

Diss. ETH Nr. 12485

**Molekularer Darwinismus
Ein neuer Denkansatz zur strukturellen Aufklärung der
Immunsuppressivität und Antitumoraktivität der
seminalen Ribonuklease des Rindes**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

Nathalie Trabesinger-Rüf

Dipl. Natw. ETH Zürich
geboren am 28. Januar 1969
in Uster



041E

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. S. A. Benner, Referent
Prof. Dr. N. Amrhein, Korreferent

Zürich 1997

ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl die Konzepte von C. Darwin vor über einem Jahrhundert etabliert wurden, ist es noch immer schwierig, diejenigen Aminosäureänderungen zwischen homologen Proteinen in verschiedenen Spezies zu erkennen, welche durch adaptive Evolution auf molekularer Basis eingeführt wurden. Das Studium der seminalen und pankreatischen RNasen in der Linie der Paarhufer ermöglicht es nicht nur, die Mechanismen des molekularen Darwinismus besser zu verstehen, sondern auch neue Erkenntnisse über die Entstehung neuer biologischer Funktionen in der RNase-Familie zu erlangen.

Aus dem Rind (*Bos taurus*) können zwei paraloge Ribonukleasen isoliert werden: RNase A aus der Bauchspeicheldrüse und BS-RNase aus der Samenflüssigkeit. Die beiden Enzyme unterscheiden sich in 23 der je 124 Aminosäuren, wobei RNase A ein Monomer und BS-RNase ein Homodimer ist, dessen Untereinheiten mittels Disulfidbindungen verknüpft sind.

BS-RNase besitzt im Gegensatz zu RNase A die folgenden relevanten biologischen Eigenschaften:

- Immunosuppressivität
- Antitumoraktivität

In dieser Doktorarbeit wurde der strukturelle Ursprung der biologischen Eigenschaften der Immunosuppressivität und der Antitumoraktivität sowie die evolutionären Zusammenhänge der seminalen und der pankreatischen RNasen in Paarhufern genauer untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass Genduplikationen, welche in der Linie der Paarhufer stattgefunden haben, ein pankreatisches, ein seminales und ein cerebrales RNase-Gen schufen. Nach der Divergenz der Kamele konnten in Spezies wie der Giraffe, dem Schaf, der Saiga, dem Ducker, dem Kudu, dem Kaffern- und dem Waldbüffel seminale RNase-Pseudogene charakterisiert werden, welche hohe "non-silent" zu "silent"-Verhältnisse besaßen. Zwei Perioden mit positivem Selektionsdruck (adaptive Evolution), welche kurz nach der Genduplikation und kurz vor der Divergenz des Hausrindes beobachtet werden konnten, wurden durch eine Periode mit negativem Selektionsdruck in den seminalen Vorläufer-RNasen unterbrochen. Diese Perioden mit adaptiver Evolution deuten auf die Entstehung einer neuen biologischen Funktion in der seminalen RNase hin. Während dieser Phase mit adaptiver Evolution, welche kurz vor der Divergenz des Hausrindes erfolgte, wurden die Aminosäuren Asn17, Cys31, Gly111 und Ser115 in die seminale Vorläufer-RNase eingeführt und neue biologische Funktionen, wie Immunosuppressivität, konnten gewonnen werden. In der Entwicklung der pankreatischen RNase konnte eine Phase mit negativem Selektionsdruck nach der Genduplikation sowie ein positiver Selektionsdruck nach der Divergenz des Duckers bestimmt werden.

Das seminale RNase-Pseudogen des Kafferbüffels besitzt im Vergleich zur BS-RNase des Hausrindes vier unterschiedliche Aminosäuren: Ser17, Phe31, Ala111 und Tyr115. Werden diese vier Aminosäuren in BS-RNase eingeführt, so konnte eine vierfache Abnahme der Aktivität gegenüber Duplex-RNA, eine starke Verringerung des S-Peptidaustausches auf 30 % sowie eine 3.5 fache Reduktion der immunosuppressiven Aktivität beobachtet werden. Die Abnahme der Aktivität gegen Duplex-RNA konnte auf die Aminosäureänderung G111A in der Vorläufer-RNase zurückgeführt werden. Die Einführung von Phe31 anstelle eines Cysteins (intermolekulare Disulfidbindung) in BS-RNase bewirkt eine flexiblere Rotation um die Cys32-Cys32' Bindung und eine Abnahme der S-Peptidüberlappung. Diese flexiblere Quartärstruktur spiegelt sich in der reduzierten Bindungseigenschaft der seminalen Vorläufer-RNase in der akrosomalen und mitochondrialen Region von Spermien des Hausrindes wieder.

Mittels Westernblot-Experimenten konnte gezeigt werden, dass nur in der seminalen Flüssigkeit des Hausrindes eine dimere RNase (BS-RNase) vorhanden war. In den seminalen Flüssigkeiten des Kaffern- und Waldbüffels sowie des Schafes konnten zwar glykosylierte RNasen, hingegen keine dimeren RNasen charakterisiert werden. In den seminalen Flüssigkeiten des Leiherrhirsches, der Saiga und des Duckers konnten weder glykosylierte RNasen noch seminal exprimierte dimere RNasen gefunden werden.

In kinetischen Studien mit dem humanen plazentalen Inhibitor (PRI) und RNase-Mutanten konnte eine Korrelation zwischen der Inhibitionsstärke unter reduzierenden Bedingungen und der Ausbildung des S-Peptidaustausches festgestellt werden. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurden nur monomere RNasen inhibiert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass BS-RNase im Gegensatz zu RNase A durch anionische Glykolipide wie G_{M3} inhibiert wurde. Bei dieser Bindung ist ein Lipidteil, ein Zuckerteil sowie eine negative Ladung wichtig. Dimere RNasen, welche einen hohen Anteil der N-terminal überlappten Proteinform besaßen oder stark positiv geladen waren, wurden durch G_{M3} stark inhibiert. Desweiteren wurden dimere RNase A-Mutanten, welche ein Gly38 und Gly111 enthielten, ebenfalls durch G_{M3} inhibiert.

Fluoreszenzstudien zeigten, dass die Einführung der Aminosäuren Asn17, Cys31, Gly111 und Ser115 im Vorläufer der BS-RNase eine Bindung in der akrosomalen und mitochondrialen Region der Spermien des Hausrindes erlaubte. BS-RNase wurde hingegen nicht in der akrosomalen und mitochondrialen Region von Spermien des Schafes gebunden.

SUMMARY

Although the concepts of C. Darwin were established over a century ago it is still difficult to recognize those amino acid changes among homologous proteins which have been introduced by adaptive evolution. The study of the seminal and pancreatic RNases in the lineage of *Artiodactyla* not only made it possible to understand the mechanism of molecular darwinism in a better way but also to obtain new insights into the evolution of emergent biological functions within the RNase-family.

Two paralogous ribonucleases are isolated from bovine (*Bos taurus*): RNase A from the pancreas and BS-RNase from the seminal fluid. The two enzymes differ in 23 of the 124 amino acids. RNase A is a monomer and BS-RNase is a dimer with the subunits connected by disulfide bridges.

In contrast to RNase A, BS-RNase features the following important biological functions:

- Immunosuppressivity
- Antitumor-activity

In this dissertation the structural origin of the biological functions of immunosuppressivity and antitumoractivity and the evolutionary relationship between the seminal and pancreatic RNases in *Artiodactyla* have been investigated.

It was shown that gene duplications in the lineage of *Artiodactyla* created a pancreatic, a seminal and a cerebral RNase-gene. After the divergence of the camels, seminal RNase-pseudogenes with high ratios of "non-silent" to "silent" changes could be observed in the species of giraffe, sheep, saiga, duiker, kudu, cape buffalo and forest buffalo. Two periods with positive selection (adaptive evolution) for these seminal ancestor-RNases were found. The first was shortly after the gene duplication and the second just before the divergence of bovine. They were separated by a period of negative selection. These periods of adaptive evolution indicate the development of a new biological function in the seminal RNase. During the second period of adaptive evolution just before the divergence of bovine, the amino acids Asn17, Cys31, Gly111 and Ser115 were introduced into the seminal ancestor-RNase and new biological functions including immunosuppressivity have emerged. The development for the pancreatic RNase involved an episode of negative selection after the gene duplication and an episode of positive selection after the divergence of the duiker.

The seminal RNase-pseudogene of cape buffalo contains four different amino acids compared to BS-RNase of bovine: Ser17, Phe31, Ala111 and Tyr115. By

introducing these four amino acids into BS-RNase, a four fold decrease of activity against double strand RNA, a reduction of the S-peptide swap to 30% and a 3.5 fold reduction of the immunosuppressivity could be observed. The reduction of the double-strand activity could be linked to the amino acid change G111A in the ancestor-RNase. The introduction of Phe31 instead of cystein (intermolecular disulfide bridge) in BS-RNase showed a more flexible rotation of the Cys32-Cys32' bond and a reduction of the S-peptide Swap. This more flexible quaternary structure results in a reduced binding affinity to the seminal ancestor-RNase in the acrosomal and mitochondrial regions of the bovine sperm.

Western blot analyses showed that only the seminal fluid of bovine contained a RNase with dimeric structure (BS-RNase). In the seminal fluids of cape buffalo, forest buffalo, and sheep, glycosylated RNases were found but no RNases with dimeric structures could be characterized. In the seminal fluids of deer, saiga, and duiker neither glycosylated nor RNases with dimeric structures are present.

In kinetic studies with the human placental inhibitor (PRI) and RNase-mutants a correlation between the strength of inhibition under reductive conditions and the formation of the S-peptide swap has been demonstrated. Under non-reductive conditions, only RNases with monomeric structures were inhibited. Additionally it was illustrated that contrary to RNase A, BS-RNase was inhibited by anionic glycolipides like G_{M3} . A lipid component, a sugar component and a negative charge are important. Dimeric RNases with a high content of S-peptide swap or a high positive charge were strongly inhibited by G_{M3} . Further, dimeric RNase mutants which contain Gly38 and Gly111 were inhibited by G_{M3} .

Fluorescence studies showed that the introduction of the amino acids Asn17, Cys31, Gly111 and Ser115 into the ancestor of BS-RNase allowed a binding to the acrosomal and mitochondrial regions of bovine sperm. On the other hand no BS-RNase was found to bind to the acrosomal and mitochondrial regions of sheep sperm.