

# **Spektroskopische Untersuchungen zu funktionsrelevanten Eisen-Liganden- Wechselwirkungen in Häm-Thiolat-Proteinen**

Dissertation

Ramona Christina Christmann

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. Wolfgang Trommer

Datum der wissenschaftlichen Aussprache:

22.05.2015

D386



Berichte aus der Biophysik

**Ramona Christina Christmann**

**Spektroskopische Untersuchungen  
zu funktionsrelevanten Eisen-Liganden-  
Wechselwirkungen in Häm-Thiolat-Proteinen**

D 386 (Diss. Technische Universität Kaiserslautern)

Shaker Verlag  
Aachen 2015

**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., 2015

Copyright Shaker Verlag 2015

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

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-4134-7

ISSN 1439-7897

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

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

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

Meinen Eltern



## Zusammenfassung

Eisen kommt in der Natur in vielen Biomolekülen vor, die zahlreiche, oft lebenswichtige Aufgaben erfüllen. Am bekanntesten ist dabei wohl das Eisenprotein Hämoglobin, das für den Sauerstofftransport im Blut benötigt wird. Hämoglobin besitzt genau wie die in dieser Arbeit untersuchten Eisenproteine eine sogenannte Hämgruppe als aktives Zentrum, weshalb diese Proteine Hämproteine genannt werden. Bei den vier in dieser Arbeit besprochenen Hämproteinen handelt es sich um die Chloroperoxidase CPO aus dem Pilz *Caldariomyces fumago*, die beiden Cytochrom P450-Enzyme P450cam und P450bmp aus den Bakterien *Pseudomonas putida* bzw. *Bacillus megaterium* sowie das NO-Transportprotein *Cimex*-Nitrophorin aus der Bettwanze *Cimex lectularius*. Bei allen vier Proteinen ist die Hämgruppe mittels eines Schwefels aus einem Cystein mit dem Apoprotein verbunden, weshalb sie zu den Hämthiolat-Proteinen gehören.

CPO gehört zu den Peroxidasen, die eine wichtige Rolle im  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Metabolismus spielen und ist bereits gut erforscht. Es bildet bei der Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  das hochreaktive Intermediat Compound I (Cpd I), ein  $\text{Fe(IV)=O}$  Porphyrin- $\pi$ -Kation-Radikal-System. Dieses Cpd I wurde ebenfalls in manchen Cytochrom P450-Enzymen nachgewiesen. Die Enzyme der Cytochrom P450-Familie katalysieren die Hydroxylierung zahlreicher Substrate und sind an der Produktion von Hormonen und dem Metabolismus von Xenobiotika beteiligt. Für ihre Fähigkeit gesättigte CH-Bindungen zu hydroxylieren wird dabei Cpd I verantwortlich gemacht, was Cytochrom P450-Enzyme und deren Intermediat Cpd I für die industrielle Synthese verschiedener Stoffe interessant macht. In dieser Arbeit werden die beiden Cytochrome P450cam und P450bmp auf die Entstehung von Cpd I hin untersucht.

Die Reaktion von CPO mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  dient dabei als Modellsystem für die Bildung von Cpd I. Sowohl dieses Intermediat als auch das Folgeintermediat Compound II konnten für CPO mittels Stopped-Flow-Spektroskopie nachgewiesen werden, womit auch gezeigt wurde, dass der in dieser Arbeit benutzte Versuchsaufbau für den Nachweis solcher Intermediate geeignet ist.

Der gleiche Versuchsaufbau wurde zur Untersuchung der Reaktion der Cytochrome P450cam und P450bmp mit den Persäuren mCPBA (meta-Chloroperbenzoesäure) und PAA (Peressigsäure) und im Fall von P450bmp auch mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet. In diesem sogenannten „Shunt“-Weg des Reaktionszyklusses sollte ebenfalls Cpd I entstehen. Zur Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen wurden der pH-Wert, die Enzymkonzentration, die Temperatur und der Überschuss an Persäure variiert und der Einfluss der einzelnen Parameter auf die Reaktion untersucht. Es konnte zwar oft die für Cpd I typische Absorptionsbande bei 367 nm beobachtet werden, jedoch fehlte meist die zweite postulierte, schwächere Absorptionsbande bei

694 nm. Lediglich bei P450cam trat unter bestimmten Reaktionsbedingungen eine schwache Bande bei 694 nm auf, bei P450bnp nicht. Es kann davon ausgegangen werden, dass Cpd I zu schnell (innerhalb weniger Millisekunden) weiterreagiert und deshalb nicht genug für eine Detektion desselben akkumuliert.

Im Fall der beiden Cytochrom P450-Enzyme war die Herstellung der Enzymproben ebenfalls Teil dieser Arbeit. Das Cytochrom P450cam wurde dafür zunächst mittels Umklonierung mit einem His-Tag versehen, was eine Proteinaufreinigung mittels NiNTA-Affinitätschromatographie ermöglicht. Das Expressionssystem wurde dabei zunächst auf Rhamnose- und IPTG-induzierbare *E. Coli* KRX-Zellen umgestellt, später auf ebenfalls IPTG-induzierbare *E. Coli* C43 DE3-Zellen. Die Optimierung der Enzymausbeute und -reinheit erfolgte durch Variation der Anzuchtbedingungen, wobei die optimale Ausbeute durch Zugabe des Substrats Campher, der Verringerung der IPTG-Konzentration mit gleichzeitiger Verlängerung der Anzuchtdauer sowie der Zugabe eines Hämvorläufers erzielt werden konnten. Für die Präparation von P450bnp konnte ein bereits etabliertes Anzuchtprotokoll genutzt werden.

Mittels EPR-Spektroskopie wurde festgestellt, dass Imidazol bei der Aufreinigung der P450-Enzyme ans Enzym bindet und nicht wie erwartet bei der anschließenden Dialyse gegen imidazolfreien Puffer wieder entfernt wird. Da das Imidazol an die gleiche Stelle ans Hämeisen bindet wie Sauerstoff bei der Entstehung von Cpd I, ist eine Imidazolbindung unerwünscht. Deshalb ist es sinnvoll, das Imidazol bei der Aufreinigung durch Histidin zu ersetzen, da Letzteres nicht ans Enzym bindet.

Im Fall des *Cimex*-Nitrophorins wurde die Hämeisen-NO-Wechselwirkung mittels Mössbauerspektroskopie untersucht. Da davon ausgegangen wird, dass der pH-Wert für die NO-Bindung eine Rolle spielt, wurden cNP-Proben mit und ohne NO-Begasung bei zwei verschiedenen pH-Werten, die dem von InsektenSpeichel und Säugetierblut entsprechen, verwendet. Es zeigte sich, dass cNP bei dem niedrigen pH-Wert von InsektenSpeichel sowohl eine „high-spin“- ( $S = 5/2$ ) als auch eine „low-spin“-Komponente ( $S = 1/2$ ) besitzt, während es beim weitgehend neutralen pH-Wert von Säugetierblut nur eine „low-spin“-Komponente aufweist. Außerdem wurde bestätigt, dass ein NO-Molekül an das Hämeisen binden kann, was zu einem diamagnetischen Grundzustand führt. Ein weiteres NO kann eine SNO-Verbindung mit dem Cystein-60 eingehen, was in einer „low-spin“-Komponente im Mössbauer-Spektrum resultiert. Alle mittels Mössbauer-Spektroskopie nachgewiesenen Komponenten stimmen mit den in der Literatur von Weichsel et al.<sup>1</sup> postulierten Verbindungen überein.

---

<sup>1</sup> A. Weichsel, E. M. Maes, J. F. Andersen, J. G. Valenzuela, T. K. Shokhireva, F. A. Walker, W. R. Montfort; *Heme-assisted S-nitrosation of a proximal thiolate in a nitric oxide transport protein*, PNAS 102 (2005) 594-599

## Abstract

Iron containing biomolecules fulfill versatile, often vital functions. The most popular example is presumably the iron protein hemoglobin, required for the oxygen-transport in the blood. Hemoglobin contains a so called heme group as active center just like all in this work investigated proteins. This sort of proteins is called heme proteins. The four in this work discussed heme proteins are the chloroperoxidase CPO from the fungus *Caldariomyces fumago*, the two cytochrome P450-enzymes P450cam and P450bpm from *Pseudomonas putida* respectively *Bacillus megaterium*, as well as the NO transport protein Cx-nitrophorin cNP from the bedbug *Cimex lectularius*. In all four proteins the heme group is linked with a cysteine with the rest of the protein, for which reason they belong to the heme thiolate proteins.

The well explored CPO belongs to the peroxidases, which play an important role in the  $\text{H}_2\text{O}_2$  metabolism. In the reaction with  $\text{H}_2\text{O}_2$  it forms the highly reactive intermediate compound I, a  $\text{Fe(IV)=O}$  porphyrin- $\pi$ -cation-radical-system. Compound I has been detected in some cytochrome P450 enzymes too. The members of the cytochrome P450 family catalyze the hydroxylation of numerous substrates and are involved in the synthesis of hormones and the metabolism of xenobiotics. Their capability of hydroxylating saturated C-H-bonds is attributed to compound I. This is why the P450 enzymes and their intermediate compound I are of great interest for the industrial synthesis of versatile substances. In this work the two cytochromes P450cam and P450bpm are investigated with respect to the formation of compound I.

The reaction of CPO with  $\text{H}_2\text{O}_2$  serves as a model system for the formation of compound I and as a test for the experimental setup. Both compound I and the subsequent intermediate compound II could be detected with stopped-flow-spectroscopy, showing that the experimental setup used in this work is suitable for the detection of such intermediates.

With the same experimental-setup the reaction of cytochrome P450cam and cytochrome P450bpm with the peracids mCPBA (meta-chloroperoxybenzoic acid) and PAA (peracetic acid), and in the case of P450bpm with  $\text{H}_2\text{O}_2$  too, was investigated. In this so called „shunt“-way of the reaction cycle compound I should be formed. For the determination of the optimal reaction conditions, the pH-value, the concentration of the enzyme, the temperature and the excess of peracid were varied. Although the typical absorption band at 367 nm for compound I could be detected, the second postulated, weaker absorption band at 694 nm was mostly missing. Only for P450cam there was a weak absorption band at 694 nm under certain reaction conditions. For P450bpm this was not the case. It is assumed, that compound I reacts too fast (in the range of a few ms), preventing its accumulation and detection.

In the case of the two cytochrome P450 proteins the preparation of the enzyme samples was also part of this work. The cytochrome P450cam was first provided with a His-tag by subcloning, making the enzyme isolation via NiNTA affinity chromatography possible. The expression system was changed over first to rhamnose- and IPTG-inducible *E. coli KRX* cells and later to IPTG-inducible *E. coli C43 DE3* cells. Improvement of enzyme yield and enzyme purity was achieved by varying the expression terms. Best yield was achieved by adding the substrate camphor, the reduction of IPTG concentration combined with increase of expression time, and adding of a heme precursor. In the case of cytochrome P450bmp a well-established protocol was used.

Via ESR spectroscopy it was determined, that imidazole binds at the P450 enzymes during protein isolation and cannot be removed by dialysis against an imidazole-free buffer. The imidazole binds at the same location like oxygen in the formation of compound I. That's why a binding of imidazole is undesirable. To prevent this problem, the imidazole in the protein isolation can be replaced by histidine, which does not bind at the heme.

For the *Cimex* nitrophorin cNP from *Cimex lectularius* the heme-iron-NO-interaction was investigated via Mössbauer spectroscopy. Samples of cNP with and without NO and with two different pH-values, corresponding the pH-value of insect saliva and mammalian blood, were used. At the low pH-value of insect saliva cNP has a high-spin ( $S = 5/2$ ) and a low-spin ( $S = 1/2$ ) component, but at the nearly neutral pH-value of mammalian blood only a low-spin component is detected. Furthermore the binding of a NO molecule at the heme iron, leading to a diamagnetic ground state, was confirmed. A second NO molecule can undergo a SNO-bond with the cystein-60, resulting in a low-spin component in Mössbauer spectrum. All via Mössbauer spectroscopy detected components are in agreement with the the postulated components in the literature of Weichsel et al.<sup>i</sup>

---

<sup>i</sup> A. Weichsel, E. M. Maes, J. F. Andersen, J. G. Valenzuela, T. K. Shokhireva, F. A. Walker, W. R. Montfort; *Heme-assisted S-nitrosation of a proximal thiolate in a nitric oxide transport protein*, PNAS 102 (2005) 594-599

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Biologische Grundlagen .....	3
2.1	Mikrobiologische Grundlagen .....	3
2.1.1	Aufbau von Bakterien .....	3
2.1.2	<i>Escherichia Coli</i> .....	4
2.1.3	Rolle von Plasmiden .....	4
2.2	Proteinbiosynthese/Expression .....	5
2.2.1	Grundlagen .....	5
2.2.2	Transkription .....	6
2.2.3	Translation .....	7
2.3	Präparation von rekombinantem Protein .....	9
2.3.1	Klonierung eines Gens und Transformation in ein Bakterium .....	9
2.3.2	Proteinexpression in <i>Escherichia Coli</i> -Zellen .....	19
2.3.3	Isolation des gewünschten Proteins .....	24
2.3.4	Proteinkonzentration und Reinheit .....	28
2.4	Hämthiolat Proteine .....	31
2.4.1	Funktion von Hämproteinen .....	31
2.4.2	Spektrale Eigenschaften von Hämenzymen .....	32
2.4.3	Chloroperoxidase .....	33
2.4.4	Die Cytochrom P450-Familie .....	36
2.4.5	Cytochrom P450cam .....	40
2.4.6	Cytochrom P450bmp .....	43
2.4.7	<i>Cimex</i> -Nitrophorin .....	44
3	Physikalische Grundlagen .....	47
3.1	UV-Vis-Stopped-Flow-Spektroskopie .....	47
3.1.1	Physikalische Grundlagen optischer Spektroskopie .....	47
3.1.2	Aufbau einer Stopped-Flow-Anlage .....	49
3.1.3	Zur Auswertung der Daten verwendete Techniken .....	50
3.2	Grundlagen Reaktionskinetik .....	53
3.2.1	Reaktionsgeschwindigkeit .....	53
3.2.2	Reaktion erster Ordnung .....	53
3.2.3	Reaktion zweiter Ordnung .....	54
3.2.4	Reaktion pseudoerster Ordnung .....	54

3.2.5	Folgereaktionen .....	54
3.2.6	Temperaturabhängigkeit chemischer Reaktionen.....	55
3.3	EPR-Spektroskopie .....	55
3.3.1	Physikalische Grundlagen der EPR-Spektroskopie .....	55
3.3.2	g-Wert .....	56
3.3.3	Spin-Hamilton-Operator .....	57
3.3.4	Aufbau und Funktionsweise einer EPR-Anlage .....	58
3.4	Mössbauer-Spektroskopie .....	59
3.4.1	Der Mössbauer-Effekt .....	59
3.4.2	Analyse von Mössbauerspektren .....	60
3.4.3	Spin-Hamilton-Formalismus .....	61
3.4.4	Aufbau eines Mössbauer-Spektrometers.....	62
4	Material und Methoden .....	65
4.1	Geräte.....	65
4.2	Verwendete Substanzen .....	67
4.2.1	Verwendete Bakterienstämme .....	67
4.2.2	Umklonierung.....	67
4.2.3	Proteinexpression .....	70
4.2.4	Proteinaufreinigung .....	73
4.2.5	Reaktionspartner für die „Shunt“-Reaktion.....	74
4.2.6	Proteincharakterisierung .....	76
4.3	Methoden zur Umklonierung.....	77
4.3.1	Plasmidpräparation .....	77
4.3.2	Herstellen der Primer.....	80
4.3.3	PCR.....	80
4.3.4	Restriktion der DNA-Stücke und Ligation zum neuen Plasmid .....	82
4.3.5	Colony-PCR .....	84
4.3.6	Kontrollverdau .....	86
4.3.7	Gensequenzierung .....	86
4.4	Proteinexpression .....	86
4.4.1	Expression von Cytochrom P450cam in <i>E. Coli</i> KRX-Zellen.....	86
4.4.2	Expression von Cytochrom P450cam in <i>E. Coli</i> C43 DE3-Zellen nach etabliertem Protokoll .....	88

4.4.3	Verbesserte Expression von Cytochrom P450cam in <i>E. Coli C43 DE3</i> -Zellen	89
4.4.4	Expression von Cytochrom P450bmp in <i>E. Coli DH5α</i> -Zellen	90
4.5	Stammhaltung	91
4.5.1	Anlegen von Kryokulturen	91
4.6	Proteinaufreinigung	91
4.6.1	Isolation des Enzyms mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie	91
4.6.2	Dialyse des Enzyms und Aufkonzentrierung	92
4.7	Proteincharakterisierung	93
4.7.1	CO-Differenz-Test	93
4.7.2	Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test)	93
4.7.3	SDS-Gelelektrophorese	95
4.7.4	Stopped-Flow-UV-Vis-Spektroskopie	97
4.7.5	EPR-Spektroskopie	98
4.7.6	Mössbauer-Spektroskopie	98
5	Ergebnisse und Diskussion	101
5.1	Die Reaktion von Chloroperoxidase mit Wasserstoffperoxid	101
5.1.1	Präparation	101
5.1.2	Kinetik der Reaktion von CPO mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	101
5.2	Die Reaktion von Cytochrom P450cam mit Peroxysäuren	105
5.2.1	Umklonierung von Cytochrom P450cam zur Aufreinigung durch His-Tag	105
5.2.2	Optimierung der Enzympräparation	111
5.2.3	Bindung des Substrats Campher an Cytochrom P450cam	119
5.2.4	Kinetik der Reaktion von P450cam mit Persäuren	122
5.2.5	Bindet Imidazol an P450cam?	142
5.2.6	EPR-Spektren von Cytochrom P450cam	143
5.2.7	Problematik des Nachweises von Cpd I in P450cam	146
5.3	Die Reaktion von Cytochrom P450bmp mit Wasserstoffperoxid und Peroxysäuren	149
5.3.1	Präparation	149
5.3.2	Kinetik der Reaktion von P450bmp mit Wasserstoffperoxid und Persäuren	149
5.3.3	EPR-Spektren von Cytochrom P450bmp	169
5.4	Mössbauerspektroskopische Untersuchungen zur NO-Bindung am <i>Cimex</i> -Nitrophorin (cNP)	172

6	Zusammenfassung und Ausblick.....	181
7	Literaturverzeichnis .....	183
8	Anhang .....	189
8.1	Veröffentlichungen.....	189
8.2	Verwendete Plasmide .....	190
8.2.1	Konzentrationen und Reinheiten der verwendeten Plasmide.....	190
8.2.2	Konzentrationen der verwendeten DNA-Stücke .....	190
8.2.3	Primersequenzen .....	190
8.2.4	Basensequenz für pET20b+-CamC-Thrombin-His .....	191
8.2.5	Basensequenz für pET20b+-CamC-TEV-His .....	195
8.2.6	Basensequenz für pET20b+-CamC-Y75F/Y96F-Thrombin-His .....	197
8.2.7	Basensequenz für pET20b+-CamC-Y75F/Y96F-TEV-His .....	201
8.3	Spektroskopische Charakterisierung von Cytochrom P450cam .....	204
8.3.1	Einfluss von Campher auf die Expression von Cytochrom P450cam Y75F/Y96F .....	204
8.3.2	Test der Performance von <i>Pro-Kineticist</i> .....	206
8.3.3	Kinetik der Reaktion von P450cam Y75F/Y96F mit Persäuren .....	206
8.4	Charakterisierung von <i>Cimex</i> -Nitrophorin mittels Mössbauer-Spektroskopie.....	215
	Index.....	217
	Danksagung .....	221
	Lebenslauf .....	223