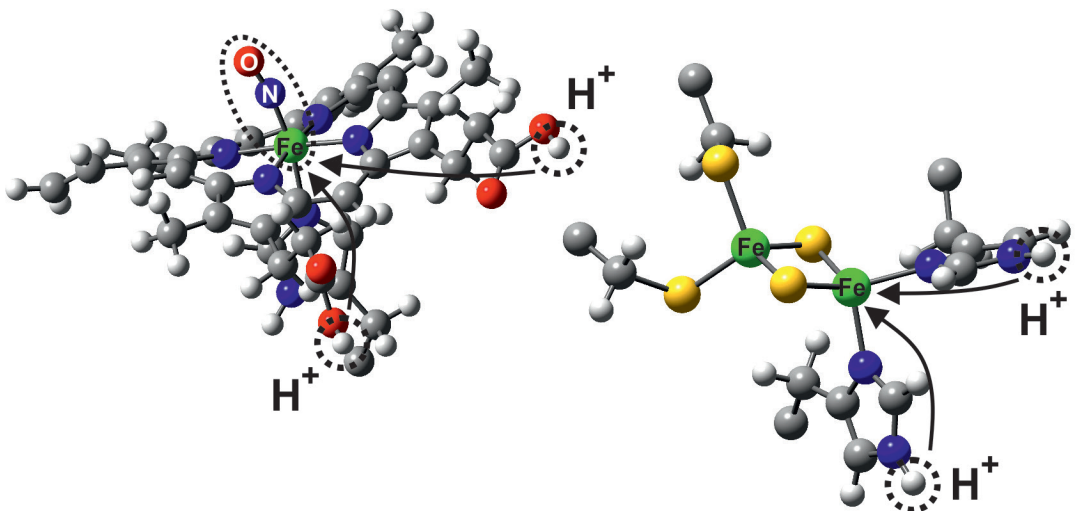


# Auswirkungen von Protonierung auf die elektronischen und vibronischen Eigenschaften von Eisenzentren in Häm- und Eisenschwefel-Proteinen

Hendrik Auerbach



# **Auswirkungen von Protonierung auf die elektronischen und vibronischen Eigenschaften von Eisenzentren in Häm- und Eisenschwefel-Proteinen**

Dissertation

Hendrik Auerbach

Vom Fachbereich Physik der Technischen Universität Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation

Betreuer: Prof. Dr. Volker Schünemann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rolf Diller

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 06.02.2019

D 386



Berichte aus der Biophysik

**Hendrik Auerbach**

**Auswirkungen von Protonierung auf  
die elektronischen und vibronischen  
Eigenschaften von Eisenzentren in  
Häm- und Eisenschwefel-Proteinen**

D 386 (Diss. Technische Universität Kaiserslautern)

Shaker Verlag  
Düren 2019

**Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Kaiserslautern, TU, Diss., 2019

Copyright Shaker Verlag 2019

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-6777-4

ISSN 1439-7897

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Telefon: 02421 / 99 0 11 - 0 • Telefax: 02421 / 99 0 11 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • E-Mail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

## Abstract

The regulation of the activity and of the function of proteins takes place in biological systems via various processes. One of them is e.g. a pH-related conformational change of the protein's tertiary structure. This can have an influence on the function of the protein. If this is a reversible process, the protein function will be actively controlled via the pH value. In this study, the effects of protonation on the electronic and vibronic properties of iron centers in two large subgroups of metalloproteins are investigated, the heme and iron sulfur proteins. Conventional Mössbauer spectroscopy as well as synchrotron-based, resonant, elastic (NFS) and inelastic (NIS) scattering experiments in combination with density functional theory (DFT) calculations are used. The selected methods provide information about oxidation and spin states of the irons as well as their dynamical properties in the protein.

The protein nitrophorin (NP) is a heme protein from the blood sucking kissing bug *Rhodnius prolixus* with the ability to bind NO reversibly to the ferric heme iron. The release of NO is controlled by the pH value of the surrounding environment. The experimentally determined pDOS of the isoforms NP2 and NP7 ligated with NO and the mutants Leu132Val of NP2 and Glu27Val of NP7 show a complex vibrational pattern up to  $400\text{ cm}^{-1}$ , which is mainly due to *in-plane* and *out-of-plane* iron movements in the heme plane. Above  $400\text{ cm}^{-1}$  there is a distinct band around  $\sim 600\text{ cm}^{-1}$ . This is characteristic for Fe-NO complexes with an electronic structure consistent with  $\{\text{FeNO}\}^6$  complexes.

The DFT simulations on crystal structures of the used proteins with different protonated carboxyl residues of the heme and the simulated pDOS clearly show how protons directly effect the Fe-NO modes. The simulated pDOSs of the structures with protonated carboxyl residues of the heme are in a good agreement with the experimental data of all four protein samples. The underlying vibrations of these striking bands are composed of modes with a pronounced bending and stretching character. This manifests the conclusion that the carboxyl groups of the heme in the NPs are protonated in the saliva of insects.

In order to gain a deeper insight into the electronic structure of the Fe-NO unit of the NPs, the molecular orbitals (MOs) were investigated for characteristic orbitals with a pronounced 3d atomic orbital (AO) character and for the  $\pi^*$  orbitals of the ligand. The evaluation of the results from the point of view of the position of these MOs and of characteristic energy differences showed that the electronic structure of the Fe-NO unit is best described by a  $\text{Fe}^{3+}$  with a  $\text{NO}^{\times}$ -molecule with a radical character in the case of structures with deprotonated carboxyl residues of the heme and by a  $\text{Fe}^{3+}$  with a neutral  $\text{NO}^0$ -molecule in the case of structures with protonated carboxyl residues. The energy difference between the MOs with binding and antibinding combination ( $\pi^* + d_{xz / yz}$ ) gives information about the stability of the Fe-NO unit. Consequently, the Fe-NO unit of the structures with protonated carboxyl residues is more stable compared to the structures with deprotonated carboxyl residues, which is consistent with the observations in the living organisms.

In addition to the NPs, the iron sulfur protein APD1 was also investigated in this study. The characterization of the protein by conventional Mössbauer spectroscopy showed that the protein contains a [2Fe-2S]-cluster, which in its native state has the total charge "2+" and a diamagnetic ground state. The values determined for the isomer shift and the quadrupole splitting are characteristic for a Rieske-like cluster coordination, i.e. the iron sulfur cluster (Fe/S-cluster) is connected via two cysteines and two histidines to the rest of the protein. The question concerning the cluster coordination is unambiguously clarified. In addition to electron transfer, Rieske-like Fe/S-clusters can also transfer protons by protonation or deprotonation of the imidazole rings of the coordinated histidines. If these two processes take place stepwise or parallel, they are referred as a proton-coupled electron transfer (PCET). To verify this behavior, the pH of the protein solution was varied, which has a demonstrable influence on the electronic structure of the irons with non-cysteine ligands of the [2Fe-2S]-cluster. This was shown by conventional Mössbauer spectroscopy and NFS experiments.

The NIS experiments performed at the synchrotron have additionally shown that a modified electronic structure has a demonstrable influence on the vibronic behaviour of the [2Fe-2S]-cluster as a whole. The positions of individual characteristic bands, especially in the range between 240 and 300  $\text{cm}^{-1}$ , in the experimentally determined pDOS show a pH-dependent offset. The DFT simulations performed on a structural model for the [2Fe-2S]-cluster allow the classification of the underlying modes in this area as *out-of-plane* modes of iron with non-cysteine ligands.

In addition, single and double mutants are investigated, in which one or both histidines of the cluster are replaced by cysteines. The motivation behind this is to test which amino acids coordinate to the iron sulfur cluster and the examination of the possibility of obtaining a similar cluster coordination to human MitoNEET. The protein MitoNEET has a cluster coordination of three cysteines and one histidine and is a key regulator of mitochondrial functions and lipid homeostasis in the human body. It may have the ability to bind pioglitazone, a drug used to treat diabetes. The determined Mössbauer parameters are in a good agreement with corresponding parameters of human MitoNEET protein.

## Zusammenfassung

Die Regulation der Aktivität und Funktion von Proteinen findet in biologischen Systemen über verschiedene Prozesse statt. Einer davon ist z. B. eine pH-bedingte Konformationsänderung der Tertiärstruktur des Proteins. Diese kann Einfluss auf die Funktion des Proteins haben. Handelt es sich dabei um einen reversiblen Prozess kann die Proteinfunktion aktiv über den pH-Wert gesteuert werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Auswirkungen von Protonierungen auf die elektronischen und vibronischen Eigenschaften von Eisenzentren in den zwei großen Untergruppen der Metalloproteine, den Häm- und den Eisenschwefel-Proteinen, untersucht. Hierzu werden die konventionelle Mössbauerspektroskopie sowie synchrotron-basierte, resonante, elastische (NFS) und inelastische (NIS) Streuexperimente in Kombination mit Dichtefunktionaltheorie-Rechnungen (DFT-Rechnungen) benutzt. Die ausgewählten Methoden geben sowohl Aufschluss über Oxidations- und Spinzustände der Eisen-Ionen als auch über deren dynamische Eigenschaften im Protein.

Das Protein Nitrophorin ist ein Hämprotein mit der Fähigkeit NO reversibel an das dreiwertige Eisen-Ion des Hämrings zu binden. Die Freisetzung von NO wird dabei über den pH-Wert des umgebenden Milieus gesteuert. Die experimentell ermittelten pDOS der mit NO ligandierten Isoformen NP2 und NP7, sowie der Mutanten Leu132Val von NP2 und Glu27Val von NP7 zeigen ein komplexes Schwingungsbandenmuster bis  $400\text{ cm}^{-1}$ , das vor allem auf *in-plane* und *out-of-plane* Eisenbewegungen in der Hämebene zurückzuführen ist. Oberhalb von  $400\text{ cm}^{-1}$  tritt eine ausgeprägte Bande um  $\sim 600\text{ cm}^{-1}$  auf. Diese ist charakteristisch für Fe-NO Komplexe mit einer elektronischen Konfiguration, die zu  $\{\text{FeNO}\}^6$  Komplexen konsistent ist.

Die DFT-Simulationen an Kristallstrukturen der verwendeten Proteine mit verschiedenen protonierten Carboxylresten des Hämrings und den daraus bestimmten simulierten pDOS zeigen deutlich wie Protonen direkte Auswirkungen auf die Fe-NO Schwingungen besitzen. Die beste Übereinstimmung mit den Messdaten weist bei allen vier Proteinproben die simulierten pDOSs der Strukturen mit protonierten Carboxylresten des Hämrings auf. Die zugrundeliegenden Schwingungen dieser markanten Banden setzen sich aus Moden mit einem ausgeprägten Biege- und Streckcharakter zusammen. Dies manifestiert die Schlussfolgerung, dass die Carboxylgruppen des Hämrings bei den NPs protoniert im Speichel der Insekten vorliegen.

Zwecks eines tieferen Einblicks in die elektronische Struktur der Fe-NO Einheit der NPs wurden die Molekülorbitale (MOs) nach charakteristischen Orbitalen mit einem ausgeprägten 3d Atomorbital-Charakter (AO-Charakter) sowie nach den  $\pi^*$ -Orbitalen des Liganden durchsucht. Die Auswertung der Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt der Position dieser MOs sowie charakteristischer Energieunterschiede hat ergeben, dass die elektronische Struktur der Fe-NO Einheit am besten durch ein  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion mit einem  $\text{NO}^X$ -Molekül mit einem Radikalcharakter im Fall der Strukturen mit deprotonierten Carboxylresten des Hämrings und durch ein  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion mit einem neutralen  $\text{NO}^0$ -Molekül bei den Strukturen mit protonierten



Carboxylresten beschrieben wird. Die Energiedifferenz zwischen den MOs mit bindender und antibindender Kombination ( $\pi^* + d_{xz} / yz$ ) ist ein Maß für die Stabilität der Fe-NO Einheit. Demzufolge ist die Fe-NO Einheit der modifizierten 2P Strukturen stabiler im Vergleich zur 0P Strukturen, was sich mit den Beobachtungen im lebenden Organismus deckt.

Neben den Nitrophorinen wurde in dieser Arbeit das Eisenschwefel-Protein APD1 untersucht. Die Charakterisierung des Proteins mittels konventioneller Mössbauerspektroskopie hat ergeben, dass das Protein einen [2Fe-2S]-Cluster enthält, der im nativen Zustand die Gesamtladung „2+“ und einen diamagnetischen Grundzustand besitzt. Die ermittelten Werte für Isomerieverschiebung und Quadrupolaufspaltung sind charakteristisch für eine Rieske-ähnliche Clusterkoordination, d. h. der Eisenschwefel-Cluster (Fe/S-Cluster) ist über zwei Cysteine und zwei Histidine mit dem Rest des Proteins verbunden. Die Frage bzgl. der Clusterkoordination ist damit eindeutig geklärt. Rieske-ähnliche Fe/S-Cluster können zusätzlich zum Transfer von Elektronen ebenfalls Protonen, durch die Protonierung oder Deprotonierung der Imidazolringe der koordinierten Histidine, transferieren. Finden diese beiden Prozesse schrittweise oder parallel statt, spricht man von einem Protonen gekoppelten Elektronentransfer (PCET). Zur Überprüfung dieses Verhaltens, wurde der pH-Wert der Proteinlösung variiert, was einen nachweisbaren Einfluss auf die elektronische Struktur des Eisen-Ions mit nicht Cystein-Liganden des [2Fe-2S]-Clusters hat. Dies wurde anhand von konventionellen Mössbauerspektroskopie- und NFS-Experimenten nachgewiesen.

Die am Synchrotron durchgeführten NIS-Experimente haben zusätzlich gezeigt, dass eine geänderte elektronische Struktur einen nachweisbaren Einfluss auf das vibronische Verhalten des [2Fe-2S]-Clusters insgesamt besitzt. Die Positionen einzelner charakteristischer Banden, vor allem im Bereich zwischen  $240$  und  $300 \text{ cm}^{-1}$ , in den experimentell bestimmten pDOS zeigen einen pH-abhängigen Versatz. Die durchgeführten DFT-Rechnungen an einem Strukturmodell für den [2Fe-2S]-Cluster erlauben die Klassifizierung der zugrundeliegenden Schwingungen in diesem Wellenzahlbereich als *out-of-plane* Moden des Eisen-Ions mit nicht Cystein-Liganden sowie weiterer charakteristischer Moden oberhalb von  $300 \text{ cm}^{-1}$ .

Darüber hinaus werden Einzel- und Doppelmutanten untersucht, bei denen jeweils eins oder beide Histidine des Clusters durch Cysteine ersetzt werden. Die Motivation dahinter ist die Überprüfung der an den Fe/S-Cluster koordinierten Aminosäuren sowie die Möglichkeit eine zu menschlichem MitoNEET ähnliche Clusterkoordination zu erhalten. Das Protein MitoNEET weist eine Clusterkoordination von drei Cysteinen und einem Histidin vor und ist ein Schlüsselregulator von mitochondrialen Funktionen und der Lipid-Homöostase im menschlichen Körper. Es besitzt möglicherweise die Fähigkeit Pioglitazon zu binden, ein Medikament zur Behandlung von Diabetes. Die ermittelten Mössbauerparameter stimmen mit den entsprechenden Werten von menschlichem MitoNEET gut überein.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theoretische Grundlagen .....	3
2.1	Ligandenfeld.....	3
2.2	Mössbauerspektroskopie.....	5
2.2.1	Mössbauer-Effekt.....	5
2.2.2	Hyperfeinwechselwirkung .....	6
2.3	Nukleare inelastische Streuung (NIS).....	11
2.4	Nukleare Vorwärtsstreuung (NFS).....	14
2.5	Dichtefunktionaltheorie (DFT).....	15
2.5.1	Theoretischer Hintergrund .....	15
2.5.2	Basissätze .....	16
2.5.3	Molekulare Mechanik.....	17
2.5.4	ONIOM-Verfahren.....	18
3	Material und Methoden .....	19
3.1	Proteine .....	19
3.1.1	Mit NO ligandierte Hämproteine NP2 und NP7 .....	19
3.1.2	Eisenschwefel-Protein APD1 .....	20
3.2	Probenpräparation.....	21
3.3	Konventionelle Mössbauerspektroskopie.....	22
3.3.1	Experimenteller Aufbau.....	22
3.3.2	Softwarepaket VindaB zur Analyse der Mössbauerspektren .....	24
3.4	NIS- und NFS-Experimente am Synchrotron .....	25
3.4.1	Experimenteller Aufbau.....	25
3.4.2	Software zur Berechnung der partiellen Zustandsdichte .....	27
3.4.3	Software zur Auswertung von NFS-Spektren .....	28
3.5	Eingabestrukturen und DFT-Simulationen mit Gaussian 09.....	28
3.5.1	Präparation der NO ligandierten Hämproteinstrukturen.....	28
3.5.2	Präparation des Modells für das Eisenschwefel-Protein APD1 .....	31
3.5.3	Durchführung der DFT-Simulationen .....	32
4	Elektronische und vibronische Eigenschaften der Fe-NO Einheit in Nitrophorinen..	33
4.1	Einleitung und biochemische Grundlagen.....	33
4.2	NIS-Experimente an den mit NO ligandierten Proteinen NP2 und NP7.....	35
4.3	DFT-Simulationen an den NO ligandierten Strukturen von NP2 und NP7 .....	42

4.3.1	Einfluss von Protonen auf die Fe-NO Wechselwirkung in NP2 und NP7 .....	42
4.3.2	Einfluss der Proteinmatrix auf die Fe-NO Wechselwirkung in NP2 und NP7 ....	50
4.3.3	Auswirkungen der Substitution des Liganden NO auf die Fe-NO Einheit in NP2 und NP7.....	52
4.3.4	Strukturelle Veränderungen der Fe-NO Einheit in NP2 und NP7 in Abhängigkeit der Auslenkungsvektoren der Fe-NO Streckschwingung .....	58
4.3.5	Einfluss von Protonen auf die Fe-NO Wechselwirkung in weiteren Hämproteinen .....	66
4.3.6	Bestimmung der elektronischen Struktur der Fe-NO Einheit in NP2 und NP7 ..	70
4.4	Zusammenfassung .....	77
5	Elektronische und strukturelle Eigenschaften des Fe/S-Clusters von APD1.....	79
5.1	Einleitung und Grundlagen .....	79
5.2	Ergebnisse und Diskussion der Mössbauerspektroskopie-Experimente .....	80
5.2.1	APD1 im nativen Zustand .....	80
5.2.2	APD1 nach der Zugabe des Reduktionsmittels Dithionit .....	82
5.2.3	APD1 Einzelmутanten His255Cys und His259Cys und Doppelmутante His255/259Cys .....	85
5.3	Ergebnisse und Diskussion der Auswirkungen variabler pH-Werte auf den Fe/S-Cluster von APD1 .....	91
5.3.1	Konventionelle und Synchrotron-basierte Mössbauerspektroskopie .....	93
5.3.2	DFT-Simulationen an einem Cluster-Modell für APD1 .....	103
5.3.3	Einfluss der Protonierung von His255 und His259 auf Eisen-Ligand Moden ..	127
5.3.4	Thermodynamische Parameter des Proteins APD1 bei verschiedenen pH-Werten .....	133
5.4	Zusammenfassung .....	134
6	Abschließende Zusammenfassung .....	137
7	Literaturverzeichnis.....	141
8	Anhang .....	150
8.1	Instrumentenfunktionen der NIS-Experimente .....	150
8.2	Aminosäuresequenz APD1 .....	151
8.3	NIS-Spektren der Nitrophorin-Proben .....	152
8.4	NSD-Analyse der verwendeten Kristallstrukturen von Nitrophorin.....	153
8.5	Auflistung der animierten Abbildungen einzelner Moden der Nitrophorine .....	154
8.6	Ergänzende DFT-Simulationen der Nitrophorine .....	157
8.7	Weitere Energiediagramme der Strukturen von Nitrophorin .....	163
8.8	Mössbauerspektren von APD1 .....	167
8.9	NFS-Spektren von APD1 vor und nach den NIS-Experimenten .....	169

8.10	NIS-Spektren der APD1 Proben .....	170
8.11	Ergänzungen zu den DFT-Simulationen von APD1 .....	171
8.12	Auflistung der animierten Abbildungen einzelner Moden von APD1.....	172
8.13	Bindungslängenänderungen des mit Histidinen koordinierten Eisens während der Auslenkung einzelner Moden.....	174
8.14	Clustergeometrien der Kristallstrukturen des Rieske Proteins.....	176