

# Die enzymatische Synthese von Ribonucleinsäure (RNS)

Nobel-Vortrag am 11. Dezember 1959\*)

Von Prof. Dr. SEVERO OCHOA

New York University College of Medicine, New York, N. Y., USA

Ribonucleinsäure (RNS) ist an der Biosynthese der Proteine beteiligt. In einigen Viren ist sie Träger der genetischen Information. Aus *Azotobacter vinelandii* konnte ein Enzym, Polynucleotid-Phosphorylase, isoliert werden, das die Bildung hochmolekularer RNS aus Nucleosid-diphosphaten auch im Reagensglas katalysiert. Die Synthese muß durch Zugabe von Oligo- oder Polynucleotiden gestartet werden. Die Starter-Wirkung der Polynucleotide weist eine begrenzte Spezifität auf. — Ribonucleinsäuren bilden in Lösung Komplexe, denen die Struktur einer zwei- oder drei-strängigen Helix zukommt. Die Polynucleotid-Ketten werden in diesen Komplexen durch Wasserstoff-Brücken zwischen den Purin- und Pyrimidin-Basen zusammengehalten.

Nucleinsäuren besitzen — infolge der Rolle, die sie beim Zellwachstum und bei der Weitergabe der Erbmerkmale spielen — große biologische Bedeutung. Die grundlegenden Arbeiten von *Caspersson* und *Brachet* gaben den ersten Hinweis, daß Ribonucleinsäure (RNS) an der Biosynthese der Proteine beteiligt ist und so das Zellwachstum beeinflußt. Für die Weitergabe der Erbmerkmale ist Desoxyribonucleinsäure (DNS) verantwortlich; sie bildet den Hauptbestandteil der im Zellkern enthaltenen Chromosomen. Interessanterweise ist in einigen Viren, die aus RNS und Protein bestehen (z. B. Tabak-Mosaik-, Influenza- und Poliomyelitis-Virus), Ribonucleinsäure Träger der genetischen Information.

Die in einer Zelle enthaltene RNS befindet sich größtenteils im Cytoplasma. Man unterscheidet zwei Arten cytoplasmatischer RNS: die Moleküle der einen Art sind verhältnismäßig klein, sie kommen in der Plasma-Flüssigkeit vor und werden als lösliche RNS bezeichnet. Die andere Art hat ein wesentlich größeres Molekulargewicht; sie ist als Ribonucleoprotein Bestandteil der Mikrosomen. Beide spielen bei der Proteinsynthese eine wesentliche Rolle. Außerdem ist etwas RNS im Zellkern enthalten, zum größten Teil im Nucleolus. Es gibt Hinweise dafür, daß die cytoplasmatische RNS überwiegend — wenn nicht gänzlich — im Zellkern synthetisiert und anschließend ins Zellplasma transportiert wird. Man nimmt an, daß die DNS des Zellkernes den Aufbau der RNS bestimmt, daß diese nach Übertritt ins Cytoplasma wiederum die Zusammensetzung der Proteine festlegt und daß auf diesem Wege die genetische Information der DNS realisiert wird.

Während man über die Biosynthese der Nucleotide, d. h. der DNS- und RNS-Bausteine, verhältnismäßig gut Bescheid wußte, war bis vor kurzem über den Syntheseweg der hochmolekularen Nucleinsäuren nur sehr wenig bekannt. Unsere heutigen Kenntnisse auf diesem Gebiet verdanken wir der Entdeckung von Enzymen, welche im Reagensglas die Synthese von RNS und DNS aus einfachen, in der Natur auftretenden Vorstufen katalysieren. Diese Vorstufen sind Nucleosid-di- und -triphosphate, deren Nucleotid-Reste unter Freisetzung von Ortho- bzw. Pyrophosphat zu langen Ketten polymerisiert werden.

## Polynucleotid-Phosphorylase

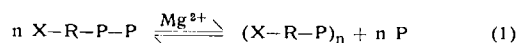
1955 isolierten wir aus Bakterien ein Enzym, das hochmolekulare Polyribonucleotide aus Nucleosid-diphosphaten synthetisiert<sup>1,2)</sup>. Bei der Reaktion wird Orthophosphat

\*) Das liebenswürdige Entgegenkommen des Nobel-Komitees, Stockholm, hat es uns ermöglicht, diesen Nobel-Vortrag, der erst später in den Veröffentlichungen des Nobel-Komitees erscheinen wird, schon jetzt zu bringen.

<sup>1)</sup> M. Grunberg-Manago u. S. Ochoa, J. Amer. chem. Soc. 77, 3165 [1955].

<sup>2)</sup> M. Grunberg-Manago, P. J. Ortiz u. S. Ochoa, Science [Washington] 122, 907 [1955].

frei. Sie ist reversibel, erfordert die Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen und kann durch die Gleichung



beschrieben werden. Darin bedeuten X eine Base (z. B. Adenin, Hypoxanthin, Guanin, Uracil oder Cytosin), R einen Ribose-Rest, P-P Pyrophosphat und P Orthophosphat. In der umgekehrten Richtung bewirkt das Enzym die Spaltung von Polynucleotiden durch Phosphat, d. h. eine Phosphorolyse unter Bildung von Ribonucleosid-diphosphaten. Die Reaktion gleicht also der reversiblen Synthese und Spaltung von Polysacchariden, die durch Phosphorylase katalysiert wird. Das neue Enzym erhielt daher den Namen Polynucleotid-Phosphorylase. Infolge der Reversibilität der oben angeschriebenen Reaktion bewirkt das Enzym auch einen Austausch des in den Nucleosid-diphosphaten endständigen Phosphat-Restes gegen das auf der rechten Seite der Gleichung (1) stehende Orthophosphat. Durch diesen Phosphat-Austausch wurde es von uns entdeckt, als wir einem Reaktionsansatz radioaktiv markiertes Orthophosphat zusetzten. Unter Verwendung des Austausches als Indikator-Reaktion konnten wir zusammen mit *Grunberg-Manago* aus *Azotobacter vinelandii* ein teilweise gereinigtes Enzym-Präparat gewinnen. Das Enzym katalysiert nicht nur die Synthese von RNS aus den vier natürlich vorkommenden Ribonucleosid-diphosphaten, sondern auch die Bildung unnatürlicher Polyribonucleotide, die nur aus einer Nucleotid-Sorte bzw. aus zwei oder drei verschiedenen Nucleotiden bestehen. Welcher Art das Produkt ist, hängt von der Natur der Nucleosid-diphosphate ab, die als

Substrat	Polymer
ADP	Poly-A
GDP	Poly-G
UDP	Poly-U
CDP	Poly-C
IDP	Poly-I
Ribothymidin-diphosphat	Polyribothymidylsäure
ADP + UDP	Poly-AU
GDP + CDP	Poly-GC
ADP + GDP + CDP + UDP	Poly-AGUC (= synthetische RNS)

Tabelle 1. Synthetische Polyribonucleotide <sup>2a)</sup>

<sup>2a)</sup> Anm. des Übers.: A, G, U, C und I bedeuten die Ribonucleotide Adenyl-, Guanyl-, Uridyl-, Cytidyl- und Inosinsäure. Poly-AU bezeichnet ein Polyribonucleotid, das aus Adenylsäure und Uridylsäure besteht. — Die in den Nucleosiden enthaltenen Basen werden durch Ad, Gu, Ur und Cy (= Adenin, Guanin, Uracil und Cytosin) wiedergegeben. — Ferner bedeuten: ADP = Adenosin-diphosphat, GDP = Guanosin-diphosphat, UDP = Uridin-diphosphat, CDP = Cytidin-diphosphat, IDP = Inosin-diphosphat, AMP = Adenosin-monophosphat, GMP = Guanosin-monophosphat, UMP = Uridin-monophosphat, CMP = Cytidin-monophosphat.

Substrat verwendet werden<sup>3,4)</sup>. Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Polynucleotid-Typen, die bisher mit Hilfe der Polynucleotid-Phosphorylase dargestellt worden sind. Über die Bildung von Polyribothymidylsäure aus synthetischem Ribothymidin-diphosphat wurde kürzlich berichtet<sup>5)</sup>.

### Struktur der Polynucleotide

Zusammen mit L. A. Heppel<sup>6-8)</sup> konnten wir zeigen, daß die synthetischen Polyribonucleotide strukturell in jeder Hinsicht mit natürlicher RNS übereinstimmen. Der Abbau mit Alkali oder Enzymen, wie Schlangengift- und Milz-Phosphodiesterase oder Pankreas-Ribonuclease ergab, daß sie aus unverzweigten Ketten bestehen, in denen die Nucleosid-Bausteine durch 3'.5'-Phosphodiester-Brücken aneinander gebunden sind. Diese Übereinstimmung mit natürlicher RNS läßt sich besonders gut durch Einwirkung von

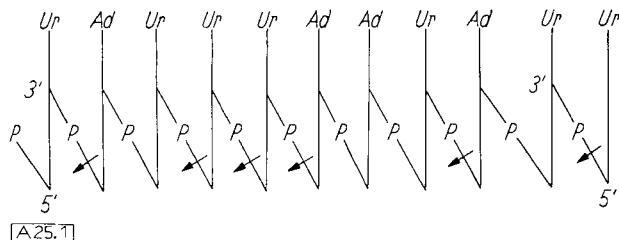


Abb. 1. Schema der Spaltung von Poly-AU durch Pankreas-Ribonuclease. Die vertikalen Linien bedeuten Ribose-Reste, Ur und Ad sind Abkürzungen für Uracil und Adenin. Die Pfeile geben an, wo das Molekül gespalten wird

Pankreas-Ribonuclease auf synthetisches Poly-AU beweisen: nach der Art, wie das Enzym natürliche RNS spaltet, muß es Poly-AU an den in Abb. 1 durch Pfeile gekennzeichneten Stellen angreifen. Es müßte sich also eine Reihe kleinerer Oligonucleotide bilden, deren jedes aus einem Uridylsäure-Rest und einem oder mehreren Adenylsäure-Resten besteht. Als einziges Mononucleotid sollte Uridylsäure (= Uridin-3'-monophosphat) entstehen.

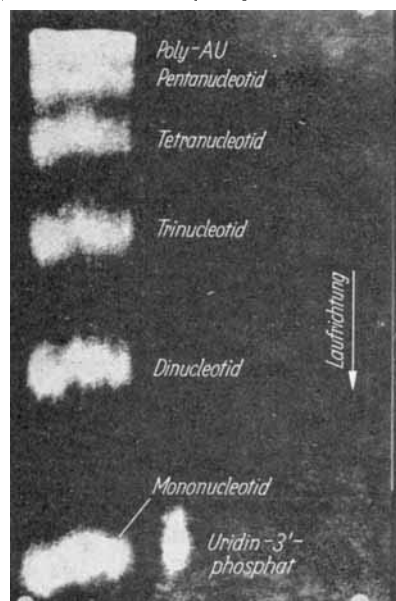


Abb. 2. Chromatogramm der Hydrolyseprodukte, die mit Ribonuclease aus Poly-AU entstehen (L. A. Heppel)

Abb. 2 zeigt — im UV-Licht photographiert — ein Chromatogramm des mit Ribonuclease erhaltenen Poly-AU-Hydrolysates. Man erkennt (in der Reihenfolge ihrer  $R_F$ -Werte) Penta-, Tetra-, Tri- und Dinucleotide sowie als einziges Mononucleotid Uridin-3'-monophosphat, dessen Identität durch die Übereinstimmung seines  $R_F$ -Wertes mit dem einer authentischen Probe bewiesen wird. Die Oligonucleotide wurden eluiert und nach Hydrolyse mit Alkali durch ihre Zusammensetzung identifiziert.

Die Spaltung synthetischer RNS mit Ribonuclease ergibt neben Uridyl- und Cytidylsäure Gemische von Oligonucleotiden, die — soweit sie bisher charakterisiert werden konnten — mit den aus natürlicher RNS unter gleichen Bedingungen entstehenden Oligonucleotiden identisch sind.

Die Frage, ob ein bestimmtes Nucleotid in den synthetischen Polynucleotid-Ketten mit den anderen Nucleotiden ebenso verknüpft ist, wie in natürlicher RNS, läßt sich leicht durch einen Abbau synthetischer RNS, die radioaktives Phosphat enthält, beantworten<sup>9)</sup>. Abb. 3 zeigt die Struktur eines Polynucleotides (Poly-\*AGUC), das aus einem Gemisch von markiertem Adenosin-diphosphat (Adenosin-<sup>32</sup>P-P) und unmarkiertem Guanosen-, Uridin- und Cytidin-diphosphat gewonnen wurde. Ist die markierte Adenylsäure (\*A) wie in der Abbildung statistisch über das ganze Molekül verteilt, so werden bei der Hydrolyse mit Schlangengift-Phosphodiesterase (Abb. 3A) Nucleosid-5'-monophosphate entstehen, von denen nur das Adenosin-5'-monophosphat markiert ist. Dagegen müssen alle Nucleosid-3'-monophosphate markiert sein, die sich mit Milz-Phosphodiesterase bilden (Abb. 3B).

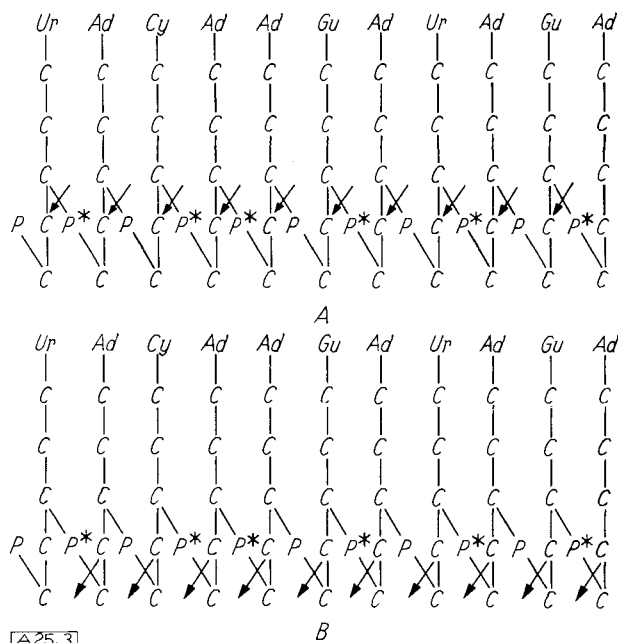


Abb. 3. Schema der Hydrolyse von <sup>32</sup>P-RNS (Poly-\*AGUC) durch (A) Schlangengift- und (B) Milz-Phosphodiesterase. Pfeile geben die gespaltenen Bindungen an, P\* bedeutet <sup>32</sup>P. Bezüglich der Abkürzungen siehe 2a)

Abb. 4 zeigt, daß dies in der Tat so ist. Die Hydrolyse-Produkte wurden durch Ionenaustausch-Chromatographie getrennt.

Variiert man das Verhältnis der Nucleosid-diphosphate, die als Substrate dienen, sehr stark, so macht sich dies in der Zusammensetzung des Polymeren bemerkbar. Verwendet man eine äquimolare Mischung von Adenosin-, Guanosen-, Uridin- und Cytosin-diphosphat zur RNS-Synthese, so ist das Produkt der aus *Azotobacter* isolierten, natürlichen

<sup>3)</sup> S. Ochoa, Feder. Proc. 15, 832 [1956].

<sup>4)</sup> M. Grunberg-Manago, P. J. Ortiz u. S. Ochoa, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 20, 269 [1956].

<sup>5)</sup> B. E. Griffin, A. Todd u. A. Rich, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 1123 [1958].

<sup>6)</sup> S. Ochoa u. L. A. Heppel in W. D. McElroy u. B. Glass: The Chemical Basis of Heredity. Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1957, S. 615; S. Ochoa in: Cellular Biology, Nucleic Acids, and Viruses, N.Y. Acad. Sci. Special Publications 5, 191 [1957].

<sup>7)</sup> L. A. Heppel, P. J. Ortiz u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 229, 679 [1957].

<sup>8)</sup> L. A. Heppel, P. J. Ortiz u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 229, 695 [1957].

<sup>9)</sup> P. J. Ortiz u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 234, 1208 [1959].

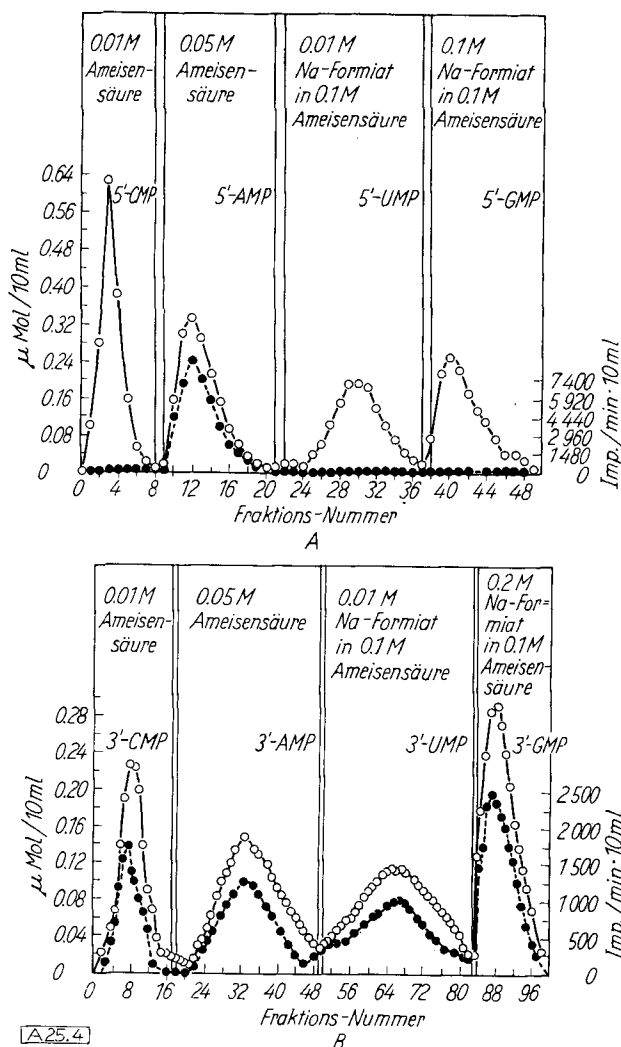


Abb. 4. Hydrolyse von Poly-AGUC mit (A) Schlangengift- und (B) Milz-Phosphodiesterase. Trennung der Mononucleotide durch Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex-1-Formiat. -o-o-o-o- = Nucleotid-Konzentration, -●-●-●- = Radioaktivität<sup>12)</sup>

RNS hinsichtlich seines Nucleotid-Gehaltes sehr ähnlich. Dies zeigt Tabelle 2, in der die Basen-Verhältnisse von *Azotobacter*-RNS und zwei synthetischen Produkten einander gegenübergestellt worden sind. Es ist bemerkenswert, daß die Werte stark von 1 verschieden sind, obwohl zur Synthese ein äquimolares Gemisch der vier Nucleosid-diphosphate verwendet wurde.

Base	<i>Azotobacter</i> -RNS	Poly-AGUC (Probe 1)	Poly-AGUC (Probe 2)
Adenin .....	1,00	1,00	1,00
Guanin .....	1,30	1,16	1,25
Uracil .....	0,73	0,66	0,69
Cytosin .....	0,90	0,72	0,73

Tabelle 2. Basen-Gehalt natürlicher und synthetischer RNS<sup>9)</sup> (Adenin = 1)

Auch in ihrer Größe gleichen natürliche RNS und synthetische Polyribonucleotide einander. Deren Molekulargewicht liegt zwischen  $30000$  und  $1 \cdot 10^6$  bis  $2 \cdot 10^6$ . Die Sedimentationskonstanten von synthetischer und aus *Azotobacter* isolierter RNS sind ähnlich. Polynucleotide, die nur aus einer Nucleotid-Sorte bestehen, erreichen oft ein sehr hohes Molekulargewicht, ihre Lösungen sind entsprechend stark viscos. Man kann das Fortschreiten der Synthese mit bloßem Auge an der Viscositäts-Zunahme erkennen, die eintritt, wenn man Nucleosid-diphosphate mit einigen  $\mu\text{g}$  Enzym inkubiert. Natürliche RNS besitzt eine gewisse

unspezifische biologische Aktivität, die auch synthetische RNS aufweist. Beispielsweise regt synthetische RNS hämolytische Streptococci ebenso sehr zur Bildung von Streptolysin S (einer Lecithinase) an, wie dies natürliche RNS tut<sup>10)</sup>.

### Synthese-Mechanismus

Um den Mechanismus der Polynucleotid-Synthese mit Polynucleotid-Phosphorylase untersuchen zu können, mußten hochgereinigte Enzym-Präparate gewonnen werden. Der letzte Reinigungsschritt war die Chromatographie an einer Hydroxylapatit-Säule, ein von Tiselius und Mitarbeitern<sup>11)</sup> entwickeltes Verfahren. Nur so war es möglich, das Enzym von einem gelben Protein unbekannter Natur zu befreien, das erst bei einer höheren Puffer-Konzentration von der Säule eluiert wird (Abb. 5).

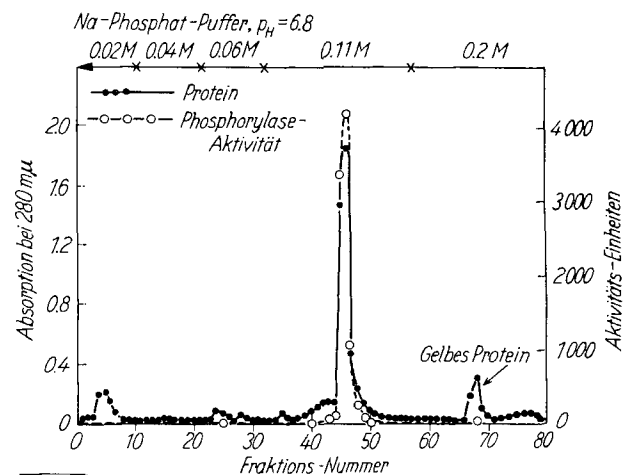


Abb. 5. Chromatographie von Polynucleotid-Phosphorylase aus *Azotobacter vinelandii* an Hydroxylapatit<sup>11a)</sup>

Nach der Chromatographie ist das Enzym gegenüber dem ursprünglichen *Azotobacter*-Extrakt etwa 600-fach gereinigt. Es enthält noch fest gebunden ein Oligonucleotid<sup>12)</sup>, das sich weder durch Behandlung mit Aktivkohle oder Ribonuclease noch nach irgendeinem anderen Verfahren ohne Zerstörung des Enzym-Proteins entfernen läßt. So konnte bisher nicht entschieden werden, ob diese Substanz, die etwa 3,5% des Enzyms ausmacht, eine prosthetische Gruppe oder nur eine Verunreinigung ist. Das Oligonucleotid besteht aus etwa zwölf Nucleotid-Resten und enthält Adenyl-, Guanyl-, Uridyl- und Cytidylsäure ungefähr im gleichen molaren Verhältnis wie RNS aus *Azotobacter*. Es kann nach Denaturierung des Proteins mit Perchlorsäure oder Phenol isoliert werden.

Da das Enzym-Präparat aus *Azotobacter* sowohl RNS synthetisiert als auch Polynucleotide, die nur aus einer Nucleotid-Sorte bestehen, stellt sich die Frage, ob man es mit einem einzigen Enzym zu tun hat oder mit einem Gemisch mehrerer Enzyme, deren jedes mit einem anderen Nucleosid-diphosphat reagiert. Steigt bei der Reinigung des Enzyms dessen Aktivität gegenüber allen Nucleosid-diphosphaten im gleichen Maße an, so läßt sich mit einiger Wahrscheinlichkeit, wenn auch nicht eindeutig, folgern, daß nur ein Enzym vorhanden ist. Tabelle 3 zeigt, daß sich die Aktivität des Phosphorylase-Präparates gegenüber fünf Nucleosid-diphosphaten bei der chromatographischen

<sup>10)</sup> K. Tanaka, F. Egami, T. Hayashi, J. E. Winter, A. W. Bernheimer, S. Mii, P. J. Ortiz u. S. Ochoa, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] 25, 663 [1957].

<sup>11)</sup> A. Tiselius, S. Hjerten u. O. Levin, *Arch. Biochem. Biophysics* 65, 132 [1956].

<sup>11a)</sup> S. Ochoa u. S. Mii, unveröffentl.

<sup>12)</sup> S. Ochoa, XI. Conseil de Chimie Solvay, Brüssel, Juni 1959.

Reinigung etwa gleichmäßig erhöht, wenn man als Maß für die Aktivität den Austausch mit radioaktivem Phosphat verwendet. Gleiches wurde für die vor der Chromatographie liegenden Reinigungsschritte beobachtet.

Reinigungs-Schritt	Aktivität des Enzyms gegenüber				
	ADP	GDP	UDP	CDP	IDP
Adsorption an $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Gel und Eluierung	39	33	46	35	41
Chromatographie an Hydroxylapatit	316	300	370	280	370
Aktivitäts-Verhältnis	8,1	9,1	8,0	8,0	9,0

Tabelle 3. Aktivität zweier aus *Azotobacter* gewonnener Phosphorylase-Präparate verschiedener Reinheit<sup>11a)</sup>. Als Aktivitätsmaß diente der Phosphat-Austausch. Die Zahlen geben die Menge des in die Nucleosid-diphosphate eingebauten  $^{32}\text{P}$  in  $\mu\text{mol/mg}$  Enzym an. Reaktionsdauer: 15 min bei 30 °C

Gibt man teilweise gereinigte Polynucleotid-Phosphorylase zu einem im übrigen vollständigen Reaktions-Ansatz, so beginnt unmittelbar die Synthese des Polynucleotids. Dies ist jedoch nicht der Fall, wenn man ein hochgereinigtes Präparat verwendet. Hier beginnt die Synthese erst mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Verzögerung und steigert sich dann allmählich. Das Gleichgewicht wird auch nach mehreren Stunden nicht erreicht. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt aber stark an, wenn man dem Ansatz kleine Mengen eines Oligo- oder Polynucleotides hinzufügt, die — ähnlich wie bei der Synthese von Glykogen aus Glucose-1-phosphat mit (Polysaccharid)-Phosphorylase — als Starter wirken. Heppel und Mitarbeiter<sup>13)</sup> entdeckten die Starter-Wirkung von Oligoribonucleotiden, in unserem Laboratorium wurde die von Polynucleotiden gefunden<sup>14)</sup>. Am häufigsten sind Di-, Tri- oder Tetra-adenylsäuren, die man durch Hydrolyse von Polyadenylsäure mit einer aus Leberzellkernen gewonnenen Nuclease erhält<sup>15)</sup>, als Starter verwendet worden.

Die Starter-Wirkung der Oligonucleotide ist nicht spezifisch. Oligo-adenylsäuren können die Synthese von Polyadenyl- und Polyuridylsäure ebenso in Gang bringen wie

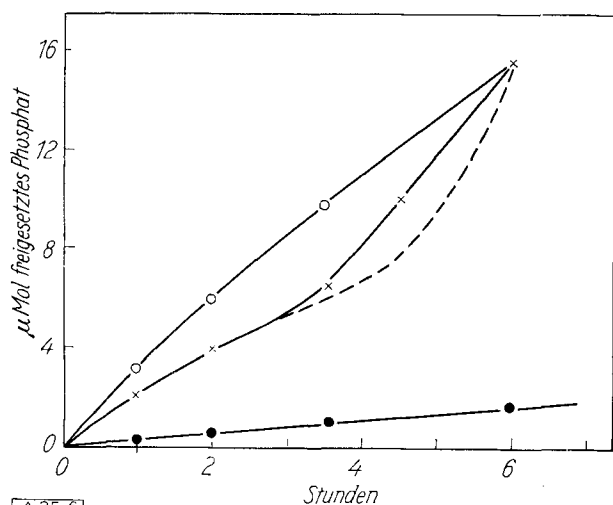


Abb. 6. Start der RNS-Synthese durch 0,5  $\mu\text{Mol}$  Tri-A (—○—○—), 1,0  $\mu\text{Mol}$  Poly-C (---x---x---) und 1,0  $\mu\text{Mol}$  Leber-RNS (—●—●—). —●—●— = kein Starter. — Der Reaktionsansatz enthielt je 5  $\mu\text{Mol}$  ADP, GDP, UDP und CDP, 2,0  $\mu\text{Mol}$   $\text{Mg}^{2+}$ , 140  $\mu\text{g}$  Enzym, 150  $\mu\text{Mol}$  Tris.  $\text{pH} = 8,1$ . Gesamtvolumen = 1,0 ml

<sup>13)</sup> M. F. Singer, L. A. Heppel u. R. J. Hilme, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] 26, 447 [1957].

<sup>14)</sup> S. Mii u. S. Ochoa, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] 26, 445 [1957]; S. Ochoa, S. Mii u. M. C. Schneider, *Proceedings Internat. Symposium on Enzyme Chemistry*, Maruzen Comp., Tokio, Japan 1957, Bd. 2, S. 44.

<sup>15)</sup> L. A. Heppel, P. J. Ortiz u. S. Ochoa, *Science* [Washington] 123, 415 [1956].

die Bildung von RNS oder irgendwelcher anderer Polynucleotide. Dagegen zeigt die Starter-Wirkung der Polynucleotide eine gewisse Spezifität. Beispielsweise startet Polyadenylsäure nur seine eigene Synthese und das gleiche gilt für Polyuridylsäure. RNS jedoch — synthetischen oder natürlichen Ursprungs — bringt sowohl die RNS-Synthese als auch die von Polyadenyl- und Polyuridylsäure in Gang. Sehr merkwürdig und gänzlich unerklärt ist das Verhalten von Polycytidylsäure, welche die Bildung aller bisher geprüften Polynucleotide starten kann (Tabelle 4). Abb. 6 zeigt, wie die RNS-Synthese mit hochgereinigter Polynucleotid-Phosphorylase durch Triadenylsäure (Tri-A), Leber-RNS und Polycytidylsäure (Poly-C) gestartet wird.

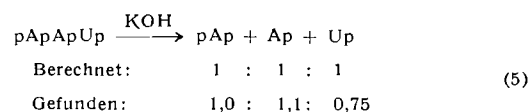
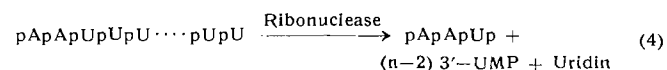
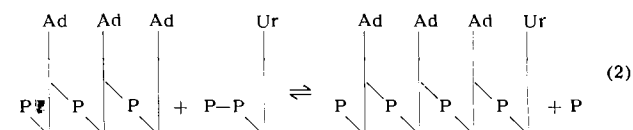
Die Wirkung einiger Polynucleotide auf verschiedene Synthese-Reaktionen gibt Tabelle 4 wieder. Bemerkenswert ist, daß Polyadenylsäure die Synthese von Polyuridylsäure nicht nur nicht in Gang bringt, sondern die langsame Polymeren-Bildung, die in Abwesenheit eines Starters stattfindet, auch noch hemmt. Umgekehrt gilt das gleiche. Auffällig ist ferner, daß die Synthese von Polycytidylsäure nur durch diese selbst gestartet werden kann.

Synthetisiertes Polymer	Starter-Wirkung von					RNS (natürl. od. synthet.)
	Poly-A	Poly-U	Poly-C	Poly-I	Poly-AU	
Poly-A	+	—	+	0	+	+
Poly-U	—	+	+	0	+	+
Poly-C	—	—	+			—
Poly-G	0	0	+			
Poly-I	—	0	+	+		
Poly-AU					+	
Poly-AGUC	0	0	+			+

+ = startet, — = hemmt, 0 = ohne Wirkung, leeres Feld = nicht untersucht

Tabelle 4. Spezifität der Starter-Wirkung von Polynucleotiden<sup>14)</sup>

Auf welche Weise Polynucleotide eine Synthese starten, ließ sich bisher ebenso wenig klären, wie die Ursache und Bedeutung der dabei auftretenden Spezifität. Für die Hypothese, daß Polyrribonucleotide als Matrizen ihre eigene Vervielfältigung bewirken, gibt es bisher keine experimentelle Bestätigung. Dagegen konnten Heppel und Mitarbeiter<sup>13,16)</sup> in eleganten Untersuchungen die Starter-Wirkung der Oligonucleotide aufklären. Sie zeigten, daß die Oligonucleotide als „Kerne“ dienen, aus denen sich Polynucleotid-Ketten durch schrittweise Anlagerung von Mononucleotid-Einheiten bilden. Es sei daran erinnert, daß Polysaccharid-Phosphorylase in ganz ähnlicher Weise die Addition von Glucose-Resten an ein als Starter wirkendes Polysaccharid katalysiert. Startet man die Synthese von Polyuridylsäure mit Di- oder Triadenylsäure, so sollten die neuen Polynucleotid-Ketten Uridylsäure-Reste enthalten,



denen zwei oder drei Adenylsäure-Reste vorangehen (Gleichung 2 und 3). Daß dies tatsächlich der Fall ist, ließ sich

<sup>16)</sup> M. F. Singer, L. A. Heppel u. R. J. Hilme, *J. biol. Chemistry* 235, 738 [1960].

nach dem Ribonuclease-Abbau von Polyuridylsäure, die mit Diadenylsäure als Starter gewonnen worden war, zeigen<sup>13,16</sup>). Ribonuclease spaltet die Polynucleotid-Kette in das an ihrem Anfang stehende Trinucleotid (pApApUp Gleichung 4), in mehrere Uridin-3'-monophosphat-Reste und in ein Molekül Uridin. Das Trinucleotid ließ sich chromatographisch isolieren und wurde mit Kalilauge hydrolysiert. Dabei sollten Adenosin-5'-3'-diphosphat, Adenosin-3'-monophosphat und Uridin-3'-monophosphat in äquimolaren Mengen entstehen (Gleichung 5), was auch der Fall ist.

Der Schluß erscheint gerechtfertigt, daß Polynucleotid-Phosphorylase eine Polynucleotid-Kette nicht allein aus Nucleosiddiphosphaten aufbauen kann, sondern daß die Anwesenheit eines Oligonucleotides, das den Kern einer neuen Polynucleotid-Kette bildet, unbedingt erforderlich ist. Gelänge es, das Enzym völlig von Oligonucleotiden zu befreien, so wäre es — ohne den Zusatz von Oligonucleotiden — wahrscheinlich gänzlich unwirksam.

### Biologische Bedeutung

Polynucleotid-Phosphorylase findet sich weit verbreitet in Bakterien. Das Enzym ist auch aus anderen Mikroorganismen als *Azotobacter vinelandii* teilweise gereinigt worden<sup>17-19</sup>), und Polyribonucleotide konnten mit solchen Präparaten synthetisiert werden. Auch grüne Blätter scheinen das Enzym zu enthalten<sup>17</sup>). Dagegen ist sein Nachweis in tierischem Gewebe schwierig. *Hilmoe* und *Heppel*<sup>20</sup>) fanden es jedoch kürzlich in Zellkern-Präparaten aus Säugerleber.

Polynucleotid-Phosphorylase scheint in der Natur so weit verbreitet zu sein, daß man annehmen darf, es sei allgemein an der Biosynthese der RNS beteiligt. Diese Hypothese wird gestützt durch neuere Untersuchungen mit Ribonucleosid-diphosphaten, die Analoga der natürlich in ihnen vorkommenden Basen enthalten. So wird 5-Bromuridin-diphosphat, das 5-Brom-uracil (ein Analogon des Uracils oder des Thymins) enthält, von intakten Bakterien in DNS eingebaut, nicht aber in RNS, und es dient auch der Polynucleotid-Phosphorylase nicht als Substrat. Dagegen ist Thio-uridin-diphosphat, welches das uracil-analoge Thio-uracil enthält und nicht in DNS, sondern nur in RNS eingebaut wird, ein Substrat des Enzyms. Damit stimmt überein, daß Aza-uridin-diphosphat mit dem uracil-analogen Aza-uracil weder in vivo als RNS-Baustein benutzt wird, noch in vitro mit der Polynucleotid-Phosphorylase reagiert<sup>21</sup>). Aber obwohl das Enzym RNS der gleichen Zusammensetzung und Größe wie *Azotobacter*-RNS synthetisiert und trotz der auffallenden Spezifität, mit der Polynucleotide diese Reaktion starten, gibt es bisher kein Anzeichen dafür, daß das Enzym das Starter-Molekül replizieren kann, wie es die von *Kornberg* untersuchte DNS-Polymerase tut. Da es aber in der Zelle Mechanismen geben muß, nach denen Ribonucleinsäure-Moleküle mit festgelegter Nucleotid-Sequenz synthetisiert werden können, wird man in Zukunft wahrscheinlich auch noch Enzyme finden, denen diese Funktion zukommt.

Enzyme, welche die Angliederung einiger Nucleotid-Einheiten an ein bereits existierendes RNS-Molekül katalysie-

ren, wurden kürzlich mehrfach beschrieben<sup>22-24</sup>). Diese Enzyme übertragen Cytidylsäure- und Adenylsäure-Reste aus den entsprechenden Nucleosid-triphosphaten auf die Enden von Polynucleotid-Ketten, sie bringen aber keine Neubildung von RNS<sub>2</sub>-Zustände. Andere Forscher<sup>25,26</sup>) haben den Einbau von Ribonucleotiden ins Innere von RNS-Ketten mit Zellpartikeln aus tierischem Gewebe beschrieben. So katalysiert eine aus Rattenleber-Zellkernen gewonnene Fraktion den Einbau von radioaktiver Cytidylsäure aus Cytidin-triphosphat in Anwesenheit einer Mischung von nichtmarkiertem Adenosin-, Guanosin- und Uridin-triphosphat. Bei der Einwirkung von Ribonuclease nahm die Reaktionsgeschwindigkeit beträchtlich ab, was auf die Beteiligung von RNS als Starter hinweist. Diese Ergebnisse lassen auf das Vorhandensein eines Enzyms schließen, das *Kornbergs* DNS-Polymerase ähnelt.

### Wechselwirkungen zwischen Polynucleotid-Ketten

Physikochemische Untersuchungen an synthetischen Polyribonucleotiden haben neues Licht auf deren makromolekulare Struktur geworfen und unser Verständnis der biologischen Eigenschaften von RNS und DNS sehr gefördert. *Warner*<sup>27</sup>) fand in unserem Laboratorium, daß Polyadenyl- und Polyuridylsäure in Lösung einen stabilen Komplex bilden. Bei bestimmten  $p_H$ -Werten wandert dieser Komplex elektrophoretisch als einzelnes, scharf begrenztes Band mit einer Geschwindigkeit, die zwischen den Wanderungsgeschwindigkeiten von Poly-A und Poly-U liegt. In der Ultrazentrifuge hat der Komplex eine höhere Sedimentationskonstante als seine beiden Komponenten (Abb. 7).

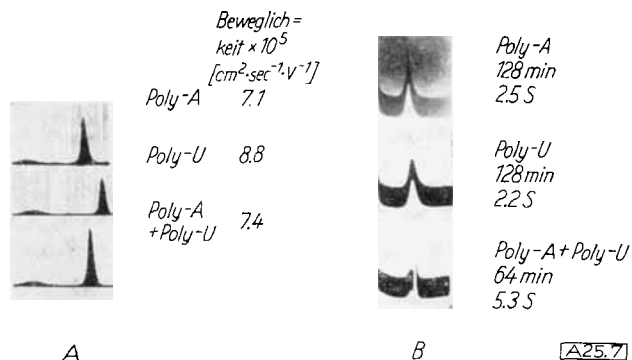


Abb. 7. Verhalten von Poly-A, Poly-U und Poly-A + Poly-U (A) bei der Elektrophorese (Glycin-Puffer,  $p_H = 9,6$ ) und (B) in der Ultrazentrifuge (Phosphat-Puffer,  $p_H = 7$ ;  $\Gamma/2 = 0,2$ ; 59780 U/min)

*Warner* fand außerdem, daß die Bildung des Komplexes mit einer Abnahme der UV-Absorption einhergeht (Abb.8). Man kann seine Entstehung mit bloßem Auge an der Viskositäts-Erhöhung erkennen, die beim Mischen einer Poly-A- mit einer Poly-U-Lösung eintritt.

Bei der Röntgenstrukturanalyse<sup>28</sup>) geben Fasern, die aus dem Poly-A-Poly-U-Komplex bestehen, Beugungsbilder, die an DNS<sup>29</sup>) erinnern, d. h. der Komplex hat die Struktur einer doppel-strängigen Helix. Weitere Unter-

<sup>17</sup>) D. O. Brummond, M. Staehelin u. S. Ochoa, J. biol. Chemistry 225, 835 [1957]; S. Ochoa in: Recent Progress in Microbiology, Symposia of VII. Internat. Congress for Microbiology. Verlag Almqvist & Wiksell, Stockholm 1958, Bd. 2, S. 122.

<sup>18</sup>) U. Z. Littauer u. A. Kornberg, J. biol. Chemistry 226, 1077 [1957].

<sup>19</sup>) R. F. Beers jr., Nature [London] 177, 790 [1956].

<sup>20</sup>) R. J. Hilmoe u. L. A. Heppel, J. Amer. chem. Soc. 79, 4810 [1957].

<sup>21</sup>) J. Škoda, J. Kára, A. Šormová u. F. Šorm, Biochim. biophysica Acta 33, 579 [1959].

<sup>22</sup>) L. I. Hecht, P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson u. J. F. Scott, J. biol. Chemistry 233, 954 [1958].

<sup>23</sup>) E. S. Canellakis, Biochim. biophysica Acta 25, 217 [1957].

<sup>24</sup>) J. Hurwitz, A. Bresler u. A. Kaye, Biochem. Biophys. Res. Communications 1, 3 [1959].

<sup>25</sup>) E. Goldwasser, J. Amer. chem. Soc. 77, 6083 [1955].

<sup>26</sup>) S. B. Weiss u. L. Gladstone, J. Amer. chem. Soc. 81, 4118 [1959].

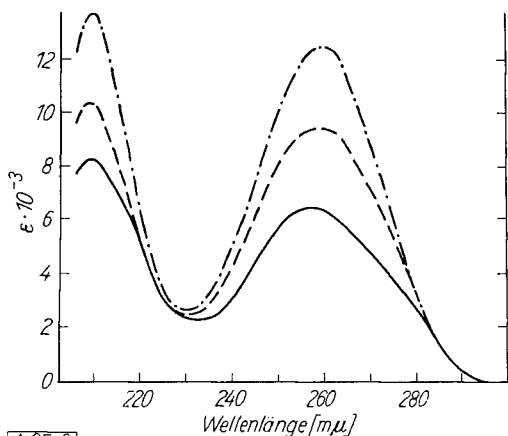
<sup>27</sup>) R. C. Warner, Feder. Proc. 15, 379 [1956]; J. biol. Chemistry 229, 711 [1957].

<sup>28</sup>) A. Rich u. D. R. Davies, J. Amer. chem. Soc. 78, 3548 [1956];

A. Rich in: W. D. McElroy u. B. Glass: The Chemical Basis of

Heredity, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1957, S. 557.

<sup>29</sup>) J. D. Watson u. F. H. C. Crick, Nature [London] 171, 737 [1953].

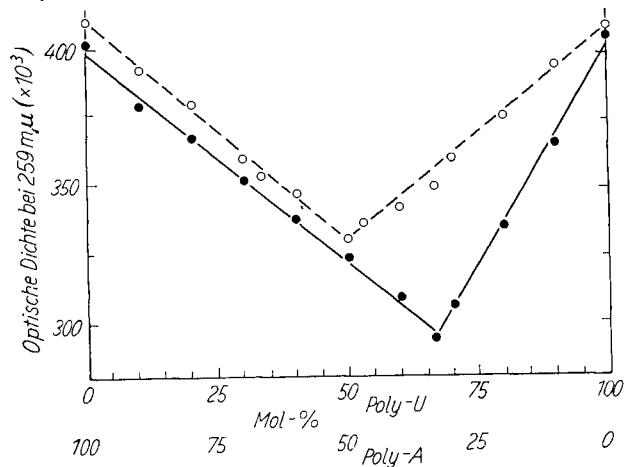


[A25.8]

Abb. 8. UV-Absorptionsspektren. — = Spektrum eines äquimolaren Gemisches aus Poly-A und Poly-U. --- = Berechnete Kurve für die beiden einzelnen Polymeren. - - - = Spektrum der Mononucleotide, die bei alkalischer Hydrolyse von Poly-A + Poly-U entstehen.

suchungen<sup>30)</sup> zeigten, daß die beiden Stränge durch Wasserstoff-Brücken zwischen komplementären Paaren der Basen Adenin und Uracil zusammengehalten werden. Diese Beobachtungen bildeten den ersten experimentellen Beweis dafür, daß Polynucleotide tatsächlich doppel-strangige Helices bilden können, wie Watson und Crick dies für DNS vorgeschlagen hatten, und daß auch RNS eine solche Struktur besitzen kann.

Die Abnahme der UV-Absorption, die mit der Bildung der Polynucleotid-Komplexe verbunden ist, hat die ausführliche Untersuchung<sup>31-33)</sup> der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Polynucleotiden sehr erleichtert. Rich und Mitarbeiter fanden, daß Polyribonucleotide auch drei-strangige Helix-Strukturen bilden können. Wie Abb. 9 zeigt, entsteht ein solcher Komplex aus einem Molekül Poly-A und zwei Molekülen Poly-U in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen. Man sieht, daß die optische Dichte bei 259 mμ abnimmt, wenn steigende Mengen einer Lösung von Polyuridylsäure zu einer Polyadenylnsäure-Lösung gegeben werden. In Abwesenheit von Magnesium-Ionen liegt das Absorptionsminimum bei einem Molverhältnis 1:1 der beiden Polynucleotide. In Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen wird das



[A25.9]

Abb. 9. Optische Dichte verschiedener Gemische aus Poly-A und Poly-U<sup>33a)</sup>. -o-o-o- = Ohne  $MgCl_2$ , -●-●- = mit  $1,2 \cdot 10^{-2} M$   $MgCl_2$

<sup>30)</sup> R. C. Warner u. E. Breslow: Symposia of Fourth International Congress of Biochemistry, Wien 1958, Pergamon Press, London, Bd. 9, S. 157.

<sup>31)</sup> G. Felsenfeld u. A. Rich, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 26, 457 [1957]; A. Rich in: Cellular Biology, Nucleic Acids, and Viruses. N.Y. Acad. Sci. Special Publications 5, 186 [1957].

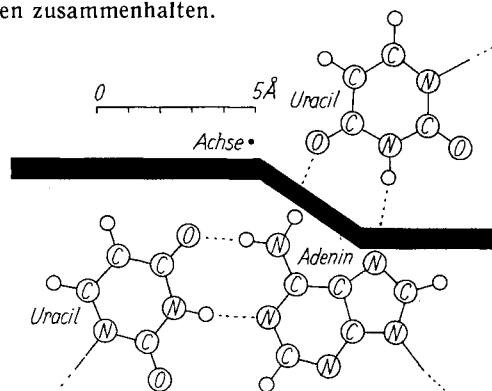
<sup>32)</sup> A. Rich, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 29, 502 [1958].

<sup>33)</sup> A. Rich, Nature [London] 187, 521 [1958].

<sup>33a)</sup> G. Felsenfeld, D. R. Davies u. A. Rich, J. Amer. chem. Soc. 79 2023 [1957].

Minimum dagegen erst erreicht, wenn die Lösung 2 Mol Polyuridylsäure pro Mol Polyadenylnsäure enthält.

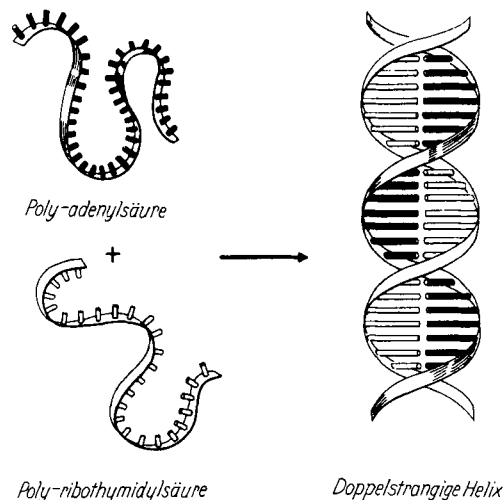
In Abb. 10 ist die Art der Wasserstoff-Brücken dargestellt, die nach Rich in den Komplexen aus Polyuridylsäure und Polyadenylnsäure (1:1 sowie 2:1) die Polynucleotid-Ketten zusammenhalten.



[A25.10]

Abb. 10. Wasserstoffbrücken (···) in Poly-A + Poly-U und Poly-A + Poly-U + Poly-U<sup>33b)</sup>

Rich konnte kürzlich einen Komplex mit doppel-strangiger Helix-Struktur aus Polyadenylnsäure und Polyribothymidylnsäure gewinnen. Seine Bildung ist schematisch in Abb. 11 dargestellt.



[A25.11]

Abb. 11. Schematische Darstellung zweier statistisch geknäuelter Moleküle von Polyadenylnsäure und Polyribothymidylnsäure, die sich zu einer zweisträngigen Helix vereinigen. Die kurzen Stäbe symbolisieren die Basen<sup>33b)</sup>

Gelöste Polyadenylnsäure kann gleichfalls eine zweistrangige Helix bilden. Doty und Mitarbeiter<sup>34)</sup> haben gezeigt, daß Polyadenylnsäure in Lösung bei  $p_H > 7$  statistisch geknäuel ist, daß die kettenförmigen Moleküle dagegen bei  $p_H < 7$  zu Komplexen mit spiraliger Struktur vereinigt sind. Diese Zusammenlagerung ist reversibel, und es gibt einen scharfen Umwandlungspunkt. In Tabelle 5 sind alle bisher bekannten Polyribonucleotid-Komplexe verzeichnet.

zwei-strangig	Poly-A + Poly-U
	Poly-A + Polyribothymidylnsäure
	Poly-I + Poly-C
	Poly-A + Poly-A
drei-strangig	Poly-A + Poly-U + Poly-U
	Poly-A + Poly-I + Poly-I
	Poly-I + Poly-I + Poly-I

Tabelle 5. Zwei- und drei-strangige Polyribonucleotid-Komplexe

<sup>33b)</sup> Dr. Rich danke ich für die Erlaubnis, diese Abbildungen zu verwenden.

<sup>34)</sup> J. R. Fresco u. P. Doty, J. Amer. chem. Soc. 79, 3928 [1957]; J. R. Fresco u. E. Klemperer, Ann. N.Y. Acad. Sci. 81, 730 [1959].

Diese Untersuchungen sind für das Verständnis der physikochemischen Umwandlungen, denen die DNS bei der Zellteilung unterliegt, von Bedeutung. Die beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Polynucleotid-Ketten können ebenso eine Rolle im biologischen Verhalten der RNS spielen. Da es zuverlässige Anzeichen dafür gibt, daß die genetische Information von der DNS zuerst auf RNS übertragen wird, nimmt man an, daß DNS als Matrize für die RNS-Synthese wirkt. Dabei könnten Ribonucleotide im Hohlraum einer zwei-strangigen DNS-Molekel schrittweise zu einer Polynucleotid-Kette zusammengefügt werden, so daß schließlich eine drei-strangige Helix entsteht. Oder aus einer einstrangigen DNS-Matrize könnte sich eine zwei-strangige DNS-RNS-Helix bilden<sup>35-37</sup>).

<sup>35</sup>) G. Stent, *Advances in Virus Research* 5, 138 [1958].

<sup>36</sup>) G. Zubay, *Nature [London]* 182, 1290 [1958].

<sup>37</sup>) A. Rich, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 81, 709 [1959].

Die Arbeiten Kornbergs und seiner Mitarbeiter<sup>38</sup>) haben uns einen tiefen Einblick in die Vorgänge bei der DNS-Reduplikation gegeben, und vielleicht gelingt es in nicht allzu ferner Zukunft, genetisches Material im Reagensglas zu synthetisieren. Da RNS die genetische Substanz einiger Viren ist, können die hier beschriebenen Untersuchungen den Weg ebnen für eine künstliche Synthese biologisch aktiver Virus-RNS und der Viren selbst. Viren stehen an der Schwelle des Lebens, und es scheint, daß sie uns dazu verhelfen können, einige seiner wichtigsten Prinzipien besser zu verstehen.

Übersetzt von Dr. H. Grünewald, Heidelberg

Eingegangen am 18. Januar 1960 [A 25]

<sup>38</sup>) A. Kornberg, *Angew. Chem.* 72, 231 [1960].

## Die biologische Synthese von Desoxy-ribonucleinsäure (DNS)

### Nobel-Vortrag am 11. Dezember 1959\*)

Von Prof. Dr. ARTHUR KORNBERG

Stanford University, School of Medicine, Stanford, California (USA)

Die enzymatische Reduplikation von Desoxy-ribonucleinsäure (DNS) und die Eigenschaften eines aus *Escherichia coli* gewonnenen, DNS-synthetisierenden Enzyms werden beschrieben. Das Enzym katalysiert die Bildung neuer DNS-Ketten, deren Zusammensetzung durch eine DNS-Matrize bestimmt wird. Dies geschieht, indem sich zwischen den Basen der Matrize und den komplementären Basen der als Substrate dienenden Nucleosid-triphosphate Wasserstoff-Brücken bilden. Komplementäre Basen-Paare sind Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin. Folgende Befunde bilden die experimentelle Grundlage dieser Vorstellungen: 1. Eine ein-strangige Matrize führt zur Bildung zwei-strangiger DNS. — 2. Nucleotide, die Analoga der natürlichen Purin- und Pyrimidin-Basen enthalten, können nur ganz bestimmte, natürliche Nucleotide ersetzen. — 3. Die chemische Zusammensetzung wird redupliziert. — 4. Die Dinucleotid-Sequenzen werden redupliziert, und es entstehen zwei DNS-Stränge mit entgegengesetzter Basen-Sequenz. — 5. Die DNS-Synthese gelingt nur, wenn die Triphosphate aller vier Desoxy-nucleoside (Thymin, Desoxy-adenosin, -guanosin und -cytidin) sowie etwas DNS anwesend sind.

Die Kenntnisse, die wir in den letzten Jahren durch die Untersuchung der bakteriellen Transformation<sup>1</sup>) und der Virus-Infektion von Bakterien-Zellen<sup>2</sup>) gewonnen haben, sprechen zusammen mit anderen Befunden<sup>3</sup>) überzeugend dafür, daß Desoxy-ribonucleinsäure (DNS) die genetische Substanz ist. Wir wollen also annehmen, daß DNS nicht nur die Synthese der Proteine und die Entwicklung der Zelle lenkt, sondern daß sie auch diejenige Substanz ist, die identisch vervielfältigt werden muß, damit sich die Nachkommenschaft einer Zelle über viele Generationen wieder in gleicher Weise entwickelt. Wie eine Tonband-Aufnahme enthält die DNS eine Botschaft mit ganz bestimmten Anweisungen, welche Arbeiten getan werden sollen. Und wie von einer Tonband-Aufnahme können von den DNS-Molekeln exakte Kopien hergestellt werden, so daß die in ihnen verborgene Information zu einer anderen Zeit und an einem anderen Ort wieder wirksam werden kann.

Sind diese beiden Funktionen — Realisierung der genetischen Information (Protein-Synthese) und ihre Vervielfältigung (Erhaltung der Rasse) — eng miteinander verknüpft oder lassen sie sich trennen? Aus unseren Arbeiten während der letzten fünf Jahre geht hervor, daß man die Reduplikation der DNS untersuchen und durch Zerlegung in enzymatisch katalysierte Reaktions-Schritte wenigstens teilweise verstehen kann, obwohl das Geheimnis der DNS-gesteuerten Protein-Synthese noch in der Zelle verschlossen liegt.

#### DNS-Struktur

Zunächst seien einige Merkmale der DNS-Struktur beschrieben, die für unsere weiteren Überlegungen wichtig sind. Analysen von DNS-Proben aus den verschiedensten Quellen und in vielen Laboratorien<sup>4</sup>) hatten das bemerkenswerte Ergebnis, daß der Purin-Gehalt stets gleich dem Pyrimidin-Gehalt ist. Unter den Purinen kann das Verhältnis Adenin:Guanin beträchtlich variieren, ebenso unter den Pyrimidinen das Verhältnis Thymin:Cytosin. Aber die Zahl der Basen mit einer Amino-Gruppe in Stellung 6 des Ringes (Adenin, Cytosin) entspricht der Zahl der Basen mit einer Keto-Gruppe in 6-Stellung (Guanin, Thymin). Watson und Crick<sup>5</sup>) leiteten aus diesen Befunden ihre meisterhafte Hypothese über die DNS-Struktur ab. Wie

\*) Das liebenswürdige Entgegenkommen des Nobel-Komitees, Stockholm, hat es uns ermöglicht, diesen Nobel-Vortrag, der erst später in den Veröffentlichungen des Nobel-Komitees erscheinen wird, schon jetzt zu bringen.

<sup>1</sup>) O. T. Avery, C. M. MacLeod u. M. McCarty, *J. exp. Medicine* 79, 137 [1944]; R. D. Hotchkiss in W. D. McElroy u. B. Glass: *The Chemical Basis of Heredity*. Johns Hopkins Press, Baltimore 1957, S. 321.

<sup>2</sup>) A. D. Hershey, *Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol.* 18, 135 [1953].

<sup>3</sup>) G. W. Beadle in W. D. McElroy u. B. Glass: *The Chemical Basis of Heredity*. Johns Hopkins Press, Baltimore 1957, S. 3.

<sup>4</sup>) E. Chargaff in E. Chargaff u. J. N. Davidson: *Nucleic Acids*, Academic Press, New York 1955, Bd. I, S. 307–371.

<sup>5</sup>) J. D. Watson u. F. H. C. Crick, *Nature [London]* 171, 737 [1953]; *Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol.* 18, 123 [1953].