



Doctoral Thesis

Chemische und konformationelle Eigenschaften von Thioredoxin-Fragmenten

Author(s):

Boos, Roman

Publication Date:

1988

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000502041> →

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. 8540

Chemische und konformationelle Eigenschaften von Thioredoxin-Fragmenten

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
Roman Boos
dipl. chem. ETH
geboren am 8. November 1954
von Zürich (ZH)

Angenommen auf Antrag von
Prof. P.L. Luisi, Referent
Prof. P. Pino, Korreferent

Zürich 1988
Zentralstelle der Studentenschaft

8. Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Konformationen von Proteinfragmenten.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der bekannte konformationelle Übergang von Fragment Thioredoxin (1-73), welcher bei Übergang von pH 7 auf pH 3 stattfindet, untersucht.

Das Fragment Thioredoxin (1-73) wurde nach einer bewährten Methode hergestellt. Anschliessend wurden die Carboxylgruppen von Thioredoxin (1-73) mit N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminoprpyl)-carbodiimid/Methylamin- hydrochlorid amidiert. Es konnten Reaktionsbedingungen gefunden werden, welche das Ausfallen des Fragmentes Thioredoxin (1-73) während der Reaktion vermeiden.

Eine quantitative Analyse der Anzahl Mol amidierter Carboxylgruppen unter Verwendung von ^{14}C -Methylamin-hydrochlorid wurde ausgearbeitet. Pro Mol Fragment Thioredoxin (1-73) wurden 9 Mol Carboxylgruppen amidiert nach einer Stunde Reaktionszeit.

Die Zirkulardichroismus Eigenschaften von amidiertem Thioredoxin (1-73) wurde im fernen UV Bereich (200 - 250 nm) untersucht. Die CD Spektren von amidiertem Fragment Thioredoxin (1-73) bei pH 7 zeigen, dass die Intensität der Elliptizität bei 220 nm zwischen der Elliptizität vom Fragment Thioredoxin (1-73) bei pH 7 und vom Fragment Thioredoxin (1-73) bei pH 2.5 liegt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die durch Carboxypeptidase Y Spaltung erhaltenen Fragmente von Thioredoxin hergestellt. Es wurden zwei Fraktionen erhalten, welche als erste Fraktion (TRX CPY 1) und zweite Fraktion (TRX CPY 2) bezeichnet werden [78].

Es wurde mit Gelfiltration die Homogenität der Fraktionen und der Molmassenbereich bestimmt. TRX CPY 1 verhält sich bei nativen Bedingungen nicht homogen und besteht aus mehreren Spezies mit Molmassen im Bereich von 10000 bis 30000 Dalton.

TRX CPY 1 und TRX CPY 2 wurde mit Sedimentation untersucht. TRX CPY 1 zeigt sich bei nativen Bedingungen als inhomogene Probe aus mindestens drei Spezies bestehen mit den Gewichtsmittelwerten

TRX CPY 1 und TRX CPY 2 wurde mit Sedimentation untersucht. TRX CPY 1 zeigt sich bei nativen Bedingungen als inhomogene Probe aus mindestens drei Spezies bestehen mit den Gewichtsmittelwerten von 14600, 19800 und 29800 Dalton. TRX CPY 2 zeigt sich bei nativen Bedingungen als eine homogene Probe mit einem Gewichtsmittelwert von 10700 Dalton. Bei denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (6 M Guanidinium - hydrochlorid / 1 mM reduziertes Glutathion) verhält sich TRX CPY 1 wie eine homogene Probe mit einem Gewichtsmittelwert von 10000 Dalton. TRX CPY 2 weist bei denaturierenden Bedingungen ein Gewichtsmittelwert von 10400 Dalton auf.

Mit Zirkulardichroismus wurde die Stabilität als Funktion der Temperatur, Guanidinium - hydrochlorid - Konzentration und Acetonitril-Konzentration bestimmt. TRX CPY 1 besitzt eine Konformation, deren CD Eigenschaften sich reversibel durch Temperatur, Guanidinium - hydrochlorid und Acetonitril denaturieren lässt.

Die thermische Denaturierung der Konformation von TRX CPY 2 wurde mit CD verfolgt. Die Denaturierung ist reversibel und zeigt oberhalb 80°C ein neues Minimum der Elliptizität bei 205 nm. Im Thioredoxin Reduktase / NADPH System zeigt TRX CPY 1 eine zehnmal grössere Fähigkeit Disulfidbindungen zu reduzieren als TRX CPY 2.

Abschliessend kann man festhalten, dass die Amidierung der Carboxylgruppen von Thioredoxin (1 - 73) wenigstens einen teilweisen Einfluss auf den konformationellen Übergang hat. Die Untersuchungen der durch Spaltung mit Carboxypeptidase Y erhaltenen Fragmente von Thioredoxin ergeben, dass TRX CPY 1 heterogen ist und ein effizienterer Reduktor von Disulfidbindungen im Thioredoxin Reduktase / NADPH System ist als TRX CPY 2, welches homogen und ein ähnliches Gewichtsmittel wie Thioredoxin aufweist.

9. Abstract

This work is concerned with the conformational investigation of protein fragments.

In the first part the known conformational transition of fragment Thioredoxin (1-73) by acidification from pH 7 to pH 3 is investigated. The central question was whether this conformational transition is influenced by the charges of the carboxyl groups of Thioredoxin.

Fragment Thioredoxin (1-73) was produced according to a established method [92]. Amidation of the carboxyl groups of Thioredoxin (1-73) was achieved by methylammoniumchloride in the presence of ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid. Reaction conditions could be found where precipitation of the protein was minimized.

A quantitative analysis of the number of moles of amidated carboxyl groups was developed with the use of ^{14}C -labelled methylammoniumchloride. 9 moles of carboxyl groups per mole of Thioredoxin (1-73) were found to have reacted.

The dichroic properties in the far UV region (200 - 250 nm) of amidated Thioredoxin (1-73) were investigated. The ellipticity at 220 nm of amidated Thioredoxin (1-73) is more negative than of Thioredoxin (1-73) at pH 7 and less negative than of Thioredoxin (1-73) at pH 3.

The second part deals with the fragments obtained by Carboxypeptidase Y cleavage of Thioredoxin. Two fractions which will be called TRX CPY 1 and TRX CPY 2 can be isolated [78].

Investigation by gel filtration under native conditions showed that TRX CPY 1 represents an inhomogenous species with a molecular weight range of 10000 to 30000 dalton.

Sedimentation studies of TRX CPY 1 are in agreement with the results of the gel filtration studies. Under native conditions at least three species with a weight average of 14600, 19800 and 29800 dalton could be detected. Under denaturing and reducing conditions we find one homogenous species with a weight average of 10000 dalton.

Sedimentation studies of TRX CPY 2 show as well as under native conditions one species with a weight average of 10700 dalton as well as under denaturing conditions one species with a weight average of 10400 dalton.

The dichroic properties of TRX CPY 1 were investigated as a function of increasing temperature, increasing concentration of guanidinium - hydrochlorid and increasing acetonitril concentration. TRX CPY 1 shows under these conditions that all transitions are reversible and the conformation is less stable than that of Thioredoxin.

TRX CPY 2 was thermally denatured by observing the ellipticity. The denaturation is reversible and shows above 80⁰C a new minimum at 205 nm.

Analysis by the Thioredoxin Reductase / NADPH system shows that TRX CPY 2 is ten times less efficient in reducing disulfid bonds than TRX CPY 1 based on the initial rate.

We conclude that amidation of carboxyl groups of Thioredoxin (1-73) has at least a partial influence on the conformational transition. The studies of the fragments obtained by Carboxypeptidase Y cleavage of Thioredoxin show that TRX CPY 1 is heterogeneous with a rate of disulfide bond reduction in the Thioredoxin Reductase / NADPH system than TRX CPY 2 and has a less stable conformation referring to the mentioned denaturants than Thioredoxin. TRX CPY 2 is homogenous with a similar weight average as uncleaved Thioredoxin and with a less stable conformation than Thioredoxin referring to thermal denaturation.