

# Dynamics and structure in the $\text{Mn}^{2+}$ 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

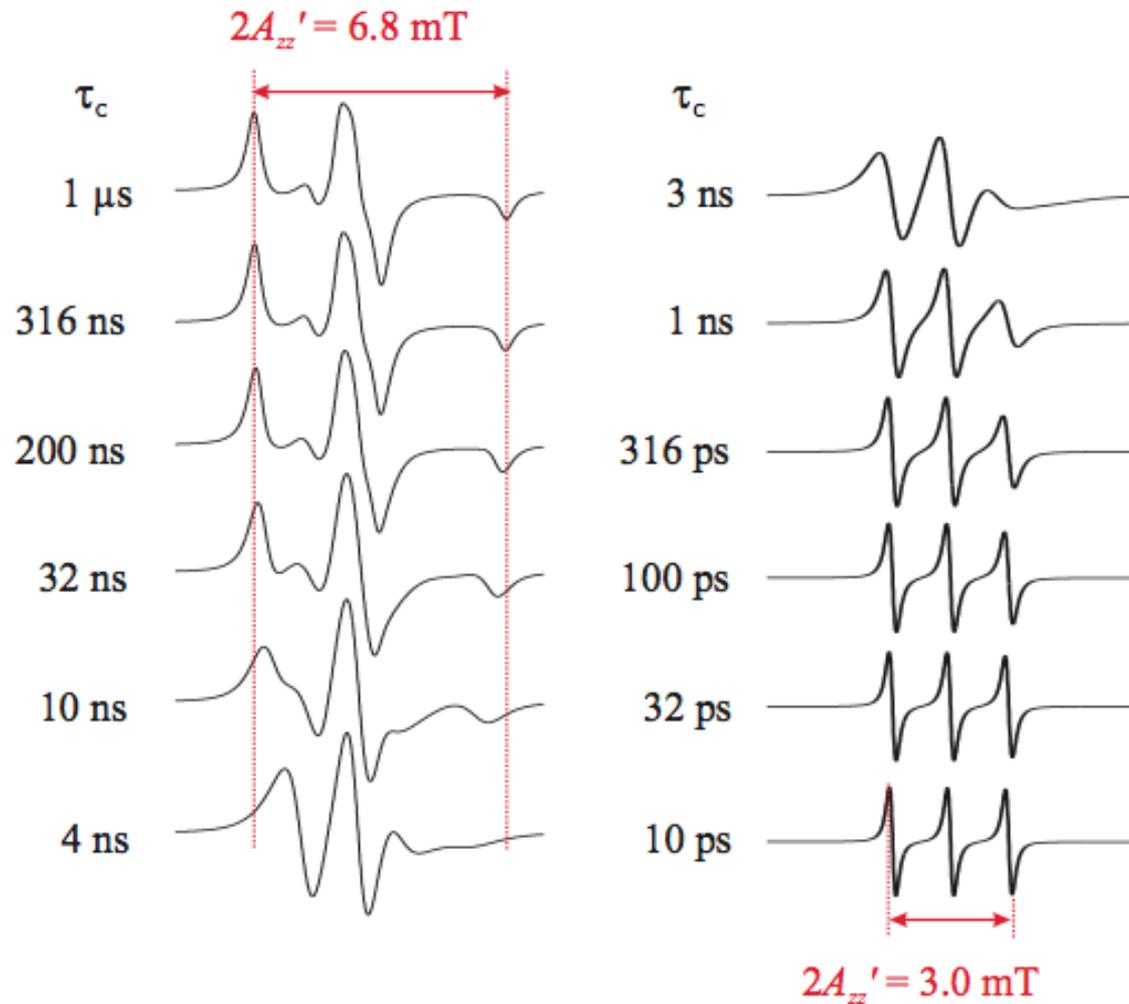
**Deniz Ar**

**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)

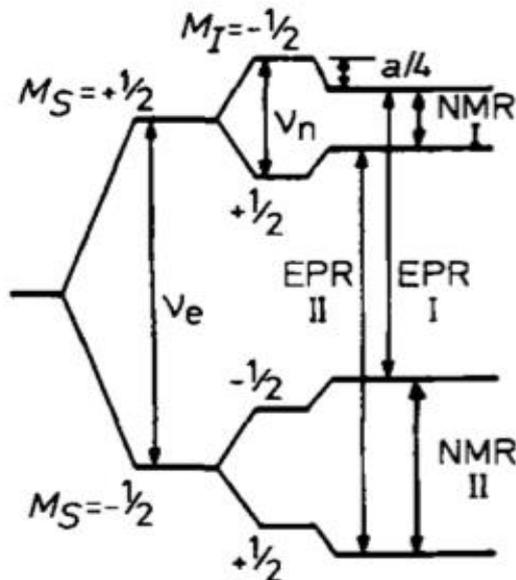
©Dissertation Silvia Scheidt, 2006 Uni Mainz

# Einleitung

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

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

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



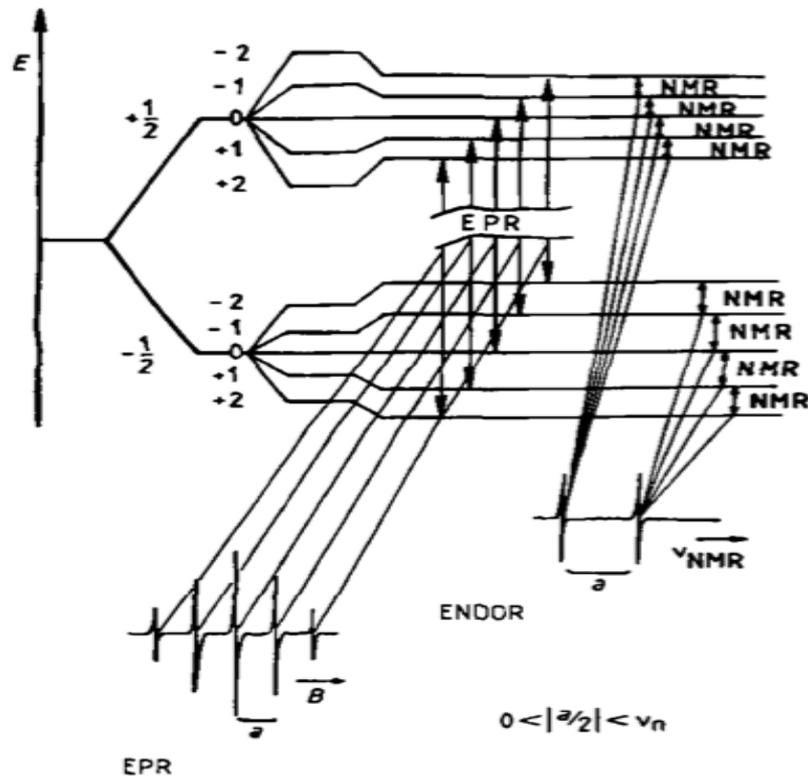
Auswahlregeln EPR  
 $\Delta M_s = \pm 1$  &  $\Delta M_I = 0$

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

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

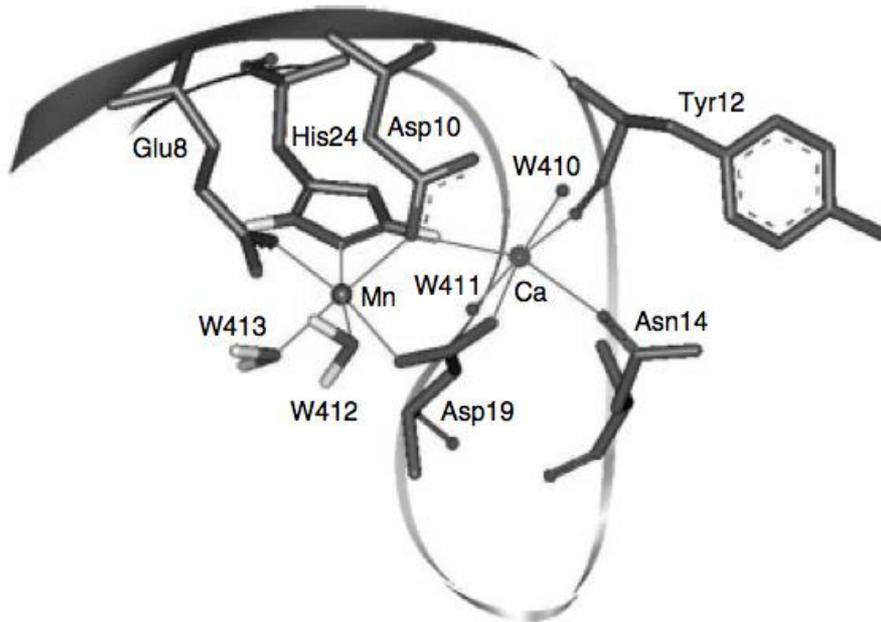
# Einleitung

- 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:  $\beta$ -Faltblatt Strang  
→ jellyroll motif

Assoziiert als Dimer von Dimer → Tetramer

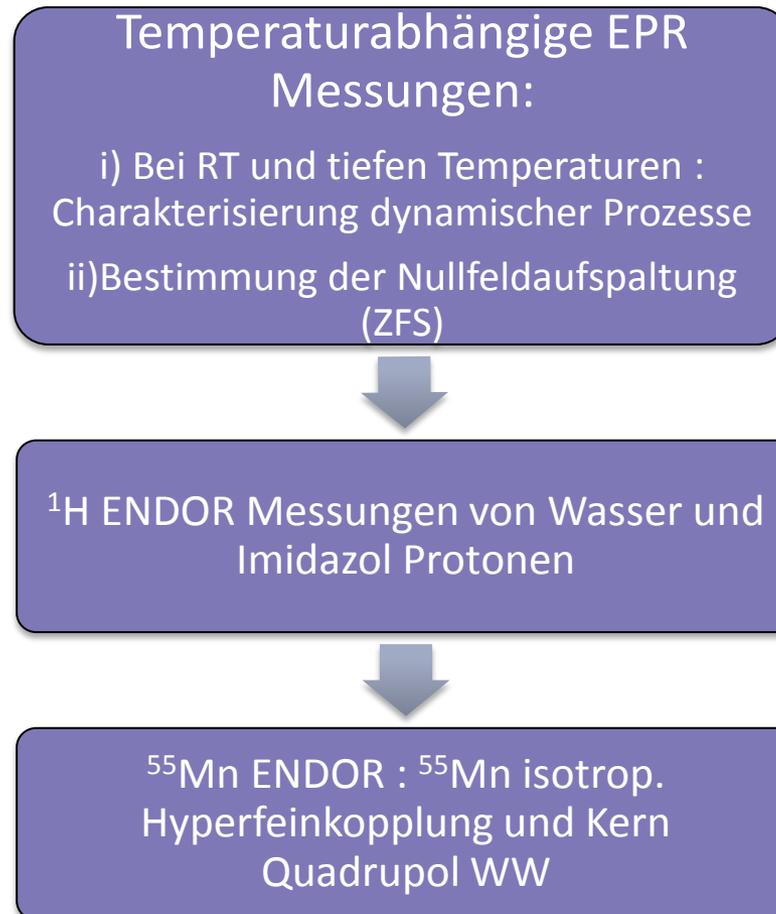


Jedes Monomer 25 kDa :

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

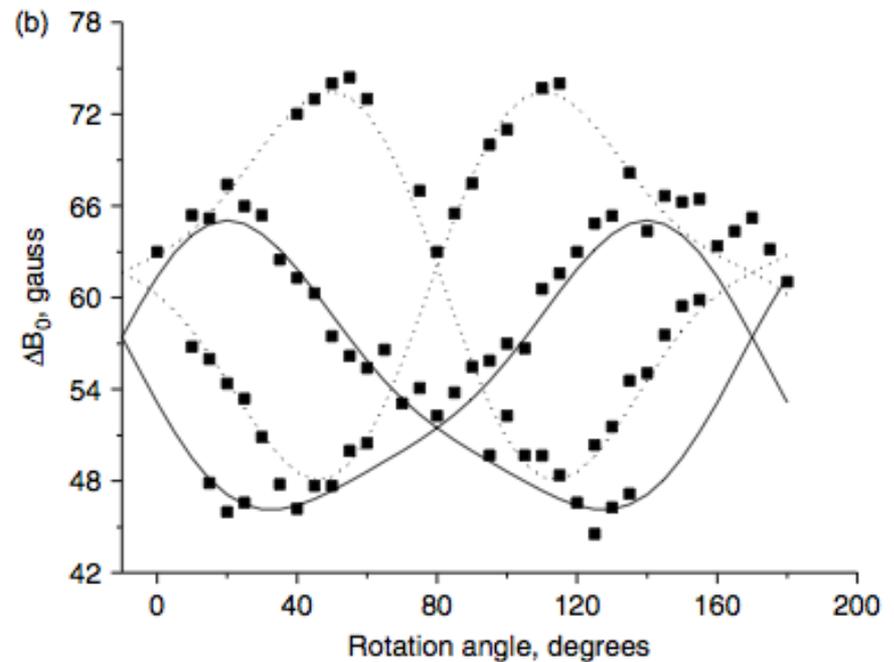
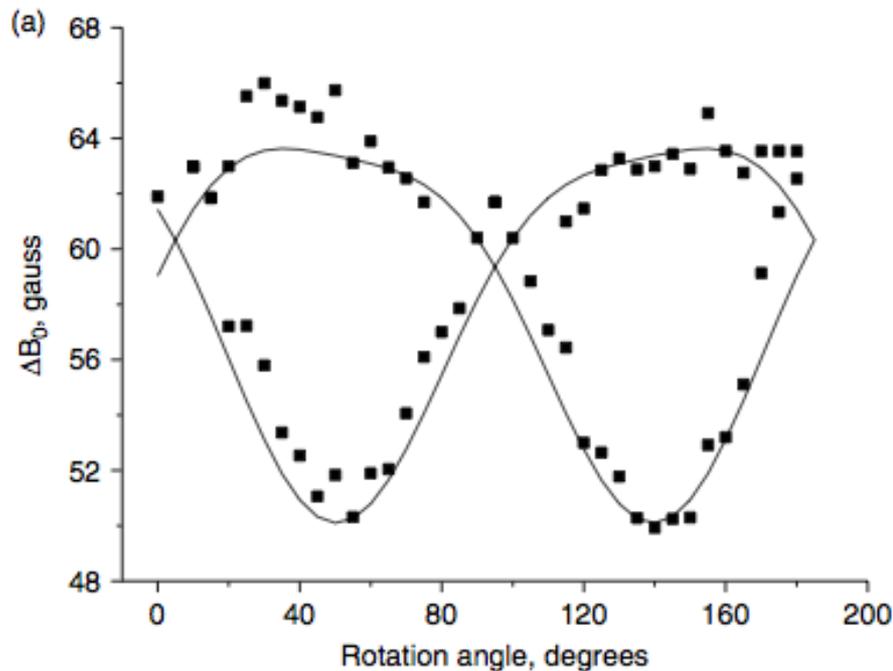
# Kurzer Inhalt des Papers

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

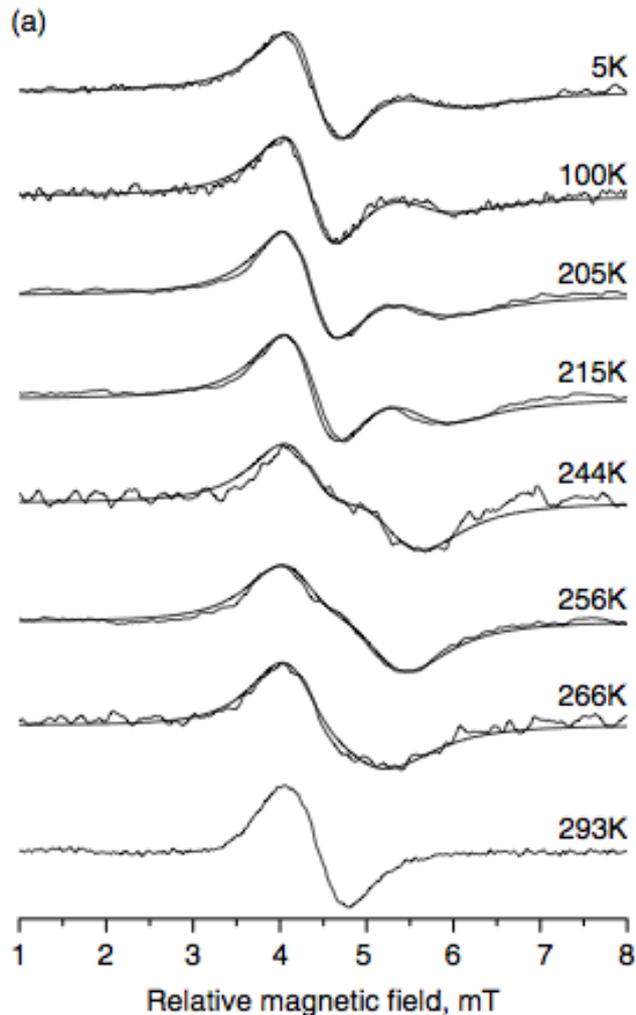
Mn sites	$D(\pm 10)^a$ MHz	$\frac{E}{D}(\pm 0.005)$	$\alpha \pm 5$ (degrees)	$\beta \pm 3$ (degrees)	$\gamma \pm 5$ (degrees)
$Mn^{2+}(RT)$	726	0.115	34	127	41
$Mn_A^{2+}(4.5\text{ K})$	789	0.24	59	118	44
$Mn_B^{2+}(4.5\text{ K})$	970	0.145	2	135	52

## 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

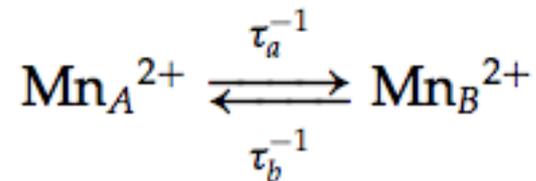


Bis 205 K keine Veränderungen, nur 2 Lorentz Linien

>205 K der Abstand zwischen den Linien wird größer

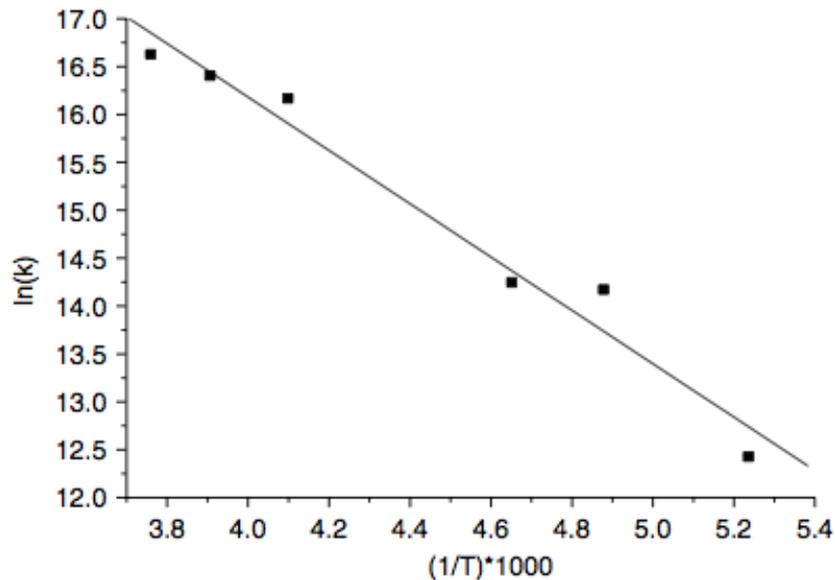
Bei RT nur noch eine Lorentz Linie

Diese Veränderung der Linie typisch für Zwei-Seiten-Austausch



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

# EPR Messungen



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

Mit Anstieg der T steigt auch k

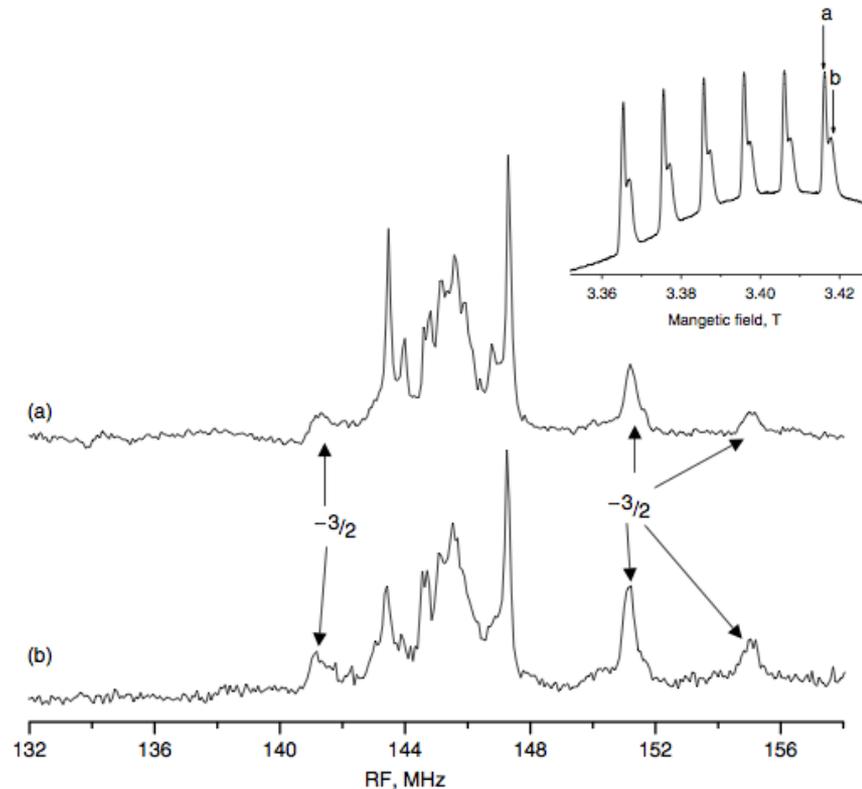
EPR zeigt auch, dass  $|a_{iso}|=265 \text{ MHz}$

Für beide  $\text{Mn}_A^{2+}$  und  $\text{Mn}_B^{2+}$  gleich

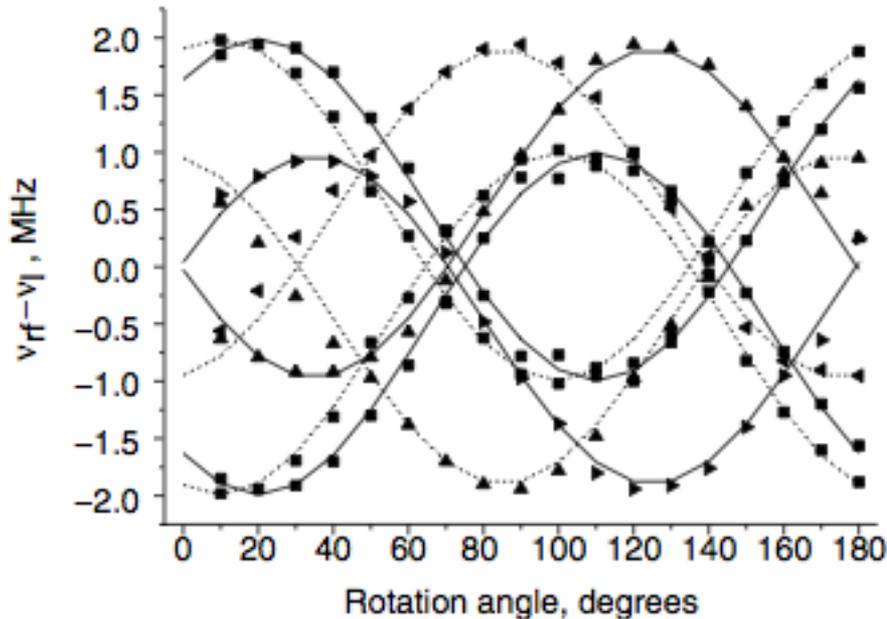
- $\text{H}_2\text{O}$  und Imidazol Protonen am nächsten zum  $\text{Mn}^{2+}$  → dominieren das  $^1\text{H}$  ENDOR Spektrum
- Unterscheidung der  $\text{H}_{\text{Im}}$  und  $\text{H}_{\text{W}}$  durch Vergleich der Spektren in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$  (in  $\text{D}_2\text{O}$  keine  $\text{H}_2\text{O}$  Signale)
- $^1\text{H}$  ENDOR Spektren bei Feldpositionen a und b zeigen keine Unterschiede
  - d.h. keine strukturelle Unterschiede zwischen den Protonen bzgl. der zwei  $\text{Mn}^{2+}$  Typen

# $^1\text{H}$ ENDOR

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



# $^1\text{H}$ ENDOR



Imidazolprotone  $\text{H}_{im1}$  und  $\text{H}_{im2}$  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
$\text{H}_{im1}$	1.94	0.08	83	-70.3	3.44
$\text{H}_{im2}$	1.99	0.08	89.5	5.3	3.41
$\text{H}_{w1}$	3.49	0.8	78.3	143.0	2.82
$\text{H}_{w2}$	3.96	0.1	112.9	134.0	2.71
$\text{H}_{w3}$	2.5	0.4	47.0	50.0	3.16
$\text{H}_{w4}$	3.9	0.4	67.0	72.0	2.72

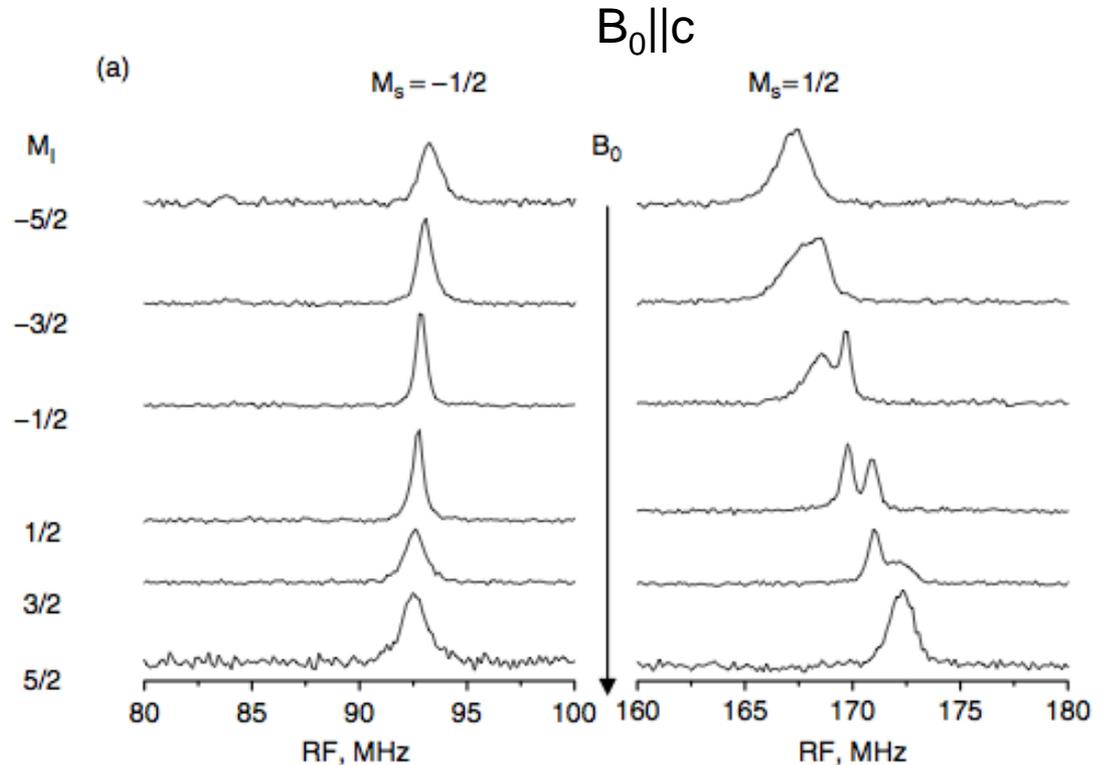
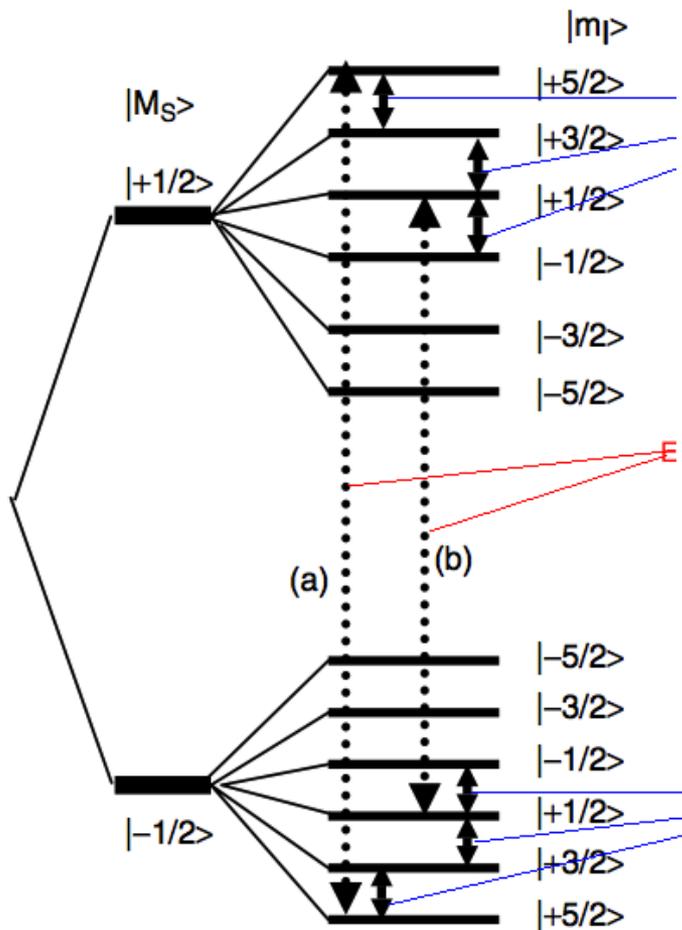
## $^{55}\text{Mn}$ Hyperfein WW

- Bestimmt durch EPR Messungen
- gegenüber  $\text{Mn}_A^{2+}$  und  $\text{Mn}_B^{2+}$  nicht empfindlich
- Prisner et. al: Untersuchung von Mn(II) Typen in  $\text{MnAlPO}_n$  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%  $\text{Mn}^{2+}$  in  $\text{ZnGeP}_2$   
durchgeführt: Quadrupol WW aufgelöst

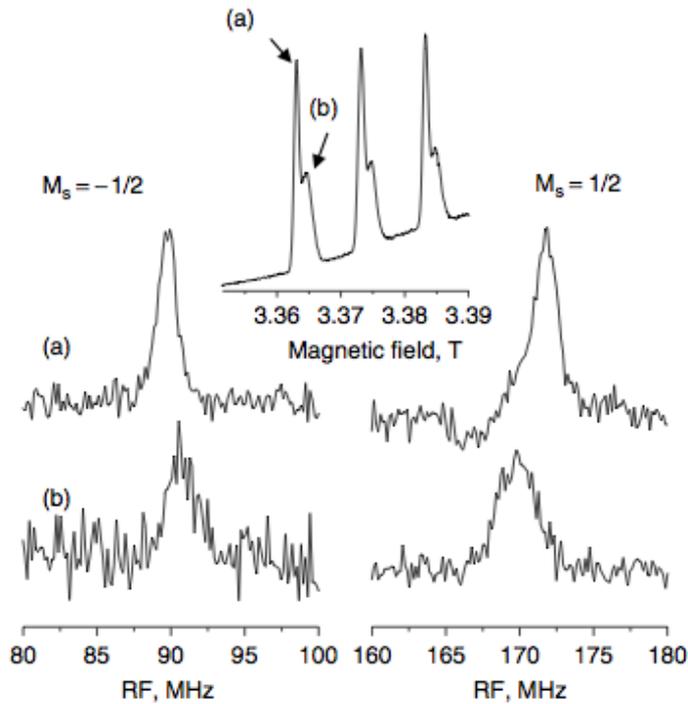
# $^{55}\text{Mn}$ ENDOR



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

# $^{55}\text{Mn}$ ENDOR

$B_0 \parallel a$



$\text{Mn}_A^{2+}$   $P(a) = 0,57$  MHz  
 $\text{Mn}_B^{2+}$   $P(a) = 0,26$  MHz

- Temperaturabhängige EPR Messungen zeigen Austauschprozesse zwischen zwei nicht äquivalente  $\text{Mn}^{2+}$  Seiten:  $\text{Mn}_A^{2+}$  und  $\text{Mn}_B^{2+}$
- $^1\text{H}$ -ENDOR:  $\text{H}_2\text{O}$  und Imidazol an diesem dynamischem Prozess nicht beteiligt
- $^{55}\text{Mn}$  ENDOR: unterschiedliche Quadrupol WW Werte für  $\text{Mn}_A^{2+}$  und  $\text{Mn}_B^{2+}$

- 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  $\text{MnCl}_2$  und 1mM  $\text{CaCl}_2$  durch eine Dialyse gegen 0,1 M  $\text{NaNO}_3$  mit 0,05 M Tris Acetat (pH 6,5)**

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

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

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

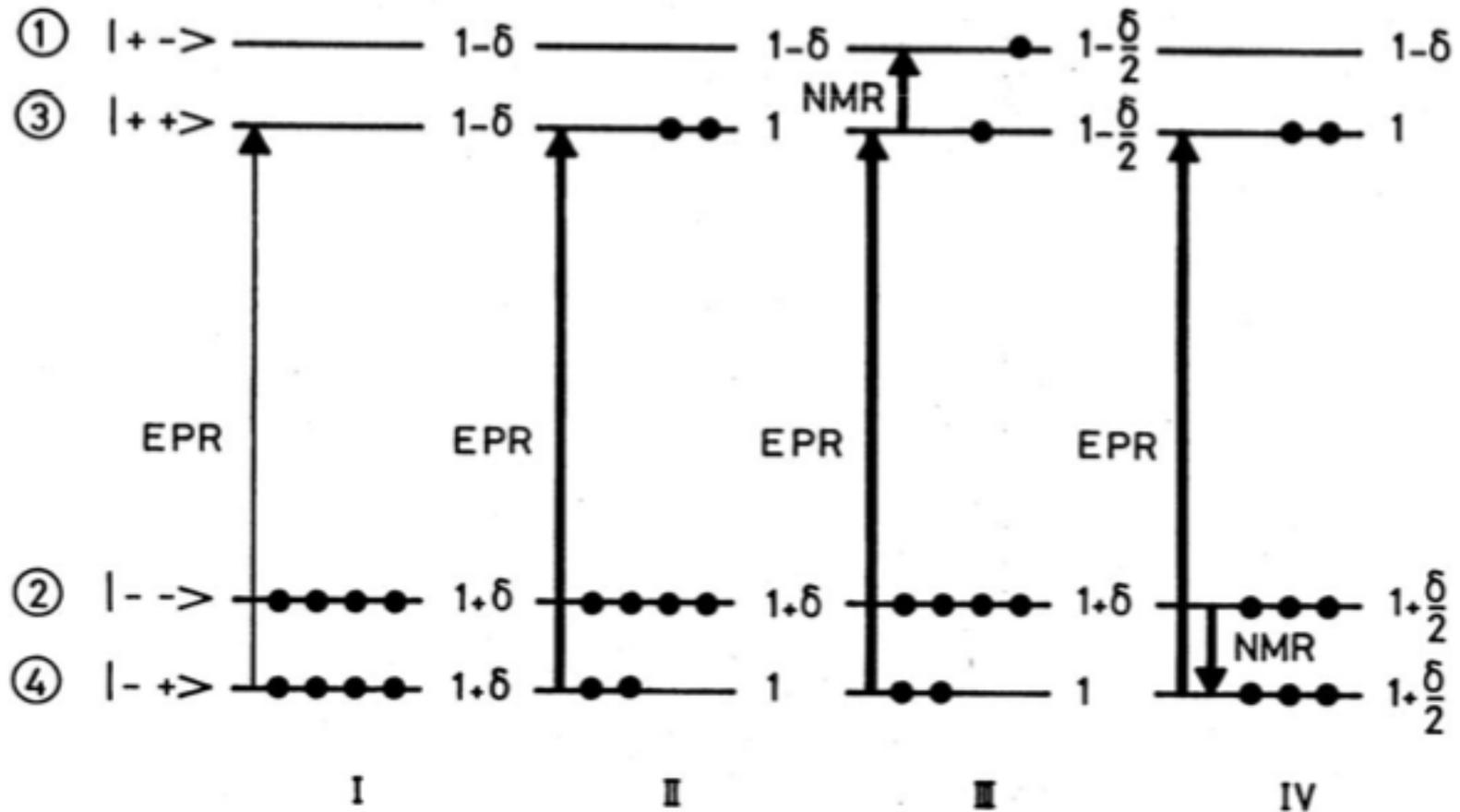
$$\Delta v_{\pm \frac{1}{2}} = 2v_I - 2P(2m_I - 1) + \frac{17}{2} \frac{a_{\text{iso}}^2}{v_0}$$

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

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

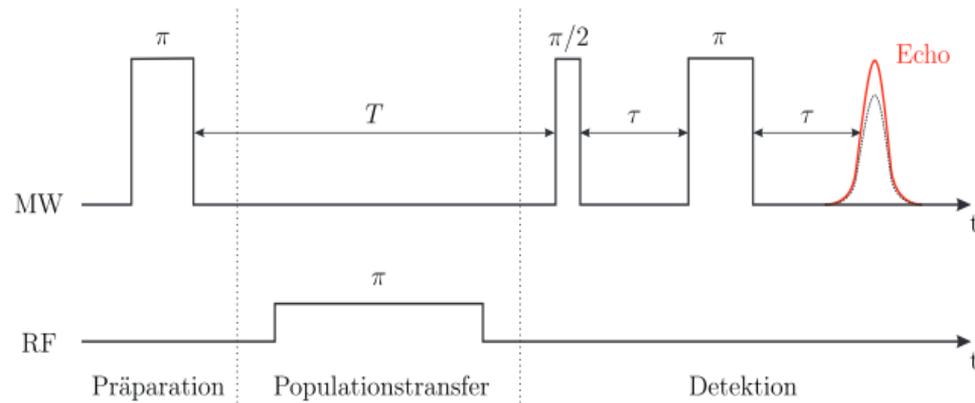
$$\eta = \frac{P_{xx} - P_{yy}}{P_{zz}}$$

# Änderung der Besetzungszahlen

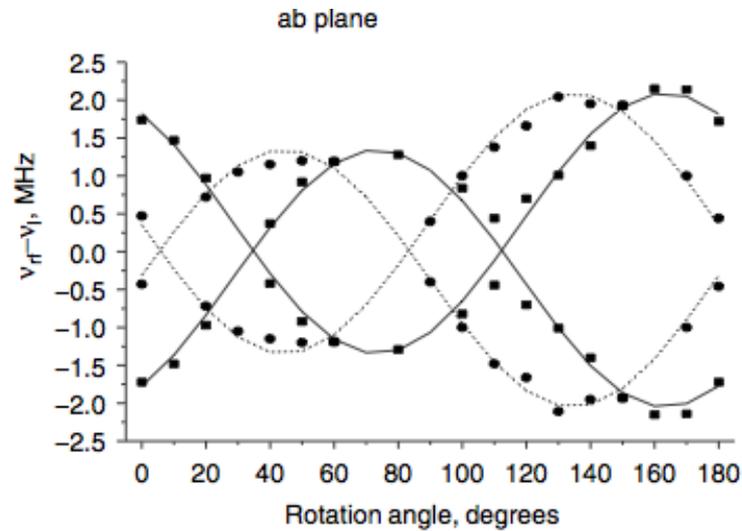
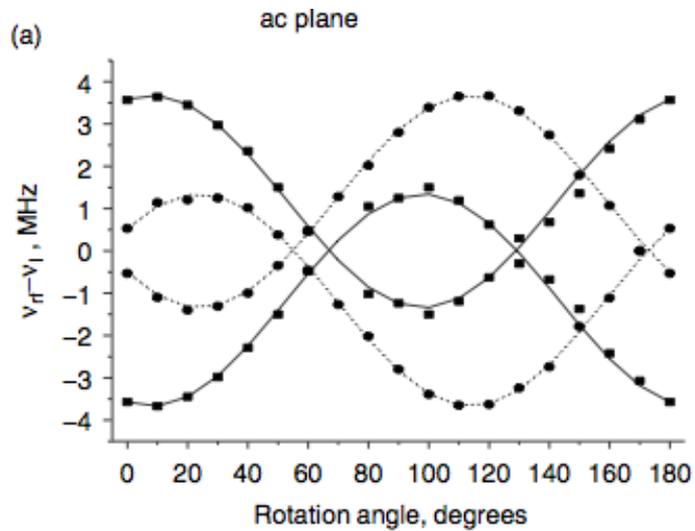


© Priv.-Doz. Dr. Burkhard Kirste  
 Institut für Chemie und Biochemie, FU Berlin

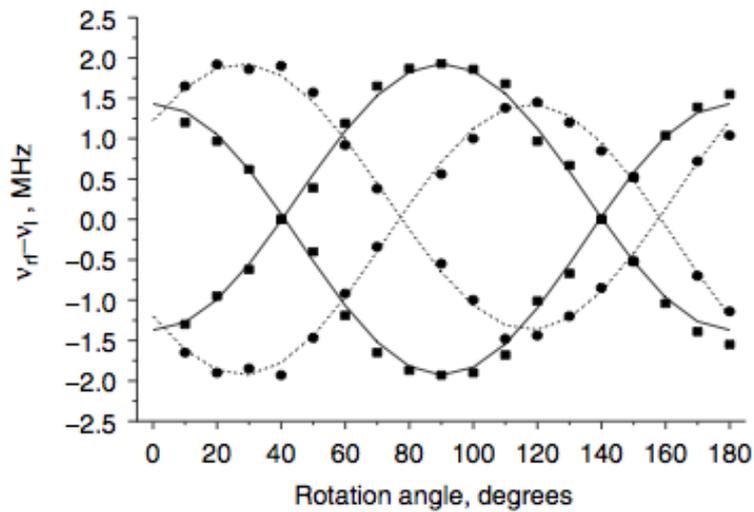
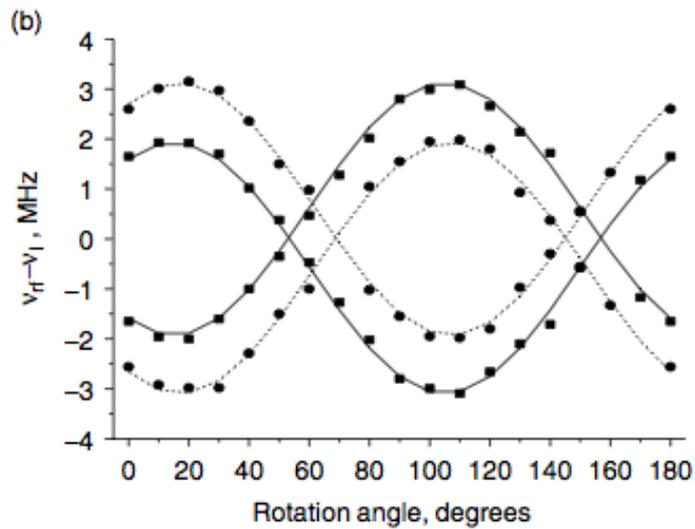
# Davies ENDOR Pulssequenz



# $^1\text{H}$ ENDOR



$H_{W1}$   
Seite I und II



$H_{W2}$   
Seite I und II

