

Mössbauer-Spektroskopie- und Dichte-Funktional-Theorie- Untersuchungen an Modellkomplexen der [Fe]-Hydrogenase und dem Protein LytB

Dissertation
Annegret S. Reinhard

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

Betreuer: Prof. Dr. Schünemann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Urbassek

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 14. November 2012

D 386

Berichte aus der Biophysik

Annegret S. Reinhard

**Mössbauer-Spektroskopie- und Dichte-Funktional-
Theorie-Untersuchungen an Modellkomplexen
der [Fe]-Hydrogenase und dem Protein LytB**

D 386 (Diss. Technische Universität Kaiserslautern)

Shaker Verlag
Aachen 2012

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., 2012

Copyright Shaker Verlag 2012

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

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-1562-1

ISSN 1439-7897

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Für Erna Schuster

Abstract

Because of its variability and abundance, the transition metal iron is one of nature's most important elements. It takes part in many vital biochemical reactions. For example, oxygen transport in blood is only made possible by the iron protein hemoglobin. Furthermore, the catalysis of many enzymes is due to the reactivity of iron centers. For certain applications, it can be interesting to copy these mechanisms in order to design catalysts for industrial processes. In some cases it is most important to learn how to inhibit these reactions to reduce the growth of parasitic organisms. It is the purpose of this work to characterize different model complexes of the hydrogenase Hmd and to understand the reaction mechanism and inhibition of the iron-sulfur-center in the LytB protein.

Iron has an open 3d electron shell which determines its chemical properties. It can be found in many electronic and magnetic states. Mössbauer spectroscopy is the ideal technique to study these different states of the iron ion. This method detects the hyperfine interactions between electrons and nucleus. Nuclear inelastic scattering (NIS) is employed as a complementary technique to analyze the dynamics of the iron center. In this work both of these methods were applied to examine the properties of the iron centers in the samples. Additionally, density functional theory (DFT) calculations were performed to connect electronic and magnetic properties of the iron center to the three-dimensional structures of the molecules.

Hmd hydrogenase catalyzes the dissociation of molecular hydrogen into two protons and two electrons. This reaction can be exploited in environmentally friendly hydrogen fuel cell technologies. Until today it is catalyzed by expensive platinum particles and therefore a cheaper alternative is requested. By copying the Hmd hydrogenase active center, new chemical compounds were developed which may also catalyze the dissociation of H_2 . The models analyzed in the scope of this work were synthesized by Prof. Dr. Xile Hu of the Laboratory of Inorganic Synthesis and Catalysis at the École Polytechnique Fédérale de Lausanne and his co-workers. The electronic structure of the Hmd iron center and the model complexes in question are in very good agreement. The isomer shift gives the charge and spin state of the iron ion. The model complexes cdf103, cdf104, and cdf374 reproduce the isomer shift of the protein within error limits. Applying DFT calculations on these complexes, a strong dependence between Mössbauer parameters and the geometry of the molecule could be shown. Thus it was possible to predict the three-dimensional structures of some of the complexes even if experimental X-ray diffraction data was not available. For example, it is very likely

that the two carbonyl ligands (CO ligands) in the cdf333 complex are in trans- and not cis-geometry as initially assumed.

The iron-sulfur protein LytB possesses four iron centers. It takes part in the metabolic pathway leading to isoprenic units, without which no organism can survive. Only bacteria and some pathogens as the malaria parasite *Plasmodium falciparum* use this pathway to synthesize isoprenes, while LytB does not occur in human cells. Therefore this protein is a promising target for new antibiotics. The protein samples investigated in this work were purified by Dr. Myriam Seemann and coworkers from the Institute de Chimie at the Université de Strasbourg. In the scope of this work the active site of LytB with and without its substrate HMBPP and in interaction with two possible inhibitors (AMBPP and TMBPP) is discussed. Mössbauer spectroscopy studies show that both inhibitors are bound to the iron center. Using DFT calculations, models of the four different forms of the protein were developed. With these models the experimentally obtained Mössbauer parameters were reproduced satisfyingly. By applying the same methods it was possible to propose the still unknown ligands of substrate-free LytB. There is no experimentally obtained crystal structure of this form of the protein, but DFT calculations indicate that two water molecules are directly bound to one of the four iron ions. A third water molecule near the iron center but not within binding range improves the calculations. So it is very likely that the whole protein pocket of substrate-free LytB is filled with water. NIS data of substrate-free, substrate-bound, and AMBPP-bound LytB were also taken. Using the same calculated molecular structures discussed above, theoretical NIS-spectra were obtained. The comparison of the experimentally and calculated spectra also shows good agreement.

Zusammenfassung

Das Übergangsmetall Eisen ist aufgrund seiner Variabilität und seines häufigen Auftretens eines der interessantesten Elemente in biologischen Systemen, das an vielen lebenswichtigen Prozessen beteiligt ist. So wird beispielsweise der Sauerstofftransport im Blut erst durch das Eisenprotein Hämoglobin möglich. Auch in vielen katalytisch aktiven Proteinen bestimmt ein zentrales Eisenion die Reaktivität. Je nach Bedeutung dieses biologischen Systems kann es von Interesse sein, die katalytischen Eigenschaften des Eisenzentrums zu kopieren oder auch zu hemmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Modellkomplexe der Hydrogenase Hmd und das aktive Zentrum des Eisen-Schwefel-Proteins LytB charakterisiert.

Aufgrund seiner nicht abgeschlossenen 3d-Elektronenschale kann Eisen viele verschiedene elektronische Zustände annehmen, die sowohl die Reaktivität als auch die magnetischen Eigenschaften des Systems bestimmen. Mössbauer-Spektroskopie ist die optimale Technik solche Eisenzentren zu analysieren. Es handelt sich dabei um eine kernspektroskopische Methode, bei der die Hyperfeinwechselwirkungen zwischen Elektronenhülle und Atomkern untersucht werden. Unterstützt werden diese Analysen durch kerninelastische Streuexperimente (NIS-Experimente), mit denen die dynamischen Eigenschaften eines solchen Komplexes bestimmt werden können. Durch Dichte-Funktional-Theorie-Rechnungen (DFT-Rechnungen) werden diese experimentellen Ergebnisse mit der dreidimensionalen Struktur der Probe verknüpft.

Die [Fe]-Hydrogenase Hmd katalysiert die Umwandlung von molekularem Wasserstoff in zwei Protonen und zwei Elektronen. Diese Reaktion kann in umweltfreundlichen Wasserstoffbrennzellen nutzbar gemacht werden. Bis heute sind dafür teure Platin-Katalysatoren nötig. Es existiert daher ein großer Bedarf an billig produzierbaren Ersatz-Katalysatoren. Die [Fe]-Hydrogenase könnte als Vorbild für einen solchen Stoff dienen. Die Modelle für Hmd wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Xile Hu vom *Laboratory of Inorganic Synthesis and Catalysis* an der *École Polytechnique Fédérale de Lausanne* hergestellt. Es konnte festgestellt werden, dass die elektronische Struktur der Modellkomplexe der des aktiven Zentrums des Proteins sehr gut entspricht. Dies kann anhand des Mössbauer-Parameters Isomerieverschiebung belegt werden, der Aussagen über Ladungs- und Spinzustand des Eisenions macht. Für die Eisen-Komplexe cdf 103 und 104 sowie für den Dimer cdf374 stimmt die Isomerieverschiebung innerhalb der Fehlergrenzen mit der des Proteins überein. Darüber hinaus konnte durch Anwendung von DFT-Rechnungen eine starke Abhängigkeit zwischen der elektronischen Umgebung des Eisenzentrums und der dreidimensionalen Struktur des

Moleküls festgestellt werden. Mit Hilfe dieser Analysen können nun auch Vorschläge für die Geometrie von Komplexen gemacht werden, deren Struktur bisher noch nicht experimentell bestimmt worden ist. So kann mit großer Wahrscheinlichkeit gesagt werden, dass im Modellkomplex cdf333 die zwei Carbonyl-Liganden (CO-Liganden) in trans-Position zueinander stehen und nicht wie zunächst angenommen in cis-Anordnung vorliegen.

Das Eisen-Schwefel-Protein LytB besitzt vier Eisen-Zentren. Es ist an der Synthese von Isoprenoiden in Bakterien und manchen Krankheitserregern wie dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* beteiligt. Isoprenoide sind überlebensnotwendige Stoffe, ohne die der Organismus stirbt. Da LytB nicht in menschlichen oder tierischen Zellen vorkommt, wurde versucht, die Funktion des Enzyms mit potentiellen Inhibitoren zu hemmen. Diese Inhibitoren können auch als mögliche Antibiotika in Betracht gezogen werden. Die Proteine wurden von Frau Dr. Myriam Seemann und ihren Mitarbeitern am Institute de Chimie an der Université de Strasbourg aufgereinigt. Die Mössbauer-Spektren von LytB wurden ohne und mit dem Substrat HMBPP sowie mit den beiden Inhibitoren AMBPP und TMBPP aufgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass AMBPP und TMBPP in ähnlicher Weise wie das Substrat am Eisen-Zentrum binden. Die Mössbauer-Parameter konnten mit Hilfe von DFT-Rechnungen zufriedenstellend nachvollzogen werden. Dazu wurden aus der bekannten molekularen Struktur für substratgebundenes LytB Struktur-Modelle für die beiden inhibitorgebundenen Formen entwickelt. Darüber hinaus wurde ein Vorschlag für die molekulare Struktur des substratfreien Proteins gemacht, die bisher noch nicht durch Kristallstrukturanalyse bestimmt werden konnte. Die Ergebnisse legen nahe, dass eines der Eisen-Zentren direkt mit zwei Wassermolekülen koordiniert ist und dass weitere Wassermoleküle den Rest der Protein-Tasche füllen. An den substratfreien, substratgebundenen und AMBPP-gebundenen Proben wurden zusätzlich NIS-Experimente durchgeführt. Die experimentell bestimmten Spektren wurden mit den durch DFT bestimmten strukturellen Modellen berechnet. Auch hier hat sich eine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Daten gezeigt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	3
2.1. Komplexchemie und Spin-Hamilton-Formalismus	3
2.1.1. Aufbau von chemischen Komplexen	3
2.1.2. Ligandenfeldtheorie und Spin-Hamilton-Operator	8
2.2. Konventionelle Mössbauer-Spektroskopie	17
2.2.1. Der Mössbauer-Effekt und grundlegende Begriffe	17
2.2.2. Hyperfeinwechselwirkungen	19
2.2.3. Analyse von Mössbauer-Spektren	25
2.3. Kernresonante inelastische Streuung (<i>Nuclear Inelastic Scattering</i> , NIS)	28
2.4. Dichte-Funktional-Theorie-Rechnungen und Molekulare Mechanik	29
2.4.1. Dichte-Funktional-Theorie-Rechnungen	29
2.4.2. Berechnung der Mössbauer-Parameter mit DFT	31
2.4.3. Molekulare Mechanik	33
2.4.4. Kombination von DFT-Rechnungen und Molekularer Mechanik	35
2.4.5. Berechnung von NIS-Spektren	36
3. Material und Methoden	37
3.1. Konventionelle Mössbauer-Spektrometer	37
3.1.1. <i>Closed-Cycle</i> -Kryostat für die Hochfeld-Mössbauer-Spektroskopie	43
3.1.2. Stickstoffgekühlter Durchflusskryostat	46
3.1.3. Datenanalyse mit dem Vinda-Makro	48
3.1.4. Eigenschaften der Proben und Probenbehälter	50
3.2. NIS-Experimente am Synchrotron	51
3.2.1. Eigenschaften der Proben und Probenbehälter	56
3.3. Untersuchte chemische Komplexe	57
3.3.1. Chemische Modelle der [Fe]-Hydrogenase	57
3.3.2. Zustände des Proteins LytB/IspH	57
4. Chemische Modelle der [Fe]-Hydrogenase	59
4.1. Einleitung	59
4.2. Grundlagen	60

4.3. Ergebnisse	64
4.3.1. Modellkomplexe cdf 104 und cdf 103	67
4.3.2. Modellkomplex cdf 006	74
4.3.3. Modellkomplex cdf 240	78
4.3.4. Modellkomplex cdf 322	81
4.3.5. Modellkomplex cdf 333	84
4.3.6. Modellkomplex cdf 392	86
4.3.7. Modellkomplex cdf 248	90
4.3.8. Modellkomplex cdf 374	93
4.4. Abschließende Diskussion	95
5. Inhibition des Proteins LytB/IspH	99
5.1. Einleitung	99
5.2. Biochemische Grundlagen	100
5.2.1. Isoprenoid-Synthese durch den MEP-Weg	101
5.2.2. Eigenschaften von LytB	104
5.3. Ergebnisse	106
5.3.1. Substratfreies LytB	107
5.3.2. Substratgebundenes LytB	117
5.3.3. LytB mit (E)-4-Amino-3-methylbut-2-enyl-diphosphat (AMBPP)	122
5.3.4. LytB mit (E)-4-Thio-3-methylbut-2-enyl-diphosphat (TMBPP)	128
5.4. Abschließende Diskussion	133
6. Zusammenfassung und Ausblick	139
6.1. Chemische Modelle der [Fe]-Hydrogenase	139
6.2. Inhibition des Proteins LytB/IspH	140
Literaturverzeichnis	143
A. Anhang: Material und Methoden	157
B. Anhang: Chemische Modelle der [Fe]-Hydrogenase	167
C. Anhang: Inhibition des Proteins LytB/IspH	175