



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

**Approaches to structure and dynamics of biological systems by electron-paramagnetic-resonance spectroscopy**  
Scarpelli, F.

**Citation**

Scarpelli, F. (2009, October 28). *Approaches to structure and dynamics of biological systems by electron-paramagnetic-resonance spectroscopy*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14261>

Version: Corrected 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/1887/14261>

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

## Samenvatting

Eiwitten en enzymen spelen een sleutelrol in alle biologische systemen. Het begrijpen van het mechanisme achter de biologische functies en reacties waarbij eiwitten en enzymen een rol spelen vereist een gedetailleerde karakterisering van de eiwitstructuur en -dynamica. Het begrip eiwitstructuur verwijst hier naar de geometrische structuur, die wordt bepaald door de lokale ordening van de aminozuren, en naar de elektronische structuur, in het bijzonder die van het actieve centrum van eiwitten en enzymen. Dynamica verwijst naar de structuurveranderingen die het eiwit ondergaat als het zijn functie vervult.

Het werk beschreven in dit proefschrift betreft de ontwikkeling van elektron-paramagnetische-resonantie (EPR) methoden en de toepassing daarvan op de studie van eiwitstructuur en -dynamica. Daartoe zijn zowel experimenten met continue microgolffexcitatie (cw) als experimenten met gepulste microgolffexcitatie uitgevoerd. In het onderzoek zijn overgangsmetaalionen, zoals Cu(II) en Fe(III), en nitroxide spin-labels gebruikt als paramagnetische sensoren.

In hoofdstuk 2 wordt een hoogfrequent (95 GHz) EPR experiment aan de M150E mutant van het eiwit nitrietreductase (NiR) beschreven. Het wild type van NiR is een homotrimeer waarvan elk monomeer een type-1 (blauw) kopercentrum en een type-2 (niet-blauw) kopercentrum bevat. Het NiR eiwit katalyseert de reductie van nitriet naar stikstofmonoxide. In de katalytische cyclus van het eiwit bindt het type-2 kopercentrum, waarin het koper is gebonden aan drie histidines (His100, His135 en His306) en een watermolecuul, het nitriet ten koste van water. Vervolgens wordt het nitriet gereduceerd tot stikstofmonoxide doordat een elektron wordt overgeheveld vanuit het type-1 kopercentrum.

Type-1 kopercentra zijn uitgebreid bestudeerd. Minder is bekend over de elektronische structuur van type-2 kopercentra. In deze studie hebben we de mutant M150E van het NiR eiwit onderzocht, waarvan het type-1 kopercentrum geen EPR signaal geeft. Een eenkristal is onderzocht en de volledige g-tensor is bepaald. De g-tensor kon worden geïnterpreteerd in termen van de koperorbitalen die deel uitmaken van de golf functie van het ongepaarde elektron.

Analyse van de EPR data afkomstig van het eenkristal leverde drie mogelijke oriëntaties op van de  $g$ -tensor ten opzichte van het kopercentrum. Op basis van een analyse van de coördinatie van het koper en van de koper  $d$ -orbitalen die deel uitmaken van de golffunctie van het ongepaarde elektron kon de meest waarschijnlijke oriëntatie van de  $g$ -tensor worden gekozen. Deze oriëntatie suggereert dat het ongepaarde elektron in een moleculaire orbitaal is die een koper  $d_{xy}$ -orbitaal bevat in  $\sigma$ -antibindende overlap met de orbitalen van de vrije elektronenparen van de stikstofatomen van His135 en His306.

Om de rhombiciteit van de  $g$ -tensor en de oriëntatie ten opzichte van het kopercentrum beter te kunnen begrijpen hebben we een model gebruikt dat beschrijft hoe de spin-baankoppeling van het koperatoom de  $g$ -tensor bepaalt door te kijken welke  $d$ -orbitalen deel uitmaken van de moleculaire orbitaal die het ongepaarde elektron bevat. Dit model geeft aan dat de rhombiciteit zeer waarschijnlijk een gevolg is van de spin-baankoppeling op het zuurstofatoom van het watermolecuul.

In hoofdstuk 3 wordt een EPR studie van tien spin-gelabelde oppervlakteplaatsen van het eiwit cytochrome  $c$  peroxidase (CcP) beschreven. Om de mobiliteit van de spin-labels te kunnen bestuderen is de cw EPR studie uitgevoerd aan een vloeibare oplossing van dit eiwit.

In deze studie vergelijken we de rotatie-correlatietijd,  $\tau_c$ , welke een directe maat is voor de mobiliteit verkregen uit de simulatie van EPR spectra, met de data over de mobiliteit verkregen uit de door de Hubbell onderzoeksgroep voorgestelde analyse van de vorm van het spectrum, de zogenaamde Hubbell-plot. Verder hebben we onderzocht hoe goed methoden die gebruik maken van de kristalstructuur van een eiwit mobiele, toegankelijke oppervlakteplaatsen kunnen voorspellen. Hiertoe vergelijken we de mobiliteit met voorspellingen van de toegankelijkheid voor het oplosmiddel en een model voor de conformatievrijheid van het spin-label.

De  $\tau_c$  waarden geven een betrouwbare volgorde voor de mobiliteit van oppervlakteresiduen. Voor oppervlakteplaatsen voegt de mobiliteitsplot verkregen uit het Hubbell-model niet erg veel toe aan de analyse van  $\tau_c$ . Dit is een gevolg van de kleine mobiliteitsverschillen en de fouten in de parameters. De mobiliteitsplot is meer geschikt om onderscheid te kunnen maken tussen spin-labels, die in het ene uiterste geval volledig

ingebed liggen en in het andere uiterste geval oppervlakteresiduen zijn, en daarom een veel grotere spreiding hebben in hun mobiliteitsparameters. Data over de fractionele toegankelijkheid voor het oplosmiddel zijn zeer geschikt om residuen te identificeren die voldoende bereikbaar zijn voor oppervlakte labeling. Ze zijn minder geschikt om de mobiliteit te voorspellen, als gevolg van de afwezigheid van structuurparameters die de conformatie van de binding tussen het cysteine en het spin-label bepalen. De mobiliteit verkregen uit een model dat de conformatievrijheid van het spin-label voorspelt volgt de trend in  $\tau_c$ -waarden verkregen uit de simulatie, hetgeen suggereert dat dit model de essentie van de mobiliteit van spin-labels weergeeft.

Hoofdstuk 4 gaat over een cw EPR studie van spin-gelabelde WALP peptiden in membranen (lipide dubbellen). Het WALP peptide vormt een transmembrane  $\alpha$ -helix, en kan dienen als model om elementaire aspecten van eiwit-membraaninteracties te bestuderen. Een van de intrigerende en biologisch relevante reacties van peptiden op verschillende membraancondities is aggregatie.

We hebben spin-gelabeld WALP onderzocht in verschillende lipidesystemen, dat wil zeggen onverzadigde lipiden (DOPC) en verzadigde lipiden (DPPC), en bij verschillende temperaturen. Dit bood ons de mogelijkheid om het effect van zowel een gelfase als een vloeibaar-kristallijne fase van de lipiden op de aggregatie van het WALP te bestuderen.

Spin-label EPR is op verschillende manieren gebruikt om membraan-peptide systemen te onderzoeken. De hier beschreven aanpak is nieuw in de zin dat de peptide-peptideinteractie direct kan worden onderzocht door het peptide te voorzien van een spin-label waardoor met behulp van de spin-spin interactie de aggregatie kan worden waargenomen. We hebben een model ontwikkeld dat kwalitatief onderscheid kan maken tussen verschillende conformaties van de peptiden in het aggregaat. We vinden dat de hogere graad van ordening van de lipideketens in de gelfase een belangrijke factor ter promotie van aggregatie lijkt te zijn. We concluderen dit omdat de verzadigde lipide DPPC en de onverzadigde lipide DOPC beide de aggregatie van WALP in de gelfase bevorderen. Echter, de verzadigingsgraad van de lipiden lijkt van invloed te zijn op het type aggregaat dat gevormd wordt en onze analyse suggereert clusteraggregatie in DPPC en lijnaggregatie in DOPC.

In hoofdstuk 5 beschrijven we een nieuwe “relaxation induced dipolar modulation” ofwel “RIDME” pulssequentie.

In de laatste tien jaar zijn verschillende gepulste EPR methoden ontwikkeld en gebruikt om afstanden te meten en de structuur van chemische en biologische systemen te bepalen uit de dipolaire interactie tussen elektronspins. Deze technieken vereisen dat de pulsen een groot gedeelte van het spectrum van het paramagnetische molecuul exciteren. Door instrumentele beperkingen is de excitatiebandbreedte van pulsen beperkt en dit maakt het onderzoeken van systemen met grote spectrale anisotropie moeilijk. Vanwege deze beperking worden gepulste technieken voornamelijk gebruikt om afstanden te meten tussen radicalen die een kleine spectrale anisotropie hebben, zoals nitroxide spin-labels en organische radicalen. Om de afstand tussen een nitroxide spin-label en een overgangsmetaalion dat een grote spectrale anisotropie heeft te kunnen meten zijn andere methoden nodig. Een dergelijke methode is de RIDME-techniek. Deze pulssequentie maakt gebruik van spontane spin flips van het overgangsmetaalion. Er is daarom geen pomppuls met een grote excitatiebandbreedte nodig om de spin flip van het overgangsmetaalion te bewerkstelligen. De bruikbaarheid van de RIDME techniek was beperkt vanwege het probleem met de dode tijd. Voor systemen met een grote spectrale anisotropie bevindt de meeste informatie over de dipolaire interactie zich in het eerste stuk van de dipolaire modulatiecurve en dit eerste stuk gaat verloren in de dode tijd. In ons onderzoek hebben we een nieuwe vijf-puls RIDME sequentie ontwikkeld, waarbij geen dode tijd optreedt. We passen deze nieuwe pulssequentie toe op cytochrome f om de afstand te bepalen tussen het laag-spin Fe(III) centrum, een paramagnetisch centrum met een grote spectrale anisotropie, en een nitroxide spin-label. De met behulp van deze nieuwe techniek gevonden afstand komt goed overeen met de afstand verkregen uit Röntgen-diffractie. Op dit moment is er geen andere methode die dergelijke afstanden zo nauwkeurig kan bepalen.