

**MECHANISMUS UND SPEZIFITÄT
DER
PHENYLALANYL-tRNA-SYNTHEASE
AUS HEFE**

ABHANDLUNG

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
SINNE A.J. de LEEUW
Dipl. Chem. Technische Hochschule Eindhoven (NL)
geboren am 18. April 1951
Niederländischer Staatsangehöriger

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. H. Zuber, Referent
PD Dr. H. Dutler, Korreferent

5. Zusammenfassung

- (1) Die Ausbeute bei der Isolation der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe konnte durch Modifikation der Methode von Mayer [11] und Stingelin [12] um 50 % verbessert werden. Schwankungen in der Qualität des Enzyms im Rohextrakt konnten durch die genaue Erfassung der Spitze der spezifischen Enzymaktivität im Hefewachstum und durch einen effizienteren Aufschluss der Hefezellen vermieden werden.
- (2) Die spezifische Aktivität des reinen Enzyms lag bei 37° C um 10 % höher als beim Präparat von Stingelin [12]. Bei 0° C betrug sie noch 10 % des Wertes bei 37° C. Die Uebertragung auf tRNA^{Phe} wird durch hohe Mg²⁺-Konzentrationen vollständig inhibiert, obwohl die Stöchiometrie des Enzyms in der Adenylatbildungsreaktion unter den gleichen Bedingungen von 1 auf 2 Phe-AMP/Phe-RS erhöht wird.
- (3) Die Methode des kinetischen Quenchings, die von Mayer entwickelt wurde [11], eignete sich nur unter bestimmten Reaktionsbedingungen für die Bestimmung der gebildeten Menge des Enzym-Adenylat-Komplexes. Die Reproduzierbarkeit der Methode konnte durch die Einführung genauerer Pipetten und die Durchführung bei 3° C statt bei Zimmertemperatur verbessert werden. Für das Quenching der Aktivierungsreaktion eigneten sich eine niedrige und konstante Menge ¹²C-Phe oder ein genügend grosser Ueberschuss an L-Phe-ol am besten, so dass die gebildete Menge des Enzym-Adenylat-Komplexes direkt aus der Menge Phe-tRNA^{Phe} abgeleitet werden konnte.
- (4) Höhere Substratkonzentrationen erhöhen das Verhältniss Phe-AMP/Phe-RS auf 2. Die Methode des kinetischen Quenchings und die der Isolation des Enzym-Adenylat-Komplexes auf Nitro-

cellulose-Filtern ergaben das gleiche Resultat. Für die Aktivierung von Phe durch Phe-RS wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, in dem die beiden aktiven Stellen des Enzyms bei unterschiedlich hohen Substratkonzentrationen mit Adenylat besetzt werden. Als Folge einer negativen Kooperativität verläuft die Adenylatbildung an der 1. Stelle bei tiefen, an der 2. Stelle erst bei hohen Substratkonzentrationen. PPase ermöglicht die Aktivierung bei bedeutend tieferen Phe-Konzentrationen, hebt indessen die negative Kooperativität und den dadurch entstandenen Unterschied zwischen beiden Stellen nicht auf.

- (5) Das enzymgebundene Phe-AMP wird langsam auf dem Enzym hydrolysiert. Dies konnte durch die Messung der entsprechend erhöhten AMP-Produktion mittels Chromatographie des entstandenen ^{14}C -AMP auf PEI-Platten festgestellt werden. Das Adenylat an der 2. Stelle wird schneller hydrolysiert aber langsamer gebildet, wobei sich zeigte, dass die langsamste Adenylatbildung noch viel schneller ist als die schnellste Hydrolyse. Aus diesen Resultaten folgte ein Modellvorschlag für die Adenylatbildung mit und ohne PPase.
- (6) Die Hydrolyse des Enzym-Adenylat-Komplexes wird von tRNA-Spezies stark stimuliert; nicht-koğnate tRNA hatten keinerlei Einfluss. Das Ausmass dieser Stimulierung ist für $\text{tRNA}_{\text{CC-}}^{\text{Phe}}$ und $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ identisch. Mit der Hilfe dieser Befunde wurde ein Modell vorgeschlagen, in welchem die aktivierte Aminosäure auf eine Stelle X des Enzyms übertragen wird, nachdem durch die Bindung der tRNA an das Enzym eine tRNA^{Phe} -spezifische Konformationsänderung des Enzyms stattgefunden hat. Das Phe wird von dieser X-Stelle bedeutend schneller auf tRNA übertragen als abhydrolysiert.
- (7) Phe-RS aktiviert auch die nicht-kognaten Aminosäuren Tyr und Leu nach dem gleichen Mechanismus wie die Aktivierung

von Phe bis zur Bildung des E.Phe-AMP-Komplexes. In Gegensatz zur kognaten Aminosäure werden diese nicht-kognaten Aminosäuren wesentlich langsamer auf tRNA^{Phe} übertragen, vermutlich wegen einer ungünstigen Orientierung der aktivierten Aminosäure bezüglich der tRNA^{Phe} . Damit wird die Hydrolysegeschwindigkeit relativ zur Uebertragungsgeschwindigkeit höher.

- (8) Die Spezifität der Aminoacylierungsreaktion kommt durch 2 spezifische Schritte zustande: Die Adenylatbildung und die Uebertragung von der X-Stelle auf tRNA^{Phe} . Bei diesem letzten Schritt wird durch eine starke Verlangsamung gegenüber der Hydrolyse bei den nicht-kognaten Aminosäuren die Entfernung aus dem Reaktionsweg den Vorzug gegeben. Ein Proofreading bzw. Editing des Enzyms durch eine nachträgliche Korrektur der missacylierten tRNA^{Phe} wird auf Grund des hier vorgeschlagenen Modells kaum stattfinden (vgl. [16,20]).

6. Abstract

Phe-RS was isolated by a slightly modified method, which resulted in a 50 % better yield in total enzymic activity as compared to a previous isolation of Stingelin. The specific activity of the purified enzyme, as measured at 0° C and 37° C, was strongly dependant on the concentration of Mg^{2+} -ions. At high concentrations of Mg^{2+} (above 200 mM) no residual aminoacylation activity could be found, although both active sites could be occupied with adenylate. Both active sites of Phe-RS were also occupied with adenylate at high concentrations of Phe and ATP. The formation of the $E.(Phe-AMP)_2$ -Komplex is characterised by a strong negative cooperativity, which is not abolished by the use of Pyrophosphatase.

The isolated enzyme-adenylate-complex is hydrolysed by a two-step-mechanism. The first adenylate molecule is hydrolysed fast compared to the second one, due to the negative cooperativity. The hydrolysis of the second adenylate molecule will however not be visuable, wenn Phe and ATP are available, because adenylation on the unoccupied active site is much faster than hydrolysis. The rate of hydrolysis is strongly accelerated in the presence of the cognate tRNA. A model in agreement with other authors is proposed, in which the activated amino acid is acylated to a binding site X on the enzyme. This reaction is induced by a conformational change of the enzyme in the presence of $tRNA^{Phe}$. From this X-site the amino acid can be transfered to the $tRNA^{Phe}$ and hydrolysis occurs if this transfer is not possible. This mechanism is used in describing the specificity of reaction of Phe-RS. Both non-cognate amino acids Tyr and Leu are activated by the enzyme and the observed rates of hydrolysis are comparable with those, which were determined with Phe. It is proposed that the specificity of the $tRNA^{Phe}$ -aminoacylation reaction is obtained by differences in the rate of transfer to $tRNA^{Phe}$; the cog-

nate amino acid is transferred much faster and the non-cognate amino acid much slower than it is hydrolysed from the X-site. The earlier proposed proofreading mechanism of Cramer and von der Haar et. al. and the editing mechanism of Fersht et. al., in which the non-cognate amino acid is transferred to the tRNA prior to hydrolysis of the acyl bond by the enzyme, do not seem to be of importance for the specificity of reaction of Phe-RS from Yeast.