



Doctoral Thesis

## Evolutionary guidance as a tool in organic chemistry

**Author(s):**

Allemann, Rudolf Konrad

**Publication Date:**

1989

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000510383> →

**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](#).

Stm Benner

Diss. ETH No. 8804

# Evolutionary Guidance as a Tool in Organic Chemistry

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
Rudolf Konrad Allemann  
Dipl. Chem. ETH  
born April 29, 1960  
citizen of Welschenrohr (SO)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Steven A. Benner, examiner  
Prof. Dr. Albert Eschenmoser, co-examiner

ADAG Administration & Druck AG  
Zurich 1989

## 8: Summary

*Drosophila melanogaster* is known to contain an alcohol dehydrogenase with a stereochemistry opposite that of the alcohol dehydrogenases from yeast and from mammals. A 'stereochemical profile' was constructed for dehydrogenases from *Drosophila*. Three of the enzymes examined (malate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, and malic enzyme) catalyze the transfer of the pro-R hydrogen from NAD(P)H. Three other enzymes (glucose-6-phosphate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, and glycerol-3-phosphate dehydrogenase) catalyze the transfer of the pro-S hydrogen from NAD(P)H. These results, together with published data, can easily be explained by a functional model that correlates stereoselectivity with the redox potential of the substrate that the enzyme has evolved to reduce. It is concluded that evolution is capable of engineering even subtle details of the behavior of enzymes.

Based on known details of the decarboxylation of beta-ketoacids by natural decarboxylases a 14 residue polypeptide was designed. The peptide (ART-OAD) was synthesized on a solid support and its structure in aqueous solution proven to be an amphiphilic alpha-helix by a combination of CD- and 2D-NMR-spectroscopy. Only hydrophilic residues (lysines) protrude on one side of the alpha-helix, while only hydrophobic residues (leucines and alanines) protrude on the other side. The helical structure can be stabilized by the addition of trifluoroethanol as a cosolvent. This synthetic polypeptide is an efficient catalyst for the decarboxylation of oxaloacetate at neutral pH as a consequence of an unusually low  $pK_a$  of 7.25 for one of the lysine residues, which can be explained by the proximity of positive charges in the helical conformer of ART-OAD. The unprotonated form of the amino group is necessary for the formation of the Schiff's base as the first step in the catalyzed decarboxylation. The catalytic efficiency of ART-OAD is increased by the addition of 5% trifluoroethanol. This is evidence that catalysis is indeed the result of the alpha-helical conformation of the peptide. The decarboxylation of oxaloacetate by ART-OAD follows Michaelis-Menten kinetics, and a  $k_{cat}$  of  $0.39 \text{ min}^{-1}$  and a  $K_M$  of 8.8 mM were determined.

The primary sequences of two pancreatic polypeptides and the crystal structure of one of them are known. Based on these data the primary sequence of the peptide was altered in such a way as to maximize the number of mutations without changing its tertiary structure. The altered peptide (31 amino acids) was synthesized using solid phase methodology and characterized. CD data were in agreement with the proposed tertiary structure in which a collagen like helix,

where every third residue is a proline, is packed onto an alpha helix. The peptide forms a non-covalent dimer in aqueous solution at physiological pH as determined by gel filtration. Preliminary NMR data suggest that the dimer is symmetrical.

Four hybrids between bovine pancreatic RNase A, a digestive enzyme that hydrolyzes single stranded RNA including dinucleotides such as UpA, and human angiogenin, a homologue of RNase A that induces the growth of blood vessels and effectively hydrolyzes ribosomal RNA but not small RNA substrates such as UpA, were prepared by inserting short segments of human angiogenin into bovine pancreatic RNase A using molecular biological techniques. The proteins were expressed in *E. coli*, purified, and characterized. The mutant in which residues 49 to 53 had been replaced could not be reconstituted probably due to folding problems. Replacement of the amino acids 15 through 24 and 112 through 116 led to two mutants that had properties comparable to RNase A both with respect to the hydrolysis of UpA and the capability to inhibit *in vitro* translation. However, replacement of residues 63 to 74 leads to a mutant protein with markedly different properties. The specific activity for the hydrolysis of UpA is decreased by nearly two orders of magnitude as compared to RNase A, while its activity as an inhibitor of *in vitro* translation was increased by 11%. This demonstrates that the catalytic activity against small RNA substrates characteristic of digestive RNases can be structurally separated from the increased catalytic activity against ribosomal RNA characteristic of angiogenin.

The work presented in this thesis shows that studying the evolutionary processes that have engineered proteins for billions of years is a powerful strategy for the development of hypotheses that relate structure and function of proteins.

## 9: Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass die Alkohol-Dehydrogenase aus *Drosophila melanogaster* eine andere Stereochemie aufweist als die Alkohol-Dehydrogenasen der Hefe und der Säugetiere. Ein 'stereochemisches Profil' der Dehydrogenasen aus *Drosophila* wurde bestimmt. Drei der untersuchten Enzyme (Malat-Dehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase und Malic Enzym) katalysieren den Transfer des pro-R Wasserstoffes von NAD(P)H auf ihr jeweiliges Substrat, während die Enzyme Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, Alkohol-Dehydrogenase und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase die Uebertragung des pro-S Wasserstoffes von NAD(P)H katalysieren. Ein funktionelles Modell, in welchem die Stereospezifität des Wasserstofftransfers mit dem Redoxpotential des natürlichen Substrates des Enzymes korreliert wird, kann sowohl diese Resultate als auch andere Daten aus der Literatur in einfacher Weise erklären. Es zeigt sich, dass die Evolution sogar feinste Details im Verhalten der Enzyme optimiert hat.

Ausgehend von den bekannten Details der durch natürliche Enzyme katalysierten Decarboxylierung von beta-Ketosäuren wurde ein 14 Aminosäuren langes Polypeptide entworfen und an einem Festkörper synthetisiert. CD- und NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass dieses Peptide (ART-OAD) in wässriger Lösung eine amphiphile Helix bildet, in welcher die eine Seite nur hydrophile (Lysine) und die andere Seite nur hydrophobe (Alanine und Leucine) Aminosäuren enthält. Die helikale Struktur kann durch Zugabe von Trifluoethanol stabilisiert werden. Als Folge eines pK<sub>S</sub>-Wertes von 7.25 für die Aminogruppe eines der Lysine ist ART-OAD ein effizienter Katalysator der Decarboxylierung von Oxalessigsäure bei neutralem pH-Wert. Dieser extrem tiefe pK<sub>S</sub>-Wert ist durch die gegenseitige Beeinflussung der positiv geladenen Aminogruppen der Lysinreste erklärbar, welche sich in der helikalen Konformation des Peptides nahe beieinander befinden. Die unprotonierte Form der Aminogruppe ist die reaktive Spezies in der für die Katalyse der Decarboxylierung notwendigen Bildung einer Schiffischen Base. Dass die Zugabe von 5% Trifluoethanol den katalytischen Effekt von ART-OAD vergrößert, ist in Einklang damit, dass die Katalyse wirklich eine Folge der helikalen Konformation des Peptides ist. Die Decarboxylierung von Oxalessigsäure durch ART-OAD folgt einer Michaelis-Menten Kinetik. Die gemessenen Werte für  $k_{cat}$  und  $K_M$  betragen  $0.38 \text{ min}^{-1}$  und  $8.8 \text{ mM}$ .

Ausgehend von den Primärstrukturen von zwei pankreatischen Polypeptiden und von der Kristallstruktur eines der beiden wurden ihre Aminosäuresequenzen derart verändert, dass die Anzahl der Mutationen maximal war bei gleichzeitiger Erhaltung der Tertiärstruktur. Das so entworfene 31 Aminosäuren lange Peptide wurde synthetisiert und charakterisiert. Die CD-Daten sind mit der vorgeschlagenen Struktur in Einklang, in welcher eine alpha-Helix und eine dazu antiparallele Helix, die eine Sekundärstruktur wie Kollagen aufweist, in welcher jede dritte Aminosäure ein Prolin ist, in engem Kontakt zueinander stehen. Das Peptide bildet Dimere in wässriger Lösung (pH=7) wie durch Gel-Filtration gezeigt werden konnte. Auf Grund von NMR-Messungen scheint die Struktur des Dimeren symmetrisch zu sein.

Es wurden vier Hybride zwischen RNase A aus der Pankreas des Rindes - ein Enzym des Verdauungstraktes, welches bevorzugt einzelsträngige RNS, wie zum Beispiel UpA, hydrolysiert - und menschlichem Angiogenin - ein zu RNase A homologes Protein, welches das Wachstum von Blutgefäßen induziert, und welches ein effizienter Katalysator der Hydrolyse von ribosomaler RNS, nicht jedoch von kleinen RNS-molekülen wie UpA ist, hergestellt. Dazu wurden kurze Stücke eines Genes für RNase A durch die entsprechenden Segmente aus Angiogenin ersetzt. Die Proteine wurden in *E. Coli* exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Der Mutant, in welchem die Aminosäuren 49 bis 53 ersetzt wurden, konnte Faltungsproblemen wegen nicht rekonstituiert werden. Der Ersatz der Aminosäuren 15 bis 24 und 112 bis 116 führte zu Hybriden, welche ähnliche Eigenschaften aufweisen wie RNase A. Ihre Aktivität als Katalysatoren der Hydrolyse von UpA und als Inhibitoren der *in vitro* Translation - Angiogenin ist ein effizienterer Inhibitor der *in vitro* Translation als RNase A - war der Aktivität von RNase A vergleichbar. Wurden jedoch die Aminosäuren 63-74 in RNase A durch die entsprechenden Aminosäuren aus Angiogenin ersetzt, resultierte ein Hybrid, welches für die Hydrolyse von UpA nur 1.6% der Aktivität von RNase A aufweist. Diese Hybrid ist jedoch ein um 11% bessere Inhibitor der *in vitro* Translation als RNase A. Es ist demzufolge möglich, die für RNase A charakteristische katalytische Aktivität gegenüber kleinen RNS Substraten strukturell von der erhöhten katalytischen Aktivität gegenüber ribosomaler RNS, welche typisch für Angiogenin ist, zu trennen.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass das Studium der evolutionären Prozesse, welche die Struktur der Proteine während Milliarden von Jahren verändert und dabei ihre Eigenschaften optimiert haben, eine erfolgversprechende Strategie zur Formulierung von Hypothesen ist, welche eine Verbindung zwischen der Struktur und der Funktion von Proteinen herstellen.