



## Doctoral Thesis

# **NMR studies of singly cross-linked DNA duplexes and the trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase mutant DHFR(F98Y)**

**Author(s):**

Altmann, Serge

**Publication Date:**

1996

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001763290> →

**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 No 11996

**NMR studies of singly cross-linked DNA duplexes  
and the trimethoprim-resistant dihydrofolate  
reductase mutant DHFR(F98Y)**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
Serge Altmann  
dipl. sc. nat. ETH

born May 29, 1967  
citizen of Ennenda / GL

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Kurt Wüthrich, examiner  
Prof. Dr. Rudolf Glockshuber, co-examiner  
Dr. Werner Leupin, co-examiner  
Dr. Hans Senn, co-examiner

1996

## Abstract

The present work consists of two parts, one is dealing with NMR studies of singly cross-linked DNA duplexes and the other with the purification and resonance assignment of a mutant trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase (DHFR)

The use of short double stranded DNA oligomers in physical and biochemical studies can be limited due to their low thermal stability and due to the difficulty to mix two single strands in an exact 1:1 ratio. These problems can be overcome by the incorporation of a linker which covalently bridges the two complementary strands of the DNA. Linkers have been searched for as part of research projects at F. Hoffmann-La Roche Ltd. These studies started out from molecular modeling work resulting in the design of a variety of non-nucleotidic covalent linkers to join the 3'-end of the (+)-strand and the 5'-end of the (-)-strand in DNA duplexes. Three of these linkers were synthesized (abbreviations I, II and III) and used to prepare singly cross-linked duplexes d(GTGGAATTC)-linker-d(GAATTCCAC), referred to as duplexes I, II and III. Linker I is an assembly of a propylene-, a phosphate- and a second propylene-group and is thought to mimic the backbone of two nucleotides. Linkers II and III consist of five and six ethyleneglycol units, respectively. The melting temperatures of the cross-linked duplexes are 65°C for duplex I, 72°C and 73°C for duplexes II and III, respectively, as compared to 36°C for the corresponding non-linked nondeoxynucleotide duplex. As part of the thesis the three cross-linked duplexes have been structurally characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy. The <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P resonance assignments in the DNA stem were obtained using standard methods. For the resonance assignment of the linker protons, two-dimensional [<sup>1</sup>H-<sup>31</sup>P]-heteronuclear COSY and two-quantum-experiments were used. Distance geometry calculations with NOE-derived distance constraints were performed and the resulting structures were energy-minimized. In duplex I, the nucleotides flanking the linker do not form a Watson-Crick base-pair, whereas in the duplexes II and III the entire DNA-stem is in a B-type double helix conformation.

The second part of this thesis addresses the problem of widespread resistance of bacterial strains to known antibiotics, which makes the synthesis of new effective drugs to treat bacterial infections an urgent requirement. In *Staphylococcus aureus*, the origin of the resistance to the antibiotic trimethoprim (TMP) was found to be a single point mutation resulting in an amino acid substitution of Phe to Tyr at position 98 in DHFR (Dale *et al.*, 1996). An optimized purification procedure for DHFR(F98Y), including an affinity chromatography and a gel filtration step, was developed to isolate highly pure

protein. The yields of purified protein had to be reasonably high to allow  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -labeling of the protein, which requires the use of expensive  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -sources during the fermentation of DHFR(F98Y)-overproducing *Escherichia coli* cells. The labeled protein is needed for heteronuclear NMR measurements. The purified protein was characterized with different analytical methods and the ternary complex of DHFR(F98Y) with the inhibitor TMP and the coenzyme NADPH turned out to be the most suitable species for NMR spectroscopic studies. The application of a series of heteronuclear NMR experiments then yielded nearly complete  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  resonance assignments of DHFR(F98Y). As judged from the analysis of  $^{13}\text{C}$ - and  $^{15}\text{N}$ -edited NOESY spectra and the measurement of exchange rates of backbone amide protons, the regular secondary structures of the protein in solution are identical to the secondary structures in the x-ray crystal structure of the protein. The central feature of the protein is an eight-stranded parallel  $\beta$ -sheet with the topology  $-1x -1x +3x -2x +2x -1 +2x$ . The majority of the most slowly exchanging amide-protons (31 out of 42) are located in this sheet. The resonance assignments obtained in this study serves as a basis for further studies with DHFR(F98Y) such as its structure calculation, the determination of the binding mode of substrate, inhibitor or coenzyme molecules and the localization of water molecules, which are important in the catalytic mechanism.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation besteht aus zwei Teilen, wovon sich der erste mit NMR Studien über einfach verbrückte DNA Doppelhelices befasst und der zweite die Reinigung und Resonanzzuordnung einer Trimethoprim-resistenten Dihydrofolat Reduktase (DHFR) beschreibt.

Die Verwendung von kurzen, doppelsträngigen DNA Oligomeren in physikalischen und biochemischen Studien kann problematisch sein, einerseits wegen der geringen thermischen Stabilität und andererseits wegen der Schwierigkeit die zwei Einzelstränge genau im Verhältnis 1:1 zu mischen. Diese Probleme können durch die kovalente Verknüpfung der beiden komplementären Stränge der DNA beseitigt werden. Ein Forschungsprogramm bei F. Hoffmann-La Roche AG führte zur Entwicklung von verschiedenen, einfach verbrückten DNA Doppelhelices. Durch Computermodellierung wurden nicht-nukleotidische Brücken vorgeschlagen, welche das 3'-Ende des (+)-Stranges mit dem 5'-Ende des (-)-Stranges einer DNA Doppelhelix verbinden. Drei dieser Modelle wurden synthetisiert (Bezeichnung I, II und III) und verwendet, um einfach verbrückte Doppelhelices der Sequenz d(GTGG AATTC)-Brücke-d(GAATTCCAC) herzustellen (Doppelhelices I, II und III). Brücke I ist aus einer Propylen-, einer Phosphat- und einer zweiten Propylengruppe zusammengesetzt und ahmt den Rückgrat zweier Nucleotide nach. Die Brücken II und III bestehen aus fünf bzw. sechs Ethylenglykol-Einheiten. Die Schmelztemperatur für Doppelhelix I liegt bei 65°C, für Doppelhelix II bei 72°C und für Doppelhelix III bei 73°C. Im Gegensatz dazu liegt die Schmelztemperatur der entsprechenden DNA Doppelhelix ohne kovalent verknüpfte Einzelstränge mit 36°C vergleichsweise tief. In dieser Arbeit wird die strukturelle Charakterisierung dieser drei einfach verbrückten DNA Doppelhelices mittels NMR Spektroskopie beschrieben. Die Zuordnung der  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -Resonanzen des DNA Stammes erfolgte mittels gebräuchlicher Methoden. Für die Resonanz Zuordnung der Protonen in den Brückenfragmenten wurden zwei-dimensionale, heteronukleare [ $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ ]-COSY und Doppelquanten Experimente verwendet. Mittels NOE-quantifizierten Distanzeinschränkungen wurden Distanzgeometrie-Rechnungen durchgeführt und die daraus bestimmten Strukturen energieminiert. Daraus folgt, dass in Doppelhelix I die beiden der Brücke am nächsten liegenden Nucleotide kein Watson-Crick Basenpaar bilden. Im Gegensatz dazu liegt der gesamte DNA Stamm der Doppelhelices II und III in der B-Form vor.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschreibt die Reinigung einer Trimethoprim-resistenten Dihydrofolat Reduktase Mutante und deren Resonanzzuordnung. Das Auftreten von

Resistenzen gegenüber fast allen bekannten Antibiotika in vielen Bakterienstämmen ist alarmierend, weshalb die Synthese neuer, wirksamer Medikamente gegen bakterielle Infektionen eine dringende Notwendigkeit ist. In *Staphylococcus aureus* wurde der Ursprung der Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Trimethoprim (TMP) gefunden. Es handelt sich um eine Punktmutation, welche zu einer Aminosäure Substitution von Phe zu Tyr an Position 98 von DHFR führt (Dale *et al.*, 1996). Ein optimiertes Reinigungsschema für DHFR(F98Y), welches einen Affinitätschromatographie- und einen Gelfiltrations-Schritt beinhaltet, wurde entwickelt, um hochreines Protein zu isolieren. Die Ausbeute der Reinigung musste genügend hoch sein, damit das Protein  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiert werden konnte, da während der Fermentation der Proteinüberproduzierenden *Escherichia coli* Bakterien teure  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Quellen eingesetzt werden. Die Markierung ist notwendig für die Durchführung von heteronuklearen NMR Experimenten. Das gereinigte Protein wurde mit verschiedenen analytischen Methoden charakterisiert, wobei sich der ternäre Komplex von DHFR(F98Y) mit dem Inhibitor TMP und dem Koenzym NADPH als der für NMR spektroskopische Untersuchungen geeignetste erwies. Die Anwendung einer Serie heteronuklearer NMR Experimente ermöglichte die fast vollständige Zuordnung der  $^1\text{H}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen in DHFR(F98Y). Aus der Analyse von  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY Spektren und Messungen der Austauschraten von Rückgrat Amidprotonen kann geschlossen werden, dass die regulären Sekundärstrukturen des Proteins in Lösung identisch sind mit den Sekundärstrukturen in der Kristallstruktur des Proteines. Das zentrale Element des Proteines ist ein acht-strängiges  $\beta$ -Blatt mit der Topologie  $-1x -1x +3x -2x +2x -1 +2x$ . Die Mehrheit der langsam austauschenden Amidprotonen (31 von 42) ist in diesem  $\beta$ -Blatt lokalisiert. Die in dieser Arbeit durchgeführte Resonanzzuordnung bietet die Grundlage für weitere Studien mit DHFR(F98Y), wie zum Beispiel die Strukturermittlung des Proteines, die Bestimmung der Bindungsarten von Substrat-, Inhibitor- oder Koenzymmolekülen, sowie die Lokalisierung von Wassermolekülen, welche wichtig sind für den katalytischen Mechanismus.