

Diss. ETH No. 14582

**Role of structural flexibility in site-specific  
protein modifications.**

**A molecular dynamics investigation**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
For the degree of  
Doctor of Natural Science

Presented by  
**Simona Cotesta**  
M. Phys. University 'La Sapienza' Rome (IT)  
born 01.11.1974  
citizen of Italy

PD Dr. Ernesto E. Di Iorio, examiner  
Prof. Dr. Ari Helenius, co-examiner  
PD Dr. Peter Güntert, co-examiner

2002

# **Role of structural flexibility in site-specific protein modifications.**

## **A molecular dynamics investigation.**

### **Abstract**

The role of structural flexibility in post-translational modifications has been investigated using well-characterised model systems, namely RNase A and  $\alpha$ -lactalbumin. RNase A and its glycosylated derivative RNase B can be cleaved by subtilisin, leading to the nicked protein, respectively RNase AS or RNase BS, constituted by the S-peptide, which comprises the first 20 amino acids, and by the S-protein. The S peptide can be removed, obtaining respectively the S-protein or the BS-protein. This molecular system has been previously used to investigate experimentally the mechanism underlying the process of quality control in the endoplasmic reticulum (ER), which allows only correctly folded and/or assembled proteins to enter the secretory pathway (Trombetta & Helenius, 2000). Only the BS-protein is recognised as incorrectly folded by the sensing enzyme UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase (GT) (Ritter, 2002). Based on these experimental findings we have postulated that the dynamic properties might play a fundamental role in the recognition of misfolded proteins and have therefore carried out comparative molecular dynamics (MD) simulations on RNase A and on the S-protein. A detailed analysis of our 10 ns long atomic trajectories shows that, compared to RNase A, the S-protein has a larger volume, it displays enhanced structural fluctuations, during the simulation it explores a much larger conformational space, its free energy landscape is highly roughed, and it is highly frustrated. These are all signs consistent with a drift of the molecule towards a molten-globule like state. Based on this finding, we propose that GT senses the enhanced dynamics of the S-protein, thus considering it not properly folded.

Alpha-lactalbumin binds a single calcium atom with high affinity. Experiments show that, upon its removal or by lowering the pH of the medium to 2,  $\alpha$ -lactalbumin (LA) becomes a molten globule and is susceptible to selective proteolysis (Polverino De Laureto et al., 1999). Detailed structural information on these two derivatives of LA are missing. Therefore, we have decided to carry out comparative MD simulations on the native enzyme, on its fully protonated form and on the apo-derivative. The idea behind this computational approach is to clarify if local dynamics are responsible, as in other systems, for selective proteolysis and to better characterise – at structural level - partially unfolded states of the molecule. The results obtained show that, within the limited time-window of classical MD simulations (few ns), the atomic trajectories of the apo-enzyme and of the fully protonated derivative are indistinguishable from those of the native protein. We therefore used a novel approach to perturb the system and “push” it out of the energy minimum that competes to the native state of the protein. This approach consists in increasing - for a limited time - the repulsive term of the Lennard-Jones potential, used in classical MD to model van der Waals interactions. We applied this simulation protocol to the apo-derivative of LA and could model a state that has the typical features of a molten globule and has enhanced dynamics in the regions susceptible to selected proteolysis in apo-lactalbumin. Also in this case,

the partially unfolded state displays a roughed energy landscape, visits a large region of the conformational space, and gains in ergodicity.

In both systems analysed we could therefore show that dynamics play a fundamental role in post-translational modifications.

# Role of structural flexibility in site-specific protein modifications.

## A molecular dynamics investigation.

### Riassunto

In questo lavoro abbiamo studiato il ruolo svolto dalla flessibilità strutturale sulle modificazioni post-traslazionali di proteine, usando come modelli due sistemi ben caratterizzati, cioè la Ribonucleasi A e l' $\alpha$ -lattalbumina. L'RNasi A e l'RNasi B, suo derivato glicosilato, possono essere digerite con la subtilisina ottenendo rispettivamente l'RNase AS o l'RNase BS, costituite dal peptide-S, formato dai primi 20 amminoacidi, e rispettivamente dalla proteina-S o proteina-BS. Il peptide-S può essere rimosso, ottenendo rispettivamente la proteina-S o la proteina-BS. Questo sistema molecolare è stato in precedenza studiato per analizzare sperimentalmente il meccanismo alla base del processo responsabile nel reticolo endoplasmatico (RE) del controllo di qualità di proteine, che consente solamente a proteine correttamente ripiegate di entrare la via secretoria (Trombetta & Helenius, 2000). Solo la proteina-BS viene considerata non correttamente ripiegata dal sensore molecolare UDP-glucosiltransferasi di glicoproteine (GT) (Ritter, 2002). Sulla base di questi risultati sperimentali, abbiamo postulato che le proprietà dinamiche potessero svolgere un ruolo fondamentale nel riconoscimento di proteine non correttamente ripiegate. Abbiamo quindi deciso di eseguire simulazioni di dinamica molecolare (MD) comparative sull'RNasi A e sulla proteina-S. L'analisi dettagliata delle nostre traiettorie atomiche, lunghe 10 ns, mostra che, a confronto con l'RNasi A, la proteina-S ha un volume maggiore, fluttuazioni strutturali accentuate, esplora durante la simulazione uno spazio conformazionale più esteso, ha una mappa topografica dell'energia più corrugata e un elevato grado di frustrazione. Questi sono tutti segni che il sistema si sta avviando verso uno stato di *molten globule*. Alla luce di questi risultati si può ipotizzare che la GT è sensibile all'aumentata flessibilità strutturale della proteina-S, riconoscendola quindi come non correttamente ripiegata.

L' $\alpha$ -lattalbumina è una proteina che lega un singolo atomo di calcio con grande affinità. Dati sperimentali mostrano che con la rimozione del calcio o con l'abbassamento del pH a 2, l' $\alpha$ -lattalbumina (LA) diventa un *molten globule* ed è suscettibile a proteolisi selettiva (Polverino De Laureato, 1999). Non esistono dati strutturali dettagliati su questi due derivati della LA. Per questo motivo, abbiamo deciso di eseguire simulazioni comparative di dinamica molecolare sull'enzima nativo, sulla sua forma completamente protonata e sull'apo-enzima. L'idea di base che sta dietro a quest'indagine computazionale è quella di chiarire se, come avviene in altri sistemi, la dinamica stabilisce la specificità della proteolisi selettiva e caratterizzare meglio - sul piano strutturale - stati parzialmente ripiegati della molecola. I risultati ottenuti mostrano che, nell'ambito della ristretta finestra temporale tipica delle simulazioni di MD, le traiettorie atomiche dell'apo-enzima e della forma totalmente protonata non sono distinguibili da quella relativa alla proteina nativa. Abbiamo quindi deciso di usare un approccio completamente nuovo per spingere il sistema fuori dalla buca di potenziale che compete alla struttura nativa. Esso consiste nell'aumentare - per un tempo limitato - il termine repulsivo del potenziale di Lennard-Jones, utilizzato in simulazioni di MD classiche per descrivere le interazioni di van der Waals. Abbiamo applicato questo protocollo per

simulare l'apo-lattalbumina ottenendo così un derivato che mostra le tipiche caratteristiche di un *molten globule* e fluttuazioni accentuate nelle regioni in cui la proteina è suscettibile a proteolisi selettiva. Anche in questo caso lo stato parzialmente ripiegato mostra una mappa topologica dell'energia potenziale molto corrugata, il sistema visita uno spazio conformazionale esteso e guadagna ergodicità.

In ambedue i casi studiati abbiamo potuto dimostrare che la dinamica strutturale gioca un ruolo fondamentale nella regolazione di processi post-traslazionali di modifica delle proteine.