



Doctoral Thesis

Protein structure and enzyme regulation the NMR solution structures of ShPI, rTAP and WmKT

Author(s):

Antuch García, Walfrido Ernesto

Publication Date:

1995

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001576143> →

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. 11401

**Protein structure and enzyme regulation: The NMR solution
structures of ShPI, rTAP and WmKT.**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Walfrido Ernesto Antuch García



CatE

B.Sc. Chemistry, University of Havana, Cuba

born on the 5th of November, 1963

citizen of Cuba

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. K. Wüthrich, examiner

Prof. Dr. R. Glockshuber, co-examiner

P.D. Dr. W. Sidler, co-examiner

1995

2.0 Summary.

Enzyme regulation is a fascinating topic in the biological sciences and for many years the study of proteinase inhibitors has been a major research field. The Kunitz-type proteinase inhibitors are one of the most widely known protein families, and one of its members the bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) is one of the most extensively studied proteins.

Kunitz-type proteinase inhibitors have been found in many living organisms from invertebrates to humans, either as independent molecules or as domains of bigger proteins. The elucidation of their tertiary structure constitutes an important step in the understanding of the specificity in their mechanisms of action.

The first part of this thesis describes the NMR solution structure of a 55-amino acid residue Kunitz-type trypsin inhibitor, ShPI, isolated from the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. This high-quality solution structure of ShPI has a nearly identical molecular architecture as BPTI, despite a mere 39% of sequence homology between the two proteins. A detailed comparison of this structure with four homologous proteins for which the three-dimensional structure is available is also presented.

The second section of this dissertation is dedicated to the determination of the solution structure of the recombinant tick anticoagulant protein (rTAP), a 60-residue protein functioning as a highly specific inhibitor of the coagulation protease factor Xa, which was originally isolated from the tick *Ornithodoros moubata*. Its regular secondary structure consists of a two-stranded antiparallel β -sheet and an α -helix. The relative orientation of these regular secondary structure elements has nearly identical counterparts in BPTI. In contrast, the loop between the β -sheet and the C-terminal α -helix as well as the N-terminal 20-residue segment preceding the β -sheet adopt different three-dimensional folds in the two proteins. This high-quality solution structure is the first reported for a factor Xa inhibitor and the aforementioned observations are discussed with regard to the implications of a new mechanism of protease inhibition, which is different from the one by the Kunitz-type proteinase inhibitors.

The third chapter is devoted to the elucidation of the NMR solution structure of a member of the group of killer toxins. These are proteins which are secreted to the extracellular medium by certain strains of fungi in order to kill competing sensitive strains. This part of the thesis describes the optimization of the conditions for the production of the killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii* (WmKT), ^{15}N -labelling and purification of the protein and the determination of the high-quality NMR solution structure. WmKT is a 88-amino acid residue protein which inhibits the synthesis of the cell wall β -glucans of sensitive yeasts, such as *Saccharomyces cerevisiae*, thus leading to their death.

WmKT folds into two "Greek key" motifs, which in turn define two four-stranded antiparallel β -sheets, which are the only regular secondary structure elements. Each β -sheet is formed by three strands of one motif and one strand of the other one. A dense network of hydrogen bonds, numerous hydrophobic interactions in the well defined core and five disulfide bonds hold the two β -sheets together in a compact structure, which has a high thermal stability.

WmKT shows no significant sequence homology to any protein of known three-dimensional structure, but surprisingly a comparison with the structures in the protein data bank revealed three-dimensional structural similarities with the members of the β - γ -crystallin superfamily, which have completely different biological roles. It has been proposed that the two-domain β - γ -crystallin structure is the result of successive gene-duplication and fusion events; WmKT now appears to be the first example of an analogue of the ancestor monomeric one-domain protein.

Kurzfassung.

Enzymregulation ist ein faszinierendes Thema in den biologischen Wissenschaften und das Studium der Proteinase-Inhibitoren stellt seit vielen Jahren ein wichtiges Forschungsgebiet dar. Die Proteinase-Inhibitoren vom Kunitz-Typ bilden eine der bekanntesten Proteinfamilien und der basische pankreatische Trypsin-Inhibitor (BPTI) ist eines der am meistens untersuchten Proteine.

Die Proteinase-Inhibitoren vom Kunitz-Typ wurden in verschiedenen Organismen von primitiven Lebensformen bis zum Menschen gefunden, entweder als unabhängige Proteine oder als Domänen größerer Proteine. Die Ermittlung ihrer dreidimensionalen Struktur ist ein wichtiger Schritt für das Verständnis der Spezifität ihrer Wirkungsmechanismen.

Der erste Teil dieser Doktorarbeit beschreibt die Struktur eines Trypsin-Inhibitors vom Kunitz-Typ, ShPI (55 Aminosäuren), isoliert aus der Seeanemone *Stichodactyla helianthus*, die mittels kernmagnetischer Resonanz (NMR) bestimmt wurde. Diese hochaufgelöste NMR-Struktur von SHPI zeigt eine nahezu identische molekulare Architektur wie BPTI, obwohl nur 39% Sequenzhomologie zwischen den beiden Proteinen besteht. Ein detaillierter Vergleich dieser Struktur mit vier homologen Proteinen, deren dreidimensionale Struktur bekannt ist, wird vorgestellt.

Der zweite Teil der Dissertation ist der Strukturermittlung des rekombinanten antikoagulant Proteins aus Zecken (rTAP) gewidmet. rTAP ist ein Protein von 60 Aminosäuren, das als hochspezifischer Inhibitor der Blutgerinnungsprotease Faktor-Xa wirkt und ursprünglich aus der Zecke *Ornithodoros moubata* isoliert worden ist. Dies ist die erste dreidimensionale Struktur eines Faktor-Xa-Inhibitors. Seine Sekundärstrukturelemente sind ein zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt und eine α -Helix. Die relative Orientierung dieser Sekundärstrukturelemente entspricht fast genau derjenigen in BPTI. Im Gegensatz dazu zeigen die Schlaufe zwischen dem β -Faltblatt und der C-terminalen α -Helix sowie das N-terminale Segment von 20 Aminosäuren in den beiden Proteinen verschiedene dreidimensionale Faltungen. Diese strukturellen Unterschiede deuten darauf hin, daß hier ein neuar-

tiger Mechanismus der Proteaseinhibition vorliegt, der sich von dem der Protease-Inhibitoren vom Kunitz-Typ unterscheidet.

Das dritte Kapitel ist der Ermittlung der NMR-Struktur in Lösung eines Mitgliedes der Gruppe der Killer-Toxine gewidmet. Dabei handelt es sich um Proteine, die von einigen Pilzstämmen ins extrazelluläre Medium sekretiert werden um konkurrierende Stämme zu töten, die gegen dieses Toxin sensitiv sind. Dieser Teil der Doktorarbeit beschreibt die Optimierung der Bedingungen für die Herstellung des Killer-Toxins aus der Hefe *Williopsis mrakii* (WmKT), die ^{15}N -Markierung, die Reinigung und die Ermittlung der hochaufgelösten NMR-Struktur dieses Protein. WmKT ist ein Protein von 88 Aminosäuren, das die Synthese der β -Glucane der Zellwand sensitiver Hefestämme, z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, inhibiert und auf diese Weise die Zellen zum Absterben bringt.

WmKT faltet in zwei "Greek key"-Motive, die ihrerseits zwei viersträngige antiparallele β -Faltblätter definieren. Jedes β -Faltblatt besteht aus drei Strängen eines Motives und einem Strang des anderen Motives. Ein dichtes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen, zahlreiche hydrophobe Wechselwirkungen in dem gut bestimmten Kern und fünf Disulfidbrücken halten die zwei β -Faltblätter zusammen in einer kompaktem Struktur mit hoher thermischer Stabilität.

WmKT zeigt keine signifikante Sequenzhomologie mit einem Protein bekannter dreidimensionaler Struktur. Ein Vergleich mit Strukturen der Brookhaven Proteindatenbank zeigte jedoch strukturelle Ähnlichkeiten der dreidimensionalen Struktur mit Mitgliedern der β - γ -Crystallin-Superfamilie. Es ist postuliert worden, daß die Zweidomänenstruktur von β - γ -Crystallin die Folge von aufeinanderfolgender Gensduplikation und Fusion ist; WmKT scheint das erste Beispiel eines Analogons des monomeren Vorläufers mit einer Domäne zu sein.