

jetzt erzielten und eigentlich unerwarteten Erfolge der Röntgenanalyse von Nucleinsäuren und Proteinen geben zum Optimismus guten Grund.

## Dank

Während der vergangenen zwölf Jahre haben mir beim Studium der Nucleinsäure-Struktur so viele Menschen geholfen, daß es unmöglich wäre, ihnen allen hier in gerechter Weise Anerkennung zuteil werden zu lassen. Ich muß jedoch einigen ausdrücklich danken:

Sir *John Randall* für seine seit langem gewährte Hilfe und Ermutigung sowie für seine Voraussicht und Energie beim Aufbau und bei der Leitung eines einzigartigen Instituts;

allen meinen Mitarbeitern zu verschiedenen Zeiten der vergangenen zwölf Jahre: zuerst *Raymond Gosling*, *Alex Stokes*, *Bill Seeds* und *Herbert Wilson*; dann *Bob Langridge*, *Clive Hooper*, *Max Feughelman*, *Don Marvin* und *Geoffrey Zubay*; und jetzt *Michael Spencer*, *Watson Fuller* und *Struther Arnott*. Sie alle haben mit viel Geschick, Fähigkeit und Geduld (oft bis in die Nacht hinein) die Röntgenanalysen, die Modellkonstruktionen und die Berechnungen ausgeführt;

meiner verstorbenen Kollegin *Rosalind Franklin*, die mit großem Geschick und großer Erfahrung in der Röntgenanalyse zu den ersten Untersuchungen an der DNS so viel beigetragen hat; *Leonard Hamilton* für seine ständige Ermutigung und freundliche Zusammenarbeit und dafür, daß er uns mit DNS von hoher Qualität in vielen Formen und aus vielen Quellen versorgte;

*Geoffrey Brown* für moralische und geistige Unterstützung während der vergangenen fünfzehn Jahre und für die Herstellung von RNS für Röntgenanalysen; *Hariett Ephrussi-Taylor* für die Zusammenarbeit bei der Kristallisation des transformierenden Prinzips; den Laboranten, Mechanikern und Photographen, unter ihnen *P. J. Cooper*, *N. Chard*, *J. Hayward*, *Mrs. F. Collier*, *Z. Gabor* und *R. Lerner*, für ihren wertvollen Anteil an der Arbeit in vielen Stadien.

Außerdem möchte ich danken:

dem Medical Research Council für seine weitsichtige und ständige Unterstützung unserer Arbeit; dem King's College als unserer Basis; I.B.M. United Kingdom Limited und I.B.M. World Trade Corporation sowie der London University Computer Unit für ihre Hilfe bei den Berechnungen; der Rockefeller Foundation und The British Empire Cancer Campaign für finanzielle Unterstützung; dem Sloan Kettering Institute, New York, und der Stazione Zoologica, Neapel, für Arbeitsmöglichkeiten.

Ein mehr allgemeiner Dank gebührt:

*Francis Crick* und *Jim Watson* für anregende Diskussionen; *Norman Simmons* für die Verfeinerung der Verfahren zur Isolierung von DNS, womit er vielen, darunter auch uns, geholfen hat; und ganz besonders *Erwin Chargaff*, der durch seine analytischen Arbeiten und die Entdeckung der gleichen Basenverhältnisse in der DNS die Grundlage für die Strukturuntersuchung der DNS geschaffen hat und der uns Neulingen auf dem Nucleinsäure-Gebiet großzügig half.

Eingegangen am 21. Januar 1963 [A 296]

Übersetzt von Dr. H. Grünewald, Heidelberg

## Die Beteiligung der Ribonucleinsäure an der Proteinsynthese

Nobel-Vortrag am 11. Dezember 1962 [\*]

VON PROF. DR. J. D. WATSON

BIOLOGICAL LABORATORIES, HARVARD UNIVERSITY,  
CAMBRIDGE, MASS. (USA)

## Prolog

Ich kam im Herbst 1951 nach Cambridge. *Luria* hatte mir die Zusammenarbeit mit *John Kendrew* vermittelt, obwohl mein Interesse vorher vor allem der Genetik gegolten hatte. Aber ich war der Experimente mit Phagen überdrüssig geworden und wollte mehr über die Struktur der Moleküle wissen, von denen die Genetiker so leidenschaftlich sprachen. Außerdem brauchte *John* [\*\*]

[\*] Wir danken dem Autor und dem Nobel-Komitee, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieses Vortrags.

[\*\*] Anmerkung des Übersetzers: Der deutsche Text folgt dem englischen, in dem, amerikanischer Gewohnheit entsprechend, hier und an anderen Stellen nur der Vorname gebraucht wird.

einen Mitarbeiter und hoffte, daß ich ihm bei der Röntgenanalyse des Myoglobins helfen könnte. So wurde ich research student am Clare College, und meine Arbeiten standen unter *Johns* Aufsicht.

Aber schon bald nachdem ich das Cavendish-Laboratorium betreten hatte, wußte ich innerlich, daß ich für *John* nie eine große Hilfe sein würde. Ich hatte nämlich begonnen, mit *Francis Crick* zu diskutieren. Vielleicht hätte mich das Myoglobin auch ohne *Francis* rasch gelangweilt, aber mit ihm als Gesprächspartner war mein Schicksal besiegelt. Wir entdeckten bald, daß wir

über biologische Fragen in gleicher Weise dachten. Mittelpunkt der Biologie war das Gen und die von ihm ausgeübte Kontrolle über den Zellstoffwechsel, und als Hauptproblem galt das Verständnis der Gen-Reduplikation und der Art, in der Gene die Proteinsynthese lenken. Ganz offensichtlich konnten diese Fragen nur angegangen werden, wenn die Struktur des Gens bekannt war. Und das lief auf die Bestimmung der DNS-Struktur [\*\*\*] hinaus. Dieses Ziel schien den Genetikern damals jenseits des Erreichbaren zu liegen. Aber wir in unserem kalten, dunklen Cavendish-Laboratorium hielten die Aufgabe durchaus für lösbar, möglicherweise innerhalb einiger Monate. Unser Optimismus gründete sich zum Teil auf *Paulings* Kunststück [1], die  $\alpha$ -Helix der Proteine großenteils mit Hilfe derjenigen Regeln der theoretischen Chemie abzuleiten, die er in seinem klassischen Buch „The Nature of the Chemical Bond“ so überzeugend dargelegt hatte. Wir wußten außerdem, daß *Maurice Wilkins* Röntgenaufnahmen kristalliner DNS besaß und daß diese Substanz daher eine definierte Struktur haben mußte. Es gab also eine Antwort, und es galt sie zu finden.

Während der nächsten achtzehn Monate – so lange dauerte es, bis die Struktur der Doppelhelix deutlich wurde – sprachen wir oft über die Notwendigkeit, daß die richtige Struktur die Fähigkeit zur Selbst-Reduplikation haben müsse. Und in pessimistischer Stimmung befürchteten wir, die richtige Struktur könne ausdruckslos sein, d. h. keine weiteren Folgerungen zulassen und uns ebenso wenig anregen wie irgendeine inerte Substanz, z. B. Kollagen.

Die Entdeckung der Doppelhelix [2] brachte uns daher nicht nur Freude, sondern auch große Erleichterung. Sie war unvollstellbar interessant und ermöglichte sogleich einen ernsthaften Vorschlag [3] für den Mechanismus der Gen-Reduplikation. Dieses Reduplikationschema beruhte auf durchaus bekannten, konventionellen chemischen Kräften. Einige theoretische Physiker, unter ihnen *Pascual Jordan* [4], hatten früher erwogen, daß an vielen biologischen Phänomenen, insbesondere an der Gen-Reduplikation, weitreichende Kräfte beteiligt sein könnten, die aus quantenmechanischen Resonanzwechselwirkungen entstehen sollten. *Pauling* [5] schätzte diese Annahmen ganz und gar nicht und bestand darauf, daß bekannte Kräfte geringer Reichweite

zwischen komplementären Oberflächen auch die Basis der biologischen Reduplikation bilden müßten.

Die Klärung der DNS-Struktur bestätigte unser Vertrauen in *Paulings* Argumente und zeigte, daß weitreichende Kräfte oder irgendwelche mystischen Dinge an der Proteinsynthese nicht beteiligt sind. Aber für eine Theorie der Proteinsynthese gab die DNS-Struktur allein keine Grundlage. Das betrückte uns jedoch nicht, denn es gab die Hypothese, daß RNS, nicht DNS, an der Proteinsynthese teilnehmen sollte.

## Einleitung

Die Vorstellung, daß RNS bei der Proteinsynthese eine Rolle spielt, geht über 20 Jahre zurück auf die bahnbrechenden Arbeiten von *Brachet* und *Caspersson* [6]. Sie zeigten, daß Protein synthetisierende Zellen viel RNS enthalten. Als später radioaktive Aminosäuren zugänglich wurden, fand man [7], daß das Protein in der Zelle an den Mikrosomen gebildet wird, die zum großen Teil aus kugelförmigen, RNS-reichen Partikeln bestehen. Weitere Versuche [8] ergaben, daß die Peptidbindungen an diesen Ribonucleoprotein-Partikeln (heute Ribosomen genannt) entstehen und nicht an den Lipoprotein-Membranen, an die sie oft gebunden sind. Die meisten Ribosomen findet man im Cytoplasma, und daher geht die zelluläre Proteinsynthese überwiegend ohne die direkte Mitwirkung der DNS vor sich, die im Zellkern sitzt. Damit bestand die Möglichkeit, daß die in der DNS enthaltene genetische Spezifität erst auf RNS übertragen wird, und daß diese dann als Matrize für den Zusammenbau der Aminosäuren zu Proteinen wirkt.

Wir konnten diese Hypothese präziser formulieren, als 1953 die Struktur der DNS bekannt geworden war. Es zeigte sich nämlich, daß die genetische Spezifität der DNS in den Basen-Sequenzen längs der beiden komplementären miteinander verzweigten Polynucleotidketten beschlossen ist. Eine oder beide dieser komplementären Ketten mußte als Matrize für die Synthese von RNS-Molekeln dienen, in denen wiederum die Basen-Sequenz die genetische Information enthält. Diese RNS-Molekeln sollten dann – so glaubten wir – dreidimensionale Konfigurationen annehmen, deren Oberflächen den Seitenketten der 20 Aminosäuren komplementär wären.

## 1. Röntgenuntersuchungen an RNS und RNS-enthaltenden Viren

Der direkte Weg zur Prüfung dieser Hypothese war, die RNS-Struktur zu klären. Schon 1952 hatte ich erste Röntgenaufnahmen der RNS angefertigt. Sie waren aber sehr diffus. Erst im Herbst 1953, nach meiner Rückkehr

[\*\*\*] Folgende Abkürzungen werden verwendet:

DNS = Desoxyribonucleinsäure  
RNS = Ribonucleinsäure  
IRNS = lösliche Ribonucleinsäure  
TMV = Tabakmosaikvirus  
ATP = Adenosintriphosphat  
AMP = Adenosinmonophosphat  
GTP = Guanosintriphosphat  
GDP = Guanosindiphosphat  
GMP = Guanosinmonophosphat

[1] *L. Pauling* u. *R. B. Corey*, Proc. nat. Acad. Sci. USA 37, 235 (1951).

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

[3] *J. D. Watson* u. *F. H. C. Crick*, Nature (London) 171, 964 (1953).

[4] *P. Jordan*, Physik. Z. 39, 711 (1938); siehe auch *H. J. Muller*, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B, 1947.

[5] Vgl. *L. Pauling* u. *M. Delbrück*, Science (New York) 92, 77 (1940).

[6] *J. Brachet*, Arch. Biol. (Liège) 53, 207 (1942); *T. Caspersson*, Naturwissenschaften 28, 33 (1941).

[7] *H. Borsook*, *C. L. Deasy*, *A. J. Hagen-Smit*, *G. Keighley* u. *P. H. Lowy*, J. biol. Chemistry 187, 839 (1950); *T. Hultrén*, Exp. Cell Res. 1, 376 (1950).

[8] *J. W. Littlefield*, *E. B. Keller*, *J. Gross* u. *P. C. Zamecnik*, J. biol. Chemistry 217, 111 (1955); *V. G. Allfrey*, *M. M. Daly* u. *A. E. Mirsky*, J. gen. Physiol. 37, 157 (1953).

in die USA, begannen wir ernsthaft mit der Röntgenanalyse der RNS. *Alexander Rich* und ich, damals beide am California Institute of Technology, untersuchten RNS-Proben verschiedener Herkunft. Es ermutigte uns [9] sehr, daß alle Proben, einerlei woher sie kamen, ähnliche Beugungsbilder gaben. Es mußte also eine allgemeine RNS-Struktur existieren, und das gab uns die Hoffnung, daß diese Struktur – einmal geklärt – interessant sein würde. Schon unsere ersten Bilder zeigten das systematische Fehlen von Meridian-Reflexen und sprachen damit für eine spiralförmige Struktur. Aber trotz vieler Anstrengungen, native, nicht abgebaute RNS mit hohem Molekulargewicht zu gewinnen, kamen wir nicht zu befriedigenden Beugungsbildern.

Die Reflexe waren stets diffus, man erkannte kein Anzeichen einer Kristallinität, und obwohl es deutliche Ähnlichkeiten mit den Beugungsbildern der DNS gab, hatten wir keinen sicheren Grund zu der Annahme, daß diese Ähnlichkeiten auf ähnlich gebaute Helices zurückzuführen wären. Die Frage, ob eine RNS-Molekel aus einer oder mehreren Ketten besteht, blieb also unbeantwortet.

Wir erwogen dann die Möglichkeit, daß RNS nur in Kombination mit Protein eine regelmäßige Struktur haben könnte. Man hatte damals (1955) noch keinen rechten Beweis für die Existenz proteinfreier RNS. Vielmehr nahm man an, daß RNS nur als Komponente von Viren oder zusammen mit Protein in Ribonucleoprotein-Partikeln existiere. Es erschien also logisch, die Aufmerksamkeit den Ribonucleoprotein-Partikeln (den Ribosomen) zuzuwenden, um so mehr, als an ihrer Oberfläche Proteine synthetisiert werden. Wir hofften wieder, daß die Struktur der Ribosomen die lange gesuchten, für Aminosäuren spezifischen „Höhlen“ erkennen lassen würde.

Uns überraschte die morphologische Ähnlichkeit zwischen Ribosomen und kleinen RNS-haltigen Viren, wie dem Turnip Yellow Mosaic Virus oder dem Poliomyelitis-Virus. Ich war damals (1955–1956) wieder in Cambridge, um gemeinsam mit *Crick* einige Prinzipien der Virusstruktur zu formulieren [10]. Unser Gedanke war, daß der begrenzte Nucleinsäure-Gehalt der Viren nur die Chiffrierung einer begrenzten Zahl von Aminosäuren ermöglichen könne. Infolgedessen sollte die Proteinhülle nicht aus vielen verschiedenartigen Proteinen bestehen, sondern aus einigen kleinen, untereinander gleichen und regelmäßig angeordneten Protein-Untereinheiten. Diese Vorstellung war beim stäbchenförmigen Tabakmosaikvirus schon bestätigt worden. *D. L. D. Caspar* [11], der damals mit uns im Cavendish-Laboratorium arbeitete, erhielt zu unserer Freude von Bushy-Stunt-Virus-Kristallen sehr schöne Beugungsbilder und konnte experimentelle Beweise für die Richtigkeit unserer Gedanken auch bei den kugelförmigen Viren erbringen.

[9] *A. Rich* u. *J. D. Watson*, *Nature* (London) 173, 995 (1954); *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 40, 759 (1954).

[10] *F. H. C. Crick* u. *J. D. Watson*, *Nature* (London) 177, 473 (1956); *Ciba Foundation Symposium „The Nature of Viruses“* (1957).

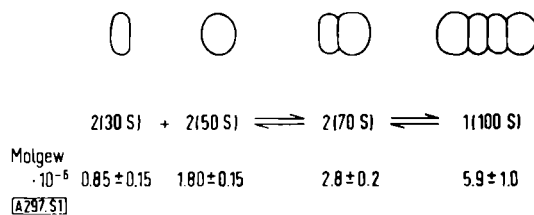
[11] *D. L. D. Caspar*, *Nature* (London) 177, 475 (1956).

## 2. Strukturuntersuchungen an Ribosomen

Die Struktur der Ribosomen war damals noch fast gar nicht untersucht worden. Zu ihrer Charakterisierung dienten vor allem die Sedimentationskonstanten, die für Ribosomen höherer Organismen [12] zwischen 70 und 80 S liegen. Bakterielle Ribosomen [13] schienen kleiner zu sein und in zwei Größen mit Sedimentationskonstanten von 30 und 50 S aufzutreten. Wegen ihrer Kleinheit sollten sich die bakteriellen Partikel für Strukturuntersuchungen besonders eignen. Als *Alfred Tissières* und ich 1956 in die biologischen Laboratorien der Harvard-Universität kamen, begannen wir daher die Ribosomen des schon vielfältig studierten Bakteriums *Escherichia coli* zu erforschen. Wir hofften, daß ihre Struktur der kleiner kugelförmiger RNS-Viren ähneln würde. Dann hätte vielleicht die Möglichkeit bestanden, sie zu kristallisieren und mit Hilfe der Röntgenanalyse ein dreidimensionales Bild ihrer Struktur zu gewinnen.

### a) Ribosomen-Untereinheiten

Von Anfang an zeigten unsere Versuche aber, daß die Struktur der Ribosomen komplizierter ist als die RNS-haltiger Viren. Je nach der Konzentration zweiwertiger Kationen (wir verwendeten stets  $Mg^{2+}$ ) fanden wir vier Sorten *E.coli*-Ribosomen mit Sedimentationskonstanten von 30, 50, 70 und 100 S. Zunächst beobachteten wir bei  $10^{-4}$  M  $Mg^{2+}$  30-S- und 50-S-Ribosomen. Zur gleichen Zeit entdeckte *Bolton* [14] am Carnegie Institute of Washington bei höheren  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen rascher sedimentierende Ribosomen und nahm an, es handle sich um Aggregate der kleineren Teilchen. Bald danach konnten wir zeigen [15], daß sich bei steigender  $Mg^{2+}$ -Konzentration ein 30-S- und ein 50-S-Teilchen zu einem 70-S-Ribosom vereinigen, und daß bei noch höheren  $Mg^{2+}$ -Gehalten zwei 70-S-Ribosomen zu einem 100-S-Ribosomen dimerisieren (Schema 1 und Abb. 1).



Schema 1. Skizze der Untereinheiten von *E.coli*-Ribosomen und ihrer Aggregate. Die Molgewichte stammen aus einer Arbeit von *Tissières* et al. [15]. Alle Teilchen bestehen aus 64 % RNS und 36 % Protein.

[12] *M. L. Petermann* u. *M. G. Hamilton*, *J. biol. Chemistry* 224, 725 (1957); *P. Tso*, *J. Bonner* u. *J. Vinograd*, *J. biophysic. biochem. Cytol.* 2, 451 (1956).

[13] *H. K. Schachman*, *A. B. Pardee* u. *R. Y. Stanier*, *Arch. Biochem. Biophysics* 38, 245 (1952).

[14] *E. T. Bolton*, *B. H. Hoyer* u. *D. B. Ritter*: *Microsomal Particles and Protein Synthesis*. Pergamon Press, New York 1958, S. 18.

[15] *A. Tissières* u. *J. D. Watson*, *Nature* (London) 182, 778 (1958), *A. Tissières*, *J. D. Watson*, *D. Schlessinger* u. *R. B. Hollingworth*, *J. molecular Biol.* 1, 221 (1959); *C. E. Hall* u. *H. S. Slayeter*, *ibid.* 1, 329 (1959); *H. E. Huxley* u. *G. Zubay*, *ibid.* 2, 10 (1960).

Ribosomen – einerlei welchen Ursprungs – sind stets ähnlich aus Untereinheiten zusammengesetzt. Und stets bestimmt die Konzentration zweiwertiger Kationen, welche Ribosomen vorherrschen. Bakterielle Ribosomen brauchen höhere  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen, um zu größeren Einheiten zu aggregieren. Entsprechend fallen sie

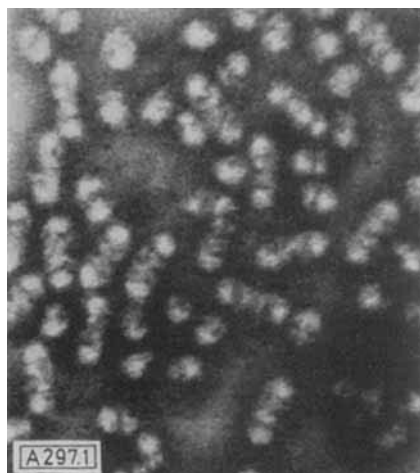


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme negativ gefärbter *E. coli*-Ribosomen (nach Huxley und Zubay [15]). Zwei Partikelarten überwiegen: 70-S-Partikel, die aus zwei Untereinheiten verschiedener Größe bestehen, und 100-S-Partikel, die sich aus zwei an ihren kleineren (30-S)-Untereinheiten aneinandergefügt 70-S-Partikeln zusammensetzen.

viel schneller wieder in 30-S- und 50-S-Teilchen auseinander, wenn der  $Mg^{2+}$ -Gehalt abnimmt. Bei Säugetier-Ribosomen ist es oft zweckmäßig [16], einen Komplexbildner zuzufügen, um die 80-S-Ribosomen (die den bakteriellen 70-S-Ribosomen entsprechen) in ihre 40-S- und 60-S-Untereinheiten zu zerlegen. Bakterielle Ribosomen sind also nicht wesentlich kleiner als die der Säugetiere. Es ist in bakteriellen Systemen lediglich einfacher, die kleinen Untereinheiten zu beobachten.

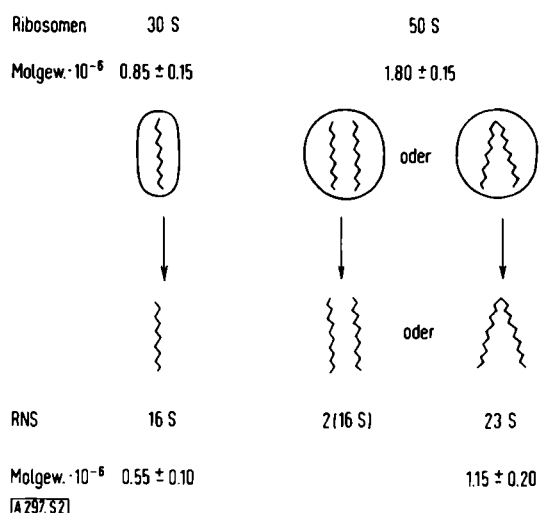
## b) Ribosomen-RNS

Schon 1958 gab es mehrere Veröffentlichungen [17], aus denen hervorging, daß die RNS der Ribosomen in zwei deutlich verschiedenen Komponenten (18 S und 28 S) sedimentiert. Uns schien, daß die leichtere Komponente aus den kleineren, die schneller sedimentierende aus den größeren Untereinheiten stammen könnte. Versuche von C. G. Kurland [18] bestätigten diese Vermutung sehr rasch: Die 30-S-Ribosomen von *E. coli* enthalten eine RNS-Kette (16 S) mit einem Molekulargewicht von  $5,5 \times 10^5$ , während man in den meisten 50-S-Ribosomen eine größere RNS-Molekel (23 S) mit einem Molekulargewicht von  $1,1 \times 10^6$  findet (Schema 2).

[16] H. Lamfrom u. E. R. Glowacki, J. molecular Biol. 5, 97 (1962); P. Tso u. J. Vinograd, Biochim. biophysica Acta 49, 113 (1961).

[17] B. Hall u. P. Doty, J. molecular Biol. 1, 111 (1959); U. Z. Littauer u. H. Eisenberg, Biochim. biophysica Acta 32, 320 (1959); S. M. Timasheff, A. Brown, J. S. Colter u. M. Davies, ibid. 27, 662 (1958).

[18] C. G. Kurland, J. molecular Biol. 2, 83 (1960).



Schema 2. Molekulargewichte der aus *E. coli*-Ribosomen isolierten RNS. Das Schema soll nicht die Konformation der Ribosomen-RNS wiedergeben.

## c) Ribosomen-Proteine

Die Analyse der Protein-Komponente ergab ein sehr viel komplizierteres Bild. Im Gegensatz zu den kleinen RNS-Viren, deren Proteinhülle durch die regelmäßige Anordnung vieler gleichartiger Protein-Molekeln entsteht, enthält jedes Ribosom wahrscheinlich viele verschiedenartige Polypeptidketten. Zunächst sprach allerdings die Analyse der aminoendständigen Reste in *E. coli*-Ribosomen (J. P. Waller und J. I. Harris) für das Vorliegen einfacher Verhältnisse: im wesentlichen ließen sich nur Alanin, Methionin und kleinere Mengen Serin nachweisen. Daraus schien zu folgen, daß am Bau des Ribosoms nur wenige Proteinarten beteiligt sind. Weitere Versuche von Dr. Waller [19] ergaben dann aber das Gegenteil: zerlegte man Proteinfractionen aus Ribosomen durch Stärkegel-Elektrophorese, so traten mehr als 20 Banden auf. Fast alle diese Proteine wanderten bei pH = 7 zur Anode, was die negative Gesamtladung des Ribosomen-Proteins [20] bestätigte. Mehrere Kontrollversuche zeigten, daß die Banden voneinander verschiedene Proteine repräsentierten und nicht Aggregaten gleichartiger Untereinheiten zuzuordnen waren. Außerdem unterschied sich das Elektrophorogramm der 30-S-Ribosomen radikal von dem der 50-S-Teilchen. Bisher haben wir noch keinen sicheren Beweis dafür, daß jedes 70-S-Ribosom alle Proteinarten der 30-S- und 50-S-Ribosomen enthält. Es ist Dr. Waller aber auch noch nicht gelungen, intakte 70-S-Ribosomen chromatographisch in Fraktionen mit unterschiedlichem Elektrophorogramm zu zerlegen. Ein 70-S-Ribosom enthält etwa  $9 \times 10^5$  Atomgewichtseinheiten Protein. Aus der Endgruppenbestimmung errechnet man pro Proteineinheit ein durchschnittliches Molekulargewicht von  $3 \times 10^5$ . Danach sollten die 50-S-Ribosomen ungefähr 20 Polypeptidketten, die 30-S-Teilchen etwa 10 enthalten. Möglicherweise sind alle Polypeptidketten der 30-S-Ribosomen verschieden. Dr. Waller hat in den 30-S-

[19] J. P. Waller u. J. I. Harris, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 18 (1961).

[20] P. F. Spahr, J. molecular Biol. 4, 395 (1962).

Ribosomen 10 verschiedene Komponenten nachweisen können. Daß sich in den 50-S-Ribosomen nicht mehr Komponenten beobachten lassen, ist unter Umständen dadurch zu erklären, daß mehrere Polypeptide die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit haben.

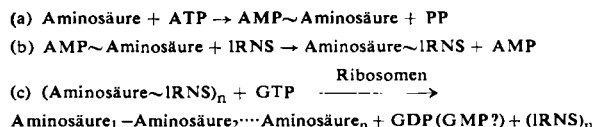
Wahrscheinlich haben diese Proteine zum großen Teil oder sogar gänzlich vorwiegend strukturelle Funktionen, d. h. sie sind keine Enzyme, sondern dienen vor allem dazu, die Ribosomen-RNS und notwendige Zwischenprodukte in einer für die Bildung der Peptidbindung günstigen Lage zu halten. Einige Enzyme sind außerdem fest an die Ribosomen gebunden. Ihre Funktion ist noch unklar. Unter ihnen befindet sich eine bakterielle Ribonuclease, die nach *Elson* [21] in latenter Form an die 30-S-Ribosomen gebunden ist. Eine Ribonuclease-Aktivität ist erst nachweisbar, wenn die Ribosomen zerfallen. Dr. *Spahr* [22] in unserem Laboratorium hat das Enzym gereinigt, seine Spezifität untersucht und aus Messungen der spezifischen Aktivität abgeleitet, daß nicht einmal jedes zwanzigste 30-S-Ribosom das Enzym trägt. Es ist klar, daß die freie, aktive Form des Enzyms für die Zelle tödlich wäre. Sein Auftreten in latenter Form ist daher verständlich. Warum es aber an den Ribosomen sitzt, ist noch ein vollkommenes Rätsel.

### 3. Zwischenprodukte bei der Proteinsynthese

Unsere ersten Untersuchungen an Ribosomen standen kaum in Beziehung zu den Bemühungen der Biochemiker. Die Ziele schienen damals sehr verschieden. Die enzymologisch orientierten Biochemiker suchten nach den Zwischenprodukten und den Enzymen, die an der Bildung der Peptidbindung beteiligt sind. Wir mit unserer genetischen Fragestellung wollten die Matrize der Peptidsynthese finden und wissen, wie sie die jeweils richtige Aminosäure herausucht. Sehr bald aber kamen diese Wege zusammen, teils weil die Natur der Aminosäure-Zwischenprodukte erkannt worden war, teils durch einen einschneidenden Gedanken *Cricks*.

Die biochemischen Fortschritte kamen zum großen Teil aus *Paul Zamecniks* [23] Laboratorium im Massachusetts General Hospital. Dort war ein reproduzierbares in-vitro-System entwickelt worden, das Ribosomen, Faktoren aus dem Überstand und ATP enthielt und Aminosäuren in Protein einbaute. Mit diesem System gelangen *Hoagland* zwei bedeutende Entdeckungen: er zeigte [24], daß Aminosäuren zunächst durch ATP unter Bildung energiereicher Aminosäure-AMP-Komplexe aktiviert werden und [25] daß sie aus diesen Komplexen auf RNS-Molekeln geringen Molekulargewichtes [heute als lösliche RNS oder als Überträger-(transfer)-RNS bezeichnet] übertragen werden. Es entstehen Aminoacyl-IRNS-Verbindungen, in denen die Amino-

säuren gleichfalls in aktivierter Form vorliegen. Sie sind die Zwischenprodukte der Peptidbildung (Schema 3).



Schema 3. Stufen bei der enzymatischen Bildung einer Peptidbindung. Die Schritte (a) und (b) werden je durch ein einzelnes Enzym katalysiert. Die Zahl der für Reaktion (c) erforderlichen Enzyme ist unbekannt.

Es war schon früher klar gewesen, daß die Aminosäuren aktiviert werden müssen. Dennoch kam *Hoaglands* zweite Entdeckung (1956), daß eine bis dahin unbekannt gebliebene Form der RNS, die lösliche RNS, an der Aktivierung beteiligt ist, fast gänzlich unerwartet. Einige Jahre früher (1954) hatten *Leslie Orgel* und ich einen Herbst lang vergeblich versucht, RNS-Strukturen mit Höhlen zu entwerfen, in die die Seitenketten der Aminosäuren hineinpassen sollten. Nicht nur ergaben plausible Konfigurationen der RNS-Kette keine brauchbaren Höhlen; es war selbst bei Vernachlässigung der Konfiguration der Kette nicht möglich, überzeugende Höhlen zu finden, die ähnliche Aminosäuren, wie Valin und Isoleucin, wirksam hätten unterscheiden können. *Crick* sah (Anfang 1955) das gleiche Dilemma und schlug für dieses gedankliche Paradox eine radikale Lösung vor [26]: die Aminosäuren sollten sich nicht mit der Matrize verbinden, sondern vielmehr mit einem spezifischen „Zwischenstück“, das in der Lage wäre, mit den Purin- und Pyrimidinbasen an der RNS-Oberfläche durch Wasserstoffbrücken in Wechselwirkung zu treten. Dieses Schema erforderte mindestens zwanzig verschiedene „Zwischenstücke“, deren jedes für eine Aminosäure spezifisch sein mußte, und die sich dann in Form der IRNS nachweisen ließen. Bald nach *Hoaglands* Entdeckung der IRNS zeigten besonders *Hoagland* und *Paul Berg* [27] durch zahlreiche Versuche die Aminosäure-Spezifität der IRNS. Damit wurde es möglich, sich entsprechend *Cricks* Überlegungen vorzustellen, daß sich nicht die Seitenketten der Aminosäuren, sondern spezifische Basengruppierungen im RNS-Teil der Aminoacyl-IRNS-Verbindungen an die in den Ribosomen enthaltenen Matrizen für die Proteinsynthese anlagern.

### 4. Beteiligung aktiver Ribosomen an der Proteinsynthese

Das zellfreie System, das die Arbeitsgruppe am Massachusetts General Hospital entwickelt hatte, synthetisierte nur sehr wenig Protein. Nur mit radioaktiv markierten Substanzen ließ sich der Einbau von Aminosäuren in Protein überzeugend nachweisen. Dies erschien zunächst unwichtig, denn es bestand die Hoffnung, daß verbesserte Bedingungen eine auch ohne radioaktive Markierung sichtbare Proteinsynthese ergeben würden. Aber

[21] D. Elson, *Biochim. biophysica Acta* 27, 216 (1958); 36, 372 (1959).

[22] P. F. Spahr u. B. R. Hollingworth, *J. biol. Chemistry* 236, 823 (1961).

[23] J. W. Littlefield, E. B. Keller, J. Gross u. P. C. Zamecnik, *J. biol. Chemistry* 217, 111 (1955); J. W. Littlefield u. E. B. Keller, *ibid.* 224, 13 (1957); P. C. Zamecnik u. E. B. Keller, *ibid.* 209, 337 (1954); E. B. Keller u. P. C. Zamecnik, *ibid.* 221, 45 (1956).

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

[25] M. B. Hoagland, M. L. Stephenson, J. F. Scott, L. I. Hecht u. P. C. Zamecnik, *J. biol. Chemistry* 231, 241 (1958).

[26] F. H. C. Crick, *Symposia Soc. exp. Biol.* 12, 138 (1958).

[27] P. Berg u. E. J. Ofengand, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 44, 78 (1958).

trotz optimistischer Berichte aus mehreren Laboratorien gelang es nicht die Wirksamkeit des zellfreien Systems wesentlich zu steigern. Einige Versuche (1959) von *A. Tissières* und *D. Schlessinger* [28] mit Extrakten von *E.coli* zeigten das sehr deutlich. Bei 30 °C bildet das zellfreie System 5 bis 10 Minuten lang Protein und hört dann allmählich auf. Das in dieser Zeit neu synthetisierte Protein beträgt 1 bis 3 µg/mg Ribosomen. Etwa ein Drittel dieser Menge wird freigesetzt, der Rest bleibt an die Ribosomen gebunden.

Die Proteinsynthese in zellfreien *E.coli*-Extrakten erfordert die hohen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen (ca.  $10^{-2}$  M), welche die Bildung von 70-S-Ribosomen aus den 30-S- und 50-S-Einheiten begünstigen. Nach der Inkubation lassen sich diejenigen Ribosomen, die neugebildete Polypeptidketten enthalten, nicht mehr leicht in 30-S- und 50-S-Ribosomen zerlegen. Dialysiert man das zellfreie System (nach der Proteinsynthese) kurze Zeit gegen  $10^{-4}$  M  $Mg^{2+}$ -Lösung, so werden 80 bis 90 % der 30-S- und 50-S-Ribosomen frei. 10 bis 20 % der 70-S-Ribosomen bleiben intakt, und es sind diese „beständigen“ Ribosomen, die den größten Teil des neugebildeten, aber an Ribosomen gebundenen Proteins enthalten. Daraus folgt zweierlei: erstens, daß Protein an den 70-S-Ribosomen und nicht an den freien 30-S- und 50-S-Untereinheiten synthetisiert wird, und zweitens, daß im *E.coli*-Extrakt nur eine kleine Ribosomenfraktion funktionsfähig ist. *Tissières* und *Schlessinger* nannten diese Fraktion „aktive Ribosomen“ und nahmen an, daß sie eine Komponente enthalten, die den anderen Ribosomen fehlt.

Jedes aktive Ribosom synthetisiert im Durchschnitt 15000 bis 50000 Atomgewichtseinheiten Protein. Das ist in der Größenordnung natürlich vorkommender Polypeptidketten. Während uns die geringe Menge des insgesamt synthetisierten Proteins also unbefriedigt ließ, war die Syntheseleistung des Systems doch groß genug, um die Bildung vollständiger Protein-Moleküle möglich erscheinen zu lassen. Das ermutigte uns, nach  $\beta$ -Galactosidase zu suchen, aber trotz vieler Mühe ließ sie sich nicht nachweisen [29].

Diese frühen (1959) Untersuchungen an *E.coli*-Extrakten hatten noch ein weiteres wichtiges Ergebnis: fügte man den Ansätzen kleine Mengen gereinigter Desoxyribonuclease zu, so sank die Proteinsynthese auf 20 bis 40 % ihres ursprünglichen Wertes [28]. Das war völlig unerwartet, denn man mußte daraus schließen, daß hochmolekulare DNS bei der Proteinsynthese im bakteriellen Extrakt eine Rolle spielt. Da aber nach der Zerstörung der DNS mit DNase eine Restsynthese übrig bleibt, kann die DNS an der Bildung der Peptidbindung nicht direkt beteiligt sein. Vielmehr war in nicht mit DNase behandelten Extrakten eine Synthese neuer RNS-Matrizen an der DNS anzunehmen. Traf das zu, so bestand die vorher kaum erwogene Möglichkeit, daß die RNS-Matrizen instabil sind und damit die Proteinsynthese in zellfreien Systemen begrenzen.

[28] *A. Tissières, D. Schlessinger u. F. Gros, Proc. nat. Acad. Sci. USA* 46, 1450 (1960).

[29] *Françoise Gros u. D. Schlessinger, unveröffentlichte Versuche* (1961–1962).

## 5. Stabilität der Ribosomen-RNS im Stoffwechsel

Allen unseren frühen Untersuchungen an Ribosomen hatte die Annahme zugrunde gelegen, daß Ribosomen-RNS die Matrize ist. Es gab zahlreiche Hinweise dafür, daß Proteine an den Ribosomen synthetisiert werden, und da die Matrize RNS sein mußte, war es natürlich anzunehmen, daß die RNS der Ribosomen diese Rolle spiele. Als Ribosomen-RNS galt dabei eine Kollektion von Molekeln mit unterschiedlicher Basen-Sequenz, die an den aktiven Abschnitten der Chromosomen-DNS synthetisiert werden. Nach ihrer Synthese sollten sie sich mit den basischen Ribosomen-Proteinen vereinigen und so die fertigen Ribosomen bilden. Wir hatten also damit zu rechnen, daß die morphologisch gleichartig erscheinenden Ribosomen in Wirklichkeit genetisch verschiedenartige Partikel waren und daß diese Tatsache durch die Ähnlichkeit ihrer Proteinkomponenten verdeckt wurde.

Es gab außerdem überzeugende Hinweise dafür, daß die RNS-Molekeln der Ribosomen in wachsenden Bakterien nicht verändert werden. Schon 1949 war gezeigt worden, daß RNS-Vorstufen nach ihrem Einbau in die RNS darin blieben. Damals war der Unterschied zwischen Ribosomen-RNS und löslicher RNS noch nicht bekannt. Aber die Arbeitsgruppen am Carnegie Institute of Washington und an der Harvard-Universität wiesen später die ähnliche Stabilität beider Fraktionen nach. Allerdings hatten diese Experimente nicht das Schicksal einzelner Molekeln verfolgt, und so blieb die Möglichkeit, daß ein besonderer Trick den Abbau der Ribosomen-RNS und die bevorzugte Verwendung der Fragmente zur Synthese neuer Ribosomen-RNS gestattet. *Davern* und *Meselson* [30] konnten diese Möglichkeit jedoch ausschließen, indem sie Bakterien Ribosomen-RNS in einem  $^{13}C$ - und  $^{15}N$ -haltigen Medium synthetisieren ließen und die Bakterien dann mehrere Generationen in ein  $^{12}C$ - und  $^{14}N$ -haltiges Medium brachten. Sie trennten dann in einem Caesiumformiat-Dichtegradienten leichte und schwere RNS und konnten zeigen, daß die mit den schweren Isotopen markierten RNS-Molekeln mindestens zwei Generationen lang vollkommen intakt geblieben waren. Diese Ergebnisse sprachen dafür, daß die Matrizen für die Proteinsynthese in wachsenden Bakterien unbegrenzt beständig sind, wenn man für die Ribosomen-RNS eine genetische Spezifität annehmen darf.

## 6. Versuche, die für unbeständige Matrizen sprachen

Schon als *Davern* und *Meselson* ihre Versuche unternahmen (1959), erhielt man vor allem am Institut Pasteur Hinweise dafür, daß einige oder sogar alle bakteriellen Matrizen unbeständig sind und ihre Lebensdauer nur einige Prozent der Generationszeit beträgt. Keines dieser Experimente war für sich allein überzeugend. Jedes war auch mit der Vorstellung stabiler Ma-

[30] *C. I. Davern u. M. Meselson, J. molecular Biol.* 2, 153 (1960).

trizen zu interpretieren, aber zusammengekommen bildeten sie doch ein starkes Argument.

Diese Experimente waren von verschiedener Art. In einem Fall wurde der Einfluß des plötzlichen Zusatzes oder der plötzlichen Zerstörung spezifischer DNS-Molekeln untersucht. Der plötzliche Zusatz gelang, indem man eine (männliche) Donorzelle einen Chromosomenabschnitt in eine (weibliche) Acceptorzelle übertragen ließ, der dieser fehlte. Gleichzeitig wurde die Funktionsfähigkeit des übertragenen Gens (d. h. die Synthese eines enzymatisch aktiven Proteins) in der Empfängerzelle gemessen. *Riley, Pardee, Jacob und Monod* [31] fanden überraschenderweise, daß  $\beta$ -Galactosidase, von einem übertragenen Gen determiniert, bereits einige Minuten nach der Genaufnahme mit maximaler Geschwindigkeit synthetisiert wird. Die im stationären Zustand vorhandene Zahl von  $\beta$ -Galactosidase-Matrizen wird also fast sofort erreicht. Bei der Inaktivierung des *E.coli*-Chromosoms durch Einbau und Zerfall von  $^{32}\text{P}$ -Atomen hört die Enzyymbildung innerhalb weniger Minuten auf. Die in den Ribosomen enthaltenen Matrizen schienen also unwirksam zu werden, sobald die funktionsfähige DNS fehlte.

Zur gleichen Zeit entdeckte *François Gros* [32], daß Bakterien, die in einem Medium mit 5-Fluoruracil wachsen, anomales Protein, wahrscheinlich mit veränderter Aminosäure-Sequenz, hervorbringen. 5-Fluoruracil wird glatt in bakterielle RNS eingebaut, und seine Anwesenheit in der Matrizen-RNS fördert die Bildung fehlerhaften Proteins. Unerwartet aber war die Beobachtung, daß die Synthese normalen Proteins wenige Minuten nach der Zugabe von 5-Fluoruracil vollkommen aufhört. Auch dies sprach gegen die Existenz beständiger Matrizen.

## 7. Instabile RNS-Molekeln in phagen-infizierten Zellen

Man glaubte zunächst, daß in Zellen mit einer Infektion durch T2-Bakteriophagen keine RNS synthetisiert werde. *Hershey* [33] fand aber 1952 eine sehr rasche RNS-Synthese, doch sammelt sich infolge eines ebenso schnellen Abbaus keine RNS an. Überraschenderweise nahm fast niemand diese Entdeckung zur Kenntnis. Das ging zum Teil auf die damals noch herrschende Ansicht zurück, daß sich der Stoffwechsel einer mit Viren infizierten Zelle qualitativ von dem normaler Zellen unterscheidet.

*Volkin und Astrachan* [34] waren (1956) die ersten, die *Hersheys* instabile RNS ernst nahmen. Sie bestimmten ihren Basengehalt und fanden ihn von dem der RNS normaler *E.coli*-Zellen verschieden. Er glich aber dem der infizierenden DNS, was vermuten ließ, daß die RNS an der Phagen-DNS als Matrize synthetisiert wird. Darüber hinaus – und dies ist besonders wichtig –

mußte diese instabile RNS die Matrize für die Synthese der Phagen-Proteine sein. Nur wenn man annimmt, daß an der Synthese des Phagen-Proteins gar keine RNS beteiligt ist, kommt man um die Folgerung herum, daß die von *Volkin* und *Astrachan* nachgewiesene DNS-ähnliche RNS die Aminosäure-Sequenz im Phagen-Protein bestimmt.

Diese RNS wurde erst im Spätsommer des Jahres 1959 weiter untersucht. *Nomura, Hall und Spiegelman* [35] prüften ihre Beziehung zur bereits bekannten löslichen und Ribosomen-RNS. Sie fanden sogleich, daß die unter dem Einfluß der Phagen-DNS synthetisierte RNS (als T2-RNS bezeichnet) nicht in stabile Ribosomen eingebaut wird. Sie liegt bei  $10^{-4}$  M  $\text{Mg}^{2+}$  in freier Form vor und schien bei  $10^{-2}$  M  $\text{Mg}^{2+}$  Bestandteil von Partikeln zu werden, die 30-S-Ribosomen glichen. Zur gleichen Zeit begann *R. W. Risebrough* in unserem Laboratorium mit dem Studium der T2-RNS. Er wendete gleichfalls die Zentrifugation im Dichtegradienten einer Rohrzucker-Lösung an und fand, daß sich die T2-RNS von typischer Ribosomen-RNS unterschied. Außerdem beobachtete er als erster (Frühjahr 1960), daß bei einer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von  $10^{-2}$  M der größte Teil der T2-RNS nicht mit 30-S-Partikeln, sondern mit den größeren 70-S- und 100-S-Ribosomen sedimentiert.

Diese Ergebnisse führten ganz natürlich zu der Hypothese, daß die Synthese des Phagen-Proteins an genetisch unspezifischen Ribosomen vor sich geht, die an stoffwechsel-instabile RNS-Matrizen gebunden sind. Unabhängig von unseren Arbeiten kamen *Brenner* und *Jacob* durch die oben beschriebenen Untersuchungen im Institut Pasteur zu der Überzeugung, daß die Zeit für einen direkten Nachweis stoffwechsel-instabiler RNS-Matrizen reif sei. *Jacob und Monod* [36] hatten diesen Matrizen den Namen messenger-RNS gegeben. *Brenner und Jacob* reisten im Juni 1960 nach Pasadena, um in *Meselsons* Laboratorium ein experimentum crucis zu unternehmen. Sie folgerten, daß die T2-messenger-RNS mit alten, d. h. vor der Phagen-Infektion in der Zelle synthetisierten Ribosomen verknüpft sein müsse, und konnten das in der Tat sehr elegant beweisen [37]: Sie infizierten  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markierte Bakterien in einem  $^{12}\text{C}$ - und  $^{14}\text{N}$ -haltigen Medium mit T2-Phagen. Anschließend Dichtegradienten-Zentrifugation in einer CsCl-Lösung ergab, daß die T2-messenger-RNS zum größten Teil an „alte“ Ribosomen gebunden ist. Gleiches gilt für das an den Ribosomen haftende neugebildete Protein, das durch kurzzeitige Inkubation der Zellen mit radioaktiven Aminosäuren markiert worden war.

## 8. Nachweis von messenger-RNS in nicht infizierten Bakterien

Wir waren davon überzeugt, daß sich ähnliche messenger-RNS auch in nicht infizierten Bakterien finden lassen mußte. Ihr Nachweis war infolge der gleichzeitigen

[31] *M. Riley, A. Pardee, F. Jacob u. J. Monod*, J. molecular Biol. 2, 216 (1960).

[32] *S. Naono u. F. Gros*, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. 250, 3889 (1960).

[33] *A. D. Hershey, J. Dixon u. M. Chase*, J. gen. Physiol. 36, 777 (1953).

[34] *E. Volkin u. L. Astrachan*, Virology 2, 149 (1956).

[35] *M. Nomura, B. D. Hall u. S. Spiegelman*, J. molecular Biol. 2, 306 (1960).

[36] *F. Jacob u. J. Monod*, J. molecular Biol. 3, 318 (1961).

[37] *S. Brenner, F. Jacob u. M. Meselson*, Nature (London) 190, 576 (1961).

Synthese von löslicher und Ribosomen-RNS schwieriger. *François Gros* war damals (Mai 1960) gerade zu einem Besuch in unserem Laboratorium eingetroffen, und wir entschlossen uns gemeinsam mit *C. G. Kurland* und *W. Gilbert*, in Zellen, die kurze Zeit mit einer radioaktiven RNS-Vorstufe inkubiert worden waren, nach markierter messenger-RNS zu suchen. Versuche mit T2-infizierten Zellen hatten gezeigt, daß die messenger-RNS 2 bis 4 % der gesamten RNS ausmacht und daß die Lebensdauer ihrer Molekeln größtenteils unter einigen Minuten lag. Galt gleiches auch für normale Zellen, so mußte die in einer beliebigen, kurzen Zeitspanne synthetisierte RNS überwiegend messenger-RNS sein. Eine Ansammlung von messenger-RNS war nicht zu erwarten, da Synthese und Abbau gleich schnell verlaufen sollten.

Wiederum ließ sich die Hypothese von der messenger-RNS bestätigen [38]: die durch kurzzeitige Inkubation radioaktiv markierte RNS befand sich bei einer  $Mg^{2+}$ -Konzentration von  $10^{-2}$  M zum größten Teil an den 70-S- und 100-S-Ribosomen. Bei  $10^{-4}$  M  $Mg^{2+}$  löste sie sich von den Ribosomen und sedimentierte in freier Form mit einer Sedimentationskonstante von 14 S. Die Analyse des Basengehaltes ergab eine Ähnlichkeit mit der DNS, in Übereinstimmung mit der Annahme, daß die RNS an vielen DNS-Matrizen längs des bakteriellen Chromosoms synthetisiert wird. Bald danach konnten *Hall* und *Spiegelman* [39] künstliche Hybridmolekeln aus DNS vom T2-Phagen und T2-messenger-RNS erzeugen. In mehreren Laboratorien [40] gelang dann die Bildung von Hybridmolekeln aus *E.coli*-DNS und der durch kurze Inkubation mit radioaktiven Vorstufen markierten RNS von *E.coli*, so daß die Bildung der messenger-RNS an DNS-Matrizen heute als bestätigt gelten kann.

## 9. Die Rolle der messenger-RNS bei der Proteinsynthese in zellfreien Systemen

Es wurde nun möglich zu erklären, warum Desoxyribonuclease die Proteinsynthese in *E.coli*-Extrakten teilweise hemmt: DNS sollte auch in den Extrakten die Matrize für die Synthese der messenger-RNS sein. Die neugebildete messenger-RNS vereinigt sich dann mit Ribosomen und dient als zusätzliche Matrize für die Proteinsynthese. Da Desoxyribonuclease nur die Fähigkeit zur Neubildung von messenger-RNS zerstört, kann sie die bei der Herstellung des Extraktes bereits vorhandene messenger-RNS nicht beeinflussen. Daher muß auch bei noch so großer Desoxyribonuclease-Konzentration stets eine restliche Proteinsynthese bleiben. Versuche von *Tissières* und *Hopkins* [41] in unserem Labo-

ratorium sowie von *Berg*, *Chamberlin* und *Wood* [42] in Stanford bestätigten diese Vorstellungen. Zunächst ließ sich zeigen, daß die Proteinsynthese in Extrakten, die von DNS befreit worden waren, deutlich ansteigt, wenn man wieder DNS hinzufügt. Zweitens geht der in-vitro-Proteinsynthese eine RNS-Synthese parallel. Die gebildete RNS hat eine der DNS ähnliche Zusammensetzung, ist bei  $10^{-2}$  M  $Mg^{2+}$  mit Ribosomen verknüpft und gleicht physikalisch einer in vitro synthetisierten messenger-RNS.

Weiterhin fand *Tissières*, daß der Zusatz von Fraktionen, die viel messenger-RNS enthalten, die Proteinsynthese auf das 2- bis 5-fache steigert. Noch überraschendere Ergebnisse berichteten *Nirenberg* und *Matthaei* [43]. Sie überlegten, daß die Zerstörung der messenger-RNS der Hauptgrund für das allmähliche Aufhören der Proteinsynthese in zellfreien Extrakten sein könnte. Traf dies zu, so mußten Extrakte, die durch Vorinkubation an natürlicher messenger-RNS verarmt worden waren, auf den Zusatz neuer messenger-RNS noch stärker reagieren. Tatsächlich beobachteten sie nach der Zugabe phenol-gereinigter *E.coli*-RNS einen Anstieg der Proteinsynthese auf das zwanzigfache. Wie *Tissières* aktive Fraktion sedimentierte auch ihre stimulierende RNS heterogen, d. h. es konnte sich weder um Ribosomen-RNS noch um lösliche RNS handeln. Noch überzeugender wurde dieses Argument, als sie vorinkubierten *E.coli*-Extrakten TMV-RNS zusetzten und wieder eine 10- bis 20-fache Zunahme der Proteinsynthese beobachteten. Hier war keine Verwechslung mit Ribosomen-RNS mehr möglich. Einen geradezu dramatischen Effekt [44] hatte der Zusatz von Polyuridylsäure (die wie TMV-RNS einsträngig ist): sie stimulierte spezifisch die Synthese von Polyphenylalanin aus Phenylalanin. Mit diesem Versuch (Juni 1961) wurde die Hypothese von der messenger-RNS zur Gewißheit. Es war direkt bewiesen worden, daß einsträngige messenger-RNS die Matrize für die Proteinsynthese ist.

## 10. Messenger-RNS in aktiven Ribosomen

In zellfreien Systemen enthalten gewöhnlich nur 10 bis 20 % der *E.coli*-Ribosomen messenger-RNS. Dies ging zuerst aus Versuchen von *Risebrough* [45] hervor, der Extrakte T2-infizierter Zellen im Dichtegradienten einer Rohrzuckerlösung zentrifugierte. Ribosomen mit markierter messenger-RNS sedimentieren schneller als gewöhnliche Ribosomen. *Gilbert* [46] konnte nachweisen, daß diese rascher sedimentierenden Ribosomen „aktiv“ sind, d. h. Aminosäuren in Proteine einbauen können: Ein frischer zellfreier Extrakt wurde im Dichtegradienten einer Rohrzuckerlösung zentrifugiert. Längs des

[38] *F. Gros*, *H. Hiatt*, *W. Gilbert*, *C. G. Kurland*, *R. W. Risebrough*, u. *J. D. Watson*, *Nature* (London) 190, 581 (1961).

[39] *B. D. Hall* u. *S. Spiegelman*, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 47, 137 (1961).

[40] *M. Hayashi* u. *S. Spiegelman*, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 47, 1564 (1961); *F. Gros*, *W. Gilbert*, *H. Hiatt*, *G. Attardi*, *P. F. Spahr* u. *J. D. Watson*, *Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol.* 26 (1961).

[41] *A. Tissières* u. *J. W. Hopkins*, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 47, 2015 (1961).

[42] *M. Chamberlin* u. *P. Berg*, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 48, 81 (1962); *W. B. Wood* u. *P. Berg*, *ibid.* 48, 94 (1962).

[43] *M. W. Nirenberg* u. *J. H. Matthaei*, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 4, 404 (1961).

[44] *M. W. Nirenberg* u. *J. H. Matthaei*, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 47, 1588 (1961).

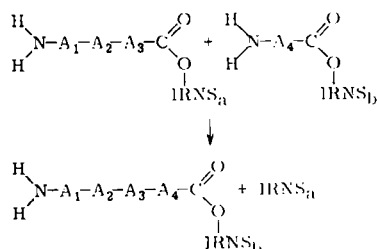
[45] *R. W. Risebrough*, *A. Tissières* u. *J. D. Watson*, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 48, 430 (1962).

[46] *W. Gilbert*, *J. molecular Biol.* (1963), im Druck.

Dichtegefälle wurden Proben entnommen und ihre Fähigkeit zur Proteinsynthese geprüft. Aktivität und Gehalt an messenger-RNS gingen vollkommen parallel. Zentrifugiert man nun einen Extrakt nach der Proteinsynthese, so setzen sich auch die neugebildeten Proteinketten mit einer kleinen Fraktion schnell sedimentierender Ribosomen ab [45]. Diese Ribosomen enthalten noch messenger-RNS. Zerstört man diese mit Ribonuclease ( $\mu\text{g}$ -Mengen Ribonuclease greifen Ribosomen nicht an), so sedimentiert das Protein mit 70-S-Ribosomen. Das heißt: das neugebildete Protein haftet nicht an der messenger-RNS, sondern muß direkt mit den Ribosomen verbunden sein.

## 11. Bindung der IRNS an Ribosomen

Versuche von *Schweet* [47] und *Dintzes* [48] zeigten, daß Proteine durch schrittweise Verknüpfung einzelner Aminosäuren vom Aminoende her aufgebaut werden. Da die unmittelbaren Proteinvorstufen Aminoacyl-IRNS-Verbindungen sind, läßt sich daraus ableiten, daß die entstehende Polypeptidkette am wachsenden Carboxylende einen IRNS-Rest trägt (Schema 4). Um diese



Schema 4. Schrittweise Verlängerung einer Polypeptidkette. Die Synthese beginnt mit der aminoendständigen Aminosäure. Am wachsenden Ende der Kette steht ein IRNS-Rest. Der Buchstabe A symbolisiert eine Aminosäure.

Folgerung zu prüfen, untersuchten wir die Bindung zwischen löslicher RNS und Ribosomen. Findet keine Proteinsynthese statt, so bindet bei  $10^{-2} \text{ M}$   $\text{Mg}^{2+}$  jede 50-S-Untereinheit der 70-S-Ribosomen reversibel ein Molekül IRNS [49]. Gleiches gilt, wenn die Proteinsynthese vor sich geht, und es gilt mit und ohne Proteinsynthese auch für Aminoacyl-IRNS.

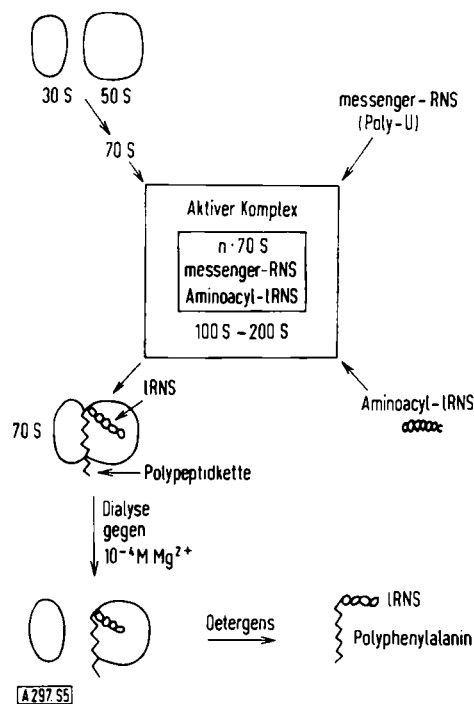
Dagegen hat die Proteinsynthese einen Einfluß auf die Bindung bei  $10^{-4} \text{ M}$   $\text{Mg}^{2+}$ : ohne Proteinsynthese bleibt keine IRNS an den Ribosomen haften, wenn man die  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von  $10^{-2} \text{ M}$  auf  $10^{-4} \text{ M}$  senkt. Nach der Proteinsynthese aber haften IRNS-Reste fest an den „beständigen“ 70-S-Ribosomen, deren Gehalt an neugebildetem Protein den leichten Zerfall in 30-S- und 50-S-Ribosomen verhindert. An jedem beständigen Ribosom scheint ein IRNS-Rest zu hängen. Bei langdauernder Dialyse gegen eine  $10^{-4} \text{ M}$   $\text{Mg}^{2+}$ -Lösung dissoziieren schließlich auch die beständigen Ribosomen.

[47] J. Bishop, J. Leahy u. R. Schweet, Proc. nat. Acad. Sci. USA 46, 1030 (1960).

[48] H. Dintzes, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 247 (1961).

[49] M. Cannon, R. Krug u. W. Gilbert, unveröffentlicht.

In diesem Fall bleibt die gesamte gebundene IRNS und fast das gesamte neugebildete Protein an den 50-S-Ribosomen, woraus sich schließen läßt, daß die gebundene IRNS an den Proteinketten sitzt (Schema 5). Einen



Schema 5. Beteiligung der Ribosomen an der Proteinsynthese. Eine Skizze des aktiven Komplexes zeigt Schema 6. Die Spaltung der beständigen 70-S-Ribosomen durch Dialyse gegen eine  $\text{Mg}^{2+}$ -Lösung geringer Konzentration (unten links) ist bisher nur bei der Synthese von Polyphenylalanin beobachtet worden.

direkten Beweis erbrachte *Gilbert* [50], indem er mit dem Detergens Duponol® die 50-S-Ribosomen in ihre Protein- und RNS-Komponenten zerlegte. Neugebildetes Protein und IRNS bleiben danach sowohl bei der Dichtegradienten-Zentrifugation in Rohrzuckerlösung als auch an Sephadex-G 200-Säulen beisammen. Nach Behandlung mit schwachem Alkali oder mit Hydroxylamin, d. h. mit Mitteln, die Aminoacylbindungen spalten, wanderten Protein und IRNS dagegen getrennt.

Die Bedeutung der reversiblen IRNS-Bindung durch inaktive, d. h. keine messenger-RNS enthaltende Ribosomen ist unbekannt. Möglicherweise sind in wachsenden Zellen alle Ribosomen an messenger-RNS gebunden und synthetisieren Protein. Unter diesen Bedingungen können nur solche IRNS-Reste in die Höhlen der Ribosomen schlüpfen, die der Basensequenz an der messenger-RNS entsprechen. Wenn aber, wie in unseren zellfreien Extrakten, die meisten Ribosomen ohne messenger-RNS sind, kann vielleicht jedes beliebige IRNS-Molekül, beladen oder unbeladen, die leere Höhle füllen.

Alle Ergebnisse sprechen dafür, daß die neugebildeten Peptidketten nicht durch kovalente Bindungen an den Ribosomen gehalten werden. Vielmehr ist es wahrscheinlich, daß der endständige IRNS-Rest die Bindung vermittelt, indem er durch sekundäre,  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Kräfte in einer Höhle des 50-S-Ribosoms festgehalten wird. Durch langdauernde Dialyse gegen  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$   $\text{Mg}^{2+}$  (bei der die 30-S- und 50-S-Ribosomen nicht verändert werden) lassen sich die neugebildeten Proteinketten von

[50] W. Gilbert, J. molecular Biol., (1963), im Druck.

den 50-S-Ribosomen trennen [50,51]. Die so freigesetzten Polypeptide haben eine Sedimentationskonstante von etwa 4 S und enthalten, wenn die latente Ribonuclease nicht aktiviert wird, wahrscheinlich noch endständige IRNS. Bringt man die  $Mg^{2+}$ -Konzentration wieder auf  $10^{-2} M$ , so kehren viele freigesetzte Polypeptidketten zu den Ribosomen zurück.

## 12. Bewegung der Matrice (der messenger-RNS) relativ zur Oberfläche der Ribosoms

Jedes Protein synthetisierende Ribosom enthält nur eine neugebildete Polypeptidkette. In dem Maße, wie diese sich verlängert, entfernt sich das Aminoende von der Stelle, an der die Peptidbindungen geknüpft werden, und kann möglicherweise schon weitgehend seine endgültige dreidimensionale Konfiguration annehmen, bevor am Carboxylende alle Aminosäuren angefügt worden sind. Die messenger-RNS muß so angeordnet sein, daß stets nur die „richtige“ Aminoacyl-IRNS-Verbindung an die Stelle tritt, an der die Peptidbindung entsteht. Das verlangt die Bildung spezifischer Wasserstoffbrücken (Basenpaare?) zwischen der Matrice und einigen (sehr wahrscheinlich drei) Nucleotiden im IRNS-Rest. In Gegenwart der notwendigen Enzyme wird dann die Aminoacylbindung zum endständigen IRNS-Rest geöffnet und eine Peptidbindung zur neu eintretenden Aminoacyl-IRNS gebildet (Schema 4). Gleichzeitig müssen für das freigewordene IRNS-Molekül energetisch ungünstige Verhältnisse entstehen, so daß es die IRNS-bindende Stelle am Ribosom verläßt, die dann vom neuen endständigen IRNS-Rest besetzt wird, womit sich der Kreis schließt. Es ist nicht bekannt, wie lange die Verknüpfung zwischen der messenger-RNS und der Aminoacyl-IRNS erhalten bleibt. Auf jeden Fall muß sich die Matrice relativ zum Ribosom um eine bestimmte Strecke verschieben, damit ihre nächste Nucleotidgruppierung in die Lage gelangt, in der sie die nächste Aminosäure auswählen kann. Ribosom und Matrice können nicht in einer statischen Anordnung verharren, wenn es im Ribosom nur eine Stelle gibt, an der Peptidbindungen entstehen können.

## 13. Verknüpfung einer Molekel messenger-RNS mit mehreren Ribosomen

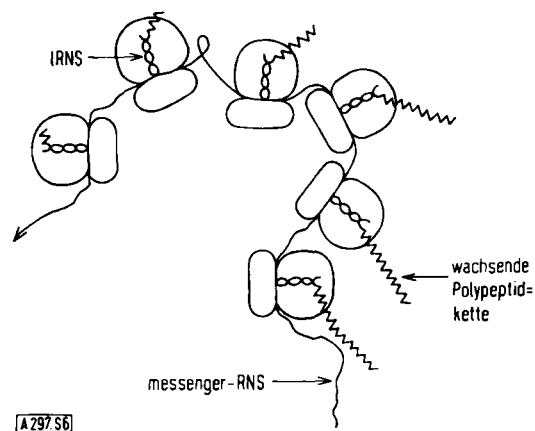
Setzt man zellfreien Extrakten, die hauptsächlich 70-S-Ribosomen enthalten, als synthetische messenger-RNS Polyuridylsäure (Poly-U) zu, so wächst die Zahl aktiver Ribosomen, die mit Konstanten von 150 bis 200 S sedimentieren [52]. Die Anlagerung eines 70-S-Ribosoms (Molgewicht  $3 \times 10^6$ ) an eine Molekel Poly-U (Molgewicht  $1 \times 10^5$ ) sollte die Sedimentation des Ribosoms

[51] D. Schlessinger u. Françoise Gros, J. molecular Biol. (1963), im Druck.

[52] S. H. Barondes u. M. W. Nirenberg, Science (Washington) 138, 813 (1962); G. J. Spyrides u. F. Lipman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1977 (1962); W. Gilbert, J. molecular Biol. (1963), im Druck.

nicht wesentlich beeinflussen. Unwahrscheinlich ist auch, daß sich sehr viele Poly-U-Molekeln mit einem einzelnen Ribosom verbinden, denn das Molverhältnis von gebundener Polyuridylsäure zu 70-S-Ribosomen betrug bei diesen Versuchen weniger als 1:5. Die einzige plausible Erklärung ist die Vereinigung mehrerer Ribosomen mit einer einzelnen Poly-U-Molekel. Die 300 Nucleotide in einer Poly-U-Molekel vom Molgewicht ca.  $10^5$  haben insgesamt eine Länge von etwa 1000 Å, wenn der Abstand zwischen den einzelnen Nucleotiden 3,4 Å beträgt. Es können sich also vier bis acht Ribosomen (Durchmesser ca. 200 Å) an eine Molekel messenger-RNS anlagern, je nachdem, wie sich diese über (oder durch) die Ribosomen bewegt. Diese Abschätzung stimmt gut mit der mittleren Größe der Aggregate überein, die man aus der Sedimentationsgeschwindigkeit der „aktiven“ Komplexe ableitet. Werden die mit Poly-U versetzten Extrakten nach der Proteinsynthese zentrifugiert, so findet man den größten Teil des gebildeten Polyphenylalanins mit den rasch sedimentierenden „aktiven“ Ribosomen vereinigt.

Eine einzelne Molekel der messenger-RNS bewegt sich also wahrscheinlich gleichzeitig über mehrere Ribosomen und wirkt in jedem als Matrice für die Proteinsynthese (Schema 6). Aufeinanderfolgende Ribosomen



Schema 6. Vereinigung der messenger-RNS mit mehreren Ribosomen. Die Verknüpfungsstellen sind unbekannt.

sollten Polypeptidketten zunehmender Länge tragen, je nachdem, wie groß der Abschnitt der über sie bereits hinweggelaufenen messenger-RNS ist. Wenn ein Ribosom die gesamte Matrice durchlaufen hat, muß ein besonderer Mechanismus, der vielleicht durch eine bestimmte Nucleotid-Sequenz in der Matrice ausgelöst wird, das fertige Protein freisetzen. Das vakante Ribosom kann dann den Anfang einer neuen (vielleicht auch der gleichen) Matrice aufnehmen und mit der Synthese eines neuen Proteins beginnen.

Die Vorstellung, daß sich eine Molekel der messenger-RNS mit mehreren Ribosomen vereinigen kann, löst ein lästiges Paradox, das mit der Hypothese von der messenger-RNS verbunden war: 4 bis 6 % der RNS von *E. coli* ist messenger-RNS [40,53]. Aus ihrer durchschnittlichen Sedimentationskonstante von 14 S [54] errechnet man ein mittleres Mole-

[53] S. S. Cohen, H. D. Barner u. J. Lichtenstein, J. biol. Chemistry 236, 1448 (1961).

[54] R. Monier, S. Naono, D. Hayes, F. Hayes u. F. Gros, J. molecular Biol. 5, 311 (1962); K. Asano, unveröffentlichte Versuche.

kulargewicht von etwa 500000. Dieser Wert mag zu niedrig sein, denn es ist sehr schwierig, jeden enzymatischen Abbau zu vermeiden. Aber auf jede Molekel messenger-RNS kommen danach mindestens sechs bis acht 70-S-Ribosomen. Es ließ sich nicht recht denken, daß stets nur 10 bis 20 % der Ribosomen funktionsfähig sein sollten. Dies um so mehr, als die Proteinsynthese unter mehreren Bedingungen der Ribosomen-Menge proportional ist [55]. Es ist sehr viel wahrscheinlicher, daß in vivo fast alle Ribosomen aktiv sind. Bei der Herstellung der zellfreien Extrakte mögen viele Ribosomen ihre Matrice verlieren und damit unwirksam werden. Trifft dies zu, so darf man sich von milderem Verfahren zum Aufschluß der *E.coli*-Zellen einen höheren Anteil rasch sedimentierenden Materials erwarten. Es wurde bereits berichtet [56], daß die Ribosomen aus Säugetier-Reticulocyten zu mehr als 50 % in Aggregaten von fünf bis sechs 80-S-Partikeln vorliegen. Und es sind diese Aggregate, die in vivo das Protein synthetisieren.

#### 14. Lebensdauer der Matrice

Im hier entwickelten Schema wäre die Funktion einer Molekel messenger-RNS zeitlich nicht begrenzt. In Wirklichkeit aber arbeitet eine bakterielle Matrice infolge ihrer Instabilität im Durchschnitt nur zehn- bis zwanzigmal. Das geht aus Versuchen im Laboratorium von *Levinthal* [57] hervor, bei denen die Synthese neuer messenger-RNS durch das Antibiotikum Actinomycin D blockiert wurde. Bereits vorhandene messenger-RNS (*Bacillus subtilis* hat eine Generationsdauer von 60 Minuten) zerfiel unter diesen Bedingungen mit einer Halbwertszeit von 2 Minuten. Entsprechend nahm die Proteinsynthese ab. Es muß also Wege zum spezifischen Abbau der messenger-RNS geben. In bakteriellen Extrakten finden sich mehrere Enzyme (Polynucleotid-Phosphorylase und eine  $K^+$ -abhängige Diesterase), die freie messenger-RNS rasch abbauen [58]. Sie sind jedoch wesentlich weniger wirksam, wenn die messenger-RNS mit Ribosomen vereinigt ist [59]. Möglicherweise kann der freie Anfang einer Matrice in statistischer Verteilung enzymatisch abgebaut werden oder sich mit einem vakanten Ribosom verbinden. Träfe dies zu, so wäre die wichtige Entscheidung zwischen beiden Alternativen dem Zufall überlassen und hätte mit dem biologischen Bedarf für spezifische Matrizen nichts zu tun.

[55] O. Maale, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. 26, 45 (1961); F. C. Neidhardt u. D. Fraenkel, ibid. 26, 63 (1961).

[56] A. Gierer, J. molecular Biol. (1963), im Druck; J. R. Warner, P. M. Knopf u. A. Rich, Proc. nat. Acad. Sci. USA, im Druck.

[57] C. Levinthal, A. Keynan u. A. Higa, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1631 (1962).

[58] S. S. Cohen, J. biol. Chemistry (1963), im Druck; D. Schlesinger u. P. F. Spahr, unveröffentlicht.

[59] R. Gesteland u. J. D. Watson, unveröffentlicht.

#### 15. Folgerungen

Wir dürfen heute mit beträchtlicher Sicherheit sagen, daß man die Grundzüge der biologischen Proteinsynthese versteht. Die Beteiligung der RNS ist sehr viel komplizierter als man 1953 annehmen konnte. Es gibt nicht nur eine aktive RNS, sondern die Proteinsynthese bedarf der geordneten Wechselwirkung zwischen drei RNS-Arten: der Ribosomen-RNS, der löslichen RNS und der messenger-RNS. Vieles ist jedoch noch immer ungeklärt. Beispielsweise gibt es keine Theorie der Ribosomen-Untereinheiten, und auch die funktionelle Bedeutung der Ribosomen-RNS liegt noch im Dunkeln. Sehr befriedigend ist die Gewißheit, daß an allen Schritten der Proteinsynthese nur bekannte chemische Kräfte beteiligt sind. Aber wir kennen noch nicht alle Einzelheiten. Bestimmen zum Beispiel die von der DNS her bekannten Basenpaare auch die Auswahl der Aminoacyl-tRNS-Verbindungen durch die messenger-RNS? Mit etwas Glück werden wir die Antwort bald wissen. Und man darf erwarten, daß auch alle weiteren Ergebnisse der Untersuchungen über alle selektive Proteinsynthese (und ihre Konsequenzen für die Embryologie) definierte und – wenn verstanden – leicht zu fassende chemische Grundlagen haben werden.

#### Dank

Ich hatte das Glück der Zusammenarbeit mit vielen fähigen Studenten und Kollegen. Die Doktorarbeiten von Dr. C. G. Kurland, Dr. David Schlessinger und Dr. Robert Risebrough bewiesen viele der hier vorgetragenen Ideen. Ebenso bedeutend waren Untersuchungen mit Dr. Kimiko Asano, Dr. Michael Cannon, Dr. Walter Gilbert, Dr. François Gros, Dr. Françoise Gros, Dr. Johns Hopkins, Dr. Masayasu Nomura, Dr. Pierre François Spahr, Dr. Alfred Tissières und Dr. Jean-Pierre Waller. Der Besuch von François Gros im Frühjahr 1960 war entscheidend, indem damals unsere Aufmerksamkeit auf die messenger-RNS gelenkt wurde. Als besonders wichtig möchte ich die langdauernde Zusammenarbeit mit Alfred Tissières hervorheben. Seit 1960 habe ich auch das Glück einer engen Zusammenarbeit mit Walter Gilbert.

Eingegangen am 18. Februar 1963 [A 297]

Übersetzt von Dr. H. Grünwald, Heidelberg