



Doctoral Thesis

C-13 Kernresonanzstudien an kleinen Modellpeptiden sowie am basischen pankreatischen Trypsin-Inhibitor und seinem Komplex mit Proteasen

Author(s):

Richarz, René

Publication Date:

1980

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000184792> →

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. 6495

^{13}C KERNRESONANZSTUDIEN AN KLEINEN
MODELLPEPTIDEN SOWIE AM BASISCHEN PANKREA-
TISCHEN TRYPSIN INHIBITOR UND SEINEM
KOMPLEX MIT PROTEASEN

ABHANDLUNG

zur Erlangung des
Titels des Doktors der Naturwissenschaften

EIDGENOESSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE
ZUERICH

vorgelegt von

RENE RICHARZ

Dipl.Phys. ETH, Zürich
geboren am 20. Januar 1952
von Zuerich und Bern

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. K. Wüthrich, Referent
Prof. Dr. R. Ernst, Korreferent

1980

ZUSAMMENFASSUNG

Als Hilfsmittel zum Studium der Konformation und Dynamik der Struktur von globulaeren Proteinen wurden die Chemischen Verschiebungen der zwanzig natuerlichen Aminosaeurereste in den Tetrapeptiden H-Gly-Gly-L-X-L-Ala-OH untersucht. Weiter wurden die entsprechenden Methoden entwickelt oder verfeinert, um individuelle Zuordnungen von aliphatischen Protonen und Kohlenstoffen in den entsprechenden Kernresonanzspektren vorzunehmen. Diese Methoden wurden angewandt, um die Resonanzen der Methylgruppen des Basischen Pankreatischen Trypsin Inhibitors (BPTI) zu individuellen Gruppen in der dreidimensionalen Struktur zuzuordnen.

Diese Zuordnungen dienten als Grundlage fuer eine Untersuchung der Dynamik der Proteinstruktur des Basischen Pankreatischen Trypsin Inhibitors. Dazu wurden theoretische Modelle diskutiert sowie das "wobble in cone" Modell in Zusammenarbeit mit Dr. K. Nagajama entwickelt. Es zeigte sich, dass das Protein im Frequenzbereich zwischen $1E+7$ und $1E+11$ Hz stochastische interne Fluktuationen ausfuehrt. Fuer die Hauptkette wurden Fluktuationen in einem Raumwinkelbereich von 20 Grad, fuer die Seitenketten zum Teil in einem wesentlich groesseren Raumwinkelbereich gefunden. Es wurde gezeigt, dass diese Bewegungen durch die Stabilitaet von hydrophoben Regionen im Innern des Proteins, nicht aber durch die globale Stabilitaet des Proteins, die in der Denaturationstemperatur und in den Austauschraten von internen Amidprotonen manifestiert ist, beeinflusst wird.

Um die Funktion des Basischen Pankreatischen Trypsin-Inhibitors im Detail zu studieren, wurde eine selektive Anreicherung des Carbonylkohlenstoffs der reaktiven Peptidbindung des Inhibitors mit ^{13}C vorgenommen. Da bei dieser chemischen Modifikation die Peptidbindung

zwischen Arg 39 und Ala 40 gespalten wurde, musste die chemische und räumliche Struktur des markierten Inhibitors im Detail analysiert werden. Es zeigte sich, dass dieser modifizierte Inhibitor trotzdem für Bindungsstudien mit Proteasen geeignet war, da er dieselbe räumliche Struktur wie der native Inhibitor besass. Es wurde die Bindung des markierten Inhibitors an Trypsin, Trypsinogen und das enzymatisch inaktive Anhydrotrypsin untersucht. Dabei zeigte sich jeweils bei der Bildung des Inhibitors an den Komplex eine kleine Tieffeldverschiebung von +0.6 ppm der Resonanz der markierten Carbonylgruppe des Inhibitors bei der Bildung des Komplexes. Im Falle von Trypsinogen wurde diese Verschiebung erst nach der Zugabe von H-Ile-Val-OH beobachtet. Diese Studien zeigten, dass es sich bei diesen Komplexen nicht um Acyl-Enzym-Komplexe handelt. Die Daten liessen sich am Besten mit der Annahme einer einfachen Michaelis-Bindung zwischen Inhibitor und Protease interpretieren. Eine starke tetraedrische Deformation des reaktiven Carbonylkohlenstoffs des Inhibitors schien unwahrscheinlich.

ABSTRACT

As an aid to study the conformation of globular proteins by ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR), the ^{13}C chemical shifts of the twenty common amino acid residues have been measured in the tetrapeptides H-Gly-Gly-L-X-L-Ala-OH. Methods have been developed to assign ^1H and ^{13}C resonances of aliphatic side chains in globular proteins to individual sites. These methods have been applied to the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor (BPTI) and resulted in the individual assignments of most of the methyl resonances in the ^1H and the ^{13}C spectra of the protein. These individual assignments have been used to study internal motions in the globular protein molecule by ^{13}C relaxation. A relaxation model, the wobble in cone model, has been developed to relate ^{13}C relaxation times in globular proteins to different types of internal motions. It was found, that both the backbone and the side chains undergo internal librational motions with a correlation time in the order of 10^{-9} sec. and angular displacements of $\pm 20^\circ$ for the backbone and up to $\pm 50^\circ$ for the longest side chains. By comparing the behaviour of the native inhibitor with a chemically modified molecule with lower denaturation temperature and faster amide proton exchange rates, no correlation between the global stability of the molecule and the motions affecting ^{13}C relaxation times have been observed. To study in detail the structure of the complexes formed between the inhibitor and Trypsin, the carbonyl carbon at the reactive site of the inhibitor has been enriched by ^{13}C . This allowed to study the hybridisation of the reactive site carbonyl carbon of BPTI in the complexes with trypsin,

trypsinogen and the enzymatically inactive Anhydrotrypsin. The experiments showed, that neither an acyl-enzyme-complex nor a strong tetrahedral distortion of the reactive site carbonyl carbon is formed upon binding of the inhibitor to the proteases.