

Diss. ETH Nr. 9468

## **Investigations on *Escherichia coli* Phenylalanyl-tRNA Synthetase at the Molecular Level:**

### **Identification and Genetic Engineering of a Phenylalanine Specificity Determinant and Possible Application of a Relaxed Specificity Mutant**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH  
for the degree of  
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by  
PETER KAST  
Dipl. Natw. ETH  
born on June 12, 1961  
citizen of Wetzikon (ZH) and Fischingen (TG)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. H. Hennecke, examiner  
Prof. Dr. T. Leisinger, co-examiner

Zürich 1991

## Abstract

---

The enzyme phenylalanyl-tRNA synthetase (PheRS) catalyses the covalent coupling of the amino acid phenylalanine to the corresponding tRNA<sup>Phe</sup>. Neither the tertiary structure nor the topology of the substrate binding sites are known for PheRS. In this work, it was attempted, by molecular-genetic means, to characterize the phenylalanine binding site of PheRS from the bacterium *Escherichia coli*.

To localize amino acid residues in PheRS which interact with phenylalanine, two types of PheRS mutants with altered substrate binding properties were analyzed. Since both mutations mapped to *pheS* (the gene encoding the  $\alpha$  subunit of PheRS), the mutated *pheS* genes were cloned and sequenced. One of the mutations, causing a lowered affinity for phenylalanine in PheRS, resulted in an amino acid exchange in motif 2, a generally conserved sequence of class II aminoacyl-tRNA synthetases to which PheRS belongs. The second mutation affected motif 3, another class II-specific sequence. The resulting amino acid exchange (alanine-to-serine at position 294 of the PheRS  $\alpha$  subunit) was responsible for the resistance of the *E. coli* mutant strain against the substrate analogue *para*-fluoro-phenylalanine (*p*-F-Phe). The exclusion of *p*-F-Phe from the enzymatic reaction by the mutant PheRS (in contrast to the wild-type enzyme) may now be explained by alterations of steric interactions.

The sequence around position 294 (Gly<sup>292</sup>-Phe<sup>293</sup>-Ala<sup>294</sup>-Phe<sup>295</sup>-Gly<sup>296</sup>) is also well conserved in *Bacillus subtilis* and yeast cytoplasmic and mitochondrial PheRSs. To enlarge the number of sequences for comparisons, the *pheS* genes from *Salmonella typhimurium* and *Thermus thermophilus* were cloned and partially sequenced. The sequence data confirmed that amino acid residue 294 was located in a PheRS-specific site. The choice of *T. thermophilus* was influenced by the fact that its PheRS had been crystallized; the availability of amino acid sequence information will therefore greatly help elucidate the tertiary structure.

Replacement of the phenylalanines at positions 293 and 295 by selected other amino acids revealed that these residues do not directly interact with the amino acid substrate, but seem to affect PheRS stability. Replacements at position 294 showed that this residue contacts the *para*-position of the substrate's aromatic ring. The most interesting exchange, alanine-to-glycine, generated an enzyme with relaxed substrate specificity for *para*-substituted phenylalanine analogues. This mutant can possibly be exploited in an *in vivo* system for the incorporation of non-proteinogenic amino acids into proteins of pharmaceutical relevance.

## Kurzfassung

---

Das Enzym Phenylalanyl-tRNA Synthetase (PheRS) katalysiert die kovalente Kopplung der Aminosäure Phenylalanin an die zugehörige tRNA<sup>Phe</sup>. Von der PheRS sind weder Tertiärstruktur noch Topologie der Substratbindungsstellen bekannt. In dieser Arbeit sollte versucht werden, mit molekulargenetischen Methoden die Bindungsstelle für Phenylalanin in der PheRS des Bakteriums *Escherichia coli* zu charakterisieren.

Für die Lokalisierung von PheRS-Aminosäuren, die mit Phenylalanin interagieren, wurden zwei Typen von PheRS-Mutanten mit beeinträchtigter Substratbindung untersucht. Da die Mutationen in *pheS*, dem Gen für die PheRS  $\alpha$ -Untereinheit kartierten, wurden die mutierten *pheS*-Gene kloniert und sequenziert. Eine Mutation, die zu einer erniedrigten Affinität des Enzyms für Phenylalanin führte, ergab einen Aminosäureaustausch in Motiv 2, einer generell konservierten Sequenz der sogenannten Klasse II-Aminoacyl-tRNA Synthetasen, zu denen PheRS gehört. Die zweite Mutation betraf das ebenfalls für Klasse II spezifische Sequenz-Motiv 3. Der resultierende Aminosäure-Austausch (Alanin zu Serin an Position 294 der PheRS  $\alpha$ -Untereinheit) war verantwortlich für die Resistenz eines entsprechenden *E. coli* Mutanten-Stamms gegen das Substrat-Analog *p*-Fluor-Phenylalanin (*p*-F-Phe). Der Ausschluss von *p*-F-Phe von der Reaktion der Mutanten-PheRS (im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym) konnte mit veränderten sterischen Interaktionen erklärt werden.

Die Region unmittelbar um Position 294 (Gly<sup>292</sup>-Phe<sup>293</sup>-Ala<sup>294</sup>-Phe<sup>295</sup>-Gly<sup>296</sup>) ist gut konserviert in PheRS von *Bacillus subtilis* und Hefe (aus Cytoplasma und Mitochondrien). Um weitere Sequenzvergleiche anstellen zu können, wurden die *pheS*-Gene aus *Salmonella typhimurium* und *Thermus thermophilus* kloniert und teilweise sequenziert. Die Sequenzierungsresultate bestätigten, dass Aminosäure 294 in einer für PheRS spezifischen Region liegt. Die Wahl von *T. thermophilus* erfolgte auch deshalb, weil *T. thermophilus* PheRS-Kristalle vorhanden sind, die es später erlauben sollten, mit Hilfe der Aminosäuresequenz die dreidimensionale Struktur zu ermitteln.

Ein gezielter Ersatz der Phenylalanine 293 und 295 durch ausgewählte andere Aminosäuren zeigte, dass diese Positionen nicht direkt mit dem Aminosäure-Substrat interagieren, jedoch für die PheRS-Stabilität wichtig sind. Austausche an Position 294 bestätigten hingegen, dass hier Interaktionen mit der *para*-Position

des aromatischen Rings des Substrats stattfinden. Der interessanteste Austausch, Alanin zu Glycin, ergab ein Enzym mit relaxierter Spezifität für *para*-substituierte Phenylalanin-Analoga. Dieses Mutanten-Enzym lässt sich möglicherweise in einem *in vivo* Produktionssystem für den Einbau von nicht-proteinogenen Aminosäuren in pharmazeutisch relevante Proteine einsetzen.