

Proteinbiosynthese: Die codonspezifische Aktivierung der Aminosäuren

Von Eggehard Holler^[*]

Professor Hermann Hartmann gewidmet

Zu Beginn der Proteinbiosynthese werden die Aminosäuren durch Veresterung mit den Transfer-Ribonucleinsäuren, die die entsprechenden Anticodons besitzen, chemisch aktiviert. Die Veresterung wird mit ungewöhnlich hoher Spezifität durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysiert. Unsere gegenwärtigen Kenntnisse von den strukturellen Eigenschaften der Reaktionspartner, vom Reaktionsverlauf und von den Ursachen der Spezifität werden zusammenfassend beschrieben.

1. Einleitung

In der Proteinbiosynthese haben Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNA) die Funktion, Aminosäuren in einer von der Messenger-Ribonucleinsäure (mRNA) vorgeschriebenen Reihenfolge dem ribosomalen Syntheseparat zuzuführen (siehe Abb. 1). Die Veresterung der Aminosäure mit der tRNA sorgt

für die chemische Aktivierung der Carboxygruppe, das für die Aminosäure charakteristische Anticodon der tRNA sorgt für die Übersetzung des Nucleinsäurecodes in eine Aminosäuresequenz. Diese Übersetzung ist äußerst präzise. Gemessen am gelegentlichen Einbau von L-Valin statt L-Isoleucin in eine Säugetier-Hämoglobinkette entspricht die erzeugte Aminosäuresequenz in mindestens 99,97 % der Fälle der genetischen „Vorlage“^[1].

Die Veresterung zwischen Aminosäuren und tRNA wird durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysiert. Sie stehen im Mittelpunkt des vorliegenden Aufsatzes. Auf frühere Übersichtsartikel wird hingewiesen^[2].

2. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

2.1. Vorkommen

In Bakterienzellen ist jeder Aminosäure eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase zugeordnet. In pflanzlichen und tierischen Zellen sind die Enzyme des Cytoplasmas und der Organellen (Mitochondrien und Chloroplasten) nicht identisch. Sie beladen vorzugsweise die in den gleichen Kompartimenten beheimateten tRNA-Spezies. Einige cytoplasmatische Synthetasen bilden größere, offenbar membranabhängige Komplexe, die Molekulargewichte von 10^6 erreichen^[3].

Intrazelluläre Konzentrationen von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und tRNA liegen bei Bakterien in der Größenordnung von 10^{-6} mol/Liter. Für Pflanzen- und Tierzellen lassen sich infolge der Kompartimentierung keine Angaben machen. Aus den Werten der Konzentrationen und Dissoziationskonstanten läßt sich schließen, daß ein beträchtlicher Anteil der Synthetasen im Komplex mit tRNA vorliegt.

2.2. Struktur

Ein- oder zweisträngige Synthetasen (α - oder α_2 -Typ) haben Molekulargewichte im Bereich von 46000 bis 140000, viersträngige ($\alpha_2\beta_2$ -Typ) zwischen 220000 und 290000. Der dimere Strukturtyp überwiegt, wenn man die viersträngigen Enzyme als ($\alpha\beta$)₂-Enzyme betrachtet. Die Tertiärstruktur einsträngiger Synthetasen besteht aus globulären Faltungsbereichen. Einige Bereiche zeigen Wiederholungen in der Aminosäuresequenz^[4]. Die homologen Sequenzen sind vermutlich Ergebnisse der Duplikation und Fusion einzelner Ur-Gene.

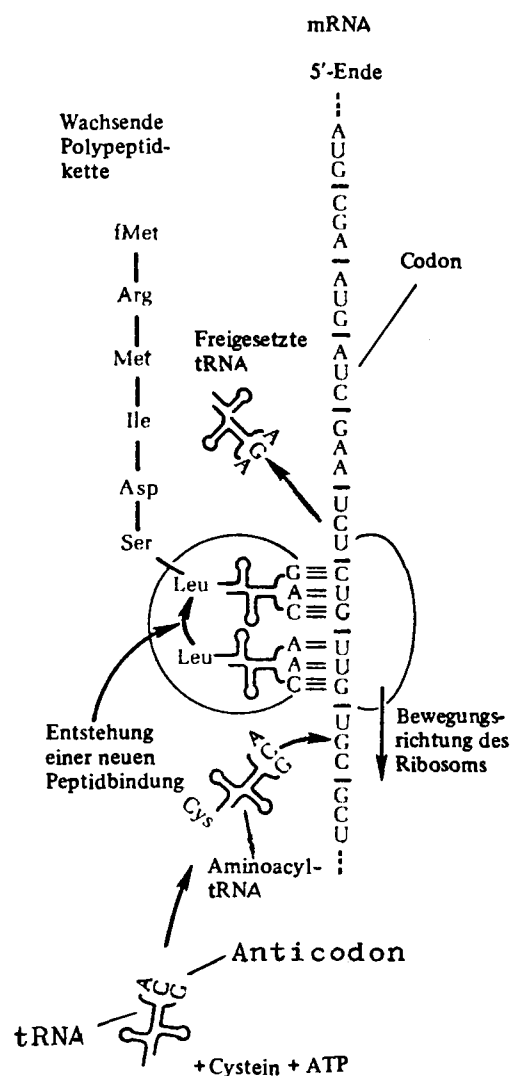


Abb. 1. Die wichtigsten Schritte der Proteinsynthese.

[*] Dr. E. Holler
Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität
Universitätsstraße 31, D-8400 Regensburg

Eine Röntgenstrukturanalyse liegt für die Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus *Bacillus stearothermophilus* bei 2.7 Å Auflösung und für das tryptische (aber enzymatisch aktive) Fragment der Methionyl-tRNA-Synthetase aus *Escherichia coli* bei 4 Å

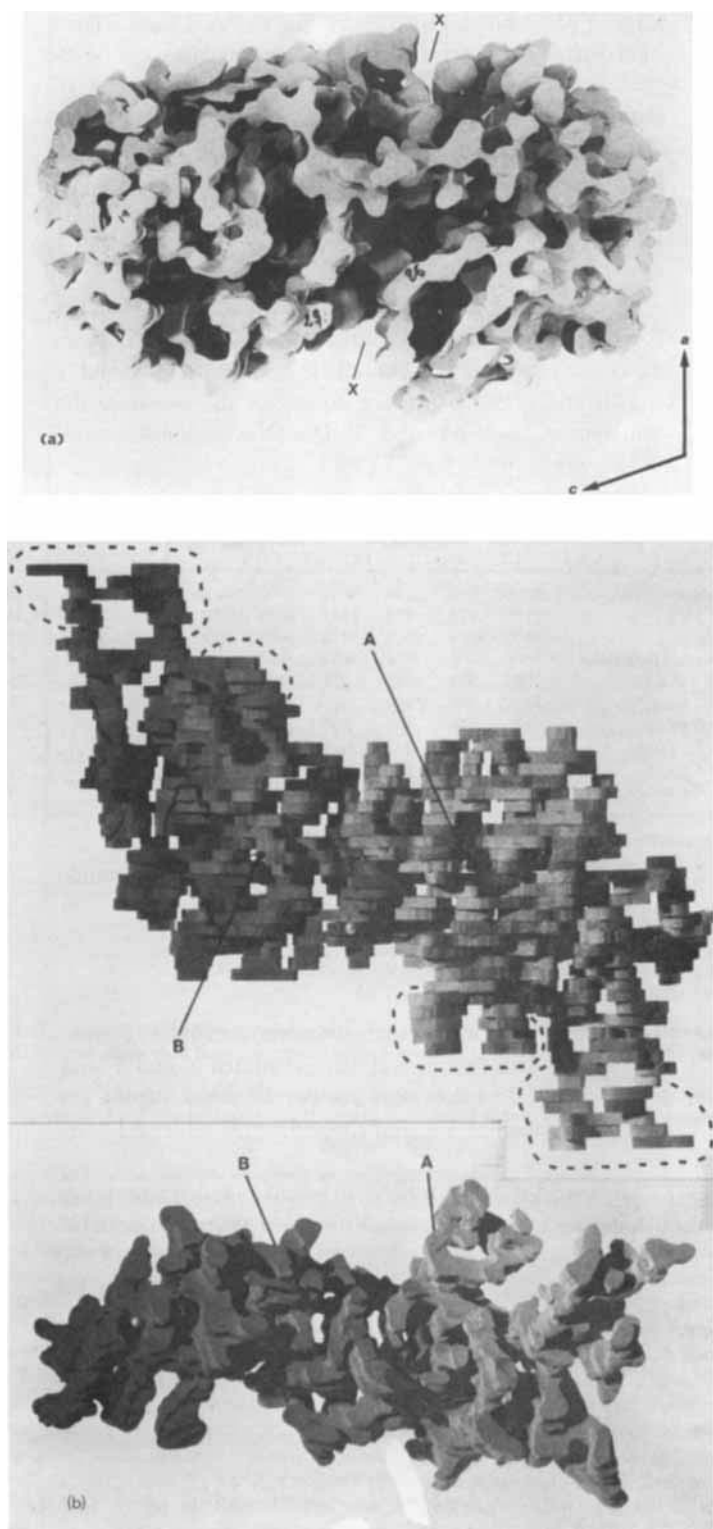


Abb. 2. Aufgrund röntgen-kristallographischer Untersuchungen gebaute Strukturmodelle zweier Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. (a) Proteolytisches Fragment der Methionyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* bei 4 Å Auflösung [6]. Das Fragment ist enzymatisch aktiv, hat das Molekulargewicht 64000 und ist monomer. Native Methionyl-tRNA-Synthetase ist dimer und hat das Molekulargewicht 172000. Das Fragment besteht aus zwei Teilen, die an der Berührungsfläche (X—X) kovalent verknüpft sind. (b) Zwei orthogonale Ansichten eines Strukturmodells für Tyrosyl-tRNA-Synthetase bei 5.5 Å Auflösung [5]. Das Enzym ist dimer und hat das Molekulargewicht 90000. Die umstrichenen Bestandteile sind beweglich und haben keine exakt bestimmbare Position. Die beiden aktiven Zentren liegen bei A und B.

Auflösung vor^[5, 6] (Abb. 2). Für das zuletzt genannte Enzym ist zudem die Röntgenkleinwinkelstreuung gemessen worden^[7]. Als gemeinsames Ergebnis tritt eine im Vergleich zu anderen Enzymen wenig kompakte Struktur hervor. Das Monomer der Tyrosyl-tRNA-Synthetase (MW = 45000) hat einen Raumbedarf von $60 \times 60 \times 40 \text{ Å}^3$, das Dimer eine maximale Ausdehnung von 130 Å.

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zeigen wie andere Enzyme, die symmetrisch aus Untereinheiten aufgebaut sind, eine negative Kooperativität^[*] bei der Substratbindung und eine Halbzentren-Reaktivität^[**] [8–10]. Beim $\alpha_2\beta_2$ -Typus ergibt sich zudem das Problem, wie Substratbindungsstellen oder aktive Zentren und Untereinheiten einander zuzuordnen sind. Ergebnisse beim phenylalanin-spezifischen System aus *E. coli* sprechen dafür, daß für die Komplexbildung mit der Aminosäure und mit der tRNA nicht die gleichen Untereinheiten verantwortlich sind^[11]. Beim glycin-spezifischen System aus *Bacillus brevis* katalysiert die kleine Untereinheit (α) nur den aminosäureabhängigen ATP- $^{[32}\text{P}]$ Pyrophosphat-Austausch (siehe Abschnitt 4.2), während das vollständige Enzym ($\alpha_2\beta_2$) die Aminoacylierung der tRNA bewirkt^[12].

Mit Ausnahme des lysin-spezifischen Enzyms aus *E. coli* werden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen durch Substanzen, die mit Sulfhydrylgruppen reagieren [Quecksilber(II)- oder Disulfid-Verbindungen] reversibel, durch Alkylierungsmittel irreversibel inhibiert. Dabei tritt häufig eine Auffaltung des Proteins ein, die bei Enzymen mit Quartärstruktur vom Zerfall in die Untereinheiten begleitet ist^[13].

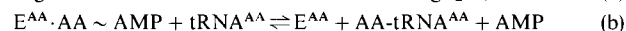
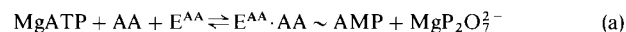
Histidin-spezifische Reagentien wie Diethyl-pyrocyanat und Rose Bengal (photochemische Oxidation) inhibieren die katalytische Funktion von Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli*^[14]. Eine längere Inkubation führt auch hier zu einer Dissoziation in die Untereinheiten.

Metallionen können die Proteinstruktur stabilisieren und die Enzyme aktivieren^[9, 15]. Für Phenylalanyl-tRNA-Synthetase liegt der wirksame Konzentrationsbereich für Mg^{2+} zwischen 10^{-4} und 10^{-2} M.

Die enzymatische Aktivität von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wird in Säugetiergeweben durch eine hormonell gesteuerte Phosphorylierung/Dephosphorylierung reguliert^[16].

2.3. Katalyse

Die von den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysierten Reaktionen bestehen aus der Aminosäureaktivierung [Gleichung (a)] und der Aminosäureübertragung [Gleichung (b)].



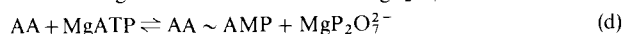
Hier bedeuten AA die Aminosäure, E^{AA} die spezifische Synthetase und tRNA^{AA} die codon-spezifische tRNA. Adenosin-5'-triphosphat ist nur in Verbindung mit Mg^{2+} , d. h. als MgATP,

[*] Negative Kooperativität wird bei Enzymen beobachtet, die aus mehreren, gleichartigen Proteinketten bestehen und mehrere, gleichartige Bindungsstellen für das gleiche Substrat besitzen. Die Affinität für die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes ist für jede Bindungsstelle gleich, solange das Enzym unbeladen ist. Bei zunehmender Beladung des Enzyms mit Substrat nimmt die Affinität der noch freien Bindungsstellen zum Substrat ab.

[**] Halbzentren-Reaktivität liegt vor, wenn bei einem (multivalenten) Enzym nur die Hälfte der aktiven Zentren katalytisch aktiv ist.

Substrat. Produkte der beiden Reaktionen sind Magnesiumpyrophosphat ($\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$), Adenosin-5'-monophosphat (AMP) und Aminoacyl-tRNA ($\text{AA-tRNA}^{\text{AA}}$).

Bei der Aminosäureaktivierung [Gleichung (a)] assoziieren in wahrscheinlich kinetisch geordneter, aber nicht obligatorischer Reihenfolge Aminosäure (AA) und MgATP mit dem aktiven Zentrum der Synthetase (E^{AA}). Der primären Anlagerung folgt eine möglicherweise mehrstufige Umlagerung, bei der die Carboxylatgruppe der Aminosäure unter Überwindung elektrostatischer Abstoßung dem Triphosphatrest des ATP angenähert und die Anhydridbindung $\text{P}_\alpha\text{—O—P}_\beta$ im ATP in Richtung auf die Abspaltung des Pyrophosphatrestes polarisiert wird, so daß sich schließlich ein Aminoacyladenylat ($\text{AA} \sim \text{AMP}$) bilden kann. Die dafür notwendige freie Enthalpie (7 bis 10 kcal/mol je nach Art der Synthetase) wird durch die Bildung von Nebenvalenz-Bindungen (elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoff-Brückenbindungen) zwischen dem Enzym und seinen Substraten aufgebracht, denn die Bildung des ternären Komplexes [Synthetase-Aminoacyladenylat- $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$] entsprechend Gleichung (c) ist gegenüber der Reaktion (d) um diesen Betrag an freier Energie bevorzugt^[17–19].



Das in freier Form hochgradig labile Aminoacyladenylat ($\text{AA} \sim \text{AMP}$) bleibt aufgrund seiner Tendenz zur Komplexbildung mit der Synthetase assoziiert (Bindungskonstante 10^9 Liter/mol), während $\text{MgP}_2\text{O}_7^{2-}$ abdissoziiert und in der Zelle enzymatisch zu Orthophosphat hydrolysiert wird. Dadurch verlagert sich das Gleichgewicht auf die Seite der Adenylatbildung.

Der Bildung des Aminoacyladenylats folgt die Übertragung des Aminosäurerestes auf die tRNA, und zwar, je nach Art der Synthetase, auf die 2'- oder 3'-Hydroxygruppe des 3'-terminalen Riboserestes der tRNA^[20]. Es ist ungeklärt, ob zwischen durch eine Aminoacyl-Synthetase-Verbindung entsteht^[21]. Der Übertragung folgt eine schnelle 2',3'-Isomerisierung (Halbwertszeit 0,3 s für Leucyl-tRNA)^[22]. Es ist offen, ob die Isomerisierung noch im Komplex mit der Synthetase oder erst nach der Abdissoziation der Aminoacyl-tRNA vom Enzym erfolgt. Die primäre Acylierungsstelle ließ sich durch Verwendung von Transfer-Ribonucleinsäuren mit terminaler 2'- oder 3'-Desoxyribose nachweisen.

Der letzte Schritt der Katalyse ist die Abdissoziation der Aminoacyl-tRNA vom Enzym. Die Dissoziationskonstanten für die tRNA (Substrat) und die Aminoacyl-tRNA (Produkt) sind von gleicher Größenordnung (10^{-7} bis 10^{-6} mol/Liter). Die Enzymkinetik zeigt Produktinhibition.

Mit welchen Geschwindigkeiten folgen die beschriebenen Elementarschritte aufeinander? Einen Überblick gibt Tabelle 1. Einer schnellen Komplexbildung zwischen Synthetase und Substrat folgt die langsamere Bildung des Aminoacyladenylat-Zwischenproduktes und dieser die erheblich langsamere Übertragung des Aminoacyl-Restes auf die tRNA. Dieser Schritt ist in den meisten Systemen unter den Bedingungen des Fließgleichgewichtes limitierend. Eine Ausnahme ist das phenylalaninspezifische System aus *E. coli*, bei dem die Limitierung durch eine zum Enzym-Produkt-Komplex führende Umlagerung verursacht wird^[23].

2.4. Das Problem der Produktinhibition

Bei einer enzymatischen Synthese entsteht das Problem der kompetitiven Hemmung^[*] durch das Produkt $\text{X} \rightarrow \text{Y}$, wenn dieses die wesentlichen Bestandteile der Substrate X und Y enthält und über die gleichen Reste wie die Substrate mit dem Enzym assoziiert (Abb. 3). Die Dissoziationskonstante

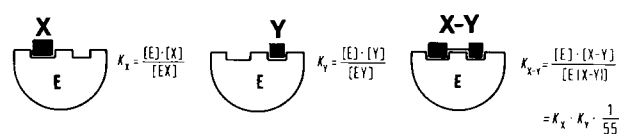


Abbildung 3. Berechnung der Dissoziationskonstante $K_{\text{X-Y}}$ eines Komplexes aus Enzym und Ligand $\text{X} \rightarrow \text{Y}$ aus den Dissoziationskonstanten K_{X} und K_{Y} für die Komplexe mit den Fragmenten X und Y. Das dargestellte Modell ist vereinfacht: Die Komplexe EX und EY werden durch dieselben Nebenvalenzen zusammengehalten wie der Komplex E(X-Y). Der Faktor 1/55 ergibt sich aus der Berücksichtigung des thermodynamischen Standardzustandes (1 M wäßrige Lösung) [43].

für den Komplex zwischen Enzym und Reaktionsprodukt ist dann

$$K_{\text{X-Y}} = (1/55) \cdot K_{\text{X}} \cdot K_{\text{Y}}$$

wobei K_{X} und K_{Y} die Dissoziationskonstanten für die Komplexe zwischen dem Enzym und den Substraten X und Y sind. Der Faktor 1/55 ergibt sich aus der Berücksichtigung des thermodynamischen Standardzustandes (1 M wäßrige Lösungen).

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen bilden mit den Substraten (Aminosäure und tRNA) feste Komplexe. Aufgrund der Beziehung für $K_{\text{X-Y}}$ sollten sie mit dem Produkt (Aminoacyl-tRNA) einen noch festeren Komplex bilden und daher schon bei

[*] Eine kompetitive Hemmung liegt vor, wenn der Inhibitor (im vorliegenden Fall das Produkt) mit dem Substrat um die Bindungsstelle des Enzyms konkurriert.

Tabelle 1. Geschwindigkeitskonstanten der Elementarschritte der Aminosäureaktivierung und -übertragung. Die Messungen wurden bei 25°C, pH=7 bis 8, der Ionenstärke 0,05 bis 0,2 mol/Liter und der Magnesium-Konzentration 0,001 bis 0,01 mol/Liter durchgeführt.

Richtung	AA	Komplexbildung der Synthetase mit MgATP	tRNA ^{AA} oder $\text{AA-tRNA}^{\text{AA}}$	Adenylatbildung [Gleichung (c)] [s ⁻¹]	Aminoacylübertragung [Gleichung (b)] [s ⁻¹]	Gesamtreaktion im Fließgleichgewicht [Gleichungen (a)+(b)] [s ⁻¹]
→	[Liter/(mol·s)] 10 ⁶	[Liter/(mol·s)] 10 ⁶	[Liter/(mol·s)] (1–3)·10 ⁸	20–350	2–28	2–6
←	[s ⁻¹] 15–25	[s ⁻¹] 400 [17]	[s ⁻¹] 5–120	20–1000	10 [23]	10 [23]

sehr geringen Produktkonzentrationen (10^{-10} bis 10^{-12} mol/Liter je nach Art der Synthetase) kompetitiv gehemmt sein. Tatsächlich hat jedoch die Aminoacyl-tRNA die gleiche Tendenz zur Komplexbildung mit dem Enzym wie die (unbelade-

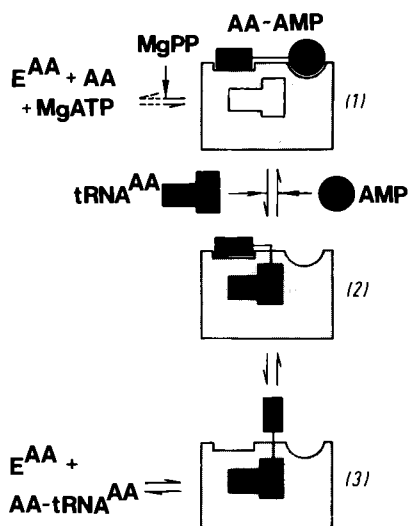


Abbildung 4. Reaktionsschema für die Übertragung des Aminoacylrestes von AMP auf tRNA und für die Abdissoziation der aminoacylierten tRNA. Das Enzym ist durch die Grautönung gekennzeichnet. Substrate und ihre Bestandteile sind schwarz (Aminosäure: Rechteck, AMP: Kreis, tRNA^{AA}: T-förmiges Symbol). Die Übertragung des Aminoacylrestes auf die tRNA findet im Schritt (1) → (2) statt. Der Komplex (2) ist instabil, weil das Aminosäure- und das tRNA-Fragment aus sterischen und/oder energetischen Gründen nicht zur selben Zeit mit der Synthetase komplexieren können. Er lagert sich unter Abdissoziation des Aminoacylrestes von der Aminosäure-Bindungsstelle zum Komplex (3) um.

ne) tRNA. Der Aminoacylrest liefert also keinen Beitrag zur Stabilität des Komplexes aus Enzym und Aminoacyl-tRNA. Offenbar sind das Aminosäure- und das tRNA-Fragment aus sterischen und/oder energetischen Gründen im Synthetase-Aminoacyl-tRNA-Komplex nicht in der Lage, gleichzeitig mit den Bindungsstellen für die Aminosäure und die tRNA dauerhaft zu assoziieren (Abb. 4). Bei der katalytischen Reaktion bildet sich im Zuge der Übertragung des Aminoacylrestes auf die tRNA der instabile Komplex (2) nur als Zwischenprodukt. Durch die anschließende Umlagerung (2) → (3) wird die Wechselwirkung zwischen der Synthetase und dem Aminoacylrest eliminiert. Interessant ist, daß diese Umlagerung für die Reaktion der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* geschwindigkeitsbestimmend ist^[23].

Die energetischen Verhältnisse bei der Eliminierung der Wechselwirkung zwischen Enzym und Aminoacylrest ergeben sich aus Abbildung 5, in der schematisch die freie Reaktionsenthalpie als Funktion der Reaktionskoordinate dargestellt ist. Der Synthetase-Aminosäure-MgATP-Komplex bildet sich, indem Energie verbraucht wird, um die spezielle Geometrie des Enzym-Substrat-Komplexes herzustellen. Diese Energie wird wieder verfügbar, wenn das Aminoacyladenylat synthetisiert wird, weil die elektrostatischen und/oder sterischen Verhältnisse neu geordnet werden. Sie wird aber nicht abgegeben, sondern dem Aminoacyladenylat einverleibt^[9, 17, 24].

Das Gruppenübertragungspotential^[*] des Aminoacyl-AMP beträgt 14 kcal/mol^[25], das der Aminoacyl-tRNA 7

[*] Das Gruppenübertragungspotential einer Verbindung A—B ist identisch mit dem Wert der freien Standardreaktionsenthalpie, die bei der hydrolytischen Spaltung zu AH und B—OH unter Standardbedingungen (pH = 7.0, 25°C, Ionenstärke 0.1 mol/Liter) gemessen wird.

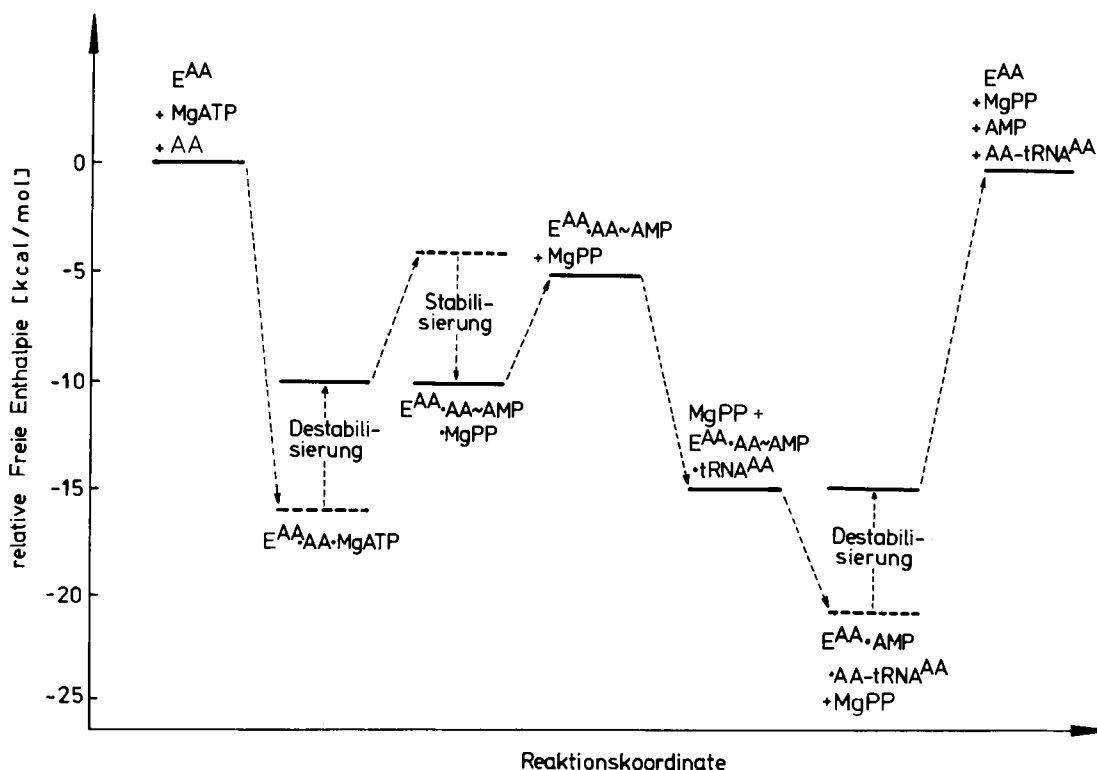


Abb. 5. Die freie Reaktionsenthalpie als Funktion der Reaktionskoordinate der tRNA-Aminoacylierung. Die Entstehung von Synthetase-Substrat-, Synthetase-Zwischenprodukt- und Synthetase-Produkt-Komplexen ist angezeigt. Aktivierter Übergangskomplexe wurden weggelassen. Gestrichelt gezeichnete Niveaus beziehen sich auf die hypothetischen Fälle, in denen die Nebenvalenzen zwischen Synthetase, Aminosäure und MgATP, oder Aminoacyl-tRNA nicht für die energieverbrauchende Orientierung der Liganden im Komplex mit dem Enzym aufkommen würden. Diese Werte wurden unter Zugrundelegung der Komplexe aus Synthetase und Substrat-Fragmenten berechnet. Die Zahlenwerte beziehen sich auf das phenylalanin-spezifische System aus *Escherichia coli* [9].

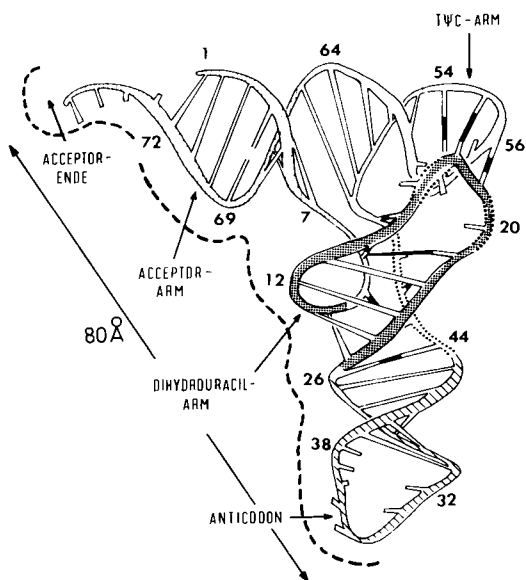


Abb. 8. Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur (Tertiärstruktur) der tRNA^{Phe} aus Hefe. Der Ribosephosphat-Strang ist als durchgehendes Band dargestellt. Die Wasserstoffbrücken werden durch Sprossen symbolisiert. Die Arme der tRNA sind durch unterschiedliche Schraffuren gekennzeichnet. Die durch punktierte Linien markierten Sequenzen haben je nach Art der tRNA verschiedene Längen. Die gestrichelte Linie gibt die Oberfläche des Moleküls im Kontakt mit der Aminoacyl-tRNA-Synthetase an. Die Abbildung entstammt einem Übersichtsartikel [50].

liegen an den Enden des „L“. 5. Die Dihydrouracil-Schleife und die TΨC-Schleife bilden die Ecke des „L“.

Die Tertiärstruktur wird durch Wechselwirkungen zwischen dem Dihydrouracil-Arm, dem TΨC-Arm und dem variablen Arm, also im Bereich der Ecke des „L“, verursacht. Zu den Wechselwirkungen zählen: 1. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Basen, zwischen Basen und Ribosereisten und zwischen Ribosereisten, 2. die elektrostatische Abstoßung zwischen Phosphatgruppen und 3. die Koordination mit Mg²⁺. Die elektrostatische Abstoßung destabilisiert die Tertiärstruktur. Elektrolyte erhöhen die Stabilität, indem sie einen Teil der negativen Ladungen neutralisieren^[34, 35]. Wahrscheinlich wird die Tertiärstruktur unter physiologischen Bedingungen bei der Bildung von Komplexen der tRNA mit ihren Reaktionspartnern (Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, ribosomaler Elongationsfaktor, Ribosom) moduliert.

Untersuchungen an anderen Transfer-Ribonucleinsäuren deuten an, daß die aufgezählten Eigenschaften auch dort zutreffen. Resultate für wäßrige Lösungen stimmen mit den Ergebnissen für die Kristallstruktur überein.

4. Die codon-spezifische Zuordnung von Aminosäuren und Transfer-Ribonucleinsäuren durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Bei der Aminoacylierung der tRNA muß jede Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus den zwanzig Aminosäurearten, die in der Zelle vorliegen, genau diejenige auswählen, die zu „ihrer“ tRNA paßt. Hohe Präzision ist hier vonnöten, denn die codon-spezifische Zuordnung von Aminosäure und tRNA wird im weiteren Verlauf der Eiweißsynthese nicht mehr „überprüft“. Ein bei der Aminosäureaktivierung unterlaufener Fehler hat also ein fehlerhaftes Proteinmolekül zur Folge.

Die korrekte Zuordnung von Aminosäure und tRNA wird während der Synthese der Aminoacyl-tRNA mehrfach geprüft und gesichert (siehe Abb. 9), nämlich bei der Bildung des

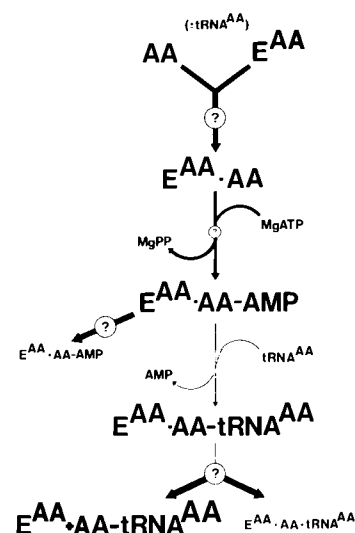


Abb. 9. Überprüfung der Entsprechung zwischen Anticodon und Aminosäure bei der tRNA-Aminoacylierung. Schritte, die eine Barriere für codon-unspezifische Aminosäuren darstellen, sind durch Fragezeichen und entsprechend ihrer Wichtigkeit durch die Breite der Pfeile gekennzeichnet. Die diskriminierenden Reaktionsschritte sind von oben nach unten: Bildung des Enzym-Aminosäure-Komplexes, Synthese des Aminoacyladenylates, Beständigkeit des Synthetase-Aminoacyladenylat-Komplexes (bei unspezifischen Aminosäuren dissoziiert ein erheblicher Teil der Komplex-Moleküle, bevor sie mit der tRNA weiterreagieren können), Korrektur-Hydrolyse der mißacylierten tRNA.

Enzym-Aminosäure-Komplexes, auf der Stufe des Enzym-Aminoacyladenylat-Komplexes und durch ein hydrolytisches „Korrekturlesen“ nach der Bildung des Enzym-Aminoacyl-tRNA-Komplexes.

4.1. Die Erkennung der Aminosäure

Die Bildung des Enzym-Aminosäure-Komplexes ist der Erkennungsschritt mit dem größten Gewicht. Den strukturellen Merkmalen einer Aminosäure entsprechend haben die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen Bindungsbereiche für die primäre Ammoniumgruppe, die Carboxylatgruppe und die Seitenkette^[19, 36]. Die Erkennung ist mit wenigen Ausnahmen^[37] stereospezifisch in bezug auf die Konfigurationen an C-2 und C-3.

Die Wechselwirkung des zwitterionischen Bereichs der Aminosäure mit der Synthetase ist elektrostatischer Natur^[19]. Die Komplexbildung mit der Seitenkette der Aminosäure beruht je nach Beschaffenheit der Seitenkette auf polaren oder hydrophoben Wechselwirkungen. Hydrophobe Mechanismen dienen insbesondere zur Erkennung aliphatischer Aminosäuren^[17, 38, 39]. Für das isoleucin-spezifische System konnte gezeigt werden, daß die Assoziationsentropie für die „richtige“ Aminosäure den höchsten Wert besitzt^[40].

Die Unterscheidung verwandter Aminosäuren wie L-Tyrosin und L-Phenylalanin oder L-Isoleucin und L-Valin beruht auf der Wechselwirkung zwischen den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und charakteristischen Bestandteilen der Seitenketten wie der OH-Gruppe beim L-Tyrosin und der zusätzlichen CH₃-Gruppe beim L-Isoleucin. Der Grad der Unterscheidung

ist außerordentlich hoch; L-Tyrosin wird 2000mal so fest wie L-Phenylalanin und L-Isoleucin 100mal so fest wie L-Valin gebunden. Das Zustandekommen derartiger Affinitätsunterschiede kann mit einfachen Modellen für die Bildung von Wasserstoffbrücken oder für Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Substanzen nicht erklärt werden^[17, 18]. Wahrscheinlich spielen wie im isoleucin-spezifischen System^[17] konformative Änderungen der Enzymstruktur und Änderungen der Hydratation eine Rolle (Abb. 10).

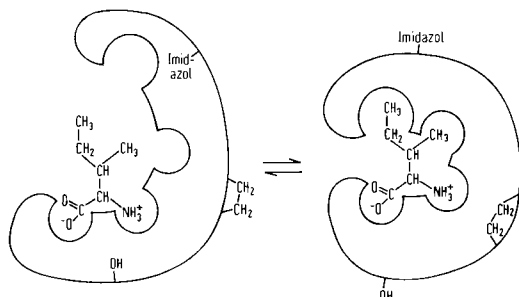


Abb. 10. Schematische Darstellung einer Strukturänderung, die bewirkt, daß sich die Tendenz zur Bildung des Enzym-Aminosäure-Komplexes vergrößert. Die Bindung des Substrats L-Isoleucin an die Synthetase ist mit einer Konformationsänderung des Enzyms gekoppelt. Diese bewirkt eine Veränderung der Hydratation des Synthetase, hier willkürlich dargestellt als Solvation eines Imidazol-Restes und einer Hydroxygruppe sowie als Übergang einer Ethylengruppe ins Innere der Enzymstruktur.

Bindungsstudien mit Substrat-Fragmenten ergaben, daß der Triphosphatrest des MgATP und der zwitterionische Bereich der Aminosäure im ternären Enzym-Substrat-Komplex aufeinander einwirken^[19, 24]. Dabei hat die elektrostatische Anziehung zwischen der α -Ammoniumgruppe und dem Triphosphatrest eine Stabilisierung und die elektrostatische Abstoßung zwischen Carboxylatgruppe und Triphosphatrest eine Destabilisierung des Komplexes zur Folge. Die Größen der gegensätzlichen Wechselwirkungen sind so, daß sich die Effekte eliminieren, und Aminosäure wie MgATP scheinbar unabhängig voneinander mit der Synthetase assoziieren^[19] [*].

4.2. Thermodynamische Kontrolle der Bildung des Enzym-Aminoacyladenylat-Komplexes

Tabelle 2 zeigt, daß die Dissoziationskonstante

$$K_{\text{Diss}} = \frac{[\text{E}^{\text{AA}}][\text{AA}]}{[\text{E}^{\text{AA}} \cdot \text{AA}]}$$

für den bei der Aminosäureaktivierung entstehenden Enzym-Substrat-Komplex beim Aminosäurepaar Isoleucin/Valin für die codon-spezifische Aminosäure (Isoleucin) um zwei Größenordnungen kleiner ist als für die unspezifische Aminosäure. Für andere Paare sind in Tabelle 2 die Michaelis-Menten-Konstanten des ATP-[³²P]Pyrophosphat-Austausches^[**] ver-

[*] Die elektrostatische Abstoßung zwischen dem Triphosphatrest und der Carboxylatgruppe einerseits und die Wechselwirkung des Triphosphatrestes mit der Bindungsstelle des MgATP andererseits bewirken den relativ hohen Energieinhalt des Synthetase-Aminosäure-MgATP-Komplexes (siehe Abb. 5). Durch die Reaktion zum Enzym-Aminoacyladenylat-Komplex wird die „innere Spannung“ des ternären Komplexes abgebaut.

[**] Durch den ATP-[³²P]Pyrophosphat-Austausch wird die Umkehrung der Aminosäureaktivierung [Gleichung (a)], d. h. die Reaktion des Synthetase-Aminoacyladenylat-Komplexes mit [³²P]Pyrophosphat gemessen. Das System befindet sich dabei im chemischen Gleichgewicht. Bei genügend hohen Pyrophosphat-Konzentrationen bestimmt die Neubildung von Aminoacyladenylat die Geschwindigkeit, mit der die [³²P]-Markierung auch im ATP auftritt. Der ATP-[³²P]Pyrophosphat-Austausch ist damit ein indirektes Maß für die Bildung des Synthetase-Aminoacyladenylat-Komplexes.

Tabelle 2. Dissoziations-, Michaelis-Menten- und relative Geschwindigkeitskonstanten für die Aminosäureaktivierung [Gleichung (a)] bei strukturell verwandten Aminosäure-Paaren.

Aminosäure	K_{Diss} [$\mu\text{mol/Liter}$]	ATP-[³² P]Pyrophosphat-Austausch	
		K_m [$\mu\text{mol/Liter}$]	k (relativ)
Ile (spezifisch)	4.5 [64]	4–6 [41, 42, 66]	1.0
<chem>CC(C)N</chem>	5.8 [17]	5 [67]	
Val	570 [64]	800 [67]	0.77 [67]
<chem>CC(C)N</chem>			
Tyr (spezifisch)	10 [65]	1.8 [65]	1.0
<chem>OC1=CC=C(C=C1)C(N)C(=O)O</chem>		25 [37]	
Phe		50000 [65]	0.4 [65]
<chem>c1ccccc1C(N)C(=O)O</chem>			
Val (spezifisch)	66 [66]	140 [39]	1.0
<chem>CC(C)N</chem>		30 [38]	
Thr		17000 [39]	0.38 [39]
<chem>CC(O)C(N)C(=O)O</chem>		7000 [38]	0.42 [38]

glichen, deren Werte unter den praktizierten Bedingungen^[41] gleich den Werten der Michaelis-Menten-Konstanten K_m^{AA} für die Aminosäureaktivierung und ungefähr gleich den Werten der Dissoziationskonstanten K_{Diss} sind. Man sieht, daß auch bei den Aminosäurepaaren Tyrosin/Phenylalanin und Valin/Threonin der Synthetase-Aminosäure-Komplex der codon-spezifischen Aminosäure thermodynamisch um mehrere Größenordnungen begünstigt ist.

Diese Situation kann durch die Konzentrationsverhältnisse, in der die Aminosäuren in der Zelle vorliegen, noch verbessert werden: Konkurriert die spezifische Aminosäure mit einer unspezifischen um die Synthetase, so gilt für die tatsächliche Dissoziationskonstante $K_{\text{Diss(app)}}^u$ des Komplexes mit der unspezifischen Aminosäure

$$K_{\text{Diss(app)}}^u = K_{\text{Diss}}^u \left\{ 1 + \frac{[\text{AA}]}{K_{\text{Diss}}^{\text{AA}}} \right\}$$

d. h. die unspezifische Aminosäure hat um so geringere Chancen, den „falschen“ Synthetase-Aminosäure-Komplex zu bilden, je größer die Konzentration [AA] der „richtigen“ Aminosäure ist.

Die Spezifität wird weiterhin dadurch verbessert, daß die „richtige“ Aminosäure im Verlaufe der katalytischen Aminoacylierung der tRNA die Synthetase in der Form des Aminoacyladenylates okkupiert und so die Chance für eine Assoziation zwischen dem Enzym und einer „falschen“ Aminosäure vermindert. Dennoch zustande gekommene Enzym-Aminoacyladenylat-Komplexe mit „falschen“ Aminosäuren werden durch Hydrolyse^[44] oder durch Veresterung mit der tRNA und anschließendes hydrolytisches „Korrekturlesen“ (siehe Abschnitt 4.4) beseitigt^[38].

4.3. Die Erkennung der Transfer-Ribonucleinsäure

Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der tRNA kommen durch die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäureseitenketten der Synthetase (Asn, Gln und Arg) und Purinbasen der tRNA zustande^[45]. Stapelwechselwirkungen zwischen Basen und aromatischen Aminosäure-Seitenketten sind weniger bedeutsam. Unklar ist, ob Mg^{2+} -Ionen eine Stabilisierung der Enzym-tRNA-Komplexe durch Einlagerung zwischen die Berührungsflächen zwischen Synthetase und tRNA bewirken^[46–48] oder ob Mg^{2+} selektiv diejenigen Tertiärstrukturen von Enzym und tRNA stabilisiert, die besonders feste Komplexe miteinander bilden^[9, 15, 49].

Im Enzym-tRNA-Komplex berühren sich Synthetase und Transfer-Ribonucleinsäure an den Innenseiten des „L“-förmigen tRNA-Moleküls (Abb. 8)^[50], wahrscheinlich entlang einer Einbuchtung der Proteinoberfläche. Der Bindungsbereich der tRNA wird durch Bestandteile des Acceptor-Stammes, des Dihydrouracil-Stammes sowie bei einigen Arten durch das Anticodon gebildet. Der T ψ C-Arm und der variable Arm haben keinen Kontakt mit der Synthetase. Im Bereich der Berührungsstellen befinden sich die meisten variablen Basen.

Dem Acceptor-Ende —CAA wird eine noch nicht in allen Einzelheiten verstandene Schlüsselrolle bei der Erkennung der tRNA durch die Synthetase zugeschrieben^[51]. Wahrscheinlich verändert dieser Bereich bei der Aminoacylierung seine Konformation^[52].

Die Bildung des Synthetase-tRNA-Komplexes ist bei einigen Systemen mit der Bildung der Enzym-Aminosäure- und/oder Enzym-MgATP-Komplexe gekoppelt. Die Koppelung zeigt je nach Art der Synthetase eine positive^[53] oder negative Kooperativität^[9, 10, 54]. Die Koppelung tritt bei Enzymen mit Dimer-Struktur in einigen Fällen erst bei Belegung der beiden aktiven Zentren mit den Substraten in Erscheinung.

Die Assoziation zum Synthetase-tRNA-Komplex verläuft zweistufig^[49, 55]. Zunächst bildet sich ein relativ unspezifischer Anlagerungs-Komplex, der unter Betätigung wahrscheinlich spezifischer Nebenvalenzen zum stabilen Enzym-Substrat-Komplex umlagert. Im glutamin- und phenylalanin-spezifischen System geht die Bildung des Enzym-tRNA-Komplexes mit einer Umlagerung des tRNA-Moleküls einher^[56].

Die Unterscheidung zwischen „richtiger“ und „falscher“ Transfer-Ribonucleinsäure beruht allerdings weniger auf den thermodynamischen Eigenschaften der Enzym-tRNA-Komplexe als vielmehr auf einer kinetischen Kontrolle^[57]: die „richtige“ tRNA wird 10^3 - bis 10^4 mal so schnell aminoacyliert wie die „falsche“ tRNA.

4.4. Die Hydrolyse mißacylierter tRNA

Ungeachtet der bisher beschriebenen „Kautelen“ wird die Transfer-Ribonucleinsäure gelegentlich mit einer falschen Aminosäure acyliert. Diese Mißacylierung ist um so häufiger, je ähnlicher die Aminosäuren sind.

Eine falsch beladene Aminoacyl-tRNA wird jedoch von der tRNA-spezifischen Synthetase hydrolysiert. Beispiele sind Val-tRNA^{Ile}^[38, 58, 59], Thr-tRNA^{Val}^[38, 60] und Ile-tRNA^{Phe}^[61]. Die Korrektur erfolgt nach der Bildung des Enzym-Aminoacyl-tRNA-Komplexes und verläuft schnell im Vergleich mit der Esterbildung zwischen der „richtigen“ Aminosäure und der tRNA^[59, 60]. Vermutlich wird ein soeben synthetisierter,

„falscher“ Ester noch vor der Dissoziation des Enzym-Aminoacyl-tRNA-Komplexes wieder gespalten.

Die Effizienz der hydrolytischen Korrektur ist um so größer, je häufiger eine Synthetase eine „falsche“ Aminosäure aktiviert. Auch die „richtig“ aminoacylierte tRNA wird hydrolysiert, allerdings viel langsamer als die mißacylierte tRNA. Wie die Aminoacyl-tRNA-Synthetase die Identität des Aminoacylrestes der Aminoacyl-tRNA erkennt, ist unbekannt. Es ist wahrscheinlich, daß die Aminosäure-Bindungsstelle der Synthetase dabei keine Rolle spielt. Mißaktivierte Aminosäuren haben immer eine kleinere Seitenkette als die „richtige“. Es ist möglich, daß die kleinere Seitenkette noch in eine hydrolytisch wirksame Stelle hinein paßt, während das bei der „richtigen“ Aminosäure nicht mehr möglich ist^[44].

Die enzymatische Hydrolyse der Aminoacyl-tRNA wird durch Mg^{2+} aktiviert. Ihre Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration stimmt nicht mit der Mg^{2+} -Abhängigkeit der Aminoacylierung überein^[62]. Sulfhydryl-Reagentien hemmen die Hydrolyse in einer Weise, die sich von der Hemmung der Aminoacylierung der tRNA unterscheidet^[62]. Wahrscheinlich besitzt die Synthetase für die Hydrolyse ein zweites aktives Zentrum. Die nicht veresterte Hydroxygruppe in 2'- oder 3'-Stellung des Adenosinrestes am Acceptorende der tRNA hat vermutlich bei der Hydrolyse eine katalytische Funktion^[59, 63].

5. Zusammenfassung und Schluß

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysieren die codon-spezifische Veresterung von Aminosäuren und Transfer-Ribonucleinsäuren. Die zusammengehörenden Reaktanden finden aufgrund normaler enzymatischer Mechanismen zueinander, nämlich durch die Festigkeit der Enzym-Substrat-Komplexe und durch eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit. Ungewöhnlich ist ein von der Synthetase katalysierter Korrekturschritt, in dem „falsch“ gebildete Ester hydrolysiert werden. Dieser Mechanismus tritt in Kraft, wenn bei strukturell ähnlichen Aminosäuren die gewöhnlichen Unterscheidungsmaßnahmen nicht ausreichen.

Die Spezifität wird weiterhin dadurch verbessert, daß die „richtige“ Aminosäure unter physiologischen Bedingungen die Synthetase in der Form des Aminoacyladenylates okkupiert und so die Chance für eine Assoziation zwischen Enzym und einer „falschen“ Aminosäure vermindert. Die intrazellulären Konzentrationsverhältnisse bewirken zudem eine Sättigung der Synthetasen mit den „richtigen“ Aminosäuren und tRNAs.

Die codon-spezifischen Aminosäuren und Transfer-Ribonucleinsäuren haben zu „ihren“ Enzymen eine hohe Affinität. Dies würde aber zu einer katalytisch unzweckmäßigen Sättigung der Synthetasen mit Aminoacyl-tRNA führen, wenn nicht für die leichte Abdissoziation des Produktes gesorgt würde. Die Triebkraft für die Lockerung des Komplexes wird am Anfang der enzymatischen Reaktion bereitgestellt, indem die Reaktanden energiereiche Positionen einnehmen. Bei der Übertragung des Aminoacylrestes auf die tRNA bewirkt der Energieüberschuß die Abtrennung des Aminoacylrestes vom aktiven Zentrum und erleichtert damit die Abdissoziation der Aminoacyl-tRNA.

Eingegangen am 22. November 1976,
in geänderter Fassung am 20. März 1978 [A 229]

- [1] R. B. Lofthield, D. Vanderjagd, *Biochem. J.* 128, 1353 (1972).
- [2] A. H. Mehler, K. Chakraborty, *Adv. Enzymol.* 35, 443 (1971); R. B. Lofthield, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 12, 87 (1972); L. L. Kisselev, O. O. Favorova, *Adv. Enzymol.* 40, 141 (1974); D. Söll, P. R. Schimmel in P. Boyer: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1974, Vol. 10, S. 489; F. Kalousek, W. Konigsberg in: *MTP International Review of Science. Biochemistry Series One*. Butterworths, University Park Press 1975, Vol. 7, S. 57.
- [3] A. K. Bandyopadhyay, M. P. Deutscher, *J. Mol. Biol.* 60, 113 (1971); K. Som, B. Hardesty, *Arch. Biochem. Biophys.* 166, 507 (1975); W. K. Roberts, W. H. Coleman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 206 (1971); A. Hampel, M. D. Enger, *J. Mol. Biol.* 79, 285 (1973).
- [4] M.-R. Kula, *FEBS Lett.* 35, 299 (1973); G. L. E. Koch, Y. Boulanger, B. S. Hartley, *Nature* 249, 316 (1974); R. M. Waterson, W. H. Konigsberg, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 376 (1974).
- [5] M. J. Irwin, J. Nyborg, B. R. Reid, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* 105, 577 (1976).
- [6] C. Zelwer, J. L. Risler, C. Monteilhet, *J. Mol. Biol.* 102, 93 (1976).
- [7] A. Gulik, C. Monteilhet, P. Dessen, G. Fayat, *Eur. J. Biochem.* 64, 295 (1976).
- [8] A. Pingoud, D. Boehme, D. Riesner, R. Kownatzki, G. Maass, *Eur. J. Biochem.* 56, 617 (1975).
- [9] P. Bartmann, T. Hanke, E. Holler, *Biochemistry* 14, 4777 (1975).
- [10] M. Lazdunski, *Prog. Bioorg.* 3, 81 (1974); S. Blanquet, P. Dessen, M. Iwatsubo, *J. Mol. Biol.* 103, 765 (1976); J.-M. Berther, P. Mayer, H. Dutler, *Eur. J. Biochem.* 47, 151 (1974); F. Fasiolo, P. Remy, J. Pouyet, J.-P. Ebel, *ibid.* 50, 227 (1974); H. R. Bosshard, G. L. E. Koch, B. S. Hartley, *ibid.* 53, 493 (1975); R. Jakes, A. R. Fersht, *Biochemistry* 14, 3344 (1975).
- [11] H. Hennecke, A. Böck, *Eur. J. Biochem.* 55, 431 (1975); P. Bartmann, T. Hanke, B. Hammer-Raber, E. Holler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 743 (1974).
- [12] A. P. Surguchov, I. G. Surguchova, *Eur. J. Biochem.* 54, 175 (1975).
- [13] D. L. Ostrem, P. Berg, *Biochemistry* 13, 1338 (1974); F. Iborra, G. Mourgeon, B. Labouesse, J. Labouesse, *Eur. J. Biochem.* 39, 547 (1973); T. Hanke, P. Bartmann, E. Holler, *ibid.* 56, 605 (1975).
- [14] H. Hennecke, A. Böck, *Eur. J. Biochem.* 50, 157 (1974).
- [15] J. E. Craine, A. Peterkofsky, *J. Biol. Chem.* 251, 241 (1976); F. von der Haar, *Eur. J. Biochem.* 64, 395 (1976); E. Holler, *Biochemistry* 12, 1142 (1973).
- [16] B. H. Berg, *Biochim. Biophys. Acta* 479, 152 (1977).
- [17] E. Holler, M. Calvin, *Biochemistry* 11, 3741 (1972); E. Holler, P. Rainey, A. Orme, E. L. Bennett, M. Calvin, *Biochemistry* 12, 1150 (1973).
- [18] W. P. Jencks, *Adv. Enzymol.* 43, 219 (1975).
- [19] S. Blanquet, G. Fayat, J.-P. Wälder, *J. Mol. Biol.* 94, 1 (1975); E. Holler, B. Hammer-Raber, T. Hanke, P. Bartmann, *Biochemistry* 14, 2496 (1975); F. Hyafil, Y. Jaques, G. Fayat, M. Fromant, P. Dessen, S. Blanquet, *ibid.* 15, 3678 (1976); F. Hyafil, S. Blanquet, *Eur. J. Biochem.* 74, 481 (1977).
- [20] M. Sprinzl, F. Cramer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 3049 (1975); T. H. Fraser, A. Rich, *ibid.* 72, 3044 (1975); A. C. Chinault, K. H. Tan, S. M. Hassur, S. M. Hecht, *Biochemistry* 16, 766 (1977).
- [21] P. Remy, J. P. Ebel, *FEBS Lett.* 61, 28 (1976); R. Thiebe, *FEBS Lett.* 60, 342 (1975).
- [22] R. Wolfenden, D. H. Rammler, F. Lipmann, *Biochemistry* 3, 329 (1964).
- [23] E. Holler, *J. Biol. Chem.* 251, 7717 (1976).
- [24] F. Hyafil, S. Blanquet, *Eur. J. Biochem.* 74, 481 (1977).
- [25] H. R. Mahler, E. H. Cordes in: *Biological Chemistry*. Harper and Row, New York 1969, S. 201; E. R. Stadtman in P. Boyer: *The Enzymes*. Academic Press, New York 1973, Vol. 8, S. 1.
- [26] P. Berg, F. H. Bergmann, E. J. Ofengand, M. Dieckmann, *J. Biol. Chem.* 236, 1726 (1961).
- [27] T. S. Stewart, R. J. Roberts, J. L. Strominger, *Nature* 230, 36 (1971).
- [28] R. L. Soffer, *Adv. Enzymol.* 40, 91 (1974).
- [29] U. Z. Littauer, H. Inouye, *Annu. Rev. Biochem.* 42, 439 (1973); J. E. Brenchley, L. S. Williams, *Annu. Rev. Microbiol.* 29, 251 (1975).
- [30] J. E. Dahlberg, R. C. Sawyer, J. M. Taylor, A. J. Faras, W. E. Levinson, H. M. Goodman, J. M. Bishop, *J. Virol.* 13, 1126 (1974); A. J. Faras, J. E. Dahlberg, R. C. Sawyer, F. Harada, J. M. Taylor, W. E. Levinson, J. M. Bishop, H. M. Goodman, *ibid.* 13, 1134 (1974).
- [31] P. Yot, M. Pinck, A. Haenni, H. Duranton, F. Chapeville, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 1345 (1970).
- [32] A. Rich, U. L. Rajbhandary, *Annu. Rev. Biochem.* 45, 805 (1976).
- [33] S.-H. Kim, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 17, 181 (1976).
- [34] C. Urbanke, R. Römer, G. Maass, *Eur. J. Biochem.* 55, 439 (1975).
- [35] R. Römer, R. Hack, *Eur. J. Biochem.* 55, 271 (1975); J. M. Wolfson, D. R. Kearns, *Biochemistry* 14, 1436 (1975); S. M. Coutts, D. Riesner, R. Römer, C. R. Rabl, G. Maass, *Biophys. Chem.* 3, 275 (1975); A. Stein, D. M. Crothers, *Biochemistry* 15, 157 (1976).
- [36] J. Flossdorf, H.-J. Prätorius, M.-R. Kula, *Eur. J. Biochem.* 66, 147 (1976).
- [37] R. Calender, P. Berg, *Biochemistry* 5, 1690 (1966); S. L. Owens, F. E. Bell, *J. Mol. Biol.* 38, 145 (1968).
- [38] A. R. Fersht, M. M. Kaethner, *Biochemistry* 15, 3342 (1976); A. R. Fersht, *ibid.* 16, 1025 (1977).
- [39] S. L. Owens, F. E. Bell, *J. Biol. Chem.* 245, 5515 (1970).
- [40] H.-J. Hinz, K. Weber, J. Flossdorf, M.-R. Kula, *Eur. J. Biochem.* 71, 437 (1976).
- [41] F. X. Cole, P. R. Schimmel, *Biochemistry* 9, 480 (1970).
- [42] A. R. Fersht, M. M. Kaethner, *Biochemistry* 15, 818 (1976).
- [43] W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* 14, 1 (1959).
- [44] A. R. Fersht, *Biochemistry* 16, 1025 (1977); R. S. Mulvey, A. R. Fersht, *ibid.* 16, 4731 (1977).
- [45] N. C. Seeman, J. M. Rosenberg, A. Rich, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 804 (1976).
- [46] J. Bonnet, J.-P. Ebel, *Eur. J. Biochem.* 58, 193 (1975).
- [47] H. G. Bluestein, C. C. Allende, J. E. Allende, G. L. Cantoni, *J. Biol. Chem.* 243, 4693 (1968).
- [48] S. Blanquet, M. Iwatsubo, J.-P. Wälder, *Eur. J. Biochem.* 36, 213 (1973).
- [49] G. Krauss, D. Riesner, G. Maass, *Eur. J. Biochem.* 68, 81 (1976).
- [50] A. Rich, *Biochimie* 56, 1441 (1974); H. J. P. Shoemaker, P. R. Schimmel, *J. Biol. Chem.* 251, 6823 (1976).
- [51] F. von der Haar, E. Gaertner, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 1378 (1975).
- [52] L. S. Kan, P. O. P. Ts'o, M. Sprinzl, F. von der Haar, F. Cramer, *Biophys. J.* 16, 11a (1976); G. J. Thomas, Jr., M. C. Chem, R. C. Lord, P. S. Kotsiopoulos, T. R. Tritton, S. C. Mohr, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 570 (1973); M. Caron, N. Brisson, H. Dugas, *J. Biol. Chem.* 251, 1529 (1976).
- [53] S. K. Mitra, K. Chakraborty, A. H. Mehler, *J. Mol. Biol.* 49, 139 (1970).
- [54] H. Hustedt, J. Flossdorf, M.-R. Kula, *Eur. J. Biochem.* 74, 199 (1977).
- [55] D. Riesner, A. Pingoud, D. Boehme, F. Peters, G. Maass, *Eur. J. Biochem.* 68, 71 (1976).
- [56] G. E. Willick, C. M. Kay, *Biochemistry* 15, 4347 (1976); A. Favre, E. Holler, noch unveröffentlicht.
- [57] J.-P. Ebel, R. Giegé, J. Bonnet, D. Kern, N. Befort, C. Bollack, F. Fasiolo, J. Gangloff, G. Dirheimer, *Biochimie* 55, 547 (1973).
- [58] A. N. Baldwin, P. Berg, *J. Biol. Chem.* 241, 839 (1966).
- [59] E. W. Eldred, P. R. Schimmel, *J. Biol. Chem.* 247, 2961 (1972).
- [60] G. L. Igloi, F. von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* 16, 1696 (1977).
- [61] M. Yarus, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 1915 (1972).
- [62] A. A. Schreier, P. R. Schimmel, *Biochemistry* 11, 1582 (1972).
- [63] F. von der Haar, F. Cramer, *FEBS Lett.* 56, 215 (1975); *Biochemistry* 15, 4131 (1976).
- [64] J. Flossdorf, M.-R. Kula, *Eur. J. Biochem.* 36, 534 (1973).
- [65] A. R. Fersht, R. S. Mulvey, G. L. Koch, *Biochemistry* 14, 13 (1975).
- [66] C. Hélène, F. Brun, M. Yaniv, *J. Mol. Biol.* 58, 349 (1971).
- [67] R. B. Lofthield, E. A. Eigner, *Biochem. Biophys. Acta* 130, 426 (1966).