



Universiteit
Leiden
The Netherlands

High-frequency EPR on high-spin transitions-metal sites

Mathies, G.

Citation

Mathies, G. (2012, March 1). *High-frequency EPR on high-spin transitions-metal sites*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18552>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18552>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/18552> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Mathies, Guinevere

Title: High-frequency EPR on high-spin transition-metal sites

Issue Date: 2012-03-01

Samenvatting

In bijna de helft van alle bekende eiwitten en enzymen maakt een overgangsmetaalion deel uit van de actieve plaats. Dit hangt ongetwijfeld samen met de flexibiliteit van de chemische coördinatie en van de elektronische structuur van overgangsmetaalionen. Deze elektronische structuur is zeer sterk verweven met de (geometrische) structuur van de actieve plaats en de functie. Informatie over de elektronische structuur van deze actieve centra kan worden verkregen met electron-paramagnetische-resonantie (EPR) spectroscopie.

In een typisch EPR experiment wordt de absorptie gemeten van microgolven van een vaste frequentie door het te bestuderen paramagnetische monster, terwijl het magneetveld wordt opgevoerd. De meest gebruikte frequentie is 9.5 GHz of X band. Er zijn echter legio paramagnetische systemen waarvoor EPR spectroscopie bij hogere frequentie nieuwe informatie oplevert, of waarvoor slechts de combinatie van EPR bij verschillende frequenties een complete interpretatie van de EPR spectra mogelijk maakt.

Bij high-spin overgangsmetaalionen, bijvoorbeeld, is als gevolg van de aanzienlijke spin-baan koppeling de ontaarding van de magnetische subniveaus reeds geheel of gedeeltelijk opgeheven zonder dat een magneetveld aanwezig is. Dit wordt aangeduid als de nulveldsplitsing. Indien de nulveldsplitsing voor een bepaald spinsysteem groter is dan de energie van de toegepaste microgolven, kan het onmogelijk worden om een overgang te induceren, of, als een EPR signaal kan worden waargenomen, is het moeilijk om op grond hiervan de absolute waarde van de nulveldsplitsing te bepalen.

Realisatie van EPR spectroscopie bij hogere microgolffrequenties, met name boven de 200 GHz, is niet eenvoudig, maar de afgelopen decennia zijn op dit gebied aanzienlijke vorderingen gemaakt. Een struikelblok is momenteel het verkrijgen van voldoende gevoeligheid bij hogere frequenties. Hoge gevoeligheid en stabiliteit van het EPR signaal gedurende de lange tijd die gemoeid is met het opnemen van een spectrum zijn in het bijzonder van belang als men hoog-frequente EPR spectra wil opnemen van een (bevroren) oplossing van eiwitten of enzymen, waarvan de actieve plaats een high-spin overgangsmetaalion bevat.

De nulveldsplitsing reflecteert de lokale elektronische structuur van de actieve plaats, maar vertaling naar informatie over de moleculaire energieniveaus en golf-

Samenvatting

functies is niet eenvoudig. De afgelopen jaren is veel vooruitgang geboekt met geavanceerde kwantum-chemische berekeningen, die deze vertaalslag kunnen maken, maar het werk hieraan is geenszins voltooid. Dit vormt een belangrijke motivatie voor de nauwkeurige bepaling van nulveldsplittingsparameters van verschillende overgangsmetaalionen, in verschillende coördinaties, te gebruiken als ijking voor de berekeningen, niet alleen in hun biologische omgeving, maar ook in modelcomplexen.

Hoofdstuk 2 laat zien dat, door gebruik te maken van een single-mode trilholt met hoge kwaliteitsfactor en een speciaal ontwerp van de bevestiging van de modulatiespoel, het met de in Leiden ontwikkelde 275.7 GHz (J band) EPR spectrometer zeer wel mogelijk is om continuous-wave (cw) spectra op te nemen van 20 nl bevroren oplossing van 1 mM Fe(III)-EDTA, een standaard coördinatiecomplex waarin een Fe^{3+} ion is gebonden in de high-spin vorm. De gevoeligheid en stabiliteit van de spectrometer worden verder geïllustreerd aan de hand van J-band EPR spectra van het eiwit rubredoxine. In de geoxideerde toestand bevat de actieve plaats van rubredoxine, dat een rol speelt bij electrontransport in diverse micro-organismen, een high-spin Fe^{3+} ion in een bij benadering tetraëdische coördinatie van vier zwavel atomen afkomstig van vier cysteine residuen. Opvallend zijn de zeer kleine verschillen in de nulveldsplittingsparameters die worden gevonden voor rubredoxines van verschillende organismen, wat illustreert hoe nauw elektronische structuur en functie met elkaar verweven zijn.

In Hoofdstuk 3 worden de mogelijkheden van de J-band spectrometer verder verkend. Onderwerp van studie is de actieve plaats van het eiwit desulforedoxine, dat sterk verwant is aan rubredoxine. In de literatuur is het X-band spectrum van de actieve plaats van desulforedoxine bekend, maar hieruit kan slechts een schatting worden gemaakt van de nulveldsplittingsparameters. Uit het J-band spectrum van desulforedoxine zijn deze parameters voor het high-spin Fe^{3+} centrum van desulforedoxine nauwkeurig bepaald. Een simulatie van het experimentele X-band spectrum met deze parameters laat kleine verschillen, orde van grootte 1 mT, zien tussen de berekende en gemeten resonantievelden. Natuurlijke variatie in de conformatie van de actieve plaatsen en de manier waarop deze wordt meegenomen in de simulatie speelt hierin zeer waarschijnlijk een rol.

Het Fe^{3+} ion in de actieve plaats van desulforedoxine kan worden gesubstitueerd met Co^{2+} en ook deze gesubstitueerde vorm is bestudeerd met EPR spectroscopie. Bij J band konden geen EPR signalen worden waargenomen, maar het X-band spectrum maakt het mogelijk de nulveldsplittingsparameters te schatten. Bovendien is getracht een EPR signaal van Co(II)-rubredoxine waar te nemen, maar dit is niet gelukt. De verschillen in structuur tussen de actieve plaatsen van rubredoxine en desulforedoxine zijn tamelijk subtiel en dit maakt de verschillen in de nulveldsplittingsparameters opvallend. Begrip van de oorsprong van deze verschillen kan alleen worden verkregen uit een volledige berekening van de elektronische structuur.

In Hoofdstuk 4 wordt gepulste ENDOR bij 94.9 GHz (W band) ingezet om de on-

gepaarde-electronendichtheid op de liganden van het complex $\text{Co}[(\text{SPPH}_2)(\text{SP}^i\text{Pr}_2)\text{N}]_2$ te verkennen. In dit complex zorgen twee bidentaalliganden voor een bij benadering tetraëdische zwavelcoördinatie van het centrale high-spin Co^{2+} ion. De symmetrie van het complex als geheel is slechts C_2 . De hyperfijninteractie met de fosforkernen in de liganden blijkt afhankelijk te zijn van de chemische groepen die aan het fosfor zijn gebonden. Met andere woorden, de Co-S bindingen zijn verschillend als gevolg van een subtiel verschil relatief ver van het Co(II)S_4 centrum.

In Hoofdstuk 5 wordt de studie beschreven van het complex $\text{Fe}[(\text{SPPH}_2)_2\text{N}]_2$ met EPR spectroscopie bij 275.7 GHz en 94.1 GHz. De combinatie van EPR spectroscopie bij J en W band maakt het mogelijk de nulveldsplittingsparameters van de twee conformaties, die het complex blijkt aan te nemen, zeer nauwkeurig te bepalen. De J-band EPR spectra van een kristal laten zien dat beide conformaties voorkomen in twee sites die ten opzichte van elkaar 90 graden gedraaid zijn om de z -as van het spin systeem. Zeer opmerkelijk is dat deze resultaten van hoogfrequente EPR spectroscopie niet compatibel zijn met de resultaten van Röntgen diffractie, die bij kamertemperatuur een eenheidscel laten zien met daarin slechts twee moleculen verbonden via een inversiecentrum.

Hoofdstuk 6 geeft de resultaten van cw EPR bij J band aan het eiwit transferrin, dat een belangrijke rol speelt in de ijzerstofwisseling van alle gewervelden. De meeste vormen van transferrin bestaan uit twee homologe lobben, die beide een high-spin Fe^{3+} ion zeer sterk, doch reversibel, kunnen binden. In de literatuur vindt men vele EPR spectra van transferrin, in verschillende vormen en onder verschillende omstandigheden, de oudste reeds uit 1963. De informatie die kan worden verkregen uit de X-band spectra is echter beperkt: de twee gebonden ijzerionen kunnen niet van elkaar worden onderscheiden en de voor ijzer gebonden aan transferrin zeer karakteristieke vorm van het X-band spectrum is niet begrepen. In J-band spectra van human serum transferrin kunnen duidelijk signalen van twee verschillende high-spin ijzercentra worden onderscheiden. Doordat ook J-band spectra zijn bestudeerd van twee mutanten van human serum transferrin, waarin via een lokale mutatie binding van ijzer door een van de twee lobben onmogelijk is gemaakt, is vastgesteld dat deze twee signalen inderdaad afkomstig zijn van de ijzerionen gebonden in de twee homologe lobben. Bovendien zijn de experimentele spectra van deze individuele ijzercentra begrepen en goed te simuleren.

In het werk dat in Hoofdstuk 7 wordt beschreven, wordt geen gebruik gemaakt van EPR spectroscopie, maar van resonante-Raman spectroscopie. Resonante-Raman spectroscopie wordt toegepast om de vibratiemodes van de cofactor sferoideen in het fotosynthetische reactiecentrum van *Rhodobacter sphaeroides* waar te nemen. Dit caroteen speelt vermoedelijk een rol in de bescherming van het reactiecentrum tegen overbelichting, maar het onderliggende mechanisme is niet volledig begrepen. In de literatuur bestaat geen consensus over de configuratie die het sferoideen aanneemt in het reactiecentrum. Vanzelfsprekend is kennis van deze configuratie nodig voor het begrip van de rol die het caroteen speelt in de fotoprotectie.

Samenvatting

In de afgelopen twee decennia is in onze onderzoeksgroep, in samenwerking met andere groepen, een methode ontwikkeld om de resonante-Raman spectra van sferoïdeen, die uiteraard afhankelijk zijn van de configuratie, te berekenen. Deze berekeningen zijn ontwikkeld en geïjkt met behulp van experimentele resonante-Raman spectra van isotoop-gelabeld sferoïdeen, dat was gereconstitueerd in het reactiecentrum van *Rb. sphaeroides* R26, een mutant die geen sferoïdeen produceert.

In Hoofdstuk 7 worden resonante-Raman spectra, gedetecteerd bij verschillende excitatiegolflengtes, van sferoïdeen in het wild-type reactiecentrum vergeleken met spectra van sferoïdeen gereconstitueerd in het reactiecentrum van de mutant R26. Combinatie van deze spectra met resultaten van de berekeningen heeft het mogelijk gemaakt vast te stellen dat de configuratie van sferoïdeen in het reactiecentrum van wild-type *Rb. sphaeroides* 15,15'-*cis* is. Bovendien is vastgesteld dat sferoïdeen in gereconstitueerde R26 reactiecentra voorkomt in twee configuraties, namelijk 15,15'-*cis* en 13,14-*cis*.