



Doctoral Thesis

Konformationsuntersuchungen von Thioredoxin aus *Escherichia coli* und seinen Trypsinfragmenten mit Hilfe spektroskopischer Methoden

Author(s):

Reutimann, Herbert Robert

Publication Date:

1983

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000359305> →

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](#).

KONFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN VON THIOREDOXIN AUS
ESCHERICHIA COLI UND SEINEN TRYPSINFRAGMENTEN
MIT HILFE SPEKTROSKOPISCHER METHODEN

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

HERBERT ROBERT REUTIMANN
dipl. Natw. ETH

geboren am 11. Oktober 1954
von Istighofen TG
und Weerswilen TG

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. P.L. Luisi, Referent
Prof. Dr. K.H. Winterhalter, Korreferent

8. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit Fragen auf dem Gebiet der Stabilität von Proteinkonformationen, insbesondere mit derjenigen der kritischen Kettenlänge eines offenkettigen Polypeptides, welche die Ausbildung einer konformationell stabilen Faltung in Lösung ermöglicht. Diese Studien wurden anhand von Thioredoxin aus *E.coli* und seinen Trypsinfragmenten durchgeführt. Für die Untersuchungen gelangten Absorptions-, Zirkulardichroismus-, Fluoreszenz- und Protonen Kernresonanzspektroskopie zur Anwendung. Diese Methoden, besonders der Zirkulardichroismus, wurden kritisch auf ihre vor allem quantitative Aussagekraft hin überprüft. Es zeigte sich, dass die quantitative Analyse von Zirkulardichroismusspektren im fernen UV-Bereich nur begrenzt möglich ist. Die einzige Sekundärstruktur, die bei Polypeptiden mit unbekannter Konformation zuverlässig abgeschätzt werden kann, ist die α -Helix; bei allen anderen wurden nur ungenügende Resultate erhalten.

Der erste, präparative Teil der Arbeit umfasst, nach weitgehend bekannten Methoden, die Züchtung von *E.coli* Bakterien, die Isolierung und Reinigung des Thioredoxin-Systems aus diesen Mikroorganismen sowie die spezifische proteolytische Spaltung des Thioredoxins durch Trypsin und die Reinigung der Fragmente.

Der zweite Teil befasst sich mit spektroskopischen Untersuchungen des nativen Proteins. Die Studien ergaben im wesentlichen folgende Resultate:

- Die bereits früher beobachtete Stabilität der Konformation von Thioredoxin gegen Änderungen des pH-Wertes und gegen Denaturierungsmittel wurde bestätigt. Die Erwärmung auf 80 °C bewirkt lediglich eine geringe Zunahme der Flexibilität der Konformation, wie aus CD- und $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen ersichtlich ist. Der Oxidationszustand der Disulfidbrücke ist für die Stabilität der Konformation von untergeordneter Bedeutung.
- Der Beitrag der beiden Tyrosinreste zur gesamten Proteinfluoreszenz ist aussergewöhnlich hoch, was einerseits auf die

geringe Quantenausbeute der beiden Tryptophanreste andererseits auf das Fehlen eines effektiven Energietransfers von Tyrosin- zu Tryptophanresten zurückzuführen ist.

- Der Vergleich der verschiedenen Methoden ermöglichte die Unterscheidung zwischen lokalen Effekten, die nur einzelne Aminosäureseitenketten betreffen und solchen, die auch die Peptid-Hauptkette beeinflussen. Die Reduktion der Disulfidbrücke verändert die Konformation um die aktive Stelle nur geringfügig.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Konformation der Trypsinfragmente in Lösung. Die wichtigsten Ergebnisse sind die folgenden:

- Beide Fragmente, T-(1-73) und T-(74-108), besitzen in neutraler, wässriger Lösung eine weitgehend ungeordnete Struktur.
- Beim Uebergang zu saurer Lösung bildet das Fragment T-(1-73) eine globuläre Faltung aus. Die Protonierung von einer oder mehreren Carboxylgruppe(n) ist auf Grund des beobachteten pK-Wertes für diese Konformationsänderung verantwortlich. Die spektroskopischen Untersuchungen deuten auf eine Konformation hin, die derjenigen ähnelt, die das Fragment im nativen Protein besitzt; die experimentellen Daten weisen jedoch auf eine deutlich höhere Flexibilität der Struktur hin. Eine exakte Beschreibung der Konformation des Fragmentes in saurer Lösung ist nur auf Grund von spektroskopischen Daten nicht möglich.

-Für das kurze Fragment T-(74-108) wurden, im Gegensatz dazu, in wässriger Lösung keine Bedingungen gefunden, die zur Ausbildung eines grösseren Anteils an geordneter Sekundärstruktur führen. Die intramolekularen Wechselwirkungen dieser Sequenz reichen somit in wässriger Lösung nicht aus, für die Ausbildung einer nativ-ähnlichen Konformation.

- Für die aussergewöhnlich hohe Stabilität der Konformation des nativen Proteins ist auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit die ganze Polypeptidkette (1-108) notwendig.

ABSTRACT

This dissertation deals with the problem of the stability of protein conformation. In particular we try to determine the minimal length required for an open-chain polypeptide to fold in a native-like, globular conformation. Thioredoxin from *E. coli* and its trypsin fragments are used as an experimental model. UV-absorption, circular dichroism (CD), fluorescence and proton nuclear magnetic resonance are the spectroscopic methods used for this purpose. The reliability using the far-UV region of the CD-spectra to determine the secondary structure of polypeptides is studied. Only for the helix content was there good agreement with X-ray data.

Studies of the conformation show that the small thioredoxin molecule (m.w. 12'000 Dalton) is remarkably stable against denaturation. Another peculiarity of this protein is that its fluorescence emission spectrum is marked by an intense tyrosine contribution, although the protein contains two tryptophan as well as two tyrosine residues. This has been ascribed to the low quantum yield of the two tryptophan residues and the absence of an effective energy transfer from tyrosine to tryptophan residues.

Of the two trypsin fragments, T-(1-73) and T-(74-108), the small carboxy-terminal fragment does not fold into a globular form in aqueous solution. However, in acid solution, the intramolecular interactions of the fragment T-(1-73) are strong enough to stabilize a globular folding of this polypeptide chain. The protonation of one or several carboxyl-groups, according to the observed pK-value, induces this conformational change. CD- and fluorescence-studies indicate that in acid solution the folding is very similar to that of this sequence in the native protein.