



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Transient interactions studied by NMR : iron sulfur proteins and their interaction partners

Xu, X.

Citation

Xu, X. (2009, January 21). *Transient interactions studied by NMR : iron sulfur proteins and their interaction partners*. Leiden. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13428>

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/1887/13428>

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

Summary

Protein-protein interactions play important roles in a variety of cellular processes. The lifetime and the affinity of a protein complex are well correlated with its function in a process. Transient interactions between electron transfer proteins are of great interests because a fast association and a fast turnover have to be balanced to allow a fast electron-flow. The study described in this thesis focuses on the dynamic interactions between iron-sulfur proteins and their interacting partners, with an aim to advance our understanding the basic mechanism of transient protein-protein interactions. Chapter 1 is a general introduction on transient protein interactions, the proteins of this study, and different nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) methods.

In chapter 2, we described the characterization of a weak complex formed between yeast cytochrome *c* (*Cc*) and bovine adrenodoxin (*Adx*) by paramagnetic NMR and small angle X-ray scattering (SAXS). The study highlighted the dynamics of the complex. A rigid complex was constructed by introducing cysteines on the protein surfaces and cross-linking the proteins by an intermolecular disulfide bridge. Comparisons were made between the native and the rigid control complex. Chemical shift perturbations upon complex formation are large in the rigid complex, which is in contrast to the small chemical shift changes in the native complex. The intermolecular paramagnetic effects, originating from the metal sites, are significant in the rigid complex, whereas these effects are not observable due to an extensive averaging of multiple orientations in the native complex. A spin label was attached to *Cc*, cause

widespread intermolecular PRE effects on the surface of Adx in the native complex, suggesting *Cc* samples a large area of complex. The mobility of the native complex was simulated by creating an ensemble of structures with different orientations. Within this ensemble, *Cc* needs to sample at least 50% surface of Adx to reduce any PCS effect to an insignificant level.

SAXS indicated that the native complex forms tetramers at higher concentrations and low ion strength conditions, through a stochastic mechanism. In contrast, the crosslinked complex does not form oligomers. The SAX data also suggested a dynamic process of complex formation of *Cc*/Adx.

In the two-step model of complex formation, the encounter state precedes the final stereo-specific complex. The role of the encounter state has been suggested to facilitate the optimal orientation formation through reduced dimensional search. Often, the encounter state exists as a small fraction of the population of a complex. The dynamic complex of *Cc* and Adx characterized in this chapter provides an example of two proteins that largely exist as multiple orientations in fast exchange, yet active in electron transfer. Thus, these two proteins form a complex without a dominant orientation. It is concluded that this complex can be considered as a pure encounter complex.

In the chapter 3, a method based on paramagnetism-induced residual dipolar coupling (RDC) was applied to the study on the dynamics of the complex Adx/*Cc*. A paramagnetic lanthanide probe CLaNP-5 was specifically attached to two cysteine residues of a *Cc* mutant via two arms, and cause little perturbation for the native interaction. The rigidly attached probe induced large paramagnetic effect and slight alignment on *Cc*. The RDCs observed on *Cc* are as large as 8-9

Hz. The RDC observed on the Adx in the complex is dramatically reduced due to the fast averaging of multiple orientations. The orientation exchanges of the two proteins in the complex were simulated with a similar method described in chapter 2. Simulation shows that Cc needs to sample a large part of the surface of Adx to average the alignment effect on Adx. This method is straightforward in observing intermolecular dynamics of protein complexes or multiple-domain proteins and generally applicable for the dynamics study of protein systems without metal sites.

The complex formed between plant-type ferredoxin (Fd) and ferredoxin thioredoxin reductase (FTR) from *Synechocystis* sp. PCC6803 was studied by solution NMR (Chapter 4). The interface of Fd in the complex was mapped with NMR chemical shift perturbations. In the native Fd, the NMR signals of the residues around the iron-sulfur cluster are broadened out because of the relaxation enhancement of the iron-sulfur cluster. This problem was overcome by a replacement of the iron-sulfur cluster with a diamagnetic gallium ion through an unfolding- refolding method. Gallium substitution slightly changes the affinity of Fd with FTR. The gallium substituted structural analogue, however, enables a complete mapping of the interface on Fd in the Fd/FTR complex. The interface of Fd/FTR obtained in solution state is identical to that obtained in the crystallography study.

The utility of the GaFd as a structural analogue of Fd for interaction studies by NMR was further justified by a structural characterization (Chapter 5). An ensemble of ten NMR structures of GaFd was determined with an average RMSD of 0.3 Å from the mean for backbone atoms. Structural comparison between the

GaFd and the native Fd shows that only a small distortion exists in the metal binding loop, whereas the general tertiary fold is well conserved.

The interaction of Fd, FTR and *m*-type thioredoxin (Trx) was investigated by NMR titrations and docking (Chapter 6). The titration experiments indicate that FTR uses distinct interfaces to interact with Fd and Trx-*m* simultaneously to form a non-covalent ternary complex. The structure model of the non-covalent complex between FTR and Trx-*m* was determined by restrained soft docking, using intermolecular paramagnetic restraints of the Fe₄S₄ cluster of FTR. The noncovalent FTR/Trx-*m* complex in solution state shows a similar interface but different orientations from the crosslinked FTR/Trx-*m* complex for which the crystal structure was determined recently. A rotational domain movement in forming the crosslinked FTR/Trx-*m* intermediate from the non-covalent complex is proposed to account for this difference.

Samenvatting

Eiwit-eiwit interacties spelen een belangrijke rol in allerlei processen in de cel. De levensduur en de affiniteit van een eiwitcomplex zijn nauw gerelateerd aan zijn functie in het proces. Kortstondige interacties tussen eiwitten die elektronen overdragen zijn interessant omdat hierbij een snelle binding en dissociatie in balans moeten zijn om een snelle electronoverdracht te bereiken.

Het onderzoek in dit proefschrift concentreert zich op dynamische interacties tussen ijzerzwaveleiwitten en hun partners, met als doel om ons begrip van de basismechanismen van kortstondige eiwit-eiwitinteracties te vergroten.

Hoofdstuk 1 bevat een algemene inleiding in kortstondige eiwitinteracties, de eiwitten van dit onderzoek, en verschillende kernspinresonantie (NMR) spectroscopie methoden.

In hoofdstuk 2 wordt de karakterisatie van een zwak eiwitcomplex tussen gist cytochrome *c* (Cc) en runder-adrenodoxine (Adx) door middel van paramagnetische NMR en kleine-hoek Röntgenstraling verstrooiing (SAXS) beschreven. Het onderzoek werpt licht op de dynamiek van dit complex. Een rigide complex werd verkregen door cysteïnen op de eiwitoppervlakten aan te brengen en de eiwitten met een intermoleculaire zwavelbrug aan elkaar te verbinden. Het natieve en het rigide controlecomplex werden vervolgens met elkaar vergeleken. Veranderingen van chemische verschuivingen bij de vorming van het rigide complex zijn groter in het rigide complex dan in het natieve complex. De intermoleculaire paramagnetische effecten, veroorzaakt door de metaalcentra van beide eiwitten, zijn significant in het rigide complex, terwijl

deze effecten in het natieve complex niet worden waargenomen vanwege een uitgebreide middeling van oriëntaties.

Ook werd een spin label bevestigd op *Cc*, wat intermoleculaire paramagnetische relaxatie versterking (PRE) over een groot deel van het oppervlakte van Adx veroorzaakte. Dit geeft aan dat *Cc* dit oppervlak afzoekt tijdens de levensduur van het complex. De beweeglijkheid van het natieve complex werd gesimuleerd door een verzameling structuren met verschillende oriëntaties te creëren. In deze verzameling moet *Cc* tenminste 50% van het oppervlak van Adx bezoeken om alle pseudocontact effecten (PCS) tot een insignificant niveau te reduceren.

SAXS onderzoek gaf aan dat het natieve complex bij hogere eiwitconcentraties en lage zoutsterkte tetrameren vormt, door een stochastisch mechanisme. Daarentegen vormt het rigide controlecomplex geen oligomeren. Ook de SAXS-resultaten suggereren derhalve dat de vorming van het *Cc*/Adx-complex een dynamisch proces is.

In het twee-staps model van complexvorming gaat een zgn. ontmoetingscomplex vooraf aan het uiteindelijke stereo-specifieke complex. De rol van dit eerste complex zou zijn om de vorming van het stereo-specifieke te versnellen door een dimensionaliteitsreductie van het diffusiegedreven zoekproces. Veelal bestaat het ontmoetingscomplex slechts als een klein gedeelte van het gehele complex. Het dynamische complex van *Cc* en Adx beschreven in dit hoofdstuk geeft een voorbeeld van twee eiwitten die vooral voorkomen als een verzameling oriëntaties die snel in elkaar overgaan, en toch in staat zijn tot electronoverdracht. Deze eiwitten vormen dus een complex zonder één dominante oriëntatie en er wordt geconcludeerd dat het complex kan worden beschouwd als een puur

ontmoetingscomplex.

In hoofdstuk 3 wordt een methode toegepast gebaseerd op paramagnetisme-geïnduceerde residueële dipolaire koppelingen (RDC), voor de bestudering van de dynamiek van het Cc/Adx-complex. Een paramagnetische lanthanide probe, CLaNP-5, werd specifiek via twee armen op twee cysteïnes van een Cc mutant bevestigd en resulteerde in weinig verstoring van de natieve interactie. De rigide probe veroorzaakte een sterk paramagnetisch effect op en lichte preferentiële oriëntatie van Cc. De RDCs die voor Cc werden waargenomen waren wel 8-9 Hz groot. De RDCs voor Adx zijn veel kleiner door snelle middeling van vele oriëntaties. De uitwisseling van oriëntaties van twee eiwitten in het complex werd gesimuleerd met de methode zoals beschreven in hoofdstuk 2, hetgeen liet zien dat Cc een groot deel van het oppervlak moet afzoeken om te komen tot middeling van de RDCs voor Adx. Deze methode is derhalve een eenvoudige manier om intermoleculaire dynamiek van eiwitcomplexen of multidomein eiwitten waar te nemen, algemeen toepasbaar voor de bestudering van dynamiek van eiwitten zonder metaalcentra.

Het complex van plant-type ferredoxine (Fd) en ferredoxine thioredoxine reductase (FTR) van *Synechocystis* sp. PCC6803 werd bestudeerd met NMR (Hoofdstuk 4). De bindingsplaats op Fd werd bepaald met behulp van chemische-verschuivingsveranderingen. Voor het natieve Fd zijn de signalen van de residuen rond het ijzerzwavelcluster sterk verbreed door de relaxatieversterking van het cluster. Dit probleem werd vermeden door vervanging van het cluster door een diamagnetisch gallium ion door middel van een ontvouwing-hervouwing methode. Vervanging met gallium verandert de affiniteit van Fd voor FTR

enigszins. Het Fd-analagon met gallium maakt het echter mogelijk een compleet beeld te krijgen van de bindingsplaats op Fd voor FTR in oplossing, welke identiek blijkt te zijn aan die in de kristalstructuur.

Het nut van GaFd als een structurele analagon van Fd voor interactiestudies met NMR werd nog verder gerechtvaardigd door structurele karakterisatie (Hoofdstuk 5). Er werd een verzameling van tien NMR structuren van GaFd bepaald met een RMSD van 0.3 Å van de gemiddelde structuur voor de backbone-atomen. Een vergelijking tussen GaFd en het natieve Fd laat zien dat er maar een kleine verstoring optreedt in het metaalbindende deel van het eiwit, terwijl de algemene driedimensionele vouwing goed bewaard blijft na vervanging van het cluster door gallium.

De interactie tussen Fd, FTR en *m*-type thioredoxin (Trx) werd onderzocht door middel van NMR titraties en bindingssimulaties (Hoofdstuk 6). De titratie-experimenten laten zien dat FTR verschillende delen van het oppervlak gebruikt voor de gelijktijdige binding van Fd en Trx-*m* om zo een niet-covalent driedeling complex te vormen. The model van de structuur van het complex van FTR en Trx-*m* in oplossing laat soortgelijke bindingsplaatsen zien voor Trx-*m* en FTR, maar met verschillende oriëntaties voor Trx-*m* ten opzichte van de kortgeleden opgehelderde kristalstructuur van het covalentgebonden complex. Een rotatie van Trx-*m* bij de overgang van het niet-covalente naar het covalente complex wordt voorgesteld ter verklaring van dit verschil in oriëntatie.