

# ÜBER DAS AMINOACYLIERUNGSVERHALTEN CHEMISCH MODIFIZIERTER PHENYLALANINSPEZIFISCHER TRANSFER-RIBONUCLEINSÄURE AUS HEFE: (1) GLYKOLSPALTUNG UND REDUKTION ZUM DIOL AN DER 3'-TERMINALEN RIBOSE

F. CRAMER, F. v.d. HAAR und E. SCHLIMME

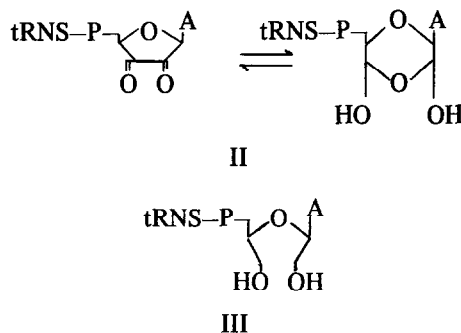
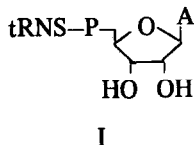
Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie,  
3400 Göttingen, Germany

Eingegangen am 15. November 1968

The terminal cis-glycol-group of phenylalanine specific tRNA ( $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$ , I) from yeast was oxidized to the dialdehyde by  $\text{NaIO}_4$  ( $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{oxi}}$ , II) and subsequently reduced to the diol by  $\text{NaBH}_4$  ( $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$ , III). In charging experiments it could be shown that  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  is still completely specific for phenylalanine. The Michaelis constant of  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  remains unchanged when compared with  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$ , while the maximum velocity of charging  $v_{\text{max}}$  of  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  is decreased to about one half.

## 1. Einleitung

Die spezifische Aminoacylierung von Transfer-Ribonucleinsäure (tRNS) ist von zentraler Bedeutung bei der Proteinbiosynthese. Dennoch liegen bisher nur wenige Informationen darüber vor, welche strukturellen Elemente für die hohe Spezifität der Enzym-Substrat-Wechselwirkung verantwortlich sind [1-6]. Um die Spezifität der Aminoacylierung bezüglich der Position der 3'-OH-Gruppe zu prüfen, wurde  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  (I) aus Hefe am Acceptorende modifiziert. Die cis-Glykolgruppierung der 3'-terminalen Ribose wurde mit  $\text{NaIO}_4$  zum Dialdehyd  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi}}$  (II) aufgespalten und dieser mit  $\text{NaBH}_4$  zum Diol  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  (III) reduziert.



Die Aminoacylierung von  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  wurde im Vergleich zu  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  untersucht.

## 2. Material und Methoden

$\text{tRNS}^{\text{Phe}}$ :  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  (82% aminoacylierbar, keine Fremdaktivität im Test nach Neuhoﬀ et al. [7]) wurde aus  $\text{tRNS}^{\text{Gemisch}}$  aus Brauerhefe (Boehringer, Mannheim) isoliert [8].

$\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi}}$ : 100  $\mu\text{l}$  einer 0.002 m  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$ -Lösung in 0.05 m Na-Acetat-Puffer pH 6.5 wurden mit der

gleichen Menge an 0.004 m  $\text{NaJO}_4$ -Lösung 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und die überschüssige Perjodsäure mit 100  $\mu\text{l}$  einer 0.005 m Glukose-Lösung zerstört [9,10]. Die  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi}}$  wurde mit dem 3-fachen Volumen Äthanol gefällt, in Wasser gelöst und für den Reduktionsansatz verwendet oder in Wasser über eine Sephadex-G50-Säule ( $2 \times 40$  cm) gegeben und lyophilisiert.

$\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$ : Ein Gemisch von 50  $\mu\text{l}$  Phosphat-Puffer pH 6.9 und 300  $\mu\text{l}$   $\text{NaBH}_4$ -Lösung (10 mg/ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.) wurde mit 2 m Acetat-Puffer pH 5.2 auf pH 7.8 eingestellt. Dazu wurden 200  $\mu\text{l}$  wässriger 0.001 m  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi}}$  gegeben, auf 1.2 ml mit bidest. Wasser verdünnt und  $3\frac{1}{2}$  Std. im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde mit Acetat-Puffer auf pH 5 eingestellt und mit dem 3-fachen Volumen Äthanol gefällt. Nach 1-stündigem Stehen bei  $-20^\circ$  wurde zentrifugiert und in wenig bidest. Wasser aufgenommen.  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  wurde in Wasser über eine Sephadex-G50-Säule ( $2 \times 40$  cm) gegeben, lyophilisiert, in bidest. Wasser aufgenommen und bei  $-20^\circ$  aufbewahrt.

Unter den gewählten Bedingungen treten weder Phosphat-Eliminierungen [9] noch reduktive Ringspaltungen von Dihydropyrimidinen [11] auf [12].

$\text{A}^{14\text{C}}$  und  $\text{A}^{14\text{C}}_{\text{oxi-red}}$ : Zum Beweis, daß Oxidation und Reduktion quantitativ verlaufen waren, wurde eine am 3'-terminalen Adenosin-Rest  $^{14\text{C}}$ -markierte  $\text{tRNS}$  eingesetzt. 100 OD  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi}}$  wurden in 200  $\mu\text{l}$  0.1 m Acetatpuffer pH 5 gelöst, zur  $\beta$ -Eliminierung des terminalen Adenosins 50  $\mu\text{l}$  Anilin zugesetzt [13], 4 Std. im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen und über Sephadex-G50 aufgetrennt. Zur Abspaltung des 3'-Phosphats wurden je 100 OD  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  mit 35  $\mu\text{g}$  saurer Phosphomonoesterase aus Schweinemilz (Präparat von Dr. Sternbach in unserem Labor) bei  $37^\circ$  in 300  $\mu\text{l}$  0.15 m Acetat-Puffer pH 5.0 12 Std. inkubiert. Durch Phenolisieren und erneute Passage über Sephadex-G50 wurde die  $\text{tRNS}$  zurückgewonnen. Die Präparation der Pyrophosphorylase aus Bäckerhefe und der Ansatz zur Regenerierung des CCA-Endes der  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  erfolgte nach Lebowitz et al. [14] mit  $\text{ATP}^{14\text{C}}$  (Schwarz Bioresearch, Orangeburg, USA, spez. Akt. 24.5 mC/mM). Ein Teil dieser  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  wurde in der beschriebenen Weise oxidiert und reduziert. Die Nucleoside  $\text{A}^{14\text{C}}$  und  $\text{A}^{14\text{C}}_{\text{oxi-red}}$  wurden durch Hydrolyse der jeweiligen  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  in 0.3 n KOH bei  $37^\circ$  über Nacht gewonnen. Durch absteigende

Papier-Chromatographie auf dem Papier 2043b (Schleicher u. Schüll, Dassel/Deutschland), gewaschen, im System Äthanol/1 m Ammon-Acetat (8:2, v/v) wurde in der markierten  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$   $\text{A}^{14\text{C}}$  und in der markierten  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$   $\text{A}^{14\text{C}}_{\text{oxi-red}}$  durch Vergleich mit entsprechend umgesetztem Adenosin als einziges markiertes Hydrolyseprodukt nachgewiesen ( $R_F$ -Werte  $\text{A}^{14\text{C}} = 0.48$ ,  $\text{A}^{14\text{C}}_{\text{oxi-red}} = 0.58$ ).

Aminoacylierung: Die Aminoacylierung erfolgte wie beschrieben [7,15]. Die Auswertung erfolgte nach der Startfleckenmethode [16], die Zählung der Proben im Scintillationszähler Packard Typ 3375. Phenylalanyl- $\text{tRNS}$ -Synthetase wurde in Anlehnung [17] an aus Bäckerhefe (Fa. Langemeyer, Mettingen) ca. 350-fach aufgereinigt (frei von anderen Aminoacyl- $\text{tRNS}$ -Synthetasen) [15].

Hyperchromie: Die Messung wurde am Gilford Typ 2000 mit Temperatureinrichtung in demselben Puffer wie die Aminoacylierung ausgeführt.

Ultrazentrifuge: Die Zentrifugenläufe wurden in einer analytischen Ultrazentrifuge Beckman Modell E 704 mit Scanner-Einrichtung bei  $20^\circ$  ausgeführt. Ausgewertet wurde über die integrierte Sedimentationskoeffizientenverteilung [18].

### 3. Ergebnisse der Aminoacylierung von $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$

Die Versuche mit dem markierten terminalen Adenosin  $\text{A}^{14\text{C}}$  zeigten, daß Oxidation und Reduktion von  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  zu  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  quantitativ verlaufen waren. Ferner konnten wesentliche Veränderungen der Struktur von  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  ausgeschlossen werden, da  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$ ,  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi}}$  und  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  beim Schmelzen nahezu identisches Verhalten aufweisen; nur  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi}}$  ergibt oberhalb  $80^\circ$  geringe Abweichungen (Abb. 1). Zum anderen zeigen  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  und  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  in der analytischen Ultrazentrifuge keinen Unterschied.

Wie Aminoacylierungsversuche mit Phenylalanin sowie allen übrigen Aminosäuren ergaben, bleibt bei  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  völlige Spezifität für Phenylalanin erhalten. Die Michaelis-Konstante  $K_m$  ist für  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  und  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  bei  $36^\circ$  dieselbe (Abb. 2). Dagegen ist die Maximalgeschwindigkeit der Aminoacylierung  $v_{\text{max}}$  bei  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi-red}}$  gegenüber  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}$  um etwa die Hälfte kleiner.

Wird  $\text{tRNS}^{\text{Phe}}_{\text{oxi}}$  in steigenden Konzentrationen

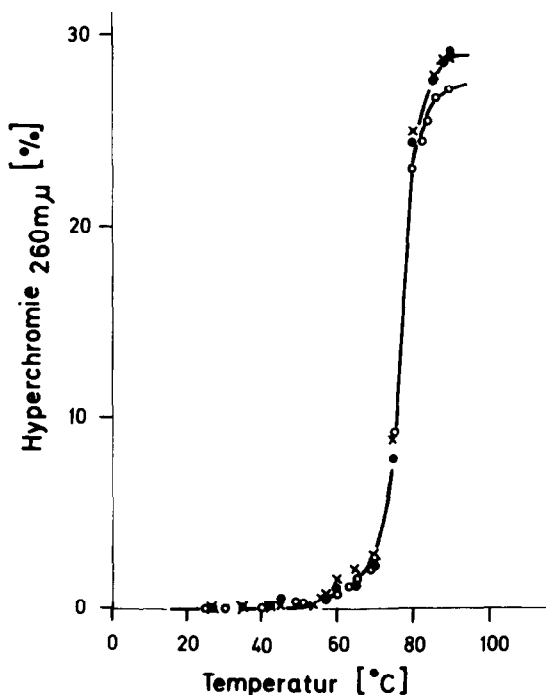


Abb. 1. Schmelzverhalten von nativer und modifizierter  $tRNS^{Phe}$  aus Hefe. Abszisse: Temperatur [°C]. Ordinate: Hyperchromie bei 260  $m\mu$  [%]. Puffer: 0.15 m Tris-HCl pH 7.4; 0.01 mMg<sup>2+</sup>.

x—x:  $tRNS^{Phe}$ , Hyperchromie = 28.8% und  $T_m = 77.5^\circ$ .

o—o:  $tRNS^{Phe}_{oxi}$ , Hyperchromie = 27.1% und  $T_m = 76.5^\circ$ .

●—●:  $tRNS^{Phe}_{oxi-red}$ , Hyperchromie = 29.0% und  $T_m = 77.5^\circ$ .

Aminoacylierungsansätzen mit  $tRNS^{Phe}$  zugesetzt und bei 36° die Abhängigkeit der Aminoacylierung von der Reaktionszeit gemessen, läßt sich unter den gegebenen Reaktionsbedingungen keine inhibierende Wirkung durch  $tRNS^{Phe}_{oxi}$  feststellen, wie sie in gewissen Umfang von anderen Autoren [3] gefunden wurde.

#### 4. Diskussion

Durch die Spaltung der 2',3'-Kohlenstoffbindung werden die  $-CH_2OH$ -Gruppen in 2'- und 3'-Stellung der Ribose prinzipiell frei drehbar, da sie nicht mehr im 5-Ring der Ribose fixiert sind. An CPK-Kalottenmodellen ist jedoch zu sehen, daß die Rotation durch

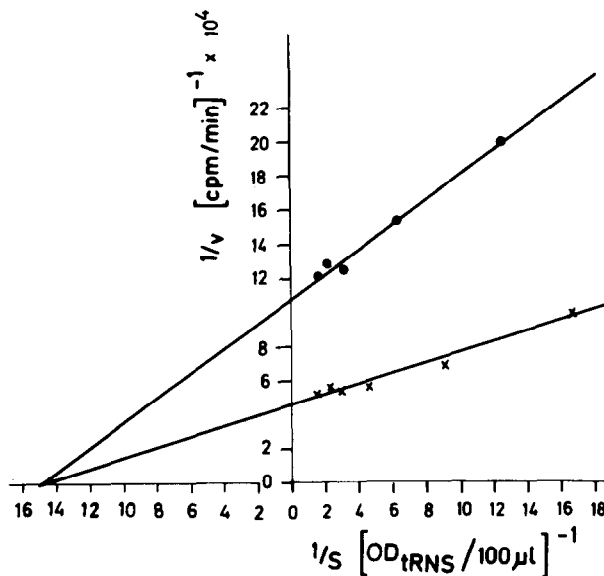


Abb. 2. Lineweaver-Burk-Plot der Aminoacylierung bei verschiedenen Konzentrationen von  $tRNS^{Phe}$  (x-x-x) und  $tRNS^{Phe}_{oxi-red}$  (●-●-●). Abszisse: reziproke Substratkonzentration  $[OD tRNS / 100 \mu l]^{-1}$  (1 OD =  $1.49 \times 10^{-9}$  Mol tRNS). Ordinate: reziproke Aminoacylierungsgeschwindigkeit  $[cpm/min]^{-1}$ .  $K_m tRNS^{Phe} = K_m tRNS^{Phe}_{oxi-red} = 10^{-6}$  [Mol].

die zusätzlichen Wasserstoffatome stark gehindert sein dürfte. Das Molekül sollte also trotz der Spaltung relativ starr sein. Dennoch vermindert die flexiblere geometrische Lage der 3'-OH-Gruppe die maximale Aminoacylierungsgeschwindigkeit um etwa die Hälfte im Vergleich zu unveränderter  $tRNS^{Phe}$ . Die Erniedrigung von  $v_{max}$  bei gleichbleibendem  $K_m$  und völliger Erhaltung der Spezifität bedeutet: eine gewisse Beweglichkeit des 2'C bzw. 3'C hat auf die spezifische Erkennung und Affinität ( $K_m$ ) keinen Einfluß; der eigentliche chemische Schritt der Aminoacylierung ist jedoch behindert. Diese experimentellen Befunde entsprechen einem Verhalten, das auf Grund einer allgemeinen Konformation von tRNS [5] gefordert werden sollte.

Wir danken Frau Dr. E.Gottschalk für die Ultrazentrifugen-Messungen und Frl. D.Niehus für geschickte und gewissenhafte Mitarbeit.

**Literatur**

- [1] G.D.Novelli, *Ann. Rev. Biochem.* 36 (1967) 449.
- [2] K.-I.Miura, in: *Progr. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol.* Vol. 6, eds. J.N.Davidson und W.E.Cohn (Academic Press, New York, London, 1967) p. 39.
- [3] K.L.Roy und G.M.Tener, *Biochem.* 6 (1967) 2847; M.P.Stulberg und K.R.Isham, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57 (1967) 1310.
- [4] R.Thiede und H.G.Zachau, *European J. Biochem.* 5 (1968) 546.
- [5] F.Cramer, *Angew. Chem.* 79 (1967) 653; *Angew. Chem. Internat. Edit.* 6 (1967) 642; F.Cramer, H.Doepler, F.v.d.Haar, E.Schlimme und H.Seidel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, im Druck.
- [6] A.A.Bayev, T.V.Venkstern, A.D.Mirzabekov, A.I.Krutina, V.D.Axelrod, L.Li, I.Fodor, L.Ya.Kasarinova und V.A.Engelhardt, in: *Structure and Function of Transfer RNA and 5S-RNA* (FEBS, Oslo, 1967), eds. L.O.Fröholm und S.G.Laland (Universitetsforlaget, Oslo und Academic Press, London, New York, 1968) p. 17.
- [7] V.Neuhoﬀ, F.v.d.Haar, E.Schlimme und M.Weise, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* (1968), im Druck.
- [8] F.v.d.Haar, unveröff. Ergebnisse.
- [9] A.Steinschneider und H.Fraenkel-Conrat, *Biochemistry* 5 (1966) 2729.
- [10] F.Kathawala und F.Cramer, *Liebigs Ann. Chem.* 709 (1967) 185.
- [11] G.Ballé, P.Cerutti und B.Witkop, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 3946.
- [12] U.L.RajBhandary, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 556.
- [13] A.Steinschneider und H.Fraenkel-Conrat, *Biochemistry* 5 (1966) 2735.
- [14] P.Lebowitz, P.L.Ipata, M.H.Makman, H.H.Richards und G.L.Cantoni, *Biochemistry* 5 (1966) 3617.
- [15] E.Schlimme, F.v.d.Haar und F.Cramer, *Z. Naturforsch. Teil b*, im Druck.
- [16] H.Matthaei, G.Heller, H.P.Voigt, R.Neth, G.Schöch und H.Kübler, in: *Genetic Elements, Properties and Function* (FEBS, Warsaw, 1966), ed. D.Shugar (Academic Press, London, New York und PWN Polish Scientific Publishers, Warsaw, 1966) p. 233.
- [17] M.H.Makman und G.L.Cantoni, *Biochemistry* 4 (1965) 1434.
- [18] J.W.Williams, K.E.van Holde, R.L.Baldwin und H.Fujita, *Chem. Rev.* 58 (1958) 715.