

Charakterisierung der strukturellen Eigenschaften von Hirudin mit NMR in Lösung sowie Entwicklung und Anwendung neuer NMR-Methoden zur Untersuchung von Proteinen in Lösung

Doctoral Thesis

Author(s):

Szyperski, Thomas

Publication date:

1992

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000692028>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

**Charakterisierung der strukturellen Eigenschaften von Hirudin mit NMR in Lösung
sowie Entwicklung und Anwendung neuer NMR-Methoden zur Untersuchung von
Proteinen in Lösung**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

vorgelegt von

Thomas Szyperski

Dipl.-Chem. Univ., TU München

geboren am 13. 12. 1963

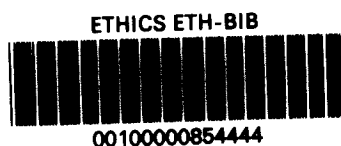
deutscher Staatsangehöriger

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. K. Wüthrich, Referent

Prof. Dr. G. Wagner, Koreferent

1992



CatE

I. Abstract

This dissertation describes the structural characterization of hirudin, a novel approach to investigate the backbone dynamics of proteins, and the development of new NMR methods to study proteins in solution. The three-dimensional structure of the N-terminal 51-residue domain of recombinant hirudin was determined by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (Chapter III.1). The residues 3-30 and 37-48 form a well defined molecular core with two antiparallel β -sheets comprising residues 14-16 and 20-22, and 27-31 and 36-40, respectively, and three reverse turns at residues 8-11 (type II), 17-20 (type II') and 23-26 (type II). Increased structural disorder was found for the N-terminal dipeptide segment, the loop 31-36, and the C-terminal tripeptide segment. The resulting high-quality solution structure was compared to the corresponding structures obtained from studies with the intact, 65-residue polypeptide chain of hirudin. The solution structure of hirudin(1-51) shows the same molecular architecture as the corresponding polypeptide segment in natural hirudin and in recombinant hirudin. In addition, it was possible to compare it with the N-terminal 51-residue segment of hirudin in an X-ray crystal structure of the hirudin-thrombin complex. Both structures turned out to be closely similar, with the exception of the N-terminal tripeptide segment and residues 17-21, where significant local structural differences were observed. Most of these structural differences could be directly related to thrombin-hirudin contacts. Investigation of the protein surface of recombinant hirudin (Chapter III.2) with *pH*-titration experiments enabled both, the identification of four hydrogen bonds between sidechain carboxylates and amide protons and the characterization of the electrostatic interaction of histidine 51 with two aspartates.

In order to establish a novel approach to determine the correlation times of internal

segmental motions of the protein backbone, the ^{15}N -relaxation times in the rotating frame as a function of the spin-lock power were measured for the ^{15}N nuclei in the backbone amide groups of the basic pancreatic trypsin inhibitor (Chapter IV). As an application, the motional modes present near the active site were investigated.

A new method for the determination of scalar coupling constants for spins with a single coupling partner, in particular $^3J_{HN\alpha}$ in polypeptides has been developed (Chapter V.1). The scalar coupling constants are extracted from in-phase multiplets of homonuclear $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY spectra or heteronuclear $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -COSY spectra through inverse Fourier-transformation of the data points representing a cross peak along ω_2 , and a subsequent nonlinear least-squares fit in the time domain. The method has been applied for hirudin(1-51) and the basic pancreatic trypsin inhibitor.

The recently developed technique of biosynthetically-directed fractional ^{13}C -labeling has been extended to support the ^1H spin system identification in such labeled proteins (Chapter V.2). Studies of the hydrolysates of proteins that were fractionally ^{13}C -labeled in *E.coli* showed that the 59 aliphatic carbon positions in the 20 proteinogenic amino acids exhibit 16 different types of ^{13}C - ^{13}C coupling fine structures. These provide support for the assignment of the resonances of all methyl groups in a protein, which are otherwise often poorly resolved in homonuclear ^1H NMR spectra. The identification of most of the other spin systems can be supported on the basis of coupling patterns that are common to small groups of amino acid residues. Furthermore, a quantitative analysis showed that the ^{13}C - ^{13}C coupling fine structures can be traced back to known biosynthetic pathways.

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschreibt die strukturelle Charakterisierung von Hirudin, die Entwicklung einer neuen Methode zur Untersuchung der Dynamik des Proteinrückgrats, sowie die Entwicklung neuer NMR-Methoden zur Untersuchung von Proteinen in Lösung. Die dreidimensionale Struktur der N-terminalen Domäne von Hirudin, die 51 Aminosäurereste enthält, wurde mit Hilfe der ^1H NMR-Spektroskopie in Lösung ermittelt (Kapitel III.1). Die Aminosäurereste 3-30 und 37-48 bilden einen gut definierten molekularen Kern mit zwei antiparallelen β -Faltblättern, die aus den Aminosäureresten 14-16 und 20-22, bzw. 27-31 und 36-40 bestehen, sowie drei Schlaufen, die die Aminosäurereste 8-11 (Typ II), 17-20 (Typ II') und 23-26 (Typ II) enthalten. Nur geringe strukturelle Ordnung wurde dagegen für das N-terminale Dipeptidsegment, die Schlaufe der Aminosäurereste 31-36 und das C-terminale Tripeptidsegment beobachtet. Die erhaltene, qualitativ hochwertige NMR-Struktur wurde mit den NMR-Strukturen verglichen, die für das intakte Hirudin, bestehend aus 65 Aminosäureresten, vorlagen. Hirudin(1-51) besitzt die gleiche molekulare Architektur wie das entsprechende Polypeptidsegment im natürlichen und im rekombinanten Hirudin. Der Vergleich mit dem N-terminalen Polypeptidsegment(1-51) in einer Röntgenstruktur des Hirudin-Thrombin-Komplexes zeigte, daß die konformativen Änderungen von Hirudin bei Bindung an Thrombin gering sind. Nur für das N-terminale Tripeptidsegment und die Aminosäurereste 17-21 wurden signifikante Unterschiede beobachtet. Die meisten dieser strukturellen Unterschiede konnten unmittelbar auf Hirudin-Thrombin-Kontakte zurückgeführt werden. Die Untersuchung der Proteinoberfläche des rekombinanten Hirudins erfolgte mit Hilfe von *pH*-Titrationsexperimenten (Kapitel III.2), die zum einen die Identifikation von vier Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Seitenketten-Carboxylaten und Rückgrat-Amidprotonen erlaubten und zum anderen die Charakterisierung der elektrostatischen

Wechselwirkungen von Histidin 51 mit zwei Aspartaten ermöglichte.

Um eine neue Methode zur Bestimmung der Korrelationszeiten interner Bewegungen des Protein-Rückgrats zu etablieren, wurden die ^{15}N -Relaxationszeiten im rotierenden Koordinatensystem für die ^{15}N -Kerne der Amidgruppen des Protein-Rückgrats in Abhängigkeit von der Spin-lock-Amplitude gemessen (Kapitel IV). Beispielhaft wurden interne Bewegungen in der Nähe des aktiven Zentrums des basischen pankreatischen Trypsin-Inhibitors untersucht.

Des Weiteren wurde eine neue Methode zur Bestimmung von skalaren Kopplungskonstanten für Spins mit nur einem Kopplungspartner, insbesondere also $^3J_{\text{HN}\alpha}$ -Kopplungskonstanten in Polypeptiden, entwickelt (Kapitel V.1). Die skalaren Kopplungskonstanten werden aus In-Phase-Multipletts, wie sie in homonuklearen [^1H , ^1H]-NOESY-Spektren oder heteronuklearen [^{15}N , ^1H]-COSY-Spektren auftreten, durch inverse Fourier-Transformation der Datenpunkte, die einen Kreuzpeak entlang ω_2 repräsentieren und einen anschließenden nicht-linearen Fit in der Zeitdomäne erhalten. Eine Anwendung erfolgte für Hirudin(1-51) und den basischen pankreatischen Trypsin-Inhibitor.

Schließlich wurde die kürzlich entwickelte Methode der biosynthetisch gesteuerten, partiellen ^{13}C -Markierung auf die Unterstützung der Identifikation der ^1H -Spinsystem in derart markierten Proteinen erweitert (Kapitel V.2). Die Untersuchung der Hydrolysate von Proteinen, die in *E. coli* biosynthetisch gesteuert, partiell ^{13}C -markiert wurden, zeigte, daß die 59 aliphatischen Kohlenstoffpositionen der 20 proteinogenen Aminosäuren 16 verschiedene Typen von ^{13}C - ^{13}C Kopplungsfeinstrukturen aufweisen. Diese lassen sich zur Unterstützung der Resonanzzuordnung aller Methylgruppen, die im allgemeinen in homonuklearen ^1H NMR-Spektren schlecht aufgelöst sind, heranziehen. Zur Unterstützung der Identifikation der meisten anderen Spinsysteme kann die Tatsache genutzt werden, daß bestimmte Feinstrukturen typisch für kleine Gruppen von Aminosäuren sind. Eine quantitative Analyse der ^{13}C - ^{13}C Feinstrukturen zeigte dann, daß diese sich vollständig im Rahmen bekannter Biosynthesewege erklären lassen.