



Universiteit
Leiden
The Netherlands

NMR studies of protein-small molecule and protein-peptide interactions

Guan, J.

Citation

Guan, J. (2013, December 2). *NMR studies of protein-small molecule and protein-peptide interactions*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22565>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/22565>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22565> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Guan, Jia-Ying

Title: NMR studies of protein-small molecule and protein-peptide interactions

Issue Date: 2013-12-02

Samenvatting

Het werk beschreven in dit proefschrift richt zich op de toepassing van diverse kernspinresonantie (*Nuclear Magnetic Resonance, NMR*) technieken voor het bestuderen van de interactie tussen eiwitten en kleine moleculen en tussen eiwitten en peptiden. Er is gebruik gemaakt van zowel klassieke NMR-technieken als recent ontwikkelde paramagnetische NMR methoden. Computeranalyses zijn gebruikt om de experimentele data aan te vullen en te visualiseren.

In Hoofdstuk 1 wordt een overzicht van NMR-technieken gegeven die gebruikt worden voor het bestuderen van eiwit-ligand interacties. Vanwege zijn superieure gevoeligheid voor de detectie van zwakke bindingen, is NMR de meest gebruikte techniek voor fragmentgebaseerde geneesmiddelen ontwikkeling, maar de kracht van NMR is niet beperkt tot alleen dit soort onderzoek.

Het werk gepresenteerd in Hoofdstuk 2 geeft gedetailleerde informatie over de karakterisatie van fragmenten die binden aan FKBP12, door gebruik te maken van 1D-¹H NMR. Recente ontwikkelingen in paramagnetische NMR-spectroscopie hebben geleid tot een breed spectrum van toepassingen voor het bestuderen van eiwit-eiwit complexen, maar er zijn weinig studies van eiwit-ligand complexen gerapporteerd. Om geschikte liganden te vinden voor toepassing van paramagnetische NMR-methoden (Hoofdstuk 4), zijn 15 FKBP12 liganden met verschillende bindingsaffiniteiten geselecteerd voor een eerste onderzoek. De geschiktheid van de liganden is bepaald op basis van bindingsaffiniteit, chemische structuur, isomere zuiverheid en veranderingen van chemische verschuivingen (*chemical shifts*) bij binding aan het eiwit. Op basis van de gevonden resultaten zijn de algemene regels voor een ideale ligand als volgt: (1) de ligand moet zich in snelle uitwisseling (*fast exchange*) bevinden op de NMR-tijdschaal; (2) de ligand moet een voldoende aantal goed gescheiden proton resonanties vertonen in het 1D-¹H NMR spectrum; (3) de ligand moet isomeer-zuiver zijn; (4) de ligand moet een duidelijke en meetbare chemische verschuiving vertonen bij binding aan het eiwit. De bindingspositie van het meest geschikte ligand is vervolgens gedetailleerd gekarakteriseerd, zoals beschreven in Hoofdstukken 3 en 4.

Hoofdstuk 3 beschrijft de bepaling van de bindingspositie van een klein molecuul gebonden aan FKBP12, gebaseerd op NOE (*Nucleaire Overhauser Effect*) gegevens. Analyse van de verstoringen in chemische verschuiving (*Chemical shift perturbation, CSP*) toonden aan dat een groot gebied van FKBP12, waaronder de bekende bindingsplaatsen 1 en 2, direct of

indirect wordt beïnvloed door binding van ligand. De CSP ‘kaart’ geeft daarom geen inzicht in de daadwerkelijke bindingsplek. Derhalve zijn NOEs, verkregen uit standaard isotoop gefilterde/gekoppelde NOESY-experimenten, gebruikt om de bindingsplaats en bindingsoriëntatie van het ligand te bepalen. De uiteindelijke structuur is niet in overeenstemming met alle NOEs, wat vermoedelijk wordt veroorzaakt door dynamiek van het ligand in de bindingsplaats. Toch is het resultaat waarschijnlijk betrouwbaar, mede omdat een waterstofbrugnetwerk aanwezig is, welk ook is gevonden bij andere FKBP12 liganden.

Hoofdstuk 4 presenteert een orthogonale NMR methode om de structuur van het hierboven genoemde complex te bepalen, gebaseerd op paramagnetische NMR *pseudocontact shifts* (PCSs). CLaNP-5, een eiwitprobe met twee armen welke een lanthanide-ion kan binden, is bevestigd aan drie verschillende dubbel-cysteïne mutanten van FKBP12. De resultaten tonen aan dat het mogelijk is de bindingsplaats van een ligand te identificeren en een structuur met lage resolutie te verkrijgen door gebruik te maken van ligand-PCSs verkregen uit simpele 1D-¹H NMR spectra. Door de rigide structuur van CLaNP5 was optimalisatie van het *tensor frame* en de positie van de lanthanide niet noodzakelijk, al leidde dit wel tot een hogere kwaliteit van de structuur. Om deze reden kan deze methode in het bijzonder waardevol zijn voor het bestuderen van grotere eiwitten of eiwitten die moeilijk te verrijken zijn met isotopen.

De zwakke interactie en het dynamisch gedrag van kortstondige complexen zijn een uitdaging om te bestuderen met de huidige experimentele hulpmiddelen. De bindingspartners van deze in de natuur voorkomende complexen, meestal eiwitten, hebben een lage specificiteit en kunnen opeenvolgende interacties vertonen met meerdere partners. Hoofdstuk 5 beschrijft de karakterisatie van de dynamiek in een kunstmatig kortlevend complex gevormd door plastocyanine en korte, geladen peptides. Door gebruik te maken van CSP en *PRE* NMR spectroscopie is de dynamiek van de kortstondige complexen gevisualiseerd en vergeleken met de resultaten van elektrostatische *Monte Carlo* (MC) simulaties. De zeer vergelijkbare CSP ‘kaarten’ tussen verschillende complexen evenals de kleine verschuivingen, suggereren een hoge mate van dynamiek. Bovendien tonen de verspreide *PRE*’s de aanwezigheid aan van meerdere oriëntaties. De algehele resultaten suggereren dat de complexen uit meerdere oriëntaties bestaan en door elektrostatische interacties worden gedomineerd. Tevens zijn er aanwijzingen voor zwakke korte-afstandinteracties op grond van de *PRE* data.