

26. Feb. 1992

Diss. ETH Nr. 9687

**Use of NMR spectroscopy for the study of small proteins in the native
and in the urea-unfolded form: application to the N-terminal domain
of the phage 434 repressor**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

DARIO NERI

Dottore in Chimica, Università di Pisa e Scuola Normale Superiore di Pisa

born in Rome on the 1st of May, 1963

citizen of Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. K. Wüthrich, examiner

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



1992

1. ABSTRACT

The N-terminal domain of the repressor of the phage 434 (residues 1-69), a small helical globular protein, has been investigated by NMR in aqueous solution. With this technique, the three-dimensional structure of this protein was solved and its behaviour upon urea-denaturation was studied. In addition, new NMR experiments for the structural and dynamical characterization of proteins in solution were developed using the 434 repressor(1-69) system.

The work presented in this dissertation is divided in seven main parts which are essentially independent. Chapter 3 describes how this small protein was produced in large quantities, purified and labeled with NMR-active nuclei (^{15}N or ^{13}C). Chapter 4 describes how the resonances of the 434 repressor(1-69) were assigned and how its secondary structure was determined. Chapter 5 describes the solution structure of the 434 repressor(1-69) in aqueous solution, as determined by NMR spectroscopy and distance geometry calculations. The structure is very well determined for the protein segment 1-63, whereas the terminal residues 64-69 are conformationally disordered. This three-dimensional structure is then compared with the crystal structure of the same protein in chapter 6. The two structures are overall very similar. In chapter 7, novel NMR experiments for protein structure characterization are described, which were developed using the 434 repressor(1-69) system. In chapter 8 the behaviour of the 434 repressor(1-69) upon urea-induced denaturation is described. This study has led to the first complete assignment of a protein in an unfolded state. Finally, in chapter 9 the cloning and properties of the 434 repressor(1-63), a truncated version of the 434 repressor(1-69), are described. This protein has essentially the same structure of the polypeptide segment 1-63 in the uncleaved 434 repressor(1-69). Information on the

residual structure conserved by the protein in the presence of 7M urea was also collected.

RIASSUNTO

Il dominio N-terminale del fago 434 (con residui 1-69), una piccola proteina globulare, è stata studiata con la tecnica NMR in soluzione acquosa. La struttura tridimensionale di questa proteina è stata determinata, come pure è stato investigato il suo processo di denaturazione mediato da urea. In aggiunta, nuovi esperimenti NMR sono stati sviluppati con il repressore 434, utili per la caratterizzazione strutturale e dinamica di proteine in soluzione.

La tesi è divisa in sette parti essenzialmente indipendenti. Il capitolo 3 descrive come questa piccola proteina è stata prodotta in grande quantità, purificata e marcata con nuclei NMR-attivi (^{15}N o ^{13}C). Il capitolo 4 descrive come le risonanze del repressore 434 (1-69) sono state assegnate e come la struttura secondaria fu determinata. Il capitolo 5 descrive la struttura del repressore 434 (1-69) in soluzione acquosa, determinata con spettroscopia NMR e calcoli "distance geometry". La struttura è molto ben determinata per il segmento proteico 1-63, mentre i residui terminali 64-69 sono disordinati conformazionalmente. Questa struttura è stata confrontata nel capitolo 6 con la struttura determinata mediante diffrazione a raggi X. Le due strutture sono nel complesso molto simili. Nel capitolo 7 vengono descritti nuovi esperimenti NMR per la caratterizzazione strutturale di proteine, sviluppati con il repressore 434 (1-69). Nel capitolo 8 viene descritto il comportamento del repressore 434 (1-69) in seguito a denaturazione mediata da urea. Questo studio ha permesso il primo assegnamento completo delle risonanze di una proteina nello stato denaturato. Infine, nel capitolo 9 si

descrive il clonaggio e le proprietà del repressore 434 (1-63), una versione troncata del repressore 434 (1-69). Questa proteina ha essenzialmente la stessa struttura del segmento polipeptidico 1-63 nel repressore 434 (1-69) intatto. In aggiunta, sono state raccolte informazioni sulla struttura residua di questa proteina nella forma denaturata in presenza di urea.