

**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

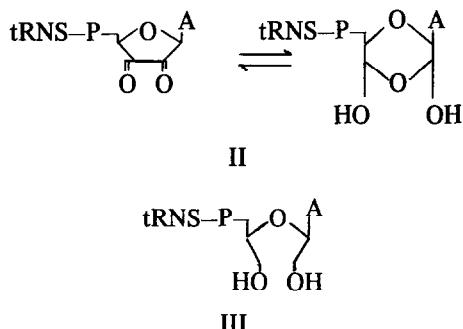
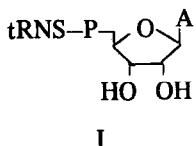
*Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie,
3400 Göttingen, Germany*

Eingegangen am 15. November 1968

The terminal cis-glycol-group of phenylalanine specific tRNA ($tRNA^{Phe}$, I) from yeast was oxidized to the di-aldehyde by $NaIO_4$ ($tRNA_{oxi}^{Phe}$, II) and subsequently reduced to the diol by $NaBH_4$ ($tRNA_{oxi-red}^{Phe}$, III). In charging experiments it could be shown that $tRNA_{oxi-red}^{Phe}$ is still completely specific for phenylalanine. The Michaelis constant of $tRNA_{oxi-red}^{Phe}$ remains unchanged when compared with $tRNA^{Phe}$, while the maximum velocity of charging v_{max} of $tRNA_{oxi-red}^{Phe}$ is decreased to about one half.

1. Einleitung

Die spezifische Aminoacylierung von Transfer-Ribonucleinsäure (tRNA) 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 $tRNA^{Phe}$ (I) aus Hefe am Acceptorende modifiziert. Die cis-Glykolgruppierung der 3'-terminalen Ribose wurde mit $NaIO_4$ zum Dialdehyd $tRNA_{oxi}^{Phe}$ (II) aufgespalten und dieser mit $NaBH_4$ zum Diol $tRNA_{oxi-red}^{Phe}$ (III) reduziert.



Die Aminoacylierung von $tRNA_{oxi-red}^{Phe}$ wurde im Vergleich zu $tRNA^{Phe}$ untersucht.

2. Material und Methoden

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

$tRNA_{oxi}^{Phe}$: 100 μ l einer 0.002 m $tRNA^{Phe}$ -Lösung in 0.05 m Na-Acetat-Puffer pH 6.5 wurden mit der

gleichen Menge an 0.004 m NaJO₄-Lösung 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und die überschüssige Perjodsäure mit 100 µl einer 0.005 m Glukose-Lösung zerstört [9,10]. Die tRNS^{Phe}_{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 × 40 cm) gegeben und lyophilisiert.

tRNS^{Phe}_{oxi-red}: Ein Gemisch von 50 µl Phosphat-Puffer pH 6.9 und 300 µl NaBH₄-Lösung (10 mg/ml H₂O bidest.) wurde mit 2 m Acetat-Puffer pH 5.2 auf pH 7.8 eingestellt. Dazu wurden 200 µl wässriger 0.001 m tRNS^{Phe}_{oxi} gegeben, auf 1.2 ml mit bidest. Wasser verdünnt und 3½ Stdn. 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° wurde zentrifugiert und in wenig bidest. Wasser aufgenommen. tRNS^{Phe}_{oxi-red} wurde in Wasser über eine Sephadex-G50-Säule (2 × 40 cm) gegeben, lyophilisiert, in bidest. Wasser aufgenommen und bei -20° aufbewahrt.

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

A¹⁴C und A¹⁴C_{oxi-red}: Zum Beweis, daß Oxidation und Reduktion quantitativ verlaufen waren, wurde eine am 3'-terminalen Adenosin-Rest ¹⁴C-markierte tRNS eingesetzt. 100 OD tRNS^{Phe}_{oxi} wurden in 200 µl 0.1 m Acetatpuffer pH 5 gelöst, zur β-Eliminierung des terminalen Adenosins 50 µl Anilin zugesetzt [13], 4 Stdn. im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen und über Sephadex-G50 aufgetrennt. Zur Abspaltung des 3'-Phosphats wurden je 100 OD tRNS^{Phe} mit 35 µg saurer Phosphomonoesterase aus Schweinemilz (Präparat von Dr. Stermbach in unserem Labor) bei 37° in 300 µl 0.15 m Acetat-Puffer pH 5.0 12 Stdn. inkubiert. Durch Phenolisieren und erneute Passage über Sephadex-G50 wurde die tRNS zurückgewonnen. Die Präparation der Pyrophosphorylase aus Bäckerhefe und der Ansatz zur Regenerierung des CCA-Endes der tRNS^{Phe} erfolgte nach Lebowitz et al. [14] mit ATP¹⁴C (Schwarz Bioresearch, Orangeburg, USA, spez. Akt. 24.5 mC/mM). Ein Teil dieser tRNS^{Phe} wurde in der beschriebenen Weise oxidiert und reduziert. Die Nucleoside A¹⁴C und A¹⁴C_{oxi-red} wurden durch Hydrolyse der jeweiligen tRNS^{Phe} in 0.3 n KOH bei 37° 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 tRNS^{Phe} A¹⁴C und in der markierten tRNS^{Phe}_{oxi-red} A¹⁴C_{oxi-red} durch Vergleich mit entsprechend umgesetztem Adenosin als einziges markiertes Hydrolyseprodukt nachgewiesen (*R*_F-Werte A¹⁴C = 0.48, A¹⁴C_{oxi-red} = 0.58).

Aminoacylierung: Die Aminoacylierung erfolgte wie beschrieben [7,15]. Die Auswertung erfolgte nach der Startfleckmethode [16], die Zählung der Proben im Scintillationszähler Packard Typ 3375. Phenylalanyl-tRNS-Synthetase wurde in Anlehnung [17] an aus Bäckerhefe (Fa. Langemeyer, Mettingen) ca. 350-fach aufgereinigt (frei von anderen Aminoacyl-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° ausgeführt. Ausgewertet wurde über die integrierte Sedimentationskoeffizientenverteilung [18].

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

Die Versuche mit dem markierten terminalen Adenosin A¹⁴C zeigten, daß Oxidation und Reduktion von tRNS^{Phe} zu tRNS^{Phe}_{oxi-red} quantitativ verlaufen waren. Ferner konnten wesentliche Veränderungen der Struktur von tRNS^{Phe}_{oxi-red} ausgeschlossen werden, da tRNS^{Phe}, tRNS^{Phe}_{oxi} und tRNS^{Phe}_{oxi-red} beim Schmelzen nahezu identisches Verhalten aufweisen; nur tRNS^{Phe}_{oxi} ergibt oberhalb 80° geringe Abweichungen (Abb. 1). Zum anderen zeigen tRNS^{Phe} und tRNS^{Phe}_{oxi-red} in der analytischen Ultrazentrifuge keinen Unterschied.

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

Wird tRNS^{Phe}_{oxi} in steigenden Konzentrationen

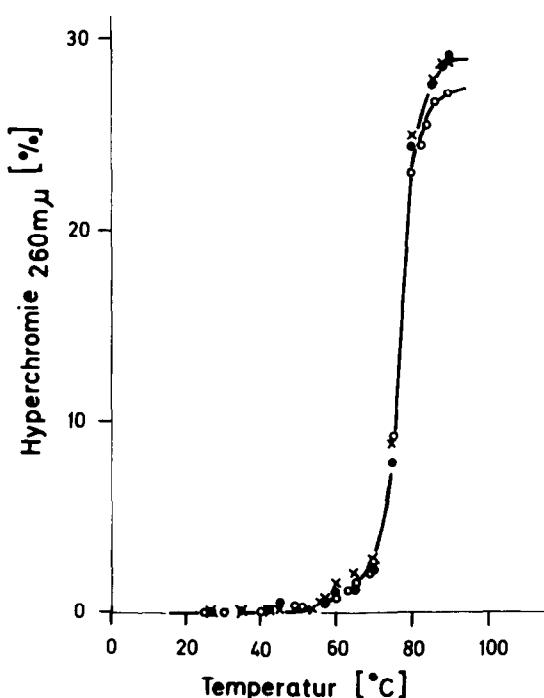


Abb. 1. Schmelzverhalten von nativer und modifizierter tRNS^{Phe} aus Hefe. Abszisse: Temperatur [°C]. Ordinate: Hyperchromie bei 260 mμ [%]. Puffer: 0.15 M Tris-HCl pH 7.4; 0.01 mMg²⁺.

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 —CH₂OH-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

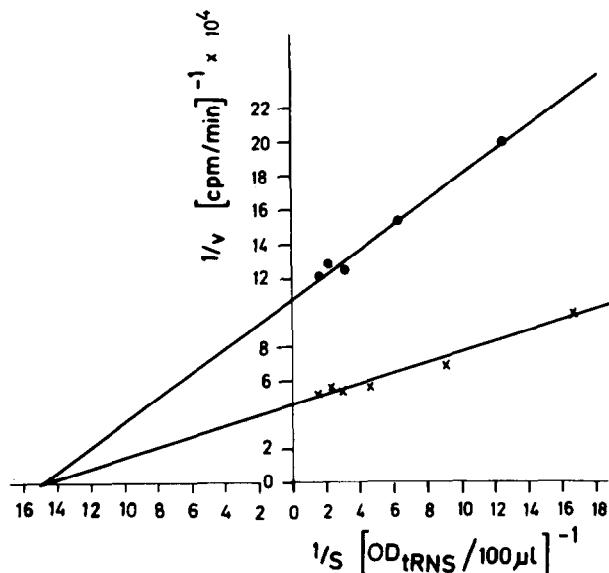


Abb. 2. Lineweaver-Burk-Plot der Aminoacylierung bei verschiedenen Konzentrationen von tRNS^{Phe} (x-x-x) und tRNS^{Phe}_{oxi-red} (●-●-●). Abszisse: reziproke Substratkonzentration [OD_{tRNS}/100 μl]⁻¹ (1 OD = 1.49 × 10⁻⁹ Mol tRNS). Ordinate: reziproke Aminoacylierungsgeschwindigkeit [cpm/min]⁻¹. K_m 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 Fr. 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.Thiebe 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.Doepner, 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.Krutilina, 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.Fröhholm 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.