

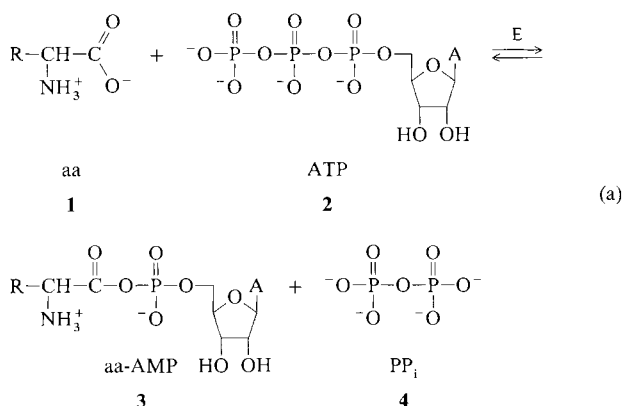
# Aminoacyl-tRNA-Synthetasen: Einteilung in zwei Klassen durch Chemie an Substraten und Enzymen vorweggenommen

Von Friedrich Cramer\* und Wolfgang Freist\*

In biologischen Systemen werden fast alle chemischen Reaktionen durch Enzyme katalysiert. Um die Wirkungsweise dieser Biokatalysatoren zu verstehen, sind genaue Kenntnisse ihrer Struktur sowie ihres aktiven Zentrums und seiner funktionellen Gruppen erforderlich. Entscheidend sind weiterhin diejenigen Teile des Proteinmoleküls, die für die genaue Erkennung der Substrate, d.h. für die spezifische Wechselwirkung der Enzyme mit ihren Reaktanten, verantwortlich sind. Von der Isolierung eines Enzyms bis zur Bestimmung seines genauen Aufbaus durch Röntgenstrukturanalysen können Jahrzehnte vergehen. Dem Chemiker stehen jedoch Mittel zur Verfügung, um relativ schnell zu ersten Informationen zu kommen: die Synthese von modifizierten Substraten und Affinitätsmarkierungen. Diese beiden Methoden wurden auch in den vergangenen fünfundzwanzig Jahren an Aminoacyl-tRNA-Synthetasen erprobt. Heute ist über die Strukturen dieser Enzyme genügend bekannt, um den Erfolg dieser „Chemie an Makromolekülen“ oder deren Substraten bewerten zu können. Es zeigt sich, daß die Chemiker hier wichtige Vorarbeit für die Strukturanalytiker geleistet haben.

## 1. Einleitung

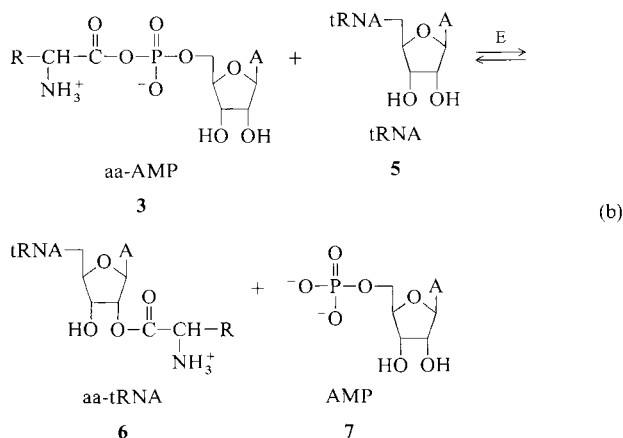
Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sind ein wesentlicher Teil des Übersetzungsapparates, der in jeder Zelle die in Nucleotidsequenzen gespeicherte genetische Information in die Aminosäuresequenzen der Proteine umwandelt. Sie katalysieren die Veresterung einer bestimmten Transfer-RNA (tRNA) mit einer bestimmten Aminosäure. Im ersten Reaktionsschritt wird aus der Aminosäure **1** und ATP **2** ein enzymgebundenes Aminoacyladenylat **3** gebildet [Gl. (a)]; die



„aktivierte“ Aminosäure **3** wird im zweiten Schritt mit einer der beiden terminalen OH-Gruppen der tRNA verestert<sup>[1-3]</sup> [Gl. (b)].

Bei beiden Schritten werden hohe Anforderungen an die Spezifität der Enzyme gestellt; sie müssen eine bestimmte Aminosäure unter 20 teilweise sehr ähnlichen erkennen und eine bestimmte tRNA unter 40–60 ebenfalls sehr ähnlichen tRNA-Molekülen auswählen, da sonst fehlerhafte und möglicherweise funktionsunfähige Proteine synthetisiert werden.

Die hohe Spezifität der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen weckte schon bald nach ihrer Entdeckung das besondere Interesse am Mechanismus der von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen, den daran beteiligten funktionellen Gruppen und an der Lage des aktiven Zentrums innerhalb des Proteinmoleküls. So wurden schon lange vor der Aufklä-



rung von Enzymstrukturen modifizierte Substrate synthetisiert, um mit ihnen für die Substraterkennung wichtige Atomgruppen zu ermitteln, während man gleichzeitig mit Affinitätsmarkierungen versuchte, essentielle Gruppen des aktiven Zentrums zu identifizieren.

## 2. Primärstrukturen der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Schon bald nach der Isolierung der ersten Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurde damit begonnen, ihre Aminosäuresequenz mit den klassischen Methoden der Proteinsequenzierung zu untersuchen. Doch noch bevor eine Primärstruktur auf diese Weise vollständig geklärt war, erwies sich der Weg über die Sequenzierung der Synthetasegene als schneller und vorteilhafter. So wurden auch die durch

[\*] Prof. Dr. F. Cramer, Dr. W. Freist  
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin  
Hermann-Rein-Strasse 3, W-3400 Göttingen

Edman-Abbau erhaltenen Teilstrukturen der aus 939 Aminosäuren bestehenden Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *Escherichia coli*<sup>[4, 5]</sup> bestätigt und vervollständigt durch Daten, die durch DNA-Sequenzierung erhalten wurden<sup>[6]</sup>. Trotz der Fortschritte in der Technik der Gensequenzierung ist der klassische Edman-Abbau der Proteine nicht ganz entbehrlich geworden. So erwies es sich als nützlich, auch ein Teilstück des Proteins klassisch zu sequenzieren, um eine Kontrolle darüber zu haben, ob den einzelnen Aminosäuren der Proteinsequenz auch die richtigen Nucleotide als Triplets des genetischen Codes zugeordnet wurden<sup>[7]</sup>.

Inzwischen sind alle Primärstrukturen der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen oder ihrer Gene aus *E. coli* und die meisten der aus Hefe isolierten Enzyme bekannt. Sie sind in allgemein zugänglichen Datenbanken wie der EMBO-Library in Heidelberg oder der Genbank in Los Alamos gespeichert. In Lösung liegen die Enzyme entweder als Monomere ( $\alpha$ ) oder als Dimere vom Quartärstrukturtyp  $\alpha_2$  vor, in einem und in zwei Fällen in den Formen  $\alpha_4$  bzw.  $\alpha_2\beta_2$  (siehe Tabelle 1)<sup>[8, 9]</sup>. Die Molekulargewichte der  $\alpha$ -Einheiten schwanken zwischen 37 000 und 126 000, entsprechend etwa 300 bis 1100 Aminosäureresten. Synthetasen aus demselben Organismus, aber spezifisch für verschiedene Aminosäuren, oder aus verschiedenen Organismen, aber spezifisch für dieselbe Aminosäure, weisen wenig Gemeinsamkeiten auf. In den meisten Fällen waren nur ca. 20% der Aminosäurereste identisch, wenn die Gesamtsequenzen in passender Weise

gegeneinander verschoben (aligned) und miteinander verglichen wurden<sup>[10]</sup>.

## 2.1. Einteilung in Klasse-I- und Klasse-II-Enzyme

Trotz der geringen Sequenzhomologien von Synthetaseprimärstrukturen war es möglich, die Enzyme aufgrund relativ kurzer gemeinsamer Teilsequenzen, der „Konsensus-“ oder „Signatursequenzen“, in zwei Klassen (Klasse I und Klasse II) zu je zehn Enzymen einzuteilen<sup>[11–13]</sup>.

Die beiden Konsensus-Sequenzen der Klasse I werden, entsprechend dem Einbuchstaben-Code für die Aminosäuren, „HIGH“- (His-Ile-Gly-His) und „KMSKS“-Region (Lys-Met-Ser-Lys-Ser) genannt. Nach den drei bisher vorliegenden Röntgenstrukturanalysen von Klasse-I-Synthetasen weisen sie auf eine Strukturdomäne hin, die als „Rossmann-“ oder „Nucleotidbindungsstellen“-Faltung bezeichnet wird<sup>[11–19]</sup>. Sie wurde zuvor bei mehreren Dehydrogenasen als die Bindungsstelle von Nicotinamidadeninucleotid (NAD<sup>+</sup>) erkannt<sup>[20]</sup> und besteht, generell gesehen, aus zwei Hälften zu je drei (oder einmal zwei) parallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen und je zwei (oder einmal drei)  $\alpha$ -Helices (Abb. 1). Bei allen bisher untersuchten Klasse-I-Aminoacyl-tRNA-Synthetasen liegen in diesem Bereich die Bindungsstellen für ATP oder das Aminoacyladenylat und für das C-C-A-Ende der tRNA<sup>[11–19]</sup>. Als Beispiel für die Struktur einer Klasse-I-Synthetase ist in Abbildung 2 die der Methionyl-tRNA-



*Friedrich Cramer, emeritierter Direktor am Max-Planck-Institut (MPI) für experimentelle Medizin in Göttingen, Honorarprofessor an den Universitäten Göttingen und Braunschweig, wurde 1923 geboren. Er studierte in Heidelberg von 1944–1949 Chemie, wo er 1949 bei K. Freudenberg promovierte und sich 1953 habilitierte. In den Jahren 1953 und 1954 war er Gastdozent an der University of Cambridge (Großbritannien), 1959 wurde er zum Professor an der Technischen Hochschule Darmstadt ernannt. Von 1962 bis 1991 war er Direktor am MPI für experimentelle Medizin in Göttingen. Er ist Mitglied der Göttinger und der Heidelberger Akademie der Wissenschaften, der Polnischen Akademie der Wissenschaften sowie Honorary Fellow der American Society of Biological Chemists. 1990 erhielt er den Bayerischen Staatspreis für Literatur (Karl-Vofler-Preis) und im selben Jahr die Kopernikus-Medaille der Polnischen Akademie der Wissenschaften. Er ist Hauptautor von ca. 400 Originalpublikationen über Einschlußverbindungen, die Synthese von Nucleinsäuren, die Struktur von Transfer-Ribonucleinsäure, über Proteinbiosynthese, molekulare Genetik und über Zell-Zell-Spezifität. Friedrich Cramer hat auch eine Reihe von Büchern verfaßt: Einschlußverbindungen (1954), Forscher zwischen Wissen und Gewissen (1974), Fortschritt durch Verzicht – Kann das biologische Wesen Mensch seine Zukunft bewältigen? (1975) Chaos und Ordnung – die komplexe Struktur des Lebendigen (1988), Amazonas (Novelle, 1991) Die Natur der Schönheit – Zur Dynamik der Schönen Formen (1992), Der Zeitbaum – Grundlegung einer allgemeinen Zeittheorie (1993).*



*Wolfgang Freist, geboren 1940 in Bremen, studierte Chemie an der Universität Kiel, wo er 1968 mit einer Arbeit über Alkaloide bei R. Greve promovierte. Seit 1968 ist er in der Abteilung Chemie des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin in Göttingen tätig. Seine Arbeitsgebiete umfassen die Synthesen von modifizierten Nucleotiden als Substratanaloga, die Substratspezifität von Enzymen der Proteinbiosynthese und Enzymkinetiken.*

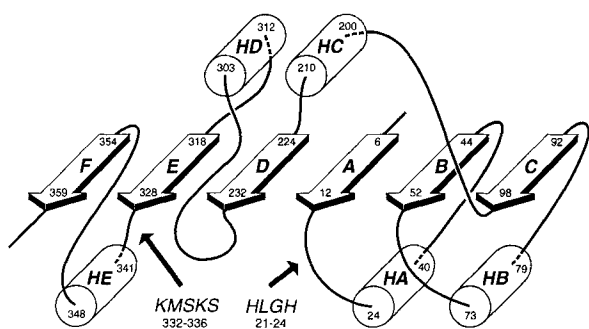


Abb. 1. Schematische Darstellung der N-terminalen Domäne der Methionyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli*. Sie enthält die für Klasse-I-Synthetasen typische Rossmann-Faltung, in der die Bindungsstellen für ATP und das C-C-A-Ende der tRNA liegen. Die Ziffern geben die fortlaufende Nummerierung der Aminosäuren vom N-Terminus her wieder. In diesem Teil des Enzyms liegen auch die für die Klasse I typischen Signatursequenzen KMSKS und HIGH (bei Methionyl-tRNA-Synthetase HLGH). Die Benennung der  $\beta$ -Faltblattstränge (A, B, C, D, E, F) und der Helices ist die bei der Methionyl-tRNA-Synthetase übliche; bei Faltblattstrang F und bei der Helix HE ist nicht klar, ob sie allgemein zu der Nucleotidbindungsstellen-Faltung gerechnet werden können [17]. (Die Zeichnung ist eine modifizierte Version der Abbildungen 2, 3, 1 und 7 in Lit. [16, 17, 103, 104].)

Synthetase aus *E. coli* gezeigt<sup>[17]</sup>. In diesem Fall konnte nicht das vollständige dimere Synthetase-Molekül kristallisiert

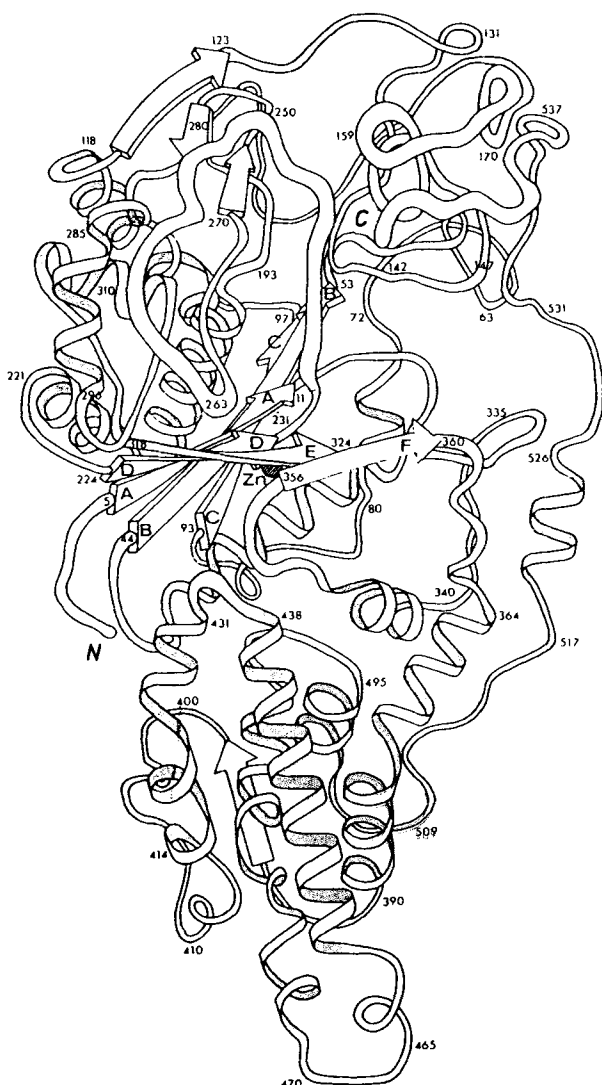


Abb. 2. Schematische Darstellung der Struktur eines tryptischen Fragments der Methionyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli*; aus Lit. [17].

werden, sondern nur ein monomeres, tryptisches Fragment, dem zwar 125 C-terminale Aminosäurereste fehlten<sup>[17, 26]</sup>, das aber trotzdem noch die volle enzymatische Aktivität besaß. Es besteht aus zwei Domänen und einem C-terminalen Polypeptid. Die erste, N-terminale Domäne enthält die Rossman-Faltung aus sechs parallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen und fünf  $\alpha$ -Helices (Aminosäurereste 1–360).

Die zweite Domäne (Positionen 361–525) besteht überwiegend aus  $\alpha$ -Helices; das C-terminale Polypeptid, das bis zur Position 551 reicht, faltet sich teilweise zurück in Richtung auf den N-Terminus und verbindet so das C-terminale Polypeptid mit den N-terminalen Domänen.

Die bisher bekannten Synthetasestrukturen wurden kürzlich von Moras in einem Übersichtsartikel zusammengefaßt<sup>[21]</sup>. Der Klasse I werden die Synthetasen zugeordnet, die spezifisch sind für Valin, Leucin, Isoleucin, Glutaminsäure, Glutamin, Arginin, Tyrosin, Tryptophan, Methionin und Cystein (Tabelle 1). Durch einen detaillierten Struktur- und Sequenzvergleich lassen sich die Klasse-I-Enzyme noch in drei Unterklassen einteilen<sup>[13]</sup>, die Ia, Ib und Ic genannt werden sollen. Klasse Ia besteht aus der Tyrosyl- und der Arginyl-tRNA-Synthetase, in Klasse Ib sind Glutaminyl-, Glutamyl- und Tryptophanyl-tRNA-Synthetase zusammengefaßt, Klasse Ic besteht aus den Enzymen, die Leucin, Isoleucin, Valin, Methionin und Cystein umsetzen.

Den Klasse-II-Enzymen sind drei „Sequenzmotive“ gemeinsam, die Motiv 1, 2 und 3 genannt werden; zwei Enzyme weisen allerdings nur das Motiv 3 auf (Tabelle 1)<sup>[11, 12]</sup>. Jedes Motiv hat ein unveränderliches Zentrum, einen festen Aminosäurerest. Bei Motiv 1 ist es Prolyl P, „davor“ steht zweimal je ein hydrophober Rest  $\phi$ , gefolgt von je zwei beliebigen Aminoacylgruppen x, am Anfang des Motivs meistens Glycyl g. „Nach“ dem Prolinrest folgen zwei hydrophobe Gruppen  $\phi$ .

$g\phi xx\phi xxP\phi\phi$  Motiv 1

Motiv 2 besteht aus zwei Teilen, der erste beginnt mit Phenylalanyl F, Tyrosyl Y oder Histidyl H, dann folgt als unveränderliches Zentrum Arginyl R, weiterhin ein variabler Rest und Glutamyl E oder Aspartyl D.

(F/Y/H)Rx(E/D) Motiv 2, 1. Teil

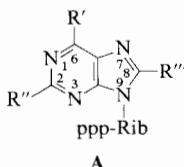
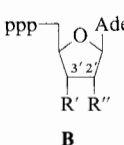
Zwischen vier und zwölf Aminoacylgruppen „aufwärts“ beginnt der zweite Teil mit Arginyl oder Histidyl, es folgen drei variable Reste und als unveränderliches Zentrum Phenylalanin, dem wiederum drei variable Reste und Aspartyl oder Glutamyl folgen.

(R/H)<sub>xxx</sub>F<sub>xxx</sub>(D/E) Motiv 2, 2. Teil

Motiv 3 beginnt mit dem Acylrest einer kurzkettigen Aminosäure  $\lambda$ , zunächst gefolgt von einem variablen und einem hydrophoben Rest; dann zweimal von je einem häufig auftretenden Glycylrest und je einer hydrophoben Gruppe. Dann steht vor dem zentralen Arginyl- meist noch ein Glutamylrest  $\epsilon$  (der Kleinbuchstabe deutet an, daß dieser Rest variieren kann), den Abschluß des Motivs bilden vier hydrophobe Reste.



$\lambda\chi\phi g\phi g\phi eR\phi\phi\phi\phi$  Motiv 3

Tabelle 1. Einteilung der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen in Klassen und Unterklassen (die weitere, in Zeile vier gestrichelt angedeutete Unterteilung der Enzyme entspricht einer weiteren Feineinteilung nach genauen Sequenzvergleichen [13, 25]) sowie Quartärstrukturen, Aminoacylierungspositionen, Spezifität in bezug auf ATP-Analoga A (basenmodifiziert) und B (zuckermodifiziert) und Stammbaum der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen nach Sequenzvergleich. s bedeutet, daß die Substanz für das betreffende Enzym Substrat ist. i bedeutet, daß die Substanz als Inhibitor wirkt. — zeigt an, daß die Substanz weder Substrat noch Inhibitor ist.

							
R'	R''	R'''					
2-Cl-ATP	NH <sub>2</sub>	Cl	H		2'-d-ATP	OH	H
8-Br-ATP	NH <sub>2</sub>	H	Br		3'-d-ATP	H	OH
TuTP	= 7-Desazaadenosin-				2'-OCH <sub>3</sub> -ATP	OH	OCH <sub>3</sub>
	triphosphat				3'-OCH <sub>3</sub> -ATP	OCH <sub>3</sub>	OH

Klasse	I										II									
Konsensus-Sequenzen	HIGH + KMSKS										Motive 1, 2, 3			Motiv 3		Motive 1, 2, 3				
Unterklasse nach Lit. [13, 25]	Ib			Ia		Ic					IIa				IIc		IIb			
Aminosäurespezifität	Glu	Gln	Trp	Arg	Tyr	Cys	Ile	Leu	Val	Met	Ser	Thr	His	Pro	Ala	Gly	Phe	Asp	Asn	Lys
Quartärstruktur	α	α	α <sub>2</sub>	α	α <sub>2</sub>	α	α	α	α	α <sub>2</sub>	α <sub>2</sub>	α <sub>2</sub>	α <sub>2</sub>	α <sub>2</sub>	α <sub>4</sub>	α <sub>2</sub> β <sub>2</sub>	α <sub>2</sub> β <sub>2</sub>	α <sub>2</sub>	α <sub>2</sub>	α <sub>2</sub>
Position der veresterten tRNA-OH-Gruppe	2'	2'	2'	2'	2',3'	2',3'	2'	2'	2'	2'	3'	3'	3'	3'	3'	3'	2'	3'	3'	3'

ATP-Analoga-Spezifität:																				
TuTP	s	s	i	s	s	s	s	s	s	s	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2-Cl-ATP	i	i	s	—	—	—	s	s	s	s	s	s	s	—	—	s	s	s	s	s
8-Br-ATP	i	i	i	i	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2'-d-ATP	i	i	s	s	—	—	—	—	—	—	s	s	—	—	—	s	s	s	s	s
3'-d-ATP	i	i	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	i	i	i	s	s	s	s	s
2'-OCH <sub>3</sub> -ATP	i	i	s	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	i	i	—	—	—	—	—
3'-OCH <sub>3</sub> -ATP	i	i	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	i	i	—	—	—	—	—

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen-Stammbaum nach Lit. [44]																					
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Die bisher vorliegenden Röntgenstrukturanalysen von Klasse-II-Enzymen, der Seryl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* und der Aspartyl-tRNA-Synthetase aus Hefe, zeigen, daß die Moleküle aus zwei Domänen aufgebaut sind, einer

N-terminalen „helicalen“ und einer C-terminalen „katalytischen“<sup>[22–24]</sup>. Die drei charakteristischen Motive befinden sich sämtlich in der katalytischen Domäne, die um ein siebensträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt aufgebaut ist<sup>[22–24]</sup> (Abb. 3). Als Beispiel ist in Abbildung 4 die Struktur der Seryl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* gezeigt<sup>[23, 25]</sup>. Dieses Enzym gehört dem Quartärstrukturtyp  $\alpha_2$  an, jede der beiden Untereinheiten besteht aus 430 Aminosäureresten. Dieser Strukturtyp weist eine C-terminale, 330 Aminosäurereste umfassende katalytische Untereinheit auf, die das siebensträngige  $\beta$ -Faltblatt enthält; die 100 N-terminalen Aminosäurereste bilden einen langen, aus zwei antiparallelen Helices bestehenden Arm. Das aktive Zentrum dürfte sowohl von Teilen des  $\beta$ -Faltblatts als auch von den verbindenden Einzelsträngen gebildet werden. Ein ungeordneter Einzelstrang, der das Motiv 2 enthält, scheint eine flexible „Klappe“ über dem aktiven Zentrum zu bilden<sup>[25]</sup>.

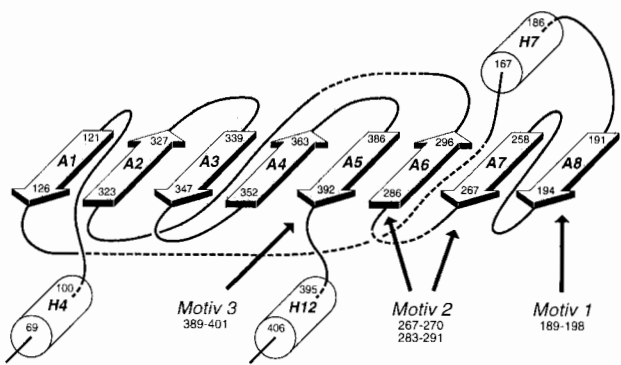


Abb. 3. Schematische Darstellung der C-terminalen katalytischen Domäne der Seryl-tRNA-Synthetase aus *E. coli*. Der Aufbau aus sieben antiparallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen gilt als typisch für Aminoacyl-tRNA-Synthetasen der Klasse II. In den gestrichelten Bereichen treten Abweichungen zur bisher einzigen weiteren röntgenkristallographisch bestimmten Klasse-II-Synthetase-Struktur auf, der von Aspartyl-tRNA-Synthetase aus Hefe. Die C-terminale Domäne des Enzyms enthält die für die Klasse II typischen Sequenzmotive. Die Ziffern entsprechen der fortlaufenden Numerierung der Aminosäuren vom N-Terminus her, die Benennung der Faltblattstränge und Helices ist die bei der Seryl-tRNA-Synthetase übliche. (Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an die Abbildungen 5, 7 und 1 in Lit. [23, 24, 25].)

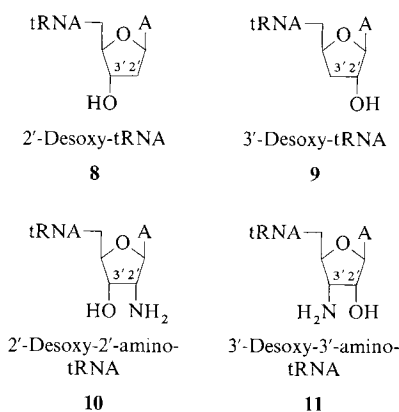
Motiv 1 hat wahrscheinlich nur eine indirekte Bedeutung für das aktive Zentrum durch Stabilisierung seiner Konformation<sup>[23]</sup>; nach einem Vergleich der Aminosäuresequenz der Seryl-tRNA-Synthetase mit denen anderer Klasse-II-Enzyme<sup>[25]</sup> ist es wahrscheinlich verantwortlich für die Assoziation der monomeren Untereinheiten der Enzyme zum  $\alpha_2$ -Quartärstrukturtyp; einigen Klasse-II-Enzymen, die aus vier Untereinheiten bestehen, fehlt dieses Motiv (siehe Tabelle 1). Die Motive 2 und 3 sind dagegen wohl Teile des in der C-ter-

alanin, Glycin und Alanin (siehe Tabelle 1)<sup>[25]</sup>. Von den letzteren sollen die Phenyl- und die Glycyl-tRNA-Synthetase in Teilsequenzen Ähnlichkeiten mit den Enzymen der Unterklasse IIb aufweisen, Alanyl-tRNA-Synthetase mit denen der Unterklasse IIa (siehe Tabelle 1).

Beeinflußt von Emil Fischers „Schloß-Schlüssel“-Modell für die Enzym-Substrat-Wechselwirkung haben Chemiker seit jeher Analoga von Enzymsubstraten, Hormonen, Antibiotika und pflanzlichen Wirkstoffen synthetisiert. Dieses führte nicht nur zur Entwicklung neuer, hochwirksamer Pharmaka, sondern lieferte Erkenntnisse über die Mechanismen von enzymkatalysierten Reaktionen sowie über die Strukturen von Substratbindungsstellen und von Rezeptoren für Hormone und Pharmaka.

### 3.1. tRNA-Analoga

Als ungewöhnlich aufschlußreich für die nähere Aufklärung des Mechanismus der Aminoacylierung und, wie sich jetzt zeigt, auch für die Klasseneinteilung der Synthetasen, erwiesen sich Experimente mit modifizierten tRNAs, wie **8–11**, in denen der endständigen Adenosin-Einheit eine der freien Hydroxygruppen fehlt oder durch eine Aminogruppe ersetzt ist<sup>[26–32]</sup>.


$$\text{tRNA-C-C} \xrightleftharpoons[\text{tRNA-Nucleotidyl-transferase, NTP}]{\text{tRNA-Nucleotidyl-transferase, NTP}} \text{tRNA-C-C-N} + \text{PP}_i \quad (\text{c})$$

12
13

Es zeigte sich, daß fast alle Synthetasen nur eine der beiden Desoxy- oder Amino-tRNAs mit der Aminosäure verestern (siehe Tabelle 1)<sup>[26-33]</sup>. Man schloß daraus, daß auch die natürlich vorkommende tRNA in der Zelle nur an einer bestimmten OH-Gruppe der endständigen Ribose beladen wird, das Primärprodukt isomerisiert dann allerdings spontan zu einem Gemisch aus 2'- und 3'-O-Aminoacyl-estern<sup>[32, 34]</sup>. Vergleicht man die durch Modifizierung der tRNAs erhaltene Einteilung der Synthetasen in 2'- und 3'-„Belader“, so zeigt es sich, daß diese erstaunlicherweise vollkommen mit der Einteilung in Klasse-I- und Klasse-II-Enzyme übereinstimmt: Die Klasse-I-Synthetasen verestern die tRNA an der 2', die Klasse-II-Synthetasen an der 3'-OH-Gruppe (siehe Tabelle 1). Diese Eigenschaft muß also durch die prinzipiell verschiedene Struktur der beiden Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Gruppen bedingt sein. Ausnahmen bilden lediglich die Phenylalanyl-tRNA-Synthetase, die als Klasse-II-Enzym die 2'-OH-Gruppe der Ribose belädt und die Cysteinyl- und Tyrosyl-tRNA-Synthetasen, die anscheinend beide OH-Gruppen verestern können.

*Angew. Chem.* **1993**, *105*, 198–209

tung, daß AMP auch an der Tyrosinbindungsstelle gebunden werden kann, wenn es allein in der Lösung vorhanden ist<sup>[36]</sup>. Dies führte zu der Vermutung, daß auch der Adenosinmonophosphat-Teil des Aminoacyladenylats sowohl in einer Nucleotid- als auch in der Aminosäurebindungsstelle gebunden werden könnte. Der dadurch mögliche Lagewechsel des Aminoacyladenylats könnte die Carbonylgruppe des Aminoacylrests abwechselnd in die Nähe der 2'- oder der 3'-OH-Gruppe bringen.

Die ersten Röntgenstrukturanalysen von Komplexen aus tRNA, Synthetase und ATP, die jetzt für das Glutaminylsystem (Klasse I)<sup>[19]</sup> und das Aspartylsystem (Klasse II)<sup>[24]</sup> vorliegen, zeigen jedoch, daß diese Vermutungen nicht zutreffen können.

Die Glutaminyl-tRNA-Synthetase, ein aus 553 Aminosäureresten aufgebautes, monomeres Enzym, konnte als Komplex mit seiner kognaten, d. h. der von ihm als Substrat erkannten tRNA<sup>Gln</sup> und ATP kristallisiert werden<sup>[19]</sup>. Die Röntgenstrukturanalyse dieses Komplexes zeigte, daß das Enzym aus vier Domänen aufgebaut ist, von denen drei für die Erkennung der tRNA verantwortlich zu sein scheinen, während eine das aktive Zentrum enthält (vgl. Abb. 5). Die

Das erste Basenpaar des Aminoacylacceptorstammes der tRNA<sup>Gln</sup>-Kleeblattstruktur ist aufgebrochen, und das 3'-Ende der tRNA bildet eine „Hairpin“-Struktur, in der die ungepaarten Basen eine in Richtung des Anticodons zurückgebogene Schleife bilden. Die 2'-Hydroxygruppe des endständigen Adenosins dürfte so in die Nachbarschaft der Carbonylgruppe des Glutaminyladenylats gebracht werden.

Die Aspartyl-tRNA-Synthetase aus Hefe, ein dimeres Enzym vom Quartärstrukturtyp  $\alpha_2$  mit je 557 Aminosäureresten pro Untereinheit, konnte als Komplex mit tRNA<sup>Asp</sup> kristallisiert werden<sup>[24]</sup>. Das dimere Enzym bindet dabei zwei tRNA-Moleküle. Die Röntgenstrukturanalyse ergab, daß die monomere Einheit aus zwei Domänen zusammengesetzt ist, von der die C-terminale das aktive Zentrum enthält (vgl. Abb. 6). Ähnlich wie bei der Seryl-tRNA-Synthetase besteht die katalytische Untereinheit aus einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt, das von  $\alpha$ -Helices umgeben ist und enthält die für die Klasse II charakteristischen Motive 1–3. Motiv 1 bewirkt die Dimerisierung, die Motive 2 und 3 die Bindung des C-C-A-Endes der tRNA und von ATP.

Das C-C-A-Ende der tRNA<sup>Asp</sup> hat im Enzym-tRNA-Komplex eine normale helicale Struktur, die das terminale

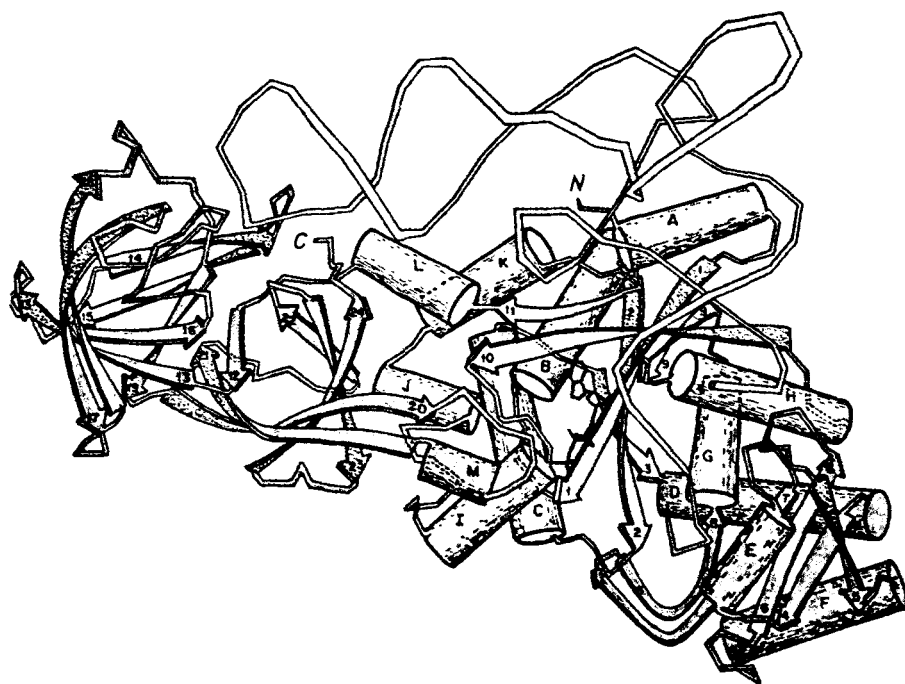


Abb. 5. Schematische Darstellung der Glutaminyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli*, komplexiert mit tRNA<sup>Gln</sup> und ATP; aus Lit. [19].

letzte liegt am N-Terminus und weist die für Klasse-I-Enzyme typische Rossmann-Faltung auf, die hier in der ersten „Hälfte“ aus drei  $\beta$ -Faltblattsträngen und zwei  $\alpha$ -Helices, im anderen Teil aus zwei  $\beta$ -Faltblattsträngen und ebenfalls zwei  $\alpha$ -Helices besteht. Sowohl der beide „Hälften“ verbindende Einzelstrang als auch die zweite „Hälfte“ der Rossmann-Faltung bewirken die Bindung der tRNA.

Das ATP-Molekül liegt mit seiner  $\alpha$ -Phosphatgruppe in einer für Wasserstoffbrücken geeigneten Entfernung von der 2'-Hydroxygruppe des endständigen Adenosins der tRNA, die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphatgruppen liegen in der Nähe der beiden Histidylreste der HIGH-Konsensus-Sequenz der Klasse-I-Enzyme.

Adenosin so positionieren dürfte, daß die Aminoacylierung der tRNA an der 3'-Hydroxylgruppe möglich ist<sup>[24]</sup>. Im übertragenen Sinne ist also die 2',3'-Spezifität der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen nicht auf eine wechselnde Lage des Aminoacyladenylats zurückzuführen, sondern auf die der endständigen Hydroxygruppen der tRNA.

### 3.2. ATP-Analoga

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen konnten auch anhand der Ergebnisse von Untersuchungen mit zahlreichen ATP-Analoga noch vor der Aufklärung der ersten Primärstrukturen in



Abb. 6. Schematische Darstellung der C-terminalen Domäne der Aspartyl-tRNA-Synthetase, komplexiert mit tRNA<sup>Asp</sup>; aus Lit. [24].

Klassen und sogar in Unterklassen eingeteilt werden<sup>[37–43]</sup>. Da diese Ergebnisse bereits ausführlich beschrieben worden sind<sup>[3, 42, 43]</sup>, sollen hier nur einige besonders charakteristische Befunde, die für die Klasseneinteilung der Enzyme wichtig sind, erwähnt werden (siehe Tabelle 1). Der deutlichste Unterschied zwischen den Klassen I und II tritt im Verhalten von Tubercidintriphosphat TuTP in der Aminoacylierungsreaktion zutage. Dieses modifizierte ATP, in dem das Stickstoffatom in Position 7 des Purinsystems durch ein Kohlenstoffatom ersetzt ist, kann den Klasse-I-Enzymen ATP als Substrat ersetzen; im Falle der Tryptophanyl-tRNA-Synthetase ist es allerdings ein Inhibitor. Für die Klasse-II-Enzyme ist dieses Triphosphat dagegen weder ein Substrat noch ein Inhibitor (siehe Tabelle 1). Mit den weiteren sechs ATP-Analoga, deren „Spezifitätsraster“ in Tabelle 1 dargestellt ist, läßt sich die Unterklasse Ib deutlich von den Unterklassen Ia und Ic abgrenzen. Auch die mögliche Feinunterteilung der Unterklasse Ib, in der nach der Länge eines „CP1“ genannten Sequenzstückes die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase von der Glutamyl- und der Glutaminyl-tRNA-Synthetase abgegrenzt wird<sup>[113]</sup>, ist in dem Spezifitätsraster angedeutet.

In der Klasse II zeigen die Unterklassen IIb und IIa, mit Ausnahme der Prolyl-tRNA-Synthetase, die gleichen Spezifitäten. Von der Unterklasse der tetrameren Enzyme IIc haben die Glycyl- und die Phenylalanyl-tRNA-Synthetase gleiche ATP-Spezifität wie die Enzyme der Unterklassen IIa und IIb; dem entspricht die Beobachtung, daß diese Proteine, wie sich aus Sequenzvergleichen ergibt, eine Beziehung zur Unterklasse IIa aufweisen<sup>[25]</sup>. Die Alanyl-tRNA-Synthetase weist dagegen das gleiche Spezifitätsmuster auf wie die Prolyl-tRNA-Synthetase, die in der Unterklasse IIa die einzige Ausnahme ist. In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, daß aufgrund der Sequenzvergleiche die Alanyl-tRNA-Synthetase eine gewisse Ähnlichkeit mit den Enzymen der Unterklasse IIa hat<sup>[25]</sup>.

Mit Hilfe ausführlicher Sequenzvergleiche konnten jetzt die ersten Evolutionsstammbäume für die beiden Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Klassen aufgestellt werden<sup>[44]</sup>. Da jede der beiden Gruppen das ganze Spektrum an Aminosäuretypen umfaßt (hydrophobe, basische, saure), kann man

vermuten, daß das heutige System von zwanzig Aminosäure-Synthetasepaaren aus zwei voneinander unabhängigen zu je zehn entstanden ist. Die ermittelten Stammbäume für die Klassen I und II sind in Tabelle 1 gezeigt. Sie stimmen ebenfalls recht gut mit der Einteilung überein, die schon früher anhand der ATP-Spezifitäten vorgenommen werden konnten. In Klasse I ist lediglich die Verwandtschaft der Tryptophanyl- mit der Tyrosyl-tRNA-Synthetase eine Ausnahme, in Klasse II sind die beiden Ausnahmen Alanyl- und Prolyl-tRNA-Synthetase nicht miteinander, sondern mit der Histidyl- bzw. der Threonyl-tRNA-Synthetase verwandt. Da die Spezifitäten gegenüber ATP-Analoga jedoch von wenigen für die Bindung entscheidenden Aminosäureresten abhängen dürften, sind die Abweichungen zu Beziehungen, die durch Vergleich längerer Sequenzen gefunden wurden, nicht ungewöhnlich. Insgesamt stimmen die mit modifizierten tRNAs und ATP-Analoga herausgearbeiteten Befunde recht gut mit den später durch Sequenzvergleich gefundenen Einteilungen überein.

### 3.3. Aminosäureanaloga

Die genaue Erkennung der Aminosäuren durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ist Vorbedingung für die Biosynthese funktionsfähiger Proteine. Erste Versuche zur in-vivo-Spezifität der Proteinbiosynthese zeigten, daß Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin und Phenylalanin nicht öfter als in einem von 3000 Fällen gegeneinander ersetzt wurden<sup>[45]</sup>. In neueren Arbeiten wurden jedoch auch Fehlerraten von 1:100 bis 1:1000 für den Austausch von Arginin und Tryptophan gegen Cystein gefunden<sup>[46]</sup>. Bei der genauen in-vitro-Untersuchung der Spezifitäten einzelner Enzyme wurden in bezug auf die zwanzig in natürlichen Proteinen vorkommenden Aminosäuren teils geringere, teils höhere Fehlerraten als die zuvor genannten festgestellt<sup>[47–52]</sup>. Dagegen scheinen nicht in natürlichen Proteinen vorkommende Aminosäuren prinzipiell schlechter von den kognaten, normalerweise von den Enzymen umgesetzten Substraten, unterschieden zu werden<sup>[45, 53]</sup>. Offensichtlich ist die hohe Spezifität der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen im Laufe der biologischen Evolution hauptsächlich gegenüber den zwanzig natürlichen Aminosäuren entwickelt worden.

Systematische Studien über die Substrateigenschaften nichtkognater Aminosäuren mit einzelnen Enzymen können jeweils nur Aufschluß geben über die Topographie der Aminosäurebindungsstelle des betreffenden Proteins; dennoch konnten einheitliche Prinzipien der Aminosäureerkennung herausgearbeitet werden, die sich möglicherweise auch im Falle der Klassen I und II unterscheiden<sup>[48–52]</sup>.

Nach dem „Stopper-Modell“ besitzen vier auf ihre Aminosäurespezifität untersuchte Klasse-I-Enzyme eine Aminosäurebindungstasche, die eine besonders „dichte“ Packung ermöglicht und zu starken hydrophoben Wechselwirkungen führt<sup>[48–52, 54]</sup>. Die Bindungstasche ist durch eine Aminosäureseitenkette in ihrer Länge begrenzt. Außerdem ragen auch andere Seitenketten in die Bindungstasche, die bei der Bindung des Substrates „zur Seite“ gedrängt werden. Nichtkognate Aminosäuren verdrängen bei ihrer Bindung auch die begrenzende Gruppe oder eventuell zusätzlich noch andere. Die Bindungsenergie für die Aminosäureseitenkette setzt sich zusammen aus den Energiebeiträgen, die durch die

hydrophoben Wechselwirkungen und falls möglich, durch Wasserstoffbrückenbindungen gewonnen werden, aber auch durch die notwendige Verdrängung von in die Bindungsstelle hineinragenden Gruppen verloren gehen. Die Aminosäure wird in diesem Modell gleichsam mit „Fingern“ des Proteins abgetastet. Nichtkognate Aminosäuren erzielen entweder geringere hydrophobe Wechselwirkungen, können die entsprechenden Wasserstoffbrücken nicht bilden oder müssen zusätzlich andere Aminosäureseitenketten aus ihrer Position verdrängen (Abb. 7). Ihre Bindungsenergie konnte nach den für die natürlichen Aminosäuren gefundenen Gesetzmäßigkeiten in guter Näherung abgeschätzt werden<sup>[48–50]</sup>.

Für sämtliche untersuchten Klasse-I-Enzyme muß aufgrund kinetischer und stöchiometrischer Daten angenommen werden, daß die Bindung der Aminosäuren in zwei Stufen verläuft (Abb. 7)<sup>[48–52]</sup>. Auf den ersten Bindungsschritt dürfte eine Konformationsänderung der Enzyme folgen<sup>[55]</sup>, die zu der „besonders dichte Packung“ genannten<sup>[48–52, 54]</sup> Struktur mit starken hydrophoben Wechselwirkungen führt. Deren Betrag ist etwa doppelt so hoch wie der sonst in der Literatur angegebene von  $25 \text{ cal } \text{\AA}^{-2}$  ( $10.5 \text{ kJ nm}^{-2}$ )<sup>[56–58]</sup>.

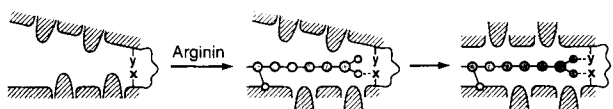


Abb. 7. Schematische Darstellung der Bindung von Arginin an Arginyl-tRNA-Synthetase als Beispiel für eins von vier untersuchten Klasse-I-Enzymen. Die Bindung erfolgt in zwei Schritten.

Zusätzlich zum „Abtasten“ der Aminosäure in der spezifischen Bindungsstelle ist die Aminosäurespezifität jedoch außerdem noch auf zwei hydrolytische Prüfschritte zurückzuführen, in denen Aminoacyladenylate von nichtkognaten Aminosäuren und aus diesen gebildete Aminoacyl-tRNAs wieder hydrolysiert werden<sup>[48–52]</sup>. In den meisten Fällen überwiegt der erste, der Prätransfer-Korrekturschritt, während der zweite, der Posttransfer-Schritt, kaum eine Rolle spielt.

Von den Klasse-II-Enzymen wurde bisher nur die Lysyl-tRNA-Synthetase auf ihre Aminosäurespezifität untersucht. Sie führt ebenfalls die beiden hydrolytischen Korrekturschritte aus, allerdings etwas weniger effektiv<sup>[59]</sup>; die Bindung der Aminosäure scheint jedoch in nur einem Schritt zu verlaufen und die Bindungsstelle dürfte von vornherein eine Struktur mit dichter Packung haben (Abb. 8). Der gesamte



Abb. 8. Schematische Darstellung der Bindung von Lysin an Lysyl-tRNA-Synthetase, das einzige bisher in gleicher Weise wie die vier Klasse-I-Enzyme untersuchte Klasse-II-Enzym. Die Bindung erfolgt in einem Schritt.

Erkennungsvorgang besteht also im Gegensatz zu dem der untersuchten Klasse-I-Enzyme aus drei statt aus vier Schritten. Die Spezifität der Lysyl-tRNA-Synthetase gegenüber nichtkognaten Aminosäuren ist erheblich geringer als die der untersuchten Klasse-I-Enzyme, doch ist es für eine Entschei-

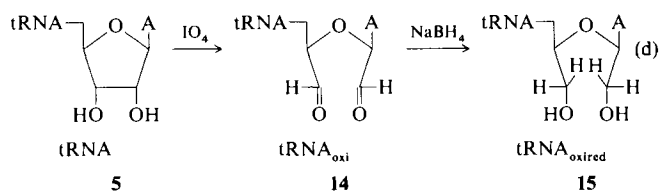
dung, ob für alle Klasse-II-Enzyme ähnliche Befunde zu erwarten sind und ein allgemeiner Unterschied zwischen den Klasse-I- und Klasse-II-Enzymen vorliegt, noch zu früh.

#### 4. Affinitätsmarkierungen

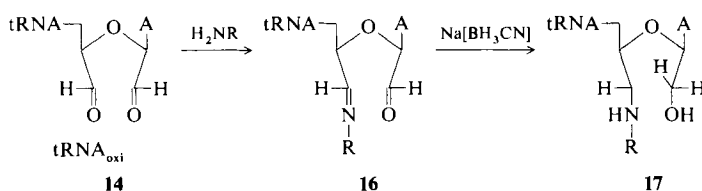
Um die für die spezifische Substraterkennung wichtigen Teile der Enzymmoleküle zu bestimmen, wurden Substratmoleküle mit reaktiven Gruppen versehen, die zu einer kovalenten Bindung zwischen Substrat und Enzym führen können. Durch teilweisen Abbau oder Sequenzierung der so markierten Enzyme konnten Informationen darüber gewonnen werden, an welcher Untereinheit oder Aminosäure des Enzyms die reaktive Gruppe des Substrats gebunden wurde. Dabei geht man von der, wie weiter unten ausgeführt wird, nicht immer ganz berechtigten Annahme aus, daß die Markierung des Enzyms überwiegend an der Substratbindungsstelle erfolgt.

Überwiegend erfolgreich verliefen Versuche mit modifizierten tRNAs und ATP-Analoga, die reaktive Halogenatome wie Brom in Bromessigsäureestern<sup>[60, 61]</sup> oder Chlor in *N*-Chlorethylgruppen<sup>[62]</sup> oder die photoreaktive Azidogruppe in *p*-Azidoanilidresten enthielten<sup>[62–65]</sup>. Als weitere reaktive Gruppen wurden vereinzelt 5,5'-Dinitro-2,2'-dithiodibenzoesäure und *p*-Nitrophenylchlorformiat<sup>[66]</sup>, <sup>3</sup>H-markiertes Acetanhydrid<sup>[67]</sup>, Pyridoxalphosphat<sup>[68]</sup>, 2,4,6-Trimethylbenzoyl-AMP („Mesityl-AMP“)<sup>[69]</sup>, 3,3'-Dithiobis(succinimidopropionat)<sup>[70]</sup> und Adenosin(5')triphospho(5')pyridoxal **18** (siehe Abschnitt 4.3)<sup>[71]</sup> eingesetzt. Auch durch direktes Bestrahlen mit UV-Licht konnten in tRNA-Synthetase-Komplexen kovalente Bindungen, wahrscheinlich zwischen den Basen der Nucleotide und SH-Gruppen der Proteine, geknüpft werden<sup>[72, 73]</sup>.

Die aufschlußreichsten Versuche waren jedoch die mit den aus ATP **2** und tRNA **5** durch Oxidation mit Periodat erhaltenen Dialdehyden **14**<sup>[74–91]</sup>. Ursprünglich wurden diese Dialdehyde hergestellt, um durch Reduktion mit Natriumborhydrid die ATP- bzw. tRNA-Derivate mit gespaltenen C2'-C3'-Bindung **15** zu erhalten<sup>[92, 93]</sup> [Gl. (d)].



Bei der Affinitätsmarkierung reagieren die Aldehydgruppen mit den Aminogruppen von Lysinseitenketten zu Schiff-Basen **16**, die mit Natriumcyanotrihydroborat zu Aminen **17** reduziert werden<sup>[80]</sup>, um die Markierung zu stabilisieren.





Diese stabilen, kovalent gebundenen Marker ermöglichen den Abbau der Proteine bis zur Identifizierung der einzelnen reagierenden Lysinseitenketten.

In den folgenden Abschnitten werden hauptsächlich die mit diesen Dialdehyd-Affinitätsmarkern gewonnenen Erkenntnisse diskutiert.

#### 4.1. Markierungen mit tRNA<sub>oxi</sub>

Die ersten Informationen, die durch Affinitätsmarkierungen mit den aus tRNAs hergestellten Dialdehyden erhalten wurden, bezogen sich auf die Zusammensetzung der Enzym-tRNA-Komplexe. Für Methionyl- und Tyrosyl-tRNA-Synthetase (Quartärstruktur  $\alpha_2$ ) wurden Komplexe aus einer kovalent gebundenen tRNA und dem dimeren Enzym gefunden<sup>[78, 84, 85]</sup>; für Leucyl-tRNA-Synthetase (Quartärstruktur  $\alpha$ ) ergab sich eine oxidierte tRNA tRNA<sub>oxi</sub> **14** pro monomerem Enzym<sup>[90]</sup>. Dagegen bildete Arginyl-tRNA-Synthetase (Quartärstruktur  $\alpha$ ) neben einem 1:1-Komplex auch in etwa gleicher Menge eine Verbindung von zwei tRNA<sub>oxi</sub> und dem Enzym<sup>[91]</sup>. Bei der tetrameren Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (Quartärstruktur  $\alpha_2\beta_2$ ) wurde zwar übereinstimmend die Bindung von zwei oxidierenden tRNA<sub>oxi</sub> festgestellt, doch wurde zunächst eine Bindung an die kleinere  $\beta$ -Untereinheit postuliert<sup>[79, 83]</sup>, dann eine an die größere  $\alpha$ -Einheit<sup>[86]</sup>.

Interessant ist ein Vergleich dieser stöchiometrischen Verhältnisse mit den nach anderen Methoden erhaltenen. Fluoreszenzspektroskopische Messungen ergaben für die Methionyl-tRNA-Synthetase ebenfalls die Bildung eines Enzym-tRNA-Komplexes im Verhältnis 1:1<sup>[94]</sup>; aus Bindungsstudien zwischen tRNA und Enzym<sup>[95]</sup> folgte für Tyrosyl-tRNA-Synthetase einerseits eine antikooperative, d. h. eine in der zweiten Stufe erschwerte Bindung von zwei tRNA-Molekülen pro Enzymmolekül, andererseits aber unter den Bedingungen der Katalyse, d. h. bei Anwesenheit aller drei Substrate, nur die Bindung von einem tRNA-Molekül pro Enzymmolekül<sup>[96]</sup>. Mit Fluoreszenztitrationen wurde für die Bindung der tRNA an Arginyl-tRNA-Synthetase eine 1:1-Stöchiometrie ermittelt<sup>[97]</sup>. Bemerkenswert ist hierbei, daß mit tRNA<sub>oxi</sub> auch Verbindungen aus zwei tRNA<sub>oxi</sub>-Molekülen und einem Enzymmolekül der Quartärstruktur  $\alpha$  gebildet werden. Dieses mag die Möglichkeit bestätigen, daß auch die monomeren Enzyme mit katalytischen Cyclen arbeiten, in deren Verlauf zwei tRNA-Moleküle an das Enzym gebunden sind. Solche Cyclen werden bisher aufgrund von kinetischen Studien z. B. für die Isoleucyl-tRNA-Synthetase postuliert<sup>[3, 98, 99]</sup>. Für die Phenylalanyl-tRNA-Synthetase stimmt die mit physikalischen Methoden gefundene Zahl von zwei gebundenen tRNA-Molekülen pro Enzymmolekül<sup>[99–101]</sup> mit dem durch Affinitätsmarkierung gefundenen Verhältnis überein.

Bei Alaninyl-<sup>[87]</sup>, Phenylalanyl-<sup>[86]</sup>, Tyrosyl-<sup>[85]</sup> und Methionyl-tRNA-Synthetase<sup>[88]</sup> konnten sogar die einzelnen Aminosäuren identifiziert werden, die mit der oxidierten tRNA eine kovalente Bindung eingehen. In den meisten Fällen handelt es sich um Lysyl-<sup>[85–88]</sup>, in einigen auch um Arginylreste<sup>[88]</sup>. Wie von Kritikern der Methode erwartet, wird die tRNA<sub>oxi</sub> von den einzelnen Enzymen nicht an einem einzigen Aminosäurerest gebunden, sondern an mehreren Positionen<sup>[84–86, 88]</sup>. In den Fällen jedoch, in denen schon

Röntgenstrukturanalysen der Enzyme vorliegen (Tyr, Met)<sup>[85, 88]</sup> liegen die markierten Aminosäurereste räumlich nicht weit voneinander entfernt.

Die Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* verliert nach dem kovalenten Binden von tRNA<sub>oxi</sub> sowohl ihre Fähigkeit, den ATP-Pyrophosphataustausch (Umkehrung der Aktivierungsreaktion [Gl. (a)]) als auch die Aminoacylierung von tRNA<sup>Tyr</sup> zu katalysieren<sup>[85]</sup>. Nach Abbau des markierten Enzyms mit Chymotrypsin und Abbau der tRNA mit Ribonuclease A wurden zwei Oligopeptide (Positionen 227–235 und 236–244) isoliert, die kovalent gebundenes Adenosin enthielten. Im ersten Peptid mit zwei Lysylresten (Positionen 229 und 234) wurde hauptsächlich Lysin 234 umgesetzt, in geringerem Maß Lysin 229. Im zweiten Peptid war der einzige darin enthaltene Lysinrest (Position 237) vollständig umgesetzt.

Nach dem Vergleich mit der durch Röntgenbeugung bestimmten Struktur der Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus *Bacillus stearothermophilus*<sup>[14, 15]</sup> gehören die markierten Lysylreste zu einem unstrukturierten Proteinteil, der die *N*-terminale  $\alpha/\beta$ -Domäne und eine  $\alpha$ -helicale Domäne verbindet. Die erstere enthält die Mononucleotidbindungsstelle, die zweite soll für die Bindung der tRNA verantwortlich sein. Das lysinhaltige und dadurch positive Ladungen tragende Zwischenstück ist sowohl wegen der möglichen Wechselwirkung mit den negativen Ladungen der tRNA als auch wegen seiner Lage für die Bindung des C-C-A-Endes der tRNA<sup>Tyr</sup> geeignet. Der Lysylrest 229 gehört der KMSKS-Sequenz an, die für die Klasse-I-Enzyme typisch ist.

Die Tatsache, daß tRNA<sub>oxi</sub><sup>Tyr</sup> mit drei verschiedenen Lysylresten reagieren kann, weist einerseits darauf hin, daß an der Bindung des C-C-A-Endes mehrere Lysylreste beteiligt sein dürften, andererseits auch darauf, daß es im Enzym-tRNA-Komplex nicht streng fixiert ist, sondern eine gewisse Beweglichkeit besitzt, die durch Konformationsänderungen der tRNA, des Enzyms oder beider ermöglicht wird.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Affinitätsmarkierung von Methionyl-tRNA-Synthetase mit oxidiertem tRNA<sup>Met</sup>, die für Formylmethionin spezifisch ist, erhalten<sup>[78, 84, 88]</sup>. Nach der Umsetzung des Enzyms mit tRNA<sup>Met</sup><sub>oxi</sub> hatte der gebildete 1:1-Komplex seine Fähigkeit zur Katalyse des ATP-Pyrophosphataustausches und zur Beladung von tRNA verloren<sup>[78]</sup>. Nach Abbau mit Chymotrypsin und Ribonuclease A wurden drei Oligopeptide mit aus der tRNA stammendem, kovalent gebundenem Adenosin gefunden. Zwei von ihnen enthielten je einen vollständig umgesetzten Lysylrest (Positionen 61 und 335), in einer dritten Oligopeptidfraktion war je einer der Lysylreste 142, 147 oder 149 umgesetzt. Alle diese Lysylreste gehören zu der *N*-terminalen Domäne des Enzyms (Position 1–360), die die Nucleotidbindungsstellen-Faltung enthält; Lysin 335 ist Teil der KMSKS-Signatursequenz. Nach der Röntgenstrukturanalyse des kristallisierten Enzyms liegen alle diese Lysinreste innerhalb eines Radius von 5.5 Å ( $\approx 1/10$  eines Domänenradius), so daß in diesem Falle auch eine Aussage über das Ausmaß der relativen Beweglichkeit des C-C-A-Endes der tRNA im Enzym-tRNA-Komplex gemacht werden kann.

Außer an den beiden für Tyrosin und Methionin spezifischen Klasse-I-Enzymen wurden auch bei den für Phenylalanin und Alanin spezifischen Klasse-II-Enzymen die Aminosäurereste bestimmt, die mit oxidiertem tRNA reagieren. Im

Gegensatz zu den ersteren Enzymen behalten die beiden letzteren ihre Fähigkeit, trotz kovalent gebundener tRNA den ATP-Pyrophosphataustausch zu katalysieren<sup>[86, 87]</sup>. Bei der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase setzt sich tRNA<sup>Phe</sup> mit drei Lysylresten um (Positionen 2, 61 und 106), bei der Alaninyl-tRNA-Synthetase nur mit einem Lysylrest (Position 73). Alle diese Lysin-Positionen liegen in den *N*-terminalen Domänen der Enzyme. Da noch keine Röntgenstrukturanalysen von Phenylalanyl- und Alaninyl-tRNA-Synthetasen vorliegen, können bisher keine Aussagen über die räumliche Anordnung der markierten Lysylreste im Enzymmolekül gemacht werden.

Somit könnte man vermuten, daß der Unterschied zwischen Klasse-I- und Klasse-II-Enzymen darin besteht, daß letztere trotz kovalenter Bindung eines tRNA-Moleküls weiterhin den ATP-Pyrophosphataustausch katalysieren, doch dürfte für solch eine allgemeine Aussage die Zahl der bisher untersuchten Enzyme zu gering sein. Auch sprechen Ergebnisse dafür, die mit einer Leucyl-tRNA-Synthetase erhalten wurden<sup>[90]</sup>. Dieses Klasse-I-Enzym soll ebenfalls nach Umsetzung mit tRNA<sup>Leu</sup> noch die Aminosäureaktivierung katalysieren.

#### 4.2. Markierung mit ATP<sub>oxi</sub>

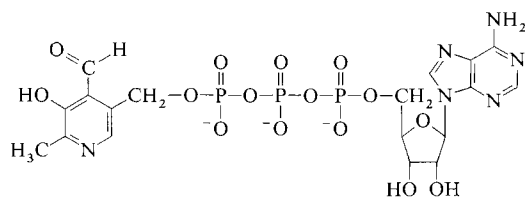
So wie mit oxidiertem tRNA können die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen auch mit dem zum Dialdehyd oxidierten ATP umgesetzt werden<sup>[74, 75, 77]</sup>. Methionyl-, Tyrosyl- und Tryptophanyl-tRNA-Synthetasen (Quartärstruktur  $\alpha_2$ ) können nach Bindung von je zwei Molekülen ATP<sub>oxi</sub> den ATP-Pyrophosphataustausch nicht mehr katalysieren<sup>[74]</sup>. Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (Quartärstruktur  $\alpha_2\beta_2$ ) ist erst nach der Bindung des zweiten ATP<sub>oxi</sub>-Moleküls vollständig inaktiviert; Isoleucyl-tRNA-Synthetase (Quartärstruktur  $\alpha$ ) wird durch die Bindung eines ATP<sub>oxi</sub>-Moleküls inaktiviert, bei strengem Ausschluß der für die Katalyse sonst notwendigen Mg<sup>2+</sup>-Ionen wurde jedoch auch noch ein zweites ATP<sub>oxi</sub>-Molekül in das Enzym inkorporiert<sup>[74]</sup>.

Diese anfangs aussichtsreich erscheinende Affinitätsmarkierung erwies sich letztlich aber doch als weniger geeignet. Eingehende Untersuchungen an Lysyl- und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* ergaben, daß diese Enzyme bis zu 5 bzw. 50 ATP<sub>oxi</sub>-Moleküle pro Enzymmolekül binden können<sup>[75]</sup>. Auch durch oxidiertes GTP oder Uridin konnten ähnliche Effekte wie mit ATP<sub>oxi</sub> erzielt werden<sup>[75]</sup>. Einer Tryptophanyl-tRNA-Synthetase aus Rinderpankreas (Quartärstruktur  $\alpha_2$ ) blieb sogar nach Bindung von zwei Molekülen ATP<sub>oxi</sub> die Fähigkeit zur Bildung des Tryptophanladenyates erhalten<sup>[77]</sup>. Aus diesen Befunden mußte geschlossen werden, daß ATP<sub>oxi</sub> nicht spezifisch mit Lysylresten der ATP-Bindungsstelle reagiert, sondern zusätzlich oder überwiegend mit anderen leicht zugänglichen Lysylresten der Enzymoberfläche.

#### 4.3. Markierungen mit Adenosin(5')triphospho(5')pyridoxal (AP<sub>3</sub>-PL)

Als wesentlich besser geeignet für die Affinitätsmarkierung der ATP-Bindungsstelle erwies sich das ATP-Derivat **18**, in dem die  $\gamma$ -Phosphatgruppe von ATP mit der 5'-Hy-

droxygruppe der Pyridoxaleinheit verestert ist<sup>[71]</sup>. Die Aldehydgruppe der Pyridoxaleinheit kann ähnlich wie die Aldehydgruppen oxidiertem tRNA oder von ATP<sub>oxi</sub> mit Lysylresten des Enzyms reagieren.



Adenosin(5')triphospho(5')pyridoxal (AP<sub>3</sub>-PL)

**18**

Methionyl- und Valyl-tRNA-Synthetase bildeten mit diesem Reagens einen 1:1-Komplex und verlieren die Fähigkeit, den ATP-Pyrophosphataustausch und die Beladung von tRNA zu katalysieren.

Bei der Methionyl-tRNA-Synthetase wurden insgesamt drei Lysylreste in den Positionen 335, 402 und 528 markiert. Der erste Lysylrest (335) liegt noch in der *N*-terminalen Domäne des Enzyms und gehört zur KMSKS-Signatursequenz. Er wurde auch bei der Affinitätsmarkierung des gleichen Enzyms mit tRNA<sup>Met</sup> umgesetzt. Über die genaue Funktion dieses Lysylrestes während der Katalyse kann zwar noch keine Aussage gemacht werden, doch kann man vermuten, daß er entweder als Ligand für das C-C-A-Ende der tRNA oder für die Phosphatgruppen von ATP, eventuell auch für beides, wichtig sein dürfte<sup>[71]</sup>.

Der Lysylrest 528 ist nach der Röntgenstrukturanalyse des Enzyms nur 4 Å von Lys 335 entfernt, vermutlich kann seine protonierte NH<sub>2</sub>-Gruppe ebenso wie die des Lysins 335 sowohl mit den Phosphatgruppen des tRNA-Endes als auch mit denen von ATP in Wechselwirkung treten. Der Lysylrest 402 liegt nach der Röntgenstrukturanalyse etwa 30 Å vom aktiven Zentrum des Moleküls entfernt. Es wird vermutet, daß er normalerweise an der Bindung der tRNA beteiligt sein könnte, und daß hier anstelle der tRNA auch Nucleotide gebunden werden können.

Bei Valyl-tRNA-Synthetase wurden ebenfalls drei Lysylreste mit dem Markierungsreagens erfaßt (Positionen 557, 593 und 909). Davon gehört Lysin 557 wiederum der KMSKS-Signatursequenz an. Da noch keine Röntgenstrukturanalyse einer Valyl-tRNA-Synthetase vorliegt, kann bisher nichts über die Lage der beiden Lysylreste in der Tertiärstruktur des Enzyms ausgesagt werden. Es läßt sich nur vermuten, daß die C-terminale Domäne dieses Enzyms ähnlich gefaltet ist wie die der Methionyl-tRNA-Synthetase. So ist die Ähnlichkeit der Tertiärstrukturen der beiden Klasse-I-Enzyme zwar angedeutet, aber für eine Klassenunterscheidung von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen durch einen ATP-ähnlichen Affinitätsmarker fehlt noch nahezu jegliches Vergleichsmaterial.

### 5. Zusammenfassung und Ausblick

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen bilden eine Gruppe von Enzymen, die in jeder Zelle vorhanden sind und die die glei-

chen Reaktionen katalysieren. Sie eignen sich daher besonders gut dazu, bei Vorliegen von genügend Datenmaterial die Aussagekraft von Versuchen mit modifizierten Substraten oder reaktiven Substratanaloga zu überprüfen. In jedem Falle sind jedoch systematische Untersuchungen an mehreren Enzymen nötig. Da hierbei jedoch vom Material- und Zeitaufwand Grenzen gesetzt sind, kann man auch gezwungen sein, sich auf Arbeiten an einigen ausgewählten Enzymen zu beschränken, wie beispielsweise bei den hier besprochenen Arbeiten zur Affinitätsmarkierung.

Durch die Untersuchung der Substrateigenschaften von tRNA- und ATP-Analoga konnte die Einteilung der Synthetasen in zwei Klassen schon mehr als fünfzehn Jahre früher vorgenommen werden als durch den Vergleich der erst in den letzten Jahren durch Gensequenzierung ermittelten Primärstrukturen. Der Wert der daraus erhaltenen Informationen wurde zunächst unterschätzt und wird erst jetzt, da auch Vergleiche mit Ergebnissen von Röntgenstrukturanalysen möglich sind, in vollem Umfang erkennbar. Die aus den Primärstrukturen abgeleiteten Evolutionsstammbäume<sup>[44]</sup>, nach denen die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen von zwei „Ur-Synthetasen“ abstammen, liefern eine einfache Erklärung für die von uns vorhergesagte Einteilung der Enzyme in zwei Hauptgruppen.

Die Affinitätsmarkierungen ergeben nicht in jedem Falle Hinweise auf Aminosäurereste, die für die Bindung der Substrate essentiell sind, liefern aber fast immer Informationen über die Umgebung der Substratbindungsstelle. Für eine Gruppeneinteilung der Synthetasen läßt sich mit diesen Ergebnissen wegen der geringen Zahl der untersuchten Enzyme noch keine detaillierte Aussage machen, doch scheinen die bisherigen Befunde schon ansatzweise mit der Einteilung der Synthetasen in Klasse-I- und Klasse-II-Enzyme übereinzustimmen.

Trotz jahrzehntelanger Forschungen liegt der genaue Katalysemechanismus der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen immer noch weitgehend im Dunkeln. Bisher sind weder alle an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste noch die im Laufe des Katalysezyklus auftretenden Konformationsänderungen der Enzyme bekannt. Hier könnten noch zu entwickelnde, mit bestimmten Aminosäureresten spezifisch reagierende Substratanaloga zur endgültigen Aufklärung wertvolle Beiträge leisten.

Die durch einfache Chemie gewonnenen Erkenntnisse über die Strukturen und die komplizierten Katalysemechanismen der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ermutigen dazu, die hier aufgezeigten Methoden weiterzuentwickeln und auch bei anderen Enzymen anzuwenden.

Eingegangen am 31. März 1992 [A 892]

- [1] L. L. Kisselev, O. O. Favorova, *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **1974**, *40*, 141–238.
- [2] D. Söll, P. Schimmel in *The Enzymes*, Vol. 10, 3rd. Ed. (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, **1974**, S. 489–538.
- [3] W. Freist, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 795–811; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 773–778.
- [4] M.-R. Kula, *FEBS Lett.* **1973**, *35*, 299–302.
- [5] H. Tsai, M.-R. Kula, W. Lindemaier in *Genetic Engineering Techniques: Recent Developments* (Hrsg.: P. C. Huang, T. T. Kuo, R. Wu), Academic Press, New York, **1982**, S. 159–172.
- [6] T. Webster, H. Tsai, M.-R. Kula, G. A. Mackie, P. Schimmel, *Science* **1984**, *226*, 1315–1317.
- [7] U. Englisch, S. Englisch, P. Markmeyer, J. Schischkoff, H. Sternbach, H. Kratzin, F. Cramer, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1987**, *368*, 971–979.

- [8] A. Joachimiak, I. Barciszewski, *FEBS Lett.* **1980**, *119*, 201–204.
- [9] M. Mirande, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1991**, *40*, 95–143.
- [10] D. L. Gatti, A. Tzagoloff, *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 557–568.
- [11] G. Eriani, M. Delarue, O. Poch, J. Gangloff, D. Moras, *Nature* **1990**, *347*, 203–206.
- [12] P. Schimmel, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 1–3.
- [13] J. J. Burbaum, P. Schimmel, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 16965–16968.
- [14] T. N. Bhat, D. M. Blow, P. Brick, *J. Mol. Biol.* **1982**, *158*, 699–709.
- [15] P. Brick, T. N. Bhat, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* **1988**, *208*, 83–98.
- [16] J. L. Risler, C. Zelwer, S. Brunie, *Nature* **1981**, *292*, 384–386.
- [17] S. Brunie, C. Zelwer, J. L. Risler, *J. Mol. Biol.* **1990**, *216*, 411–424.
- [18] T. Meinnel, Y. Mechulam, F. Dardel, J. M. Schmitter, C. Hountoudji, S. Brunie, P. Dessen, G. Fayat, S. Blanquet, *Biochimie* **1990**, *72*, 625–632.
- [19] M. A. Rould, J. J. Perona, D. Söll, T. A. Steitz, *Science* **1989**, *246*, 1135–1142.
- [20] M. G. Rossman, A. Liljas, C. I. Brändén, L. J. Banaszak in *The Enzymes*, Vol. 11, 3rd Ed. (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York **1975**, S. 61–102.
- [21] D. Moras, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 154–164.
- [22] S. Cusack, C. Berthet-Colominas, M. Härtlein, N. Nassar, R. Leberman, *Nature* **1990**, *347*, 249–255.
- [23] R. Leberman, M. Härtlein, S. Cusack, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1089*, 287–298.
- [24] M. Ruff, S. Krishnaswami, M. Boeglin, A. Poterszman, A. Mitschler, A. Podjarny, B. Rees, J. C. Thierry, D. Moras, *Science* **1991**, *252*, 1682–1689.
- [25] S. Cusack, M. Härtlein, R. Leberman, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 3489–3498.
- [26] M. Sprinzl, F. Cramer, *Nature* **1973**, *246*, 3–5.
- [27] F. Cramer, H. Faulhammer, F. von der Haar, M. Sprinzl, H. Sternbach, *FEBS Lett.* **1975**, *56*, 212–214.
- [28] M. Sprinzl, F. Cramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 3049–3053.
- [29] A. C. Chinault, K. H. Tan, S. M. Hassur, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1977**, *16*, 766–775.
- [30] B. Alford, S. M. Hecht, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 4844–4850.
- [31] T. H. Fraser, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 2671–2675.
- [32] T. H. Fraser, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 3044–3048.
- [33] M. Sprinzl, K. H. Scheit, H. Sternbach, F. von der Haar, F. Cramer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *51*, 881–887.
- [34] S. Chladek, M. Sprinzl, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 377–398; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 371–392.
- [35] W. Freist, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1983**, *131*, 65–80.
- [36] C. Monteilhet, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* **1978**, *122*, 407–417.
- [37] W. Freist, F. von der Haar, M. Sprinzl, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *64*, 389–393.
- [38] W. Freist, F. von der Haar, H. Faulhammer, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *64*, 493–497.
- [39] W. Freist, H. Sternbach, F. von der Haar, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1978**, *84*, 499–502.
- [40] W. Freist, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1980**, *107*, 47–50.
- [41] W. Freist, H. Wiedner, F. Cramer, *Bioorg. Chem.* **1980**, *9*, 491–504.
- [42] W. Freist, H. Sternbach, F. Cramer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1981**, *362*, 1247–1254.
- [43] W. Freist, *Chem. Unserer Zeit* **1990**, *24*, 143–150.
- [44] G. M. Nagel, R. F. Doolittle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8121–8125.
- [45] R. B. Loftfield, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1982**, *12*, 87–128.
- [46] F. Bouadloun, D. Donner, C. G. Kurland, *EMBO J.* **1983**, *2*, 1351–1356.
- [47] S. X. Lin, M. Baltzinger, P. Remy, *Biochemistry* **1984**, *23*, 4109–4116.
- [48] W. Freist, H. Sternbach, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *169*, 33–39.
- [49] W. Freist, H. Sternbach, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *173*, 27–34.
- [50] W. Freist, H. Sternbach, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *177*, 425–433.
- [51] W. Freist, H. Sternbach, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186*, 535–541.
- [52] W. Freist, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *191*, 123–129.
- [53] G. L. Igloi, F. von der Haar, F. Cramer, *Biochemistry* **1978**, *17*, 3459–3468.
- [54] A. R. Fersht, *Proc. R. Soc. London B* **1981**, *212*, 351–379.
- [55] E. Holler, M. Calvin, *Biochemistry* **1972**, *11*, 3741–3752.
- [56] C. Chothia, *Nature* **1974**, *248*, 338–339.
- [57] C. Chothia, *Nature* **1975**, *254*, 304–308.
- [58] C. Chothia, *J. Mol. Biol.* **1976**, *105*, 1–14.
- [59] W. Freist, H. Sternbach, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *204*, 1015–1023.
- [60] V. Z. Akhverdyan, L. L. Kisselev, *J. Mol. Biol.* **1977**, *113*, 475–501.
- [61] S. N. Khodyreva, N. A. Moor, V. N. Aniklova, O. J. Lavrik, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *830*, 206–212.
- [62] O. Leon, LaDonne H. Schulman, *Biochemistry* **1987**, *26*, 7113–7121.
- [63] V. N. Aniklova, D. G. Knorre, V. V. Kravchenko, O. I. Lavrik, G. A. Nevinsky, *FEBS Lett.* **1975**, *60*, 172–175.
- [64] I. I. Gorskova, D. G. Knorre, O. I. Lavrik, G. A. Nevinsky, *Nucleic Acids Res.* **1976**, *3*, 1577–1589.
- [65] R. Wetzel, D. Söll, *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 1681–1694.
- [66] C. I. Bruton, B. S. Hartley, *J. Mol. Biol.* **1970**, *52*, 165–178.
- [67] H. R. Bosshard, G. L. E. Koch, B. S. Hartley, *J. Mol. Biol.* **1978**, *119*, 377–389.

- [68] M. Baltzinger, F. Fasiolo, P. Remy, *Eur. J. Biochem.* **1979**, 97, 481–494.
- [69] I. A. Madoyan, O. O. Favorova, G. K. Kovaleva, N. I. Sokolova, Z. A. Shaborova, L. L. Kisselev, *FEBS Lett.* **1981**, 123, 156–160.
- [70] D. Valenzuela, LaDonne H. Schulman, *Biochemistry* **1986**, 25, 4555–4561.
- [71] C. Hountondji, J.-M. Schmitter, T. Fukui, M. Tagaya, S. Blanquet, *Biochemistry* **1990**, 29, 11266–11273.
- [72] E. J. Ackerman, A. Joachimiak, V. Klinghofer, P. B. Sigler, *J. Mol. Biol.* **1985**, 181, 93–102.
- [73] J. J. Rosa, M. D. Rosa, P. B. Sigler, *Biochemistry* **1979**, 18, 637–647.
- [74] G. Fayat, M. Fromant, S. Blanquet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 2088–2092.
- [75] A. H. Mehler, J. P. Kim, A. A. Olsen, *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, 212, 475–482.
- [76] R. Parfait, *Eur. J. Biochem.* **1973**, 38, 572–580.
- [77] M. Fournier, B. Labouesse, J. Labouesse, *Eur. J. Biochem.* **1987**, 167, 533–540.
- [78] G. Fayat, C. Hountondji, S. Blanquet, *Eur. J. Biochem.* **1979**, 96, 87–92.
- [79] M. Baltzinger, F. Fasiolo, P. Remy, *Eur. J. Biochem.* **1979**, 97, 481–494.
- [80] C. Hountondji, G. Fayat, S. Blanquet, *Eur. J. Biochem.* **1979**, 102, 247–250.
- [81] E. Gerlo, J. Charlier, *FEBS Lett.* **1979**, 99, 25–27.
- [82] C. Hountondji, G. Fayat, S. Blanquet, *Eur. J. Biochem.* **1980**, 107, 403–407.
- [83] M. Renaud, F. Fasiolo, M. Baltzinger, Y. Boulanger, P. Remy, *Eur. J. Biochem.* **1982**, 123, 267–274.
- [84] C. Hountondji, S. Blanquet, *Biochemistry* **1985**, 24, 1175–1180.
- [85] C. Hountondji, F. Lederer, P. Dessen, S. Blanquet, *Biochemistry* **1986**, 25, 16–21.
- [86] C. Hountondji, J.-M. Schmitter, C. Beauvallet, S. Blanquet, *Biochemistry* **1987**, 26, 5433–5439.
- [87] K. Hill, P. Schimmel, *Biochemistry* **1989**, 28, 2577–2585.
- [88] C. Hountondji, J.-M. Schmitter, Ch. Beauvallet, S. Blanquet, *Biochemistry* **1990**, 29, 8190–8198.
- [89] Y. Mechulam, F. Dardel, D. Le Corre, S. Blanquet, G. Fayat, *J. Mol. Biol.* **1991**, 217, 465–475.
- [90] S.-T. Huang, S.-X. Lin, J.-P. Shi, Y.-L. Wang, *Sci. Sin. Ser. B (Engl. Ed.)* **1987**, 12, 1298–1304.
- [91] X.-D. Cheng, S.-X. Lin, I.-P. Shi, Y.-L. Wang, *Sci. China Ser. B* **1991**, 34, 297–305.
- [92] F. Cramer, F. von der Haar, E. Schlimme, *FEBS Lett.* **1968**, 2, 136–139.
- [93] F. von der Haar, E. Schlimme, M. Gómez-Guillen, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 24, 296–302.
- [94] S. Blanquet, M. Iwatsubo, J.-P. Waller, *Eur. J. Biochem.* **1973**, 36, 213–226.
- [95] A. Pingoud, D. Boehme, D. Riesner, R. Kownatzki, G. Maass, *Eur. J. Biochem.* **1975**, 56, 617–622.
- [96] R. Jakes, A. R. Fersht, *Biochemistry* **1975**, 14, 3344–3350.
- [97] S. S. Lin, Q. Wang, Y. L. Wang, *Biochemistry* **1988**, 27, 6348–6353.
- [98] W. Freist, H. Sternbach, F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **1982**, 128, 315–329.
- [99] W. Freist, *Biochemistry* **1989**, 28, 6787–6797.
- [100] F. Fasiolo, P. Remy, J. Pouyet, J. P. Ebel, *Eur. J. Biochem.* **1974**, 50, 227–236.
- [101] G. Krauss, D. Riesner, G. Maass, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 68, 81–93.
- [102] P. Bartmann, T. Hanke, E. Holler, *Biochemistry* **1975**, 14, 4777–4786.
- [103] R. M. Starzyk, T. A. Webster, P. Schimmel, *Science* **1987**, 237, 1614–1618.
- [104] C. Zelwer, I. L. Risler, S. Brunie, *J. Mol. Biol.* **1982**, 155, 63–81.

# Nur Kopieren ist teurer...

... und zudem mühsamer! Diplomanden und Doktoranden können als studentische Mitglieder der GDCh die "Angewandte" für zehn Mark und ein paar Zerquetschte jeden Monat druckfrisch frei Haus erhalten. Das sind weniger als acht Pfennige pro Seite!

## Interessiert?

Dann rufen Sie doch einfach bei Beate Geiß an (Tel. 0 62 01 / 6 06 - 1 99) oder schicken ihr ein Fax (0 62 01 / 6 06 - 1 84). Aber natürlich können Sie ihr auch schreiben:

**VCH-Leserservice, Postfach 10 11 61, 6940 Weinheim**

