



Doctoral Thesis

Totalsequenz der thermophilen Lactatdehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus*

Author(s):

Wirz, Beat

Publication Date:

1981

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000352226> →

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. Nr. 6842

TOTALSEQUENZ DER THERMOPHILEN LACTATDEHYDROGENASE
AUS BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS

A B H A N D L U N G

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der

E I D G E N O E S S I S C H E N T E C H N I S C H E N
H O C H S C H U L E Z U E R I C H

vorgelegt von

Beat Wirz
Dipl. Natw. ETH
geboren am 30. Januar 1953
von Luzern

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H. Zuber, Referent
PD Dr. H. Dutler, Korreferent
1981

ZUSAMMENFASSUNG

Die Primärstruktur der thermophilen Lactatdehydrogenase (LDH) aus *B. stearothermophilus* wurde bestimmt, um genauere Auskunft über die Stabilisierungs-Mechanismen von thermophilen (und indirekt auch mesophilen) Proteinen zu erhalten. Auch dient die Totalsequenz mit als Grundlage zur Strukturaufklärung mittels Röntgendiffraktion.

LDH wurde mittels Affinitätschromatographie an Oxamat-Sepharose gereinigt.

Die Strategie dieser Sequenzanalyse bestand in der Sequenzierung möglichst grosser Spaltfragmente, die über 90 % der Sequenz und die Mehrzahl der Ueberlappungen lieferten.

Fünf der sechs BrCN-Fragmente der LDH konnten durch Gel-filtration direkt oder durch Rechromatographie über Bio-Rex 70 isoliert werden. Bei zwei Fragmenten wurden mittels automatischer Sequenzierung noch nicht bekannte Bereiche (Pos. 86-92, 107-114, 238-249) erfasst, ein Fragment davon wurde mit Hilfe von Carboxypeptidase Y vollständig bestimmt (210A-251).

Durch Spaltung mit o-Iodosobenzoesäure konnten alle vier Tryptophan-Fragmente gewonnen werden. Zwei der Fragmente lieferten durch automatischen Edman-Abbau überlappend an bekannte Abschnitte neue Sequenzen (173-197, 204-209D).

Durch tryptische Gesamtsplaltung der LDH konnte ein grosses tryptisches Peptid erhalten werden, welches die Sequenz-lücke 198-203 zwischen zwei Trp-Fragmenten beidseits überlappend schloss.

Der C-Terminus der LDH wurde mittels Hydroxylaminsplaltung des C-terminalen BrCN-Fragments durch die Sequenzierung von Fragment 297-331 bis an sein C-Ende vollständig bestimmt. Der C-Terminus wurde durch Carboxypeptidase Y und Hydrazinolyse bestätigt.

Das Nachspalten des BrCN-Fragments 65-128 mit Staphylococcen-Protease lieferte Sequenzabschnitt 116-124. Durch Carboxypeptidase-Abbau wurde das BrCN-Fragment vollständig bestimmt.

Eine Stelle nicht überlappender Sequenzen (251/252) wurde durch die Aminosäureanalyse des entsprechenden tryptischen Ueberlappungspeptids bestätigt. Für eine zweite solche Stelle (128/129) fehlt diese.

Die Sequenzbestimmung der LDH aus *B. stearothermophilus* stellt die erste Totalsequenz einer thermophilen und zugleich bakteriellen LDH dar.

Die LDH, der die ersten 15 Aminosäurereste fehlen, besitzt ein Molekulargewicht von 141100 D (Tetramer). Sie stellt einen eigenen prokaryontischen (P-) Typus dar. In den Vertebraten-LDH's wichtige Aminosäuren wie Arg 101, Ala 31 bzw. Gln 31 (M- bzw. H-Typ), Tyr 245 und Cys 165 sind durch Asn 101, Phe 31, Ala 245 und Thr 165 ersetzt.

Die thermophile LDH ist zu allen bekannten Vertebraten-LDH's ca. 35 % homolog. Die Homologie zu den bacillären (mesophilen) LDH's beträgt fast das Doppelte.

Die interne Homologie der Mononukleotid-Bindungsgebiete und die Homologie zum N-Terminus von m-MDH sind leicht höher als bei anderen LDH's.

Die Art der Aminosäureaustausche beim Uebergang mesophile → thermophile LDH wurde diskutiert. Beispielsweise sind Anzeichen für eine Stabilisierung von α -Helices im thermophilen Enzym durch Ser,Thr → Ala - Austausch vorhanden. Auch zeigt ein Vergleich mit Vertebraten-LDH's anhand der räumlichen Struktur von Hundshai-LDH, dass bei einer etwa gleich grossen Zahl möglicher Ionenbindungen in der thermophilen LDH signifikant mehr Arginine an den Salzbrücken beteiligt sind.

Die Sekundärstrukturelemente der thermophilen LDH wurden nach Chou & Fasman abgeschätzt.

ABSTRACT

The primary structure of the thermophilic lactatedehydrogenase (LDH) from *B. stearotherophilus* has been determined in order to get more informations about mechanisms of stabilization of thermophilic (and hence also mesophilic) proteins. Furthermore the total sequence is a basis for the structure determination by x-ray diffraction.

LDH was purified by affinity chromatography on oxamate-sepharose.

The strategy of this sequence determination was to sequence large peptides from which over 90 % of the sequence data and most overlaps were obtained.

Five out of six BrCN fragments of the LDH have been isolated by gel filtration alone or with subsequent chromatography on Bio-Rex 70. With two BrCN fragments automated sequence degradation proceeded into unknown regions (pos. 86-92, 107-114, 238-249) and one of the fragments was fully determined by additional carboxypeptidase Y treatment (210A-251).

Cleavage with o-iodosobenzoic acid yielded all four tryptophan fragments. With two of them automated Edman-degradation resulted in new sequences (173-197, 204-209D) overlapping known segments.

Complete tryptic digestion of LDH released a large tryptic peptide which filled the gap between two Trp fragments (198-203) and overlapped with both of them.

The C-terminus of LDH has been determined by hydroxylamine cleavage of the C-terminal BrCN fragment, sequencing peptide 297-331 to its C-end. The C-terminus has been confirmed by carboxypeptidase Y and hydrazinolysis.

Fragmentation of BrCN fragment 65-128 by staphylococcus-protease rendered the determination of residues 116-124 possible. The BrCN fragment was determined completely by degradation with carboxypeptidase.

The non-overlapping sequence around pos. 251/252 has been confirmed by the amino acid analysis of the corresponding overlapping tryptic peptide. However, no such peptide could be obtained for pos. 128/129.

This first total sequence of a thermophilic LDH represents at the same time the first microbial LDH sequence.

This LDH, which is lacking the first 15 amino acid residues compared to other LDH's, has a molecular weight of 141'100 D (tetramer) and represents a particular procaryotic (P-) type. Amino acids which are relevant to the vertebrate LDH's such as Arg 101, Ala 31 resp. Gln 31 (M- resp. H-type), Tyr 245 and Cys 165 are replaced by Asn 101, Phe 31, Ala 245 and Thr 165.

The thermophilic LDH and all known vertebrate LDH's are 35 % homologous. The homology with bacillic (mesophilic) LDH's, as far as sequences are available to date, is almost twice as high.

The internal homology of the mononucleotide binding sites and the homology with the N-terminus of m-MDH are slightly higher than in other LDH's.

The characteristics of the mesophilic→thermophilic amino acid exchanges in LDH have been discussed. There are, e.g., indications for a stabilization of α -helices in the thermophilic enzyme by Ser,Thr→Ala-exchanges. Moreover, the comparison with vertebrate LDH's based on the tertiary structure of dogfish LDH manifests a significantly higher participation of arginines in ionic bonds in the thermophilic LDH, whereas the whole number of possible saltbridges is about the same for all LDH's.

The elements of the secondary structure of the thermophilic LDH have been estimated by the method of Chou & Fasman.