



Doctoral Thesis

"Maximum Parsimony" ein neuer Ansatz zum besseren Verständnis von Protein/ Nukleinsäure-Wechselwirkungen

Author(s):

Opitz, Jochen Georg

Publication Date:

1995

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001425624> →

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. 10952

**„Maximum Parsimony“:
Ein neuer Ansatz zum besseren Verständnis von
Protein / Nukleinsäure-Wechselwirkungen**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

Jochen Georg Opitz

Dipl.-Chem. Universität München
geboren am 28. April 1962
in Bad Honnef (Deutschland)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. S. A. Benner, Referent
Prof. Dr. P. L. Luisi, Korreferent

Zürich 1995

V. Zusammenfassung

„Bovine Seminal“-RNase, ein aus der Samenflüssigkeit von Stieren isoliertes Protein, stellt einen außergewöhnlichen Vertreter der Ribonuklease-Familie dar. Diese Nuklease besitzt neben der zu erwartenden katalytischen Aktivität gegenüber einzelsträngigen RNA-Substraten eine Anzahl ungewöhnlicher Eigenschaften, u.a.:

- eine 10 bis 30-fach erhöhte katalytische Aktivität gegenüber Duplex-RNA unter physiologischen Bedingungen (150 mM Salzkonzentration bei einem pH-Wert von 7)
- thermische Destabilisierung von Duplex-DNA unter Bedingungen, bei denen RNase A wenig aktiv ist
- Inhibition der Proliferation von B- und T-Lymphozyten
- Cytotoxizität gegenüber Tumorzelllinien
- Bindung anionischer Glykolipide.

Diese Eigenschaften müssen in einigen oder allen der 23 Unterschiede der Primärstrukturen zwischen dem pankreatischen und dem in der Samenflüssigkeit vorkommenden Enzym begründet liegen.

Die „Maximum Parsimony“ Theorie stellt eine Möglichkeit dar, die Primärstrukturen von Proteinen bereits ausgestorbener Organismen aus denen ihrer Nachkommen zu rekonstruieren. Aufgrund der Verfügbarkeit einer großen Anzahl von Proteinsequenzen eignet sich die Familie der pankreatischen RNasen gut für die Anwendung dieser Methode.

In dieser Dissertation wurde mit Hilfe dreier Vorgehensweisen die RNase A Mutante K31C S32C D38G E111G (Turbo) konstruiert, die einige der interessantesten Eigenschaften der „Bovine Seminal“-RNase aufweist. In einem ersten Schritt wurden anhand der „Maximum Parsimony“ Theorie die gemeinsamen Vorfahren der Ribonukleasen von Pecora und „Bovine Seminal“ (Mutante h), Pecora (Mutante g), Hirsche (Mutante e), Hirsche, Gabelantilope und Giraffe (Mutante f), sowie die gemeinsamen Vorfahren von Büffel, Elenantilope, Nilgauantilope und Gazellen (Mutante c) hergestellt. Anschließend wurden die RNase-Gene dieser Vorfahren aus einem künstlichen Gen für RNase A mit Hilfe von ortsspezifischer Mutagenese konstruiert, die Proteine anschließend im *E. coli*-Stamm lon^r exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Durch einen

Vergleich der Primärstrukturen und der katalytischen Eigenschaften dieser Mutanten konnte Gly-38 als hinreichend (RNase A D38G: ds-Aktivität 5) und notwendig (h_1 G38D: ds-Aktivität 1) für die fünffach erhöhte katalytische Aktivität des gemeinsamen Vorfahren von Pecora- und „Bovine Seminal“-RNase (Mutante *h*, ds-Aktivität 5) gegenüber Duplex-RNA identifiziert werden. Durch einen Sequenzvergleich aller in der Literatur getesteten Ribonukleasen konnte gezeigt werden, daß Gly-38 allgemein hinreichend für eine Erhöhung der Doppelstrangaktivität ist.

In einem zweiten Schritt wurde ein systematischer Vergleich von Aminosäuresequenz und Doppelstrangaktivität durchgeführt für alle Hybridmutanten von RNase A und BS-RNase, die in der Arbeitsgruppe von S. A. Benner hergestellt worden waren. Durch diese Analyse wurde die Hypothese entwickelt, daß zusätzlich zu dem durch einen „Parsimony“-Ansatz identifizierten Aminosäurerest Gly-38 drei weitere Reste für die erhöhte Doppelstrangaktivität der BS-RNase einen Beitrag leisten: Cys-31, Cys-32 und Gly-111. In einem letzten Schritt wurden diese vier Aminosäuren kombiniert in RNase A eingeführt. Diese Vorgehensweise führte zu einem Protein mit einer 28-fach erhöhten Doppelstrangaktivität. Eine Kombination aller Unterschiede in den Primärstrukturen zwischen RNase A und BS-RNase hingegen hätte die Konstruktion von 7.408.077 Hybriden erfordert. Eine konsequente Anwendung des in der Literatur allgemein akzeptierten Modells von Libonati und Sorrentino hätte nie zu dem richtigen Ergebnis geführt. Die Autoren schlossen aus Untersuchungen von Ribonukleasen unterschiedlicher Spezies, daß die katalytische Aktivität gegenüber Duplex-RNA und -DNA von der Anzahl basischer Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche sowie vom Glykosylierungsgrad des Enzyms abhängt. Die Einführung basischer Aminosäurereste zeigte jedoch keinerlei Einfluß. Die Mutante K31C S32C D38G E111G besitzt sogar eine geringere Anzahl basischer Aminosäurereste als RNase A.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die Mutante K31C S32C D38G E111G in der Lage ist, doppelhelicale DNA im gleichen Maße zu destabilisieren (Helix-Destabilisierungsaktivität) wie „Bovine Seminal“-RNase. Es erscheint deshalb sehr wahrscheinlich, daß die Doppelstrangaktivität und die thermische Destabilisierung von Duplex-DNA auf demselben Mechanismus beruhen. Die in dieser Arbeit konstruierten Vorfahren *c*, *e*, *f*, *g*, *h* sowie die RNase A Mutanten D38G, D38N, D38S, E111G, D38G E111G und K31C S32C D38G E111G widerspiegeln dabei dieses Prinzip: je größer die katalytische Aktivität

gegenüber Duplex-RNA desto größer ist auch die Helix-Destabilisierungsaktivität. Darüber hinaus zeigten alle Mutanten die gleiche katalytische Aktivität gegenüber den einzelsträngigen RNA-Substraten Poly(U) und UpA im Rahmen der Fehlergrenzen ($\pm 8\%$ bzw. $\pm 15\%$).

Ein Vergleich der Computermodelle der Kristallstruktur von „Bovine Seminal“-RNase mit idealisierter A-RNA Doppelhelix (Ciglic, 1994) sowie die Kristallstruktur von RNase A, kokristallisiert mit einem Pentadesoxyribonukleotid (Fontecilla-Camps et al., 1994), lieferte eine Idee für die strukturelle Erklärung der Bedeutung der Aminosäurereste Cys-31, Cys-32, Gly-38 und Gly-111. Durch die Dimerisierung kann das RNase-Molekül simultan mit beiden Strängen der doppelhelicalen RNA wechselwirken („Chelat-Effekt“). Eine Verknüpfung der beiden Untereinheiten zwischen den Cysteinresten 31 und 32' bzw. 32 und 31' ist eine grundlegende Voraussetzung für eine derartige Interaktion. Bei der Bindung muß die BS-RNase die A-RNA lokal deformieren, bevor die Einzelstränge in einem „in line“-Mechanismus hydrolysiert werden können. Dieses Modell liefert Erklärungen für die Bedeutung der Aminosäuren an den Positionen 38 und 111 in RNase A; die Seitenkette von Glu-111 befindet sich in der Nähe einer Base der Einzelstrang-RNA (Fontecilla-Camps et al., 1994); das Segment der Doppelhelix, das im Fontecilla Modell die Einzelstränge verbindet, müßte an Position 38 vorbeiführen. Die um einen Faktor von 3 bis 5 geringere katalytische Aktivität von dimerisierter RNase A gegenüber Duplex-RNA (Libonati, 1971) bezogen auf die Mutante K31C S32C D38G E111G läßt sich nicht ausschließlich mit einer elektrostatische Abstossungen zwischen Asp-38 bzw. Glu-111 und den Phosphatresten des Substrats erklären. Für die Aminosäurereste an Position 38 konnte gezeigt werden, daß die Doppelstrangaktivität der monomeren RNase A Mutanten D38N und D38S bezüglich der Mutante D38G um den Faktor zwei vermindert war. Wäre nur die Eliminierung der negativen Ladung entscheidend, hätten alle drei Mutanten die gleichen katalytischen Aktivitäten gegenüber Duplex-RNA aufweisen müssen.

Neben der Bestimmung ihrer katalytischen Eigenschaften gegenüber Nukleinsäuren wurden die Mutanten K31C S32C D38G E111G, D38G E111G und h₁ auch auf immunosuppressive Aktivitäten getestet. Die Proteine zeigten keine oder nur eine sehr geringe inhibierende Wirkung auf die Proliferation von T-Lymphozyten.

Von anionischen Glykolipiden wurde die Mutante K31C S32C D38G E111G im gleichen Maße kompetitiv inhibiert wie „Bovine Seminal“-RNase. Die Inhibition von D38G E111G war nur etwa halb so stark, während die anderen Mutanten eine unverändert hohe katalytische Aktivität aufwiesen (Rüf, persönliche Mitteilung).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Aminosäurereste Cys-31, Cys-32, Gly-38 und Gly-111 hinreichend für die katalytische Aktivität gegenüber Duplex-RNA, die Destabilisierung doppelsträngiger DNA und die Bindung anionischer Glykolipide der „Bovine Seminal“-Ribonuklease sind.

VI. Summary

Bovine seminal RNase, a protein isolated from the seminal fluid of bulls, is an extraordinary member of the ribonuclease family. This RNase has, in addition to its expected catalytic activity against single-stranded RNA substrates, a number of unusual properties, including:

- a factor of 10 to 30 higher catalytic activity against duplex RNA under physiological conditions (150 mM salt concentration at a pH of 7)
- thermal destabilization of duplex DNA under conditions at which RNase A has little destabilizing activity
- inhibition of the proliferation of B- and T-lymphocytes
- cytotoxicity against tumor cell lines
- binding to anionic glycolipids.

These properties must arise from some or all of the 23 differences in the primary structure between the pancreatic and the seminal enzyme.

The Maximum Parsimony theory says that the primary structure of proteins from extinct organisms can be reconstructed from the sequences of their descendants. Due to the availability of a large number of protein sequences belonging to the pancreatic RNase superfamily, this family offers an excellent system for applying this theory.

In this dissertation the ribonuclease A variant K31C S32C D38G E111G (Turbo) was designed with the help of three difference strategies. In the first step, Maximum Parsimony theory was used to reconstruct sequences for the common ancestors of the RNases of pecora and bovine seminal (mutant h), pecora (mutant g), deer (mutant e), deer, pronghorn and giraffe (mutant f), as well as the common ancestors of buffalo, eland, nilgai and gazelles (mutant c). Next, genes for these ancestors were synthesized from an artificial gene for RNase A with the help of site-directed mutagenesis. The proteins were then expressed in the *E. coli* lon⁻ cell line, purified, and characterized. By comparing the primary structure and the catalytic properties of these mutants, Gly-38 could be shown to be sufficient (RNase A D38G: ds-activity 5) and necessary (h₁G38D: ds-activity 1) for the five fold increase in catalytic activity of the common ancestor of pecora- and bovine seminal RNase (mutant h, ds-activity 5) against duplex RNA. Through a sequence comparison of all RNases

examined in the literature, it could be shown that Gly-38 is generally sufficient for an increased catalytic activity towards duplex RNA.

In a second step, a systematic comparison of amino acid sequence and double-stranded activity was carried out for all hybrid mutants of RNase A and BS-RNase, which had been prepared in the research group of S. A. Benner. From this analysis evolved the hypothesis that in addition to Gly-38, identified by the Parsimony method, three other residues contributed to the increased double-stranded activity of seminal plasma RNase: Cys-31, Cys-32 and Gly-111. In the last step, these four amino acids were introduced together into RNase A. This resulted in a protein with a 28 fold increased catalytic activity against double stranded nucleic acid. A combination of all differences in the primary structure between RNase A and BS-RNase would have required the construction of 7,408,077 hybrids. Further, application of the generally accepted literature model of Libonati and Sorrentino would never have yielded the desired outcome. These authors concluded from investigations of RNases of various species that the catalytic activity of a RNase towards duplex RNA and -DNA depended on the number of basic amino acid residues on the protein surface as well as the level of glycosylation of the enzyme. The introduction of basic amino acid residues in fact showed no impact on double-stranded activity. The mutant K31C S32C D38G E111G has in fact a smaller number of basic amino acid residues than RNase A.

It could also be shown that the mutant K31C S32C D38G E111G can destabilize double helical DNA (helix-destabilization activity) to approximately the same extent as bovine seminal RNase. It appears probable that the double-stranded activity and the thermal destabilization of duplex DNA arise from the same mechanism. The ancestors *c*, *e*, *f*, *g*, *h* constructed in this work, as well as the RNase A mutants D38G, D38N, D38S, E111G, D38G E111G and K31C S32C D38G E111G reflect this principle: the larger the catalytic activity against duplex RNA, the larger the helix-destabilization activity. All mutations showed the same catalytic activity against the single stranded RNA substrates poly(U) and UpA within experimental error ($\pm 8\%$ and $\pm 15\%$).

A comparison of computer models for the crystal structure of bovine seminal RNase with idealized A-RNA double helix, (Ciglic, 1994) and the crystal structure of RNase A, cocrystallized with a pentadeoxyribonucleotide (Fontecilla-Camps et al., 1994), suggested a structural explanation for the

impact of the amino acid residues Cys-31, Cys-32, Gly-38 and Gly-111 on these behaviors. Through dimerization, the RNase molecule can simultaneously interact with both strands of a double helical segment of RNA ("chelate effect"). A connection between the two protein subunits joining cysteine residues 31 and 32' (32 and 31' respectively) is a requirement for this type of interaction. Through this binding, BS-RNase can locally deform the A-type duplex, a deformation that is necessary to permit the "in line" mechanism required for hydrolysis. This model provides an explanation for the impact of the amino acid substitution at positions 38 and 111 on the behavior of the RNase. The side chain of Glu-111 is near a base of the single-stranded RNA (Fontecilla-Camps et al., 1994); the segment of the double helix that connects the single strand regions bound in the active site must, in the Fontecilla model, pass by position 38. The factor of 3 to 5 lower catalytic activity of dimerized RNase A against duplex RNA (Libonati, 1971) relative to the mutant K31C S32C D38G E111G cannot be exclusively explained through an electrostatic repulsion between Asp-38, Glu-111 and the phosphate residues of the substrate. It can be shown for the amino acid residues at position 38 that the double-stranded activity of the monomeric RNase A mutants D38N and D38S is a factor of two lower than that of the mutant D38G. If only the elimination of the negative charge was decisive, then all three mutants would have shown the same catalytic activity towards duplex RNA.

In addition to their catalytic activity towards nucleic acids, the immunosuppressivity of K31C S32C D38G E111G, D38G E111G and h₁ was also tested. The proteins showed no (or only very slight) activity as inhibitors of the proliferation of T-lymphocytes.

Anionic glycolipids inhibit the mutant K31C S32C D38G E111G to approximately the same extent as they inhibit bovine seminal RNase. The inhibition of D38G E111G by anionic glycolipids was only 50% so great as with Turbo. The other mutants were not inhibited by anionic glycolipids (Rüf, personal communication).

In summary, it can be concluded that the amino acid residues Cys-31, Cys-32, Gly-38 and Gly-111 are sufficient for the catalytic activity of a RNase against duplex RNA, the helix destabilization of double stranded DNA, and the binding to anionic glycolipids, as seen in bovine seminal ribonuclease.