



Doctoral Thesis

The NMR structure of proteins, nucleic acids and their complexes

Author(s):

Fernández Estrabao, César

Publication Date:

1999

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-002060507> →

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. 13055

The NMR Structure of Proteins, Nucleic Acids and their Complexes

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
César Fernández Estrabao
M. Chem. Univ. Central de las Villas, Cuba

born on July 16, 1967
citizen of Cuba

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Kurt Wüthrich, examiner
Prof. Dr. Rudi Glockshuber, co-examiner

Zürich 1999

Summary

This dissertation describes the determination and functional interpretation of nuclear magnetic resonance (NMR) structures of proteins, nucleic acids and their complexes in solution.

The first chapter of this thesis presents the determination of the three-dimensional structure by multinuclear NMR spectroscopy of the 15 kDa plant pathogenesis-related protein P14a, which displays antifungicidal activity and is involved in the defense mechanisms in tomato plants. The high-quality structure obtained serves as a clue for elucidating the so far unknown biological function of P14a and hence of the entire PR-1 family, which is of direct interest for the generation of transgenic plants with improved host defense properties. The high sequence homology between P14a and the glioma pathogenesis-related protein GliPR, which is highly expressed in the brain tumor *glioblastoma multiforme*, suggested a structural link between both proteins. To follow up on this suggestion, and in view of the possible role of GliPR as a potential target for drugs interfering with tumor growth, the three-dimensional structure of GliPR was modeled using a novel NMR- and homology-based approach. The strict conservation of a cluster of amino acid residues in all known plant PR-1 proteins and in GliPR indicates a common active site for these proteins and thus a functional link between the human immune system and the defense system of plants. Moreover, the NMR models of P14a were successfully applied to solve the phase problem by molecular replacement during the structure determination of P14a by X-ray diffraction techniques. A comparison of the three-dimensional structures obtained by both techniques is presented at the end of chapter one.

The second chapter includes the studies by multinuclear NMR spectroscopy of ^{13}C - and ^{15}N -isotope-labeled DNA duplexes, both free in solution and in a protein–DNA complex. It describes the structural investigation and the determination of the three-dimensional structures of a DNA duplex containing the sequence of the *BS2* binding site of the *Antennapedia* homeodomain protein, and of the corresponding 17 kDa *Antennapedia* homeodomain–DNA complex. This system has actually become a paradigm for studies of general principles governing protein–DNA interaction, and is of special interest because of its importance for developmental biology. As a result, high-quality structures were obtained for both molecular species. Comparison of the three-dimensional structures on the basis of the extensive data that

were collected as a consequence of the ^{13}C - and ^{15}N -labeling of the DNA, enabled the identification of subtle conformational changes upon complex formation. These local protein-induced structural changes may have implications for rationalizing the high affinity of the *Antennapedia* homeodomain for its DNA binding site. In this chapter, there is some emphasis on the implementation and development of new NMR techniques for resonance assignment and measurement of scalar couplings, since this constitutes the first application of a ^{13}C - and ^{15}N -labeled DNA for the determination of its three-dimensional NMR structure. The important impact of the double labeling of the DNA is evident throughout this chapter.

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit strukturellen Untersuchungen von Proteinen, Nukleinsäuren und ihren Komplexen in Lösung mittels magnetischer Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie). Die erhaltenen dreidimensionalen Strukturen werden detailliert beschrieben und die biologische Bedeutung der gewonnenen strukturellen Daten wird diskutiert.

Das erste Kapitel dieser Dissertation behandelt die strukturelle Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie eines ^{13}C - und ^{15}N -markierten 15 kDa-Proteins, P14a, das antifungizide Aktivität besitzt und im Abwehrmechanismus von Tomatenpflanzen involviert ist. Die aus dieser Arbeit resultierende hochaufgelöste NMR-Struktur soll dabei helfen, die noch unbekannt biologische Funktion von P14a und der weiteren PR-1 Proteinen aufzuklären, die für die Herstellung transgener Pflanzen mit verbesserten Abwehreigenschaften von grossem Interesse ist. Die hohe Sequenzhomologie zwischen P14a und dem Protein GliPR, das in Hirntumoren des Typs *Glioblastoma multiforme* in grosser Menge produziert wird, deutet auf eine strukturelle Analogie zwischen beiden Proteinen hin. Um diesem Hinweis zu folgen, und weil GliPR eventuell eine bedeutende Rolle als potentieller Bindungspartner für tumorwachstumshemmende Drogen haben könnte, wurde die dreidimensionale Struktur von GliPR mit Hilfe einer neuen Methode modelliert, die auf NMR und Sequenzhomologie basiert. Die strikte Konservierung einer Gruppe von Aminosäuren in allen bekannten PR-1 Proteinen und in GliPR deutet auf ein gemeinsames aktives Zentrum in diesen Proteinen und demzufolge auf eine funktionelle Verwandtschaft zwischen dem menschlichen Immunsystem und dem pflanzlichen Abwehrmechanismus hin. Ausserdem wurden die NMR-Modelle von P14a verwendet, um das Phasenproblem bei der Bestimmung der Röntgenstruktur zu lösen. Am Schluss des Kapitels werden die NMR- und Röntgenstrukturen von P14a verglichen.

Das zweite Kapitel beinhaltet die Studien von ^{13}C - und ^{15}N -markierten DNS-Duplexen mittels NMR-Spektroskopie. Es beschreibt die strukturellen Untersuchungen und die dreidimensionale Strukturbestimmung eines DNS-Moleküls, das die Sequenz der Bindungsstelle BS2 für das *Antennapedia* Homeodomänen-Protein enthält, sowohl frei in Lösung als auch im Komplex (MW = 17 kDa) mit diesem Protein. Dieses System ist ein Modell für die Untersuchung der grundlegenden Prinzipien der Protein–DNS Wechselwirkungen und ist von besonderem Interesse wegen seiner Bedeutung für die Entwicklungsbiologie. Die Untersu-

chungen lieferten hochaufgelöste Strukturen des freien DNS-Moleküls und des Protein–DNS Komplexes. Der Vergleich der dreidimensionalen Strukturen zusammen mit der Analyse der aufgrund der ^{13}C - und ^{15}N -Markierung der DNS gewonnenen strukturellen Daten ermöglichte es, kleine konformationelle Unterschiede zu erkennen, welche auf die Komplexbildung zurückgeführt werden können. Diese strukturellen Veränderungen könnten zur Affinität der *Antennapedia* Homeodomäne zur DNS-Bindungsstelle beitragen. In diesem Kapitel wird ausführlich auf die Entwicklung und Implementierung von NMR-Experimenten zur Resonanzzuordnung und Messung skalarer Kopplungen eingegangen, weil hier zum ersten Mal ^{13}C - und ^{15}N -markierten DNS-Molekülen zur NMR-Strukturermittlung verwendet wurden. Die Vorteile der Isotopenmarkierung der DNS sind aus den hier präsentierten Resultaten klar ersichtlich.