Schnellmarkierte RNS in Blättern

II. Charakterisierung der schnellmarkierten RNS

R. WOLLGIEHN und M. RUESS

Deutsche Akademie der Wissenschaften, Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle/Saale

(Z. Naturforsch. 23 b, 1198—1208 [1968]; eingegangen am 3. Januar 1968)

The nucleic acid metabolism of young leaves (*Nicotiana rustica*, *Pisum sativum*) was investigated by ^{32}P -labelling in short-time experiments. The nucleic acids were extracted quantitatively with buffer, containing SDS, and fractionated on the MAK column. Several rapidly labelled RNA fractions were found in the region of sRNS, DNA and rRNA. We have characterized two rapidly labelled fractions more detailed. The first one is a high molecular AU-RNA, which is eluted from the MAK column after the rRNA. The second one is a low molecular fraction in the region of the sRNA.

The AU-RNA has the following properties: 1) It is rapidly labelled in pulse experiments. 2) the half-life of the AU-RNA in chase experiments is 4 hours at its maximum, showing faster degradation compared to the other fractions. 3) The ^{32}P -incorporation is quantitatively inhibited by actinomycin D. 4) The base composition resembles DNA base composition (high AU and low GC content). 5) AU-RNS appears as a heterogeneous fraction in the sucrose gradient, and sediments similar to rRNA. 6) AU-RNA occurs in all particle fractions of the homogenates.

The low molecular, rapidly labelled RNA shows the following properties: 1) The radioactive peak does not correspond with 4 S or 5 S RNA peaks. 2) This RNA is metabolically stable, the radioactivity decreases very slowly in chase-experiments. 3) The ^{32}P -incorporation is less inhibited by actinomycin D than the other RNA fractions. 4) The base composition is not similar to DNA base composition. A high content of labelled CTP in this RNA fraction may indicate the rapid ^{32}P -incorporation by exchange of the terminal CpCpA group of tRNA.

The possible messenger function of the AU-RNA is discussed.

Aus Bakterien und tierischen Geweben sind in den letzten Jahren vielfach RNS*-Fraktionen isoliert worden, die alle Forderungen erfüllen, die an eine Messenger-RNS zu stellen sind. Zur Charakterisierung einer RNS als „Messenger“ müssen mehrere Kriterien herangezogen werden. 1. Schnelle Markierung im „pulse“-Experiment und hohe Umsatzrate im Vergleich zu allen anderen RNS-Typen. 2. Große Heterogenität in der Molekülgröße, entsprechend der Funktion, die unterschiedlichsten Proteine zu codieren, vorausgesetzt, daß es sich nicht um einen spezifischen Messenger, sondern um die Gesamt-mRNS eines Gewebes handelt. 3. Der homologen DNS entsprechende Basenzusammensetzung. 4. Bildung von Hybriden mit der homologen DNS. 5. Stimulierung der Proteinsynthese in einem zellfreien System.

Der Begriff Messenger-RNS sollte immer vermie-

den werden, wenn für eine bestimmte RNS-Fraktion nicht alle wesentlichen Kriterien für mRNS nachgewiesen sind, vor allem die Fähigkeit zur Stimulation der Proteinsynthese im zellfreien System nicht geprüft worden ist. Es gibt zahlreiche experimentelle Befunde, wonach einzelne der genannten Charakteristika nicht nur für mRNS, sondern auch für andere RNS-Fraktionen zutreffen können. Dadurch wird die Zuordnung der RNS-Fraktionen sehr erschwert.

Unsere Kenntnisse über die Messenger-RNS höherer Pflanzen sind noch sehr lückenhaft. In Erdnußkeimlingen konnten CHERRY et al. RNS-Fraktionen nachweisen, die alle genannten Voraussetzungen erfüllen, also wohl mit Sicherheit als mRNS angesprochen werden können¹⁻⁵. Aber auch aus Geweben anderer höherer Pflanzen sind RNS-Fraktionen mit

* Verwendete Abkürzungen: RNS=Ribonucleinsäure; DNS=Desoxyribonucleinsäure; NS=Nucleinsäure; mRNS=Messenger-RNS; rRNS=ribosomale RNS; sRNS, tRNS=lösliche oder Transfer-RNS; AU-RNS=RNS mit hohem Adenin+Uracil-Gehalt; AMP oder A=Adenylnsäure; GMP oder G=Guanylnsäure; CMP oder C=Cytidylsäure; UMP oder U=Uridylsäure; T=Thymidylsäure; AD=Actinomycin D; MAK=Methylalbumin mit Kieselgur als Träger; SDS=Natriumdodecylsulfat; O.D.=Optische Dichte (Extinktion bei 260 bzw. 254 nm).

¹ J. H. CHERRY, Science [Washington] **146**, 1066 [1964].

² J. H. CHERRY, SEB Symposium **21**, 247 [1967].

³ H. CHOCZEK u. J. H. CHERRY, J. molecular Biol. **19**, 28 [1966].

⁴ R. B. HUYSTEE u. J. H. CHERRY, Biochem. biophysic. Res. Commun. **23**, 835 [1966].

⁵ E. E. EWING u. J. H. CHERRY, Phytochemistry **6**, 1319 [1967].

Messenger-Eigenschaften isoliert worden⁶⁻¹⁶. Eingehende Untersuchungen an Blättern liegen bisher nicht vor, obwohl sich aus der genetischen Autonomie der Plastiden ganz spezifische Probleme des Nucleinsäure-Stoffwechsels in Blättern ergeben.

Wir haben aus jungen Tabakblättern schnellmarkierte RNS-Fractionen isoliert und charakterisiert. Über Einzelheiten der Isolierung und Fraktionierung von RNS aus Blättern haben wir an anderer Stelle berichtet¹⁷. In der vorliegenden Arbeit sollen erste Ergebnisse zur Charakterisierung der schnellmarkierten RNS mitgeteilt werden.

Methoden

Chemikalien

$\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ vom Zentralinstitut für Kernforschung Rossendorf; 2-Mercaptoäthanol, Cetyltrimethylammoniumbromid, Dowex-1, Dowex-50, Actinomycin D, Triton $\times 100$ von Serva, Heidelberg; Bentonit von Merck, Darmstadt; Tris und SDS von Ferak, Berlin; Rinderseralbumin von Calbiochem, Luzern/Schweiz; 8-Hydroxychinolin von Laborchemie Apolda; Kieselgur (Hyflo Super-Cel) von Light & Co, Bucks/England.

Versuchsmaterial

Als Versuchsmaterial dienten junge, 2 bis 4 cm große Blätter von Gewächshauspflanzen von *Nicotiana rustica*, die im Winter unter Zusatzlicht angezogen wurden. Einige Versuche wurden mit Blättern 10 Tage alter grüner Keimpflanzen von *Pisum sativum* durchgeführt.

Versuchsdurchführung

Für jede Säulenanalyse wurden 2 g Blätter gewaschen, abgetrocknet, fein zerschnitten und mit 4 ml Lösung von 0,25 mC trägerfreiem $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ im Licht (helle Stableuchten) inkubiert. Bei Homogenat-Fraktionierungen wurden 10 g Blätter mit

1 mC ^{32}P inkubiert. Die Inkubationszeit betrug – falls nicht anders angegeben – 45 Min. („pulse“-Markierung). Der radioaktiven Lösung setzten wir 0,1 mg/ml Penicillin hinzu, obwohl sich bei kurzen Inkubationszeiten Bakterien-Verunreinigungen nicht bemerkbar machten. Auf Einzelheiten zur Durchführung der „chase“-Versuche und der Actinomycin-Versuche wird an den betreffenden Stellen eingegangen.

Fraktionierung von Blatthomogenaten durch Differential-Zentrifugation

Das Blattmaterial wurde bei $2-4^\circ$ 30 Sek. im Bühlerhomogenisator homogenisiert oder im Mörser mit folgendem Homogenisationspuffer schonend zerrieben: 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,05 M KCl, 0,005 M MgCl_2 , 0,005 M Mercaptoäthanol, 0,2 mg/ml Bentonit¹⁷, 0,5 M Saccharose.

Das Homogenat wurde durch mehrere Lagen Mull gepreßt und durch Differential-Zentrifugation in folgende Fraktionen aufgearbeitet:

- Fraktion 1: 200 g (5 Min.) „Kernfraktion“,
- Fraktion 2: 1500 g (10 Min.) „Chloroplasten-Fraktion“,
- Fraktion 3: 20000 g (20 Min.) „Mitochondrien-Fraktion“,
- Fraktion 4: 150000 g (60 Min.) „Mikrosomen-Fraktion“,
- Fraktion 5: Überstand, „lösliche“ Fraktion.

Nucleinsäure-Extraktion

Die Blätter wurden in der Kälte im Mörser mit Sand in folgendem Puffer (15 ml/2 g Blattmaterial) zerrieben: 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 + 0,1 M NaCl. In vielen Versuchen setzten wir dem Puffer 2 mg/ml Bentonit hinzu, obwohl wir bei der kurzen Aufarbeitungszeit auch mit Bentonit-freiem Puffer keinen RNS-Abbau beobachteten¹⁷. Das Homogenat wurde durch Mull gepreßt und mit einer 20-proz.

⁶ U. E. LOENING, Nature [London] **195**, 467 [1962].

⁷ U. E. LOENING, Biochem. J. **97**, 125 [1965].

⁸ U. E. LOENING, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B **162**, 121 [1965].

⁹ J. INGLE, J. L. KEY u. R. E. HOLM, J. molecular Biol. **11**, 730 [1965].

¹⁰ J. L. KEY u. J. INGLE, Proc. nat. Acad. Sci. USA **52**, 1382 [1964].

¹¹ A. R. BELLAMY, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **123**, 102 [1966].

¹² L. C. WATERS u. L. S. DURE, J. molecular Biol. **19**, 1 [1966].

¹³ V. HEMLEBEN-VIELHABEN, Z. Naturforsch. **21 b**, 983 [1966].

¹⁴ G. GALLING u. V. HEMLEBEN-VIELHABEN, Arch. Mikrobiol. **56**, 205 [1967].

¹⁵ C. Y. LIN, J. L. KEY u. C. E. BRACKER, Plant Physiol. **41**, 976 [1966].

¹⁶ Y. HOTTA u. H. STERN, J. Cell Biol. **19**, 45 [1963].

¹⁷ R. WOLLGIEHN, Flora [Jena], Abt. A, **159**, 58 [1968].

Lösung von SDS zu einer Endkonzentration von 2% versetzt. Die Suspension wurde mit dem gleichen Volumen Phenol (frisch destilliert, wassergesättigt, 0,1% 8-Hydroxychinolin-haltig) versetzt und bei 20° 45 Min. mit einem Magnetrührer lebhaft gerührt. Durch Zentrifugation (15 Min., 4000 g bei 4°) wurde die wäßrige Phase vom Phenol getrennt, abpipettiert und 2 weitere Male je 10 Min. mit dem halben Volumen Phenol zum vollständigen Deproteinisieren gerührt. Die Nucleinsäuren wurden aus der Pufferphase mit 2 Vol. Äthanol bei -10° über Nacht ausgefällt, abzentrifugiert, in 0,015 M Natriumcitratpuffer (+ 0,15 M NaCl) pH 6,7 gelöst, erneut in der Kälte ausgefällt, abzentrifugiert und 2-mal mit 0,05 M NaCl-haltigem 66-proz. Äthanol gewaschen.

Aus Homogenatfraktionen wurden die Nucleinsäuren in der gleichen Weise extrahiert.

Fraktionierung der Nucleinsäuren

a) *Fraktionierung auf der Methylalbumin-Kieselgur(MAK)-Säule*

Die Analysen wurden in Anlehnung an das von RICHTER und SENGER¹⁸ beschriebene Verfahren durchgeführt. Rinderserumalbumin (Fraktion V) wurde wie folgt methyliert: 1 g Albumin wurde in 100 ml Methanol suspendiert, mit 4,2 ml konz. HCl versetzt und 8 Tage unter gelegentlichem Schütteln aufbewahrt. Dann wurde das methylierte Albumin abzentrifugiert, mit Methanol und Äther gewaschen und getrocknet.

Methylalbumin wurde an Kieselgur absorbiert und in eine Säule von 1,8·10,5 cm gefüllt¹⁸. 3 mg der in wenigen ml Citrat-NaCl-Puffer gelösten Nucleinsäuren (mit 0,05 M Phosphat-Puffer (+ 0,1 M NaCl) pH 6,7 auf 60 ml aufgefüllt, wurden auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte bei 30° mit einem logarithmischen Gradienten von 0,1–1,5 M NaCl (gepuffert mit 0,05 M Phosphat-Puffer pH 6,7) bei konstanter Durchflußgeschwindigkeit (70 ml/h). Die Extinktion des Eluats wurde mit dem LKB-Uvicord aufgezeichnet. Es wurden Fraktionen von 6 ml gesammelt. Die Radioaktivität der Proben wurde im Flüssigkeitszählrohr bestimmt.

b) *Fraktionierung durch Zentrifugation im Saccharose-Gradienten*

Zur Fraktionierung im Saccharosegradienten war es erforderlich, die Nucleinsäuren durch Umfällen mit Cetyltrimethylammoniumbromid zu reinigen¹⁹. 0,5–1 ml RNS-Lösung (3 mg) wurden auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten von 5–20% aufgetragen (0,025 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4; 0,05 M NaCl). Zentrifugiert wurde bei 25000 U/Min., 16 Std. bei 2° im Swing-out-Rotor I (3·25 ml) in der Ultrazentrifuge P 50 K (WKF/PHYWE). Fraktionen von 10 Tropfen wurden nach Anstechen der Zentrifugenbecher mit einer Injektionsnadel gesammelt und zur Messung der UV-Absorption und der Radioaktivität (Flüssigkeitszählrohr) mit Wasser verdünnt.

Bestimmung der Nucleotid-Zusammensetzung der RNS

Die einzelnen RNS-Fraktionen, die aus den MAK-Säulen-Eluaten durch Fällung mit 0,2-n. HClO₄ gewonnen wurden, hydrolysierten wir 18 Std. bei 37° mit 0,5-n. KOH. Das Hydrolysat wurde mit HClO₄ neutralisiert. Die Nucleotide wurden nach einer veränderten Methode von KATZ und COMZ²⁰ bestimmt. Der Originalmethode entsprechend wurden von einer DOWEX-50-Säule Uridylsäure und Guanylsäure getrennt und dann Cytidylsäure und Adenylsäure gemeinsam eluiert. Die weitere Auftrennung von CMP und AMP erfolgte dann jedoch auf einer DOWEX-1-Cl-Säule (0,9·8 cm) mit einem HCl-Gradienten, wobei zu 300ml Wasser zunächst 0,05-n. HCl (60 ml) und dann 0,1-n. HCl zugegeben wurden (nach l. c.¹³). Auf diese Weise erzielten wir eine scharfe Trennung aller Nucleotide.

Ergebnisse

1. Verlauf des ³²P-Einbaus in die RNS-Fraktionen von Blättern

Die Analyse der Gesamt-Nucleinsäuren aus Tabakblättern auf der MAK-Säule ergibt die typischen Elutionsprofile mit folgenden Fraktionen, gemessen durch UV-Absorption (Abb. 1): I. tRNS (4 S RNS),

¹⁸ G. RICHTER u. H. SENGER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **87**, 502 [1964].

¹⁹ R. K. RALH u. A. R. BELLAMY, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **87**, 9 [1964].

²⁰ S. KATZ u. D. G. COMB, J. biol. Chemistry **238**, 3065 [1963].

Abb. 1. Fraktionierung radioaktiv markierter Nucleinsäuren aus Tabakblättern auf der MAK-Säule. Zeitlicher Verlauf des Einbaus von ^{32}P . Inkubationsdauer A: 45 Min., B: 6 Stunden.

II. 5 S ribosomale RNS, III. DNS, IV. rRNS 1, V. rRNS 2.

Der Einbau von ^{32}P in die Gesamt-RNS von Blättern verläuft über mehrere Std. nahezu linear. Die Synthesegeschwindigkeit der einzelnen RNS-Fractionen ist dabei unterschiedlich (Abb. 1 A). Nach 45 Min. Einbau von ^{32}P stimmt die Radioaktivitätskurve nicht mit der UV-Absorptionskurve überein, es treten folgende radioaktiv markierte Fractionen auf:

A. Ein Radioaktivitätsgipfel im niedermolekularen Bereich, der sich weder mit der 4 S- noch mit der 5 S-RNS deckt. B. RNS-DNS-Komplex, C. rRNS 1, D. rRNS 2, E und F. 2 Fractionen schnellmarkierter RNS mit besonders hoher spezifischer Aktivität, die aber nicht in allen Versuchen deutlich voneinander getrennt sind. Diese RNS hat im Vergleich zur rRNS einen hohen Gehalt an Adenin + Uracil und soll deshalb als AU-RNS bezeichnet werden.

Bei längerer Incorporation von ^{32}P gleicht sich die Radioaktivitätskurve allmählich der UV-Absorptionskurve an, nach 6 Std. ist eine völlige Übereinstimmung erreicht (Abb. 1 B). Im hochmolekularen Bereich werden in dieser Zeit rRNS und auch AU-RNS ständig weitergebildet. Während jedoch rRNS akkumuliert wird, unterliegt die AU-RNS einem ständigen Umsatz (vgl. Abb. 3, Tab. 1), so daß sich nach einiger Zeit die AU-RNS nicht mehr als besondere Fraction von der rRNS abhebt. Im niedermolekularen Bereich sind nach 6 Std. 2 Aktivitätsgipfel über der 4 S RNS und der 5 S RNS ausgebildet.

2. Charakterisierung der schnellmarkierten RNS

a) Umsatzgeschwindigkeit der schnellmarkierten RNS („Chase“-Versuch)

Die schnelle Markierung im „pulse“-Experiment ist das auffallendste Charakteristikum der Messenger-RNS. Es muß jedoch damit gerechnet werden, daß nicht nur mRNA, sondern auch andere RNS-Fractionen schnell markiert werden. Deshalb gilt als weiteres Charakteristikum für mRNA ihre Kurzlebigkeit, wodurch sie sich von anderen schnellmarkierten RNS-Typen (sRNS, ribosomaler Vorstufen-RNS) unterscheidet.

Die Umsatzgeschwindigkeit der RNS kann im „chase“-Versuch bestimmt werden, d. h. im Anschluß an die „pulse“-Markierung mit ^{32}P wird das Gewebe einem Überangebot an inaktivem ^{31}P ausgesetzt, um den weiteren Einbau von ^{32}P zu stoppen. An der Abnahme der Radioaktivität kann nun der RNS-Abbau im Verlauf des natürlichen Umsatzes gemessen werden.

Es hat sich jedoch gezeigt, daß „chase“-Versuchen mit pflanzlichen Geweben gewisse Fehler anhaften. Während der ^{31}P -„chase“-Periode nach ^{32}P -„pulse“-Markierung ist die Phosphataufnahme und damit der Austausch von ^{32}P gegen ^{31}P zu langsam, um ein sofortiges Abstoppen des ^{32}P -Einbaues in die RNS zu erreichen. Aus dem ^{32}P -Nucleotidpool werden im ^{31}P -Medium noch über längere Zeit markierte Nucleotide in die RNS aller Fractionen eingebaut (Abb. 2). Deshalb haben wir den RNS-Umsatz erst gemessen, nachdem der Einbau von ^{32}P beendet war (nach 3 Std. ^{31}P „chase“) und der Abbau einsetzte. Es zeigte sich (Abb. 3, Tab. 1), daß die schnellmarkierte RNS im Bereich der sRNS und

Abb. 2. Verlauf der Akkumulation von ^{32}P in die GesamtrNS von Tabakblättern während 45 Min. Markierung mit ^{32}P und anschließender Inkubation mit ^{31}P (0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,0).

Abb. 3. Abbau ^{32}P -markierter RNS im „chase“-Versuch. A. Die Tabakblätter wurden 45 Min. mit ^{32}P inkubiert (Kontrolle). B. Die Blätter wurden 45 Min. mit ^{32}P inkubiert, dann wurden die Proben gewaschen und 5 Std. mit ^{31}P nachinkubiert (0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,0).

der rRNS relativ langsam abgebaut wird, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, daß sich die rRNS mit der AU-RNS überlagert, der Umsatz beider Fraktionen also nicht eindeutig zu fassen ist. Die AU-RNS wird in 3 Std. bereits zu 40% abgebaut, d. h. sie hat eine Halbwertszeit von maximal 3,5 – 4 Stunden.

	sRNS		rRNS Radioaktivität		AU-RNS	
	[Imp./ Min.]	[%]	[Imp./ Min.]	[%]	[Imp./ Min.]	[%]
Kontrolle:						
45 Min. Einbau von ^{32}P , dann	12700	100	24300	100	27800	100
2 Std. ^{31}P						
Versuch:						
45 Min. Einbau von ^{32}P , dann	12100	95	20900	86	16400	59
5 Std. ^{31}P						

Tab. 1. Der Abbau verschiedener RNS-Fractionen in Tabakblättern während der Inkubation mit ^{31}P (0,05 M P-Puffer, pH 7,0) im Anschluß an eine Kurzzeitmarkierung (45 Min.) mit ^{32}P („chase“-Versuch). Die Werte für die einzelnen RNS-Fractionen wurden durch Analyse der Nucleinsäuren auf der MAK-Säule gewonnen.

b) Wirkung von Actinomycin auf den RNS-Stoffwechsel

Actinomycin ist ein Antibiotikum, das selektiv die enzymatische DNS-abhängige RNS-Synthese hemmt. Obwohl man davon ausgehen kann, daß alle RNS-Fractionen in einer Actinomycin-empfindlichen, DNS-abhängigen Reaktion gebildet werden, wird die Synthese der einzelnen RNS-Typen unterschiedlich stark durch AD gehemmt (Lit. s. l. c.²¹).

In Blättern wird bei Kurzzeitmarkierung der ^{32}P -Einbau in ribosomale RNS und AU-RNS in gleicher Weise Konzentrations-abhängig durch Actinomycin gehemmt (Abb. 4, Tab. 2). Auch die Synthese der DNS-gebundenen RNS (Fraktion B) wird durch höhere Konzentrationen vollständig gehemmt im Gegensatz zu Befunden von CHROBOCZEK und CHERRY³, wonach in Erdnußkotyledonen die Synthese von DNS-RNS durch AD gefördert wird – ein Effekt, dessen Deutung große Schwierigkeiten bereitet.

Der Hemmeffekt auf die niedermolekulare, schnellmarkierte RNS ist weitaus schwächer. Selbst bei 50 μg AD/ml ist der ^{32}P -Einbau noch beträchtlich

²¹ E. REICH u. J. H. GOLDBERG, Progr. in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol. 3, 184 [1964].

Abb. 4. Wirkung von Actinomycin D auf die ^{32}P -Inkorporation in die RNS von Tabakblättern. Je 2 g Blätter wurden 90 Min. mit Wasser bzw. 10 μg AD/ml vorinkubiert. Dann wurden die Proben gewaschen und 45 Min. mit je 0,25 mC ^{32}P in 4 ml Wasser bzw. AD-Lösung (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Nucleinsäureanalysen auf der MAK-Säule (je 3 mg NS).

Actinomycin D [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Hemmung des ^{32}P -Einbaues in % Gesamt-RNS	rRNS	AU-RNS	sRNS
0	0	0	0	0
1	22	29	32	3
10	66	75	76	41
50	87	90	93	67

Tab. 2. Die Wirkung von Actinomycin auf die Synthese verschiedener RNS-Fractionen in Tabakblättern. Je 2 g Blattgewebe wurden 90 Min. mit Lösungen von AD in den angegebenen Konzentrationen vorinkubiert. Dann wurden die Proben 45 Min. mit je 0,25 mC ^{32}P (4 ml) unter Zusatz von AD in den gleichen Konzentrationen inkubiert. Die Werte wurden durch Analyse der NS auf der MAK-Säule gewonnen.

im Vergleich zu den anderen RNS-Fractionen (Tab. 2). Diese relative Resistenz der sRNS-Synthese gegen Actinomycin ist wiederholt beobachtet worden^{3, 22-25}.

Es muß dabei jedoch berücksichtigt werden, daß AD zwar die RNS-Polymerase vollständig hemmt, nicht aber die RNS-Pyrophosphorylase, ein Enzym, das CMP und AMP an das Ende der tRNS-Kette anfügt²⁶. Auf diese Weise könnte ein Teil der sRNS-Aktivität in Gegenwart von Actinomycin (und natürlich auch im AD-freien „pulse“-Experiment) in das CCA-Ende eingebaut worden sein^{22-24, 27}.

Bei der Bestimmung der Stabilität der verschiedenen RNS-Fractionen im „chase“-Experiment mit ^{31}P (Tab. 1/Abb. 3) hatten sich Schwierigkeiten ergeben, weil die RNS-Synthese durch Austausch des ^{32}P gegen ^{31}P nur langsam gestoppt werden kann. Deshalb sollte in einem weiteren Experiment versucht werden, eine schnellere Hemmung durch Zusatz von Actinomycin (+ ^{31}P) zu erzielen.

Auch in diesem Fall wird der ^{32}P -Einbau nicht sofort unterbrochen, weil die AD-Aufnahme relativ langsam erfolgt. Die RNS-Synthese ist jedoch nach einer Stde. vollständig gestoppt, dann beginnt der Abbau in nahezu gleicher Weise wie im ^{31}P -„chase“-Versuch. Bei einer relativ geringen Abnahme der Radioaktivität im sRNS-, rRNS- und DNS-RNS-Be-

	sRNS	rRNS		AU-RNS	
	[Imp./ Min.]	[%]	Radioaktivität [Imp./ Min.]	[%]	[Imp./ Min.]
Kontrolle:					
45 Min. Einbau von ^{32}P , dann 1 Stde. ^{31}P und Actinomycin	13600	100	30200	100	35000
Versuch:					
45 Min. Einbau von ^{32}P , dann 4 Stdn. ^{31}P und Actinomycin	12600	93	27500	91	21700

Tab. 3. Der Abbau verschiedener RNS-Fractionen in Tabakblättern während der Inkubation mit Actinomycin D (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und ^{31}P (0,05 m P-Puffer, pH 7,0) im Anschluß an eine Kurzzeit-Markierung (45 Min.) mit ^{32}P („chase“-Versuch). Die Werte für die einzelnen RNS-Fractionen wurden durch Analysen der Nucleinsäuren auf der MAK-Säule gewonnen.

²² R. EASON, M. J. CLINE u. R. M. S. SMELLIE, J. biol. Chemistry **238**, 3978 [1963].

²³ R. M. FRANKLIN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **72**, 555 [1963].

²⁴ I. MERITS, Biochem. biophysic. Res. Commun. **10**, 254 [1963].

²⁵ M. REVEL u. H. H. HIATT, Biochem. biophysic. Res. Commun. **17**, 730 [1964].

²⁶ J. HURWITZ, J. J. FURTH, M. MALAMY u. M. ALEXANDER, Proc. nat. Acad. Sci. USA **48**, 1222 [1962].

²⁷ R. TSANEV, G. DESSEV u. G. G. MARKOV, C. R. Acad. bulg. Sci. **19**, 409 [1966].

reich wird die AU-RNS wesentlich schneller abgebaut (Tab. 3). Auch in diesem Versuch beträgt die Halbwertszeit der AU-RNS ca. 4 Stunden. Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Versuche zeigt, daß es sich auch in Gegenwart von Actinomycin nur um den natürlichen Umsatz der AU-RNS handelt und nicht um einen zusätzlichen, durch Actinomycin verursachten Abbau²⁸.

c) Basenzusammensetzung der RNS

Es ist allgemein üblich, die Basenzusammensetzung schnellmarkierter RNS (mit ³²P) auf Grund der Radioaktivitäts-Verteilung in den 4 Nucleotiden zu bestimmen. Wir haben nach 45 Min. Inkubation der Blätter mit ³²P die Nucleinsäuren auf der MAK-Säule fraktioniert, aus den Eluaten einige Nucleinsäure-Fractionen entnommen und die Nucleotid-Zusammensetzung vergleichend durch Messung der UV-Absorption und der Radioaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

	s-RNS	rRNS	AU-RNS	rRNS Langzeit- markierung	Tabak- DNS ²⁹
	Fraktion 15–23 I	Fraktion 34–40 II	Fraktion 42–48 III	Fraktion 34–48 IV	V
A: Nucleotidzusammensetzung [Mol.-%]					
C	24,3	23,2	22,9	22,9	19,6
A	19,4	23,7	24,1	23,4	29,6
G	29,0	31,2	30,4	31,1	19,8
U (T)	27,3	22,1	22,9	22,6	30,7
B: Radioaktivitäts-Verteilung [%]					
C	33,9	21,4	19,5	22,3	—
A	18,4	25,3	27,9	23,8	—
G	23,4	28,4	24,7	30,0	—
U	24,3	24,9	28,7	23,9	—

Tab. 4. Nucleotid-Zusammensetzung verschiedener RNS-Fractionen aus 45 Min. mit ³²P inkubierten Tabakblättern, die auf der MAK-Säule gewonnen wurden (Spalten I–III). Spalte IV: Nucleotid-Zusammensetzung der rRNS nach 18-stdg. Markierung mit ³²P. Nucleotid-Zusammensetzung bestimmt durch UV-Absorption (A) und durch ³²P-Verteilung (B). Die Fraktionsnummern entsprechen den Angaben in Abb. 1 A.

Die Fraktion schnellmarkierter RNS, die wir als AU-RNS bezeichnen, unterscheidet sich durch ihren hohen AU- und niedrigen GC-Gehalt deutlich von

der ribosomalen RNS, mit der sie sich überlagert (Spalte III). Es ergibt sich somit eine gewisse Annäherung an die Basenzusammensetzung der Tabak-DNS (Spalte V).

Die schnellmarkierte RNS im Bereich der ribosomalen RNS (Spalte II) ist nicht völlig mit der ribosomalen RNS identisch. Es handelt sich offenbar um ein Gemisch aus radioaktiv markierter rRNS und AU-RNS, die über einen weiten Bereich des Elutionsprofils verteilt zu sein scheint. Bei Langzeitmarkierung gleicht sich die Nucleotid-Zusammensetzung der radioaktiv markierten RNS der Zusammensetzung der rRNS an (Spalte IV).

Die schnellmarkierte RNS im niedermolekularen Bereich unterscheidet sich deutlich von der sRNS (Spalte I). Auffallend ist der sehr hohe Cytosin-Gehalt. Es handelt sich also nicht um eine niedermolekulare DNS-ähnliche RNS, wie sie von anderen Autoren beschrieben worden ist^{30, 14, 13}. Wir hatten bereits darauf hingewiesen, daß der ³²P-Einbau in die schnellmarkierte niedermolekulare RNS nicht unbedingt auf dem Wege einer echten RNS-Synthese erfolgt sein muß. Es ist möglich, daß ein Teil der Markierung durch Nucleotid-Austausch in die CCA-Endgruppe der tRNS eingebaut worden ist. Dafür spricht der hohe C-Gehalt, dagegen jedoch der niedrige A-Gehalt der RNS nach ³²P-Markierung. Auf Grund der Basenzusammensetzung sind also keine Aussagen möglich, ob es sich bei dieser RNS um tRNS oder um einen völlig anderen niedermolekularen RNS-Typ handelt.

d) Molekülgröße der schnellmarkierten RNS

Aus den Ergebnissen der MAK-Säulenanalysen könnte der Schluß gezogen werden, daß die AU-RNS eine relativ einheitliche, hochmolekulare RNS-Fraktion ist. Die MAK-Säule trennt die Nucleinsäuren jedoch nicht nur nach den Mol.-Gew., sondern auch nach anderen Eigenschaften wie z. B. der Basenzusammensetzung. Die Molekülgröße der einzelnen RNS-Fractionen kann also nicht durch MAK-Säulenanalyse, jedoch durch Zentrifugation im Saccharosegradienten bestimmt werden.

Wenn wir „pulse“-markierte RNS pflanzlicher Gewebe in Saccharosegradienten mit einem Puffer nied-

²⁸ C. LEVINTHAL, D. P. FAN, A. HIGA u. R. A. ZIMMERMANN, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. **28**, 183 [1963].

²⁹ J. W. LYTLETON u. G. B. PETERSEN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **80**, 391 [1964].

³⁰ G. GALLING u. G. RICHTER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **123**, 613 [1966].

riger Ionenstärke zentrifugieren, dann erhalten wir eine wesentlich andere RNS-Verteilung als auf der MAK-Säule (Abb. 5).

Abb. 5. Vergleich der Fraktionierung ^{32}P -markierter Nucleinsäuren aus Erbsenblättern auf der MAK-Säule und im Saccharosegradienten. A: 45 Min. Inkubation mit ^{32}P , Analyse der NS auf der MAK-Säule. B: 45 Min. Inkubation mit ^{32}P , Analyse im 5–20% Saccharosegradienten. C: 12 Stdn. Inkubation mit ^{32}P , Analyse wie B.

Deutlich ausgeprägte hochmolekulare Fraktionen treten nicht auf, die Radioaktivität ist über die ganzen Bereiche der ribosomalen RNS und der sRNS

verteilt. Eine völlige Übereinstimmung der UV-Absorptionskurve und der Aktivitätskurve besteht jedoch nicht, das Aktivitätsspektrum ist breiter als das O.D.-Spektrum der rRNS (Abb. 5 B). Das bedeutet offenbar, daß die schnellmarkierte RNS heterogener ist als die rRNS und in einem größeren Bereich sedimentiert. Nach Langzeitmarkierung der Blätter deckt sich erwartungsgemäß die UV-Absorptionskurve völlig mit dem Radioaktivitäts-Spektrum (Abb. 5 C). Diesen Versuch haben wir nicht mit Tabak-, sondern mit Erbsenblättern durchgeführt, weil die AU-RNS aus Erbsenblättern bei der Analyse auf der MAK-Säule noch ausgeprägter ist als AU-RNS aus Tabakblättern.

e) Lokalisation der schnellmarkierten RNS in der Zelle

Die Zellkerne sind die wichtigsten Syntheseorte für Messenger-RNS in tierischen und pflanzlichen Zellen. Nach „pulse“-Markierung ist es deshalb möglich, den größten Teil der schnellmarkierten RNS in den Zellkernen nachzuweisen. Es muß aber damit gerechnet werden, daß in einem grünen Gewebe ein Teil der schnellmarkierten RNS in den Plastiden gebildet wird. Die Chloroplasten enthalten DNS, sRNS und rRNS^{31, 32} und es muß angenommen werden, daß sie auch mRNS enthalten und diese in einem durch die eigene DNS gesteuerten Mechanismus auch selbst synthetisieren. Wir haben deshalb versucht, die Lokalisation der schnellmarkierten RNS in der Zelle, d.h. in den einzelnen Fraktionen des Blatthomogenats, zu bestimmen.

Das Blattmaterial wurde in üblicher Weise 45 Min. mit ^{32}P inkubiert. Aus dem Homogenat wurden die einzelnen subzellulären Fraktionen durch Differential-Zentrifugation isoliert. Dabei ist zu berücksichtigen, daß es sich meist nicht um reine Fraktionen handelt, sondern nur um Anreicherungen der jeweiligen Hauptkomponente.

Die schnellmarkierte RNS (gemessen als Radioaktivität) ist über alle Homogenat-Fractionen verteilt, der größte Anteil findet sich in der Chloroplasten-Fraktion und der Mikrosomen-Fraktion. In der löslichen Fraktion, der Chloroplasten-Fraktion und der Mitochondrien-Fraktion, ist der sRNS-Bereich stark markiert. AU-RNS findet sich nach 45 Min. „pulse“-Markierung in allen Partikel-Fraktio-

³¹ B. PARTHIER u. R. WOLLGIEHN, in: „Probleme der biol. Replikation“, Springer-Verlag, Heidelberg 1966, S. 244.

³² R. WOLLGIEHN, M. RUESS u. D. MUNSCH, Flora [Jena] 157 A, 92 [1966].

nen (Tab. 5, Versuch 1): 36% in der Chloroplasten-Fraktion, 26% in der Mikrosomen-Fraktion, aber nur relativ wenig in der Kernfraktion. Es scheint also ein sehr schneller Austritt von mRNS aus den Zellkernen zur Polysomenbildung ins Cytoplasma zu erfolgen. Verunreinigungen durch Kernbruchstücke liegen in der Mikrosomen-Fraktion nicht vor, denn sie enthält keine DNS.

	Gesamt-Nucleinsäure-Aktivität der Fraktion in %		AU-RNS-Aktivität in % der Gesamt-AU-TRNS-Aktivität des Homogenats		Gesamt-Nucleinsäuren in % der Gesamt-Nucleinsäuren der Blätter (Versuch 1)
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2	
A. 200 g 5 Min. Kernfraktion	11	23	17	33	8
B. 1500 g 10 Min. Chloroplasten-Fraktion	31	17	36	19	16
C. 20000 g 20 Min. Mitochondrien-Fraktion	17	17	15	15	13
D. 150000 g 60 Min. Mikrosomen-Fraktion	24	26	25	24	50
E. Überstand lösliche Fraktion	17	17	4	9	13

Tab. 5. Verteilung der schnellmarkierten RNS auf verschiedene subzelluläre Fraktionen aus Tabakblättern. Die Homogenate aus 45 Min. mit ^{32}P inkubierten Blättern wurden durch Differential-Zentrifugation aufgearbeitet. Analyse der Nucleinsäuren auf der MAK-Säule. Einzelheiten über die Versuche 1 und 2 sind im Text erläutert.

Da die Trennung der Zellkerne von den Chloroplasten bei einfacher Differential-Zentrifugation der Homogenate sehr unvollständig ist, haben wir in weiteren Experimenten versucht, Methoden zur besseren Trennung zu finden. Durch Reinigung der Partikel im Dichtegradienten erhielten wir keine völlig befriedigenden Ergebnisse. Deshalb haben wir die Kernfraktion und die Chloroplasten-Fraktion in üblicher Weise aus dem Homogenat abzentrifugiert und die Chloroplasten-Fraktion anschließend mit Triton X-100 behandelt. Dabei lösen sich die Chloroplasten vollständig auf, die Kerne bleiben unverletzt³³. Durch Zentrifugation bei 1500 g haben wir dann aus der Suspension die Kerne und Kernbruchstücke abgetrennt, die mit den Chloroplasten

sedimentiert waren. Das Sediment wurde mit der Kernfraktion vereinigt.

Die Nucleinsäure-Analysen ergaben nun eine andere RNS-Verteilung. Die Gesamtradioaktivität der Kernfraktion ist jetzt wesentlich höher (Abb. 6 und Tab. 5, Vers. 2), sie enthält 33% der AU-RNS der Blätter. Die Aktivität der Chloroplasten-Fraktion ist dementsprechend niedriger als nach einfacher Differential-Zentrifugation. Es ist sehr wahrscheinlich, daß dieser Versuch die tatsächlichen Verhältnisse in der Zelle exakter wiedergibt.

Abb. 6. MAK-Säulenanalyse der Nucleinsäuren einer Kernfraktion (A) und einer Chloroplasten-Fraktion (B) aus Tabakblättern. Das Homogenat aus 10 g 45 Min. mit ^{32}P inkubierten Blättern wurde zunächst der Differentialzentrifugation unterworfen (s. Methoden). Die mit Kernen verunreinigte Chloroplasten-Fraktion wurde in folgendem Puffer suspendiert und 10 Min. gerührt: 0,025 M Tris-Puffer pH 7,4; 10^{-3} M MgCl_2 ; 5% Triton $\times 100$. Dann wurde bei 1500 g abzentrifugiert und das Sediment mit der Kernfraktion vereinigt. Der Überstand (Chloroplasten-Fraktion) wurde mit Alkohol gefällt. Aus beiden Fraktionen wurden die NS extrahiert und analysiert (vgl. auch Tab. 5, Versuch 2).

Diskussion

Die Untersuchungen führten zum Nachweis mehrerer schnellmarkierter RNS-Fractionen in Blättern, die bei der MAK-Säulenanalyse im Bereich der sRNS, der DNS und der ribosomalen RNS erscheinen. Die auffallendste, am stärksten markierte Fraktion wird erst mit Salzlösungen hoher Konzentrationen nach der Hauptmenge ribosomaler RNS eluiert. Mit dieser Fraktion, die wir als AU-RNS bezeichnen, haben wir uns eingehender beschäftigt und zu

³³ D. SPENCER u. S. G. WILDMAN, *Biochemistry* 3, 954 [1965].

klären versucht, ob es sich um Messenger-RNS handeln könnte.

Das auffallendste Merkmal dieser RNS ist die schnelle Markierung im „pulse“-Experiment, wodurch sie sich deutlich von der ribosomalen RNS unterscheidet. Das allein genügt jedoch nicht für eine sichere Zuordnung, denn es gibt auch andere RNS-Typen, die im „pulse“-Experiment schnell markiert sein können. Das gilt sowohl für sRNS, vor allem aber für ribosomale Vorstufen-RNS (45 S RNS), die sich bei der Analyse im Saccharosegradienten und noch mehr bei der Elution von der MAK-Säule mit Messenger-RNS überlagern kann (Lit. s. l. c. ³⁴).

Ein weiteres Charakteristikum für mRNA ist die relativ kurze Lebensdauer. In unseren Versuchen ergab sich für die AU-RNS im „pulse-chase“-Versuch eine Halbwertszeit von maximal 4 Stunden. In ähnlicher Größenordnung liegen die Werte, die für mRNA aus anderen Pflanzengeweben ermittelt wurden (1,5 h für Erdnuß-Kotyledonen³; 1,6 h für Kartoffelknollengewebe³⁵; 2 h für Sojabohnen-Hypocotyle⁹; aber nur 10 Min. für Erbsenwurzeln⁸). Die Lebensdauer der mRNA von Bakterien beträgt dagegen nur wenige Minuten. Für tierische Gewebe wurden dagegen Werte von einigen Std. bis zu einigen Tagen ermittelt (Lit. s. l. c. ³⁴).

Es muß damit gerechnet werden, daß es in allen höheren Organismen auch langlebige mRNA gibt. Das ist vielfach auf indirektem Wege gezeigt worden. Nach Unterbrechung der RNS-Synthese durch Actinomycin konnte in einigen pflanzlichen³⁶ und tierischen³⁷⁻⁴⁰ Geweben ein Fortgang der Proteinsynthese bis zu mehreren Tagen beobachtet werden. Außerdem wurde nachgewiesen, daß auch kernlose Teile der einzelligen Alge *Acetabularia*⁴¹, kernlose Erythrocyten⁴², kernlose Amöben, *Tetrahymena* und HeLa-Zellen⁴³ und alte, kernfreie Siebzellen von *Vicia faba*⁴⁴, in denen keine RNS-Synthese stattfindet, über längere Zeit zur Proteinsynthese befähigt sind. Diese Zellen müssen also langlebige, funktionsfähige mRNA enthalten.

Die Annahme, daß die Basenzusammensetzung der mRNA der Basenzusammensetzung der DNS des gleichen Organismus entspricht, wurde vom Messenger-Begriff selbst hergeleitet, aber vor allem aus der Gleichheit der Basenverhältnisse von T₂-Phagen-DNS und der RNS, die nach Infektion von *E. coli* mit dem Phagen entsteht. In vielen Fällen hat sich tatsächlich gezeigt, daß auch die mRNA höherer Organismen eine mehr oder weniger ausgeprägte Ähnlichkeit zur DNS besitzt (bei Pflanzen ^{11, 3, 16, 9, 15, 6}). Unsere schnellmarkierte AU-RNS unterscheidet sich deutlich von der rRNS und besitzt durch ihren hohen AU- und niedrigen GC-Gehalt eine gewisse Verwandtschaft zur DNS.

Diese Beziehungen sollten aber nicht überbewertet werden, denn aus mehreren Gründen ist es unwahrscheinlich, daß es überhaupt gelingt, aus höheren Organismen mRNA zu isolieren, die völlig homolog zur DNS ist. 1. Es ist fraglich, ob die durch ³²P-Markierung ermittelte Basenzusammensetzung einwandfreie Ergebnisse liefert, solange nicht gesichert ist, daß im Precursor-Pool tatsächlich ein Nucleotid-Gleichgewicht besteht. 2. Es wird kaum möglich sein, völlig reine mRNA zu isolieren. 3. Nicht alle DNS wird in mRNA übersetzt. 4. Messenger-RNS ist die Kopie nur eines DNS-Stranges, so daß gar keine Notwendigkeit einer Äquivalenz im Basenverhältnis von mRNA und DNS besteht.

Über das Mol.-Gew. der mRNA aus verschiedenen Geweben sind sehr viele Untersuchungen durchgeführt worden. Man sollte erwarten, daß die Gesamt-mRNA eines Gewebes sehr heterogen in der Molekülgröße ist. Es mag deshalb überraschen, daß auf der MAK-Säule die AU-RNS als relativ einheitliche Fraktion nach der ribosomalen RNS erscheint. Das erweckt den Anschein, als würde es sich um eine einheitliche hochmolekulare RNS-Fraktion handeln. Das ist aber nicht der Fall, denn die Nucleinsäuren werden auf der MAK-Säule nicht nur nach ihrer Molekülgröße, sondern auch „by extent of hydrogen bonding“ und nach der Basenzusammensetzung ge-

³⁴ M. F. SINGER u. P. LEDER, *Annu. Rev. Biochem.* **35**, 195 [1966].

³⁵ R. E. CLICK u. D. P. HACKETT, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **142**, 403 [1967].

³⁶ L. DURE u. L. WATERS, *Science* [Washington] **147**, 410 [1965].

³⁷ J. W. DRYSDALE u. H. N. MUNRO, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **103** 185 [1965].

³⁸ M. REVEL u. H. H. HIATT, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **51**, 810 [1964].

³⁹ R. B. SCOTT u. E. BELL, *Science* [Washington] **145**, 711 [1964].

⁴⁰ A. SPECTOR u. J. H. KINOSHITA, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **95**, 561 [1965].

⁴¹ H. CLAUS u. G. WERZ, *Z. Naturforsch.* **16b**, 162 [1961].

⁴² H. G. SCHWEIGER, *Int. Rev. Cytol.* **13**, 135 [1962].

⁴³ D. PRESCOTT, *J. Histochem. Cytochem.* [Baltimore] **10**, 145 [1962].

⁴⁴ ST. NEUMANN u. R. WOLLGIEHN, *Z. Naturforsch.* **19b**, 1066 [1964].

trennt⁴⁵. RNS-Fractionen werden um so später eluiert, je höher ihr AU-Gehalt ist³.

Aufschluß über die Molekülgröße können dagegen RNS-Fraktionierungen im Saccharosegradienten geben. Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß die AU-RNS ein heterogener RNS-Typ ist, der über den ganzen Bereich ribosomaler RNS verteilt zu sein scheint. Ein sehr ähnliches Sedimentationsspektrum ist auch für mRNS aus Sojabohnen-Kotyledonen beschrieben worden, die von der MAK-Säule ebenfalls als relativ einheitliche Fraktion nach der rRNS eluiert wird⁹.

Die biologische Aktivität der Messenger-RNS, d. h. die Fähigkeit, die Proteinsynthese zu stimulieren, kann nur in einem zellfreien System getestet werden. Derartige Versuche sind in Vorbereitung. Als ein indirekter Hinweis auf die Funktion der AU-RNS als Messenger kann jedoch die Tatsache gewertet werden, daß ein nicht unbeträchtlicher Teil dieser RNS in der Mikrosomen-Fraktion lokalisiert ist, offenbar in aktiven Polysomen. Ein anderer Teil ist nach 45 Min. „pulse“-Markierung in den Zellkernen lokalisiert. Das ist offenbar derjenige Teil der AU-RNS, der aus Gesamthomogenaten schwerer als ribosomale RNS, lösliche RNS und cytoplasmatische AU-RNS extrahierbar ist (nur mit SDS bei 20°, Lit. s. l. c.¹⁷), sich bei der Extraktion also ähnlich wie die DNS verhält.

Ob die in den Chloroplasten nachgewiesene schnellmarkierte AU-RNS — ebenso wie alle anderen RNS-Typen der Chloroplasten — auch dort gebildet worden sind, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden. Erst Versuche mit isolierten Chloroplasten können diese Frage klären. RNS-Polymerase-Aktivität ist jedoch bereits wiederholt in isolierten Chloroplasten nachgewiesen worden^{46, 47}. Nach Befunden von SPENCER und WHITFIELD⁴⁷ sedimentiert die in vivo und in vitro gebildete schnellmarkierte RNS von Spinachchloroplasten jedoch bei 8 S, ein Befund, der unseren Ergebnissen widerspricht.

Obwohl wir noch nicht alle Eigenschaften der schnellmarkierten RNS aus Blättern geprüft haben, ist es nach den bisherigen Befunden sehr wahrscheinlich, daß die AU-RNS die Messenger-RNS der Blätter ist.

Wesentlich schwieriger ist dagegen eine Zuordnung der niedermolekularen schnellmarkierten RNS. Sie ist zwar im „pulse“-Versuch schnell markiert, es muß aber offen bleiben, ob die ³²P-Markierung ausschließlich durch eine echte DNS-abhängige RNS-Synthese oder auch durch Nucleotidaustausch in die CpCpA-Endgruppe des Moleküls eingebaut wird^{22–24, 26, 27}). Auf diese Weise könnte ein neuer, von der sRNS abweichender RNS-Typ vorgetäuscht werden.

Der Radioaktivitätsgipfel dieser Fraktion deckt sich aber weder mit dem 4 S- noch mit dem 5 S-RNS-Gipfel. Das wiederum könnte bedeuten, daß hier tatsächlich ein besonderer RNS-Typ vorliegt. Im Gegensatz zu Befunden anderer Autoren^{30, 14, 13} hat diese niedermolekulare RNS keine DNS-ähnliche Basenzusammensetzung.

Von der AU-RNS unterscheidet sich die niedermolekulare RNS in zwei wichtigen Punkten. 1. Ihre Synthese ist relativ unempfindlich gegen Actinomycin, 2. sie wird wesentlich langsamer abgebaut als AU-RNS. Beide Eigenschaften sprechen dagegen, daß diese RNS zum Messenger-Typ gehört. Die relative Resistenz gegen Actinomycin könnte wiederum auf einen Nucleotidaustausch in der CCA-Endgruppe zurückzuführen sein, es ist aber andererseits bekannt, daß auch in Gegenwart von AD eine echte DNS-abhängige tRNS-Synthese möglich ist^{48, 25}.

Im Gegensatz zu Befunden von GALLING et al.¹⁴ wird unsere schnellmarkierte niedermolekulare RNS ebenso wie sRNS und rRNS bereits unter sehr schonenden Bedingungen aus dem Gewebe extrahiert¹⁷. Der größte Teil ist nach „pulse“-Markierung in der löslichen Cytoplasmafraktion lokalisiert. Sie unterscheidet sich auch hierin deutlich von der AU-RNS.

Es muß noch darauf hingewiesen werden, daß ein Teil der schnellmarkierten RNS aus Blättern (ca. 15%) mit einem NaCl-Gradienten von der MAK-Säule nicht eluiert werden kann. Diese Fraktion, die wir mit 1 M NH₄OH eluieren können, haben wir aber noch nicht näher charakterisiert.

Wir danken Herrn Professor Dr. K. MOTHES für vielfältige Förderung der Arbeit und Frau SIGRID SCHWARZ für zuverlässige technische Mitarbeit.

⁴⁵ N. SUEOKA u. T. J. CHENG, J. molecular Biol. **4**, 161 [1962].

⁴⁶ J. T. O. KIRK, Biochem. biophysic. Res. Commun. **16**, 233 [1964].

⁴⁷ D. SPENCER u. P. R. WHITFIELD, Arch. Biochem. Biophysics **121**, 336 [1967].

⁴⁸ R. P. PERRY, Nat. Cancer Inst. Monogr. **14**, 73 [1964].