

Summary

TRANSIENT COMPLEXES OF HAEM PROTEINS

Cellular functions are mediated by a staggering variety of protein interactions. In fact, the dissociation constants of protein-protein complexes span a range of twelve orders of magnitude. At one extreme of this continuum are static complexes – characterized by tight binding, long life-times, and high specificity – like those formed between antigens and antibodies or enzymes and inhibitors. At the other end of the protein interactions' scale are weak, short-lived complexes formed by the proteins that recognize multiple partners. As a rule, transient complexes orchestrate biochemical transmission processes that require high turn-over rates, such as those taking place in electron transfer (ET) chains or signal-transduction cascades.

In order to understand what structural features determine the transient nature of a protein complex, we have studied two short-lived complexes of haem proteins involved in the biomolecular ET. Using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy as the main tool, not only were we able to perform a thorough structural characterization of those complexes, but also to assess the role of dynamics – yet another salient feature of transient interactions – in the process of protein complex formation.

The interaction of bovine cytochrome b_5 (Cyt b_5) with yeast cytochrome c (Cyt c) has been investigated by heteronuclear NMR spectroscopy. Chemical shift perturbations for ^1H and ^{15}N nuclei of both cytochromes, arising from the interactions with the respective unlabelled partner protein, have been used to map the interacting surfaces on both proteins. Protein – protein docking simulations, performed for the binary Cyt b_5 – Cyt c and ternary Cyt b_5 – (Cyt c)₂ complexes, have demonstrated that Cyt c uses a confined surface patch for interaction with a much more extensive surface area of Cyt b_5 . The experimental data are best interpreted by the presence of a dynamic ensemble of protein – proteins orientations within the complex rather than a single, well-defined structure.

The physiological complex of Cyt c and yeast cytochrome c peroxidase (CcP) is a paradigm for the biological ET. In order to resolve a long-standing debate whether the crystal structure of this complex represents the dominant form in solution, we have solved its solution structure using paramagnetic relaxation enhancement (PRE) NMR spectroscopy. We show that the solution structure is very similar to that observed in the

crystal. In addition, the observed paramagnetic effects were used to delineate the conformational space sampled by the protein molecules during the dynamic part of the interaction. Our findings corroborate the dynamic behaviour of this complex and offer an insight into the mechanism of the protein complex formation in solution.

Using site-directed mutagenesis in combination with NMR spectroscopy and isothermal titration calorimetry, we were able to appraise the molecular determinants of both the specificity and the affinity in Cyt *c* – CcP complex. Thus, we have found that a single residue of yeast Cyt *c*, R13, controls the specificity of the interaction between Cyt *c* and CcP, while only moderately affecting the affinity. Our results suggest that, while the solution structure of the dominant form of R13A Cyt *c* – CcP complex is the same as that of the wild-type (wt) complex, the proteins occupy the well-defined, single-orientation form for ~ 25 % of the lifetime of the complex, with the rest of the time spent in the dynamic encounter state. We propose that R13 stabilizes the complex by a cation- π interaction with Y39 residue of CcP, which would explain the drastic difference in the binding behaviour of the wt Cyt *c* and the charge-conserved R13K variant.

Contrary to our expectations, mutation of yet another Cyt *c* residue, T12A, enhances the binding by an order of magnitude, with the favourable enthalpy term responsible for the additional stabilization. At the same time, the solution structure of the dominant form of T12A Cyt *c* – CcP complex is the same as that of the wt complex, and – as evidenced by both chemical shift perturbation and PRE analyses – the mutation has very little influence on the protein dynamics within the complex. Thus, our results suggest that T12A mutation of Cyt *c* increases the binding affinity of Cyt *c* – CcP complex without affecting the specificity of the interaction. We argue that the affinity increase is mediated by ordering of water molecules at the interface.

As illustrated by the disagreement between the theoretical models for Cyt *c* – Cyt *b*₅ or Cyt *c* – CcP with the experimental data presented in this work, consideration of intermolecular electrostatic forces alone is not enough for the correct prediction of the binding geometry in transient protein-protein complexes. Therefore, additional factors – such as the proposed intermolecular cation- π interaction or interfacial water reorganization in case of Cyt *c* – CcP complex – must contribute to the specificity and affinity of the protein association.

KORTLEVENDE COMPLEXEN VAN HAEM EIWITTEN

Cellulaire functies worden beïnvloed door zeer uiteenlopende eiwit-interacties. De dissociatieconstanten van eiwitcomplexen omvatten twaalf orden van grootte. Aan de ene kant van dit spectrum zien we statische complexen – met een karakteristieke sterke binding, lange levensduur en een duidelijke specificiteit. Voorbeelden zijn complexen van antigenen en antilichamen of van enzymen en inhibitoren. Aan het andere uiteinde vinden we zwakke, kortlevende complexen, die gevormd worden door eiwitten met een scala van partners. Zeer vaak reguleren kortlevende complexen biochemische doorgifteprocessen met een hoge omzettingssnelheid, zoals die zich afspelen in elektrontransport (ET)-ketens of cascades voor signaaloverdracht.

Om te begrijpen welke structurele eigenschappen bepalend zijn voor de korte levensduur van een eiwitcomplex hebben we onze aandacht gericht op twee kortlevende complexen van haem-eiwitten die een functie hebben in het biomoleculaire ET. De voornaamste experimentele methode was spectroscopie van kernspinresonantie (NMR), waarmee niet alleen de structuren van de complexen gekarakteriseerd konden worden, maar ook de rol van dynamiek in de vorming van eiwitcomplexen bepaald kon worden, kenmerkend als die is voor kort levende interacties.

Met behulp van heteronucleaire NMR spectroscopie is onderzoek gedaan aan de interactie van runder-cytochroom b_5 (Cyt b_5) met het gist-cytochroom c (Cyt c). Verstoringen van de chemische verschuivingen van ^1H en ^{15}N kernen van de twee cytochromen, die voortkwamen uit de interacties met het partner-eiwit zijn gebruikt voor het in kaart brengen van de contactoppervlakken op beide eiwitten. Eiwit-eiwit bindingssimulaties, die uitgevoerd zijn op het binaire Cyt b_5 -Cyt c en het ternaire Cyt b_5 -(Cyt c)₂ complex, hebben aangetoond dat Cyt c slechts een beperkt stukje oppervlak gebruikt voor interactie met een veel groter stuk van het oppervlak van Cyt b_5 . De resultaten van de proeven leiden tot het inzicht dat er binnen het complex een dynamische verzameling van eiwit-eiwit oriëntaties aanwezig is, en niet één eenvoudige en duidelijk begrensde structuur.

Het fysiologische complex van Cyt *c* en gist-cytochroom *c* peroxidase (CcP) is een paradigma van de biologische ET. Er heerst al lange tijd twijfel of de kristalstructuur van dit complex overeenkomt met de dominante vorm in oplossing. Om dit te bepalen hebben wij de oplossingsstructuur bepaald met paramagnetische relaxatie-versnelling (PRE) NMR spectroscopie. Wij hebben aangetoond dat de structuur in oplossing sterk overeenkomt met de kristalstructuur. Verder hebben we de waargenomen paramagnetische verschijnselen gebruikt ter afbakening van de conformationele ruimte die de eiwitmoleculen innemen tijdens het dynamische deel van de interactie. Onze bevindingen bevestigen het dynamische gedrag van dit complex en geven inzicht in het mechanisme van de vorming van het eiwitcomplex in een oplossing.

Met behulp van gerichte mutagenese in combinatie met NMR spectroscopie en isothermische titratie calorimetrie konden we vaststellen welke moleculaire factoren bepalend zijn voor de specificiteit en de affiniteit in het Cyt *c* - CcP complex. Zo hebben we geconstateerd dat een enkel aminozuur-residu van gist Cyt *c*, Arg13, bepalend is voor de specificiteit van de interactie tussen Cyt *c* en CcP, met niet meer dan een matige invloed op de affiniteit. Onze bevindingen geven aan dat de oplossingsstructuur van de dominante vorm van het complex Arg13Ala Cyt *c* - CcP weliswaar dezelfde is als die van het wild type (wt) complex, maar dat de eiwitten de goed gedefinieerde enkele oriëntatie vorm gedurende ongeveer 25 % van de levensduur van het complex innemen, en de rest van de tijd in de dynamische encounter staat verkeren. Wij poneren dat Arg13 het complex stabiliseert door een kation- π interactie met residu Tyr39 van CcP, hetgeen een verklaring zou vormen voor het drastische verschil in bindingsgedrag van het wt Cyt *c* en de ladingsgeconserveerde variant Arg13Lys.

In tegenstelling tot onze verwachting wordt door mutatie van het Cyt *c* residu, Thr12 naar Ala, de bindingsaffiniteit een orde van grootte versterkt, waarbij de gunstige enthalpieterm zorgt voor de toegenomen stabiliteit. Bovendien is de oplossingsstructuur van het Thr12Ala Cyt *c* - CcP complex gelijk aan die van het wt complex en blijkt uit de analyses van verstoringen van de chemische verschuivingen en PRE's dat de mutatie een zeer geringe invloed heeft op de eiwitdynamiek binnen het complex. Onze bevindingen wijzen erop dat de Thr12Ala mutatie bij Cyt *c* de bindingsaffiniteit van het Cyt *c* - CcP complex verhoogt zonder de specificiteit van de interactie aan te tasten. Wij stellen dat de

toegenomen affiniteit veroorzaakt wordt door de ordening van watermoleculen in het raakvlak van de eiwitoppervlakken.

De theoretische modellen van Cyt *c* - Cyt *b*₅ en Cyt *c* - CcP zijn duidelijk in strijd met de experimentele gegevens die dit proefschrift bevat, en daaruit blijkt dat het analyseren van intermoleculaire elektrostatische krachten opzich onvoldoende is om te komen tot een juiste voorspelling van de bindingsgeometrie in kortlevende eiwit-eiwit complexen. Daarom moeten er bijkomende factoren zijn – zoals de hier voorgestelde intermoleculaire kation- π interactie of reorganisatie van water op het raakvlak bij het Cyt *c* - CcP complex – die bijdragen tot de specificiteit en de affiniteit van het eiwitcomplex.

КОРОТКОЖИВУЩИЕ КОМПЛЕКСЫ ГЕМ-СОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ

Широкое разнообразие взаимодействий между белками играет важную роль в работе клетки. Константы диссоциации наблюдаемых белковых комплексов лежат в диапазоне величиной в двенадцать порядков. На одном конце шкалы находятся стационарные комплексы (например, комплексы антигенов с антителами или ферментов с ингибиторами), для которых характерно крепкое связывание, большое время жизни и высокая селективность. На другом конце шкалы взаимодействий находятся слабые короткоживущие комплексы, образуемые белками, способными связываться с многочисленными белками-партнёрами. Как правило, короткоживущие комплексы контролируют биохимические процессы, требующие высоких констант превращения, как, например, в цепях электронного переноса (ЭП) или каскадах преобразования биохимических сигналов.

Для определения характерных черт, определяющих природу короткоживущих белковых комплексов, мы исследовали два комплекса между гем-содержащими белками, участвующими в процессах ЭП. Используя спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в качестве основного метода, мы смогли не только охарактеризовать структуру этих комплексов, но также оценить роль подвижности (ещё одной выдающейся особенности короткоживущих взаимодействий) в процессе комплексообразования между белками.

Мы исследовали взаимодействие бычьего цитохрома b_5 (Цит b_5) с дрожжевым цитохромом c (Цит c) методом гетероядерной ЯМР спектроскопии. Изменения химических сдвигов ^1H и ^{15}N ядер обоих цитохромов, возникающие в результате взаимодействия белка с изотопно-немеченным партнером, были использованы для описания взаимодействующих поверхностей обоих белков. Компьютерное моделирование белкового связывания в бинарных (Цит b_5 - Цит c) и троичных (Цит b_5 - [Цит c] $_2$) комплексах показало, что Цит c использует ограниченный участок своей поверхности для взаимодействия с обширной поверхностной областью цитохрома b_5 . В целом, экспериментальные данные скорее указывают на присутствие

набора подвижных белковых ориентаций в комплексе, чем на существование единой чётко определенной структуры.

Физиологический комплекс цитохрома *c* и дрожжевой цитохром *c* пероксидазы (ЦцП) является парадигмой биологического ЭП. Чтобы разрешить длительную дискуссию относительно того, представляет ли кристаллическая структура этого комплекса основную форму образуемую белками в растворе, мы определили структуру белкового комплекса в растворе, используя явление парамагнитного усиления релаксации (ПУР) в ЯМР спектроскопии. Мы показали, что структура этого комплекса в растворе практически идентична кристаллической структуре. Кроме того, мы использовали экспериментальный парамагнитный эффект для описания конформационного пространства, занимаемого молекулами белков во время динамичной фазы взаимодействия. Результаты этого исследования подтверждают подвижность белков в этом комплексе и расширяют наше понимание механизма белкового комплексообразования в растворе.

Используя направленный мутагенез в сочетании с ЯМР спектроскопией и изотермальной титрационной калориметрией, мы смогли оценить молекулярные факторы, определяющие селективность (то есть выбор партнера) и сродство (то есть константу связывания) в Цит *c* - ЦцП комплексе. Так, мы обнаружили, что один аминокислотный остаток дрожжевого Цит *c* (аргинин 13) контролирует селективность взаимодействия между Цит *c* и ЦцП, лишь умеренно влияя на сродство. Наши результаты показывают, что структура преобладающего аргинин 13 / аланин Цит *c* - ЦцП комплекса в растворе такая же, как и структура комплекса дикого типа. В то же время, белки занимают чётко определенную единую конфигурацию лишь 25 % времени жизни комплекса, проводя остальное время в подвижном низко селективном “встречном” комплексе. Мы предполагаем, что аргинин 13 (Цит *c*) стабилизирует комплекс посредством катион-пи взаимодействия с тирозином 39 (ЦцП). Такое межмолекулярное взаимодействие могло бы объяснить значительную разницу в связывании Цит *c* дикого типа и аргинин 13 / лизин мутанта с сохранением заряда.

Вопреки ожиданиям, мутация ещё одного аминокислотного остатка Цит *c*, треонин 12 / аланин, увеличивает константу связывания на один порядок. Дополнительная стабилизация комплекса осуществляется за счёт уменьшения

энтальпии комплексообразования. Структура преобладающей формы треонин 12 / аланин Цит ζ - ЦцП комплекса в растворе совпадает со структурой комплекса дикого типа. В то же время, анализ ПУР и изменений химических сдвигов показывает, что мутация оказывает минимальное влияние на селективность взаимодействия. Таким образом, экспериментальные результаты указывают на то, что мутация треонин 12 / аланин (Цит ζ) увеличивает константу связывания без изменения селективности взаимодействия. Мы предполагаем, что увеличение сродства осуществляется посредством реорганизации молекул воды на поверхности контакта между белками.

Как показывает расхождение теоретических моделей Цит β_5 - Цит ζ и Цит ζ - ЦцП комплексов с экспериментальными данными, представленными в данной работе, рассмотрение одних электростатических межмолекулярных взаимодействий недостаточно для корректного описания геометрии связывания белков в короткоживущих комплексах. Таким образом, дополнительные факторы (например, предложенное катион-пи взаимодействие или реорганизация воды на контактной поверхности в случае Цит ζ - ЦцП комплекса) должны влиять на селективность и сродство в процессе комплексообразования между белками.

