



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Understanding protein complex formation: the role of charge distribution in the encounter complex

Di Savino, A.

Citation

Di Savino, A. (2021, June 15). *Understanding protein complex formation: the role of charge distribution in the encounter complex*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3185507>

Version: 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/1887/3185507>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/3185507> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Di Savino, A.

Title: Understanding protein complex formation: the role of charge distribution in the encounter complex

Issue date: 2021-06-15

Nederlandse samenvatting

De traditionele beschrijving van twee eiwitten die direct met elkaar een complex vormen, zoals een sleutel en slot, wordt langzamerhand vervangen door een meer dynamisch model. Door middel van willekeurige botsingen komen eiwitten zelden direct met hun specifieke bindingsplaatsen tegen elkaar. Om de efficiëntie van complexvorming te verhogen worden eiwitten in oplossing vaak tot elkaar aangetrokken door elektrostatistische interacties. Gunstige elektrostatistische interacties verkleinen het eiwitoppervlak dat bezocht wordt om de juiste bindingsconformatie te vinden. Bovendien verlengen ze de levensduur van het ontmoetingscomplex (*encounter complex*). Het encounter complex kan productief zijn, indien het leidt tot een actief eiwitcomplex, of zinloos, indien de twee eiwitten elkaar loslaten zonder een actief complex gevormd te hebben. Naast elektrostatistische interacties kunnen op korte afstanden ook hydrofobe interacties een rol spelen. Omdat het encounter complex zeer dynamisch is, is het niet mogelijk het met traditionele biochemische technieken te karakteriseren. Door de ontwikkeling van paramagnetische relaxatieversterking (*paramagnetic relaxation enhancement*, PRE) kernspinresonantie (*nuclear magnetic resonance*, NMR), is het mogelijk om het encounter complex te bestuderen. Deze techniek meet de relaxatie van kernspins van een naderend eiwit, veroorzaakt door een paramagnetische groep gebonden aan het oppervlak van het andere eiwit. PRE is zeer sterk wanneer de kern dicht in de buurt van het paramagnetische centrum komt, waardoor PRE zeer gevoelig voor zulke conformaties, zelfs als ze maar een fractie uitmaken van de gehele populatie conformaties.

Kortstondige eiwitcomplexen, zoals die van redoxeiwitten, zijn evolutionair geoptimaliseerd om zeer snelle en efficiënte reacties uit te voeren. Hierdoor heeft het encounter complex een grotere populatie dan bij complexen met hoge affiniteit en langere levensduur. Daarom zijn deze complexen een uitstekend systeem om het encounter complex te onderzoeken. In dit proefschrift bestuderen wij een al goed begrepen elektronoverdracht complex, bestaand uit cytochroom *c* (Cc) en cytochroom *c* peroxidase (CcP) van *Saccharomyces cerevisiae* (bakkergist). Het Cc:CcP complex is verantwoordelijk voor bescherming van de cel tegen waterstofperoxide, door het te reduceren tot water. Bij de vorming van het complex spelen de positieve ladingen rondom de bindingsplaats van Cc en de negatieve op CcP een grote rol. Het encounter complex kan goed voorspeld worden met Monte Carlo simulaties, die alleen gebaseerd zijn op elektrostatistische interacties. PRE experimenten hebben laten zien dat het encounter complex slechts een beperkt deel (~15%) van het oppervlak van CcP uitmaakt. Het complex bestaat voor 30% uit encounter complex, en de resterende 70% uit het actieve complex.

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is om de noodzaak van een geoptimaliseerde ladingverdeling op het eiwitoppervlak voor het vormen van het actieve complex aan de orde te stellen. De hypothese dat de juiste verdeling van ladingen cruciaal is voor snelle vorming van het complex, wordt getoetst door het introduceren van nieuwe negatieve ladingen op de oppervlakte van CcP en het neutraliseren van bestaande. Vijf

varianten van CcP zijn ontworpen door nieuwe ladingen op de ‘zijkant’ of aan de ‘achterkant’ van CcP te introduceren, ten opzichte van de bindingplaats voor het actieve complex. Ook worden de natuurlijke negatieve ladingen rond de bindingsplaats van actieve complex in sommige varianten verwijderd.

In **Hoofdstuk 3** wordt een variant van CcP met nieuwe negatieve ladingen aan de zijkant van het eiwit (CcP_B) geanalyseerd door middel van Monte Carlo simulaties, PRE, en *stopped flow* experimenten, om te onderzoeken wat voor effect deze nieuwe ladingen hebben op het encounter complex en het vormen van het actieve complex. Monte Carlo simulaties tonen aan dat Cc sterk wordt aangetrokken door de nieuwe negatieve bindingsplek. De resultaten van de PRE-experimenten bevestigen experimenteel die van de Monte Carlo simulaties, en tonen dat de nieuwe plek door Cc in het encounter complex wordt bemonsterd. Alhoewel er dus een groter oppervlak bemonsterd wordt, tonen metingen met *stopped flow* aan dat de vorming van het actieve complex niet negatief beïnvloed wordt door de nieuwe ladingen. Het Cc:CcP_B complex wordt zelfs sneller gevormd dan het natuurlijke complex. Dit suggereert dat het nieuwe encounter complex tussen Cc en CcP_B productief is en dat de specifieke verdeling van ladingen over CcP niet cruciaal is voor het snel vormen van het actieve complex. In **Hoofdstuk 4** worden de complexen gevormd door Cc en andere varianten van CcP gekarakteriseerd. Monte Carlo simulaties tonen aan dat Cc aangetrokken wordt door de nieuwe negatieve bindingsplekken op deze varianten, vooral als de oorspronkelijke negatieve ladingen rondom de bindingsplek van het actieve complex verwijderd zijn. *Stopped flow* experimenten tonen aan dat de bindingssnelheid van de Cc:CcP complex sterk verminderd wordt wanneer de oorspronkelijke negatieve ladingen verwijderd zijn. Verbazingwekkend genoeg blijkt dat een nieuwe negatieve bindingsplek vrijwel altijd een positief effect heeft op de bindingssnelheid van Cc, zelfs als de bindingsplek op de achterkant van CcP ligt. Dit toont aan dat de totale lading een grotere rol speelt dan de specifieke verdeling van deze lading over het oppervlak. In **Hoofdstuk 5** wordt getoetst of dit zou kunnen komen door de verdeling tussen het encounter complex en het specifieke complex (30% tegen 70%). Deze verdeling is zeer gevoelig voor specifieke mutaties in de bindingsplek van Cc in het actieve complex. Als Arg13 van Cc veranderd wordt in Ala (R13A), bestaat het complex met CcP voor 80% uit encounter complex. Ook wordt bindingsconstante van het complex honderd keer lager. Om te onderzoeken hoe deze herverdeling van encounter complex en actief complex de bindingssnelheid beïnvloedt, zijn de complexen van Cc R13A en het wildtype CcP (CcP_A) en CcP_B bestudeerd. De verstoringen in de chemische verschuivingen in het NMR-spectrum van het complex gevormd door Cc R13A zijn significant kleiner dan die met het wildtype Cc, doordat het complex dynamischer is geworden. Overeenkomstig de metingen van Hoofdstuk 3, tonen de PRE-experimenten dat ook Cc R13A de nieuwe negatieve ladingen op CcP_B bezoekt, en een groter gedeelte van het eiwitoppervlak bemonstert in het encounter complex. Ten slotte tonen kinetische experimenten aan dat de toegevoegde negatieve ladingen op CcP_B de bindingssnelheid met Cc R13A niet beïnvloeden, behalve bij lage zoutconcentratie. Desalniettemin laat de Cc R13A een 5- tot

Nederlandse samenvatting

7-voudige lagere bindingsnelheid zien over een brede reeks zoutconcentraties. Dit geeft aan dat de balans tussen encounter en specifiek complex een belangrijke rol speelt voor de efficiëntie van elektronoverdracht.

In **Hoofdstuk 6** worden de resultaten en technieken van dit proefschrift besproken in een brede context.