

Über die Sequenzanalyse an Ribonukleinsäuren*

Von MARTIN A. BILLETER

Institut für Molekularbiologie der Universität Zürich

Summary

Methods used for the nucleotide sequence determination of ribonucleic acids are reviewed. Special emphasis is given to a new approach to the sequence determination of bacteriophage Q β RNA using enzymatically synthesized RNA.

Während die Strukturanalyse bei den Proteinen bereits sehr weit vorangetrieben worden ist – von einigen kennt man die dreidimensionale Struktur bis ins Detail –, gelang es erst in den letzten Jahren, die Nukleotidsequenzen einiger Ribonukleinsäuren von relativ kleinem Molekulargewicht zu eruieren. Dies liegt neben der größeren Instabilität der Ribonukleinsäuren vor allem daran, daß sie monotoner aufgebaut sind: nur 4 verschiedene Nukleotide, die allerdings in vielen Fällen modifiziert vorliegen, werden zu ihrem Aufbau verwendet; demgegenüber verleihen die 20 verschiedenen Aminosäuren den Proteinen eine unvergleichlich größere Versatilität des chemischen Charakters. Es ist daher einerseits viel schwieriger, reine Ribonukleinsäure-Spezies zu isolieren, und andererseits gestaltet sich die Sequenzanalyse angesichts der Tatsache, daß sich im selben Molekül Folgen von wenigen Bausteinen sehr oft wiederholen, zu einem Unterfangen, von dem noch vor einem Jahrzehnt nur wenige Leute glaubten, daß es sich überhaupt durchführen ließe. Allen Pessimisten zum Trotz gelang es 1965 erstmals der Arbeitsgruppe von HOLLEY, die Sequenz einer RNA – eine aus Hefe isolierte Transfer-RNA** – vollständig aufzuklären¹.

Es sollen hier zusammenfassend die wichtigsten bei der Sequenzanalyse von Ribonukleinsäuren verwendeten Techniken etwas erläutert werden unter besonderer Hervorhebung einer speziellen Arbeitsweise, welche kürzlich am Institut für Molekularbiologie der Universität Zürich, in Zusammenarbeit mit den Universitäten Genf und Bristol, entwickelt worden ist^{2,3}. Die wertvol-

len Rückschlüsse, welche diese Strukturanalysen auf die biologische Funktion der untersuchten Makromoleküle erlauben, können hier aus Platzgründen nicht diskutiert werden.

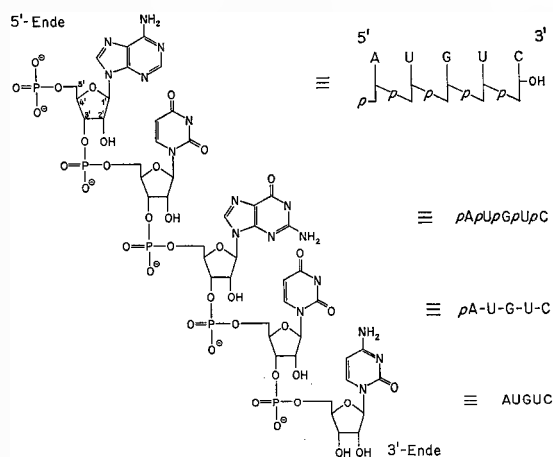


Abb. 1. Verschiedene Schreibweisen für Ribonukleinsäure-Strukturen

In Abb. 1 sind die verschiedenen Schreibweisen für ein ganz kurzes RNA-Molekül dargestellt. Wie aus dem chemischen Formelbild hervorgeht, besteht das Grundgerüst aus β -D-Ribosyl-Resten, die durch Phosphoryl-Reste jeweils zwischen der 3'- und 5'-Stellung in Diesterbindungen miteinander verknüpft sind. Es resultiert daraus ein polarer Aufbau des Moleküls; die Enden werden als 5'- bzw. 3'-Ende bezeichnet, je nachdem, ob der endständige Ribosyl-Rest eine freie (d. h. nicht an einer Phosphodiesterbindung beteiligte) 5'- bzw. 3'-Hydroxylgruppe besitzt. An dieses Grundgerüst sind die variablen Elemente des Moleküls, die Purinbasen Adenin und Guanin bzw. die Pyrimidinbasen Uracil und Cytosin, in β -glykosidischer Bindung angelagert. In den verschiedenen üblichen Schreibweisen, deren abgekürzteste Form nur noch die Anfangsbuchstaben der Basen enthält (endständige Phosphatreste können entfallen,) kommt konventionsgemäß das 5'-Ende des Moleküls links zu stehen.

Daß überhaupt an Ribonukleinsäuren Sequenzanalysen durchgeführt werden können, ist dem Umstand zu verdanken, daß die Nukleotidkette auf enzymatischem

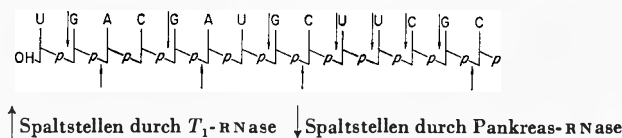
* Aus einem Vortrag, gehalten am 27. August 1970 anlässlich des vom Schweizerischen Chemiker-Verband organisierten Symposiums über Bio-Polymere in Bern.

** In dieser Arbeit verwendete Abkürzungen und Begriffe: RNA = Ribonukleinsäure, DNA = Deoxyribonukleinsäure, RNase = Ribonuklease (ein Enzym, welches Phosphodiesterbindungen in RNA spalten kann), Endonuklease = eine Nuklease, welche eine Nukleinsäurekette im Innern des Moleküls, meist an spezifischen Stellen, spaltet, Exonuklease = eine Nuklease, welche eine Nukleinsäurekette Nukleotid für Nukleotid vom einen der beiden Enden her abbaut.

¹ R. W. HOLLEY, F. APCAR, G. A. MADISON, J. R. PENSWICK und A. ZAMIR, *Science* 147 (1965) 1462.

² M. A. BILLETER, J. E. DAHLBERG, H. M. GOODMAN, J. HINDLEY und C. WEISSMANN, *J. Cell. Physiol.* 74 (1969) 197.

³ M. A. BILLETER, J. E. DAHLBERG, H. M. GOODMAN, J. HINDLEY und C. WEISSMANN, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34 (1969) 635.



1. Oligonukleotidkataloge

 T_1 -RNase-Abbau

UG
ACG
AUG
CUUCG
C

Pankreas-RNase-Abbau

3 U
GAC
GAU
2 GC
C

2. Anordnung: 6 Möglichkeiten

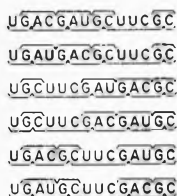


Abb. 2. Beispiel einer RNA-Sequenzaufklärung mit konventionellen Methoden. Die Sequenz der meisten durch enzymatische Spaltung entstandenen Oligonukleotide muß durch partielle Abbaumethoden mittels Exonukleasen ermittelt werden. Zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen Anordnungsmöglichkeiten der Oligonukleotide müssen durch partielle Spaltung mit Endonukleasen (z.B. T_1) größere Fragmente gewonnen und analysiert werden

Weg an ganz bestimmten Stellen durch verschiedene spezifische Ribonukleasen gespalten werden kann. Die Wirkungsweise der beiden wichtigsten bei der Sequenzanalyse verwendeten Ribonukleasen ist in Abb. 2 dargestellt: T_1 -Ribonuklease spaltet immer die Phosphodiesterbindung zur Rechten eines Guanylat-Restes; das Phosphat bleibt dabei als Phosphomonoester an die 3'-Stellung gebunden. Ganz analog spaltet pankreatische Ribonuklease jeweils zur Rechten von Pyrimidin-Nukleotiden, also sowohl bei Uridyl- als auch bei Cytidyl-Resten.

Die erste Aufgabe bei der Sequenzanalyse besteht darin, die durch enzymatischen Abbau entstandenen Oligonukleotide voneinander zu trennen. Hier können zwei grundsätzlich verschiedene Wege eingeschlagen werden. Abb. 3 illustriert die Chromatographie an DEAE-Ionenaustauschersäulen, die aufgrund der Anzahl negativer Ladungen aufzutrennen. Bei leicht alkalischem pH sind die Basen ungeladen; jeder interne Phosphatrest trägt eine negative Ladung, jeder endständige zwei. Bei diesen Bedingungen werden daher jeweils sämtliche Oligonukleotide gleicher Kettenlänge miteinander aus der Kolonne eluiert. An solchen Säulen können alle Größenklassen bis zu Dekanukleotiden gut voneinander abgetrennt werden. Für die weitere Separation macht man sich die Tatsache zunutze, daß die Basen mit abnehmendem pH in der Reihenfolge CAGU in die protonisierte Form übergehen, in welcher dann eine negative Ladung kompensiert wird. Durch Wahl geeigneter pH-Werte für die Chromatographie läßt sich daher derselbe Ionenaustauscher schrittweise zur Aufspaltung

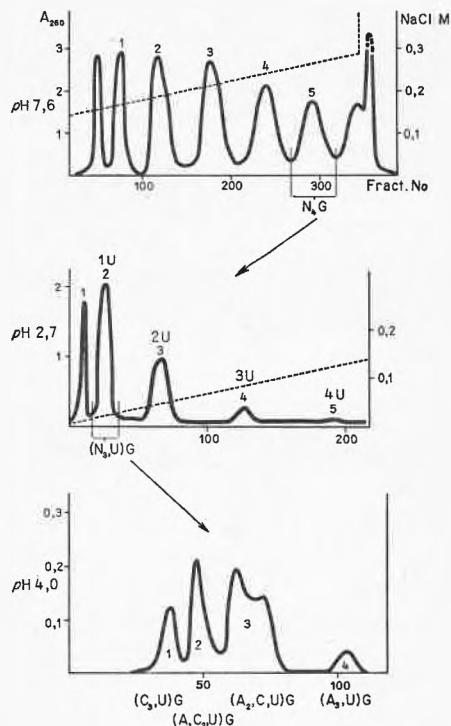


Abb. 3. Fraktionierung von Oligonukleotiden an DEAE-Säulen. Die Oligonukleotide sind durch Behandlung von RNA mit Ribonuklease T_1 gewonnen worden; sie tragen daher alle einen Guanylat-Rest am 3'-Ende. Für die Erklärung der Trenneffekte siehe Text

der Größenklassen in zusammensetzungsmäßig homogene Oligonukleotide verwenden, in denen aber immerhin dieselben Komponenten in verschiedene Sequenzen geordnet vorliegen können (für eine Übersicht dieser Methodik siehe Ref. 4 und 5). Diese Separationsmethode muß dann gewählt werden, wenn in der zu untersuchenden RNA modifizierte Basen vorkommen, deren Struktur noch nicht bekannt ist. Untersuchungsmaterial muß dann in genügenden Mengen vorliegen, so daß die aufgetrennten Bruchstücke mit chemischen und spektroskopischen Methoden untersucht werden können.

Eine große technische Erleichterung hat eine «Fingerprint»-Technik gebracht, die durch die Arbeitsgruppe von SANGER entwickelt wurde⁶ und welche im Verlauf von 24 Stunden die vollständige Auftrennung der enzymatischen Abbauprodukte von RNA-Molekülen in der Größenordnung von hundert Nukleotiden ermöglicht (Abb. 4). Das Gemisch der enzymatischen Abbauprodukte wird zunächst einer Elektrophorese auf einem inerten Trägermaterial unterworfen, wobei die Bruchstücke vor allem aufgrund ihrer Basenzusammensetzung separiert werden. Nach Übertragung auf ein DEAE-Ionenaustauscherpapier erfolgt eine Elektrophorese bei tiefem

⁴ G. M. TENER, *Methods Enzymology XII, Nucleic Acids, Part A* (1967) 398.

⁵ G. W. RUSHIZKY und H. A. SOBER, *Progr. Nucl. Acid Res.* 8 (1968) 171.

⁶ F. SANGER und G. G. BROWNLEE, *Methods Enzymology XII, Nucleic Acids, Part A* (1967) 361.

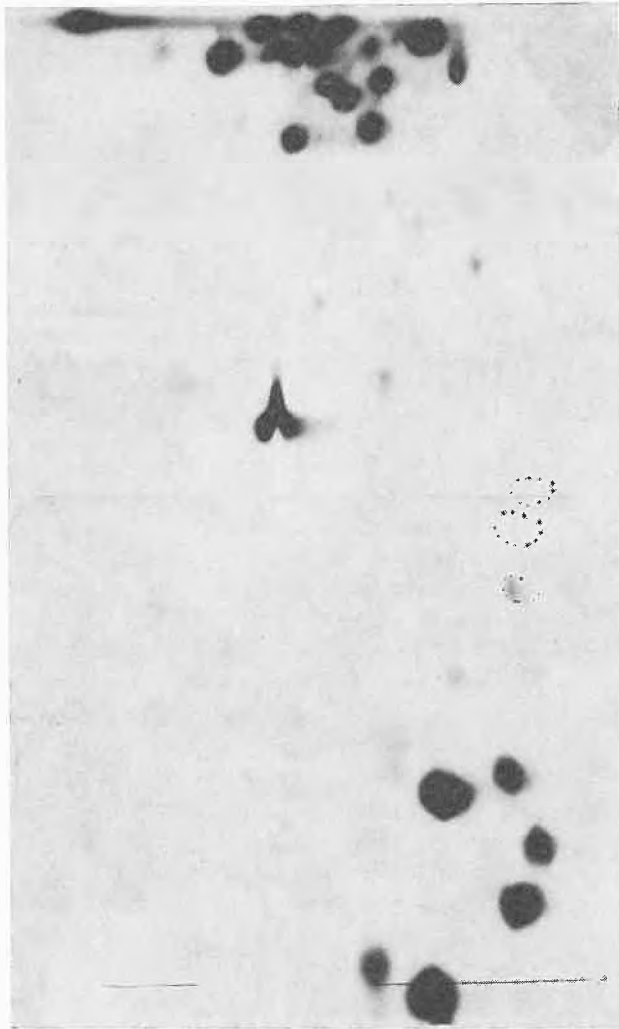


Abb. 4. Auftrennung der enzymatischen Abbauprodukte einer RNA mit Hilfe der Fingerprint-Technik von SANGER⁶. Das hier untersuchte RNA-Segment (etwa 175 Nukleotide lang) entspricht dem 5'-terminalen Ende von Q β -RNA und wurde durch enzymatische Synthese in Gegenwart von α -P³²-GTP gewonnen (siehe weiter unten im Text). Der Abbau erfolgt mit RNase T₁

pH in der zweiten Dimension, bei welcher die Wanderung hauptsächlich auf Elektroendosmose zurückzuführen ist und wobei neben dem Basenverhältnis auch die Größe der Oligonukleotide für die Mobilität ins Gewicht fällt. Mit dieser Methode können nur sehr geringe Mengen an Ribonukleinsäure analysiert werden (in der Größenordnung von 20 μ g); um überhaupt nachweisbar zu sein, muß das untersuchte Material mit radioaktiven Isotopen sehr hoher spezifischer Aktivität markiert sein. Die Abbauprodukte solcher Präparate werden mittels Autoradiographie nachgewiesen, und auf ihren chemischen Charakter kann durch Vergleich ihres Verhaltens bei Elektrophorese mit Substanzen bekannter Zusammensetzung geschlossen werden.

Der zweite Schritt der Sequenzanalyse besteht nun darin, die Nukleotidsequenzen der isolierten Oligonukleotide zu bestimmen. Bei Dinukleotiden genügt die Kenntnis der Zusammensetzung (bestimmt durch Totalabbau

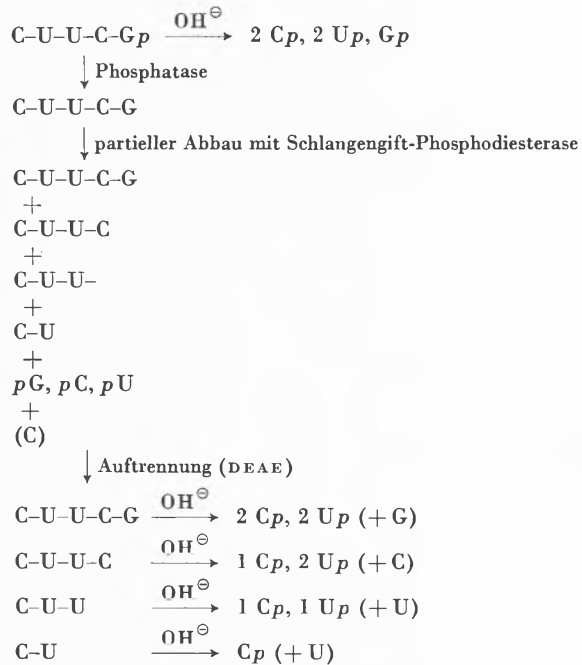


Abb. 5. Sequenzaufklärung des kleinen Oligonukleotides CUUCC mittels partiellem Abbau durch eine Exonuklease

z. B. mittels Alkali): die Sequenz ist dann ohne weiteres klar, da beispielsweise ein durch T₁-Abbau gewonnenes Bruchstück am 3'-Ende einen Guanosyl-Rest tragen muß. Bei der großen Mehrzahl der Bruchstücke gestaltet sich die Analyse komplizierter. Ein erster Aufschluß kann oft dadurch erhalten werden, daß durch eine zweite spezifische Endonuklease noch weiter fragmentiert wird (z. B. ein T₁-Oligonukleotid mit pankreatischer RNase); wieder müssen die Produkte getrennt und durch Totalabbau auf ihre Zusammensetzung hin untersucht werden. Statt der spezifischen Endonucleasen müssen, wie das Beispiel in Abb. 5 zeigt, meist auch noch Exonucleasen verwendet werden. Schlangengift-Phosphodiesterase baut Nukleotid für Nukleotid vom 3'-Ende her ab (Phosphat-Reste in 3'-Stellung müssen zuerst durch Phosphatase entfernt werden), wobei 5'-Mononucleotide entstehen. Die Bedingungen des Abbaus müssen sorgfältig gewählt werden, so daß die Reaktion unvollständig bleibt und Zwischenprodukte isoliert werden können. Durch Auftrennung und Analyse aller Zwischenprodukte geht die ursprüngliche Sequenz eindeutig hervor.

Ganz analog wie Schlangengift-Phosphodiesterase kann eine aus Rindermilz gewonnene Phosphodiesterase verwendet werden, welches schrittweise vom 5'-Ende her abbaut unter Bildung von 3'-Mononucleotiden.

Abb. 6. zeigt eine Methode des schrittweisen Abbaus, welche über eine größere Anzahl von Abbauschritten völlig eindeutige Analysenresultate liefert. Diese schon länger bekannte Methode ist kürzlich wesentlich verfeinert worden⁸, und es sollte möglich sein, die vorläufig

⁷ U. L. RAJ BANDHARY, J. Biol. Chem. 243 (1968) 556.

⁸ H. L. WEITH und P. T. GILHAM, Science 166 (1969) 1004.

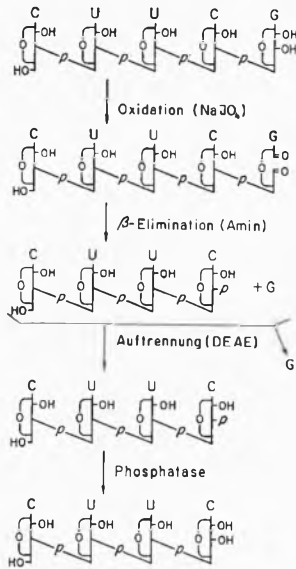


Abb. 6. Schrittweiser Abbau des Oligonukleotids CUUCG: erster Abbauzyklus

noch sehr arbeitsaufwendige Prozedur vollständig zu automatisieren (das untersuchte Oligonukleotid würde dabei mit seinem 5'-Ende an ein unlösliches Trägermaterial gebunden).

Nach der Aufklärung aller Sequenzen der Oligonukleotide, welche einerseits durch T_1 - und andererseits durch Pankreas-Ribonukleaseabbau entstanden sind, folgt nun die dritte Aufgabe: die Anordnung der verschiedenen Bruchstücke im ursprünglichen Molekül muß bestimmt werden. Eine gewisse Hilfe geben hier Überlappungen der beiden Klassen von Oligonukleotiden, aber wie aus Abb. 2 hervorgeht, gibt es schon in dem einfachen als Beispiel gewählten RNA-Molekül, das aus nur 14 Bausteinen besteht, sechs Möglichkeiten der Anordnung. Hier hilft nun nur die Methode des partiellen Abbaus: das untersuchte RNA-Molekül wird mit einer spezifischen Endonuklease (meist wird T_1 verwendet) unter so milden Bedingungen behandelt, daß nur wenige aller vom betreffenden Enzym spaltbaren Phosphodiesterbindungen hydrolysiert werden⁹. Das entstehende fast immer sehr komplexe Gemisch großer Bruchstücke muß dann aufgetrennt werden, und nach erschöpfendem Abbau jedes Bruchstückes mit dem selben Enzym kann festgestellt werden, welche der schon bekannten Oligonukleotide nahe beieinander liegen. Da verschiedene der großen Bruchstücke einander gegenseitig überlappen, kann schließlich eine eindeutige Anordnung abgeleitet werden. Abb. 7 zeigt, wie viele partielle Abbauprodukte einer ribosomalen 5S-RNA, bestehend aus 125 Nukleotiden, tatsächlich untersucht werden mußten, um die Sequenz rekonstruieren zu können¹⁰.

⁹ J. R. PENSWICK und R. W. HOLLEY, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 53 (1965) 543.

¹⁰ B. G. FORGET und S. M. WEISSMAN, *Science* 158 (1967) 1695.

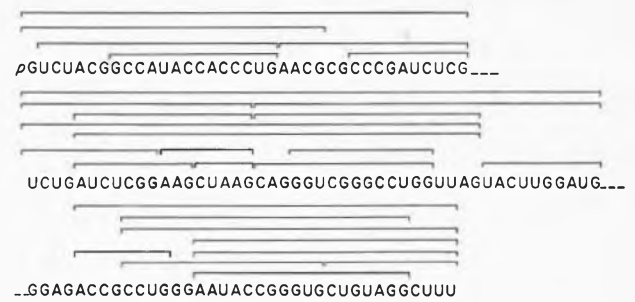


Abb. 7. Struktur der 5S-ribosomalen RNA aus *K. B.* Zellen: Zusammenstellung der durch partiellen Abbau mittels Ribonuklease T_1 gewonnenen großen Oligonukleotide¹⁰

Mittels der bisher erwähnten Methoden lassen sich Ribonukleinsäuren relativ kleiner Kettenlänge aufklären. Es ist aber von großer Bedeutung, Sequenzen von größeren Molekülen zu kennen. Biologisch sehr interessante Ribonukleinsäuren sind beispielsweise die Genome von RNA-Viren. Dabei stellen die einfachen RNA-Bakteriophagen ein besonders gut zu handhabendes Untersuchungsobjekt dar. In groben Zügen zusammengefaßt hat ein solches Molekül folgende Aufgaben zu erfüllen: es dient als «messenger», der nicht nur die Bildung von viruspezifischen Proteinen an sich codiert, sondern auch deren Bildungsrate reguliert; es wird vom virusinduzierten Replikationsenzym spezifisch als Matrize erkannt und tausendfach vermehrt, und schließlich geht es als Strukturelement in ein Viruspartikel ein, aus welchem es sich bei der Infektion auf noch völlig ungeklärte Weise herauslösen muß, um in die Wirtszelle einzudringen. Da das ganze Molekül mit seinen rund 3500 Nukleotiden zur direkten Sequenzanalyse viel zu kompliziert ist, müssen auf irgendeine Weise relativ kurze Segmente gewonnen werden, die dann der Strukturaufklärung zugänglich sind. Die Arbeitsgruppe von SANGER geht bei der Analyse von R17 RNA in der Weise vor, daß P^{32} -markierte RNA unter sehr milden Bedingungen mit Nuklease behandelt wird. Das resultierende, äußerst komplexe Gemisch von Hunderten von Fragmenten wird entweder (für größere Fragmente) mittels Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen der Größe nach aufgetrennt, oder aber (für kleinere Fragmente) einer besonderen Art der Fingerprint-Technik unterworfen, bei welcher in der zweiten Dimension auf einer DEAE-Schicht mittels Oligonukleotiden eine «Verdrängungschromatographie» (Homochromatographie) durchgeführt wird¹¹. Auf diese Weise konnten wichtige Teilregionen aus dem R17-Genom analysiert werden^{12, 13, 14}. Diese Methode ist aber mit Nachteilen belastet: es gelingt nur ausnahmsweise, Fragmente völlig rein zu erhalten, und im

¹¹ G. G. BROWNLEE, F. SANGER und B. G. BARRELL, *J. Mol. Biol.* 34 (1968) 379.

¹² J. M. ADAMS, P. G. N. JEPPESEN, F. SANGER und B. G. BARRELL, *Nature* 223 (1969) 1009.

¹³ J. N. NICHOLS, *Nature* 225 (1970) 147.

¹⁴ J. M. ADAMS und S. CORY, *Nature* 227 (1970) 570.

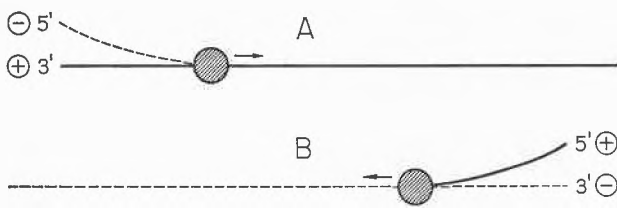


Abb. 8. Schema der Arbeitsweise von Q β -RNA-Replikase; A: Synthese eines Minusstranges, B: Synthese eines Plusstranges

allgemeinen kann nicht herausgefunden werden, aus welcher Region der RNA ein solches Fragment stammt.

Im Falle des Bakteriophagen Q β ist es uns nun möglich gewesen, mit Hilfe des oben erwähnten virusinduzierten Replikationsenzym, welches wir in unserem Laboratorium nach einer im wesentlichen bereits von AUGUST¹⁵ beschriebenen Methode in größeren Mengen rein herstellen, relativ kurze Q β -RNA-Segmente zu synthetisieren, welche direkt der Sequenzanalyse zugänglich sind und deren Lage im Virus-Genom eindeutig bestimmt ist^{2,3}. In Abb.8 ist sehr vereinfacht und schematisiert die Wirkungsweise dieses Enzyms dargestellt. Es bindet in einem ersten Reaktionsablauf das 3'-Ende der Virus-RNA (als Plusstrang bezeichnet) und synthetisiert einen Komplementärstrang (Minusstrang) antiparallel, d.h. vom 5'-Ende her beginnend. Im zweiten Reaktionsablauf dient dann der neugebildete Minusstrang wiederum als Matrize zur Synthese eines Plusstranges¹⁶. Das erste Ziel war es nun, kurze Segmente relativ homogener Länge vom 5'-Ende des Plus- und des Minusstranges zu synthetisieren (durch die Sequenzaufklärung des letzteren erhält man dank der Komplementarität Aufschluß über die Sequenz am 3'-Ende des Plusstranges). Beide

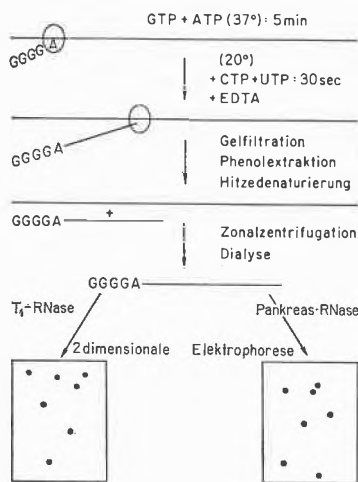


Abb. 9. Versuchsanordnung zur Gewinnung und Analyse kurzer RNA-Segmente ungefähr homogener Kettenlänge vom 5'-Ende von Q β -RNA (Plus- oder Minusstrang)

¹⁵ L.EOYANG und J.T.AUGUST, *Methods Enzymology* XII, *Nucleic Acids*, Part B (1968) 530.

¹⁶ G.FEIX, R.POLLET und C.WEISSMANN, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 59 (1968) 145.

Synthesen ließen sich mit der prinzipiell gleichen Versuchsanlage ausführen (siehe Abb. 9). Verschiedene Arbeiten^{17,18,19} hatten gezeigt, daß beide komplementären Stränge am 5'-Ende mit Purinnukleotiden (G und A) beginnen. Diese Tatsache wurde zur Synchronisierung der Enzymreaktion ausgenützt. Matrize und Enzym werden in Gegenwart von GTP und ATP vorinkubiert; dabei finden alle Enzymmoleküle eine Matrize, binden sie in der richtigen Art und Weise und beginnen mit der Synthese des Komplementärstranges. Es dauert einige Minuten, bis diese Initiationsphase von allen Enzymmolekülen durchlaufen ist; die Verlängerung der Kette wird an der Stelle hintangehalten, an der das erste Pyrimidinnukleotid eingesetzt werden muß. Bei Zugabe von CTP und UTP startet die Kettenelongation synchron. Nach 30 Sekunden bei 20° wird die Reaktion schlagartig unterbrochen; während dieser Zeit ist eine Kette von etwa 170 Nucleotiden synthetisiert worden (bei normaler Temperatur von 37° und optimaler Konzentration an Triphosphaten würde während dieser Zeit eine rund 7 mal längere Kette synthetisiert). Nach Elimination der Triphosphate, des Proteins und der Matrizen-RNA wird das RNA-Segment in einem minimalen Reaktionsvolumen von rund 3 μ l enzymatisch abgebaut. Es muß radioaktiv markiert sein mit äußerst hoher spezifischer Aktivität, da es nur ein Bruchteil von einem Mikrogramm ausmacht. Die im Phosphat in α -Stellung markierten Nucleosidtriphosphate, die als Substrat für das Replikationsenzym verwendet werden (Abb.10), müssen daher nach einem speziell adaptierten Verfahren synthetisiert werden. Auch weiter im Innern des Genoms liegende radioaktiv markierte Segmente können gewonnen werden, indem man die synchronisierte Enzymreaktion zunächst während einer gewissen Zeit in Gegenwart von unmarkierten Nucleosid-Triphosphaten ablaufen läßt, und dann erst radioaktives Substrat zusetzt.

Auch abgesehen davon, daß auf diese Weise isotopisch reine Segmente von bekannter Lage im Genom

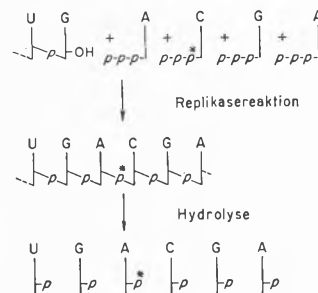


Abb. 10. Übertragung von radioaktiv markiertem Phosphat von der 5'-Stellung eines Nucleosid-Triphosphates auf die 3'-Stellung seines nächsten Nachbarn zur Linken

¹⁷ R.DE WACHTER und W.FIERS, *Nature* 221 (1969) 233.

¹⁸ H.L.WEITH, G.L.ASTERIADIS und P.T.GILHAM, *Science* 160 (1968) 1459.

¹⁹ J.T.AUGUST, A.K.BANERJEE, L.EOYANG, M.T.FRANZE DE FERNANDEZ, K.HORI, C.H.KUO, U.RENSING und L.SHAPIRO, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33 (1968) 73.

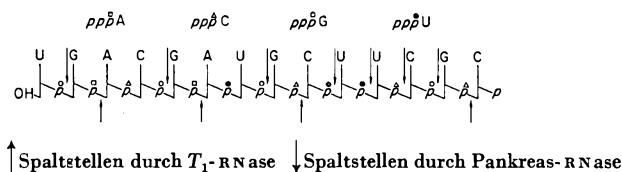
Markierung mit	Markiertes Nukleotid nach alkalischer Hydrolyse	Deduktion
1. GTP	C	CG
2. CTP	1 G, 1 U	UCG [C]
3. UTP	1 U, 1 C	CUUCG [C]

Abb. 11. Sequenzbestimmung des Oligonukleotids CUUCG mit Hilfe der Analyse der nächsten Nachbarn (vgl. Abb. 10). Das Symbol in eckiger Klammer bedeutet ein Nukleotid, welches auf das endständige G ein radioaktives Phosphat überträgt, aber selber nicht zum Oligonukleotid gehört

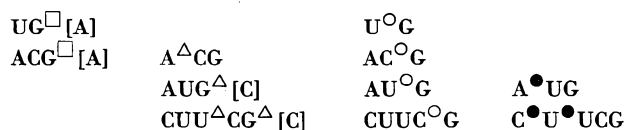
gewonnen werden können, bietet die Sequenzanalyse an solchen *in vitro* hergestellten Molekülen eine Reihe von Vorteilen. Beispielsweise kann man bei der Synthese so vorgehen, daß nur eines der vier Nukleosid-Triphosphate radioaktiv markiert ist. Man gewinnt dann wichtige Informationen über die Nachbarn jedes Nukleotids. Abb. 10 zeigt, daß das markierte Phosphat, von der 5'-Stellung eines Nukleosid-Triphosphates in die RNA eingeführt, nach deren Abbau in der 3'-Stellung des Nachbarn zur Linken erscheint. (Das Prinzip dieser Analyse der nächsten Nachbarn ist erstmals beim Studium von DNA-Polymerase angewandt worden²⁰.) Wir stellen jeweils vier verschiedene Präparate derselben RNA-Region her, wobei zu jeder Synthese immer nur eines der vier Substrate radioaktiv markiert ist. Aus Abb. 11 ist ersichtlich, daß aus der Markierung der Nachbarn eindeutig die Sequenz einfacher Oligonukleotide hervorgeht, ohne daß zu den weiter oben beschriebenen Abbaumethoden gegriffen werden muß. Auch für komplizierte Bruchstücke ergeben sich so wichtige Anhaltspunkte über die Struktur. Vielleicht noch wertvoller ist die Information über die nächsten Nachbarn zur Aufklärung der Anordnung der Oligonukleotide innerhalb des ganzen Moleküls (siehe Abb. 12), da man von jedem Oligonukleotid weiß, mit welchem Nukleotid das Nachbaroligonukleotid zur Rechten beginnt. Damit besteht im gezeigten Beispiel nur eine einzige Anordnungsmöglichkeit. Natürlich gibt diese Analyse der nächsten Nachbarn nur bei kurzen RNA-Segmenten eine eindeutige Antwort über die Anordnung der Fragmente.

Nun erlaubt aber unsere Analysentechnik, auch für längere Segmente zusätzliche Information über die Stellung der Oligonukleotide zu erhalten, durch die Untersuchung der sequentiellen Synthese des Segments. Das Prinzip ist dabei folgendes: Nach dem Start der enzymatischen Synthese wird alle fünf Sekunden ein Teil des Reaktionsgemisches entnommen und die Kettenverlängerung gestoppt. Durch Analyse aller verschiedenen langen Syntheseprodukte kann errechnet werden, wann jedes Oligonukleotid synthetisiert wird, woraus seine ungefähre Lage im ursprünglichen Molekül hervorgeht.

²⁰ F. JOSSE, A. D. KAISER und A. KORNBERG, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 864.

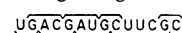


1. Katalog der T_1 -RNase-Oligonukleotide



2. Anordnung

Einzigste Möglichkeit



Andere Möglichkeiten ausgeschlossen durch



Abb. 12. Beispiel einer RNA-Sequenzaufklärung mit Hilfe der Analyse der nächsten Nachbarn (vgl. mit Abb. 2 und 11). Gezeigt ist das Markierungsmuster, welches resultiert, wenn vier verschiedene Präparate des gleichen RNA-Segments hergestellt werden, wobei bei der Synthese immer nur eines der vier Nukleosid-Triphosphate markiert ist. Es ist leicht ersichtlich, daß die Sequenz aller Oligonukleotide eindeutig aus dem Markierungsmuster hervorgeht, welches überdies nur eine einzige Anordnung der Oligonukleotide erlaubt

Auf diese Weise war es möglich, ein 175 Nukleotide umfassendes Segment vom 5'-Ende von $Q\beta$ -RNA aufzuklären (Abb. 13)²¹, wobei zunächst lediglich die relative Lage zweier Fragmente (T_{12} und T_{23}) ungeklärt blieb. Es genügte daher, einige wenige durch partiellen T_1 -Ribonuklease-Abbau hervorgegangene Stücke zu untersuchen, um diese Unsicherheit beizulegen und um die schon zuvor bestimmte Anordnung aller andern Fragmente zu bestätigen.

Überdies ist es gelungen, die Sequenz von 52 Nukleotiden vom 3'-Ende aufzuklären²²; von weiteren 150 bzw. 100 Nukleotiden des 5'- bzw. des 3'-Endes ist die Analyse schon weit vorangetrieben worden. Es erscheint durchaus möglich, Segmente von insgesamt mindestens 500 Nukleotiden an beiden Enden der RNA mit Hilfe der beschriebenen Methoden analysieren zu können. Die Sequenzanalyse im Innern des RNA-Moleküls wird aber zunehmend schwieriger, da die Synchronie der Enzymreaktion sich bei längeren Synthesenzeiten verschlechtert. Unter Zuhilfenahme einiger weiterer Methoden erscheint aber im Prinzip die Möglichkeit der Sequenzaufklärung des gesamten $Q\beta$ -Genoms als gegeben.

²¹ M. A. BILLETER, J. E. DAHLBERG, H. M. GOODMAN, J. HINDLEY und C. WEISSMANN, *Nature* 224 (1969) 1083.

²² H. M. GOODMAN, M. A. BILLETER, J. HINDLEY und C. WEISSMANN, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 67 (1970) 921.

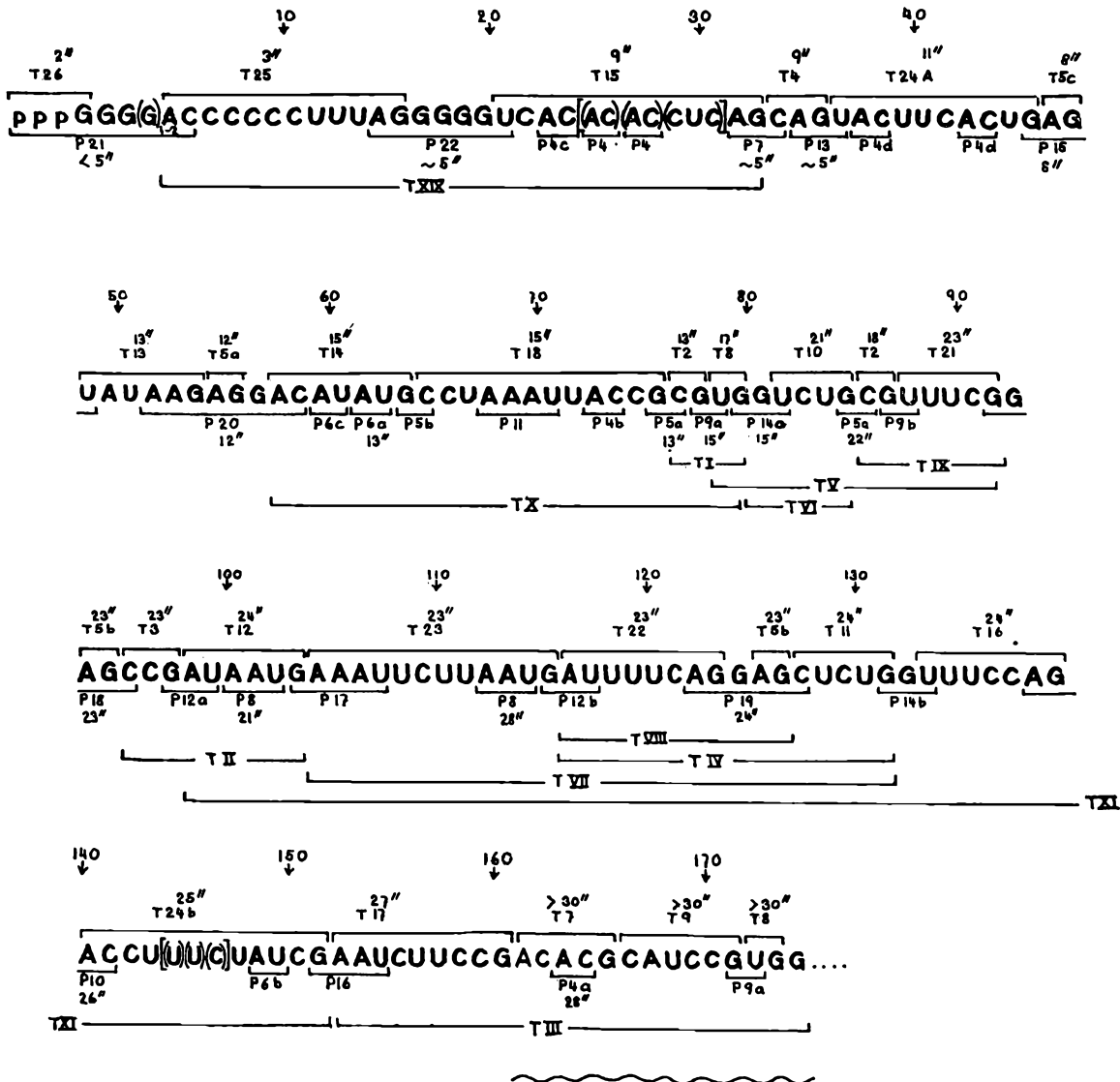


Abb. 13. Nukleotidsequenz des 5'-terminalen Endes von Qβ-RNA. Die durch vollständigen Abbau mit T₁- bzw. pankreatischer Ribonuklease entstandenen Oligonukleotide sind mit T bzw. P, gefolgt von einer arabischen Zahl, bezeichnet. Bei jedem Oligonukleotid ist angegeben, zu welcher Zeit nach dem Start der Enzymreaktion es synthetisiert wird (extrapolierter Wert für die Zeit, bei welcher 0,5 Mol des Oligonukleotids gebildet ist). Die durch partiellen Abbau mit T₁-RNase gewonnenen langen Oligonukleotide sind mit T, gefolgt von einer römischen Zahl, bezeichnet

Abschließend sei bemerkt, daß die Sequenzanalyse unter Zuhilfenahme eines RNA-synthetisierenden Enzyms in Zukunft auch auf andere Systeme wird ausgeweitet werden können. Mit Hilfe von RNA-Polymerasen, die als Matrize Deoxyribonukleinsäuren verwenden, wird es möglich sein, Sequenzen der letzteren aufzuklären, was bisher praktisch nicht möglich war, da noch

keine Methoden gefunden worden sind, DNA-Moleküle an spezifischen Stellen zu spalten. Abgesehen von vielen Viren besteht das Genmaterial aller Organismen aus DNA. Es liegt daher auf der Hand, wie bedeutungsvoll es ist, mindestens Teile der Struktur solcher Genome aufzuklären zu können.