



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Transient interactions between photosynthetic proteins

Hulsker, R.

Citation

Hulsker, R. (2008, May 21). *Transient interactions between photosynthetic proteins*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12860>

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/1887/12860>

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

Nederlandse samenvatting

De biologische processen, die de basis vormen van al het leven, worden voor een groot deel bepaald door eiwitinteracties. De eiwitcomplexen, die betrokken zijn bij deze interacties, kunnen ingedeeld worden naar affiniteit, waarbij we statische (hoge affiniteit) en kortlevende of transient (lage affiniteit) complexen onderscheiden. Complexen die elektronen transporteren, zijn meestal kortlevende complexen, omdat ze een hoge omzetsnelheid moeten combineren met specificiteit. Ze bereiken hun hoge omzetsnelheid door hoge dissociatie constanten, terwijl hun associatie constanten vergelijkbaar of hoger zijn dan die van statische complexen. Samen resulteren zij in de zwakke binding die karakteristiek is voor kortlevende eiwitcomplexen.

De kortlevende complexen die in dit werk worden onderzocht zijn allemaal onderdeel van de fotosynthetische redox keten, waarin elektronen van het membraan gebonden cytochrome *f* (cyt*f*) naar plastocyanine (Pc) of naar cytochrome *c*₆ (cyt*c*₆) worden overgedragen. Het katalytische centrum van deze eiwitten bevat een metaal-ion, en in het geval van de cytochromen een haem, die gecoördineerd worden door de zijketens van verschillende aminozuren van het eiwit.

In Hoofdstuk II wordt de protonatie van een histidine koper ligand in plastocyanine bestudeerd bij een lage pH, die het eiwit inactieveert. Met één uitzondering wordt dit bij alle plastocyanines waargenomen. Er werd aangenomen dat Pc's uit varen niet protoneerde door de aanwezigheid van een π - π stacking interactie. Met behulp van kernspinresonantie (NMR) spectroscopie hebben we kunnen aantonen dat de histidine wel protoneert, zij het bij een lagere p*K*_a dan verwacht. Van de mutaties F12L en G36P werd verwacht dat ze de protonatie zouden beïnvloeden, maar dit bleek niet het geval. Ze veranderen de p*K*_a niet. Het is opvallend dat in de kristalstructuur van het wild type (wt) en G36P varen Pc de histidine gedeprotoneerd is. Deze schijnbare tegenstelling tussen kristallografische en NMR data kan worden verklaard door kristalcontacten rond de histidine. De nabijheid van de aangrenzende asymmetrische eenheid levert waarschijnlijk een voorkeur op voor de gedeprotoneerde vorm. Dit voorbeeld laat de voordelen zien van onderzoek met kernspinresonantie uitgevoerd op eiwitten en in het bijzonder kortlevende eiwitcomplexen in oplossing.

De bestudering van het Pc - cytf complex en andere kortlevende eiwitcomplexen heeft geleid tot een twee-staps model voor complexvorming. Volgens dit model associëren twee eiwitten om een dynamisch encounter complex te vormen, gevolgd door een goed gedefinieerd complex, dat elektronen kan overdragen. Het effect van de mutatie van twee normaal gesproken geconserveerde residuen in het hydrofobe gedeelte rond het katalytische centrum van *P. hollandica* Pc wordt bestudeerd in Hoofdstuk III. De structuur van het wt Pc - cytf complex kon bepaald worden met behulp van bindingssimulaties op basis van NMR begrenzingsen. Die begrenzingsen zijn gebaseerd op verstoringen van de chemische verschuivingen en pseudocontact verschuivingen (PCS). Voor het complex met het mutante Pc was structuurbepaling niet mogelijk. Uit de kleinere verstoringen van chemische verschuivingen en PCS werd geconcludeerd dat het mutante complex dynamischer is dan het wt complex. De bewegingen in het complex zijn gesimuleerd door een verzameling van structuren, waarbij het wt complex als uitgangspunt is gebruikt. Uit een vergelijking van de gesimuleerde met de geobserveerde gemiddelde NMR parameters blijkt dat het complex van de goed gedefinieerde staat naar de encounter staat verschuift door de mutaties. Dit levert een manier op om de bewegingen en dynamiek van de encounter staat van kortlevende eiwitcomplexen te bestuderen.

Een vergelijkbare benadering is gebruikt in Hoofdstuk IV om de dynamiek in het cytc₆ - cytf complex te bestuderen. In dit hoofdstuk wordt het gebruik van paramagnetische relaxatieversnelling (PRE) geïntroduceerd, die extra informatie oplevert bovenop de verstoringen van de chemische verschuivingen en PCS. Hiervoor werden vijf verschillende spinlabels op de oppervlakte van cytf geplaatst, die de relaxatie van cytc₆ kernen in de buurt van het spinlabel versnellen. Als NMR begrenzingsen gebaseerd op PRE van verschillende spinlabel-posities worden gebruikt in bindingssimulaties, worden geconvergeerde structuren gevonden. Deze structuren hebben echter verschillende oriëntaties, afhankelijk van de combinatie van PRE data. Daarbij blijven de overschrijdingen van de begrenzingsen voor elk van de bepaalde structuren groot. Dit suggereert dat het complex dynamisch is en niet beschreven kan worden door een enkele structuur. Net als in Hoofdstuk III hebben we verzamelingen van structuren gecreëerd, die in dit geval niet de overschrijdingen van de PRE begrenzingsen konden verminderen.

Daaruit kan geconcludeerd worden dat het cyt_6 - $\text{cyt}f$ complex niet beschreven kan worden door een gelijkmatig verdeelde verzameling van structuren en dat de verzameling waarschijnlijk voorkeurs-orientaties heeft. Het gebruik van methoden die geen uitgangsstructuur nodig hebben, zoals Brownian dynamics, zou een preciezere beschrijving van de encounter staat van het complex kunnen opleveren.

Elektrostatische interacties tussen eiwitten in een complex spelen een belangrijke rol in de associatie en oriëntatie van de eiwitten. Een andere vereiste bij de vorming van een kortlevend complex is dat de elektrostatische interacties de snelle dissociatie van de eiwitten niet tegenhouden. Daarom is de balans tussen elektrostatische, hydrofobe en andere oppervlakte-eigenschappen van de bindingsplaatsen in complexen het onderwerp van vele studies. In hoofdstuk V worden geladen peptiden gebruikt om de rol van elektrostatica in eiwitassociatie te onderzoeken. Hiervoor werd ^{15}N -verrijkt *S. pratensis* Pc geproduceerd en werden de hoofdketen amiden toegekend. Bij toevoeging van positief geladen tetra-lysine peptide aan Pc, waarvan bekend is dat dat het elektronen transport naar $\text{cyt}f$ inhibeert, worden de chemische verschuivingen van het negatief geladen gedeelten van Pc verstoort. Het is verrassend dat het aantal verstoorde residuen en de grootte van de verstoringen aangeven dat het complex tussen tetra-lysine en Pc relatief dynamisch is. De toevoeging van hydrofobe residuen aan het peptide verandert de binding van het peptide niet significant. Dit ondersteunt het idee dat het oppervlak van elektronen transport eiwitten ontworpen is om een zwakke, maar specifieke interactie met de partners te hebben.

De verdunde oplossingen waarin eiwitten en eiwitcomplexen vaak bestudeerd worden, verschillen van het cellulaire milieu waarin ze normaal gesproken functioneren. Dit verschil kan onderzocht worden door het gebruik van moleculaire crowders, die de aanwezigheid van grote aantallen andere macromoleculen in hoge concentraties nabootsen. In Hoofdstuk VI wordt het Pc - $\text{cyt}f$ complex bestudeerd met NMR in de aanwezigheid van crowders. Het gebruik van verschillende crowders werd getest op een klein rond eiwit. Hieruit bleek dat Ficoll70, een sterk vertakte polymeer van sucrose en dextran T70, een synthetische, lineaire polysaccharide de NMR experimenten het minst verstoren. De toevoeging van 20% Ficoll70 aan het Pc - $\text{cyt}f$ complex resulteerde niet in

significante veranderingen van de bindingsconstante of bindingsplaatsen. Dit ondersteunt het idee dat crowders met een groot molecuulgewicht zoals Ficoll70 niet gelijkmatig over de oplossing verdeeld zijn, maar een poreus medium vormen. Hierin kunnen relatief kleine eiwitten bewegen zoals in een verdunde oplossing. Men kan zich afvragen of crowders met een groot molecuulgewicht het beste model voor het cellulaire milieu vormen.

Dit werk beschrijft de bestudering van verschillende aspecten van kortlevende eiwitinteracties, die toepasbaar is op vele andere kortlevende eiwitcomplexen. Het gebruik van -bij voorkeur- NMR voor deze studies heeft aangetoond dat het een onmisbare techniek is om inzicht te verkrijgen in de regels die de vorming van kortlevende eiwitcomplexen bepalen. Hopelijk zullen nieuwe ideeën, zoals het gebruik van PRE en het creëren van verzamelingen van structuren, leiden tot volledig begrip van de dynamica en van de vele manieren waarop kortlevende complexen die dynamica gebruiken om hun functie in de cel uit te voeren.