

Selbstpleißen und enzymatische Aktivität einer intervenierenden Sequenz der RNA von *Tetrahymena* (Nobel-Vortrag)**

Von Thomas R. Cech*

Einleitung

In einer lebenden Zelle sind tausende chemischer Reaktionen nötig, damit essentielle Prozesse wie Energiegewinnung, Bewegung, Wachstum, Reaktion auf externe Stimuli und Reproduktion ablaufen können. Obwohl es sich um spontane Reaktionen handelt, sind die Reaktionsgeschwindigkeiten selten groß genug, um Leben zu ermöglichen. Enzyme, d. h. biologische Katalysatoren, die in allen Zellen vorkommen, beschleunigen diese Reaktionen stark und verleihen ihnen außerordentliche Spezifität.

Im Jahre 1926 kristallisierte *James B. Sumner* das Enzym Urease und identifizierte es als Protein. Skeptiker argumentierten, daß die enzymatische Aktivität möglicherweise von einer im Präparat in Spuren vorhandenen Verunreinigung statt vom Protein stammen könnte^[1], und es dauerte weitere zehn Jahre, bis *Sumners* Entdeckung allgemein anerkannt war. Als mehr und mehr Proteinenzyme gefunden wurden, schien es, als ob ausschließlich Proteine als Biokatalysatoren fungierten. In den Jahren 1981 und 1982 entdeckten meine Forschungsgruppe und ich, daß eine Ribonucleinsäure (RNA), genetisches Material, dazu fähig ist, die eigenen Nucleotidbindungen zu spalten und wieder zusammenzufügen. Zum ersten Mal wurde so die Bildung eines katalytisch aktiven Zentrums durch eine selbstpleißende Ribonucleinsäure nachgewiesen.

In diesem Vortrag gebe ich aus meiner Sicht die Ereignisse wieder, welche zur Entdeckung des RNA-Selbstpleißens und des Katalysepotentials der RNA führten. Einmal mehr wird deutlich, auf welchen Umwegen die Forschung oft zum Ziel kommt. Die Entscheidung, unsere frühen Experimente so ausführlich zu beschreiben, führt dazu, daß vieles, was uns heute über das System bekannt ist, nicht zur Sprache kommen wird. Für eine umfassendere Betrachtung des Selbstpleißmechanismus und der Struktur der RNA von *Tetrahymena* sowie der RNA-Katalyse im allgemeinen sei deshalb auf eine Anzahl kürzlich erschienener Übersichtsartikel verwiesen^[2-7]. Auch mögliche medizinische und pharmazeutische Implikationen der RNA-Katalyse sind kürzlich beschrieben worden^[8].

Warum *Tetrahymena*?

In den frühen siebziger Jahren, bevor rekombinante DNA verfügbar war, wurden Struktur und Funktion von eukaryontischen Chromosomen meist an vollständigen Genomen

untersucht. Ich forschte zu der Zeit mit *John Hearst* in Berkeley und *Mary Lou Pardue* am Massachusetts Institut of Technology (MIT) über die Organisation von DNA-Sequenzen und chromosomalen Proteinen im Genom der Maus. Während meines Aufenthaltes am MIT machte mich dieser globale Ansatz zunehmend unzufrieden, und ich fragte mich, wie man zu einem detaillierteren Verständnis von Struktur und Eigenschaften einzelner Gene gelangen könnte. Als ich dann 1978 mein eigenes Labor in Boulder aufbaute, lenkte ich dementsprechend meine Aufmerksamkeit ausschließlich auf die rDNA (Gen für die großen ribosomalen RNAs) des Wimperntierchens *Tetrahymena* (Abb. 1).

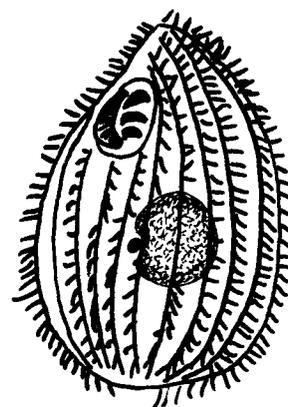


Abb. 1. *Tetrahymena thermophila* mit dem transkriptionsaktiven Makronucleus und dem Mikronucleus der Keimzellen.

Im Gegensatz zu den meisten im Zellkern enthaltenen Genen, welche in riesige Chromosomen eingebettet sind, befinden sich die Gene für die rRNA in *Tetrahymena* auf kleinen DNA-Molekülen in den Nucleoli, d. h. sie liegen extrachromosomal vor^[9, 10]. Außerdem wird das Gen im transkriptionsaktiven Makronucleus auf ca. 10 000 Kopien amplifiziert^[11]. Hierdurch gelang es, eine signifikante Menge rDNA zu isolieren. Die Fähigkeit, das Gen zu reinigen, war an sich noch keine große Leistung, da zu dieser Zeit schon gentechnische Methoden verfügbar waren, die im Prinzip die Isolierung und Sequenzierung jedes Gens ermöglichten. Reizvoll war dagegen die Aussicht, das Gen vollständig mit allen assoziierten Strukturproteinen und den Proteinen, die die Transkription (die Synthese einer RNA-Kopie durch RNA-Polymerase) regulieren, isolieren zu können.

Ein Merkmal der *Tetrahymena*-rDNA, das mich zu der Zeit nur am Rande interessierte, war die Anwesenheit einer intervenierenden Sequenz (IVS oder Intron), welche die rRNA-codierenden Sequenzen der rDNA in einigen Stämmen der *Tetrahymena pigmentosa* unterbrach^[12]. Während des Kartierens der für RNA codierenden Regionen der rDNA von *Tetrahymena thermophila* fanden *Don Rio* und ich, daß auch diese Spezies eine IVS in ihrer rDNA enthielt

[*] Prof. T. R. Cech
Howard Hughes Medical Institute,
Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado
Boulder, CO 80309-0215 (USA)

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

(Abb. 2; Cech und Rio^[13], unabhängig dazu beschrieben von Din et al.^[14]). Obwohl intervenierende Sequenzen erst zwei Jahre vorher von Phil Sharp et al. am MIT und einer Gruppe im Cold-Spring-Harbor-Laboratorium entdeckt worden waren, hatte man schon eine große Anzahl gefunden. Die Entdeckung einer neuen IVS war also kein Grund, unseren Plan, die die rDNA-Transkription regulierenden Proteine zu untersuchen, zu ändern.

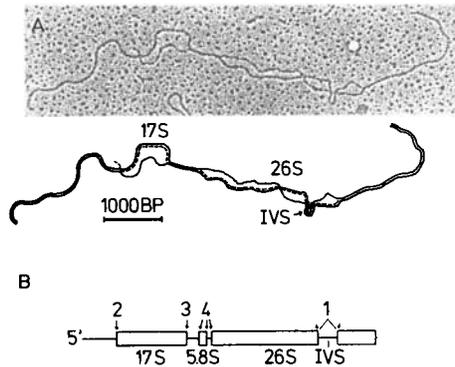
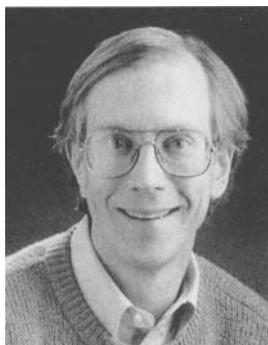


Abb. 2. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme der für RNA codierenden Abschnitte der *T. thermophila*-rDNA. Die ausgereifte, processed rRNA wurde unter R-Loop-Bedingungen zur DNA hybridisiert. In der Interpretation stellt jede durchgezogene Linie einen DNA-Einzelstrang und jede gestrichelte Linie einen RNA-Strang dar (nach [13]). BP: Basenpaar. B) Die pre-rRNA; dünne Linien stellen die Abschnitte dar, die während des Processings entfernt werden, und offene Kästen repräsentieren ausgereifte rRNA-Sequenzen. Numerierte Pfeile indizieren die gewöhnliche Abfolge der Schritte des RNA-Processings: 1) Spleißen, 2–4) endonucleolytische Spaltungen.

RNA-Spleißen in vitro

Der erste Schritt zum biochemischen Aufschlüsseln des Transkriptionsprozesses war, herauszufinden, ob die rRNA-Synthese in einem zellfreien System vonstatten gehen würde. Wir isolierten hierzu Nuclei von *T. thermophila* (die Nuclei enthalten die RNA-Polymerase und die ribosomalen Chromatintemplate) und inkubierten diese mit den zur Transkription benötigten Nucleosidtriphosphaten und Salzen. Zusätzlich gaben wir α -Amanitin zu, ein Pilzgift, das Polymerasen inhibiert, die mRNA, tRNA und andere kleine RNAs transkribieren, um uns auf die Synthese der großen rRNAs konzentrieren zu können.



Thomas R. Cech, geboren am 8. Dezember 1947, studierte Chemie am Grinnell College, Iowa (BA 1970) und an der University of California, Berkeley (Ph. D. 1975). Nach einem Postdoc-Aufenthalt im Department of Biology am Massachusetts Institut of Technology ging er 1978 an die University of Colorado, Boulder. Seine Entdeckung der selbstspleißenden RNA und die Untersuchung ihres Katalysemechanismus haben ihm viele nationale und internationale Auszeichnungen und Preise eingetragen, die 1989 im Nobel-Preis für Chemie gipfelten. 1987 wurde Cech zum Mitglied der National Academy of Sciences (USA) gewählt. Er bleibt an der University of Colorado, wo er American Cancer Society Professor und Investigator am Howard Hughes Medical Institute ist.

Die Produkte dieser in-vitro-Transkriptionsversuche wurden durch Gelelektrophorese getrennt. Sie bestanden aus Gemischen von RNAs mit hoher Molmasse (≥ 26 S), der Größe, die man für ungekürzte pre-rRNA erwartet (Abb. 3). Ferner ließ sich ein einheitliches Produkt mit niedriger Molmasse (ca. 9 S) isolieren. Bei dieser kleinen RNA, die nach der Transkription entstanden war^[15], schien es sich um eine der kurzen pre-rRNA-Regionen zu handeln, welche während des Reifungsprozesses herausgeschnitten und letztendlich vernichtet werden. Die in Frage kommenden Regionen waren ein externer, transkribierter Spacer am 5'-Ende, die internen, transkribierten Spacer, welche die 5.8 S-rRNA flankieren, und die IVS (vgl. Abb. 2 B). Mehr aus Neugier als

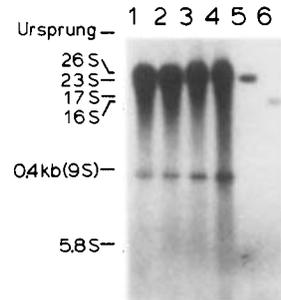


Abb. 3. Transkription und Spleißen der pre-rRNA in isolierten *T. thermophila*-Nuclei in vitro. Bahnen 1–4: RNA, die durch Inkubation der Nuclei (5–60 min) bei 30 °C entstanden ist. Die 0.4 Kilobasen-Spezies ist freigesetzte IVS-RNA. Bahnen 5 und 6: Gereinigte *Tetrahymena*-26S- und -17S-rRNAs, die als Molgewichtsstandard dienen. Die RNA wurde durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (nach [15]).

aus der Überzeugung heraus, daß die Resultate von zentraler Bedeutung für unsere Forschungsziele sein würden, ermutigte ich Art Zaugg, die Sequenzen, welche die kleine RNA codierten, zu identifizieren. Er bestätigte, daß die kleine RNA im rRNA-Gen codiert war und ordnete sie der intervenierenden Sequenz zu^[15, 16].

Diese Entdeckung war äußerst aufregend: Die intervenierende Sequenz, die als Teil der pre-rRNA in unserer in-vitro-Transkriptionsreaktion synthetisiert wurde, wurde auch in vitro sauber aus der pre-rRNA herausgetrennt. Obwohl das Interesse am Mechanismus des RNA-Spleißens groß war^[17–20], war nur ein anderer Fall bekannt – pre-tRNA in Hefe –, in dem RNA-Spleißen in vitro nachgewiesen werden konnte^[21, 22]. Es schien begründet, anzunehmen, daß die rRNA in *Tetrahymena* über einen grundsätzlich anderen

Weg gespleißt wurde als die tRNA in Hefe. Dies rechtfertigte ein detailliertes Studium beider Systeme.

Jede *Tetrahymena*-Zelle enthält 10 000 identische Gene, von denen jedes einzelne ungespleißte pre-rRNA mit einer Geschwindigkeit von einer Kopie pro Sekunde produziert. Ich überlegte mir, daß das fürs Spleißen ursächliche Enzym in ungewöhnlich hoher Konzentration im Zellkern vorliegen müsse, um diese Reaktionsgeschwindigkeit zu bewirken, was seine Isolierung erleichtern könnte. Daß ein „Spleißenzym“ im traditionellen Sinn gar nicht existiert, sondern daß etwas viel Interessanteres auf uns wartete, ahnten wir zu diesem Zeitpunkt nicht.

Unerkanntes Selbstspleißen

Unsere Strategie zur Reinigung des Spleißenzym war konventionell: Wir suchten Bedingungen, unter denen pre-rRNA-Transkription stattfand, das Spleißen aber inhibiert wurde, um dann die angereicherte pre-rRNA zu reinigen und als Substrat zu verwenden. Die pre-rRNA wollten wir dann mit Extrakten von *Tetrahymena*-Zellkernen behandeln, von denen wir schon wußten, daß sie Spleißaktivität hatten, und die Spleißreaktion durch Gelelektrophorese verfolgen. Schließlich würden wir immer reinere, aktive Unterfraktionen des Zellkernextraktes isolieren, um am Ende reines Spleißenzym zu erhalten.

Das ungespleißte pre-rRNA-Substrat konnte ohne Komplikationen isoliert werden^[23]. *Art Zaug* reinigte diese RNA durch gewöhnliche SDS-Phenol-Extraktion (SDS = Natriumdodecylsulfat) und verwendete sie anschließend in einer Reihe von Spleißreaktionen. Ein Satz Reagensgläser enthielt dabei Substrat-RNA und Zellkernextrakt in der gleichen Lösung von Nucleotiden und Salzen, in der wir auch die RNA-Transkription und das Spleißen mit intakten Zellkernen durchgeführt hatten. Ein weiteres Reagensglas, welches bis auf den Zellkernextrakt die gleichen Komponenten enthielt wie die anderen Reagensgläser, diente als „Spleiß-Minus“-Kontrollprobe.

Gleich der erste Versuch war erfolgreich: Die RNA in den Reagensgläsern mit Zellkernextrakt erzeugte eine kleine, für die IVS charakteristische Bande. Erstaunlicherweise bildete sich jedoch in der Kontrollösung, in der die RNA nur mit Salzen und Nucleotiden inkubiert worden war, die gleiche Menge an IVS. „Nun, Art, das sieht ja sehr ermutigend aus, nur müssen Sie irgendeinen Fehler bei der Herstellung der Kontrollprobe gemacht haben“. Die sorgfältige Wiederholung des Experiments führte jedoch zum gleichen Ergebnis: IVS wurde unabhängig von der Anwesenheit des Zellkernextraktes und daher anscheinend unabhängig von jeglichem Enzym freigesetzt. Ich befürchtete, daß wir gar nicht RNA-Spleißen beobachteten; vielleicht war die RNA, die wir als „Vorläufer“ bezeichneten, schon in vivo gespleißt worden, und was wir in vitro beobachteten, war möglicherweise nur irgendeine Desaggregation oder Freisetzung der IVS aus bereits gespleißter RNA. Es war ganz klar, daß es sich nur lohnte, die Reaktion weiter zu untersuchen, wenn es uns zu zeigen gelänge, daß die chemische Transformation in vitro ablief und daß dabei das gleiche Spalten und Knüpfen von Bindungen stattfand wie in lebenden Zellen. Wir mußten uns also ein wenig RNA-Chemie beibringen.

Das Mysterium des zusätzlichen G's

Um die Genauigkeit des RNA-Spleißens in den Zellkernen zu untersuchen, entschieden wir uns, die Nucleotidsequenz des IVS-RNA-Produktes zu bestimmen. Da wir schon wußten, daß das IVS-Produkt von der IVS-Region der rDNA stammte und diese im Rahmen der Fehlergrenzen die richtige Länge hatte, um der gesamten IVS zu entsprechen, war nicht zu erwarten, daß dieses Vorgehen zu einer besonderen Erkenntnis führen würde. Als *Art Zaug* die RNA am 5'-Ende mit ³²P markierte und sie dann den Sequenzierungsreaktionen unterzog, fand er die Sequenz 5'-GAAAUAGNAA... (wobei N für ein nicht identifiziertes Nucleotid steht). Die DNA-Sequenz an der Übergangsstelle zwischen Exon und IVS war für *T. pigmentosa* schon von *Wild* und *Sommer*^[24] bestimmt worden, und *Nancy Kan* in *Joe Galls* Laboratorium war dabei, die entsprechende Sequenz für *T. thermophila* zu bestimmen. Aus der *T. thermophila*-DNA-Sequenz konnte entnommen werden, daß die IVS-RNA mit 5'-AAAUAGCAA... beginnen würde.

Also stimmt unsere RNA-Sequenz bis auf das zusätzliche G am 5'-Ende vollkommen mit der DNA-Sequenz überein. *Art Zaug* überprüfte mehrmals mit größter Genauigkeit und unter Anwendung verschiedenster enzymatischer und chromatographischer Verfahren die Identität dieses terminalen Nucleotids, bis feststand: Die IVS-RNA begann mit einem normalen Guanosinrest, der mit dem nächsten Nucleotid über eine 3'-5'-Phosphodiesterbindung, wie sie von RNA-Polymerase gebildet wird, verknüpft war. Es schien klar, daß jemandem im Gall-Laboratorium, das für die hohe Qualität seiner Forschung bekannt ist, ein Fehler unterlaufen sein mußte. Wir riefen an und teilten ihnen mit, daß sie den größten Teil der Sequenz richtig bestimmt, aber offenbar ein G direkt am 5'-Ende der IVS übersehen hätten. Zu unserer größten Überraschung verteidigten sie jedes Nucleotid ihrer Sequenz: keinerlei Ungewißheit bezüglich der DNA-Sequenz, zumindest in dieser Region, und keine Chance für ein G an der 5'-Spleißstelle.

Ungefähr zur gleichen Zeit versuchte ich, die minimal notwendigen Komponenten für das Freisetzen der IVS aus pre-rRNA zu bestimmen. Die ursprünglichen Experimente waren in einem „Transkriptionscocktail“ durchgeführt worden, welcher alle vier Nucleosidtriphosphate als Bausteine für die RNA-Synthese enthielt. Ich fand heraus, daß die Abwesenheit von dreien der NTPs keinen Einfluß auf die Reaktion hatte. Nur das vierte, GTP, wurde in mikromolarer Konzentration benötigt. Darüber hinaus fand die Freisetzung der IVS nur in Gegenwart MgCl₂ statt und wurde durch bestimmte Salze wie (NH₄)₂SO₄ stimuliert.

War es Zufall, daß ausgerechnet GTP, das Nucleotid, das für die Freisetzung der IVS benötigt wurde, auch am 5'-Ende der herausgetrennten IVS gefunden wurde? Oder gab es vielleicht einen kausalen Zusammenhang zwischen den beiden Beobachtungen? Die einfachste Hypothese war, daß GTP während des Spleißens an das 5'-Ende der IVS geknüpft wurde. Die Überprüfung dieser Hypothese war einfach: Man mische ³²P-markiertes GTP mit unmarkierter pre-rRNA und schaue anschließend, ob die IVS während ihrer Freisetzung markiert worden ist.

Dieses Experiment war das sonderbarste, das ich jemals durchgeführt habe! Einerseits konnte ein erfolgreicher Verlauf nach allem, was wir über das System wußten, vorausge-

sagt werden, andererseits erschien es unglaublich naiv und unrealistisch, anzunehmen, daß schlichtes Mischen eines Nucleotids mit einer Phenol-extrahierten und Proteinase-behandelten RNA zur Bildung einer neuen kovalenten Bindung führen könne. Ich wollte auf jeden Fall vermeiden, mich vor meinen Doktoranden und Kollegen zu blamieren, und führte daher das Experiment in aller Stille durch.

Am nächsten Tag ließ ich das Gel laufen und bildete es autoradiographisch auf einem Röntgenfilm ab. In der Probe, die ^{32}P -GTP und MgCl_2 enthielt, erschien ein deutliches Radioaktivitätssignal an der Stelle der IVS-RNA. Dagegen enthielt weder die Probe mit ^{32}P -GTP, aber ohne MgCl_2 , noch die Probe, in der das ^{32}P -GTP durch ^{32}P -ATP ersetzt war, radioaktiv markierte IVS.

Während der nächsten Wochen bestätigten wir einige Hauptcharakteristika der Reaktion. Der GTP-Einbau war stöchiometrisch, ein GTP pro IVS-RNA. Das GTP wurde ausschließlich an das 5'-Ende der IVS unter Bildung einer 3'-5'-Phosphodiesterbindung addiert. Schließlich war das Triphosphat unnötig, auch GMP und sogar Guanodin waren aktiv. Durch letztere Beobachtungen wurde die ansonsten sehr plausible Hypothese hinfällig, daß GTP wie ATP im Fall der T4-Phage-Ligase als Energiequelle für die Ligation diene. Wäre diese Hypothese zutreffend gewesen, so hätten Verbindungen wie GMP und Guanodin, in denen die Phosphorsäureanhydridgruppe fehlt, inaktiv sein müssen.

Es waren nur einige Augenblicke des Nachdenkens nötig, um die neuen Erkenntnisse in einen einfachen Spleißmechanismus umzusetzen: Die Addition von Guanodin an das Phosphoratom der 5'-Spleißstelle mußte über einen Transfer des Phosphatesters oder über eine Umesterung verlaufen (Abb. 4A). Eine solche Reaktion würde das 5'-Exon freisetzen und dabei eine neue 3'-Hydroxygruppe am 3'-Ende hinterlassen. Der einfachste Weg von einem solchen Zwischenprodukt zu den beobachteten Endprodukten wäre der über eine zweite Umesterung: Angriff der 3'-Hydroxygruppe des

5'-Exons auf die 3'-Spleißstelle. Ein einziges, aktives Zentrum für die Umesterung konnte demzufolge die gesamte Spleißreaktion bewirken.

Das Modell in Abbildung 4A ist, seit wir es im Jahre 1981 erstmals beschrieben und im Jahre 1982 genauer dargestellt haben, nur geringfügig geändert worden^[23, 25]. Mit diesem Modell konnte mittlerweile eine ganze Reihe anderer IVS-katalysierter Reaktionen vorausgesagt werden^[26, 27]. Das Modell ist außerdem durch Isolierung und Charakterisierung der vorgeschlagenen Zwischenprodukte^[28], durch Demonstration der Reversibilität der Reaktionen^[29, 30] und durch Bestimmung des stereochemischen Ablaufs^[31, 32] untermauert worden. In Abbildung 4B ist ein $\text{S}_{\text{N}}2(\text{P})$ -Mechanismus für die Umesterung auf atomarem Niveau dargestellt.

Erkennen des Selbstspleißens

Die Guanodinaddition lieferte uns den Beweis, den wir brauchten: In unserer einfachen in-vitro-Spleißreaktion wurden spezifische RNA-Bindungen gebrochen und geknüpft. Eine chemisch so komplizierte Reaktion zwischen sehr unreaktiven Molekülen war mit Sicherheit katalysiert worden. Was aber war der Katalysator?

Unsere erste Vermutung war, daß die Spleißaktivität von einem Protein herrührte, welches fest (möglicherweise auch kovalent) an die aus den *Tetrahymena*-Zellkernen isolierte pre-rRNA gebunden war. Es mußte sich um einen sehr ungewöhnlichen Protein-RNA-Komplex handeln, um die verschiedenen Torturen zu überleben, die wir ihm angetan hatten: Kochen in Gegenwart des Detergens SDS, SDS-Phenol-Extraktion bei 65 °C und längere Behandlung mit unspezifischen Proteasen (Abb. 5). Die Ernsthaftigkeit, mit

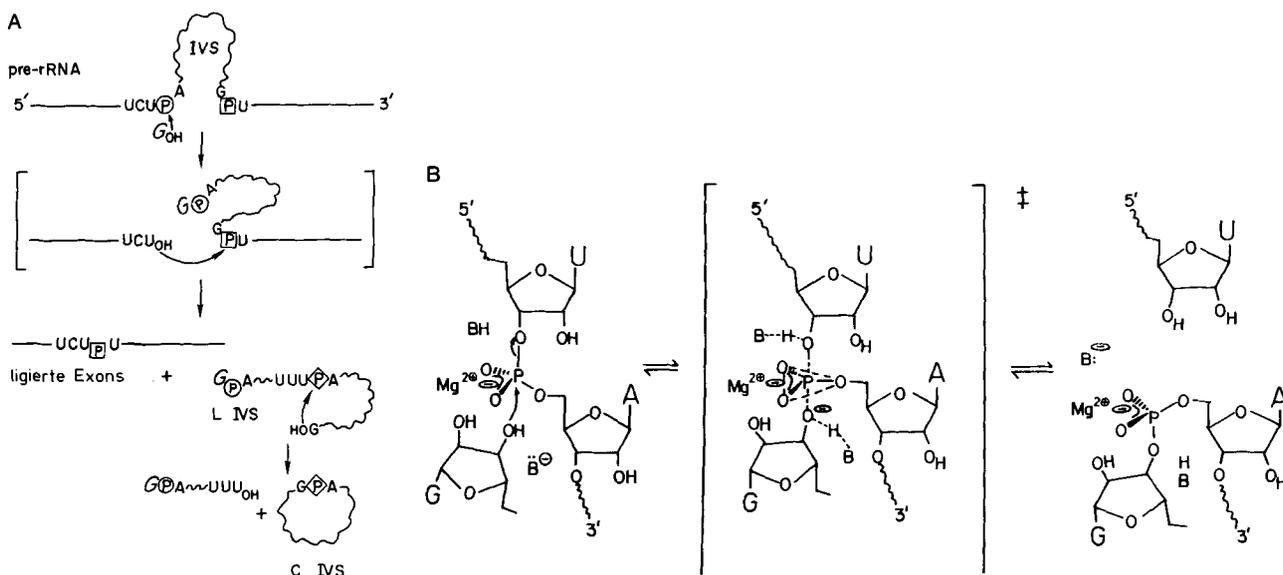


Abb. 4. A) Selbstspleißen der *Tetrahymena*-pre-rRNA über eine Abfolge von Umesterungen. Gerade Linien: Exons (ausgereifte rRNA-Sequenzen), geschlängelte Linie: IVS, Kreis: Phosphat der 5'-Spleißstelle, Quadrat: Phosphat der 3'-Spleißstelle, Karo: Phosphat an der Cyclisierungsstelle. B) Modell für den ersten Schritt, in dem das Phosphoratom an der 5'-Spleißstelle von der 3'-Hydroxygruppe des Guanosins nucleophil angegriffen wird. Die Hypothese eines „in-line- $\text{S}_{\text{N}}2$ -Angriffes“ mit Inversion der Konfiguration am Phosphor wurde inzwischen bestätigt [31]. Die Hypothese einer Säure-Base-Katalyse und der Koordination des Mg^{2+} -Ions an die Phosphatgruppe, wodurch die Elektrophilie des Phosphoratoms erhöht und der trigonal bipyramidale Übergangszustand stabilisiert würde, ist noch nicht untersucht worden (nach [3]).

der wir dieser Vermutung nachgingen, zeigt eindrucksvoll, wie sehr wir von der herrschenden Meinung, nur Proteine seien zur hocheffizienten und spezifischen biologischen Katalyse befähigt, beeinflusst waren.

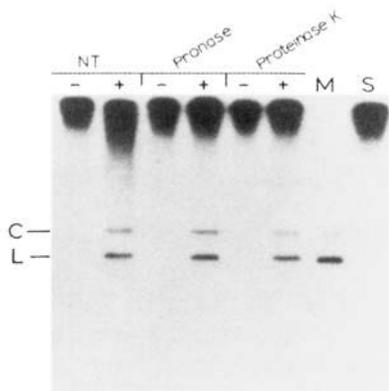


Abb. 5. Das Herausschneiden der IVS-RNA und die Cyclisierungsaktivität sind resistent gegen Behandlung mit Protease. Bahn S: durch SDS-Phenol-Extraktion gereinigte pre-rRNA. Diese RNA wurde anschließend ausgiebig mit Protease behandelt (NT: nicht behandelt). Inkubation mit GTP erfolgte entweder in Abwesenheit von $MgCl_2$ (Bahnen -) oder in Gegenwart von 10 mM $MgCl_2$ (Bahnen +). Die Freisetzung der IVS-RNA in Form eines linearen Moleküls (L) und die darauffolgende Überführung in die zirkuläre Form (C) wurden durch die Proteasebehandlung nicht beeinträchtigt. Bahn M: isolierte lineare und zirkuläre IVS-RNAs (nach [96]).

Eine alternative Hypothese war folgende^[23]:

„The resistance of the splicing activity to phenol extraction, SDS and proteases can also be interpreted in a more straightforward manner. The rRNA precursor might be able to undergo splicing without the participation of a protein enzyme. A portion of the RNA chain could be folded in such a way that it formed an active site or sites that bound the guanosine cofactor and catalyzed the various bond-cleavage and ligation events. If one of the RNA molecules produced in the reaction (for example, the free IVS) retained is activity and catalyzed additional splicing events, then it would be an example of an RNA enzyme.“

Während wir auf der Suche nach dem mit der pre-rRNA verknüpften Protein ein negatives Ergebnis nach dem anderen bekamen, schien die alternative „nur-RNA-Hypothese“ immer attraktiver. Wie aber sollten wir ihre Gültigkeit nachweisen?

Die denkbar beste Strategie war, die RNA so zu synthetisieren, daß sie niemals mit *Tetrahymena*-Zellen, unserer bislang einzigen RNA-Quelle, in Kontakt kam. Die Totalsynthese einer RNA von der Größe der pre-rRNA oder auch nur der IVS war zu der Zeit (und ist heute noch) technisch unmöglich. Der zweitbeste Ansatz war, die RNA aus einem rekombinanten DNA-Templat mit gereinigter RNA-Polymerase herzustellen.

Ein bakterielles Plasmid, das für die IVS und einen Teil der flankierenden rRNA-Sequenzen codierte und das für die Transkription mit *Escherichia coli*-RNA-Polymerase geeignet war, war bereits in *Kelly Krugers* Laboratorium konstruiert worden. Die ursprüngliche Idee war gewesen, die Synthese großer Mengen pre-rRNA zu erleichtern, mit deren Hilfe dann die Spleißenzyme isoliert werden sollten. Die Clonierung dauerte sehr viel länger als angenommen, so daß wir zum Zeitpunkt ihrer Vollendung das Plasmid sehnlichst für

einen ganz anderen Zweck haben wollten: um synthetische pre-rRNA für den Selbstspleißtest herzustellen.

Das Plasmid wurde in *E. coli* gezüchtet, vorsichtig deproteiniert und unter Bedingungen, von denen wir wußten, daß sie das Spleißen inhibierten, mit gereinigter *E. coli*-RNA-Polymerase inkubiert. Die Polymerase wurde anschließend verunreinigt und die RNA unter denaturierenden Bedingungen

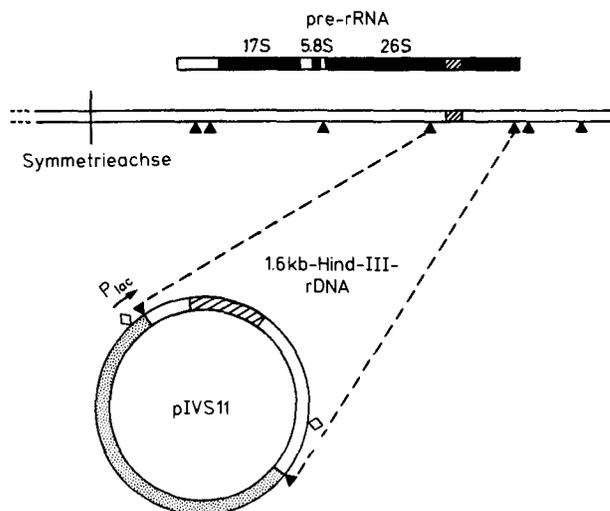


Abb. 6. Plasmid für die Synthese einer künstlichen, verkürzten Version der pre-rRNA. Oben: Diagramm der natürlichen pre-rRNA. Die transkribierten Spacer sind als weiße Kästchen, die ausgereifte rRNA als schwarze Kästchen und die IVS als schraffierte Kästchen dargestellt. Mitte: Die *T. thermophila*-rDNA. Eine Hälfte der palindromischen rDNA ist abgebildet. Unten: Plasmid pIVS11. Das 1.6 Kilobasen-Hind-III-Fragment der rDNA befindet sich neben dem *E. coli*-RNA-Polymerase-Promoter P_{1ac} . Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen sind Hind III (Dreieck) und Eco RI (Raute) (nach [34]).

durch Gelelektrophorese gereinigt. Durch Zugabe von GTP, $MgCl_2$ und Salz wurde die IVS aus dieser künstlichen, verkürzten pre-rRNA freigesetzt. Die Stelle, an der GTP die RNA-Kette spaltete, war genau die Stelle, die als 5'-Spleißstelle in vivo diente, was uns zuversichtlich machte, daß das Selbstspleißen auch in lebenden Systemen von Bedeutung sei.

Wir hielten eine eher ruhige Feier im Laboratorium ab. Von Champagner beflügelt erstellten wir eine Liste möglicher Namen für RNA-Moleküle, die dazu fähig sind, die Aktivierungsenergie für eine spezifische biochemische Reaktion herabzusetzen. Dies war der Moment, in dem wir beschlossen, Ribonucleinsäuren mit enzymähnlichen Eigenschaften „Ribozyme“ zu nennen.

Zirkuläre RNA

Gleichzeitig mit unseren Untersuchungen des pre-rRNA-Spleißens in isolierten Zellkernen verfolgten wir ein post-Spleiß-Phänomen: die Umwandlung der freigesetzten IVS in zirkuläre RNA in isolierten *Tetrahymena*-Nuclei^[33]. Die zirkuläre Form überstand die Behandlung mit Proteasen und denaturierenden Reagentien, was darauf schließen ließ, daß es sich um eine kovalent geschlossene zirkuläre RNA handeln müsse. Bei der Charakterisierung entdeckte *Paula Grabowski*, damals Doktorandin, daß die Cyclisierung mit

gründlich deproteinierter RNA in einfachem MgCl_2 -Puffer ablief. Ich mißdeutete ihre Beobachtung einer proteinfreien Cyclisierung als Artefakt einer unvollständig denaturierten linearen RNA. Als sich die Experimente als reproduzierbar erwiesen, tröstete ich mich damit, daß zwei Forscher, *Zaug* und *Grabowski*, die zwei unterschiedliche Reaktionen untersuchten, Spleißen und Cyclisieren, katalytische Aktivität in Abwesenheit von Protein fanden. Zwei merkwürdige Resultate waren mir irgendwie behaglicher als eines. Beide Beobachtungen wurden verständlich, als wir herausfanden, daß die sich selbst spleißenden Plasmidtranskripte eine IVS-RNA bildeten, die selbst cyclisierte^[34]. Die zirkuläre IVS-RNA bildete sich nicht durch Aneinanderfügen der Enden der linearen Form, sondern das 3'-Ende der linearen IVS griff ein internes Phosphoratom in der Nähe des 5'-Endes der Verbindung an und spaltete dabei ein kleines Oligonucleotid vom 5'-Ende ab (Abb. 4A). Die Cyclisierung beruhte also genau wie das RNA-Spleißen auf einer Umesterung^[26].

Wie macht es die RNA?

Auf den ersten Blick scheint die RNA schlecht zur Katalyse geeignet zu sein. Mit ihren vier recht ähnlichen Basen scheint sie kaum dazu fähig, eine spezifische, substratbindende Tasche zu bilden. Die 20 in Proteinen vorkommenden Aminosäuren variieren dagegen stark in Größe und Form und sind teils hydrophob, teils hydrophil. Für chemische Reaktionen fehlen der RNA Gruppen, die bei ungefähr neutralem pH-Wert ionisierbar sind, wohingegen Proteine Histidin und Cystein (pK_a -Werte zwischen 6 und 8) enthalten. Wie war es also möglich, daß die *Tetrahymena*-IVS eine Umesterung katalysieren konnte?

Erste Einblicke in den katalytischen Mechanismus erhielten wir durch detaillierte Studien darüber, welche Eigenschaften des Guanosins unabdingbar waren. *Brenda Bass* untersuchte jedes verfügbare Guanosinanalogen und fand große Unterschiede in ihrer Reaktivität^[35, 36]. Derivate, die sperrige Substituenten an der 7- oder 8-Position des Guaninrests oder der 5'-Position des Zuckers enthielten, waren genauso aktiv wie Guanosin – diese Positionen traten also nicht mit der IVS-RNA in Wechselwirkung. Manche Derivate waren zwar voll aktiv, jedoch nur in hoher Konzentration, während andere als Substrate inaktiv waren, aber die Reaktion von Guanosin kompetitiv inhibierten. Auf der Grundlage der K_m - und K_i -Werte dieser Guanosinanaloga war es uns möglich, die Beiträge zur freien Energie einzelner funktioneller Gruppen des Guanosins zu bestimmen. Alle Daten deuteten auf eine wohldefinierte Bindungsstelle für das Guanosin in der IVS hin. Diese Bindungsstelle konnte kürzlich auf äußerst elegante Weise von *Michel et al.*^[37] bestimmt werden.

Die Existenz einer Guanosin-bindenden Stelle erklärte die hohe Spezifität für dieses Nucleosid. Zusätzlich sollte die G-bindende Stelle durch Orientierung des Nucleophils zum Phosphatrest der 5'-Spleißstelle substantiell zur Reaktionsbeschleunigung beitragen. Die RNA-Katalyse erschien plötzlich im gewohnten Kontext: Der durch Bildung eines spezifischen Enzym-Substrat-Komplexes herbeigeführte Entropieverlust und die Orientierung reagierender Gruppen

sind von grundlegender Bedeutung für die Katalyse durch Proteinenzyme^[38, 39].

Auch der andere Reaktant im ersten Umesterungsschritt, das Phosphoratom an der 5'-Spleißstelle, wird durch eine bindende Wechselwirkung in der richtigen Position gehalten. Wie zuerst von *Davies et al.*^[40] vorgeschlagen und auch aus den Modellen von *Michel et al.*^[41] ersichtlich, werden die letzten Nucleotide des 5'-Exons durch Basenpaarung an die 5'-Exon-Bindungsstelle der IVS gebunden. Diese bindende Wechselwirkung bestimmt einerseits die Stelle, an der das Guanosin addiert wird, und hält andererseits das 5'-Exon in Position für den zweiten Schritt des Spleißens, die Exonligation^[42–45].

Die IVS bewirkt jedoch viel mehr als nur das Positionieren der reaktiven Gruppen. In Abwesenheit von Guanosin werden spezifisch die Phosphodiesterbindungen der Spleißstellen hydrolysiert, wobei sich 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxytermini bilden^[28, 46]. Eine 3'-Hydroxygruppe entsteht auch beim Selbstspleißen, nicht aber bei der unspezifischen alkalischen Hydrolyse der RNA. Diese regiospezifische Hydrolyse deutet auf die Fähigkeit der IVS hin, die Phosphate der Spleißstellen zu aktivieren (oder möglicherweise das Nucleophil, wobei OH^\ominus sowie die Guanosin-Hydroxygruppe aktiviert werden müßten). Obwohl die strukturelle Grundlage dieser Aktivierung unbekannt ist, ist die Annahme begründet, daß die Struktur des pentakoordinierten Phosphoratoms im Übergangszustand stabilisiert ist und daß eine spezifische Koordination eines Mg^{2+} -Ions vorliegt^[3, 46–49]. Man findet also im Prinzip die Katalysestrategie von Proteinenzymen auch in RNA-Katalysatoren.

Nicht nur *Tetrahymena*

Während wir uns mit der Charakterisierung des Spleißens in *Tetrahymena* beschäftigten, fragten wir uns auch, wann (und vielleicht ob) verwandte intervenierende Sequenzen in anderen Organismen gefunden werden würden. Die Unterschiede in den Nucleotidsequenzen in der Nähe der Spleißstellen machten es unwahrscheinlich, daß das *Tetrahymena*-rRNA-Spleißen mit nuclearem tRNA- oder mRNA-Spleißen verwandt sein würde. Verwandte intervenierende Sequenzen kamen aus einer ganz unerwarteten Richtung – sie wurden in Hefemitochondrien gefunden. Da Mitochondrien, die von symbiotischen Prokaryonten abstammen, normalerweise keine Gene oder Modi der Genexpression haben, die denen der Eukaryonten ähneln, war dies vollkommen unvorhersehbar. Hinzu kommt noch, daß Hefe evolutionär sehr weit von *Tetrahymena* entfernt ist.

Im Jahre 1982 identifizierten mehrere Forschungsgruppen kurze konservierte Sequenzelemente in einer Gruppe von intervenierenden Sequenzen aus Pilzmitochondrien^[40, 41, 50]. Die Forschungsgruppen um *Michel*^[41] und um *Davies*^[40] erkannten außerdem, daß die konservierten Sequenzblöcke einen Satz von kurzen basengepaarten Regionen bildeten, die dazu dienen, die intervenierenden Sequenzen in die gleiche Grundstruktur zu falten (Abb. 7 oben). *Michel* nannte diese intervenierenden Sequenzen Group-I-Introns, um sie von einer zweiten Gruppe mitochondrialer Introns, die andere gemeinsame Strukturelemente haben, zu unterscheiden^[51].

Die *Tetrahymena*-rRNA-IVS enthält die konservierten Sequenz- und Sekundärstrukturelemente, die charakteristisch für die mitochondriale Gruppe I sind^[51, 52]. Ein sehr ähnliches Strukturmodell wurde unabhängig durch Minimierung

Bedeutung. In bezug auf den Spleißmechanismus war es unwahrscheinlich, daß das *Tetrahymena*-Intron einzigartig sein würde; wir konnten daher unsere Kenntnisse über den Mechanismus durch Vergleich des Spleißens verschiedener Mitglieder der Group-I-Introns erweitern. Außerdem hatten wir nun ein plausibles Modell für die Sekundärstruktur der *Tetrahymena*-IVS zur Hand und konnten anfangen, Struktur/Funktionszusammenhänge zu formulieren. Schließlich bestand die Möglichkeit, daß der Ursprung der *Tetrahymena*-rRNA und der Introns von Pilzmitochondrien durch ihre Gemeinsamkeiten aufgeklärt werden würde; möglicherweise waren es transponierbare Elemente mit der Fähigkeit, in nucleare und mitochondriale Kompartimente einzudringen^[53].

Warten auf Nummer Zwei

Falls die RNA-Katalyse von genereller Bedeutung für die Biologie war, dann mußte es weitere Beispiele geben. Obwohl 1982 und anfangs auch 1983 keine gefunden wurden, gab es einige gute Kandidaten. Im Herbst 1983 schrieben wir einen Artikel, in dem wir spekulierten^[35]:

„Several enzymes, such as RNase P, 1,4- α -glucan branching enzyme and potato *o*-diphenol oxidase, have RNA components essential for their catalytic activities. The peptidyl transferase activity of ribosomes also requires an RNA-protein complex. It remains to be seen whether the RNA is directly involved in the active site of any of these ribonucleoprotein enzymes.“

Als unser Artikel 1984 publiziert wurde, war die Spekulation über RNase P schon überholt, denn *Guerrier-Takada* et al.^[54] hatten berichtet, daß eine RNA die katalytische Untereinheit dieses Ribonucleoproteinenzym war. Anfang 1984 wurde bekannt, daß eine synthetische RNA aus *E.-coli*-RNase P, die in vitro von einem rekombinanten DNA-Templat transkribiert worden war, ebenfalls intrinsische katalytische Aktivität hatte; die Möglichkeit, daß die Katalyse von einer Proteinverunreinigung herrührte, war dabei ausgeschlossen^[55]. Ähnlich fungierte auch die RNA-Untereinheit der *Bacillus-subtilis*-RNase P in vitro als Enzym^[54, 56]. Die Entdeckung über die RNase P war sehr aufregend für uns, nicht nur, weil sie ein zweites Beispiel für die Herabsetzung der Aktivierungsenergie einer spezifischen biochemischen Reaktion durch eine RNA lieferte, sondern auch, weil zum ersten Mal bewiesen war, daß eine RNA eine Reaktion katalysieren konnte, ohne dabei selbst eine Umwandlung zu erfahren. Die RNA-Katalyse war also nicht auf den Bereich der intramolekularen Katalyse beschränkt.

Während des folgenden Jahres wurde über weitere selbstspleißende Group-I-Introns berichtet. *Garriga* und *Lambowitz*^[57] fanden heraus, daß die erste IVS der Cytochrom-b-pre-mRNA von *Neurospora*-Mitochondrien sich in vitro selbst spleißte. Etliche selbstspleißende Group-I-RNAs aus Hefemitochondrien wurden von *Van der Horst* und *Talbak*^[58] charakterisiert. Völlig unerwartet wurden selbstspleißende Group-I-IVS' in drei T4-Bacteriophage-mRNAs entdeckt^[59-61]; RNA-Spleißen fand also auch in Prokaryonten statt. In allen diesen Fällen verlief das Spleißen über die gleiche G-Additionsroute wie bei der *Tetrahymena*-rRNA-IVS.

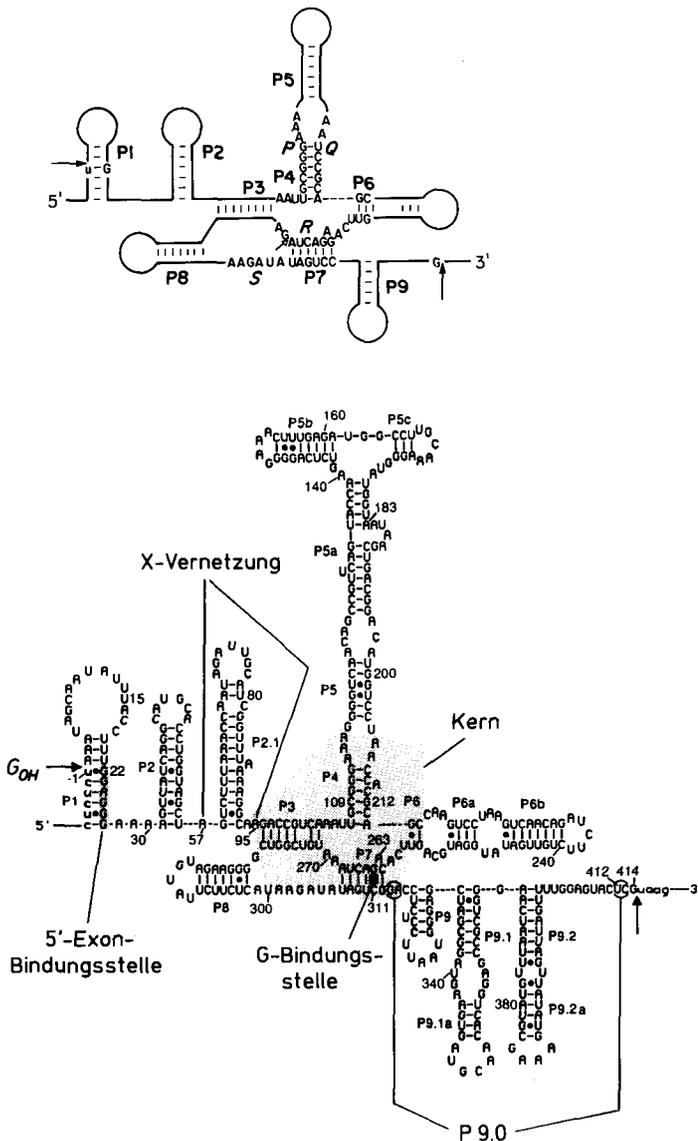


Abb. 7. Von *Michel* et al. [41] und *Davies* et al. [40] durch vergleichende Sequenzanalyse [97, 98] bestimmte Sekundärstruktur der Group-I-intervenierenden Sequenzen. Oben: Verallgemeinerte Struktur, in der die konservierten basengepaarten Elemente P1–P9 angedeutet sind. Die konservierten Sequenzelemente P, Q, R, S werden durch ihre häufigsten Nucleotidsequenzen repräsentiert. Gefüllte Pfeile: 5'- und 3'-Spleißstellen. Offener Pfeil: Stelle, an der sich in Group-I-A-Strukturen eine zusätzliche Stammschleife befindet. – Unten: Sekundärstruktur der *T. thermophila*-rRNA-IVS. Die 5'-Exon-Bindungsstelle und der in den Group-I-IVS am stärksten konservierte Teil der Kernstruktur sind schattiert. Die Guanosin-Bindungsstelle wurde von *Michel* et al. [37] bestimmt. Durch UV-Quervernetzung (X-Vernetzung) können die Tertiärstrukturwechselwirkungen bestimmt werden [99]. Kleinbuchstaben: Exons. Großbuchstaben: IVS (nach [4]).

der freien Energie entwickelt, wobei die experimentell bestimmten Stellen miteinbezogen wurden, an denen die gefaltete RNA von verschiedenen Nucleasen gespalten wird^[53]. Ein Strukturmodell nach heutigem Wissensstand ist in Abbildung 7 unten dargestellt.

Die Konvergenz der beiden ursprünglich nicht in Zusammenhang stehenden Ideen war in verschiedener Hinsicht von

Die mitochondrialen Group-II-IVS' haben konservierte Sequenzen und Sekundärstrukturelemente, die sich von denen der Group-I-IVS' unterscheiden^[51]. *Peebles et al.*^[62] und *Van der Veen et al.*^[63] entdeckten, daß pre-mRNAs mit Group-II-IVS in vitro selbstspleißend sind. Bei der Reaktion, die ohne Guanotin abläuft, entsteht eine verzweigte „Lariat“-Struktur. Der vorgeschlagene Mechanismus dieser Reaktion ist in Abbildung 8 dargestellt.

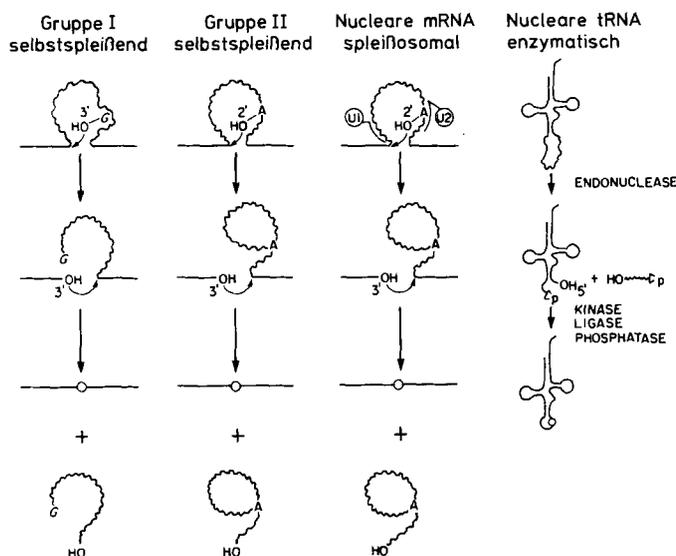


Abb. 8. Mechanismus des Spleißens der vier Hauptgruppen von Vorläufer-RNAs. Geschlängelte Linien indizieren intervenierende Sequenzen, gerade Linien die flankierenden Exons. Zum Spleißens der nuclearen mRNA assoziieren viele Komponenten mit der pre-mRNA unter Bildung eines Spleißosoms; nur die kleinen Ribonucleoproteine U1 und U2 sind hier dargestellt (nach [102]).

Die grundlegende Chemie der selbstspleißenden Group-II-RNAs scheint die gleiche zu sein wie die der nicht selbstspleißenden nuclearen pre-mRNAs. Für das Spleißens der nuclearen mRNA muß sich aus dem Substrat und einem großen Komplex von Proteinen und kleinen nuclearen Ribonucleoproteinen ein Spleißosom bilden^[64–66]. Die Ähnlichkeit der Mechanismen führte zur Annahme, daß nucleares mRNA-Spleißens auch RNA-katalysiert sein könnte, wobei die kleinen nuclearen RNAs den größten Teil zur Katalyse beitragen würden^[34, 67].

Erzürnte Enzymologen

Obwohl unsere Beschreibung des RNA-Selbstspleißens auf viele schockierend wirkte, wurde sie in wissenschaftlichen Kreisen schnell akzeptiert. Dagegen führten die von uns verwendeten Begriffe „Katalyse“ und „enzymähnlich“ zu heißen Debatten.

Unsere Gründe dafür, die enge Beziehung zwischen RNA-Selbstspleißens und biologischer Katalyse zu betonen, lassen sich vielleicht besser im Kontext der in Tabelle 1 gegebenen Definition verstehen. Ein erstes Kriterium für biologische Katalyse ist, daß sie eine Reaktionsbeschleunigung um den Faktor 10^6 bis 10^{13} bewirkt und dadurch Reaktionszeiten auf ein für lebende Systeme brauchbares Zeitmaß bringt. Dieses Kriterium wird eindeutig vom Selbstspleißens erfüllt.

Tabelle 1. Definition der Eigenschaften biologischer Katalysatoren (nach [95]).

Eigenschaft	Selbstspleißens	L – 19-IVS
1. Reaktionsbeschleunigung	+	+
2. Spezifität	+	+
3. Regeneration des Katalysators	– [a]	+

[a] Nein, obwohl das aktive Zentrum während der Reaktion erhalten bleibt.

Die Reaktionsbeschleunigung kann zwar nur für die vom aktiven Zentrum einer RNA gesteuerte regioselective Hydrolyse durch Hydroxid-Ionen quantifiziert werden; die Geschwindigkeit selbst dieser relativ langsamen Nebenreaktion ist jedoch 10^{10} mal so groß wie die geschätzte Geschwindigkeit der unkatalysierten Reaktion (Abb. 9). Ein zweites Kri-

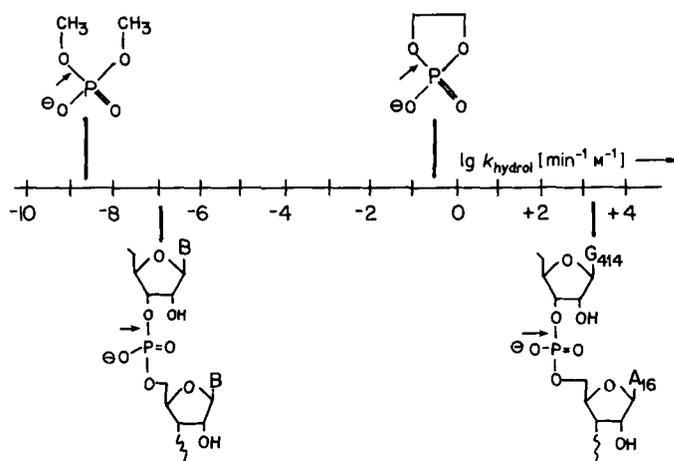


Abb. 9. Die IVS hat ein äußerst effizientes katalytisches Zentrum. Die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung (42°C) für die alkalische Hydrolyse der Phosphodiester sind logarithmisch dargestellt. Pfeile deuten auf die P–O-Bindung, die gespalten wird. Oberhalb der Skala: Daten für Dimethylphosphat und Ethylenphosphat von *Kumamoto et al.* [100] und *Haake und Westheimer* [101]. Unterhalb der Skala: Hydrolyse der RNA, links unkatalysiert und rechts durch das katalytische Zentrum der *Tetrahymena*-IVS katalysiert (nach [3]).

terium für biologische Katalyse, die außergewöhnliche Spezifität, ist auch bei Selbstspleißreaktionen erfüllt: Das selbstspleißende Molekül selektiert beim ersten Schritt der Reaktion Guanotin als angreifende Gruppe und ist fähig, zwei der ca. 6000 Nucleotide in der pre-rRNA als Spleißstellen auszuwählen. Andererseits geht die IVS-RNA nicht völlig unverändert aus der von ihr katalysierten Reaktion hervor; aber der Zweck des Selbstspleißens liegt ja überhaupt nur darin, die pre-rRNA in verknüpfte Exons und herausgeschnittene IVS zu überführen. Schließlich haben die Enzymologen den Begriff der intramolekularen Katalyse eingeführt^[38, 39, 68], und wir glauben, daß diese Bezeichnung das Selbstspleißens besonders gut beschreibt.

Die Enzymologen, die unseren Artikel (*Bass und Cech*^[35]) rezensierten, waren alles andere als überzeugt. Alle drei Gutachter bekundeten großes Interesse an unseren Daten, rügten uns jedoch für unsere Naivität bezüglich Enzymen, z. B.: „Enzymes are true catalysts: they speed the rate of a reaction, but are themselves unchanged by the reaction. In the present instance, the ribozyme acts in a “one-shot” reaction and is permanently changed so that it can no longer cycle as does a true catalyst. The authors are well aware of this, but

appear to ignore this key feature in making their comparisons.“

Wie grundlegend ist die Unterscheidung zwischen Selbstspießen und Katalyse? Die Meinungen hierüber variieren heute wahrscheinlich genauso wie vor sechs Jahren. Anstatt diese Diskussion unnötig in die Länge zu ziehen, entschlossen wir uns, experimentell zu untersuchen, ob es möglich ist, die selbstspießende RNA in einen Katalysator mit mehrfachem Umsatz zu verwandeln. Arthur Zaug veränderte die selbstspießende IVS geringfügig, indem er die ersten 19 Nucleotide entfernte. Die so gebildete L-19-IVS-RNA erfüllte alle drei Kriterien für einen biologischen Katalysator^[69] (Tabelle 1).

Verkürzte Formen der *Tetrahymena*-IVS sind vielfältig katalytisch aktiv. Je nach Substratangebot können diese RNA-Enzyme Nucleotidyltransfer, Phosphoryltransfer und Hydrolysen katalysieren; ein Nucleotidyltransfer kann zum endonucleolytischen Bindungsbruch oder zur Polymerisation der RNA führen^[43, 69-74].

Als Beispiel sei die in Abbildung 10 dargestellte Reaktion angeführt. Eine Form der IVS-RNA, in der beide Spleißstellen fehlen, katalysiert die Spaltung anderer RNA-Moleküle hinter Sequenzen, die der normalen 5'-Exon-CUCU-Sequenz ähneln. Die Reaktion ist eine intermolekulare Version des ersten Schrittes des RNA-Selbstspießens, in dem die RNA-Spaltung von der Bindung des Guanosins an das 5'-Ende des 3'-Reaktionsproduktes begleitet wird. Da die IVS-RNA durch die Reaktion nicht verändert wird, kann sie sukzessive eine große Anzahl von RNA-Substratmolekülen binden und verarbeiten. Der k_{kat}/K_m -Wert für die Spaltung eines Oligoribonucleotidsubstrats mit CCCUCU-Erkennungssequenz liegt mit $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ im gleichen Bereich wie die Werte für Proteinenzyme^[75].

Gezielte Mutagenese der 5'-Exon-Bindungsstelle der IVS verändert die Substratspezifität entsprechend den Watson-Crick-Komplementaritätsregeln^[71, 76]. Es war möglich, einen ganzen Satz neuer „RNA-Restriktionsendonucleasen“ herzustellen, die sich zum sequenzspezifischen Spalten einer RNA eignen könnten.

Die Überführung einer selbstverarbeitenden RNA in ein RNA-Enzym durch physische Trennung des internen Substrates vom katalytischen Zentrum war erfolgreich. Die „Hammerhead“- und „Hairpin“-Ribozyme, die beide in pflanzeninfizierenden Agentien (Viroiden oder viralen Satelliten-RNAs) gefunden werden, sind beide selbstspießend, wobei sie 2',3'-cyclisierte terminale Phosphate hinterlassen^[77, 78]. Beide sind in RNA-Enzyme überführt worden^[79-81]. Ein Group-II-Exon kann eine RNA mit 5'-

Spleißstelle oder ligierter Exon-RNA in einer intermolekularen Reaktion spalten^[82, 83], doch konnte in diesen Fällen kein Mehrfachumsatz nachgewiesen werden. Sogar die intramolekulare Bleispaltung von tRNA kann in ein enzymatisches System verwandelt werden^[84]. Die Fähigkeit von Stücken strukturierter RNA, sich selbst zu aktiven Einheiten zusammenzufügen, scheint eine generelle Eigenschaft des RNA-Biopolymers zu sein. Wenn das reagierende Fragment durch eine relativ schwache Wechselwirkung (z. B. die einiger Basenpaare) an den Rest des Moleküls gebunden ist, so kann es schnell genug dissoziieren, um einen mehrfachen Umsatz zu gewährleisten.

Phantasien über den Ursprung des Lebens

Die Entdeckung des RNA-Selbstspießens und der enzymatischen Aktivität von RNase-P-RNA entfachte erneut die Spekulationen über die mögliche Rolle der RNA bei der Entstehung des Lebens^[85-87]. Heutige Zellen sind von einem komplexen Zusammenspiel von Nucleinsäuren und Proteinen abhängig; Nucleinsäuren dienen als Informationsträger, Proteine als Katalysatoren, die diese Information replizieren und exprimieren. Auch das erste selbstreplizierende biochemische System benötigte mit Sicherheit sowohl informationstragende als auch katalysierende Substanzen. Das Dilemma war deshalb: *Was war zuerst da, die Nucleinsäure oder das Protein, die Information oder die Funktion?* Eine mögliche Lösung ist die Coevolution von Nucleinsäuren und Proteinen^[88]. Die Entdeckung, daß eine RNA sowohl Katalysator wie auch Informationsträger sein kann, macht ein alternatives Szenario plausibel: Das erste selbstreplizierende System könnte ausschließlich aus RNA bestanden haben^[87, 89, 90].

Eine der Reaktionen, die vom *Tetrahymena*-IVS-RNA-Enzym katalysiert wird, ist, vielleicht rein zufällig, vielleicht aber auch aus Gründen der Abstammung, ein Nucleotidyltransfer mit grundsätzlicher Ähnlichkeit zu der von RNA-Replikasen katalysierten Reaktion^[69, 73]. Ein genaues Modell für die RNA-Selbstreplikation, das auf den Eigenschaften des katalytischen Zentrums der *Tetrahymena*-IVS-RNA aufbaut, ist in Abbildung 11 dargestellt. Das RNA-Enzym (Ribozym) unterscheidet sich von der L-19-IVS dahingehend, daß es statt eines internen ein externes Templat verwendet^[91]. Doudna und Szostak^[74] gelang es kürzlich, die Templatregion vom Rest des katalytischen Zentrums unter Aufrechterhaltung der Aktivität zu trennen.

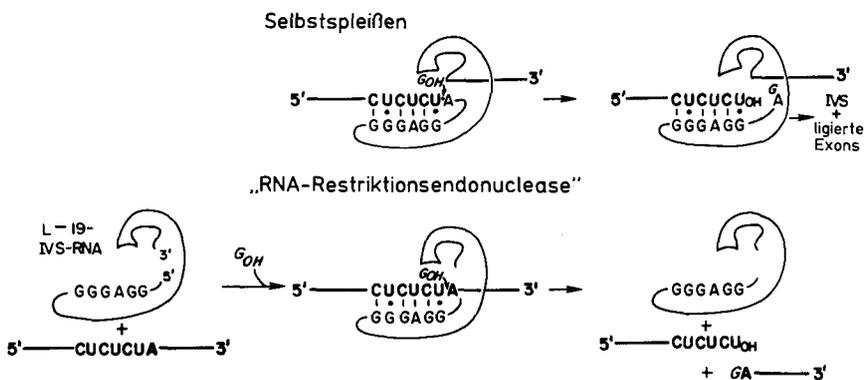


Abb. 10. Eine verkürzte Variante der *Tetrahymena*-IVS-RNA hat endonucleolytische enzymatische Aktivität. Der Mechanismus ist eine intermolekulare Version des ersten Schrittes des Selbstspießens. Dünne Buchstaben und Linien: IVS-Sequenzen, fette Buchstaben und Linien: Exon-Sequenzen (oben) oder Sequenzen der Substrat-RNA (unten); kursives G: freies Guanosin oder GTP (nach [71]).

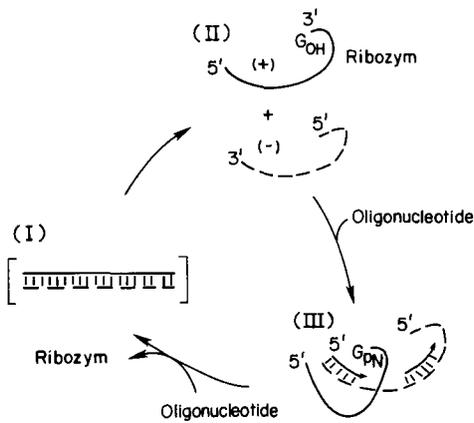


Abb. 11. Hypothetisches Modell der RNA-Selbstreplikation mit einem RNA-Katalysator (Ribozym). Die beiden Stränge der Doppelstrang-RNA (I) trennen sich unter Bildung eines Ribozyms ((+)-Strang) und eines komplementären (-)-Stranges (II). Das Ribozym katalysiert unter Verwendung des (-)-Stranges als Template die Synthese eines neuen (+)-Stranges (III). Der detaillierte Mechanismus wird in [91] beschrieben. Vervollständigung der Synthese führt zur Bildung eines neuen Doppelstranges (I). Ein zweiter Cyclus ist zur Replikation des Startmaterials erforderlich.

Jetzt, da wir Beispiele für katalytisch wirkende RNAs kennen, ist es unterhaltsam, auf frühere Spekulationen über das katalytische Potential von RNAs zurückzuschauen. Als repräsentatives Beispiel sei folgendes angeführt^[92]:

„... in the evolutionary scheme, folded nucleic acid structures were abandoned by nature in favour of proteins. Although nucleic acids may have performed many enzymatic tasks in primitive cells, this is much more efficiently done by proteins... With nucleic acids the four bases are all of one structural type, though the existence of many modified bases points to an evolutionary proliferation giving much greater possibilities in forming structures. Nevertheless, the use of bases cannot match the enormous flexibility provided by having twenty amino acids which fall into three or four different structural types.“

Das Zitat impliziert, daß Nucleinsäuren, sollten sie überhaupt katalytisch aktiv sein, von Natur aus schlechtere Katalysatoren als Proteine sein müssen. Bis zu einem gewissen Zeitpunkt unterlag ich selber diesem Vorurteil, das ich aber in Anbetracht der enormen vom katalytischen Zentrum des *Tetrahymena*-Ribozyms bewirkten Reaktionsbeschleunigung und Spezifität verwarf. Die zweite Folgerung, daß RNA-Katalysatoren nicht sehr vielseitig seien, scheint mir noch immer richtig zu sein. Das Substrat für einen RNA-Katalysator oder ein Ribonucleoprotein ist in allen wohldokumentierten Beispielen eine RNA oder DNA oder (im Falle der Proteinsynthese am Ribosom) die eng verwandte Aminoacyl-tRNA. Andererseits kann die RNA eine spezifische Bindungstasche für zumindest eine Aminosäure bilden^[93], und es scheint bewiesen, daß die kovalente Bindung des terminalen Proteins an die Poliovirus-RNA zumindest teilweise RNA-katalysiert wird^[94]. Dennoch ist unwahrscheinlich, daß RNAs die enorme Vielfalt der von Proteinen gebildeten Bindungstaschen auch nur annähernd erreichen kann. Die Liste der RNA-katalysierten Reaktionen wächst ziemlich schnell. Sollte es aber jemals eine vollständige Liste biologischer Katalysatoren geben, so ist anzunehmen, daß sie mehr Proteine als RNAs enthalten wird.

Dank

Ich widme diesen Vortrag meiner Frau *Carol* und meinen Eltern *Robert* und *Annette*. Ich bin meinen Mitarbeitern des letzten Jahrzehnts, die die Experimente durchgeführt und eine Menge Ideen über die RNA-Katalyse beigetragen haben, sehr zu Dank verpflichtet. Zusätzlich zu denen, deren Arbeit ich hier beschrieben habe, gibt es viele Mitarbeiter, die wichtige Beiträge geliefert haben und hier unerwähnt, aber durchaus nicht ungeschätzt geblieben sind. Finanziell unterstützt wurde unsere Arbeit hauptsächlich von den National Institutes of Health und der American Cancer Society, in letzter Zeit auch vom Howard Hughes Medical Institute; ich danke ihnen für ihre stetige und enthusiastische Förderung. Nicht zuletzt habe ich die Kameradschaft und hilfreiche Kritik der RNA-Forscher in Boulder und weltweit genossen.

Eingegangen am 30. Januar 1990 [A 767]
Übersetzt von Dr. *Christian Schneider*
und Dipl.-Chem. *Ulrike von Krosigk*, Zürich

- [1] J. B. S. Haldane: *Enzymes*, Longmans, Green & Co., UK 1930, M.I.T. Press, MA-Cambridge 1965.
- [2] T. R. Cech, B. L. Bass, *Annu. Rev. Biochem.* 55 (1986) 599–629.
- [3] T. R. Cech, *Science (Washington D.C.)* 236 (1987) 1532–1539.
- [4] T. R. Cech, *Gene* 73 (1988) 259–271.
- [5] T. R. Cech, *Annu. Rev. Biochem.* 59 (1990), im Druck.
- [6] J. M. Burke, *Gene* 73 (1988) 273–294.
- [7] S. Altman, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 62 (1989) 1–36.
- [8] T. R. Cech, *J. Am. Med. Assoc.* 260 (1988) 3030–3034.
- [9] J. Engberg, J. R. Nilsson, R. E. Pearlman, V. Leick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 894–898.
- [10] J. G. Gall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 3078–3081.
- [11] M.-C. Yao, A. R. Kimmel, M. A. Gorovsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 3082–3086.
- [12] M. A. Wild, J. G. Gall, *Cell* 16 (1979) 565–573.
- [13] T. R. Cech, D. C. Rio, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 5051–5055.
- [14] N. Din, J. Engberg, W. Kaffenberger, W. Eckert, *Cell* 18 (1979) 525–532.
- [15] A. J. Zaig, T. R. Cech, *Cell* 19 (1980) 331–338.
- [16] Siehe auch M. Carin, B. F. Jensen, K. D. Jentsch, J. C. Leer, O. F. Nielson, O. Westergaard, *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 5551–5566.
- [17] J. E. Darnell, Jr., *Science (Washington D.C.)* 202 (1978) 1257–1260.
- [18] J. Abelson, *Annu. Rev. Biochem.* 48 (1979) 1035–1069.
- [19] F. H. C. Crick, *Science (Washington D.C.)* 204 (1979) 264–271.
- [20] M. R. Lerner, J. A. Boyle, S. M. Mount, S. L. Wolin, J. A. Steitz, *Nature (London)* 283 (1980) 220–224.
- [21] G. Knapp, R. C. Ogden, C. L. Peebles, J. Abelson, *Cell* 18 (1979) 37–45.
- [22] C. L. Peebles, R. C. Ogden, G. Knapp, J. Abelson, *Cell* 18 (1979) 27–35.
- [23] T. R. Cech, A. J. Zaig, P. J. Grabowski, *Cell* 27 (1981) 487–496.
- [24] M. A. Wild, R. Sommer, *Nature (London)* 283 (1980) 693–694.
- [25] A. J. Zaig, T. R. Cech, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 2823–2838.
- [26] A. J. Zaig, P. J. Grabowski, T. R. Cech, *Nature (London)* 301 (1983) 578–583.
- [27] H. F. Tabak, G. Van der Horst, A. M. J. E. Kamps, A. C. Arnberg, *Cell* 48 (1987) 101–110.
- [28] T. Inoue, F. X. Sullivan, T. R. Cech, *J. Mol. Biol.* 189 (1986) 143–165.
- [29] F. X. Sullivan, T. R. Cech, *Cell* 42 (1985) 639–648.
- [30] S. A. Woodson, T. R. Cech, *Cell* 57 (1989) 335–345.
- [31] J. A. McSwiggen, T. R. Cech, *Science (Washington D.C.)* 244 (1989) 679–683.
- [32] J. Rajagopal, J. A. Doudna, J. W. Szostak, *Science (Washington D.C.)* 244 (1989) 692–694.
- [33] P. J. Grabowski, A. J. Zaig, T. R. Cech, *Cell* 23 (1981) 467–476.
- [34] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaig, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* 31 (1982) 147–157.
- [35] B. L. Bass, T. R. Cech, *Nature (London)* 308 (1984) 820–826.
- [36] B. L. Bass, T. R. Cech, *Biochemistry* 25 (1986) 4473–4477.
- [37] F. Michel, M. Hanna, R. Green, D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Nature (London)* 342 (1989) 391–395.
- [38] W. P. Jencks: *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York 1969.
- [39] A. Fersht: *Enzyme Structure and Mechanism*, 2. Auflage, Freeman, New York 1985.

- [40] R. W. Davies, R. B. Waring, J. A. Ray, T. A. Brown, C. Scazzocchio, *Nature (London)* 300 (1982) 719–724.
- [41] F. Michel, A. Jacquier, B. Dujon, *Biochimie* 64 (1982) 867–881.
- [42] R. B. Waring, P. Towner, S. J. Minter, R. W. Davies, *Nature (London)* 321 (1986) 133–139.
- [43] M. D. Been, T. R. Cech, *Cell* 47 (1986) 207–216.
- [44] J. V. Price, J. Engberg, T. R. Cech, *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 49–60.
- [45] E. T. Barford, T. R. Cech, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 3657–3666.
- [46] A. J. Zaug, J. R. Kent, T. R. Cech, *Science (Washington D.C.)* 224 (1984) 574–578.
- [47] C. Guerrier-Takada, K. Haydock, L. Allen, S. Altman, *Biochemistry* 25 (1986) 1509–1515.
- [48] C. A. Grosshans, T. R. Cech, *Biochemistry* 28 (1989) 6888–6894.
- [49] N. Sugimoto, M. Tomka, R. Kierzek, P. C. Bevilacqua, D. H. Turner, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 355–371.
- [50] J. M. Burke, U. L. RajBhandary, *Cell* 31 (1982) 509–520.
- [51] F. Michel, B. Dujon, *EMBO J.* 2 (1983) 33–38.
- [52] R. B. Waring, C. Scazzocchio, T. A. Brown, R. W. Davies, *J. Mol. Biol.* 167 (1983) 595–605.
- [53] T. R. Cech, N. K. Tanner, I. Tinoco, Jr., B. R. Weir, M. Zuker, P. S. Perlman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 3903–3907.
- [54] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* 35 (1983) 849–857.
- [55] C. Guerrier-Takada, S. Altman, *Science (Washington D.C.)* 223 (1984) 285–286.
- [56] T. L. Marsh, N. R. Pace, *Science (Washington D.C.)* 229 (1985) 79–81.
- [57] G. Garriga, A. M. Lambowitz, *Cell* 39 (1984) 631–641.
- [58] G. Van der Horst, H. F. Tabak, *Cell* 40 (1985) 759–766.
- [59] M. Belfort, J. Pedersen-Lane, D. West, K. Ehrenman, G. Maley, F. Chu, F. Maley, *Cell* 41 (1985) 375–382.
- [60] K. Ehrenman, J. Pedersen-Lane, D. West, R. Herman, F. Maley, M. Belfort, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 5875–5879.
- [61] J. M. Gott, D. A. Shub, M. Belfort, *Cell* 47 (1986) 81–87.
- [62] C. L. Peebles, P. S. Perlman, K. L. Mecklenburg, M. L. Petrillo, J. H. Tabor, K. A. Jarrell, H.-L. Cheng, *Cell* 44 (1986) 213–223.
- [63] R. Van der Veen, A. C. Arnberg, G. Van der Horst, L. Bonen, H. F. Tabak, L. A. Grivell, *Cell* 44 (1986) 225–234.
- [64] E. Brody, J. Abelson, *Science (Washington D.C.)* 228 (1985) 963–966.
- [65] D. Frendewey, W. Keller, *Cell* 42 (1985) 355–367.
- [66] P. J. Grabowski, S. R. Seiler, P. A. Sharp, *Cell* 42 (1985) 345–353.
- [67] T. Maniatis, R. Reed, *Nature (London)* 325 (1987) 673–678.
- [68] M. L. Bender, R. J. Bergeron, M. Komiyama: *The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis*, Wiley, New York 1984.
- [69] A. J. Zaug, T. R. Cech, *Science (Washington D.C.)* 231 (1986) 470–475.
- [70] A. J. Zaug, T. R. Cech, *Biochemistry* 25 (1986) 4478–4482.
- [71] A. J. Zaug, M. D. Been, T. R. Cech, *Nature (London)* 324 (1986) 429–433.
- [72] P. S. Kay, T. Inoue, *Nature (London)* 327 (1987) 343–346.
- [73] M. D. Been, T. R. Cech, *Science (Washington D.C.)* 239 (1988) 1412–1416.
- [74] J. A. Doudna, J. W. Szostak, *Nature (London)* 339 (1989) 519–522.
- [75] D. Herschlag, T. R. Cech, unveröffentlicht.
- [76] F. Murphy, T. R. Cech, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 9218–9222.
- [77] G. A. Prody, J. T. Bakos, J. M. Buzayan, I. R. Schneider, G. Bruening, *Science (Washington D.C.)* 231 (1986) 1577–1580.
- [78] A. C. Forster, R. H. Symons, *Cell* 49 (1987) 211–220.
- [79] O. C. Uhlenbeck, *Nature (London)* 328 (1987) 596–600.
- [80] J. Haseloff, W. L. Gerlach, *Nature (London)* 334 (1988) 585–591.
- [81] A. Hampel, R. Tritz, *Biochemistry* 28 (1989) 4929–4933.
- [82] A. Jacquier, M. Rosbash, *Science (Washington D.C.)* 234 (1986) 1099–1104.
- [83] K. A. Jarrell, C. L. Peebles, R. C. Dietrich, S. L. Romiti, P. S. Perlman, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 3432–3439.
- [84] J. R. Sampson, F. X. Sullivan, L. S. Behlen, A. B. DiRenzo, O. C. Uhlenbeck, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52 (1987) 267–277.
- [85] C. Woese: *The Genetic Code: The Molecular Basis for Genetic Expression*, Harper and Row, New York 1967, S. 186.
- [86] F. H. C. Crick, *J. Mol. Biol.* 38 (1968) 372.
- [87] L. E. Orgel, *J. Theor. Biol.* 123 (1986) 127–149.
- [88] M. Eigen, *Naturwissenschaften* 58 (1971) 465–523.
- [89] P. A. Sharp, *Cell* 42 (1985) 397–400.
- [90] N. R. Pace, T. L. Marsh, *Origins Life* 16 (1985) 97–116.
- [91] T. R. Cech, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 4360–4363.
- [92] A. Klug, J. Ladner, J. D. Robertus, *J. Mol. Biol.* 89 (1974) 511–516.
- [93] M. Yarus, *Science (Washington D.C.)* 240 (1988) 1751–1758.
- [94] G. J. Tobin, D. C. Young, J. B. Flanagan, *Cell* 59 (1989) 511–519.
- [95] T. R. Cech, *Harvey Lect.* 82 (1988) 123–144.
- [96] P. J. Grabowski, S. L. Brehm, A. J. Zaug, K. Kruger, T. R. Cech in D. H. Hamer, M. J. Rosenberg (Hrsg.): *Gene Expression, Vol. 8*, Alan R. Liss, New York 1983, S. 327–342.
- [97] G. Fox, C. R. Woese, *Nature* 256 (1975) 505–507.
- [98] H. F. Noller, C. R. Woese, *Science (Washington D.C.)* 212 (1981) 403–410.
- [99] W. D. Downs, T. R. Cech, *Biochemistry* 29 (1990), im Druck.
- [100] J. Kumamoto, J. R. Cox, Jr., F. H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 4858–4860.
- [101] P. C. Haake, F. H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 1102–1109.
- [102] T. R. Cech, *Cell* 44 (1986) 207–210.