

Idiosynkrasien der DNA-Struktur (Nobel-Vortrag)^[**]

Von A. D. Hershey^[*]

1958 erwies sich die Summe des Wissens über die genetische Struktur der Phagenpartikeln als Paradoxon. Einerseits ergaben genetische Kreuzungsversuche die Existenz eines einzigen zusammenhängenden Genoms^[1], andererseits jedoch ließen physikalische Ergebnisse vermuten, daß Phagenpartikeln mehr als ein DNA-Molekül und möglicherweise sogar mehr als eine Spezies von DNA-Molekülen enthalten. Wir brauchen hier nicht bei dem Paradoxon zu verweilen, denn es ergab sich später, daß die physikalischen Ergebnisse nicht richtig waren. Phagenpartikeln enthalten jeweils nur ein einziges DNA-Molekül, und dieses ist spezies-spezifisch.

Beim Versuch, das Paradoxon von 1958 zu beseitigen, mußten meine Kollegen und ich damit beginnen, die Extraktion, die Reinigung und die Charakterisierung von DNA-Molekülen zu erlernen. Unsere Unerfahrenheit war kein ernstes Handicap, weil die damals bekannten Techniken noch ziemlich primitiv waren. Sie waren primitiv aus einem guten Grund: Bevor man in der Lage war, Viruspartikeln auseinanderzunehmen, hatte noch niemand eine Lösung einheitlicher DNA-Moleküle gesehen. Ohne es zu wissen, traten wir in eine jener glücklichen Perioden ein, in denen jeder technische Fortschritt zu neuen Erkenntnissen führt.

Joseph Mandell und ich versuchten zunächst, eine Chromatographie der DNA in Gang zu bringen^[2]. Dies gelang uns, wie manchen Chromatographen vor uns, mehr mit Hilfe der Fingerfertigkeit als mit Hilfe der Theorie^[3]. Elizabeth Burgi und ich erhielten bei

der ersten Anwendung unserer Methode folgende Ergebnisse^[4]:

1. Aus dem Phagen T2 extrahierte DNA erwies sich als chromatographisch homogen.
2. Bei einer kritischen Rührgeschwindigkeit ging die DNA in einem Einstufenprozeß in eine zweite chromatographische Spezies über. Die zweite Spezies ergab eine Bande, die chromatographisch nicht homogen war. Wir vermuteten, daß sie aus Fragmenten der halben Länge bestand, die durch Brüche vorzugsweise im mittleren Bereich des ursprünglichen Moleküls entstanden waren.
3. Eine chromatographisch isolierte Fraktion der Halb-Fragmente ging bei höherer kritischer Rührgeschwindigkeit in einem Schritt in eine dritte chromatographische Spezies über, die wir Viertel-Fragmente nannten.
4. Unfraktionierte Halb-Fragmente konnten durch Rühren graduell, nicht schrittweise, verändert werden, vermutlich weil die Fragmente verschiedener Länge bei verschiedenen charakteristischen Rührgeschwindigkeiten zerbrachen.
5. Diese Resultate zeigten, daß das chromatographische Verhalten und die Zerlegbarkeit durch Scherung von der Länge der Moleküle abhingen und daß unser Ausgangsmaterial nach beiden Kriterien im Bezug auf die Länge einheitlich war.

Burgi und ich stützten unsere Ergebnisse durch Sedimentationsanalysen und gaben uns Mühe, präzise Halb- und Viertel-Moleküle zu isolieren^[5].

An diesem Punkt waren wir davon überzeugt, charakteristische DNA-Moleküle in der Hand zu haben, kannten aber keine Methode, sie zu wägen oder zu messen. Glücklicherweise verfügten Irwin Rubenstein

stellung mit der Säulenfüllung während des Passierens der Säule erwarten könne. Aber wenigstens hatten es Mandell und ich mit ionischen Wechselwirkungen zu tun. Einige Jahre später mußten Doty, Marmur und ihre Kollegen einer wirklichen theoretischen Krise ins Auge blicken: Wie sollte man nun, nachdem sie die Renaturierung der DNA entdeckt hatten, die beachtliche Geschwindigkeit dieses Vorgangs erklären?

[4] A. D. Hershey u. E. Burgi, J. Mol. Biol. 2, 143 (1960).

[5] E. Burgi u. A. D. Hershey, J. Mol. Biol. 3, 458 (1961).

[*] Prof. Dr. A. D. Hershey
Genetics Research Unit,
Carnegie Institution of Washington,
Cold Spring Harbor, New York (USA)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1970. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

[1] A. D. Kaiser, Virology 1, 424 (1955); G. Streisinger u. V. Bruce, Genetics 45, 1289 (1960).

[2] J. D. Mandell u. A. D. Hershey, Anal. Biochem. 1, 66 (1960).

[3] Ich erinnere mich an ein entmutigendes Gespräch mit Paul Doty, in dem er (unter meiner Zustimmung) darauf hinwies, daß man bei großen DNA-Molekülen kaum eine Gleichgewichtsein-

und C. A. Thomas jr. über eine Meßmethode, aber sie hatten Schwierigkeiten beim Präparieren des Materials. In gemeinsamer Anstrengung konnten wir durch radiographische Methoden den Phosphorgehalt der T2-DNA-Moleküle sowie ihrer Hälften und Viertel messen^[6]. Wir fanden ein Molekulargewicht von 130 Millionen für die intakte DNA. Ja mehr noch, da das DNA-Molekül und die Phagenpartikel gleich viel Phosphor enthielten, konnte es nur ein Molekül pro Partikel geben. Demnach besaß also der Phage T2 ein unimolekulares Chromosom.

Da uns nun das aus dem Phagen T2 gewonnene Material als Standard zur Verfügung stand, arbeiteten Burgi und ich Bedingungen aus, unter denen die Sedimentationsgeschwindigkeit in Rohrzuckerlösung als Maß für das Molekulargewicht genutzt werden konnte^[7]. Wir fanden die nützliche Beziehung

$$D_2/D_1 = (M_2/M_1)^{0.35} \quad (1)$$

Darin bedeutet D die Distanz, um die ein Molekül sedimentiert ist, M das Molekulargewicht, und die Indices beziehen sich auf verschiedene DNA-Spezies. Die Beziehung ermöglicht es, das Molekulargewicht einer unbekannten DNA mit dem einer bekannten DNA zu vergleichen, wenn man die beiden gemeinsam sedimentieren läßt. Nach dieser Methode ergibt sich z.B. für die DNA des Phagen λ ein Molekulargewicht von 31 Millionen.

Natürlich gilt Gl. (1) nur für typische bihelicale DNA-Moleküle. Als Test auf Vergleichbarkeit der Strukturen haben wir die Zerbrechlichkeit unter hydrodynamischer Scherung gemessen, die sowohl vom Molekulargewicht als auch von der Molekülstruktur abhängt^[8].

Während es gelang, die Prinzipien der T2-DNA-Struktur wie beschrieben auszuarbeiten, führte die genetische Analyse des Chromosoms zu einem eigenen Paradoxon. Damals hatte der Phage T4 den Phagen T2 für experimentelle Zwecke weitgehend ersetzt, aber die beiden Phagen sind so eng miteinander verwandt, daß an einem von ihnen gewonnene Erkenntnisse gewöhnlich für beide zutreffen.

Das Paradoxon ergab sich aus der Arbeit von Doermann und Boehner^[9], die fanden, daß T4-Heterozygoten in der Tat ohne Segregation replizieren konnten und eine irgendwie polarisierte Struktur hatten. Diese Eigenschaften waren mit dem Heteroduplex-Modell für Heterozygoten unvereinbar und veranlaßten deshalb Streisinger und seine Kollegen, zwei sehr entscheidende Eigenschaften der T4-DNA-Struktur zu postulieren: Die zirkuläre Permutation und die terminale Repetition^[10]. Ich werde gleich auf diese Eigenschaften zurückkommen und möchte hier nur

festhalten, daß beide durch physikalische Analysen bestätigt worden sind^[11]. Ich wende mich jetzt einer recht andersartigen DNA zu, der des Phagen λ .

Zunächst einmal erwiesen sich unsere λ -DNA-Präparationen als widerspenstig. Sie weigerten sich, durch unsere Chromatographiesäule zu laufen und ergaben keine brauchbare Bande in der Ultrazentrifuge. Erst als es uns gelang, hochaufgelöste Sedimentationsprofile in Rohrzuckerlösung zu erhalten, wurden unsere Resultate sinnvoll^[12]. Wir konnten nun in geeigneten Präparationen vier Komponenten feststellen. Drei von ihnen sedimentierten mit Geschwindigkeiten, die nach Gl. (1) für lineare Strukturen mit den Längenverhältnissen 1:2:3 zutrafen. Wir nannten sie vorläufig Monomere, Dimere und Trimere. Die vierte Komponente sedimentierte schneller als das Monomere, aber langsamer als das Dimer. Wir nannten sie ein geschlossenes oder gefaltetes Monomeres.

Eine weitere Analyse wurde möglich, als wir fanden, daß Erhitzen auf ungefähr 75 °C (noch nicht ausreichend für Denaturierung) alle miteinander in lineare Monomere umwandelte. Weiter konnten wir zeigen, daß Monomere in verdünnter Lösung durch Erhitzen auf 55 °C vollständig in die geschlossene Form überführt werden. Umgekehrt lieferte das Erhitzen konzentrierter Lösungen auf 55 °C Dimere, Trimere und größere Aggregate. Außerdem nahm die Zerbrechlichkeit der Gebilde unter Scherung in der richtigen Reihenfolge ab: Trimere, Dimere, geschlossene Monomere, lineare Monomere. Schließlich erwiesen sich das Entstehen der geschlossenen Struktur und die Aggregation deutlich als kompetitive Prozesse, was vermuten ließ, daß jedes Molekül zwei Bindungsstellen hat, die für beide Prozesse verantwortlich sind.

Wir prüften unser Modell, indem wir uns die Molekülhälften vornahmen, die entsprechend der Hypothese ja lediglich eine Bindungsstelle tragen und also nur in der Lage sein sollten, sich zu Paaren zu vereinigen (Abb. 1). Dies erwies sich als korrekt: Durch

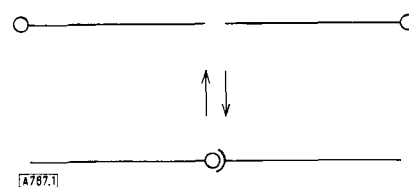


Abb. 1. Reversible Vereinigung der Molekülhälften der λ -DNA (schematisch). Oben: Molekülhälften. Unten: Vereinigung der Molekülhälften über ihre terminalen Bindungsstellen.

thermische Behandlung konnten wir Molekülhälften reversibel in Strukturen umwandeln, die mit gleicher Geschwindigkeit wie die nicht gebrochenen linearen Moleküle sedimentierten. Mehr noch, die wiedervereinigten Hälften wiesen eine Schwimmdichte auf, wie

[6] I. Rubenstein, C. A. Thomas jr. u. A. D. Hershey, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47, 1113 (1961).

[7] E. Burgi u. A. D. Hershey, Biophys. J. 3, 309 (1963).

[8] A. D. Hershey, E. Burgi u. L. Ingraham, Biophys. J. 2, 424 (1962).

[9] A. H. Doermann u. L. Boehner, Virology 21, 551 (1963).

[10] G. Streisinger, R. S. Edgar u. G. Harrar Denhardt, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 51, 775 (1964).

[11] C. A. Thomas jr. u. I. Rubenstein, Biophys. J. 4, 94 (1964); L. A. MacHattie, D. A. Ritchie, C. A. Thomas jr. u. C. C. Richardson, J. Mol. Biol. 23, 355 (1967).

[12] A. D. Hershey, E. Burgi u. L. Ingraham, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 49, 748 (1963).

sie für gepaarte rechte und linke Molekülhälften zu erwarten ist, nicht aber für gepaarte rechte Hälften oder gepaarte linke Hälften^[13]. Die Bindungsstellen mußten also in ihrer Struktur komplementär und nicht nur einfache unspezifische Klebestellen sein. Unsere Resultate waren außerdem mit der Annahme terminaler Bindestellen in Einklang, was später elektronenmikroskopisch belegt wurde. Die geschlossene und die offene Form der λ -DNA sind in Abbildung 2 schematisch wiedergegeben.

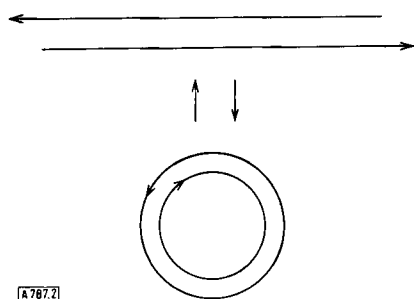


Abb. 2. Gegenseitige Umwandlung von offenen und geschlossenen Formen der λ -DNA. Das bihelicale DNA-Molekül ist durch parallele Linien entgegengesetzter Polarität dargestellt.

Die Phagen T4 und λ repräsentieren zwar nicht erschöpfend alle Möglichkeiten der Phagen-DNA-Struktur^[14], aber sie bieten doch manches Prinzipielle. Um zusammenzufassen, was wir von ihnen gelernt haben, möchte ich in Abbildung 3 drei Typen idealisierter DNA-Moleküle zeigen.

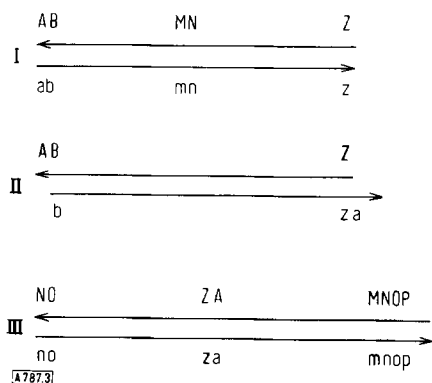


Abb. 3. Drei bihelicale DNA-Moleküle als Informationsdiagramme dargestellt. Jeder große Buchstabe symbolisiert eine beliebige lange Nucleotidsequenz, jeder kleine Buchstabe die komplementäre Sequenz.

Struktur I gibt eine Watson-Crick-Doppelhelix in ihrer einfachsten Form wieder. Tatsächlich aber ist bisher nicht bekannt, daß Struktur I existiert, möglicherweise, weil die Replikation der Enden des Moleküls mechanisch schwer vorstellbar ist.

Struktur II zeigt die besprochene lineare Form der λ -DNA. Man beachte, daß sie auf dem Papier von Struktur I abgeleitet ist, ohne daß Nucleotide weggenommen oder hinzugefügt worden sind. In der Natur kann aber Struktur II nicht aus Struktur I entstanden sein, weil sie die Sequenz za enthält, die in

I fehlt. In Struktur II können A und a bindende Sequenzen genannt werden, und diese müssen nur lang genug sein, um eine spezifische Basenpaarung zu ermöglichen. In der λ -DNA umfassen die bindenden Sequenzen jeweils ungefähr 20 Nucleotide^[15]. Vermutlich umgeht der Phage λ die Schwierigkeit, die Enden zu replizieren, indem er sie abschafft (Abb. 2).

Struktur III gilt für T4-DNA. Sie ist auf dem Papier von Struktur I durch zyklische Permutation abgeleitet, wobei zusätzlich Sequenzwiederholungen an einem Ende angefügt sind. Man sagt, T4-DNA-Moleküle seien zirkular permutiert und meint damit, daß die 200000 möglichen zyklischen Permutationen mit gleicher Häufigkeit vorkommen. Die terminalen Wiederholungen in der T4-DNA sind relativ lang: ungefähr 1 % der Länge des Moleküls, und sie enthalten ungefähr zwei Gene. Das heißt also, die T4-DNA löst das Problem der Replikation der Enden, indem sie sie entbehrlich macht. Die gleiche Eigenschaft schützt die Genfunktion während der Permutation, weil die zerbrochenen Gene in einem bestimmten DNA-Molekül jeweils in einer zweiten, intakten Kopie vorhanden sind.

Die Struktur III hat drei genetische Konsequenzen. Zunächst sind durch Rekombination entstandene Moleküle heterozygot für Genorte, die in den terminalen Repetitionen liegen^[16]. Weiter scheinen solche Heterozygoten so, als ob sie nur ein Ende hätten, und können vor der Segregation replizieren^[9]. Schließlich führt die zirkuläre Permutation zu einer zirkulären Genkarte^[10].

Der Phage T4 kann seine permutierten DNA-Moleküle nicht dadurch erzeugen, daß er spezifische Internucleotidbindungen spaltet, muß sie also irgendwie der Größe nach zurechtschneiden. Im Prinzip könnte er das tun, indem er entweder die Gesamtlänge oder die Länge der terminalen Repetitionen mißt. Vor vielen Jahren suchten George Streisinger und ich nach T4-DNA-Molekülen, die als Folge genetischer Deletionen verkürzt sind. Wir fanden keine. Der Grund ist, daß der Phage T4 sein Chromosom nach Messung der Gesamtlänge schneidet. Demnach werden bei Verkürzung des Genoms die terminalen Repetitionen verlängert^[17].

Auch die für λ -DNA gezeigte Struktur II hat ihre genetischen Konsequenzen. Hier müssen die Enden des Chromosoms durch die Spaltung spezifischer Internucleotidbindungen entstanden sein; daraus folgt, daß Deletionen notwendigerweise das DNA-Molekül verkürzen^[18]. Die Bindungsstellen in der λ -DNA liefern zwar keinen Anlaß für eine zirkuläre Genkarte, erweisen sich aber als Bindeglied in der Mitte des Prophagen und führen zu einer Genkarte des λ -Phagen mit zwei zyklischen Permutationen. Tat-

[15] R. Wu u. A. D. Kaiser, J. Mol. Biol. 35, 523 (1968).

[16] J. Séchaud, G. Streisinger, J. Emrich, J. Newton, H. Lanford, H. Reinhold u. M. Morgan Stahl, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 54, 1333 (1965).

[17] G. Streisinger, J. Emrich u. M. Morgan Stahl, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 57, 292 (1967).

[18] E. Burgi, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 49, 151 (1963).

[13] A. D. Hershey u. E. Burgi, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 53, 325 (1965).

[14] C. A. Thomas jr. u. L. A. MacHattie, Annu. Rev. Biochem. 36, 485 (1967).

sächlich hat *Campbell*^[19] die Notwendigkeit für eine funktionelle Zirkularität des λ -Chromosoms zu einer Zeit vorausgesehen, als die DNA nur als irgend etwas höchst Nebulöses beschrieben werden konnte.

Zusammenfassung

Die Arbeiten mit den beiden Phagen-Spezies führten zu drei Verallgemeinerungen, die wahrscheinlich für alle Viren gelten.

1. Viruspartikeln enthalten ein einziges Molekül Nucleinsäure.
2. Die Moleküle sind spezies-spezifisch und, allerdings mit interessanten Ausnahmen, in Viruspartikeln einer bestimmten Spezies identisch.
3. Verschiedene Virusspezies enthalten Nucleinsäuren, die nicht nur in Länge und Nucleotidsequenz verschieden sind, sondern zusätzlich in mancher unerwarteten Weise. Ich habe nur zwei Beispiele beschrieben: λ -DNA, als Beispiel für terminale bindende Sequenzen, und T4-DNA als Beispiel für zirkuläre Permutation und terminale Repetition von Nucleotidsequenzen.

Nachwort

Im Vorangehenden habe ich bewußt nur einen einzigen roten Faden verfolgt, während ich sowohl Parallelentwicklungen in anderen Laboratorien als auch Arbeiten, die in meinem Laboratorium ohne meine direkte Mitwirkung geleistet worden sind, vernachlässigt habe. Einige dieser Unterlassungen möchte ich jetzt wieder gutmachen.

Der Abbau von DNA-Molekülen durch Scherkräfte ist schon mehrfach vor uns untersucht worden. *Davison*^[20] hat zuerst die extreme Anfälligkeit sehr langer DNA-Moleküle für Scherkräfte bemerkt und mit *Levinthal*^[21] die Theorie der Molekülbrüche abgeleitet. Immerhin konnten wir die stufenweisen

Brüche bei kritischen Scherkräften als erste beobachten. Diese Beobachtung stützte die Theorie und vervollständigte unsere Beweise für die Homogenität der Moleküle.

Davison et al.^[22] haben auch gezeigt, daß Partikeln des Phagen T2 einzelne DNA-Moleküle enthalten, doch versuchten diese Forscher nicht, das Molekulargewicht direkt zu messen.

Physikalische Studien an der DNA waren natürlich schon einige Jahre im Gange, bevor die Analyse der Viruspartikeln begann. Beispielsweise haben *Doty*, *McGill* und *Rice*^[23] eine Beziehung abgeleitet, die unserer Gl. (1) mit einem Exponenten von 0.37 entspricht. Ihre Daten überdeckten den Molekulargewichtsbereich unterhalb von 7 Millionen. Größere Moleküle waren zu dieser Zeit noch nicht bekannt und hätten auch keinesfalls mit den damaligen Methoden untersucht werden können.

Unsere Arbeiten über die Sedimentation der DNA in Rohrzuckerlösungen wären erheblich erleichtert worden, wenn uns *Martins* und *Ames*'^[24] Arbeit über die Sedimentation von Enzymen bekannt gewesen wäre.

Das erste Beispiel einer zirkulären DNA^[25], und auch der erste Beweis für die Existenz nur eines DNA-Moleküls pro Phagenpartikel^[26], war *Sinsheimers* Arbeit mit dem Phagen Φ X 174 zu entnehmen. Seine DNA bildet Einzelstränge von nur 1.7 Millionen Dalton Molekulargewicht und gestattet somit Lichtstreuungsmessungen.

Elizabeth Burgi^[18] hat verminderte Molekulargewichte für die DNA aus λ -Phagen mit Deletionen nachgewiesen, bei denen schon vorher *G. Kellenberger et al.*^[27] gezeigt hatten, daß eine Phagenpartikel weniger DNA enthält.

Eingegangen am 25. Februar 1970 [A 787]
Übersetzt von Dr. Thomas Höpner, Heidelberg

[19] *A. Campbell*, *Advan. Genet.* 11, 101 (1962).

[20] *P. F. Davison*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 45, 1560 (1959).

[21] *C. Levinthal* u. *P. F. Davison*, *J. Mol. Biol.* 3, 674 (1961).

[22] *P. F. Davison*, *D. Freifelder*, *R. Hede* u. *C. Levinthal*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 47, 1123 (1961).

[23] *P. Doty*, *B. McGill* u. *S. Rice*, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 44, 432 (1958).

[24] *R. G. Martin* u. *B. N. Ames*, *J. Biol. Chem.* 236, 1372 (1961).

[25] *W. Fiers* u. *R. L. Sinsheimer*, *J. Mol. Biol.* 5, 408 (1962).

[26] *R. L. Sinsheimer*, *J. Mol. Biol.* 1, 43 (1959).

[27] *G. Kellenberger*, *M. L. Zichichi* u. *J. Weigle*, *J. Mol. Biol.* 3, 399 (1961).