



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Spin-label EPR Approaches to Protein Interactions

Son, M. van

Citation

Son, M. van. (2014, December 4). *Spin-label EPR Approaches to Protein Interactions*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/29986>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/29986>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29986> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Son, Martin van

Title: Spin-label EPR approaches to protein interactions

Issue Date: 2014-12-04

SAMENVATTING

Dit proefschrift beschrijft vier onderzoeken aan de structuur en dynamica van biomoleculen met behulp van elektron paramagnetisch resonantie (EPR). In *Hoofdstuk 1* worden de principes van deze magnetische resonantietechniek geïntroduceerd.

Membraanfusie, het samengaan van twee membranen tot één, is in eukaryoten een essentieel biomoleculair proces. De details van het mechanisme van membraanfusie moeten nog worden ontrafeld. In dit kader beschrijft *Hoofdstuk 2* een studie van de interactie tussen twee typen van kleine biomoleculen, de peptiden E en K. De peptiden zijn zodanig ontworpen dat zij een heterodimeer vormen wanneer zij in oplossing gemengd worden, d.w.z. een type peptide vormt een dimeer met het andere type, maar niet met hetzelfde type peptide. We hebben de peptiden met EPR onderzocht en geconcludeerd dat de vorming van het heterodimeer gedetecteerd kan worden met deze techniek. In de volgende fase zijn wij van plan om de peptiden te koppelen aan membraanvesikels. Wij vermoeden dat de modelconstructen die zo ontstaan in staat zijn om membraanfusie te ondergaan. Ons uiteindelijke doel is om EPR toe te passen op de modelconstructen om informatie te verkrijgen over hun structuur tijdens membraanfusie.

Tallose vormen van eiwit-eiwit-interacties zijn betrokken bij celmetabolisme, spiercontractie en signaaloverdracht. Deze interacties variëren van statisch tot dynamisch. *Hoofdstuk 3* rapporteert over een studie naar de dynamische interactie tussen de eiwitten cytochroom *c* (Cc) and cytochroom *c* peroxidase (CcP). Een spinlabel werd op het oppervlak van Cc geplaatst. Conventionele EPR (9 GHz) werd toegepast op Cc in mengsels met verschillende

concentraties van CcP. De spectra laten zien dat het spinlabel geïmmobiliseerd wordt ten gevolge van complexvorming. *Principal component analysis* (PCA) werd gebruikt om de spectra te ontrafelen. De analyse leverde de spectra van twee zuivere componenten op die overeenkomen met een langzame fractie en een snelle fractie van het spinlabel. De bevindingen stemmen overeen met de resultaten van eerdere studies, wat aantoont dat zowel een statisch, stereospecifiek complex als een dynamischer, los gebonden *encounter complex* betrokken zijn bij de interactie tussen Cc en CcP. De PCA-analyse bleek effectief te zijn en kan – in combinatie met EPR – worden beschouwd als een uitstekend gereedschap om eiwit-eiwit-interacties te bestuderen.

Een nuttige manier om informatie te verkrijgen over de structuur van een biomolecuul is door de afstand tussen twee punten te meten, bijvoorbeeld tussen twee paramagnetische centra. Afstanden in het bereik van 1.5 nm tot 6.0 nm zijn goed waarneembaar met gepulste EPR-technieken. Afstanden kleiner dan 1.5 nm zijn moeilijker te meten. *Hoofdstuk 4* verkent de mogelijkheid om de *J*-koppeling (*exchange interaction*) tussen twee spins te relateren aan hun afstand. We hebben vier peptiden onderzocht, elk met twee spinlabels die gescheiden zijn door twee, drie, vier respectievelijk vijf aminozuren. Een voorafgaande *continuous-wave* EPR-studie heeft laten zien dat in twee van deze peptiden de *J*-koppeling significant groter is dan in de andere twee peptiden. In de huidige studie werden verzadigingsexperimenten toegepast op de peptiden om relaxatieparameters van de elektronspins te verkrijgen. We hebben gezien dat naarmate de spinlabels dichter bij elkaar zijn, de relaxatie sneller is, wat wij toeschrijven aan een navenant hogere *J*-koppeling. Dit maakt het mogelijk om onderscheid te maken tussen paren van spinlabels op verschillende posities in de peptiden. Wij concluderen dat verzadigingsexperimenten gebruikt kunnen worden voor het bepalen van korte

afstanden. In tegenstelling tot gepulste EPR-technieken om afstanden te bepalen, kunnen verzadigingsexperimenten worden uitgevoerd onder biologisch relevante condities, namelijk in oplossing en bij kamertemperatuur.

Eiwitvouwing is in iedere levende cel een cruciaal proces. Correcte vouwing van het eiwit leidt tot een driedimensionale structuur die in staat is om een biologische functie uit te voeren. Foutieve vouwing van het eiwit wordt als de oorzaak gezien van aandoeningen als taaislijmziekte en de ziekte van Alzheimer. *Hoofdstuk 5* beschrijft een nieuwe methode om experimentele gegevens over het vouwingsproces te verkrijgen. Twee spinlabels werden op verschillende plekken van het eiwit flavodoxine geplaatst. Met *double electron-electron resonance* (DEER) hebben we de afstand gemeten tussen de spinlabels op flavodoxine in verschillende concentraties denaturant. De met DEER verkregen afstandsverdelingen laten zien dat de lokale structuur in het ontvouwende eiwit kan worden gemeten en levert bewijs voor een vouwingsintermediair dat lokaal compacter is dan het eiwit in de native conformatie. We tonen aan dat we de ontvouwing van flavodoxine met DEER kunnen volgen en veranderingen in de lokale structuur kunnen meten die samengaan met ontvouwing.

