



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Dynamics in electron transfer protein complexes

Bashir, Q.

### Citation

Bashir, Q. (2010, October 27). *Dynamics in electron transfer protein complexes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16077>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/16077>

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

## Nederlandse samenvatting

Een grote meerderheid van alle biologische processen wordt gereguleerd door eiwit-eiwit interacties. Afhankelijk van de affiniteit van de interacties variëren eiwitcomplexen van statisch tot vergankelijk. De statische complexen worden gekarakteriseerd door hoge affiniteit en een lage dissociatiesnelheid. De eiwitten betrokken in dergelijke complexen vertonen een hoge specificiteit en vormen een enkel, goed gedefinieerd complex. De vergankelijke complexen, daarentegen, worden gekenmerkt door lage affiniteit en zowel hoge associatie-als dissociatiesnelheden. De eiwitten betrokken bij deze complexen vertonen lage specificiteit en hebben interacties met meerdere partners. De snelle associatie en dissociatie van de vergankelijke complexen wordt bereikt door de vorming van een ontmoetingscomplex, welke in evenwicht is met het goed gedefinieerde complex. Het evenwicht tussen het ontmoetingscomplex en het specifieke complex varieert tussen verschillende complexen. Elektrontransportprocessen waarbij een hoge omzettingssnelheid nodig is, worden uitgevoerd door vergankelijke eiwitcomplexen.

Het werk beschreven in dit proefschrift is gericht op de dynamica in vergankelijke complexen, met een nadruk op de karakterisering van het ontmoetingscomplex. Gebruikmakend van kernspinresonantiespectroscopie en Monte-Carlo-computersimulaties, hebben wij het evenwicht tussen het ontmoetingscomplex en het specifieke complex bestudeerd. We hebben ook onderzocht hoe dit evenwicht gemoduleerd kan worden door enkele mutaties in de grensoppervlakte van de eiwitten.

Hoofdstuk 2 beschrijft de studie naar de binding van gistcytochroom *c* (Cc) aan GALDH uit *A. thaliana*, met behulp van kernspinresonantiespectroscopie. Het interactieoppervlak van gist-Cc werd bepaald aan de hand van de verandering van de chemische verschuiving van zijn residuen, veroorzaakt door de interactie met GALDH. De geringe grootte van deze veranderingen geeft aan dat het complex dynamisch van aard is. De locatie van de Cc-residuen betrokken bij de interactie met GALDH is beperkt tot een enkele plek rondom de rand van de heem van Cc. Het interactieoppervlakte is vergeleken met die met zijn andere interactiepartners. Uit de resultaten blijkt dat Cc gebruik maakt van een geconserveerd oppervlakte om interacties met zijn partners aan te gaan. We hebben ook onderzocht wat het effect is van een

negenvoudige mutant van oppervlakteladingen van GALDH op de interactie met Cc. De dissociatieconstanten van GALDH en de negenvoudige mutant bedragen respectievelijk  $50 \pm 10 \mu\text{M}$  en  $44 \pm 10 \mu\text{M}$ . De bindingsplaats van de negenvoudige mutant lijkt op die van wildtype GALDH. Blijkbaar blijft de interactie bestaan na het verwijderen van de negen geladen residuen van de oppervlakte van GALDH.

Alhoewel vergankelijke eiwit interacties betrokken zijn bij vele biologische processen, is er maar weinig bekend over de principes die ten grondslag liggen aan deze interacties, door de moeilijkheden geassocieerd met het karakteriseren van de structuren. De meeste kennis over eiwitherkenning en binding in de vergankelijke eiwitcomplexen, is opgedaan in de studie naar stabiele en statische complexen. Het is niet duidelijk begrepen of zogenaamde “binding hotspots”, die frequent voorkomen in statische complexen, ook bestaan in vergankelijke complexen. In hoofdstuk 3 hebben we gist-Cc en cytochroom *c* peroxidase (CcP) gebruikt als modeleiwitten om deze vraag te beantwoorden. Met behulp van kernspinresonantiespectroscopie is aangetoond dat residu R13 van Cc een hotspot is in dit vergankelijke complex, omdat de R13A mutatie de binding destabiliseert. We hebben ook gebruik gemaakt van een dubbele-mutatiecyclus en laten zien dat R13 van Cc interacties aangaat met Y39 van CcP. Deze resultaten tonen aan dat binding hotspots ook de interacties in zwakke en vergankelijke complexen zouden kunnen bepalen.

Het proces van eiwitcomplexvorming wordt gemodelleerd door een twee-staps proces. De eiwitten benaderen elkaar eerst, gedreven door diffusie en associëren in een ontmoetingscomplex, gevolgd door de vorming van het specifieke complex. Het ontmoetingscomplex is aangetoond bij een aantal eiwitcomplexen. Het visualiseren van het ontmoetingscomplex is tot nu toe een probleem door een gebrek aan experimentele methoden om het te onderzoeken. In hoofdstuk 4 hebben we het ontmoetingscomplex gekarakteriseerd in het zwakke elektron transport complex gevormd door Cc en CcP.

Gebruikmakend van paramagnetisch versterkte relaxatie in kernspinresonantie spectroscopie, hebben we de complete conformationele ruimte die door CcP wordt doorzocht in het ontmoetingscomplex experimenteel in kaart gebracht. Het ontmoetingsensemble werd ook berekend met behulp van Monte Carlo computersimulaties, waarbij alleen de elektrostatische interacties op atomair niveau in ogenschouw werden genomen. De experimentele data tezamen met de simulaties

verschafte een completer beeld van het ontmoetingscomplex dan wat werd verkregen door beide methoden afzonderlijk. De resultaten tonen aan dat Cc slechts ongeveer 15% van de oppervlakte van CcP bemonstert in het ontmoetingscomplex, nabij de bindingsplaats. De relatieve bezetting van het ontmoetingscomplex en het specifieke complex werden bepaald op respectievelijk 30% en 70%, met derhalve slechts 0.5 kcal/mol verschil in vrije energie tussen de twee toestanden. Dit fragiele evenwicht zorgt waarschijnlijk voor een snelle elektronenoverdracht en een hoge omzettingssnelheid. De gebruikte aanpak biedt voor het eerst een methode om de fractie van het ontmoetingscomplex te bepalen.

De bezettingsgraad van het ontmoetingscomplex kan variëren in verschillende complexen. We hebben laten zien dat de relatieve bezetting van het ontmoetingscomplex en het specifieke complex kan worden gevarieerd door middel van mutaties van enkele residuen in het grensoppervlak (hoofdstuk 5). Door gebruik te maken van paramagnetisch versterkte relaxatie en Monte-Carlo-computersimulaties, hebben we laten zien dat de bezettingsgraad van het ontmoetingscomplex verhoogd en verlaagd kan worden door enkele puntmutaties in het vergankelijke complex gevormd door gist Cc en CcP. Het native complex bestaat in een evenwicht van 30% van het ontmoetingscomplex en 70% van het specifieke complex. Enkel de R13K mutatie verhoogt de bezetting van het ontmoetingscomplex naar 50% en de R13A mutatie draait het evenwicht zelfs om, naar 80% van het ontmoetingscomplex. De T12A mutatie verlaagt de bezetting van het ontmoetingscomplex juist naar 10%. Hieruit blijkt dat door een zorgvuldige keuze van puntmutaties aan de grensoppervlakte het mogelijk is de bezettingsgraad van het ontmoetingscomplex en de bindingsspecificiteit in vergankelijke complexen te moduleren.

Paardecytochroom *c* (pCc) vormt een niet-fysiologisch complex met gist-CcP. Dit complex is meer dynamisch dan het fysiologische complex tussen gist-Cc (gCc) en CcP (gCcP). De structuren van het specifieke complex verschillen in de relatieve oriëntatie van de Cc moleculen. gCc heeft een Arg residu op positie 13. In hoofdstuk 5 hebben we laten zien dat het gist-Cc-CcP complex meer dynamisch kan worden gemaakt door dit residu te muteren naar een Lys of Ala. pCc heeft een Lys residu op de equivalente positie. In hoofdstuk 6 hebben we onderzoek verricht naar de rol van dit residu in het controleren van de specificiteit van het hCc-gCcP complex. De resultaten onthullen dat

de K13R mutatie het zeer dynamische, niet-fysiologische pCc-gCcP complex verandert in een meer specifieke variant, die lijkt op het gCc-gCcP complex. Anderzijds maakt de K13A mutatie het complex meer dynamisch. De specificiteit van het vergankelijke complex kan dus veranderd worden door middel van rationele aanpassingen van residuen op het grensvlak.