

Diss. ETH Nr. 11399

**The bifunctional  
 $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor from *Ragi*:  
Three-dimensional structure,  
inhibitory properties and oxidative  
folding *in vivo* and *in vitro***

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

presented by

**Klaus Maskos**

Diplombiologe (Universität Regensburg, Germany)

born on December 16, 1966

Federal Republic of Germany

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Rudi Glockshuber, examiner

Prof. Dr. Ulrich Suter, co-examiner

1995

## Abstract

The aim of this work was the structural and biochemical characterization of the bifunctional  $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor from *Eleusine coracana* Gaertneri (RBI). RBI represents the prototype of a relatively new class of plant  $\alpha$ -amylase and trypsin inhibitors. The monomeric inhibitor consists of 122 amino acids and is stabilized by 5 intramolecular disulfide bonds. RBI is the only member of the protein family which possesses both inhibitory functions simultaneously. No three-dimensional structure had been determined for any member of the inhibitor family.

In the first part of the thesis, an efficient system for functional secretory expression of RBI in *E. coli* on minimal medium was established in order to prepare  $^{15}\text{N}$ -labeled RBI for the determination of its solution structure by NMR. By using an inducible T7 promoter, coexpression of the disulfide catalyst DsbA and addition of reduced glutathione to the growth medium, the yields of functional RBI in  $^{15}\text{N}$ -minimal medium could be strongly increased, which was the prerequisite to obtain sufficient amounts of purified,  $^{15}\text{N}$ -labeled RBI for structure determination.

In collaboration with S. Strobl (ETH Zürich) and Dr. T. Holak (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Germany), the three-dimensional NMR structure of RBI was determined. RBI possesses a hitherto unknown fold for serine proteinase inhibitors. It contains 4  $\alpha$ -helices with up-and-down topology comprising residues 18-29, 37-51, 58-65, and 87-94, and a two-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet (residues 67-69 and 73-75). The 5 disulfide bonds are formed between residues 6/55, 20/44, 29/85, 45/103, and 57/114. The conformation of the trypsin binding loop in RBI is identical to the canonical conformation observed for most serine proteinase inhibitors with known three-dimensional structure.

As a first step for the biochemical characterization of RBI, its inhibitory activities were determined. RBI is a strong, competitive inhibitor of bovine trypsin ( $K_i = 1.2 \pm 0.2 \text{ nM}$ ). In accordance with the standard mechanism observed for most protein inhibitors of serine proteinases, RBI binds to trypsin in a substrate-like manner where the peptide bond between Arg34 and Leu35 is reversibly cleaved. RBI is also a strong inhibitor of  $\alpha$ -amylase ( $K_i = 11 \pm 2 \text{ nM}$ ). The inhibition pattern for  $\alpha$ -amylase can be well described by a simple, competitive mechanism, when the disaccharide p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltoside is used as substrate. The inhibition mode becomes more complex when larger

oligosaccharide substrates (7 to 27 saccharide units) are used. Trypsin and  $\alpha$ -amylase bind simultaneously to RBI and form a stable, ternary complex with the inhibitor in a 1:1:1 stoichiometry. The binding sites for the target enzymes are fully independent.

In a series of site-directed mutagenesis experiments, the role of disulfide bonds for the stability and function of RBI was investigated. The Cys20/Cys44 disulfide was found to be essential for the intrinsic stability of the inhibitor. Removal of the Cys29/Cys85 disulfide, which stabilizes the conformation of the trypsin binding loop, strongly increases the loop flexibility and the substrate character of RBI for trypsin. Exchange of Cys55 for an alanine leads to a native, dimeric RBI variant with native disulfide pattern that dimerizes oxidatively via Cys6. The C55A dimer has the same affinity for trypsin as natural RBI, but is no longer an inhibitor of  $\alpha$ -amylase.

In the last part of this work, oxidative folding of RBI was investigated *in vitro* and *in vivo*. For *in vivo* folding studies, the influence of coexpression of the periplasmic disulfide oxidoreductases DsbA and DsbC on the yield of RBI was analyzed. For folding *in vivo*, isomerization of scrambled disulfides was found to be yield-limiting. Coexpression of DsbA mutants with different redox properties showed that the yields of native inhibitor were independent of the redox potential of DsbA. Coexpression of DsbC strongly increased the yield of RBI up to 25-fold, even in the absence of reducing agents in the periplasm. Therefore, the intrinsic disulfide isomerase activity of DsbC is significantly higher than that of DsbA *in vivo*.

Fully consistent results were obtained from *in vitro* folding studies. Reduced, unfolded RBI refolds spontaneously to the native protein in glutathione redox buffers. Especially under reducing conditions, only a limited number of folding intermediates is observed, whose isomerization determines the overall rate of RBI folding. Stoichiometric and catalytic amounts of DsbA and DsbC were used to study the role of both enzymes during oxidative folding of the inhibitor. While DsbA is mainly involved in random oxidation of reduced RBI, the most important role of DsbC for RBI folding *in vitro* is the isomerization of nonnative disulfide bonds. Therefore, DsbA and DsbC ideally complement each other as catalysts of oxidative protein folding in the bacterial periplasm.

## Kurzfassung

Ziel dieser Arbeit war, den bifunktionalen  $\alpha$ -Amylase/Trypsininhibitor aus *Eleusine coracana* Gaertneri (RBI) in struktureller und biochemischer Hinsicht zu charakterisieren. RBI stellt den Prototyp einer relativ neuen Klasse von pflanzlichen  $\alpha$ -Amylase- und Trypsininhibitoren dar. Der monomere Inhibitor besteht aus 122 Aminosäuren und wird durch 5 intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. RBI ist das einzige Mitglied dieser Proteinfamilie, das beide inhibitorischen Eigenschaften gleichzeitig besitzt.

Im ersten Teil der Doktorarbeit wurde ein effizientes System zur funktionellen, sekretorischen Expression von RBI in *E. coli* Minimalmediumkulturen etabliert, um  $^{15}\text{N}$ -markiertes RBI für die Aufklärung der NMR-Struktur zu erhalten. Durch die Verwendung eines induzierbaren T7-Promotors, der Koexpression des Disulfidkatalysators DsbA und der Zugabe reduzierten Glutathions zum Wachstumsmedium konnte die Ausbeute an funktionellem RBI in  $^{15}\text{N}$ -Minimalmedium stark gesteigert werden. Dies war die Voraussetzung, um genügend Mengen an gereinigtem,  $^{15}\text{N}$ -markiertem RBI für die Struktur-aufklärung zu erhalten.

In Zusammenarbeit mit S. Strobl (ETH Zürich) und Dr. T. Holak (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland) wurde die dreidimensionale NMR-Struktur von RBI bestimmt. RBI besitzt ein bis dato unbekanntes Faltungsmotif für Serinproteinaseinhibitoren. Es besteht aus 4  $\alpha$ -Helices mit "auf-ab"-Topologie, welche die Reste 18-29, 37-51, 58-65 und 87-94 beinhalten, und einem zweisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt (Aminosäurereste 67-69 und 73-75). Die 5 Disulfidbrückenbindungen werden zwischen den Resten 6/55, 20/44, 29/85, 45/103 und 57/114 ausgebildet. Die Konformation des Trypsinbindungsloops in RBI entspricht der kanonischen Konformation, die für die meisten Trypsininhibitoren mit bekannter dreidimensionaler Struktur beobachtet wird.

Als ersten Schritt der biochemischen Charakterisierung von RBI wurden die inhibitorischen Eigenschaften bestimmt. RBI ist ein starker, kompetitiver Inhibitor von Rindertrypsin ( $K_i = 1.2 \pm 0.2 \text{ nM}$ ). In Übereinstimmung mit dem Standardmechanismus, der für die meisten Proteininhibitoren von Serinproteinasen beobachtet wird, bindet RBI an Trypsin in einer substratähnlichen Weise, wobei die Peptidbindung zwischen Arg34 und Leu35 reversibel gespalten wird. RBI ist auch ein starker  $\alpha$ -Amylaseinhibitor ( $K_i = 11 \pm 2 \text{ nM}$ ). Die Art der  $\alpha$ -Amylaseinhibition kann sehr gut durch einen einfachen kompetitiven Mechanismus beschrieben werden, wobei das Disaccharid p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-

maltosid als Substrat benutzt wird. Die Art der Inhibition wird komplizierter, wenn längere Oligosaccharidsubstrate (7-27 Saccharideinheiten) benutzt werden. Trypsin und  $\alpha$ -Amylase binden gleichzeitig an RBI und bilden mit dem Inhibitor im Verhältnis 1:1:1 einen stabilen ternären Komplex. Die Bindungsstellen für die Zielenzyme sind vollständig unabhängig.

In einer Reihe von gezielten Mutageneseexperimenten wurde die Rolle der Disulfidbrücken für die Stabilität und Funktion von RBI untersucht. Die Disulfidbrücke Cys20/Cys44 ist unverzichtbar für die intrinsische Stabilität des Inhibitors. Wird die Disulfidbrücke Cys29/Cys85 entfernt, welche die Konformation der Trypsinbindungsschleife stabilisiert, erhöht sich die Flexibilität dieser Schleife und somit auch die Substrateigenschaften von RBI für Trypsin stark. Ersetzt man Cys55 durch Alanin, erhält man eine native, dimere RBI-Variante, die das native Disulfidverbrückungsmuster aufweist und über Cys6 oxidativ dimerisiert. Das C55A-Dimer inhibiert Trypsin wie der Wildtyp, aber nicht mehr  $\alpha$ -Amylase.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die oxidative Faltung von RBI *in vitro* und *in vivo* untersucht. Für die *in vivo* Faltungsstudien wurde der Einfluss der Koexpression der periplasmatischen Disulfidoxidoreduktasen DsbA und DsbC auf die RBI-Ausbeute analysiert. Für die *in vivo* Faltung ist die Isomerisierung der falschverbrückten Disulfide limitierend. Die Koexpression einer Reihe von DsbA-Mutanten mit unterschiedlichen Redoxeigenschaften zeigte, dass die Ausbeute an nativem Inhibitor unabhängig vom DsbA-Redoxpotential ist. Die Koexpression von DsbC erhöht die Ausbeute an RBI bis zu 25-fach, selbst in der Abwesenheit reduzierender Substanzen im Periplasma. Die intrinsische Disulfidisomerase-aktivität von DsbC ist deshalb *in vivo* signifikant höher als jene von DsbA.

Vollständig übereinstimmende Ergebnisse wurden durch *in vitro* Faltungsstudien erhalten. Reduziertes, ungefaltetes RBI faltet sich spontan in Glutathionredoxpuffern zum nativen Protein. Speziell unter reduzierenden Bedingungen wird nur eine begrenzte Anzahl an Faltungsintermediaten, deren Isomerisierung die Gesamtgeschwindigkeit der RBI-Faltung bestimmen, beobachtet. Um den Einfluss von DsbA und DsbC während der oxidativen Faltung des Inhibitors zu untersuchen, wurden sowohl stöchiometrische, als auch katalytische Mengen beider Enzyme verwendet. Während DsbA reduziertes RBI zufällig aufoxidiert, ist die wichtigste Aufgabe von DsbC während der RBI-Faltung *in vitro* die Isomerisierung der nicht-nativen Disulfidbrücken. DsbA und DsbC ergänzen sich deshalb ideal bei der Katalyse der oxidativen Proteinfaltung im Periplasma.