

Isoleucyl-tRNA-Synthetase: Ein Enzym mit mehreren Katalysewegen, variabel in Spezifität und Energieverbrauch

Von Wolfgang Freist*

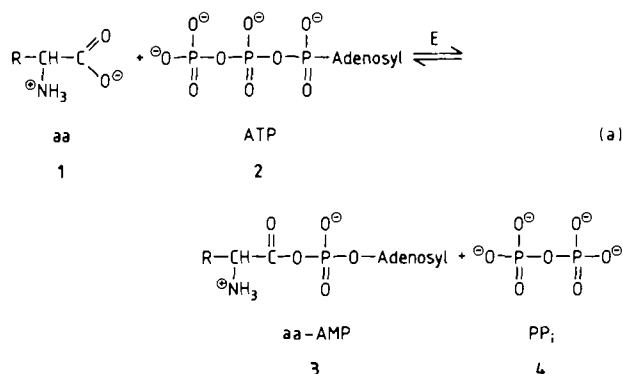
Die Übersetzung des genetischen Codes in Proteinstrukturen ist Voraussetzung für die Lebensvorgänge in den Zellen. Die außerordentlich große Genauigkeit, mit der diese Aufgabe erfüllt werden muß, stellt besondere Anforderungen an die Spezifität aller daran beteiligten Enzyme; deshalb fanden deren Struktur und Funktionsweise in den letzten zwanzig Jahren das besondere Interesse von Molekularbiologen und Biochemikern. Die Unterscheidung der im Cytosol vorhandenen Aminosäuren und deren Veresterung mit einer bestimmten tRNA ist Aufgabe der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Eine der schwierigsten Aufgaben haben die für Isoleucin spezifischen Enzyme zu bewältigen, denn sie müssen diese Aminosäure von so ähnlichen Verbindungen wie Valin unterscheiden. Sie arbeiten dabei mit besonderen Korrektur-Mechanismen, die sie vor anderen wichtigen Enzymen des Stoffwechsels auszeichnen. Am genauesten sind bisher die Katalysemechanismen von Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe und aus *Escherichia coli* untersucht worden. Beide Enzyme bestehen aus Einzelketten mit Molekulargewichten um 110 000, Sequenzhomologien zu anderen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen scheinen nur in engen Bereichen, z. B. der ATP-Bindungsstelle, vorzukommen. Die Enzyme identifizieren die Aminosäuren wahrscheinlich in einem Vierstufenprozeß; in den beiden ersten Schritten sind vorwiegend die unterschiedlichen hydrophoben Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten bei der anfänglichen Bindung an das Enzym entscheidend, darauf folgen zwei hydrolytische Korrekturschritte, die hauptsächlich von der sterischen Erkennung beherrscht zu sein scheinen. Das besondere Merkmal dieser Enzyme ist es, daß schon geringe Variationen der Reaktionsbedingungen über Konformationsänderungen der Proteine den katalytischen Zyklus verändern können. Die Spezifität der Enzyme läßt sich somit nahezu beliebig einstellen. Allgemein ist hohe Spezifität mit hohen Energiekosten verbunden, die sich in hohem ATP-Verbrauch äußern. Unter physiologischen Bedingungen scheint eine mittlere Spezifität, verbunden mit mittlerem Energieverbrauch, bevorzugt zu werden.

1. Einleitung

Seitdem Mitte der fünfziger Jahre die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen als wichtige Enzyme der Proteinbiosynthese entdeckt wurden^[1-7], sind bis jetzt weit über hundert dieser Proteine isoliert und charakterisiert worden^[8-12]. Die Quartärstrukturen und Molekulargewichte der gereinigten Enzyme sind sehr unterschiedlich. Die meisten bestehen aus Einzelketten (α) oder sind Dimere aus zwei gleichen Untereinheiten (α_2). Die Molekulargewichte der ersteren liegen im Bereich von 40 000–140 000, die der zweiten im Bereich von 65 000–240 000. Weniger häufig sind Quartärstrukturen von Typ $\alpha_2\beta_2$ ($M_r = 85\,000$ – $287\,000$), selten die Typen $\alpha\beta$ ($M_r = 102\,000$ – $130\,000$) und α_4 ($M_r = 116\,000$ – $380\,000$)^[8-12]. Allgemein enthalten diese Enzyme ein aktives Zentrum pro Untereinheit und beim $\alpha_2\beta_2$ -Typ pro $\alpha\beta$ -Teil^[9-11, 13-21].

Für die Reaktion, die von den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (E) katalysiert wird, nimmt man heute allgemein einen zweistufigen Verlauf an, der aus einem Aktivierungsschritt und einem Transferschritt besteht^[9, 10]. Im *Aktivierungsschritt* (a) wird aus der Aminosäure 1 und Adenosintriphosphat 2 ein Aminoacyladenylat 3 (und Pyrophosphat 4)

gebildet, das am Enzym gebunden und dadurch gegen Hydrolyse geschützt bleibt.

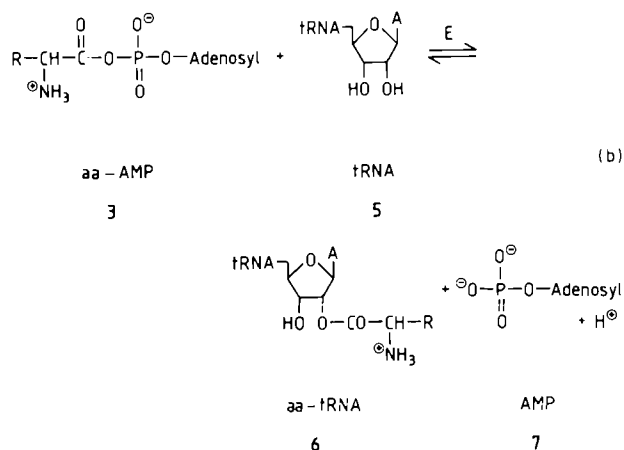


Die aktivierte Aminosäure 3 wird im *Transferschritt* (b) auf eine der beiden Hydroxygruppen der endständigen Ribose der Transfer-RNA 5 übertragen. Dabei entstehen Aminoacyl-tRNA 6 und Adenosinmonophosphat 7.

Dieser zweistufige Mechanismus wurde jedoch von mehreren Autoren zumindest für einige der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen in Frage gestellt^[8, 22-25]. Beim postulierten einstufigen Mechanismus tritt kein Aminoacyladenylat 3 als Zwischenprodukt auf.

[*] Dr. W. Freist

Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie
Hermann-Rein-Strasse 3, D-3400 Göttingen



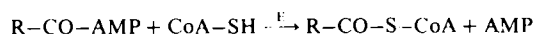
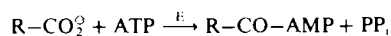
2. Struktur und Reaktionsmechanismus

Die Isoleucyl-tRNA-Synthetasen aus Hefe und aus *E. coli* gehören zu dem Typ von Enzymen, die nur aus einer Peptidkette aufgebaut sind (Typ α). Das Molekulargewicht der Synthetase aus *E. coli* B wurde zu $M_r = 112\,000$ ^[26], der aus *E. coli* MRE600 zu $M_r = 102\,000$ ^[27] und das der aus Hefe isolierten zu $M_r = 115\,000$ bestimmt^[28, 29].

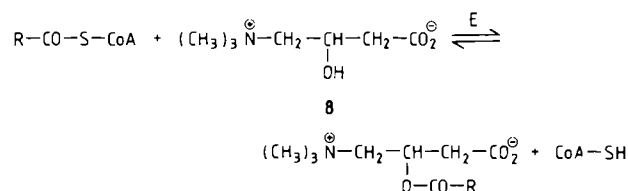
Für die Isoleucyl-tRNA-Synthetasen ist bisher nur eine Primärstruktur publiziert worden^[30]. Sie wurde durch DNA-Sequenzierung des Isoleucyl-tRNA-Synthetase-Gens aus *E. coli* K 12 und durch teilweise Peptid-Sequenzierung des Enzyms aus *E. coli* MRE600 bestimmt. Das Enzym besteht aus 939 Aminosäuren; das berechnete Molekulargewicht beträgt $M_r = 105\,087$. Nur ein sehr kleiner Bereich von elf Aminosäuren zeigt direkte Sequenzhomologien mit drei^[31–33] der bisher bekannten sieben^[31–37] Primärstrukturen von weiteren Aminoacyl-tRNA-Synthetasen^[*].

Untersuchungen zur Stöchiometrie der Adenylatbildung ergaben, daß Isoleucyl-tRNA-Synthetase mit Isoleucyladenylat 3, R = *sec*-Butyl, einen 1 : 1-Komplex bildet, was auf ein aktives Zentrum pro Peptidkette hindeutet^[14]. Die Wechselzahl (turnover number) für die Aminoacylierung von tRNA¹⁶ liegt für die Enzyme aus *E. coli* oder Hefe unter optimierten Bedingungen bei $k_{\text{cat}} = 1 \text{ s}^{-1}$ ^[14, 38]. Damit gehören die Isoleucyl-tRNA-Synthetasen sowohl innerhalb der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ($k_{\text{cat}} = 1\text{--}25 \text{ s}^{-1}$)^[8, 39–42] als auch im Vergleich mit anderen wichtigen Enzymen des Stoffwechsels zu den „langsamen“ Enzymen (vgl. ^[43–46]).

Eine formale Ähnlichkeit zur (zweistufigen) Aminoacylierung von tRNA findet man bei der Aktivierung von Fettsäuren; die Acyl-CoA-Synthetasen bilden als Zwischenprodukt ebenfalls ein enzymgebundenes Acyladenylat, von dem dann der Acylrest auf die Thiolgruppe des Coenzym A gebracht wird.



Vom Schwefel kann der Acylrest auch leicht auf ein Sauerstoffatom übertragen werden, z. B. durch Carnitin-Acyltransferase auf Carnitin 8^[47, 48].



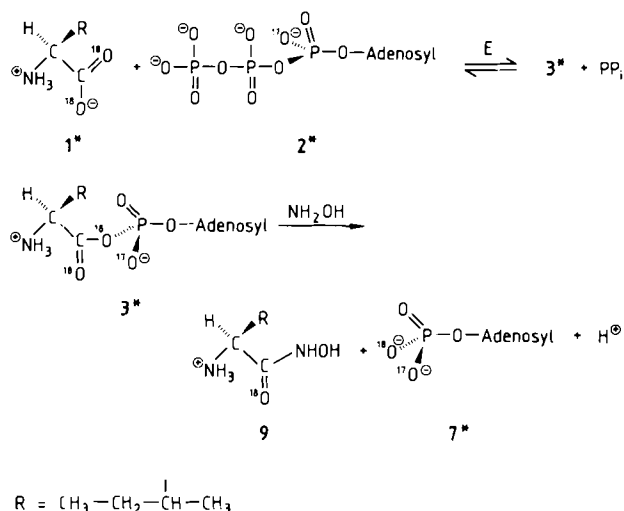
Auch die Gramicidin-S-Synthetasen und verwandte Enzyme, die Peptid-Antibiotica synthetisieren, bilden Aminoacyladenylate vom Typ 3. Die Aminosäuren in 3 müssen dabei zunächst in Thioester umgewandelt werden, bevor Peptidbindungen hergestellt werden können^[49–51]. Es lag daher nahe, bei den Reaktionen der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ebenfalls einen Aminosäurethioester als Zwischenprodukt zu vermuten, doch ist dessen eindeutiger Nachweis bis heute noch nicht gelungen.

Mit SH-gruppenspezifischen Reagentien konnten bei der Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* von den sechzehn Cysteinylresten bis zu elf umgesetzt werden^[52], davon einer „besonders schnell“^[52–54]. Nach Blockierung dieser einen, „schnell“ reagierenden SH-Gruppe war das Enzym nur noch in der Lage, die Aktivierungsreaktion (a) zu katalysieren, nicht jedoch die komplette Aminoacylierung^[52, 54]. Dieser Befund könnte ein Hinweis darauf sein, daß tatsächlich die Aminosäure aus dem Aminoacyladenylat 3 über einen Thioester auf die tRNA übertragen wird. Andere Autoren fanden dagegen nach Blockierung einer SH-Gruppe noch eine geringe Restaktivität und zogen den Schluß, daß die „schnell“ reagierende SH-Gruppe für die Katalyse nicht essentiell sei^[55]. Nach Aufklärung der Primärstruktur des Enzyms konnte dem „schnell“ reagierenden Cysteinylrest die Position 431 zugeordnet werden^[30]. Diese liegt 364 Aminoacylreste von dem elf Aminosäuren umfassenden Bereich (Positionen 57–67) entfernt, in dem direkte Sequenzhomologien mit anderen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen vorhanden sind und in dem die ATP-Bindungsstelle liegen dürfte^[30]. Beide Bereiche gehören zum N-terminalen Teil des Enzyms, so daß wenigstens vermutet werden kann, daß die Katalyse in diesem Teil des Enzyms stattfindet^[30].

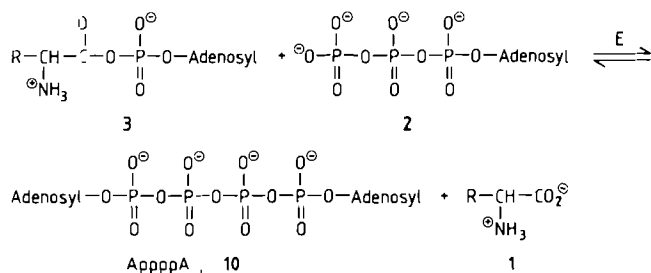
Während die Frage nach einem Thioester als Zwischenprodukt im Transferschritt (b) noch nicht endgültig geklärt ist, scheint die Aktivierungsreaktion (a) nach stereochemischen Untersuchungen nicht über ein Zwischenprodukt zu verlaufen^[56]. Bei Verwendung von [¹⁸O]Isoleucin 1* und Adenosin-5'-[(R)- α -¹⁷O]triphosphat 2* und Spaltung des daraus gebildeten Isoleucyladenylats 3* mit Hydroxylamin wurde eine Inversion der Konfiguration am markierten Phosphoratom von AMP (7*) festgestellt.

Dies deutet auf eine direkte Reaktion am α -Phosphoratom von ATP hin und schließt den Weg über ein Zwischenprodukt, etwa ein Adenylenzym, aus, doch kann der unwahrscheinliche Reaktionsweg über zwei Zwischenprodukte nicht ausgeschlossen werden.

[*] Nach Fertigstellung dieser Übersicht wurden weitere Primärstrukturen von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aufgeklärt, u. a. auch die von Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe. Dieses Enzym besteht aus 1073 Aminosäuren ($M_r = 123\,040$) und zeigt 27% Sequenzhomologie mit dem Enzym aus *E. coli*, insbesondere in den mutmaßlichen Bereichen der ATP- und tRNA-Bindungsstellen (U. Englisch, S. Englisch, P. Markmeyer, J. Schischkoff, H. Sternbach, H. Kratzin, F. Cramer, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 368 (1987) 971).



Das Aminoacyladenylat **3** ist als gemischtes Säureanhydrid eine Verbindung, in der nicht nur der Aminoacyl-, sondern auch der Adenylrest in aktivierter Form vorliegt. So wurden bei den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen auch Reaktionen beobachtet, bei denen der AMP-Rest auf verschiedene Phosphatreste übertragen wird^[57-65]. Der einfachste Fall einer solchen Umsetzung ist die Rückreaktion der Aminoacyladenylatbildung [Reaktion (a)], die leicht durch den Einbau von ³²P-markiertem Pyrophosphat in ATP verfolgt werden kann. Wichtig ist auch die Umsetzung des Adenylats **3** mit einem ATP-Molekül, die bei einigen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zur Bildung von Diadenosin-5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphat (AppppA) **10** als zweitem Produkt der Aminoacylierungsreaktion führt^[57, 58, 60-65].



Dieser Substanz werden wichtige regulatorische Funktionen bei der Initiation der DNA-Replikation, Zellproliferation und tRNA-Synthese zugeschrieben^[66-68]. Während jedoch die Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* die Entstehung von AppppA katalysiert^[60, 61], läßt sich die Bildung dieses Produktes bei dem aus Hefe isolierten Enzym nicht nachweisen; das Nebenprodukt Adenosin-5'-diphosphat (ppA)^{69]} dürfte allerdings durch Spaltung von zuvor synthetisiertem AppppA entstanden sein^[69].

Für beide Enzyme vorläufig noch völlig offen ist die Möglichkeit einer Phosphorylierung durch eine Kinase, die die Aktivität der Enzyme beeinflußt. Eine solche Kinase wurde bisher nur bei einer Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Kaninchen-Reticulocyten beobachtet^[70].

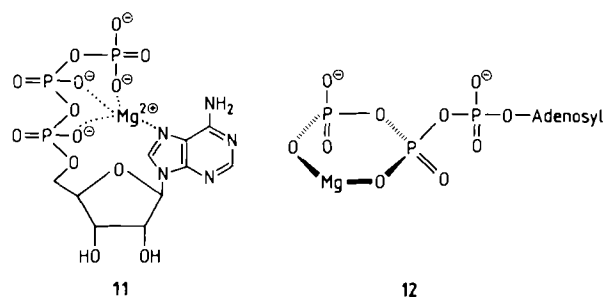
3. Substratspezifität

3.1. ATP-Analoga

Da alle Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ATP umsetzen, sind Analoga dieses gemeinsamen Substrates besonders dazu geeignet, Unterschiede oder Gemeinsamkeiten in der Substratspezifität der einzelnen Enzyme zu untersuchen. Durch systematische Veränderung des ATP-Moleküls ließen sich die Topographien der ATP-Bindungsstellen ausloten und die Enzyme in Gruppen ähnlicher Spezifität zusammenfassen. Für Isoleucyl-tRNA-Synthetase konnten dabei erste Hinweise darauf gefunden werden, mit welchen anderen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen dieses Enzym phylogenetisch am ehesten verwandt sein könnte.

Eine gewisse Schwierigkeit ergab sich daraus, daß das eigentliche Substrat der Synthetasen kein freies ATP, sondern ein Komplex aus ATP und einem Mg²⁺-Ion ist^[8-11], dessen genaue Struktur noch nicht aufgeklärt werden konnte. Ausgehend von der Struktur des Natriumsalzes^[71] und von NMR-Befunden^[72-74] wurde das Strukturmodell **11** entwickelt. In **11** ist das zweiwertige Metall-Ion mit N-7 des Purinrings und je einem Sauerstoffatom der β - und γ - oder aller drei Phosphateinheiten koordiniert^[75].

In einem anderen Modell, das von den Substrateigenschaften eines Tetraammincobalt(III)-ATP-Komplexes gegenüber Hexokinase ausgeht, wird der Mg²⁺-ATP-Komplex als zweizähliger β, γ -Komplex **12** dargestellt^[76]. Die Möglichkeit einer Koordination des Metall-Ions zum N-7 wird dabei nicht diskutiert^[76].



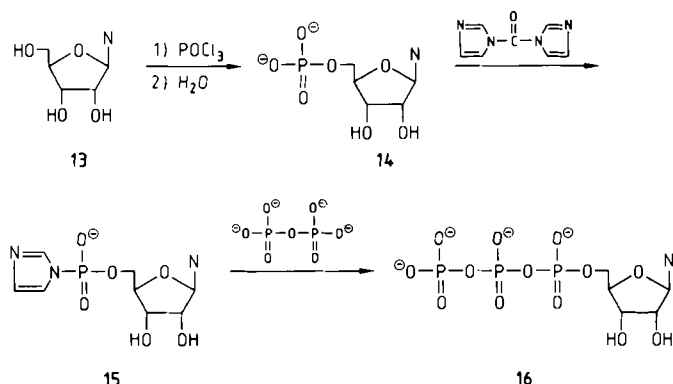
Die Versuchsergebnisse, die mit den ATP-Analoga erzielt wurden, deuten darauf hin, daß die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen verschieden strukturierte ATP-Mg²⁺-Komplexe als Substrat benutzen, die diesen beiden Modellen entsprechen könnten.

Zur Synthese von ATP-Analoga kann man heute einerseits auf die zahlreichen in den letzten dreißig Jahren synthetisierten Nucleosid-Derivate zurückgreifen^[77, 78], andererseits auch auf einige aus Mikroorganismen isolierte Nucleosid-Antibiotica^[79]. In den meisten Fällen können die ATP-Analoga aus den Nucleosid-Analoga **13** mit einfachen Methoden hergestellt werden, z. B. Phosphorylierung mit POCl₃ zum Monophosphat **14** und Umsetzung des Monophosphatimidazolid **15** mit Pyrophosphat zum Triphosphat **16**^[80-83].

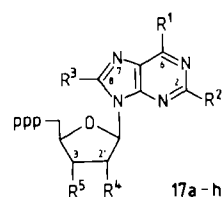
Von insgesamt 35 ATP-Analoga vom Typ **16**, die in der Aminoacylierungsreaktion auf Substrat- oder Inhibitoreigenschaften getestet wurden^[84-87], wurde eine charakteristische Auswahl von acht Substanzen (**17a-h**) zum Vergleich verschiedener Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus

Tabelle 1. Substratspezifität von zwanzig Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus *E. coli* und von dreizehn Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus Hefe gegenüber den ATP-Analoga 17a–h (α , bezeichnet den Quartärstrukturtyp). sss bedeutet mehr als 50%, ss 10–50%, s weniger als 10% der Substrataktivität von ATP. iii bedeutet Aktivität als Inhibitor mit einer Verringerung der Substrataktivität von ATP um mehr als 50%, ii um mehr als 20% und i um mehr als 10%, wenn Inhibitor und ATP in gleicher Menge anwesend sind. – bedeutet, daß die Substanz weder Substrat noch Inhibitor ist.

Gruppe		I							II					III			IV		V		VI	
ATP-Analogon		Asp	Asn	Lys	Thr	Ser	Gly	Phe	Ile	Leu	Val	Met	Tyr	Cys	Glu	Gln	Ala	Pro	Arg	Trp	His	
<i>Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus E. coli:</i>																						
		α_1		α_1	α_2	α_2	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	α	α	α	α_2	α_2		α ($\alpha\beta$)	α		α_4	α_2	α	α_2	α_2
m ⁶ ATP	17a	—		ss		—	—	—	s	—	—	—	—	—	i	ii	—	—	—	ii	—	
cl ² ATP	17b	sss	sss	sss	sss	sss	sss	sss	sss	s	sss	s	ss	—	ii	ii	—	—	—	s	ss	
br ⁸ ATP	17c	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	i	ii	—	—	ii	ii	—	
TuTP	17d	—	—	—	—	—	—	—	sss	ss	s	sss	sss	sss	sss	sss	—	—	sss	ii	—	
dATP	17e	ss	ss	ss	ss	sss	sss	ss	—	—	i	—	—	—	ii	ii	—	—	ss	s	—	
d ^{3'} ATP	17f	sss	sss	s	s	ss	sss	ss	s	sss	s	s	ss	s	ii	ii	iii	iii	—	s	ii	
m ^{2'} ATP	17g	—	—	ss	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	iii	ii	iii	iii	—	s	—	
m ^{3'} ATP	17h	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	iii	ii	iii	iii	sss	sss	—	
<i>Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aus Hefe:</i>																						
			α_2	α_2	α_2		$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	α	α_2	α	α_2							α	α_2		
m ⁶ ATP	17a		—	—	—	i	—	—	iii	—	—	s	iii	—	—	—	—	—	iii	—	—	
cl ² ATP	17b		sss	sss	sss	sss	sss	—	i	—	s	sss	—	—	—	—	—	—	—	sss	ss	
br ⁸ ATP	17c		iii	—	—	—	—	—	iii	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ii	—	i	
TuTP	17d		ii	ii	—	ii	—	—	s	sss	ss	sss	—	—	—	—	—	—	sss	ss	ii	
dATP	17e		iii	iii	sss	iii	ss	—	i	—	—	—	—	—	—	—	—	—	sss	s	ii	
d ^{3'} ATP	17f		iii	ii	ii	ii	ii	—	iii	—	iii	—	—	—	—	—	—	—	ii	—	ii	
m ^{2'} ATP	17g		ii	ii	—	ii	—	—	—	—	iii	—	—	—	—	—	—	—	ss	—	ii	
m ^{3'} ATP	17h		iii	ii	—	ii	—	—	—	—	iii	—	—	—	—	—	—	—	ss	s	ii	



Hefe und *E. coli* benutzt^[88]. Vier Analoga sind am Adeninteil in den Positionen 2, 6, 7 und 8, vier am Riboseteil in den Positionen 2' und 3' modifiziert.



5'-Triphosphat von	Abk.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
17a	N ⁶ -Methyladenosin	m ⁶ ATP	NH—CH ₃	H	H	OH
17b	2-Chloradenosin	cl ² ATP	NH ₂	Cl	H	OH
17c	8-Bromadenosin	br ⁸ ATP	NH ₂	H	Br	OH
17d	Tubercidin	TuTP[a]	NH ₂	H	H	OH
17e	2'-Desoxyadenosin	dATP	NH ₂	H	H	H
17f	3'-Desoxyadenosin	d ^{3'} ATP	NH ₂	H	H	OH
17g	2'-Methoxyadenosin	m ^{2'} ATP	NH ₂	H	H	OCH ₃
17h	3'-Methoxyadenosin	m ^{3'} ATP	NH ₂	H	H	OCH ₃

[a] In Position 7 ist =N— durch =CH— ersetzt.

Die Befunde in Tabelle 1 ermöglichen es, die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen gleichsam mit einem „Raster“ in Gruppen einzuteilen. Deutlich lassen sich sowohl bei den *E.-coli*-Enzymen als auch bei den aus Hefe isolierten zwei übereinstimmende Hauptgruppen (I, II) unterscheiden. Neben diesen beiden Hauptgruppen sind unter den *E.-coli*-Synthetasen drei Zweiergruppen (III–V) und, soweit untersucht, auch bei den Hefe-Enzymen eine Zweiergruppe (V) zu erkennen. Histidyl-tRNA-Synthetase nimmt eine Sonderstellung ein (VI).

Für nahezu alle untersuchten Enzyme scheint zur Erkennung des ATP-Moleküls die Aminogruppe des Adeninteiles in Position 6 wichtig zu sein (17a). Ein Substituent von der Größe eines Bromatoms in Stellung 8, der die Base in die *syn*-Konformation drängt und die freie Drehbarkeit um die Glycosylbindung behindert (vgl. Anhang), macht das ATP-Analogon für alle Aminoacyl-tRNA-Synthetasen als Substrat ungeeignet (17c). In Gruppe I darf das Stickstoffatom N-7 nicht fehlen; dieses könnte bedeuten, daß ATP bei diesen Enzymen tatsächlich als ein ATP-Mg²⁺-Komplex vom Typ 11 gebunden wird, in dem das Magnesium-Ion an N-7 koordiniert ist (17d). Die Hydroxygruppen der Ribose sind für die *E.-coli*-Enzyme dieser Gruppe beide nicht wichtig, bei den Hefe-Enzymen sind sie in den meisten Fällen essentiell (17e, f). Bei beiden Organismen dürfen sie aber nicht durch Substituenten wie Methylgruppen vergrößert werden (17g, h).

In Gruppe II ist zur Komplexierung des Mg²⁺-Ions offenbar kein Stickstoffatom in Position 7 nötig; hier könnte ein ATP-Mg²⁺-Komplex vom Typ 12 vorliegen, in dem das Mg²⁺-Ion nur mit den Phosphatresten koordiniert ist (17d). Die 2'-OH-Gruppe ist zur Substraterkennung essentiell, die 3'-OH-Gruppe kann bei den *E.-coli*-Enzymen fehlen (17e, f). O-Methylgruppen werden in keinem Fall toleriert (17g, h).

Auch für die Enzyme der Gruppe III und den größten Teil der Gruppe V ist N-7 des Adensins nicht wichtig (**17d**); bei den Enzymen der Gruppen IV und VI ist kein Schluß auf die Struktur des ATP-Mg²⁺-Komplexes möglich. Bemerkenswert ist noch die Beobachtung, daß in Gruppe V auch ATP-Analoga mit Methoxygruppen an der Ribose als Substrat akzeptiert werden (**17g, h**).

Durch Verwendung von mehr als den hier erwähnten acht ATP-Analoga lassen sich die Aussagen über die zur Substraterkennung wichtigen Teile des ATP-Moleküls für die einzelnen Enzyme noch erheblich verfeinern^[87, 89], doch schon mit dem hier gezeigten „Spezifitäts-Raster“ läßt sich die Isoleucyl-tRNA-Synthetase in eine Gruppe einordnen, die außerdem die für Leucin, Valin, Methionin, Tyrosin, Cystein (und auch noch Glutaminsäure und Glutamin) spezifischen Enzyme umfaßt. Innerhalb dieser Gruppe ist eine ähnlich strukturierte ATP-Bindungsstelle zu erwarten, und tatsächlich zeigt in der Primärstruktur der Isoleucyl-tRNA-Synthetasen der Bereich der ATP-Bindungsstelle direkte Sequenzhomologien zu entsprechenden Bereichen anderer Aminoacyl-tRNA-Synthetasen^[30], und zwar zu Methionyl-, Tyrosyl- und Glutaminyl-tRNA-Synthetase, die auch im „Raster“ zur gleichen Gruppe gehören.

3.2. Isoleucin-Analoga

Die genaue Übersetzung des genetischen Codes erfordert generell eine sehr hohe Spezifität gegenüber Aminosäuren; so wird von den übrigen neunzehn „falschen“ Aminosäuren im normalen Beladungsversuch praktisch keine Übertragung auf tRNA^{Ile} beobachtet. In Kaninchenreticulocyten kommt auf 3000 in Proteine eingebaute Isoleucylreste nur ein fälschlicherweise eingebauter Valylrest^[90]. Die zu solch geringen in-vivo-Fehlerraten führenden, extrem langsamen Umsetzungen nicht kognater Aminosäuren können jedoch in abgewandelter Versuchsanordnung gemessen werden (vgl. Abschnitt 5).

Die hohe Spezifität gegenüber Aminosäuren fehlt nur bei einigen unnatürlichen Aminosäuren, gegen die im Verlauf der biologischen Evolution kein Unterscheidungsmechanismus entwickelt werden mußte. So kann Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe γ -Hydroxyisoleucin und γ,δ -Dehydroisoleucin mit tRNA^{Ile} verestern. Das aus *E. coli* isolierte Enzym zeigte sich in diesen Fällen spezifischer und katalysiert diese Reaktionen nicht^[91].

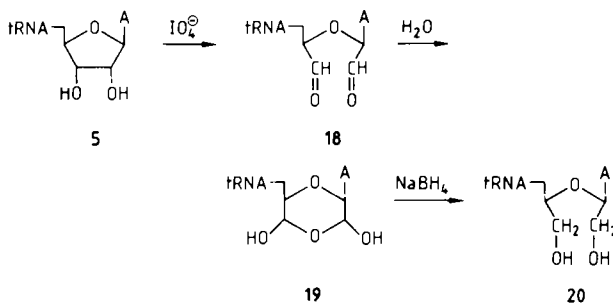
Die Bindungsstelle von Isoleucin und ATP an der Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* wurde eingehend untersucht. Aus Bindungsstudien mit Isoleucin-Derivaten wie 3-Methylpentansäure, 2-Methylbutylamin und 2-Amino-3-methyl-1-pentanol (Isoleucinol) wurde geschlossen, daß die Carboxylat- und die protonierte Aminogruppe des Isoleucins dazu dienen könnten, am Enzym ein Ionenpaar zu öffnen^[92]. Durch die positive Ladung am Enzym soll außerdem die Abstoßung zwischen der negativ geladenen Triphosphatgruppe von ATP und der Carboxylatgruppe vermindert werden^[93]. Die pH-Abhängigkeit der Stabilität des Enzym-ATP-Komplexes läßt vermuten, daß eine Histidin- oder eine Lysinseitenkette an der Bindung von ATP beteiligt ist; eine Lysinseitenkette des Enzyms könnte auch die Carboxylatgruppe von Isoleucin binden^[94]. Um welche Histidyl- oder Lysylreste der publizierten Enzymse-

quenz^[30] es sich dabei handelt, kann aus diesen Befunden nicht abgeleitet werden.

3.3. tRNA-Analoga

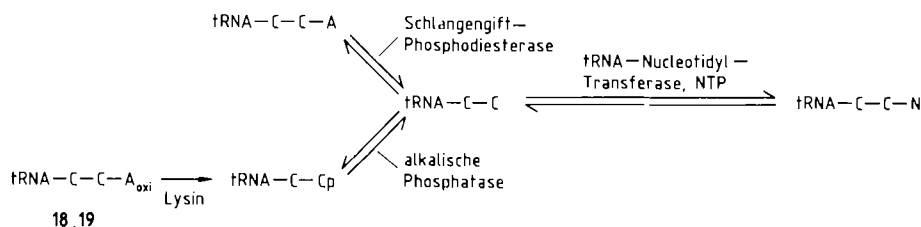
Für die Übertragung der aktivierten Aminosäuren stehen den meisten Aminoacyl-tRNA-Synthetasen mehrere tRNAs (Isoacceptoren) zur Verfügung, die für die betreffende Aminosäure spezifisch sind^[95]. So sind aus *E. coli* bisher zwei mit Isoleucin beladbare tRNAs isoliert und sequenziert worden^[96]. Diese bestehen aus 77 bzw. 76 Nucleotiden, von denen 27 verschieden sind. Weiterhin kann dieses Enzym in vitro auch mit sehr geringer, gerade noch meßbarer Geschwindigkeit tRNA^{Phe} und tRNA^{Met} aus *E. coli* mit Isoleucin beladen^[97, 98]. Diese beiden tRNAs unterscheiden sich in 39 bzw. 40 Nucleotidpositionen von tRNA^{Ile}^[96]. Bei der Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe konnte die Fehlbeladung von tRNA^{Val}, die ein offenbar in wechselnden Mengen in tRNA^{Val}-Präparationen enthaltener Isoacceptor bewirkt, sogar in kinetischen Studien untersucht werden^[99]. Weder durch Vergleich von tRNA-Sequenzen, insbesondere von Isoacceptoren oder fehlbeladbaren tRNAs, noch durch Versuche mit enzymatisch oder chemisch modifizierten tRNAs konnte der Mechanismus für die Erkennung der tRNAs durch die Enzyme genau geklärt werden^[100]; dagegen waren mit chemisch und enzymatisch ausschließlich am endständigen Nucleotid modifizierten tRNAs weitere wichtige Aufschlüsse über den Mechanismus der Aminoacylierung zu gewinnen^[101, 102].

Die endständige Ribose der tRNA läßt sich mit Periodat leicht selektiv zum Dialdehyd **18** oxidieren, der in wäßriger Lösung hauptsächlich als Hemiacetalhydrat **19** vorliegt^[103, 104]. Die entstandene tRNA_{oxi} (**18, 19**) kann mit NaBH₄ zum Diol (tRNA_{oxi-red}) **20** reduziert werden^[103].



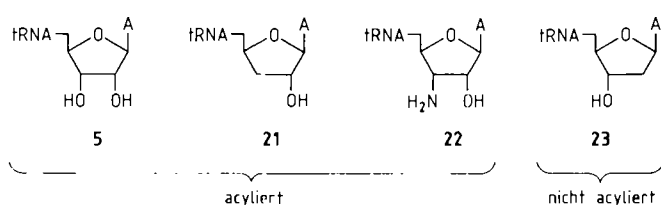
Im Isoleucinsystem ist die tRNA_{oxi-red} **20**, in der die C2'-C3'-Bindung gespalten ist, kein Substrat mehr für die Aminoacylierungsreaktion, sondern wirkt, wie tRNA_{oxi} **18**, als Inhibitor^[29, 105]. Eine intakte endständige Riboseinheit ist also Voraussetzung für die enzymatische Acylierung der tRNA^{Ile}.

Weitere wichtige Modifikationen des C-C-A-Endes der tRNA können mit enzymatischen Methoden erreicht werden^[101, 106–108]. Das endständige Nucleotid (AMP) der tRNA **5** kann durch kontrollierten Abbau mit Schlangengift-Phosphodiesterase abgespalten werden; tRNA-Nucleotidyl-Transferase ermöglicht den Einbau von AMP-Analoga. Bei einem anderen Verfahren wird aus tRNA_{oxi} **18** in Gegenwart von Lysin zunächst das oxidierte Nucleosid eliminiert, das endständige Phosphat mit alkalischer Phos-

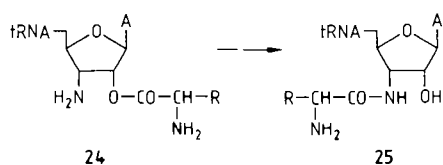


phatase abgespalten und dann das modifizierte Nucleotid eingebaut^[109].

Durch Einbau von 2'- und 3'-Desoxyadenosinmonophosphat gelang es, die Hydroxygruppe herauszufinden, an der die verschiedenen tRNAs von den entsprechenden Enzymen acyliert werden. Sowohl Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe als auch aus *E. coli* aminoacylieren tRNA^{Ile}-C-C-3'dA **21**, nicht aber tRNA^{Ile}-C-C-2'dA **23**^[106, 109, 110].



Man schloß daraus, daß die natürliche tRNA^{Ile}-C-C-A **5** vom Enzym an der 2'-Hydroxygruppe acyliert wird; die entstandene 2'-O-Acyl-tRNA isomerisiert dann allerdings sehr schnell zu einem Gemisch aus 2'- und 3'-Isoleucyl-tRNA^[111-114]. Die durch Einbau von 3'-Desoxy-3'-amino-adenosinmonophosphat erhaltene tRNA^{Ile}-C-C-A(3'NH₂) **22** wird ebenfalls von beiden Enzymen acyliert^[38, 115-118]. Dabei wird der zuerst gebildete 2'-O-Acylester **24** durch intramolekulare Aminolyse in das Säureamid **25** umgewandelt^[118].



Die Bedeutung dieser Reaktion liegt darin, daß hier ein gegen Hydrolyse erheblich stabileres Produkt (**25**) als die O-Acylester **24** entsteht^[107]. Mit tRNA^{Ile}-C-C-A(3'NH₂) **22** konnten deshalb weitere, wichtige Einsichten in die Mechanismen gewonnen werden, die die Aminosäurespezifität erhöhen (vgl. Abschnitt 5.1).

4. Substratbindung und katalytischer Cyclus

4.1. Bindungs- und Gleichgewichtskonstanten

4.1.1. Aktivierungsreaktion

Mit der „stopped flow“-Technik wurden zuerst bei Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* B die Geschwindigkeitskonstanten für Bindung und Dissoziation der „klei-

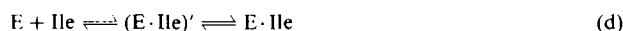
nen“ Substrate Isoleucin und ATP gemessen^[119]. Entsprechend Reaktion (c)^[*]



wurde für Isoleucin eine Dissoziationskonstante

$$K_d^{\text{Ile}} = [\text{Ile}][E]/[E \cdot \text{Ile}] = k_{-1}/k_1 = 15 \text{ s}^{-1}/2.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} = 6.8 \times 10^{-6} \text{ M}$$

gefunden. Der Wert von k_1 für den Bindungsschritt ist etwa zehnmal kleiner als für einen ausschließlich diffusionskontrollierten Vorgang zu erwarten wäre. Tatsächlich konnte durch Messungen bei niedriger Temperatur festgestellt werden, daß Isoleucin in Wirklichkeit nach einem Zweistufenmechanismus gebunden wird [Gl. (d)]. Der erste Schritt läuft schnell ab. Die folgende langsamere Isomerisierung des Primärkomplexes ist als substratinduzierte Konformationsänderung aufzufassen und spielt vielleicht eine wichtige Rolle bei der Erkennung der Aminosäure (vgl. Abschnitt 5.2).

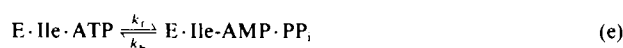


Die freie Standardbindungsenthalpie von Isoleucin wurde aus der Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstante zu $\Delta G^\circ = -31.80 \text{ kJ mol}^{-1}$ berechnet^[119] und kann jetzt allein durch hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäure mit der Enzymoberfläche erklärt werden^[120] (vgl. Abschnitt 5.1).

ATP wird in Gegenwart von Mg²⁺ schneller als Isoleucin gebunden; einzelne Geschwindigkeitskonstanten konnten jedoch nicht mehr genau gemessen werden. Die Dissoziationskonstante K_d^{MgATP} beträgt $1.75 \times 10^{-4} \text{ M}$ ^[119].

Sehr ähnliche Dissoziationskonstanten ($K_d^{\text{Ile}} = 4.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $K_d^{\text{MgATP}} = 1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$) wurden auch mit anderen kinetischen Methoden erhalten, bei denen die Einbaugeschwindigkeit von ³²P-markiertem Pyrophosphat in ATP in Abhängigkeit von den Substratkonzentrationen verfolgt wurde^[121].

Bei der Umsetzung der beiden „kleinen“ Substrate ATP und Isoleucin im Enzym-Isoleucin-ATP-Komplex zum Isoleucyladenylat [Gl. (e)]



ist die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion kleiner ($k_f = 135 \text{ s}^{-1}$) als die der Rückreaktion ($k_b = 670 \text{ s}^{-1}$). So-

[*] Im folgenden wird eine physikalische Bindung bei der Komplexbildung aus Enzym und Substraten durch einen Punkt, z. B. in $E \cdot \text{Ile}$, dargestellt. Der Strich, z. B. in aa-AMP (Aminoacyladenylat), kennzeichnet eine chemische, kovalente Bindung.

mit liegt das Gleichgewicht für diesen sich am Enzym abspielenden Teilschritt nicht auf der Seite des Enzym-Produkt-Komplexes ($K_E = k_f/k_b = 0.2$)^[119].

Die Gleichgewichtskonstante für die gesamte Aktivierungsreaktion entsprechend Gleichung (f)



hat den geringen Wert von

$$K = [\text{Ile-AMP}][\text{PP}_i]/[\text{Ile}][\text{ATP}] = 4.5 \times 10^{-4} \quad [119].$$

4.1.2. Beladungsreaktion

Für die Dissoziation von tRNA^{Ile} oder $\text{Ile-tRNA}^{\text{Ile}}$ von der Synthetase

$$K_d = [\text{E}][\text{tRNA}]/[\text{E} \cdot \text{tRNA}]$$

werden aufgrund von Bindungsstudien Werte der Dissoziationskonstante von 10^{-6} bis 10^{-8} M angegeben^[122, 123]. Den optimierten Reaktionsbedingungen für das Enzym aus *E. coli* B kommt wohl ein Wert von 3×10^{-7} M am nächsten^[124]. Die Gleichgewichtskonstante für die Gesamtreaktion

$$K = [\text{Ile-tRNA}][\text{AMP}][\text{PP}_i]/([\text{tRNA}][\text{ATP}][\text{Ile}])$$

dürfte etwa bei 1 liegen^[125].

Hauptsächlich durch Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der Adenylatbildung ($> 3.5 \text{ s}^{-1}$), der Acylierungsreaktion (0.05 s^{-1}) und der Dissoziation des E-Ile-tRNA-Komplexes (0.042 s^{-1}) wurde für das aus *E. coli* B präparierte Enzym ein katalytischer Zyklus postuliert. In diesem Zyklus (g) ist der Komplex E-Ile-AMP-Ile-tRNA die in Lösung vorherrschende Spezies, und die Entlassung der beladenen tRNA aus dem Enzym-Substrat-Komplex ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt^[122].

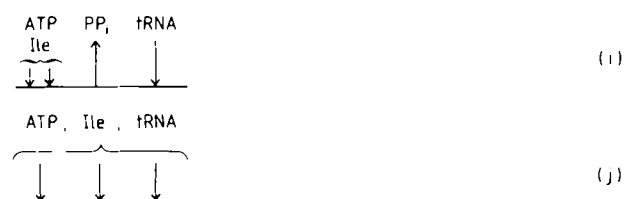
Dieses Schema konnte bei der Untersuchung der Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* K 12 mit der „pulsed

Die Dissoziation der beladenen tRNA kann hier nicht als geschwindigkeitsbestimmend angesehen werden; Hauptspezies in der Lösung ist der Komplex E-tRNA-Ile-AMP.

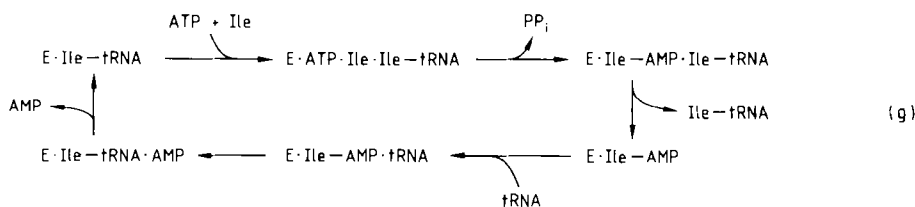
4.2. Reihenfolge der Substrataddition und Produktabgabe

Einige der synthetisierten Substratanaloga vom Typ 17 erwiesen sich als Inhibitoren für die Aminoacylierungsreaktion. Dieser Befund ermöglichte kinetische Untersuchungen, in denen die Reihenfolge der Substrataddition an das Enzym und die Reihenfolge der Produktabgabe mit den gut ausgearbeiteten Methoden der „initial rate“-Kinetik (vgl. Anhang) ermittelt wurden^[127-134]. Insbesondere unter den ATP-Analoga fanden sich Inhibitoren aller drei Typen: kompetitive, nichtkompetitive und unkompetitive. Auch die modifizierten, nicht beladbaren tRNA-Derivate (vgl. Abschnitt 3.3) sind kompetitive oder nichtkompetitive Inhibitoren.

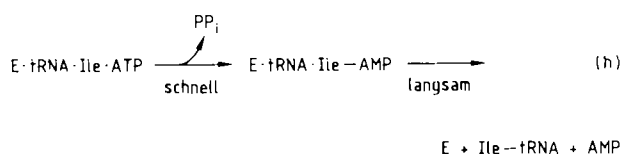
Die ersten Untersuchungen über die Reihenfolge der Substrataddition bei Isoleucyl-tRNA-Synthetasen wurden mit dem aus *E. coli* B isolierten Enzym durchgeführt^[135], um den Einfluß von Spermin, einem in allen pflanzlichen und tierischen Zellen vorkommenden Polyamin^[136], auf die Aminoacylierungsreaktion zu untersuchen. Für die Reaktion in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen wurde ein nicht in allen Einzelheiten festgelegter „Ping-pong-Mechanismus“ postuliert [siehe (i)]. Dabei werden zuerst ATP und Isoleu-



cin am Enzym gebunden. Erst nach Bildung von Isoleucyladenylat und Abgabe von Pyrophosphat wird die tRNA ans Enzym addiert.



quenched flow“-Technik^[126] nicht bestätigt werden^[14]. Es stellte sich vielmehr heraus, daß auf die schnelle Bildung von Isoleucyladenylat (für den ATP/PP_i-Austausch wurde $k_{\text{cat}} = 62 \text{ s}^{-1}$ gefunden) ein langsamer Transferschritt ($k = 1.47 \text{ s}^{-1}$) folgt, der die Gesamtgeschwindigkeit bzw. die Wechselzahl ($k_{\text{cat}} = 1.46 \text{ s}^{-1}$) der Aminoacylierung bestimmt [Gl. (h)]^[14].



In Gegenwart von Spermin verläuft die Reaktion dagegen unter sequentieller, nicht genau charakterisierter Addition der Substrate [siehe (j)]. Dieser Befund wurde als Argument für die Hypothese benutzt, daß die Aminoacylierung in Gegenwart von Spermin nicht über eine Adenylatbildung verläuft, sondern über einen anderen konzertierten Mechanismus, bei dem alle drei Substrate gleichzeitig reagieren^[8, 135]. Wie später gezeigt wird [vgl. (l)], lassen sich jedoch auch katalytische Cyclen mit sequentieller Addition der Substrate formulieren, die die Bildung eines Aminoacyladenylats 3 einschließen. Um den Einfluß von Spermin auf die Aminoacylierung zu erklären, wird angenommen, daß dieses Polyamin nicht primär auf das Enzym ein-

wirkt, sondern an die tRNA gebunden wird. Dabei verändert sich die Konformation der Nucleinsäure und dadurch auch der Reaktionsablauf^[137].

Bei eingehenden Untersuchungen konnten für Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe insgesamt vier Reaktionswege aufgeklärt werden^[99, 138, 139], die in Tabelle 2 aufgeführt sind. Die vielfache Variation der Reaktionsbedingungen kann als schrittweise Annäherung an physiologische Bedingungen angesehen werden.

Tabelle 2. Bedingungen der Aminoacylierung, Reihenfolge der Substrataddition und Produktabgabe bei Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe (A = ATP, B = Isoleucin, C = tRNA^{Ile}, P = Pyrophosphat, Q = Ile-tRNA^{Ile}, R = AMP) sowie k_{cat} -Werte. Die Benennung der Mechanismen entspricht der Nomenklatur von Cleland [130, 134] (Abkürzungen siehe Text).

Bedingungen	Reihenfolge	Mechanismus	k_{cat} [s ⁻¹]
pH 6.5, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺	A → B → C → E → P → Q → R	sequentiell ungeordnet Ter-Ter	0.47
pH 7.65, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺	A ↓ B ↓ C ↓ P ↑ Q ↑ R ↑	sequentiell geordnet Ter-Ter	0.83
pH 8.6, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺	A ↓ B ↓ C ↓ P ↑ Q ↑ R ↑	sequentiell geordnet Ter-Ter	0.52
pH 7.65, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺ , PPase	A ↓ B ↓ P ↑ C ↓ Q, R ↑	ungeordnet Bi-Uni Uni-Bi Ping-pong	1.40
pH 7.65, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺ , EF-Tu · GTP	A ↓ B ↓ C ↓ P ↑ Q ↑ R ↑	sequentiell geordnet Ter-Ter	0.28
pH 7.65, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺ , EF-Tu · GTP, PPase	A ↓ B ↓ C ↓ P ↑ Q ↑ R ↑	sequentiell geordnet Ter-Ter	0.23
pH 7.65, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺ , EF-Tu · GTP, PPase, Spermin	B ↓ A ↓ P, Q ↑ C ↓ R ↑	Bi-Bi Uni-Uni Ping-pong	0.098
pH 7.65, 0.1 M KCl, 1 mM Mg ²⁺ , EF-Tu · GTP, PPase, Spermin	B ↓ A ↓ P, Q ↑ C ↓ R ↑	Bi-Bi Uni-Uni Ping-pong	0.135

Unter den allgemein üblichen, für die Katalyse optimierten Reaktionsbedingungen (pH 7.65, 0.1 M KCl, 15 mM Mg²⁺) verläuft die Aminoacylierung nach einem sequentiellen Mechanismus, bei dem zuerst ATP, dann Isoleucin und danach tRNA^{Ile} an das Enzym addiert werden; die Produkte werden in der Reihenfolge Pyrophosphat, Ile-tRNA^{Ile}, AMP freigesetzt. Die Wechselzahl beträgt unter diesen Bedingungen 0.83 s⁻¹. Wird der pH-Wert von 7.65 auf 6.5 erniedrigt – einen Wert, der auch innerhalb von Hefezellen vorkommt^[140] – bilden die Substrate in beliebiger Reihenfolge Enzym-Substrat-Komplexe, und die Pro-

dukte werden in beliebiger Reihenfolge entlassen. Die Wechselzahl (0.47 s⁻¹) ist beinahe halbiert. Eine Erhöhung des pH-Wertes auf 8.6 hat lediglich zur Folge, daß die Wechselzahl auf 0.52 s⁻¹ herabgesetzt wird.

Pyrophosphatase (PPase) ist eines der in relativ großer Menge in *E. coli*^[141] und Hefezellen^[142] enthaltenen Enzyme. Sein Zusatz bewirkt einen Wechsel vom sequentiellen zum Ping-pong-Mechanismus. Bei diesem können ATP und Isoleucin in beliebiger Reihenfolge mit dem Enzym Komplexe bilden, dann wird Pyrophosphat abgegeben und tRNA^{Ile} addiert, und die beiden anderen Produkte werden in noch ungeklärter Reihenfolge entlassen. Die Wechselzahl ist bei diesem Reaktionsweg auf 1.40 s⁻¹ erhöht. Für den Einfluß der Pyrophosphatkonzentration auf den katalytischen Prozeß gibt es bisher keine sichere mechanistische Begründung; möglicherweise handelt es sich um eine allosterische Wirkung^[138].

Wird statt Pyrophosphatase der Elongationsfaktor-Komplex EF-Tu · GTP zugesetzt, bleibt der sequentielle Mechanismus erhalten, die Wechselzahl wird jedoch auf 0.28 s⁻¹ erniedrigt. EF-Tu · GTP bildet sehr spezifisch Komplexe mit allen beladenen tRNAs^[99, 143–147] und verringert so, ähnlich wie Pyrophosphatase, die Konzentration eines Reaktionsproduktes im Aminoacylierungsansatz. Eine sichere Erklärung für die Verringerung der Wechselzahl ist bisher nicht gefunden worden^[148]. Erstaunlich ist auch, daß ein Zusatz von Pyrophosphatase in Gegenwart von EF-Tu · GTP die Aminoacylierungsreaktion praktisch nicht verändert.

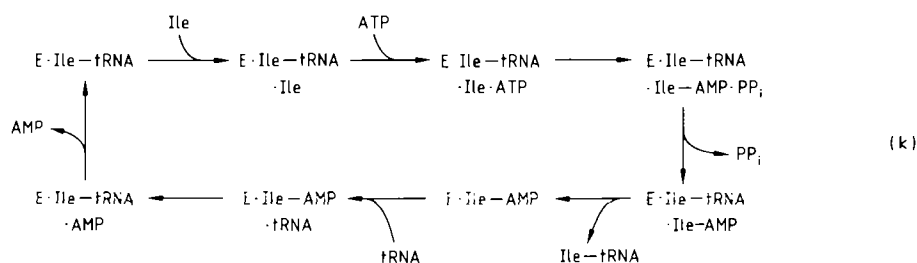
Versetzt man diesen Ansatz mit Spermin, das ebenfalls in der Zelle vorhanden ist^[136], tritt abermals ein Ping-pong-Mechanismus in Kraft, bei dem zuerst Isoleucin, dann ATP addiert wird; darauf werden Pyrophosphat und, zunächst erstaunlicherweise, Isoleucyl-tRNA entlassen. Wie es möglich ist, daß Isoleucyl-tRNA freigesetzt wird, bevor sich tRNA^{Ile} überhaupt an das Enzym addiert, soll etwas später erklärt werden [vgl. (k)]. In der katalytischen Reaktionsfolge wird nun tRNA^{Ile} nach Abgabe dieser Produkte gebunden und danach AMP als letztes Produkt entlassen. Die Wechselzahl sinkt auf den niedrigen Wert von 0.098 s⁻¹. Eine Herabsetzung der Mg²⁺-Konzentration, die in dem normalerweise verwendeten, optimierten Enzymassay höher ist (15 mM) als unter physiologischen Bedingungen (1 mM)^[149, 150], hat bei Anwesenheit von Pyrophosphatase, EF-Tu · GTP und Spermin keinen Einfluß auf den Reaktionsweg, erhöht aber die Wechselzahl geringfügig auf 0.135 s⁻¹. Damit läuft die Aminoacylierungsreaktion in diesem Ansatz, der den physiologischen Bedingungen am ähnlichsten ist, etwa zehnmal langsamer ab als im optimierten Enzymassay.

Bei der Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* MRE600 wurden bisher ein Mechanismus mit sequentieller Substrataddition und ein Ping-pong-Mechanismus festgestellt^[151] (Tabelle 3); Zusätze von EF-Tu · GTP oder Spermin haben keinen Einfluß auf die Wechselzahl der Aminoacylierung. In Gegenwart von Spermin gibt es noch andere Reaktionswege, die aber bisher noch nicht genau untersucht worden sind^[146]. Fest steht jedoch, daß dieses Enzym auf ähnlich vielfältige Weise arbeiten kann wie das aus Hefe isolierte und sich in bezug auf die Reaktionswege anders verhält als das Hefeenzym und das vorher erwähnte, aus *E. coli* B präparierte Enzym^[135].

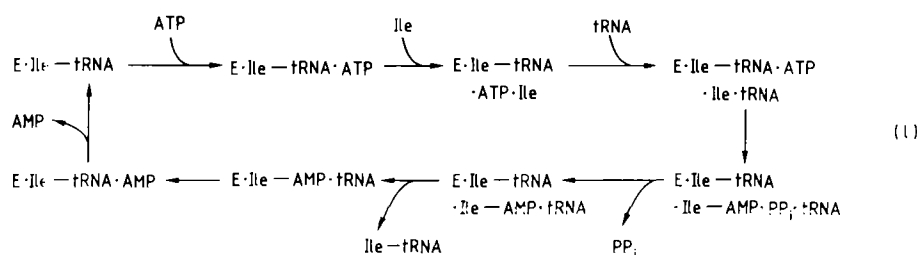
Tabelle 3. Bedingungen der Aminoacylierung, Reihenfolge der Substrataddition und Produktabgabe bei Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* MRE600 (A = ATP, B = Isoleucin, C = tRNA^{Ile}, P = Pyrophosphat, Q = Ile-tRNA^{Ile}, R = AMP) sowie k_{cat} -Werte. Die Benennung der Mechanismen entspricht der Nomenklatur von Cleland [130, 134] (Abkürzungen siehe Text).

Bedingungen	Reihenfolge	Mechanismus	k_{cat} [s ⁻¹]
pH 7,6, 0,15 M KCl, 0,05 mM Mg ²⁺	A → B → C → E	sequentiell ungeordnet Ter	0,74
pH 7,6, 0,15 M KCl, 0,05 mM Mg ²⁺ , PPase	A ↓ B ↓ P ↑ C ↓ R ↑ Q ↑	Bi-Uni Uni-Bi Ping-pong	1,2
pH 7,6, 0,15 M KCl, Spe-min	nicht bestimmt	sequentiell	0,2
pH 7,6, 0,15 M KCl, Spe-min, PPase	nicht bestimmt	sequentiell	0,4
pH 7,6, 0,15 M KCl, 0,05 mM Mg ²⁺ , Spe-min	nicht bestimmt	Ping-pong	0,2
pH 7,6, 0,15 M KCl, 0,05 mM Mg ²⁺ , Spe-min, PPase	nicht bestimmt	Ping-pong	0,5

Die Analyse der „initial-rate“-Kinetik liefert nur Aufschluß über die Reihenfolge der Substrataddition und Produktabgabe, sagt aber nichts aus über die Art der Enzym-Substrat-Komplexe, an die die Substrate addiert bzw. aus denen die Produkte abgegeben werden. Das als „E“ in den Tabellen 2 und 3 sowie im Anhang bezeichnete Enzym muß nicht notwendigerweise das freie Enzym sein, sondern kann ebenso gut als vorher gebildeter Enzym-Substrat-Komplex vorliegen. So ist beim Hefeenzym die in Gegenwart von Spermin beobachtete Folge der Substrataddition nur möglich, wenn Isoleucin an einen Komplex aus dem Enzym und Ile-tRNA^{Ile} addiert wird. Der dazugehörige katalytische Cyclus (k) ist vorläufig rein hypothetisch.



Für den sequentiellen, geordneten Mechanismus kann man in analoger Weise einen katalytischen Cyclus (l) for-



mulieren, in dem die „kleinen“ Substrate ATP und Isoleucin an einen E·Ile-tRNA·AMP-Komplex addiert werden: Man sieht, daß in (l) die drei Substrate ATP, Ile und tRNA^{Ile} direkt nacheinander addiert werden können – und trotzdem verläuft die Reaktion chemisch über ein Aminoacyladenylat (Ile-AMP) als Zwischenprodukt. Ähnliche katalytische Cyclen, bei denen zeitweise zwei tRNA-Moleküle an das Enzym gebunden sind, wurden auch für Phenylalanyl-^[152] und Valyl-tRNA-Synthetase^[153] aus Hefe postuliert. Daß Isoleucyl-tRNA-Synthetase zwei Bindungsstellen für tRNA aufweist, wird dadurch gezeigt, daß mehrere tRNA-Analoga in der Aminoacylierungsreaktion als nichtkompetitive Inhibitoren wirksam sind^[29, 105]. Allerdings bleibt offen, ob es sich um zwei Bindungsstellen auf einer Peptidkette oder um zwei Bindungsstellen eines dimerisierten Enzyms handelt^[148].

Die Vielfalt der möglichen Reaktionswege, die sowohl für Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe als auch aus *E. coli* gefunden wurde, deutet an, daß das Proteinmolekül nicht als starres Gebilde aufgefaßt werden kann, sondern schon bei geringen Veränderungen seiner Umgebung seine Konformation ändert und mit verschiedenen Mechanismen und Geschwindigkeiten arbeitet. Der physiologische Sinn dieses Verhaltens erschien zuerst unklar; Vermutungen, daß ein Zusammenhang mit der Spezifität des Enzyms besteht, haben sich dann in gewisser Weise bestätigt.

5. Fehlerraten bei der Aminoacylierung

Die Spezifität eines Enzyms läßt sich durch den Quotienten aus der Geschwindigkeit charakterisieren, mit der das „richtige“ Substrat umgesetzt wird, und der Geschwindigkeit für die Umsetzung des „falschen“ Substrats. Diese Größe ist gleich dem Produkt aus einem Diskriminationsfaktor D und dem Quotienten der Substratkonzentrationen: für das Beispiel der Unterscheidung von Isoleucin und Valin gilt:

$$v_{\text{Ile}}/v_{\text{Val}} = D \cdot ([\text{Ile}]/[\text{Val}]) \quad (\text{m})$$

Der Faktor *D* wird bestimmt durch die kinetischen Konstanten *k_{cat}* und *K_m*:

$$D = (k_{cat}/K_m)^{Ile}/(k_{cat}/K_m)^{Val} \tag{n}$$

Bei Substraten, die nur mit sehr geringen Geschwindigkeiten umgesetzt werden (wie hier alle natürlichen Aminosäuren außer Isoleucin), ist es meist sehr schwierig, die *k_{cat}*- und *K_m*-Werte zu bestimmen. Die zu messende Inkorporation von radioaktiv markierten Substraten in tRNA hebt sich meist kaum von der Hintergrundstrahlung ab. Die Umsetzungsgeschwindigkeiten können aber trotzdem mit hinreichender Genauigkeit abgeschätzt werden, wenn die Reaktion über längere Zeit verfolgt, mehrmals wiederholt und mit statistischen Methoden ausgewertet wird^[145]. So wurde für die Unterscheidung von Isoleucin und Valin durch die Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe der folgende Wert für *D* gefunden^[139]:

$$D = (0.83\text{ s}^{-1}/0.02\text{ mM})/(0.0001\text{ s}^{-1}/0.09\text{ mM}) = 38\,000$$

Für das aus *E. coli* isolierte Enzym lag dieser Wert mit

$$D = (0.82\text{ s}^{-1}/0.006\text{ mM})/(0.00019\text{ s}^{-1}/0.1\text{ mM}) = 71\,900$$

beinahe doppelt so hoch^[154]. Das bedeutet, daß bei Anwesenheit gleicher Mengen Isoleucin und Valin auf 38 000 bzw. 71 900 umgesetzte Isoleucinmoleküle nur ein Molekül Valin mit der tRNA verestert wird. Beide *D*-Werte sind sehr viel höher als aufgrund des geringen Unterschiedes in der hydrophoben Wechselwirkung der beiden Aminosäureseitenketten (Isobutyl- und Isopropylrest) mit ihrem Bindungspartner zu erwarten wäre. Die allein daraus resultierende Spezifität berechnete *Pauling* zu 4.3 : 1 und schätzte deren obere Grenze auf 20 : 1^[155]. Bei der Aufklärung der einzelnen Erkennungsschritte, die die Spezifität des Enzym um das viertausendfache steigern, wurden weitere entscheidende Erkenntnisse mit Hilfe modifizierter tRNAs, insbesondere mit tRNA^{Ile}-C-C-A(3'NH₂) **22**, gewonnen.

5.1. Unterscheidung der Aminosäuren bei der Aminoacylierung von tRNA^{Ile}-C-C-A(3'NH₂)

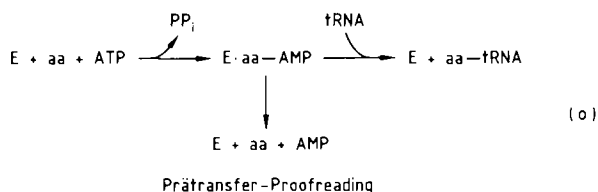
tRNA^{Ile}-C-C-A(3'NH₂) **22** läßt sich im Gegensatz zur nativen tRNA^{Ile}-C-C-A **5** mit relativ hohen Geschwindigkeiten auch mit „falschen“ Aminosäuren wie Valin durch Isoleucyl-tRNA-Synthetase verestern^[38, 115–118]. So konnten die *k_{cat}*- und *K_m*-Werte für die Fehlbeladung mit den übrigen neunzehn, in Proteinen vorkommenden Aminosäuren ermittelt und damit die Diskriminationsfaktoren (bei der Beladung von tRNA^{Ile}-C-C-A(3'NH₂) *D*₁ genannt) berechnet werden^[120] (vgl. Tabelle 4). Diese *D*₁-Werte sind weit aus niedriger als die für die Beladung von tRNA^{Ile}-C-C-A **5** geltenden *D*-Werte (z. B. beim Hefeenzym für Valin: *D* = 38 000, *D*₁ = 167), jedoch auch noch erheblich höher als die von *Pauling* berechneten Werte (für Valin 1 : 10)^[155]. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die spezifitätserhöhenden Reaktionsschritte bei der Acylierung von tRNA-C-C-A(3'NH₂) **22** erheblich eingeschränkt sind.

Bei der Untersuchung der Stöchiometrie der AMP-Bildung [vgl. Gl. (a) und (b)] zeigte sich, daß in allen Fällen mehr als ein Molekül AMP pro Molekül acylierter tRNA entsteht^[120], z. B. vom Hefeenzym bei der Beladung mit Valin 111, bei der Beladung mit Isoleucin 2.2. Diese überhöhte AMP-Bildung deutet auf einen schon früher postulierten^[156, 157] hydrolytischen Korrekturschritt hin, der auf der Stufe des Aminoacyladenylates erfolgen muß (Prätransfer-Proofreading), denn die Transacylierung einer anfänglich an der 2'-OH-Gruppe beladenen tRNA^{Ile}-C-C-A(3'NH₂) zum hydrolysestabilen 3'-Aminoacylamid **25** verläuft sehr viel schneller (vgl. ^[116, 120]) als die enzymatische Hydrolyse von Aminoacylestern^[28], so daß kein ins Gewicht fallender Anteil der Aminosäure in einem Posttransfer-Proofreading von der 2'-OH-Gruppe abgespalten worden sein kann. Das Enzym kann also in gewissem Ausmaß bei Aktivierung einer „falschen“ Aminosäure das entstandene Aminoacyladenylat wieder spalten [vgl. (o)].

Voraussetzung für die Gültigkeit der obigen Schlußfolgerung ist allerdings, daß die 2',3'-Acylwanderung an der

Tabelle 4. Diskriminationsfaktoren *D* und *D*₂ (≈ *D*₁), Stöchiometrie der AMP-Bildung bei der Aminoacylierung sowie Faktoren *I*₁, *I*₂, *Π*₁, *Π*₂ für die Unterscheidung von Isoleucin und Valin durch Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe (Abkürzungen siehe Text).

Bedingungen	<i>D</i>	AMP pro Ile-tRNA	AMP pro Val-tRNA	<i>D</i> ₂	AMP pro Ile-tRNA-C-C-3'dA	AMP pro Val-tRNA-C-C-3'dA	<i>I</i> ₁	<i>I</i> ₂	<i>Π</i> ₁	<i>Π</i> ₂
pH 6.5, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺	8000	3.5	288	48	1.81	13	6.7	14.5	7.2	11.4
pH 7.65, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺	38000	5.5	828	180	1.94	96	3.6	70.1	49.5	3.0
pH 8.6, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺	14000	6.9	588	94	2.31	71	3.1	53.0	30.7	2.8
pH 7.65, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺ , PPase	32000	6.3	1165	100	2.63	49	5.4	32.0	18.6	9.9
pH 7.65, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺ , EF-Tu·GTP	8000	3.0	192	72	1.25	19	4.7	26.6	15.2	4.2
pH 7.65, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺ , EF-Tu·GTP, PPase	3000	5.1	165	69	2.63	43	4.2	22.1	16.3	2.0
pH 7.65, 0.1 M KCl, 15 mM Mg ²⁺ , EF-Tu·GTP, PPase, Spermin	2000	6.1	118	85	3.12	48	5.5	18.8	15.4	1.3
pH 7.65, 0.1 M KCl, 1 mM Mg ²⁺ , EF-Tu·GTP, PPase, Spermin	10500	3.4	255	105	1.1	20	5.8	24.1	18.2	4.1

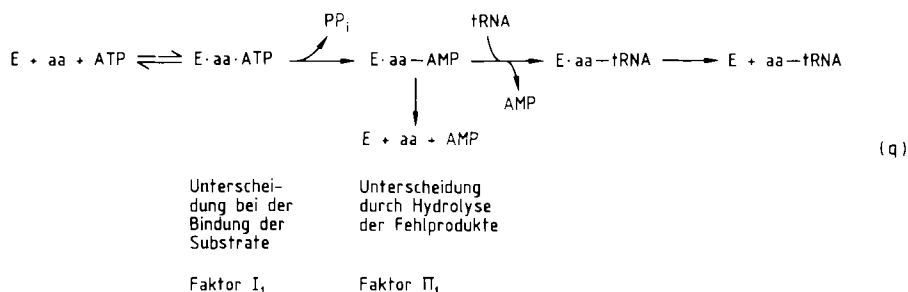


endständigen Ribose (vgl. 24 → 25) bei der enzymgebundenen tRNA ebenso ungehindert abläuft wie bei nicht komplexierter tRNA. Das Verhältnis der AMP-Bildungszahlen der einzelnen Aminosäuren zur Anzahl der bei der Beladung mit Isoleucin erzeugten AMP-Moleküle gibt an, wieviel Mal häufiger die falsche Aminosäure im Proofreading-Schritt zurückgewiesen wird als Isoleucin. Für Valin beträgt dieser Proofreading-Faktor beim Hefeenzym $\Pi_1 = 111/2.2 = 50$.

Der Diskriminationsfaktor D_1 wird außer durch den Proofreading-Faktor Π_1 auch durch die Unterschiede in den freien Bindungsenthalpien zwischen „falschen“ Aminosäuren und Isoleucin bestimmt (Faktor I_1), so daß für D_1 Gleichung (p) gilt:

$$D_1 = I_1 \cdot \Pi_1 \quad (p)$$

und der Gesamtvorgang der Aminosäureerkennung bei der Aminoacylierung von tRNA^{Leu}-C-C-A(3'NH₂) 22 dem Schema (q) entspricht.



Der Unterschied zwischen den freien Bindungsenthalpien einer der neunzehn anderen Aminosäuren und Isoleucin läßt sich direkt nach Gleichung (r)

$$\Delta\Delta G_1 = RT \ln I_1 = RT \ln (D_1/\Pi_1) \quad (r)$$

berechnen^[158]. Für Valin ergab sich danach ein Betrag von $\Delta\Delta G_1 = 3.08 \text{ kJ mol}^{-1}$ ^[139], der mit dem zugehörigen Faktor $I_1 = 3.3$ recht gut mit den von *Pauling* berechneten Werten^[155] („ $I^* = 4.3$, „ $\Delta\Delta G^* = 3.77 \text{ kJ mol}^{-1}$ “) übereinstimmt. Diese Zahlen entsprechen der hydrophoben Wechselwirkung einer Methylengruppe mit dem Enzym. Werte in der gleichen Größenordnung können auch anhand einer Hydrophobieskala abgeschätzt werden, die für die Überführung von Aminosäureseitenketten aus wäßriger Lösung in organische Lösungsmittel aufgestellt wurde^[159].

Durch die Analyse von Proteinstrukturen hat sich gezeigt, daß für die hydrophobe Wechselwirkung von Aminosäureseitenketten innerhalb von Proteinen nur die zugängliche freie Oberfläche des Moleküls entscheidend ist^[160-162]. Diese wurde definiert als die Fläche, auf der das Zentrum eines als kugelförmig angesehenen Lösungsmit-

telmoleküls in van-der-Waals-Kontakt mit einer Protein- oder Aminosäureoberfläche plaziert werden kann^[163]. Für jedes Quadrat-Ångström zugänglicher Oberfläche, das nicht mehr in Kontakt mit der wäßrigen Lösung steht, wird ein Energiebetrag von 105 J mol^{-1} gewonnen^[160-162].

Werden die aus Messungen der Beladungskinetik berechneten $\Delta\Delta G_1$ -Werte der natürlich vorkommenden Aminosäuren gegen die aus van-der-Waals-Radien berechneten^[164] zugänglichen freien Oberflächen S_{aa} aufgetragen, zeigen sich deutlich lineare Abhängigkeiten (Abb. 1)^[120].

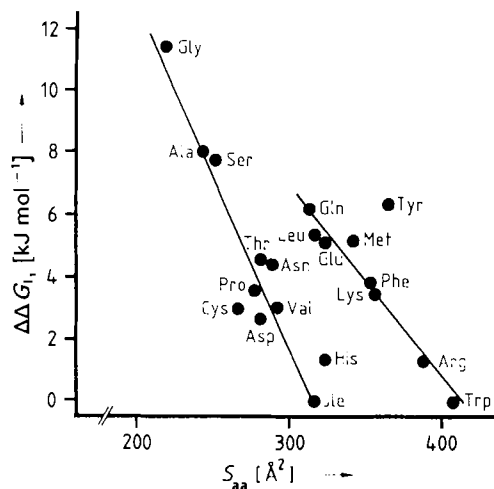


Abb. 1. Abhängigkeit der Differenzen der freien Bindungsenthalpien $\Delta\Delta G_1$ von der zugänglichen freien Oberfläche S_{aa} der Aminosäuren.

Auffälligerweise sind zwei Gruppen von Aminosäuren zu unterscheiden; die erste umfaßt Moleküle mit kleineren Oberflächen und kürzeren Seitenketten als Isoleucin, die zweite diejenigen mit größeren Oberflächen und längeren Seitenketten. Die Steigungen der Geraden entsprechen Beträgen an freier Enthalpie von $111 \text{ J mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$ und $61 \text{ J mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$; diese Werte stimmen gut mit den für hydrophobe Wechselwirkungen zu erwartenden Werten überein. Der Schnittpunkt der ersten Geraden mit der Ordinate gibt die freie Enthalpie wieder, mit der Isoleucin an das Enzym gebunden wird. Dieser Betrag von $34.93 \text{ kJ mol}^{-1}$ hat die gleiche Größenordnung wie der in Abschnitt 4.1.1 angegebene Wert der freien Standardbindungsenthalpie ($\Delta G^0 = -31.80 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Die Einteilung der Aminosäuren in zwei Gruppen läßt sich leicht durch ein einfaches, hypothetisches Modell der Aminosäurebindungsstelle des Enzyms erklären (Abb. 2)^[120]. Eine Bindungswanne, die der Seitenkette des Isoleucins angepaßt ist, wird durch eine zapfenartige Atomgruppe („stopper“) begrenzt. Kleinere Aminosäuren können in dieser Wanne gebunden werden; bei der Bindung größerer Aminosäuren muß die „stopper“-Gruppe aus ih-

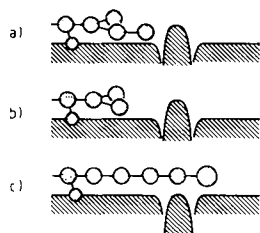


Abb. 2. Anfängliche Bindungsstelle mit a) Isoleucin: Die Bindungswanne ist mit der Isoleucinseitenkette vollständig ausgefüllt; b) Valin: Die Bindungswanne ist nur teilweise ausgefüllt, es fehlt an der freien Bindungsenthalpie der Wert, der der Differenz an freier zugänglicher Oberfläche entspricht ($\Delta\Delta G_{II}$); c) Lysin: Die Lysinseitenkette muß bei ihrer Bindung die „stopper“-Gruppe zur Seite drücken. Für die erste Gruppe in Abb. 1 gilt $\Delta\Delta G_{II} = 111 (S_{IIc} - S_{aa})$ [J mol^{-1}]; für die zweite Gruppe in Abb. 1 gilt $\Delta\Delta G_{II} = 61 (S_{IIc} - S_{aa}) + 6000$ [J mol^{-1}]. (S_{IIc} = zugängliche freie Oberfläche von Isoleucin, S_{aa} = zugängliche freie Oberfläche der übrigen Aminosäuren).

rer Position gedrückt werden, was einen Energiebetrag erfordert, der durch den Abstand der beiden Geraden in Höhe der Isoleucin-Oberfläche wiedergegeben wird (6 kJ mol^{-1}).

Für die aus *E. coli* isolierte Isoleucyl-tRNA-Synthetase ergibt sich ein sehr ähnliches Bild^[120]. Man findet die gleiche Einteilung der Aminosäuren in zwei Gruppen, mit dem Unterschied, daß Leucin hier zur ersten Gruppe gehört, die die Aminosäuren von Glycin bis Isoleucin umfaßt, und daß alle $\Delta\Delta G_{II}$ -Werte geringfügig höher als beim Hefeenzym liegen (z. B. $\Delta\Delta G_{II} = 3.87 \text{ kJ mol}^{-1}$ statt 3.08 kJ mol^{-1} für Valin). Diese Beobachtung deutet auf ähnliche, nur geringfügig anders strukturierte Bindungsstellen hin.

Analog zu den $\Delta\Delta G_{II}$ -Werten berechnete $\Delta\Delta G_{III}$ -Werte hängen nicht signifikant von den zugänglichen freien Oberflächen der Aminosäuren ab. Allgemein läßt sich sagen, daß für beide Enzyme die $\Delta\Delta G_{III}$ -Werte um einen Betrag von 10 kJ mol^{-1} streuen, und daß – anders als an der initialen Bindungsstelle – an der hydrolytischen Bindungsstelle hydrophobe Wechselwirkungen keine entscheidende Rolle spielen. Völlig unklar bleibt, durch welche sterischen Einflüsse das kognate Isoleucyladenylat von der Hydrolyse weitestgehend verschont bleibt.

5.2. Unterscheidung der Aminosäuren bei der Aminoacylierung von tRNA-C-C-A

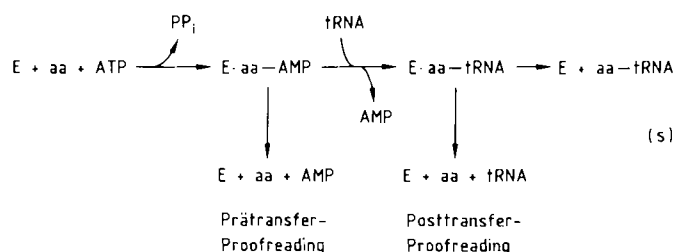
Die vorläufig für Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe aus den kinetischen Konstanten k_{cat} und K_m berechneten Diskriminationsfaktoren D liegen für die neunzehn nicht-kognaten, in Proteinen enthaltenen Aminosäuren alle um das drei- bis über zweihundertfache höher als die Diskriminationsfaktoren D_1 , die bei der Beladung der tRNA-C-C-A(3'-NH₂) **22** bestimmt wurden^[165].

Unerwartet niedrige D -Werte (300–700) wurden für die Aminosäuren Cystein, Asparaginsäure, Asparagin und Tryptophan gefunden, doch sind neuerdings auch bei in-vivo-Experimenten für einige Aminosäuren Fehlerraten in ähnlich niedriger Höhe festgestellt worden (Cystein anstelle von Arginin 1:1700^[166], Lysin anstelle von Arginin 1:500^[167]). Die höchsten Diskriminationsfaktoren beim Hefeenzym ergaben sich für Leucin, Serin, Methionin, Glycin (10 000–20 000) und Valin (38 000). Die zu den übrigen Aminosäuren gehörenden Faktoren liegen in einem mittleren Bereich zwischen 2000 und 10 000.

Das aus *E. coli* isolierte Enzym zeigt dagegen Diskriminationsfaktoren zwischen 600 und 72 000; dabei wurden die niedrigsten Werte (600–3000) ebenfalls für Cystein, Tryptophan und Arginin gefunden. Die höchsten D -Werte haben Glycin, Alanin und Valin ($\approx 70 000$), die D -Werte der anderen Aminosäuren liegen zwischen 20 000 und 50 000^[165].

Überraschenderweise scheint es für beide Organismen wichtig zu sein, den Fehleinbau der Aminosäuren zu vermeiden, die Isoleucin strukturell am ähnlichsten sind; es dürfte also zumindest nicht immer gleichgültig sein, ob z. B. in einer Peptidsequenz ein Isoleucylrest durch den sehr ähnlichen Valylrest ersetzt wird. Beiden Organismen gemeinsam ist auch die geringe Fähigkeit, zwischen Isoleucin und Cystein, Tryptophan oder Arginin zu unterscheiden.

Zusammen mit den höheren D -Werten werden bei der Aminoacylierung der natürlichen tRNA-C-C-A **5** auch höhere AMP-Bildungsraten beobachtet als bei der Acylierung der tRNA-C-C-A(3'-NH₂) **22** (vgl. Tabelle 4). Die Ursache dafür dürfte ein zweiter hydrolytischer Korrekturschritt sein, den das Enzym nach dem Transfer der Aminosäure auf die tRNA ausführt (Posttransfer-Proofreading). Die noch am Enzym gebundenen hydrolyseempfindlichen Aminoacyl-tRNA-Ester können bei Übertragung einer falschen Aminosäure auf die tRNA teilweise schneller hydrolysiert werden als Isoleucyl-tRNA^[28, 110, 168] [vgl. (s)].



Die Proofreading-Faktoren des Prätransfer- (Π_1) und des Posttransfer-Schrittes (Π_2) multiplizieren sich dann zum Gesamt-Proofreading-Faktor Π' . Unter der Voraussetzung, daß bei der Aminoacylierung der nativen tRNA-C-C-A **5** das Prätransfer-Proofreading in gleichem Ausmaße erfolgt wie bei der Acylierung von tRNA-C-C-A(3'-NH₂) **22**, läßt sich der Faktor Π_2 angenähert als Quotient aus Π' und Π_1 bestimmen.

Diese Proofreading-Faktoren Π_2 sind beim Hefeenzym sehr viel kleiner als die Faktoren Π_1 des Prätransfer-Schrittes; nur in sieben Fällen erhöht dieser Vorgang überhaupt den Diskriminationsfaktor D ($\Pi_2 \geq 1$). Dieser zweite Hydrolyseschritt dient bemerkenswerterweise fast nur dazu, die Unterscheidung von Isoleucin und Valin zu verbessern ($\Pi_2 \approx 3$), für die Spezifität gegenüber elf anderen Aminosäuren ergeben sich sogar nachteilige Folgen ($\Pi_2 \leq 1$).

Auffälligerweise entspricht der Faktor Π_2 für Valin ($\Pi_2 \approx 3$) wieder der von Pauling berechneten freien Bindungsenthalpie einer Methylengruppe. Die Bindungsstelle, an der der zweite hydrolytische Korrekturschritt erfolgt, scheint ausschließlich für die Unterscheidung einer Isobutyl- von einer Isopropylgruppe zu sorgen, während die übrigen Aminoacylreste wohl sterisch bedingt je nach Mög-

lichkeit schneller oder langsamer als ein Isoleucylrest abgespalten werden.

Für analog zu den $\Delta\Delta G_{\Pi_1}$ -Werten berechnete $\Delta\Delta G_{\Pi_2}$ -Werte ergibt sich ebenfalls keine systematische Zuordnung zur zugänglichen freien Oberfläche oder irgendwelchen anderen Strukturmerkmalen der Aminosäuren.

Analog zu den Diskriminationsfaktoren D_1 sind die Faktoren D für die Aminoacylierung von natürlicher tRNA-C-C-A ebenfalls als Produkt eines durch unterschiedliche freie Bindungsenthalpien verursachten Faktors (I') und eines Proofreading-Faktors (Π') aufzufassen [Gl. (t)]:

$$D = I' \Pi' \quad (t)$$

Die Faktoren I' lassen sich wiederum aus den Werten von D und Π' berechnen. Alle I' -Werte sind höher als die I_1 -Werte; so ergibt sich z.B. für Valin ein $\Delta\Delta G_{I'}$ -Wert von $14.25 \text{ kJ mol}^{-1}$ [165], also ein etwa viermal höherer Betrag als bei der Aminoacylierung von tRNA-C-C-A(3'NH₂). Ähnlich hohe Werte wurden auch schon aus kinetischen Konstanten der mit Isoleucin und Valin ablaufenden Aktivierungsreaktion berechnet [157, 158]. Die Ursache für diesen beträchtlichen Unterschied ist bisher noch unbekannt; es kann vermutet werden, daß die in Abschnitt 4.1.1 erwähnte Konformationsänderung des Enzyms bei der Bindung von Isoleucin mit diesem Phänomen verknüpft ist. Da im Falle der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase beträchtliche Unterschiede in der Komplexbildungskinetik für die Komplexe Enzym-tRNA-C-C-A und für die Komplexe aus Enzym und modifizierten tRNAs beobachtet wurden [169, 170], liegt die Vermutung nahe, daß bei der Aminoacylierung von tRNA-C-C-A(3'NH₂) eine durch die Bindung von Isoleucin ausgelöste Konformationsänderung („induced fit“) ausbleibt, die im Falle der Acylierung von tRNA-C-C-A die Isoleucin-Bindungsstelle verändert und die hydrophobe Wechselwirkung verstärkt. Ein aus diesem Prozeß resultierender Faktor I_2 müßte sich mit I_1 zu I' multiplizieren, so daß für D Gleichung (u) gilt

$$D = I_1 \cdot I_2 \cdot \Pi_1 \cdot \Pi_2 \quad (u)$$

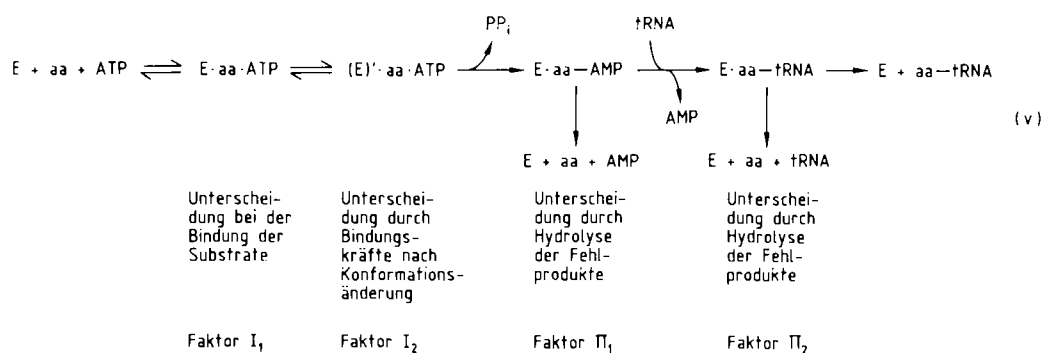
und der Gesamtvorgang der Aminosäureauswahl [Schema (v)] nach dem erweiterten Schema der Aminoacylierung von tRNA-C-C-A(NH₂) [(q) in Abschnitt 5.1] ablaufen dürfte.

Die zu den Faktoren I_2 berechneten $\Delta\Delta G_{I_2}$ -Werte zeigen wiederum lineare Abhängigkeiten von den zugänglichen freien Oberflächen der Aminosäuren, doch lassen sich die

Aminosäuren hier nicht, wie bei den $\Delta\Delta G_{I_1}$ -Werten, in zwei, sondern in drei Gruppen einteilen, deren Bedeutung noch nicht geklärt ist.

6. Modulation von Spezifität und Energieverbrauch

Für die in Tabelle 2 aufgeführten Katalysewege und Reaktionsbedingungen schwanken die k_{cat} -Werte des Hefeenzym im Bereich von 0.098 bis 1.40 s^{-1} . Da diese Werte direkt die Diskriminationsfaktoren D bestimmen, ist zu erwarten, daß Isoleucyl-tRNA-Synthetase je nach den Reaktionsbedingungen auch unterschiedliche Substratspezifitäten aufweist. Tatsächlich variieren die für die gleichen Reaktionsbedingungen aus den k_{cat} - und K_m -Werten bestimmten Diskriminationsfaktoren für die Unterscheidung von Isoleucin und Valin von 2000 bis 38 000 (Tabelle 4) [139]. Der Verbrauch von ATP und die entsprechende Bildung von AMP liegen bei der Synthese von Ile-tRNA^{Ile}-C-C-A beim Hefeenzym zwischen 3.0 und 6.9, beim *E. coli*-Enzym zwischen 1.0 und 1.73 Molekülen AMP pro Molekül Aminoacyl-tRNA [139, 165]. Bei der Synthese des Fehlproduktes Val-tRNA^{Ile}-C-C-A schwankt die AMP-Bildung von 118 bis 1165 bzw. 530 bis 2700 Molekülen pro Molekül Aminoacyl-tRNA. Parallel zu den D -Werten ändern sich mit gleicher Tendenz auch die Diskriminationsfaktoren, die für das Hefeenzym unter verschiedenen Reaktionsbedingungen bei der Beladung von tRNA^{Ile}-C-C-3'dA mit Isoleucin und Valin bestimmt wurden [139] (Tabelle 4). Diese sonst eigentlich D_2 genannten Werte gleichen im Falle von Valin praktisch den D_1 -Werten, die bei der Beladung von tRNA^{Ile}-C-C-A(3'NH₂) erhalten werden, und lassen sich ebenso wie die mit tRNA^{Ile}-C-C-3'dA bestimmten AMP-Bildungsraten zur Berechnung der Faktoren I_1 , I_2 , Π_1 und Π_2 benutzen. Die Faktoren D_2 ($\cong D_1$) betragen 48 bis 180, während die Anzahl der pro Molekül Aminoacyl-tRNA gebildeten AMP-Moleküle bei der Beladung mit Isoleucin zwischen 1.1 und 3.12 und bei der Beladung mit Valin zwischen 13 und 96 liegt. Für das Enzym aus *E. coli* wurden D_1 -Werte zwischen 100 und 4400 bestimmt, und bei der Beladung mit Isoleucin werden 1.0 bis 1.7, bei der Beladung mit Valin 2.6 bis 24 Moleküle ATP verbraucht [120]. Beim Vergleich der wie vorher berechneten Einzelfaktoren I_1 , I_2 , Π_1 und Π_2 fällt auf, daß beim Hefeenzym in einem Falle (pH 6.5, 0.1 M KCl, 15 mM Mg²⁺) der Proofreading-Faktor Π_2 größer ist als Π_1 , während für alle anderen Bedingungen das Umgekehrte gilt. Wie in Tabelle 2 aufgeführt, reagiert das Enzym nur unter diesen Be-



dingungen nach einem ungeordneten Mechanismus, d. h. die Substrate werden in beliebiger Reihenfolge an das Enzym addiert und die Produkte in beliebiger Folge abgegeben. Dieser Mechanismus scheint sich also von den anderen dadurch zu unterscheiden, daß das Enzym hier in einer Konformation vorliegt, in der es mit dem Posttransfer-Proofreading effektiver arbeitet als mit dem Prätransfer-Proofreading. Bestätigt wird diese Annahme durch die bisher vom *E.-coli*-Enzym bekannten Reaktionswege. Diese Synthetase arbeitet bei pH 7.65 ebenfalls nach einem ungeordneten Mechanismus (Tabelle 3), und auch in diesem Falle ist der Proofreading-Faktor Π_2 etwa doppelt so groß wie der Faktor Π_1 . Damit bestätigt sich auch die Vermutung, daß das Auftreten der verschiedenen Katalysewege, die sich in der Reihenfolge der Substrataddition und Produktabgabe unterscheiden, mittelbar mit der Spezifität des Enzyms verknüpft ist.

Die Isoleucyl-tRNA-Synthetasen haben also vielfältige Möglichkeiten, ihre Spezifität zu verändern. Zum einen können sie mit verschiedenartigen katalytischen Cyclen arbeiten, die durch unterschiedliche Reihenfolgen von Substrataddition und Produktabgabe charakterisiert sind, zum anderen können sie in diesen Katalysecyclen auch mit verschiedenen Geschwindigkeiten arbeiten. Somit dürften sich die Enzyme durch Wahl der Reaktionsbedingungen auf nahezu beliebige Spezifitätsgrade einstellen lassen. In jedem Falle muß die Spezifität jedoch mit Energieverbrauch bezahlt werden. Unter den Bedingungen in Tabelle 2, die den physiologischen am nächsten kommen mögen (pH 7.65, 0.1 M KCl, 1 mM Mg^{2+} , EF-Tu·GTP, PPase, Spermin), liegen Spezifität und Energieverbrauch der Enzyme im mittleren Bereich (Hefeenzym: $D=10\,500$, 3.4 AMP/Isoleucyl-tRNA; *E.-coli*-Enzym: $D=40\,600$, 1.04 AMP/Isoleucyl-tRNA).

7. Zusammenfassung und Ausblick

Obwohl in den letzten zwanzig Jahren beträchtliche Fortschritte bei der Erforschung der Proteinbiosynthese und der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erzielt worden sind und sich in Hunderten von Publikationen niedergeschlagen haben, sind wir auch heute noch weit davon entfernt, die Funktionsweise dieser Enzyme vollständig zu verstehen. Da es noch keine sichere Kenntnis der Struktur des aktiven Zentrums, der beteiligten reaktiven Gruppen sowie eventuell gebildeter Zwischenprodukte gibt, ist selbst der genaue chemische Ablauf der Aminosäureaktivierung und -übertragung auf die tRNA noch als unbekannt anzusehen.

Die kinetischen Untersuchungen zeigen, daß das Enzymmolekül viele Möglichkeiten zu sinnvollen Konformationsänderungen haben muß und in diesen verschiedenen Formen mit verschiedenen katalytischen Cyclen arbeitet. Über die Art der Konformationswechsel, die dabei auftreten können, gibt es bis heute überhaupt keine Vorstellungen. Selbst wenn eines Tages Röntgenstrukturanalysen von Enzym-Substrat-Komplexen zur Verfügung stehen sollten, dürfte es schwer sein, derartige Vorgänge aufzuklären, da die Moleküle dabei nur in „eingefrorenen“, für die Kristallbildung günstigen Zuständen vorliegen. Wahrscheinlich sind die Konformationsänderungen mit einer „Prote-

inbeben“ („proteinquake“) genannten Wellenbewegung verbunden, wie sie für Myoglobin postuliert wurde^[17].

Die hohe Spezifität der Enzyme, die zunächst rätselhaft war, kann nur in einem vierstufigen Prozeß erreicht werden, da die Strukturunterschiede der Aminosäuren sehr gering sind. In den vier Schritten sind sterische Anpassung und hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Enzym entscheidend. Damit kann die Spezifität auf einfache, bekannte Phänomene zurückgeführt werden.

Das Zusammenwirken dieser bekannten Phänomene hat allerdings die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zu einem neuen Typ von Enzymen werden lassen, denn sie können praktisch auf jeden beliebigen Spezifitätsgrad eingestellt werden. Hohe Spezifität erfordert hohen Energieverbrauch; in der Zelle scheint z. B. für Valin ein mittlerer Diskriminationsfaktor (Hefeenzym: $D=10\,000$; *E.-coli*-Enzym: $D=40\,000$) bei mittlerem Energieverbrauch verwendet zu werden. Im Falle der Isoleucyl-tRNA-Synthetasen enthält der prokaryontische Organismus *Escherichia coli* anscheinend ein genauer arbeitendes Enzym als der eukaryontische Hefeorganismus.

Anhang

Erläuterungen zu Struktur und Synthese von ATP-Analoga

N^6 -Methyladenosin-5'-triphosphat (m^6 ATP) **17a** kann aus 6-Chlorpurin wie folgt hergestellt werden: Umsetzung zum 6-Chlorpurinribosid [172, 173], Substitution des reaktiven Chloratoms in Position 6 durch Methylamin [173, 174], Phosphorylierung und Triphosphatsynthese.

2-Chlor- (cl^2 ATP) **17b** und 8-Bromadenosin-5'-triphosphat (br^8 ATP) **17c** weisen verschiedene Konformationen an der Glycosylbindung auf. cl^2 ATP liegt wie das natürliche Substrat ATP in der *anti*-Konformation vor; darin ist der Adenylrest von der Ribose weggerichtet [75, 175, 176]. In br^8 ATP ist dagegen das Bromatom von der Ribose weggerichtet, so daß das Purinring-system sich über dem Zucker befindet [177, 178]. Diese Anordnung wird als *syn*-Konformation bezeichnet [175, 176]. Von den modifizierten Nucleosiden, die diesen beiden ATP-Analoga zugrunde liegen, kann 8-Bromadenosin durch Bromierung von Adenosin hergestellt werden [179, 180]. 2-Chloradenosin muß aus 2,6-Dichlorpurin durch Umsetzung zum Ribosid und Substitution des Chlors in Position 6 durch Ammoniak synthetisiert werden [181]. 7-Desazaadenosin, genannt Tubercidin, wird aus *Streptomyces tubercidicus* isoliert [77, 79, 182, 183]. Wegen des fehlenden Stickstoffatoms in Position 7 kann Tubercidin-5'-triphosphat (TuTP) **17d** keinen Mg^{2+} -Komplex mit Koordination des Mg^{2+} -Ions an dieses Stickstoffatom bilden. NMR-spektroskopische Untersuchungen an Tubercidin und Tubercidin-5'-phosphat zeigten, daß das heterocyclische System leicht um die Glycosylbindung drehbar ist und weder die *anti*- noch die *syn*-Konformation bevorzugt ist [184].

2'- und 3'-Desoxyadenosin sind beide natürlichen Ursprungs, 2'-Desoxyadenosin als Bestandteil der DNA, 3'-Desoxyadenosin (auch Cordycepin genannt) als Stoffwechselprodukt des Mikroorganismus *Cordyceps militaris* [77, 79, 185]. 2'- und 3'-Methoxyadenosin können leicht durch Methylierung von Adenosin mit Diazomethan erhalten werden [186, 187]. Die vier Nucleosid-Analoga werden wie oben zu den Triphosphaten umgesetzt.

Grundlagen der „initial rate“-Kinetik

Wenn die Geschwindigkeit der tRNA-Aminoacylierung in Abhängigkeit von der Konzentration eines der drei Substrate gemessen wird, erhält man beim Auftragen der reziproken Geschwindigkeit gegen die reziproke Konzentration bei allen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen klassische, lineare Lineweaver-Burk-Plots [188], die sich von der bekannten Michaelis-Menten-Gleichung [189] ableiten. Aus den Achsenabschnitten lassen sich die Konstanten K_m (Michaelis-Konstante; Abszissenabschnitt: $1/K_m$) und V (Maximalgeschwindigkeit; Ordinatenabschnitt: $1/V$) bestimmen. Abbildung 3 zeigt die charakteristischen Veränderungen des Lineweaver-Burk-Plots, die durch Inhibitoren (I) verschiedener Typen im Reaktionsgemisch bewirkt werden.



Bei der einfachsten enzymatischen Reaktion [vgl. (w)], bei der nur ein Substrat umgesetzt wird, würde ein kompetitiver Inhibitor, durch dessen Zusatz nur die Steigung der Gerade verändert wird, mit E einen E·I-Komplex bilden, der dann nicht mehr weiter reagiert. Wenn I nicht mit E, sondern mit

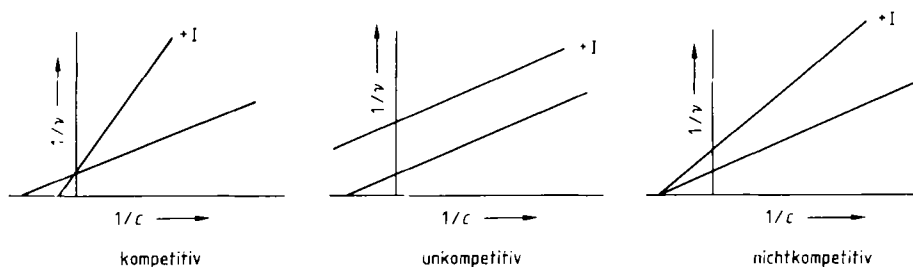
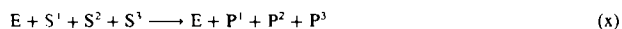


Abb. 3. Lineweaver-Burk-Plots für Enzymreaktionen mit und ohne Inhibitoren. c = Substratkonzentration, v = Reaktionsgeschwindigkeit (siehe Text).

$E \cdot S$ zu $E \cdot S \cdot I$ reagiert, wird nicht die Steigung der Geraden verändert, sondern nur der Schnittpunkt mit der $1/v$ -Achse, die Gerade also parallel verschoben. Dieser Inhibitortyp wird unkompetitiv genannt. Kann I sowohl mit E als auch mit $E \cdot S$ reagieren, werden Steigung und Schnittpunkt mit der $1/v$ -Achse verändert, es handelt sich um einen nichtkompetitiven Inhibitor [127–129].

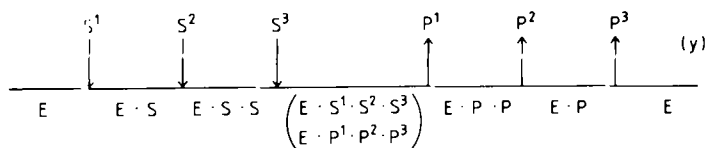
Während die Beobachtung von nichtkompetitiven Inhibitoren unter den modifizierten tRNAs auf eine zweite Bindungsstelle für dieses Substrat hindeutet, kann dieser Schluß im Falle der ATP-Analoga jedoch nicht gezogen werden, da für das „kleine“ Substrat ATP auch Bindungen an den hydrophoben Teil der Aminosäure-Bindungsstelle [190] und unspezifische Bindungen an die Aminoacyl-tRNA-Synthetase bekannt sind [191].

Bei der Aminoacylierungsreaktion werden statt des einen drei Substrate umgesetzt [vgl. (x)]:



Hier hängt der Inhibitortyp zusätzlich davon ab, welches der drei Substrate als variables Substrat für den Lineweaver-Burk-Plot gewählt wird. Ein Inhibitor kann beispielsweise kompetitiv sein, wenn die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproke Konzentration von S^1 aufgetragen wird, dagegen nichtkompetitiv erscheinen, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Konzentration von S^2 oder S^3 betrachtet wird. In welcher Weise sich der Typ des kompetitiven Inhibitors mit dem variablen Substrat verändert, hängt vom Reaktionsmechanismus ab, das heißt in diesem Falle von der Reihenfolge, in der die drei Substrate mit dem Enzym zu Enzym-Substrat-Komplexen reagieren. Die zu erwartenden Inhibitortypen sind für nahezu alle möglichen Enzymmechanismen in Tabellen zusammengefaßt [127–129].

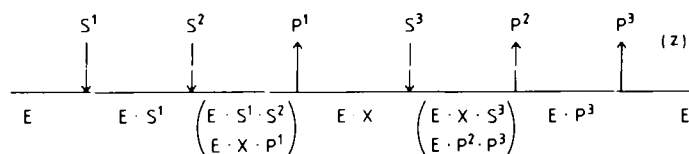
Stehen drei Inhibitoren zur Verfügung, die zu je einem Substrat ein kompetitives Verhalten zeigen, erhält man ein charakteristisches Inhibitionsmuster, wenn man jeweils auch die anderen beiden Substrate als variable Substrate benutzt. Dieses charakteristische Muster von neun Inhibitionstypen ermöglicht es, den dazugehörigen Mechanismus (Reihenfolge der Substrataddition) zu identifizieren. In Tabelle 5 sind als Beispiele die entsprechenden Inhibitionsmuster für zwei auch bei Isoleucyl-tRNA-Synthetasen gefundene Mechanismen angegeben (vgl. Tabellen 2 und 3). Beim ersten werden die Substrate in der festgelegten Reihenfolge S^1 , S^2 , S^3 addiert, dann findet die Umsetzung zu den Produkten statt, die in der Reihenfolge P^1 , P^2 , P^3 abgegeben werden. In der dafür üblichen Schreibweise [130] wird dies wie in (y) dargestellt.



Dabei ist die Reaktionssequenz von links nach rechts geschrieben, das Enzym wird durch eine waagerechte Linie repräsentiert, und Substrataddition und Produktabgabe werden durch senkrechte Pfeile angezeigt. Die Zahl der in einer Richtung addierten Substrate oder abgegebenen Produkte wird mit den Silben „Uni“, „Bi“ und „Tri“ bezeichnet. Wenn alle Substrate addiert werden müssen, bevor irgendein Produkt vom Enzym dissoziiert, handelt es sich um einen sequentiellen („sequential“) Mechanismus, wenn ein oder mehrere Produkte entlassen werden, bevor alle Substrate an das Enzym addiert worden sind, um einen Ping-pong-Mechanismus. Wenn die Reihenfolge, in der Substrate addiert oder Produkte abgegeben werden, festgelegt ist, wird von geordneten („ordered“) Mechanismen gesprochen, ist die Reihenfolge beliebig, von ungeordneten („random“) Mechanismen.

Der Mechanismus (y) muß also als sequentiell geordnet Ter-Ter bezeichnet werden.

Beim zweiten, einem geordneten Bi-Uni Uni-Bi Ping-pong-Mechanismus, werden erst die Substrate S^1 und S^2 addiert, dann wird das Produkt P^1 entlassen und das Substrat S^3 addiert; schließlich werden die Produkte P^2 und P^3 abgegeben [vgl. (z): X = Zwischenprodukt].



Die zu den beiden Reaktionswegen gehörenden Inhibitionsmuster (Tabelle 5) unterscheiden sich in zwei Positionen und ermöglichen somit eine eindeutige Zuordnung der Mechanismen.

Tabelle 5. Inhibitionsmuster des sequentiell geordneten und des geordneten Ping-pong-Mechanismus nach den Schemata (y) bzw. (z) (k = kompetitiv, u = unkompetitiv, n = nichtkompetitiv).

Inhibitor	Sequentiell, geordnet (y)			Inhibitor	Ping-pong, geordnet (z)		
	Variables Substrat S^1	S^2	S^3		Variables Substrat S^1	S^2	S^3
I^1	k	n	n	I^1	k	n	u
I^2	u	k	n	I^2	u	k	u
I^3	u	u	k	I^3	u	u	k

Eingegangen am 22. Dezember 1986,
veränderte Fassung am 5. Juni 1987 [A 675]

- [1] M. B. Hoagland, *Biochim. Biophys. Acta* 16 (1955) 288.
- [2] J. A. DeMoss, G. D. Novelli, *Biochim. Biophys. Acta* 18 (1955) 592.
- [3] P. Berg, *J. Biol. Chem.* 222 (1956) 1025.
- [4] M. B. Hoagland, E. B. Keller, P. C. Zamecnik, *J. Biol. Chem.* 218 (1956) 345.
- [5] M. B. Hoagland, P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, *Biochim. Biophys. Acta* 24 (1957) 215.
- [6] M. B. Hoagland, M. L. Stephenson, J. F. Scott, L. I. Hecht, P. C. Zamecnik, *J. Biol. Chem.* 231 (1958) 241.
- [7] P. C. Zamecnik, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34 (1969) 1.
- [8] R. B. Loftfield, *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 12 (1972) 87.
- [9] L. I. Kisselev, O. O. Favorova, *Adv. Enzymol.* 40 (1974) 141.
- [10] D. Söll, P. R. Schimmel in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 10, 3. Aufl., Academic Press, New York 1974, S. 489.
- [11] F. Kalousek, W. Konigsberg, *MTP Int. Rev. Sci. Biochem. Ser. One* 7 (1975) 57.
- [12] A. Joachimiak, J. Barciszewski, *FEBS Lett.* 119 (1980) 201.
- [13] D. Kern, R. Giegé, J. P. Ebel, *Biochemistry* 20 (1981) 5156.
- [14] A. R. Fersht, M. M. Kaethner, *Biochemistry* 15 (1976) 818.
- [15] R. S. Mulvey, A. R. Fersht, *Biochemistry* 15 (1976) 243.
- [16] S. Blanquet, M. Iwatsubo, J. P. Waller, *Eur. J. Biochem.* 36 (1973) 213.
- [17] J. M. Berther, P. Mayer, H. Dutler, *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 151.
- [18] F. Fasiolo, J. P. Ebel, *Eur. J. Biochem.* 49 (1974) 257.
- [19] F. Fasiolo, P. Remy, J. Pouyet, J. P. Ebel, *Eur. J. Biochem.* 50 (1974) 227.
- [20] G. Krauss, A. Pingoud, D. Boehme, D. Riesner, F. Peters, G. Maass, *Eur. J. Biochem.* 55 (1975) 517.
- [21] G. Krauss, D. Riesner, G. Maass, *Eur. J. Biochem.* 68 (1976) 81.

- [22] R. B. Loftfield, E. A. Eigner, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 1746.
- [23] T. N. E. Lövgren, J. Heinonen, R. B. Loftfield, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 3854.
- [24] M. P. Deutscher, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 1132.
- [25] R. Parfait, H. Grosjean, *Eur. J. Biochem.* 30 (1972) 242.
- [26] A. N. Baldwin, P. Berg, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 831.
- [27] A. Duvekić, J. Flossdorf, M.-R. Kula, *Eur. J. Biochem.* 36 (1973) 528.
- [28] F. von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* 15 (1976) 4131.
- [29] F. von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* 17 (1978) 3139.
- [30] T. Webster, H. Tsai, M.-R. Kula, G. A. Mackie, P. Schimmel, *Science (Washington, D.C.)* 226 (1984) 1315.
- [31] D. G. Barker, J.-P. Ebel, R. Jakes, C. J. Bruton, *Eur. J. Biochem.* 127 (1982) 449.
- [32] G. Winter, G. L. E. Koch, B. S. Hartley, D. G. Barker, *Eur. J. Biochem.* 132 (1983) 383.
- [33] P. Hoben, N. Royal, A. Cheung, F. Yamao, K. Biemann, D. Söll, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 11644.
- [34] G. P. Winter, B. S. Hartley, *FEBS Lett.* 80 (1977) 340.
- [35] S. D. Putney, N. J. Royal, H. Neumann de Vegvar, W. C. Herlith, K. Biemann, P. Schimmel, *Science (Washington, D.C.)* 213 (1981) 1497.
- [36] D. G. Barker, C. J. Bruton, G. Winter, *FEBS Lett.* 150 (1982) 419.
- [37] J. Amiri, H. Mejdoub, N. Hounwanou, Y. Boulanger, J. Reinbolt, *Biochimie* 67 (1985) 607.
- [38] W. Freist, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 131 (1983) 65.
- [39] A. R. Fersht, J.-P. Shi, J. Knill-Jones, D. M. Lowe, A. J. Wilkinson, D. M. Blow, P. Brick, P. Carter, M. M. Y. Waye, G. Winter, *Nature (London)* 314 (1985) 235.
- [40] F. Fasiolo, A. R. Fersht, *Eur. J. Biochem.* 85 (1978) 85.
- [41] A. R. Fersht, M. M. Kaethner, *Biochemistry* 15 (1976) 3342.
- [42] N. Piel, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig 1982.
- [43] J. H. Segel, *Enzyme Kinetics*, Wiley-Interscience, New York 1968, S. 80.
- [44] A. L. Lehninger: *Biochemie*, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1979, S. 168.
- [45] L. Stryer: *Biochemie*, Vieweg, Braunschweig 1979, S. 86.
- [46] D. E. Metzler: *Biochemistry*, Academic Press, New York 1977, S. 303.
- [47] G. D. Greville, P. K. Tubbs, *Essays Biochem.* 4 (1968) 155.
- [48] A. L. Lehninger: *Biochemie*, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1979, S. 449.
- [49] F. Lipmann, *Science (Washington, D.C.)* 173 (1971) 875.
- [50] G. S. Laland, T. L. Zimmer, *Essays Biochem.* 9 (1973) 31.
- [51] W. Schlumbohm, J. Vater, H. Kleinkauf, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366 (1985) 925.
- [52] T. Kuo, M. DeLuca, *Biochemistry* 8 (1969) 151.
- [53] M. Taccarino, P. Berg, *J. Mol. Biol.* 42 (1969) 151.
- [54] M. Kanda, K. Hori, T. Kurotsu, S. Miura, Y. Saito, *J. Biochem.* 96 (1984) 701.
- [55] P. Rainey, B. Hammer-Raber, M.-R. Kula, E. Holler, *Eur. J. Biochem.* 78 (1977) 239.
- [56] G. Lowe, B. S. Sproat, G. Tansley, P. M. Cullis, *Biochemistry* 22 (1983) 1229.
- [57] P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, C. M. Janeway, K. Randerath, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24 (1966) 91.
- [58] K. Randerath, C. M. Janeway, M. L. Stephenson, P. C. Zamecnik, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24 (1966) 98.
- [59] E. Rapaport, S. K. Svihovec, P. C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2653.
- [60] P. Plateau, J.-F. Mayaux, S. Blanquet, *Biochemistry* 20 (1981) 4654.
- [61] O. Goerlich, R. Foekler, E. Holler, *Eur. J. Biochem.* 126 (1982) 135.
- [62] J. L. Led, W. K. Switon, K. F. Jensen, *Eur. J. Biochem.* 136 (1983) 469.
- [63] S. P. Harnett, G. Lowe, G. Tansley, *Biochemistry* 24 (1985) 2908.
- [64] S. Z. Wahab, D. C. H. Yang, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 5286.
- [65] S. Z. Wahab, D. C. H. Yang, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 12735.
- [66] E. Rapaport, P. C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 3984.
- [67] P. C. Lee, B. R. Bochner, B. N. Ames, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6827.
- [68] A. Varshavsky, *Cell (Cambridge, Mass.)* 34 (1983) 711.
- [69] W. Freist, unveröffentlicht.
- [70] A. M. Pendergast, J. A. Traugh, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 11789.
- [71] O. Kennard, N. W. Isaacs, J. C. Coppola, A. J. Kirby, S. Warren, W. D. S. Motherwell, D. G. Watson, D. L. Wampler, D. H. Chenery, A. C. Larson, K. A. Kerr, L. R. di Sanseverino, *Nature (London)* 225 (1970) 333.
- [72] T. A. Glassman, C. Cooper, L. W. Harrison, T. J. Swift, *Biochemistry* 10 (1971) 843.
- [73] G. P. P. Kuntz, T. A. Glassman, C. Cooper, T. J. Swift, *Biochemistry* 11 (1972) 538.
- [74] V. Wee, I. Feldman, P. Rose, S. Gross, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 103.
- [75] M. Sundaralingam, *Biopolymers* 7 (1969) 821.
- [76] R. D. Cornelius, W. W. Cleland, *Biochemistry* 17 (1978) 3279.
- [77] Vgl. P. Roy-Burman: *Analogues of Nucleic Acid Components*, Springer, Berlin 1970.
- [78] Vgl. L. B. Townsend, R. S. Tipson (Hrsg.): *Nucleic Acid Chemistry*, Vol. 1, 2, Wiley, New York 1978.
- [79] R. J. Suhadolnik: *Nucleoside Antibiotics*, Wiley-Interscience, New York 1970.
- [80] W. Freist, F. Cramer in L. B. Townsend, R. S. Tipson (Hrsg.): *Nucleic Acid Chemistry*, Vol. 2, Wiley, New York 1978, S. 827.
- [81] K. H. Scheit: *Nucleotide Analogs*, Wiley-Interscience, New York 1980.
- [82] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* 1967, 5065.
- [83] D. E. Hoard, D. G. Ott, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 1785.
- [84] W. Freist, F. von der Haar, M. Sprinzl, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 64 (1976) 389.
- [85] W. Freist, F. von der Haar, H. Faulhammer, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 66 (1976) 493.
- [86] W. Freist, H. Sternbach, F. von der Haar, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 84 (1978) 499.
- [87] W. Freist, H. Wiedner, F. Cramer, *Bioorg. Chem.* 9 (1980) 491.
- [88] W. Freist, H. Sternbach, F. Cramer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362 (1981) 1247.
- [89] N. Piel, W. Freist, F. Cramer, *Bioorg. Chem.* 12 (1983) 18.
- [90] R. B. Loftfield, D. Vanderjagt, *Biochem. J.* 128 (1972) 1353.
- [91] S. Englisch, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig 1984.
- [92] E. Holler, P. Rainey, A. Orme, E. L. Bennett, M. Calvin, *Biochemistry* 12 (1973) 1150.
- [93] E. Holler, B. Hammer-Raber, T. Hanke, P. Bartmann, *Biochemistry* 14 (1975) 2496.
- [94] E. Holler, G. Schwarze, R. Scheibl, B. Hammer-Raber, *Biochemistry* 19 (1980) 5403.
- [95] Vgl. D. H. Gauss, F. von der Haar, A. Maelicke, F. Cramer, *Annu. Rev. Biochem.* 40 (1971) 1045.
- [96] M. Sprinzl, D. Gauss, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) r1.
- [97] M. Yarus, *Biochemistry* 11 (1972) 2352.
- [98] M. Mertes, M. A. Peters, W. Mahoney, M. Yarus, *J. Mol. Biol.* 71 (1972) 671.
- [99] W. Freist, H. Sternbach, *Biochemistry* 23 (1984) 5742.
- [100] Vgl. U. Englisch, D. Gauss, W. Freist, S. Englisch, H. Sternbach, F. von der Haar, *Angew. Chem.* 97 (1985) 1033; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 1015.
- [101] M. Sprinzl, F. Cramer, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 22 (1978) 1.
- [102] S. M. Hecht, *Tetrahedron* 33 (1977) 1671.
- [103] F. Cramer, F. von der Haar, E. Schlimme, *FEBS Lett.* 2 (1968) 136.
- [104] F. Hansske, F. Cramer, *Carbohydr. Res.* 54 (1977) 75.
- [105] F. von der Haar in J. Augustyniak (Hrsg.): *Biological Implications of Protein-Nucleic Acid Interactions*, Elsevier/North Holland, Amsterdam 1980, S. 325.
- [106] F. Cramer, H. Faulhammer, F. von der Haar, M. Sprinzl, H. Sternbach, *FEBS Lett.* 56 (1975) 212.
- [107] T. H. Fraser, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 2671.
- [108] M. Sprinzl, H. Sternbach, F. von der Haar, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 81 (1977) 579.
- [109] M. Sprinzl, F. Cramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3049.
- [110] F. von der Haar, F. Cramer, *FEBS Lett.* 56 (1975) 215.
- [111] B. E. Griffin, M. Jarmen, C. B. Reese, J. E. Sulston, D. R. Trentham, *Biochemistry* 5 (1966) 3638.
- [112] M. Taiji, S. Yokoyama, S. Higuchi, T. Miyazawa, *J. Biochem.* 90 (1981) 885.
- [113] M. Taiji, S. Yokoyama, T. Miyazawa, *Biochemistry* 22 (1983) 3220.
- [114] M. Taiji, S. Yokoyama, T. Miyazawa, *Biochemistry* 24 (1985) 5776.
- [115] F. Cramer, F. von der Haar, G. L. Igloi in P. R. Schimmel, D. Söll, J. N. Abelson (Hrsg.): *Transfer RNA: Structure, Properties, and Recognition*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1979, S. 267.
- [116] G. Wehmeyer, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig 1980.
- [117] G. L. Igloi, F. von der Haar, F. Cramer, *Methods Enzymol.* 59 (1979) 282.
- [118] T. H. Fraser, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3044.
- [119] E. Holler, M. Calvin, *Biochemistry* 11 (1972) 3741.
- [120] W. Freist, H. Sternbach, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 169 (1987) 33.
- [121] F. X. Cole, P. R. Schimmel, *Biochemistry* 9 (1970) 480.
- [122] M. Yarus, P. Berg, *J. Mol. Biol.* 42 (1969) 171.
- [123] T. N. E. Lövgren, A. Pastuszyn, R. B. Loftfield, *Biochemistry* 15 (1976) 2533.
- [124] S. S. M. Lam, P. R. Schimmel, *Biochemistry* 14 (1975) 2775.
- [125] P. R. Schimmel, *Acc. Chem. Res.* 6 (1973) 299.
- [126] A. R. Fersht, R. Jakes, *Biochemistry* 14 (1975) 3350.
- [127] Siehe z. B.: H. I. Fromm: *Initial Rate Enzyme Kinetics*, Springer, Berlin 1975.
- [128] I. H. Segel: *Enzyme Kinetics*, Wiley-Interscience, New York 1975.
- [129] K. M. Plowman: *Enzyme Kinetics*, McGraw-Hill, New York 1972.
- [130] W. W. Cleland, *Biochim. Biophys. Acta* 67 (1963) 104.
- [131] W. W. Cleland, *Biochim. Biophys. Acta* 67 (1963) 173.
- [132] C. F. Midelfort, A. H. Mehler, *Methods Enzymol.* 29 (1974) 627.
- [133] W. W. Cleland, *Biochim. Biophys. Acta* 67 (1963) 188.
- [134] W. W. Cleland in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 2, 3. Aufl., Academic Press, New York 1970, S. 1.

- [135] Y. Takeda, K. Matsuzaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59 (1974) 1302.
- [136] T. T. Sakai, S. S. Cohen, *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 17 (1976) 15.
- [137] T. N. E. Lövgren, A. Petersson, R. B. Loftfield, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 6702.
- [138] W. Freist, F. von der Haar, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 119 (1981) 151.
- [139] W. Freist, I. Pardowitz, F. Cramer, *Biochemistry* 24 (1985) 7014.
- [140] I. Slavik, A. Kotyk, *Biochim. Biophys. Acta* 766 (1984) 679.
- [141] J. Josse, S. C. K. Wong, in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 4, 3. Aufl., Academic Press, New York 1971, S. 499.
- [142] L. G. Butler in P. D. Boyer (Hrsg.): *The Enzymes*, Vol. 4, 3. Aufl., Academic Press, New York 1971, S. 529.
- [143] A. V. Furano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 4780.
- [144] A. Pingoud, C. Urbanke, G. Krauss, F. Peters, G. Maass, *Eur. J. Biochem.* 78 (1977) 403.
- [145] A. Pingoud, C. Urbanke, *Biochemistry* 19 (1980) 2108.
- [146] S. Tanada, M. Kawakami, T. Yoneda, S. Takemura, *J. Biochem. (Tokyo)* 89 (1981) 1565.
- [147] S. Tanada, M. Kawakami, K. Nishio, S. Takemura, *J. Biochem. (Tokyo)* 91 (1982) 291.
- [148] W. Freist, F. Cramer, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367 (1986) 331.
- [149] R. B. Loftfield, E. A. Eigner, A. Pastuszyn in D. R. Morris, L. J. Marton (Hrsg.): *Polyamines in Biology and Medicine*, Marcel Dekker, New York 1981, S. 207.
- [150] D. Veloso, R. W. Guynn, M. Oskarsson, R. L. Veech, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 4811.
- [151] W. Freist, H. Sternbach, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 128 (1982) 315.
- [152] R. E. Thiebe, *Nucleic Acids Res.* 5 (1978) 2055.
- [153] D. Kern, J. Gangloff, *Biochemistry* 20 (1981) 2065.
- [154] W. Freist, F. Cramer, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368 (1987) 229.
- [155] L. Pauling in: *Festschrift Prof. Dr. Arthur Stoll zum siebzigsten Geburtstag 1957*, Birkhäuser, Basel 1958, S. 597.
- [156] J. J. Hopfield, T. Yamane, V. Yue, S. M. Coutts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 1164.
- [157] A. R. Fersht, *Biochemistry* 16 (1977) 1025.
- [158] A. R. Fersht: *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, San Francisco 1977.
- [159] Y. Nozaki, C. Tanford, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 2211.
- [160] C. Chothia, *Nature (London)* 248 (1974) 338.
- [161] C. Chothia, *Nature (London)* 254 (1975) 304.
- [162] C. Chothia, *J. Mol. Biol.* 105 (1976) 1.
- [163] B. Lee, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* 55 (1971) 379.
- [164] C. Frömmel, *J. Theor. Biol.* 111 (1984) 247.
- [165] W. Freist, H. Sternbach, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 173 (1988) 27.
- [166] P. Edelmann, J. Gallant, *Cell (Cambridge, Mass.)* 10 (1977) 131.
- [167] N. Mori, Y. Funatsu, K. Hiruta, S. Goto, *Biochemistry* 24 (1984) 1231.
- [168] E. W. Eldred, P. R. Schimmel, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 2961.
- [169] G. Krauss, D. Riesner, G. Maass, *Nucleic Acids Res.* 4 (1977) 2253.
- [170] G. Krauss, F. von der Haar, G. Maass, *Biochemistry* 18 (1979) 4755.
- [171] A. Ansari, J. Berendzen, S. F. Bowne, H. Frauenfelder, I. E. T. Iben, T. B. Sauke, E. Shyamsunder, R. D. Young, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 5000.
- [172] J. Wempen, J. J. Fox, *Methods Enzymol.* 12 (1967) 63.
- [173] J. A. Johnson, H. J. Thomas, H. J. Schaeffer, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 699.
- [174] B. T. Walsh, R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 6221.
- [175] M. Sundaralingam, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 255 (1975) 3.
- [176] W. Saenger, *Angew. Chem.* 85 (1973) 680; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 12 (1973) 591.
- [177] S. S. Tavale, H. M. Sobell, *J. Mol. Biol.* 48 (1970) 109.
- [178] M. Ikehara, S. Vesugi, K. Yoshida, *Biochemistry* 11 (1972) 830.
- [179] E. J. Reist, D. F. Calkins, L. V. Fisher, L. Goodman, *J. Org. Chem.* 33 (1968) 1600.
- [180] R. E. Holmes, R. K. Robins, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 1242.
- [181] J. A. Montgomery, K. Hewson, *J. Heterocycl. Chem.* 1 (1964) 213.
- [182] K. Anzai, G. Nakamura, S. Suzuki, *J. Antibiot. Ser. A* 10 (1957) 201.
- [183] G. Nakamura, *J. Antibiot. Ser. A* 14 (1961) 90.
- [184] F. E. Evans, R. H. Sarma, *Cancer Res.* 35 (1975) 1458.
- [185] K. G. Cunningham, S. A. Hutchinson, W. Mason, F. S. Spring, *J. Chem. Soc.* 1951, 2299.
- [186] J. B. Gin, C. A. Dekker in W. W. Zorbach, R. S. Tipson (Hrsg.): *Nucleic Acid Chemistry. Vol. 1*, Interscience, New York 1968, S. 207.
- [187] D. M. G. Martin, C. B. Reese, G. F. Stephenson, *Biochemistry* 7 (1968) 1406.
- [188] H. Lineweaver, D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 658.
- [189] L. Michaelis, M. L. Menten, *Biochem. Z.* 49 (1913) 333.
- [190] C. Monteilhet, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* 122 (1978) 407.
- [191] G. Engel, H. Heider, A. Maelicke, F. von der Haar, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 29 (1972) 257.