



Doctoral Thesis

**Die Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg
Reinigung, Charakterisierung und Vergleich mit dem Enzym aus
einer *Pseudomonas*-resistenten Mutante**

Author(s):

Rechsteiner, Thomas

Publication Date:

1990

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000578009> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 9128

**Die Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus
Methanobacterium thermoautotrophicum
Marburg:**

**Reinigung, Charakterisierung und Vergleich mit dem
Enzym aus einer Pseudomonas-resistenten Mutante**

ABHANDLUNG

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

vorgelegt von
THOMAS RECHSTEINER
dipl. Natw. ETH
geboren am 24. Juni 1959
von Appenzell (Kt. Appenzell I.Rh.)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. Th. Leisinger, Referent
Prof. Dr. H. Hennecke, Korreferent

Th. Leisinger

1990

1. KURZFASSUNG

Pseudomonat, ein Antibiotikum aus *Pseudomonas fluorescens*, ist eine der wenigen Verbindungen, die *Methanobacterium (M.) thermoautotrophicum* Marburg in niedriger Konzentration hemmen. Nach Mutagenese mit Nitrosoguanidin konnten stabile Pseudomonat-resistente Mutanten dieses Organismus isoliert werden. Die Pseudomonat-Resistenz bietet sich somit als Werkzeug für genetische Experimente (Gentransfer, Vektorkonstruktion) mit dem Methanbakterium *M. thermoautotrophicum* an. Im Hinblick auf die Isolierung des Resistenz vermittelnden Gens befasst sich die vorliegende Arbeit mit der biochemischen Charakterisierung der Pseudomonat-Resistenz in Mutanten von *M. thermoautotrophicum*.

Pseudomonat wirkte wie bei *Escherichia (E.) coli* auch bei *M. thermoautotrophicum* als kompetitiver Inhibitor der Isoleucyl-tRNA-Synthetase. Unter Verwendung von Pseudomonat-Sepharose als Affinitätsmatrix konnte eine einfache Reinigungsmethode für die Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *M. thermoautotrophicum* entwickelt werden. Die Isoleucyl-tRNA-Synthetasen aus dem Wildtyp (MBT 1) und aus einer Pseudomonat-resistenten Mutante (MBT 10) von *M. thermoautotrophicum* wurden durch Pseudomonat-Sepharose retiniert, während die übrigen Proteine entweder gar nicht an die Säule banden oder bei hoher Ionenstärke ausgewaschen werden konnten. Die an die Affinitätsmatrix gebundenen Isoleucyl-tRNA-Synthetasen wurden anschliessend je nach Stabilität der Enzym-Pseudomonat-Komplexe durch 5.5 mM (MBT 10) oder 12.9 mM (MBT 1) Isoleucin spezifisch eluiert. Die homologen Enzyme aus *E. coli* und *Saccharomyces (S.) cerevisiae* liessen sich mit Hilfe dieser Methode nicht reinigen, weil die Wechselwirkung zwischen Enzym und Antibiotikum entweder zu stark (*E.coli*) oder zu schwach (*S. cerevisiae*) war.

Die Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *M. thermoautotrophicum* ist ein Monomer von rund 120'000 Da. Die Aktivitätsoptima des Enzyms bezüglich pH, Temperatur und Mg-Konzentration variierten je nach gemessener Reaktion und verwendeter tRNA (Aminoacylierung: pH 7.0, 80 °C, 2 mM Mg²⁺; Aminoacylierung von *E. coli*-tRNA: pH 7.8, 55 °C, 7.5 mM Mg²⁺; Aminoacylierung von *M. thermoautotrophicum*-tRNA: pH 8.2, 50 °C, 4 mM Mg²⁺). Das Enzym belud isoleucinspezifische *E. coli*-tRNA.

Die kinetische Analyse der *M. thermoautotrophicum* -Isoleucyl-tRNA-Synthetase ergab in An- und Abwesenheit von tRNA ein Anfangsgeschwindigkeitsmuster («initial velocity pattern»), das eine sequentielle, ungeordnete («sequential random») Reihenfolge der Substrataddition von ATP und Isoleucin nahelegte. Die Hemmkinetik von Pseudomonat war vereinbar mit diesem kinetischen Mechanismus: Pseudomonat hemmte das Enzym kompetitiv bezüglich Isoleucin und ATP. Die Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus der Mutante MBT 10 zeigte bezüglich des kinetischen Mechanismus das gleiche Verhalten wie das Wildtypenzym.

Der Vergleich einiger kinetischer Konstanten (K_M , k_{kat} , K_i) der beiden Enzyme zeigte Unterschiede bei allen Parametern, wobei die 10-fache Erhöhung der beiden Inhibitions-konstanten $K_i(\text{Ile})$ und $K_i(\text{ATP})$ des Mutantenzym für die Pseudomonatresistenz entscheidend sein dürfte. Interessant war auch die Tatsache, dass die Affinität des Mutantenzym für Isoleucin und ATP (messbar als Erniedrigung von $K_M(\text{Ile})$ und $K_M(\text{ATP})$) im Vergleich zur Affinität des Wildtypenzym für diese beiden Substrate erhöht war. Dadurch wurde die Erniedrigung der katalytischen Konstante (k_{kat}) des Mutantenzym kompensiert, so dass die katalytische Effizienz (k_{kat}/K_M) der beiden Enzyme gleich blieb.

Aus den kinetischen Untersuchungen wurde gefolgert, dass Pseudomonat auf die Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus *M. thermoautotrophicum* wie ein Aminoacyladenylatanalog wirkt und dass die erniedrigte Affinität zwischen Enzym und Antibiotikum die primäre Ursache für die Pseudomonat-Resistenz des Mutantenzym aus *M. thermoautotrophicum* MBT 10 darstellt.

1. ABSTRACT

Pseudomonic acid, an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*, is one of the few compounds inhibiting the growth of *Methanobacterium (M.) thermoautotrophicum* Marburg at low concentrations. Nitrosoguanidine-mutagenesis of *M. thermoautotrophicum* yielded stable pseudomonic acid-resistant mutants of this organism were obtained. Resistance to pseudomonic acid thus may be useful as a selectable genetic marker in gene transfer experiments with this methanogenic bacterium. In this context it was of interest to biochemically characterize the pseudomonic acid-resistance of some pseudomonic acid-resistant strains of *M. thermoautotrophicum*.

Pseudomonic acid acted in *M. thermoautotrophicum*, as it does in *Escherichia coli*, as a competitive inhibitor of isoleucyl-tRNA synthetase. With pseudomonic acid-Sepharose as a affinity matrix a simple purification method for the *M. thermoautotrophicum* isoleucyl-tRNA synthetase was developed. On columns of pseudomonic acid-Sepharose the isoleucyl-tRNA synthetases of both, the wildtype (MBT 1) and a pseudomonic acid-resistant mutant (MBT 10) of *M. thermoautotrophicum* were retained, while other proteins did not bind. Depending on the stability of the pseudomonic acid-enzyme complexes, the isoleucyl-tRNA synthetases of the mutant and of the wildtype were specifically eluted by 5.5 mM and 12.9 mM L-isoleucine. The homologous enzymes from *E. coli* and *Saccharomyces (S.) cerevisiae* could not be purified by this method, because the interactions between the enzymes and the antibiotic were either too strong (*E. coli*) or too weak (*S. cerevisiae*)

Isoleucyl-tRNA synthetase from *M. thermoautotrophicum* is a monomer of approx. 120,000 Da. Optimal conditions for activity with respect to pH, temperature and Mg-concentration varied depending on the reaction of the enzyme measured and on the source of the tRNA being charged (aminoadenylation: pH 7.0, 80 °C, 2 mM Mg²⁺; aminoacylation of *E. coli* -tRNA: pH 7.8, 55 °C, 7.5 mM Mg²⁺; aminoacylation of *M. thermoautotrophicum* -tRNA: pH 8.2, 50 °C, 4 mM Mg²⁺). The enzyme charged isoleucine-specific *E. coli*-tRNA in heterologous aminoacylation.

Kinetic analysis of the isoleucyl-tRNA synthetase from *M. thermoautotrophicum* MBT 1 and MBT 10 suggested a sequential random order of substrate addition of ATP and isoleucine in the absence and the presence of tRNA as deduced from initial velocity patterns. Inhibition kinetics with pseudomonic acid as an inhibitor of amino acid activation and aminoacylation of tRNA was consistent with this kinetic mechanism: Pseudomonic acid inhibited both reactions competitively with respect to isoleucine and ATP.

Comparison of some kinetic constants of the two enzymes (K_M , k_{kat} , K_i) revealed differences in all parameters. The 10-fold increase of the inhibition constants $K_i(\text{Ile})$ and $K_i(\text{ATP})$ of the mutant enzyme with respect to the wildtype enzyme was the biochemical

basis for pseudomonic acid-resistance. Interestingly, the mutant enzyme's affinity for isoleucine and ATP was increased. This increase, measurable as decrease of $K_M(\text{Ile})$ and $K_M(\text{ATP})$, compensated for the lower catalytic constant (k_{cat}) of the mutant enzyme. As a consequence the catalytic efficiencies (k_{cat}/K_M) of the two enzymes were kept at the same level.

From the kinetic studies it was concluded that pseudomonic acid acts as an aminoacyladenylate analogue and that pseudomonic acid-resistance of the mutant strain *M. thermoautotrophicum* MBT 10 is based on the decreased affinity of its isoleucyl-tRNA synthetase for the antibiotic.