

ANGEWANDTE CHEMIE

102. Jahrgang 1990

Heft 7

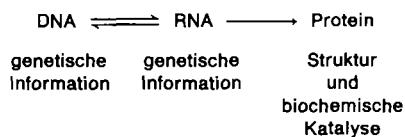
Seite 735–850

Enzymatische Spaltung der RNA durch RNA (Nobel-Vortrag)**

Von Sidney Altman *

Einleitung

Der Transfer genetischer Information von Nucleinsäuren zu Proteinen innerhalb einer Zelle kann entsprechend Schema 1 dargestellt werden: Die Information, die in der linearen Abfolge der Nucleotide in der DNA enthalten ist, wird ge-



Schema 1. Darstellung des intrazellulären Informationsflusses von der DNA zum Protein. Dieses Diagramm gibt das zentrale Dogma nicht vollständig wieder [1].

nau in die lineare Abfolge der Nucleotide der RNA übersetzt, welche wiederum intrazellulär in Proteine translatiert wird, d. h. in die Makromoleküle, die den Ablauf vieler wichtiger biochemischer Reaktionen *in vivo* steuern. Der direkte Transfer der Information von der DNA zum Protein erfolgt über messenger-RNAs (mRNAs). Das Diagramm geht nicht auf die Funktion anderer von der DNA transkribierter RNAs ein, etwa der transfer-RNA (tRNA), der ribosomalen RNA (rRNA) und der vielen anderen, selteneren RNA-Spezies, die man mittlerweile *in vivo* gefunden hat und denen man bis 1976 keine Funktion hat zuordnen können. Unberücksichtigt bleibt ferner, daß die Information der DNA und RNA zu Tochter-DNAs und -RNAs repliziert werden kann^[1].

[*] Prof. S. Altman
Department of Biology, Yale University
New Haven, CT 06520 (USA)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1990. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

Ribosomen sind Komplexe, die z. B. in *Escherichia coli* aus ca. 50 Proteinen und drei RNA-Molekülen aufgebaut sind. Genau auf diesen Partikeln wird die Synthese der Proteine aus freien Aminosäuren von der mRNA gesteuert. tRNA-Moleküle dienen als Adaptoren, indem sie je einer Gruppe von drei Nucleotiden auf der zu translatierenden mRNA eine spezielle Aminosäure zuordnen und dabei dafür sorgen, daß die wachsende Polypeptidkette (das Protein) die richtige lineare Abfolge der Aminosäurebausteine enthält

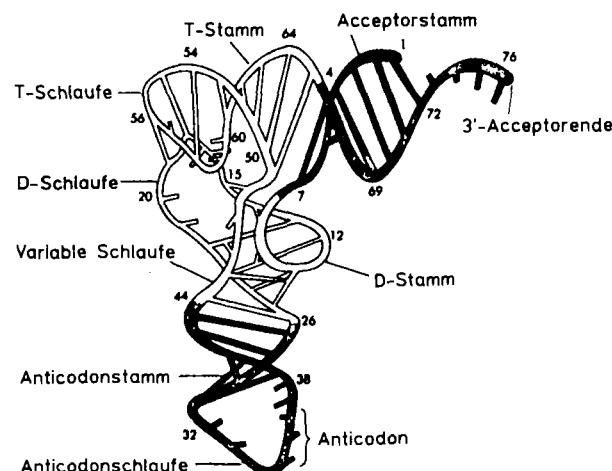


Abb. 1. Faltung des Hefe-tRNA^{Phe}-Moleküls. Das Ribose-Phosphat-Rückgrat ist als kontinuierliches Band dargestellt, interne Wasserstoffbrückenbindungen sind als Querbalken angedeutet. Die Positionen einzelner Basen sind absichtlich als verkürzte Balken dargestellt. Der Anticodon- und der Acceptorarm sind schattiert (nach [63]; Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Benjamin/Cummings).

(Abb. 1). rRNA und tRNA beteiligen sich also beide am Prozeß des Informationstransfers innerhalb der Zellen, aber sie erfüllen diese Funktion in einer relativ komplexen Art und Weise.

Meine Arbeit auf dem Gebiet der RNA begann mit dem Studium bestimmter Mutanten, in denen die Fähigkeit der tRNA-Moleküle, sich während der Translation normal zu verhalten, gestört war^[21]. Diese Forschung wiederum führte zur Identifizierung einer weiteren RNA, die unerwarteterweise alle Eigenschaften eines Enzyms hatte^[13]. Unsere Entdeckung, daß RNAs enzymatisch aktiv sein können, hat zu Neubetrachtungen sowohl der Rolle der RNA in der modernen Biochemie (Schema 1; Übersichtsartikel siehe Cech^[4] und Altman^[5]) als auch der Natur der vor Äonen existierenden, komplexen biochemischen Systeme geführt^[6-11] und ist von grundlegender Bedeutung für all diejenigen, die sich mit Katalyse und Enzymologie beschäftigen.

Wie Woese^[12], Crick^[13] und Orgel^[14] vor 20 Jahren erstmals gezeigt haben, sollte, falls die RNA als Katalysator wirken kann, die Entstehung des genetischen Codes während der frühen Stadien der Evolution der ersten zur Selbstreplikation befähigten biochemischen Systeme an Bedeutung verlieren. Die Vielfalt biochemischer Reaktionen, die mittlerweile als RNA-beherrscht erkannt worden sind^[5], spricht dafür, daß viele enzymatische Reaktionen tatsächlich in Abwesenheit von Proteinen stattfinden könnten (Tabelle 1). Um

Tabelle 1. Einige Eigenschaften katalytisch wirksamer RNAs.

RNA	Endständige Gruppen [a]	Cofaktor nötig	Mechanismus
1. Group-I-Intron	5'-P, 3'-OH	Ja	Umesterung
2. Group-II-Intron	5'-P, 3'-OH	Nein	Umesterung
3. M1-RNA	5'-P, 3'-OH	Nein	Hydrolyse
4. Viroid/Satellit	5'-OH, 2',3'-cyclisches Phosphat	Nein	Umesterung
5. Blei-Ion/tRNA	5'-OH, 2',3'-cyclisches Phosphat	Nein	Ähnlich wie bei RNase A

[a] Die endständigen Gruppen sind diejenigen, die während der ersten Spaltung bei Selbstspleißreaktionen oder während normaler Spaltungsreaktionen anderer RNA-Spezies entstehen.

genauere Kenntnisse über das Leben auf unserem Planeten vor über einer Milliarde Jahre zu erlangen, ist es wichtig, unser Verständnis der heutigen katalytisch wirksamen RNAs und ihrer Funktionen *in vivo* zu erweitern. Die folgende Diskussion befaßt sich hauptsächlich mit der Entdeckung und Charakterisierung der katalytisch wirksamen RNA-Untereinheit des Enzyms Ribonuclease P aus *Escherichia coli*.

Eine kurze Zusammenfassung der Studien über Ribonuclease P

Finden des Substrats

Im Oktober 1969 kam ich zum Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, England, um, wie ich dachte, die dreidimensionale Struktur der tRNA mit Hilfe physikalisch-chemischer Methoden zu untersuchen. Bei meiner Ankunft informierten mich Sydney Brenner und Francis Crick, daß die Kristallstruktur der HefetRNA^{Ph} soeben gelöst worden war^[15, 16]. Dann wurde ich angewiesen, mich erst einmal richtig einzurichten, mir ein bis zwei Wochen lang Gedanken über ein neues Projekt zu machen und anschließend wieder vorbeizuschauen. Obwohl einige meiner Kollegen mich als ziemlich enttäuscht von dieser Unterhaltung mit Brenner und Crick in Erinnerung haben, muß dieses Gefühl schnell vorübergegangen sein, da ich nur noch weiß, daß ich es als eine wunderbare Gelegenheit empfand, meinen eigenen Ideen nachzugehen.

Ich schlug vor, Acridin-induzierte Mutanten der tRNA^{Tyr} von *E. coli* zu züchten, um zu untersuchen, ob eine durch Auslassen oder Einfügen eines Nucleotids herbeigeführte Veränderung der räumlichen Verhältnisse in einer tRNA die Funktion dieses Moleküls drastisch verändert würde. Da Brenner, John D. Smith und ihre Kollegen^[17-19] gerade eine klassische Studie über Basen-Substitutions-Mutanten der tRNA^{Tyr} fertiggestellt hatten, waren sie nicht übermäßig von der Aussicht begeistert, daß jemand einfach noch mehr Mutanten züchten wollte. Trotzdem hielten mich Brenner und Crick nicht davon ab, und John D. Smith erteilte mir später wertvolle Ratschläge zum im Laboratorium verwendeten genetischen System.

Die von mir gezüchteten Mutanten hatten ihre normale Funktion als Suppressor-tRNAs verloren und produzierten keine ausgereifte tRNA *in vivo*, sie mutierten jedoch zu einem sehr hohen Anteil (ca. 1 %) zum Wildtyp zurück. Diese Eigenschaften deuteten darauf hin, daß es möglicherweise eine instabile oder eine partielle Duplikation des Gens für die tRNA in der DNA gab, welche die Information für die tRNA enthielt. Weiterhin schien es denkbar, daß die RNA von diesem mutierten Gen transkribiert wurde. Ich überlegte mir, daß ich vielleicht die Natur dieses Duplikationsvorganges entschlüsseln könnte, wenn es mir gelänge, das RNA-Transkript, das instabil sein mußte, da keine reife tRNA gebildet wurde, zu isolieren.

Der einfache Trick, Phenol schnell zu einem gleichen Volumen einer $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ -markierten, wachsenden *E. coli*-Kultur



Sidney Altman, geboren 1939 in Montreal, studierte zunächst Physik am Massachusetts Institute of Technology bei Lee Grodzins und an der Columbia University und setzte seine Studien an der University of Colorado Medical Center (Biophysik bei Leonard Lerman) sowie an der Harvard University (Molekularbiologie bei Mathew Meselson) fort. Seine Arbeit bei Sydney Brenner und Francis Crick am Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, England, legte den Grundstein zur Entdeckung der RNase P und der enzymatischen Eigenschaften der RNA-Untereinheit dieses Enzyms. 1971 erhielt er einen Ruf als Assistant Professor an die Yale University, wo er 1980 Professor wurde. Sidney Altman erhielt 1989 zusammen mit Thomas R. Cech den Nobel-Preis für Chemie.

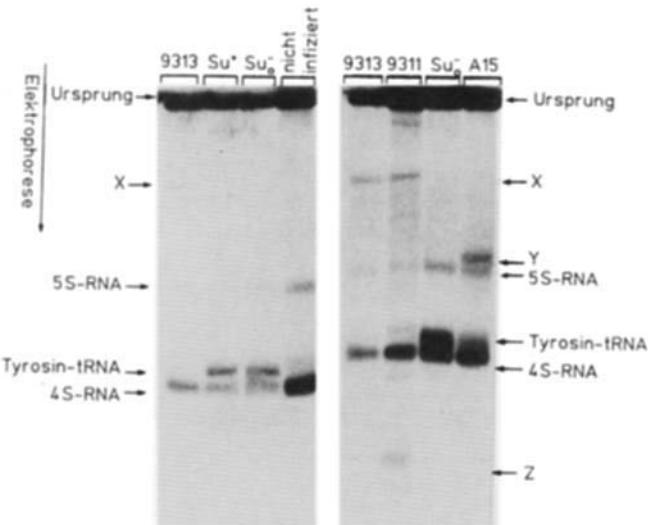


Abb. 2. Gelelektrophorese-Trennung markierter RNA aus *E. coli*, die mit Derivaten des Bakteriophagen ϕ 80 infiziert wurde, die unterschiedliche tRNA^{Tyr}-Gene enthielten. Die Abbildung zeigt ein Autoradiogramm eines Polyacrylamidgels (nach [2], experimentelle Details siehe dort). Jede Bahn ist entsprechend der tRNA^{Tyr} beschriftet, die der infizierende Phage enthielt. 9313 und 9311 sind Acridin-induzierte Mutanten der Suppressor-tRNA^{Tyr} Su⁺. A15 ist ein Mutant, der die G15-A15-Mutation enthält, und Su⁻ ist die Wildtyp-tRNA^{Tyr} (Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Magazines Ltd.).

zu geben, ermöglichte es mir, das Transkript des Gens für die Acridin-mutierte tRNA^{Tyr} zu isolieren und zu charakterisieren wie auch die Transkripte des Gens für die tRNA^{Tyr} (Abb. 2)^[2], das vorher mit anderen Methoden von *Brenner*, *Smith* und ihren Kollegen mutiert worden war. Diese Gentranskripte enthielten neben den Sequenzen der reifen tRNA an beiden Enden zusätzliche Sequenzen (Abb. 3)^[20a] und waren daher tRNA-Vorläufer. Die Isolierung dieser Vorläufer wurde dadurch erleichtert, daß die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Konformation einnehmen, die sie weniger empfindlich für den Angriff durch

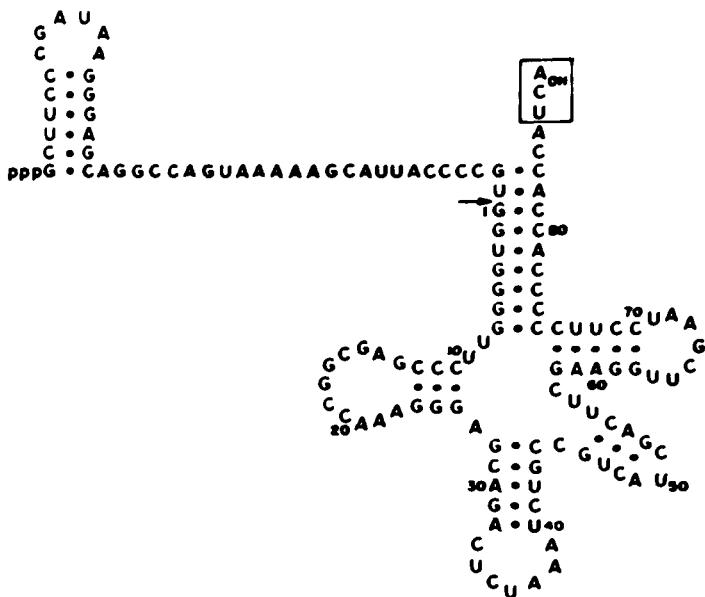


Abb. 3. Nucleotidsequenz des Vorläufers der tRNA^{Tyr} Su⁺. Der Pfeil zeigt die Spaltungsstelle an der 5'-Seite des Nucleotids 1 der reifen tRNA-Sequenz. Die umrahmten Nucleotide sind zusätzliche Nucleotide am 3'-Terminus (nach [20a]).

intrazelluläre Nucleasen macht als den Wildtyp. Die zusätzlichen Sequenzen waren zwar an sich interessant, da zu dieser Zeit solche Segmente von Gentranskripten noch nicht charakterisiert worden waren, aber sie erwiesen sich bald als nicht allzu aufschlußreich.

Frühere Arbeiten von *Darnell* et al.^[21a] und *Burdon*^[21b, c] hatten gezeigt, daß tRNAs in eukaryontischen Zellen wahrscheinlich aus Vorläuferverbindungen hergestellt wurden; die weitere Charakterisierung der an der Biosynthese von tRNA oder der Verarbeitung von tRNA beteiligten Enzyme konnte jedoch nur mit radiochemisch reinem, homogenem Substrat, wie ich es isoliert hatte, fortgesetzt werden.

Behandelte man den Vorläufer eines der tRNA^{Tyr}-Mutanten mit *E. coli*-Extrakt, so war sofort ersichtlich, daß enzymatische Aktivitäten im Zellextrakt vorhanden waren, die zur Abspaltung der zusätzlichen Nucleotide vom 5'- und vom 3'-Ende der reifen tRNA-Sequenz führten (Abb. 4)^[20a, b]. Im Gegensatz zum 3'-Ende des Vorläufermoleküls, das anscheinend unselektiv exonucleolytisch abgebaut wurde, wurde das 5'-Ende von einem Enzym, das wir Ribonuclease P nannten, durch eine einzige, spezifische endonucleolytische Spaltung verarbeitet. Tatsächlich waren zu jener Zeit keine Ribonucleasen bekannt, die derart regiospezifisch Bindungen spalten konnten wie die RNase P, so daß unser Interesse an dieser Reaktion wach blieb. Einige Charakteristika der Reaktion untersuchte ich sofort in Zusammenarbeit mit *Hugh Robertson* und *John Smith*^[20b].

Charakterisierung der Ribonuclease P von *Escherichia coli*

Im MRC-Laboratorium konnten wir zeigen, daß RNase P, anders als die meisten unspezifischen Nucleasen, die an der Spaltungsstelle 5'-Hydroxy- und 3'-Phosphatgruppen hinterlassen, terminale 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxygruppen produzierte^[20b], was damit in Einklang war, daß reife tRNAs Phosphatgruppen an ihren 5'-Termini enthalten. Während wir Fortschritte bei der chromatographischen Reinigung des Enzyms machten, war die in Retrospektive auffallendste Beobachtung aus unseren frühen Untersuchungen, daß „it is possible that the active form of RNase P, which must have a strong negative charge, could be associated with some nucleic acid.“ Der nächste wichtige Schritt kam einige Jahre später von *Benjamin Stark*, einem Doktoranden in meinem Laboratorium an der Yale University. Er zeigte zuerst, daß eine RNA mit hoher Molmasse stark mit der enzymatischen Aktivität zusammenhing, und demonstrierte dann in einem klassischen Experiment, daß diese RNA sogar essentiell für die enzymatische Aktivität war^[22]. Die RNA wurde als M1-RNA bezeichnet und hatte einen fingerprint, der dem einer stabilen RNA-Spezies (Band IX) unbekannter Funktion ähnelte, die von *Ikemura* und *Dahlberg*^[23] innerhalb einer Serie kleiner RNA-Spezies aus *E. coli* beschrieben worden war. Die Proteinuntereinheit der RNase P wurde als C5-Protein bezeichnet.

Die essentielle Rolle der RNA-Komponente wurde nachgewiesen, indem die RNase P zuerst mit Mikrokokken-Nuclease (einem Enzym, welches RNA zerstört) behandelt und danach die RNase-P-Aktivität des behandelten Enzyms gemessen wurde: Die gesamte Aktivität ging nach der Nuclease-Behandlung (Abb. 5) und auch nach Behandlung mit di-

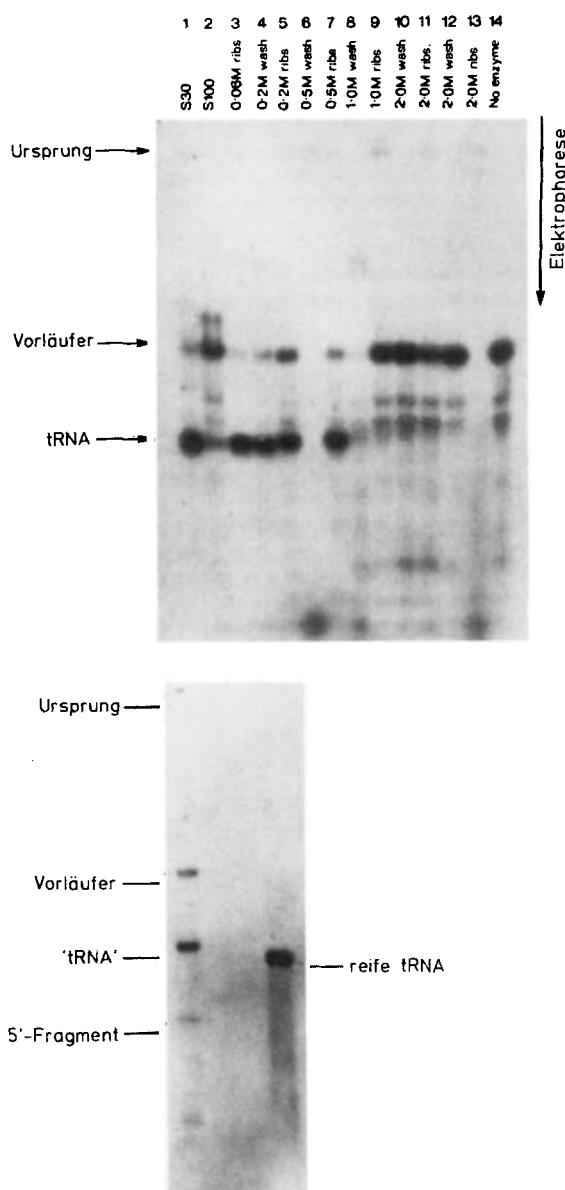


Abb. 4. Oben: RNase-P-Aktivität in *E. coli*-Extrakten. Herstellung der *E. coli*-Extrakte, partielle Reinigung von RNase P und Spaltungsreaktionen sind in [20b] allgemein beschrieben. Als Substrat wurde der Vorläufer von *E. coli*-tRNA^{Tr} verwendet. Die Beschriftung der Bahnen in der Abbildung beziehen sich auf rohe Zellextrakte von *E. coli* und auf durch Zentrifugierung der 100S-Fraktion präparierte Ribosomen, die mit NH₄Cl-Lösungen von zunehmender Konzentration gewaschen worden waren. Bahn 1: Zugabe von ca. 100 µg Protein; übrige Bahnen: geringere Mengen Protein. Spontane Abbauprodukte der Substrate sind zwischen den „Vorläufer“- und den „tRNA“-Banden auf dem Gel zu sehen. Unten: Gelektrophorese-Trennung der in-vitro-Spaltungsprodukte des Vorläufers der tRNA^{Tr} A25 durch ein partiell gereinigtes Präparat (DEAE-Sephadex-Fraktion) der RNase P. Das Fragment des 3'-Endes („tRNA“) enthält die zusätzlichen Nukleotide des Vorläufers (nach [20b]; Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der American Society of Biological Chemists, Inc.).

versen Proteasen verloren. Unter den damals gewählten Bedingungen (Puffer mit 5 mM MgCl₂) waren beide, die Protein- und die RNA-Komponenten, essentiell für die enzymatische Aktivität. Ferner zeigten wir, daß das Enzym in CsCl-Lösung eine Auftriebsdichte von 1.72 g mL⁻¹ hat^[22], welche für RNA-Protein-Komplexe, die hauptsächlich aus RNA bestehen, charakteristisch ist. Der Sedimentationskoeffizient des Enzyms betrug ungefähr 11.5 S^[20b].

Während die biochemische Reinigung Fortschritte machte, zeigten Untersuchungen an den von Schedl, Primakoff et

al.^[24, 25] und Shimura, Ozeki et al.^[26, 27] gezüchteten temperaturempfindlichen Mutanten von *E. coli*, daß RNase P in *E. coli* essentiell für die Biosynthese aller tRNAs ist und daß die RNA- und die Proteinuntereinheiten in vivo benötigt werden. Weiterhin lieferten die Laboratorien von William McClain^[28, 65] und John Carbon^[29] Beweise dafür, daß RNase P das Processing vieler tRNA-Vorläufer bewirkt. Obwohl die entsprechenden genetischen Analysen nicht durchgeführt werden konnten, konnten wir zeigen, daß RNase-P-ähnliche Aktivität in Zellextrakten vieler anderer Organismen, einschließlich denen der Menschen, vorkommt^[30, 31]. RNase P war also fähig, viele verschiedene tRNA-Vorläufermoleküle zu spalten und es gab keine erkennbare Ähnlichkeit zwischen den Nukleotidsequenzen in der Umgebung der Spaltstellen. Die Frage, wie das Enzym die zu spaltenden Bindungen in den Substraten selektiv erkannte, schien ein detailliertes Studium zu rechtfertigen. Es wurde angenommen, daß eine Strureigenschaft, die in Lösung allen tRNA-Vorläufern gemein ist, diese Erkennung ermöglichte.

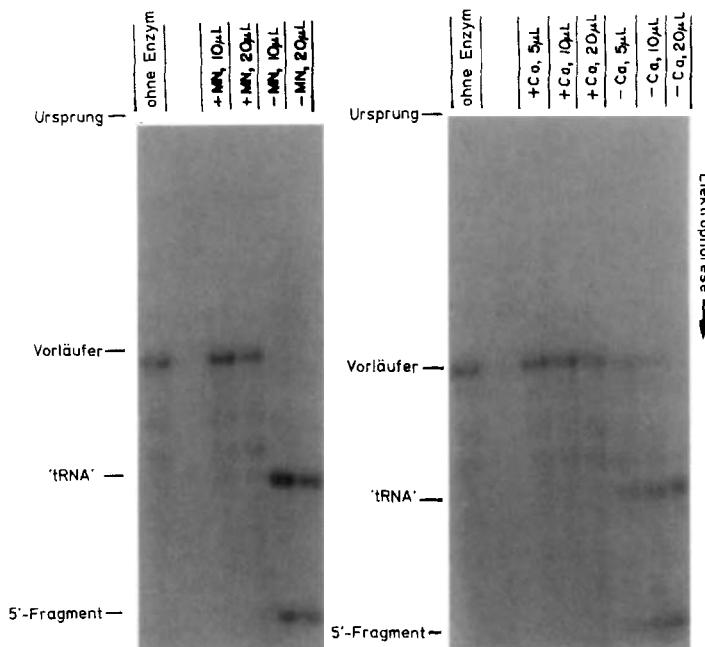


Abb. 5. Desaktivierung der RNase P durch Vorbehandlung mit Ribonuclease. Kontrollreaktionen wurden ohne Mikrokokken-Nuclease (MN) (links) oder ohne CaCl₂ (rechts) in der Vorbehandlungsmixtur durchgeführt. RNase P, die mit MN vorbehandelt wurde, hatte weniger als 5% der Aktivität einer in der Kontrollreaktion eingesetzten RNase P. Das Ausmaß der Desaktivierung kann durch Variation der Reaktionsbedingungen gesteuert werden (nach [22]; Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der National Academy of Sciences, Washington D.C.).

Als Starks Experimente veröffentlicht wurden, hatten wir nicht die Verwegenheit vorzuschlagen und vermuteten auch gar nicht, daß die katalytische Aktivität ausschließlich auf der RNA-Komponente der RNase P beruht. Allein die Tatsache, daß ein einfaches Enzym eine essentielle RNA-Untereinheit hatte, schien schon ketzerisch genug. Kurze Zeit später jedoch demonstrierte Ryszard Kole, daß das Enzym aus einer RNA- (M1-RNA) und einer Proteinuntereinheit (C5-Protein; *M*, ca. 15 000) bestand, die nicht kovalent verbunden waren. Beide Untereinheiten waren für sich alleine katalytisch inaktiv, rekonstituierten sich jedoch, wenn man sie vereinigte, zum aktiven Enzym^[32]. Die Ähnlichkeit der chemischen Zusammensetzung und der Assoziierungseigen-

schaften dieses Systems zu denen der Ribosomen war auffallend genug, daß wir immer wieder über die Möglichkeit nachdachten, ob nicht die RNA zumindest an der Bildung des aktiven Zentrums des Enzyms beteiligt war. Der Vergleich unseres Systems mit Ribosomen war wichtig, um den Widerstand gegen die Vorstellung zu überwinden, daß ein Enzym eine RNA-Untereinheit enthalten konnte^[33]. Vom rein chemischen Standpunkt aus gab es keinen Grund, warum RNA nicht an der Bildung eines aktiven Zentrums oder auch an der Katalyse selbst beteiligt sein sollte.

Die Einführung von Techniken zur DNA-Rekombination und wirkungsvollen Systemen zur in-vitro-Transkription isolierter DNA-Stücke ermöglichte es uns, die RNA-Untereinheit der RNase P im Detail zu untersuchen (377 Nucleotide)^[34] und große Mengen RNA für biologische Versuche herzustellen. Durch Fortschritte bei der Reinigung der Proteinuntereinheit konnten in Zusammenarbeit mit *Norman Paces* Gruppe von der Indiana University Hybridenzyme mit Untereinheiten von *E. coli* (in unserem Laboratorium) und *B. subtilis* (in *Paces* Laboratorium) hergestellt werden. Im Verlauf der Experimente prüfte *Cecilia Guerrier-Takada* in meinem Laboratorium die Aktivität rekonstituierter RNase P von *E. coli* bei Ionenkonzentrationen, die für die Aktivität des Holoenzymes aus *B. subtilis* optimal waren und sich von den bislang verwendeten unterschieden. Durch Kontrollexperimente, in denen RNA- und Proteinuntereinheiten getrennt getestet wurden, fand sie heraus, daß die RNA-Untereinheit von *E. coli* in Puffern mit 60 mM MgCl₂ für sich alleine katalytische Aktivität entfaltete. Ein Beispiel einer solchen Reaktion zeigt Abbildung 6. Katalytische Ak-

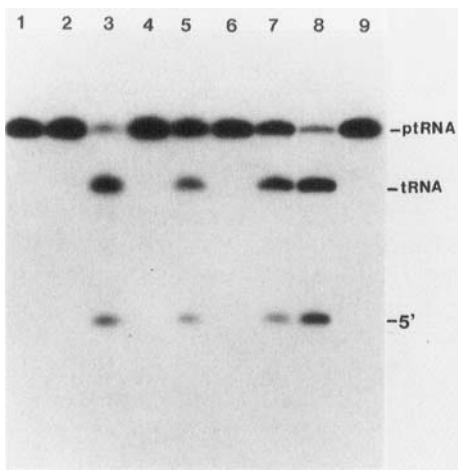


Abb. 6. Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der M1-RNA von der Mg^{2+} -Konzentration. Der Vorläufer der tRNA^{Trn}, abgekürzt als ptRNA, diente als Substrat. Reaktionen und Rekonstituierung der RNase P wurden entsprechend [3] durchgeführt. Bahn 1: kein Enzym zugegeben, 10 mM MgCl₂; Bahn 2: M1-RNA (2×10^{-8} M), 10 mM MgCl₂; Bahn 3: M1-RNA (0.1×10^{-8} M) plus C5-Protein (2×10^{-8} M), 10 mM MgCl₂; Bahn 4: kein Enzym, 100 mM MgCl₂; Bahn 5: M1-RNA (2×10^{-8} M), 100 mM MgCl₂; Bahn 6: M1-RNA (0.1×10^{-8} M) plus C5-Protein (2×10^{-8} M), 100 mM MgCl₂; Bahn 7: M1-RNA (2×10^{-8} M), 100 mM MgCl₂ und 4% Polyethylenglycol; Bahn 8: M1-RNA (2×10^{-8} M) plus C5-Protein (4×10^{-7} M), 100 mM MgCl₂; Bahn 9: C5-Protein (4×10^{-7} M), 10 mM MgCl₂.

tivität von M1-RNA ist nachweisbar, wenn die Mg^{2+} -Konzentration größer als 20 mM ist^[3]. Die Proteinuntereinheit des Enzyms erhöhte zwar k_{cat} um einen Faktor von 10–20, hatte aber wenig Einfluß auf K_m . Wir stellten schnell fest,

daß die M1-RNA alle Eigenschaften eines echten Enzyms im Sinne der Lehrbuchdefinition hatte^[35]: Sie ging aus der Reaktion (in der Größe) unverändert hervor, sie bewirkte einen echten Substratumsatz (bestimmt durch Michaelis-Menten-Analyse der kinetischen Daten, Abb. 7) und war daher ein Katalysator, sie wurde nur in kleinen Mengen gebraucht und war stabil. Diese Beobachtungen waren nur auf der Basis der Reinheit der M1-RNA-Präparate und durch Verwendung eines natürlichen Substrates, des tRNA^{Tyr}-Vorläufers aus *E. coli*, möglich.

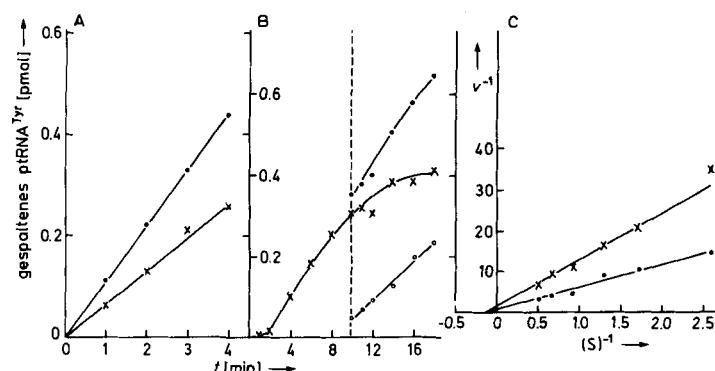


Abb. 7. Analyse der Kinetik der Reaktionen von M1-RNA und RNase P mit tRNA^{Tr} als Substrat. A: Vergleich der Kinetik von dialytisch rekonstituierter *E. coli*-RNase P in 5 mM MgCl₂ enthaltendem Puffer mit der Kinetik von gleichbehandelter M1-RNA in 60 mM MgCl₂ enthaltendem Puffer. • RNase-P-Aktivität, × M1-RNA-Aktivität. B: Kinetik der M1-RNA-katalysierten Reaktion in Puffer mit 60 mM MgCl₂. M1 wurde mit einem fünffachen Überschuss an ptRNA^{Tr} inkubiert. 10 min nach Beginn der Inkubation wurden entweder ein weiterer dreifacher Überschuss an ptRNA^{Tr} oder nur Puffer zugegeben. • ptRNA^{Tr} zugegeben, × nur Puffer zugegeben, ○ netto zugegebene und nach 10 min gespaltene ptRNA^{Tr}. C: Bestimmung von K_m und v_{max} für die in A gezeigten Reaktionen (Lineweaver-Burk-doppelt-reziproke graphische Darstellung). • RNase P in Puffer mit 5 mM MgCl₂, × M1-RNA in Puffer mit 60 mM MgCl₂. Einheiten: (S)⁻¹ [(pmol $\times 5 \times 10^{-4}$)⁻¹]; v⁻¹ [(pmol gespaltenes Substrat pro min)⁻¹] (nach [3]; Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von MIT Press).

Wir stellten bald ein Modell für die Sekundärstruktur der M1-RNA vor, das auf der Empfindlichkeit der RNA gegenüber Nucleasen in Lösung und einigen einfachen Regeln über die Stabilität von RNA-Strukturen beruhte. Ferner beschrieben wir die Abhängigkeit der Reaktion von der Gegenwart bestimmter Ionen (Tabelle 2)^[36]. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird zwischen pH 5 und pH 9 kaum vom pH-Wert beeinflußt, was darauf hindeutet, daß mehr als eine Gruppe mit einem für Nucleotide in Lösung ungewöhnlichen pK_a an der Reaktion beteiligt sein muß. Man kann daher annehmen, daß das aktive Zentrum der M1-RNA in eine gefaltete Struktur eingebettet ist und daß die lokale Umgebung des aktiven Zentrums sich vom wäßrigen Puffer, in dem das ganze Molekül gelöst ist, unterscheidet.

Tabelle 2. Katalytische Aktivität der M1-RNA.

M1-RNA aktiv [a]: $\geq 20 \text{ mM MgCl}_2$; 10 mM MgCl₂ und C5-Protein; 10 mM MgCl₂ und 5 mM Polyamin
M1-RNA nicht aktiv: 10 mM MgCl₂

[a] Diese Tabelle fasst die von *Guerrier-Takada et al.* [3] präsentierte Daten zusammen. Die vollständige Zusammensetzung der Reaktionsmischungen wird in der Referenz angegeben.

Diese Ergebnisse ergänzten die Befunde von *Thomas Cechs* Gruppe über selbstspleißende RNA^[37, 38] und waren die Grundlage für ausgiebige Spekulationen über die Rolle, die die RNA bei der Entstehung des Lebens gespielt haben könnte. Unser direktes Interesse galt aber der exakten Bestimmung der Funktionsweise des Enzyms, seiner Rolle in vivo und der Frage, wie das Enzym es schafft, ungefähr 60 Substrate in *E. coli* zu erkennen, die alle keine ersichtliche Ähnlichkeit in der Sequenz um die Spaltstellen haben.

Neuere Arbeiten

Struktur

Das ursprüngliche Modell der M1-RNA-Sekundärstruktur^[64] ist hauptsächlich von *Pace* et al. durch phylogenetische Analyse (Abb. 8) umfassend verfeinert worden^[39]. Die-

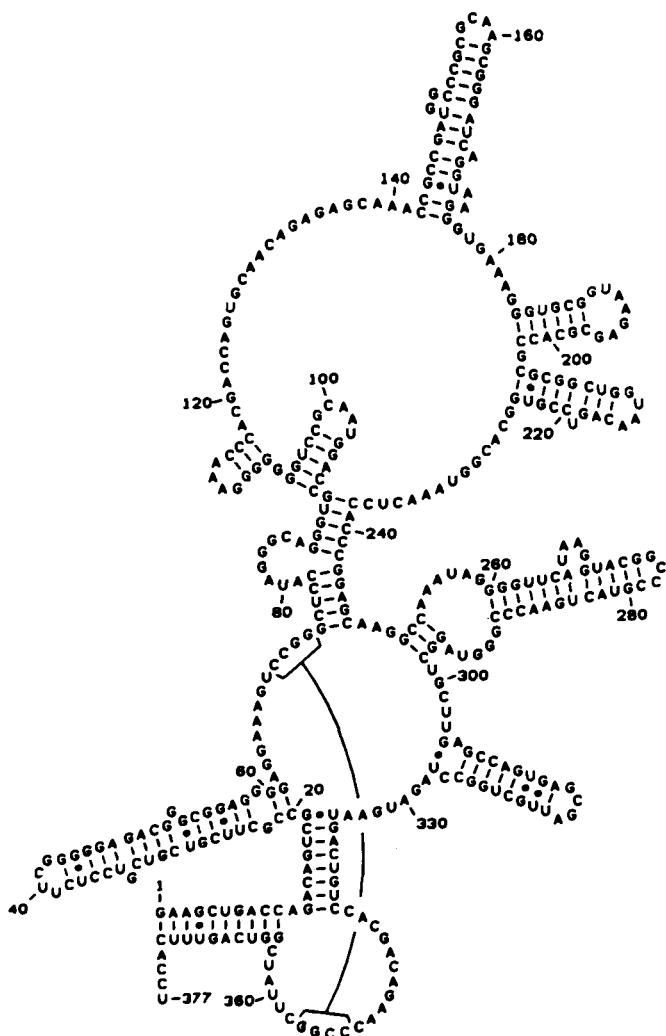


Abb. 8. Modell der Sekundärstruktur der M1-RNA, das auf einer umfassenden phylogenetischen Analyse der Nucleotidsequenzen der RNase-P-RNA-Untereinheit von verschiedenen Eubakterien basiert (nach [39]; Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von MIT Press).

se Analyse hat bis jetzt noch keine befriedigende Korrelation zwischen den Phenotypen der Mutanten^[40] und den Charakteristika der Sekundärstruktur von M1-RNA oder deren Analoga aus anderen Bakterien ergeben (siehe unten). Die

phylogenetische Analyse läßt jedoch evolutionär konservierte Regionen erkennen, die als Basis für Hypothesen über die Funktion der für die M1-RNA essentiellen Bereiche dienen können^[41]. Zudem wird die Notwendigkeit deutlich, die Eigenschaften der dreidimensionalen M1-RNA-Struktur zu ermitteln. Mit diesem Ziel werden gegenwärtig weitere phylogenetische Vergleiche unter Verwendung von Daten M1-RNA-homologer RNAs einiger Eukaryonten^[42-45] sowie kristallographische Untersuchungen durchgeführt. Interessant ist die Beobachtung, daß die evolutionäre Uhr für die RNA- und die Proteinuntereinheiten von RNase P sehr schnell läuft im Vergleich zu der von rRNAs^[46, 47]. Obwohl die Funktion von RNase P (wie aus den antigenen Eigenschaften des Proteins hervorgeht)^[48a, b] stark konserviert ist

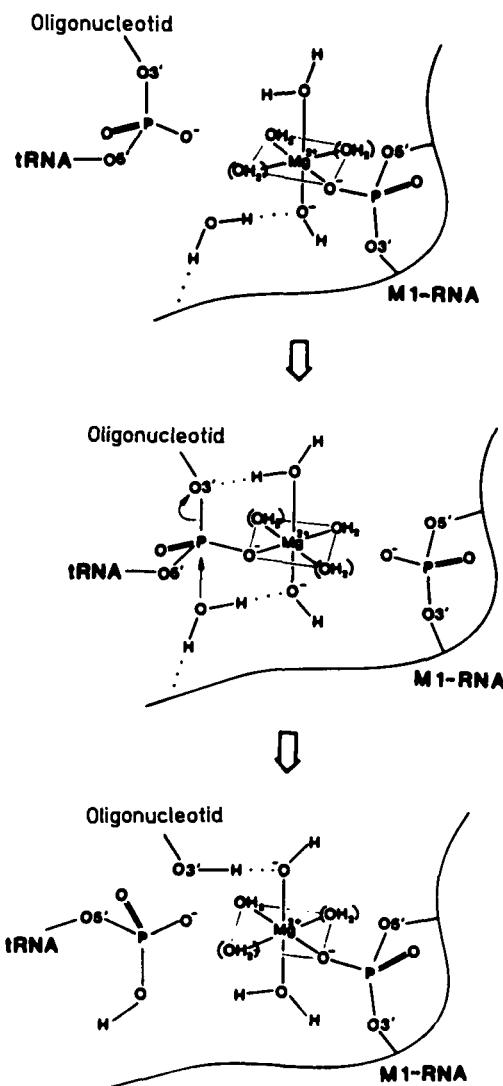


Abb. 9. Hypothetischer Mechanismus der Hydrolyse des tRNA-Vorläufers durch M1-RNA von RNase P. Die Reaktion wird durch einen Mg-H₂O-Komplex, der zunächst an eine Phosphatgruppe der M1-RNA gebunden ist, katalysiert. Das Mg-Ion ist dabei formal hexakoordiniert, es ist aber auch möglich, daß es tetrakoordiniert vorliegt, was durch die Klammern um die beiden äquatorialen Wassermoleküle angedeutet werden soll. Oben: Ein Wassermolekül, das an der Hydrolyse teilnehmen wird, wird über eine Wasserstoffbrückenbindung an einem O- oder N-Atom der M1-RNA positioniert. In der Mitte und unten ist das tRNA-Vorläufersubstrat durch das mit der M1-RNA assoziierte Wassermolekül gebunden und durchläuft einen Übergangszustand, bevor das zusätzliche Oligonucleotid abgespalten und bevor OH an die O5'-terminale Phosphatgruppe addiert wird. Im Anschluß an die hier gezeigten Reaktionsschritte wird das Enzym durch eine Kette von Wassermolekülen zwischen den axialen Liganden des Mg-Ions für den nächsten Cyclus regeneriert (nach [36]; Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der Am. Chem. Soc.).

sowie auch ihre Fähigkeit, verschiedene Substrate zu spalten und aktives Enzym aus Untereinheiten verschiedener Organismen zu rekonstituieren^[3, 46, 49], sind die Nucleotidsequenzen der Gene für die Untereinheiten der Enzyme extrem schnell auseinandergedriftet^[45, 47].

Mechanismus

Der Mechanismus der RNase-P-katalysierten Reaktion ist nicht genau bekannt, jedoch existieren zwei Hypothesen hierüber. In einem Fall wird eine Variation des S_N2 -in-line-Mechanismus vorgeschlagen, bei dem ein Komplex zwischen einem Magnesium-Ion und sechs Wassermolekülen die nucleophile Reaktion eines Wassermoleküls in Lösung erleichtert (Abb. 9)^[36]. Untersuchungen der Selbstspleißreaktion der *Tetrahymena*-rRNA in Thomas Cechs Laboratorium zeigen, daß der S_N2 -Mechanismus, der für die RNase-P-Reaktion vorgeschlagen wurde, auch beim Selbstspleißen von Bedeutung sein könnte^[4, 50]. In der anderen Hypothese über den Mechanismus der RNase-P-Reaktion^[51] befindet sich das Nucleophil an der Oberfläche des Enzyms; die Rolle des Magnesium-Ions ist nicht genau definiert. In unserem Laboratorium wird zur Zeit das erste Modell geprüft. Hierzu soll eine Phosphothioatgruppe an der Spaltstelle eingesetzt und die Stereochemie des Spaltproduktes analysiert werden.

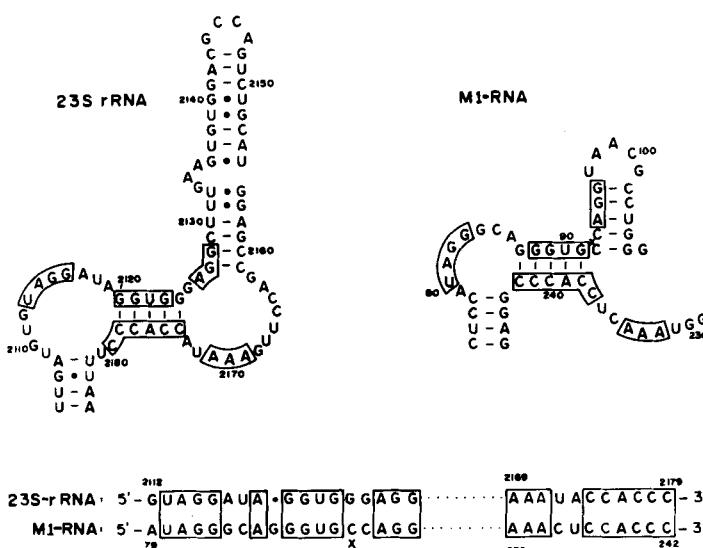
Viele Aspekte der RNase-P-Reaktion könnten aufgeklärt werden, wenn die Struktur des Enzyms im Kristall bekannt wäre, doch ist es nicht sicher, ob man diese je bestimmen können wird. Daher haben wir mit Versuchen begonnen, durch UV-Licht-Vernetzung des Substrats mit dem Enzym die Regionen der M1-RNA zu identifizieren, die für die Reaktion von zentraler Bedeutung sind. Solche Experimente haben gezeigt, daß sich eine Vernetzung zwischen einem Nucleosid in der Nähe der Spaltstelle des Substrats (C3, siehe Abb. 3) und dem Rest C92 in der M1-RNA bildet^[52]. Entfernt man C92 von der M1-RNA, so ändern sich die Kinetik

der Reaktion und die Spaltungsstellen verschiedener Substrate signifikant. Die Sekundärstruktur um C92 in M1-RNA ähnelt außerdem der tRNA-E-Region in 23S-rRNA (Abb. 10). Zusätzliche Studien haben gezeigt, daß diese Stelle für das Binden des Aminoacylstamms der tRNA-Vorläufers an das Enzym wesentlich ist und daß die 3'-terminale CCA-Sequenz die Wechselwirkung des Enzyms mit dem Substrat verursacht, wie dies auch bei der Bindung der tRNA an die E-Region der 23S-rRNA der Fall ist^[53]. Domänen mit ähnlicher Struktur und funktionellen Eigenschaften treten bei RNA-Molekülen mit sehr unterschiedlichen zellulären Funktionen auf. Es ist naheliegend, die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat und die einzelnen Schritte der enzymatischen Reaktion in dieser Region genauer zu untersuchen.

Substraterkennung

Erste Vorstellungen darüber, was für die Erkennung des Substrats durch die RNase P wichtig sein könnte, schlossen die Möglichkeit von Watson-Crick-Paarungen zwischen den in allen tRNAs enthaltenen Nucleotidsequenzen (z. B. CCA und GUUCG) und Sequenzen der M1-RNA ein^[54] sowie einen (unvollständig spezifizierten) Mechanismus des Maßnahmens, der die dreidimensionale Gestalt eines Teils der Vorläufer-tRNA erkennt^[55]. Experimente ergaben, daß die Basenpaarung zwischen Enzym und Substrat nicht essentiell für die enzymatische Reaktion ist^[54, 56]. Daher richtete sich alle Aufmerksamkeit auf die Konformation des Substrates in Lösung. Es war bekannt, daß RNase P beliebigen Ursprungs tRNA-Vorläufer beliebigen anderen Ursprungs spalten kann. Als nun eine ungewöhnliche tRNA entdeckt wurde, in der D-Stamm und D-Schlaufe fehlten, nämlich die tRNA^{Ser} aus Schweinemitochondrien^[57], untersuchten wir, ob M1-RNA ein Analogon auch eines Vorläufers dieser tRNA spalten könne.

In Zusammenarbeit mit William McClain zeigten wir, daß nicht nur auf D-Stamm und D-Schlaufe verzichtet werden konnte, sondern daß auch Anticodonstamm und -schlaufe nicht entscheidend für die Erkennung des Moleküls waren (Abb. 11)^[58]. Selbst ein mini-tRNA-Substrat, bestehend aus Aminoacylacceptor-Stamm mit daraufgeschichteten T-Stamm und -Schlaufe, wurde mit fast der gleichen Effizienz wie die entsprechende Vorläufer-tRNA gespalten. Dieses Minimalsubstrat enthält eine RNA-Helix, die dem Teil der intakten dreidimensionalen Struktur der normalen tRNA gleicht, in dem der T-Stamm auf den Aminoacylacceptor-Stamm geschichtet ist (vgl. Abb. 1). Darüber hinaus konnten wir kürzlich zeigen, daß die RNA-Spaltung auch ohne das Vorhandensein der T-Schlaufe M1-katalysiert wird und daß dazu nur sechs Basenpaare in der Helixregion nötig sind. In separaten Experimenten fanden wir, daß nur ein zusätzliches Nucleotid am 5'-Ende zur Spaltung ausreicht. Obwohl diese verkürzten Substrate nicht so effizient gespalten wurden wie tRNA-Vorläufer oder pAT1 (das haarnadelähnliche Substrat in Abb. 11), müssen ihre Erkennungselemente doch ausreichen, um das Ablauen der Reaktion zu gewährleisten. Alle diese Modellsubstrate enthalten die 3'-terminale CCA-Sequenz, und keines wird effizient gespalten, wenn diese verändert wird. Daher scheinen die CCA-Sequenz, wie wir schon vorher mit normalen tRNA-Vorläufern erkannt hat-



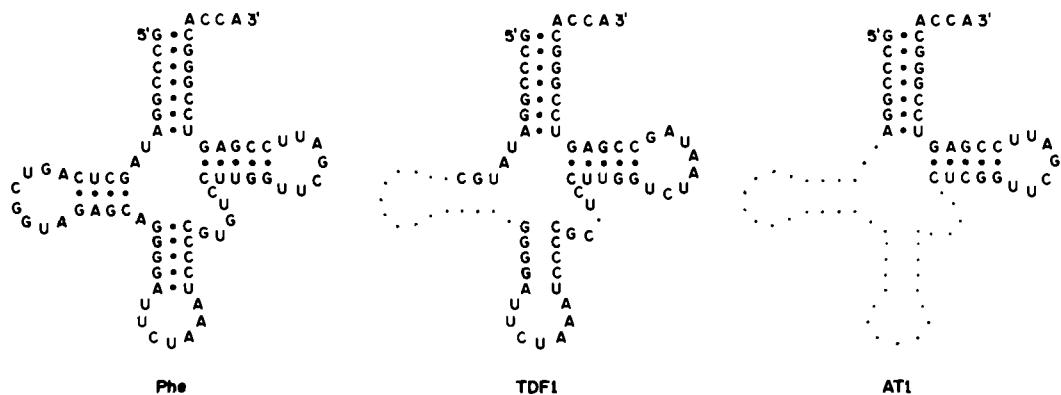


Abb. 11. Struktur der reifen tRNA^{Phe} und verschiedener Derivate, die von synthetischen Genen codiert werden. Die Sequenzen werden ohne die für die reife tRNA^{Phe} charakteristischen modifizierten Basen gezeigt, da diese in den in-vitro-Transkripten nicht vorhanden sind. Die Transkripte enthalten zusätzliche Nucleotide an beiden Enden des Moleküls (nach [58]). Unten: Struktur des AT-1-Vorläufers, in einer Stamm-Schlaufen-Struktur gezeichnet, die der Struktur der entsprechenden Region in tRNA^{Phe} ähnelt. Die Pfeile markieren die Stelle der Spaltung durch RNase P oder M1-RNA. Die Sequenz der reifen AT-1-RNA ist im oberen Teil der Abbildung gezeigt (nach [58]; Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der American Association for the Advancement of Science).

ten^[59], sowie zumindest eine halbe Drehung einer RNA-Helix für die Erkennung kleiner Substrate essentiell zu sein.

Aus Experimenten mit Modellsubstraten können nur unter Vorbehalt Schlüsse gezogen werden, da einige der Erkennungselemente, die in diesen Beispielen von großer Bedeutung sind, möglicherweise in normalen, d. h. in Zellen vorkommenden tRNA-Vorläufern nur eine untergeordnete Rolle spielen oder von anderen Faktoren ergänzt werden. Sicherlich können Veränderungen des D-Stamms oder des Anticodonstamms eines normalen tRNA-Vorläufers dramatische Auswirkungen auf die Spaltungsgeschwindigkeit durch RNase P haben, während diese Regionen des Substrats in den Modellsystemen überhaupt nicht vorkommen.

Durch die Hybridisierung zweier Oligoribonucleotide (Abb. 12) können wir Substrate kreieren und manipulieren. Eine „externe Führungssequenz“, welche die RNase P zu ihrer Zielsequenz führt, kann theoretisch an jede beliebige RNA bekannter Sequenz hybridisiert werden, so daß sie den 3'-Abschnitt des Substrates bildet. RNase P sollte dann das Hybridsubstrat an der 5'-Seite des doppelsträngigen Teils der Übergangsregion von Einzel- zu Doppelstrang spalten. Diese neue Methode ermöglicht es, den Erkennungsmechanismus detailliert zu untersuchen und prinzipiell eine RNA von beliebiger Sequenz *in vivo* zu desaktivieren (Abb. 13). Abgesehen vom Problem der *in-vivo*-Expression der externen Führungssequenz hat diese Methode den Vorteil, daß RNase P in fast allen Zellen schon vorhanden ist. Vorausgesetzt, daß das Hybridsubstrat so entworfen werden kann, daß es der Regiospezifität des Enzyms des ausgewählten Wirtsorganismus entspricht, sollte die Ziel-RNA desaktiviert werden.

Daß ein Oligoribonucleotid dazu verwendet wird, die RNase P zu dem zu spaltenden Oligonucleotid zu dirigieren, ähnelt zumindestens formal der Selektion der Spaltstelle durch andere bekannte RNA-Katalysatoren. Die Group-I-Introns, die Satelliten-RNAs und andere RNAs verwenden Führungssequenzen^[4, 5], um Spaltstellen auszuwählen oder um Strukturen mit definierter Spaltstelle zu bilden. In fast

allen anderen Aspekten unterscheiden sich diese Reaktionen jedoch wesentlich von der RNase-P-Reaktion.

Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft von RNase P

Die Entdeckung der RNA-Katalyse hat zu neuen Hypothesen über den Ursprung der ersten selbstreplizierenden biochemischen Systeme geführt. Die Modelle für diese frühen Systeme beruhen sämtlich auf RNA als genetischem Material und als Quelle katalytischer Aktivität (Schema 2)^[6, 7, 10, 11]. Alle Spekulationen setzen voraus, daß das, was wir in heutigen Systemen sehen, in irgendeiner Weise die Eigenschaften der RNA von vor einer Milliarde Jahren widerspiegelt. Sollte dies tatsächlich der Fall sein, so ist die Vielfalt der von RNA-Reaktionen aufgewiesenen, biochemischen Mechanismen (Tabelle 1) sehr eindrucksvoll und könnte die Entwicklung ziemlich komplexer Systeme in Abwesenheit von Proteinen und DNA ermöglicht haben. In diesem Zusammenhang sollen kurz einzelne Aspekte der von RNase P *in vivo* katalysierten Reaktionen betrachtet werden.

Obwohl M1-RNA sehr einfach Substrate spalten kann, ist klar ersichtlich, daß diese speziellen Spaltungsreaktionen heutzutage *in vivo* nicht auftreten können, da sie viel zu häufig vorkämen, die gesamte RNA-Zellpopulation also zu empfindlich gegenüber dem RNase-P-katalysierten Abbau wäre. Man kann sich jedoch vorstellen, daß es in einer „RNA-Welt“ durchaus von Vorteil war, ein RNA-Molekül zu haben, daß viele Stellen in sehr langen, enzymatisch oder nichtenzymatisch generierten Molekülen identifizieren konnte. Durch Bildung vieler kleiner Moleküle aus größeren könnte eine größere Anzahl verschiedener Konformationen von RNA in Lösung entstanden sein, von denen manche

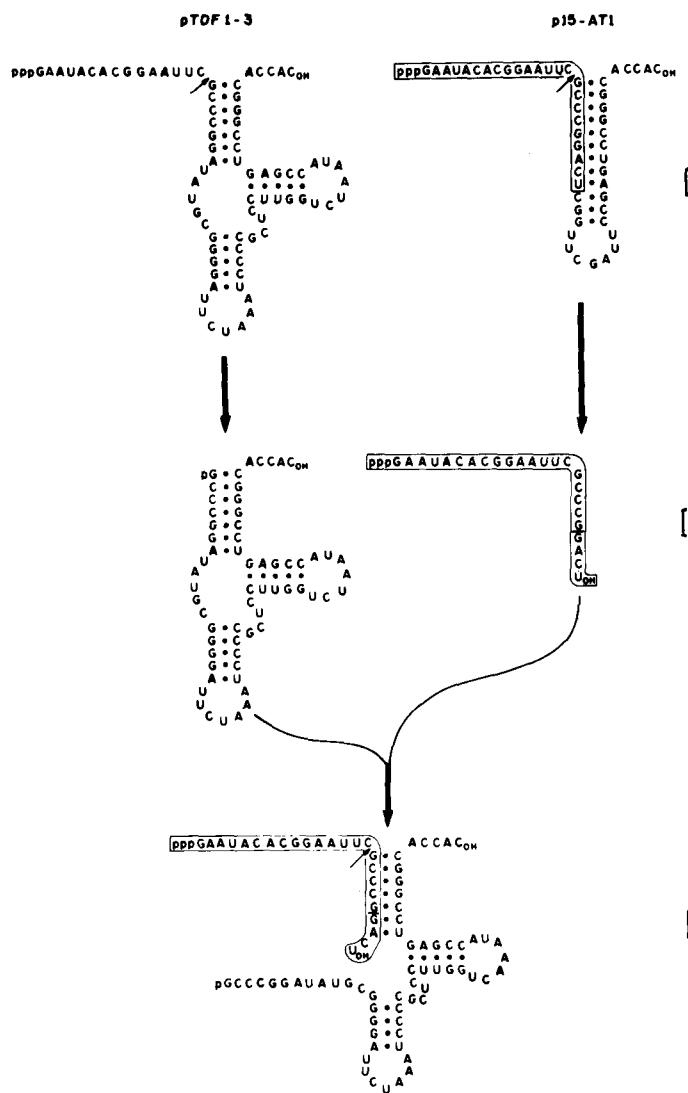
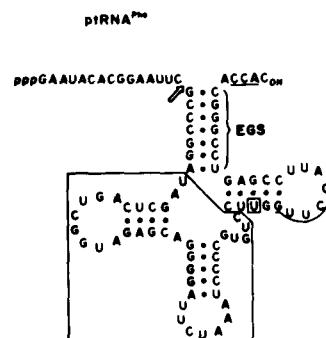


Abb. 12. Schematische Darstellung der Bildung eines Substrates für RNase P durch Hybridisierung von zwei Oligoribonucleotiden. TDF-1 (siehe Abb. 11) wurde durch RNase-P-Spaltung des entsprechenden durch in-vitro-Transkription hergestellten Vorläufers erhalten [58]. Ein Teil (eingeklammerte Sequenz) des Vorläufers von AT-1 (Abb. 11) wurde durch in-vitro-Transkription eines Restriktionsfragments der DNA, die für das AT-1-synthetische Gen codiert, hergestellt (A. C. Forster und S. Altman, unveröffentlicht). [a] Gespalten, [b] unge- spalten.

wiederum eine katalytische Aktivität hatten oder eine andere brauchbare Funktion, die von den großen Molekülen nicht ausgeübt werden konnte. Abgesehen von den Details des Ursprungs des genetischen Codes und der Proteine kann man sich fragen, warum sich eine Proteinuntereinheit mit der

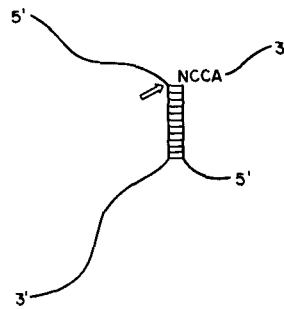
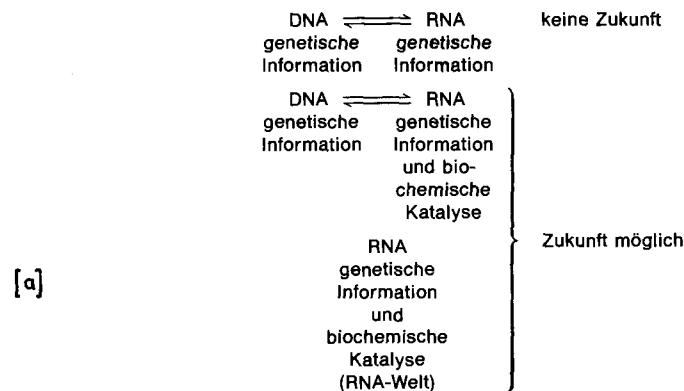


Abb. 13. Erzeugung einer Zielsequenz für die Spaltung durch RNase P. Eine externe Führungssequenz (EGS) ist durch die kürzere, mit NCCA endende Linie angedeutet. Für N wird in tRNA-Molekülen hauptsächlich A gefunden. Die Region der EGS, die mit Wasserstoffbrücken gebunden wird, ist so entworfen, daß sie zu einer Region bekannter Sequenz der zu spaltenden RNA komplementär ist.

M1-RNA assoziierte? Wir haben kürzlich gezeigt, daß die Proteinuntereinheit der RNase P die Spaltungsstelle und die Geschwindigkeit, mit der spezielle Substrate umgesetzt werden, verändern kann^[52, 60]. Möglicherweise bewirken die Proteine also die Feineinstellung der Spezifität bezüglich der Spaltungsstelle, indem sie die Reaktionsgeschwindigkeit an speziellen Stellen spezieller Substrate erhöhen. Was wir heutzutage als die normalen Spaltungsstellen ansehen, mag in Verbindung mit dem Auftreten von Proteincofaktoren und während stetiger Änderung der physiologischen Bedingungen über Äonen selektiert worden sein. Die „unselektierten“ Reaktionen, beispielsweise die mit sehr kleinen Haarnadelsubstraten, wurden in der Folge zu zweitrangigen oder unwichtigen Reaktionen, die *in vivo* nicht mehr relevant sind.



Schema 2. Drei Möglichkeiten des Informationstransfers, bevor Proteine daran teilnahmen. Die Mechanismen des Informationstransfers zwischen DNA und RNA, ob enzymatisch oder nichtenzymatisch, sind nicht spezifiziert. Die Bezeichnung „RNA-Welt“ wurde von Gilbert [7] eingeführt.

Und schließlich: Warum spalten RNA-Enzyme nur Phosphodiesterbindungen? Drei Antworten kommen einem sofort in den Sinn. Die erste und trivialste ist, daß RNA-Enzyme möglicherweise andere Klassen von Bindungen spalten können und wir nur noch nicht die richtigen Beobachtungen gemacht oder nicht die richtigen Reaktionsbedingungen gefunden haben (der letzte Teil der Antwort ist eine generische Erwiderung auf Fragen bezüglich des mangelnden Erfolges bei der Durchführung jeglicher Reaktion *in vitro*). Zweitens

ist es möglich, daß in einer RNA-Welt RNA-Moleküle nur Phosphodiesterbindungen spalten oder knüpfen konnten, da die RNA-Welt eine primitive Welt war, in der keine anderen Reaktionen von Enzymen katalysiert wurden. Als dann Proteine erschienen, war eine Diversifizierung der RNA-Enzyme nicht mehr nötig. Die dritte und wichtigste Antwort schließlich ist, daß die Chemie der RNA-Enzyme und der Enzyme mit RNA-Untereinheiten^[61, 62], wenn sie ausreichend verstanden ist, uns zeigen wird, daß es einen zwingenden Grund dafür gibt, daß RNA-Moleküle nur Phosphodiesterbindungen spalten. Die Gültigkeit oder Ungültigkeit der letzten Antwort kann direkt experimentell geprüft werden, und hierin liegt die Arbeit der nächsten Jahre.

Dank

Ich bin so vielen Leuten zu Dank verpflichtet, daß es unmöglich ist, sie alle hier aufzuzählen. Trotzdem möchte ich meinen Eltern, meiner Familie, meinen Lehrern (speziell *Leonard Lerman, Mathew Meselson, Sydney Brenner, John D. Smith und Lee Grodzins*), meinen Arbeitskollegen (speziell *Hugh Robertson und William H. McClain*) sowie meinen Studenten und Mitarbeitern in meinem Laboratorium (speziell *Cecilia Guerrier-Takada*) danken. Die Steuerzahler der Vereinigten Staaten von Amerika haben über die Agenturen der National Institutes of Health und der National Science Foundation meine Arbeit großzügig unterstützt.

Eingegangen am 30. Januar 1990 [A 772]
Übersetzt von Dr. Christian Schneider
und Dipl.-Chem. Ulrike von Krosigk, Zürich

- [1] F. Crick, *Nature (London)* 277 (1970) 561–563.
- [2] S. Altman, *Nature (London) New Biol.* 229 (1971) 19–21.
- [3] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell (Cambridge Mass.)* 35 (1983) 849–857.
- [4] T. R. Cech, *Science (Washington D.C.)* 236 (1987) 1532–1539.
- [5] S. Altman, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 62 (1989) 1–36.
- [6] J. E. Darnell, W. F. Doolittle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 1271–1275.
- [7] W. Gilbert, *Nature (London)* 319 (1986) 618.
- [8] H. D. Robertson, *Nature (London)* 322 (1986) 16–17.
- [9] F. H. Westheimer, *Nature (London)* 319 (1986) 534–535.
- [10] A. M. Weiner, N. Maizels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 7383–7387.
- [11] G. F. Joyce, *Nature (London)* 338 (1989) 217–223.
- [12] C. R. Woese: *The Origins of the Genetic Code*, Harper and Row, New York 1967.
- [13] F. Crick, *J. Mol. Biol.* 38 (1968) 367–379.
- [14] L. Orgel, *J. Mol. Biol.* 38 (1968) 381–393.
- [15] S. H. Kim, F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, J. L. Sussman, A. H. J. Wang, N. C. Seeman, A. Rich, *Science (Washington D.C.)* 185 (1974) 435–440.
- [16] J. D. Robertson, J. E. Ladner, J. T. Finch, D. Rhodes, R. S. Brown, B. F. C. Clark, A. Klug, *Nature (London)* 250 (1974) 546–551.
- [17] J. N. Abelson, M. L. Gefter, L. Barnett, A. Landy, R. L. Russell, *J. Mol. Biol.* 47 (1970) 15–28.
- [18] R. L. Russell, J. N. Abelson, A. Landy, M. L. Gefter, S. Brenner, J. D. Smith, *J. Mol. Biol.* 47 (1970) 1–13.
- [19] J. D. Smith, L. Barnett, S. Brenner, R. L. Russell, *J. Mol. Biol.* 54 (1971) 1–14.
- [20] a) S. Altman, J. D. Smith, *Nature (London) New Biol.* 233 (1971) 35–39; b) H. D. Robertson, S. Altman, J. D. Smith, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 5243–5251.

- [21] a) D. Bernhardt, J. E. Darnell, *J. Mol. Biol.* 42 (1967) 43–56; b) R. H. Burdon, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 11 (1971) 33–79; c) *Brookhaven Symp. Biol.* 26 (1974) 138–153.
- [22] B. C. Stark, R. Kole, E. J. Bowman, S. Altman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 3717–3721.
- [23] T. Ikemura, J. E. Dahlberg, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 5024–5032.
- [24] P. Schedl, P. Primakoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 2091–2095.
- [25] P. Schedl, P. Primakoff, J. Roberts, *Brookhaven Symp. Biol.* 26 (1974) 53–76.
- [26] H. Ozeki, H. Sakano, S. Yamada, T. Ikemura, Y. Shimura, *Brookhaven Symp. Biol.* 26 (1974) 89–105.
- [27] H. Sakano, S. Yamada, T. Ikemura, Y. Shimura, H. Ozeki, *Nucleic Acids Res.* 1 (1974) 355–371.
- [28] W. H. McClain, *Acc. Chem. Res.* 10 (1977) 418–425.
- [29] J. Carbon, S. Chang, L. L. Kirk, *Brookhaven Symp. Biol.* 26 (1974) 26–36.
- [30] S. Altman, H. D. Robertson, *Mol. Cell. Biochem.* 1 (1973) 83–93.
- [31] R. L. Garber, M. A. Q. Siddiqui, S. Altman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 635–639.
- [32] R. Kole, S. Altman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 3795–3799.
- [33] R. Kole, S. Altman, *Biochemistry* 20 (1981) 1902–1906.
- [34] R. Reed, M. Baer, C. Guerrier-Takada, H. Donis-Keller, S. Altman, *Cell (Cambridge Mass.)* 30 (1982) 627–636.
- [35] J. Fruton, S. Simmonds: *General Biochemistry*, 2. Auflage, Wiley, New York 1958, S. 211.
- [36] C. Guerrier-Takada, K. Haydock, L. Allen, S. Altman, *Biochemistry* 25 (1986) 1509–1515.
- [37] T. R. Cech, A. J. Zaug, P. J. Grabowski, *Cell (Cambridge Mass.)* 27 (1981) 487–496.
- [38] T. R. Cech, B. L. Bass, *Annu. Rev. Biochem.* 55 (1986) 599–629.
- [39] B. James, G. J. Olsen, J. Lin, N. Pace, *Cell (Cambridge Mass.)* 52 (1988) 19–26.
- [40] N. Lumelsky, S. Altman, *J. Mol. Biol.* 202 (1988) 443–454.
- [41] D. S. Waugh, C. J. Green, N. R. Pace, *Science (Washington D.C.)* 244 (1989) 1569–1571.
- [42] D. L. Miller, N. C. Martin, *Cell (Cambridge Mass.)* 34 (1983) 911–917.
- [43] G. Krupp, B. Cherayil, D. Frendeway, S. Nishikawa, D. Soll, *EMBO J.* 5 (1986) 1697–1703.
- [44] J. Y. Lee, D. R. Engelke, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 2536–2543.
- [45] M. Bartkiewicz, H. Gold, S. Altman, *Genes Dev.* 3 (1989) 488–499.
- [46] N. P. Lawrence, A. Richman, R. Amini, S. Altman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 6825–6829.
- [47] H. A. Gold, *Ph. D. Thesis*, Yale University, New Haven, CT USA 1988.
- [48] a) H. A. Gold, J. Craft, J. A. Hardin, M. Bartkiewicz, S. Altman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 5483–5487; b) M. J. Mamula, M. F. Baer, J. Craft, S. Altman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 8717–8721.
- [49] H. A. Gold, S. Altman, *Cell (Cambridge Mass.)* 44 (1986) 243–249.
- [50] J. A. McSwiggen, T. R. Cech, *Science (Washington D.C.)* 244 (1989) 679–683.
- [51] C. I. Reich, G. J. Olsen, B. Pace, N. R. Pace, *Science (Washington D.C.)* 239 (1988) 178–181.
- [52] C. Guerrier-Takada, N. Lumelsky, S. Altman, *Science (Washington D.C.)* 246 (1989) 1578–1584.
- [53] D. Moazed, H. F. Noller, *Cell (Cambridge Mass.)* 57 (1989) 585–597.
- [54] C. Guerrier-Takada, S. Altman, *Cell (Cambridge Mass.)* 45 (1986) 177–183.
- [55] A. L. M. Bothwell, B. C. Stark, S. Altman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 1912–1916.
- [56] M. F. Baer, R. M. Reilly, G. M. McCormick, T.-Y. Hai, S. Altman, U. L. RajBhandary, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 2344–2351.
- [57] M. H. L. de Brujin, A. Klug, *EMBO J.* 2 (1983) 1309–1321.
- [58] W. H. McClain, C. Guerrier-Takada, S. Altman, *Science (Washington D.C.)* 238 (1987) 527–530.
- [59] C. Guerrier-Takada, W. H. McClain, S. Altman, *Cell (Cambridge Mass.)* 38 (1984) 219–224.
- [60] C. Guerrier-Takada, A. van Belkum, C. W. A. Pleij, S. Altman, *Cell (Cambridge Mass.)* 53 (1988) 267–272.
- [61] D. D. Chang, D. A. Clayton, *Science (Washington D.C.)* 235 (1987) 1178–1184.
- [62] C. W. Greider, E. H. Blackburn, *Cell (Cambridge Mass.)* 51 (1987) 887–898.
- [63] J. D. Watson, N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, A. M. Weiner: *Molecular Biology of the Gene*, 4. Auflage, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, 1987, S. 388.
- [64] C. Guerrier-Takada, S. Altman, *Biochemistry* 23 (1984) 6327–6334.
- [65] C. Guthrie, J. G. Seidman, S. Altman, B. G. Barrell, J. D. Smith, W. H. McClain, *Nature (London) New Biol.* 246 (1973) 6–11.