ETH zürich

ETH Library

Structure and function of redox-active proteins involved in N-linked glycosylation and cytochrome aa_3 maturation

Doctoral Thesis

Author(s):
Mohorko, Elisabeth

Publication date:
2012

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-007614831

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. –No. ETH 20858

Structure and function of redox-active proteins involved in *N*-linked glycosylation and cytochrome aa_3 maturation

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Elisabeth Mohorko

Mag.rer.nat. (Karl-Franzens-Universität, Graz)

born February 5, 1983

citizen of Austria

accepted on the recommendation of

Prof. Rudi Glockshuber, examiner

Prof. Markus Aebi, co-examiner

Prof. Hauke Hennecke, co-examiner

Prof. Eilika Weber-Ban, co-examiner

2012

Summary

Thiol-disulfide oxidoreductases are redox-active enzymes that catalyze the formation, isomerization or reduction of disulfide bonds in substrate proteins. Thiol-disulfide exchange proceeds through electron transfer between a C-x-x-C active-site motif in the enzymes and a cysteine pair of the substrate protein. Thiol-disulfide oxidoreductases share a common thioredoxin-like fold consisting of a four-stranded β-sheet surrounded by three α-helices of which the N-terminus of α-helix 1 usually accommodates the catalytic disulfide bond. The C-x-x-C active-site motif may also function as a binding site for copper ions in copper binding proteins, and conversely the active-site cysteine residues in the typical C-x-x-x-C copper binding site of copper chaperones may catalyse thiol-disulfide exchange instead of copper metallation. The aim of this thesis was to characterize the role of two unique members of these redox-active proteins that are involved in *N*-linked glycosylation and cytochrome aa_3 maturation.

The first part of this thesis presents the structural and functional characterization of the redox-active N33/Tusc3 subunit of human oligosaccharyltransferase complex, the central enzyme in *N*-linked glycosylation. The C-x-x-C active-site motif in the ER-luminal domain forms a catalytic disulfide bond with a redox potential of −285 mV. This enables the attack of the disulfide bond of N33/Tusc3 by thiols of newly translocated polypeptide chains in the ER and transient mixed disulfide formation between N33/Tusc3 and folding glycoproteins. The 1.6 Å crystal structure of N33/Tusc3 in the oxidized form unveiled a thioredoxin-like fold exhibiting a peptide binding groove in the proximity of the catalytic disulfide bond. High-resolution crystal structures of two mixed disulfide complexes between N33/Tusc3 and model substrate peptides revealed specific recognition of a hydrophobic residue in the substrate peptide. Surprisingly, the peptides were bound in opposite orientation in the structures of the mixed disulfide complexes but showed almost identical positions of the main chain carbonyl atoms. The results presented here suggest that N33/Tusc3 regulates glycosylation efficiency by transient mixed disulfide formation with a subset of glycoproteins selected by sequence-specific recognition. Specifically, mixed disulfide formation may either increase glycosylation efficiency by preventing substrate folding or decrease glycosylation efficiency by preventing access of the catalytic subunit to glycosylation sequons.

In the second part of this thesis, thiol-disulfide exchange between TlpA and ScoI, two membrane-anchored periplasmic thioredoxin-like proteins from *Bradyrhizobium japonicum*

is reported. TlpA is a thioredoxin-like thiol-disulfide oxidoreductase possessing a C-x-x-C active-site motif with a strongly reducing redox potential. ScoI contains a copper binding site formed by a C-x-x-x-C active-site motif with a comparably highly oxidizing redox potential of −160 mV. Reduction of oxidized ScoI by TlpA proceeded rapidly, with a second-order rate constant of 9.4 x 10^4 M^{-1} s^{-1}, and TlpA-ScoI mixed heterodisulfides show that thiol-disulfide exchange proceeds through the amino-terminal active-site cysteine residue of TlpA and the carboxy-terminal active-site cysteine residue of ScoI. The fast rate of thiol-disulfide exchange between both proteins, which is in the range of physiologically relevant thiol-disulfide exchange reactions, provides strong evidence for an interaction between ScoI and TlpA *in vivo* by which TlpA may maintain ScoI in the reduced state and thus competent for binding copper ions.

The third part of this thesis establishes a theoretical method for the accurate determination of the dissociation constants of copper-protein binding equilibria. The presented strategy allows precise data evaluation using classical mathematical programs such as MATLAB, and provides a framework for the experimental design of copper-protein titration experiments.

Zusammenfassung

Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen stellen eine Enzymklasse redoxaktiver Proteine, die Schwefelbrücken in Substratproteinen einbauen, umbilden und bei Bedarf wieder reduzieren. Dieser Thiol-Disulfid Austausch ist eine Redoxreaktion, bei welcher Elektronen zwischen einer katalytischen Schwefelbrücke, bestehend aus einem C-x-x-C Sequenzmotiv in der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase, und einem Cysteinpaar im Substratprotein übertragen werden.

Alle bis jetzt bekannten Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen besitzen eine Thioredoxin-ähnliche dreidimensionale Struktur, bestehend aus einem zentralen β-Faltblatt, welches üblicherweise von drei α-Helices umgeben wird. Die katalytische Schwefelbrücke ist dabei häufig am aminoterminalen Ende der ersten α-Helix lokalisiert. Das C-x-x-C Sequenzmotiv, welches typischerweise eine katalytische Schwefelbrücke bildet, kann aber auch als Bindungsstelle für Kupferionen in kupferbindenden Proteinen dienen. Andererseits können kupferbindende Proteine, die häufig ein C-x-x-x-C Sequenzmotiv besitzen, auch Thiol-Disulfid Austauschreaktionen katalysieren. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von zwei redoxaktiven Proteinen, die eine wichtige Rolle in der *N*-Gykosylierung und der Biogenese der Cytochrome *c* Oxidase spielen.

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation wird die Struktur und Funktion der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase N33/Tusc3 aufgeklärt. N33/Tusc3 ist eine redoxaktive Untereinheit der humanen Oligosaccharyltransferase, dem zentralen Enzym der *N*-Glykosylierung. Es wird gezeigt, dass die ER-orientierte lösliche Domäne von N33/Tusc3 ein C-x-x-C Sequenzmotiv besitzt, welches eine katalytische Schwefelbrücke mit einem Redoxpotential von −285 mV bildet. Die Bildung dieser Schwefelbrücke im endoplasmatischen Retikulum ermöglicht den nukleophilen Angriff eines Thiols in einer translozierenden Polypeptidkette, wobei ein transientes gemischtes Disulfid zwischen N33/Tusc3 und dem Glykoprotein gebildet wird. Die 1.6 Å Kristallstruktur von N33/Tusc3 in der oxidierten Form zeigt einen Thioredoxin-ähnlichen Aufbau mit einer Peptidbindungstasche nahe der katalytischen Schwefelbrücke. Hochauflösende Kristallstrukturen von zwei Disulfid-Komplexen zwischen N33/Tusc3 und unterschiedlichen Modellpeptiden zeigen die spezifische Erkennung einer hydrophoben Aminosäure in den Modellpeptiden. Erstaunlicherweise sind die Modellpeptide in entgegengesetzter Orientierung gebunden, obwohl die Carbonylgruppen der Hauptkette an nahezu gleicher Position liegen. Die Resultate dieser Arbeit implizieren, dass N33/Tusc3 die

Zusammenfassung

Glykosylierung bestimmter Substratproteine über die Ausbildung transienter, gemischter Disulfid-Komplexe reguliert. Dabei könnte die Ausbildung gemischter Disulfide einerseits die Proteinfaltung verhindern und dadurch die Glykosylierung erhöhen, andererseits könnten gemischte Disulfide den Zugang der katalytischen Untereinheit verhindern und dabei die Glykosylierung bestimmter Sequons blockieren.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wird der Thiol-Disulfid-Austausch zwischen TlpA und ScoI, zwei membrangebundenen Thioredoxin-ähnlichen Proteinen aus *Bradyrhizobium japonicum* beschrieben. TlpA ist eine typische Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase mit einem C-x-x-C Sequenzmotiv und einem stark reduzierenden Redoxpotential- ScoI hingegen enthält ein C-x-x-x-C Sequenzmotiv um Cu(II) Ionen zu binden. Für das C-x-x-x-C Sequenzmotiv in ScoI wurde ein Redoxpotential von −160 mV gemessen. Die Reduktion von oxidiertem ScoI mit TlpA ergab eine Geschwindigkeitskonstante von $9.4 \times 10^4\ M^{-1}\ s^{-1}$. Zudem konnte gezeigt werden, dass TlpA und ScoI gemischte Hetero-Disulfide über das aminoterminale Cystein der katalytischen Schwefelbrücke in TlpA und das carboxyterminale Cystein der Kupferbindungsstelle in ScoI bilden. Die physiologisch relevante Geschwindigkeitskonstante der Thiol-Disulfid- Austauschreaktion zwischen den beiden Proteinen gibt einen klaren Hinweis auf eine *in vivo* Proteininteraktion zwischen TlpA und ScoI, bei der ScoI von TlpA für die Kupferbindung reduziert wird.

Im dritten Teil dieser Dissertation wird eine theoretische Methode zur exakten Bestimmung der Dissoziationskonstante in Kupfer-Protein Bindungsgleichgewichten erarbeitet. Diese Strategie ermöglicht eine exakte Datenauswertung mit klassischen mathematischen Programmen wie MATLAB und bietet eine Basis für ein Design von Kupfer-Protein-Titrationsexperimenten.