



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Modelling copper-containing proteins

Bosch, Marieke van den

### Citation

Bosch, M. van den. (2006, January 18). *Modelling copper-containing proteins*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4361>

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/1887/4361>

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

---

## SAMENVATTING

Dit proefschrift beschrijft hoe fysische eigenschappen van enkele koper-bevattende eiwitten gemodelleerd kunnen worden onder gebruikmaking van Moleculaire Dynamica (MD) simulaties. De simulatie start vanaf een beginstructuur van het eiwit,  $\{\mathbf{r}_i(0)\}$ . Ieder atoom wordt een initiële snelheid toegekend,  $\mathbf{v}_i(-1/2\Delta t)$ , waarna de nieuwe posities voor de atomen worden bepaald door  $\{\mathbf{r}_i(t)\} = \{\mathbf{r}_i(0)\} + \{\mathbf{v}_i(-1/2\Delta t)\}\Delta t$ . Vervolgens wordt met behulp van een zogenaamd krachtveld, de kracht op ieder atoom berekend,  $\{\mathbf{F}_i(0)\}$ , en een nieuwe snelheid voor ieder atoom met massa  $m$  bepaald,  $\{\mathbf{v}_i(+1/2\Delta t)\} = \{\mathbf{v}_i(-1/2\Delta t)\} + \{\mathbf{F}_i(0)\}\Delta t/m_i$ . Door dit proces vaak genoeg te herhalen kan de dynamica van het eiwit worden gesimuleerd. Om dit te bewerkstelligen voor de eiwitten beschreven in dit proefschrift moet ook een krachtveld voor het koperatoom worden ontwikkeld. Overgangsmetalen zoals koper vertonen een grote variatie in hun ligand-coördinatie en de bijbehorende ladingsverdeling. Verschillende krachtvelden voor overgangsmetalen, waaronder koper, en de methoden gebruikt om die krachtvelden af te leiden zoals beschreven in de literatuur zijn geschetst in **hoofdstuk 1**.

**Hoofdstuk 2** beschrijft de ontwikkeling van een krachtveld voor het koperatoom en de coördinerende liganden waarbij de laatste niet covalent aan de koper worden gebonden. Hiertoe is het koperatoom rondom de bindingsplaats bewogen waarbij op iedere positie de energie van het systeem is bepaald. De koperpositie waar de energie minimaal is, is vergeleken met de positie in de kristalstructuur. Dit is gedaan bij variërende “force field” parameters en zodoende is een optimale parameterset verkregen. MD-simulaties met het ontwikkelde krachtveld zijn vervolgens toegepast op verschillende eiwitten met eenzelfde koperomringing, de zogenaamde type-I koper-eiwitten, om te bekijken of, na een MD-simulatie, het kopercentrum de goede structuur heeft zoals bepaald met röntgen diffractie methoden. Vervolgens is het krachtveld toegepast op eiwitten waar de koper

omringing is veranderd door het koper-ligand Met 121 te vervangen door andere aminozuren. Nagegaan is of het krachtveld de juiste structuur van het kopercentrum voorspelt zoals in de kristalstructuur wordt waargenomen.

Het krachtveld is vervolgens toegepast op een azurinevariant waarbij twee mutaties, één in koper omringing: His117→Gly, en één aan de buitenzijde van het eiwit: Asn42→Cys, zijn aangebracht. Spectroscopische data leidden tot de conclusie dat het gemuteerde residue Cys 42 en het originele Cu-ligand Cys 112 beide de koper coördineren. In **hoofdstuk 3** staat beschreven hoe een model is gegenereerd van de koper-structuur van deze dubbelmutant. De Cys 42 is meerdere malen geleidelijk naar het koperatoom toe getrokken waarbij telkens een verschillend aantal van de oorspronkelijke liganden covalent aan het koper vastgezet zijn. Het niet-covalente Cu-krachtveld zoals beschreven in hoofdstuk 2 is gebruikt om de stabiliteit van de verschillende modellen te verifiëren. Uit de simulaties is gebleken dat Met 121 in de dubbelmutant waarschijnlijk geen deel uitmaakt van de Cu-omringing. De His 46 is daarentegen nodig om een stabiele Cu-structuur te verkrijgen.

Azurine bezit fluorescente en fosforescente eigenschappen welke afkomstig zijn van een Trp residue gesitueerd in de hydrofobe omgeving van het eiwit. Mutaties in de nabije omgeving van de Trp, Ile7→Ser en Phe110→Ser, beïnvloeden deze de spectroscopische eigenschappen. **Hoofdstuk 4** beschrijft de MD-simulaties welke het effect laten zien van de mutaties op de flexibiliteit en heterogeniteit rondom het Trp residue in aan- én afwezigheid van het koperatoom. Ook is de toegankelijkheid voor water bestudeerd van de inwendige structuur van de verschillende eiwitten. Zodoende kon het effect van toegevoegde stoffen zoals acrylamide en glycerol op de spectroscopische eigenschappen worden verklaard.

In **hoofdstuk 5** staat beschreven hoe een om met behulp van MD-simulaties de verschillen in redox potentiaal tussen *wt* azurine bij pH 5 en bij pH 9 en tussen azurin en enkele azurine mutanten geanalyseerd zijn. Met behulp van “Density Functional Theory” berekeningen is een ladingsverdeling voor de koperomgeving bepaald in geoxideerde alswel gereduceerde toestand. MD-simulaties zijn uitgevoerd voor de twee

---

oxidatietoestanden en voor een aantal toestanden waar de ladingen zijn geïnterpoleerd tussen de gereduceerde naar de geoxideerde toestand. Eén set berekeningen is uitgevoerd met met His 35 in de geprotoneerde vorm, een tweede met His 35 in de gedeprotoneerde vorm. Vervolgens zijn er soortgelijke MD-simulaties uitgevoerd maar nu bij constante redoxtoestand waarbij de lading van His 35 is veranderd. De thermodynamische integratiemethode is gebruikt om het vrije enthalpieverschil te bepalen tussen geoxideerd en gereduceerd eiwit zowel bij hoge als bij lage pH en tussen geprotoneerd en gedeprotonerd eiwit zowel in de geoxideerde als de gereduceerde vorm. De nauwkeurigheid van de vrije-energieberekeningen is bepaald als functie van de hoeveelheid en volgorde van de tussenliggende toestanden, de lengte van de simulaties en de start-condities. De nauwkeurigheid bleek sterk af te hangen van de relaxatie van het waterstof-brug netwerk rondom de His 35. De fouten in de vrije-energiewaarden variëren van 1 tot 10  $k_B T$ . Alleen kwalitatieve voorspellingen van de verandering in redoxpotentiaal als gevolg van mutaties konden worden verkregen.

Quercetinase is een kopereiwit dat de inbouw van beide atomen van een zuurstofmolecuul in quercetine en verwante moleculen bewerkstelligt. In de kristalstructuur is een gedeelte van de loop, die in de monomeer de C-terminale met de N-terminale domein verbindt, ongeordend. Wanneer een substraat zich in het enzymatische centrum bevindt, treedt gedeeltelijke ordening op. In **hoofdstuk 6** wordt met behulp van MD-simulaties de dynamica van deze loop geanalyseerd in aan- en afwezigheid van het substraat kampferol. Na het weghalen van het substraat wordt de beweeglijkheid van de loop groter. De hoeveelheid waterstofbruggen tussen de loop en de rest van het eiwit vermindert terwijl de hoeveelheid waterstof bruggen tussen de loop en het oplosmiddel geleidelijk toeneemt, wat ontvouwing van de loop impliceert. De ontstane holte vult zich binnen een nanoseconde met water.

---