

Abschließende Bemerkungen

Der genetische Code ist heute im wesentlichen entziffert. Ich hatte das Glück, im Laufe unserer Arbeiten viele begeisterte Mitarbeiter zu haben. Den Jahren der Mühe und den wichtigen Beiträgen von Mitarbeitern und zahllosen Kollegen überall auf der Welt Rechnung zu tragen, ist in der verfügbaren Zeit unmöglich. Man braucht nur auf die zusammenfassenden Berichte

auf den Cold Spring Harbor Symposien über quantitative Biologie 1963 und 1966 zu verweisen, um die Weite dieses Gebietes und das Ausmaß der heute verfügbaren Informationen zu sehen. Zusätzliche Angaben können den neu erschienenen Büchern von *Woese*^[9] und *Jukes*^[84] entnommen werden.

Eingegangen am 21. Juli 1969 [A 727]
Übersetzt von Dr. Th. Höpner, Heidelberg

[84] T. Jukes: *Molecules and Evolution*. Columbia University Press, New York 1967.

Nucleinsäure-Synthese als Werkzeug für das Studium des genetischen Codes (Nobel-Vortrag)^[**]

Von H. G. Khorana^[*]

I. Einführung

Der neuerliche Fortschritt im Verständnis des genetischen Codes ist der Erfolg der Anstrengungen zahlreicher Forscher, die eine Vielfalt wissenschaftlicher Disziplinen vertreten. Es scheint mir deswegen angebracht, einen kurzen Überblick über die wichtigsten Schritte bei der Entwicklung des genetischen Codes zu geben, bevor ich meinen Beitrag diskutiere, der stets zum großen Teil auf den Anstrengungen einer ganzen Gruppe basierte. Ich möchte auch in Ihr Gedächtnis zurückrufen, daß Crick einen Überblick über das Problem des genetischen Codes bis 1962 in seinem Nobelvortrag^[1] gegeben hat.

Es ist immer schwierig, vielleicht unmöglich, den Ausgangspunkt eines wissenschaftlichen Gebietes zu determinieren oder klar zu definieren; die Idee, daß Gene Proteine herstellen, war aber auf jeden Fall ein wichtiger Schritt, und dieses Konzept wurde besonders durch die Ein-Gen-ein-Protein-Hypothese von *Beadle* und *Tatum*^[2] in den Brennpunkt des Interesses gerückt. Damit war die biochemische Genetik geboren. Der nächste Schritt war getan, als feststand, daß Gene Nucleinsäuren sind. Die Transformationsversuche von *Avery* und Mitarbeitern^[3] und danach die Bakteriophagen-Experimente von *Hershey* und *Chase*^[4] sicherten dies für die DNA, die Arbeit mit der Tabakmosaikvirus-RNA einige Jahre später auch für die RNA^[5,6].

[*] Prof. Dr. H. G. Khorana

The University of Wisconsin, Madison, Wisc. 53706 (USA)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1969. — Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

[1] F. H. C. Crick in: *Les Prix Nobel En 1962* (Norstedt, Stockholm 1963), S. 179; *Angew. Chem.* 75, 425 (1963).

[2] G. W. Beadle u. E. L. Tatum, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 27, 499 (1941).

[3] O. T. Avery, C. M. MacLeod u. M. McCarty, *J. exp. Medicine* 79, 137 (1944).

[4] A. D. Hershey u. M. Chase, *J. gen. Physiol.* 36, 39 (1952).

[5] A. Gierer u. G. Schramm, *Nature (London)* 177, 702 (1956).

[6] H. Fraenkel-Conrat, B. Singer u. R. C. Williams, *Biochim. biophysica Acta* 25, 87 (1957).

Anfang der fünfziger Jahre stand damit fest, daß Gene Nucleinsäuren sind, und daß Nucleinsäuren die Protein-Synthese steuern, wobei die direkte Beteiligung der RNA an diesem Prozeß in den frühen Arbeiten von *Caspersson*^[7] sowie *Brachet*^[8] vermutet wurde. Auf dieser Stufe war es wichtig, mehr über die Chemie der Nucleinsäuren zu wissen, und tatsächlich waren die nun immer schneller aufeinanderfolgenden Entdeckungen weitgehend eine Folge der Arbeit an den Nucleinsäuren auf biochemischer und chemischer Ebene.

Die Strukturchemie der Nucleinsäuren, die sich während etwa 70 Jahren in vielen Ländern entwickelte, ging Schritt für Schritt von der Chemie der Bestandteile aus: von Purinen, Pyrimidinen und Zuckern zu den Nucleosiden und schließlich den Nucleotiden. Ein Höhepunkt war 1952 mit der Aufklärung der Intercucleotidbindung in Nucleinsäuren durch *Brown* und *Todd* und ihre Mitarbeiter^[9] erreicht. (Es war ein großes Glück für mich, Mitarbeiter von Professor, jetzt Lord *Todd* vor dem Beginn meiner Arbeit auf dem Nucleotidgebiet gewesen zu sein.) Kurz danach wurde die Watson-Crick-Struktur^[10] für DNA vorgeschlagen, die die Aufmerksamkeit besonders auf die biologische Bedeutung ihrer physikalischen Struktur lenkte.

Etwa um diese Zeit entstand die Hypothese, daß eine lineare Sequenz von Nucleotiden in der DNA die lineare Sequenz von Aminosäuren und Proteinen bestimmt. Einige Jahre später kam die Enzymologie der DNA durch die Arbeiten von *Kornberg* und Mitarbeitern^[11] in Gang: Ihre Entdeckung und Charakterisierung des Enzyms DNA-Polymerase war ein Triumph der modernen Enzymologie, und die Methoden, die

[7] T. Caspersson, *Naturwissenschaften* 28, 33 (1941).

[8] J. Brachet, *Arch. Biol. (Liège)* 53, 207 (1942).

[9] D. M. Brown u. A. R. Todd in E. Chargaff u. J. N. Davidson: *Nucleic Acids*. Academic Press, New York 1955, Bd. 1, S. 409.

[10] J. D. Watson u. F. H. C. Crick, *Nature (London)* 171, 737 (1953).

[11] I. R. Lehman, M. J. Bessman, E. S. Simms u. A. Kornberg, *J. biol. Chemistry* 233, 163 (1958).

damals ausgearbeitet worden sind, halfen einige Jahre später bei der Charakterisierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase^[12–16]. Die Entdeckung dieses Enzyms machte klar, wie die Information der DNA in die einer RNA, die wir heute als Messenger-RNA bezeichnen, transkribiert wird^[17–21]. Der letzte biochemische Meilenstein, der hier genannt werden muß, war die Entwicklung eines zellfreien aminosäureeinbauenden Systems. Die Arbeit daran galt zunächst der Biosynthese der Peptidbindung. Dieses Gebiet hat eine lange Geschichte; die entscheidenden Fortschritte begannen Anfang der fünfziger Jahre. Man denkt dabei besonders an die Pionierarbeit von Zamecnik und Hoagland^[22], Lipmann^[23] sowie Berg^[24] und in bezug auf das bakterielle System an die Arbeiten von Watsons Laboratorium^[25], von Berg^[26] und an die wichtige Verfeinerung, die 1961 durch Matthaei und Nirenberg^[27] dazukam.

Angesichts der chemischen Struktur der Nucleinsäuren sah sich der Chemiker zwei Hauptfragen gegenüber: der Synthese und der Sequenzanalyse. Die chemische Synthese kurzkettiger Oligonucleotide bekam Vorrang in meinem Laboratorium. Es traten dabei mehrere Probleme auf: 1. Die Aktivierung der Phosphomonoestergruppe eines Mononucleotids, so daß es eine Hydroxygruppe eines anderen Nucleosids oder Nucleotids phosphorylieren kann; 2. die Auswahl geeigneter Schutzgruppen für die funktionellen Gruppen (primäre und sekundäre Hydroxygruppen der Zuckerringe, Aminogruppen der Purin- und Pyrimidinringe sowie der Verhinderung der Phosphoryl-Dissoziation in der Phosphomonoestergruppe); 3. die Ausarbeitung von Methoden für die Polymerisation von Mononucleotiden und für die Trennung und Charakterisierung der entstehenden Polynucleotide; und 4. das Auffinden von Wegen für die schrittweise Synthese von Polynucleotiden mit bestimmten Sequenzen.

Während auch jetzt noch die organisch-chemischen Methoden weiterer Forschung und Verfeinerung be-

- [12] S. B. Weiss, Proc. nat. Acad. Sci. USA 46, 1020 (1960).
- [13] A. Stevens, J. biol. Chemistry 236, PC43 (1961).
- [14] J. Hurwitz, J. J. Furth, M. Anders u. A. Evans, J. biol. Chemistry 237, 3752 (1962).
- [15] M. Chamberlin u. P. Berg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 81 (1962).
- [16] D. P. Burma, H. Kroger, S. Ochoa, R. C. Warner u. J. D. Weill, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 749 (1961).
- [17] A. D. Hershey, J. Dixon u. M. Chase, J. gen. Physiol. 36, 777 (1953).
- [18] E. Volkin u. L. Astrachan, Virology 2, 149 (1956).
- [19] F. Jacob u. J. Monod, J. molecular. Biol. 3, 318 (1961).
- [20] S. Brenner, F. Jacob u. M. Meselson, Nature (London) 190, 576 (1961).
- [21] F. Gros, W. Gilbert, H. Hiatt, C. G. Kurland, R. W. Risenbrough u. J. D. Watson, Nature (London) 190, 581 (1961).
- [22] P. C. Zamecnik, Harvey Lectures LIV, 256 (1958/1959).
- [23] F. Lipmann, W. C. Hulsmann, G. Hartmann, H. G. Boman u. G. Acs, J. cellular comp. Physiol., Suppl. 1, 54, 75 (Dez. 1959).
- [24] P. Berg, Annu. Rev. Biochem. 30, 293 (1961).
- [25] J. D. Watson in: Les Prix Nobel En 1962 (Norstedt, Stockholm 1963), S. 155; Angew. Chem. 75, 439 (1963).
- [26] W. B. Wood u. P. Berg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 94 (1962).
- [27] J. H. Matthaei u. M. W. Nirenberg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 1580 (1961).

dürfen, so wurde doch die Synthese kurzkettiger Desoxyribopolynucleotide mit vorher bestimmten und vollständig kontrollierten Sequenzen bereits Anfang der sechziger Jahre möglich. Zusätzlich gelang die eindeutige Synthese kurzer Ribooligonucleotide mit ausschließlich 3' → 5'-Internucleotidbindungen. Die chemischen Aspekte dieser Probleme können in diesem Vortrag nicht diskutiert werden; dafür sollten andere Übersichtsaufsätze^[28–33] herangezogen werden.

Der folgende Überblick wird sich auf den Teil der synthetischen Arbeit beschränken, der sich mit den Problemen des genetischen Codes beschäftigt. Die Aufmerksamkeit soll in der Hauptsache auf die biochemischen Experimente gerichtet werden, die durch synthetische Polynucleotide erst möglich geworden sind.

II. Polynucleotid-Synthese und genetischer Code

Einige wenige Worte über die experimentelle Entwicklung des Code-Problems sind jetzt angebracht. Anfang der fünfziger Jahre erweckten mögliche Gesetze für den genetischen Code die Aufmerksamkeit vieler Theoretiker; Gamow^[34] war der erste, der über eine mögliche Beziehung zwischen DNA- und Proteinstruktur spekulierte. Bis 1961 war experimentell allerdings nur der direkte Vergleich der Sequenz einer Nucleinsäure mit der des von ihr bestimmten Proteins möglich. Man hoffte, dies entweder chemisch tun zu können, z. B. durch Untersuchungen des Hüllproteins eines Virus und seiner RNA, oder mit der Mutantentechnik. Eine geniale Anwendung der „frameshift mutation“ gelang Crick und Mitarbeitern, die einige fundamentale Eigenschaften des genetischen Codes korrekt abgeleitet haben^[1]. Diese Möglichkeiten eröffneten allerdings wenig Hoffnung auf einen unmittelbaren Zugang zum Codeproblem.

Die Entdeckung, die einen direkten experimentellen Angriff auf den genetischen Code einleitete, stammte von Matthaei und Nirenberg^[27], die beobachteten, daß Polyuridylylat die Synthese von Polyphenylalanin im bakteriellen zellfreien aminosäureeinbauenden System steuerte. Das Ziel war es nun, synthetische Polynucleotide definierter Zusammensetzung *in vitro* als Messenger zu benutzen. Tatsächlich haben zwischen 1961 und 1963 sowohl Ochoa^[35] als auch Nirenberg^[36] und ihre Mitarbeiter sehr viel über die Brutto-

- [28] H. G. Khorana, Federat. Proc. 19, 931 (1960).
- [29] H. G. Khorana: Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest. Wiley, Inc., New York 1961.
- [30] H. G. Khorana, T. M. Jacob, M. W. Moon, S. A. Narang u. E. Ohtsuka, J. Amer. chem. Soc. 87, 2954 (1965).
- [31] H. G. Khorana, Federat. Proc. 24, 1473 (1965).
- [32] H. G. Khorana, Proc. 7th int. Congress Biochemistry, Tokyo, 1967, S. 117 (1968).
- [33] H. G. Khorana: Proceedings of Plenary Lectures of IUPAC Symposium on Natural Products. London 1968, im Druck.
- [34] G. Gamow, Nature (London) 173, 318 (1954).
- [35] S. Ochoa, Federat. Proc. 22, 62 (1963).
- [36] M. W. Nirenberg, J. H. Matthaei, O. W. Jones, R. G. Martin u. S. H. Barondes, Federat. Proc. 22, 55 (1963).

Nucleotidzusammensetzung der Code-Einheiten unter Verwendung von Polynucleotiden festgestellt, die mit dem Enzym Polynucleotid-Phosphorylase gewonnen worden waren.

1. Kurzkettige Desoxyribopolynucleotide mit sich wiederholenden Nucleotidsequenzen^[*]

Wir hofften, Ribopolynucleotid-Messenger mit vollständig definierter Nucleotidsequenz synthetisieren zu können. Damals jedoch erlaubten die chemischen Methoden lediglich die Synthese von Oligonucleotiden mit einigen wenigen Ribonucleotid-Einheiten (s. u. bei Trinucleotid-Synthese). In der Desoxynucleotid-Reihe war die Chemie ein bißchen weiter, und die Synthese von längeren – aber immer noch kurzen – Ketten mit 10 bis 15 Nucleotiden war möglich. Deswegen entschlossen wir uns, das RNA-transkribierende Enzym zu studieren, und hofften, daß es chemisch synthetisierte kurze Desoxyribopolynucleotide in der gleichen Art wie biologisch aktive DNA als Matrizen benutzen würde.

Unsere ersten Experimente mit der RNA-Polymerase^[37] schlossen sich an die Beobachtung von Hurwitz und Mitarbeitern^[38] an, daß eine Mischung chemisch synthetisierter Thymidin-Oligonucleotide als Matrize für die Synthese von Ribopolyadenylat wirkte. Unser Ziel war es, ein Ribopolynucleotid-Produkt zu erhalten, das an Kettenlänge dem als Matrize benutzten Desoxyribopolynucleotid gleichkam. Statt dessen zeigte die Analyse, daß das RNA-Produkt unabhängig von der Länge der kurzen Desoxypolynucleotid-Matrize immer sehr viel länger war; es enthielt in allen Fällen mehr als 100 Nucleotideinheiten. Auf den ersten Blick schienen die Ergebnisse insofern entmutigend, als wir anscheinend die Kontrolle über die exakte Größe des Produktes verloren hatten, obwohl wir die Größe der Oligothymidyl-Matrize sorgfältig überwacht hatten. Aber es wurde auch bald deutlich, daß dieses „slipping“ oder wiederholte Kopieren durch das Enzym eine vortreffliche Möglichkeit zur Vermehrung der Information sein könnte, die in den kurzen, chemisch synthetisierten Polynucleotiden enthalten war. In den weiteren Arbeiten bemühten wir

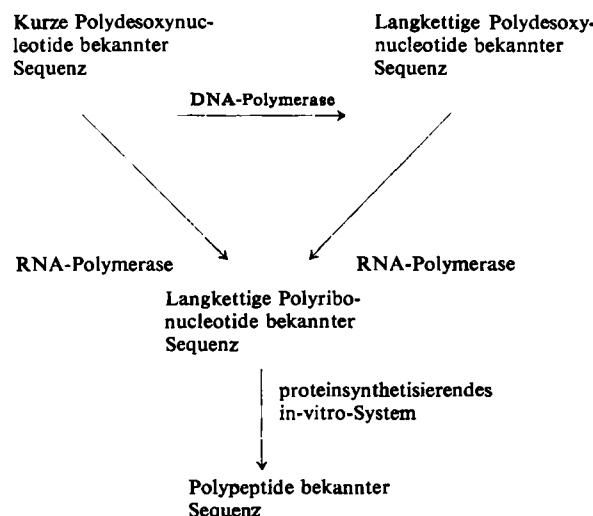
[*] Abkürzungen: Die Buchstaben A, C, G, T und U bedeuten die Nucleoside oder Nucleotide von Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin bzw. Uracil. Die Präfixe d und r bezeichnen die Desoxyribose- bzw. Riboserielle der Polynucleotide. Alle in diesem Aufsatz genannten Polynucleotide, die mehr als eine Sorte Nucleotide enthalten, bestehen aus streng sich wiederholenden Nucleotidsequenzen. Die sich wiederholende Einheit ist angegeben. Zum Beispiel: Poly-r-UG und Poly-r-UAG bedeuten Polymere, in denen sich die Dinucleotidsequenz UG bzw. die Trinucleotidsequenz UAG wiederholen. Polythymidylat mit elf Nucleotideinheiten in der Kette wird mit dT₁₁, das Hepta-desoxyadenylat mit dA₇ abgekürzt. tRNA oder sRNA bedeutet Transfer-RNA; Met-tRNAMet bezeichnet die nichtformylierbare Spezies der methioninspezifischen tRNA, die mit der Aminosäure beladen ist; Fmet-tRNAMet bedeutet die formylierbare Spezies der methioninspezifischen tRNA, die mit formyliertem Methionin beladen ist.

[37] A. Falaschi, J. Adler u. H. G. Khorana, J. biol. Chemistry 238, 3080 (1963).

[38] J. Hurwitz, J. J. Furth, M. Anders u. A. Evans, J. biol. Chemistry 237, 3752 (1962).

uns, die Bedingungen für diese „Vermehrung“ ein bißchen besser kennenzulernen^[39].

Einige Monate später suchte ich Kornbergs Laboratorium auf (eine meiner vielen Wallfahrten zu diesem bedeutenden Laboratorium) und begann einige Experimente mit der DNA-Polymerase. Und auch hier veranlaßten sehr kurze synthetische Oligonucleotide, die abwechselnd A- und T-Einheiten enthielten, das Enzym zu ausgiebiger Synthese des vorher bereits charakterisierten hochmolekularen d-AT-Polymeren^[40]. Diese ermutigenden Resultate ließen uns ein allgemeines Schema (Schema 1) für in-vitro-Studien



Schema 1. Vorgeschlagene Reaktionsfolge für die Darstellung hochmolekularer RNA-Messenger und die anschließende in-vitro-Synthese von Polypeptiden bekannter Aminosäure-Sequenz.

des Code-Problems konzipieren. Damals stellten wir uns die „Vermehrung“ bei der DNA- oder RNA-Produktion als allgemeine Eigenschaft der Polymerasen in dem Fall vor, daß die chemisch synthetisierten Desoxypolynucleotid-Matrizen sich wiederholende Einheiten von Nucleotidsequenzen enthielten (Homopolynucleotide, sich wiederholende Di- oder Trinucleotide). Von da ab ging alles bemerkenswert gut, und zwischen Frühjahr 1963 und Ende 1967 lag wirklich eine Zeit fast ununterbrochenen Erfolges bei der Arbeit über den genetischen Code.

Die Entscheidung für die Synthese von Desoxyribopolynucleotiden mit sich wiederholenden Sequenzen war auch aus anderen Gründen glücklich. Das zellsfreie proteinsynthetisierende System, das ja nur ein roher Bakterienextrakt war, enthielt zweifellos sehr aktive Nucleaseen und Peptidasen. Bei der Benutzung von Messengern mit vollständig definierter, aber sich strikt wiederholender Nucleotidsequenz konnte man unzweideutige Antworten erwarten, und zwar unabhängig von Beschädigungen 1. der synthetischen Messenger durch Exo- und/oder Endonucleaseen und 2. der Polypeptide durch die gegen sie gerichteten proteolytischen Enzyme.

[39] B. D. Mehrotra u. H. G. Khorana, J. biol. Chemistry 240, 1750 (1965).

[40] A. Kornberg, L. L. Bertsch, J. F. Jackson u. H. G. Khorana, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 315 (1964).

Die tatsächliche Auswahl der Nucleotid-Kombinationen in den zu synthetisierenden Desoxyribonucleotiden ging von der damaligen Vorstellung aus, daß – mindestens in einem zellfreien proteinsynthetisierenden System – die Messenger-RNA in einzelsträngiger Konfiguration benutzt zu werden scheint. Tatsächlich war die einzige DNA, die mehr als eine Nucleotid-Spezies enthielt und deren Sequenz vollständig bekannt war, die oben erwähnte Poly-d-AT. Die RNA-Polymerase synthetisiert an diesem Polynucleotid sehr schön die erwartete Poly-r-AU mit strikt alternierender Sequenz der beiden Basen, doch hat Poly-r-AU wegen seiner Selbstkomplementarität eine feste doppelsträngige Struktur und ruft keine Wirkung auf die Ribosomen des zellfreien Systems hervor. Damit stand fest, daß man Kombinationen von Nucleotiden, die zu Polynucleotiden mit derart starker Basenpaarung führen, vermeiden muß [30–32].

Alle unsere chemischen Synthesen, die für den genetischen Code wichtig waren, sind in Tabelle 1 gezeigt.

Gründe für die Auswahl der Nucleotidsequenzen in den beiden letzten Serien sind: 1. enthalten sie an jeder vierten Stelle die Kettenabbruch-Codons, und 2, kann diese Klasse von Polymeren benutzt werden, um die Ableserichtung der Messenger-RNS zu beweisen [49–51].

Es soll noch auf zwei allgemeine Punkte bei allen in Tabelle 1 gezeigten synthetischen Polynucleotiden hingewiesen werden. Der erste Punkt ist, daß jede Serie zwei Polynucleotide enthält, die *antiparallel* komplementär im Sinne der Watson-Crick-Basenpaarung sind. Ein *parallel* komplementäres Paar von Polymeren mit sich wiederholenden Trinucleotiden erwies sich als ungeeignet für die DNA-Polymerase [52]. Der zweite Punkt ist, daß es tatsächlich nötig war, Segmente zu synthetisieren, die beiden Strängen des erwünschten DNA-Polymeren entsprachen (s.u.). Die DNA-Polymerase löst keine Polymerisation aus, wenn man ihr nur eines der beiden Segmente als Matrize gibt.

Tabelle 1. Synthetische Desoxyribopolynucleotide mit sich wiederholenden Nucleotidsequenzen.

sich wiederholende Dinucleotidsequenz	sich wiederholende Trinucleotidsequenz	sich wiederholende Tetranucleotidsequenz					
{ d(TC) ₆ } d(AG) ₆ }	{ d(TG) ₆ } d(AC) ₆ }	{ d(TTC) ₄ } d(AAG) ₄ } { d(TTG) ₄₋₆ } d(CAA) ₄₋₆ }	{ d(CCT) ₃₋₅ } d(GGA) ₃₋₅ } { d(CGA) ₃₋₅ } d(CGT) ₃₋₅ }	{ d(TAC) ₄₋₆ } d(TAG) ₄₋₆ } { d(ATC) ₃₋₅ } d(ATG) ₃₋₅ }	{ d(CCA) ₃₋₅ } d(GGT) ₃₋₅ }	{ d(TTAC) ₄ } d(GTAA) ₂ }	{ d(TCTA) ₃ } d(TAGA) ₂ }

Zuerst haben wir die beiden links gezeigten Serien von Polynucleotiden hergestellt, die sich wiederholende Dinucleotidsequenzen enthalten. Eine Serie enthält das Hexamere des Dinucleotids mit sich abwechselnden Thymidylat- und Guanylresten sowie das Hexamere des Dinucleotids mit abwechselnden Adenylat- und Cytidylresten. Die zweite Serie besteht aus dem Hexameren des Dinucleotids mit abwechselnden Thymidylat- und Cytidylresten und dem Hexameren des Dinucleotids mit abwechselnden Adenylat- und Guanylresten [41]. Diese Arbeiten wurden auf Polynucleotide mit sich wiederholenden Trinucleotidsequenzen ausgedehnt. Es gibt ein theoretisches Maximum von zehn solcher Serien, die mehr als eine Nucleotidbase enthalten, und wir synthetisierten sieben davon [42–46]. In Tabelle 1 sind außerdem zwei Serien von Polymeren mit sich wiederholenden Tetranucleotidsequenzen [47, 48] gezeigt. Zwei zusätzliche Beweg-

2. Doppelsträngige DNA-ähnliche Polymere mit sich wiederholenden Nucleotidsequenzen

In einem Teil der früheren Arbeit wurden kurzkettige Desoxyribopolynucleotide mit sich wiederholenden Sequenzen, z. B. (TTC)₃ und (TC)₅, direkt als Matrizen für die RNA-Polymerase aus *E. coli* benutzt. Obwohl diese Experimente erfolgreich waren [31, 53], zeigte die weitere Arbeit bald, daß als „Verstärker“ die DNA-Polymerase bei weitem vorzuziehen war. Deswegen untersuchten wir nach der chemischen Synthese der Matrizen zunächst die DNA-Polymerase und charakterisierten die DNA-ähnlichen Produkte, die sie mit den kurzkettigen Matrizen produziert.

In Schema 2 sind die vier Reaktionstypen der DNA-Polymerase aufgeführt, einschließlich der Reaktionen unter Verwendung kurzer Homopolynucleotide. Laut Reaktion (1) bewirkt ein Gemisch von dT₁₁ und dA₇ eine ausgedehnte Polymerisation von dATP und dTTP zu einem DNA-ähnlichen Polymeren mit Polyadenylat und Polythymidylat in den beiden Strängen. In Reaktion (2) steuert ein Gemisch der beiden kurzkettigen Polynucleotide mit sich wiederholenden Dinucleotidsequenzen die Synthese von langkettigem DNA-ähn-

[41] E. Ohtsuka, M. W. Moon u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 87, 2956 (1965).

[42] T. M. Jacob u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 87, 2971 (1965).

[43] S. A. Narang u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 87, 2981 (1965).

[44] S. A. Narang, T. M. Jacob u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 87, 2988 (1965).

[45] S. A. Narang, T. M. Jacob u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 89, 2158 (1967).

[46] S. A. Narang, T. M. Jacob u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 89, 2167 (1967).

[47] H. Kössel, H. Büchi u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 89, 2185 (1967).

[48] E. Ohtsuka u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 89, 2195 (1967).

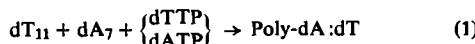
[49] H. G. Khorana, H. Büchi, T. M. Jacob, H. Kössel, S. A. Narang u. E. Ohtsuka, J. Amer. chem. Soc. 89, 2154 (1967).

[50] H. Kössel, A. R. Morgan u. H. G. Khorana, J. molecular Biol. 26, 449 (1967).

[51] H. Kössel, Biochim. biophysica Acta 157, 91 (1968).

[52] R. D. Wells, T. M. Jacob, S. A. Narang u. H. G. Khorana, J. molecular Biol. 27, 237 (1967).

[53] S. Nishimura, T. M. Jacob u. H. G. Khorana, Proc. nat. Acad. Sci. USA 52, 1494 (1964).



Schema 2. Typen von Reaktionen, die von der DNA-Polymerase katalysiert werden. Bei allen DNA-ähnlichen Polymeren ist zwischen die beiden komplementären Stränge ein Doppelpunkt gesetzt. Die komplementären Sequenzen der einzelnen Stränge sind so geschrieben, daß die antiparallele Basenpaarung deutlich wird.

lichem Polymerem mit exakt den gleichen Sequenzen wie in den kurzkettigen Matrizen^[54, 55]. In weiteren Versuchen wurden ähnliche Reaktionen mit kurzkettigen Matrizen, die sich wiederholende Tri- und Tetranucleotide^[52, 56] enthielten, demonstriert. Die hochmolekularen DNA-ähnlichen Polymeren wurden u.a. durch Nachbargruppenanalyse, Elektronenmikroskopie (vgl.^[55]), Sedimentationsgeschwindigkeit und Bandenbildung in alkalischen Cäsiumchlorid-Dichtegradienten^[57] charakterisiert.

Einige der von der DNA-Polymerase katalysierten Reaktionen sind bemerkenswert: 1. zeigt das Enzym in allen untersuchten Reaktionen (Schema 2) vollständige Zuverlässigkeit in der Reproduktion der Sequenzen; 2. ist die Synthese extensiv, 50- bis 200-fach, und die Produkte haben ein hohes Molekulargewicht (300000 bis über 1000000); 3. vermehrt das Enzym die durch chemische Synthese geschaffene Information, und 4. ist es schließlich vom Standpunkt des Organikers der befriedigendste Aspekt, daß die so erhaltenen DNA-Polymeren wiederholt für die weitere Produktion der gleichen Polymeren benutzt werden können. Es ist nicht nötig, auf die zeitraubende chemische Synthese zurückzugreifen, um die Matrizen erneut zu gewinnen. Die DNA-Polymerase sichert die Kontinuität dieser Sequenzen.

Tabelle 2 führt die Arten von Polymeren auf, die bisher synthetisiert und charakterisiert worden sind. Es ergaben sich drei Klassen von Polymeren: Zwei dop-

Tabelle 2. DNA-ähnliche Polymere mit sich wiederholenden Nucleotid-Sequenzen.

sich wiederholende Dinucleotidsequenz	sich wiederholende Trinucleotidsequenz	sich wiederholende Tetranucleotidsequenz
Poly-d-TC: GA	Poly-d-TTC: GAA	Poly-d-TTAC: GTAA
Poly-d-TG: CA	Poly-d-TTG: CAA	Poly-d-TAC: GATA
	Poly-d-TAC: GTA	
	Poly-d-ATC: GAT	

[54] C. Byrd, E. Ohtsuka, M. W. Moon u. H. G. Khorana, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 79 (1965).

[55] R. D. Wells, E. Ohtsuka u. H. G. Khorana, J. molecular Biol. 14, 221 (1965).

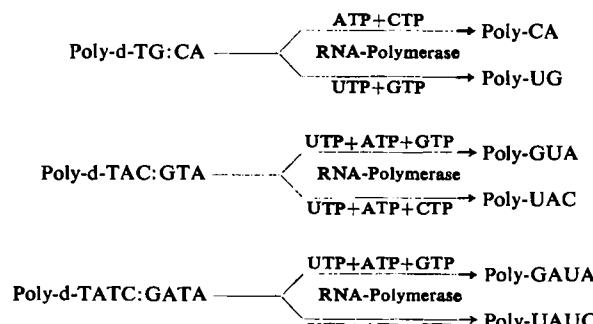
[56] R. D. Wells, H. Büchi, H. Kössel, E. Ohtsuka u. H. G. Khorana, J. molecular Biol. 27, 265 (1967).

[57] R. D. Wells u. J. E. Blair, J. molecular Biol. 27, 273 (1967).

pelsträngige Polymere mit sich wiederholenden Dinucleotidsequenzen, vier Polymere mit sich wiederholenden Trinucleotidsequenzen und zwei Polymere mit sich wiederholenden Tetranucleotidsequenzen.

3. Einzelsträngige Ribopolynucleotide mit sich wiederholenden Nucleotidsequenzen

Der nächste Schritt war die Transkription der DNA-ähnlichen Polymeren mit Hilfe von RNA-Polymerase in einzelsträngige Ribopolynucleotide. Das durchweg benutzte Prinzip ist in Schema 3 gezeigt. Alle DNA-ähnlichen Polymeren enthalten zwei oder maximal drei



Schema 3. Darstellung einzelsträngiger Ribonucleotide über DNA-ähnliche Polymere mit sich wiederholenden Nucleotidsequenzen.

Arten von Basen in jedem Strang. Es ist deshalb durch Zugabe der nur für die Kopie eines Stranges nötigen Nucleosidtriphosphate möglich, die Aktivität der RNA-Polymerase auf diesen Strang zu beschränken. Dies ist bei allen Polymeren in Schema 3 der Fall. Die Analyse der Nachbargruppenhäufigkeit aller RNA-Produkte zeigt wieder, daß sie streng sich wiederholende Nucleotidsequenzen enthalten^[58–60]. Die bisher dargestellten RNA-ähnlichen Polymeren sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3. Synthetische Ribopolynucleotide mit sich wiederholenden Nucleotidsequenzen.

sich wiederholende Dinucleotid- sequenzen	sich wiederholende Trinucleotid- sequenzen	sich wiederholende Tetranucleotid- sequenzen
Poly-rUG	Poly-rUAC	Poly-rUAAG
Poly-rAC	Poly-rGUA	Poly-rUAGA
Poly-rUC	Poly-rAUC	Poly-rUCUA
Poly-rAG	Poly-rGAU	Poly-rUUAC
	Poly-rUUG	
	Poly-rCAA	
	Poly-rUUC	
	Poly-rGAA	

Die bisher beschriebene Arbeit kann wie folgt zusammengefaßt werden: Durch Kombination rein chemischer Methoden, die nötig sind, um neue und spezifische Information zu produzieren, und durch Weitergabe dieser Information an die beiden Enzyme DNA-Polymerase und RNA-Polymerase, die wundervoll

[58] S. Nishimura, D. S. Jones u. H. G. Khorana, J. molecular Biol. 13, 302 (1965).

[59] H. G. Khorana: Genetic Elements. Federation of European Societies for Biological Chemists, April 1966, S. 209.

[60] A. R. Morgan, unveröffentlicht.

präzise Kopiermaschinen sind, haben wir eine Vielfalt hochmolekularer Ribopolynucleotide bekannter Sequenz zur Verfügung. Fehler – wenn sie überhaupt auftreten – sind zu vernachlässigen.

4. Chemische Synthese der 64 möglichen Ribotrinucleotide

Ungefähr zu der Zeit, als die genannten Methoden für die Synthese langkettiger Ribopolynucleotide vollständig definierter Nucleotidsequenz entwickelt worden waren, verwendeten *Nirenberg* und *Leder* (s.u.) erstmals Ribotrinucleotide zur Bestimmung der Nucleotidsequenz innerhalb der Codons für die 20 Aminosäuren (s.u.). Wie oben erwähnt, hatten chemische Methoden auf dem Ribonucleotidgebiet, die in unserem Laboratorium entwickelt worden waren, zu allgemeinen Synthesemethoden für Ribonucleotide ge-

ten solche Polymere den Einbau von zwei Aminosäuren in streng alternierender Sequenz dirigieren. Polymere mit sich wiederholenden Trinucleotiden, $(ABC)_n$, enthalten drei sich wiederholende Triplets, in Abhängigkeit vom Startpunkt, nämlich ABC, BCA und CAB. Hier würde man voraussagen, daß auf einmal nur eine Aminosäure unter Bildung einer Homopolypeptidkette eingebaut werden sollte, und daß maximal drei solche Ketten entstehen sollten. Ähnliche Überlegungen für Polynucleotide mit sich wiederholenden Tetranucleotidsequenzen $(ABCD)_n$ zeigen, daß bei der in-vitro-Polypeptidsynthese Produkte mit sich wiederholenden Tetrapeptidsequenzen entstehen sollten, unabhängig vom Startpunkt der Messenger-Ablesung. Alle diese Voraussagen sind ohne Ausnahme experimentell bestätigt worden. Die Resultate mit den drei Klassen von Polymeren seien wie folgt zusammengefaßt.

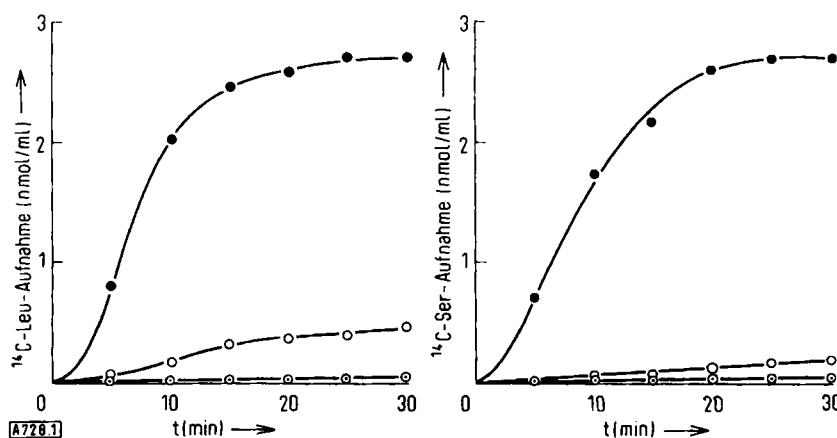


Abb. 1. Einbau von ¹⁴C-Serin und ¹⁴C-Leucin in Polypeptide in Gegenwart von Poly-UC. ●: + Poly-UC + Ser bzw. Leu; ○: + Poly-UC - Ser bzw. Leu; ⊙: -- Poly-UC + Ser bzw. Leu.

führt. In Anbetracht der Wichtigkeit dieser Oligonucleotide für die Arbeit am genetischen Code wurden alle 64 Trinucleotide, die sich aus den vier üblichen Ribonucleotiden A, C, U und G ergeben, eindeutig synthetisiert und charakterisiert. Einzelheiten der dabei angewendeten chemischen Prinzipien können einem speziellen Aufsatz^[61] entnommen werden. Über die Verwendung der Trinucleotide für die Zuordnung der Codons zu den Aminosäuren wird unten berichtet.

III. Polypeptid-Synthese in vitro und genetischer Code

1. Zellfreie Polypeptid-Synthese unter Verwendung von Polynucleotiden mit sich wiederholenden Sequenzen

Polymere mit sich wiederholender Dinucleotidsequenz, $(AB)_n$, enthalten abwechselnd zwei Triplets, ABA und BAB. Nimmt man an, der Code sei nicht überlappend und ein Codon habe drei Buchstaben, so soll-

Abbildung 1 gibt ein Beispiel für die Art der Resultate, die mit Ribopolynucleotiden mit zwei Nucleotiden in alternierender Sequenz erhalten worden sind. Drei Charakteristika dieses Aminosäureeinbaus, die für alle Messenger dieser Klasse gelten, sind: 1. es wird der Einbau von nur zwei Aminosäuren beobachtet; 2. der Einbau der einen Aminosäure hängt von der Anwesenheit der anderen Aminosäure ab, und 3. der Einbau der beiden Aminosäuren ist äquimolekular. Diese Charakteristika lassen vermuten, daß Copolypeptide mit zwei Aminosäuren in alternierender Sequenz produziert worden sind. Dies ist durch gründliche Analyse aller vier Serien von Polypeptiden, die in Tabelle 4 aufgeführt sind, gezeigt worden^[58,62].

Tabelle 4. Zellfreie Copolypeptid-Synthese unter Verwendung von Messengern mit sich wiederholenden Dinucleotid-Sequenzen (System: *E. coli* B).

Polynucleotid	Copolypeptide mit zwei Aminosäuren in alternierender Sequenz
Poly-UC	$(\text{Ser-Leu})_n$
Poly-AG	$(\text{Arg-Glu})_n$
Poly-UG	$(\text{Val-Cys})_n$
Poly-AC	$(\text{Thr-His})_n$

[61] R. Lohrmann, D. Söll, H. Hayatsu, E. Ohtsuka u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 88, 819 (1966).

[62] D. S. Jones, S. Nishimura u. H. G. Khorana, J. molecular Biol. 16, 454 (1966).

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse an Polymeren mit sich wiederholenden Trinucleotidsequenzen zusammengestellt. Demnach geben diese Polymere als Regel drei Homopolypeptide [63, 64], und es soll hier ausdrücklich

Tabelle 5. Zellfreie Homopolypeptid-Synthese unter Verwendung von Messingern mit sich wiederholenden Trinucleotid-Sequenzen (System: *E. coli* B).

Polynukleotid	Homopolypeptid aus einzelnen Aminosäuren
Poly-UUC	Phe, Ser, Leu
Poly-AAG	Lys, Glu, Arg
Poly-UUG	Cys, Leu, Val
Poly-CAA	Gln, Thr, Asn
Poly-GUA	Val, Ser (Kettenabbruch)
Poly-UAC	Tyr, Thr, Leu
Poly-AUC	Ile, Ser, His
Poly-GAU	Met, Asp (Kettenabbruch)

bemerkt werden, daß dies der Fall war, weil bei allen Arbeiten mit dem zellfreien System eine unphysiologisch hohe Magnesiumionen-Konzentration vorhanden war und deshalb die Polypeptid-Synthese ohne das entsprechende Signal einsetzen konnte. Zwei Polymere, Poly-r-UAG und Poly-r-AUG, waren insofern Ausnahmen, als sie den Einbau von nur zwei Aminosäuren dirigierten [64]. Diese Polymeren enthalten jeweils ein Kettenabbruch-Triplett; UAG ist das gut bekannte „Amber“-Triplett, und UGA ist jetzt ebenfalls als Kettenabbruch-Triplett bekannt.

Schließlich dirigieren, wie Tabelle 6 zeigt, Polymere mit sich wiederholenden Tetranucleotidsequenzen den Aminosäureeinbau zu Produkten mit sich wiederholenden Tetrapeptidsequenzen, es sei denn, daß Ketten-

Tabelle 6. Zellfreie Polypeptid-Synthese unter Verwendung von Messingern mit sich wiederholenden Tetranucleotid-Sequenzen (System: *E. coli* B).

Polynukleotid	Polypeptid
Poly-UAUC	(Tyr-Leu-Ser-Ile) _n
Poly-UUAC	(Leu-Leu-Thr-Tyr) _n
Poly-GUAA	Di- und Tri-peptide
Poly-AUAG	Di- und Tri-peptide

abbruch-Triplets anwesend sind. Dies wurde durch Analyse der beiden in Tabelle 6 gezeigten Produkte festgestellt [50], und diese Analyse beweist unabhängig, daß der Messenger in der Richtung vom 5'- zum 3'-Ende abgelesen wird. Andere Laboratorien erhielten das gleiche Ergebnis [65, 66]. Die letzten beiden gezeigten Polynukleotide haben an jeder vierten Stelle die Kettenabbruch-Triplets UAG und UAA; aus diesem Grunde kann hier kein längeres Peptid entstehen, aber es ist die Bildung von Tripeptiden demonstriert worden [51].

Die oben zusammengefaßten Ergebnisse führen zu folgenden allgemeinen Schlüssen: 1. Die DNA diri-

giert tatsächlich die Aminosäuresequenz in Proteinen, und diese Information wird über eine RNA weitergebracht. (Hier wurde erstmals der direkte Zusammenhang zwischen der Sequenz der DNA und der eines Proteins verifiziert.) 2. Alle diese Resultate beweisen einen Code aus drei Buchstaben, der nicht überlappt. 3. Schließlich können auch Informationen über die Codon-Zuordnungen aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden.

2. Codon-Zuordnungen. Die Struktur des Codes

Die beschriebenen Experimente allein erlauben keine eindeutigen Codon-Zuordnungen, es sei denn, man führt außerst viele Polypeptid-Synthesen aus. Bei den Codons UCU und CUC, die Serin und Leucin bedeuten, ist es z. B. nach diesen Experimenten nicht zu entscheiden, welches Codon welche Aminosäure bedeutet. Nun ist aber der Code tatsächlich durch Kombination der Ergebnisse, die Nirenberg und Leder [67] mit ihrer Bindungstechnik erzielten, und den Ergebnissen der oben erwähnten Arbeiten mit Polymeren sich wiederholender Sequenzen abgeleitet wurden. In Nirenbergs Technik kommt es auf die Stimulation der Bindung verschiedener Aminoacyl-tRNAs an Ribosomen in Gegenwart spezifischer Trinucleotide an. Abbildung 2 zeigt ein Beispiel, bei dem die Frage, welches der drei Sequenzisomeren AAG, AGA und GAA das Codon für Lysin ist, geprüft wird. Man mißt die Bindung von ¹⁴C-Lysyl-tRNA an Ribosomen in Gegenwart steigender Mengen dieser Trinucleotide.

Wie man in Abbildung 2 sieht, wird die Bindung spezifisch durch AAG induziert. Ein anderes Trinucleotid, das ebenfalls eine feste Bindung bewirkt, ist AAA; das Experiment mit AAA ist ebenfalls in Abbildung 2 aufgenommen. Die Trinucleotide AAG und AAA sind demnach die Codons für Lysin. Diese Technik ist in

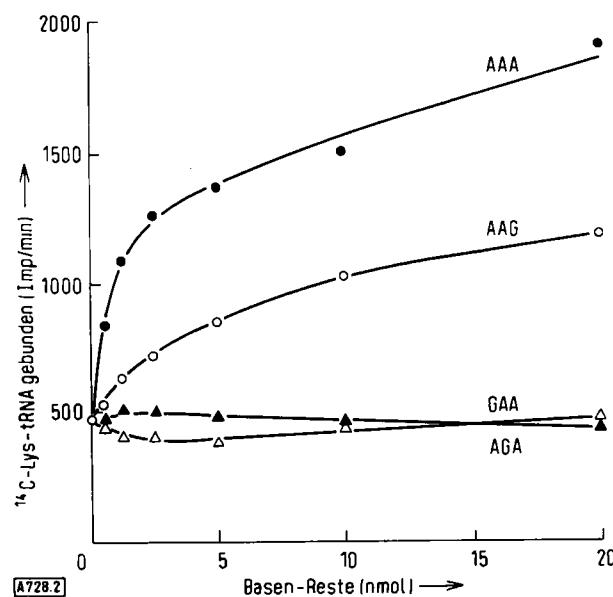


Abb. 2. Stimulierung der Bindung von ¹⁴C-Lysyl-tRNA an Ribosomen durch Trinucleotide.

[63] S. Nishimura, D. S. Jones, E. Ohtsuka, H. Hayatsu, T. M. Jacob u. H. G. Khorana, J. molecular Biol. 13, 283 (1965).

[64] A. R. Morgan, R. D. Wells u. H. G. Khorana, Proc. nat. Acad. Sci. USA 56, 1899 (1966).

[65] Näheres siehe: The Genetic Code. Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biology, Bd. XXXI, 1966.

[66] H. Lamfrom, C. S. McLaughlin u. A. Sarabhai, J. molecular Biol. 22, 359 (1966).

[67] M. W. Nirenberg u. P. Leder, Science 145, 1399 (1964).

Nirenbergs Laboratorium ausgiebig angewendet worden, und meine Kollegen haben ebenfalls alle 64 synthetischen Trinucleotide in dieser Art Analyse getestet. Wenn diese Technik auch außerordentlich brauchbar ist, so hat sie sich doch nicht als vollständig zuverlässig erwiesen. Oft sind die Effekte sehr klein, und es gibt Fälle, in denen bestimmte Trinucleotide die Bindung unerwarteter tRNAs stimulieren. Umgekehrt gibt es Fälle, in denen authentische Trinucleotide keinerlei Bindung ergeben. Wie schon erwähnt, ist der größte Teil des Codes in der Tat mit dieser Technik kombiniert mit den Ergebnissen unter Verwendung von Polymeren mit sich wiederholenden Sequenzen und auch oft mit Hinweisen aus in-vivo-Experimenten entziffert worden.

Die so erarbeitete Struktur des Codes ist in Tabelle 7 gezeigt. Diese Art der Darstellung ist inzwischen nicht mehr ungewöhnlich^[65]:

Tabelle 7. Der genetische Code. Als Abkürzungen für die Aminosäuren sind die Standardabkürzungen verwendet. C.T. bedeutet Kettenabbruch, d.h. die Trinucleotid-Sequenz ist kein Codon für eine Aminosäure, sondern signalisiert wahrscheinlich das Ende einer Peptidkette. C.I. heißt Signal für den Start der Protein-Synthese. Die Anordnung dieser Tabelle folgt der konventionellen Art der Trinucleotidschreibweise: Der erste Buchstabe (die erste Base) steht links (5'-Ende), der dritte Buchstabe (3'-Ende) steht rechts von der mittleren (zweiten) Base. Beispiele für die Ableitung von Codons für verschiedene Aminosäuren aus dieser Tabelle: Codons für Phenylalanin sind UUU und UUC, Codons für Alanin sind GCU, GCC, GCA und GCG.

1. Buchstabe	2. Buchstabe				3. Buchstabe
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	C.T.	C.T.	A
	Leu	Ser	C.T.	Try	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met (C.I.)	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val (C.I.)	Ala	Glu	Gly	G

In der linken Spalte ist ein Feld für jede Base als ersten Buchstaben. In jedes Feld in der rechten Spalte ist eine der vier Basen als dritter Buchstabe gesetzt. In der Mitte sind vier Spalten, jede für eine Base als zweiten Buchstaben (zum Gebrauch der Tabelle siehe Legende).

Nur einige allgemeine Beobachtungen sollen herausgestellt werden: 1. Der gezeigte Code gilt für den Mikroorganismus *E. coli* B, aber wahrscheinlich gilt er im wesentlichen auch für andere Organismen; eine detaillierte und systematische Prüfung in anderen Systemen (Pflanzen und Tieren) steht noch aus. 2. Es sind alle 64 Trinucleotide eingetragen (es gibt keinen absoluten „Unsinn“). Der Code ist in semisystematischer Art hochgradig degeneriert. Die Degeneration betrifft meist den dritten Buchstaben, bei dem alle vier Basen die gleiche Aminosäure bedeuten können, oder bei dem die beiden Purinbasen für eine und die beiden Pyrimidinbasen für eine andere Aminosäure stehen

können. Eine Ausnahme ist das Feld mit dem ersten Buchstaben A und dem zweiten Buchstaben U. Hier repräsentieren AUU, AUC und AUA Isoleucin, während das vierte Codon, AUG, für Methionin steht. Drei Aminosäure-Codons zeigen in anderen Positionen als dem dritten Buchstaben zusätzliche Degeneration. Demnach sind die Codons für Leucin und Arginin im ersten Buchstaben degeneriert, während das Codon für Serin als einziges im ersten und im zweiten Buchstaben degeneriert ist. 3. Wenn man jetzt auch den Code allgemein für weitgehend universal hält, sollte man doch nicht schließen, daß alle Organismen die gleichen Codons für die Protein-Synthese verwenden. Universalität bedeutet hier, daß ein Trinucleotid-Codon seine Bedeutung nicht von einem Organismus zum nächsten ändert. Nach allem, was wir wissen, ist die DNA verschiedener Organismen sehr unterschiedlich zusammengesetzt, und deshalb verwenden diese möglicherweise in wechselndem Ausmaß verschiedene Codons für die gleiche Aminosäure. 4. Die Codons AUG und GUG, die Methionin bzw. Valin bedeuten, dienen gleichzeitig als Signale für den Start der Polypeptid-Synthese (Start der Protein-Synthese s.u.). 5. Es gibt drei Trinucleotide, UAA, UAG und UGA, die den Abbruch einer Polypeptidkette verursachen. Es ist unklar, welche davon in der Natur benutzt werden und unter welchen Umständen ein bestimmtes benutzt wird. Neuere Arbeiten (siehe die vorstehende Arbeit von M. Nirenberg) zeigen, daß es Proteinfaktoren geben mag, die spezifisch für eines der Abbruch-Codons sind.

Schließlich sollte ausdrücklich bemerkt werden, daß große Teile des Codes in ausdauernden und intensiven Studien von Yanofsky und Mitarbeitern, von Streisinger und Mitarbeitern, von Whitmann und von Tsugita sowie anderen abgeleitet oder bestätigt worden sind (zusammenfassende Darstellung dieser Arbeiten s. [65]).

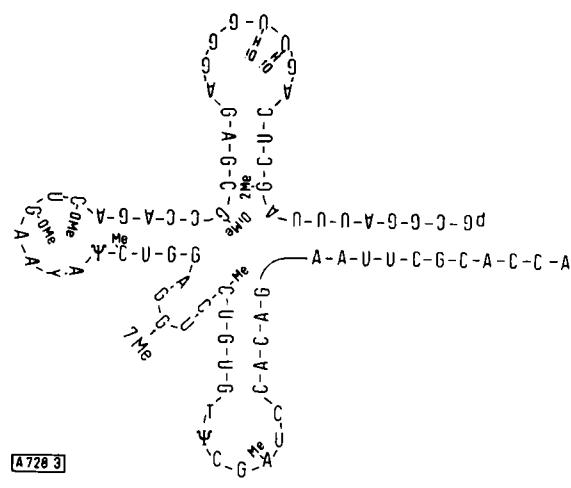
IV. Transfer-RNA-Strukturen: Anticodon und Codon-Erkennung

Der Aufklärung der Nucleotidsequenz von Hefe-Alanin-tRNA durch Holley und Mitarbeiter^[68] folgten ähnliche Arbeiten an anderen tRNAs. Gegenwärtig sind etwa sechs tRNAs aus Hefe, vier aus *E. coli*, eine aus Rattenleber und eine aus Weizenkeimen in der Sequenz aufgeklärt, und wahrscheinlich wird man in naher Zukunft die Strukturen von vielen weiteren kennen.

Dr. RajBhandary und Mitarbeiter^[69] haben die Primärstruktur der Hefe-Phenylalanin-tRNA aufgeklärt. Ihre Struktur ist in Abbildung 3 wie üblich als Kleeball-Modell gezeigt. An allen tRNAs, deren Primärstruktur bekannt ist, hat sich bisher nachweisen lassen,

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

[69] 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).



A726 3

Abb. 3. Kleeblatt-Modell für die Sekundärstruktur der Hefe-Phenylalanin-tRNA. Die Modifikationen in den seltenen Basen folgen aus den Abkürzungen, die bei ihnen stehen. Ψ bedeutet Pseudouridin, Y, in der Nähe des angenommenen Anticodons, G-A-A, ist noch nicht identifiziert. OMe

dass sie diese Kleeblatt-Sekundärstruktur annehmen können. Wie RajBhandary und Mitarbeiter^[69] sowie andere im Detail diskutierten, sind die tRNAs in Bezug auf viele wichtige physikalische Eigenschaften bemerkenswert ähnlich. Es ist nicht meine Absicht, mich

dons wirklich Nucleotid-Nucleotid-Wechselwirkungen kraft Basenpaarung einschließt? Wenn diese Vorstellung richtig ist, dann sollte man erwarten, in der Primärstruktur einer aminosäurespezifischen tRNA drei benachbarte Nucleotideinheiten zu finden, „komplementär“ den gesicherten Codons für die einzelne Aminosäure. In der Tat ist die ermutigendste gemeinsame Eigenschaft aller tRNA-Moleküle bekannter Primärstruktur, daß sie alle die gleiche, schleifenartig exponierte Region tragen, in der solche Trinucleotidsequenzen vorhanden sind. In Tabelle 8 sind viele der bekannten Anticodons und die gesicherten Codons für mehrere Aminosäuren aufgeführt. Man kann sehen, daß in jedem Fall die abgeleiteten Anticodons antiparallele Watson-Crick-Basenpaarung mit den Codons eingehen. Mehr noch, die Tatsache, daß 1. ein einfacher Nucleotidaustausch im Anticodon der *E. coli*-tRNA^{Tyr} eine Änderung der Codeeigenschaften dieser tRNA hervorruft^[71] und daß 2. ein Oligonucleotid-Fragment aus *E. coli*-tRNA^{Fmet}, das die Anticodonsequenz trägt, spezifisch als Antwort auf das Codon für Formyl-methionin^[72] gebunden wird, gibt uns die Sicherheit, daß das Konzept von Anticodons aus drei benachbarten Nucleotiden in allen tRNA-Spezies richtig ist.

Tabelle 8. Codon-Anticodon-Paarung [a], abgeleitet aus den gesicherten Codons für bestimmte Aminosäuren und aus der Primärstruktur der tRNA für die entsprechende Aminosäure.

Aminosäure	Ala	Tyr	Tyr	„amber“-Codon	Phe	Val	Ser	Met
Codons	G C U C A	U A U A Ψ G	U A U C	U A G	U U U C	G U U C	U C U C A	A U G
Anticodons [a]	C G I	A Ψ G	A U G [b]	A U C	A A G-OMe	C A I	A G I	U A C [c]
(tRNA) Quelle	Hefe	Hefe	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> (Tyr-Suppressor-tRNA)	Hefe und Weizenkeime	Hefe	Hefe und Rattenleber	<i>E. coli</i>

[a] Die Codon-Anticodon-Paarung findet in antiparalleler Richtung statt. Dementsprechend sind die Anticodons in umgekehrter Richtung wie bei Oligonucleotiden üblich geschrieben. [b] Die Struktur dieses G-Derivats ist noch unbekannt. [c] Die Struktur dieses C-Derivats ist noch unbekannt.

hier im einzelnen mit dem umfassenden und erregenden Gegenstand der tRNA-Struktur und ihrer biologischen Funktion im einzelnen zu beschäftigen. Die folgenden Abschnitte sind auf solche Aspekte beschränkt, bei denen besonders wichtige Informationen von meinen Kollegen in Madison stammten.

Die erste allgemeine Frage, die zu stellen wäre, ist: Wie werden die Trinucleotid-Codons durch den proteinsynthetisierenden Apparat erkannt? Der erste wichtige Fortschritt war hier das Konzept eines Adaptermoleküls, das nach heutiger Ansicht ein tRNA-Molekül ist. Die Experimente von Benzer, Lipmann und ihren Mitarbeitern^[70] brachten eine elegante Bestätigung dieser Hypothese. Die nächste Frage lautet: Wodurch wird bewiesen, daß die Erkennung der Co-

Ein weiterer wichtiger Aspekt der biologischen Funktion der tRNA verdient Beachtung. Kann ein tRNA-Molekül mehr als ein Codon erkennen? Zur Zeit glauben wir, daß dies beim dritten Buchstaben der Codons oft der Fall ist, und daß dies auf einer schnell wechselnden Paarung mehrerer Basen im tRNA-Molekül beruht, so daß zusätzliche Basenpaarungen zu den Standard-Watson-Crick-Basenpaaren möglich werden^[73]. Ein solcher Fall von multipler Codon-Erkennung durch eine tRNA ist bewiesen^[74]. So kann Phenylalanin-tRNA, die wir in reiner Form in unserem Laboratorium zur Verfügung haben und von der wir wissen, daß das Anticodon 2'-O-Methyl-GAA ist, so-

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

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

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

[74] D. Söll u. U. L. RajBhandary, J. molecular Biol. 29, 97 (1967).

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

wohl UUU als auch UUC erkennen, die gesicherten Codons für Phenylalanin. Dies wurde durch Polyphenylalanin-Synthese unter Benutzung vorher beladener Phenylalanyl-tRNA und der beiden Polymeren Polyuridylat und Poly-UUC bewiesen, das eine sich wiederholende Trinucleotidsequenz enthält (Abb. 4).

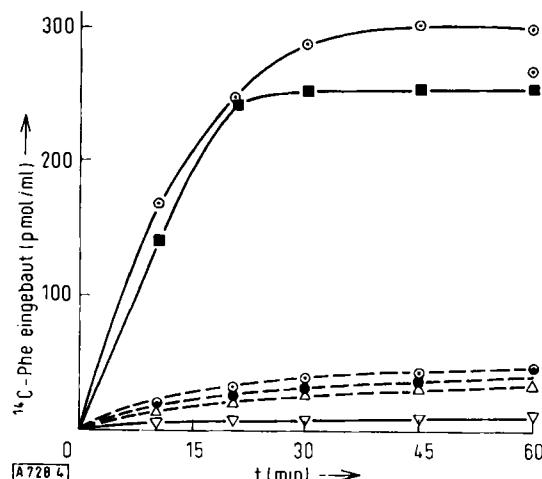


Abb. 4. Polyphenylalanin-Bildung unter Verwendung des protein-synthetisierenden Systems aus *E. coli* und gereinigter Hefe-Phe-tRNA. Messenger sind Poly-U und Poly-UUC. ○: + Poly-UUC + Phe-tRNA; ■: + Poly-U + Phe-tRNA; ○: - tRNA + Poly-UUC + Phe; ●: - tRNA + Poly-U + Phe; △: - Poly-UUC + Phe-tRNA; ▽: - Poly-U + Phe-tRNA.

Es gibt noch andere Möglichkeiten für die multiple Erkennung. Beispielsweise scheint Inosin in der ersten Position U, A und C^[73] erkennen zu können. Ergebnisse, die diese Art der multiplen Erkennung stützen, sind ebenfalls veröffentlicht^[75, 76]. Mögliche biologische Implikationen der multiplen Codon-Erkennung durch tRNA-Moleküle sind an anderer Stelle diskutiert worden^[75].

Transfer-RNA-Moleküle sind im Reiche der Biologie eine einzigartige Klasse. Offenbar müssen sie zahlreiche Funktionen ausüben. Man hat viele Hinweise, daß diese Moleküle zusätzlich zur üblichen Sekundärstruktur eine Tertiärstruktur haben^[65]. Weiterhin wurde ein sehr plausibles und attraktives Modell für die Anticodonschleife entwickelt^[77]. Vor kurzem erzielte Erfolge in mehreren Laboratorien^[78-83] bei Versuchen, tRNA-Kristalle zu erhalten, bilden aller Wahrscheinlichkeit den Beginn einer neuen Ära für die Arbeit über Struktur und Funktion der tRNA.

- [75] D. Söll, J. Cherayil, D. S. Jones, R. D. Faulkner, A. Hampel, R. M. Bock u. H. G. Khorana [65], dort S. 51.
- [76] D. Söll, J. D. Cherayil u. R. M. Bock, J. molecular Biol. 29, 97 (1967).
- [77] W. Fuller u. A. Hodgson, Nature (London) 215, 817 (1967).
- [78] B. F. C. Clark, B. P. Doctor, K. C. Holmes, A. Klug, K. A. Marcker, S. J. Morris u. H. H. Paradies, Nature (London) 219, 1222 (1968).
- [79] S. Kim u. A. Rich, Science 162, 1381 (1968).
- [80] A. Hampel, M. Labanauskas, P. G. Connors, L. Kirkegaard, U. L. RajBhandary, P. B. Sigler u. R. M. Bock, Science 162, 1384 (1968).
- [81] F. Cramer, F. v. d. Haar, W. Saenger u. E. Schlimme, Angew. Chem. 80, 969 (1968).
- [82] H. H. Paradies, FEBS Letters 2, 112 (1968).
- [83] J. R. Fresco, R. D. Blake u. R. Langridge, Nature (London) 220, 1285 (1968).

Fortschritte auf diesem Gebiet wären nicht deswegen aufregend, weil sie unser Verständnis vom Ablauf der Protein-Synthese vertiefen würden, sondern auch wegen der Möglichkeit, daß ein guter Teil der Evolution des genetischen Codes gleichbedeutend mit der Evolution der tRNA-Moleküle ist.

V. Weitere Aspekte des Codes und der Protein-Synthese

1. Start der Protein-Synthese

Die Entdeckung der Formylmethionyl-tRNA durch Marcker und Sanger^[65] hat eine Welle von Untersuchungen über den Start der Protein-Synthese in *E. coli* ausgelöst. Es wird heute allgemein angenommen, daß Formyl-methionin (Fmet), an eine bestimmte Spezies methioninspezifischer tRNA gebunden, das Startsignal zur Protein-Synthese ist. Wie oben erwähnt lag bei den Arbeiten an der Codon-Zuordnung unter Verwendung synthetischer Polynukleotide als Messerger meist eine unphysiologisch hohe Magnesiumionen-Konzentration vor. Unter diesen Bedingungen erübrigten sich ein spezifischer Startmechanismus für die Polypeptidkette.

Die Notwendigkeit eines Startmechanismus kann jedoch durch Erniedrigung der Magnesiumionen-Konzentration auf etwa 4–5 mmol/l (vergleichen mit 10 bis 15 mmol/l in den früheren Arbeiten) demonstriert werden. Dann verursachen in einem zellfreien System nur diejenigen Messenger schnell eine Reaktion, die Codons enthalten, die von der Fmet-tRNA^{Fmet} erkannt werden können. Die Peptid-Synthese beginnt dann mit Fmet am Aminoende. Wiederum erlaubt mir die Zeit keine vollständige Würdigung der Arbeit anderer Laboratorien auf diesem Gebiet. Ich will mich auf die Experimente meines Laboratoriums beschränken, die 1. eine Ableitung der am Kettenstart beteiligten Codons in *E. coli*^[84] gestatten und 2. einiges Licht auf die Rolle der Ribosomen-Untereinheiten bei der Protein-Synthese werfen^[85].

Poly-r-AUG steuert die Polymethionin-Synthese, wie oben erwähnt. Führt man das Experiment bei einer Magnesiumionen-Konzentration von 5 mmol/l aus, so erhält man die in Abbildung 5 gezeigten Ergebnisse. Die Synthese beginnt also verzögert und recht langsam, wenn nur Met-tRNA^{Met} vorhanden ist. Die Zugabe von Fmet-tRNA^{Fmet} führt zu einer schlagartigen Beschleunigung. Daraus ist zu schließen, daß Fmet-tRNA^{Fmet} für den Start und Met-tRNA^{Met} für die Kettenverlängerung nötig ist.

In ähnlicher Weise benötigt die durch Poly-r-UG gesteuerte Synthese des Val-Cys-Copolypeptids (Abb. 6) bei einer Magnesiumionen-Konzentration von 5 mmol/l die Gegenwart von Fmet-tRNA^{Fmet}, und die Zugabe der Proteinfaktoren, die als „initiation factors“

- [84] H. P. Ghosh, D. Söll u. H. G. Khorana, J. molecular Biol. 25, 275 (1967).
- [85] H. P. Ghosh u. H. G. Khorana, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 2455 (1967).

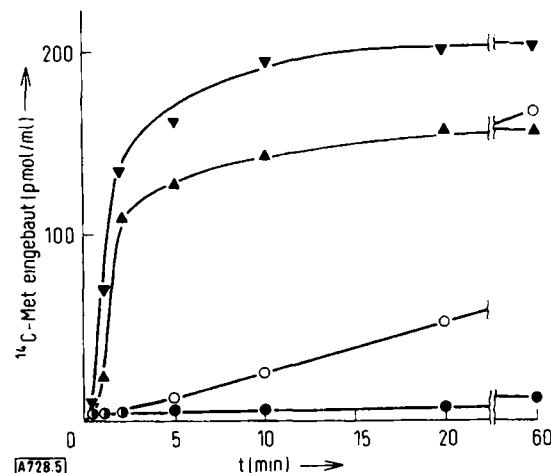


Abb. 5. Polymethionin-Synthese in Gegenwart von Poly-r-AUG und ^{14}C -Met-tRNA $^{\text{Met}}$. Hier ist die Wirkung von Fmet-tRNA $^{\text{Fmet}}$ und den „initiation factors“ gezeigt. ▼: + Poly-r-AUG + Fmet-tRNA + „initiation factor“; ▲: + Poly-r-AUG + Fmet-tRNA; ○: + Poly-r-AUG; ●: - Poly-r-AUG.

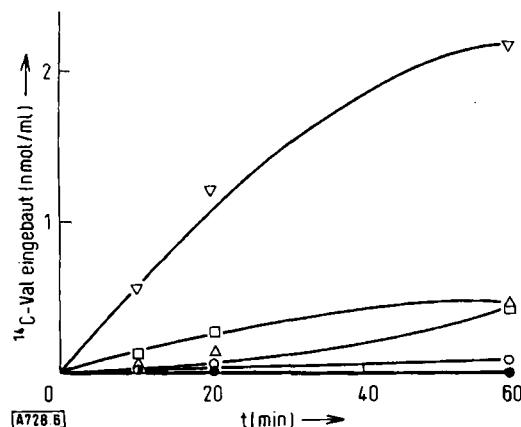


Abb. 6. Synthese des Val-Cys-Copolypeptids, gesteuert durch Poly-r-UG. Die Synthese wurde bei einer Magnesiumionen-Konzentration von 5 mmol/l ausgeführt. Hier ist die Wirkung von Fmet-tRNA $^{\text{Fmet}}$ und den „initiation factors“ gezeigt. ▽: + Poly-r-UG + Fmet + „initiation factor“; □: + Poly-r-UG + „initiation factor“; △: + Poly-r-UG + Fmet; ○: + Poly-r-UG; ●: - Poly-r-UG.

bezeichnet werden, hat schlagende Wirkung^[65]. Die Analyse der terminalen Sequenz des gebildeten Polypeptids zeigte, daß Fmet am Aminoende gebunden war und daß dann Cys und Val folgten.

Aus den obigen Ergebnissen ist zu schließen, daß AUG und GUG die Startcodons in *E. coli* sind^[84]. Hier verblüfft die Degeneration im ersten Buchstaben.

Daß die ribosomale 70-S-Partikel aus *E. coli* in eine 30-S- und eine 50-S-Untereinheit gespalten werden kann, war bereits Ende der fünfziger Jahre bekannt. Die Bedeutung der beiden Untereinheiten für die Protein-Synthese blieb allerdings bis in die jüngste Zeit unklar. Kürzlich wurde gefunden, daß man bei schonender Lyse von *E. coli*-Zellen hauptsächlich die 30-S- und die 50-S-Untereinheit erhält. Dieses Ergebnis ließ eine Rolle für das 50-S-/30-S-Paar bei der Protein-Synthese vermuten^[86]. Es sollte angemerkt werden, daß frühere biochemische Ergebnisse für mindestens zwei Bindungsstellen auf den 70-S-Ribosomen sprechen. Kürzlich haben Nomura und Mit-

arbeiter^[87] gezeigt, daß Fmet-tRNA $^{\text{Fmet}}$ in Gegenwart von RNA aus f2-Viren spezifisch an 30-S-Partikeln gebunden wird, während die übrigen (nichtinitierenden) tRNAs nicht gebunden werden.

Weitere Studien an der oben beschriebenen poly-r-AUG-gesteuerten Polymethionin-Synthese^[85] brachten folgende Ergebnisse: 1. Die 30-S-Partikeln binden Fmet-tRNA $^{\text{Fmet}}$ in Gegenwart von Poly-r-AUG bei einer Magnesiumionen-Konzentration von 5 mmol/l. 2. Die nichtinitierende tRNA (Met-tRNA $^{\text{Met}}$) wird erst nach Zugabe der 50-S-Partikeln zu den 30-S-Partikeln gebunden. 3. Es gelang, die Synthese des Dipeptids Formylmethionyl-methionin (Fmet-met) durch schrittweise Bildung des alle Komponenten enthaltenden Komplexes zu zeigen. Dabei wurde Fmet-tRNA $^{\text{Fmet}}$ in Gegenwart von Poly-r-AUG und den „initiation factors“ an die 30-S-Partikeln gebunden. Der Komplex wurde durch Zentrifugieren isoliert und mit 50-S-Partikeln, danach mit Met-tRNA $^{\text{Met}}$ versetzt. Der resultierende Komplex, der jetzt 30-S-Partikeln, Poly-r-AUG, Fmet-tRNA $^{\text{Fmet}}$, 50-S-Partikeln und Met-tRNA $^{\text{Met}}$ enthielt, wurde abermals durch Zentrifugieren isoliert. Als dieser Komplex mit dem S-100-Überstand versetzt wurde, entstand das Dipeptid Fmet-met. Daraus geht hervor, daß sowohl Fmet-tRNA $^{\text{Fmet}}$ als auch Met-tRNA $^{\text{Met}}$ gleichzeitig an 30-S-/50-S-Partikeln gebunden werden.

Die Resultate beweisen das Vorhandensein von zwei tRNA-Bindungsstellen an den 70-S-Ribosomen. Darüber hinaus ist aus diesen Ergebnissen die Rolle der ribosomalen Untereinheiten zu entnehmen: der erste Schritt beim Start der Protein-Synthese ist die Bindung der Initiator-tRNA an den 30-S-Ribosomen/mRNA-Komplex. Der resultierende Initiator-Komplex vereinigt sich dann mit der 50-S-Partikel und ist nun in der Lage, eine andere Aminoacyl-tRNA zu binden, so daß eine Peptidbindung gebildet werden kann. Nomura^[87] und Mitarbeiter zogen aus ihrer Arbeit den gleichen Schluß; die obigen Ergebnisse stützen ihre Resultate. Mehrere andere Laboratorien haben danach ähnliche Ergebnisse erzielt.

Wie erwähnt, kann man bestimmte Proteinfaktoren, die für den Start der Protein-Synthese benötigt werden, von den Ribosomen ablösen. Diese Faktoren, die allgemeine Chemie der Ribosomenproteine und die Ribosomenuntereinheiten selbst werden derzeit in vielen Laboratorien untersucht. Vor sehr kurzer Zeit sind entscheidende Fortschritte bei der Rekonstitution der 30-S-Untereinheiten im Arbeitskreis von Nomura gelungen. Diese und ähnliche Studien eröffnen neue Wege zu einem tieferen Verständnis der Protein-Synthese.

2. „Missense“-Suppression: tRNA-Beteiligung

Eine andere Anwendung der Ribopolynucleotid-Messenger mit sich wiederholenden Nucleotidsequenzen war die Untersuchung des Mechanismus der genetischen Suppression („missense“ → „sense“). Aus den

[86] G. Mangiarotti u. D. Schlessinger, J. molecular Biol. 20, 123 (1966); ibid. 29, 395 (1967); D. Schlessinger, G. Mangiarotti u. D. Apirion, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 1782 (1967).

[87] M. Nomura u. C. V. Lowry, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 946 (1967); M. Nomura, C. V. Lowry u. C. Guthrie, ibid. 58, 1487 (1967).

Arbeiten von Yanofsky und Mitarbeitern ist bekannt, daß viele *E. coli*-Mutanten nur ein defektes A-Protein der Tryptophan-Synthetase erzeugen können. In einem Fall (Mutante A-78) ist ein Glycin-Rest im A-Protein durch Cystein ersetzt. In einer Suppressor-Mutante (A-78-Su-78) ist in geringem Ausmaß das ursprünglich vorhandene Glycin wieder an den Platz des Cysteins gesetzt. Bei Benutzung des zellfreien proteinsynthetisierenden Systems aus *E. coli* B ist gezeigt worden, daß das System ^{14}C -Glycin in Gegenwart von Valin unter Poly-r-UG-Stimulation einbaut (Abb. 7), wenn es mit tRNA aus dem Stamm A-78-Su-78 versetzt ist [88].

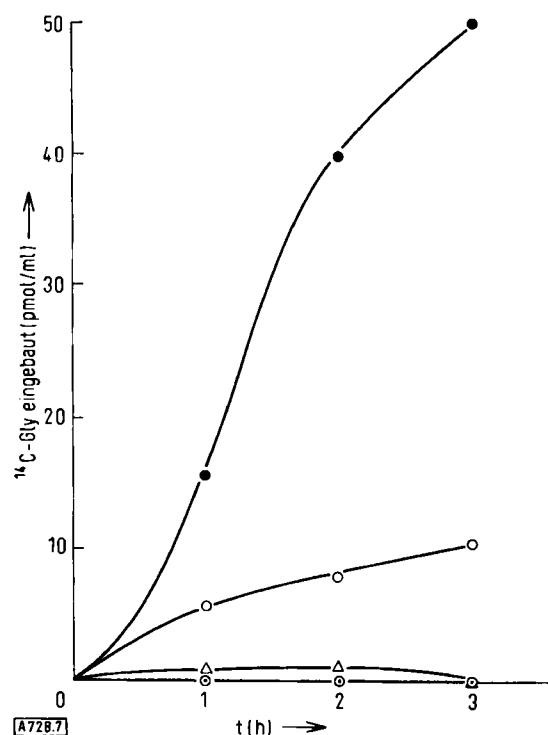


Abb. 7. Einbau von ^{14}C -Glycin in das Valin-Glycin-Copolypeptid, stimuliert durch Poly-r-UG in Gegenwart von tRNA aus dem Stamm A-78-Su-78 von *E. coli*. ●: + Poly-UG + tRNA + Val; ○: + Poly-UG + tRNA - Val; △: - Poly-UG + tRNA + Val; ◇: + Poly-UG - tRNA + Val.

Wie oben berichtet, steuert das Polymere normalerweise die Synthese des Valin-Cystein-Copolypeptids. Das Valin-Glycin-Copolypeptid, das spezifisch in Gegenwart der tRNA aus A-78-Su-78 gebildet worden war, wurde eingehend charakterisiert [88]. In ähnlicher Weise zeigten Carbon, Berg und Yanofsky [89], daß ein anderer „missense“-Suppressor einer Glycin → Arginin-Mutation im A-Protein ebenfalls auf der Ebene der tRNA agierte. Schon früher wurde bewiesen, daß die tRNA für die Suppression eines „amber“-Codons in einer Bakteriophagen-RNA verantwortlich ist [90,91].

[88] N. K. Gupta u. H. G. Khorana, Proc. nat. Acad. Sci. USA 56, 772 (1966).

[89] J. Carbon, P. Berg u. C. Yanofsky, Proc. nat. Acad. Sci. USA 56, 764 (1966).

[90] M. R. Capecchi u. G. N. Gussin, Science 149, 417 (1965).

[91] D. L. Engelhardt, R. Webster, R. C. Wilhelm u. N. D. Zinder, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 1791 (1965).

Wie erwähnt ließ sich in einem Fall nachweisen, daß eine „amber“-Suppression auf einen einzigen Nucleotidaustausch im Anticodon einer tRNA zurückgeht [71].

3. Translation einzelsträngiger DNA-ähnlicher Polymerer

Kürzlich wurde das eindrucksvolle Ergebnis veröffentlicht [92], daß denaturierte DNA in Gegenwart von Aminoglykosid-Antibiotika wie Neomycin B den Einbau von Aminosäuren in einem bakteriellen zellfreien proteinsynthetisierenden System stimuliert. Weitere Studien unter Verwendung einzelsträngiger Desoxyribopolynucleotide mit definierter Nucleotid-Sequenz (Poly-d-TG, Poly-d-AC und Poly-d-T) erbrachten sehr ermutigende Ergebnisse [93]. Die Reaktion auf die DNA-ähnlichen Polymeren war ausgezeichnet, und die Fehler waren überraschenderweise sehr selten und klein. Zum Beispiel steuerte Poly-d-CA die Synthese des Thr-His-Copolypeptids, wobei keine andere Aminosäure eingebaut wurde. Diese Ergebnisse bieten neue Möglichkeiten für das Studium der Ribosomenfunktion und könnten sich darüber hinaus in Zukunft praktisch verwenden lassen.

Wie an anderer Stelle beschrieben [94], ist es nicht undenkbar, daß die Synthese spezifischer Proteine im Laboratorium unter Benutzung von Nucleinsäure-Matrizen durchgeführt wird. Für diesen Zweck könnten geschützte Trinucleotide als Codons in großem Maßstab auf kommerzieller Basis hergestellt und für die Synthese von Nucleinsäure-Matrizen für Proteine verwendet werden. Dieser Weg würde auf der Ebene der Matrize Flexibilität und Selektivität für Aminosäure-Substitutionen bieten.

VI. Schlußbemerkungen

Während in einigen Einzelaspekten des genetischen Codes die letzte Klarheit noch fehlt, ist es außerordentlich befriedigend für viele von uns, die an diesen Problemen gearbeitet haben, daß über die allgemeine Struktur des genetischen Codes vollständige Übereinstimmung herrscht. Beweise, die aus einer Vielfalt von Techniken, genetischen und biochemischen, aus in-vivo- und in-vitro-Experimenten kommen, haben die oben erwähnten Codon-Zuordnungen ermöglicht. Es ist unwahrscheinlich, daß eine dieser Zuordnungen korrigiert werden muß. Trotzdem bleibt noch viel auf biochemischer und chemischer Ebene zu tun, um das sehr komplizierte proteinsynthetisierende System zu verstehen. Nichtsdestoweniger scheint das Problem des genetischen Codes mindestens im eindimensionalen Sinn gelöst (lineare Entsprechung der Nucleotidsequenz von Polynucleotiden mit der Aminosäure-

[92] B. J. McCarthy u. J. J. Holland, Proc. nat. Acad. Sci. USA 54, 880 (1965).

[93] A. R. Morgan, R. D. Wells u. H. G. Khorana, J. molecular Biol. 26, 477 (1967).

[94] A. Kumar u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc., im Druck.

sequenz von Polypeptiden). Wir können hoffen, daß diese Kenntnisse als Basis für weitere Arbeit auf dem Gebiet der Molekular- und der Entwicklungsbiologie dienen.

Dank

Ich möchte noch einmal unterstreichen, wie sehr die Arbeit, die den Inhalt dieser Vorlesung bildet, ein Erfolg gemeinsamer Anstrengungen ist. Einer Vielzahl engagierter und hingebungsvoller Kollegen, Chemikern und Biochemikern, mit denen ich das Glück einer guten Zusammenarbeit teilte, bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Die Bemühungen und der Fortschritt in der Wissenschaft werden mehr und mehr voneinander abhängig. Dies trifft ganz sicherlich für die Arbeit am genetischen Code zu. Viele der großen Wissenschaftler, die direkt oder indirekt die hier zusammengefaßten Ergebnisse beeinflußt haben, sind im Text erwähnt. Ich

möchte hier einem weiteren Wissenschaftler meine Reverenz erweisen. Zu meinem Glück wurde ich von Professor *V. Prelog* an der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, zu Studien nach dem Doktorexamen angenommen. Die Zusammenarbeit mit diesem großen Wissenschaftler und Menschen hat mein Denken und Philosophieren über Wissenschaft, Arbeit und Einsatz ungemein beeinflußt.

Meine Arbeit begann im British Columbia Research Council, Vancouver, Canada, wo sie durch die Ermutigung von Dr. *Gordon M. Shrum* (jetzt Kanzler der Simon Fraser University, B.C.) und durch die finanzielle Unterstützung des National Research Council of Canada ermöglicht wurde. Später habe ich großzügige Unterstützung vom National Cancer Institute der National Institutes of Health, U.S. Public Health Service, von der National Science Foundation, Washington, vom Life Insurance Medical Research Fund und von der Graduate School der University of Wisconsin erhalten.

Eingegangen am 21. Juli 1969 [A 728]
Übersetzt von Dr. *Th. Höpner*, Heidelberg

Alanin-Transfer-RNA (Nobel-Vortrag)^[**]

Von R. W. Holley^[*]

Die Arbeit an der Alanin-Transfer-RNA begann eigentlich 1956 im Laboratorium von *James Bonner* im California Institute of Technology. Ich hatte von der Geneva Experiment Station der Cornell University ein Jahr Forschungsurlaub und beschäftigte mich mit der Protein-Synthese. Gegen Ende meines Aufenthaltes unternahm ich Versuche, um den Acceptor aktivierter Aminosäuren zu finden.

Damals war es aus den Arbeiten von *Hoagland*, *Keller* und *Zamecnik*^[1], *DeMoss*, *Genuth* und *Novelli*^[2] sowie *Berg* und *Newton*^[3] bereits bekannt, daß die Aminosäuren enzymatisch unter Bildung enzymgebundener Aminoacyladenylate (Enz-AA-AMP, Abb. 1) aktiviert werden. Wahrscheinlich würden diese Aminoacyladenylate mit irgendeiner Substanz reagieren, die in Abbildung 1 mit „X“ bezeichnet ist, und ein Produkt dieser Reaktion müßte AMP (Adenosin-5'-monophosphat) sein, wie es in Gl. (2) formuliert ist. Eine solche Reaktion könnte möglicherweise reversibel sein, und wenn, so sollte es möglich sein, die Brutto-

Rückreaktion durch den Einbau von radioaktivem AMP in ATP in Abhängigkeit von Aminosäuren zu beobachten.



Abb. 1. Schematische Wiedergabe der Aminosäure-Aktivierung.

Auf diese Weise wurde ein alaninabhängiger Einbau von AMP in ATP mit dem „pH-5-Enzym“, das aus der niedermolekularen „löslichen“ Fraktion eines Rattenleber-Homogenats gewonnen worden war, gefunden. Von größtem Interesse war die Entdeckung, daß der AMP-Einbau durch Ribonuclease gehemmt wurde^[4]. Daraufhin wurde dieses alaninabhängige AMP-einbauende System durch Kombination des teilweise gereinigten alaninaktivierenden Enzyms mit einer niedermolekularen RNA aus dem Rattenleber-„pH-5-Enzym“ rekonstruiert^[5].

Unterdessen hatten *Hoagland* et al.^[6] sowie *Ogata* und *Nohara*^[7] gezeigt, daß radioaktive Aminosäuren in der Rattenleber-pH-5-Präparation an eine niedermoleku-

[*] Prof. Dr. R. W. Holley

The Salk Institute, San Diego, Calif. 92112
und Cornell University, Ithaca, N. Y. 14850 (USA)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1969. — Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

[1] M. B. Hoagland, Biochim. biophysica Acta 16, 288 (1955); M. B. Hoagland, E. B. Keller u. P. C. Zamecnik, J. biol. Chemistry 218, 345 (1956).

[2] J. A. DeMoss, S. M. Genuth u. G. D. Novelli, Proc. nat. Acad. Sci. USA 42, 325 (1956).

[3] P. Berg u. G. Newton, Federat. Proc. 15, 219 (1956).

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

[5] R. W. Holley u. J. Goldstein, J. biol. Chemistry 234, 1765 (1959).

[6] M. B. Hoagland, P. C. Zamecnik u. M. L. Stephenson, Biochim. biophysica Acta 24, 215 (1957); M. B. Hoagland, M. L. Stephenson, J. F. Scott, L. I. Hecht u. P. C. Zamecnik, J. biol. Chemistry 231, 241 (1958).

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