



Doctoral Thesis

Random and directed approaches to study the folding and function of DsbA from *Escherichia coli*

Author(s):

Hennecke, Jens

Publication Date:

1998

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001991609> →

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 ex. B

Diss. ETH Nr. 12813

**Random and directed approaches to study the folding
and function of DsbA from *Escherichia coli***

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich
for the degree of
Doctor of Natural Science

presented by

Jens Hennecke

Dipl. Biol. (Universität Göttingen, Germany)

born on October 5, 1967

Federal Republic of Germany



Cat E

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. R. Glockshuber, examiner

Prof. Dr. T. J. Richmond, co-examiner

1998

1. Abstract

The aim of this work was the characterization of the folding and function of the thiol/disulfide oxidoreductase DsbA from *Escherichia coli*. DsbA is a soluble, monomeric protein of 189 amino acids and is essential for disulfide bond formation in the periplasmic space. DsbA randomly and very rapidly oxidizes folding polypeptides by disulfide transfer from the extremely unstable disulfide bond in its active site sequence Cys³⁰-Pro³¹-His³²-Cys³³ to substrate proteins. The high-resolution structures of DsbA revealed that the catalytic domain possesses a thioredoxin-like fold into which a second α -helical domain of unknown function is inserted.

In the first part of this thesis, the influence of circular permutations of a polypeptide chain and the location of the new termini on its folding and function was systematically investigated using DsbA as a model protein. A circular permutation of a polypeptide chain can be envisioned as the result of joining its natural N- and C-termini to create a circle, and subsequently cleaving it at another site. Hence, the new linear polypeptide sequence differs in the location of the chain termini and in the order of long stretches of the amino acid sequence, secondary structure elements and possibly domains. In order to introduce new termini at any position, a library of circularly permuted *dsbA* genes was constructed using a novel random approach and screened for active variants *in vivo*. 51 different active circularly permuted variants were identified by sequencing the corresponding genes. Strikingly, the majority of these variants had the new termini within regular secondary structures, and the termini were distributed over about 70% of the polypeptide chain. The observation that DsbA can be circularly permuted in so many different ways without loss of the ability to fold indicates a high redundancy of the folding pathway of DsbA. However, new termini of active variants were excluded from approximately 30% of the DsbA sequence that corresponded to four α -helices within the α -helical domain. Introduction of new termini into these "forbidden segments" by rational design exclusively yielded inactive circularly permuted proteins with altered spectroscopic properties and strongly decreased stabilities. In contrast, all active variants analyzed so far show structural and catalytic properties comparable to those of DsbA wild type. Consequently, random circular permutation may be used to identify segments in a protein that are essential for its function and folding.

In addition, the circularly permuted DsbA variant H32-P31 was rationally designed. This variant has both new termini located between the active-site cysteines. Its oxidized form thus possesses covalently linked N- and C-termini. The variant H32-P31 folds reversibly and cooperatively into a native-like structure in both redox forms. In contrast to the wild-type protein and all other circularly permuted variants of DsbA which are less stable in the oxidized form, the disulfide bond stabilizes the variant H32-P31. The variant is also unable to act as a disulfide oxidoreductase *in vivo* and *in vitro* and has a strongly lowered redox

potential. Therefore, the catalytic disulfide bond of the variant H32–P31 was converted into a structural disulfide bond.

The active site of DsbA is located at the amino-terminus of a kinked α -helix (residues 30–50) and close to a negatively charged patch on the surface of the molecule. In the second part of this thesis it was investigated whether the kink, caused by residues 38–40 or glutamate 37 and 38, which are part of the acidic patch, are factors that determine the oxidative force of DsbA ($E_0' = -125$ mV) and the low pK_a of 3.4 of the nucleophilic thiol of Cys30. A series of DsbA variants (Δ 38–40, Δ 38–40/H41P, E37Q, E38Q, and E37Q/E38Q) was characterized. In contrast to theoretical predictions, the redox potentials of all these variants are almost unchanged and the pK_a values of Cys30 do not differ by more than 0.5 units from that of DsbA wild type. The amino acid replacements also have no influence on the polypeptide specificity of the protein, which was shown to be independent of the isoelectric point of the polypeptide substrate and most pronounced at acidic pH. We conclude that neither the kink in the active-site helix, nor Glu37 or Glu38 are critical for the biophysical properties of DsbA.

Many members of the thiol/disulfide oxidoreductase family show a strong increase in tryptophan fluorescence upon reduction of their active-site disulfide bond, a property often used to study the reaction mechanism of these enzymes. In contrast to most other enzymes of the family, where tryptophan residues are located in close proximity to the active-site and are directly quenched by the catalytic disulfide, both tryptophan residues of DsbA, W76 and W126, are not in contact with the disulfide, are located in the α -helical domain and are 12 to 20 Å away from the active site. In a collaboration with Alain Sillen and Prof. Yves Engelborghs (University of Leuven, Belgium) the origin of the fluorescence quenching in oxidized DsbA was investigated in the third part of this thesis. Analysis of the DsbA variants W76F and W126F revealed that the fluorescence of W126 is fully quenched in every redox state of DsbA. W126 is also a sink for non-radiative energy transfer from W76. In oxidized DsbA, W76 is quenched by an intramolecular, dynamic quenching process which involves an energy transfer from W76 via F26 to the disulfide. Analysis of the thermodynamic stabilities of the variants W76F and F26L revealed that the inter-domain contact between W76 and F26 strongly contributes to the overall stability of DsbA, and selectively stabilizes its oxidized form.

2. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Faltung und Funktion der Thiol/Disulfid Oxidoreductase DsbA aus *Escherichia coli*. DsbA ist ein lösliches, monomeres Protein (189 Aminosäuren) und ist essentiell für die Bildung von Disulfidbrücken im Periplasma. Disulfidaustauschreaktionen zwischen der extrem instabilen Disulfidbrücke im katalytischen Zentrum Cys³⁰-Pro³¹-His³²-Cys³³ und Substratproteinen führen zu einer schnellen aber statistischen Disulfidverbrückung in faltenden Proteinen. Strukturelle Untersuchungen zeigten einen Thioredoxin-ähnlichen Faltungstyp für die katalytische Domäne und eine zweite, stark α -helikale Domäne unbekannter Funktion.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Zirkularpermutationen von Polypeptidketten und der daraus resultierenden veränderten Lage der Kettentermini auf die Funktion und Faltung eines Proteins systematisch untersucht. Als Modellprotein dafür diente DsbA. Zirkularpermutationen von Polypeptidketten können als das Ergebnis der Verknüpfung der natürlichen N- und C-Termini und eines darauffolgenden Schnittes der Kette an einer anderen Stelle betrachtet werden. So erzeugte neue Polypeptidketten unterscheiden sich durch die Lage ihrer Kettentermini und die sequentielle Anordnung von grossen Aminosäureabschnitten, von Sekundärstrukturelementen und möglicherweise sogar von ganzen Domänen. Die Verwendung eines neuentwickelten Zufallsansatzes zur Konstruktion einer Bibliothek von zyklisch permutierten Genen von *dsbA* erlaubte die Insertion neuer Termini an jeder Position der Polypeptidkette. Eine phänotypische Untersuchung der Bibliothek und die anschliessende Nukleotidsequenzanalyse der entsprechenden Gene führte zur Identifikation von 51 verschiedenen, aktiven zirkularpermutierten Varianten. Überraschenderweise waren die Termini der meisten Varianten in regulären Sekundärstrukturelementen lokalisiert und über 70% der gesamten Polypeptidkette verteilt. Die Beobachtung, daß DsbA ausgehend von so vielen verschiedenen zirkularpermutierten Varianten in eine aktive Konformation falten kann, ist ein Hinweis auf eine große Redundanz des Faltungsprozesses. Allerdings konnten in 30% der DsbA Sequenz keine neuen Termini von aktiven Varianten gefunden werden. Varianten mit neuen Termini in diesen "verbotenen Bereichen" wurden konstruiert und führten zu inaktivem Protein mit veränderten spektroskopischen Eigenschaften und stark verminderten Stabilitäten. Im Gegensatz dazu zeigten alle aktiven Varianten und DsbA Wildtyp vergleichbare strukturelle und katalytische Eigenschaften. Die Methode der zufälligen Zirkularpermutation könnte daher generell dazu verwendet werden, Bereiche in Proteinen, die essentiell für die Funktion und Faltung sind, zu identifizieren.

Schliesslich wurde die zirkular permutierte DsbA Variante H32-P31 in einem rationalen Ansatz konstruiert. Die neuen Termini dieser Variante liegen zwischen den Cysteinen des katalytischen Zentrums, so dass in ihrer oxidierten Form die Termini kovalent verknüpft sind.

Trotz dieser Veränderungen faltet die Variante H32–P31 in beiden Redoxformen reversibel und kooperativ in eine native Struktur. Während DsbA Wildtyp und alle übrigen zirkularpermutierten Varianten in ihrer oxidierten Form weniger stabil sind, stabilisiert die Disulfidbrücke H32–P31. Die Variante hat auch die Disulfid Oxidoreduktaseaktivität sowohl *in vivo* als auch *in vitro* verloren und besitzt ein stark erniedrigtes Redoxpotential. Die ursprünglich katalytische Disulfidbrücke zeigt also in der Variante H32–P31 die Eigenschaften einer strukturellen Disulfidbrücke.

Das katalytische Zentrum von DsbA liegt am Aminoterminus einer geknickten α -Helix (Reste 30–50) und nah an einem negativ geladenen Bereich auf der Oberfläche des Moleküls. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob der durch die Aminosäuren 38–40 verursachte Knick und die Aminosäurereste Glutamat 37 und Glutamat 38, die Teil des negativen Bereiches sind, einen Einfluss auf die ungewöhnlich starke Oxidationskraft von DsbA ($E_0' = -125$ mV) und den niedrigen pK_a von 3.4 des nukleophilen Thiols von Cystein 30 haben. Eine Serie von DsbA Varianten ($\Delta 38-40$, $\Delta 38-40/H41P$, E37Q, E38Q und E37Q/E38Q) wurde hierzu charakterisiert. Im Widerspruch zu theoretischen Vorhersagen änderte sich das Redoxpotential aller Varianten nicht und der pK_a von Cystein 30 erhöhte sich höchstens um 0.5 Einheiten im Vergleich zu DsbA Wildtyp. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die besonders im sauren pH ausgeprägte Peptidspezifität von DsbA unabhängig vom isoelektrischen Punkt des Substratpeptids ist und auch durch die hier untersuchten Aminosäureaustausche nicht beeinflusst wird. Weder der Helix-Knick noch Glutamat 37 oder 38 sind daher für die biophysikalischen Eigenschaften von DsbA von großer Bedeutung.

Der bei vielen Mitgliedern der Thiol/Disulfid Oxidoreduktase Familie beobachtete Anstieg der Tryptophanfluoreszenz nach Reduktion der katalytischen Disulfidbrücke war bei der Aufklärung der Reaktionsmechanismen dieser Enzyme von grossem Nutzen. Im Gegensatz zu den meisten Enzymen dieser Familie, bei denen Tryptophanreste in der Nähe des katalytischen Zentrums liegen, sind beide Tryptophane von DsbA, W76 und W126, nicht in Kontakt mit der Disulfidbrücke sondern sind in der α -helikalen Domäne in einer Entfernung von 12 Å und 20 Å zur Disulfidbrücke lokalisiert. In einer Zusammenarbeit mit Alain Sillen und Prof. Yves Engelborghs (Universität Leuven, Belgien) wurden daher im dritten Teil dieser Arbeit die Ursache für die Fluoreszenzlöschung in der oxidierten Form von DsbA untersucht. Die Charakterisierung der DsbA Varianten W76F und W126F zeigte, daß die Fluoreszenz von W126 in beiden Redoxzuständen vollständig gelöscht ist. Außerdem existiert ein strahlungsloser Energietransfer von W76 zu W126. In der oxidierten Form von DsbA wird die Fluoreszenz von W76 durch einen Energietransfer über F26 zur Disulfidbrücke dynamisch gelöscht. Die Untersuchung der thermodynamischen Stabilitäten der Varianten W76F und F26L zeigte, daß der unter anderem über W76 und F26 vermittelte Interdomänenkontakt stark zur Stabilität von DsbA, besonders aber von dessen oxidierten Form, beiträgt.