

ANGEWANDTE CHEMIE

87. Jahrgang 1975
Heft 14
Seite 497-526

Biosynthese der Ribonucleinsäuren

Von John P. Richardson^[*]

Die Biosynthese der Ribonucleinsäuren (RNA) umfaßt die Polymerisation von Ribonucleotiden an Desoxyribonucleinsäuren (DNA) als Matrize und die Umwandlung der primär gebildeten Gen-Kopien zu fertigen, „gereiften“ RNA-Molekülen. Der vorliegende Fortschrittsbericht faßt unser gegenwärtiges Verständnis dieser Prozesse kurz zusammen.

1. Einleitung

RNA ist ein bedeutungsvoller und unentbehrlicher Zellbestandteil, der bis zu einem Viertel des Trockengewichts einer Zelle ausmachen kann^[1, 2]. Der größte Teil der RNA spielt bei der Proteinsynthese eine Rolle, doch wird eine kleine Menge auch für die Replikation der DNA benötigt, und andere RNA kann eine regulatorische Funktion haben. Ungefähr die Hälfte der zu einem gegebenen Zeitpunkt synthetisierten RNA liegt in Form stabiler Moleküle vor: Dies sind die ribosomale RNA (rRNA), die ein Strukturelement der Ribosomen ist, und die Transfer-RNA (tRNA), die während der Proteinsynthese zur Anpassung der Aminosäuren an den genetischen Code dient. Die andere Hälfte sind RNA-Moleküle mit sehr geringer Stabilität im Stoffwechsel, und zwar die Messenger-RNA (mRNA) als Matrizen der Proteinsynthese, ferner viele der RNA-Moleküle des Zellkerns als Vorläufer der stabilen RNA und der mRNA, und die RNA-Zwischenstufen, die an der Replikation der DNA beteiligt sind. Die Lebensdauer dieser RNA-Moleküle beträgt oft weniger als ein Zehntel der Lebensdauer einer Zellgeneration. Weil ein großer Teil der RNA instabil ist, gibt die Zusammensetzung einer Zelle ihren der RNA-Bildung gewidmeten Anteil an Synthesekapazität nicht richtig wieder; gewichtsmäßig macht die RNA-Synthese ein Drittel der Synthese aller Makromoleküle aus.

[*] Prof. Dr. J. P. Richardson
Department of Chemistry
Indiana University
Bloomington, Indiana 47401 (USA)

Chemisch gesehen ist RNA ein lineares Polymeres aus Ribonucleotiden, die durch Phosphodiesterbindungen zwischen dem Kohlenstoffatom 5' eines Ribonucleotids und dem Kohlenstoffatom 3' des benachbarten Ribonucleotids verknüpft sind. Die vier normalen Ribonucleotide der RNA enthalten die Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil, doch die stabilen RNA – insbesondere die tRNA – haben auch kleine, aber wichtige Anteile anderer Ribonucleotide, die durch Modifizierung der vier normalen Nucleotide entstehen.

In vielen ihrer chemischen Eigenschaften ähnelt RNA der DNA. Der chemisch bedeutendste Unterschied liegt in den Zuckerresten – RNA enthält Ribose statt der in DNA gefundene

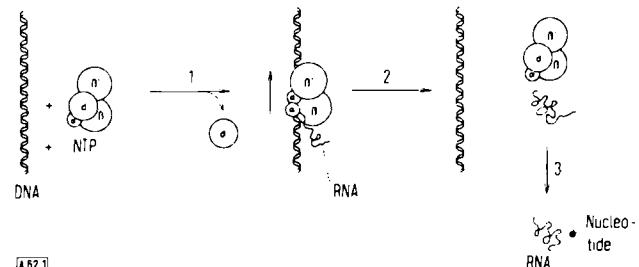


Abb. 1. Schema der RNA-Biosynthese. Wenn RNA-Polymerase (2 γ , β , β' , σ) zusammen mit DNA in Gegenwart beliebiger Nucleosidtriphosphate (NTP) inkubiert wird (Schritt 1), so entsteht ein Komplex aus DNA und RNA-Polymerase RNA-Moleküle. Der σ -Faktor dissoziiert kurz nach dem Beginn einer RNA-Kette. Erreicht das Enzym ein Terminationssignal der Transkription, so dissoziiert es ebenfalls von der Matrize und setzt ein RNA-Molekül frei (Schritt 2). Die RNA-Synthese wird in vielen Fällen durch die Wirkung von Nucleasen, die bestimmte Abschnitte der ursprünglichen Kopie spalten, und durch modifizierende Enzyme, die bestimmte Nucleotide verändern, vervollständigt (Schritt 3).

nen 2'-Desoxyribose – sowie in der Anwesenheit von Uracil als normaler Base anstelle von Thymin (5-Methyluracil). Ferner sind RNA-Moleküle meist kleiner als DNA-Moleküle und gewöhnlich einsträngig, während DNA doppelsträngig ist. Dennoch ist die Ähnlichkeit groß genug, daß RNA stabile Komplexe mit DNA bilden kann^[3]. Derartige Komplexe haben die Struktur einer regulären Hybrid-Doppelhelix, in der der RNA-Strang antiparallel zu einem komplementären DNA-Strang verläuft^[4]. Die Bildung solcher Strukturen ist der Schlüssel zu einem möglichen Mechanismus der RNA-Polymerisation.

Die Biosynthese der RNA-Moleküle geschieht in zwei Hauptschritten, die schematisch in Abb. 1 dargestellt sind.

2. Die Polymerisation von Ribonucleotiden

2.1. RNA-Polymerasen

Nahezu die gesamte RNA wird durch einen Transkription genannten Prozeß direkt an DNA-Matrizen („template“) polymerisiert. Das geht aus der Tatsache hervor, daß im gleichen Organismus nahezu sämtliche RNA homolog zu DNA-Sequenzen ist^[5], daß die stärkste RNA-Syntheseaktivität in DNA-abhängigen Enzymen gefunden wird^[6], und daß die gesamte RNA-Synthese durch Stoffe wie Actinomycin D blockiert werden kann, die sich sehr fest an DNA binden^[7].

Eine bekannte Ausnahme bilden einige Virus-Ribonucleinsäuren, die direkt an RNA-Matrizen repliziert werden. Ferner können Ribonucleotide durch Nucleotidyl-Transferasen an das 3'-Ende einiger RNA ankondensiert werden, ohne daß eine Matrize erforderlich wäre. Obwohl es schon seit langem für möglich gehalten wurde, daß die RNA der Zellen auch an RNA-Matrizen dupliziert werden kann, ließ sich diese Hypothese erst stützen, als man kürzlich in Kaninchen-Reticulocyten eine RNA-abhängige RNA-Polymerase fand^[8]. Da diese Zellen keine DNA mehr enthalten, wird ihre mRNA, besonders die für das Globin, möglicherweise durch ein solches Enzym gebildet; dies ist allerdings noch unbewiesen.

Das für die RNA-Synthese an DNA-Matrizen verantwortliche Enzym heißt DNA-abhängige RNA-Polymerase. In Bakterien wurde nur eine Form (Grundstruktur) dieses Enzyms gefunden^[9]. Sie wird durch Rifampicin gehemmt und kann durch Bindung anderer Proteinfaktoren oder chemische Änderungen in ihrer Aktivität modifiziert werden. Eine andere Form hat man für die mit der Replikation des Chromosoms zusammenhängende RNA-Synthese postuliert^[10], denn diese Synthese wird anscheinend nicht durch Rifampicin gehemmt^[11]. Jedoch konnte die RNA-Polymerase, der diese Aktivität zugeschrieben wird, noch nicht isoliert werden.

In eukaryotischen Zellen lassen sich vier Formen der RNA-Polymerase unterscheiden^[12], und zwar eine in den Mitochondrien und drei weitere im Zellkern, von denen wiederum eine aus dem Nucleolus, dem Syntheseort ribosomaler RNA-Vorläufer, stammt. Das häufigere der Enzyme des Zellkerns wird durch geringe Mengen des Pilzgiftes α -Amanitin gehemmt. Dies Enzym macht man für die Synthese von mRNA-Vorläufern verantwortlich; das andere nucleare Enzym scheint die Synthese von 5S-rRNA und tRNA zu bewirken^[13].

Die meisten RNA-Polymerasen sind komplizierte, anscheinend unsymmetrisch und aus mehreren Untereinheiten aufgebaute Proteine. Bei der RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*

hat die kleinste Einheit mit RNA-Polymeraseaktivität, das Core-Enzym, ein Molekulargewicht von 390000^[9, 14]. Es besteht aus vier Untereinheiten und enthält ein fest gebundenes Zink-Ion^[15]. Ein Polypeptid, die α -Untereinheit, liegt in zwei Kopien vor. Die beiden anderen, β und β' , sind sehr große Polypeptide mit Molekulargewichten > 150000 und trotz ähnlicher Größe deutlich verschieden^[16]. Das hochgereinigte Enzym enthält meist noch zwei weitere Polypeptide. Eins von ihnen, der σ -Faktor, wird für den Beginn der Transkription an bestimmten DNA-Matrizen benötigt; obwohl er sich fest genug an das freie Enzym bindet, um ihn als Untereinheit aufzufassen, wird er freigesetzt, wenn das Enzym mit der Polymerisation einer RNA-Kette beginnt. RNA-Polymerase einschließlich des σ -Faktors nennt man das Holoenzym. Das andere Polypeptid, ω , besitzt ein Molekulargewicht von etwa 10000 und ist vielleicht eine Verunreinigung, obwohl ω -haltige Enzympräparationen gewöhnlich eine etwas höhere spezifische Aktivität aufweisen als ω -freie.

Es gibt keinen Anhaltspunkt dafür, daß Nucleinsäuren selbst ein wichtiger ständiger Bestandteil der RNA-Polymerase sind. Allerdings weiß man, daß unter bestimmten Bedingungen Nucleotide und Phosphat kovalent gebunden werden; diese Substituenten könnten eine wichtige Rolle bei der Modulation der Enzymaktivität spielen^[17]. Wenn Core-RNA-Polymerase aus exponentiell wachsenden *E. coli*-Zellen isoliert wird, scheint sie weniger als 0.2 mol Phosphor pro mol Enzym zu enthalten, so daß diese Substituenten für die Aktivität während des normalen Zellwachstums nicht benötigt werden dürften. Andererseits wurde darüber berichtet, daß die Phosphorylierung des σ -Faktors mit einer Protein-Kinase aus Kaninchenmuskel die RNA-Polymerase beträchtlich aktivieren kann^[18]. Die Bedeutung dieses Befundes ist unklar, doch hängt sie möglicherweise mit der Existenz inaktiver Polypeptide von gleicher Größe wie der σ -Faktor in einigen Enzympräparationen zusammen^[19].

Die nucleolare und die häufigere nucleoplasmatische RNA-Polymerase aus Zellkernen des Kalbsthymus und der Rattenleber sind noch größere Proteine als das *E. coli*-Enzym^[12]. Sie bestehen ebenfalls aus mehreren Untereinheiten, darunter Peptiden, die sogar größer sind als die β, β' -Untereinheiten des *E. coli*-Enzyms. Es ist noch unbekannt, ob irgendwelche dieser Untereinheiten Initiationsfaktoren wie der σ -Faktor sind.

Im Gegensatz dazu besteht die RNA-Polymerase aus Mitochondrien von *Neurospora crassa* nur aus einer einzigen Peptidkette vom Molekulargewicht 64000^[20], und die von den Bakteriophagen T3 und T7 codierten Enzyme sind einzelne Polypeptide vom Molekulargewicht ca. 107000^[21, 22]. Eine komplizierte Proteinstruktur ist daher keine Vorbedingung für eine RNA-Polymerase. Allerdings wirken diese Enzyme an einfacheren Genomen, und die Bakteriophagen-Enzyme zeichnen sich durch strenge Spezifität aus. Die komplizierteren Strukturen der bakteriellen Enzyme und der Kern-Enzyme könnten demnach charakteristisch für solche Polymerasen sein, die unter strikter Regulation mehrere Arten genetischer Bereiche zu erkennen vermögen.

2.2. Die Reaktion

Sämtliche RNA wird durch Polymerisation von Ribonucleosidtriphosphaten (ATP, GTP, CTP und UTP) in einer von zweiwertigen Kationen (gewöhnlich Mg^{2+} -Ionen) abhängigen Reaktion synthetisiert. Für jedes an die wachsende Kette ange-

fügte Nucleotid wird ein Molekül Pyrophosphat freigesetzt. Der postulierte Verlauf dieser Polymerisationsreaktion ist in Abb. 2 dargestellt: Die 3'-Hydroxygruppe des 3'-terminalen Ribonucleotids der wachsenden RNA-Kette wird aktiviert und greift das α -Phosphoratom (d. h. das erste Phosphoratom) eines korrekt angelagerten Nucleosidtriphosphats nucleophil an. Die entstehende Phosphodiesterbindung wird auf Kosten der Anhydridbindung zwischen dem α - und dem β -Phosphoratom hergestellt, so daß Pyrophosphat austritt. Die korrekte Position des neu hinzukommenden Nucleotids beruht wahrscheinlich auf seiner Bindung an das Enzym und an die DNA-Matrize.

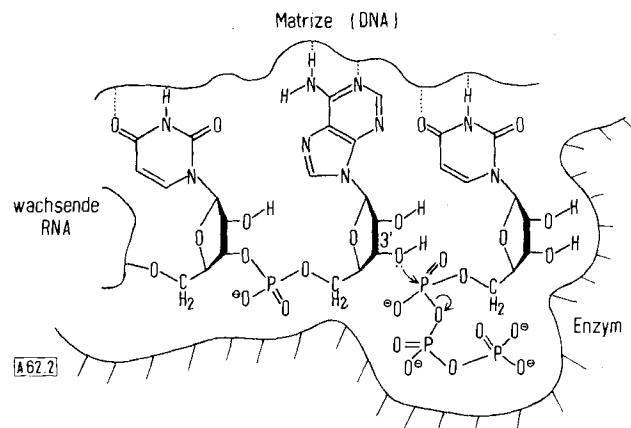


Abb. 2. Ankondensation eines Nucleotids an das 3'-Ende einer wachsenden RNA-Kette.

Obwohl die Änderung der freien Energie für die Anfügung eines Monomeren nicht groß ist ($\Delta G^0 \approx -0.5 \text{ kcal/mol}$)^[23], schreitet die Reaktion fort, solange die Pyrophosphat-Konzentration gering ist. Physiologisch wird dies durch Hydrolyse des Pyrophosphats zu Orthophosphat sichergestellt, die als sehr günstige Reaktion ($\Delta G^0 = -7.0 \text{ kcal/mol}$) von den ubiquitären Pyrophosphatasen katalysiert wird. Es ist nicht anzunehmen, daß ein weiterer Abbau von Nucleosidtriphosphaten nötig ist, um die Polymerisation voran zu treiben. Das reine Enzym scheint keine Nucleotidhydrolyse zu katalysieren; die Geschwindigkeit der RNA-Kettenpolymerisation *in vitro* stimmt praktisch mit der *in vivo* überein, wenn man physiologische Substrat-Konzentrationen anwendet^[24, 25]. In bei 37°C wachsendem *E. coli* beträgt diese Geschwindigkeit 50 Nucleotide pro Sekunde für RNA aller Typen und Größen^[26, 27]. Es dauert demnach ungefähr eine Minute, um ein RNA-Molekül vom Format der größeren ribosomalen RNA mit einem Molekulargewicht von $1.1 \cdot 10^6$ zu synthetisieren. Zum Vergleich: Die Replikation der DNA in der gleichen Zelle hat eine Geschwindigkeit von beinahe 900 Nucleotiden pro Sekunde und wachsende Kette.

Die Richtung des Kettenwachstums der RNA für die durch *E. coli*-RNA-Polymerase katalysierte Reaktion geht aus Abb. 2 hervor: Jedes hinzukommende Nucleotid wird an das Ende mit der freien 3'-Hydroxygruppe ankondensiert^[29]. Diesen Vorgang nennt man Elongation. Die Kettensynthese kann mit der gleichen Reaktion gestartet werden, die zur Elongation dient; nur wirkt anstelle der wachsenden RNA-Kette ein Nucleosidtriphosphat als Acceptor. Dieses erste Nucleotid ist das einzige, das als Triphosphat in die Kette eingebaut wird, d. h. ohne Verlust des β - und des γ -Phosphoratoms.

Im allgemeinen ist das Start-Nucleotid ATP oder GTP^[27]. Es ist denkbar, daß diese Spezifität ein Merkmal aller vom

Enzym erkannten Initiationsstellen ist; es könnte aber auch eine Wechselwirkung des Enzyms mit den Purinnucleotiden die Anlagerung des Enzyms an eine Initiationsstelle beeinflussen. ATP und GTP binden beide an je zwei Zentren des freien Enzyms, während UTP und CTP recht schwach und nur an eins dieser Zentren binden^[29]. Die zusätzliche Bindungsstelle für Purinnucleotide kann an den Startreaktionen einschließlich der korrekten Anlagerung des Enzyms an die DNA-Matrize beteiligt sein.

2.3. Die Funktion der DNA

Bei den DNA-abhängigen RNA-Polymerasen wirkt DNA als Muster für den Zusammenbau der RNA. Wenn diese Matrize und irgendwelche der von ihr spezifizierten Nucleosidtriphosphate fehlen, wird keine RNA synthetisiert. Die besten Matrizen für die meisten Enzyme sind Doppelhelix-DNA-Moleküle, doch können auch einzelsträngige DNA – und unter bestimmten Bedingungen sogar RNA – die Doppelhelix-DNA ersetzen, wenn auch mit viel geringerer Aktivität; bei DNA-Sättigung hat RNA-Polymerase aus *E. coli* in Gegenwart einzelsträngiger DNA nur ein Zehntel der Aktivität wie mit einer guten DNA-Doppelhelix^[6].

Eine Analyse der von denaturierter DNA transkribierten Bereiche weist darauf hin, daß das Enzym weniger gut diskriminiert, wenn die Matrize einzelsträngig ist^[30]: Offenbar kann RNA-Polymerase die Synthese an wesentlich mehr Bezirken einer einzelsträngigen DNA starten als an einer Doppelhelix, darunter auch an solchen, die in der Zelle nicht transkribiert werden. Die geringere Geschwindigkeit der RNA-Synthese führt also nicht von einem Mangel an Initiationspunkten her, sondern daher, daß das Kettenwachstum der RNA langsamer, der Kettenabbruch häufiger, und vielleicht auch die Initiation verlangsamt ist^[28, 31].

Der Gesamtorgang der Transkription an einer Doppelhelix-DNA ist in Bezug auf die Struktur dieser DNA vollkommen konservativ^[32]; während der RNA-Synthese erfolgt keine bleibende Veränderung der DNA. Allerdings wird die DNA während ihrer Matrizenfunktion fest mit dem Enzym und der wachsenden RNA-Kette verbunden^[33]. In manchen Fällen kann das Enzym denaturiert werden, und man erhält eine noch mit der DNA verhaftete RNA^[34], aber meist führt eine Ablösung des Enzyms auch zu einer spontanen Dissoziation der RNA^[33]. Ferner ist der größte Teil der wachsenden RNA einem Abbau durch Ribonuclease zugänglich. Diese Befunde lassen erkennen, daß RNA und DNA zwar in direkter Wechselwirkung stehen, daß der Bezirk dieser Wechselwirkung aber wahrscheinlich klein ist und durch das Enzym stabilisiert werden muß.

Es sind zwei Modelle vorgeschlagen worden, um zu erklären, wie eine doppelsträngige DNA als Matrize für die Bildung einer freien einzelsträngigen RNA benutzt werden kann, ohne die DNA-Struktur bleibend zu verändern. Im einen Modell^[35, 36] wird ein kurzer einzelsträngiger Abschnitt der DNA, der durch lokale Aufdrehung der Helix entsteht, als Matrize angenommen, wobei der Vorgang dem von Watson und Crick für die DNA-Duplikation vorgeschlagenen ähnelt; eine gegebene Base des DNA-Stranges würde am Enzym nur die Bindung desjenigen Nucleotids erlauben, das das richtige Watson-Crick-Basenpaar ergibt (Abb. 3a). In diesem Fall wird die RNA wahrscheinlich mit dem freien Strang der DNA-Matrize eine kurze Hybridhelix bilden, die aber während der Polymeri-

sation durch Rückbildung der stabileren DNA-DNA-Helix ersetzt wird.

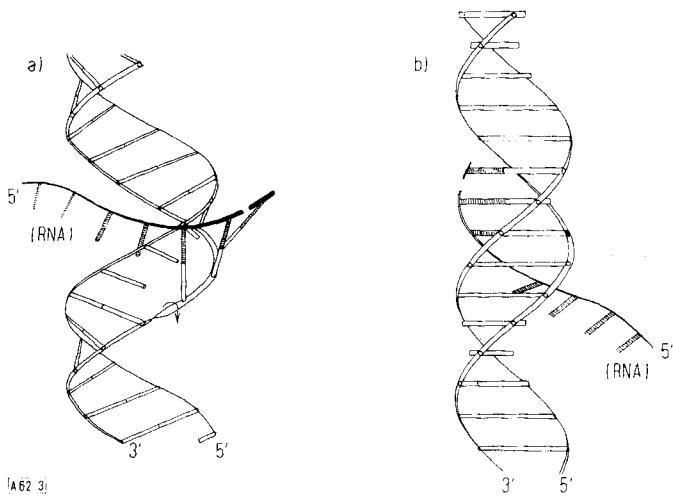


Abb. 3. Modelle für die Wechselwirkung eines wachsenden RNA-Moleküls a) mit nur einem Strang, b) mit beiden Strängen der Matrizen-DNA. Bei a) liegt die DNA in der A-Form, bei b) in der B-Form vor.

Beim alternativen Modell^[37] trennen sich die beiden DNA-Stränge nicht völlig, sondern die RNA wird in der tiefen Furche der Doppelhelix gebildet, indem die monomeren Ribonucleotide sich an *beide* Basen jedes Basenpaares binden. Die spezifischen Wechselwirkungen bei dieser Art Bindung sind an Molekülmödellen zu demonstrieren^[38] (Abb. 3 b).

Der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden Modellen ist, daß entweder ein Einzelstrang oder aber beide Stränge als Matrize benutzt werden. Der stärkste Beweis zugunsten des ersten Modells ist, daß einzelsträngige DNA als Matrize dienen kann; demnach nutzt das Enzym die Watson-Crick-Basenpaarung zur Wechselwirkung aus^[35]. Jedoch sprechen das langsame Kettenwachstum und der häufige Kettenabbruch an einzelsträngiger DNA dafür, daß der zweite DNA-Strang ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung dieser Wechselwirkung spielt. Da beide Modelle eine Verdrehung und teilweise Entspiralisierung der Helix erfordern, genügt die Tatsache, daß RNA-Polymerase die DNA zur Aufdrehung um etwa 180° pro Enzymmolekül veranlaßt^[39], nicht zur Stützung eines der beiden Modelle. Es ist vielmehr nötig, die Beteiligung entweder nur eines oder beider Stränge als Matrize zu zeigen, doch dieser Beweis ist erst noch zu führen.

3. Die Selektivität der Transkription

3.1. Initiation

Die Synthese spezifischer RNA-Moleküle ist das Ergebnis einer Initiation und Termination der Transkription an spezifischen Punkten der DNA-Matrize^[40]. Die DNA-abhängige RNA-Polymerase aus *E. coli* ist in der Lage, die auf der DNA zur Initiation vorgesehene Stelle auszuwählen; die Initiation erfolgt nicht zufällig, und in Gegenwart des σ-Faktors können die Initiationsstellen normale Doppelhelixabschnitte der DNA sein. Auch das Core-Enzym hat eine begrenzte Fähigkeit zum Start der Synthese einer spezifischen RNA; es kann bestimmte einzelsträngige Abschnitte dazu benutzen und vielleicht auch doppelsträngige Segmente zu einem – langsamen – Start heranziehen. Die Hauptfunktion des σ-Faktors besteht darin, die Wechselwirkung zwischen Enzym und Initiationsstelle zu

stabilisieren und die unspezifische Wechselwirkung, die die RNA-Polymerase mit praktisch jedem Bereich der DNA eingehen kann, zu destabilisieren. Ursprünglich hatte man vermutet, daß der σ-Faktor direkt die Erkennung einer bestimmten DNA-Region steuert^[41]; es konnten aber keine weiteren σ-Faktoren gereinigt werden, die der Aktivität der Core-RNA-Polymerase deutlich verschiedene Spezifitäten aufprägen. Daher steht eine starke Stütze dieser Anschauung noch aus.

Ein zweiter σ-Faktor ist aus *E. coli* als Bestandteil einer kleineren RNA-Polymerase-Fraktion isoliert worden. Dies neue, σ' genannte Protein besitzt das Molekulargewicht 56 000 und bindet sich fester an das Core-Enzym als der σ-Faktor^[42]. σ' erfüllt wahrscheinlich die gleichen Funktionen wie σ; σ steigert die Aktivität des mit σ' gesättigten Enzyms nicht weiter. In der Spezifität konnten keine Unterschiede gefunden werden, wenn man davon absieht, daß σ' die Neusynthese von Ribohomopolymeren und die DNA-abhängige Synthese von Polyadenylsäure besser katalysiert^[43]. In der Größe ähnelt σ' aus *Escherichia coli* dem zusammen mit RNA-Polymerase aus *Bacillus subtilis* isolierten σ. Da der σ-Faktor aus *E. coli* den σ-Faktor aus *B. subtilis* ersetzen kann, scheint die grundlegende Wechselwirkung zwischen Faktor und Core-Enzym in verschiedenen Bakterienarten konserviert worden zu sein^[44].

Das Modell zur Erkennung der Initiationsstelle der DNA durch RNA-Polymerase, wie man es sich gegenwärtig vorstellt^[40], sieht vor, daß das Enzym an zufälligen Stellen der DNA-Moleküle rasch assoziiert und wieder dissoziiert, bis es eine besondere Stelle erkennt, an der es einen festen binären Komplex bildet (Abb. 4). Dieser Komplex steht im Gleichgewicht mit einem aktivierten Komplex, in dem die DNA-Stränge sich aufdrehen und die DNA-Basen freigeben. Am aktivierten Komplex kann das Enzym eine RNA-Kette beginnen. Viele Aspekte dieses Modells ließen sich stützen, indem man die Bindung von RNA-Polymerase an DNA des Phagen T7 in Abwesenheit von Nucleosidtriphosphaten und die für einen raschen Kettenstart an RNA-Polymerase-DNA-Komplexen nötigen Voraussetzungen untersuchte. Das Schema berücksichtigt nicht, welchen Einfluß die Nucleosidtriphosphate auf die Bindungs- und Erkennungsschritte haben, doch darf man annehmen, daß das Enzym auch ohne Beteiligung von Nucleotiden sehr dicht an der Initiationsstelle binden kann.

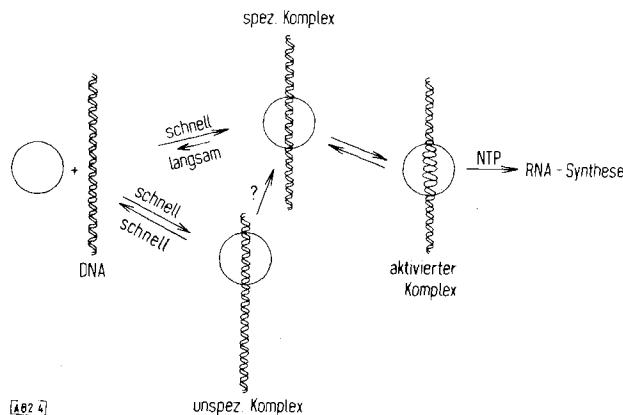


Abb. 4. Modell der Erkennung und Aktivierung des Initiationsortes auf der DNA durch RNA-Polymerase (Kreis). NTP = beliebige Nucleosidtriphosphate (verändert nach [40]).

Das genetische Element, das wahrscheinlich über die Initiation einer RNA-Kette entscheidet, heißt Promoter^[45]: Mutationen im Promoter-Bereich beeinflussen die Geschwindigkeit der Transkription der von diesem Promoter gesteuerten geneti-

schen Einheit. Zwei solcher mutierten Promoter, die die Transkription des N-Gens im λ -Phagen bestimmen, wurden etwa 33 Nucleotide von der DNA-Sequenz entfernt kartiert, die das 5'-Ende der RNA-Kopie des λ N-Gens spezifiziert^[46-48]. Obwohl demnach der Promoter-Ort mit der DNA-Sequenz, deren Transkription er kontrolliert, weder zusammenfällt noch ihr unmittelbar benachbart ist, liegt er doch innerhalb der 40 Basenpaare, die wahrscheinlich von einem einzigen RNA-Polymerase-Molekül bedeckt werden können. Der Promoter ist damit nahe genug, um direkt die Fähigkeit des Enzyms zu beeinflussen, Matrizensequenzen zum Start eines RNA-Moleküls abzulesen.

Der DNA-Abschnitt zwischen dem Beginn der N-Gen-Kopie und den Promoter-Mutationen ist sequenziert worden^[48]; die Sequenz zeigt mehrere zweizählige Drehachsen (Abb. 5). Manche dieser symmetrischen Stellen werden möglicherweise von regulatorischen λ -Proteinen einschließlich des λ -Repressors erkannt, und eine von ihnen kann für die Erkennung durch RNA-Polymerase wichtig sein. Wenn dies der Fall ist, gibt es wahrscheinlich auch eine Symmetrie in der RNA-Polymerase-Struktur; sie müßte die α -Untereinheit einschließen, weil dies die einzige doppelt vorhandene ist. Eine Stelle dieser λ -DNA-Sequenz, die durch die Hind-II-Restriktionsnuclease erkannt wird, ist ebenfalls in Abb. 5 eingezeichnet. Wenn RNA-Polymerase an λ -DNA gebunden ist, so kann die Restriktionsnuclease die λ -DNA nicht mehr an dieser Stelle spalten^[47, 49]. Auch andere Stellen der λ -DNA und einiger anderer DNA-Moleküle sind durch Bindung von RNA-Polymerase gegen die Nucleaseaktivität des Restriktionsenzymes geschützt^[49]. Allerdings werden die meisten der auf diesen DNA-Molekülen durch die Nuclease erkannten Stellen nicht durch RNA-Polymerase geschützt. Offenbar genügt eine für die Nuclease ausreichende Sequenz noch nicht als komplett Erkennungsstelle für RNA-Polymerase; immerhin könnte die Sequenz zumindest für eine Art von Polymerase-Bindung notwendig sein.

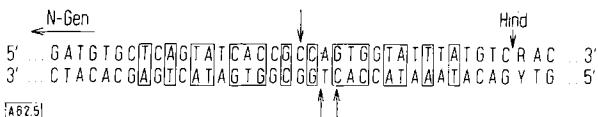


Abb. 5. Nucleotidsequenz einer λ -Operator-Promoter-Region (nach [48]). An der markierten Stelle links (GAT) beginnt die Transkription des N-Gens. Es lassen sich mehrere zweizählige Drehachsen angeben. Der vertikale Pfeil oben kennzeichnet die Drehachse für die umrandeten Sequenzen; zwei weitere Drehachsen sind unter der Sequenz angedeutet. Die Spaltstelle für Hind-Restriktionsnuclease ist ebenfalls eingezeichnet. R = Purinnucleotid, Y = Pyrimidinnucleotid.

Obwohl man keine σ -Faktoren mit nachweisbaren Spezifitätsunterschieden kennt, gibt es viele Proteine, die zusammen mit dem Holoenzym die Selektivität der Transkription beeinflussen. Die am besten charakterisierten Proteine dieser Art sind die Repressoren des Lactose-^[50] und Galaktose-Operons^[51] sowie für die frühen Transkriptionseinheiten der DNA des Bakteriophagen λ ^[52]. Diese Repressoren verhindern spezifisch die Transkription der von ihnen kontrollierten Genorte. An einer Bakteriophagen-DNA, die Sequenzen des Lactose-Operons trägt, blockiert der Lactose-Repressor nur die Transkription dieser Sequenzen und nicht die der Bakteriophagen-Gene^[53]. Ebenso hemmt der λ -Repressor spezifisch die Transkription der ersten λ -DNA-Abschnitte, aber nicht die Transkription von DNA des Bakteriophagen 434, die nahe ver-

wandt mit der λ -DNA, aber immun gegen die Wirkung des λ -Repressors ist^[52].

Repressor-Moleküle binden sich bekanntlich sehr fest und spezifisch an die Operator-Gene einer DNA. Da diese Operator-Bereiche jenen Bereichen naheliegen oder mit ihnen überlappen, die die RNA-Polymerase zur Initiation der Synthese der vom Repressor kontrollierten genetischen Einheit erkennt, ist es gut denkbar, daß die Repressor-Bindung rein physikalisch die Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase verhindert. Am λ -Repressor ließ sich dies demonstrieren^[54].

Als andere Möglichkeit könnte der Repressor das Enzym auch daran hindern, die von ihm besetzte DNA-Stelle zu passieren oder sich weiterzubewegen; auch für diese Wirkungsweise gibt es einige Hinweise^[55]. Die in Abb. 5 angegebenen Sequenzen der λ -DNA enthalten eine vom λ -Repressor erkannte Stelle. In diesem Fall scheint die Transkription gerade außerhalb der vom Repressor erkannten Region zu starten. Dagegen schließt das Transkriptionsprodukt eines Lactose-Operons mit einer besonders aktiven Promoter-Mutation auch die Sequenzen des Lactose-Operators ein^[56, 57]. Daher scheinen Repressor-Operator-Wechselwirkungen die Transkription der von ihnen regulierten Einheit auf mehreren Wegen zu beeinflussen.

Es sind zwei Faktoren isoliert worden, die die Transkription bestimmter genetischer Bereiche spezifisch *aktivieren*. Einer ist das Produkt des Gens C im Arabinose-Operon von *E. coli*. Dies Protein stimuliert in Gegenwart von L-Arabinose die Transkription der für die Enzyme des Arabinose-Stoffwechsels codierenden DNA-Abschnitte^[58, 59]; seine Wirkungsweise ist noch ungeklärt. Der andere Faktor, der unter Namen wie „Katabolit-Gen-Aktivatorprotein“ oder „cyclo-AMP-Rezeptorprotein“ bekannt ist, wird zusammen mit seinem allosterischen Effektor 3':5'-cyclo-AMP unter anderem zur Transkription von Sequenzen benötigt, die für die Proteine der Lactose-, Galaktose- und Arabinose-Verwertung codieren^[60]. Dieser Faktor bindet sich an DNA und erfordert 3':5'-cyclo-AMP zur Funktionsfähigkeit^[61]. Man hat vorgeschlagen, daß er die Aktivierungstemperatur zum Aufwinden der DNA an Initiationsstellen der betroffenen Transkriptionseinheiten herabsetzt^[40].

Es gibt außerdem mehrere Proteinfaktoren, an denen sich eine Aktivierung der Transkription von DNA-Matrizen zeigen ließ, doch ist die Rolle der meisten dieser Faktoren unbekannt^[40]. Einige Proteine, die zur Aktivierung von Genabschnitten auf T4-DNA benötigt werden, haben sich als Untereinheiten der aus T4-infizierten *E. coli*-Zellen isolierten RNA-Polymerase erwiesen^[62, 63]. Wiederum ist nicht bekannt, wie die Proteine diese Aktivierung zustandebringen.

3.2. Termination

An Bakterien- und den größeren Bakteriophagen-Genomen ist ein spezifischer Abbruch der Transkription erforderlich, um das fortgesetzte Kopieren einer genetischen Einheit in eine benachbarte zu unterbinden, die unabhängig kontrolliert sein sollte. Die *E. coli*-RNA-Polymerase erkennt offenbar bestimmte DNA-Sequenzen als Terminationssignale, da viele der in vitro synthetisierten Transkriptionsprodukte wohldefinierte Moleküle sind, die einer bestimmten genetischen Einheit der DNA entsprechen^[40]. Die Spezifität der Termination drückt sich auch in einer charakteristischen Sequenz -U-U-U-U-U-U aus, die am oder nahe dem 3'-Ende mehrerer

in vitro synthetisierter RNA-Moleküle gefunden wurde; in den meisten Fällen heißt diese Sequenz -Purinnucleotid-(U)₆-A_{OH}^[64, 65].

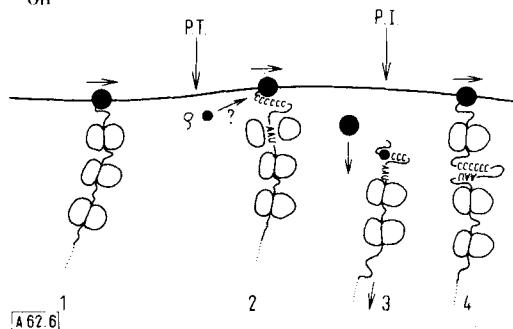


Abb. 6. Modell für die Funktion des ρ -Faktors. P.T. und P.I. markieren genetische Positionen für Terminations- bzw. Initiationssignale der Proteinsynthese. In 1 nähert sich wachsende RNA mit Ribosomen einer Terminationsstelle. In Zustand 2 wird ein Stoppsignal (UAA) auf der wachsenden RNA ein. Ribosom entlassen, und die RNA-Polymerase (großer schwarzer Kreis) produziert einen C-reichen RNA-Strang. In Zustand 3 sind als Folge einer Erkennung der C-reichen Region durch ρ RNA und RNA-Polymerase freigesetzt worden; ein Molekül ρ haftet noch am C-reichen RNA-Abschnitt. 4 zeigt eine wachsende RNA, deren Synthese nicht durch ρ beendet wurde. Wenn das Terminationssignal (P.T.) in einem Cistron (Strukturgenen) als Folge einer zu einem „Nonsense“-Codon führenden Mutation auftaucht, hat ρ die Möglichkeit, an C-reichen Abschnitten der wachsenden RNA zu wirken, die normalerweise während der Translation durch Ribosomen verdeckt oder blockiert wären. Dies Modell erklärt auch die durch Nonsense-Codons erzeugte starke Polarität.

Es gibt noch mindestens eine weitere Art Terminationssignal. Dies Signal wird in Gegenwart eines zusätzlichen Proteins, des ρ -Faktors, erkannt^[66]. In diesem Fall gibt es jedoch Hinweise, daß eine Nucleotidsequenz der RNA und nicht der DNA erkannt wird^[67]. Einige neuere Experimente deuten darauf hin, daß ρ mit spezifischen Sequenzen wachsender RNA-Moleküle in Wechselwirkung tritt und eine Nucleosidtriphosphat-Phosphohydrolase (oder -Phosphotransferase) aktiviert, die für den durch den ρ -Faktor induzierten Abbruch der RNA-Synthese wesentlich ist^[68, 69]. Diese Sequenz liegt vielleicht nahe, aber nicht genau am Ende der fertigen RNA-Kette, weil es unwahrscheinlich ist, daß auch ρ noch in das Polymerisationszentrum der RNA-Polymerase passen würde. Aus Untersuchungen über den Einfluß von ρ auf die Transkription der DNA-Abschnitte des gal- und lac-Operons hat man geschlossen, daß die Funktion von ρ vielleicht darin besteht, die Übersetzung der Gene am Ende einer Transkriptionseinheit zu vermindern, verglichen mit den Genen nahe dem Beginn einer Transkriptionseinheit^[70]. Ein Modell für die Funktion von ρ ist in Abb. 6 dargestellt.

4. Reifungsprozesse nach der Transkription

Die Synthese vieler RNA-Moleküle erfordert noch weitere biochemische Schritte im Anschluß an die Transkription der RNA-Nucleotidsequenzen von der DNA-Matrize. Darunter fallen die Abspaltung überzähliger Nucleotide von den Transkriptionsprodukten, die Modifizierung einiger Nucleotide und in einigen Fällen ein Anbau von Nucleotiden an das 3'-Ende der RNA in einer nicht von DNA-Matrizen abhängigen Reaktion.

4.1. Die Entfernung überzähliger Nucleotide

Die besten Beispiele für die Spaltung bestimmter Sequenzen stammen aus Untersuchungen über die Synthese ribosomaler

RNA in eukaryotischen Zellen^[71]. In HeLa-Zellen leiten sich beispielsweise die 18S-, die 28S- und die 7S-rRNA von einem einzigen Vorläufermolekül ab, das beinahe doppelt so groß ist wie die rRNA-Produkte zusammengenommen. Dieser Vorläufer hat lange Bereiche von RNA-Nucleotiden, die beim Reifungsprozeß abgebaut werden.

In Bakterien liegen die Sequenzen für die 16S- und 23S-rRNA ebenfalls in einer Transkriptionseinheit^[72], aber in diesem Fall läßt sich eine RNA, die sowohl vollständige 16S- als auch 23S-rRNA-Sequenzen enthält, kaum entdecken, weil der Teil mit der 16S-rRNA-Sequenz schon abgespalten wird, ehe der 23S-Abschnitt fertiggestellt ist. Deutliche Mengen dieses „langen“ RNA-Moleküls lassen sich jedoch in einer Mutante mit verringertem Gehalt an Ribonuclease III finden, einer für doppelsträngige RNA spezifischen Endonuclease^[73]. Dies weist darauf hin, daß RNase III für die Abtrennung des Teils mit den 16S-Sequenzen vom Teil mit den 23S-Sequenzen verantwortlich ist. Weitere Schritte bei der Reifung der ribosomalen RNA in *E.coli* betreffen die Entfernung einiger weniger zusätzlicher Nucleotide an den 5'- und 3'-Enden der getrennten Vorläufer. Insgesamt werden etwa 22 % der Nucleotide des ursprünglichen Transkriptionsproduktes abgebaut^[74]. Demnach bleibt in *E.coli* ein größerer Teil der transkribierten ribosomalen RNA erhalten als in HeLa-Zellen.

Die Synthese von tRNA-Molekülen scheint ebenfalls nach dem Muster von Spaltung der Kette und Entfernung zusätzlicher Nucleotide zu erfolgen. Auf den Chromosomen von *E.coli*^[75] und des Bakteriophagen T4^[76, 77] liegen mehrere Gene für tRNA-Moleküle in einem Cluster zusammen. Wenn man nur kurze Zeit radioaktiv markiert, so ist es auch möglich, markierte RNA-Moleküle zu finden, die die Sequenzen für zwei oder mehr tRNA-Moleküle enthalten. Da Segmente mit Sequenzen für noch andere tRNA schon während der RNA-Polymerisation abgespalten werden können, enthält die Transkriptionseinheit für tRNA vielleicht Sequenzen für mehrere Spezies zuzüglich Verbindungsstücken, die abgebaut werden, wenn die primäre Kopie in fertige tRNA-Moleküle umgewandelt wird. Eine Darstellung dieser Schritte enthält Abb. 7.

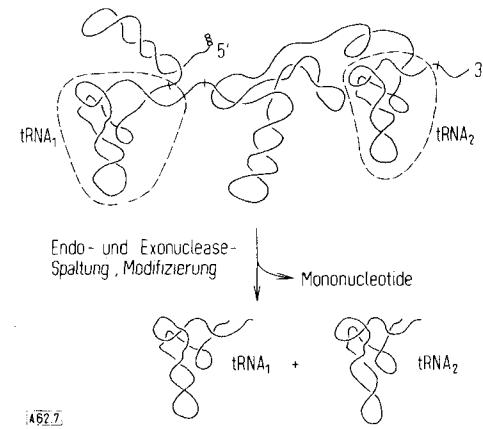


Abb. 7. Verarbeitung eines Transkriptionsproduktes, das Sequenzen für die beiden fertigen tRNA-Moleküle tRNA₁ und tRNA₂ enthält. Die Kreise am 5'-Ende deuten den Triphosphatrest an.

Die Isolierung eines Vorläufers der tyrosinspezifischen tRNA (ptrNA^{Tyr}) aus *E.coli* hat es möglich gemacht, einige der an der Entfernung zusätzlicher Nucleotide vom 5'- und 3'-Ende des Vorläufers beteiligten Enzyme zu bestimmen. Eine RNase P (für „precursor“) genannte Ribonuclease wurde in

diesem System identifiziert^[78]; es sind auch wärmeempfindliche Mutanten dieses Enzyms isoliert worden^[79]. Wenn man sie bei der restriktiven Temperatur inkubiert, reichern diese mutierten Stämme Vorläufer an, die bis zu vier tRNA-Sequenzen im gleichen RNA-Molekül enthalten.

Auch bei der Umwandlung der in den Zellkernen eukaryotischer Zellen gefundenen Gen-Kopien in die Messenger-RNA-Moleküle, die man im Cytoplasma der Zellen findet, sollen Spaltungsreaktionen sehr wesentlich sein^[80]. Die meisten nuclearen RNA-Moleküle sind viel größer als die mRNA eukaryotischer Zellen; für die ersteren wurden Molekulargewichte bis zu $2 \cdot 10^7$ gefunden, während selbst die größten mRNA-Moleküle weniger als ein Zehntel dieser Größe erreichen. Die nuclearen RNA-Moleküle sind auch metabolisch sehr labil; über 90 % der im Kern synthetisierten größeren RNA-Moleküle werden dort auch wieder zerlegt, und nur ein geringer Anteil wird ins Cytoplasma transportiert. Diese Fraktion scheint aus etwa 10 % der RNA-Kette des nuclearen Moleküls, und zwar dem 3'-endständigen Teil, zu bestehen, und wird als die Quelle für mRNA betrachtet.

Ein endgültiger Beweis für eine spezifische Vorläuferspalzung im Falle bakterieller mRNA fehlt noch. In vitro werden aber viele Bakteriophagen-mRNA-Moleküle als lange Transkriptionseinheiten synthetisiert. Die in vitro mit *E. coli*-RNA-Polymerase gebildete RNA des T7-Phagen hat ein Molekulargewicht von $2.5 \cdot 10^6$ ^[81], doch die frühe T7-Spezies, die man nach Infektion in normalen Zellen findet, ist erheblich kleiner. Wenn allerdings T7 einen *E. coli*-Stamm mit einer defekten Ribonuclease III infiziert, so ist die T7-RNA ebenso groß wie das in-vitro-Produkt^[82]. Daher dürfte Ribonuclease III an der Verarbeitung sowohl von mRNA als auch von rRNA beteiligt sein.

4.2. Modifizierung von Nucleotiden

Bei der Reifung vieler RNA-Moleküle werden einige Nucleotide im primären Transkriptionsprodukt modifiziert. Beispiele solcher modifizierten Nucleotide sind in Abb. 8 zusammengestellt. Modifizierungen kommen bei der Synthese von tRNA-Molekülen besonders häufig vor, sind aber auch bei der Synthese ribosomaler RNA-Moleküle und vielleicht bei der Syn-

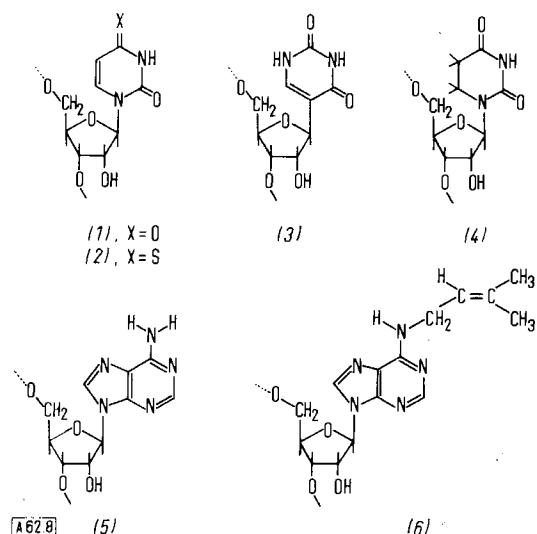


Abb. 8. Strukturen von Uridin (1) sowie Adenosin (5) und ihren modifizierten Derivaten 4-Thiouridin (2), Pseudouridin (3-β-D-Ribofuranosyluracil) (3), 5,6-Dihydrouridin (4) bzw. N⁶-(2-Isopentenyl)adenosin (6).

these einiger mRNA-Moleküle wichtig^[83-85]. Die häufigste Veränderung ist die Einführung einer Methylgruppe in ein Nucleotid. Der Donor solcher Methylgruppen ist S-Adenosylmethionin; die Reaktionen werden durch spezifische Enzyme (Methyltransferasen) katalysiert, die ein zu modifizierendes Nucleotid in einer bestimmten Umgebung erkennen. Als Produkte entstehen vorwiegend Methylderivate der Basen, doch werden auch einige 2'-O-Methylderivate der Ribose und einige Dimethylverbindungen gebildet.

Eine weitere bedeutsame Modifizierung ist die Isomerisierung bestimmter Uridylat- zu Pseudouridylatresten. Fast jedes tRNA-Molekül enthält mindestens einen Pseudouridinrest, viele haben zwei oder mehr. Das Isomere wird ferner in ribosomaler RNA von Eukaryonten und Prokaryonten gefunden. Aus *E. coli* ist ein Enzymsystem isoliert worden, das die Isomerisierung von Uridylatresten in tRNA-Molekülen katalysiert^[83], und man kennt Mutanten von *Salmonella typhimurium*, denen diese Enzyme fehlen. Derartige Mutanten haben Defekte in der Regulation der Biosynthesewege bestimmter Aminosäuren^[86].

Weitere Modifizierungsreaktionen scheinen ausschließlich bei tRNA-Molekülen vorzukommen wie die Umwandlung von Uridin in Thiouridin, die Reduktion bestimmter Uracilbasen zu Dihydrouracil sowie die Einführung eines Isopentenylrestes in die 6-Aminogruppe von Adenosinen in der Nähe bestimmter Anticodons. Viele dieser Veränderungen sind für die Funktion der Moleküle essentiell, andere haben eine noch unbekannte Bedeutung.

Sowohl in tRNA als auch in rRNA können einige der Modifizierungen schon an den größeren Vorläufern geschehen. Allerdings ist die unmodifizierte tRNA^{Tyr} aus *E. coli* nach dem Zuschnitt auf ihre richtige Größe ein besseres Substrat für die Modifizierung als ihr größerer Vorläufer^[87], und zu einigen Modifikationen an rRNA kommt es erst, nachdem bestimmte ribosomale Proteine gebunden wurden^[72]. Obwohl also die Nucleotide schon in den ersten Transkriptionsprodukten modifiziert werden können, scheint die Vervollständigung all dieser Reaktionen doch einer der letzten Schritte bei der Reifung von tRNA- und rRNA-Molekülen zu sein.

4.3. Die Anfügung von Nucleotiden

Schließlich gibt es einen wichtigen, aber noch nicht restlos verstandenen Reifungsschritt an einigen RNA-Molekülen, der zur Anfügung von Nucleotiden an das 3'-Ende der RNA führt; er wird durch terminale Nucleotid-Transferasen katalysiert, die keine DNA-Matrize brauchen^[80]. Viele der großen nuclearen RNA und die mRNA in eukaryotischen Zellen haben Polyadenylsäure-Sequenzen am 3'-Ende, die 150 bis 300 Nucleotide lang sind. Ein Beweis dafür, daß diese Adenylatreste in einer Reaktion nach der Transkription ankondensiert werden, liegt darin, daß entsprechende Matrizensequenzen für ein 300 Nucleotide langes Poly-A-Stück in der DNA nicht zu finden sind; ferner, daß Enzyme aus Zellkern wie Cytoplasma vieler verschiedener Zellen die Anfügung von Adenylatresten an RNA katalysieren, und schließlich, daß einige Drogen selektiv die Synthese der Poly-A-Sequenzen hemmen. Die genaue Funktion dieser Poly-A-Abschnitte ist noch nicht klar, doch ihre Ankondensation scheint ein notwendiger Schritt für die Reifung einiger mRNA-Spezies in höheren Organismen zu sein. Die Tatsache, daß man sie am 3'-Ende sowohl von großer nuclearer RNA als auch von mRNA-Molekülen findet,

ist ein weiterer Beweis dafür, daß das 3'-Ende der nuclearen RNA ein Vorläufer der mRNA ist. Zwar wurde auch in Bakterien ein Enzym gefunden, das den Anbau von Adenylatresten an RNA katalysieren kann, doch gibt es bisher keinen Hinweis darauf, daß derartige Sequenzen in irgendeiner bakteriellen RNA vorkommen.

Bakterien und andere Organismen haben auch Enzyme, die Cytidylsäure- und Adenylsäurereste an tRNA-Moleküle anfügen können, denen die für alle reifen tRNA-Moleküle typische Sequenz -C-C-A_{OH} am 3'-Ende fehlt^[88]. Die eine sequenzierte Vorläufer-tRNA, ptRNA^{Tyr} aus *E.coli*, enthält allerdings die -C-C-A-Sequenz der fertigen tRNA in sich^[89]. Die Funktion der den Wiederanbau katalysierenden Enzyme besteht daher vielleicht nur darin, dies Ende wieder zu ergänzen, wenn es während des Zuschnitts verloren gehen sollte. Immerhin ist nicht gesagt, daß die -C-C-A_{OH}-Sequenz in den primären Genprodukten aller tRNA bereits vorliegt. In solchen Fällen wäre die enzymkatalysierte Ankondensation nach der Transkription ein wesentlicher Reifungsschritt der tRNA-Moleküle.

Herrn Dr. T. Blumenthal danke ich für eine kritische Durchsicht dieses Fortschrittsberichtes. Die hier geschilderten eigenen Arbeiten werden durch einen Career Development Award (GM-70, 422) der U.S. National Institutes of Health unterstützt.

Eingegangen am 30. Oktober 1974 [A 62]
Übersetzt von Prof. Dr. Hartmut Follmann, Marburg

- [1] O. Maaløe u. N. O. Kjeldgaard: Control of Macromolecular Synthesis. Benjamin, New York 1966.
- [2] J. E. Darnell, Jr., Bacteriol. Rev. 32, 262 (1968).
- [3] B. D. Hall u. S. Spiegelman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 137 (1961).
- [4] G. Milman, R. Langridge u. M. J. Chamberlin, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 1804 (1967).
- [5] D. Kennell, J. Mol. Biol. 34, 85 (1968).
- [6] J. Hurwitz u. J. T. August, Progr. Nucl. Acid Res. 1, 59 (1963).
- [7] J. M. Kirk, Biochim. Biophys. Acta 42, 167 (1960); vgl. auch H. Lackner, Angew. Chem. 87, 400 (1975); Angew. Chem. internat. Edit. 14, 375 (1975).
- [8] K. M. Downey, J. J. Byrnes, B. S. Jurmark u. A. G. So, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3400 (1973).
- [9] M. J. Chamberlin in P. D. Boyer: The Enzymes. 3. Aufl., Bd. 10, Academic Press, New York 1974, S. 333.
- [10] R. Schekman, W. Wickner, O. Westergaard, D. Brutlag, K. Geider, L. L. Bertsch u. A. Kornberg, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2691 (1972).
- [11] A. Sugino, S. Hirose u. R. Okazaki, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1863 (1972).
- [12] P. Chambon in P. D. Boyer: The Enzymes. 3. Aufl., Bd. 10, Academic Press, New York 1974, S. 261.
- [13] R. Weinmann u. R. G. Roeder, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1790 (1974).
- [14] R. R. Burgess, J. Biol. Chem. 244, 6168 (1969).
- [15] M. Scrutton, C. Wu u. D. Goldthwait, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2497 (1971).
- [16] W. Zillig, K. Zechel, D. Rabussay, M. Schachner, V. S. Sethi, P. Palm, A. Heil u. W. Seifert, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 47 (1970).
- [17] C. G. Goff u. K. Weber, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 101 (1970).
- [18] O. J. Martelo, S. L. C. Woo, E. M. Reimann u. E. W. Davie, Biochemistry 9, 4807 (1970).
- [19] C. Nüsslein u. B. Heyden, Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 282 (1972).
- [20] H. Küntzel u. K. P. Schäfer, Nature New Biol. 231, 265 (1971).
- [21] M. J. Chamberlin, J. McGrath u. L. Waskell, Nature 228, 227 (1970).
- [22] E.K.F. Bautz, FEBS Lett. 36, 123 (1973).
- [23] A. L. Lehninger: Bioenergetics. Benjamin, New York 1965, S. 210.
- [24] J. P. Richardson, J. Mol. Biol. 49, 235 (1970).
- [25] R. W. Davis u. R. W. Hyman, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 269 (1970).
- [26] H. Bremer u. D. Yuan, J. Mol. Biol. 38, 163 (1968).
- [27] H. D. Manor, D. Goodman u. G. Stent, J. Mol. Biol. 39, 1 (1969).
- [28] U. Mairu u. J. Hurwitz, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54, 815 (1965).
- [29] D. A. Goldthwait, D. D. Anthony u. C. W. Wu, LePetit Colloq. Biol. Med. 1, 10 (1970).
- [30] E. N. Brody u. E. P. Geiduschek, Biochemistry 9, 1300 (1970).
- [31] H. Bremer, M. Konrad u. R. Bruner, J. Mol. Biol. 16, 104 (1966).
- [32] E. P. Geiduschek, T. Nakamoto u. S. B. Weiss, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 1405 (1961).
- [33] H. Bremer u. M. W. Konrad, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 801 (1964).
- [34] M. Hayashi, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54, 1736 (1965).
- [35] M. Chamberlin u. P. Berg, J. Mol. Biol. 8, 297 (1964).
- [36] V. L. Florentiev u. V. I. Ivanov, Nature 228, 519 (1970).
- [37] G. S. Stent, Advan. Virus Res. 5, 95 (1958).
- [38] P. A. Riley, Nature 228, 522 (1970).
- [39] J. M. Saucier u. J. C. Wang, Nature New Biol. 339, 167 (1972).
- [40] M. J. Chamberlin, Annu. Rev. Biochem. 43, 721 (1974).
- [41] R. R. Burgess u. A. A. Travers, Fed. Proc. 29, 1164 (1970).
- [42] R. Fukuda, Y. Iwakura u. A. Ishihama, J. Mol. Biol. 83, 353 (1974).
- [43] Y. Iwakura, R. Fukuda u. A. Ishihama, J. Mol. Biol. 83, 369 (1974).
- [44] R. G. Shorenstein u. R. Losick, J. Biol. Chem. 248, 6170 (1973).
- [45] W. Epstein u. J. Beckwith, Annu. Rev. Biochem. 37, 411 (1968).
- [46] B. Allet u. R. Solem, J. Mol. Biol. 85, 475 (1974).
- [47] R. Maurer, T. Maniatis u. M. Ptashne, Nature 249, 221 (1974).
- [48] T. Maniatis, M. Ptashne, B. G. Barrell u. J. Donelson, Nature 250, 394 (1974).
- [49] B. Allet, R. J. Roberts, R. F. Gesteland u. R. Solem, Nature 249, 217 (1974).
- [50] B. Müller-Hill, Angew. Chem. 83, 195 (1971); Angew. Chem. internat. Edit. 10, 160 (1971).
- [51] S. Nakanishi, S. Adhya, M. Gottesman u. I. Pastan, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 334 (1973).
- [52] M. Ptashne in A. D. Hershey: The Bacteriophage Lambda. Cold Spring Harbor Laboratory, 1971, S. 221.
- [53] B. de Crombrugghe, B. Chen, W. Anderson, P. Nissley, M. Gottesman, I. Pastan u. R. Perlman, Nature New Biol. 231, 139 (1971).
- [54] P. Chadwick, V. Pirotta, R. Steinberg u. M. Ptashne, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 283 (1970).
- [55] A. M. Wu, S. Ghosh u. H. Echols, J. Mol. Biol. 67, 423 (1972).
- [56] N. M. Maizels, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3585 (1973).
- [57] W. Gilbert u. A. Maxam, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3581 (1973).
- [58] J. Greenblatt u. R. Schleif, Nature New Biol. 233, 166 (1971).
- [59] G. Wilcox, K. Clemerton, D. Santi u. E. Englesberg, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2145 (1971).
- [60] W. Anderson, A. Schneider, M. Enniger, R. Perlman u. I. Pastan, J. Biol. Chem. 246, 5959 (1970).
- [61] A. D. Riggs, G. Reiness u. G. Zubay, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1222 (1971).
- [62] A. Stevens, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 603 (1972).
- [63] H. Horwitz, Nature New Biol. 244, 137 (1973).
- [64] P. Leibowitz, S. M. Weissman u. C. M. Radding, J. Biol. Chem. 246, 5120 (1971).
- [65] J. E. Dahlberg u. F. R. Blattner, Fed. Proc. 32, 664 Abs (1973).
- [66] J. W. Roberts, Nature 224, 1168 (1969).
- [67] J. P. Richardson, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 127 (1970).
- [68] C. Lowery-Goldhammer u. J. P. Richardson, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2003 (1974).
- [69] G. Galluppi, C. Lowery-Goldhammer u. J. P. Richardson, unveröffentlichte Beobachtungen.
- [70] B. de Crombrugghe, S. Adhya, M. Gottesman u. I. Pastan, Nature New Biol. 241, 260 (1973).
- [71] G. Attardi u. F. Amaldi, Annu. Rev. Biochem. 39, 183 (1970).
- [72] N. R. Pace, Bacteriol. Rev. 37, 562 (1973).
- [73] N. Nikolaev, L. Silengo u. D. Schlessinger, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3361 (1973).
- [74] N. Nikolaev, D. Schlessinger u. D. K. Wettauer, J. Mol. Biol. 86, 741 (1974).
- [75] A. Ghysen u. J. F. Celis, Nature 249, 418 (1974).
- [76] C. Guthrie, J. G. Seidman, S. Altman, B. G. Barrell, J. D. Smith u. W. H. McClain, Nature New Biol. 246, 6 (1973).
- [77] D. P. Nierlich, H. Lamfrom, A. Sarabhai u. J. W. Abelson, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 179 (1973).
- [78] S. Altman u. H. D. Robertson, Mol. Cell. Biochem. 1, 83 (1973).
- [79] P. Schedl u. P. Primakoff, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2091 (1973).
- [80] R. A. Weinberg, Annu. Rev. Biochem. 42, 329 (1973).
- [81] J. J. Dunn u. F. W. Studier, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1559 (1973).
- [82] J. J. Dunn u. F. W. Studier, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3296 (1973).
- [83] D. Söll, Science 173, 293 (1971).
- [84] U. Z. Littauer u. H. Inouye, Annu. Rev. Biochem. 42, 439 (1973).
- [85] R. P. Perry u. D. E. Kelley, Cell 1, 37 (1974).
- [86] C. E. Singer, G. R. Smith, R. Cortese u. B. N. Ames, Nature New Biol. 238, 72 (1972).
- [87] K. P. Schaeffer, S. Altman u. D. Söll, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3626 (1973).
- [88] M. P. Deutscher, Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 13, 51 (1973).
- [89] S. Altman u. J. D. Smith, Nature New Biol. 233, 35 (1971).