clason, *J. molecular Biol.* 39, 113 (1969); D. Bernhardt u. J. E. Darnell, *J. molekular Biol.* 42, 43 (1969).

[49] F. Fittler, L. K. Kline u. R. H. Hall, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 31, 571 (1968).

[50] R. S. Hayward u. S. B. Weiss, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 55, 1161 (1966).

[51] M. N. Lipsett u. A. Peterkofsky, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 55, 1169 (1966).

[52] R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marquisee, S. H. Merrill, J. R. Penswick u. A. Zamir, *Science* (Washington) 147, 1462 (1965).

analogen Positionen hU und C (s. Abschnitt 4). Ferner spricht die Tatsache, daß der Einbau des U-analogen 5-Fluor-U in tRNA die Bildung von T und Ψ , aber nicht die von hU reduziert [52a], gegen U als Muttersubstanz des hU. Die Umlagerung von U in Ψ nach Einbau in die RNA konnte wahrscheinlich gemacht, aber bisher nicht bewiesen werden [53]. Daß sich das Triphosphat des Pseudouridins *in vitro* in RNA einbauen läßt, spricht nicht gegen die Umlagerung von U in der RNA-Kette, denn die RNA-Polymerase akzeptiert *in vitro* und zum Teil auch *in vivo* zahlreiche Nucleotidanaloga als Substrat.

Über die Funktion der seltenen Nucleotide weiß man noch sehr wenig. Bestimmte Nucleasen können neben einigen seltenen Nucleotiden nicht spalten, so daß man hier an eine Schutzfunktion denken kann. Hypothesen über Zusammenhänge zwischen dem Methylierungsgrad von tRNA und Zell-differenzierung sowie malignem Wachstum [24] konnten nicht bewiesen werden. Isopentenyladenosin und andere N(6)-substituierte Adenosinderivate sind als Verwandte des natürlichen Kinins Zeatin potente Pflanzenwuchsstoffe. Es ist aber unbekannt, ob ein Zusammenhang zwischen der Wuchsstoffwirkung und dem Vorkommen dieser Nucleoside in der tRNA besteht. Die Rolle der seltenen Nucleotide bei der Codon-Erkennung und der Wechselwirkung mit den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wird in Abschnitt 6 diskutiert.

Seltene Nucleotide treten bevorzugt in bestimmten Positionen der tRNAs auf. Man hat aber noch keine Gesetzmäßigkeit in der Primärstruktur gefunden, etwa

[52a] R. Giege, J. Heinrich, J. H. Weil u. J. P. Ebel, *Biochim. biophysica Acta* 174, 43 (1969).

[53] Th. Ginsberg u. F. F. Davis, *J. biol. Chemistry* 243, 6300 (1968).

von der Art, daß Cytidin immer dann methyliert wird, wenn es zwischen mehreren Guanosinresten liegt. Auffallend ist, daß sich die seltenen Nucleotide überwiegend in den Bereichen der tRNAs befinden, die in den Kleeblatt-Modellen (s. Abschnitt 5) einsträngig sind. Sie können dort lokalisiert sein, um bei der Stabilisierung einer bestimmten Raumstruktur zu helfen, oder um bei der Wechselwirkung der tRNAs mit anderen Komponenten des Proteinbiosynthese-Systems mitzuwirken. Andererseits ist es durchaus wahrscheinlich, daß die unmodifizierte tRNA bereits eine ähnliche Raumstruktur besitzt wie die fertige tRNA, und daß die Häufung der seltenen Nucleotide in einsträngigen Bereichen damit zusammenhängt, daß die modifizierenden Enzyme hier besonders gut angreifen können.

Bei der Reindarstellung zahlreicher tRNAs aus *E. coli* und der Untersuchung der Bildung von sA [53a] hat sich kürzlich eine überraschende Regelmäßigkeit herausgestellt: tRNAs mit einem 3'-endständigen A im Anticodon (1. Horizontale des Codekatalogs) haben neben diesem A meist iA oder sA; tRNAs mit einem 3'-endständigen U im Anticodon (3. Horizontale des Codekatalogs) dagegen enthalten meist tA. Die funktionelle Deutung dieses Befundes steht noch aus.

tRNA^{fMet} [62], tRNA^{Met} [63], tRNA^{Val} [64]), aus Rattenleber (tRNA^{Ser} [65]) und aus Weizenkeimlingen (tRNA^{Phe} [66]). Vorläufige Strukturvorschläge wurden für tRNA^{Phe}_{Coli} [67, 68] veröffentlicht sowie Teilsequenzen für tRNA^{Ala}_{Coli} [69] und tRNA^{fMet}_{Hefe} [69a]. An der Aufklärung der Struktur von etwa einem Dutzend weiterer tRNAs wird z. Zt. gearbeitet.

Der erste Schritt der Sequenzanalyse einer Nucleinsäure ist die spezifische enzymatische Spaltung zu kleineren Bruchstücken. Zwei Endonucleasen sind bekannt, die spezifisch neben bestimmten Nucleotiden spalten. Pancreas-RNase spaltet neben den beiden Pyrimidin-Nucleotiden und den meisten von ihnen abgeleiteten seltenen Nucleotiden; die aus einem Mikroorganismus isolierte T1-RNase hydrolysiert die RNA neben G und mehreren G-Derivaten (Abb. 3). Eine spezifisch neben A spaltende Nuclease hat man trotz vieler Bemühungen noch nicht gefunden. Die in Abbildung 3 aufgeführten Exonucleasen haben sich vor allem bei der Ermittlung der Nucleotidsequenz von Oligonucleotiden bewährt, die ihrerseits aus Nucleinsäuren durch Spaltung mit Endonucleasen entstanden waren. Chemische Methoden zum schrittweisen Abbau einer Kette, die in der Proteinchemie

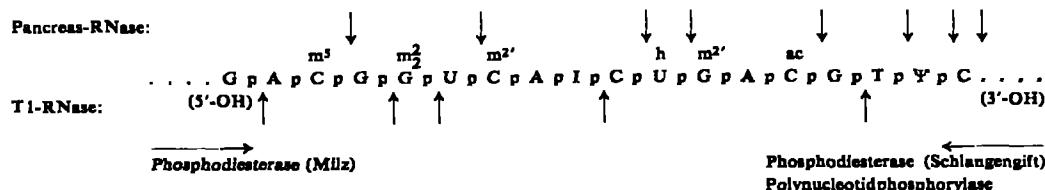


Abb. 3. Eine hypothetische Nucleotidsequenz wird von Endonucleasen an den durch senkrechte Pfeile bezeichneten Stellen gespalten und durch Exonucleasen vom 5'- oder 3'-Hydroxylende her abgebaut.

Tierische tRNA enthält einen höheren Anteil seltener Nucleotide als Hefe-tRNA, die wiederum stärker modifiziert ist als tRNA aus Bakterien. Aber auch die tRNA sehr niederer Organismen, die T4-Phagen-induzierte tRNA, enthält Y [54]. Es fällt schwer anzunehmen, daß die in der Evolution immer weiter verfeinerte Modifizierung der tRNAs nur eine „Laune der Natur“ sei. So bleibt die Suche nach den Funktionen der seltenen Nucleotide eines der interessanteren Probleme der Nucleinsäure-Biochemie.

4. Primärstruktur von tRNAs

Die Aufklärung der Nucleotidsequenzen von tRNAs war ein wesentlicher Fortschritt. Als ersten gelang Holley und seinen Mitarbeitern die Ermittlung der Primärstruktur einer tRNA, und zwar einer tRNA^{Ala}_{Hefe} [52]. Es folgten die Strukturaufklärungen anderer tRNAs aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (tRNA^{Ser}_{I+II} [33], tRNA^{Tyr} [21, 34], tRNA^{Phe} [55], tRNA^{Val} [56]), aus der Hefe *Torulopsis utilis* (tRNA^{Val} [57], tRNA^{Ileu} [58], tRNA^{Tyr} [58a]), aus *Escherichia coli* (tRNA^{Tyr} [59–61],

[53a] S. Nishimura u. H. Ishikura bzw. M. L. Geftier, persönliche Mitteilung.

[54] V. Daniel, S. Sarid u. U. Z. Littauer, Proc. nat. Acad. Sci. USA 60, 1403 (1968).

[55] U. L. RajBhandary, S. H. Chang, A. Stuart, R. D. Faulkner, R. M. Hoskinson u. H. G. Khorana, Proc. nat. Acad. Sci. USA 57, 751 (1967).

[56] A. A. Bayev, T. V. Venkstern, A. D. Mirzabekov, A. I. Krutilina, L. Li u. V. D. Axeirod, Molecular Biol. Moscow 1, 754 (1967).

[57] T. Mizutani, M. Miyazaki u. S. Takemura, J. Biochemistry (Tokyo) 64, 839 (1968).

[58] S. Takemura, M. Murakami u. M. Miyazaki, J. Biochemistry (Tokyo) 65, 489 (1969).

[58a] S. Hashimoto, M. Miyazaki u. S. Takemura, J. Biochemistry (Tokyo) 65, 659 (1969).

[59] H. M. Goodman, J. Abelson, A. Landy, S. Brenner, J. D. Smith, Nature (London) 217, 1019 (1968).

[60] B. P. Doctor, J. E. Loebel, M. A. Sodd u. D. B. Winter, Science (Washington) 163, 693 (1969).

[61] U. L. RajBhandary, S. H. Chang, H. J. Gross, F. Harada, F. Kimura u. S. Nishimura, Federat. Proc. 28, 409 (1969).

[62] S. K. Dube, K. A. Marcker, B. F. C. Clark u. S. Cory, Nature (London) 218, 232 (1968).

[63] S. Cory, K. A. Marcker, S. K. Dube u. B. F. C. Clark, Nature (London) 220, 1039 (1968).

[64] M. Yaniv u. B. G. Barrell, Nature (London) 222, 278 (1969).

[65] M. Staehelin, H. Rogg, B. C. Baguley, T. Ginsberg u. W. Wehrli, Nature (London) 219, 1363 (1968).

[66] B. S. Dudock, G. Katz, E. K. Taylor u. R. W. Holley, Proc. nat. Acad. Sci. USA 62, 941 (1969).

[67] B. G. Barrell u. F. Sanger, FEBS Letters 3, 275 (1969).

[68] M. Uziel u. H. G. Gassen, Federat. Proc. 28, 409 (1969).

[69] C. G. Alvino, L. Remington u. V. M. Ingram, Biochemistry 8, 282 (1969).

[69a] U. L. RajBhandary u. H. P. Ghosh, J. biol. Chemistry 244, 1104 (1969).

eine große Rolle spielen, ließen sich auf dem Nucleinsäuregebiet noch nicht so weit entwickeln, daß sie allgemein anwendbar sind und über eine größere Zahl

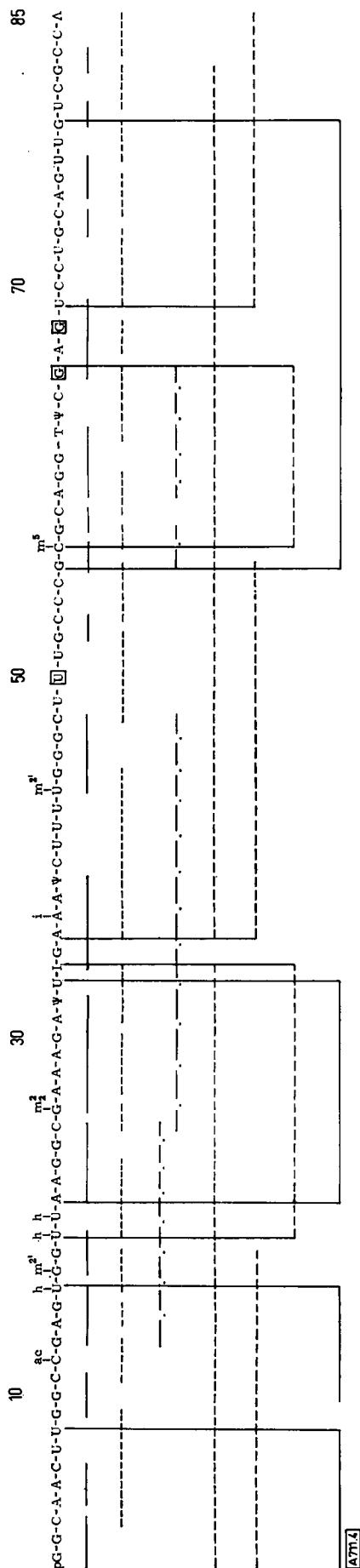


Abb. 4. Sequenzanalyse von tRNA_{Asp} aus Hefe. Bei vollständiger Spaltung mit Pancreas- und T1-Ribonuclease entstehen Oligonucleotide (—) bzw. (— — — in der 1. und 2. Strichreihe) sowie Mononucleotide. Aus „überlappenden“ Oligonucleotiden lassen sich längere Sequenzen konstruieren (— · — · —). Die folgenden drei Strichreihen symbolisieren Fragmente aus partiellen Nucleaseabspaltungen (vgl. Text). In tRNA_{Asp} sind die in der Abbildung eingerahmten Nukleotide in Position 50, 66 und 68 durch C, A und A ersetzt.

von Schritten geführt werden können. Über erste Erfolge ist berichtet worden [69b].

Hat man die Nucleotidsequenzen aller Oligonucleotide aus Pancreas- und T1-RNase-Spaltungen einer tRNA aufgeklärt, so kann man durch Vergleich der Sequenzen größere Bruchstücke der ursprünglichen Nucleinsäurekette rekonstruieren. Das wird in Abbildung 4 am Beispiel der Sequenzanalyse von tRNA_{II}^{Ser} aus Hefe gezeigt. Über Bruchstücke einer Länge von etwa 20 Nucleotiden kommt man durch derartige Vergleiche jedoch nicht hinaus. Die Nucleinsäureforschung ist bei dem Puzzlespiel der Sequenzanalyse in einer schwierigeren Lage als die Proteinchemie. Die spezifischen Proteasen, die neben 2 oder 3 von 20 verschiedenen Aminosäuren spalten, führen im Durchschnitt zu größeren Spaltprodukten als die Nucleasen, die neben 1 oder 2 von 4 verschiedenen Nucleotiden spalten. So läßt sich die Aminosäuresequenz eines Proteins im allgemeinen aus dem Vergleich mehrerer Reihen von Peptiden ableiten, die bei der vollständigen Spaltung mit spezifischen Proteasen entstanden sind.

Bei den Nucleinsäuren sind zusätzliche Methoden notwendig. Bewährt hat sich vor allem die partielle Spaltung mit Endonucleasen, die zu größeren Nucleinsäurefragmenten führt. Die Methode beruht darauf, daß in der Raumstruktur einer tRNA bestimmte Nucleotidsequenzen stärker exponiert und damit dem Angriff von Nucleasen mehr ausgesetzt sind als andere. Unter milden Spaltungsbedingungen entsteht ein sehr komplexes Gemisch größerer und kleinerer Fragmente. Isoliert man die Fragmente und spaltet sie anschließend mit der Nuclease vollständig, so findet man, welche Oligonucleotide in einem bestimmten Bereich der tRNA einander benachbart sind. Bei der tRNA_{Hefe}^{Ser} mußten 30–40 Fragmente analysiert werden [70], bis alle Überlappungsstellen gesichert waren. Einige für den Strukturbeweis wichtige Fragmente sind in Abbildung 4 eingezeichnet.

Zu den ersten vollständigen Sequenzanalysen von tRNAs, in deren Verlauf noch die Methoden ausgearbeitet werden mußten, wurden einige hundert Milligramm reiner tRNA gebraucht. Die Oligonucleotide wurden durch Säulenchromatographie getrennt; die Produkte der anschließenden Spaltungen wurden durch ihr Verhalten bei Papierchromatographie und Elektrophorese sowie durch ihre UV-Spektren identifiziert. Auch auf der letzten Abbaustufe, der der Nucleoside, war noch genügend Material vorhanden, um unbekannte seltene Nucleoside zu charakterisieren. So konnten bei der Sequenzanalyse der tRNA_{Hele}^{Ser} die bis dahin unbekannten Nucleoside iA und acC (Abb. 2) durch Massenspektrometrie und Kernresonanzmessungen^[71] bzw. durch Abbau und Synthese^[72] aufge-
 gefunden werden.

[69b] *H. L. Weith* u. *P. T. Gilham*, J. Amer. chem. Soc. 89, 5473 (1967); *M. Uziel* u. *J. X. Khym*, Biochemistry, 8, 3254 (1969).

[70] D. Dütting, H. Feldmann u. H. G. Zachau, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 347, 249 (1966).

[71] K. Biemann, S. Tsunakawa, J. Sonnenbichler, H. Feldmann, D. Dütting u. H. G. Zachau, *Angew. Chem.* 78, 600 (1966); *Angew. Chem. internat.* 5, 590 (1966).

[72] H. Feldmann, D. Dütting u. H. G. Zachau, *Hoppe-Seyler Z.*

klärt werden. iA wurde übrigens gleichzeitig auch aus unfaktionierter tRNA isoliert und aufgeklärt [73].

Heute dürfte man bei Anwendung der erwähnten Methoden der Sequenzanalyse mit 40–60 mg reiner tRNA auskommen, wenn man nicht zur Aufklärung eines besonders komplizierten seltenen Nucleosids mehr Material benötigt. Wesentlich weniger tRNA braucht man, wenn man mit radioaktiven Substanzen arbeitet. Es wurden Methoden zur Sequenzanalyse von ^{32}P -markierten Nucleinsäuren ausgearbeitet [74], die sich u.a. bei der Aufklärung von fünf tRNAs aus *E. coli* bewährt haben [59, 62–64, 67]. Oligo- und Mononucleotide werden durch Radioautographie sichtbar gemacht und durch ihr Verhalten in zweidimensionalen Elektrophoresesystemen identifiziert. Damit ist, von der Materialersparnis abgesehen, ein großer Zeitgewinn verbunden. Schwierigkeiten treten nur dann auf, wenn unbekannte seltene Nucleotide gefunden werden, da die Substanzmengen, mit denen man arbeitet, im allgemeinen nicht für ein UV-Spektrum, und schon gar nicht einmal für chemische Abbaureaktionen ausreichen. Außerdem lassen sich Nucleinsäuren mit genügender spezifischer Radioaktivität aus höheren Organismen nur sehr viel schwieriger gewinnen als aus Mikroorganismen.

Denkbar ist eine Kombination der konventionellen und der radioaktiven Methoden mit Hilfe des Enzyms Polynucleotid-Kinase [75], das Phosphat auf die 5'-Hydroxygruppen von Oligonucleotiden überträgt. Hat man nur geringe Mengen einer nicht radioaktiven Nucleinsäure, so kann man die aus ihr gewonnenen Spaltprodukte mit ^{32}P markieren [76] und nach den Sangerschen Methoden charakterisieren. Wesentlich umständlicher dürfte der ebenfalls erprobte Weg sein, nicht radioaktive Oligonucleotide durch Neutronenbeschuß radioaktiv zu machen [76a].

Die Nucleotidsequenzen der bisher bekannten tRNAs zeigen charakteristische Ähnlichkeiten und Verschiedenheiten. In Abbildung 5 sind die Sequenzen so angeordnet, daß die Ähnlichkeiten deutlich werden. Auffallend ist zunächst, daß seltene Nucleotide wie hU, m^2G und m^5C bevorzugt in analogen Regionen der tRNAs auftreten. Auch einige charakteristische Abstände sind in vielen tRNAs gleich oder ähnlich, so der Abstand zwischen m^2G und dem Anticodon und derjenige zwischen der in allen tRNAs gefundenen Sequenz G–T– Ψ –C und dem 3'-terminalen C–C–A. Ähnlichkeiten und Verschiedenheiten der Sequenzen werden in den folgenden Abschnitten im Zusammenhang mit der Raumstruktur und den Funktionen der tRNAs diskutiert.

Die Oligonucleotide einer tRNA_{Ser} aus amerikanischer Bäckerhefe [77] sind identisch mit denen von tRNA_{II} aus

[73] R. H. Hall, M. J. Robins, L. Stasiuk u. R. Thedford, J. Amer. chem. Soc. 88, 2614 (1966).

[74] F. Sanger, G. G. Brownlee u. B. G. Barrell, J. molecular Biol. 13, 373 (1965).

[75] C. C. Richardson, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 158 (1965).

[76] H. P. Voigt, R. E. Streeck u. H. G. Zachau, noch unveröffentlicht.

[76a] G. W. Rushizky u. W. W. Miller, Analyt. Biochem. 20, 181 (1967).

deutscher Bäckerhefe [33] (beides *Saccharomyces cerevisiae*). Nach einer Diskussion über die von Holley und Mitarbeitern ermittelte Sequenz einer tRNA_{Heft}^{Ala} wurde diese tRNA kürzlich aus dem gleichen Ausgangsmaterial, aber nach einem etwas veränderten Verfahren, isoliert; die so gewonnene tRNA_{Heft}^{Ala} ist um ein Nucleotid länger (ein G ist zwischen Position 47 und 48 einzusetzen) und enthält in Position 48 statt des Gemisches aus U und hU nur U [77a]. Zwischen tRNAs aus verschiedenen Hefestämmen wurden Sequenzunterschiede gefunden. tRNA^{Val} aus der Hefe *Torulopsis utilis* [57] unterscheidet sich an einigen Stellen von der in Abbildung 5 aufgeführten tRNA^{Val} aus *Saccharomyces* [56]: In der hU-Region wurde die Sequenz A-G-hU-hU-G-G-hU-C-A-U gefunden; außerdem ist die tRNA um zwei Nucleotide kürzer, nämlich um das hU in der S-Region und das G in Position 12 vom 3'-terminalen A aus. tRNA^{Tyr} aus *Torulopsis* [58a] unterscheidet sich bei gleicher Kettenlänge in sieben Positionen von tRNA^{Tyr} aus *Saccharomyces* [34].

Für tRNA^{Tyr}_{Coli} und tRNA^{Phe}_{Coli} wurden von zwei Arbeitsgruppen [60] bzw. [68] Sequenzen gefunden, die von den in Abbildung 5 und 6 gezeigten etwas abweichen. Ob das Vorliegen verschiedener multipler tRNAs die Ursache der Unterschiede ist, muß noch geklärt werden. Über Unterschiede in den seltenen Nucleotiden, die bei tRNAs aus *E. coli* durch verschiedene Wachstumsbedingungen hervorgerufen werden können, soll im Zusammenhang mit der Multiplizität von tRNAs (Abschnitt 7) gesprochen werden.

5. Raumstruktur von tRNAs

tRNAs liegen in wässriger Lösung sicher nicht als langgestreckte oder als willkürlich geknäulte Fadenmoleküle vor. Der beste Hinweis darauf, daß tRNAs eine definierte Raumstruktur besitzen, ist die Tatsache, daß sie sich (reversibel) denaturieren lassen. Wie bei den Proteinen gibt es bei den tRNAs eine oder mindestens eine native, biologisch aktive Form und eine oder mehrere inaktive denaturierte Formen [78, 79].

Da noch von keiner tRNA die genaue Raumstruktur bekannt ist, behilft man sich mit Modellen. Holley und Mitarbeiter hatten gleich nach Aufklärung der Primärstruktur von tRNA_{Heft}^{Ala} erkannt, daß bestimmte Bereiche der Nucleotidsequenz mit anderen Bereichen des gleichen Moleküls unter Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren (A:U, G:C) zusammentreten können [52]. Sie schlugen drei mögliche Modelle vor, ein langgestrecktes, ein gewinkeltes und ein kleeblattförmiges. Keines der Modelle hat gegenüber den anderen etwa den eindeutigen Vorzug, daß ein besonders hoher Prozentsatz der Nucleotide gepaart ist und sich damit in einem energetisch begünstigten Zustand befindet. Auch für die meisten anderen tRNAs bekannter Primärstruktur lassen sich mehrere alternative Modelle konstruieren. Kleeblatt-Modelle (Abb. 6) wurden jedoch von der Aufklärung der ersten Sequenzen an bevorzugt, zunächst vor allem aus ästhetischen Gründen.

[77] F. A. Neelon, M. Molinaro, H. Ishikura, L. B. Sheiner u. G. L. Cantoni, J. biol. Chemistry 242, 4515 (1967).

[77a] C. R. Merrill, Biopolymers 6, 1727 (1968).

[78] T. Lindahl, A. Adams u. J. R. Fresco, Proc. nat. Acad. Sci. USA 55, 941 (1966).

[79] W. J. Gartland u. N. Sueoka, Proc. nat. Acad. Sci. USA 55, 948 (1966).

		5'-terminaler Bereich		hU-Bereich		h			
		m ¹	G G C G C G U A G U C	b	h	h	A G C G C		
tRNA _{Ala} Hefe	(77)	pG G G C G U G U	G G C G C G U A G U C	ac	h ₁	m ²	h	A G C G C	
tRNA _{Ser} Hefe II	(85)	pG G C A A C U U	G G C C G A G U	ac	h ₁	m ²	h	A A G G C	
tRNA _{Ser} Ratte	(85)	pG U A G U C G U	G G C C G A G U	m ²	h	m ²	h	A A G G C	
tRNA _{Tyr} Hefe	(78)	pC U C U C G G U	A G C C A A G U U	S	h h	m ²	h h	G G U U U A A G G C	
tRNA _{Tyr} Coli I su-	(85)	pG G U G G G G U	U C C C C G	S	A G C	m ²	G G C C A A A G G G		
tRNA _{Phe} Hefe	(76)	pG C G G A U U U	A G C U C	A G U U	h h	GGG	A G A G C		
tRNA _{Phe} Weizen	(76)	pG C G G G G A U	A G C U C	A G U U	h h	GGG	A G A G C		
tRNA _{Phe} Coli	(76)	pG C C C G G A U	A G C U C	A G U C	h	GGG	A G A G C		
tRNA _{Val} Hefe	(77)	pG G U U U C G U	GGU C Y	A G U C	h h	GGG	A G A G C		
tRNA _{Val} Coli	(76)	pG G G U G A U U	A G C U C	A G C U	h	GGG	A G A G C		
tRNA _{Met} Coli	(77)	pG G C U A C G U	A G C U C	A G U U	h h	GGG	A G A G C		
tRNA ^f _{Met} Coli	(77)	pG G C G G G G U	GG A G C	A G C C U G G U	h h	A G C U C			
tRNA _{Ileu} Hefe	(77)	pG G U C C C U U	GG C C C	A G U U	h h	GGG	A A G G C		
		11 8 6 7 13	6 12 11 13	13 13 10 6	13 13 8 7	13 13 12 12			
Anticodon-Bereich									
tRNA _{Ala} Hefe		m ²	G C U C C C U U I G C I Y G G G A G	m ¹	A G U				
tRNA _{Ser} Hefe II		m ²	G A A A G A Y U U I G A A A Y C U U U	i	m ²	U G G G C U U U G C C C G			
tRNA _{Ser} Ratte		m ²	G A Y G G A C U I G A A A Y C C A U	m ³ i m ²	m ²	U G G G G U C U C C C G			
tRNA _{Tyr} Hefe		m ²	G C A A G A C U G Y A A A Y C U U G	i	A G A U	h			
tRNA _{Tyr} Coli I su-		S	A G C A G A C U G + U A A A Y C U G C	A G C A U C G A C U U					
tRNA _{Phe} Hefe		m ²	G C C A G A C U G A A Y A Y C U G G	m ² m ² m ⁵	A G G U C				
tRNA _{Phe} Weizen		m ²	G Y C A G A C U G A A Y A Y C U G A	m ² m ²	A G G U				
tRNA _{Phe} Coli		S	A G G G G A Y U G A A A A Y C C C C		G U G X				
tRNA _{Val} Hefe			A Y C U G C Y U I A C A C G C A G A		A C U	h			
tRNA _{Val} Coli			A C C U C C C U X A C A A G G A G G	m ⁶	GGG U				
tRNA _{Met} Coli			A C A U C A C U C + A U A + A Y G A U G		G G G X				
tRNA ^f _{Met} Coli			G U C G G G C U C A U A A C C C G A	m ²	A G G U				
tRNA _{Ileu} Hefe		m ²	G Y G G U G C U I A U A A C G C C A	t	A G A U	h			
		8 6 9 8 9 13	8 7 11 11 8 9	6	7 11 8 6				
T ^Y C-Bereich									
tRNA _{Ala} Hefe			C U C C G G T Y C G A U U U C C G G A		C U C G U C C A C C A				
tRNA _{Ser} Hefe II		m ⁵	C G C A G G T Y C G A G U C C U G C		A G U U G U C G C C A				
tRNA _{Ser} Ratte		m ⁵	C G C A G G T Y C G A A U U C C U G C	m ¹	C G A C U A C G C C A				
tRNA _{Tyr} Hefe		m ⁵	C G G G C G T Y C G A C U C G C C C	m ¹	C C G G G A G A C C A				
tRNA _{Tyr} Coli I su-			C G A A G G T Y C G A A U U C C U U C		C C C C A C C A C C A				
tRNA _{Phe} Hefe		m ⁵	C U G U G T Y C G A U C C A C A G	m ¹	A A U U C G C A C C A				
tRNA _{Phe} Weizen			C G C G U G T Y C G A U C C A C G C	m ¹	U C A C C G C A C C A				
tRNA _{Phe} Coli			C C U U G G T Y C G A U U U C C G A G		U C C G G G C A C C A				
tRNA _{Val} Hefe		m ⁵	C C C C A G T Y C G A U C C U G G G	m ¹	C G A A A U C A C C A				
tRNA _{Val} Coli			C G G C G G T Y C G A U U C C C G U C		A U C A C C C A C C A				
tRNA _{Met} Coli			C A C A G G T Y C G A A U U C C C G U		C G U A G G C C A C C A				
tRNA ^f _{Met} Coli			C G U C G G T Y C A A A U C C G G C		C C C C G C A A C C A				
tRNA _{Ileu} Hefe		m ⁵	C A G C A G T Y C G A U C C U G C U	m ¹	A G G G A C C A C C A				
		13 7	8 13 13 13 13 12 13 7 8 13 8 6 7 7		7	6 11 11 13 13 13			

Abb. 5. Vergleich der Nucleotidsequenzen von tRNAs. (Literaturzitate sind im Text angegeben.) Die Zahlen in Klammern bezeichnen die Kettenlänge. Noch unbekannt sind die folgenden seltenen Nucleoside: G⁺ in tRNA_{Coli}^{Tyr}, Y in tRNA_{Hefe}^{Phe}, Yw in tRNA_{Weizen}^{Phe}, X in tRNA_{Coli}^{Met} und C⁺, A⁺ und X in tRNA_{Coli}^{Met} (A⁺ ist tA in einer tRNA_{Coli}; S. Nishimura, H. Ishikura, pers. Mitt.). Die von den hier gezeigten Sequenzen der tRNA_{Val}^{Hefe} [56], tRNA_{Tyr}^{Coli} I su- [59] und tRNA_{Phe}^{Coli} [67] abweichenden Sequenzen sind im Text diskutiert. Unterstrichen sind die Bereiche, die in Kleeblatt-Modellen (vgl. Abb. 6) zweisträngig sind. Die untere Zahlenreihe gibt die Häufigkeit bestimmter Hauptnucleotide einschließlich der von ihnen abgeleiteten seltenen Nucleotide in analogen Positionen der Ketten an.

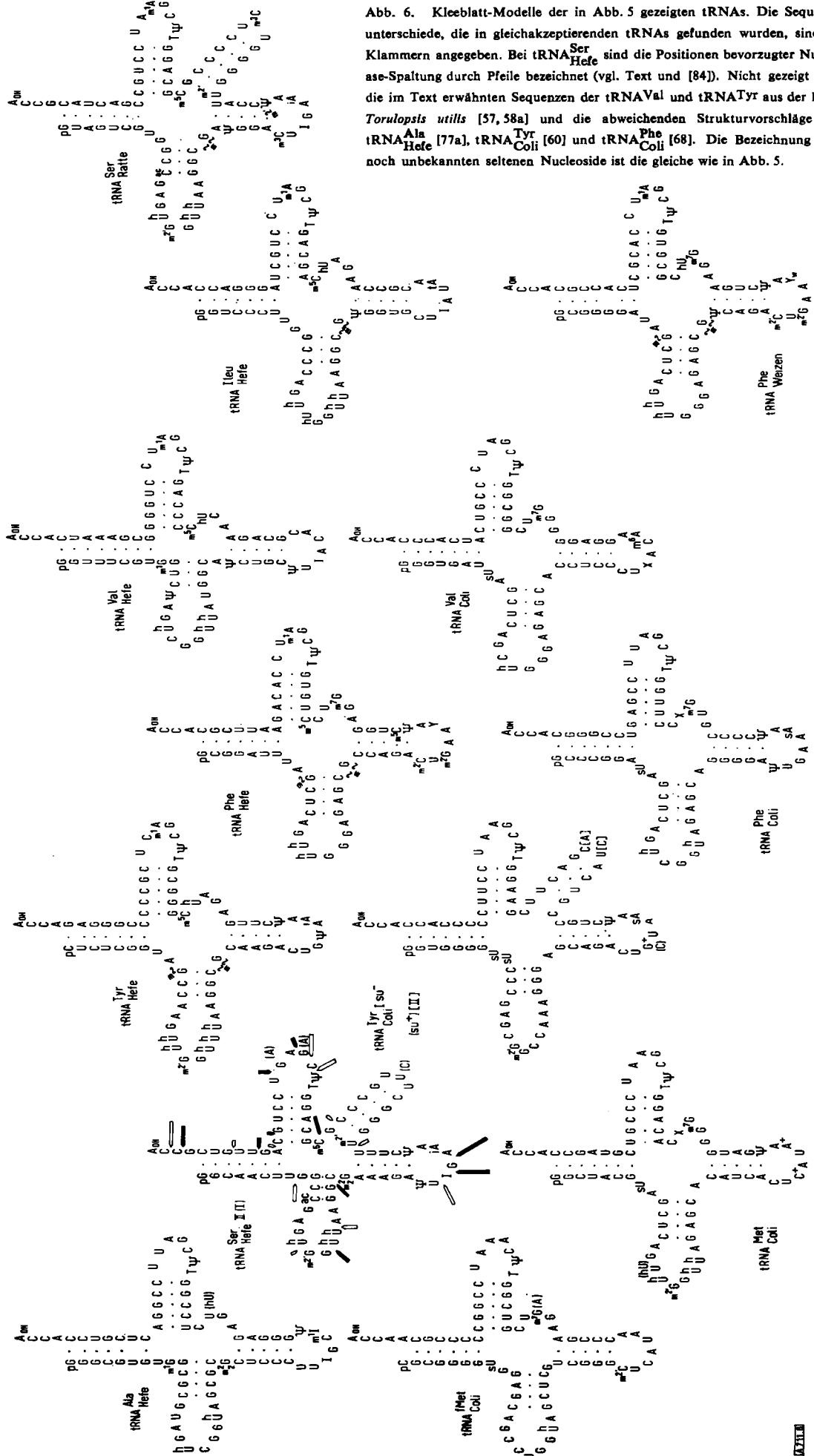


Abb. 6. Kleeblatt-Modelle der in Abb. 5 gezeigten tRNAs. Die Sequenzunterschiede, die in gleichakzeptierenden tRNAs gefunden wurden, sind in Klammern angegeben. Bei tRNA^{Ser}_{Hefe} sind die Positionen bevorzogter Nuclease-Spaltung durch Pfeile bezeichnet (vgl. Text und [84]). Nicht gezeigt sind die im Text erwähnten Sequenzen der tRNA^{Val} und tRNA^{Tyr} aus der Hefe *Torulopsis utilis* [57, 58a] und die abweichenden Strukturvorschläge für tRNA^{Ala}_{Hefe} [77a], tRNA^{Tyr}_{Coli} [60] und tRNA^{Phe}_{Coli} [68]. Die Bezeichnung der noch unbekannten seltenen Nucleoside ist die gleiche wie in Abb. 5.

den. Mittlerweile gibt es auch experimentelle Hinweise dafür, daß zumindest Teile des Kleeblatt-Modells richtig sind.

Für die Kleeblatt-Modelle spricht u.a. die Tatsache, daß sich alle bisher aufgeklärten tRNAs in dieser Form anordnen lassen, obwohl die Nucleotidsequenzen speziell in den gepaarten Bereichen sehr verschieden sind. In der Evolution, die z.B. tRNA_{Ratte}^{Ser} mit tRNA_{Hefe}^{Ser} (19 Nucleotide verschieden) und tRNA_{Weizen}^{Phe} mit tRNA_{Hefe}^{Phe} (13 Nucleotide verschieden) verbindet, muß nach der ersten mutationsbedingten Änderung in einem gepaarten Bereich ein Selektionsdruck für eine Änderung des gegenüberstehenden Nucleotids bestanden haben, damit die Basenpaarung wieder „paßt“^[66]. Den Gedankengang kann man von den gleichakzeptierenden tRNAs verschiedener Organismen auch auf die verschiedenen tRNAs eines Organismus ausdehnen, wenn man deren Entwicklung aus einer Ur-tRNA annimmt^[80,81]. Die weitgehende Konstanz der Länge der gepaarten Bereiche bei veränderter Nucleotidzusammensetzung ist nur zu erklären, wenn diese Teile der Kleeblatt-Modelle Elemente der wirklichen Raumstruktur sind.

tRNAs sind jedoch mit Sicherheit keine planaren Scheibchen. Die Kleeblatt-Modelle (und andere zweidimensionale Modelle) kann man so falten, daß die einsträngigen Bereiche der Schleifen miteinander und mit der 3'-terminalen C-C-A-Sequenz weitere Basenpaare bilden können. Durch das Falten entstehen mehr oder minder kompakte räumliche Modelle, aus denen der Anticodon-Bereich und das aminosäuretragende 3'-terminale A herausragen. Dreidimensionale Modelle sind von mehreren Autoren diskutiert worden (z.B. ^[82-86] s. u.).

Es hat sich eingebürgert, gepaarte und damit helicale Bereiche als Elemente der Sekundärstruktur zu bezeichnen und jede Festlegung der gepaarten Bereiche im Raum, z.B. durch nicht-gepaarte Bereiche, als Ausdruck der Tertiärstruktur zu betrachten. Basenpaarungen durch Wasserstoffbrücken sind mit Sicherheit nicht die einzigen, die Raumstruktur stabilisierenden Kräfte. Das coplanare Übereinanderlagern der Basen („stacking“) dürfte einen wesentlichen Beitrag leisten. So konnten Fuller und Hodgson^[87] durch Vergleich von Nucleotidsequenzen mehrerer tRNAs und durch Bauen von Modellen wahrscheinlich machen, daß in der Anticodon-Region der tRNAs ein derartig durch Übereinanderstapeln von Purinbasen

- [80] T. H. Jukes, Biochem. biophysic. Res. Commun. 24, 744 (1966).
- [81] L. E. Orgel, J. molecular Biol. 38, 381 (1968).
- [82] R. W. Holley, Sci. American 214, Nr. 2, S. 30 (1966).
- [83] C. R. Cantor, S. R. Jaskunas u. I. Tinoco jr., J. molecular Biol. 20, 39 (1966).
- [84] H. G. Zachau, D. Dütting, H. Feldmann, F. Melchers u. W. Karau, in [9], S. 417.
- [85] F. Cramer, H. Doeppner, F. v. d. Haar, E. Schlimme u. H. Seidel, Proc. nat. Acad. Sci. USA 61, 1384 (1968).
- [86] W. Guschlbauer, Nature (London) 209, 258 (1966); L. O. Fröholm u. B. R. Olsen, FEBS Letters 3, 182 (1969); G. Melcher, ibid. 3, 185 (1969); M. Staehelin, Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. 1969, im Druck; W. Fuller, S. Arnott u. J. Creek, Nature (London) 1969, im Druck; J. Ninio, A. Favre u. M. Yaniv, ibid. 1969, im Druck.
- [87] W. Fuller u. A. Hodgson, Nature (London) 215, 817 (1967).

stabilisierter Bereich vorkommt. Diese Modelle kommen der Wirklichkeit sicher näher als die zweidimensionalen Kleeblatt-Modelle mit den sieben ungepaarten Nucleotiden in der Anticodon-Schleife (Abb. 6). Betrachtet man nur die Basenpaarung, so würde man z.B. bei tRNA_{Hefe}^{Ser} den Stamm der Anticodon-Schleife um ein Basenpaar (A:Ψ; vgl. Abb. 6) verlängern und nur fünf Nucleotide ungepaart lassen. Mit Hilfe der das „stacking“ berücksichtigenden Modelle dagegen kann man die Anticodon-Bereiche aller tRNAs, einschließlich der tRNA_{Hefe}^{Ser}, gleich konstruieren. Das erste A der Anticodon-Schleife dieser tRNA dürfte in das „stacking“ einbezogen sein, statt mit dem gegenüberstehenden Ψ zu paaren. – Die durch „stacking“ stabilisierten einsträngigen Bereiche sind wahrscheinlich ähnlich starr wie die zweisträngigen Bereiche der tRNAs. Es ist daher nicht sinnvoll, die soeben erwähnte Konvention der Trennung von Sekundär- und Tertiärstruktur streng durchzuführen.

An Versuchen, die Raumstruktur von tRNAs mit physikalischen Methoden zu untersuchen, hat es nicht gefehlt. Nur ein kleiner Teil der Arbeiten kann hier zitiert werden: Kernresonanzspektroskopie^[88], Elektronenspinresonanz^[89], Temperatursprungmethoden^[90a], IR-Spektroskopie^[90b], Verfolgung der Temperaturabhängigkeit der Hyperchromizität („Schmelzkurven“)^[90], optische Rotationsdispersion^[83,91], Circulardichroismus^[92], Fluoreszenzpolarisierung^[93], Phosphoreszenzspektren^[94,95], Sedimentationsverhalten in der Ultrazentrifuge^[96,97], Strömungsdoppelbrechung^[98], Röntgenkleinwinkelstreuung^[99], vorläufige röntgenographische Untersuchungen an tRNA-Gel-Fäden^[100], Messung der Austauschkinetik mit ³H₂O^[101], Elektronenmikroskopie^[101a], Untersuchung der chromatographischen Eigenschaften^[102] und der Kinetik des enzymatischen Ab-

[88] I. C. P. Smith, T. Yamane u. R. G. Shulman, Canad. J. Biochem. 47, 480 (1969); M. Cohn, A. Danchin u. M. Grunberg-Manago, J. molecular Biol. 39, 199 (1969).

[89] B. M. Hofman, P. Schofield u. A. Rich, Proc. nat. Acad. Sci. USA 62, 1195 (1969).

[90] D. Riesner, R. Römer u. G. Maass, Biochem. biophysic. Res. Commun. 35, 369 (1969).

[90a] W. Wintermeyer, R. Thiebe, H. G. Zachau, D. Riesner, R. Römer u. G. Maass, FEBS Letters, im Druck.

[90b] K. Morikawa, M. Tsuboi, Y. Kyogoku, T. Seno u. S. Nishimura, Nature 223, 537 (1969).

[91] J. N. Vournakis u. H. A. Scheraga, Biochemistry 5, 2997 (1966).

[92] H. Hashizume u. K. Imahori, J. Biochemistry (Tokyo) 61, 738 (1967); J. T. Yang u. T. Samejima, Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular Biology 9, 223 (1969).

[93] D. B. Millar, Biochim. biophysica Acta 174, 32 (1969); K. Beardsley u. C. R. Cantor, noch unveröffentlicht.

[94] R. F. Steiner, D. B. Millar u. K. C. Hoerman, Arch. of Biochem. Biophysics 120, 464 (1967).

[95] C. Hélène, M. Yaniv u. J. W. Elder, Biochem. biophysic. Res. Commun. 31, 660 (1968).

[96] D. D. Henley, T. Lindahl u. J. R. Fresco, Proc. nat. Acad. Sci. USA 55, 191 (1966).

[97] H. Kajii u. Y. Tanaka, Biochim. biophysica Acta 138, 642 (1967).

[98] V. N. Tsvetkov, L. L. Kisselev, S. Y. Lyubina, L. Y. Frolova, S. I. Klenin, V. S. Skaska u. N. A. Nikitin, Biochimija 30, 302 (1965).

[99] J. A. Lake u. W. W. Beeman, J. molecular Biol. 31, 115 (1968).

[100] B. P. Doctor, W. Fuller u. N. L. Webb, Nature (London) 221, 58 (1969).

[101] R. R. Gant, S. W. Englander u. M. V. Simpson, Biochemistry 8, 475 (1969).

[101a] L. O. Fröholm u. B. R. Olsen, J. molecular. Biol. 40, 305 (1969).

[102] R. Stern, L. E. Zutra u. U. Z. Littauer, Biochemistry 8, 313 (1969).

baus [103, 104] von verschiedenen tRNA-Präparaten haben zu mehr oder weniger detaillierten Aussagen über die Raumstruktur von tRNAs geführt. Es stellte sich heraus, daß die Struktur sich mit der Temperatur, dem Gehalt der Lösung an ein- und zweiwertigen Ionen, dem pH-Wert usw. ändert, und daß sie bei unbeladener tRNA, Aminoacyl-tRNA und Peptidyl-tRNA verschieden ist. Die Aussage über das Ausmaß an Basenpaarung und „stacking“ sowie über die Molekülförm in Lösung sind noch recht vorläufig. Nach einigen neueren Daten würde man etwas stärker langgestreckte Strukturmodelle verziehen, die sich vom Kleeballmodell durch „stacking“ von ungepaarten Nucleotiden und nicht durch Knüpfung zahlreicher zusätzlicher Basenpaare ableiten.

Einige Hinweise auf Elemente der Raumstruktur und auf die weiter unten zu besprechenden Erkennungsregionen der tRNAs hat man durch spezifische chemische [17, 105] und enzymatische Modifizierung der Moleküle erhalten. Während der meisten Alkylierungs- und Halogenierungsreaktionen dürfte sich die Raumstruktur der tRNAs schnell verändern, so daß man kaum Rückschlüsse auf die ursprüngliche Struktur ziehen kann. Das gleiche gilt für die Acetylierung, die Acetacetylierung mit Diketen [105a] und die Oxidation mit KMnO_4 [106] oder OsO_4 [107]. Bei der Umsetzung mit Formaldehyd [108] und anderen Aldehyden, der vielfach studierten Reaktion mit Hydroxylamin und seinen Derivaten, der Desaminierung mit HNO_2 [109], der Umsetzung mit Carbodiimiden [110] und der Oxidation mit Perphthalsäure [85] reagieren anscheinend einige Regionen, die in Kleeball-Modellen und räumlichen Modellen einsträngig sind, schneller als gepaarte Regionen.

Interessant sind auch solche Reagentien, die bevorzugt oder ausschließlich mit einigen seltenen Nucleotiden reagieren, wie NaBH_4 [111] und Acrylnitril [112]. Durch NaBH_4 werden unter anderen hU und acC reduziert. Sind diese Nucleoside Teil einer tRNA-Kette, so wird zwar hU reduziert [111], acC in Position 12 der tRNA^{Ser} aber nicht [113]. Das kann ein Hinweis sein, daß – den Modellen entsprechend – hU ungepaart ist und acC durch Wechselwirkung mit anderen Nucleotiden geschützt ist. Acrylnitril, das Ψ und I modifiziert, greift das Ψ der in allen tRNAs vorkommenden Sequenz G-T- Ψ -C unter den meisten Bedingungen nicht

[103] E. B. Keller, Biochem. biophys. Res. Commun. 17, 412 (1964).

[104] M. N. Thang, W. Guschbauer, H. G. Zachau u. M. Grunberg-Manago, J. molecular Biol. 26, 403 (1967).

[105] J. P. Ebel, Bull. Soc. Chim. biol. 50, 2255 (1969); N. K. Kochetkov u. E. J. Budowsky, Progr. Nucleic Acid Res. and Molecular Biology 9, 403 (1969).

[105a] F. Ehrhardt, Dissertation, Universität München 1969.

[106] H. Hayatsu u. T. Ukita, Biochem. biophys. Res. Commun. 29, 556 (1967).

[107] K. Burton, N. F. Varney u. P. C. Zamecnik, Biochem. J. 99, 29c (1966).

[108] V. D. Axelrod, M. Y. Feldman, I. I. Chuguev u. A. A. Bayev, Biochim. biophysica Acta 186, 33 (1969).

[109] J. A. Nelson, S. C. Ristow u. R. W. Holley, Biochim. biophysica Acta 149, 590 (1967).

[110] S. W. Brostoff u. V. M. Ingram, Science (Washington) 158, 666 (1967).

[111] P. Cerutti, J. W. Holt u. N. Miller, J. molecular Biol. 34, 505 (1968).

[112] M. Yoshida u. T. Ukita, Biochim. biophysica Acta 157, 466 (1968).

[113] T. Igo-Kemenes u. H. G. Zachau, Europ. J. Biochem., im Druck.

an [112], obwohl es nach den Kleeball-Modellen in einem einsträngigen Bereich liegen sollte. Die Feststellung ist im Einklang mit dem Befund, daß die G-T- Ψ -C-Sequenz bei Partialhydrolyse mit Pancreas-RNase ungewöhnlich stabil ist [84]. In der dreidimensionalen Struktur muß dieser Bereich also geschützt sein.

Eine aussichtsreiche Methode zur Untersuchung der Raumstruktur von tRNAs scheint die partielle Spaltung mit Nucleasen zu sein. In Abbildung 6 sind bei tRNA^{Ser}_{Hefe} die bevorzugten Angriffspunkte der Pancreas- und T1-RNase eingetragen [84]. Die Länge der Pfeile ist der Menge der jeweils entstehenden Spaltprodukte ungefähr proportional. Die meisten Spaltstellen liegen dort, wo man sie nach dem Kleeball-Modell erwarten würde. Das Spaltmuster dürfte sich in weiteren Analysen noch verfeinern lassen. Die Anticodonsequenz IGA ist besonders labil gegen Nuclease; sie liegt demnach in einem exponierten einsträngigen Bereich, wie es für ihr Funktionieren im Adaptorkomplex (Abb. 1) zu fordern ist. Auch bei den meisten anderen tRNAs ist die Anticodonsequenz besonders labil gegen Nucleasen. Enzyme, die bevorzugt einsträngige Bereiche der tRNAs spalten, wie die Endonuclease aus Schafsnieren [114], sind gute Werkzeuge zur Erforschung der tRNA-Struktur [115].

Die erwähnten physikalischen, chemischen und enzymatischen Methoden reichen grundsätzlich nicht aus, um eine bestimmte Raumstruktur zu beweisen. Daher war es ein wesentlicher Fortschritt, als es im vergangenen Jahr sechs Arbeitsgruppen etwa gleichzeitig gelang, tRNA-Kristalle zu erhalten (Kommentar vgl. [116]). Anscheinend sind die bisher gewonnenen Kristalle für eine Hochauflösungs-Röntgenstrukturanalyse noch nicht optimal geeignet. Es dürfte jedoch nur eine Frage der Zeit sein, bis derartige Kristalle vorliegen und die genaue Raumstruktur einer tRNA oder einiger tRNAs ermittelt wird. Die tRNA-Modelle [83–86] könnten, falls sie der wahren Struktur nahe kommen, die Röntgenstrukturanalyse erleichtern.

Will man die Raumstruktur der tRNAs in Lösung beschreiben, so sind als Ergänzung zur Röntgenstrukturanalyse die anderen physikalischen Methoden, die chemischen Modifizierungen und die enzymatischen Spaltungen notwendig, denn wie erwähnt können die tRNAs auch unter physiologischen Bedingungen in mehreren Konformationen existieren. Wahrscheinlich werden diese Methoden bis zur Fertigstellung der Röntgenstrukturanalyse zahlreiche weitere wichtige Hinweise zur Raumstruktur der tRNAs geben.

6. Bindungs- und Erkennungsregionen der tRNAs

6.1. Wirkungsweise der Bindungs- und Erkennungsregionen

Jede tRNA akzeptiert in der enzymatischen Beladungsreaktion nur die ihr zugehörige Aminosäure; der Einbau anderer natürlicher Aminosäuren liegt unter der Nachweisgrenze, die bei der angewendeten Me-

[114] K. Kasai u. M. Grunberg-Manago, Europ. J. Biochem. 1, 152 (1967).

[115] P. Philippson, Diplomarbeit, Universität München 1968.

[116] Nature 219, 1209 (1968).

thodik mit 1:10000 angegeben wird [117]. Auch die Codon-Anticodon-Wechselwirkung und die Übertragung der tRNA-gebundenen Aminosäure auf die wachsende Peptidkette muß in vivo mit höchster Präzision verlaufen, denn die Proteine sind „molekular-einheitlich“. Hier liegt die Nachweisgrenze des Falscheinbaus bei 1:3000 [118]. Diese Angaben gelten nur für die natürlichen Aminosäuren. Einige Aminosäure-Analoga werden in Protein eingebaut. Sie „betrügen“ die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und werden auch in den späteren Stadien der Proteinsynthese nicht ausgeschlossen. Bei einigen speziell daraufhin selektionierten Mutanten von Mikroorganismen hat man einen hohen Einbau einer natürlichen, aber in dieser Position falschen Aminosäure gefunden („missense suppression“) [119, 120].

Die hohe Präzision der Proteinsynthese durch bestimmte Strukturelemente und Wechselwirkungen der beteiligten Enzyme, Nucleinsäuren und Ribosomen zu erklären, ist ein Fernziel der Forschung. Die tRNAs sind die am besten untersuchten makromolekularen Komponenten des Proteinsynthesystems, aber auch bei ihnen weiß man noch wenig über die Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion. Sucht man im tRNA-Molekül nach Nucleotidsequenzen oder nach Regionen der Raumstruktur, die für die Wechselwirkung mit einem Makromolekül verantwortlich sind, so kann man zwischen zwei Arten von Strukturelementen unterscheiden: Es muß die eigentlichen spezifitätsbestimmenden Regionen geben, die bei den einzelnen tRNAs verschieden sind, und diejenigen Regionen, deren Integrität für die Wechselwirkung zwar auch erforderlich ist, die aber für die Spezifität selbst nicht verantwortlich sind. Diese Bereiche, die bei mehreren oder allen tRNAs gleich sein können, sollen als unspezifische Bindungsregionen bezeichnet werden (s. Abschnitt 6.2–6.4). Die Unterscheidung erleichtert die derzeitige Diskussion; sie dürfte sich erübrigen, wenn man einmal die Erkennungs-vorgänge voll beschreiben kann.

6.2. Erkennung der tRNAs durch verschiedene Enzyme

Zunächst seien die Erkennungsregionen der tRNAs genannt, von denen man nicht viel mehr weiß, als daß sie existieren müssen. Die 3'-terminalen Nucleotide der tRNAs – pC, pC und pA – werden durch das bereits erwähnte Enzym C-C-A-Pyrophosphorylase angefügt. Die tRNAs müssen dazu in der nativen Konformation vorliegen; denaturierte tRNA^{Leu}_{III} aus Hefe ist ein sehr schlechtes Substrat für das Enzym [121]. In der denaturierten tRNA ist entweder die spezielle Erkennungsregion verändert, oder die gesamte Konformation dieser tRNA ist von der der nativen so verschieden, daß die Bildung des Enzym-tRNA-Komplexes erschwert ist. Da es möglicherweise nur eine Pyrophosphorylase für alle tRNAs gibt, kann man annehmen, daß dieses Enzym Nucleotidsequenzen oder Raumstrukturelemente erkennt, die in allen tRNAs einer Spezies gleich sind.

[117] R. B. Loftfield, L. I. Hecht u. E. A. Eigner, *Biochim. biophysica Acta* 72, 383 (1963).

[118] R. B. Loftfield, *Biochem. J.* 89, 82 (1963).

[119] J. Carbon, P. Berg u. C. Yanofsky, in [9], S. 487.

[120] N. K. Gupta, U. L. RajBhandary u. H. G. Khorana, in [9], S. 499.

[121] T. Lindahl, A. Adams, M. Geroch u. J. R. Fresco, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 57, 178 (1967).

Ähnliches kann für die Strukturelemente der tRNAs gelten, die für die Bindung an die Ribosomen und an die Polymerisationsenzyme verantwortlich sind, da diese Wechselwirkungen nicht für einzelne tRNAs spezifisch sind. Man weiß, daß die Ribosomen den tRNA-mRNA-Komplex stabilisieren [122]. Die Codon-Anticodon-Wechselwirkung findet an den 3OS-Untereinheiten der Ribosomen statt, während das amino-säure-tragende 3'-Ende der tRNAs an die 5OS-Untereinheiten gebunden ist [123]. Man hat auch Komplexe zwischen tRNAs und Polymerisationsenzymen gefunden [8, 124, 125], hat aber noch keine Vorstellung davon, welche Regionen der tRNAs hier beteiligt sind.

Die Enzyme, die die neugebildeten tRNAs modifizieren, dürfen sich an der Raumstruktur der tRNAs orientieren. Wie schon erwähnt, kommen die durch Modifizierung entstandenen seltenen Nucleotide vorwiegend in den Bereichen der tRNAs vor, die in Kleeblatt-Modellen einsträngig sind. m⁵C, iA, hU und andere seltene Nucleotide erscheinen jeweils in analogen Positionen der Kleeblatt-Modelle. Aber es gibt auch tRNAs, deren Nucleotide in diesen Positionen nicht modifiziert sind. Es muß daher für die Enzyme Erkennungsmerkmale geben, die aus den bisherigen Modellen nicht ersichtlich sind. Man hat in den tRNAs und auch in ribosomaler RNA [126] die Nucleotidsequenzen in der Nachbarschaft der modifizierten Nucleotide miteinander verglichen, aber keine Gesetzmäßigkeiten gefunden. Ebenso wenig weiß man, aufgrund welcher strukturellen Besonderheit die Transformylase das an tRNA^{fMet}_{Coli} gebundene Methionin formyliert, nicht aber das an tRNA^{Met}_{Coli} gebundene Methionin. Die entstehende N-Formyl-Met-tRNA^{fMet}_{Coli} wird von den Initiationsfaktoren erkannt und liefert die N-terminale Aminosäure vieler bakterieller Proteine, während ketten-internes Met aus Met-tRNA^{Met}_{Coli} stammt. Das Kleeblatt-Modell der tRNA^{fMet}_{Coli} hat fünf ungepaarte Nucleotide am 3'-Ende, gegenüber vier in den Modellen der anderen tRNAs (Abb. 6). Auch sind tRNA^{fMet}_{Coli} und tRNA^{SerI}_{Hefe} bisher die einzigen tRNAs, die statt der üblichen Sequenz –G–T–Ψ–C–G die Sequenz –G–T–Ψ–C–A– enthalten. Aber diese Besonderheiten kann man nicht mit den Funktionen der tRNAs in Beziehung setzen.

6.3. Bindung und Erkennung der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Ein besonders viel bearbeitetes Gebiet war und ist das der Wechselwirkungen zwischen den tRNAs und den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Man hat hier das am leichtesten zugängliche Modell zum Studium spezifischer Nucleinsäure-Protein-Wechselwirkungen, die

[122] C. S. McLaughlin, J. Dondon, M. Grunberg-Manago, A. M. Michelson u. G. Saunders, *J. molecular Biol.* 32, 521 (1968).

[123] S. Pestka, *J. biol. Chemistry* 243, 4038 (1968).

[124] Y. Ono, A. Skoultschi, A. Klein u. P. Lengyel, *Nature* 220, 1304 (1968).

[125] F. Ibiu u. K. Moldave, *J. biol. Chemistry* 243, 791 (1968).

[126] P. Fellner u. F. Sanger, *Nature (London)* 219, 236 (1968).

an mehreren Stellen des Zellstoffwechsels und vor allem bei der Regulation des Stoffwechsels von entscheidender Bedeutung sind.

Erinnert sei nur an die spezifische Bindung des Repressors an den Operator. Im Falle des lac-Operons von *E. coli* wurde der Repressor als Protein identifiziert^[127] und der Operator als ein relativ kurzes Stück DNA. Dissoziiert der Repressor vom Operator, so beginnen mRNA- und Proteinsynthese. Repressoren können anscheinend Nucleotidsequenzen (oder Nucleinsäure-Raumstruktur) erkennen.

In der Proteinsynthese ist die Synthetase-tRNA-Wechselwirkung der erste spezifitätsbestimmende Schritt. Bei der Knüpfung der Peptidbindung am Ribosom wird nicht noch einmal kontrolliert, ob die tRNA auch die richtige Aminosäure trägt. Das zeigte besonders gut ein Versuch^[128], in dem Cys-tRNACys mit Raney-Nickel desulfuriert wurde; das entstandene Hybrid Ala-tRNACys fügt während der Proteinsynthese – wie nach der Adaptorhypothese zu erwarten – Ala in Cys- und nicht in Ala-Positionen der Proteinkette ein. Die Nucleotidsequenz der DNA und mRNA determiniert nur, welche tRNAs am Ribosom nebeneinander aufgereiht werden. Welche Aminosäuren an den tRNAs hängen und in das Protein eingebaut werden, wird von der Aminoacyl-tRNA-Synthetase entschieden, die – mit der erwähnten hohen Präzision – nur die ihr zugehörige tRNA bindet und diese aminoacyliert. Im Zusammenhang mit den für die Spezifität der Wechselwirkungen verantwortlichen Strukturelementen der tRNAs hat man von einem „zweiten genetischen Code“ oder einem Synthetaseerkennungscode gesprochen. Über Versuche zur Entschlüsselung dieses Codes wird im folgenden berichtet.

Die 3'-terminale Sequenz der tRNAs –C–C–A ist sicher an der Wechselwirkung mit der Synthetase beteiligt. Die Aminosäuren sind ja mit der Ribose des terminalen Adenosins verestert^[129], und zwar überwiegend mit der 3'-Hydroxygruppe der Ribose^[26]. Dieser Bereich der tRNA muß während der Beladungsreaktion mit dem Enzym in Kontakt sein. Einige Veränderungen in der Struktur sind ohne Verlust der Acceptoraktivität der tRNA möglich, so z.B. das Herauslassen eines C bei der Rekonstruktion einer abgebauten tRNA mit CCA-Pyrophosphorylase^[130], die Überführung des terminalen A in I mit einer spezifischen Desaminase^[131] oder die Oxidation der 2'- und 3'-Hydroxygruppen mit HJO₄ und die anschließende Reduktion des Dialdehyds zum zweiwertigen primären Alkohol^[132]. Durch HJO₄-Oxidation ohne anschließende Reduktion oder durch Entfernung des terminalen pA werden die tRNAs vollständig inaktiviert. Je nach Art der tRNA und Art der Modifikation

[127] W. Gilbert u. B. Müller-Hill, Proc. nat. Acad. Sci. USA 56, 1891 (1966).

[128] F. Chapeville, F. Lipmann, G. v. Ehrenstein, B. Weisblum, W. J. Ray jr. u. S. Benzer, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1086 (1962).

[129] H. G. Zachau, G. Acs u. F. Lipmann, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 885 (1958).

[130] V. Daniel u. U. Z. Littauer, J. molecular Biol. 11, 692 (1965).

[131] Ch.-Ch. Li u. J.-Ch. Su, Biochem. biophysic. Res. Commun. 28, 1068 (1967).

[132] F. Cramer, F. v. d. Haar u. E. Schlimme, FEBS Letters 2, 136 (1968).

am –C–C–A-Ende wird die veränderte tRNA mehr oder weniger stark von der zugehörigen Synthetase gebunden^[133, 134]. Auch wirken verschiedene tRNAs – bei gleicher Modifikation – in unterschiedlichem Ausmaß als kompetitive Inhibitoren der Beladung der entsprechenden intakten tRNAs^[135]. Die Unterschiede bei diesen Bindungs- und Hemmversuchen weisen darauf hin, daß Bildung und Eigenschaften von Synthetase-tRNA-Komplexen von tRNA zu tRNA verschieden sein können. Versuche, die Synthetase-Erkennungsregion durch kompetitive Hemmung der Beladung mit synthetischen Oligonucleotiden oder tRNA-Fragmenten zu ermitteln, haben bisher zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Die Beladung von tRNA^{Phe}_{Hefe} scheint auch durch große Fragmente dieser tRNA nicht gehemmt zu werden^[136].

Während das bei allen tRNAs gleiche –C–C–A nur als unspezifische Bindungsregion infrage kommt, könnte der anschließende „Stamm“ des Kleeblatts an der spezifischen Erkennung der Synthetasen beteiligt sein. Kürzlich wurde postuliert^[137], daß die drei Nucleotide in Stellung 5, 6 und 7 vom 3'-Ende aus und die gegenüberstehenden drei Nucleotide des 5'-Endes die wesentliche Synthetase-Erkennungsregion seien. Diese Sequenz ist, soweit bisher bekannt, in den verschiedenen tRNAs der gleichen Spezies verschieden (Abb. 6), wie es die Hypothese fordert. Allerdings ist die Trinucleotidsequenz auch bei tRNA^{fMet}_{Coli} und tRNA^{Met}_{Coli} aus *E. coli* verschieden, obwohl die beiden tRNAs von der gleichen Synthetase beladen werden. Außerdem kennt man drei Fälle heterologer Beladung bei verschiedener Trinucleotidsequenz, d.h. Fälle, in denen die Synthetase nicht nur die zugehörige tRNA der gleichen Spezies, sondern auch die einer anderen Spezies belädt (tRNA^{Ser}_{Hefe}, tRNA^{Ser}_{Ratte}^[165]; tRNA^{Phe}_{Hefe}, tRNA^{Phe}_{Coli}^[138]; tRNA^{Val}_{Hefe}, tRNA^{Val}_{Coli}^[139]; Sequenzen vgl. Abb. 5). Diese Beladungsversuche sprechen aber nicht unbedingt gegen die Hypothese, denn der Synthetaseerkennungscode könnte, genau wie der genetische Code, degeneriert sein. Nicht mit der Hypothese im Einklang ist jedoch der Befund^[138], daß die Beladbarkeit von tRNA^{Phe}_{Hefe} mit Synthetase aus *E. coli* bei Überführung in tRNA^{Phe}_{HCl} (s. Abschnitt 2) verschwindet, also bei einer Veränderung im Anticodonbereich, die die hypothetische Erkennungsregion im Stamm des Kleeblatts auch über Raumstrukturänderungen kaum betreffen dürfte. Allerdings gibt es auch hier einen Ausweg: Die Anticodonregion könnte eine weitere essentielle Bindungsstelle für den Kontakt mit der Synthetase sein; bestimmte Veränderungen in dieser Region (aber keineswegs alle, s. unten)

[133] U. Lagerkvist, L. Rymo u. J. Waldenström, J. biol. Chemistry 241, 5391 (1966).

[134] M. Yarus u. P. Berg, J. molecular Biol. 28, 479 (1967).

[135] K. L. Roy u. G. M. Tener, Biochemistry 6, 2847 (1967).

[136] S. H. Chang, Federat. Proc. 27, 767 (1968).

[137] L. H. Schulman u. R. W. Chambers, Proc. nat. Acad. Sci. USA 61, 308 (1968).

[138] R. Thiebe u. H. G. Zachau, Biochem. biophysic. Res. Commun. 33, 260 (1968).

[139] U. Lagerkvist u. J. Waldenström, J. molecular Biol. 8, 28 (1964).

würden dann zu einem Verlust der Beladbarkeit führen, auch wenn die eigentliche Erkennungsregion intakt ist.

Das *Anticodon* selbst müßte sich auch für die Aufgabe der Synthetase-Erkennung eignen, da es bei allen tRNAs einer Spezies verschieden ist. Versuche, diese Hypothese durch Vergleich der UV-Inaktivierungskurven für Akzeptor- und Transferaktivität zu prüfen, haben nicht zu eindeutigen Ergebnissen geführt [140], ebenso wenig wie die meisten Versuche der Inaktivierung mit chemischen Agentien [17, 105]. Es gibt jedoch drei Gruppen von Versuchen, die gegen das Anticodon als Synthetase-Erkennungsregion sprechen. Einige sehr spezifische chemische Veränderungen im Anticodon oder in seiner unmittelbaren Nachbarschaft führen zu einem Verlust der Codon-Erkennung bei erhaltener Synthetase-Erkennung [36, 141–143]. Auch kann man mehrere tRNAs ohne Verlust der Akzeptoraktivität im oder neben dem Anticodon spalten [144–146, 146a].

Außerdem akzeptieren su^+ - und su^- -tRNA_{Coli}^{Tyr}, die sich im Anticodon unterscheiden (Abb. 6), die gleiche Aminosäure [59]; bei zwei sich im Anticodon unterscheidenden tRNAs_{Coli}^{Ser} wurde sogar nachgewiesen, daß sie durch die gleiche Synthetase beladen werden [147]. Diese Versuche sprechen zwar gegen eine Rolle des Anticodons als spezifische Synthetase-Erkennungsregion; sie schließen aber nicht aus, daß der Anticodonbereich bei der Bindung an die Synthetase mitwirkt, denn diese Funktion könnte auch durch eine stärker modifizierte oder durch Spaltung unterbrochene Nucleotidsequenz noch wahrgenommen werden.

Während die T- Ψ -C-haltige Region bei mehreren tRNAs gleich oder ähnlich ist und damit bestenfalls als unspezifische Bindungsregion infrage kommt, sind die *hU-haltige Schleife* und die *S-Region* bei den meisten tRNAs hinreichend verschieden, um als Erkennungsregion dienen zu können. Allerdings führt die Spaltung von tRNA_{Coli}^{fMet} in der einen [148] und von tRNA_{Coli}^{Tyr} in der anderen Region [149] nicht zum Verlust der Akzeptoraktivität. Auch kann man bei mehreren tRNAs den Dihydrouracilring reduktiv öffnen, ohne daß irgendeine der Aktivitäten der tRNAs leidet [111, 113].

Unabhängig von den Versuchen, die Synthetase-Erkennungsregion bestimmten Bereichen der tRNAs zuordnen, hat man versucht, ob die *seltenen Nucleotide* etwas mit der Spezifität der tRNAs zu tun haben. Über zahlreiche, zum Teil widersprüchvolle Ergebnisse mit „untermethylierten“ tRNAs ist berichtet worden. Unter den meisten Testbedingungen scheint sich die Aktivität dieser tRNAs von der Aktivität normaler tRNAs nicht wesentlich zu unterscheiden. Auch ist die Akzeptoraktivität von tRNA_{Hefe}^{Ala} gleich hoch, ob in Position 48 U oder hU steht [150]. tRNA_{Coli}^{Tyr} ist mit der Synthetase aus *E. coli* mit gleicher Geschwindigkeit beladbar, ob das A neben dem Anticodon der tRNA nicht, teilweise (durch eine Isopentenylgruppe) oder vollständig (außerdem noch durch eine CH₃-S-Gruppe) modifiziert ist [151]. In tRNA_{Coli}^{Met} kann der Schwefel im s⁴U fehlen, ohne daß die Akzeptoraktivität leidet [150a]. Der Einbau von 5-Fluor-U statt U [52a, 151] und der Einbau einiger anderer Nucleotidanaloga beeinflussen die Akzeptoraktivität genauso wenig wie etwa Äthylierung statt Methylierung [152] (mit Äthionin statt Methionin als Alkylgruppendonator). – Es ist durchaus denkbar, daß einige seltene Nucleotide einen geringen und mit den heutigen Methoden nicht erfassbaren Einfluß auf die Raumstruktur der tRNAs ausüben. Eine dadurch geringfügig verbesserte Bindung an die Synthetase wäre bereits ein selektiver Vorteil, der die modifizierte gegenüber der unmodifizierten tRNA auszeichnete.

Interessant ist ein *Vergleich der bisher bekannten Nucleotidsequenzen* und der Kleeblatt-Modelle (Abb. 5 und 6, frühere Vergleiche s. [21, 27, 80, 84, 105, 152a]) im Hinblick auf die Synthetase-Erkennungsregionen. Die Gesamtzahl der in bestimmten tRNAs gleichen oder verschiedenen Nucleotide scheint nicht wichtig zu sein. tRNA_{Coli}^{Met} und tRNA_{Coli}^{fMet}, die durch die gleiche Synthetase beladen werden, haben in 41 Positionen gleiche oder ähnliche Nucleotide. Ziemlich genau die gleiche Zahl von Homologien gibt es zwischen tRNA_{Hebe}^{Tyr} und tRNA_{Coli}^{Tyr}, bei denen unter den meisten Bedingungen keine heterologe Beladung gefunden wurde [153]. tRNA_{Coli}^{Met} und tRNA_{Coli}^{Val}, bei denen naturgemäß keine Kreuzbeladung möglich ist, haben sogar 51 Homologien. Erwähnenswert ist die Tatsache, daß bei den einander sehr ähnlichen tRNA_{Hebe}^{Ser} und tRNA_{Ratte}^{Ser} bzw. tRNA_{Hebe}^{Phe} und tRNA_{Weizen}^{Phe} (66 bzw. 63 Homologien), die jeweils mit den heterologen Synthetasen beladbar sind, die Sequenzunterschiede von 19 bzw. 13 Nucleotiden ganz überwiegend in den gepaarten Regionen der Klee-

- [140] P. D. Harriman u. H. G. Zachau, J. molecular Biol. 16, 387 (1966).
[141] F. Fittler u. R. H. Hall, Biochem. biophysic. Res. Commun. 25, 441 (1966).
[142] M. Yoshida, Y. Furuichi, Y. Kaziro u. T. Ukita, Biochim. biophysica Acta 166, 636 (1968).
[143] J. Carbon u. J. B. Curry, J. molecular Biol. 38, 201 (1968).
[144] A. A. Bayev, T. V. Venkstern, A. D. Mirzabekov, A. I. Krutilina, V. D. Axelrod, L. Li, I. Fodor, L. Y. Kasarinova u. V. A. Engelhardt, FEBS Symposium 1967. Structure and Function of Transfer RNA and 5S RNA. Universitetsforlaget, Oslo, und Academic Press, New York 1968, S. 17.
[145] P. Philippsen, R. Thiebe, W. Wintermeyer u. H. G. Zachau, Biochem. biophysic. Res. Commun. 33, 922 (1968).
[146] K. Oda, F. Kimura, F. Harada u. S. Nishimura, Biochim. biophysica Acta 179, 97 (1969).
[146a] N. Imura, H. Schwam u. R. W. Chambers, Proc. nat. Acad. Sci. USA 62, 1203 (1969).
[147] G. Sundharadas, J. R. Katze, D. Söll, W. Konigsberg u. P. Lengyel, Proc. nat. Acad. Sci. USA 61, 693 (1968).
[148] T. Seno, M. Kobayashi u. S. Nishimura, Biochim. biophysica Acta 174, 408 (1969).
[149] T. Seno, M. Kobayashi u. S. Nishimura, Biochim. biophysica Acta 182, 280 (1969).
[150] T. H. Kuo u. E. B. Keller, Federat. Proc. 27, 341 (1968).
[150a] B. P. Doctor, B. J. Wayman, S. Cory, P. S. Rudland u. B. F. C. Clark, Europ. J. Biochem. 8, 93 (1969).
[151] I. I. Kaiser, Biochemistry 8, 231 (1968).
[152] R. Axel, I. B. Weinstein u. E. Farber, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 1255 (1967).
[152a] G. R. Philipps, Nature (London) 223, 374 (1969); M. Yarus, Annu. Rev. Biochem. 38, 841 (1969).
[153] B. P. Doctor, J. E. Loebel u. D. A. Kellogg, in [9], S. 543.

blätter liegen. Allgemein scheinen heterologe Beladungen zwischen tRNAs und Synthetasen aus Hefe und höheren Organismen leichter und häufiger möglich zu sein als Kreuzreaktionen zwischen diesen und den tRNAs und Synthetasen aus Bakterien. Eine Falschbeladung ist erst in zwei Fällen sicher nachgewiesen worden: Eine aus dem Cytoplasma von *Neurospora* stammende Phe-tRNA-Synthetase belädt tRNA_{Coli}^{Ala} und tRNA_{Coli}^{Val} mit Phe^[154]; Phe-tRNA-Synthetase aus Hefe belädt tRNA_{Coli}^{Val}, deren hU-Region derjenigen der tRNA_{Hefe}^{Phe} sehr ähnlich ist^[154a]. Das weitere Studium der heterologen Beladungsreaktionen dürfte demnach interessante Ergebnisse bringen.

Nachdem die Synthetase-Erkennungsregionen bisher nicht in bestimmten Bereichen der tRNAs lokalisiert werden konnten, und nachdem man weiß, daß tRNAs mit veränderter Raumstruktur, nämlich denaturierte tRNAs^[78, 79], Aminosäuren nicht akzeptieren, könnte man daran denken, daß zur Synthetase-Erkennung die Raumstruktur als Ganzes unverändert sein müsse. Gegen diese Annahme spricht aber der Befund, daß Dimere, Trimere und höhere Aggregate von tRNA_{Hefe}^{Ser} Akzeptoraktivität besitzen^[155], eine Tatsache, die dann auch für Dimere von tRNA_{Hefe}^{Ala} bestätigt wurde^[156]. Die Form der Aggregate in Lösung ist sicher von der der monomeren tRNAs verschieden. Bestimmte Teile der Raumstruktur dürften jedoch in den Aggregaten und in den Monomeren gleich sein, und diese Teile – nicht die gesamte Raumstruktur – werden von der Synthetase erkannt. Gegen die Notwendigkeit der unveränderten Raumstruktur sprechen auch Versuche mit tRNA-Fragmenten: Heterologe Kombinationen der Halbmoleküle von tRNA_{Hefe}^{Phe} und tRNA_{Weizen}^{Phe}^[156a] sowie homologe Kombinationen von Fragmenten, bei denen ein Teil der tRNA weggelassen wurde^[156b, c], besitzen Akzeptoraktivität.

Ähnlich wie die aktiven Zentren mancher Enzyme, die aus mehreren in der Sequenz weit entfernten, aber durch Faltung einander nahe gebrachten Aminosäuren bestehen, könnten die Synthetase-Erkennungsregionen der tRNAs mehrere in der Primärstruktur nicht zusammenliegende Nucleotidsequenzen enthalten. Das sind u. a. der Stamm der Kleeblatt-Modelle, die hU- und die S-Region oder auch, wie kürzlich diskutiert wurde^[21], allgemein purin-reiche Sequenzen der tRNAs. Die Sequenzen können in der Raumstruktur nahe benachbart sein, brauchen es aber nicht. Man würde ohnehin mehr als eine Haftstelle zwischen tRNA und Synthetase annehmen. Ob eine oder mehrere dieser Stellen für die Spezifität der Erkennung verantwortlich sind, ist offen.

Übrigens brauchen die Synthetase-Erkennungsregionen keineswegs bei allen tRNAs in homologen Bereichen der Sequenz zu liegen. Es würde die Aufklärung des Erkennungsvorgangs sehr erleichtern, wenn immer homologe Bereiche der tRNAs betroffen wären; eine notwendige Annahme ist das jedoch nicht.

Das Problem der Synthetase-Erkennung wird leichter zu bearbeiten sein, wenn die Raumstruktur einer oder mehrerer tRNAs bekannt ist. Außerdem ist es notwendig, die strukturellen Voraussetzungen der Bindung der tRNAs an die Synthetase getrennt von denen des eigentlichen katalytischen Schritts, nämlich der Aminoacylierung, zu untersuchen. Hier bieten u. a. die Arbeiten über Synthetase-tRNA-Komplexe^[133, 134, 157, 158] interessante Ansatzpunkte. Aus genauen kinetischen Untersuchungen der Beladung von unveränderten und veränderten tRNAs in Abhängigkeit vom pH-Wert der Inkubationslösung, vom Gehalt der Lösung an Salz oder organischen Lösungsmitteln, von der Temperatur usw. könnten sich Aussagen über die bei der Synthetase-tRNA-Bindung beteiligten Kräfte^[159] und über die im katalytischen Schritt mitwirkenden funktionellen Gruppen ergeben. Hinweise auf die Beteiligung einzelner Regionen der tRNAs an der Synthetase-Erkennung kann man mit „tRNA-Mutanten“ erhalten, in denen einzelne Nucleotide durch bestimmte andere ausgetauscht sind^[159a].

6.4. Das Anticodon

Während die strukturellen Voraussetzungen der Nucleinsäure-Protein-Wechselwirkung noch unklar sind, konnten diejenigen, die der Nucleinsäure-Nucleinsäure-Wechselwirkung im Adaptorkomplex (Abb. 1) zugrunde liegen, weitgehend geklärt werden. Schon die Tatsache, daß man in allen tRNAs – und zwar in völlig analogen Positionen der Kleeblatt-Modelle – Trinucleotid-Sequenzen gefunden hat, die zu den zugehörigen Codons antiparallel komplementär sind, ist nahezu ein Beweis für die Adaptor-Hypothese und die Lokalisierung der Anticodons. Das Vorkommen von Inosin in mehreren dieser Sequenzen war zunächst überraschend, doch konnte es durch die „Wobble“- (= „Wackel“-) Hypothese von Crick^[160] in einen befriedigenden Zusammenhang mit dem Verhalten der tRNAs bei der Codon-Erkennung gebracht werden. Crick postulierte, daß I in der ersten Position des Anticodons als einziges Nucleosid mit drei verschiedenen Nucleosiden der dritten Position des Codons in Wechselwirkung treten kann, nämlich mit U, C und A; außerdem sollen in dieser Position neben den A:U- und G:C-Paaren auch G:U-Paare möglich sein. Die „Wobble“-Paarungen sind nur dann mit dem für Wasserstoffbrückenbindungen nötigen Abstand möglich, wenn die dritte Base des Codons (oder die

[154] P. O. Ritter, F. J. Kull u. K. B. Jacobson, Biochim. biophysica Acta 179, 524 (1969).

[154a] R. Taglang, J. P. Waller, N. Befort u. F. Fasiolo, Europ. J. Biochem., im Druck.

[155] H. G. Zachau, Europ. J. Biochem. 5, 559 (1968).

[156] J. S. Loehr u. E. B. Keller, Proc. nat. Acad. Sci. USA 61, 1115 (1968).

[156a] R. Thiebe u. H. G. Zachau, Biochem. biophysic. Res. Commun., im Druck.

[156b] A. D. Mirzabekov, L. Ya. Kazarinova, D. Lastity u. A. A. Bayev, FEBS Letters 3, 268 (1969).

[156c] N. Imura, G. B. Weiss u. R. W. Chambers, Nature (London) 222, 1147 (1969).

[157] W. Seifert, G. Nass u. W. Zillig, J. molecular Biol. 33, 507 (1968); T. Okamoto u. Y. Kawade, Biochim. biophysica Acta 145, 613 (1967).

[158] U. Lagerkvist u. L. Rymo, J. biol. Chemistry 244, 2476 (1969); M. Iaccarino u. P. Berg, J. molecular Biol. 42, 151 (1969); M. Yarus u. P. Berg, ibid. 42, 171 (1969); M. Yaniv u. F. Gros, ibid., im Druck.

[159] R. B. Loftfield u. E. A. Eigner, J. biol. Chemistry 242, 5355 (1967).

[159a] J. Abelson, L. Barnett, S. Brenner, M. Gestet, A. Landy, R. Russell u. J. D. Smith, FEBS Letters 3, 1 (1969).

[160] F. H. C. Crick, J. molecular Biol. 19, 548 (1966).

G C A	U C A	U U C	G U G	A U G	U A C	U A U	U A G
G C C	U C C	U U U	A U G				
G C U	U C U	U U U	A U G	A U G			
(5'→3')							
Anticodons: C G I	A G I	A A G ^{m2'}	U A C	U A C ⁺	A U G ⁺	A U C	
tRNA _{Hefe} ^{Ala}	tRNA _{Hefe} ^{Ser}	tRNA _{Hefe} ^{Phe}	tRNA _{Coli} ^{fMet}	tRNA _{Coli} ^{Met}	tRNA _{Coli} ^{Tyr_{su-}}	tRNA _{Coli} ^{Tyr_{su+}}	

Abb. 7. Beispiele für Codon-Anticodon-Paare. Um die Möglichkeiten der Basenpaarung zu verdeutlichen, wurden die Anticodons in der (ungebräuchlichen) Polarität 3'←5' geschrieben. C⁺ und G⁺ in den Anticodons von tRNA_{Coli}^{Tyr_{su-}} und tRNA_{Coli}^{Met} sind noch unbekannte seltene Nucleoside mit den Basenpaarungseigenschaften von C und G. Die Paarung von tRNA_{Coli}^{fMet} mit GUG, die einem „wobble“ in der ersten Position des Codons entspricht, ist eine Besonderheit der Kettenstart-tRNA. Die in Suppressorstämmen beobachtete Mutation, die in tRNA_{Coli}^{Tyr_{su+}} das Anticodon AUC aus AUG⁺ (3'←5') macht, führt dazu, daß die su⁺-tRNA das Kettenterminierungscodon UAG als Tyr lesen kann (s. Text).

erste Base des Anticodons) etwas aus der im Nucleinsäuredoppelstrang gegebenen Position „herauswackelt“.

Die Hypothese war aufgrund weniger damals vorhandener Daten aufgestellt worden. Die seither bekannt gewordenen Anticodonsequenzen und Codonbindungsexperimente sind mit ihr im Einklang: I-haltige tRNAs können drei Codons bedienen; diejenigen tRNAs, die U oder G in der ersten Position des Anticodons haben, können mit zwei Codons in Wechselwirkung treten (Abb. 7). Den 61 Codons des genetischen Codes (64 Codons insgesamt, davon drei Kettenterminierungscodons) brauchen also nicht 61 verschiedene tRNAs gegenüberzustehen. Der hohen Degeneration des Codes entspricht nicht eine gleich hohe Multiplizität der tRNAs (s. Abschnitt 7).

Einen direkten Beweis für die Lokalisierung des Anticodons lieferten die Arbeiten über tRNA_{Coli}^{Tyr} [59]: tRNA_{Coli}^{Tyr su⁺} und su unterscheiden sich nach den Analysen nur in einem Nucleotid, und sie verhalten sich im Codon-Bindungstest verschieden (Abb. 7); der Nucleotidaustausch muß daher im Anticodon stattgefunden haben. Daß nur die Anticodonschleife und der zugehörige gepaarte Bereich für die Codonbindung erforderlich sind und nicht der Rest des tRNA-Moleküls, zeigten Versuche mit einem Fragment aus tRNA_{Coli}^{fMet} [161]; ein 19 Nucleotide langes Fragment, das das Anticodon enthält, kann am Ribosom mit AUG und GUG in Wechselwirkung treten.

Über die Rolle der anderen seltenen Nucleotide, die außer I in Anticodons gefunden wurden, weiß man nichts. Bei einigen tRNAs, die ein eigenartiges Verhalten bei der Codon-Bindung zeigen, deren Nucleotidsequenz aber noch nicht bekannt ist, vermutet man, daß bestimmte seltene Nucleotide im Anticodon die Ursache sind. Das bei den meisten tRNAs neben dem Anticodon vorkommende seltene Nucleotid dürfte für die Raumstruktur der Anticodonschleife wichtig sein. Seine Modifizierung, die die Akzeptoraktivität der tRNAs kaum beeinflußt (s. Abschnitt 6.3), führt zu einem teilweisen [141] oder vollständigen [36] Verlust der Codon-Bindungsfähigkeit.

7. Multiplizität der tRNAs und Funktionen außerhalb der Aminosäureübertragung

Wie viele verschiedene tRNAs in einem Mikroorganismus, in einer Pflanze, in einem Tier vorkommen, ist unbekannt. Wie schon erwähnt, sind es sicher mehr

[161] B. F. C. Clark, S. K. Dube u. K. A. Marcker, Nature (London) 219, 484 (1968).

als 20, also mehr als eine tRNA pro Aminosäure. Die Existenz mehrerer tRNAs für die gleiche Aminosäure bezeichnet man als Multiplizität. Bei der Fraktionierung von tRNA_{Coli} oder tRNA_{Hefe} findet man 40 bis 60 hauptsächliche tRNA-Spezies; bei höheren Organismen dürfte die Zahl noch größer sein. Außer den in größerer Menge vorkommenden tRNAs werden bei den Chromatographien oder Gegenstromverteilungen von tRNA immer noch „Nebengipfel“ gefunden, von denen einige sicher reelle tRNAs sind. Allerdings darf man keinesfalls jeden Gipfel der Akzeptoraktivität bei einer Fraktionierung mit einer eigenen tRNA-Spezies gleichsetzen. Aggregate, verschiedene konformativ Formen der tRNAs, Heterogenität in der 3'-terminalen C-C-A-Gruppe usw. können die Zahl der tRNAs höher erscheinen lassen als sie ist. Einige Fälle, in denen mehrere tRNAs für die gleiche Aminosäure vorkommen, seien im folgenden erwähnt.

Eine Art der Multiplizität ergibt sich aus der Degeneration des genetischen Codes. Den sechs Codons für Serin z. B. brauchen wegen der Möglichkeit des „Wobble“ (s. Abschnitt 6.4) nicht sechs tRNAs zu entsprechen, notwendig sind drei tRNA^{Ser}. So wurden in *E. coli* auch nebeneinander tRNAs für UCU und UCC, für UCA und UCG sowie für AGU und AGC gefunden [147]. Die I-haltige tRNA_{Hefe}^{Ser} kann drei Codons bedienen, nämlich UCC, UCU und UCA. tRNAs^{Ser} für UCG sowie AGU und AGC sind bisher in Hefe nicht sicher identifiziert worden. Diese tRNAs sind, wenn überhaupt, in geringer Menge vorhanden [162]. Wir stoßen hier auf eine möglicherweise allgemein wichtige Tatsache, die auch bei tRNAs aus anderen Organismen beobachtet wurde [163]: Zwar ist der genetische Code universell, d. h. er gilt für alle Organismen, aber die Organismen scheinen keineswegs alle Codons in gleichem Ausmaß zu benutzen. Ein Codon, für das es keine zugehörige tRNA gibt, kann nicht übersetzt werden.

Eine weitere Form der Multiplizität von tRNAs wurde zuerst bei *Neurospora* [164] und später auch bei anderen Organismen nachgewiesen: Die Mitochondrien enthalten eine zumindest zum Teil von der des Cytosols der Zelle verschiedene tRNA-Population. So wurde

[162] J. Kruppa, Diplomarbeit, Universität München 1968; H. Feldmann, unveröffentlichte Versuche.

[163] C. T. Caskey, A. Beaudet u. M. Nirenberg, J. molecular Biol. 37, 99 (1968).

[164] W. E. Barnett u. D. H. Brown, Proc. nat. Acad. Sci. USA 57, 452 (1967); J. L. Epler, Biochemistry 8, 2285 (1969).

eine sonst nur in Mikroorganismen vorkommende und dort dem Kettenstart dienende tRNA^{fMet} in Mitochondrien aus Hefe^[165] und menschlichen Gewebekulturzellen^[166] gefunden. Auch eine der in geringer Menge vorkommenden tRNA^{Ser}_{Hefe}-Spezies könnte mitochondrialen Ursprungs sein^[167]. Ob auch Chloroplasten eine eigene tRNA-Population enthalten, ist noch offen.

Als dritte Ursache für multiple tRNA-Spezies sei unvollständige Modifizierung genannt. Das Vorkommen von U- und hU-haltiger tRNA^{Ala}_{Hefe}^[52] nebeneinander und von unmodifizierter, teilweise und vollständig modifizierter tRNA^{Tyr}_{Coli}^[35] wurde bereits erwähnt (s. Abschnitt 3 und 6.3).

Im Anticodon veränderte tRNAs, deren Rolle bei der genetischen Suppression am Beispiel der tRNA^{Tyr}_{Coli} aufgeklärt wurde^[59], dürften zu der Zahl der in geringer Menge vorkommenden tRNAs beitragen.

Keinerlei biologischen Sinn kann man bisher solchen Sequenzverschiedenheiten zuordnen, wie sie zwischen tRNA_I^{Ser} und tRNA_{II}^{Ser} aus Hefe gefunden wurden^[33], die sich in drei Nucleotiden außerhalb des Anticodons unterscheiden.

Bei einigen Mikroorganismen werden Aminosäuren in die Zellwand eingebaut durch tRNAs, die wahrscheinlich für diesen Zweck spezialisiert sind^[168]. Auch der Aminosäureeinbau in Glycerophosphatide scheint über Aminoacyl-tRNAs zu verlaufen^[168a].

Tierviren^[169] und Bakteriophagen^[54, 170] synthetisieren eigene, von denen der Wirtszellen verschiedene tRNAs oder modifizieren^[171] tRNAs der Wirtszellen. tRNAs aus Mikroorganismen verschiedenen Wachstumszustands^[172-175] und aus pflanzlichem^[176] oder tierischem Gewebe^[177-180] verschiedenen Differenzie-

rungsgrads ergaben bei der Chromatographie Elutionsprofile, die sich von denen der jeweiligen Vergleichsmaterialien unterscheiden. Neue Gipfel der Akzeptoraktivität wurden gefunden, und das Verschwinden vorhandener Gipfel wurde beobachtet. Allerdings war es bisher in noch keinem Fall möglich nachzuweisen, daß sich die neu auftretenden oder die verschwindenden tRNAs von den anderen tRNAs strukturell oder funktionell unterscheiden. Relativ leicht kann man Aggregation und Änderungen der Konformation als Ursache der Multiplizität ausschließen; eine Heterogenität in der -C-C-A-Sequenz auszuschließen, ist schon schwieriger; und die Entscheidung, ob sich zwei tRNAs im Modifizierungsgrad oder auch in der Sequenz der Hauptnucleotide unterscheiden, erfordert Untersuchungen der Primärstruktur. Leichter ist eine funktionelle Unterscheidung, etwa durch Bestimmung der Codon-Bindungsfähigkeit.

Veränderungen der Multiplizität in Abhängigkeit vom Wachstumszustand oder Differenzierungsgrad sind interessant im Zusammenhang mit der Beobachtung, daß einige Organismen für bestimmte Codons tRNAs nicht oder nur in geringer Menge zur Verfügung haben. Hier ergibt sich die Möglichkeit einer Regulation der Proteinsynthese unabhängig von der Regulation der mRNA-Synthese durch Repression und Induktion: mRNAs für bestimmte Proteine oder Gruppen von Proteinen könnten Codons enthalten, zu deren Ableseung spezielle, d. h. „regulatorische“ tRNAs erforderlich sind. Diese tRNAs könnten z. B. in bestimmten Differenzierungsstadien neu synthetisiert oder durch Modifizierung vorhandener tRNAs gebildet werden und in anderen Entwicklungsstadien wieder abgebaut werden.

Über die Regulation der tRNA-Synthese und -Modifizierung ist wenig bekannt. In bestimmten Mutanten von Mikroorganismen wird die tRNA- (und Ribosomen-RNA-)Synthese unterbrochen, wenn eine der 20 Aminosäuren fehlt^[181]; hier scheint die tRNA-Synthese an die Proteinsynthese gekoppelt zu sein. Sicher weiß man, daß die Aminosäureaktivierung in die Regulation der Aminosäurebiosynthese eingreift^[182, 183]: Nicht die Aminosäuren selbst reprimieren ihre eigene Biosynthese, wenn sie in hoher Konzentration in der Zelle vorhanden sind, sondern Produkte, die bei der Aktivierung der Aminosäuren durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase entstehen, möglicherweise die Aminoacyl-tRNAs^[184].

8. Ausblick

Die Erforschung der Struktur und Funktion der tRNAs schreitet derzeit so schnell voran, daß zu dem Zeitpunkt, an dem dieser Aufsatz erscheint, sicher bereits

- [165] A. E. Smith u. K. A. Marcker, *J. molecular Biol.* 38, 241 (1968).
- [166] J. B. Galper u. J. E. Darnell, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 34, 205 (1969).
- [167] K. Harbers, Diplomarbeit, Universität München 1968.
- [168] R. M. Bumsted, J. L. Dahl, D. Söll u. J. L. Strominger, *J. biol. Chemistry* 243, 779 (1968).
- [168a] R. M. Gould, M. P. Thornton, V. Liepkalns u. W. J. Leniarz, *J. biol. Chemistry* 243, 3096 (1968).
- [169] H. Subak-Sharpe, W. M. Shepherd u. J. Hay, in [9], S. 583.
- [170] S. B. Weiss, W.-T. Hsu, J. W. Foft u. N. H. Scherberg, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 61, 114 (1968).
- [171] T. Kano-Sueoka u. N. Sueoka, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 62, 1229 (1969).
- [172] R. H. Doi, I. Kaneko u. R. T. Igarashi, *J. biol. Chemistry* 243, 945 (1968).
- [173] C. N. Kwan, D. Apirion u. D. Schlessinger, *Biochemistry* 7, 427 (1968).
- [174] C. D. Yegian u. G. S. Stent, *J. molecular Biol.* 39, 45 (1969).
- [175] A. Shearn u. N. H. Horowitz, *Biochemistry* 8, 304 (1969).
- [176] M. B. Anderson u. J. H. Cherry, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 62, 202 (1969).
- [177] B. L. Strehler, D. D. Hendley u. G. P. Hirsch, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 57, 1751 (1967).
- [178] J. C. Lee u. V. M. Ingram, *Science (Washington)* 158, 1330 (1967).
- [179] M. W. Taylor, C. A. Buck, G. A. Granger u. J. J. Holland, *J. molecular Biol.* 33, 809 (1968).
- [180] W.-K. Yang u. G. D. Novelli, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 31, 534 (1968); J. F. Mushinski u. M. Potter, *Biochemistry* 8, 1684 (1969); B. S. Baliga, E. Borek, J. B. Weinstein u. P. R. Srinivasan, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 62, 899 (1969).

- [181] G. Edlin u. G. S. Stent, *J. molecular Biol.* 37, 257 (1968).
- [182] F. C. Neidhardt, *Bacteriological Rev.* 30, 701 (1966).
- [183] G. Nass, K. Poralla u. H. Zähner, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 34, 84 (1969).
- [184] E. Duda, M. Staub, P. Venetianer u. G. Dénes, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 32, 992 (1968); L. S. Williams u. M. Freundlich, *Biochim. biophysica Acta* 179, 515 (1969).

weitere wichtige Ergebnisse bekannt geworden sind. Die Methoden der Isolierung reiner tRNAs werden laufend verfeinert. Mehrere Gruppen arbeiten an der Aufklärung weiterer tRNA-Primärstrukturen. Die Synthese eines tRNA_{Hefe}^{Ala}-Cistrons^[185], also eines Stücks DNA, das einer tRNA_{Hefe}^{Ala} komplementär ist, ist beinahe vollendet. An der DNA als Matrize sollte sich mit Hilfe der RNA-Polymerase die entsprechende RNA herstellen lassen. Diese vollständig unmodifizierte tRNA ist ein interessantes Ausgangsmaterial für viele Untersuchungen, z. B. für die Aufklärung der Biosynthese und der Funktion der seltenen Nucleotide. Durch Röntgenstrukturanalyse und andere Methoden dürfte das Problem der Raumstruktur der tRNAs in absehbarer Zeit gelöst werden. Die Kenntnis der Raumstruktur wiederum wird die Untersuchung der Bindungs- und Erkennungsregionen der tRNAs erleichtern. Im Verständnis der tRNA-Funktionen außerhalb der Aminosäureübertragung allerdings und der möglichen Rolle der tRNAs bei den Regulationsvorgängen, stehen wir noch in den Anfängen.

Die tRNAs sind die kleinsten makromolekularen Werkzeuge der Proteinbiosynthese. Von den anderen

[185] N. K. Gupta, E. Ohtsuka, V. Sgaramella, H. Buchi, A. Kumar, H. Weber u. H. G. Khorana, Proc. nat. Acad. Sci. USA 60, 1338 (1968).

Nucleinsäuren der Zelle unterscheiden sie sich erheblich. Durch die Besonderheiten ihrer Struktur sind sie in der Lage, nicht nur mit den Synthetasen, sondern auch mit Ribosomen und mRNA in spezifischer Weise in Wechselwirkung zu treten. Es sind „Nucleinsäuren, die die Rolle eines Proteins zu spielen versuchen“^[186].

Ihrer Molekülgröße nach befinden sich die tRNAs gerade noch in einem Bereich, der einer genauen Analyse mit den heutigen physikalischen, chemischen und biochemischen Methoden zugänglich ist. Daher besteht die Hoffnung, daß am Beispiel der tRNAs einige grundsätzliche Probleme gelöst werden können, so die Frage nach den Zusammenhängen von Nucleinsäure-Struktur und -Funktion und das Problem der Nucleinsäure-Protein-Wechselwirkungen.

Im vorliegenden Aufsatz wurden mehrfach Arbeiten erwähnt, an denen der Autor und seine Arbeitsgruppe beteiligt waren. Den Mitarbeitern und Kollegen sei an dieser Stelle herzlich für die gute Zusammenarbeit gedankt. Die Arbeiten wurden in großzügiger Weise durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Eingegangen am 30. April 1969 [A 711]

[186] F. H. C. Crick, in [9], S. 3.

Strukturbestimmung organischer Moleküle und quantitative Analysen mit dem Feldionisations-Massenspektrometer

Von H. D. Beckey^[*]

Feldionisations- und Elektronenstoß-Massenspektrometrie ergänzen sich in günstiger Weise. Während beim Stoß von 70-eV-Elektronen auf organische Moleküle eine Vielzahl charakteristischer Bruchstückionen gebildet werden, die wertvolle Hinweise auf die Struktur der Moleküle geben, werden bei der „schonenden“ Feldionisierung auch von sehr instabilen Substanzen relativ intensive Molekülionen gebildet, die im Falle der Elektronenstoß-Ionisierung oft nicht nachweisbar sind. Ferner treten bei der Feldionisierung zwar wenig intensive, aber manchmal sehr charakteristische Bruchstückionen auf, die weitere Strukturhinweise liefern. Die Felddesorptionstechnik setzt die thermische Zersetzung fester organischer Proben weitgehend herab. Neue Aktivierungsmethoden für die Feldionenemitter führen zu intensiveren Ionenströmen und zu längeren Lebensdauern der Emittoren. Quantitative Analysen mit dem Feldionisations-Massenspektrometer sind bei Kohlenwasserstoffmischungen von Interesse, die eine sehr große Zahl von Komponenten (u. U. einige Hundert) enthalten. Vereinfachte Analysen können insbesondere bei höher-siedenden Erdölfraktionen durchgeführt werden.

1. Einleitung

Die qualitative und quantitative Untersuchung organischer Moleküle mit dem Massenspektrometer hat in den letzten Jahren eine ständig wachsende Bedeutung erlangt. In früheren Berichten über den Einsatz des

Massenspektrometers zur Strukturaufklärung großer organischer Moleküle^[1, 2] sowie über die massenspektrometrische Untersuchung von Umlagerungsreaktionen organischer Ionen^[3] stand – ebenso wie

[1] K. Biemann, Angew. Chem. 74, 102 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 98 (1962).

[2] G. Spiteller u. M. Spiteller-Friedmann, Angew. Chem. 77, 393 (1965); Angew. Chem. internat. Edit. 4, 383 (1965).

[3] P. Brown u. C. Djerassi, Angew. Chem. 79, 481 (1967); Angew. Chem. internat. Edit. 6, 477 (1967).

[*] Prof. Dr. H. D. Beckey
Institut für Physikalische Chemie der Universität
53 Bonn, Wegelerstraße 12