

Polymergebundenes Puromycin

Resin Linked Puromycin

Frank Seela

Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen, und Universität Paderborn — Gesamthochschule, Fachbereich 6 (Organische Chemie), Paderborn

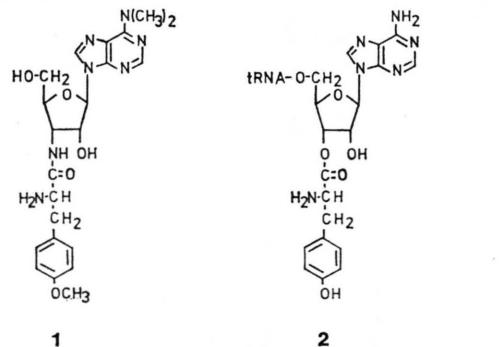
(Z. Naturforsch. **30 c**, 544—545 [1975]; eingegangen am 24. März 1975)

Resin Linked Puromycin, Affinity Chromatography, Ribosomes

A biospecific resin for the retardation of ribosomal peptidyltransferase by affinity chromatography was prepared by condensing the α -amino group of puromycin with the N-hydroxysuccinimide ester of CH-Sepharose 4B to yield the resin-linked puromycin derivative **4**.

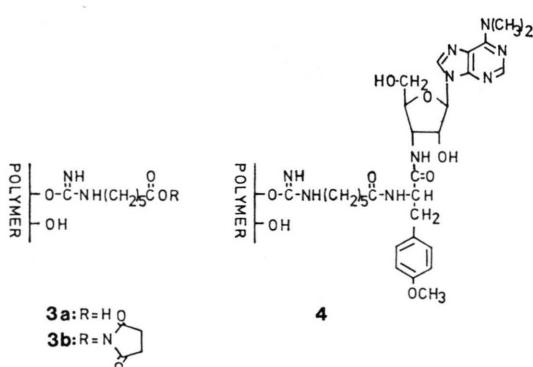
Puromycin (**1**)^{1–3} ist ein natürliches Struktur-analogon einer an C-3' mit L-Tyrosin beladenen tRNA (**2**).

Wie aminoacylierte tRNA wird Puromycin (**1**) an die 50S-Untereinheit von *E. coli*-Ribosomen gebunden⁴, wo es vermutlich die Bindungsstelle des terminalen Aminoacyl-Adenosinrestes der tRNA (Peptidyltransferasezentrum) besetzt.



1

2



Sonderdruckanforderungen an Priv.-Doz. Dr. F. Seela, Universität Paderborn — Gesamthochschule, Fachbereich 6 (Organische Chemie), D-4790 Paderborn, Pohlweg 55.

Um Kenntnis von der Struktur der Peptidyltransferase zu erlangen, wird ein Harz zur Affinitätschromatographie von Ribosomen beschrieben, das eine biospezifische Abtrennung der Peptidyltransferase gestatten sollte.

Die Abtrennung der Puromycin-Bindungspartner mit Hilfe der Affinitätschromatographie besitzt gegenüber den bisher benutzten Affinity labeling Methoden^{5, 6} den Vorteil, daß der Bindungspartner in chemisch unveränderter Form erhalten werden kann.

Als Matrix für (**1**) wurde Sepharose 4B benutzt, die über eine Alkylkette (spacer) kovalent mit Puromycin verknüpft wurde. Kondensiert man CH-Sepharose 4B (**3a**) mit N-Hydroxysuccinimid durch N-Äthyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, so wird der aktivierte N-Hydroxysuccinimidester **3b** erhalten. Dieser wird in Wasser/Dioxan mit der primären Aminogruppe von Puromycin zum farblosen Affinitätsharz der Struktur **4** umgesetzt.

Die Ligandenkonzentration von **4** ergibt sich nach dessen alkalischer Hydrolyse und Bestimmen der UV₂₇₆-Absorption der Lösung zu 2,4 $\mu\text{mol}/\text{ml}$. Wie erste chromatographische Auftrennungen von *E. coli*-Ribosomen zeigen⁷, wird ein ribosomales *E. coli*-Protein von **4** spezifisch zurückgehalten und kann in reiner Form abgetrennt werden.

Die Arbeit wurde mit Mitteln des Landes Nordrhein-Westfalen gefördert.

Experimentelles

*N-Hydroxysuccinimidester von CH-Sepharose 4B (**3b**):* 3,0 g in 50 ml 0,5 M wäßrig. Natriumchlorid gequollene CH-Sepharose (**3a**) werden auf der Glasfritte erst mit 250 ml 0,5 M Natriumchlorid, dann mit 250 ml Wasser gewaschen, abgesaugt und in eine Lösung von 230 mg (2 mmol) N-Hydroxysuccinimid in 30 ml Wasser eingetragen. Der pH-Wert der Suspension beträgt 4,0. Nach Zusatz einer Lösung von 0,5 g N-Äthyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid in 1 ml Wasser schüttelt man 12 Stunden, saugt ab und wäscht ausgiebig mit Wasser. 14,5 ml farbloses Sepharose 4B-Derivat **3b**.

*Puromycin-Derivat von CH-Sepharose 4B (**4**):* 12 ml gequollenes Sepharose 4B-Derivat **3b** werden in 20 ml einer Dioxan/Wasser(1:1)-Mischung, die 54,5 mg (100 μmol) Puromycin-dihydrochlorid enthält, bei 0 °C eingetragen. Man versetzt mit 30 μl (200 μmol) Triäthylamin, schüttelt 6 Stunden und läßt noch reaktives **3b** durch Zusatz von 20 ml 1 M Äthanolamin, das mit konz. Salzsäure auf pH 10,0 eingestellt worden war, abreagieren. Nach 1 Stunde Reaktionszeit wird das Harz abgesaugt (Glasfritte) und alternierend mit 0,1 M Na-Formiatpuffer pH 3,5

und 0,1 M Na-Carbonatpuffer pH 10,0, die beide 1 M NaCl enthalten, gewaschen. Durch Nachwaschen mit Wasser entfernt man Salze und erhält 12 ml farbloses Sepharose 4B-Derivat **4**.

*Quantitative Ligandenbestimmung des Sepharose-4B-Derivates (**4**):* 0,5 ml Sepharose 4B-Derivat **4** bzw. 0,5 ml CH-Sepharole 4B (**3a**) werden jeweils mit 4,5 ml 2 N NaOH versetzt und bei 90 °C 2 Stunden hydrolysiert. 100 µl-Proben der hellbraunen Hydrolysate von **4** bzw. **3a** werden in einer Küvette

mit 1,9 ml H₂O verdünnt und die Extinktion bei 276 nm bestimmt. Aus der Extinktion der Lösung des Puromycin-Derivates **4** ($E = 0,409$) und der CH-Sepharose 4B ($E = 0,289$) ergibt sich ein $\Delta E = 0,24$. Die Probe enthält somit 0,48 A_{276} -Einheiten freies Puromycinderivat, das gesamte Hydrolysat somit ($50 \times 0,48 A_{276}$ -Einheiten) 24,0 A_{276} -Einheiten. Bei einem molaren Extinktionskoeffizienten des Puromycins von $\varepsilon = 20\,300^1$ entsprechen 24,0 A_{276} -Einheiten 1,2 µmol Puromycin-Derivat. Die Ligandenkonzentration beträgt somit 2,4 µmol Puromycin/ml Harz.

¹ C. W. Waller, P. W. Fryth, B. L. Hutchings u. J. H. Williams, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 2025 [1953].

² B. R. Baker, R. E. Schaub, J. P. Joseph u. J. H. Williams, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 12 [1955].

³ R. J. Suhadolnik, Nucleoside Antibiotics, 3, Wiley-Interscience, New York 1971.

⁴ R. E. Monroe, J. Mol. Biol. **26**, 147 [1967].

⁵ R. J. Harris, P. Greenwell u. R. H. Symons, Biochem. Biophys. Res. Commun. **55**, 117 [1973].

⁶ O. Pongs, R. Bald, T. Wagner u. V. A. Erdmann, FEBS-Letters **35**, 137 [1973].

⁷ V. A. Erdmann u. F. Seela, in Vorbereitung.