

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 Ermütigung 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.

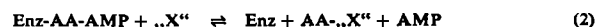


Abb. 1. Schematische Wiedergabe der Aminosäure-Aktivierung.

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).

lare RNA gebunden werden. Diese RNA wurde als „lösliche RNA“ bezeichnet und ist heute als „Transfer-RNA“ bekannt^[8]. Auf diese Weise wurde klar, daß der Acceptor der aktivierten Aminosäure eine niedermolekulare RNA war.

Nach Zachau, Acs und Lipmann^[9] sowie Hecht, Stephenson und Zamecnik^[10] werden alle aktivierten Aminosäuren an einen terminalen Adenosin-Rest der Transfer-RNA gebunden. Da verschiedenartige Aminosäuren nicht um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren^[6,11], schien es so, als ob verschiedenartige tRNA-Spezies als Acceptoren für verschiedene Aminosäuren dienten.

Für einen Chemiker war die Existenz von aminosäurespezifischen niedermolekularen RNA-Spezies sehr interessant. Es schien möglich, daß diese RNAs klein genug wären, um detaillierte Strukturstudien zu erlauben. Dies wäre von größtem Interesse, weil es die Nucleotidsequenz in den Nucleinsäuren ist, die ihnen Spezifität verleiht und sie befähigt, ihre vielen lebenswichtigen Funktionen auszuüben.

Isolierung der Alanin-Transfer-RNA aus Hefe

Extrahiert man Transfer-RNA aus Zellen, so erhält man ein Gemisch, das mindestens eine Transfer-RNA für jede der 20 Aminosäuren, die an der Protein-Synthese beteiligt sind, enthält. Für detaillierte Strukturanalysen wurde eine hochgereinigte Transfer-RNA benötigt. Aus diesem Grunde versuchten wir 1958 am US Plant, Soil and Nutrition Laboratory, einem Laboratorium des US Department of Agriculture an der Cornell University, eine individuelle Transfer-RNA für chemische Studien zu isolieren.

Unser erstes Problem war, eine Fraktionierungstechnik zu finden, die auf Transfer-RNA anwendbar ist. Mehrere Möglichkeiten wurden durchprobiert; die Craigsche Gegenstromverteilungstechnik^[12] erwies sich als vielversprechend. In Zusammenarbeit mit J. Apgar, B. P. Doctor und S. H. Merrill^[13,14] wurde das Gegenstromverteilungsverfahren innerhalb von vier Jahren zur ersten allgemein anwendbaren Methode für die Fraktionierung von Transfer-RNA entwickelt.

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse einer Gegenstromverteilung roher Transfer-RNA aus Hefe. Hefe-

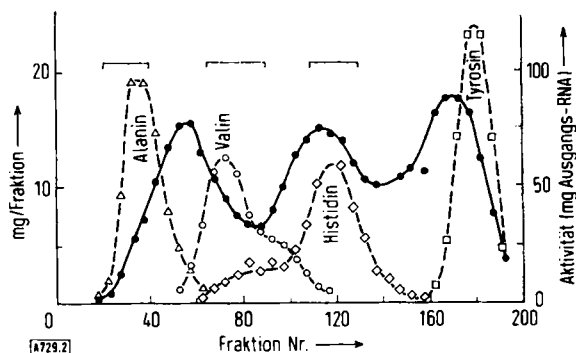


Abb. 2. Gegenstromverteilung (200 Schritte) von 500 mg roher Hefe-Transfer-RNA (aus [14]). Die Klammern im oberen Teil der Abbildung bezeichnen nochmals getrennte Fraktionen.

Transfer-RNA wurde benutzt, weil sie leicht in großen Mengen erhältlich ist^[15]. Durch wiederholte Gegenstromverteilung der aktivsten Fraktionen (vgl. Abb. 2) wurden drei der Transfer-RNA, die für Alanin, Tyrosin und Valin, in relativ homogener Form und im wesentlichen frei von Acceptor-Aktivität für andere Aminosäuren erhalten^[14].

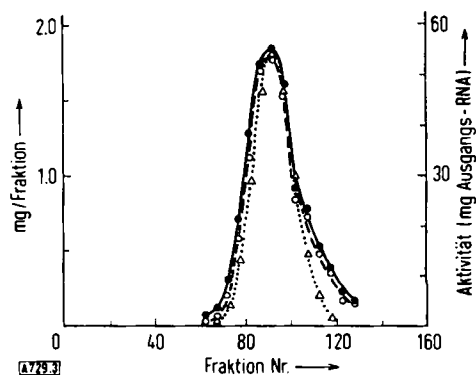


Abb. 3. Gegenstromverteilung (875 Schritte) von nochmals gereinigter Alanin-Transfer-RNA (aus [14]).

Die Ergebnisse mit der Alanin-RNA sind in Abbildung 3 gezeigt. Die ausgezeichnete Übereinstimmung zwischen der experimentellen und der berechneten Verteilungskurve ermutigte uns anzunehmen, daß die RNA rein genug für eine Strukturanalyse sei. Trotzdem war es ein Glücksspiel, mit der Strukturaufklärung zu beginnen, da die Möglichkeit bestand, daß das Präparat doch nicht rein genug oder ein Gemisch mehrerer molekularer Spezies sein könnte, die sich alle zur Alaninbindung eignen. Da Versuche, das Material weiter zu fraktionieren, erfolglos waren, schien es keine Alternative zu geben, als einige Jahre Arbeit an diesem Problem in der Hoffnung zu riskieren, daß das Material rein genug für die Strukturanalyse sei. Wäre das Material unrein gewesen, hätte uns beim Versuch der Strukturanalyse ein hoffnungsloses Durcheinander erwartet. Glücklicherweise war das nicht der Fall.

Während unserer gesamten Strukturstudien war die verfügbare Menge an gereinigter Alanin-Transfer-RNA sehr begrenzt. Der Maßstab des Reinigungsverfahrens wurde gegenüber dem in Abbildung 3 um das

[8] E. A. Allen, E. Glassman u. R. Schweet, J. biol. Chemistry 235, 1068 (1960).

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

[10] L. I. Hecht, M. L. Stephenson u. P. C. Zamecnik, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 505 (1959).

[11] P. Berg u. E. J. Ofengand, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 78 (1958); R. S. Schweet, F. P. Bovard, E. Allen u. E. Glassman, ibid. 44, 173 (1958).

[12] L. C. Craig u. D. Craig in A. Weissberger: Technique of Organic Chemistry. Interscience Publ., New York 1956, 2. Aufl., Bd. 3 / Teil 1, S. 149.

[13] B. P. Doctor, J. Apgar u. R. W. Holley, J. biol. Chemistry 236, 1117 (1961).

[14] J. Apgar, R. W. Holley u. S. H. Merrill, J. biol. Chemistry 237, 796 (1962).

[15] R. Monier, M. L. Stephenson u. P. C. Zamecnik, Biochim. biophysica Acta 43, 1 (1960); R. W. Holley, Biochem. biophysic. Res. Commun. 10, 186 (1963).

Zehnfache vergrößert, und zwar durch Verwendung einer großen Gegenstromverteilungsapparatur in Kombination mit einem modifizierten Lösungsmittelsystem, das die RNA besser löste. Trotzdem war die Ausgangsmenge an gereinigter RNA für die einzelnen Versuche immer auf 10–100 mg beschränkt. Deswegen wurden soweit irgend möglich die Versuche so angelegt, daß ein Minimum an RNA benötigt wurde. Während der drei Jahre Arbeit an der Struktur der Alanin-Transfer-RNA verbrauchten wir insgesamt 1 g hochgereinigtes Material. Dies wurde in unseren Laboratorien aus annähernd 200 g roher Hefe-Transfer-RNA isoliert, welche wiederum durch Phenol-Extraktion aus annähernd 140 kg handelsüblicher Bäckerhefe gewonnen worden waren.

Spaltung der RNA in kleine Fragmente

Die Ergebnisse vorläufiger Analysen zeigten, daß das Alanin-Transfer-RNA-Molekül aus einer einzigen Kette von annähernd 80 Nucleotidresten besteht [16]. Deswegen erforderte die Strukturanalyse im Prinzip die Identifizierung der Nucleotidreste und die Bestimmung ihrer Sequenz. Formal gesehen entsprach das Problem der Bestimmung der Reihenfolge von etwa 80 Buchstaben in einem Satz.

Der experimentelle Weg, den wir benutzten, schloß die Spaltung der Polypeptidkette in kleine Fragmente, die Identifizierung der kleinen Fragmente und dann die Rekonstruktion der ursprünglichen Nucleotidsequenz durch Bestimmung der Reihenfolge der kleinen Fragmente im RNA-Molekül ein. In der Sprache des Analogiebeispiels war die Methode äquivalent mit dem Zerschlagen des Satzes in Wörter, der Identifizierung der Wörter und der Rekonstruktion der Sequenz der Buchstaben im Satz durch Bestimmung der Reihenfolge der Wörter.

Es folgt nun eine kurze Beschreibung der Experimente. Wir verwendeten Pankreas-Ribonuclease, um die RNA neben den Pyrimidin-Nucleotiden unter Bildung einer Serie von Fragmenten zu spalten, in der jedes Fragment am Ende ein Pyrimidin-Nucleotid wie Cytidylsäure (C-) oder Uridylsäure (U-) trägt. In einer zweiten Versuchsreihe wurde Ribonuclease T1 aus Takadiatase, das von Sato-Asano und Egami [17] entdeckte Enzym, verwendet, um die RNA spezifisch bei Guanylsäureresten (G-) zu spalten. Dies gab die zweite Serie kleiner Fragmente. Die kleinen Fragmente wurden durch Ionenaustausch-Chromatographie, danach, wenn nötig, durch Papierelektrophorese oder Rechromatographie isoliert.

Abbildung 4 zeigt das Ergebnis der Chromatographie von Ribonuclease-T1-abgebauter RNA an einer Diäthylaminoäthylcellulosesäule nach der Methode von Tomlinson und Tener [18] mit Modifikationen von M.

[16] R. W. Holley, J. Apgar, S. H. Merrill u. P. L. Zubkoff, J. Amer. chem. Soc. 83, 4861 (1961).

[17] K. Sato-Asano u. F. Egami, Nature (London) 185, 462 (1960).

[18] R. V. Tomlinson u. G. M. Tener, J. Amer. chem. Soc. 84, 2644 (1962); Biochemistry 2, 697 (1963).

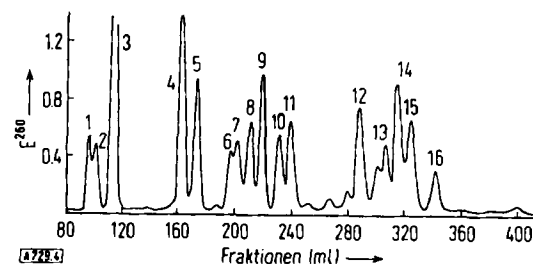


Abb. 4. Trennung der Fragmente nach dem Ribonuclease-T1-Abbau von Alanin-Transfer-RNA durch Chromatographie an DEAE-Cellulose (aus [23] und [31]). 1: C—DiMeG!; 2: U—MeG!; 3: G—; 4: C—G—; 5: A—G—; 6: DiHU—C—G—; 7: DiHU—A—G—; 8: U—A—G—; 9: pG— + U—C—C—A—C—COH; 10: C—Me!—ψ—G—; 11: T—ψ—C—G—; 12: A—C—U—C—G—; 13: U*—C—U—C—G—; 14: A—U—U—C—C—G—; 15: C—U—C—C—C—U—U—I!; 16: C—U—C—C—C—U—U—I— (Abkürzungen s. Tabelle 1).

Marquisee und J. Apgar. Unter diesen Bedingungen werden fast alle Fragmente voneinander getrennt. Jedes isolierte Fragment wurde alkalisch hydrolysiert, und die resultierenden Mononucleotide wurden durch Chromatographie, ihre elektrophoretischen Eigenschaften und die Spektren identifiziert. Dies genügte, um die Sequenz jedes Dinucleotids zu bestimmen, weil die Angriffsstelle der beiden Ribonucleasen bekannt war. Zusätzliche Informationen waren nötig, um die Nucleotidsequenz der Trinucleotide und größeren Oligonucleotide festzustellen.

Zur Identifizierung einiger der längeren Oligonucleotide wurden neue Methoden der Sequenzbestimmung benötigt. Eine neue, besonders nützliche Methode ist in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt. Wie Abbil-

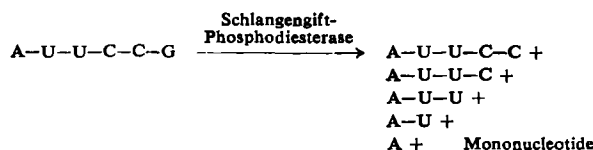


Abb. 5. Partiieller Abbau eines Oligonucleotids mit Schlangengift-Phosphodiesterase.

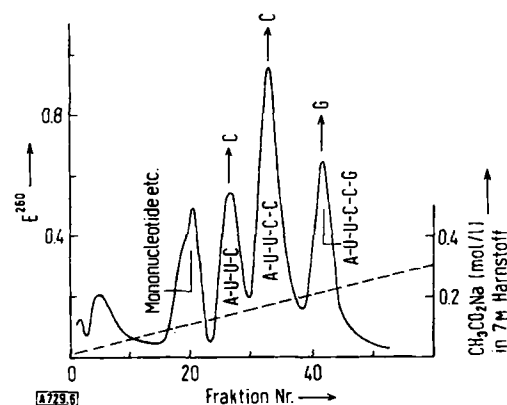


Abb. 6. Chromatographische Trennung nach partiellem Abbau von A—U—U—C—C—G. Die alkalische Hydrolyse der getrennten Oligonucleotide setzte die angegebenen Nucleoside frei (aus [32]).

dung 5 zeigt, führt der partielle Abbau eines Oligonucleotids mit Schlangengift-Phosphodiesterase zu einem Gemisch von Abbauprodukten, deren chromatographisches Verhalten aus Abbildung 6 hervorgeht. Die alkalische Hydrolyse des den einzelnen Bänden entsprechenden Materials ergibt jeweils das

Nucleosid vom 3'-Ende (dem rechten Ende). Da die Produkte des schrittweisen Abbaus aufeinanderfolgende Banden im Chromatogramm bilden, liefert die Identifizierung des aus dem Material der aufeinanderfolgenden Banden abgespaltenen Nucleosids direkt die Nucleotidsequenz^[19]. Zum Beispiel genügen die Informationen aus den Abbildungen 5 und 6, um die Nucleotidsequenz A-U-U-C-C-G- aufzustellen.

Tabelle 1. Fragmente des vollständigen Alanin-tRNA-Abbaus mit Pankreas-Ribonuclease [a].

COH [b]	MeG-G-C-
13 C-	A-G-C-
ψ-	A-G-DiHU-
6 U-	G-A-U-
A-C-	I-G-C-
MeI-ψ-	G-G-T-
DiMeG-C-	G-G-DiHU-
2 G-C-	G-G-A-C-
4 G-U-	pG-G-G-C-
G-G-G-A-G-A-G-U*	

[a] Abkürzungen: p und - werden abwechselnd zur Darstellung der Phosphatreste benutzt; A-: Adenosin-3'-phosphat; C-: Cytidin-3'-phosphat; COH: Cytidin (wohlgeordnet mit freier 3'-Hydroxygruppe); DiHU-: 5,6-Dihydrouridin-3'-phosphat; DiMeG-: N²-Dimethylguanidin-3'-phosphat; I-: Inosin-3'-phosphat; MeG-: 1-Methylguanidin-3'-phosphat; MeI-: 1-Methylinosin-3'-phosphat; ψ-: Pseudouridin-3'-phosphat; T-: Ribothymidin-3'-phosphat; U-: Uridin-3'-phosphat; U*: Gemisch von U- und DiHU-; pl: 2',3'-Cyclophosphat, z. B. IpI: Inosin-2',3'-cyclophosphat.

[b] Die Gegenwart einer freien 3'-Hydroxygruppe in diesem Fragment zeigt, daß Cytidin die terminale Position in der gereinigten Alanin-RNA einnimmt. Dies bestätigt, daß der terminale Adenylsäurerest fehlt, wie dies bei den meisten aus handelsüblicher Bäckerhefe isolierten Transfer-RNAs der Fall ist. Der terminale Adenylsäurerest wird unter Testbedingungen vor Bindung der Aminosäure angesetzt.

Tabelle 2. Fragmente des vollständigen Alanin-tRNA-Abbaus mit Ribonuclease T1 aus Takadiastase.

9 G-	DiHU-C-G-
pG-	DiHU-A-G-
C-DiMeGpI	C-MeI-ψ-G-
U-MeGpI	T-ψ-C-G-
4 C-G-	A-C-U-C-G-
2 A-G-	U-C-C-A-C-COH
U-G-	U*-C-U-C-C-G-
U-A-G-	A-U-U-C-C-G-
C-U-C-C-C-U-U-I-	

Die Tabellen 1 und 2 enthalten die identifizierten, durch den Abbau mit Pankreas-Ribonuclease bzw. Ribonuclease T1 erhaltenen Fragmente^[20]. Die Sequenzbestimmung aller Fragmente erforderte annähernd 2 1/2 Jahre. Dies war die Arbeit von J. T. Madison und A. Zamir, mit Unterstützung von G. Everett bei der Identifizierung der Nucleotide. Ganz besonders zeitraubend waren die Bestimmung der Struktur der größeren Oligonucleotide und die Identifizierung der seltenen Nucleotide, besonders von 1-Methylinosinsäure (MeI-) und 5,6-Dihydrouridylsäure (DiHU-) ^[21] (Das letztgenannte Nucleotid war noch nie in einer natürlichen Nucleinsäure gefunden worden. Es absorbiert nicht bei 260 nm und bleibt deshalb bei den üblichen Methoden des Nucleotidnachweises unsichtbar.)

[19] R. W. Holley, J. T. Madison u. A. Zamir, Biochem. biophys. Res. Commun. 17, 389 (1964).

[20] R. W. Holley, G. A. Everett, J. T. Madison u. A. Zamir, J. biol. Chemistry 240, 2122 (1965).

[21] J. T. Madison u. R. W. Holley, Biochem. biophys. Res. Commun. 18, 153 (1965).

Die Anwesenheit bestimmter Endgruppen [einer freien 5'-Phosphatgruppe (p) am linken Ende des RNA-Moleküls, wenn man die Struktur wie üblich schreibt, und einer freien 3'-Hydroxylgruppe (OH) am rechten Ende] bestätigt, daß das linke Ende des Alanin-Transfer-RNA-Moleküls die Struktur pG-G-G-C- und das rechte Ende die Struktur U-C-C-A-C-C-A_{OH} hat.

Die Anwesenheit der seltenen Nucleotide und bestimmter einzigartiger Sequenzen ergab einige Überlappungen zwischen den beiden in den Tabellen 1 und 2 gezeigten Serien von Sequenzen. Zum Beispiel gibt es nur ein I- im Molekül, und dieses findet sich in der Sequenz C-U-C-C-C-U-U-I- unter den Ribonuclease-T1-Abbauprodukten und in der Sequenz I-G-C- des Abbaus mit Pankreas-Ribonuclease. Diese beiden Sequenzen müssen überlappen, und die Gesamtsequenz muß C-U-C-C-C-U-U-I-G-C- sein.

Tabelle 3. Kombination der in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellten Ergebnisse [a].

pG-G-G-C-, G-U-G-, U-MeG-G-C-, G-C-, G-U-A-G-, DiHU-C-G-, G-DiHU-A-G-, C-G-, C-DiMeG-, C-U-C-C-C-U-U-I-G-C-, ----- MeI-ψ-, G-G-G-A-G-A-G-U*-C-U-C-C-G-, G-T-ψ-C-G-, A-U-U-C-C-G-, G-A-C-U-C-G-, U-C-C-A-C-C-A _{OH}

[a] Die gestrichelte Linie trennt die zur linken und die zur rechten Molekülhälfte gehörenden Sequenzen.

Die Informationen der Tabellen 1 und 2 sind in Tabelle 3 kombiniert. Alle Nucleotide der Alanin-RNA - insgesamt 77 - sind in den 16 Sequenzen berücksichtigt.

Spaltung der RNA in große Fragmente

Als einmal die 16 in Tabelle 3 gezeigten Sequenzen bekannt waren und die Positionen der beiden Endsequenzen festlagen, bestand das Strukturproblem in der Positionsbestimmung der 14 dazwischenliegenden Fragmente. Dies wurde durch Isolierung mehrerer großer Fragmente aus der RNA gelöst. In einem entscheidenden Experiment fand J. R. Penswick, daß eine sehr kurze Behandlung der RNA mit Ribo-

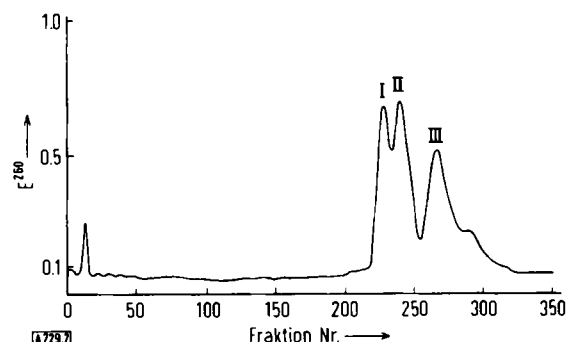


Abb. 7. Chromatographische Trennung der beiden großen Fragmente (I und II), die durch sehr vorsichtigen Abbau der Alanin-Transfer-RNA mit Ribonuclease T1 bei 0°C in Gegenwart von Magnesiumionen erhalten wurden (aus [22]). III: nicht abgebaute Transfer-RNA.

nuclease T1 bei 0°C in Gegenwart von Magnesiumionen das Molekül an nur einer einzigen Stelle spaltet [22]. Die beiden Teile des Moleküls konnten chromatographisch voneinander getrennt werden (Abb. 7). Der anschließende Abbau der getrennten Halbmoleküle mit Ribonuclease T1 und die chromatographische Analyse (Abb. 8) legten fest, daß die in Tabelle 3 ober-

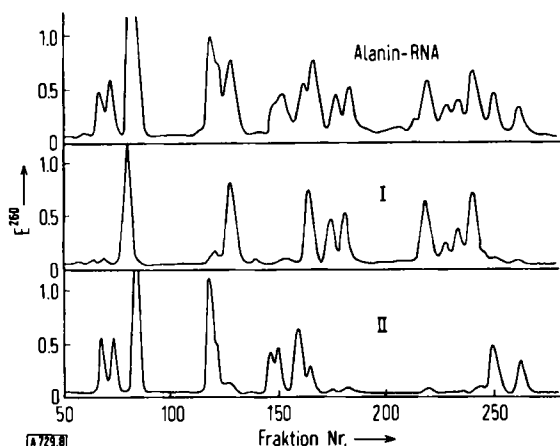


Abb. 8. Chromatographie der Ribonuclease-T1-Abbauprodukte der Alanin-Transfer-RNA und der großen Fragmente I und II aus Abb. 7 (aus [22]).

halb der gestrichelten Linie aufgeführten Fragmente in der linken Hälfte und die restlichen in der rechten Hälfte des Moleküls zu lokalisieren waren [22].

Durch etwas energischere, aber immer noch vorsichtige Behandlung der RNA mit Ribonuclease T1 erhielten wir dann mit J. Apgar eine Anzahl zusätzlicher großer Fragmente. Zur Bestimmung ihrer Struktur wurde jedes mit Ribonuclease T1 vollständig abgebaut, die Abbauprodukte chromatographisch in zwei oder mehr der bereits in Abbildung 4 identifizierten Ribonuclease-T1-Banden getrennt und diese bekannten Sequenzen dann, eine an die andere, zusammengefügt,

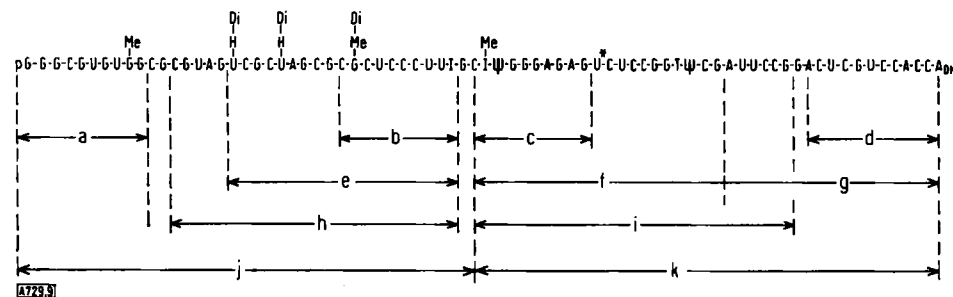


Abb. 9. Die Nucleotid-Sequenz der Alanin-Transfer-RNA aus Hefe ist in der oberen Reihe gezeigt, darunter sind die isolierten und für die Rekonstruktion der kompletten Sequenz benutzten großen Oligonucleotid-Fragmente angegeben (aus [25]).

bis die Nucleotidsequenz des großen Fragments bekannt war. Die aufgeklärten Sequenzen sind in Abbildung 9 durch die Buchstaben a bis k bezeichnet [23, 24].

[22] J. R. Penswick u. R. W. Holley, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 543 (1965).

[23] J. Apgar, G. A. Everett u. R. W. Holley, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 546 (1965).

[24] J. Apgar, G. V. Everett u. R. W. Holley, J. biol. Chemistry 241, 1206 (1966).

Der für die Rekonstruktion der langen Sequenzen benutzte Weg kann am besten durch genauere Betrachtung zweier Fragmente verdeutlicht werden.

Die chromatographische Analyse des mit Ribonuclease T1 vollständig abgebauten Fragments d ist in Abbildung 10 gezeigt. Die Anwesenheit von

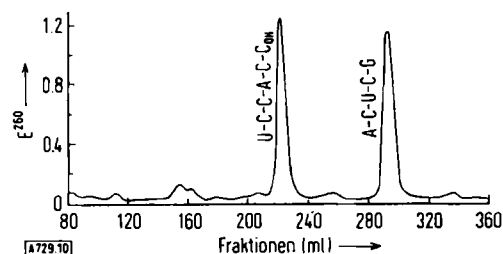


Abb. 10. Chromatographie der Produkte des vollständigen Abbaus des Fragments d mit Ribonuclease T1 (aus [23]).

U-C-C-A-C-CoH beweist, daß das Fragment d vom rechten Ende (3'-Ende) des Moleküls stammt. Aus diesem Grund muß die Sequenz A-C-U-C-G links davon stehen, und damit ist die Sequenz von d bekannt [23].

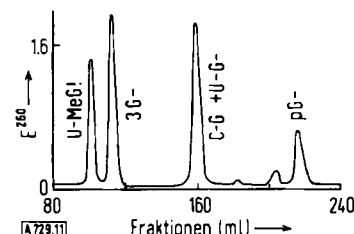


Abb. 11. Chromatographie der Produkte des vollständigen Abbaus des Fragments a mit Ribonuclease T1 (aus [23] und [31]).

Abbildung 11 zeigt die chromatographische Analyse des mit Ribonuclease T1 abgebauten Fragments a. Demnach ist das Fragment a aus U-MeG!, 3 G-, C-G-, U-G- und pG- zusammengesetzt. Die Anwesenheit von pG- legt fest, daß das Fragment a am

linken Ende des tRNA-Moleküls steht. Da bereits bekannt ist (Tabellen 1 und 3), daß am linken Ende der RNA pG-G-G-C- steht, sind die Positionen von zwei der drei G- und die des C-G- bekannt. Das terminale Pentanucleotid ist also pG-G-G-C-G-.

[25] 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).

Die Positionen des U-G-, des U-MeG- und des restlichen G- sind durch Folgendes festgelegt: Es ist bekannt (Tabelle 3), daß U-MeG- in der RNA in der Sequenz U-MeG-G-C vorkommt. Da es nur ein einziges C in Fragment a gibt und dessen Position bereits festgelegt ist, muß Fragment a vor dem C der Sequenz U-MeG-G-C- enden. Aus diesem Grunde muß U-G- links von U-MeG- stehen, und damit kann die Struktur des Fragments a mit pG-G-G-C-G-...U-G...U-MeG- wiedergegeben werden, wobei nur noch ein G- an die richtige Stelle zu setzen ist. Setzt man das G rechts oder links von U-G- in diese Struktur ein, entsteht eine G-G-U-Sequenz in der RNA. Da jede G-G-U-Sequenz im Abbau mit Pankreas-Ribonuclease erscheinen müßte und eine solche Sequenz nicht gefunden wurde (Tabelle 1), muß das restliche G rechts von MeG- stehen, und damit lautet die Sequenz des Fragments a pG-G-G-C-G-U-G-U-MeG-G^[23].

Die Struktur der anderen großen Fragmente wurde auf ähnlichem Weg bewiesen^[24]. Einige dieser Beweise waren einfach, andere schwierig zu führen. Zum Schluß boten die Analysen der großen Fragmente genügend Informationen, um die Sequenzen der RNA-Halbmoleküle (Fragmente j und k in Abb. 9) aufstellen zu können. Da die terminalen Sequenzen der RNA bereits bekannt waren, konnten die Teile nur auf eine Weise zusammengesetzt werden; dabei ergab sich die Sequenz I-G-C-, deren Anwesenheit in der RNA schon feststand (s. Tabelle 1). In Abbildung 9 ist die vollständige Sequenz der Alanin-Transfer-RNA aus Hefe abgebildet^[25].

Dies ist die erste bekannte Sequenz einer Nucleinsäure. Man kann auch sagen, daß die Sequenz, mit entsprechender Modifikation für DNA, die erste Nucleotidsequenz eines Gens ergibt.

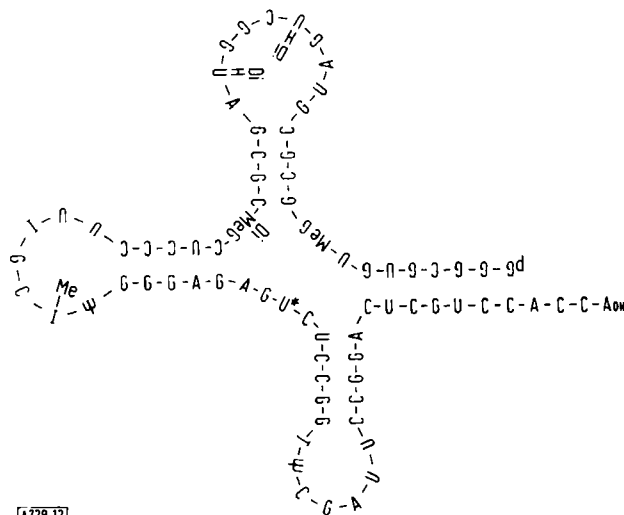
Es war natürlich außerordentlich befriedigend, jedes experimentelle Problem lösen zu können, sobald es sich stellte, und schließlich die Nucleotidsequenz vollständig aufklären zu können. Die Befriedigung war noch größer dadurch, daß wir mit der Alanin-Transfer-RNA von ihrer Entdeckung über ihre Isolierung bis hin zur Strukturanalyse arbeiten konnten. In unseren Zeiten der weitgehend in einer Wettbewerbssituation stehenden Forschung genießen nur wenige Wissenschaftler den Vorzug, neun Jahre an einem Problem arbeiten zu dürfen. Ohne daß ich das Vergnügen, Preise und Auszeichnungen zu bekommen, herabsetzen will, glaube ich doch, daß es für einen Wissenschaftler die größte Befriedigung ist, ein größeres Forschungsgebiet zu einem erfolgreichen Abschluß zu bringen.

Die dreidimensionale Struktur

Hat man ein Problem gelöst, so wendet sich die Aufmerksamkeit anderen Problemen zu. Nachdem die Nucleotidsequenz der Alanin-tRNA feststand, beschäftigten wir uns mit anderen Fragen der Alanin-RNA-Struktur. Besonders interessant war die Wech-

selwirkung zwischen der Transfer-RNA und der Messenger-RNA. Man kann spekulieren, daß in der dreidimensionalen Struktur einer Transfer-RNA in Gegenwart von Magnesiumionen unter den Bedingungen der Protein-Biosynthese das codierende Nucleotid-Triplett, das Anticodon, so exponiert ist, daß eine Wechselwirkung mit einem Nucleotid-Triplett in der Messenger-RNA, dem Codon, möglich ist^[26].

In der Alanin-Transfer-RNA bildet die Sequenz I-G-C- das Anticodon. Sie befindet sich in der Mitte des Moleküls und enthält die Bindung, die gegenüber Ribonuclease T1 so sehr empfindlich ist. Eine Anordnung der RNA-Kette, die E. B. Keller und P. S. Weiss vorschlugen, hat die Sequenz I-G-C- an einer exponierten Stelle und außerdem eine sehr interessante Symmetrie. Diese Kleeblattanordnung ist in Abbildung 12 dargestellt.



[A779.17]

Abb. 12. Mögliche Sekundärstruktur der Alanin-Transfer-RNA (aus [25]).

Zum Zeichnen dieser Anordnungen wurde angenommen, daß in den doppelsträngigen Regionen Basenpaarung vom Watson-Crick-Typ zwischen A und U sowie G und C stattfindet und daß die ungepaarten Regionen Schleifen bilden, wie Fresco, Alberts und Doty^[27] vorschlugen. Der stärkste Beweis für die kleeblattförmige Transfer-RNA-Sekundärstruktur ist die Tatsache, daß alle seit 1965 bestimmten Transfer-RNA-Sequenzen in das gleiche Schema der Basenpaarung passen. Es sind jetzt 12 dieser Sequenzen bekannt; sie ergaben sich aus Strukturstudien vieler Arbeitskreise^[28]. In allen Beispielen findet sich die Anti-

[26] M. R. Bernfield u. M. W. Nirenberg, Science 147, 479 (1965).

[27] J. R. Fresco, B. M. Alberts u. P. Doty, Nature (London) 188, 98 (1960).

[28] H. G. Zachau, D. Dütting u. H. Feldman, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 347, 212 (1966); J. T. Madison, G. A. Everett u. H. Kung, Science 153, 531 (1966); 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); A. A. Baev, T. V. Vekstern, A. D. Mirzabekov, A. I. Krutikina, L. Li u. V. D. Axelrod, Molecular Biology 1, 754 (1967); H. M. Goodman, J. Abelson, A. Landy, S. Brenner u. J. D. Smith, Nature (London) 217, 1019 (1968); S. K. Dube, K. A. Marcker, B. F. C. Clark u. S. Cory, ibid. 218, 232 (1968); S. Takemura, T. Miqutani u. M. Miyazaki, J. Biochemistry 63, 277 (1968); M. Staehelin, H. Rogg, B. C. Baguley, T. Ginsberg u. W. Wehrli, Nature (London) 219, 1363 (1968).

codon-Sequenz an der gleichen Stelle in der mittleren Schleife. Die Kleeblattanordnung kann allerdings nur eine teilweise Beschreibung der dreidimensionalen Struktur sein. Dies folgt aus chemischen und enzymatischen Studien, die zeigen, daß das Molekül gefaltet ist [29]. Die Einzelheiten dieser Faltung sind allerdings noch nicht klar. Einige weitere Informationen kann man zweifellos aus chemischen und enzymatischen Versuchen gewinnen; es scheint aber so, als ob die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur einer Transfer-RNA auf die Röntgenstrukturanalyse warten muß [30].

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

[30] B. F. C. Clark, B. P. Doctor, K. C. Holmes, A. Kug, K. A. Marcker, S. J. Morris u. H. H. Paradies, *Nature* (London) 219, 1222 (1968).

[31] R. W. Holley, *J. Amer. med. Assoc.* 194, 868 (1965).

Das also ist unsere Geschichte von der Alanin-Transfer-RNA. Alles ergab sich ganz natürlich aus einem Forschungsurlaub. Ich kann Forschungsurlaub wirklich empfehlen.

Dank

Unsere Arbeit wurde durch die finanzielle Hilfe der National Science Foundation ermöglicht. Stipendien und Sachbeihilfen der National Institutes of Health seien außerdem mit Dank genannt. Besonderen Dank schulde ich Dr. W. H. Allaway, dem Direktor des US Plant, Soil and Nutrition Laboratory, für Vertrauen und Ermutigung während der Sequenzbestimmung.

Eingegangen am 21. Juli 1969 [A 729]
Übersetzt von Dr. Th. Höpner, Heidelberg

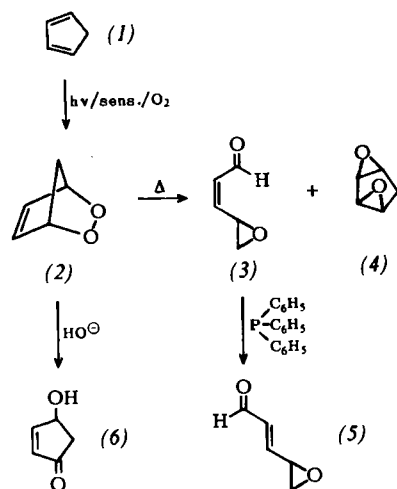
[32] R. W. Holley, *Progr. nucleic Acid Res. and molecular Biol.* 8, 37 (1968).

ZUSCHRIFTEN

Eine neue Peroxidumlagerung: *cis*-4,5-Epoxy-2-pentalenal aus 1,4-Epidioxy-2-cyclopenten

Von K. H. Schulte-Elte, B. Willhalm und G. Ohloff^[*]

1,4-Epidioxy-2-cyclopenten (2) entsteht durch 1,4-Addition von Singulett-Sauerstoff an Cyclopentadien (1) und wurde bei -100°C isoliert^[1]. Beim Versuch der Darstellung von (2) durch farbstoffsensibilisierte Photooxygenierung oberhalb von 0°C in alkoholischer Lösung und in Gegenwart von Polymerisationsinhibitoren erhielten wir überraschend in 58-proz. Ausbeute das bisher unbekannte *cis*-4,5-Epoxy-2-pentalenal (3), $K_p = 35^{\circ}\text{C}/0.1$ Torr; $n_D^{20} = 1.4933$; $d_4^{20} = 1.04$; IR: $762, 1635\text{ cm}^{-1}$ (*cis*-CH=CH-); $1675, 2730, 2850\text{ cm}^{-1}$ (-CHO); NMR ($\text{CCl}_4 + \text{CDCl}_3/\text{TMS}$): 9.92 ppm (1 H/m,



—CHO); 6.1 ppm (2 H/m, *cis*-CH=CH-); 4.17 ppm (1 H/m, Oxiranylproton); 3.12 und 2.71 ppm (2 H/2 \times 2 d, Oxiranylprotonen, $J = 4.5$ und 5.5 bzw. 2.3 und 5.5 Hz). Daneben hatten sich 7% *cis*-1,2;3,4-Diepoxy-cyclopentan (4)^[2] und 30% polymere Verbindungen gebildet.

Das früher^[1] als Isomerisierungsprodukt von (2) erhaltene 1-Hydroxy-2-cyclopenten-4-on (6) ($K_p = 70^{\circ}\text{C}/0.1$ Torr; $n_D^{20} = 1.4882$; $d_4^{20} = 1.02$) entsteht hierbei nicht. In alkalisch-alkoholischer Lösung^[3] faßten wir es jedoch in maximal

20-proz. Ausbeute. Dazu ist schnelles Arbeiten bei Raumtemperatur oder darunter und ein pH-Wert von 8–10 angezeigt.

In Gegenwart von Triphenylphosphin lagert sich das in reinem Zustand stabile (3) bei Raumtemperatur praktisch quantitativ in das *trans*-Isomere (5) um, $K_p = 36^{\circ}\text{C}/0.1$ Torr; $n_D^{20} = 1.4931$; $d_4^{20} = 1.08$; IR: $923, 972, 1638\text{ cm}^{-1}$ (*trans*-CH=CH); $1680, 2720, 2810\text{ cm}^{-1}$ (-CHO); NMR ($\text{CCl}_4 + \text{CDCl}_3/\text{TMS}$): 9.46 ppm (1 H/m, -CHO); 6.41 ppm (2 H/m, *trans*-CH=CH-); 3.53 ppm (1 H/m, Oxiranylproton); 3.06 und 2.70 ppm (2H/2 \times 2d, Oxiranylprotonen, $J = 4.5$ und 5.5 bzw. 2.3 und 5.5 Hz).

Als Dienophile sind (3) und (5) etwa so reaktiv wie Crotonaldehyd. So konnte das Addukt aus 2,3-Dimethylbutadien und (5) bereits beim Erhitzen in Benzol in 82-proz. Ausbeute erhalten werden. Beim Erhitzen mit verdünnter Salzsäure lieferten (3) und (5) glatt Furfurylalkohol, während ihre Reduktion mit NaBH_4 in Äthanol zu einem Gemisch von *trans*-2-Penten-1,4-diol ($K_p = 127^{\circ}\text{C}/12$ Torr; $n_D^{20} = 1.4740$; $d_4^{20} = 1.02$) und *trans*-2-Penten-1,5-diol ($K_p = 132^{\circ}\text{C}/12$ Torr; $n_D^{20} = 1.4712$; $d_4^{20} = 1.038$) im Verhältnis von 3 : 1 führte.

Die rein thermisch verlaufende Isomerisierung von (2) nach (3) ist für Peroxide vom Typ des 3,6-Dihydro-1,2-dioxins^[4,5] oder 1,2-Dioxolans^[6] neu. Die glatte, von Lösungsmitteln und Radikalinhibitoren unbeeinflussbare Umlagerung deutet auf eine elektrolitische Vierzentrenreaktion hin.

Alkylderivate des 1,4-Epidioxy-2-cyclopentens können gleichartig isomerisieren^[7].

Eingegangen am 14. Oktober 1969 [Z 104]

[*] Dr. K. H. Schulte-Elte, Dr. B. Willhalm und Dr. G. Ohloff
Laboratoire de Recherches, Firmenich et Cie
CH-1211 Genf 8 (Schweiz)

[1] G. O. Schenck u. E. D. Dunlap, *Angew. Chem.* 68, 248 (1956).

[2] B. Tolbert, R. Steyn, J. A. Franks jr. u. H. Z. Sable, *Carbohydrate Res.* 5, 62 (1967).

[3] M. Kornblum u. H. E. de la Mare, *J. Amer. chem. Soc.* 73, 880 (1951).

[4] J. Boche u. O. Runquist, *J. org. Chemistry* 33, 4285 (1968), dort weitere Literatur.

[5] K. Gollnick u. G. O. Schenck in J. Hamer: 1,4-Cycloaddition Reactions. Academic Press, New York 1967, S. 286.

[6] R. Criegee u. G. Paulig, *Chem. Ber.* 88, 712 (1955).

[7] K. H. Schulte-Elte, noch unveröffentlicht.