

Diss. ETH , Ex. B

Diss. ETH No.: 10006

**NMR Solution Structure of the
Proteinase Inhibitor Eglin c.
Development of Methods and Ensemble Statistics**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

SVEN Gunnar HYBERTS

M.S. in Physics, Lund Institute of Technology

born October 14, 1959
citizen of Sweden



CatE

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Kurt Wüthrich, examiner
Prof. Dr. Gerhard Wagner, co-examiner

1992

0. Abstracts in English and in German

Abstract

This thesis describes the solution structure determination of the proteinase inhibitor eglin c. The resulting structure contains a four-stranded β -sheet flanked with an α -helix on one and the active site loop on the other side. The first seven residues were found to be mobile. This is based on the fact that none but intraresidue and sequential NOE's were found, and the ^{15}N relaxation parameters were entirely different from those of the core of the protein. The β -sheet consists of two contiguous parallel β -strands and two discontinuous antiparallel β -strands, interrupted by a β -bulge on one strand and by a 3_{10} -helix on the other. The conformation of the binding loop is under-determined by NMR-data, but is locally well defined.

The resonance assignments were based on standard 2D NMR techniques. The program package DG-II was used to create a large ensemble of structures, all of which satisfied to a high degree the large number of distance constraints derived from NOESY spectra as well as dihedral angle constraints. To obtain precise structures, NOE cross peaks were quantified. An investigation of the effects of spin-diffusion is made, and a practical method of handling NOESY data-set to extract the NOE build-up rates, is presented. Two different approaches of stereo specific assignments have been applied, and the results from these two approaches are discussed.

To estimate the precision of the resulting structures, two methods complementary to existing evaluations have been developed. The precision of the local structure is evaluated by an angular order-parameter S . The order-parameter for a specific dihedral angle is compatible to a standard deviation evaluation of the same specific dihedral angle. The order-parameter has the advantage, however that it is easier to compute. The precision of the global structure is normally evaluated with an average root mean square distance ($\langle\text{rmsd}\rangle$) of the whole molecule, parts of it, or individual atoms. In crystal structures, on the other hand, the uncertainties and mobilities appear in a B-factor. To compare uncertainties and mobility in NMR and X-ray structures, a method was

developed that produces B-factors for NMR structures. From the ensemble of NMR structures, an average electron density as well as structure factors, F_{hkl} , were calculated. Using regular X-ray crystallographic refinement software, a single "best" structure was fitted to these structure factors, and an overall R-value and atomic B-factors were obtained. The R-value for the eglin structures (17%) is comparable to good crystal structures. The B-factors for the protein core are significantly smaller than for crystal structures. Surface residues and external side chains have similar or higher B-factors than the crystal structure of eglin c. The lower B-factors of the core appear to be due to the fact that X-ray B-factors contain also the overall mobility and disorder of the whole molecules relative to each other in the crystal. The developed technique represents a new way of comparing the quality of NMR and X-ray structures. It is hence shown that the precision of the solution structure presented in this thesis is comparable to that of the X-ray structure.

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschreibt die Ermittlung der Lösungsstruktur des Proteinase Inhibitors Eglin c. Das Protein enthält ein viersträngiges β -Faltblatt mit einer α -Helix auf der einen, und dem Proteinase-Bindungsstrang auf der anderen Seite. Die ersten sieben Aminosäurenreste sind im wesentlichen frei beweglich. Das ergibt sich aus der Tatsache, dass nur intraresidue und sequentielle NOEs für diese Aminosäuren beobachtet wurden. Ausserdem sind die Relaxationsparameter wesentlich verschieden von denen des Proteininneren. Das β -Faltblatt besteht aus zwei kontinuierlichen parallelen Strängen und zwei diskontinuierlichen antiparallelen Strängen. Die letzteren sind unterbrochen, auf der einen Seite durch einen β -Bulge, auf der anderen durch eine 3_{10} -Helix. Der Proteinase-Bindungsstrang ist beweglich relativ zum Rest des Proteins, hat aber eine intern wohl definierte Konformation.

Die Resonanzzuordnungen folgten etablierten 2D NMR Methoden. Das Programm Paket DG-II wurde benützt, um ein grosses Ensemble von Strukturen zu produzieren. Alle der ermittelten Strukturen befriedigen die grosse Zahl von experimentellen Distanz- und Torsions-Winkel Bereichen in hohem Masse. Um möglichst gute Strukturen zu erhalten, wurden die NOE Kreuz-Signale quantifiziert. Der Effekt der Spin Diffusion wurde analysiert, und eine praktische Methode wurde entwickelt um Aufbauraten von einer Serie von NOESY Spektren zu ermitteln. Zwei verschiedene Methoden für stereospezifische Zuordnungen von Seitenkettenresonanzen wurden angewendet und sind diskutiert.

Zwei verschiedene Methoden wurden entwickelt um die Präzision der ermittelten Strukturen zu charakterisieren. Die Präzision der lokalen Strukturen ist über einen "Winkel-Ordnungsparameter" S analysiert. Dieser ist vergleichbar mit der Standard Abweichung, ist jedoch wesentlich einfacher zu berechnen. Die Präzision der globalen Konformation wird üblicherweise durch eine gemittelte "root mean square distance" ($\langle rmsd \rangle$) beschrieben. Dieser Wert wird oft für das Gesamtmolekül, Teile davon oder für Einzelatome angegeben. In Kristallstrukturen erscheinen die Fehler in den Atompositionen, sowie interne Beweglichkeiten in sogenannten B-Faktoren. Um Unsicherheiten und interne Beweglichkeit in NMR und Kristallstrukturen vergleichen zu können, wurde eine Methode entwickelt, mit der B-Faktoren von Scharen von NMR Strukturen berechnet werden können. Von der Schar von NMR Strukturen wurde eine mittlere

Elektronendichte sowie Strukturformeln F_{hkl} berechnet. Daraufhin wurden übliche kristallographische Verfeinerungsmethoden angewandt und eine, im kristallographischen Sinne, "beste" Struktur ermittelt. Aus diesem Verfeinerungsverfahren ergaben sich ein R-Faktor und atomare B-faktoren. Der R-Faktor für die Eglin Strukturen (17%) ist vergleichbar zu guten Kristallstrukturen. Die B-Faktoren für das Proteininnere sind wesentlich kleiner als für Kristallstrukturen. Aminosäurereste an der Proteinoberfläche, sowie externe Seitenketten zeigen gleich grosse oder höhere B-Faktoren als die Kristallstruktur von Eglin c. Dies wird darauf zurückgeführt, dass B-Faktoren von Kristallstrukturen zusätzlich die gesamthafte Bewegung der Proteinmoleküle im Kristall beinhalten. Dies ist eine neue Methode um die Qualität von NMR und Kristall-Strukturen zu vergleichen. Es zeigt sich, dass die Präzision der NMR Struktur von Eglin c, sowie der Kristallstruktur vergleichbar sind.