

Diss. ETH Nr. 9589.

Th. Leisinger

**Das Strukturgen der  
Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus  
*Methanobacterium thermoautotrophicum*  
Marburg**

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels  
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
URS JENAL  
Dipl. Natw. ETH  
geboren am 31. Dezember 1961  
von Samnaun (GR)

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

Zürich, 1991

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Strukturgen *ileS* der Isoleucyl-tRNA-Synthetase wurde aus dem thermophilen Archaeobakterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg isoliert und sequenziert. *ileS* wird von einem unbekanntem offenen Leseraster und von *purL* flankiert. Diese Genanordnung unterscheidet sich von jenen, die in verschiedenen Eubakterien oder in *Saccharomyces cerevisiae* vorgefunden wurden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der Isoleucyl-tRNA-Synthetase wurde mit den Primärsequenzen der Isoleucyl-, Valyl-, Leucyl- und Methionyl-tRNA-Synthetasen aus Hefe und aus verschiedenen Eubakterien verglichen. Das archaeobakterielle Enzym passt gut in diese Gruppe verwandter Enzyme. Es enthält neben den beiden kurzen Konsensussequenzen der Klasse I Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zusätzliche Regionen, die Homologie zu den bekannten Enzymen aus der Isoleucin-Familie aufweisen. Der direkte Sequenzvergleich der Isoleucyl-tRNA-Synthetasen ergab für das Enzym von *M. thermoautotrophicum* 36% identische Aminosäuren mit dem Hefe-Enzym und 32% Identität mit dem entsprechenden Enzym von *Escherichia coli*. Das *ileS* Gen der Pseudomonat-resistenten Mutante MBT10 von *M. thermoautotrophicum* wurde ebenfalls sequenziert. Das Enzym der Mutante weist in der Position 589 einen Austausch von Glycin durch Asparaginsäure auf. Die Mutation liegt in einer konservierten Region, die auch die KMSKS Konsensussequenz enthält. Die Inhibitionskonstanten  $K_i^{Ile}$  und  $K_i^{ATP}$  des Mutantenzym sind gegenüber jenen des Wildtypenzym 10-fach erhöht. Die *ileS* Gene aus der Mutante und aus dem Wildtyp konnten in *E. coli* exprimiert werden, und ihre Produkte zeigten den erwarteten Sensitivitätsunterschied gegenüber Pseudomonat. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass die Punktmutation in *ileS* für die Resistenz von *M. thermoautotrophicum* MBT10 gegenüber Pseudomonat verantwortlich ist. Diese Erkenntnis erlaubt es, das *ileS* Gen von Stamm MBT10 als selektierbare Marke für Klonierungsvektoren von *M. thermoautotrophicum* zu verwenden.

Die *ileS*-Region enthält neben *ileS* zwei weitere offene Leseraster. Unmittelbar stromaufwärts von *ileS* liegt *orfA*, das für ein Protein unbekannter Funktion mit 401 Aminosäuren kodiert. Stromabwärts von *ileS* folgt *purL*, das aufgrund der starken Homologie seiner Aminosäuresequenz zu PurL von *Bacillus subtilis* als Strukturgen der Phosphoribosyl-Formylglycinamidin Ribonukleotid-Synthetase II identifiziert wurde. Alle drei Gene der *ileS*-Region werden in derselben Richtung

als polycistronische mRNA transkribiert. Mittels Primer-Extension wurde der Transkriptionsstart unmittelbar oberhalb von *orfA* lokalisiert. Die von diesem Promotor ausgehende Transkription scheint einer Regulation zu unterliegen. Sowohl mit Northern Blots als auch mit S1-Nuklease-Schutz Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration von *orfA-ileS-purL* mRNA in *Pseudomonas*-gehemmten und damit bezüglich Isoleucyl-tRNA verhungerten Zellen gegenüber ungehemmten Zellen etwa 10-fach erhöht war.

Mit S1-Nuklease Experimenten wurden mehrere mRNA 5'-Enden innerhalb der kodierenden *orfA*-Region lokalisiert. Diese sind vermutlich auf eine Prozessierung der mRNA in dieser Region zurückzuführen. Erste Resultate weisen darauf hin, dass das Ausmass der mRNA-Prozessierung innerhalb von *orfA* Ausdruck eines Regulationsmechanismus für die Kontrolle der Expression dieses Gens ist.

## 1. SUMMARY

The *ileS* gene encoding the isoleucyl-tRNA synthetase of the thermophilic archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg was isolated and sequenced. *ileS* was closely flanked by an unknown open reading frame and by *purL* and thus is arranged differently from the organizations observed in several eubacteria or in *Saccharomyces cerevisiae*. The deduced amino acid sequence of isoleucyl-tRNA synthetase was compared with primary sequences of isoleucyl-, valyl-, leucyl-, and methionyl-tRNA synthetases from eubacteria and yeast. The archaeobacterial enzyme fitted well into this group of enzymes. It contained the two short consensus sequences observed in class I aminoacyl-tRNA synthetases as well as regions of homology with enzymes of the isoleucine family. Comparison between the isoleucyl-tRNA synthetases of *M. thermoautotrophicum* yielded 36% amino acid identity with the yeast enzyme and 32% identity with the corresponding enzyme from *Escherichia coli*. The *ileS* gene of the pseudomonic acid-resistant *M. thermoautotrophicum* mutant MBT10 was also sequenced. The mutant enzyme had undergone a glycine to aspartic acid transition at position 589, in a conserved region comprising the KMSKS consensus sequence. The inhibition constants of pseudomonic acid,  $K_i^{ile}$  and  $K_i^{ATP}$ , for the mutant enzyme were 10-fold higher than those determined for the wild-type enzyme. Both the mutant and the wild-type *ileS* gene were expressed in *E. coli*, and their products displayed the expected difference in sensitivity toward pseudomonic acid. The point mutation in *ileS* is thus responsible for the resistance of *M. thermoautotrophicum* MBT10 towards pseudomonic acid. This finding allows the use of this gene as a selectable marker in the construction of cloning vectors for *M. thermoautotrophicum*.

The *ileS* region contains two additional open reading frames. The sequence upstream of *ileS* codes for *orfA*, whose potential product is a 401 amino acid protein of unknown function. Downstream, *ileS* is followed by *purL* which, based on its strong amino acid sequence homology to PurL of *Bacillus subtilis*, was identified as the structural gene of the phosphoribosyl-formylglycineamidate ribonucleotide synthetase II. The three genes of the *ileS* region were transcribed into a polycistronic mRNA. The transcriptional start site was mapped upstream of *orfA* by primer extension analysis. Northern blot analysis and S1 nuclease

protection experiments indicated that transcription from this promoter is regulated. Inhibition by pseudomonic acid and, hence, starvation for isoleucyl-tRNA resulted in a ten-fold increase in the concentration of *orfA-ileS-purL* mRNA as compared to the mRNA level in cells which had not been exposed to the drug.

Several mRNA 5'-ends were localized in the *orfA* coding region by S1 nuclease experiments. These mRNA's are presumably processed products of a larger mRNA species, and it appears that mRNA processing in this region reflects a specific regulatory mechanism governing the expression of *orfA*.