



Doctoral Thesis

Konformationsstudien an Calcitonin M und am Trypsin-Inhibitor BPTI mittels hochauflösender Kernresonanzen

Author(s):

Masson, André

Publication Date:

1974

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000133640> →

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 5229

**Konformationsstudien an
CALCITONIN M
und am
TRYPSIN – INHIBITOR BPTI
mittels hochauflösender Kernresonanz**

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

**vorgelegt von
ANDRE MASSON
Dipl. Phys. ETH
geboren am 9. März 1946
von Veytaux (VD)**

**Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. R. Schwyzer, Referent
Prof. Dr. K. Wüthrich, Korreferent**

**aku-Fotodruck
Zürich
1974**

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die räumliche Struktur des BPTI äussert sich in überaus deutlicher Weise im NMR-Spektrum. Mehrere Linien werden so stark aus ihrer Normalposition verschoben, dass sie in Bereichen des Spektrums erscheinen, wo sie nicht mehr durch andere Resonanzen verdeckt werden. Das relativ kleine Molekulargewicht, die ausgezeichnete Löslichkeit des Proteins, sowie die erwähnten Linienverschiebungen ermöglichen es, dass man gut aufgelöste Resonanzen einzelner Protonen beobachten kann.

Die deutliche Manifestierung der räumlichen Struktur im NMR-Spektrum ermöglicht es, auch ohne Zuordnung der einzelnen Linien zu bestimmten Residuen das Denaturierungsverhalten des BPTI zu studieren. Das Molekül ist ganz ausserordentlich stabil; es denaturiert weder bei extremen pH-Werten noch in 6 M GuHCl noch bei Erwärmung auf 95°C (pH 7). Auch die selektive Spaltung der Disulfidbrücke Cys¹⁴-Cys³⁸ vermag die Konformation nicht zu zerstören. Erst eine Kombination dieser Bedingungen führt zur Denaturierung. Andererseits ist der BPTI in DMSO und in Methanol bereits bei Zimmertemperatur vollständig denaturiert.

Zahlreiche Amidprotonen tauschen bei 20°C nur äusserst langsam gegen das umgebende Wasser aus. Das lässt bei diesem kleinen Protein auf eine besonders "harte" Konformation schliessen, bei der keine grösseren Schwingungen um die Gleichgewichtslage herum auftreten. Bei einer Temperaturerhöhung wird die Struktur langsam "weicher" (das Molekül "atmet"), was den Kontakt der Amidprotonen mit dem Wasser erlaubt. Dies erfolgt stets bei Temperaturen deutlich unterhalb der eigentlichen Denaturierungstemperatur. Es scheint, dass die Amidprotonen in den verschiedenen Regionen des Moleküls unterschiedlich gut vom Wasser abgeschirmt sind.

Es ist nicht gelungen, die Ursachen der grossen Linienverschiebungen zu erklären. Angesichts der präzisen Röntgenstrukturanalyse des BPTI und der bisherigen Erfahrungen mit anderen Proteinen erschien das ziemlich erstaunlich. Ein erneutes Prüfen der NMR-Spektren von Lysozym und Ribonuklease A ergab allerdings, dass auch bei diesen beiden Proteinen Linien vorhanden sind, die mit der bisherigen Analyse nicht erklärt werden können. Wahrscheinlich

unterscheidet sich der BPTI - was das NMR-Spektrum anbelangt - nicht in fundamentaler Weise von den anderen Proteinen; vielmehr scheinen einige Ursachen zu grösseren Linienverschiebungen bisher stets vernachlässigt worden zu sein.

Vergleich der NMR-Technik mit anderen Methoden :

Die Denaturierung des BPTI wurde in früheren Arbeiten⁽⁵²⁾ mit optischen Messungen (ORD / CD) studiert. Der grosse Nachteil dieser Methode liegt darin, dass man praktisch mit einem einzigen Parameter (z. B. Drehung bei 230 nm) die ganze Konformation des Moleküls charakterisieren sollte. Bei den NMR-Spektren steht eine ungleich höhere Anzahl von einzelnen Resonanzen zur Verfügung, die ein selektives "Abtasten" des Moleküls an verschiedenen Stellen erlaubt.

Eine analoge Situation ergibt sich beim Amidprotonen-Austausch: er kann auch mit IR⁽⁵⁴⁾ oder mit radioaktiven Tracern⁽⁵⁶⁾ verfolgt werden, aber diese Messungen liefern nur eine gemittelte Austauschgeschwindigkeit, während man mit NMR die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der einzelnen Amidprotonen bestimmen kann.

Die NMR-Methode liefert sicher eine wesentlich geringere Informationsdichte als die Röntgenstrukturanalyse; andererseits können mittels NMR ohne grossen Mehraufwand auch dynamische Untersuchungen durchgeführt werden (Denaturierung / Renaturierung, Konformationsänderung bei Temperaturerhöhung oder Wechsel des Lösungsmittels, NH-Austausch, etc.), was bei der Röntgendiffraktion nicht möglich ist. Ueberdies hat die NMR-Methode den Vorteil, dass die Konformation des Moleküls in der Lösung bestimmt wird und nicht im Kristallgitter, was den biologischen Verhältnissen sicher besser entspricht.