

Dynamics and structure in the Mn^{2+} site of concanavalin A as determined by high-field EPR and ENDOR spectroscopy

Goldfarb, D., Narasimhulu, K. V. and Carmieli, R. (2005), Magn. Reson. Chem.,
43: S40–S50

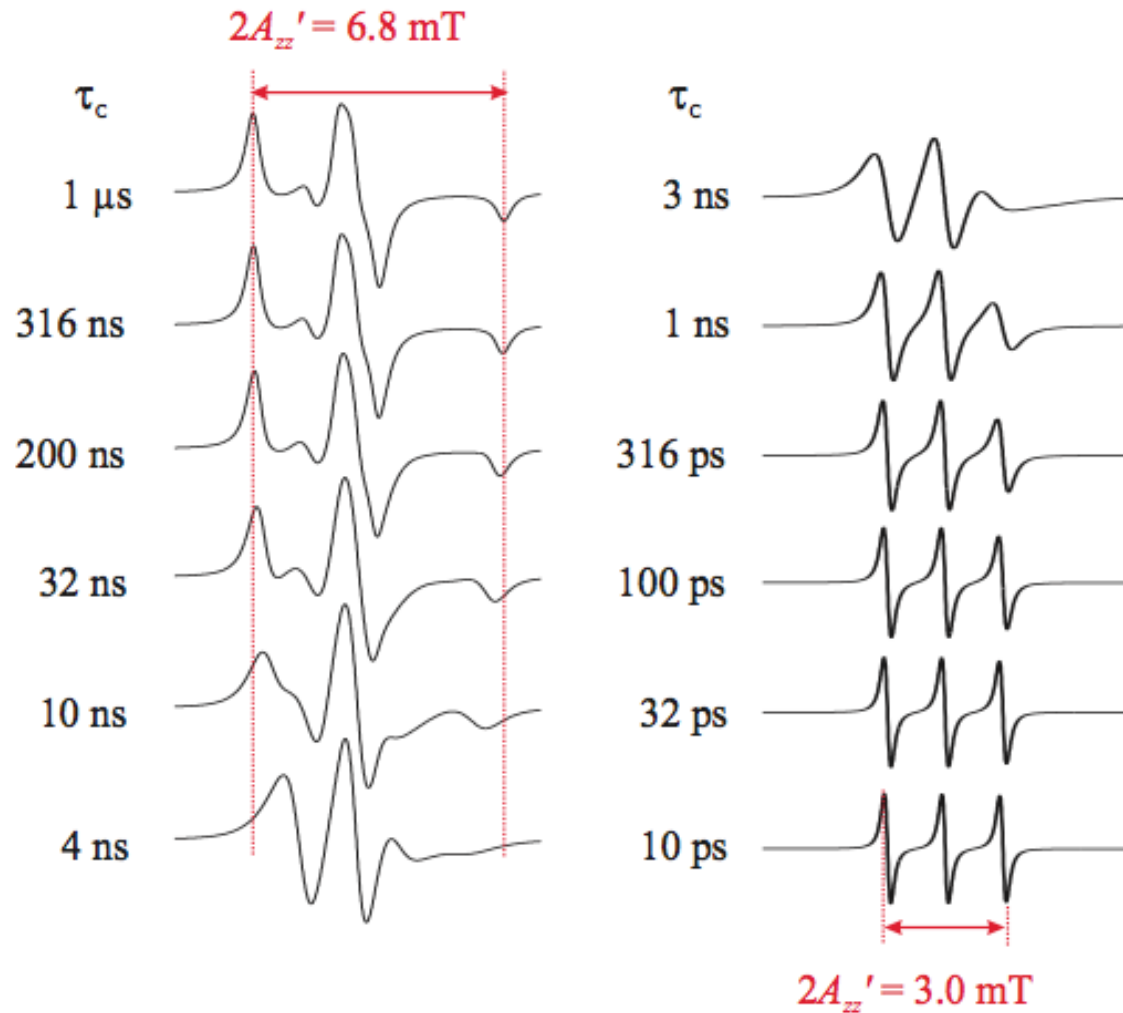
Deniz Ar

**Seminar Moderne Anwendungen der Magnetischen Resonanz
21/10/13**

1. Einleitung

- **Untersuchte Probe bei EPR/ENDOR meistens als gefrorene Lösung**
- **→ Orientierungsselektive Messungen nicht möglich**
- **Einzelkristall Messungen liefern meist vollständige und genaue Daten**
- **ABER: Protein Einzelkristall sehr klein → EPR/ENDOR schwierig**
- **Die hohe Empfindlichkeit der Hochfeld EPR gegenüber Größenlimitierte Proben machen Single Kristall Messungen von Metalloenzymen machbar**

1. Einleitung



10,5 ps \rightarrow $\sim 95 \text{ GHz}$ (W-Band)

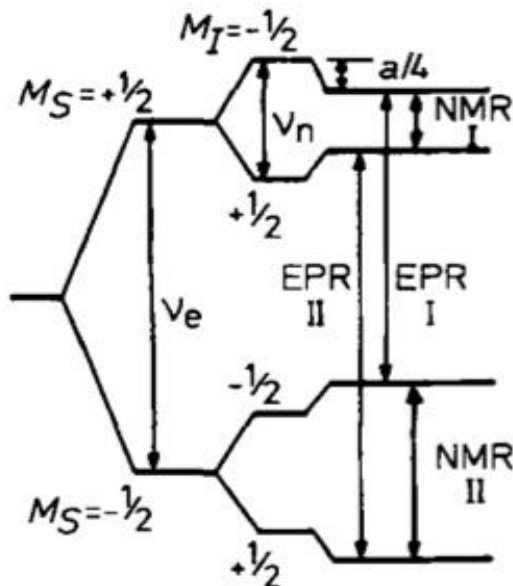
©Dissertation Silvia Scheidt, 2006 Uni Mainz

Einleitung

- ENDOR: Erweiterung von EPR zur Untersuchung komplizierter Moleküle
- EPR zur Untersuchung paramagnetischer Verbindungen

$$N_n = 2(2S + 1) \sum_{k=1}^m I_k$$

$$N_e = \prod_{k=1}^m (2I_k + 1)$$



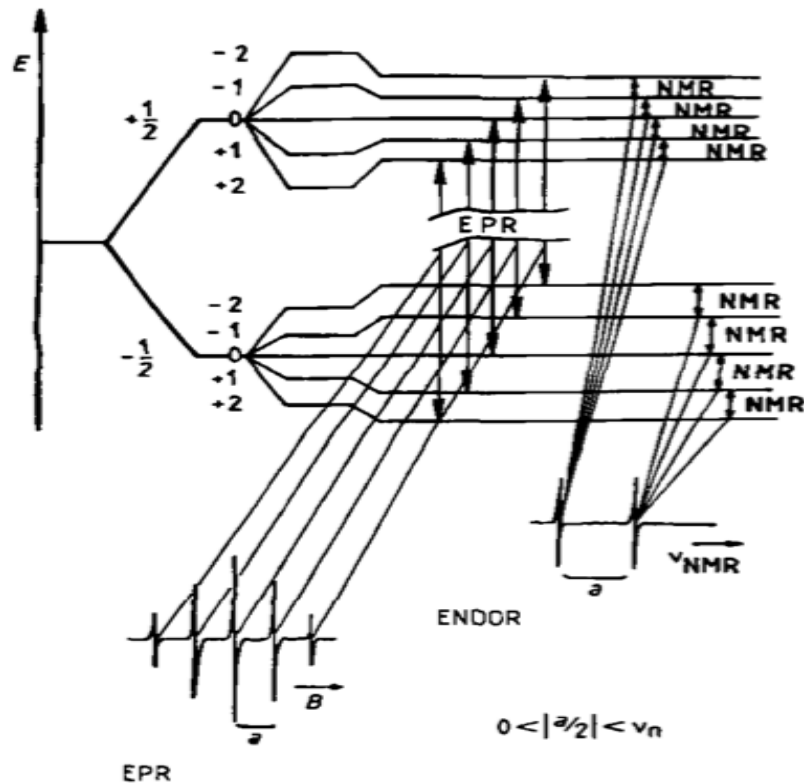
Auswahlregeln EPR
 $\Delta M_s = \pm 1$ & $\Delta M_I = 0$

Auswahlregeln ENDOR
 $\Delta M_s = 0$ & $\Delta M_I = \pm 1$

© H. Kurreck, B. Kirste, W. Lubitz, *Angewandte Chemie*, 96, 1984, 171-193.

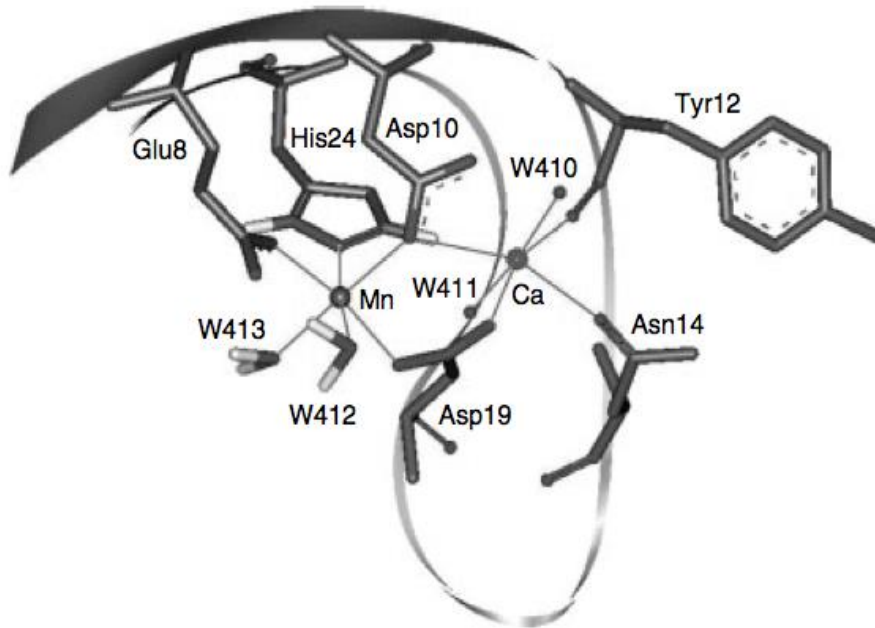
Einleitung

- EPR zur Untersuchung paramagnetischer Verbindungen
- ENDOR: Erweiterung von EPR zur Untersuchung komplizierter Moleküle



© H. Kurreck, B. Kirste, W. Lubitz, *Angewandte Chemie*, 96, 1984, 171-193.

Concanavalin A



Gehört zur Pflanzenfamilie
Haemagglutinin
(eine große Gruppe von
Saccharidbindenden Proteine)

3 D Struktur X-Ray mit einer Auflösung
0,94 Å

Struktur des Protein Dimers: β -Faltblatt Strang
→ jellyroll motif

Assoziiert als Dimer von Dimer → Tetramer

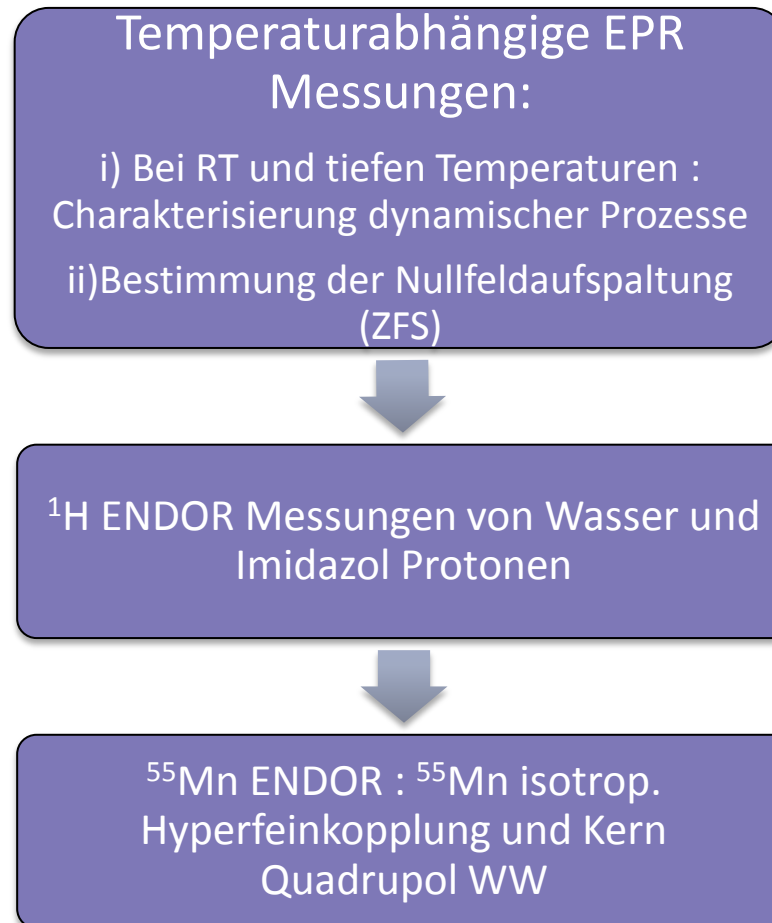


Jedes Monomer 25 kDa :

-aus 237 AS und 2 Metallbindende Seiten Ca^{2+} (S2) / Mn^{2+} (S1)

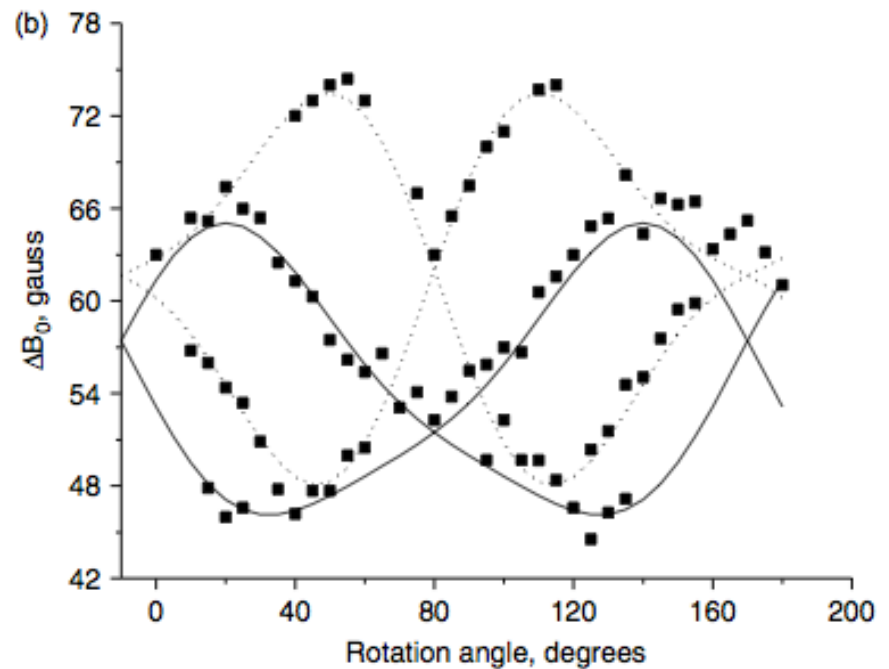
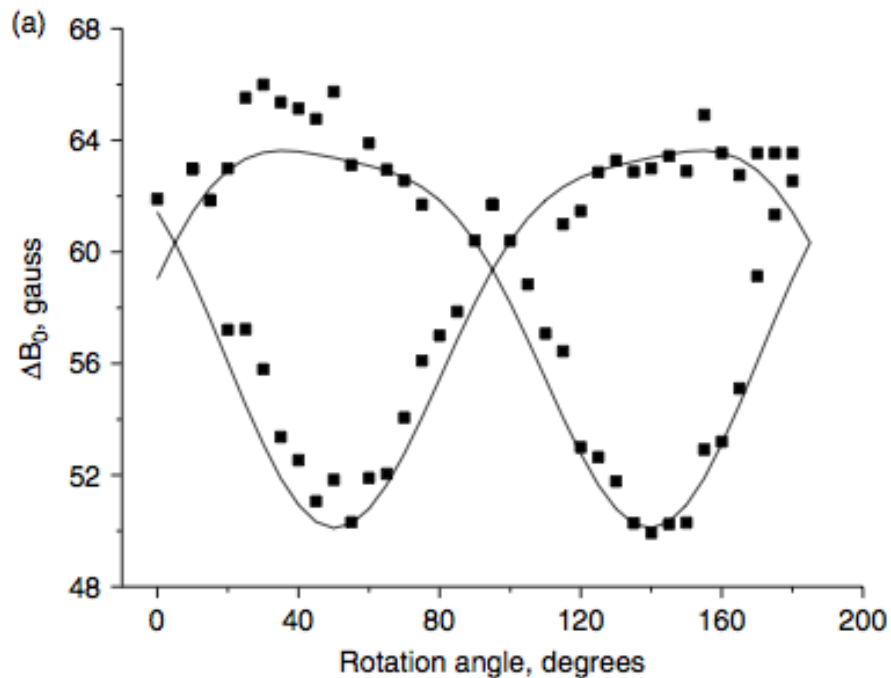
Kurzer Inhalt des Papers

Untersuchung der Eigenschaften von Mn^{2+} in Concanavalin A durch single crystal W-band EPR/ENDOR



- **Meirovitch: single crystal Q-band Spektren bei RT: gleiche Ergebnisse wie bei durch X-Ray bestimmte Struktur**
- **→ ein Tetramer in der asym. Einheit mit einem Mn^{2+} Typ pro Monomer**
W-Band Messungen bei RT mit Q-Band übereinstimmend
- **Analyse des CW-EPR Rotationsmuster bei RT bestätigt den ZFS Tensor von Meirovitch**

Vergleich: Rotationsmuster W-Band CW EPR (ac Ebene) bei a) RT und b) 4,5 K



Keine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der X-Ray Messungen bei 110 K

EPR Messungen

Unterschiedliche Werte für D und E

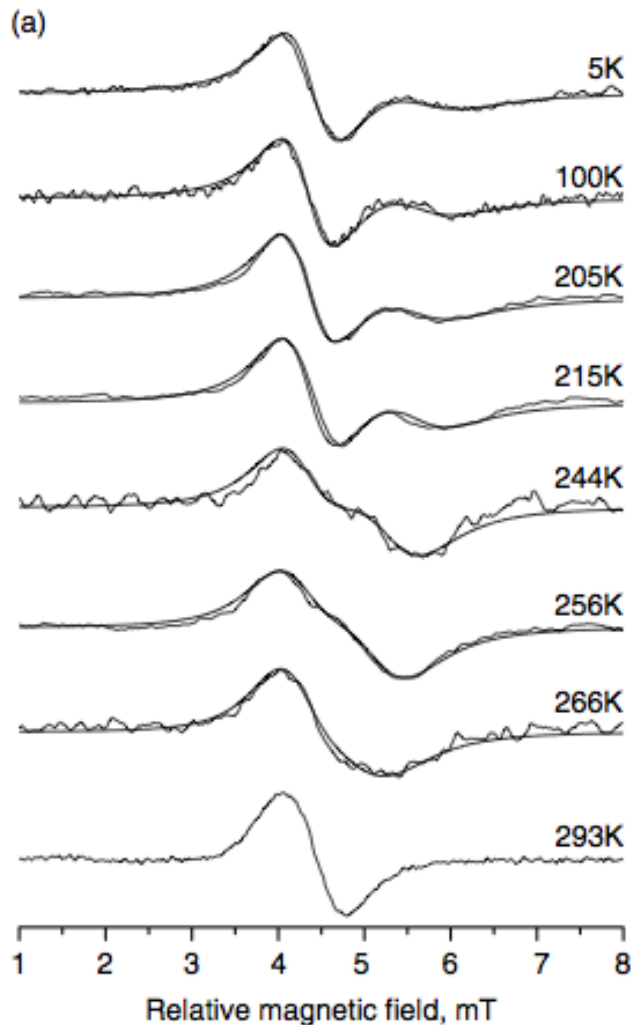
Mn sites	$D(\pm 10)^a$ MHz	$\frac{E}{D}(\pm 0.005)$	$\alpha \pm 5$ (degrees)	$\beta \pm 3$ (degrees)	$\gamma \pm 5$ (degrees)
$\text{Mn}^{2+}(\text{RT})$	726	0.115	34	127	41
$\text{Mn}_A^{2+}(4.5 \text{ K})$	789	0.24	59	118	44
$\text{Mn}_B^{2+}(4.5 \text{ K})$	970	0.145	2	135	52

2 mögliche Modelle erklären die EPR Ergebnisse

- i) 2 verschiedene Tetramere mit jeweils nur einem Typ Mn^{2+}
- ii) jedes Tetramer besitzt eine zufällige Verteilung von beiden Mn^{2+} Typen

Für den Temperatureffekt : Messung der EPR Spektren in Abh. der Temperatur ($B_0 \parallel a$)

EPR Messungen

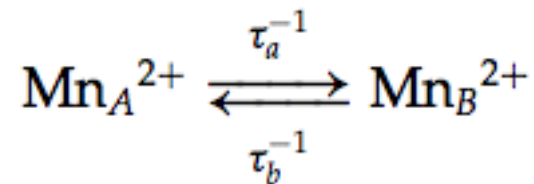


Bis 205 K keine Veränderungen, nur 2 Lorentz Linien

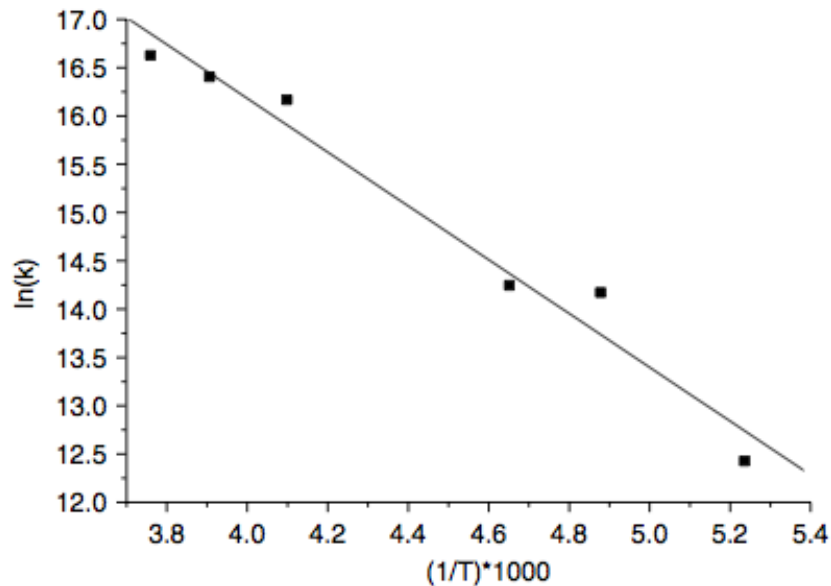
>205 K der Abstand zwischen den Linien wird größer

Bei RT nur noch eine Lorentz Linie

Diese Veränderung der Linie typisch für Zwei-Seiten-Austausch



$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} = k.$$



Arrhenius Plot $E_a=23,8 \text{ kJmol}^{-1}$ $\Delta S_e=3,2 \text{ kJmol}^{-1}$

Mit Anstieg der T steigt auch k

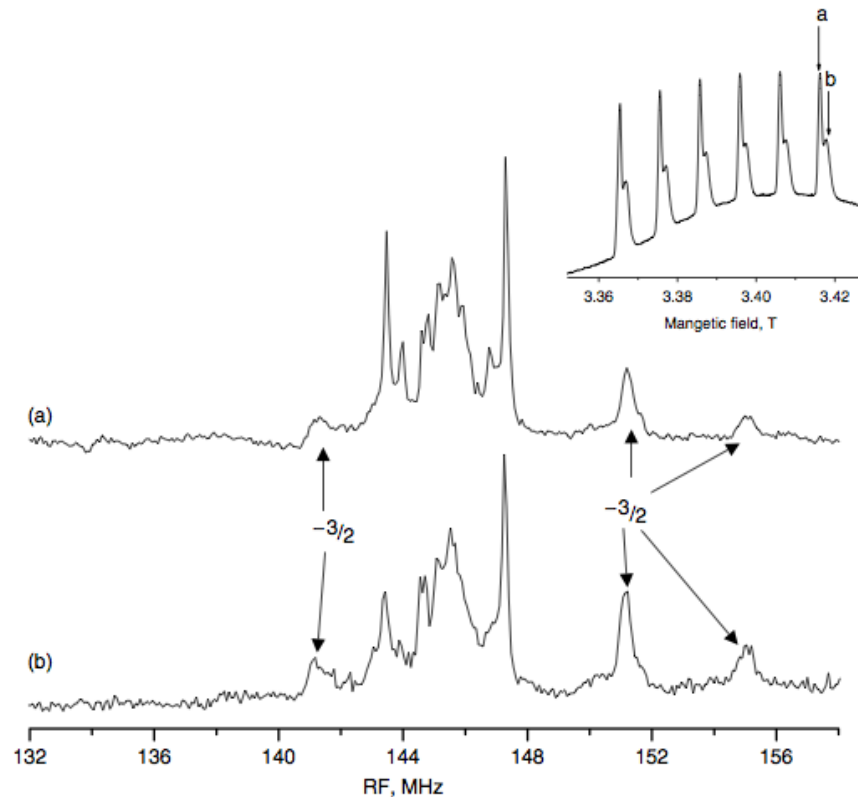
EPR zeigt auch, dass $|a_{\text{iso}}|=265 \text{ MHz}$

Für beide Mn_A^{2+} und Mn_B^{2+} gleich

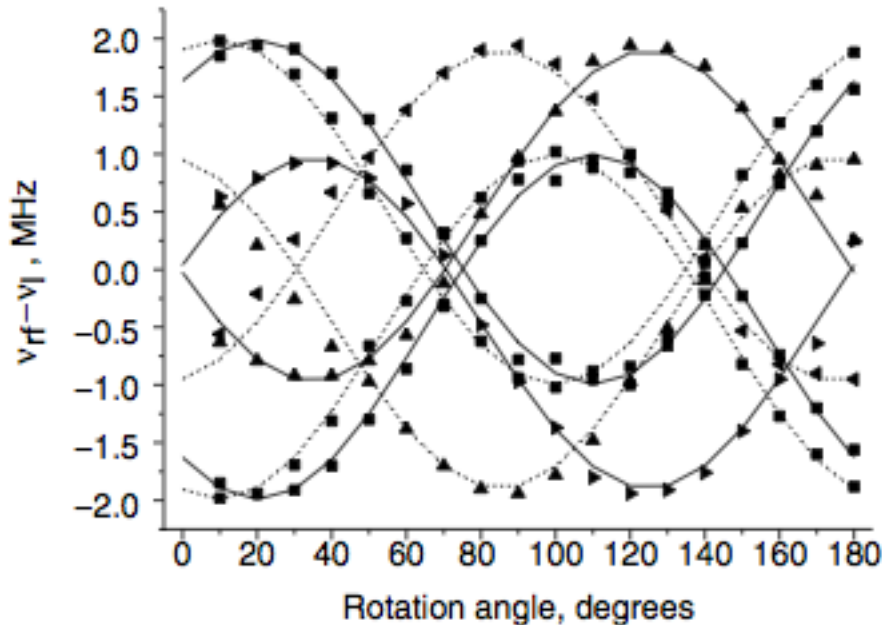
- H_2O und Imidazol Protonen am nächsten zum Mn^{2+} → dominieren das ^1H ENDOR Spektrum
- Unterscheidung der H_{Im} und H_{W} durch Vergleich der Spektren in H_2O und D_2O (in D_2O keine H_2O Signale)
- ^1H ENDOR Spektren bei Feldpositionen a und b zeigen keine Unterschiede
 - d.h. keine strukturelle Unterschiede zwischen den Protonen bzgl. der zwei Mn^{2+} Typen

^1H ENDOR

- ^1H ENDOR Spektren bei Feldpositionen a und b zeigen keine Unterschiede
→ d.h. keine strukturelle Unterschiede zwischen den Protonen bzgl. der zwei Mn^{2+} Typen



^1H ENDOR



Imidazolprotone H_{im1} und H_{im2} für
Die Seiten I und II

$$\nu_{M_S}(H) = M_S[T_{\perp}(3 \cos^2 \theta - 1) + a_{iso}] - \nu_I$$

Punkt-Dipol Näherung

$$T_{\perp} = \frac{\mu_0 (g g_N \beta \beta_N)}{4\pi h r^3},$$

Proton	$T_{\perp}(\pm 0.04)$ MHz	$a_{iso}(\pm 0.04)$ MHz	$\beta \pm 0.5$ (degrees)	$\gamma \pm 0.5$ (degrees)	$r_{Mn-H} \pm 0.02$ Å
H_{im1}	1.94	0.08	83	-70.3	3.44
H_{im2}	1.99	0.08	89.5	5.3	3.41
H_{w1}	3.49	0.8	78.3	143.0	2.82
H_{w2}	3.96	0.1	112.9	134.0	2.71
H_{w3}	2.5	0.4	47.0	50.0	3.16
H_{w4}	3.9	0.4	67.0	72.0	2.72

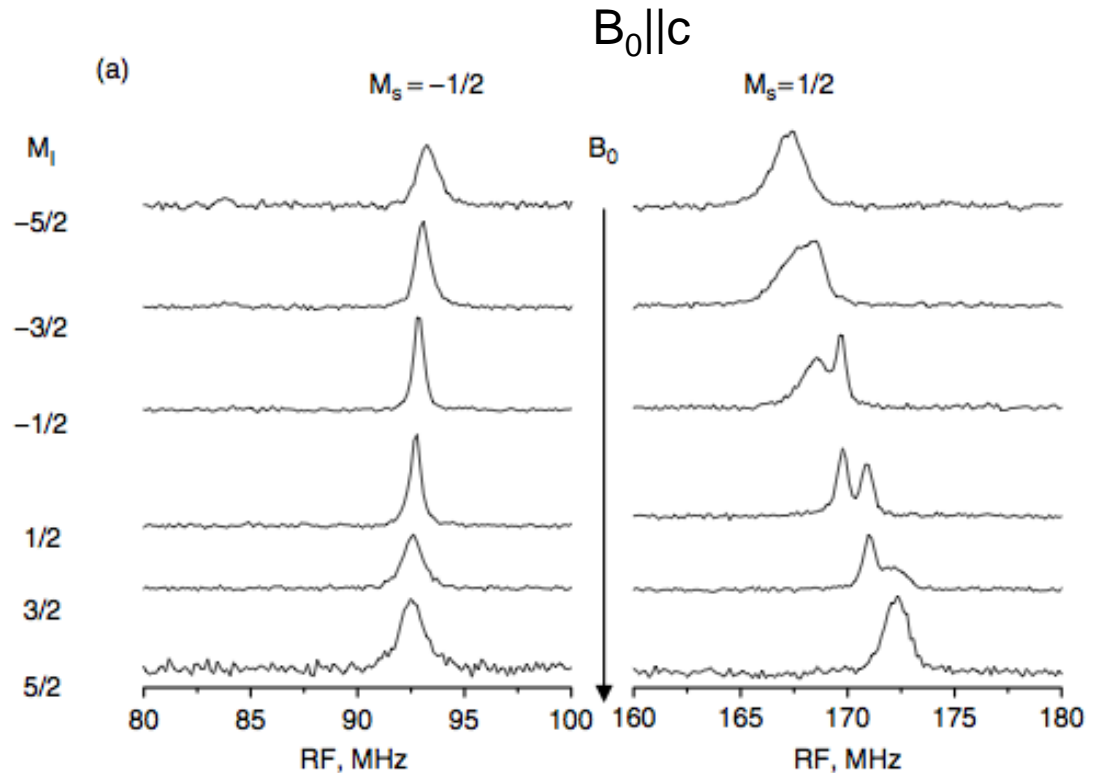
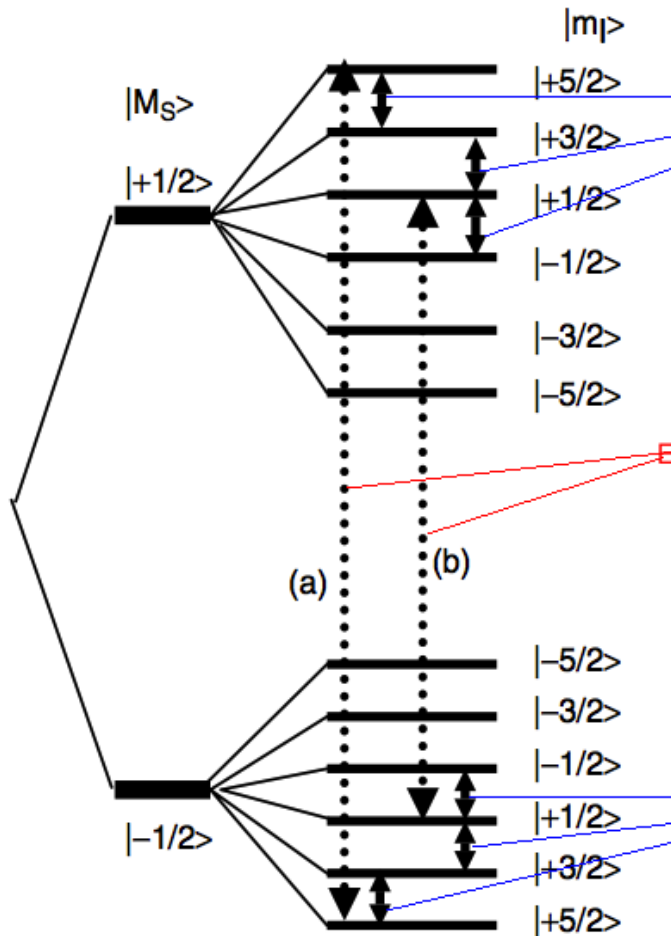
^{55}Mn Hyperfein WW

- Bestimmt durch EPR Messungen
- gegenüber Mn_A^{2+} und Mn_B^{2+} nicht empfindlich
- Prisner et. al: Untersuchung von Mn(II) Typen in MnAlPO_n durch Analyse von Hyperfein WW (W-Band ENDOR)

Kern Quadrupol WW

- Disselhorst et al. durch pulsed ENDOR bei 275 GHz
Messungen von Einzelkristallen mit 0,2% Mn^{2+} in ZnGeP_2
durchgeführt: Quadrupol WW aufgelöst

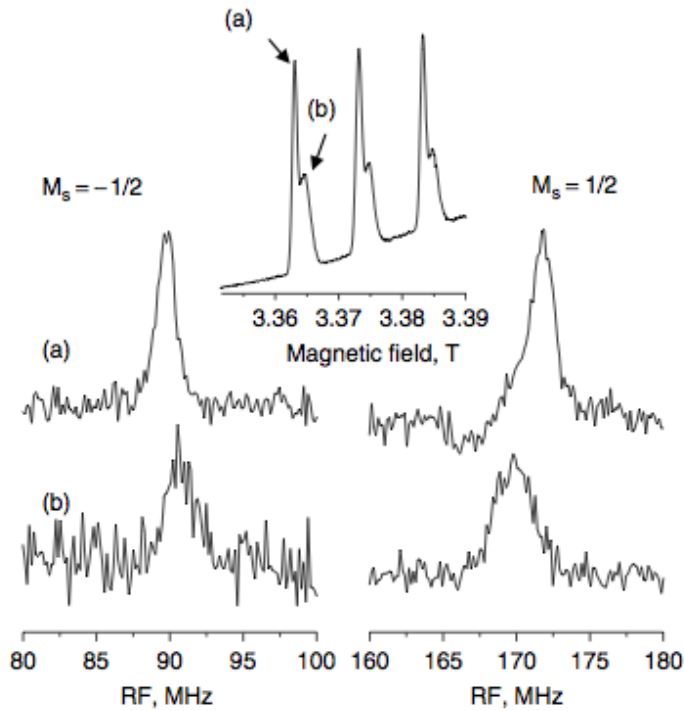
^{55}Mn ENDOR



→ ^{55}Mn ENDOR bei $B_0 \parallel c$ das selbe Spektrum für Mn_A^{2+} und Mn_B^{2+}

^{55}Mn ENDOR

$B_0 \parallel a$



Mn_A^{2+} $P(a) = 0,57$ MHz
 Mn_B^{2+} $P(a) = 0,26$ MHz

- Temperaturabhängige EPR Messungen zeigen Austauschprozesse zwischen zwei nicht äquivalente Mn^{2+} Seiten: Mn_A^{2+} und Mn_B^{2+}
- ^1H -ENDOR: H_2O und Imidazol an diesem dynamischem Prozess nicht beteiligt
- ^{55}Mn ENDOR: unterschiedliche Quadrupol WW Werte für Mn_A^{2+} und Mn_B^{2+}

- Dissertation Silvia Scheidt, **2006** Uni Mainz
- H. Kurreck, B. Kirste, W. Lubitz, *Angewandte Chemie*, 96, **1984**, 171-193.
- Meirovitch E, Luz Z, Kalb AJ, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 7538.
- Goldfarb, D., Narasimhulu, K. V. and Carmieli, R. (2005), *Magn. Reson. Chem.*, 43: S40–S50
-

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit.....

Crystal growth

Demetallisiertes conc A in einer 1mM Lösung von MnCl_2 und 1mM CaCl_2 durch eine Dialyse gegen 0,1 M NaNO_3 mit 0,05 M Tris Acetat (pH 6,5)

$$\nu_{M_S}(H) = M_S [T_{\perp} (3 \cos^2 \theta - 1) + a_{\text{iso}}] - \nu_I$$

$$T_{\perp} = \frac{\mu_0}{4\pi h} \frac{(g g_N \beta \beta_N)}{r^3},$$

$$\begin{aligned} \nu_{M_S}(Mn) &= M_S a_{\text{iso}} - \nu_I + P(2m_I - 1) \\ &+ \frac{a_{\text{iso}}^2}{\nu_0} [-S(S+1) + (M_S)^2 - M_S(2m_I - 1)] \end{aligned}$$

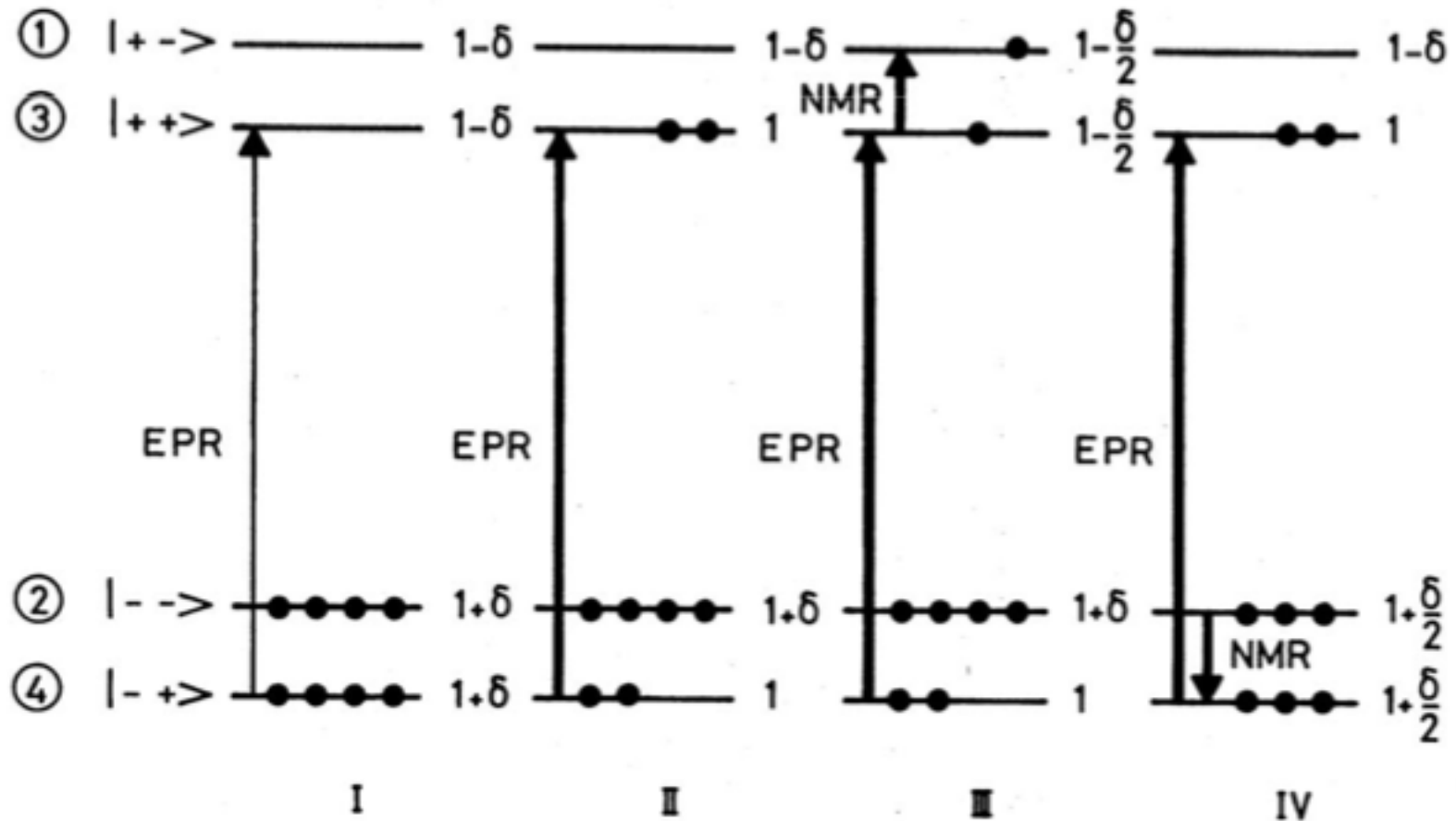
$$\Delta v_{\pm \frac{1}{2}} = 2v_I - 2P(2m_I - 1) + \frac{17}{2} \frac{a_{\text{iso}}^2}{v_0}$$

$$\bar{v}_{\pm \frac{1}{2}} = a_{\text{iso}} - \frac{a_{\text{iso}}^2}{v_0} (2m_I - 1)$$

$$P = \frac{3e^2 q Q}{8I(2I-1)\hbar} [(3 \cos^2 \theta' - 1) + \eta \sin^2 \theta' \cos(2\phi')]$$

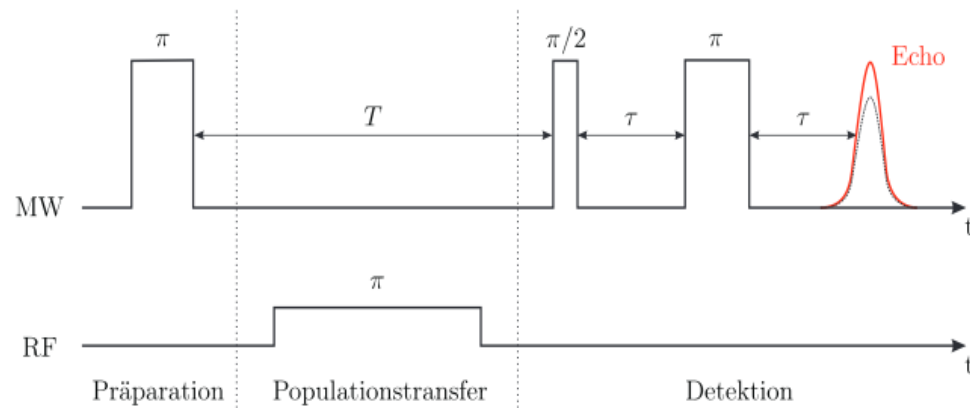
$$\eta = \frac{P_{xx} - P_{yy}}{P_{zz}}$$

Änderung der Besetzungszahlen

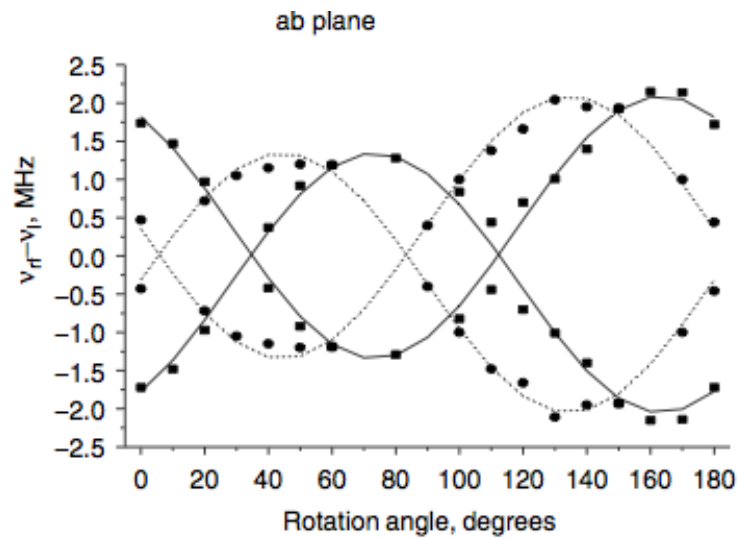
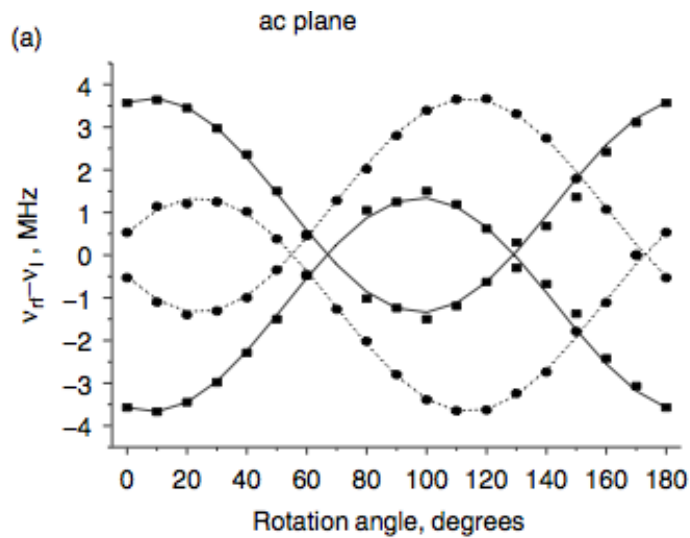


© Priv.-Doz. Dr. Burkhard Kirste
 Institut für Chemie und Biochemie, FU Berlin

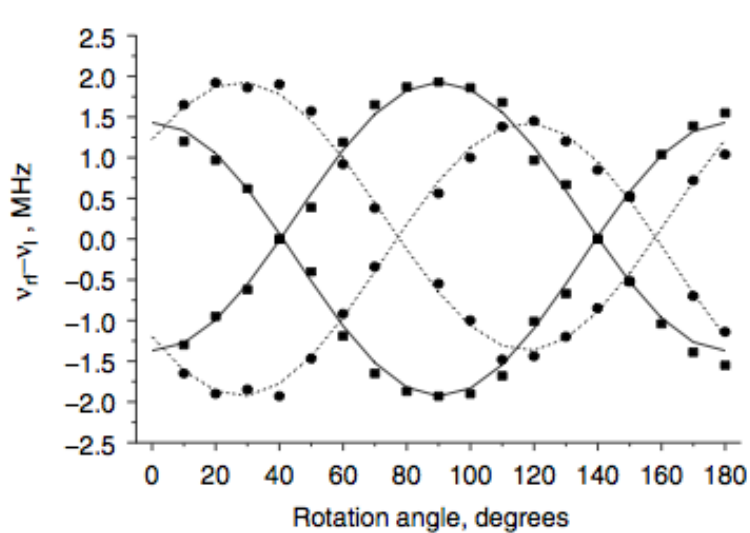
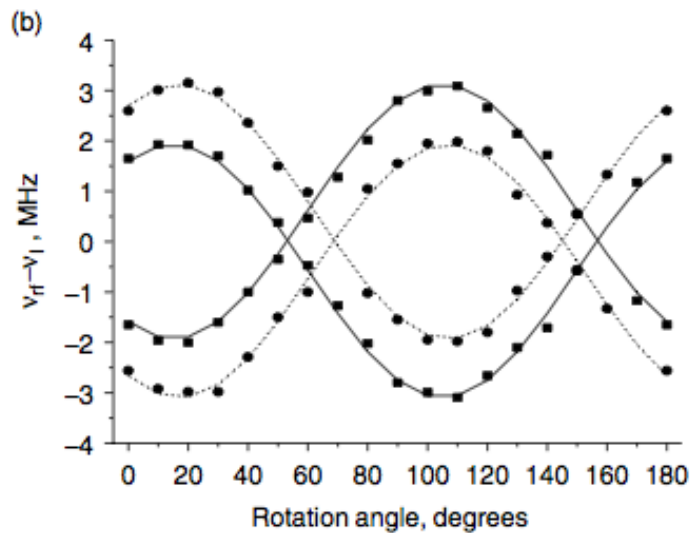
Davies ENDOR Pulssequenz



^1H ENDOR



H_{W1}
Seite I und II



H_{W2}
Seite I und II

