

University of Groningen

Studies in protein crystallography & dynamics, on Membrane Protein Crystallization, the Structure of Thermitase- Eglin and the Application of Molecular Dynamics

Gros, Piet

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1990

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Gros, P. (1990). *Studies in protein crystallography & dynamics, on Membrane Protein Crystallization, the Structure of Thermitase- Eglin and the Application of Molecular Dynamics*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

In dit proefschrift "Onderzoekingen in eiwitkristallografie en dynamica: membraaneiwwitten, de structuur van thermitase-egline en de toepassing van moleculaire dynamica" worden de volgende drie onderwerpen besproken.

I. Membraaneiwwitten

In hoofdstuk 2 worden kristallisatie experimenten met drie integrale membraaneiwwitten besproken. In 'hangende druppel' experimenten met cytochroom-c reductase zijn naaldvormige kristallen verkregen. Het membraaneiwit fosfolipase A is onder verschillende omstandigheden gekristalliseerd. Dit fosfolipase komt voor in de buitenmembraan van de bacterie *Escherichia coli*. Helaas was slechts één kristaltype stabiel genoeg om gemonteerd te worden. Dit kristaltype verstrooide tot een resolutie van 2.7 Å. De kristallen zijn echter zodanig vergroeid dat verdere röntgen-analyse aan deze kristallen niet mogelijk is.

II. Thermitase - Eglise-c

De drie-dimensionale structuur van thermitase samen met eglise-c werd bepaald in drie kristalvormen bij verschillende calcium concentraties. Thermitase is een serine proteinase, afkomstig uit de hete bron bacterie *Thermoactinomyces vulgaris*. Het eglise-c is een eiwit dat serine proteinases remt. Deze rol vervult het dan ook in de bloedzuiger *Hirudo medicinalis*.

De eerste structuurbepaling van thermitase-egline wordt beschreven in hoofdstuk 4. Voor de berekening van de eerste ruwe fasen van de structurfactoren werd de moleculaire vervangingsmethode toegepast. Hiervoor werd als model-structuur het vergelijkbare complex van subtilisine Carlsberg-egline genomen. Het feit dat 47 % van de aminozuren in de keten identiek is tussen subtilisine Carlsberg en thermitase geeft aan dat de structuren homoloog zijn. De structuur van thermitase werd vervolgens verfijnd met behulp van de moleculaire dynamica verfijningsmethode. Door deze methode werd de benodigde modelbouwtijd aanzienlijk gereduceerd. De kristallografische structuurbepaling en verfijning van de andere twee kristalvormen is beschreven in de hoofdstukken 5 en 6. De uiteindelijke R-factoren van de drie modellen waren 17.5 %, 16.5 % en 16.8 % voor data tot 2.2, 2.0 en 2.0 Å resolutie respectievelijk.

De drie-dimensionale opvouwing van thermitase lijkt sterk op de opvouwing van subtilisine Carlsberg. De belangrijkste verschillen tussen subtilisine Carlsberg en thermitase worden beschreven in hoofdstuk 5. Een groot verschil is de extra calcium-bindingsplaats in thermitase, die gevormd wordt door de residuen 57 tot 66. Daarnaast is de constructie van de N-terminus sterk verschillend. Een groot aantal verschillen in

structuur zijn waargenomen aan de buitenkant van het eiwit. Daar worden dan ook de meeste verschillen in aminozuur-samenstelling gevonden, waar onder inserties en deleties.

De drie calcium-bindingsplaatsen in thermitase zijn allereerst in hoofdstuk 5 beschreven. De invloed van de calcium-concentratie op de structuur wordt behandeld in hoofdstuk 6. In de N-terminale of sterke calcium-bindingsplaats worden geen verschillen tussen de structuren van thermitase by 0, 5 en 100 mM CaCl_2 , waargenomen. Deze bindingsplaats is in alle drie kristallen volledig bezet. De bindingsplaats gevormd door 57-66 bindt calcium middelsterk. In de kristallen met 0 en 5 mM calcium wordt de bindingsplaats gedeeltelijk bezet. De ion-bindingscoördinatie is een enigszins verstoorde pentagonale bipyramide. Bij een concentratie van 100 mM calcium wordt een volledige bezetting waargenomen in een vierkante antiprisma coördinatie. Zover ons bekend is dit de eerste keer dat deze coördinatie voor calcium-binding aan eiwitten wordt waargenomen. De zwakke calcium-bindingsplaats bindt geen calcium bij lage (0 en 5 mM) concentraties CaCl_2 . Er wordt echter een monovalent-ion gebonden, zij het op 2.5 Å afstand. In de 100mM calcium-kristalvorm bindt calcium aan de carboxylaat van Asp-201 en de carbonyl zuurstof van Trp-199 in een pentagonale bipyramidale coördinatie.

De aanleiding voor het bestuderen van thermitase bij verschillende calcium-concentraties is het sterke effect van calcium op de stabiliteit van het eiwit. Het mogelijke mechanisme dat hiervoor verantwoordelijk is wordt gegeven in hoofdstuk 6. We kunnen concluderen dat de stabilisatie een gevolg is van entropie winst of van de directe interacties tussen calcium-ionen en eiwit-atomen.

Behalve calcium-binding en thermostabiliteit, hebben we ook de interacties tussen thermitase en eglise-c in detail bestudeerd. Hoofdstuk 5 beschrijft het complex dat gevormd wordt tussen enzym en remmer. Het blijkt dat het hart van het eglise-molekuul verschillend georiënteerd is in de verschillende kristallen. Dit is hoogstwaarschijnlijk een gevolg van de verschillende kristalcontacten en duidt op een flexibiliteit van eglise in oplossing. De residuen van eglise, die rechtstreeks binden aan het proteïnase, zijn vrijwel identiek geplaatst in de complexen met thermitase of subtilisine Carlsberg. Verschillen tussen thermitase en subtilisine Carlsberg in de delen van de bindingsplaats van substraat kunnen gerelateerd worden aan verschillen in specificiteit.

Het onderzoek naar het binden van eglise aan thermitase wordt in hoofdstuk 7 aangevuld met de vergelijking van de structuren van natief thermitase en de door ons bepaalde complexen. Het binden van eglise veroorzaakt hoofdzakelijk een verbreding (0.4 Å tot 0.7 Å) van de S1 tot S3 substraatbindingsplaatsen en een vernauwing (1 Å) van de S6 bindingsplaats. Enigszins verbazingwekkend is dat geen verschillen tussen vrij en geremd thermitase te vinden zijn bij de S4 plaats. Hier zijn namelijk wel veel interacties waar te nemen tussen thermitase en eglise. Blijkbaar past de proline van eglise goed in de S4 bindingsplaats zonder structurele aanpassing. Dit geeft een eventuele substraatsvoorkeur aan voor proline op P4. Bij de S' plaatsen in thermitase worden geen atomaire verschuivingen gezien. Wanneer deze resultaten worden vergeleken met wat tot nu toe bekend is voor subtilisines, dan lijkt het meest

waarschijnlijk dat de "induced fit"-binding een algemene eigenschap is voor subtilisines. Aangezien het bestudeerde complex een zogenaamde Michaelis complex is, kan deze conclusie ook gelden voor (normale) substraten.

III. Moleculaire dynamica in de eiwitkristallografie

In dit proefschrift worden twee toepassingen van moleculaire dynamica (MD) in de eiwitkristallografie besproken. In hoofdstuk 3 wordt de MD kristallografische verfijnings methode (MDXREF) gepresenteerd. Hoofdstuk 3 beschrijft ook hoe de methode getest werd bij 600 K. De opgedane ervaring werd toegepast bij de verfijning van thermitase-egline (hoofdstuk 4). Grote correcties werden automatisch uitgevoerd wanneer de resolutie grenzen en de kristallografische gewichten in de verfijning bij 600 K op de juiste wijze gevarieerd werden. Het voorbeeld van Tyr-274 geeft aan dat hoge energie barrières overwonnen kunnen worden in dit verfijningsproces. De tyrosine ring van residue 274 stond in het startmodel naar binnen gekeerd. In de verfijning wordt de ring min of meer dubbel geklapt en vervolgens naar buiten gewrongen. Nadat de tyrosine aan het oppervlakte van het eiwit is gebracht, verloopt de verfijning rond dit residue voorspoedig. Helaas worden niet alle fouten automatisch gecorrigeerd. De structuur rond de middelsterke calcium-bindingsplaats kon slechts na herbouw van het model verfijnd worden. Chirale groepen, zoals in de zijketens van valines en leucines, leverden ook problemen op. Deze worden niet gecorrigeerd, als ze éénmaal omgekeerd in de dichtheid staan. Over het algemeen worden door de MD verfijningsmethode veel grote fouten in het model gecorrigeerd. Dit is met name van belang in het begin van de structuursverfijning, wanneer modelbouw doorgaans bemoeilijkt wordt door slechte electronen dichtheid.

In hoofdstuk 5 wordt een verrassende correctie beschreven, die is uitgevoerd door MDXREF. De oriëntatie van eglise-c ten opzichte van thermitase verschilt 10° tussen de structuren van de kristalvormen I en II. Aangezien we uitgegaan zijn van de structuur uit kristalvorm I voor de verfijning van kristalvorm II, waren de atomen van de hoofdketen van eglise tot 3 \AA verwijderd van hun correcte posities. Dit werd automatisch gecorrigeerd door MDXREF. Het voordeel van deze automatische procedure is dat geen definitie van vaste structuurelementen nodig is. De methode werkt zelfs als de onderzoeker onbewust is van deze fout in het beginmodel.

Een tweede toepassing van MD wordt beschreven in hoofdstuk 8 en de appendices A tot en met C. Hier wordt een nieuwe methode gepresenteerd, die tijdsgemiddelde kristallografisch begrenzende MD (TAX-RMD) wordt genoemd. In de klassieke methodes wordt één enkele eiwit-structuur als model geoptimaliseerd. Dit model heeft doorgaans slechts vier parameters per atoom: x, y, z en B. In onze methode wordt het één-structuur model vervangen door een ensemble van structuren. Dit is nodig, omdat met kleinste kwadraten methodes de anisotropie en anharmonieiteit in de atomaire distributies niet bepaald kunnen worden. In onze methode wordt de atomaire mobiliteit begrensd door wat theoretisch is

toegestaan. Door deze extra informatie uit de MD kunnen we de volledige thermische bewegingen van het eiwitmolekuul meenemen in de beschrijving van het kristal.

De eerste resultaten van TAX-RMD zijn beschreven in hoofdstuk 8 en de appendix A. Van het eiwit fosfolipase A₂ hebben we met deze methode een ensemble van structuren berekend. De kristallografische R-factor van dit ensemble-model was aanzienlijk lager dan de R-factor van het klassieke model: 9.8 % versus 17.1 %. Het ensemble van structuren geeft een grote beweeglijkheid weer van een aantal segmenten van de keten. Deze beweeglijkheid wordt waargenomen voor met name die residuen waarvan men vermoedt dat ze interactie aangaan met de lipide bilaag. De vergelijking van het ensemble-gemiddelde model en het klassieke model laat zien dat voor 72 % van de hoofdketen het verschil slechts 0.12 Å bedraagt. Verdere analyse van de structuurfactoren en de electronendichtheden toont aan dat toepassing van periodieke randvoorwaarden en het aanbrengen van het solvent continuüm tot verdere verbetering zal leiden. Wij hopen dat onze methode zal bijdragen tot een nauwkeuriger bestudering van de dynamica-functie relatie voor bio-macromoleculen.

31209

1996

96038126