

Fehlerhäufigkeit bei der Replikation und Expression der genetischen Information

Von Uwe Englisch*, Dieter Gauss, Wolfgang Freist, Sabine Englisch, Hans Sternbach und Friedrich von der Haar

Professor Friedrich Cramer gewidmet

Die biologische Evolution wird nur durch ständige Veränderungen in den Genomen der Zellen ermöglicht. Da trotzdem bei diesem Prozeß stabile Organismen entstehen, muß eine niedrige Fehlerhäufigkeit oder anders ausgedrückt eine hohe Genauigkeit bei der Weitergabe der genetischen Information und ihrer Umsetzung in Proteinsequenzen gewährleistet sein. Die Fehlerhäufigkeit dieses gesamten Vorgangs kann man messen und rechnerisch abschätzen: Sie ergibt sich aus den Fehlerhäufigkeiten der enzymatisch katalysierten Einzelschritte. In vielen Fällen, z. B. bei der Erkennung von Valin und Isoleucin während der Proteinbiosynthese, ist eine ausreichende Genauigkeit nicht allein aufgrund der unterschiedlichen Bindungsenergien des richtigen und des falschen Substrats zu erzielen (die beiden Aminosäuren unterscheiden sich nur durch eine CH_2 -Gruppe). Die erforderliche niedrige Fehlerhäufigkeit wird durch einen zusätzlichen Prüf- und gegebenenfalls Korrekturschritt erreicht, den die beteiligten Enzyme (nach Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes während oder nach Ablauf des katalytischen Schrittes) ausführen; dabei wird eine als nicht richtig erkannte Zwischenstufe oder ein als nicht richtig erkanntes Produkt hydrolytisch gespalten. Die Energie zur Synthese des falschen Produkts, die durch Hydrolyse von Adenosin- oder Guanosintriphosphat aufgebracht wird, geht als Preis für die niedrige Fehlerhäufigkeit verloren. In diesem Beitrag sollen – hauptsächlich an den Beispielen der DNA-Replikation und der Aminoacylierung der Transfer-RNA – die Prüf- und Korrekturmechanismen von einigen Enzymen vorgestellt werden.

1. Einleitung^{1,2)}

Die Spezifität von Enzymen hat schon sehr früh das Interesse von Chemikern und Biologen geweckt. Emil Fischers „Schloß-Schlüssel“-Prinzip der Enzym-Substrat-Erkennung war das erste mechanische Modell dieser Wechselwirkung¹⁾. Die rasche Entwicklung der Biochemie führte zu immer genaueren Vorstellungen über enzymatische Reaktionen²⁻⁴⁾, z. B. zur „induced-fit“-Theorie, die eine Anpassung des aktiven Zentrums eines Enzyms an sein Substrat beschreibt, oder zur „strain“-Theorie, die eine Aktivierung des Substrates durch das Enzym vorsieht. Gleichzeitig konnten die Prinzipien der enzymatischen Katalyse an niedermolekularen Modellen dargestellt werden^{5,6)}. Die Aufklärung der grundsätzlichen molekularen Mechanismen der Vererbung und der Ausbildung von Phänotypen in den fünfziger Jahren stimulierte die Suche nach Enzymsystemen, die an der DNA-Replikation und

der Expression der genetischen Information beteiligt sind^{7,8)} (Abb. 1). Es zeigte sich bald, daß diese Enzyme eine wesentlich höhere Spezifität aufweisen^{9,10)} als die meisten bekannten Enzyme so wichtiger Stoffwechselwege wie der Photosynthese oder des Citrat- und Harnstoffzyklus.

1963 konnte Loftfield an Zellen aus Hühner-Eileitern zeigen¹¹⁾, daß bei der Proteinbiosynthese Valin anstelle von Isoleucin mit einer Fehlerhäufigkeit von $\approx 1:3000$ eingebaut wird. In diesem Zahlenwert sind alle Fehler erfaßt, die in den dazugehörigen Schritten vorkommen können – von der Transkription über die Veresterung der Aminosäuren mit den Transfer-RNAs bis zur Knüpfung der Peptidbindungen am Ribosom.

Sehr viel kleiner ist dagegen die Fehlerhäufigkeit der DNA-Replikation in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen, wie man an der Häufigkeit spontaner Mutationen erkennen kann^{12,13)}; hier findet man nur einen Fehler auf $\approx 10^8$ bis 10^{12} eingebaute Nucleotide, was die extrem gute Konservierung der genetischen Information verdeutlicht. Diese Zahl gibt aber nicht allein die Fehlerhäufigkeit der DNA-Polymerase wieder, sondern schließt auch alle anderen Veränderungen der DNA ein¹⁴⁻¹⁷⁾, die nicht vor der Replikation durch spezifische Reparaturenzyme korrigiert werden können¹⁸⁾. Dazu gehören Veränderungen durch UV-Strahlung (z. B. Dimerisierung benachbarter Thymidine zu einem Cyclobutan-Derivat) sowie durch mutagen wirkende Substanzen (z. B. Alkylierung, Desaminierung von Nucleosiden).

Eine so niedrige Fehlerhäufigkeit wie bei der DNA-Replikation muß bei der Expression der Information nicht er-

[*] Dr. U. Englisch, Dr. D. Gauss, Dr. W. Freist, Dr. S. Englisch, Dr. H. Sternbach
Abteilung Chemie, Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin
Hermann-Rein-Straße 3, D-3400 Göttingen
Prof. Dr. F. von der Haar
Geschäftsbereich Medizin- und Labortechnik, B. Braun Melsungen AG
Postfach 1110, D-3508 Melsungen

[**] Neueste Übersichten (Anmerkungen bei der Korrektur, 7. Oktober 1985): A. R. Fersht, *Adv. Exp. Med.* 179 (1984) 525; F. Grosse, G. Kraus, J. W. Knill-Jones, A. R. Fersht, *ibid.* 179 (1984) 535; H. Echols, *Bioessays* 1 (1984) 148; M. Yarush, R. C. Thompson in J. Beckwith, J. Davies, J. Gallant (Hrsg.): *Gene Function in Prokaryotes*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1983, S. 23; L. Brakier-Gingras, P. Phoenix, *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 62 (1984) 231.

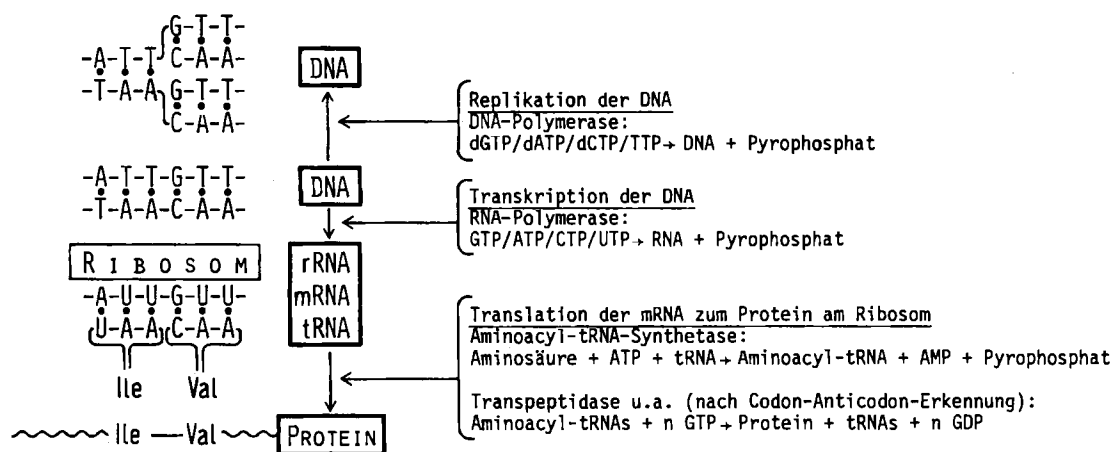


Abb. 1. Schema der Replikation, Transkription und Translation; einige Schlüsselenzyme und ihre Reaktionen mit energiereichen Substraten sind angegeben.

reicht werden, weil hier nicht *ein* Nucleinsäure-Strang als Vorlage für viele Übersetzungsvorgänge konserviert werden muß, sondern von einem DNA-Abschnitt viele mRNAs und nach diesen Kopien wiederum viele Proteine synthetisiert werden, die nach verhältnismäßig geringer Lebensdauer wieder abgebaut werden. Darüber hinaus können Proteine mit fehlerhafter Sequenz eine etwas veränderte Tertiärstruktur haben, die sie für den sofortigen Abbau durch Proteasen zugänglich macht^[19].

Da die Expression der genetischen Information ein auf Sparsamkeit und Effizienz optimiertes System aus Teilschritten ist, kann man erwarten, daß die Fehlerhäufigkeiten der Teilschritte jeweils kleiner sind als die Gesamtfehlerhäufigkeit, die sich (in erster Näherung) additiv aus den Fehlern der Teilschritte ergibt. Wird dagegen in *einem* Teilschritt die aufgrund der Substrat-Erkennung erreichte Genauigkeit durch einen Prüf- und Korrekturmechanismus erhöht, ist die erreichte Fehlerhäufigkeit (in erster Näherung) das Produkt aus der Eingangs-Unterscheidung und einem Faktor, der der Quotient aus der Zahl der Fehler nach und vor der Korrektur ist.

2. Bedeutung der Fehlerhäufigkeit bei der Replikation und der Expression der genetischen Information

Hohe Fehlerhäufigkeiten bei der Replikation und bei der Umsetzung der DNA-Sequenz in funktionsfähige Proteine und Enzyme würden sich in zweierlei Hinsicht auswirken: Einerseits würde der nicht letale häufige Ersatz einer Nucleobase durch eine andere zum Auftreten vieler Mutanten führen; dies ermöglichte dem betreffenden Organismus unter günstigen äußeren Bedingungen eine schnelle Anpassung an veränderte Umweltbedingungen und wäre somit ein Selektionsvorteil. Andererseits hätte dies aber den Nachteil, daß kein reproduzierbares Genom gebildet werden könnte, also bei der Replikation die Erhaltung nützlicher Eigenschaften nicht gewährleistet wäre. Bei der Genexpression würde dies bedeuten, daß es zu einer Anhäufung heterogener, ungenau, langsam oder gar nicht mehr funktionsfähiger Enzyme käme. Die Konsequenzen wären Funktionsstörungen oder gar der Zusammenbruch des Metabolismus von Zellen oder Zellsystemen.

menbruch des Metabolismus von Zellen oder Zellsystemen.

Dabei sind die Fehlerhäufigkeiten von Replikation und Expression insofern gekoppelt, als eine fehlerhafte Replikation selbst bei fehlerfreier Expression zur direkten Produktion von fehlerhaften Proteinen führt, während eine – gleichermaßen – fehlerhafte Proteinbiosynthese die Bildung von DNA-Polymerasen und anderen mit DNA wechselwirkenden Proteinen von geringer Spezifität hervorruft. Die Notwendigkeit, intakte Replikationseinheiten zu erhalten, aber auch Mutationen zur Anpassung zu erlauben, führte im Verlauf der Evolution zur Bildung eines Bereichs optimaler Mutationshäufigkeiten. Man kennt langsam und rasch mutierende Mutanten desselben Organismus^[20–23], wobei die Mutationshäufigkeit genetisch festgelegt sein kann oder ein Regulationsmechanismus für eine erhöhte Mutationshäufigkeit sorgen kann, wenn der Organismus sich in einer schnell wechselnden Umgebung befindet^[24].

In diese Vorstellungen fügt sich der Grundgedanke einer der ersten Theorien des Alterns ein, der Fehlerkatastrophen-Theorie von Orgel^[25]. Da alle Reaktionsschritte der Proteinbiosynthese durch Enzyme katalysiert werden, soll die Synthese fehlerhafter Enzymproteine zu immer stärker fehlerbehafteten Proteinbiosyntheseprozessen führen, was neben anderen Prozessen schließlich den Zelltod bewirkt. Heute wird eine Fehlerkatastrophe nicht mehr als alleinige Ursache des Alterns angesehen; die Abnahme von Enzymaktivitäten und -spezifitäten dürfte jedoch bei Alterungsvorgängen wichtig sein^[26–31].

Daß schon der Austausch *einer* Nucleobase im Genom ein sehr wichtiges Ereignis sein kann, ist an der Sichelzellenanämie^[32] eindrucksvoll zu sehen: Die homozygoten Träger dieser erblichen Krankheit haben aufgrund der veränderten Erythrocyten eine deutlich verminderte Lebenserwartung. Dies geht zurück auf einen Aminosäureaustausch in der sechsten Position der β -Kette des Hämoglobins, in welcher ein Valinrest statt eines Glutaminsäurerests eingebaut ist. Das Codon der Glutaminsäure im Gen der β -Kette ist CTC; in der mRNA steht dann GAG^[33]; das Codon GUG codiert, neben drei anderen Codons, für Valin.

Jüngste Arbeiten an Tumor-Zell-Linien lassen vermuten, daß Punktmutationen auch Tumor-Erkrankungen hervor-

rufen können, oder zumindest, daß eine Punktmutation maßgeblich an ihrem Beginn beteiligt sein kann: Bei Zelllinien des menschlichen Blasenkrebs macht eine nicht korrigierte Punktmutation aus einem ruhenden Protooncogen ein aktives Oncogen, und dies führt im Expressionsprodukt zu einem Glycin/Valin-Austausch^[34-37].

3. Fehlerhäufigkeit bei der DNA-Replikation

Die Synthese eines Tochterstranges der DNA aus den Desoxynucleotiden dATP, dCTP, dGTP und TTP wird durch DNA-Polymerase unter Beteiligung vieler weiterer Proteine katalysiert, wobei der Mutterstrang als Vorlage dient (vgl. Abb. 1). DNA-Polymerase weist keine Spezifität gegenüber einzelnen Nucleotiden auf, sondern erkennt die aus den Pyrimidin- und Purinnucleotiden gebildeten Basenpaare im DNA-Doppelstrang^[38]. Das Enzym orientiert sich an der Gesamtstruktur der Paare, also an der richtigen Raumerfüllung und am Wasserstoffbrückenmuster. Hierin liegt zugleich eine Schwäche des Systems, da andere Kombinationen komplementärer Basenpaare (wenn auch mit viel geringerer Häufigkeit) auftreten können, die sich ebenfalls in die Doppelhelix-Struktur der DNA einfügen. Schon Watson und Crick hatten erkannt^[39], daß Amino/Imino- und Keto/Enol-Tautomerie der Nucleobasen die Spezifität der DNA-Polymerase herabsetzen könnten. Die Iminoform von Cytosin hat die gleiche Möglichkeit zur Wasserstoffbrückenbildung wie Thymin, und für die Enolform von Thymin gilt umgekehrt das gleiche. Da in den somit möglichen Basenpaaren A:C(imino) und G:T(enol) auch die interatomaren Abstände ebenso groß sind wie in den normalen A:T- und G:C-Basenpaaren, kann die Polymerase nicht zwischen ihnen unterscheiden (Abb. 2).

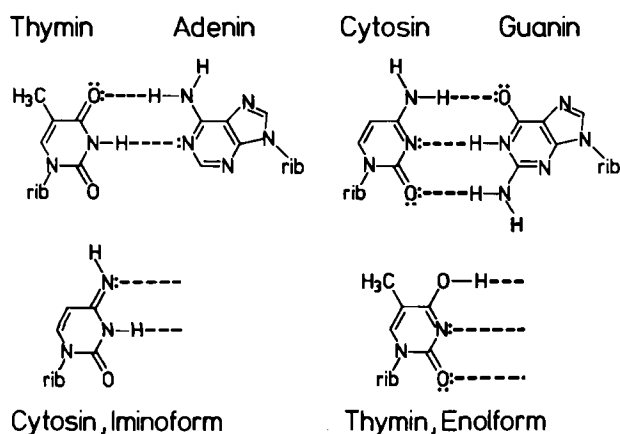


Abb. 2. Formeln der Thymin-Adenin- und Cytosin-Guanin-Basenpaare und der zur Fehlpaarung geeigneten Iminoform von Cytosin und Enolform von Thymin. rib = Ribosyl.

Auf diese falschen Basenpaarungen ist es zurückzuführen, daß beim Fehlen einer Kontrollfunktion Mutationshäufigkeiten in der Größenordnung von einem Fehler auf $\approx 10^4$ bis 10^5 eingebaute Nucleotide auftreten^[40,41]. Diese Fehlerhäufigkeit ist um Größenordnungen höher als die insgesamt in *E. coli* gemessene Mutationshäufigkeit von $\approx 1:10^8$ bis 10^{10} ^[42]. Bei Eukaryonten wird vermutet, daß die Replikation noch um den Faktor 100 genauer abläuft. Die drastisch verlangsamte Replikationsgeschwindigkeit

(≈ 30 Nucleotide/s gegen ≈ 1000 Nucleotide/s bei *E. coli*) mag einen Hinweis darauf geben, daß die DNA-Polymerasen aus Eukaryonten mehr oder aufwendigere Prüfschritte vornehmen, bevor sie ein Nucleotid im neu synthetisierten DNA-Strang als endgültig eingebaut zurücklassen^[43,44].

3.1. Prüf- und Korrekturmechanismen bei der DNA-Replikation

Zur Aufrechterhaltung einer niedrigen Fehlerhäufigkeit haben DNA-Polymerasen aus Prokaryonten neben ihrer Polymerase-Aktivität eine Exonuclease-Aktivität. Sie dient dazu, Nucleotide, die in einem Prüfschritt als fehlerhaft eingebaut erkannt wurden, aus dem neu synthetisierten DNA-Strang herauszuschneiden. Erst nach dem Prüf- und gegebenenfalls nach einem Korrekturschritt wird das nächste Nucleotid eingebaut^[44-46]. Der Zusammenhang von Polymerase- und Exonuclease-Aktivität ist zuerst bei den DNA-Polymerasen von schnell und langsam mutierenden („mutator“- und „antimutator“-) T4-Bacteriophagen gefunden worden^[47]. Die mutator-Polymerase hat im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym eine viel geringere Exonuclease- als Polymerase-Aktivität, d.h. eine herabgesetzte Reparaturkapazität. Bei der Polymerase aus antimutator-Linien wurde das Umgekehrte beobachtet. In Einklang mit diesem Befund konnte in *E.-coli*-mutator-Zell-Linien eine Mutation im Gen der ϵ -Untereinheit der Polymerase, die anscheinend die Exonuclease-Aktivität kontrolliert, nachgewiesen werden^[48,49].

Durch das Prüf- und Korrektursystem – das sowohl mit Homopolynucleotiden in in-vitro-Systemen durch biochemische Methoden^[45] als auch in in-vivo-Systemen an DNA über Methoden der molekularen Genetik^[50,51] nachgewiesen werden kann – wird die Fehlerhäufigkeit auf ein falsches Nucleotid pro $\approx 10^6$ bis 10^9 eingebaute Nucleotide gesenkt^[51-56]. Diese Verminderung der Fehlerhäufigkeit um den Faktor 100 bis 10000 gegenüber den oben erwähnten Werten von $\approx 1:10^4$ bis 10^5 ist aber noch nicht ausreichend, um die tatsächlich beobachtete, noch geringere Mutationshäufigkeit in *E. coli* zu erklären. Die weitere Verminderung der Fehlerhäufigkeit wird durch ein zweites Korrektursystem, das post-replikative Korrekturlesen, erreicht.

Bis vor kurzem schien es, als ob Fehler nur vor dem Einbau des nächsten Nucleotides korrigiert werden könnten, da die Korrekturenzyme hinterher nicht mehr feststellen können, welches Nucleotid im falschen Basenpaar ursprünglich das richtige war. Inzwischen hat sich gezeigt, daß eine Methylierung der DNA, welche in allen bisher untersuchten Zellen nachgewiesen worden ist^[57], zur Unterscheidung zwischen Mutterstrang und neu synthetisiertem Tochterstrang dient. *E.-coli*-DNA wird erst nach der Replikation an bestimmten Stellen, z. B. an N^6 eines Adenins in der Sequenz –G–A–T–C^[58], methyliert (Abb. 3), so daß der neue Strang nach der Replikation kurzzeitig un- oder untermodifiziert ist. Es gibt nun ein Enzymsystem, das den neuen, noch untermodifizierten Strang systematisch kontrolliert, wobei die falschen Nucleotide herausgeschnitten und durch die richtigen ersetzt werden^[59-61]. Durch diesen Schritt wird die Fehlerhäufigkeit der Replikation um den Faktor 100–10000 vermindert; damit

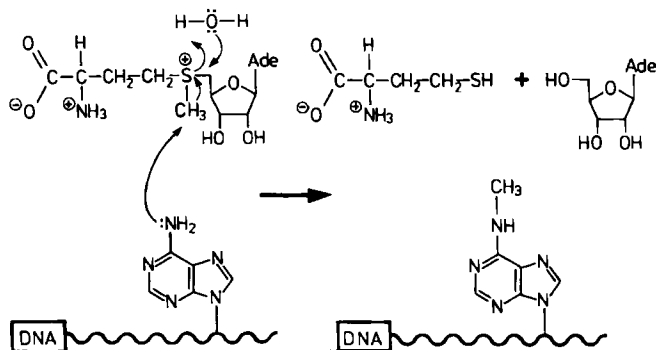


Abb. 3. Enzymatische Methylierung der DNA; diese Reaktion dient (unter anderem) dazu, beim Korrekturlesen den alten und den neusynthetisierten DNA-Strang zu unterscheiden.

kommt die Fehlerhäufigkeit schließlich in den Bereich von einem Fehler auf $\approx 10^9$ bis 10^{11} eingebaute Nucleotide.

4. Fehlerhäufigkeit bei der Transkription

Im Gegensatz zur DNA-Replikation wurde für die Umsetzung der in der DNA-Sequenz gespeicherten Information in die RNA-Sequenz der messenger-RNA durch das Enzym RNA-Polymerase (vgl. Abb. 1) kein Korrekturmechanismus gefunden^[62-64]. In-vitro-Messungen an synthetischen Polynucleotiden ergaben Fehlerhäufigkeiten im Bereich von einem Fehler auf $\approx 10^3$ bis 10^5 eingebaute Ribonucleotide^[62]; die Werte konnten durch in-vivo-Untersuchungen an einem Nonsense-Codon in *E. coli* bestätigt werden (ein Fehler auf $\approx 10^4$ eingebaute Nucleotide)^[64]. Diese Fehlerhäufigkeit entspricht derjenigen, die durch die Tautomerie der Heterocyclus verursacht ist (vgl. Abschnitt 3) und schließt somit das Bestehen eines Korrekturmechanismus zur Erhöhung der Genauigkeit aus.

5. Fehlerhäufigkeit bei der Aminoacylierung von Transfer-RNA

Bei der Replikation und Transkription besteht die Aufgabe der beteiligten Enzyme darin, die Bildung der richti-

gen Basenpaare zu ermöglichen. Dagegen muß bei der Proteinbiosynthese jeweils drei Nucleotiden (Triplet oder Codon) der messenger-RNA (mRNA) eine Aminosäure zugeordnet werden (vgl. Abb. 1). Das Bindeglied zwischen beiden Systemen sind die Transfer-RNAs (tRNAs)^[65-67], die aus 50-100 Nucleotiden bestehen. In Abbildung 4, unten links, ist der Verlauf der Kette der Phenylalanin-tRNA (tRNA^{Phe}) dargestellt. Mit den drei Nucleotiden ihrer Anticodons gehen die tRNAs Basenpaarungen mit den Codons der messenger-RNA ein; am 3'-terminalen Adenosin sind sie mit der jeweiligen Aminosäure verestert (vgl. Abb. 1 und Abb. 4). Die Verknüpfung der tRNAs mit den Aminosäuren wird von den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen^[68-72] bewirkt, wobei sich für jedes der 20 Enzyme zwei Auswahlprobleme ergeben: Die Auswahl der richtigen tRNA aus wenigstens 20, meist aber ca. 70 Spezies und die Auswahl der richtigen Aminosäure aus 20 Verbindungen^[73].

Die Aminoacylierung läuft in zwei unmittelbar aufeinander folgenden Teilschritten ab, die als Aktivierung und Übertragung (Transfer) bezeichnet werden (Abb. 4). Das Zwischenprodukt nach der Aktivierung der Aminosäure durch ATP, das Aminoacyladenylat, ist ein gemischtes Säureanhydrid. Energetische Betrachtungen zeigen, daß die freie Enthalpie der Hydrolyse der α,β -Phosphorsäureanhydrid-Bindung eines Moleküls ATP zum größten Teil in der freien Enthalpie der Hydrolyse eines Moleküls Aminoacyl-tRNA erhalten bleibt^[71]. Der Sinn dieser Energiekonservierung^[74,75] könnte darin liegen, daß die Aminolyse des Esters zum Peptid, die am Ribosom abläuft und deren Details unbekannt sind, sonst einer Zelle räumlich - die Reaktionspartner sind Makromoleküle - und zeitlich - Verlängerung des Peptids um etwa zehn Aminoacylreste pro Sekunde - nicht gerecht würde.

5.1. Auswahl der Transfer-RNA

Jede Aminoacyl-tRNA-Synthetase muß diejenige tRNA auswählen, die das für die jeweilige Aminosäure spezifische Anticodon aufweist. Das Anticodon scheint aber nicht - oder nicht allein - die Erkennungsregion der tRNA für die Synthetase zu sein. Trotz sehr vieler Studien, z. B. mit chemisch oder enzymatisch modifizierten tRNAs, mit

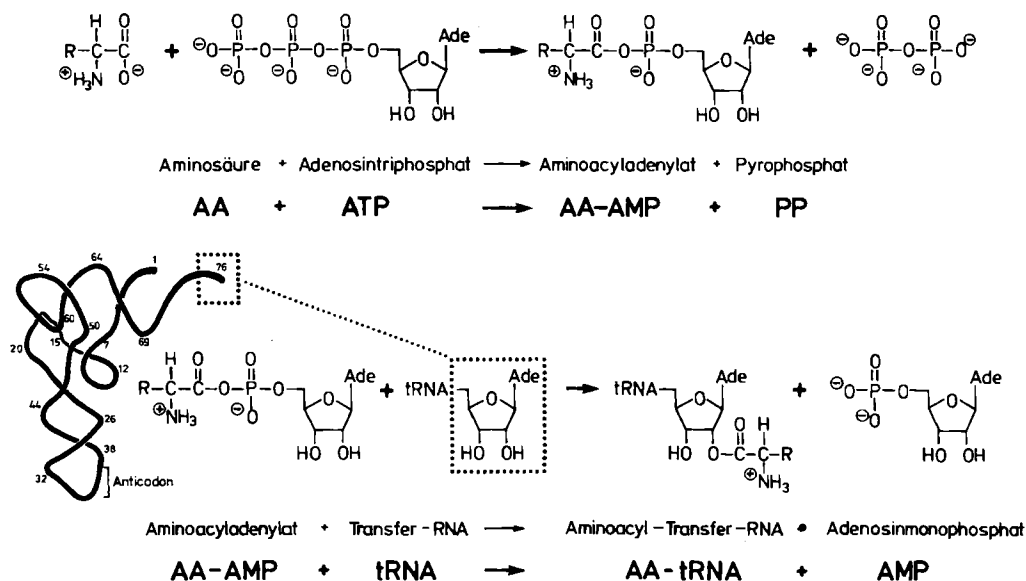


Abb. 4. Die Veresterung der tRNAs mit den Aminosäuren (Aminoacylierung) durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen verläuft in zwei Teilschritten: Die Umsetzung einer Aminosäure zum Aminoacyladenylat wird als Aktivierung bezeichnet (oberer Block), die Übertragung des Aminoacylrests auf das 3'-terminale Adenosin der tRNA als Übertragung oder Transfer (unterer Block). Unten links: Verlauf der Zucker-Phosphat-Kette der tRNA^{Phe} aus Hefe (76 Nucleotide).

vernetzenden Reagentien, durch Fehlbeladungen oder durch Vergleiche der rund 1000 bekannten tRNA-Sequenzen^[76], konnte aber auch keine andere Region der tRNA (Abb. 4) eindeutig als Erkennungsstelle identifiziert werden^[65, 67, 68, 73, 77]. Dies beleuchtet die Komplexität des Erkennungsvorganges, der sowohl bezüglich der Erkennungsstellen als auch bezüglich des Ablaufs von tRNA zu tRNA und von Enzym zu Enzym (nach Aminosäure-Spezifität und nach Organismus) wechseln könnte. Die Makromoleküle Synthetase (ca. 500–1000 Aminosäurereste) und tRNA (ca. 50–100 Nucleotide) bieten letztlich dafür eine Vielzahl von Möglichkeiten. Ausgehend vom Informationsgehalt des Anticodons oder Codons ist ein Erkennungsvorgang aus sechs Stufen wahrscheinlich. Den Vorgang der Basenpaarung kann man gedanklich nachvollziehen mit der Frage: Ist die gegenüberstehende Base ein Purin oder ein Pyrimidin? und der Folgefrage: A oder G bzw. U oder C?, so daß sich bei drei Basenpaaren sechs Fragen ergeben. Sowohl biochemische Experimente^[78–80] als auch theoretische Erkennungsstudien^[69, 81] ergeben eine ähnliche Anzahl von Stufen. Vermutlich kommt es dabei zu einem immer festeren Einrasten der tRNA am Enzym^[78–80]. Dabei spielen – zumindest in einigen Systemen – das terminale Adenosin der tRNA und seine 2'- oder 3'-Hydroxygruppen eine essentielle Rolle^[82, 83]. Der Aminoacylrest wird mit wenigen Ausnahmen selektiv entweder auf die 2'- oder die 3'-Hydroxygruppe übertragen^[84–87]. Die freibleibende Hydroxygruppe ist in mehreren Fällen (siehe Abschnitt 5.2) für die Genauigkeit der Aminoacylierung von großer Bedeutung. In den meisten Fällen erreicht die tRNA-Synthetase-Erkennung eine Fehlerhäufigkeit von $\approx 1 : 10^4$ bis 10^5 , liegt damit in der Größenordnung anderer Schritte der Gen-Expression und bedarf deshalb keiner Überprüfung und Nachbesserung. Schon 1972/1973 wurde aber beschrieben, daß Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* das Produkt Ile-tRNA^{Phe} – das Ergebnis einer Fehlbeladung durch die Isoleucyl-tRNA-Synthetase –, wieder hydrolysieren kann^[88, 89]; dies wurde als Verifikation bezeichnet. Darüber hinaus wurde 1984 für das System Isoleucyl-tRNA-Synthetase + tRNA^{Ile} + tRNA^{Val} aus Hefe gezeigt, daß bei der Erkennung nur eine Unterscheidung von $\approx 1 : 10$ erzielt wird und daß ein Prüf- und Korrekturschritt folgt, um die Fehlerhäufigkeit auf $\approx 1 : 100$ zu senken^[90], die dann in vivo durch die gleichzeitige Anwesenheit der tRNA^{Val}-komplexierenden Valyl-tRNA-Synthetase auf $\approx 1 : 10^4$ bis 10^5 erniedrigt wird. (In diesem System sind die tRNAs nahe verwandt; dies quantifiziert man an Anzahl und Art der Basen.) Über den Mechanismus dieser Korrektur ist bisher nichts bekannt.

5.2. Auswahl der Aminosäure

Im Gegensatz zu den Transfer-RNAs sind die Aminosäuren kleine Zellbausteine; zudem können sie paarweise, zum Beispiel Glycin und Alanin, Phenylalanin und Tyrosin oder Isoleucin und Valin (Abb. 5) einander ähnlich sein. Beim Vorgang der Erkennung durch das Enzym ist deshalb eine hohe Genauigkeit der Unterscheidung besonders schwierig zu erreichen.

Maßgebend für das Verhältnis, mit dem ein Enzym zwei Substrate (A + B) unterscheiden kann, ist die Differenz der

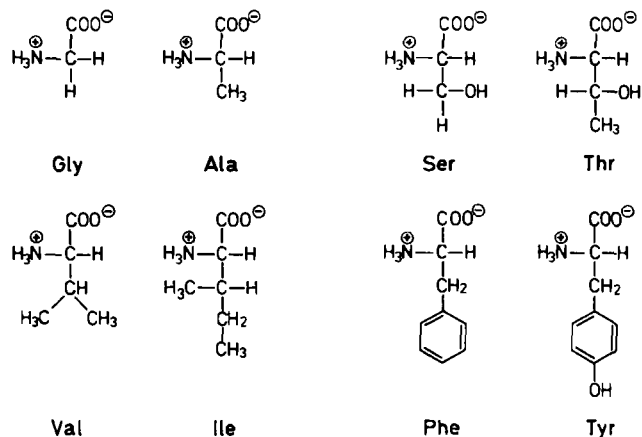


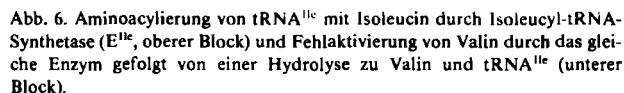
Abb. 5. Die genügend genaue Unterscheidung einiger Aminosäuren durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erfordert Prüf- und Korrekturschritte. Strukturen einiger einander ähnlicher Aminosäuren: Glycin und Alanin, Serin und Threonin, Valin und Isoleucin, Phenylalanin und Tyrosin.

Bindungsenergien beider Substrate. Diese kann unter der Voraussetzung, daß die einzelnen Reaktionsschritte bei der Umsetzung der beiden Substanzen energetisch gleich sind, aus einfach zu bestimmenden kinetischen Konstanten berechnet werden^[3, 91]. Es gilt

$$(k_{\text{cat}}/K_m)_A/(k_{\text{cat}}/K_m)_B = \exp(-\Delta\Delta G/RT)$$

wobei k_{cat} und K_m die Wechselzahl- bzw. Michaelis-Konstante der Substrate und $\Delta\Delta G$ die Differenz der freien Bindungsenthalpien im Übergangszustand sind. Durch Berechnungen, die auf der Londonschen Theorie der elektronischen Dispersionskräfte beruhen, sowie durch Messung der unterschiedlichen Bindung chemisch ähnlicher Substanzen an Antikörper, die zu gleichen Werten führten, fand *Pauling*^[92] schon in den vierziger Jahren für die hydrophobe Wechselwirkung einer Methylengruppe mit ihrem Bindungspartner einen Energiebetrag von ≈ 4 kJ/mol. Daraus errechnete er schon vor der Entdeckung des molekularen Ablaufs der Proteinbiosynthese eine Fehlerhäufigkeit von ungefähr 1 : 10 für den Einbau von Glycin statt Alanin und Valin statt Isoleucin^[93]. Eine spätere Berechnung ergab zwar etwas günstigere Werte^[94], die aber dennoch für die notwendige Genauigkeit der Proteinbiosynthese nicht ausreichten.

Die von *Pauling* vorhergesagten Schwierigkeiten bei der Unterscheidung zwischen Isoleucin und Valin durch die Isoleucyl-tRNA-Synthetase konnten bei *E. coli* experimentell nachgewiesen werden: Valin wird tatsächlich durch dieses Enzym zum enzymgebundenen Valyladenylat fehlaktiviert^[95, 96] (Abb. 6, vgl. Abb. 4, obere Zeile). In einem Schlüsselexperiment zeigten *Berg et al.*^[9, 95, 97, 98] jedoch, daß in Gegenwart von tRNA^{Ile} kein Val-tRNA^{Ile} erhalten wird (Abb. 6). 1972 wurde dann wahrscheinlich gemacht, daß Val-tRNA^{Ile} intermediär entsteht^[99]. Der Mechanismus des Vorgangs blieb zunächst unverstanden. Offensichtlich wird das Reaktionsprodukt vom Enzym überprüft, wobei eine fälschlicherweise aktivierte Aminosäure durch Hydrolyse wieder eliminiert und nicht als Aminoacyl-tRNA vom Enzym entlassen wird. Der Preis für diesen Korrekturschritt ist der Abbau eines ATP-Moleküls zu AMP für jede Fehlaktivierung (Abb. 6).



Untersuchungen und Überlegungen zum Mechanismus des Korrekturschrittes der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen haben zu mehreren Modellvorstellungen geführt, die aber jeweils nur an einer oder wenigen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen entwickelt worden sind und deshalb nicht als generell und allein zutreffend angesehen werden können. Hopfield et al.^[100, 101] schlugen 1974 einen kinetisch kontrollierten Korrekturmechanismus („kinetic proofreading“) vor. Die entscheidende Überlegung dabei ist, daß die nach der Michaelis-Menten-Kinetik mögliche Unterscheidung zweier konkurrierender Substrate am Zwischenprodukt wiederholt werden kann, so daß sich eine Fehlerhäufigkeit ergibt, die das Produkt der Fehlerhäufigkeiten beider Teilschritte ist. Dies gilt dann, wenn zwischen dem Michaelis-Menten-Komplex und dem Zwischenprodukt ein irreversibler Schritt liegt (Abb. 7, Schritt 2) und wenn das Zwischenprodukt auf zwei Wegen (Abb. 7, Schritt 3 oder 3') weiterreagieren kann. Diese Reaktionsfolge trifft auf die Aminoacylierung zu, da die Spaltung von ATP (und die weitere Spaltung des Pyrophosphats) ein irreversibler Schritt ist (Abb. 7, Schritt 2) und der Enzym-Aminoacyl-adenylat-Komplex zum Produkt weiterreagieren (Abb. 7, Schritt 3) und der Enzym-Aminoacyl-adenylat-Komplex zum Produkt weiterreagieren (Abb. 7, Schritt 3'). Diese Überlegungen sind plausibel und stehen mit dem mehrfach betrachteten Unterschied im ATP-Verbrauch bei der Aminoacylierung einiger tRNAs mit falscher und richtiger Aminosäure im Einklang. So werden z. B. 270 Moleküle ATP hydrolysiert, bevor es zur Bildung eines Moleküls Val-tRNA^{Ile} /E.

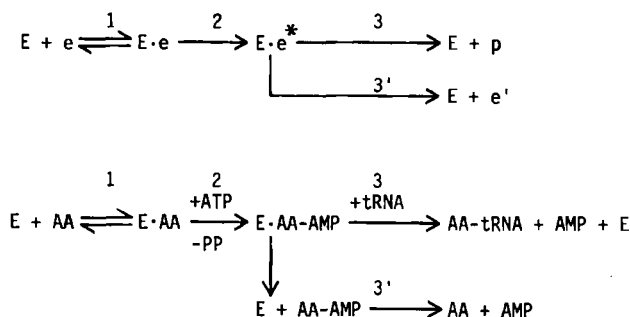


Abb. 7. Schema einer Reaktionsfolge, bei welcher ein kinetisch kontrollierter Korrekturmechanismus („kinetic proofreading“) wirksam werden kann (oberer Block, nach Hopfield) und Reaktionsfolge der Aminoacylierung, dargestellt nach diesem Schema (unterer Block; E = Aminoacyl-tRNA-Synthetase).

Zwei andere Modelle berücksichtigen die zuletzt genannte Möglichkeit. Das Doppelsiebmodell von *Fersht* et al.^[109-112] ist ein zweistufiges mechanisches Modell, in dem das aktive Zentrum zweimal als Sieb mit unterschiedlicher Maschendichte für die korrekte Auswahl der Aminosäure sorgt. Das erste Sieb, die der Kettenlänge der Aminosäure genau angepaßte Bindungsstelle des Enzyms, verhindert durch sterische Abstoßung nur die Bindung größerer Aminosäuren; kleinere und isostere Aminosäuren können aber, wenn auch mit geringerer Affinität, gebunden werden und zum Aminoacyladenylat reagieren. Das sterische Auswahlprinzip des zweiten Siebes sieht folgendermaßen aus: Nach dem Transfer des Aminoacylrests auf die akzeptierende Hydroxygruppe des terminalen Adenosins der tRNA (vgl. Abschnitt 5.1 und Abb. 4) wird der Aminoacylrest auf die nicht-akzeptierende Hydroxygruppe des terminalen Adenosins der tRNA übertragen, sofern er kleiner als der richtige Aminoacylrest ist. Dort unterliegt er der hydrolytischen Abspaltung durch das Enzym. Das Doppelsiebmodell resultiert aus Arbeiten^[113, 114], die mit den Methoden der schnellen Kinetik nachwiesen, daß Methionyl-^[110], Valyl-^[109, 111, 115] und Isoleucyl-tRNA-Synthetasen^[104, 107] aus *E. coli* und *Bacillus stearothermophilus* Korrektur-Systeme einsetzen. Die Autoren schlossen, daß die Korrektur gegenüber Isoleucin^[111], Threonin^[109] und α -Aminobuttersäure^[115] im wesentlichen nach dem Transfer des Aminoacylrestes auf die tRNA stattfindet, während bei Isoleucyl-tRNA-Synthetase die Korrektur gegenüber Valin hauptsächlich vor dem Transferschritt erfolgt. Das Modell konnte aber z.B. die Aktivierung des zu Valin isosteren Threonins durch die Valyl-tRNA-Synthetase und die anschließende Hydrolyse nach Übertragung auf tRNA^{Val} nicht ohne Zusatzannahmen erklären. Auch die Diskriminierung größerer Substrate im ersten Sieb erwies sich als nicht eindeutig^[116], da eine Fehlaktivierung von Cystein durch die Alanyl-tRNA-Synthetase nachgewiesen werden konnte.

Mit chemisch modifizierten tRNAs, bei denen am terminalen Adenosin der tRNA (vgl. Abb. 4) entweder die 2'- oder 3'-Hydroxygruppe fehlte oder durch eine Aminogruppe ersetzt war^[117, 118], konnten *Cramer, von der Haar* et al.^[119-121] zeigen, daß im eukaryotischen Hefe-System beide Hydroxygruppen bei den Korrekturschritten zusammenwirken^[122, 123]. So katalysiert z. B. die Isoleucyl-tRNA-Synthetase neben der Veresterung von Isoleucin mit tRNA^{Ile} zu Ile-tRNA^{Ile}-C-C-A (Abb. 8a) auch die Bildung fehlbeladener Val-tRNA^{Ile}-C-C-3'dA, die ebenfalls vom

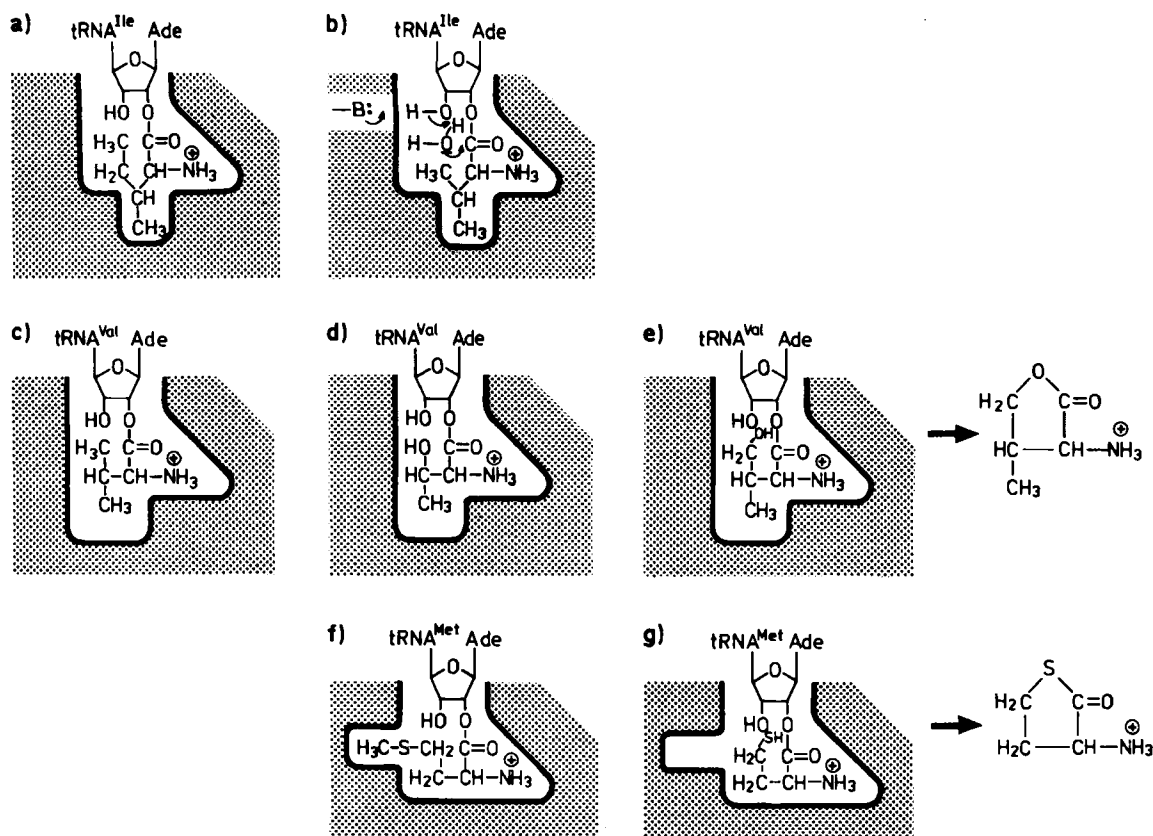


Abb. 8. Schematische Darstellung von Aminoacyl-tRNAs in den aktiven Zentren von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen: Isoleucyl-tRNA-Synthetase und $tRNA^{Ile}$ mit den Aminosäuren Isoleucin (a) und Valin (b); Valyl-tRNA-Synthetase und $tRNA^{Val}$ mit den Aminosäuren Valin (c), Threonin (d) und γ -Hydroxyvalin (e); Methionyl-tRNA-Synthetase und $tRNA^{Met}$ mit den Aminosäuren Methionin (f) und Homocystein (g).

Enzym entlassen wird. Dagegen wird Val- $tRNA^{Ile}$ -C-C-A vor dem Ablösen vom Enzym wieder hydrolysiert^[103, 124]. Das Modell des chemischen Korrekturlesens („chemical proofreading“) erklärt die Hydrolyse von Val- $tRNA^{Ile}$ -C-C-A im aktiven Zentrum der Isoleucyl-tRNA-Synthetase dadurch, daß die 3'-Hydroxygruppe und ein Wassermolekül, das den Raum der fehlenden Methylengruppe einnimmt, zusammen mit einem nucleophilen Aminosäurerest des Enzyms die Hydrolyse der Val- $tRNA^{Ile}$ -C-C-A bewirken (Abb. 8b). Obwohl für diesen Fall auf einfache Weise erklärt ist, warum der eine Ester entlassen und der andere hydrolysiert wird, können andere Fälle auf analoge Weise nicht so einfach erklärt werden. Untersuchungen im Valinsystem (Abb. 8c) zeigten, daß bei der Fehlaktivierung von Threonin durch Valyl-tRNA-Synthetase (Abb. 8d) die 3'-Hydroxygruppe des terminalen Adenosins der tRNA keine entscheidende Rolle spielt^[106, 109]. Auch wird Threonin nicht als Lacton entlassen; das wäre aber auch dann nicht zu erwarten, wenn die Reaktion über das Lacton von Threonin verlief (Abb. 8d), da ein viergliedriges Lacton mit beträchtlicher Ringspannung entstehen müßte. Ein stabiles fünfgliedriges Lacton sollte – den Überlegungen nach – Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus γ -Hydroxyvalin bilden, das etwa so groß wie Isoleucin ist; leider akzeptiert das Enzym dieses Analogon nicht als Substrat^[125, 126]. Lactone bzw. Thiolactone werden dagegen in drei Fällen erhalten, bei denen im Sinne des Doppelsiebes das Substrat um eine Methylengruppe zu groß ist, nämlich aus den künstlichen Analoga γ -Hydroxyvalin durch Valyl-tRNA-Synthetase (Abb. 8e)^[125, 126] und γ -Hydroxyisoleucin durch Isoleucyl-

tRNA-Synthetase^[127, 128], und zwar enzymkatalysiert im *E. coli*- und Hefe-System, sowie im Methionin-System aus *E. coli* (Abb. 8f) aus Homocystein durch Methionyl-tRNA-Synthetase^[108] (Abb. 8g). Dies zeigt, daß in solchen Fällen die Hydroxygruppe der Aminosäure durch nucleophilen Angriff auf die Carboxygruppe an der Hydrolyse des Esters mitwirkt.

Es gibt noch weitere Vorstellungen über Korrekturschritte, die sich an spezifischen Punkten des Reaktionsablaufs^[129], der Stabilität der Zwischen- oder Endprodukte^[130], der Wechselwirkung der Untereinheiten von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen^[131] oder der Wechselwirkung von zwei gebundenen tRNA-Molekülen pro Enzym^[132] orientieren oder sehr energiereiche Konformationen der Enzyme als mögliche Unterschiede postulieren^[133], aber für keine dieser Vorstellungen gibt es bis jetzt eindeutige experimentelle Hinweise.

Gemeinsam ist allen Messungen und Berechnungen, daß Fehlerhäufigkeiten bis zu $\approx 1:10^5$ erreicht werden; das bedeutet, daß die Fehlerhäufigkeit bei der Auswahl der Aminosäure ungefähr zehnmal geringer ist als bei der Proteinbiosynthese insgesamt. Diese Genauigkeit wird durch Multiplikation der Fehlerhäufigkeiten an drei Stellen erreicht: der Erkennung der Aminosäure durch die Synthetase, der Prüfung und gegebenenfalls Korrektur des Aminoacyladenylats (Prä-Transfer-Korrektur) und der Prüfung und gegebenenfalls Korrektur der Aminoacyl-tRNA (Post-Transfer-Korrektur); nicht jedes Enzym, das einen Prüf- und Korrekturmechanismus hat, muß beide Schritte vollziehen.

Die jüngsten Messungen an Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus Hefe zur Unterscheidung von Valin und Isoleucin zeigen, daß bei der Erkennung, der Korrektur vor und der Korrektur nach der Übertragung sich aus den Einzelfaktoren eine Gesamtfehlerhäufigkeit von $\approx 1:40000$ ($\approx 10 \times 20 \times 200$) ergibt^[102].

Vermutlich liegen die Fehlerhäufigkeiten der Proteinbiosynthese bei allen Organismen in etwa derselben Größenordnung – ausführliche Daten dazu fehlen noch. Dagegen ist bekannt, daß Art und Ausmaß der Korrekturschritte der Evolution unterliegen: Phenylalanyl-, Isoleucyl-, Valyl- und Leucyl-tRNA-Synthetase aus verschiedenen Organismen zeigten wechselnde Kombinationen von guter Erkennung und mäßiger Korrekturkapazität bis zu mäßiger Erkennung und hoher Korrekturkapazität, wobei letztere in ungleichen Anteilen vor oder nach der Übertragung oder an beiden Stellen vorkommt^[127, 128, 134–136]. Die unterschiedliche Korrekturkapazität von Synthetasen z.B. aus Wirbeltieren und aus Pilzen in Bezug auf Aminosäureanaloga wäre ein Ansatzpunkt für die gezielte Suche nach Therapeutica mit dem Angriffspunkt Proteinbiosynthese^[137].

5.2.2. Aminoacylierung ohne Korrektur

Neben den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, die Prüf- und Korrekturschritte ausführen – nach *Fersht*^[112] die für Alanin, Valin, Threonin, Isoleucin, Methionin und vielleicht Phenylalanin und Leucin spezifischen – gibt es auch Synthetasen, bei denen man keine Prüf- und Korrekturschritte kennt, vermutlich weil sie bei der Erkennung der Aminosäuren schon so präzise arbeiten, daß die Fehlerhäufigkeit deutlich unter der Gesamtfehlerhäufigkeit von $\approx 1:3000$ liegt. Beispiele für diese Klasse von Synthetasen sind die Histidyl-^[138], Tryptophanyl-^[139], Cysteinyl-^[113], Lysyl-^[127] und Tyrosyl-tRNA-Synthetase^[140]. Die Fehlerhäufigkeiten dieser Enzyme bewegen sich um $\approx 1:10^5$ für den Einbau von Prolin statt Histidin durch die Histidyl-tRNA-Synthetase oder Phenylalanin statt Tyrosin durch die Tyrosyl-tRNA-Synthetase; darüber hinaus wurden Werte bis zu $\approx 1:10^8$ für den Fall der Serin- oder Alaninaktivierung durch die Cysteinyl-tRNA-Synthetase beschrieben^[113].

Vermutlich haben sich Aminosäuren wie Histidin, Tryptophan oder Cystein bei der Evolution als Teilnehmer an katalytischen Prozessen im aktiven Zentrum von Enzymen auch deshalb qualifiziert, weil keine nahe verwandten Verbindungen vorkommen; der Einbau einer falschen Aminosäure ist somit von vornherein fast ausgeschlossen. Dieselben Aminosäuren können aber von anderen Synthetasen durchaus fehlaktiviert werden^[141]. Dies erlaubt den Schluß, daß im Verlauf der Evolution für jede Aminosäure in jedem Protein festgelegt wurde, welche Genauigkeit bei welchem Aufwand optimal ist.

6. Fehlerhäufigkeit bei der Knüpfung der Peptidbindung am Ribosom

Nach Ablösung von der Aminoacyl-tRNA-Synthetase bildet die Aminoacyl-tRNA mit GTP und dem Elongationsfaktor Tu einen Komplex und diffundiert zum Ribosom. Unter Codon-Anticodon-Erkennung bindet sie an der

leeren Aminoacyl-tRNA-Bindungsstelle unter Freisetzung von EF-Tu und Hydrolyse von GTP zu GDP. Die in der benachbarten Peptidyl-tRNA-Bindungsstelle gebundene Peptidyl-tRNA mit dem schon synthetisierten Proteinfragment überträgt unter Knüpfung einer Peptidbindung das Polymer auf die Aminoacyl-tRNA (vgl. Abb. 1). Im nächsten Schritt, der Translokation, verläßt die desacylierte tRNA die Peptidyl-tRNA-Bindungsstelle, und die neue Peptidyl-tRNA bindet unter Weitergleiten der mRNA um ein Triplett an diese Stelle. Danach kann ein neuer Elongationscyclus stattfinden. An diesem Vorgang sind zahlreiche Proteine beteiligt; er verbraucht Energie in Form von GTP. Es ist nicht geklärt, welche Anteile der Energie der Bildung der Peptidbindung, der Paarung von Codon und Anticodon, der Regenerierung der Hilfsproteine zu aktiven Konformationen oder noch anderen Schritten dienen^[142–145].

Bei diesen Prozessen können Fehler auftreten: Einmal kann das Weitergleiten der mRNA am Ribosom um zwei oder vier Nucleotide statt der üblichen drei zu einer Verschiebung des Leserahmens führen; daraus resultiert ein völlig verändertes Translationsprodukt. Außerdem kann die Bindung einer tRNA mit nicht komplementärem Anticodon an die mRNA mit anschließender Reaktion den Einbau einer falschen Aminosäure in das Translationsprodukt bewirken.

Die Häufigkeit der Verschiebung des Leserahmens der mRNA liegt in der Größenordnung von $\approx 1:10^4$ bis 10^5 ^[146, 147]; damit liegt sie im Bereich der Gesamtfehlerhäufigkeit der Proteinbiosynthese, und es bedarf keines Korrekturlesens für das Weitergleiten der mRNA.

Die Bindung von tRNAs, bei welchen *eine* der drei Nucleobasen des Anticodons nicht komplementär zum Codon der mRNA ist, z.B. die Bindung von Leu-tRNA^{Leu} an eine für Phe-tRNA^{Phe} codierende mRNA, findet mit einer Häufigkeit von $\approx 1:10$ bis 100 statt^[148], einer Größenordnung, die der Fehlerhäufigkeit bei der Bildung von Komplexen aus zwei tRNAs durch Basenpaarung ihrer Anticodons in ribosomenfreien in-vitro-Versuchen entspricht^[149]. Zwei Korrekturmodelle, das Verweilzeit („time-delay“-)Modell von *Ninio*^[130, 150] und das kinetische Korrekturlesen von *Hopfield*^[100, 101], diskutieren dynamische Prozesse zur Aussonderung von nicht völlig komplementärer tRNA nach Komplexbildung mit dem Ribosom und der mRNA: Bei ersterem ist eine Konformationsänderung der tRNA als Folge der Codon-Anticodon-Wechselwirkung, bei letzterem die GTP-Spaltung der entscheidende Schritt. Der erhöhte GTP-Verbrauch mit nicht-komplementären tRNAs, den man als Indiz für ein Abbrechen und Wiederbeginnen des gesamten Vorgangs unter Verlust der Energie ansieht, favorisiert das kinetische Korrekturlesen, widerspricht aber den Verweilzeit-Vorstellungen nicht (Abb. 9)^[151, 152].

Für die Korrektur nicht-komplementärer tRNA wird noch ein dritter Mechanismus diskutiert, der nach der Translokation auf der Ebene der Peptidyl-tRNA stattfinden soll. Fehlerhafte Peptidyl-tRNA soll dabei schnell vom Ribosom abdissoziieren und durch Peptidyl-Hydrolase gespalten werden^[153–155]. Diese Korrektur würde in Abhängigkeit von der Länge des schon synthetisierten Fragmentes aber einen erheblichen Energieverlust mit sich bringen, da z.B. bei der Hydrolyse eines Peptides aus 250 Aminosäureresten etwa 1000 Moleküle GTP verloren wären (Abb. 9).

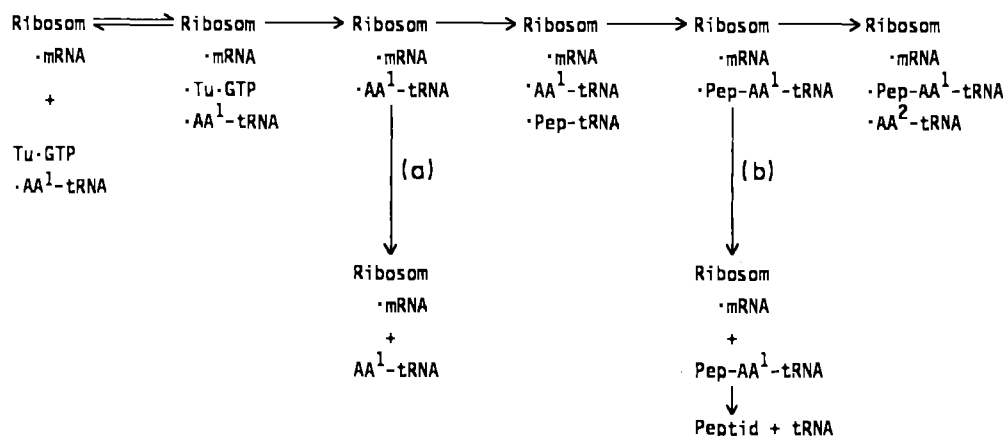


Abb. 9. Teilschritte der Knüpfung der Peptidbindung am Ribosom bei Prokaryonten mit den Prüf- und Korrekturschritten vor (a) und nach (b) der Knüpfung der Peptidbindung (mRNA = messenger-RNA, Tu·GTP = Elongationsfaktor·GTP-Komplex, AA-tRNA = Aminoacyl-tRNA, Pep-tRNA = Peptidyl-tRNA).

Aus den Daten der GTP-Hydrolyse der Arbeitsgruppen von Thompson^[148-151] und Kurland^[156] läßt sich eine Erniedrigung der Fehlerhäufigkeit durch die Korrekturmechanismen um einen Faktor von ≈ 100 bis 1000 ableiten; somit wird die Peptidbindung am Ribosom mit einer Gesamtfehlerhäufigkeit von $1:10^4$ bis 10^5 geknüpft^[157-159].

Das Prüf- und Korrektursystem der Ribosomen kann durch Antibiotica blockiert werden; es sind dann eine erhöhte Fehlerhäufigkeit und keinerlei GTP-Spaltung feststellbar^[160]. Außerdem gibt es Ribosomen-Mutanten, deren mutierte Proteine keine exakte tRNA-Bindung oder Peptidverknüpfung ermöglichen und die daher fehlerhaftes Protein synthetisieren^[161, 162].

Chemische Vorstellungen über die Veränderungen der Struktur ribosomaler Proteine durch Bindung von Antibiotica oder durch Mutation gibt es allerdings noch nicht.

7. Ausblick auf geklärte und ungeklärte Probleme

DNA- und RNA-Polymerasen würden ohne Prüf- und Korrektursysteme mit Fehlerhäufigkeiten von $\approx 1:10^4$ bis 10^5 arbeiten, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, die zwischen ähnlichen Aminosäuren zu unterscheiden haben, mit Fehlerhäufigkeiten von $\approx 1:10^1$ bis 10^2 und der ribosomale Mechanismus mit solchen von $\approx 1:10^1$ bis 10^2 (Abb. 10). Durch Korrektursysteme wird die DNA-Replikation in Prokaryonten auf Fehlerhäufigkeiten von $\approx 1:10^9$ bis 10^{11} , in Eukaryonten bis auf $\approx 1:10^{12}$ gesenkt, während alle zur Expression der Information gehörenden Reaktionen Fehlerhäufigkeiten von $\approx 1:10^3$ bis 10^5 aufweisen. Die 1963 von Lofsfeld^[11] bestimmte Gesamtfehlerhäufigkeit der Proteinbiosynthese von $\approx 1:3000$ wurde wiederholt in verschiedenen Systemen^[163-165] bestätigt, wenn auch nach

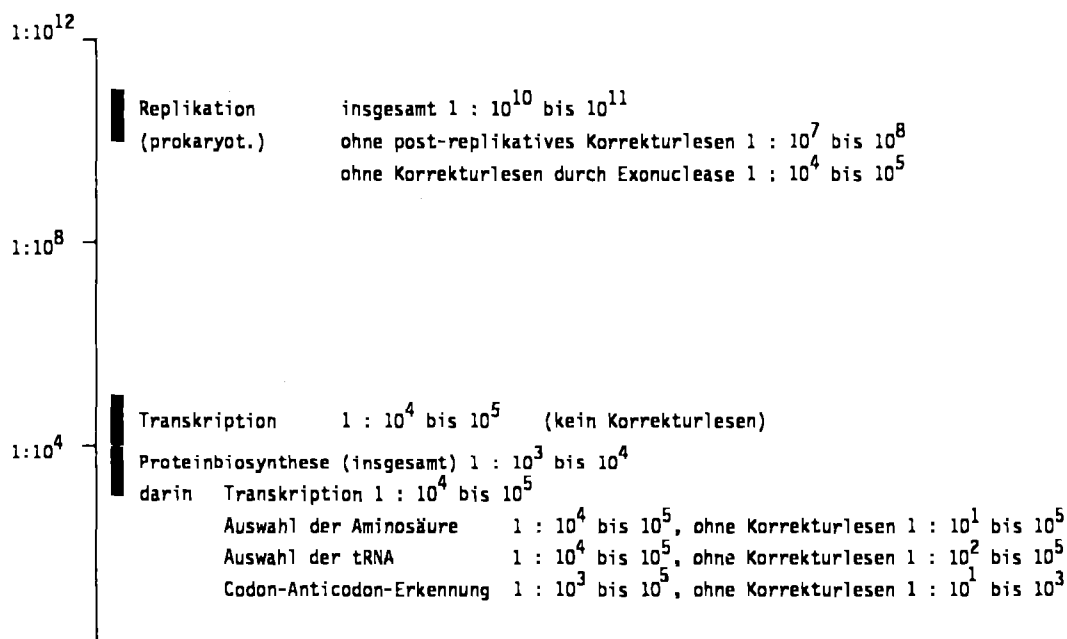


Abb. 10. Schematische mittlere Bereiche der Fehlerhäufigkeiten von Teilschritten bei der Replikation und Expression der genetischen Information. Die angegebenen Werte sind abgerundete Mittelwerte von in-vitro-Messungen; für einzelne Enzyme und Substrate gemessene Werte können davon beträchtlich abweichen. Die unter in-vivo-Bedingungen gültigen Werte könnten ebenfalls beträchtlich davon abweichen.

neueren Daten eine Abhängigkeit der Fehlerhäufigkeiten von der Synthesegeschwindigkeit und der Verwendung bestimmter Codons zu existieren scheint^[166–169].

Die energieabhängigen Korrektursysteme erbringen in allen betrachteten Fällen eine um einen Faktor von ≈ 100 bis 10000 niedrigere Fehlerhäufigkeit. Wird ein noch größerer Faktor benötigt, so muß offensichtlich ein weiteres Korrektursystem unter weiterem Energieaufwand etabliert werden, wie es z.B. bei der DNA-Replikation mit den postreplikativen Prüf- und Korrekturschritten geschehen ist.

Die für die Genauigkeit von Replikation und Proteinbiosynthese grundlegenden Mechanismen sind zwar phänomenologisch inzwischen erkannt worden, doch fehlt es noch an Informationen über die molekularen Mechanismen. Derzeit liegen die ersten Röntgen-Strukturanalysen von Methionyl-tRNA-Synthetase (*E. coli*) und Tyrosyl-tRNA-Synthetase (*Bacillus stearothermophilus*) vor^[170,171]. In beiden Strukturen ist die Aminosäurebindungstasche zu erkennen, nicht jedoch der Carboxyterminus von etwa 100 Aminosäureresten. Obwohl im Bereich der Aminosäurebindungstasche eine hohe Homologie beider Strukturen vorliegt, ist man von einer Zuordnung von Aminosäureresten zu den Korrektursystemen noch weit entfernt. Weitere Informationen dazu erwartet man von der gezielten Mutagenese^[172], die besonders bei der Tyrosyl-tRNA-Synthetase in Bearbeitung ist^[173]. Über die Bindungsstelle der tRNA und den Transfer des Aminoacylrests kann wegen des noch fehlenden Carboxyterminus nichts ausgesagt werden^[174,175]; an tRNA^{Phe} und tRNA^{Asp} wurden jedoch die Regionen, die an das Enzym binden, genau markiert^[176].

Bei der experimentellen Untersuchung der Fehlerhäufigkeiten von Enzymen und bei theoretischen Überlegungen zu Fehlerhäufigkeiten in biologischen Systemen ergab sich das Prinzip: Ohne Energieaufwand ist keine ausreichende Genauigkeit möglich; unendlich große Genauigkeit würde unendlich viel Energie erfordern. Die gemessenen Daten, die zwischen diesen Extremen liegen, lassen sich inzwischen mehr und mehr mit detaillierten mathematischen Modellen korrelieren^[63,177–180]. Die Flüsse von Stoffen, Energien und Informationen sind die eines Systems, das fern vom chemischen Gleichgewicht liegt^[181].

Professor Dr. R. B. Loftfield sei für die kritische Durchsicht des Manuskriptes herzlich gedankt.

Eingegangen am 23. August 1984 [A 556]

- [1] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 27 (1894) 2985.
- [2] D. E. Koshland, Jr., *Sci. Am.* 229 (4) (1973) 52.
- [3] A. R. Fersht: *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, San Francisco 1977.
- [4] C. Walsh: *Enzymatic Reaction Mechanism*, Freeman, San Francisco 1979.
- [5] F. Cramer, H. Hettler, *Naturwissenschaften* 54 (1967) 625.
- [6] F. Diederich, *Chem. Unserer Zeit* 17 (1983) 105.
- [7] M. B. Hoagland, *Biochim. Biophys. Acta* 16 (1955) 288.
- [8] I. R. Lehman, M. J. Bessman, E. S. Simms, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* 233 (1958) 163.
- [9] P. Berg, *Annu. Rev. Biochem.* 30 (1961) 293.
- [10] I. R. Lehman, C. C. Richardson, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 233.
- [11] R. B. Loftfield, *Biochem. J.* 89 (1963) 82.
- [12] J. W. Drake, *Nature (London)* 221 (1969) 1132.
- [13] J. W. Drake: *Molecular Basis of Mutation*, Holden-Day, San Francisco 1970.
- [14] J. W. Drake, R. M. Baltz, *Annu. Rev. Biochem.* 45 (1976) 11.
- [15] B. Singer, D. Grunberger: *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, Plenum Press, New York 1983.
- [16] J. H. Miller, *Annu. Rev. Genet.* 17 (1983) 215.
- [17] G. C. Walker, *Microbiol. Rev.* 48 (1984) 60.
- [18] T. Lindahl, *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 61.
- [19] A. L. Goldberg, J. F. Dice, *Annu. Rev. Biochem.* 43 (1974) 835.
- [20] H. P. Treffers, V. Spinelli, N. O. Belser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 40 (1954) 1064.
- [21] T. Miyake, *Genetics* 45 (1960) 11.
- [22] J. W. Drake, E. F. Allen, S. A. Forsberg, R. M. Preparata, E. O. Greening, *Nature (London)* 221 (1969) 1128.
- [23] E. C. Cox, *Annu. Rev. Genet.* 10 (1976) 135.
- [24] H. Echols, *Biochimie* 64 (1982) 571.
- [25] L. E. Orgel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 49 (1963) 517.
- [26] T. B. L. Kirkwood, *J. Theor. Biol.* 82 (1980) 363.
- [27] B. Hill, L. M. Franks, R. T. Holliday, *Trends Biochem. Sci.* 2 (1977) N80.
- [28] V. Murray, R. Holliday, *J. Mol. Biol.* 146 (1981) 55.
- [29] B. L. Strehler: *Time, Cells and Aging*, 2. Aufl., Academic Press, New York 1977.
- [30] J. R. Florini (Hrsg.): *CRC Handbook of Biochemistry in Ageing*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1981.
- [31] M. Rothstein (Hrsg.): *Review of Biological Research in Ageing*, Vol. 1, A. R. Liss, New York 1983.
- [32] F. Vogel, A. G. Motulsky: *Human Genetics*, Springer, Berlin 1982, S. 233.
- [33] R. M. Lawn, A. Efstratiadis, C. O'Connell, T. Maniatis, *Cell* 21 (1980) 647.
- [34] C. J. Tabin, S. M. Bradley, C. I. Bargmann, R. A. Weinberg, A. G. Papageorge, E. M. Scolnick, R. Dhar, D. R. Lowy, E. H. Chang, *Nature (London)* 300 (1982) 143.
- [35] E. P. Reddy, R. K. Reynolds, E. Santos, M. Barbacid, *Nature (London)* 300 (1982) 149.
- [36] D. J. Capon, E. Y. Chen, A. D. Levinson, P. H. Seeburg, D. V. Goeddel, *Nature (London)* 302 (1983) 33.
- [37] H. Land, L. F. Parada, R. A. Weinberg, *Science* 222 (1983) 771.
- [38] A. Kornberg: *DNA Replication*, Freeman, San Francisco 1980, und Supplement 1982.
- [39] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature (London)* 171 (1953) 964.
- [40] M. D. Topal, J. R. Fresco, *Nature (London)* 263 (1976) 285.
- [41] A. R. Fersht, J. W. Knill-Jones, W. C. Tsui, *J. Mol. Biol.* 156 (1982) 37.
- [42] R. G. Fowler, G. E. Degnen, E. C. Cox, *Mol. Gen. Genet.* 133 (1974) 179.
- [43] F. Grosse, G. Krauss, J. W. Knill-Jones, A. R. Fersht, *EMBO J.* 2 (1983) 1515.
- [44] L. A. Loeb, T. A. Kunkel, *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 429.
- [45] D. Brutlag, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 241.
- [46] T. Kornberg, M. L. Gefter, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 5369.
- [47] N. Muzyczka, R. L. Poland, M. J. Bessman, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 7116.
- [48] E. C. Cox, D. L. Horner, *Genetics* 100 (1982) 7.
- [49] R. Scheuermann, S. Tam, P. M. J. Burgers, C. Lu, H. Echols, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 7085.
- [50] L. A. Weymouth, L. A. Loeb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 1924.
- [51] A. R. Fersht, J. W. Knill-Jones, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 4251.
- [52] J. Neuhaard, E. Thomassen, *J. Bacteriol.* 126 (1976) 999.
- [53] L. A. Loeb, D. K. Dube, R. Beckman, M. Koplitz, K. P. Gopinathan, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 3978.
- [54] T. A. Kunkel, R. M. Schaaper, R. A. Beckman, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 9883.
- [55] T. A. Kunkel, F. Eckstein, A. S. Mildwan, R. M. Koplitz, L. A. Loeb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 6734.
- [56] A. R. Fersht, J. W. Knill-Jones, *J. Mol. Biol.* 165 (1983) 633.
- [57] T. A. Trautner (Hrsg.), Methylation of DNA, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 108 (1984).
- [58] M. G. Marinus, *J. Bacteriol.* 128 (1976) 853.
- [59] B. W. Glickman, M. Radman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 1063.
- [60] B. W. Glickman in J. F. Lemontt, W. M. Generoso (Hrsg.): *Molecular and Cellular Mechanisms of Mutagenesis*, Plenum Press, New York 1982, S. 65.
- [61] A. L. Lu, S. Clark, P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 4639.
- [62] C. F. Springgate, L. A. Loeb, *J. Mol. Biol.* 97 (1975) 577.
- [63] M. Eigen, W. Gardiner, P. Schuster, R. Winkler-Oswatitsch, *Sci. Am.* 244 (4) (1981) 78.
- [64] R. F. Rosenberger, G. Foskett, *Mol. Gen. Genet.* 183 (1981) 561.
- [65] P. R. Schimmel, D. Söll, J. N. Abelson (Hrsg.): *Transfer RNA: Structure Properties and Recognition*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1979.
- [66] D. Söll, J. N. Abelson, P. R. Schimmel (Hrsg.): *Transfer RNA: Biological Aspects*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1980.
- [67] S. Altman (Hrsg.): *Transfer RNA*, MIT Press, Cambridge, MA 1978.

- [68] P. R. Schimmel, D. Söll, *Annu. Rev. Biochem.* 48 (1979) 601.
- [69] P. R. Schimmel, *Crit. Rev. Biochem.* 9 (1980) 207.
- [70] P. R. Schimmel, *Adv. Enzymol.* 49 (1979) 187.
- [71] E. Holler, *Angew. Chem.* 90 (1978) 682; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17 (1978) 648.
- [72] R. B. Loftfield, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 12 (1972) 87.
- [73] G. L. Igloi, F. Cramer in [67], S. 294.
- [74] R. Wolfenden, *Biochemistry* 2 (1963) 1090.
- [75] D. Raacke, *Biochim. Biophys. Acta* 27 (1958) 416.
- [76] M. Sprinzl, D. H. Gauss, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) r1; vgl. auch S. Chládek, M. Sprinzl, *Angew. Chem.* 97 (1985) 377; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 371.
- [77] M. Garret, B. Labouesse, S. Litvak, P. Romby, J. P. Ebel, R. Giegé, *Eur. J. Biochem.* 138 (1984) 67.
- [78] F. von der Haar in J. Augustiniak (Hrsg.): *Biological Implications of Protein-Nucleic Acid Interactions*, Adam Mickiewicz University Press, Poznan (Polen) 1980, S. 325.
- [79] S. Beresten, V. Scheinker, O. Favorova, L. Kisselev, *Eur. J. Biochem.* 136 (1983) 559.
- [80] F. von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* 17 (1978) 4509.
- [81] W. Freist, F. Cramer, *J. Theor. Biol.* 58 (1976) 401.
- [82] F. von der Haar, E. Gaertner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 1378.
- [83] F. von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* 17 (1978) 3139.
- [84] M. Sprinzl, F. Cramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3049.
- [85] T. H. Fraser, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3044.
- [86] A. C. Chinault, K. H. Tan, S. M. Hassur, S. M. Hecht, *Biochemistry* 16 (1977) 766.
- [87] S. M. Hecht, *Tetrahedron* 33 (1977) 1671.
- [88] M. Yarus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 1915.
- [89] M. Yarus, M. Mertes, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 6744.
- [90] W. Freist, H. Sternbach, *Biochemistry* 23 (1984) 5742.
- [91] H. R. Bosshard, *Experientia* 32 (1976) 949.
- [92] L. Pauling, D. Pressman, *J. Am. Chem. Soc.* 67 (1945) 1003.
- [93] L. Pauling in: *Festschrift siebzigster Geburtstag Prof. Dr. Stoll*, Birkhäuser, Basel 1958, S. 597.
- [94] L. C. De Maeyer, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 80 (1976) 1189.
- [95] F. H. Bergmann, P. Berg, M. Dieckmann, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 1735.
- [96] R. B. Loftfield, E. A. Eigner, *Biochim. Biophys. Acta* 130 (1966) 426.
- [97] A. T. Norris, P. Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52 (1964) 330.
- [98] A. N. Baldwin, P. Berg, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 839.
- [99] E. W. Eldred, P. R. Schimmel, *Biochemistry* 11 (1972) 17.
- [100] J. J. Hopfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 4135.
- [101] J. J. Hopfield, T. Yamane, V. Yue, S. M. Coutts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 1164.
- [102] W. Freist, F. Cramer, *Biochemistry* 24 (1985), im Druck.
- [103] F. von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* 15 (1976) 4131.
- [104] R. S. Mulvey, A. R. Fersht, *Biochemistry* 16 (1977) 4731.
- [105] S. X. Lin, M. Baltzinger, P. Remy, *Biochemistry* 22 (1983) 681.
- [106] G. L. Igloi, F. von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* 16 (1977) 1696.
- [107] A. R. Fersht, *Biochemistry* 16 (1977) 1025.
- [108] H. Jakubowski, A. R. Fersht, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 3105.
- [109] A. R. Fersht, M. M. Kaethner, *Biochemistry* 15 (1976) 3342.
- [110] A. R. Fersht, C. Dingwall, *Biochemistry* 18 (1979) 1250.
- [111] A. R. Fersht, C. Dingwall, *Biochemistry* 18 (1979) 2627.
- [112] A. R. Fersht, *Trends Biochem. Sci.* 5 (1980) 262.
- [113] A. R. Fersht, C. Dingwall, *Biochemistry* 18 (1979) 1245.
- [114] A. R. Fersht, J. S. Shindler, W. C. Tsui, *Biochemistry* 19 (1980) 5520.
- [115] A. R. Fersht, C. Dingwall, *Biochemistry* 18 (1979) 1238.
- [116] W. C. Tsui, A. R. Fersht, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 4627.
- [117] H. Sternbach, F. von der Haar, E. Schlimme, E. Gaertner, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* 22 (1971) 166.
- [118] M. Sprinzl, H. Sternbach, *Methods Enzymol.* 59 (1979) 182.
- [119] F. Cramer, F. von der Haar, G. L. Igloi in [65], S. 267.
- [120] F. von der Haar, *FEBS Lett.* 79 (1977) 225.
- [121] F. von der Haar, *Naturwissenschaften* 63 (1976) 519.
- [122] G. L. Igloi, F. von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* 17 (1978) 3459.
- [123] G. L. Igloi, F. von der Haar, F. Cramer, *Methods Enzymol.* 59 (1979) 282.
- [124] F. von der Haar, F. Cramer, *FEBS Lett.* 56 (1975) 215.
- [125] S. Peters, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen 1981.
- [126] S. Peters, F. von der Haar, F. Cramer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363 (1982) 884.
- [127] S. Englisch, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig 1984.
- [128] S. Englisch, F. von der Haar, F. Cramer sowie S. Englisch, U. Englisch, F. Cramer, F. von der Haar, *Proc. FEBS Meeting, Moscow 1984*.
- [129] L. T. Smith, M. Cohn, *Biochemistry* 21 (1982) 1530.
- [130] J. Ninio, *Biochimie* 57 (1975) 587.
- [131] S. K. Degtyarev, *FEBS Lett.* 154 (1983) 293.
- [132] H. T. Wright, *FEBS Lett.* 118 (1980) 165.
- [133] J. J. Hopfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 5248.
- [134] H.-J. Gabius, F. von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* 22 (1983) 2331.
- [135] H.-J. Gabius, R. Engelhardt, F. R. Schröder, F. Cramer, *Biochemistry* 22 (1983) 5306.
- [136] F. Cramer, H.-J. Gabius in B. F. C. Clark, H. V. Petersen (Hrsg.): *Gene Expression: The Translational Step and its Control*, Munksgaard, Copenhagen 1984, S. 178.
- [137] F. von der Haar, H.-J. Gabius, F. Cramer, *Angew. Chem.* 93 (1981) 250; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 217.
- [138] U. Englisch, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig 1983.
- [139] N. Piel, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig 1982.
- [140] A. R. Fersht, C. Dingwall, *Biochemistry* 19 (1980) 5520.
- [141] T. S. Papas, H. Mehler, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 1588.
- [142] L. Bosch (Hrsg.): *The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation*, North Holland, Amsterdam 1972.
- [143] H. Weissbach, S. Pestka: *Molecular Mechanism of Protein Biosynthesis*, Academic Press, New York 1977.
- [144] L. Bosch, D. Kraal, P. H. Van der Meide, F. J. Duisterwinkel, J. M. Van Noort, *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 30 (1983) 92.
- [145] B. F. C. Clark in T. Hunt, S. Prentis, J. Tooze (Hrsg.): *DNA makes RNA makes PROTEIN*, Elsevier, Amsterdam 1983, S. 213.
- [146] J. F. Atkins, D. Elseviers, L. Gorini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 1192.
- [147] C. G. Kurland in J. E. Celis, J. D. Smith (Hrsg.): *Nonsense Mutations and tRNA Suppressors*, Academic Press, London 1979, S. 97.
- [148] R. C. Thompson, D. B. Dix, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 6677.
- [149] H. J. Grosjean, S. De Henau, D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 610.
- [150] J. Ninio, *J. Mol. Biol.* 84 (1974) 297.
- [151] R. C. Thompson, P. J. Stone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 198.
- [152] J. L. Yates, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 1150.
- [153] J. R. Menninger, *Mech. Ageing Dev.* 6 (1977) 131.
- [154] J. R. Menninger, *J. Mol. Biol.* 171 (1983) 383.
- [155] A. B. Caplan, J. R. Menninger, *Mol. Gen. Genet.* 194 (1984) 534.
- [156] T. Ruusala, M. Ehrenberg, C. G. Kurland, *EMBO J.* 1 (1982) 741.
- [157] M. Yarus, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 23 (1979) 195.
- [158] A. K. Abraham, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 28 (1983) 82.
- [159] R. C. Thompson, D. B. Dix, R. B. Gerson, A. M. Karim, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 81.
- [160] L. Brakier Gingras, P. Phoenix, *Can. J. Biochem.* 62 (1984) 231.
- [161] L. Gorini in M. Nomura, A. Tissieres, P. Lengyel (Hrsg.): *Ribosomes*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1974, S. 791.
- [162] M. Nomura, E. A. Morgan, S. R. Jaskunas, *Annu. Rev. Genet.* 11 (1977) 297.
- [163] R. B. Loftfield, D. Vanderjagt, *Biochem. J.* 128 (1973) 1353.
- [164] P. H. O'Farrell, *Cell* 14 (1978) 545.
- [165] N. Ellis, J. Gallant, *Mol. Gen. Genet.* 188 (1982) 169.
- [166] R. C. Thompson, A. R. Karim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 4922.
- [167] M. Laughrea, *Biochimie* 63 (1981) 145.
- [168] J. Parker, T. C. Johnston, P. T. Borgia, G. Holtz, E. Remaut, W. Fiers, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 10007.
- [169] F. Bouadloun, D. Donner, C. G. Kurland, *EMBO J.* 2 (1983) 1351.
- [170] M. J. Irwin, J. Nyborg, B. R. Reid, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* 105 (1976) 577.
- [171] C. Zelwer, J. L. Risler, S. Brunie, *J. Mol. Biol.* 155 (1982) 63.
- [172] M. Smith, *Trends Biochem. Sci.* 7 (1982) 440.
- [173] A. R. Fersht, J.-P. Shi, A. J. Wilkinson, D. M. Blow, P. Carter, M. M. Y. Waye, G. P. Winter, *Angew. Chem.* 96 (1984) 455; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 467.
- [174] D. M. Blow, T. N. Bhat, A. Metcalfe, J. L. Risler, S. Brunie, C. Zelwer, *J. Mol. Biol.* 171 (1983) 571.
- [175] M. M. Y. Waye, G. Winter, A. J. Wilkinson, A. R. Fersht, *EMBO J.* 2 (1983) 1827.
- [176] P. Romby, D. Moras, M. Bergdoll, P. Dumas, V. V. Vlassov, E. Westhof, J. P. Ebel, R. Giegé, *J. Mol. Biol.* 184 (1985) 455.
- [177] M. Hasegawa, T. Yano, T. Miyata, *J. Mol. Evol.* 20 (1984) 77.
- [178] C. Blomberg, *Q. Rev. Biophys.* 16 (1983) 415.
- [179] M. A. Savageau, R. R. Freter, *Biochemistry* 18 (1979) 3486.
- [180] J. Durup, *J. Theor. Biol.* 94 (1982) 607.
- [181] I. Prigogine, R. Lefever, *Adv. Chem. Phys.* 39 (1975) 1.