



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Design and synthesis of paramagnetic probes for structural biology

Liu, W.

Citation

Liu, W. (2013, November 25). *Design and synthesis of paramagnetic probes for structural biology*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22357>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/22357>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22357> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Liu, Wei-Min

Title: Design and synthesis of paramagnetic probes for structural biology

Issue Date: 2013-11-25

Nederlandse Samenvatting

Paramagnetische kernspinresonantiespectroscopie is krachtig gereedschap om eiwitstructuren mee te bepalen, om onzichtbare toestanden van eiwitten zichtbaar meete maken, om de dynamica van eiwitten te observeren en om eiwit-eiwit en eiwit-ligand interacties te bestuderen. Synthetische sondes worden regelmatig gebruikt om een paramagnetisch centrum op een eiwit aan te brengen. Het doel van het onderzoek in dit proefschrift was om nieuwe paramagnetische sondes te ontwikkelen gebaseerd op nitroxide radicalen of lanthanide ionen, om daar vervolgens biomoleculen meete bestuderen. Een overzicht van de huidige op lanthanide ionen gebaseerde sondes is gegeven in Hoofdstuk 1.

In Hoofdstuk 2 is een nieuwe paramagnetische sonde, CLaNP-7, beschreven. De netto lading van deze sonde is +1 in plaats van +3 zoals in de succesvolle CLaNP-5, door *p*-nitrophenol te introduceren als liganden voor de metaal. De $\Delta\chi$ -tensor van Yb-CLaNP-7 heeft een meer rhombisch karakter dan die van CLaNP-5. Dit zou kunnen komen door aanwezigheid van een negende ligand; een watermolecuul of een hydroxylion. Als er een histidine residue dicht in de buurt is van de verankeringsplaats van de sonde, lijkt het alsof de imidazol zijketen van de histidine een waterstofbrug vormt met het negende ligand, resulterend in een pH-afhankelijke $\Delta\chi$ -tensor.

Zwavelbruggen worden veelvuldig gebruikt voor plaats-specifieke verankering van paramagnetische sondes aan doeleiwitten. Maar deze zwakke covalente binding is instabiel onder reducerende omstandigheden. Om de stabiliteit van de verankering van de sonde te verhogen zijn er twee verschillende aanpakken onderzocht in Hoofdstuk 3. Benzylbromide, α -ketobromide en primair bromide werden geplaatst op paramagnetische sondes om zo een thio-ether te kunnen vormen. Van deze sondes bleek het Ln-CLaNP-9 complex, gebaseerd op een α -ketobromide, stabiel te zijn in waterige oplossing en kon succesvol op een eiwit worden geplaatst. Bovendien was de verbinding stabiel onder reducerende omstandigheden. De $\Delta\chi$ -tensoren van Yb³⁺ en Tm³⁺ in CLaNP-9 zijn bepaald met twee model-eiwitten. Daarom is het een aantrekkelijke sonde voor paramagnetische kernspinresonantiespectroscopie.

Voor de bio-orthogonale aanpak is er een artificieel aminozuur, *p*-azido fenylnalanine (AzF), succesvol geïncorporeerd in T4 lysozym. Helaas was de reactiviteit van het eiwit twijfelachtig, gezien de resultaten gevonden met massaspectrometrie. Verscheidene azide bevattende reactieve groepen, zoals

terminale alkyn en cyclooctyn, werden geïntroduceerd op de sondes en in reactie gebracht met AzF-gefunctionaliseerde eiwitten. Uiteindelijk bleek uit de experimenten dat het bijzonder lastig en onpraktisch is om voldoende opbrengst te verkrijgen voor kernspinresonantiespectroscopie.

In Hoofdstuk 4 zijn er derivaten van CLaNP-5 en een modelsysteem gesynthetiseerd om zo een alternatieve methode te ontwikkelen om meervoudige gegevens te verkrijgen van een enkele mutatieplaats. De ^1H kernspinresonantiespectra van het modelsysteem laten zien dat de paramagnetische verschuiving aangetast wordt door de substituties op de sonde en dat alle sondes in oplossing een enkelvoudig enantiomeerpaar vormen. Echter, de $\Delta\chi$ -tensoren bepaald met eiwitdata laten zien dat CLaNP-5-OMe en CLaNP-5 vergelijkbare magnetische susceptibiliteit tensoren hebben. Daaruit volgt dat veranderingen in de periferie van het coördinatiesysteem resulteren in te vergelijkbare $\Delta\chi$ -tensoren om praktische nut te hebben. Daarentegen, heeft de toegevoegde functionele groep (methoxyl) wel een effect op het fysische gedrag van de sonde na verankering. Twee sets van paramagnetische effecten waren aanwezig in het geval van CLaNP-5-OMe, waar er slechts een enkele set is voor CLaNP-5. Dit is waarschijnlijk te verklaren door interacties van de sonde met de aminozuren in de omgeving, door de toegenomen omvang van CLaNP-5-OMe. Deze bevinding, tezamen met die in Hoofdstuk 2, laten zien dat zijketens van aminozuren directe interacties met de sonde aan kunnen gaan en op die manier het paramagnetisch gedrag kunnen beïnvloeden.

Sondes op basis van nitroxide radicalen zijn beschreven in Hoofdstuk 5. Een twee-armige nitroxide sonde is gesynthetiseerd. Maar deze bleek instabiel na verankering aan een model eiwit. Een mogelijke verklaring hiervoor is de combinatie van spanning veroorzaakt door de verankeringplaats en de beweeglijkheid van de verzadigde vijfring. Analoga van substraten en remmers kunnen worden gezien als de volgende generatie van sondes, die een gerichte interactie kunnen aan gaan met een doeleiwit. In dit hoofdstuk zijn derivaten van 1-fenylimidazol, remmers van P450cam, gesynthetiseerd en gekristalliseerd in aanwezigheid van P450cam. De imidazolring van de meta-gesubstitueerde fenylring van 1-fenylimidazol is gelokaliseerd boven het ijzeratoom van de heemgroep en de nitroxide in het substraattoegangskanaal, waarbij het eiwit in een open toestand wordt gedwongen. Dit initiële resultaat suggereert dat deze aanpak veelbelovend is voor studies naar eiwit-ligand complexen.

In Hoofdstuk 6 zijn de toekomstperspectieven van paramagnetische sondes geschetst en bediscussieerd.

