



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2023 30 stp.

Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Strukturelle og spektroskopiske studier av Tyrosinase fra *Bacillus megaterium*

Structural and spectroscopic studies of Tyrosinase
from *Bacillus megaterium*

Ola Simen Linnerud Trosholmen

Kjemi og bioteknologi

Forord

Denne oppgaven ble utført ved institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved NMBU på Ås, våren 2023, som en avslutning på en femårig mastergrad i bioteknologi, og var en del av prosjektet COOFIX - "Utvikling av nye enzymer som reduserer og fikserer karbondioksid".

Jeg vil gjerne takke min hovedveileder Åsmund Røhr Kjendseth for å la meg ta del i COOFIX-prosjektet og for å være behjelpelig med gjennomføring av EPR-forsøk og tolkning av resultater. Jeg ønsker også å takke mine tilleggsveiledere Andrea Nikoline Englund og Eirin Landsem for all støtte og veiledning på laboratoriet, og for hjelp med tolkning av diffraksjonsdata og bygging av proteinmodeller.

Sammendrag

Prosjektet COOFIX har som formål å utvikle enzymer som fikserer og transformerer karbondioksid til fler karbonforbindelser, enten som en enkeltstående bestanddel i industrielle prosesser eller som et ledd i allerede eksisterende biosyntetiske veier. Denne oppgaven tok for seg en av de mulige kandidatene involvert i COOFIX-prosjektet, og så på flere av effektene knyttet opp til en aminosyre-substitusjon i det aktive setet i et binukleært type-3 kobbersenter, funnet i en tyrosinase fra *Bacillus megaterium* (TyrBm 3NM8). I tillegg til avstanden mellom de to kobberatomene i det aktive setet, ble mutanten og villtypen undersøkt for deres evne til å binde nikkell framfor kobber, og binding av nitritt som en etterligner av aktivert karbondioksid, hovedsaklig gjennom røntgen-krystallografi. En generell karakterisering av den magnetiske og elektroniske signaturen til mutanten og villtypen ble også utført.

Krystallisering, røntgen-diffraksjon og modellbygging av de ulike variantene viste seg mer eller mindre vellykket, basert på observasjoner og statistikk hentet fra datainnsamlingen og modell-raffinerings. Et unntak var å finne i variantene mettet med nitritt, hvor tall fra datainnsamlingen viste seg utilstrekkelig for videre prosessering. Fra de resterende modellene ble det observert en tydelig effekt på kobberavstanden i den muterte varianten, da den reduserte tilstanden viste en økning på 0.7 Å, og gode indikasjoner på binding av nikkell, både i villtypen og mutanten.

Effekten av mutasjonen var også observerbar i resultatene fra de spektroskopiske forsøkene, men i et begrenset omfang da disse ble utført under betingelser som ikke hentet frem det fulle potensialet til instrumentene som ble tatt i bruk. En UV-vis absorpsjonstopp rundt 350 nm for villtypen og 500 nm for mutanten viste seg karakteristisk for kompleksene med sentralatomet i en oksidert, toverdig tilstand. EPR-målingene ble utført i fravær av reduserende stoffer i løsningene, noe som førte til at de oksygen-aktiverede tilstandene ikke ble fanget opp. Mutasjonen var likevel synlig, gjennom de simulerte- og de eksperimentelle spektrene, og indikerte en noe lavere g_{\perp} -verdi i mutanten enn i villtypen.

Abstract

The COOFIX-project aims to develop enzymes that are able to fixate and transform carbon dioxide to multicarbon compounds, either as "stand-alone" components in industrial processes or as part of already existing biosynthetic pathways. This thesis looked at one of several enzyme-candidates involved in the COOFIX-project, specifically at the effects permeating from a single amino acid substitution in a binuclear type-3 copper centre, found in a tyrosinase from *Bacillus megaterium* (TyrBm 3NM8). The distance between the two copper atoms in wildtype- and mutant-variants, as well as their ability to bind nickel instead of copper, and to coordinate nitrite as a molecular mimic of activated carbon dioxide, was investigated through X-ray crystallography. A general characterization of their electronic- and magnetic signature, through UV-vis and EPR-spectroscopy, was also included.

Observations and statistics from the crystallization, X-ray diffraction and modelbuilding, indicated promising results, with the exception of variants saturated with nitrite, which on the basis of statistics from the datacollection, was excluded. From the remaining models, a significant effect on the distance between the two copper atoms was observed, showing a 0.7 Å increase in the reduced mutant variant, as well as good indications on the binding of nickel in the active sites of both wildtype and mutant.

Effects of the mutation was also observed in spectroscopic data - both from UV-vis and EPR, although in a limited scope compared to the potential that lies in the instruments used. A UV-vis absorption around 350 nm for the wildtype and 500 nm for the mutant, characterized the oxidized state of the copper-complexes. The EPR-measurements was limited by the absence of reducing agents in the copper-saturated protein solutions, resulting in the oxygen-activated states not being recorded. The mutation was visible, through simulated and experimental spectra, indicating a somewhat lower value of g_{\perp} in the mutant than in the wildtype.

Innhold

1	Introduksjon	8
1.1	Metalloproteiner	8
1.1.1	Koordinasjonskjemi og krystallfeltteori	9
1.1.2	Kobberproteiner	11
1.1.3	Redoksenzymer og CO_2 som råstoff (<i>feedstock</i>)	11
1.1.4	Kunstige metalloenzymer og dannelsen av karbon-karbon bindinger fra CO_2 .	13
1.2	Tyrosinaser	13
1.2.1	Struktur og aktivitet	15
1.2.2	Tyrosinase fra <i>Bacillus megaterium</i> (TyrBm)	18
1.2.3	TyrBm - F227Y	19
1.3	Formålet med denne oppgaven	20
2	Rekombinant Genteknologi	21
2.1	Restriksjonsenzymer	21
2.2	Plasmider, transformasjon og kloning	22
2.2.1	Promotorer	22
2.2.2	Seleksjonsmarkører	23
2.2.3	Affinitetsmerker og Separasjonsteknikker	23
2.3	Vertsorganismen	24
3	Spektroskopi	25
3.1	Ultrafiolett-synlig (UV/vis) spektroskopi	26
3.2	Elektron paramagnetisk resonans (EPR)	27
3.2.1	Operatorer	27
3.2.2	Iboende Spinn og Zeeman-Effekten	28
3.2.3	Elektromagnetisme og Energi	30
3.2.4	Intrumentelt	31
3.2.5	Hamilton-Operatoren ”revisited”	34
3.2.5.1	Zeeman-interaksjoner	34
3.2.5.2	Hyperfine interaksjoner	34

3.2.5.3	Superhyperfine interaksjoner	35
3.2.5.4	Interaksjoner mellom elektroner	36
3.2.5.5	Kvadrupol-interaksjoner	36
4	Røntgen-kryсталlografi	37
4.1	Krystaller	37
4.1.1	Krystaller i teorien	37
4.2	Krystalldannelse	39
4.2.1	Kjernerdannelse (nukleering) ved dampdiffusjon	39
4.3	Diffraksjon, spredning og interferens	41
4.4	Millerindekser	43
4.5	Strukturfaktorer og Fourier-transformasjonen	43
4.6	Faseproblemet - og løsningen	45
4.7	Strålingskilder og detektorer	47
4.8	Evaluering av data	47
4.8.1	Rådata	48
4.8.2	Modelldata	49
5	Metoder	49
5.1	Tillaging av protein	49
5.1.1	Kultivering av BL21(DE3)-transformanter	49
5.1.2	Proteinuttrykk	51
5.1.3	Innhøsting av celler med uttrykt protein	52
5.2	Proteinrensing	52
5.2.1	Lysering av celler	52
5.2.2	IMAC	52
5.2.3	SDS-PAGE	53
5.2.4	Bufferutbytning og oppkonsentrering	54
5.3	Kobbersaturering	54
5.4	EPR spektroskopi	55
5.4.1	Klargjøring av prøver	55

5.4.2	Innsamling av data	55
5.4.3	Simulering og <i>Least-squares fitting</i> med EasySpin	56
5.5	UV-vis Spektroskopi	57
5.6	Røntgen-krystallografi	57
5.6.1	Krystallisering	57
5.6.2	Nedfrysing av krystaller	57
5.6.3	Røntgen-diffraksjon og databehandling	58
5.6.4	Modellbygging - fasing og raffinering	58
6	Resultater	59
6.1	Utrykk-, rensing- og klargjøring av TyrBm-variantene	59
6.2	Spektroskopi	60
6.3	Krystallisering	67
6.4	Datainnsamling og modeller	69
7	Diskusjon og avsluttende kommentar	76
7.1	Avstanden mellom kobberkofaktorene	79
7.2	EPR-aktivitet	79
7.3	Utbytting av metallkofaktorer	80
7.4	Koordinering av nitritt	80
7.5	Veien videre	81
8	Referanser	82
9	Vedlegg	90

1 Introduksjon

1.1 Metalloproteiner

Elektronoverføringer i biologiske prosesser utarter seg på forskjellige måter; mest kjent er den parvise forflytningen av elektroner, som sammen med et protonpar og/eller i form av et hydridion (H^-), beveger seg fra substratet og til en elektronakseptor i ulike sentralmetabolske veier [1]. Dehydrogenaser katalyserer denne type redoksreaksjoner. En annen strategi inkorporerer oksygen i substratet fra dioksygen, direkte ved hjelp av en reduktant, resulterende i dannelsen av en hydroksylgruppe [1]. Enzymene som katalyserer denne typen reaksjoner kalles mono- eller dioksygenaser - avhengig av hvor mange av oksygenatomene i dioksygen som inkorporeres i substratet under en katalytisk syklus [2]. Både oksygenaser og dehydrogenaser kan potensielt overføre enkeltelektroner mellom organiske forbindelser [3]. Evnen til å katalysere redoksreaksjoner som involverer forflytning av elektroner, særlig enkeltelektroner, krever relativt høye reduksjonspotensialer; enzymene som er involvert er derfor ofte utstyrt med kofaktorer fra overgangsmetallene som redokssentre.

Metalloproteiner som bærer kofaktorer fra overgangsmetallene har - i tillegg til høye reduksjonspotensialer - evnen til å koordinere små molekyler med ladningsfordelinger som gir dem egenskaper i retning av Lewis baser, for eksempel molekylært oksygen og karbondioksid [4]. Metalloproteiner fungerer derfor ofte som transportører. Rundt sentralatomet vil de små molekylene aktiveres ved elektronoverføring fra kofaktoren, og kan dermed innta rollen som redokssentre, noe de for eksempel gjør i enkelte oksygenaser eller oksidaser. Sistnevnte bruker dioksygen for å deprotonere substratet (i en enkeltelektronoverføring), uten inkorporasjon av oksygen, ofte resulterende i dannelsen av radikaler [2].

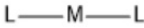
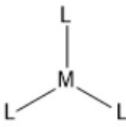
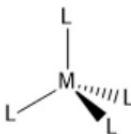




I tillegg til antallet elektroner som overføres og hvordan de overføres (for eksempel som et proton eller hydridion), har redoksenzymene ulike strukturelle trekk som differensierer samspillet mellom redokssenter og substrat. Elektronoverføringer som involverer en eller flere kofaktorer kan deles inn i to kategorier: De hvor overføringen skjer i koordinasjonssfæren til kofaktoren (*inner-sphere electron transfer*), og de hvor overføringen skjer utenfor koordinasjonssfæren (*outer-sphere electron transfer*): Elektrontransport over lengre distanser, som kan innebære tunnelering mellom to ikke-koblede redokssentre [5, 6, 7]. Begge mekanismene er helt essensielle for energiflyt i cellen,

og krever altså ofte en kofaktor i form av et ionisert overgangsmetall.

1.1.1 Koordinasjonskjemi og krystallfeltteori

I sin grunntilstand vil elektronene som opptar et atom, molekyl eller ion, være i de lavest mulige energitilstandene - representert gjennom de mest stabile orbitalene tilgjengelig. Elektronkonfigurasjonen til ubundne, nøytrale overgangsmetaller inneholder ofte elektroner i s-orbitalet tilhørende neste periode, uten at d-orbitalet er fullstendig fylt opp. Det er flere grunner til dette, blant annet frastøtende krefter mellom elektronene i d-orbitalene, som begynner å virke ved ulik grad av oppfylling for de ulike grunnstoffene [7]. Dette gjør at elektroner ”dyttes opp” til neste s-orbital [7]. Med valenselektroner i s-orbitalet har overgangsmetallene en tendens til å danne kationer - Lewis syrer, som videre danner kovalente bindinger til Lewis baser, resulterende i metallkomplekser. Antallet ligander (Lewis baser) som er koordinert rundt et sentralatom - representert ved koordinasjonstallet - avslører geometrien til koordinasjonskomplekset, som blant annet avgjøres av hvilke typer ligander som binder. Hvilke ligander som binder til sentralatomet kan altså til en viss grad predikeres gjennom HSAB-prinsippet (*hard and soft acids and bases*) [8]; spektroskopiske egenskaper ved overgangsmetallkomplekser er bedre redegjort for gjennom andre bindingsteorier, som for eksempel krystallfeltteori [8] eller ligandefeltteori.

Tabell 1. Et utvalg av geometrier basert på koordinasjonstallet til sentralatomet.

Koordinasjonstall og utvalgte strukturer				
2	3	4	5	6
				
Lineær	Trigonalt plan	Tetraeder	Trigonal bipyramidal	Oktaeder
				
				Kvadratisk pyramidal
				
				Kvadratisk plan

Krystallfeltteori gir gode heuristiske forklaringer på spektroskopiske data. Sentralatomet betraktes som fritt og ligandene som punktladninger; interaksjonene mellom dem antas å være ioniske. Kort fortalt stabiliserer den positive ladningen til metallionet de frastøtende kreftene som oppstår mellom ligandene og elektronene i d-orbitalene. Plasseringen av ligandene i forhold til enkelte av d-orbitalene (bindingsretningene) gir opphav til degenererte energinivåer. Energidifferansen mellom de degenererte orbitalene svarer til den absorberte energien observert under enkelte spektroskopiske målinger; store differanser tilsvarer sterke felter og såkalt "lav-spinn"-komplekser - hvor det er mer gunstig for elektronene å endre spinttilstand for så å dele lav-energi orbitalene (to-og-to elektroner i hver orbital - jamfør "Pauli's eksklusjonsprinsipp") enn å oppta orbitalene med høyere energier. Det motsatte tilfellet gir "høy-spinn"-komplekser. Graden av splitteeffekt varierer med overgangsmetall, oksidasjonstilstand, antallet- og type ligander.

1.1.2 Kobberproteiner

Proteiner med kobber som kofaktor finnes i alle grener av livets tre og innehar funksjoner knyttet til redokskjemi og elektron- eller oksygen transport [9]. Kobber er et edelmetall og begrenser seg til to oksidasjonstilstander - +1 og +2: Cu^+ har elektronkonfigurasjonen $[\text{Ar}]\text{d}^{10}$ og regnes som en myk Lewis syre, mens Cu^{2+} har elektronkonfigurasjonen $[\text{Ar}]\text{d}^9$ og regnes som en borderline Lewis syre. Tilstanden som i størst grad bidrar til å opprettholde funksjonen til et bestemt protein vil derfor gjenspeiles i ligandene som er tilstede; for eksempel vil svovel-holdige ligander øke reduksjonspotensialet til Cu(I) og dermed vanskeliggjøre oksidasjon til Cu(II) - fordelaktig for transport av elektroner i cellen [10], da dette krever at komplekset opprettholder stabilitet- og ikke reduserer andre molekyler på sin vei.

Koordinasjonskjemien og geometrien til metallkomplekser i kobberproteiner har gitt opphav til en rekke grupper for klassifisering av disse proteinene [10]: type I, type II, type III, Cu_A , Cu_B og Cu_Z .

1.1.3 Redoksenzymer og CO_2 som råstoff (*feedstock*)

Karbondioksid er et svært stabilt molekyl - med en høy bindingsentalpi for de to karbon-oksygen bindingene, hver av dem med en lengde på 1.16Å. Grunnet den lineære, sentrosymmetriske strukturen, er karbondioksid en upolar forbindelse, men med polare bindinger, som med et lavest ledig molekylorbital (*lowest unoccupied molecular orbital*; LUMO) med høyest tetthet rundt det sentrale karbonatomet - gjør dette atomet særlig mottakelig for nukleofilt angrep eller reduksjon [11]. Dette muliggjør dannelsen av nye karbonbindinger fra karbondioksid som byggesten (C1), ved reaksjoner katalysert av ett eller flere enzymer. Enzymatisk katalysert reduksjon av CO_2 innebærer altså overføring av elektroner til dette orbitalet (LUMO), hovedsaklig lokalisert rundt karbonatomet, fra kofaktoren i det aktive setet. CO_2 kan koordinere *end-on* via oksygenatomene ($\eta^1\text{-O}$), eller - mer sannsynlig - *side-on*, enten via C-O bindingene ($\eta^2\text{-C,O}$) eller via sentralatomet ($\eta^1\text{-C}$) [12]. Nomenklaturen i parantes, med affiks η^n , viser til haptisitet - antall overlappende elektronskyer mellom sentralatomet og liganden. tillegg finnes det flere koordinasjonsgeometrier ved tilstedeværelsen av flere sentralatomer; for eksempel $\mu_2 - \eta^2$ eller $\mu_2 - \eta^3$ [12] (figur), hvor affiksen μ_n viser antallet brodannende ligander [13, 14].



Figur 1. To muligheter for koordinering av CO_2 som brodannende ligand.

Endringen av elektrontettheten som finner sted rundt kofaktoren ved koordinering av karbondioksid, kan stabiliseres ved spesifikke endringer i den sekundære koordinasjonssfæren [15] - særlig relevant for utvikling av kunstige metallenzymmer for biokatalyserte industrielle prosesser. I dette henseendet bør også nødvendigheten av kostbare tilleggssubstrater eller andre reaktanter for tilførsel av elektroner, i prosesser som ikke tar i bruk fotokjemi eller et eksternt koblet elektrisk potensiale, holdes til et minimum. I tillegg er det fordelaktig om produktet er av høy homogenitet, og at effektiviteten til enzymet/enzymene, og ikke minst sensitivitet overfor oksygen holdes innenfor rimelige grenser.

Naturen har utviklet flere metabolske veier for omdanningen av uorganisk- til organisk karbon; reaksjonsveier som er helt grunnleggende for alt liv på jorda. De autotrofe organismene som utfører disse - flest prokaryoter - benytter seg av et bredt spekter redoksenzymmer for å lage nye forløpermetabolitter som *acetyl-CoA* eller pyruvat, enten ved å reagere karbondioksid med seg selv, eller ved å binde karbondioksid eller bikarbonat til en annen forløper. Totalt seks ulike veier er identifisert, tre av dem utelukkende i anaerobe organismer [16]. Den mest kjente av disse seks, og den eneste som er identifisert i eukaryoter, er Calvin-Benson-Bassham-syklusen (ofte forkortet til Calvin-syklusen), også kalt reduktiv-pentose-fosfat-syklusen. Enzymet ribulose-1.5-bisfosfat karboksylase/oksygenase (RuBisCO) står bak binding av CO_2 til ribulose-1.5-bisfosfat i denne reaksjonsveien, og er - blant annet grunnet vekslings mellom karboksylase- og oksygenase aktivitet - et utpreget tregt enzym (RuBisCO dukket opp i en tid med langt høyere konsentrasjoner av CO_2 i atmosfæren; forholdet mellom karboksylase- og oksygenase aktiviteten bærer preg av dette [16]).

I de naturlige CO_2 -fikserende prosessene skjer reduksjonen som regel simultant med dannelsen av nye karbonbindinger; karbonet i CO_2 forlenger en allerede eksisterende karbonforbindelse. Untaket er å finne i en metabolsk kjede kalt *the reductive acetyl-CoA pathway* (også kjent som *the Wood-Ljungdal pathway*), som inneholder oksygen-sensitive enzymer med evnen til å redusere CO_2 til formsyre og karbonmonoksid [16]. Formsyre, dannet av enzymet format dehydrogenase og NADPH, reduseres videre og binder karbonmonoksid (karbonylgruppe i koordinasjonskompleks) som en metylgruppe koordinert til et nikkelatomet, resulterende i *acetyl-CoA* [16]. Begge reduk-

sjonene, CO_2 til formsyre og karbonmonoksid, innebærer overføring av to elektroner og dermed den samme endringen i oksidasjonstilstand: Karbondioksid går fra å ha et oksidasjonstall på +4 til +2.

1.1.4 Kunstige metalloenzymer og dannelsen av karbon-karbon bindinger fra CO_2

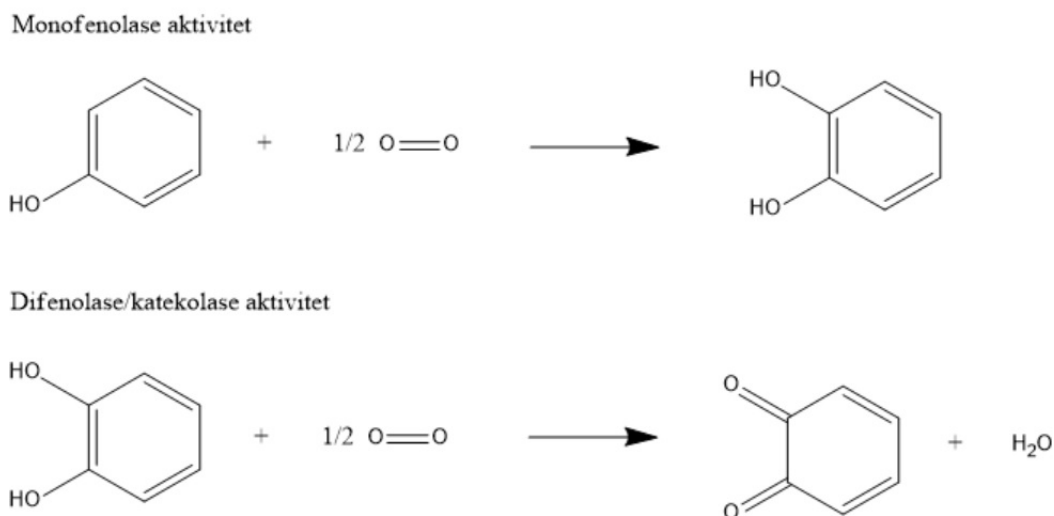
Manipulasjon av metalloenzymer, resulterende i funksjonelle endringer av enzymet som påvirker reaksjonen som katalyseres, kan sies å definere feltet som omhandler kunstige metalloenzymer [17]. RuBisCO har lenge vært en kandidat på dette feltet, i forsøk på å forbedre affiniteten til CO_2 og effektiviteten av karboksylase-aktiviteten [11]. Kunstige metalloenzymer er et forsøk på en sammenstilling-, en hybrid av bio- og organometallisk katalyse [18]. Flere strategier er utformet til dette formålet - stort sett fokusert rundt det aktive setet til eksisterende enzymer; strategier som i sin enkleste form er begrenset til endringer i den sekundære koordinasjonssfæren av metallkofaktoren(e) - i hensikt av å forbedre selektiviteten overfor et gitt substrat, eller en utbytting av metallet som opptar det aktive setet [19] for å endre reduksjonspotensialet og bindingsaffiniteten til et eventuelt kosubstrat. Rasjonelt design og evolusjonær mutagenese er blant teknikkene som tas i bruk for å konstruere kunstige metalloenzymer.

Syntetiske organometalliske komplekser som reduserer- og danner nye karbonbindinger fra CO_2 er ingen ny bragd. Reduktiv kobling av CO_2 til oksalat ved hjelp av kobber ble påvist allerede i 2001 av Peacock *et al.* [20] og senere også vist av Bouwman *et al.* [21] og Fujisawa *et al.* [4] - alle med nitrogen-ligander. Bouwman *et al.* benyttet et dikobber kompleks for å oppnå reduktiv kobling av karbondioksid, gjennom radikale anioner (en-elektron overføringer), under tilstedeværelsen av dioksygen. Selektiviteten overfor karbondioksid skyldes trolig avstanden mellom kobberatomene i dette komplekset: 5.32-5.43 Å [21]. Lignende kobberkomplekser - som hovedsaklig aktiverer oksygen og ikke karbondioksid - er å finne i naturen som type-3 kobberproteiner, og er et godt utgangspunkt for konstruksjon av nye kunstige metalloenzymer med hensikt i å ta i bruk det kritisk voksende CO_2 -lageret i atmosfæren.

1.2 Tyrosinaser

Tyrosinaser tilhører en undergruppe av type-3 kobberproteiner: polyfenol oksidaser [22], som - ulikt andre polyfenol oksidaser - katalyserer to ulike reaksjoner ved binding av molekylært oksygen til et

type-3 kobbersenter, avhengig av substratet: orto-hydroksylering av monofenoler (monofenolase aktivitet) og oksidering av difenoler (difenolase/katekolase aktivitet).

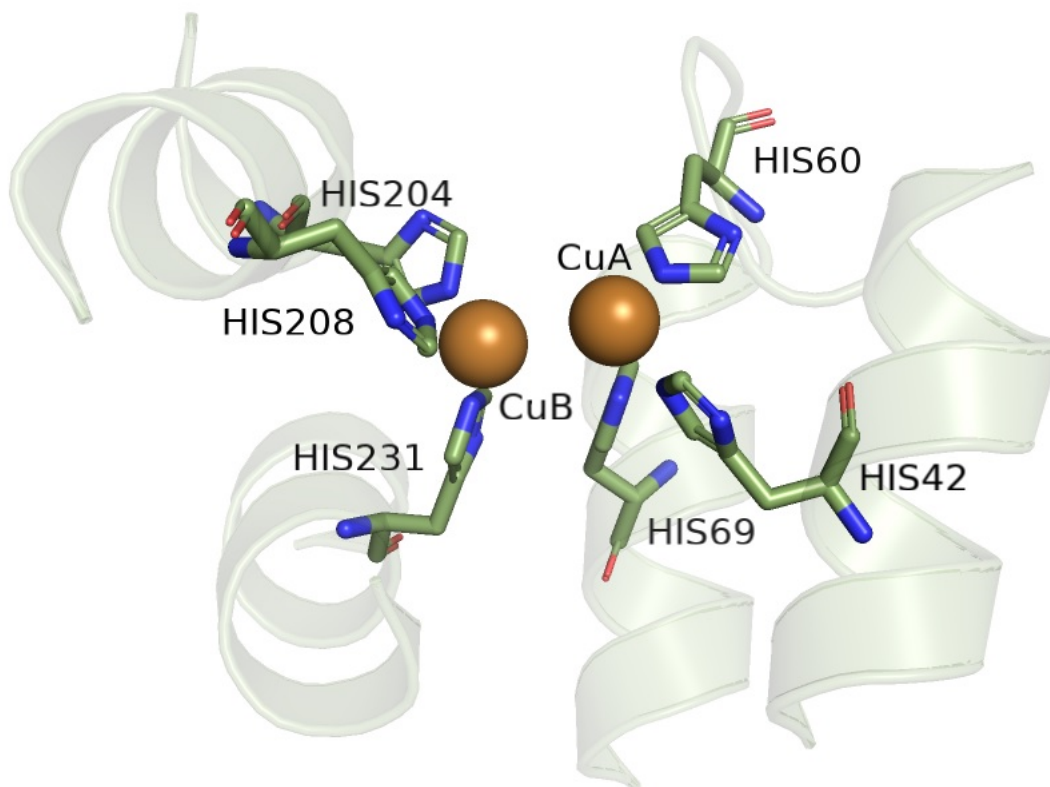


Figur 2. De to aktivitetene til tyrosinaser ved binding av molekylært oksygen: monofenolase- og difenolase.

Tyrosinaser er å finne hos organismer over et bredt fylogenetisk spekter, i alt fra arkebakterier og bakterier til planter, sopper og dyr [23]. Navnet ”tyrosinase” er gitt etter det vanligste substratet for monofenolase-aktiviteten til dette enzymet: L-tyrosin. L-tyrosin inngår i de første stegene i biosyntesen av melaniner - en gruppe heterogene polymerer som blant annet beskytter organismen mot UV-stråling og frie radikaler [24], hvor L-dihydroksyfenylalanin (L-DOPA) dannes fra hydroksylering av L-tyrosin, etterfulgt av en oksidering resulterende i L-dopaquinon (som videre omdannes til melaniner) [2]. L-DOPA er forløperen til en gruppe forbindelser kalt katekolaminer - som inkluderer flere viktige neurotransmittere, noe som belyser én av mange mulige applikasjoner tyrosinaser kan ha i et bioteknologisk øyemed [24]. Disse enzymene er derfor blitt undersøkt av flere gjennom de siste tyve til tredve årene, noe som har avdekket en gruppe med relativt variert sekvenslengde og -identitet, lav substrat-spesifisitet [25], og med ulike funksjoner i og utenfor cellen, ofte basert på små forskjeller i området rundt et svært konservert aktivt sete [26], men også en høy grad av ulikhet mellom tertiær- og kvaternærstrukturene.

1.2.1 Struktur og aktivitet

I likhet med andre type-3 kobberproteiner - som transportproteinet hemocyanin - består det sentrale området, det aktive setet i tyrosinaser, av seks konserverte histidin-residuer bundet til fire α -helikser [27], hvor nitrogenet i imidazolringen til tre-og-tre av histidin-residuene er kompleksbundet med hvert sitt en- eller to-verdige kobberatom, ofte denotert CuA og CuB (figur 3).

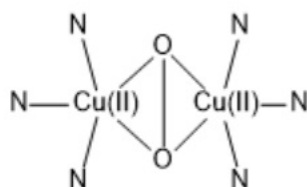


Figur 3. Det aktive setet i TyrBm 3NM8 som et eksempel på det aktive setet i type-3 kobberproteiner. Seks histiner bundet til to α -helikser, er koordinert til to kobberatomer - CuA og CuB. Strukturen er hentet fra TyrBm 3NM8 i RCSB *protein data bank*

Avstanden mellom kobberatomene i sine toverdige tilstander, med koordinert oksygen i form av en dioksygen- eller hydroksidbro, er som regel et sted mellom 2.8-4.0 Å [22], og innebærer interaksjoner mellom det magnetiske momentet fra valenselektronene som resulter i diamagnetisme og fravær av EPR-signal [27] (under normale tilstander/isoformer av enzymet). Unntak er observert ved tilstedeværelsen av enkelte inhibitorer, som kan forårsake en såkalt *half-met* tilstand: [Cu(I)Cu(II)] [28]. Normale, funksjonelle tilstander av tyrosinase (og andre katalytiske type-3 kobberproteiner) innebefatter tre ulike isoformer, basert på de to kobberatomene i det aktive setet: *oxy*

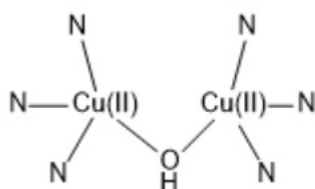
([Cu(II)-O₂²⁻-Cu(II)]), *met* ([Cu(II)-OH⁻-Cu(II)]) og *deoxy* ([Cu(I) Cu(I)]) [26].

I *oxy*-tilstanden danner molekylært oksygen en *side-on* peroksid bro mellom de to kobberatomene ($\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-O}_2$), som er atskilt fra hverandre med en avstand på 2.8-3.2 Å [22]. Det vil si at begge oksygenatomene, i tillegg til å være bundet til hverandre, også er bundet til begge kobberatomene (figur 4). Denne tilstanden har en forvrent kvadratisk pyramidal geometri (*distorted square pyramidal*) [27], og kan koordinere ett eller to oksygenatomer fra substratet som et første steg i den katalytiske syklusen. En UV-vis absorpsjon på rundt 350nm og en resonans på rundt 750cm^{-1} under Raman spektroskopi er karakteristisk for denne tilstanden [29].



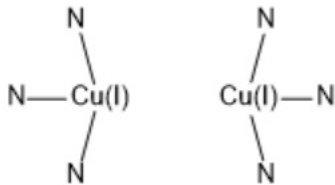
Figur 4. *Oxy*-tilstanden dannes ved aktivering av oksygen og oksidering av de to Cu(I)-atomene.

Tyrosinase har monooksygenase-aktivitet, noe som innebærer at kun ett oksygenatom fra det bundne molekylære oksygenet, inngår i reaksjonen som katalyseres; det andre blir ofte redusert til vann eller hydroksid ved hjelp av ulike hydrogendonorer [2]. I *met*-tilstanden er det resterende oksygenatomet, i form av hydroksid eller vann, bundet til de to kobberatomene (figur 5), som dermed har gått fra å ha en forvrent kvadratisk pyramidal- til plankvadratisk geometri, med en avstand mellom CuA og CuB på 3.2-4.0 Å [22]. Oksygenatomene fra et katekol-substrat kan interagere med hvert sitt kobberatom i denne tilstanden, for med det å oksideres til et quinon. Kobberet mottar altså ”nye” elektroner fra substratet. *Met*-tilstanden kan også binde monofenoler som L-tyrosin, men danner da et blindveikompleks (*dead-end complex*) [27].



Figur 5. *Met*-tilstanden dannes etter monofenolase-aktivitet, eller etter første ledd av difenolase-aktivitet - avhengig av substrat.

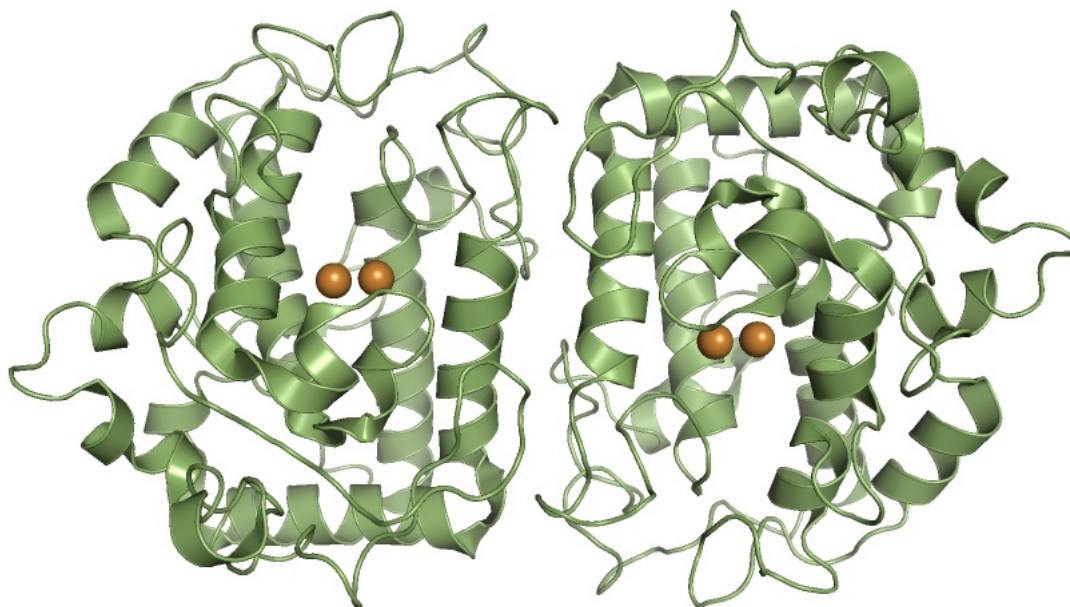
Uten koordinert oksygen vil kobberatomene normalt sett være i en redusert tilstand, med et oksidasjonstall lik +1 (figur 6). *Deoxy*-tilstanden oksideres av molekylært oksygen og gjendanner *oxy*-tilstanden. Avstanden mellom CuA og CuB er her på sitt videste, med 4.1-4.6 Å [22].



Figur 6. *Deoxy*-tilstanden dannes som siste ledd i den katalytiske syklusen. Kobberatomene er i sin reduserte tilstand, med oksidasjonstall +1.

Disse tre intermediatene av det høyt konserverte aktive setet, hvor *oxy*-tilstanden katalyserer både oksidasjonen av difenoler og hydroksylering av monofenoler, mens *met*-tilstanden kun bidrar til den første av disse, oppsummerer mye av aktiviteten til tyrosinaser. Type substrat og andelen av mono- og difenolase-aktivitet enzymet er optimalisert for, kanskje også kofaktorens evne til å aktivere andre molekyler enn oksygen, er i stor grad bestemt av et fåtall aminosyrer i sekundærsfæren av sentralatomet. Mye av innsikten i mekanismene rundt aktiviteten til tyrosinaser er samlet inn fra studier av punktmutasjoner i dette området - og den medførte virkningen på enzymets struktur og funksjon.

1.2.2 Tyrosinase fra *Bacillus megaterium* (TyrBm)

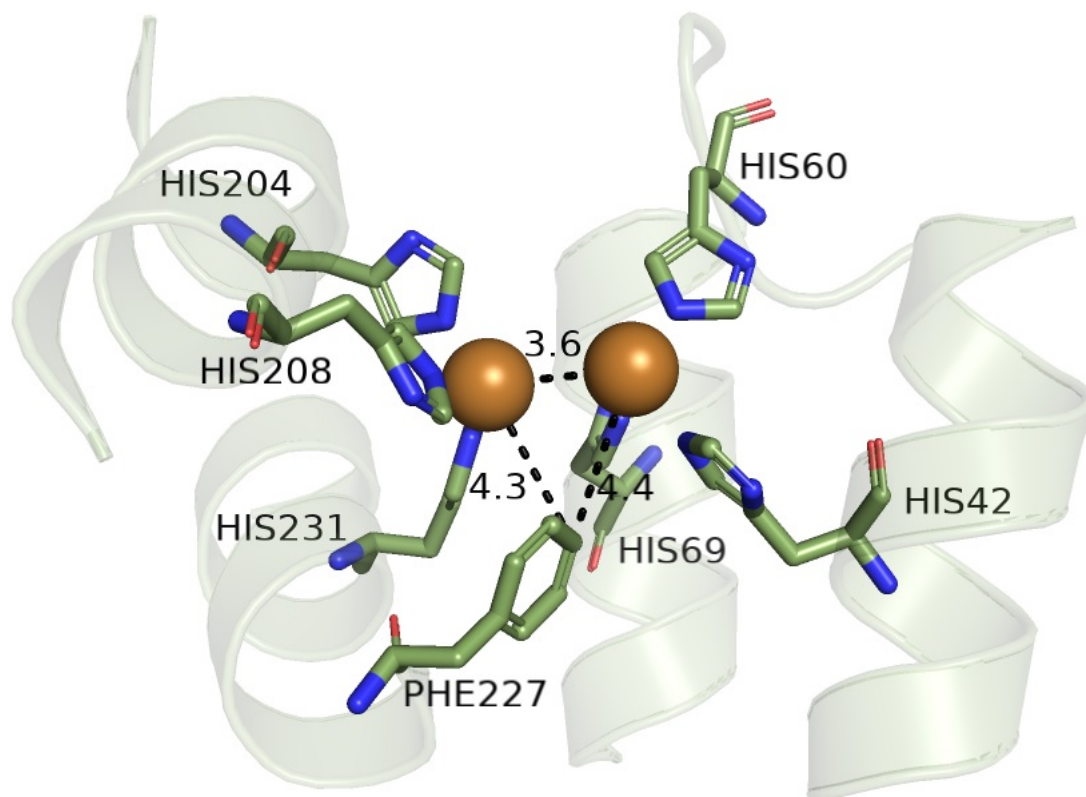


Figur 7. Homodimer av TyrBm 3NM8 som dannes ved høye konsentrasjoner, for eksempel under krystallisering. Strukturen er hentet fra TyrBm 3NM8 i RCSB *protein data bank*

Den første krystallstrukturen av tyrosinase fra *Bacillus megaterium* ble publisert i 2010 [30] med PDB identifikatoren: 3NM8 (figur 7). En tyrosinase som gjentatte ganger er blitt studert ved bruk av målrettet mutagenese (*directed mutagenesis*), muligens som en følge av enzymets evner til å katalysere reaksjoner under relativt høye temperaturer - med en optimal aktivitet målt ved 50°C [31] - og dets relativt høye stabilitet i enkelte organiske løsningsmidler [31]. TyrBm danner homodimerer med to-foldige symmetriakser, men eksisterer også som monomerer - særlig ved lavere konsentrasjoner [30]. Fraværet av andre domener enn det katalytiske i TyrBm karakteriserer én av fem typer, i en noe arbitrær, men mye brukt inndeling av tyrosinaser [24, 25], som innebærer at TyrBm har få begrensninger på aktivitet - fra det øyeblikket apoproteinet aktiveres ved inkorporering av kobber. Dette kan kontrasteres med en annen kjent type tyrosinaser, som danner heterodimerer med et hjelpeprotein (*caddie-protein*). Hjelpeproteinet i disse tyrosinasene er nødvendig for inkorporering av kobber og utskillelse fra cellen, men begrenser aktiviteten vesentlig [24]. Inkorporering av kobber i TyrBm - som altså foregår uten et hjelpeprotein - belyser noen viktige aspekter ved de to kobberasetene - CuA og CuB. Høyere konsentrasjoner av kobber er nødvendig for etableringen av CuB [32], som trolig skyldes en sterkere interaksjon mellom ligandene koordinert rundt CuA

[30, 32], og monofenolase-aktiviteten avhenger ikke av CuB [24, 33].

1.2.3 TyrBm - F227Y



Figur 8. Det aktive setet i TyrBm 3NM8 og fenylalaninet som substitueres med tyrosin. Avstandene mellom parakarbonet og de to kobberatomene er vist i Ångstrøm (Å). Strukturen er hentet fra TyrBm 3NM8 i RCSB *protein data bank*

Basert på simuleringer, og antydningen om at avstanden mellom kobberatomene i det organometaliske komplekset syntetisert av Bouwman *et al.* tilrettelegger for radikaldannelse- og reduktiv kobling av CO_2 , er substitusjonen av fenylalanin til tyrosin i posisjon 227 i 3NM8 ment å øke avstanden mellom CuA og CuB - altså å bringe aminosyren i posisjon 227 inn i den første koordinasjonssfæren til sentralatomet. Phe227 er ikke en del av den første koordinasjonssfæren til kobberet i tyrBm 3NM8, men befinner seg i en avstand på mindre enn fem Ångstrøm fra de to atomsentrene (figur 8). Substitusjonen gir en mutant som ved tilføring av tilstrekkelig høye konsentrasjoner av kobber(II) resulterer i løsninger med en karakteristisk lilla farge; en karakteristikk som også er observert i andre kobberproteiner, blant annet LsAA9 LPMO [34].

1.3 Formålet med denne oppgaven

Denne oppgaven tok til sikte på å undersøke de to variantene av TyrBm 3NM8 - villtype og mutant, for å avdekke strukturelle- og spektroskopiske trekk, underlagt et overhengende formål av å konstruere et enzym i stand til å binde- og forhåpentligvis transformere karbondioksid fra atmosfæren, først og fremst til oksalat. Et tilleggsformål er å utvikle ny kunnskap om metalloenzymer som TyrBm. De konkrete spørsmålene som er forsøkt besvart gjennom denne oppgaven var som følger:

- Hvordan påvirker mutasjonen F227Y i TyrBm 3NM8 avstanden mellom de to kobberatomene (CuA og CuB) i det aktive setet?
- Er villtypen og/eller mutanten av TyrBm EPR-aktiv(e)? Isåfall, skyldes aktiviteten avstanden mellom de kobberatomene?
- Hvordan påvirkes strukturen til det aktive setet i villtype og mutant av TyrBm 3NM8, av toverdigg nikkel fremfor kobber?
- Er de ulike variantene - mutant eller villtype, nikkel- eller kobbermettet - i stand til å koordinere nitritt - som en etterligner av aktivert karbondioksid - det vil si et radikal av karbondioksid (radikalet er - som nitritt - avbøyd, ikke lineært) - tilført i løsningen?

For å undersøke disse spørsmålene ble det tatt i bruk en rekke metoder og instrumenter, inkludert rekombinant genteknologi, spektroskopi og røntgen-krystallografi. Noen konkrete delmål for å besvare spørsmålene var som følger:

- Fremdyrking av *Escherichia coli* celler, med villtypen og mutanten av TyrBm 3NM8 proteinet, etterfulgt av proteinuttrykk og isolering/rensing.
- Spektroskopi, inkludert elektron paramagnetisk resonans (EPR), for å karakterisere den elektroniske- og magnetiske signaturen til TyrBm villtype og mutant (F227Y).
- Krystallisering av proteinene med og uten tilføring av toverdigg kobber, for å undersøke strukturen i det aktive setet i mutant og villtype gjennom røntgen-krystallografi. Metning med toverdigg- kobber eller nikkel, samt nitritt, etter krystallisering er også inkludert under dette punktet.

I tillegg har det vært en intensjon med denne oppgaven å belyse noen av de teoretiske aspektene ved disse teknikkene, på et grunnleggende, ikke for komplisert nivå. Om ikke direkte gjennom teksten, så forhåpentligvis gjennom referanseverket den er bygget på.

2 Rekombinant Genteknologi

Rekombinant genteknologi muliggjør produksjonen av store mengder DNA, peptider eller proteiner med høy grad av renhet, innenfor relativt gunstige økonomiske- og tidsmessige rammer. Flere teknologier er utviklet på dette området - som benytter ulike vertsorgansimer, former for rekombinasjon og transformasjonsmetoder. Kort fortalt, i sin enkleste form: Et gen plasseres i en ekspresjonsvektor (for eksempel et plasmid) som deretter overføres til en vertsorganisme, der genet repliseres sammen med vertens DNA og uttrykkes på en kontrollert måte, etter først å ha blitt indusert.

2.1 Restriksjonszymer

Oppdagelsen av restriksjonszymer i slutten av 1970-årene akselererte utviklingen av rekombinant genteknologi, som tidligere i det samme tiåret ble realisert med den første suksessfulle kloningen av et rekombinant plasmid [35]. Restriksjonszymer er endonukleaser som binder til spesifikke sekvenser i DNA, kalt restriksjonsområder, og kløyver fosfodiesterbindingene mellom to-og-to nukleotider. Benevnelsen ”restriksjon” kommer fra enzymenes opprinnelige funksjon i bakterier og andre mikroorganismer [36], hvor de utgjør en essensiell bestanddel av immunforsvaret: Fremmed DNA i cellen, for eksempel fra bakteriofager, vil kuttes opp og dermed hindres i å skade cellen (restriksjonsområdene i vertens DNA er ”merket” (metylert) for å hindre cellen i å angripe seg selv [36]).

Restriksjonsområdene får ofte en forskjøvet ende, altså ender med én tråd lengre enn den andre, etter påvirkning av restriksjonsenzymene. Dette gjør det mulig å innføre redigerte gensekvenser med ender som er komplementære med de etterlatt av restriksjonsenzymene. Hydrogenbindinger dannes mellom basene i de komplementære overhengene til mål-DNAet og den gitte sekvensen, og ligaser kan tilføres for å danne fosfodiester bindinger mellom møtende nukleotider fra hver av de fire tråd-endene.

2.2 Plasmider, transformasjon og kloning

Plasmider er små, ofte sirkulære, dobbelttrådede DNA-molekyler som er svært vanlig i bakterier, men som også er å finne i andre mikroorganismer [37]. De repliseres ved hjelp av vertens replikasjonsmaskineri, gitt at replikasjons origo (ORI) gjenkjennes, og inneholder ikke-essensielle gener som ofte er gunstige for vertens overlevelse, for eksempel ved at de gir antibiotikaresistens. Prosessen hvor en vertscelle inntar et plasmid fra omgivelsene kalles ”transformasjon”, og er et eksempel på horisontal genoverføring - altså aseksuell overføring av gener. Dersom vertscellene ikke er genetisk kompetente og dermed ikke kan transformeres på naturlig vis, er det utviklet en rekke metoder for å gjøre dette kunstig.

Et plasmid i rollen som ekspresjonsvektor bør inneholde følgende elementer: En promotor som binder sterkt til vertens RNA polymerase (eventuelt en induserbar RNA polymerase inkludert i vertskromosomet eller et annet plasmid); en seleksjonsmarkør; en ORI-sekvens tilpasset verten; og - noe mindre essensielt - affinitetsmerker (*affinity tags*) med muligheter for enkel fjerning i det endelige produktet [38].

Kloning viser i dette tilfellet simpelthen til dannelsen av flere identiske plasmider, og utføres ved replikasjon i og av en vertscelle over flere generasjoner.

2.2.1 Promotorer

En promotor er en sekvens som inneholder elementer for binding av transkripsjonsapparatet (RNA polymerase med eller uten bindingsfaktorer) for transkripsjon av et eller flere gener (et operon) som ligger nedstrøms ($5' \rightarrow 3'$) for promotoren. Det er her regulering av genene foregår, for eksempel gjennom en repressor - som blokkerer for RNA-polymerase; en aktivator - som binder i nærheten av RNA-polymerase og hjelper denne med å binde; eller en kombinasjon av repressorer og aktivatorer. Både aktivatorer og repressorer er ofte avhengig av binding til en induktor for å utføre sin funksjon i forhold til promotoren.

En kombinasjon av positiv- og negativ regulering er å finne i *lac*-promotoren, lokalisert foran *lac*-operonet i blant annet *E. coli*. Genene i *lac*-operonet koder for proteiner som sammen muliggjør effektivt opptak og metabolisme av laktose, men kun dersom laktose er tilstede og glukose er fraværende. Repressoren frigjøres fra promotoren dersom den binder allolaktose (laktose konverteres til allolaktose i cellen), og aktivatoren binder til promotoren dersom den selv binder syklisk

adenosinmonofosfat (cAMP) (oppopping av cAMP i cellen indikerer fravær av nyttbare energikilder) [39].

I bioteknologisk øyemed benyttes en variant av *lac*-promotoren i plasmid-vektorer, kalt *lacUV5*. Denne tillater bruk av glukose i vekstmediet ved at den ikke er avhengig av den cAMP-induserte aktivatoren for å binde RNA-polymerase; en analog av allolaktose, isopropyl β -D-1-tiogalaktopyranosid (IPTG), induserer dermed alene transkripsjon ved binding til repressoren [38].

2.2.2 Seleksjonsmarkører

Under kloningen av plasmidet i vertscellen er det nødvendig med en kontrollmekanisme for å sikre at de nye individene også bærer plasmidet. Dette kan gjøres ved å selektere ut de riktige individene ved hjelp av en seleksjonsmarkør: Et gen tilført plasmidet, som er nødvendig for overlevelse under de kontrollerte vekstforholdene. For eksempel kan det inkluderes et gen som koder for resistens mot β -laktam antibiotika, i kombinasjon med for eksempel ampicillin i vekstmediet. Dette genet krever en egen promotor, som fører til transkripsjon uten den tilførte induktoren.

2.2.3 Affinitetsmerker og Separasjonsteknikker

Etter induksjon og overuttrykk, vil det neste naturlige steget være å isolere produktet fra den komplekse blandingen av biomolekyler produktet befinner seg i etter lysing av cellene. Det finnes mange ulike metoder for å oppnå dette, avhengig av de fysikokjemiske egenskapene til produktet. Separasjonen kan optimaliseres ved å tilføre en sekvens til det relevante genet, som vil gi produktet egenskaper svært godt tilpasset en gitt separasjonsmetode, for eksempel et spesifikt kolonnemateriale i affinitetskromatografi. I tillegg til forbedret separasjon - både med hensyn til tid, renhet og utbytte - kan dette affinitetsmerket gi bedre løselighet og muliggjøre deteksjon i løpet av prosessen [38]. I tilfeller hvor produktet er et protein er det vanlig å benytte peptider, da de er små og dermed har minimal påvirkning på proteinets struktur og funksjon [38]; fjerning av denne type merker, for eksempel ved bruk av proteaser på en spesifikk sekvens inkludert i plasmidet, er altså ikke alltid nødvendig. Et alternativ er å benytte andre proteiner som affinitetsmerke. Dette har fordeler ved at de i større grad er i stand til å påvirke faktorer som løselighet. Men, størrelsen nødvendiggjør det som ofte utgjør et tids- og kvalitetsmessig kostbart tilleggstrinn i metoden, nemlig fjerning av merket (en løsning på dette er å bruke proteiner i stand til å fjerne seg selv).

Et mye brukt affinitetsmerke i proteiner er polyhistidiner. Histidin er en aminosyre som opptrer relativt sjeldent i *E. coli* [39]; et godt premiss for isolering av rekombinante proteiner med polyhistidin-merker uttrykt i disse vertscellene. Histidin har en R-gruppe som inneholder imidazol - en femringet heterosyklisk forbindelse med to nitrogenatomer - som inngår i metallkomplekser med toverdig nikkell, kobber eller kobolt som sentralatom. Denne spesifisiteten utnyttes i immobilisert metall affinitetskromatografi (*immobilized metal affinity chromatography*; IMAC), hvor metallatomet interagerer sterkt med funksjonelle grupper, for eksempel nitriloetansyre (*nitriloacetic acid*), bundet til et støttemateriale, og noe svakere til de histidinmerkede proteinene i løsning. Interaksjonen med polyhistidin er tilstrekkelig sterk for nær fullstendig retensjon i kolonnen, noe som krever tilføring av imidazol eller reduksjon av pH for eluering av proteinet [40].

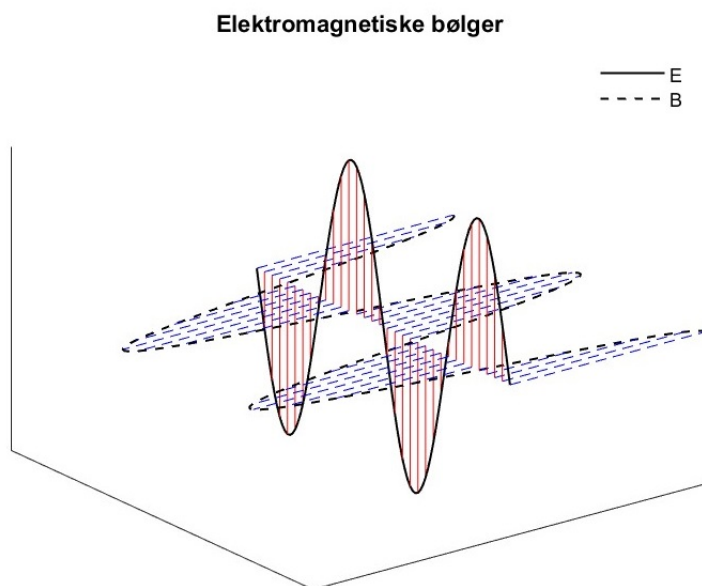
Polyhistidin affinitetsmerker og IMAC kan kombineres med en induserbar, selvkløyvende protease, for å oppnå et høyt utbytte av proteinet uten polyhistidin-halen med på kjøpet. *Cysteine protease domain* (CPD) er et domene først identifisert i *Vibrio cholerae* RTX toksin, som er essensielt i autoprosessering av dette toksinet når det tas opp og induseres i enkelte eukaryote celler [41]. CPD er svært spesifikt og induserer kløyvingen av peptidbindinger hvor leucin inngår, og som befinner seg ved siden av proteinet [42]. Aktiviteten til enzymet kan induseres med fytinsyre (*inositol hexakisphosphate*), som er fraværende i bakterier [42], og CPD kan kombineres med en polyhistidin-hale for implementering av IMAC. CPD etterlater seg - på lik linje med andre affinitetsmerker - spor i det isolerte proteinet, men dette kan reduseres til én enkelt aminosyre (leucin) ved bruk av restriksjonsområdet til endonukleasen BamHI for kloning i plasmidet [42].

2.3 Vertsorganismen

Kloning av plasmider stiller et særskilt viktig krav til vertsorganismen: rask vekst. En rekke andre faktorer blir relevante dersom verten også skal benyttes for å overuttrykke proteiner innsatt i plasmidet, for eksempel mangfoldet av proteaser i proteomet. *E. coli* har en rask vekst og er en mye brukt organisme, som modell og i applikasjoner. Stammen BL21 mangler flere av proteasene som bryter ned ekstracellulære proteiner i *E. coli*, og BL21(DE3) inkluderer en profag (*prophage*) med genet til T7 RNA-polymerase nedstrøms for en *lacUV5* promotor [38].

3 Spektroskopi

Elektromagnetiske bølger inneholder - som navnet antyder - en elektrisk- og en magnetisk komponent, noe som tydelig kan illustreres ved å betrakte planpolariserte bølger, det vil si stråling (ringbølger) som er blitt redusert til to planbølger - en for hver av de to nevnte komponentene (figur 9). De to komponentene er alltid ortogonale på hverandre.



Figur 9. Elektromagnetiske bølger kan visualiseres som par av ortogonale planbølger: én elektrisk og én magnetisk komponent.

Interaksjoner mellom elektromagnetiske bølger og materie omhandler det elektroniske- og magnetiske momentet til partiklene som er involvert. Spektroskopi utnytter disse interaksjonene, gjennom effekter som absorpsjon og emisjon av elektromagnetisk stråling, for å analysere den indre naturen til atomer, molekyler og ioner.

Den elektroniske- og magnetiske signaturen til en partikkel, viser til de mulige energinivåene - kvantifiserte, stasjonære tilstander av elektronene i partikkelen - som gir opphav til de ulike energiovergangene som induseres og måles gjennom spektroskopi. I tillegg til elektronoverganger utnyttes også overganger mellom ulike vibrasjons- og rotasjonstilstander for å ekstrahere strukturell informasjon. For å indusere en energiovergang som fører til absorpsjon må energien til den innkommende strålingen - som tidligere nevnt i forbindelse med krystallfeltteori - resonere med den bestemte overgangen, noe som inntreffer dersom energien til fotonene, $E_{foton} = h\nu$, tilsvarer den

til energiovergangen, ΔE .

Ved bestråling av en substans med monokromatisk stråling kan ulike effekter manifestere seg. Absorpsjon kan skje uten emisjon, og emisjon kan skje uten absorpsjon [43]. Energien til emittert stråling kan være høyere eller lavere enn den til den innkommende strålingen; utsendt stråling av lavere energi kan være ledsaget av et elektron; eller et elektron kan utstråles alene [43]. Dersom emisjon finner sted, vil retningen til den emitterte strålingen - i de fleste tilfeller - være ulik fra den til den innkommende strålingen. Disse interaksjonene refereres derfor ofte til som spredningseffekter (*scattering-effects*).

3.1 Ultrafiolett-synlig (UV/vis) spektroskopi

Lys med bølgelengde i området 200-800 nm korresponderer til energier som er tilstrekkelig for å indusere elektronoverganger i bindingsområdene til organiske forbindelser, eller i enkelte komplekser av overgangsmetaller, men ikke i elektronene som befinner seg i området nær atomkjernen. Lys under 200nm forårsaker eksitasjoner i kjemiske grupper som er svært vanlige (også i organiske løsningsmidler; for eksempel bindinger mellom karbon og hydrogen), resulterende i utilstrekkelig signal-støy forhold for de fleste anvendelser. Lys over 800 nm vil gjøre at elektrontransisjoner i svært stor grad akkompagneres av vibrasjons- og rotasjonsoverganger, resulterende i splitteffekter.

Grunnet indrenergien til forbindelsen som absorberer, vil absorpsjonen forårsaket av en bestemt elektronovergang induseres over et intervall av bølgelengder. Den resulterende fordelingen av absorpsjonsverdier over dette området tilnærmer en Gaussisk fordeling, med en topp (λ_{maks}) som svarer til absorpsjonen ved den forventede resonansenergien til elektronovergangen.

Evnen en forbindelse har til å absorbere lys i en bestemt del av UV/vis-området kan brukes for å finne konsentrasjonen til forbindelsen i løsning - ved å sammenligne intensiteten til monokromatisk lys sendt igjennom løsningsmiddelet med- og uten forbindelsen tilstede. Beer-Lamberts lov uttrykker et lineært forhold mellom absorpsjon (A) ved en gitt bølgelengde (λ) - gitt som tierlogaritmen av forholdet mellom intensiteten uten- og med forbindelsen tilstede - og konsentrasjonen (c) av forbindelsen:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l \quad (\text{Beer-Lamberts lov})$$

Lengden til lysveien (l ; lengden til kyvetten) og ekstinksjonskoeffisienten (ϵ) er inkludert. Sistnevnte er unik for en bestemt kromofor og kan - for proteiner - kalkuleres ut ifra molekylærvekten og sammensetningen av aminosyrer.

3.2 Elektron paramagnetisk resonans (EPR)

Energioverganger som oppstår grunnet endringer i elektronenes plassering rundt kjernen er forholdsvis enkelt å konseptualisere gjennom eldre fysikalske teorier. Ideen om elektronspinn er derimot noe mer abstrakt; omdreininger rundt elektronets egen akse er kanskje det nærmeste vi kommer en billedlig, ”intuitiv” forståelse, men er langt ifra korrekt. Siden energioverganger fra endret elektronspinn er essensen i EPR-spektroskopi, er det her inkludert noe historisk bakgrunn og noen grunnleggende konsepter innen kvantemekanikk for å belyse dette fenomenet.

3.2.1 Operatører

I kvantemekanikk brukes operatører for å beskrive spesifikke endringer som påføres en bestemt tilstand. I sin enkleste form kan dette dreie seg om posisjonen til en partikkel i én dimensjon; operatoren vil da simpelthen bestå av en variabel x som virker på en tilstand $\psi(x)$ og gir en ny tilstand $x\psi(x)$ [44].

For en bestemt operator finnes det enkelte tilstander, som - dersom operatoren virker på denne tilstanden, kun endres med en skalar størrelse. Tilstanden og den skalare størrelsen kalles en egenfunksjon og en tilhørende egenverdi, som begge er med på å karakterisere den bestemte operatoren. Operatoren kalles en hermittisk operator, dersom følgende kriterier er oppfylt: (1) egenverdiene til den bestemte operatoren består kun av reelle tall; (2) de korresponderende egenfunksjonene er ortogonale - indreproduktet, definert som integralet av produktet mellom to-og-to egenfunksjoner, er lik null; og (3) egenfunksjonene danner en komplett mengde - enhver tilstand kan skrives som en lineær kombinasjon av egenfunksjonene i mengden. Hermittiske operatører korresponderer i kvantemekanikk til observabler, altså tilstandsendringer som kan måles uten usikkerhet [44].

Den viktigste operatoren i kontekst av spektroskopi er den hermittiske energiooperatoren, også kalt Hamilton-operatoren. Denne kan konstrueres med hensyn til de ulike interaksjonene som er forventet, for eksempel i et paramagnetisk kompleks i et redoksenzym, for med det å muliggjøre en fullstendig beskrivelse av komplekset ved hjelp av datasimuleringer.

3.2.2 Iboende Spinn og Zeeman-Effekten

I 1896 gjennomførte fysikeren Pieter Zeeman et eksperiment (tidligere forsøkt av Michael Faraday), med hensikt i å observere endringer i emisjonsspekteret til en flamme som en konsekvens av et eksternt virkende magnetfelt [45, 46]. Resultatene, en fortykning (to til tre ganger opprinnelig tykkelse) av to observerte spektrallinjer i natrium ved aktiveringen av et ytre magnetfelt, ble presentert for omverdenen året etter, sammen med en hypotese utarbeidet av Hendrik Antoon Lorentz [45, 46]. Hypotesen medførte en tolkning av resultatene i retning av en dobling og tripling av de to linjene. I det påfølgende året ble denne hypotesen forsøkt bekreftet eksperimentelt av Thomas Preston, ved blant annet å bruke en sterkere magnet. Forsøket resulterte i oppdagelsen av en ytterligere ”modifisering” av spektrallinjene, som da viste seg i form av en kvartett (dobbel dublett) og en sekstett (dobbel triplett) [47]. Dermed oppstod et skille mellom det som ble kalt den ”normale” og den ”anomale” Zeeman-effekten; førstnevnte kunne forklares ved bruk av klassiske fysikalske sammenhenger (gjennom Lorentz’ modell), og senere også gjennom eldre kvantefysiske teorier (Niels Bohr’s modell), og fungerte for det fåtallet av atomer hvor det orbitale angulærmomentet står som eneste bidrag til det totale angulærmomentet. Oppdagelsen av Zeeman-effekten var et viktig bidrag i å bekrefte elektronets eksistens, og la grunnlaget for videre studier av atomets indre natur.

Spinn angulærmoment i elektroner ble postulert av Samuel Goudsmit og George Uhlenbeck i 1925 [48], blant annet på bakgrunn av Pauli’s eksklusjons prinsipp, som med dette konseptet bidro til den moderne kvantemeknikken og forklaringen på den anomale Zeeman-effekten [49]. Elektronets egenspinn ble bevist tre år tidligere, av Otto Stern og Walther Gerlack, noe som ikke ble opplagt før i 1927 [50]. Dette skyldes at Stern og Gerlack forsøkte å bevise et aspekt av Bohr-modellen (1913) som gikk ut på at det magnetiske momentet i et atom, som en konsekvens av elektronenes bane rundt kjernen, var begrenset til noen få spatiale orienteringer [50]. Eksperimentet gikk ut på å sende en gass av sølvatomer inn gjennom et magnetfelt (inhomogent, med endringer langs én bestemt akse (z) ikke lik null) og mot en glassplate. Sølvatomer består av førtisju elektroner, hvorav ett befinner seg i ”valensskallet”; magnetiske egenskaper til sølv (i nøytral form) oppstår derfor grunnet ett enkelt elektron. I følge den klassiske modellen ville atomene på glassplaten være jevnt fordelt rundt ett punkt, noe som gjennom dette eksperimentet viste seg og ikke være tilfellet: strålen med sølvatomer ble delt i to [44].

Ideen om elektronets spinn, som postulert av Goudsmit og Uhlenbeck, innebar et elektron med dreiemoment på $\frac{\hbar}{2}$ og et magnetisk moment på $\frac{e\hbar}{2m_e}$ - kjent som Bohrmagnetonet (ofte denotert μ_B). Dette fant ingen grunnlag i klassisk fysikk - under Lorentz' modell, da vinkelhastigheten i så fall ville forbigått lysets hastighet med en faktor på ti [44, 49]. En partikkels iboende spin er altså ikke forenlig med ideen om rotasjon rundt dens egen akse, men anses som en egenskap på lik linje med - for eksempel ladning. For eksempel er elektroner definert som en "spinn- $\frac{1}{2}$ partikkel", og faller inn under kategorien "leptoner" (som videre befinner seg i kategorien "fermioner" - partikler med "halvtalls" spinn) [44].

Selv om fysikalske tolkninger av elektronets spinn setter det i en annen kategori enn dreiemomentet, ved at det ikke er avhengig av spatiale variabler, er det noen likheter mellom dem i den matematiske behandlingen av de to. Som med tilfellet for operatorene som beskriver de ulike komponentene av angulærmomentet til en partikkel, kommuterer heller ikke operatorene for de ulike komponentene av partikkelens iboende spinn, noe som betyr at de ikke deler egentilstander, og dermed at observasjoner av de ulike spinn-komponentene til en partikkel ikke kan gjennomføres samtidig, uten uskarphet [44] (spinn-operatoren er ikke hermittisk). Observasjonene vil derimot være av lik karakter, siden egenverdiene til de tre operatorene er de samme, nemlig $\pm\frac{\hbar}{2}$, ofte indikert gjennom spinn kvantenummeret, $m_s = \pm\frac{1}{2}$, som: $m_s\hbar$.

Den generelle spinn-operatoren for en partikkel kan betraktes som summen av spinn-operatorene til de tre retnings-komponentene. Egenverdiene til den generelle spinn-operatoren er gitt som: $\pm s(s+1)\hbar$, hvor s er gitt ved $s = n + \frac{1}{2}$, der n er et positivt heltall. Som tidligere nevnt er altså elektronet en "spinn- $\frac{1}{2}$ -partikkel", med andre ord: En partikkel med spinn-egenverdier lik $\pm\frac{1}{2}(\frac{1}{2} + 1)\hbar$. I tilfeller der spinn-systemet ikke er fiksert i en gitt retning, vil felles egentilstander mellom den generelle- og hver av komponentoperatorene angi retningen; som med angulærmoment kommuterer kvadratet av den generelle spinn-operatoren med hver av komponentene (og er dermed målbar).

Goudsmit og Uhlenbeck baserte sine beregninger på en antagelse om at det gyromagnetiske forholdet, altså forholdet mellom det magnetiske- og angulære momentet til elektronets spinn, var ulikt det man ville forventet fra det tilsvarende forholdet til elektronet i bane rundt kjernen, med en faktor på to [49]. Denne faktoren, som gir en proporsjonalitet mellom det magnetiske momentet og dreiemomentet til en partikkel, kalles en g-faktor. For et fritt elektron er g-faktoren per i dag

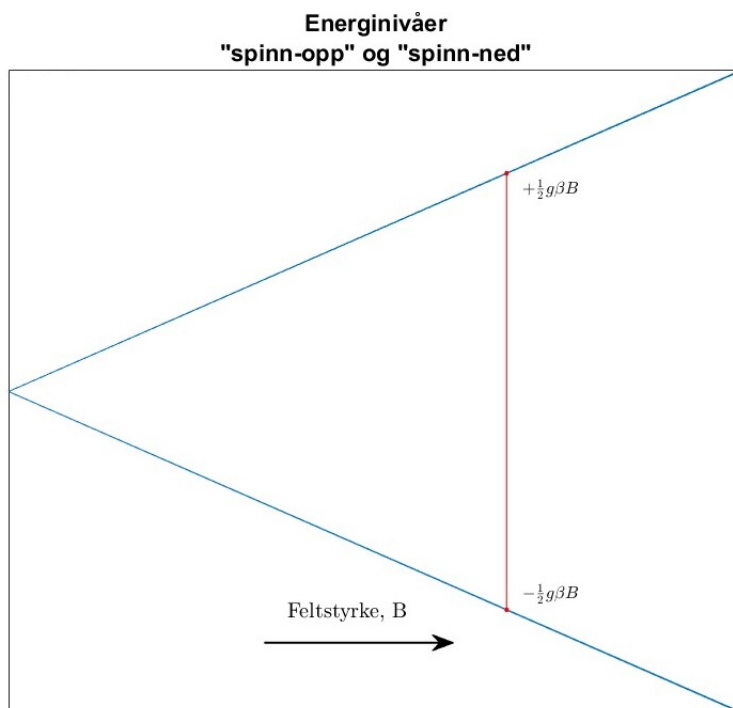
fastsatt med en usikkerhet på 0.28ppt [51].

Den anomale Zeeman-effekten kan altså forklares gjennom interaksjonsenergien til det eksterne magnetfeltet (\vec{B}) og det magnetiske momentet ($\hat{\mu}$) til elektronets iboende spinn; sistnevnte gitt ved produktet av g-faktoren (g_e), elektronets angulærmoment - Bohr-magnetonet (μ_B), og spinn-egenverdiene (\hat{S}), dividert på den reduserte Planck-konstanten (\hbar). Interaksjonsenergien til et system med et magnetisk moment - som utelukkende oppstår fra elektron-spinn, er altså gitt ved:

$$\hat{\mu} \cdot \vec{B} = g_e \left(\frac{-e}{2m_e} \right) \hat{S} \cdot \vec{B} \quad \Leftrightarrow \quad \hat{\mu} \cdot \vec{B} = -g_e \mu_B \left(\frac{1}{\hbar} \right) \hat{S} \cdot \vec{B}.$$

3.2.3 Elektromagnetisme og Energi

EPR-spektroskopi er en av få spektroskopiske metoder hvor energiovergangene hos analytten(e) er induisert av den magnetiske komponenten til den innkommende elektromagnetiske strålingen, og er derfor en metode rettet mot systemer i en paramagnetisk tilstand - tilstander med et netto elektron angulærmoment som ikke er lik null. Paramagnetiske tilstander kan altså både oppstå som en følge av elektronets banespinn og iboende spinn, begge er assosiert med det magnetiske momentet.



Figur 10. Indusert spinn-endring under bestråling og økende magnetisk feltstyrke. Den røde, vertikale linjen indikerer den energetiske avstanden for en bestemt feltstyrke.

Ettersom bestrålingen i EPR-spektroskopi foregår i et eksternt magnetfelt, kan energiovergangen mellom to spinn-tilstander (figur 10) - for et forholdsvis enkelt system, som for eksempel sølvatomet i Stern-Gerlach eksperimentet - bestemmes ut ifra:

$$\Delta E = \left[-g_e \mu_B \left(-\frac{1}{2} \right) B \right] - \left[-g_e \mu_B \frac{1}{2} B \right]$$

$$\Rightarrow h\nu = g_e \mu_B B,$$

gitt at det magnetiske momentet til elektronet er orientert langs det eksterne magnetfeltet (kun én av spinn-komponentene er da relevant), noe som ikke nødvendigvis er tilfellet under en EPR-måling. Denne ligningen antyder at endret spinn-tilstand kan induseres av den korrekte kombinasjonen mellom frekvensen til den innkommende elektromagnetiske strålingen og styrken til det eksterne magnetfeltet. I kontinuerlig-bølge EPR (*continuous wave* EPR; cw-EPR) er det kun magnetfeltet som varieres; strålingen - som for EPR-spektroskopi ligger i området for mikrobølger (10^{10} - 10^{12} Hz) - holdes konstant.

3.2.4 Intrumentelt

Et cw-EPR spektrometer består hovedsaklig av en kraftig magnet - to poler med rom til prøven i mellom, en mikrobølge-kilde, og et deteksjonssystem som detekterer endringer i en direktestrøm induisert av mikrobølgene sendt gjennom prøven [52]. I tillegg til disse tre essensielle bestanddelene har moderne EPR-spektrometere komponenter som sørger for signalforsterking og støyreduksjon, henholdsvis gjennom resonanskamre og fase-sensitive deteksjonssystemer.

For å øke energitettheten til mikrobølgene relativt til prøven, resulterende i et sterkere signal, benyttes en resonator [52, 53]. Resonatoren kan betraktes som et lite kammer, konstruert med dimensjoner som er tilpasset en gitt frekvens - den til mikrobølgene som sendes inn. Siden geometrien til kammeret bestemmer resonansfrekvensen, forandres denne ved tilstedeværelsen av en prøve i kammeret. Deteksjonsstrømmen som produseres av mikrobølgene - reflektert fra kammeret, må derfor justeres i forhold til prøven ved å justere frekvensen til mikrobølgene som sendes inn i kammeret, før det eksterne magnetfeltet varieres og målinger finner sted. En strøm på rundt 200 μA danner ofte grunnlinjen i deteksjonssignalet og er verdien frekvensen justeres i forhold til.

Mikrobølgene sendes inn gjennom en justerbar spalte, reflekteres i den andre enden av kam-

meret, og danner dermed en superposisjon med seg selv - en stasjonær resultantbølge med en amplitude lik den assosierte feltstyrken til den magnetiske komponenten av mikrobølgene. Ved en resonansfrekvens vil amplituden være ved et maksima, noe som korresponderer til høyere energitetthet og dermed høyere effekt (energi per tid). Idet prøven - plassert i midten av kammeret - begynner å absorbere energi grunnet interaksjoner med det eksterne magnetfeltet, vil den stående bølgen avbrytes og den detekterte strømmen - proporsjonal med effekten - avtar (strålingen absorberes).

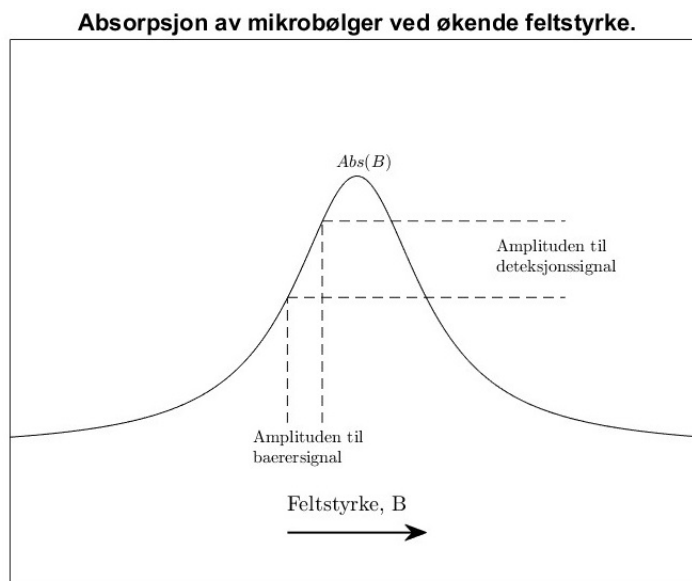
For å øke signal-til-støy forholdet, benyttes en såkalt "fase-sensitiv" deteksjonsmetode, som innebærer modulering av deteksjonssignalet [52, 53]. Feltmodulering benytter et høyfrekvent "bærersignal" som gir et varierende magnetfelt i tillegg til det kraftigere, eksterne feltet mellom de to polene på hver side av prøven. Dette gjør at amplituden til den magnetiske komponenten av mikrobølgene svinger med den kjente frekvensen til bærersignalet; endringer i amplituden til mikrobølgene fanges opp av bærersignalet [52, 53]. En *lock-in* amplifikator kan deretter plukke ut bærersignalet ved hjelp av et referansesignal, ved å utføre en operasjon tilsvarende multiplikasjon av to bølgefunksjoner [52]; produkt-til-sum identitetene (vedlegg 1) viser at en positivt produktfunksjon kun resulterer dersom faktorfunksjonene har lik frekvens; alternativt kan man benytte det faktum at produktet av to bølger med ulik frekvens vil være symmetrisk over den horisontale akse, og dermed ha et integral lik null, mens produktet av to bølger med lik frekvens alltid vil befinne seg på pluss-siden av den horisontale akse, og dermed ha et positivt integral (tilsvarende gjelder også i høyere dimensjoner). Siden moduleringssignalet følger samme vei til detektoren som mikrobølgene, og siden forskjeller i fasene påvirker deteksjonssignalet (derav "fase-sensitiv" deteksjonsmetode), benyttes en "fase-skifter" for optimalt signal [52].

Dersom amplituden til bærersignalet velges tilstrekkelig smal, vil forholdet mellom amplituden til deteksjonssignalet og bærersignalet ($\frac{\text{Amplituden til deteksjonssignal}}{\text{Amplituden til bærersignal}}$) være en god approksimasjon til den førstederiverte av absorpsjonskurven (figur 11):

$$\frac{d}{dB} \text{Abs}(B) \approx \frac{\text{Abs}(B_1 + \Delta B) - \text{Abs}(B)}{\Delta B}$$

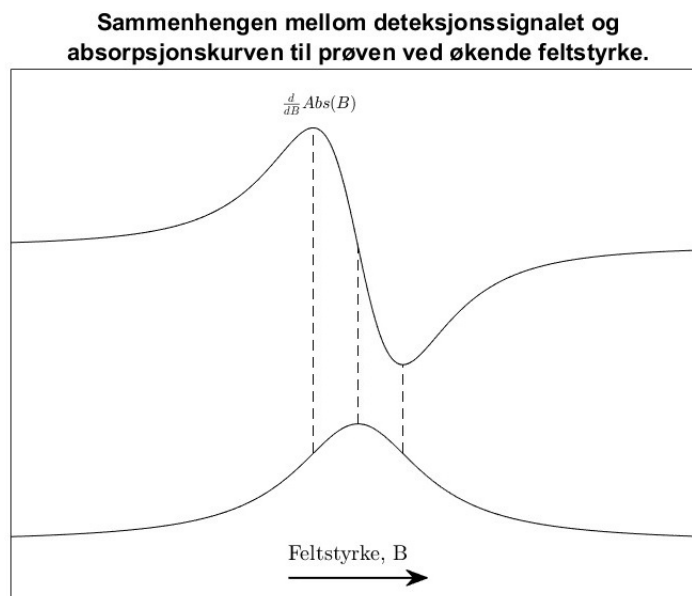
Absorpsjonskurven følger vanligvis en Gaussisk- eller Lorentzisk krue, avhengig av variansen i absorpsjon ved ulike lokasjoner i prøven. Homogene prøver - målt i forhold til sammensetningen av og variasjonen til spinn-systemene - beskrives generelt bedre av Lorentz-fordelingen enn inhomogene

prøver [53].



Figur 11. Amplitudene involvert i feltmodulering kan brukes for å approksimere den førstederiverte av absorpsjonskurven, her vist som en Lorentzisk kurve.

EPR-spektra er altså noe annerledes enn for eksempel NMR-spektra (”nuklær magnetisk resonans”) ved at grafen er å finne på begge sider av grunnlinjen, noe som simpelthen viser til tiltagende/avtagende absorpsjon av mikrobølger fra prøven i et varierende magnetfelt.



Figur 12. Sammenhengen mellom absorpsjonskurven og dens førstederiverte.

3.2.5 Hamilton-Operatoren ”revisited”

Alt som påvirker det magnetiske momentet til et elektron vil påvirke resonansenergien, ΔE , og dermed EPR-spekteret. I tillegg til det eksterne magnetfeltet og den magnetiske komponenten av strålingen, vil andre faktorer - som for eksempel kjernen elektronet er bundet til, nærheten til andre enslige elektroner eller kjernen i ulike ligander (for transisjonsmetaller) - utgjøre en viktig del av det effektive magnetfeltet rundt spinn-systemet.

En (nær) fullstendig spinn Hamilton-operator kan beskrives gjennom seks ulike bidrag [54]: Zeeman-interaksjoner- (1) mellom elektroner og (2) mellom kjerner; (3) hyperfine interaksjoner, inkludert superhyperfine; (4) interaksjoner mellom elektroner, inkludert såkalte (5) *zero-field*-interaksjoner; og (6) kvadrupol-interaksjoner. For paramagnetiske metallkomplekser i redoksensymer, målt i en nedfrost tilstand, vil variasjoner - blant annet som en følge av anisotropi, føre til begrensninger i forhold til oppløsningsevnen og mulighetene for å hente ut bidraget til alle de beskrevne interaksjonene (gitt at de er tilstede).

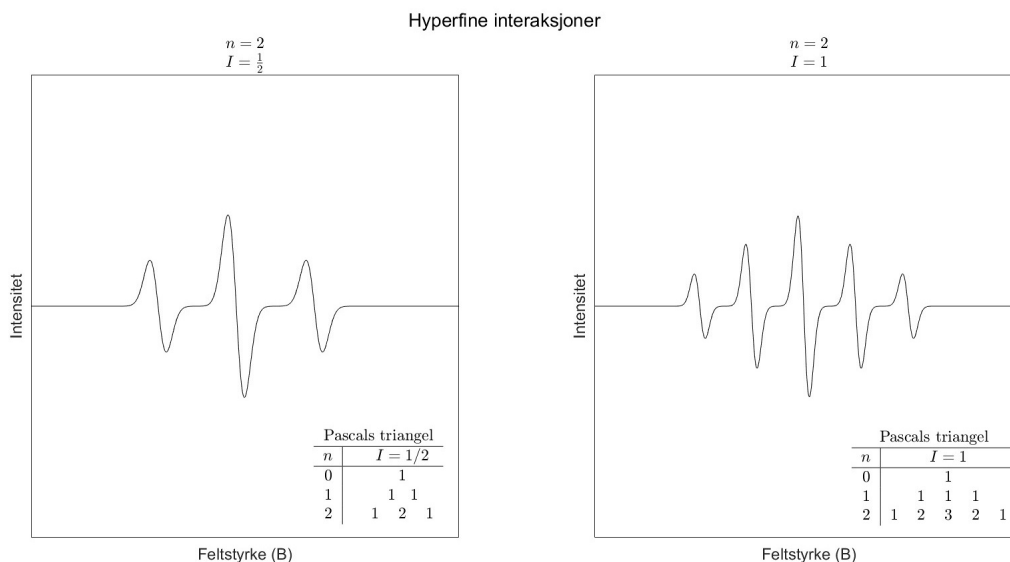
3.2.5.1 Zeeman-interaksjoner

Både kjernen og elektronet har iboende spinn; kjernen krever lavere energier enn elektronet for å gjennomgå en transisjon, men vil - som forklart over for elektronet - påvirkes av det eksterne magnetfeltet. Den nukleære Zeeman-effekten gir opphav til en interaksjonsenergi som er tilnærmet identisk - med hensyn til parametrene som inkluderes - med den for elektroner (ladningen til kjernen er positiv, så fortegnet vil være motsatt). Spinn-kvantetallet kan være forskjellig for ulike isotoper av et gitt element, dette gjelder derfor også g-faktoren.

3.2.5.2 Hyperfine interaksjoner

Ulike kombinasjoner av spinn-tilstander i kjernen og elektronet resulterer i ulike resonansenergier for elektronets spinn-overgang, siden begge altså utgjør magnetiske dipoler og dermed vil kunne påvirke hverandre. Dette fører til en oppdeling (splitteeffekt) av spekteret i tilnærmet like kurver ved ulike intervaller av feltstyrken, med ulik intensitet. Siden $\uparrow_{elektron}\downarrow_{kjerne}$ tilsvarer $\downarrow_{elektron}\uparrow_{kjerne}$ i energi ($\uparrow\downarrow$ indikerer henholdsvis spinn opp og spinn ned), vil prøven statistisk sett inneholde flere av disse konfigurasjonene enn for eksempel $\uparrow_{elektron}\uparrow_{kjerne}$, og dermed blir den korresponderende absorpsjonen mer intens. I tillegg til dipol-dipol interaksjoner og Fermi-kontakt - som oppstår

i tilfeller der elektronet har en sannsynlighet for å befinne seg i selve kjernen (for eksempel i s-orbitaler), oppstår det relativistiske effekter i form av spinn-orbital interaksjoner (som øker med massen) [53, 55]. Disse tre interaksjonene faller inn under hyperfine interaksjoner, som alle har den samme effekten på spekteret, men i ulik grad. For de sterkeste interaksjonene kan effekten oppsummeres ved ” $2nI+1$ ”-regelen, hvor I viser til kjernespinnet og n til antallet kjerner involvert. Denne regelen gir antallet forventede topper i spekteret, og Pascal’s triangel kan brukes for å finne den forventede intensiteten til hver av dem (intensitetsforholdet blir noe obskurt for mer komplekse spinn-systemer, for eksempel enkelte metallkomplekser). Hyperfine interaksjoner vil ofte manifestere seg som en utvidelse av absorpsjonskurven, noe som ofte skyldes begrensninger i oppløsningsevnen til instrumentet.



Figur 13. Den hyperfine oppsplittingen av et EPR-spekter kan bestemmes ut ifra spinnet til kjernen og Pascals trekant. Forutsetter isotropiske g -verdier.

3.2.5.3 Superhyperfine interaksjoner

For metallioner kan lignende interaksjoner som de hyperfine, finne sted mellom elektronet i sentralatomet og ligandene i et koordinasjonskompleks. Disse vil være av lavere intensitet enn de hyperfine interaksjonene og kalles superhyperfine interaksjoner [55], synlig som en ytterligere oppdeling av EPR-spekteret. Superhyperfine interaksjoner stiller svært høye krav til oppløsning.

3.2.5.4 Interaksjoner mellom elektroner

Identiske partikler i kvantefysikk kan ikke separeres fra hverandre; de kan ikke ”merkes” for så å betraktes hver for seg, uten at oppførselen deres endres. Sannsynligheten for å observere en bestemt tilstand i én av partiklene vil være den samme som å observere den andre partikkelen i den samme tilstanden. Dette beskrives ved hjelp av en utbyttingsoperator, som virker på et flerpartikkel-system ved at hver av partiklene bytter om på verdiene som beskriver dem (spinn og romlige koordinater) [44]. Denne operatoren har to egenverdier, ± 1 ., som betyr at egentilstandene enten er symmetriske eller antisymmetriske [44]. Det generaliserte Pauli-prinsippet postulerer at flerpartikkel-systemer bestående av fermioner (partikler med halvtallsverdier av spinn) alltid danner antisymmetriske bølgefunksjoner. Dette fører til ytterligere degenerte energinivåer, siden flere mulige ulike kombinasjoner av faktorer som spinn og romlige koordinater i flerpartikkelsystemet, kan resultere i en antisymmetrisk tilstand.

En annen interaksjon mellom elektroner kan observeres i tilfeller der elektronene ikke inngår i samme orbital, og kan betraktes som en lang-distanse interaksjon mellom dipoler (analogt med den beskrevet for hyperfine interaksjoner) [55]. Denne kan observeres i fravær av et eksternt magnetfelt og gir det som kalles *zero-field splitting*. *Zero-field splitting* forekommer også grunnet spinn-orbital kobling (interaksjon mellom banespinn og iboende spinn) og er vanlig for overgangsmetaller med $S > \frac{1}{2}$.

3.2.5.5 Kvadrupol-interaksjoner

For kjerner med spinnverdier større enn en halv ($I > \frac{1}{2}$) vil fordelingen av ladninger rundt kjernen ikke være sfærisk fordelt, og vil ikke danne en symmetrisk monopole. Med en asymmetrisk fordeling av ladninger i kjernen, vil interaksjoner mellom det elektriske feltet til kjernen og det fra elektronet/elektronene som omgir kjernen gi opphav til et retningsbestemt moment, kalt et kvadrupol moment, som altså kan påvirke spinnet til elektronene [53].

4 Røntgen-kristallografi

4.1 Krystaller

Krystaller er faste stoffer preget av en høy grad av orden og med en makrostruktur som ofte speiler en mikrostruktur. I motsetning til - for eksempel mineraler (uorganiske, naturlig forekommende krystaller), er krystaller av proteiner (og andre biologiske makromolekyler) ofte av langt lavere tetthet, noe som skyldes det relativt høye innholdet av løsningsmiddel (i hovedsak vann) - i snitt 50% [56]. Løsningsmiddelet, tilstede i hulrom og kanaler i krystaller av makromolekyler, gir færre interaksjoner mellom hovedkomponentene, og dermed flere frihetsgader og mer variasjon mellom de enkelte komponentenes plassering [56]. Dette resulterer i en myk og skjør struktur som medfører en noe begrenset oppløsningsevne for de ulike kristallografiske metodene som brukes for å modellere makromolekylet. Biologiske makromolekyler - som byggestener i krystaller - innehar dessuten langt høyere grad av uorden enn hva de vanlige uorganiske komponentene av mineraler gjør, noe som gjenspeiles i færre symmetrisentre og en ofte enklere oppbygning av krystallene [57].

4.1.1 Krystaller i teorien

Krystaller kan beskrives ved et tredimensjonalt gitter, med noder plassert ved hvert krysningspunkt. Nodene representerer atomer, molekyler (inkludert makromolekyler) eller ioner, og kalles gitterpunkter (*lattice points*). En enhetscelle, eller en asymmetrisk enhet [58], viser til det minste antallet punkter som behøves for å gjenskape gitteret i sin helhet; informasjonen som bygger opp gitteret gjennom en iterativ prosess. En primitiv enhetscelle konstrueres fra tre vektorer, som alle starter og slutter i et gitterpunkt, gjennom seks parametre som beskriver lengden til hver vektor (a , b og c) og vinklene mellom dem (α , β og γ). Spennet til disse tre vektorene - mengden med mulige lineære kombinasjoner mellom dem - utgjør enhetscellen.

Disse seks tallverdiene springer ut av de mulige symmetrioperasjonene til enhetscellene: Operasjoner som virker på cellene, men fører til en tilstand som er identisk med utgangspunktet. For krystaller av proteiner må disse operasjonene være retningsbevarende. Fordi proteiner er homokirale forbindelser (bygget opp av aminosyrer i L-konfigurasjon) vil retningsendrende operasjoner som inversjoner og refleksjoner, være asymmetriske [58]. Symmetrioperasjoner på enhetsceller i proteinkrystaller dreier seg derfor hovedsaklig om rotasjoner og translasjoner, og mengden av

mulige operasjoner for et gitt krystall utgjør det som kalles en romgruppe. Det finnes 65 ulike romgruppe-typer i tre dimensjoner [59] (230 dersom andre symmetrioperasjoner (refleksjoner og inversjoner) inkluderes [58]).

Rotasjonsaksene bestemmes av basisvektorene nevnt ovenfor; vektorer som ofte angir rotasjonsaksler med høy grad av symmetri. Antall mulige rotasjoner rundt disse aksene, som gir tilbake den opprinnelige strukturen (symmetriske operasjoner), definerer en såkalt punktgruppe-type [60]. Det finnes 11 mulige krystallografiske punktgruppe-typer for kirale forbindelser [61] (32 dersom andre symmetrioperasjoner inkluderes [59]). Romgruppe-typene nevnt over, består av alle mulige kombinasjoner av punktgruppe-typer og translasjonsoperasjoner.

Translasjoner kan altså kombineres med rotasjoner resulterende i en vridning av enhetscellen da den flyttes langs krystallstrukturen. Dersom et gitt antall rotasjoner, kombinert med forflytningen, fører til at enhetscellen plasseres direkte over en annen enhetscelle, er operasjonen symmetrisk. Denne typen operasjoner denoteres ofte med et tall som representerer antall mulige symmetriske rotasjoner rundt en gitt akse, kombinert med et annet tall - i senket skrift (*subscript*), som viser til antall lengder (av en gitt enhetscelle) den forflyttes langs samme akse (for eksempel 2_1 for en to-foldig symmetri). Enhetsceller med et motiv (punkt) i hvert hjørne beskriver de fleste tilfellene av proteinkrystaller, men er ikke den eneste muligheten. Disse enhetscellene kalles enkle enhetsceller og denoteres med en P (for "primitiv"). Translasjoner dekker også såkalt sentring, som ved å manipulere basisvektorene til en primitiv enhetscelle kan få frem andre symmetrier i tilfeller hvor den primitive typen ikke er fullstendig dekkende for den gjeldende enhetscellen. For eksempel kan den være *body-centered* - med ett punkt i sentrum av cellen - eller *face-centered* - med punkter i midten av alle flatene som utgjør enhetscellen.

Punktgruppe-typene kan deles inn i syv ulike krystallsystemer, basert på hvilke gittere symmetrioperatorene virker på [60]. Hver av disse systemene rommer et gitt antall punkt- og romgruppe-typer fra de fullstendige mengdene, og er altså høyere opp i hierarkiet av klassifikasjoner (romgruppe-typene defineres innenfor punktgruppe-typene, som videre defineres innenfor de ulike krystallsystemene).

Tabell 2. De syv krystallssystemene som karakteriserer mikro-, og ofte makro-strukturen til syntetisk og naturlig dannede krystaller. Hvert system kommer med restriksjoner på lengdene og vinklene til basisvektorene som spenner ut enhetscellen [61].

Krystallssystemer og deres symmetrier, med tilhørende restriksjoner.			
System	Rotasjonsakser	Lengder	Vinkler
Triklinisk	-	-	-
Monoklinisk	Én to-foldig	-	$\alpha = \gamma = 90^\circ$
Ortorombisk	Tre to-foldige	-	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Trigonal	Én tre-foldig	$a = b$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Tetragonal	Én fire-foldig	$a = b$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Hexagonal	Én seks-foldig	$a = b$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Kubisk	Fire tre-foldige	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

4.2 Krystalldannelse

Krystaller blir til gjennom en prosess som kan deles inn i tre faser: nukleering, vekst, og opphøring av vekst. Nukleering viser til dannelsen av flere separate kjerner - små aggregater med delvis ordnet struktur (orden over korte distanser) [56] - under metastabile tilstander i en overmettet løsning. Når kjernene blir større, øker stabiliteten, og vekstfasen - som i større grad er preget av orden over lengre distanser [56] - tiltar. Vekst skjer i suksessive lag, hvor initieringen av nye lag er det begrensende steget [56]. Tilgjengelige overflater og transport av protein til overflatene, for eksempel gjennom diffusjon eller strømminger i løsningen, er avgjørende for veksten [62]. Opphøringen av vekstfasen er ofte størrelsesbetinget for et gitt protein; mengden tilgjengelig protein i løsningen er ikke nødvendigvis en avgjørende årsak.

Det mest ugunstige, energetiske steget i dannelsen av krystaller er nukleeringen. Dette steget krever etablering av en overmettet løsning. Flere teknikker er utviklet for å oppnå dette, én av dem er såkalt "dampdiffusjon" (*vapor diffusion*).

4.2.1 Kjernedannelse (nukleering) ved dampdiffusjon

Faseoverganger drives av entropiendringer. Dersom entropien øker tilstrekkelig mellom to tilstander vil overgangen skje spontant. I en enkel blanding hvor proteinet er løst i vann, vil entropiendringen

i hver av komponentene avgjøre hvilke tilstander som kan observeres. Siden overgangen til en fast fase medfører en negativ entropiendring i proteinene, forutsettes det en høy positiv entropiendring i vannmolekylene for at tilstandsendringen skal finne sted [63]. Entropien til proteinene i løsningen vil alltid være ved sitt høyeste når de er diffundert i løsningen. For vannmolekylene derimot, vil det komme til et punkt - under voksende proteinkonsentrasjon - hvor entropien er høyere dersom nye interaksjoner med proteinene ikke initieres [63]. I første omgang vil dette føre til en såkalt amorf aggregering av proteinene. For krystallisering (igangsatt av nukleering), som medfører en entropiendring langt lavere enn den som gir enkel aggregering, må den korresponderende entropiendringen til vannmolekylene være enda høyere. En overmettet løsning er derfor ikke tilstrekkelig: løsningen må være supermettet. Tilstanden avviker da fra likevekt i den grad at potensialet er tilstrekkelig for nukleering og krystallisering av proteinet.

En metastabil tilstand beskriver en type tilstander med svært lav aktiveringsenergi. En supermettet løsning er en metastabil tilstand, og kan - litt forenklet - anses som en overmettet løsning under betingelser som vanligvis fører til utfelling av løst stoff. Under denne metastabile tilstanden kan nukleering finne sted. Utfordringen er derfor å oppnå- og ivareta den metastabile tilstanden over et tilstrekkelig langt tidsrom.

I praksis finnes det flere ulike tilnærminger for å oppnå supermettede proteinløsninger; fordampning av løsningsmiddelet er én av dem. En annen tilnærming, som kan kombineres med dampdiffusjon, er tilføring av en såkalt ”*antisolvent*” - et stoff som i en blanding med løsningsmiddelet gir dårligere løslighet av proteinet [64]. Dette kan for eksempel være en polymer, som grunnet sin relativt store hydrodynamiske radius bidrar til å dehydrere og tvinge frem interaksjoner mellom proteinene gjennom volumeksklusjon [57].

Dampdiffusjon kan forklares ved Raoult’s lov for ideelle blandinger, som sier at totaltrykket til en blanding er lik produktet av molfraksjonene til hver av komponentene, med deres respektive partielltrykk. Oppsettet er som følger: En dråpe er plassert øverst i et forseglet kammer - enten plassert sittende (i en grop) eller hengende (fra et dekkglass) - med en reservoar-løsning i bunnen. Dråpen inneholder protein-løsningen, blandet med reservoar-løsningen (den samme som opptar bunnen av kammeret), i varierende blandingsforhold. Bortsett fra vann er løsningene fattig på flyktige forbindelser, noe som gjør at deres bidrag til totaltrykket er neglisjerbart. Raoult’s lov tar dermed

følgende form:

$$P_{total} = \chi_{H_2O} P_{H_2O},$$

hvor P er trykket og χ_{H_2O} er molfraksjonen til vannet, som er gitt ved:

$$\chi_{H_2O} = \frac{n_{H_2O}}{n_{H_2O} + n_{annet}}, \quad n : \text{antall mol.}$$

Damptrykket til de to løsningene i kammeret er altså avhengig av molfraksjonen til vannet i hver av dem, og blir dermed mindre med økt stoffmengde av andre løste stoffer i blandingene. Reservoarløsningen, tilsatt salter og andre ikke-flyktige komponenter som bidrar til å initiere interaksjoner mellom proteinene, vil - grunnet størrelsen relativt til proteinene i dråpen, romme flere komponenter enn dråpen (høyere stoffmengde) [65]. Vannet i dråpen vil derfor diffundere til reservoarløsningen, og proteinet vil svært gradvis oppkonsentreres til en supermettet løsning.

4.3 Diffraksjon, spredning og interferens

Superposisjonen av flere elektromagnetiske bølger som møter hverandre i rommet gir opphav til et intensitetsmønster - resultantbølger med varierende amplitude (intensitet er proporsjonal med amplitude). Dette kalles interferens. Dersom amplituden og frekvensen til to møtende bølger - begge er like hverandre, vil resultantbølgen ha en konstant amplitude som er to ganger den opprinnelige, gitt at de er i fase. Dette kalles konstruktiv interferens. Det motsatte tilfellet, kalt destruktiv interferens, oppstår dersom de to bølgene er 180° ut av fase. Da vil amplituden være lik null.

I likhet med interferens er diffraksjon en egenskap som først og fremst observeres i ulike former for bølger. Når en bølge treffer et objekt eller - ofte brukt for å illustrere fenomenet - en spalteåpning, vil den avbøyes i forhold til disse; rundt objektet eller ut mot sidene etter spalteåpningen. En alternativ formulering av diffraksjon er: Retningsendringen til en bølge som møter en hindring i form av en skarp vinkelendring (en kant) (Heuygens' prinsipp, eller Huygens-Fresnel prinsippet gir en kvalitativ forklaring på dette fenomenet).

Diffraksjon kan også anses som et spesielt tilfelle av spredning (diffraksjon og spredning er to termer som ofte brukes om hverandre i litteraturen). I kontrast til de induerte energiovergangene som medfører absorpsjon - som er det vanlige i spektroskopi - står de elastiske spredningseffektene. Energien til den innkommende strålingen i disse tilfellene korresponderer med den til elektrone i

sine stasjonære tilstander, resulterende i emittert lys av samme bølgelengde som det innkommende, men - i de fleste tilfeller - med en endret retning. Energien til innkommende stråling må da tilnærme den til et fritt elektron, en egenskap som dekkes av elektromagnetisk stråling i røntgen-området av spekteret. Røntgen-stråling av høy intensitet, for eksempel fra akselererende elektroner i moderne synkrotron-fasiliteter, gir opphav til flere typer spredningseffekter, hvorav elastisk spredning utgjør rundt 10% [67]. En annen type spredningseffekt er Compton-spredning, etter Arthur H. Compton, som eksperimenterte med røntgenstråling på graffit - ikke overbevist om den fotoelektriske effekten predikert av Albert Einstein [44]. Compton-spredning har det til felles med den fotoelektriske effekten at fotoner slår løs elektroner, men i tillegg vil lys med en endret bølgelengde emitteres fra atomene. Begge kan forekomme under røntgen-krystallografi, og begge kan ha uheldige virkninger på krystallet og proteinene det er sammensatt av.

I 1912 viste Max von Laue et al. hvordan en røntgenstråle rettet mot et krystall kan gi opphav til regelmessige mønstre - interferensmønstre - på en fotografisk plate, og underbygget med det ideen om at røntgenstråler er bølger og ikke partikler. William Henry Bragg og William Lawrence Bragg, far og sønn, fulgte kort tid etter med en alternativ metode som både underbygget funnet til Laue og umiddelbart ble anvendt for å analyse enkle krystallstrukturer [66]. Ideen gikk ut på at lys reflekteres av parallelle, svært jevne overflater i krystallet (kalt *Bragg planes*), altså at tynne lag av ordnede atomer kan representeres som reflekterende plan. Lysmaksima vil kun oppstå i tilfeller hvor lys fra to ulike plan i krystallet er i tilnærmet lik fase, men lys fra to ulike plan har ulik veilengde. Lik fase mellom de to lysstrålene impliserer derfor en veilengdeforskjell lik en multiplum av bølgelengden. Forskjellen i veilengde mellom to parallelle stråler som reflekteres av to ulike plan, er gitt ved kateten som viser seg dersom en linje konstrueres, ortogonal på den nedre lysstrålen, som møter refleksjonspunktet til den øvre lysstrålen (sett i to dimensjoner). Dette førte til det som senere ble kjent som Bragg's lov:

$$n\lambda = 2d\sin\theta, \quad (\text{Bragg's lov})$$

hvor d gir avstanden mellom de to planene (den ene kateten i den konstruerte trekanten), λ er bølgelengden til det monokromatiske lyset, n er et positivt heltall, θ er vinkelen mellom det innkommende lyset og refleksjonsplanet, og tallet 2 inkluderes fordi veilengden $\sin\theta$ legges til før og etter refleksjonen. Lysmaksima vil kun oppstå ved innfallsvinkler i proporsjonalitet med bølgelengden

til lyset og avstanden mellom lag av atomer; siden bølgelengden er konstant blir oppgaven å finne riktige vinkler i forhold til en gitt laginndeling, og videre å finne alle mulige laginndelinger for et gitt krystall. Bragg's lov ble brukt sammen med den relative intensiteten for vinklene som ga lysmaksima, for å kartlegge enkle krystallstrukturer sammensatt av få grunnstoffer.

4.4 Millerindekser

Ved å igjen betrakte et krystall som et tredimensjonalt gitter, vil enhver mengde med plan, repetert med en konstant avstand, som kan konstrueres på en måte som berører alle gitterpunktene, gi opphav til Millerindeksene - h,k,l . Hver av disse indeksene viser til antallet gjennomskjæringer en bestemt mengde plan gjør på hver av de tre aksene som definerer en enhetscelle.

Dersom nodene i det tredimensjonale gitteret representerer et protein, vil hvert atom i dette proteinet - rettere sagt hver elektronsky - gi opphav til en mengde plan og tilhørende Millerindekser. Millerindeksene behandles som kontinuerlige variabler under databehandling etter diffraksjon fra proteinkrystaller (mer om dette senere).

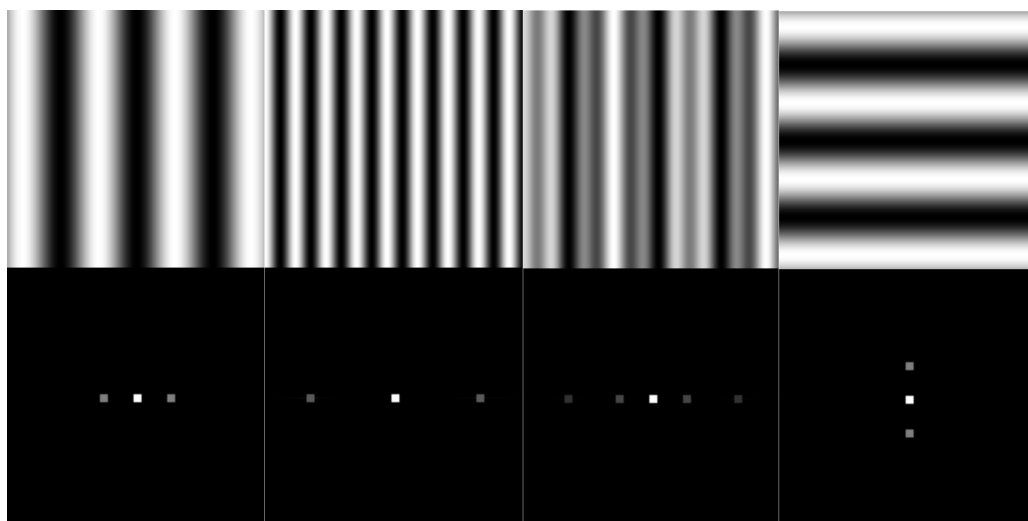
4.5 Strukturfaktorer og Fourier-transformasjonen

Jean-Baptiste Joseph Fourier, matematiker og fysiker (og egyptolog), la tidlig på 1800-tallet fram ideen om at kompliserte, uregelmessige funksjoner, kan uttrykkes gjennom en sum av enkle trigonometriske funksjoner, i det som er blitt kjent som Fourier-rekker [68]. I 1915 foreslo W.H. Bragg at man kunne benytte den periodiske tetthetsvariasjonen (periodisiteten er her essensiell) i en krystallstruktur - dersom denne var kjent - for å analysere diffraksjonsmønstre fra samme krystall via Fourier's metoder; at koeffisientene til de trigonometriske funksjonene i denne Fourier-rekken - som uttrykker tetthetsvariasjonen i krystallet, ville være proporsjonale med intensiteten av deres respektive utslag i diffraksjonsmønsteret (gitt for en mengde Millerindekser) [69]. Dette var mulig ettersom amplituden (til funksjonene i Fourier-rekken) vokste proporsjonalt med antallet enheter som sprer lys, nærmere sagt den totale massen til partiklene som ligger bak samlingen av refleksjonsplan underliggende en intensitetstopp i et diffraksjonsmønster.

Fourier-transformasjonen er en matematisk metode som gjør det mulig å uttrykke en mengde informasjon på to ulike måter, og har - i røntgen-krystallografi - (nesten) den samme funksjonen som en linse har i kontekst av mikroskopering. Det diffrakterte lyset treffer linsen og diffrakteres

igjen, men på en måte som sender alle lysstrålene i den samme retningen - mot observatøren. I motsetning til Fourier-transformasjonen brukt i røntgen-kryсталlografi vil de ulike fasene ordnes i forhold til hverandre grunnet konstruksjonen av linsen (ulik tykkelse).

Fenomenet som undersøkes - det være seg fargene i et fotografi, tonene i et sammensatt lyd-bilde, eller elektronene i et proteinkrystall - kan gis som en funksjon av én eller flere variabler (for eksempel tid eller et n-dimensjonalt rom). Funksjonen kan deretter uttrykkes som en sum av enkle trigonometriske funksjoner (en Fourier-rekke), og verdiene i den opprinnelige funksjonen kan sorteres ut ifra hvor ofte den gjentas for en bestemt- variabel eller kombinasjon av variabler.



Figur 14. De øverste bildene viser planbølger i fugleperspektiv, mens bildene plassert direkte under viser de kvadrerte amplitudene fra den korresponderende Fourier-transformasjonen (med reversert plassering i forhold til avstanden fra sentrum). Fra venstre til høyre: $\cos(x)$, $\cos(\frac{5}{2}x)$, $\cos(x) + \cos(\frac{5}{2}x)$, og transposert $\cos(x)$. En logaritmisk transformasjon av de Fourier-transformerte bildene vil inneholde flere av de opprinnelige - mindre intense - gråtonene.

For et todimensjonalt bilde vil alle de opprinnelige tonene være tilstede i det transformerte bildet, men de vil være sortert i forhold til hyppighet; de minst gjentakende tonene befinner seg i periferien, mens frekvensene som dominerer bildet vil befinne seg i nærheten av origo (dette reverseres ofte under databehandling) (figur 14). Intensiteten av hvert punkt er proporsjonal med antallet piksler som inneholder den bestemte verdien.

Et diffraksjonsmønster er et slikt transformert bilde, hentet fra ulike innfallsvinkler av røntgenstråling mot et krystall, resulterende i detekterte fotoner innenfor et sirkelområde på detektorplaten (i moderne instrumenter). Intensiteten til hvert distinkte område i diffraksjonsmønsteret, er

proporsjonal med antallet diffrakterende elektroner (elektrontettheten), mens posisjonene viser til den romlige frekvensen (avstanden mellom reflekterende plan) fra et sett med Millerindekser; korte avstander (som for eksempel mellom to karbonatomer) dukker opp i periferien av diffraksjonsmønsteret. Fra Bragg's lov: d (avstanden mellom to Braggplan) er omvendt proporsjonal med $\sin\theta$; d avtar med økende refleksjonsvinkler (mellom 0° og 90°).

Et sett med Millerindekser kommer altså med en målt intensitet et sted på diffraksjonsmønsteret, som omgjøres til en strukturfaktor. Strukturfaktorer (ofte denotert som $F_{h,k,l}$) er komplekse tall bygget opp fra amplitudene til de trigonometriske funksjonene i Fourier-rekken, uttrykt i kompleks eksponensialform. De er dimensjonsløse og avhenger kun av krystallstrukturen [70]. Miller indekserne, i teorien behandlet som kontinuerlige variabler (h_k, k_k, l_k) , gir elektrontettheten (ofte denotert som ρ) ved å invertere Fourier-transformasjonen:

$$F(h_k, k_k, l_k) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \rho(x, y, z) e^{-2\pi i(h_k x + k_k y + l_k z)} dx dy dz$$

$$\downarrow$$

$$\rho(x, y, z) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(h_k, k_k, l_k) e^{-2\pi i(h_k x + k_k y + l_k z)} dh_k dk_k dl_k.$$

4.6 Faseproblemet - og løsningen

Mengden med bølger som integreres over i Fourier-transformasjonen krever at riktig fase er knyttet opp til hver frekvens for å kunne gi en korrekt elektrontetthet, noe ligningene - som uttrykt over, ikke tar hensyn til. Intensiteten som observeres beskrives gjennom komplekskvadratet (den kvadrerte modulusen) til strukturfaktoren. Den fullstendige informasjonen om den reelle og imaginære delen av dette tallet, og dermed fasefaktoren ($e^{i\alpha_{h,k,l}}$) som må inkorporeres i Fourier-transformasjonen for korrekt elektrontetthet, kan ikke hentes ut i fra komplekskvadratet. Litt forenklet gir diffraksjonsmønsteret informasjon om de ulike planene som reflekterer strålingen, og konsentrasjonen av spredningsenheter (elektroner) som opptar hver av planene. Hvordan de ulike planene er orientert i forhold til hverandre i den fullstendige strukturen avgjøres av fasene. Elektrontettheten kan altså ikke gi seg til kjenne uten kunnskap om fasene, som videre ikke kan leses ut i fra observasjonene alene. Dette er kjent som faseproblemet i røntgen-krystallografi.

For å løse dette problemet er nøkkelen å observere lokale ulikheter i strukturfaktorene hentet

fra tilnærmet like molekyler (for eksempel proteiner). Dette kan gjøres ved metoder som: *molecular isomorphous replacement* (MIR), *anomalous scattering*, eller *Molecular replacement* (MR). I tillegg finnes det direkte metoder for mindre molekyler og i tilfeller med svært god oppløsning.

MIR krever derivater av målproteinet, hvor tyngre grunnstoffer interagerer med proteinet og endrer strukturfaktorene ved enkelte lokasjoner. Deretter kan Patterson-funksjonen [71] eller andre direkte metoder brukes for å finne fasene og posisjonene til det inkorporerte grunnstoffet. Patterson-funksjonen benytter seg av Fourier-transformasjonen, men med de kvadrerte strukturfaktorene (altså antas fasene å være lik null), for å finne vektorer mellom atomene; en topp indikerer to atomer som er separert fra hverandre med en avstand lik den kvadrerte magnituden til vektoren [71]. MIR fikk sitt gjennombrudd på 1950-tallet, først av Perutz *et al.* for oppklaringen av tertiærstrukturen til hemoglobin fra hest [72], deretter fulgte blant annet oppklaringen av vitamin B_{12} [73] og senere Myoglobin [74]. Anomal spredning virker i prinsippet på samme måte som MIR; derivater med fremmede grunnstoffer er stort sett nødvendig, men et bredere spekter som også inkluderer lettere grunnstoffer kan brukes. Ved å justere bølgelengden til den innkommende strålingen (noe som kan gjøres med høy presisjon i moderne synkrotron-fasiliteter) kan man finne absorpsjonsgrensen til enkelte atomer - altså den frekvensen som resonerer og gir absorpsjon av strålingen. I nærheten av en "absorpsjonskant" vil spredningseffektene forandre seg; koherent spredning vil avta og fasene vil endre seg. De resulterende endringen av strukturfaktorer kan utnyttes for å finne posisjonen til den anomale sprederen.

I 1960-årene dukket det opp en annen metode, som med utviklingen av datamaskiner og stadig voksende databaser endte opp som den dominerende. Som navnet antyder innebærer *Molecular replacement* anvendelsen av et referansemolekyl med strukturelt like trekk for å finne fasene i målmolekylet. På bakgrunn av blant annet sekvensidentitet og strukturellighet [75] dannes et utvalg av kandidater, som deretter gjennomgår to steg for å ytterligere redusere antallet: rotasjoner for å finne den relative orienteringen i forhold til målproteinet, og translasjon for å finne plasseringen i enhetscellen. Totalt seks parametre må altså estimeres for hver kandidat (som tidligere forklart i seksjon 4.1.1); tre vinkler og tre posisjonskoordinater [76]. Flere algoritmer er utviklet til dette formålet, som ofte først selekterer ut kandidater basert på rotasjonsestimater for å med det redusere det nødvendige antallet utregninger [76]. Mange er basert på *maximum likelihood* estimerer (MLE), som estimerer sannsynligheten for de observerte strukturfaktorene ut ifra en fordelings-

funksjon bygget på strukturfaktorene til referansen (transformert fra å inneholde faser til å ikke inneholde faser (sammenligningsgrunnlaget er bygget på diffraksjonsmønstrene, hvor fasene ikke er kjent)) [76]. Til slutt benyttes ulike statistiske metoder for å raffinere modellen ved blant annet å minimere differanser mellom strukturfaktorene til modellen og målproteinet (mer om dette senere).

4.7 Strålingskilder og detektorer

Røntgenstråling er høyenergisk elektromagnetisk stråling. Pionerene innen røntgen-kryсталlografi benyttet røntgen-rør - glassrør med en katode i den ene enden og en anode i den andre - med en elektronstrøm sterk nok til å eksitere kjerneelektronene (elektronene nærmest kjernen) i ulike metaller ved anoden [72]. Disse høyenergiske energiovergangene fører til emisjon av høyfrekvente fotoner i området av det elektromagnetiske spekteret kjent som røntgen-stråling. En fotografisk plate eller et ioniseringskammer ble brukt for å detektere intensiteten ved ulike diffraksjonsvinkler [72].

Fra 1960-årene ble en annen kilde til røntgenstråling tatt i bruk: partikkelakseleratorer. Synkrotronstråling oppstår fra elektroner (eller nøytroner) i det de akselererer rundt i en sirkulær bane, styrt av magneter. Den høye intensiteten til synkrotronstrålingen i moderne fasiliteter muliggjør svært hurtig datainnsamling - en fordel dersom krystallene er små og skjøre (høyere intensitet vil desverre også medføre raskere degradering av krystallene). I tillegg muliggjør det kontinuerlig spekteret fra disse anleggene metoder for innhenting av fasene ved bruk av *anomalous scattering*, såkalt *multiple-wavelength anomalous dispersion* (MAD) metoder [58]. Moderne detektorer måler antallet fotoner direkte ved hjelp av halvleder-teknologi (fastfase sensorer).

4.8 Evaluering av data

En rekke ulike parametre brukes for å bedømme datakvaliteten, både i forhold til rådata og modellene, alle med sine styrker og svakheter. Noen relevante parametre for å evaluere kvaliteten av rådata er: oppløsning ($\frac{1}{d}$), R_{merge} og R_{meas} , kompletthet, signalstyrke, og Wilson B-faktorer. For modellevaluering blir følgende parametre ofte tatt i bruk: R_{work} , R_{free} , *Root mean square deviation* (RMSD) for bindinger og vinkler, Ramachandran-plott, og - også her - B-faktorer.

4.8.1 Rådata

Refleksjoner som dukker opp flere ganger i målingene bringes videre i den første databehandlingen. Antall unike refleksjoner utgjør de unike Millerindeksene, og inngår sammen med antallet uavhengige observasjoner fra hver av de individuelle refleksjonene - i R_{merge} [77]:

$$R_{merge} = \frac{\sum_i \sum_j |I_{i,j} - \langle I_i \rangle|}{\sum_i \sum_j I_{ik}},$$

i : unike observasjoner;

j : uavhengige observasjoner av hver unike observasjon.

R_{merge} er et mål for spredningen av de individuelle observasjonene innen én unik refleksjon. Forholdet mellom det totale antallet refleksjoner (intensitetsmålinger) og antallet unike observasjoner kalles redudans [61]. Redudansen vil blant annet variere med antallet monomerer i proteinet og symmetrirelaterte refleksjoner, og vil påvirke R_{merge} (høy redudans gir høyere R_{merge}). R_{meas} inneholder derfor en korrigerende faktor:

$$\sum_i \left(\frac{r}{r-1} \right)^{1/2} R_{merge}, \quad r : \text{redudans.}$$

Forholdet mellom antallet målinger utført på de unike refleksjonene og det totale antallet unike refleksjoner kalles ”kompletthet” [61]. Dersom mange av målingene ekskluderes fra det endelige datasettet vil denne verdien være lav, noe som tyder på problemer under datainnsamlingen.

Signal-til-støy forholdet - signalstyrken - er gitt ved den gjennomsnittlige intensiteten dividert på standardavviket [77]:

$$\frac{I}{\sigma(I)}.$$

Wilson B-faktoren, også kalt temperaturfaktoren, er et mål på variasjonen av signalstyrken som en følge av temperatureffekter [61]. Termiske vibrasjoner vil øke volumet som hvert atom opptar; med unntak av data som innehar svært høy oppløsning, behandles dette volumet som en kule (B-faktoren er isotropisk). Siden B-faktoren også inneholder variasjoner knyttet til uorden i krystallet, vil den endres etterhvert som modellen blir til.

4.8.2 Modelldata

R-verdien (eller R_{work}) er knyttet til residualene fra tilpassing av strukturfaktorer ved bruk av minste kvadraters metode, og er i sin enkleste for gitt ved:

$$\frac{\sum_i |F_{obs.,i} - F_{kalk.,i}|}{\sum_i F_{kalk.,i}}.$$

Siden R_{work} kan reduseres ved å øke antallet parametre i modellen (såkalt overtilpasning) og/eller redusere observerte verdier, regnes den som mangelfull i enkelte tilfeller [77]. R_{free} brukes for kryssvalidering ved at den kalkuleres ut ifra en delmengde av refleksjoner som ikke er inkludert i modellen [77].

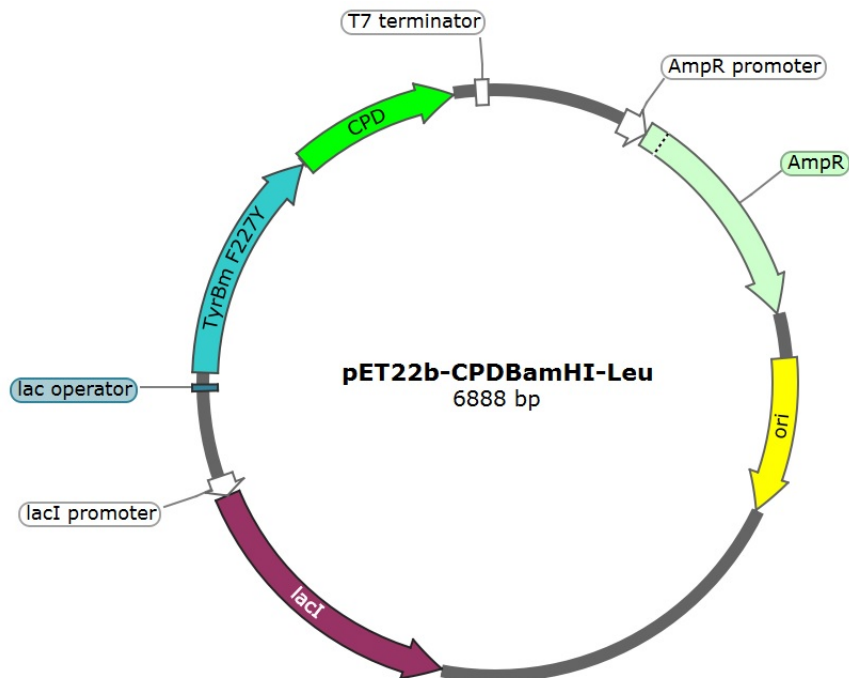
Geometrien til modellen kan bedømmes ved å betrakte RMSD for vinkler og bindinger, og/eller et Ramachandran-plott. Førstnevnte måler modelldata opp imot kjente referanseverdier, mens Ramachandran-plottet sammenligner vinklene de ulike aminosyrene har i forhold til hverandre (hovedsaklig ψ - og ϕ -vinklene).

5 Metoder

5.1 Tillaging av protein

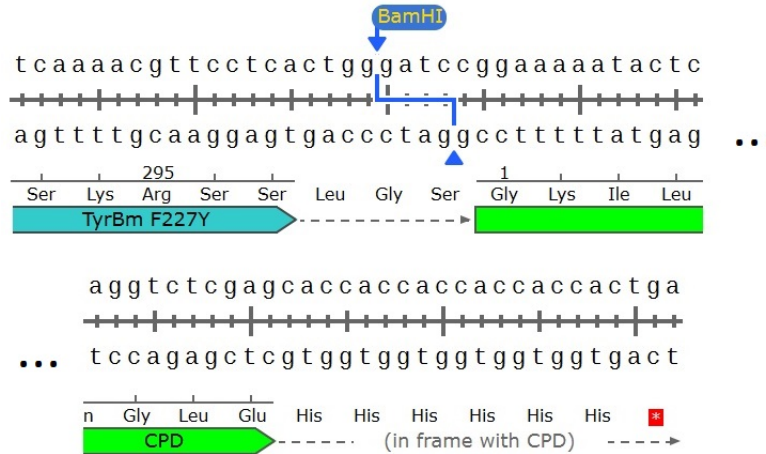
5.1.1 Kultivering av BL21(DE3)-transformanter

Nedfryste beholdninger av ekspresjonsverten *E. coli* BL21(DE3), ble tint og overført til autoklaverte Erlenmeyerkolber med 50 mL *lysogeny broth* (LB-medium) (vedlegg 9.2) tilført 50 μ L, 100 $\frac{mg}{mL}$ ampicillin, ved hjelp av innokulerte tannpirkere i et sterilt avtrekksskap (med laminære luftstrømninger). Ekspresjonsverten var tidligere blitt transformert med kloningsvektoren pET22B-CPD_{BamHI(Leu)} - én klonet med genet som koder for villtypen av TyrBm, og én med genet som koder for mutanten F227Y (figur15).



Figur 15. Vektoren med det muterte genet til TyrBm 3NM8 og CPD-proteinet brukt for effektiv proteinrensing. Seleksjonsmarkøren - ampicillin - ligger nedstrøms for en separat promotor.

Plasmidvektoren pET22B-CPD_{BamHI(Leu)} reguleres gjennom lac-operonet, som også er tilstede på kromosomet til BL21(DE3), for å regulere uttrykk av T7-RNA polymerase - nødvendig for transkripsjon av de fleste genene i plasmidet. LacI-repressoren uttrykkes både fra vertskromosomet og fra plasmidet, og binder til lac-operatoren i begge. Videre inneholder pET22B-CPD_{BamHI(Leu)} en His₆-CPD tag med et BamHI-restriksjonsområde for innsetting av en bestemt sekvens - i dette tilfellet genet som koder for villtypen og mutanten av TyrBm, med et ekstra leucin-kodon oppstrøms for CPD-sekvensen (figur 16), som markerer kløyvingsområdet til CPD og forblir værende i C-terminal ende av uttrykt- og ferdig renset protein.



Figur 16. Genet som koder for CPD-proteinet med histidinmerket var satt inn ved et BamHI restriksjonsområde, noe som innebar at CPD-merket kun etterlot seg én enkelt aminosyre på det ferdig rensede proteinet.

I tillegg er plasmidet utstyrt med et gen som koder for AmpR - en β -laktamase som gjør bæreren av plasmidet resistent mot seleksjonsmarkøren ampicillin.

Etter inokulering av LB-mediet ble kolbene overført til et varmeskap for inkubering ved 37 °C og 200 rpm over en periode på 18-20 timer.

5.1.2 Proteinuttrykk

De kultiverte transformantene ble overført til et rikere vekstmedium: *terrific broth* (TB) - som med langt høyere konsentrasjoner av gjærekstrakt, i tillegg til å inneholde glyserol (vedlegg 9.2), opprettholder den eksponentielle vekstfasen over lengre tid og dermed tillater høyere tetthet av inokulum. Til 450 mL TB-medium ble det tilført 50 mL fosfatbuffer (vedlegg 9.3), 500 μ L ampicillin (100 $\frac{mg}{mL}$), og 200 μ L skumdempende middel. Etter forvarming av behandlet TB-medium til rundt 30 °C, ble det tilført 25 mL av LB-kultur til hver flaske (to flasker per Erlenmeyerkolbe med LB-kultur). Flaskene ble deretter satt i vannbad på 30 °C og tilført oksygen direkte i mediet.

Måling av optisk tetthet ved 600 nm ble utført regelmessig ved hjelp av en Biochrom Ultraspec 10 celletetthetsmåler, frem til $OD_{600} \approx 0.8$. Deretter ble det tilført 0.5 M isopropyl β -D-1-tiogalaktopyranosid (IPTG) til hver av flaskene, og temperaturen ble hurtig redusert til rundt 20 °C ved tilføring av is og utbytting av det tempererte vannet. IPTG etterligner allolaktose, som binder og frigjør lac-repressoren og induserer transkripsjon av T7-RNA polymerase og genene som koder

for TyrBm nedstrøms for lac-promotoren i plasmid-vektoren. Kulturene ble stående i vannbad ved 20 °C over kvelden/natten (18-20 timer).

5.1.3 Innhøsting av celler med uttrykt protein

1 L sentrifugerør ble fylt fra to-og-to flasker med kultur og balansert med ultrarent vann (Milli-Q). Sentrifugering over 30 minutter ved 4 °C, med en akselerasjon på 5000 g fulgte, før supernatanten forsiktig ble fjernet og pellettene ført over i 50 mL *Falcon*-rør. Cellemassen ble resuspendert til en homogen blanding i 40 mL lysesbuffer (vedlegg 9.3) - for klargjøring til det neste steget - og oppbevart ved -20 °C.

5.2 Proteinrensing

Polyhistidin-halen i C-terminal ende av CPD-proteinet ble utnyttet for rensing av TyrBm gjennom IMAC. Renseprosessen var fullautomatisert gjennom roboten "BigTrap" og tok i overkant av fire timer å fullføre. De ulike bufferløsningene som ble benyttet står beskrevet i vedlegg 9.3. Protokollen står beskrevet nedenfor.

5.2.1 Lysering av celler

Falcon-rørene med suspendert cellemasse i stabiliserende lysesbuffer ble tint og temperert til rundt 4 °C. For å lysere cellene og frigjøre innholdet, uten å tilføre skade på- eller denaturere proteinene, ble rørene værende på is mens sonikeringen pågikk. Cellene ble sonikert i 5 minutter ved 20 kHz, med av/på-intervaller på 10 sekunder (total tid: 10 minutter) og en amplitude på 30 % (av en maksimal amplitude på rundt 120 μm).

Cellelysate ble overført til 50 mL sentrifugerør og balansert med ultrarent vann (Milli-Q); deretter sentrifugert i 40 minutter ved 4 °C og 47850 g. Supernatanten, med TyrBm-proteinet, ble overført til nye 50 mL *Falcon*-rør.

5.2.2 IMAC

En generell beskrivelse av IMAC for proteinrensing involverer fire steg: kondisjonering av kolonner, tilføring av prøve, eluering av prøvematriks og svaktbundede komponenter, og til slutt, eluering av proteiner. Kolonne-kondisjonering innebærer utbytning av lagringsbufferen med mobilfasen, for

dermed å hindre uønskede stoffer i ferdig rensset prøve.

Kolonner av typen Cytiva HiTrapTMHP (5 mL) ble kalibrert med lyseringsbufferen og proteinløsningen ble påført. Lyseringsbufferen ble deretter anvendt for å eluere ut urenheter i løsningen, mens proteinet var bundet til Ni-NTA på kolonnen - gjennom polyhistidin-halen - og fytinsyre ble tilført for å inducere autokløyving av CPD-protein. Deretter ble kolonnen vasket med en høykonsentrert løsning av imidazol (0.4 M), resulterende i redusert affinitet mellom polyhistidin-halen og stasjonærfasen, og eluering av CPD-protein. Totalt fire fraksjoner ble samlet inn: vask, *flow-through*, rensset prøve, og avfall

Samme prosedyre ble deretter gjentatt med eluatet resulterende fra autokløyvingen, for å frigjøre mulig gjenværende CPD-protein fra TyrBm: Kolonnen ble kalibrert med lyseringsbuffer; eluatet med TryBm ble tilført og rensset; og fytinsyre ble tilført på kolonnen.

5.2.3 SDS-PAGE

Elektroforese viser til en rekke separasjonsteknikker som benytter et elektrisk felt for å separere ioner. I tillegg til fortegnet på ladningen vil også størrelsen og utformingen av ionene - faktorer som påvirker mobilitet - være avgjørende i disse teknikkene. Gel-elektroforese kombinerer det elektriske feltet med en molekylær siv (*molecular sieve*) - et porøst materiale med porestørrelser innenfor et bestemt område, som påvirker mobiliteten til ladede forbindelser ytterligere og dermed øker oppløsningsevnen til separasjonen [78]. Porestørrelsene vil variere med antallet kryssbindinger mellom polymerene som utgjør materialet, og er i samme størrelsesorden som molekylene materialet er ment å separere [78].

For å kontrollere effektiviteten-, og delvis (kvalitativt) identifisere produktet av proteinrensingen - utført ved hjelp av IMAC, ble det benyttet gel-elektroforese på de ulike fraksjonene. *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) er en mye brukt metode for kvalitative analyser av proteiner [79]. Navnet hentyder til gelmaterialet - polyakrylamid, og forbindelsen anvendt som buffer - *Sodium dodecyl sulfate*. Dodecylsulfat brukes også i kombinasjon med varme, for å tilføre ladninger til de denaturerte proteinene som skal separeres; DS binder i gjennomsnitt til hver andre aminosyre, noe som gir en direkte proporsjonalitet mellom størrelsen på proteinet og antall ladninger. Ett eppendorfrør for hver av fraksjonene ble tilført 15 μL av fraksjonene fra rensingen; deretter tilført 5 μL *NuPage LDS (lithium dodecyl sulfate) sample buffer (4X)* og plassert

på varmeblokk ved 75 °C og risting i 10 minutter.

Fra hver av eppendorfrørene ble 10 μL overført til en brønn på en ferdigstøpt gel, plassert i 1X SDS-buffer (25 mM trisaminometan, 192 mM glycin, 0.1 % vekt/volum SDS). Til én av brønnene ble det overført 5 μL *Unstained Protein Standard, Broad Range (10-200 kDa)* fra *New England BiolABS inc.*. Deretter ble det påført et potensiale på 200 V i 30-40 minutter, før gelen ble avbildet ved hjelp av et *GelDoc Go* avbildningssystem fra BIO-RAD.

5.2.4 Bufferutbytning og oppkonsentrering

Ultrafiltrering er en teknikk som tar i bruk trykkendringer over semipermeable membraner for å rens løsningsmidler for forbindelser under en gitt grenseverdi. Membranene er konstruert med dimensjonerte porer og for å tolerere et bredt spekter av pH-verdier og temperaturer, i tillegg til å hindre uttørking av retentatet ved å beholde noe av løsningsmiddelet på riktig side av filteret [80]. For å tilføre trykk mot filteret kan det blant annet benyttes sentrifugalkrefter.

Proteinløsningene med villtype og mutant av TyrBm ble overført til hvert sitt Amicon[®] Ultra-15 sentrifugerør, med en avskjæringsverdi på 30 kDa. Diskontinuerlig diafiltrering (bufferutbytting) ble deretter utført for å overføre proteinet til en lagringsbuffer (vedlegg 9.3). Rørene ble balansert med lagringsbufferen og sentrifugert ved 4 °C og 4500 g i 20 minutter, gjentatte ganger (4-8 repetisjoner), med tilføring av ny lagringsbuffer før hver sentrifugering.

Formålet med ultrafiltreringen var todelt, da forsøkene som skulle utføres stilte bestemte krav til konsentrasjonen av proteinet i løsning. For å måle denne underveis ble det anvendt et spektrofotometer og en ekstinksjonskoeffisient, $\epsilon_{280} = 74500$, kalkulert fra informasjon om 3NM8 hentet fra UniProtKB (*accession*: B2ZB02), ved hjelp av ProtParam-verktøyet til ExPasy (utviklet av *Swiss Institute of Bioinformatics*) [81]. Den samme kilden (UniProtKB) ble anvendt for å finne molekylærvekten (uten kofaktorer), 34.41 kDa, av de identiske monomerene til 3NM8. Spektrofotometeret var av typen NanoDrop One.

5.3 Kobbersaturering

Metning med kobber (Cu^{2+}) ble forsøkt ved flere ulike punkter i prosessen: før- og etter rensing, kombinert med tilføring av IPTG under vekst i TB-medium, og etter krystallisering. For de spektroskopiske forsøkene ble alle prøvene tilført kobber etter rensing.

For hvert bindingsområde av toverdig kobber i proteinet ble det tilført 5 ganger Cu^{2+} i form av $CuCl_2$. Siden TyrBm bærer to kobberioner, innebærer det at 10 mol Cu^{2+} ble tilført for hver mol av protein i løsningen. Proteinet løst i lagringsbufferen ble først konsentrert til 1-5 $\frac{mg}{mL}$. Deretter ble den målte konsentrasjonen brukt for å finne det nødvendige volumet av en løsning med 100 mM $CuCl_2$, som korresponderer med regelen nevnt over (10 mol Cu^{2+} for hver mol protein). Dette volumet ble deretter tilført i proteinløsningen, og etter en periode på 5-6 timer (ved 4 °C) ble 100 μL 1 M imidazol tilført for å fjerne overflødige kobberioner ved oppkonsentrering/bufferutbytning.

5.4 EPR spektroskopi

5.4.1 Klargjøring av prøver

Løsninger med TyrBm 3NM8, villtype og mutant, ble overført til en lagringsbuffer, med en endelig konsentrasjon på henholdsvis 35.5 $\frac{mg}{mL}$ og 29.6 $\frac{mg}{mL}$. Sammen med to blindprøver (kun buffer; én for hver av proteinene) ble prøvene klargjort ved å først tilføre kobber tilsvarende 90 % av bindingsområdene for metallkofaktorer i proteinet; det vil si 90 % av det doblede antallet mol av proteinene i løsningen (to bindingsområder per protein). Hensikten med dette var å hindre/begrense EPR-signaler fra andre kobberkomplekser, enn de som oppstår i det aktive setet til proteinene, i prøvene. Deretter ble prøvene, i tillegg til en standard med 1 M perklorisyre og 500 μM kobber(II)klorid, ført over i Wilmad[®] kvarts EPR-rør fra Sigma Aldrich (4 mm ytre diameter, 25 mm lengde) ved hjelp av kapillærrør (etylen tetrafluoroetylen (ETFE)) og sprøyter.

EPR-rørene med rundt 250 μL av prøvene ble fryst ned ved å forsiktig senke rørene ned i en *styrofoam*-beholder med flytende nitrogen, deretter ble de overført til en større beholder for lagring og frakt.

5.4.2 Innsamling av data

Et EleXsys 560 EPR-spektrometer ble tatt i bruk for gjennomføring av målingene. Prøvene i EPR-rørene ble tømt for kondens ved å vende dem om 180°, og ført over i resonanskammeret i en egen beholder (en "kald finger"). Flytende nitrogen sørget for en strøm av kald gass inn i bølgelederen (*waveguide*) og beholderen, for å hindre isdannelse i prøven. Siden resonansfrekvensen i kammeret endres med prøven som opptar det, ble mikrobølgefrequensen først justert for å produsere en stabil strøm på 200 μA ; en grovjustering med standardprøven, etterfulgt av en finjustering - før målinger

fra hver av prøvene ble gjennomført. Moduleringsfrekvensen som ble brukt for å isolere signalet fra kammeret var på 100 kHz.

5.4.3 Simulering og *Least-squares fitting* med EasySpin

EPR-spektra ble simulert og tilpasset de eksperimentelle verdiene ved minste kvadraters metode gjennom programvaren EasySpin i Matlab. Totalt tjuetvåne parametre ble simulert og tilpasset: tre verdier (diagonalene) for hver av tensorene involvert. I tillegg til g-tensoren inkluderte søket også en A-tensor for hver av kjernene involvert i kobberkomplekset - tre nitrogener fra histidinene. Variasjon tilknyttet anisotropi utgjorde ni av parameterne: tre for g-verdiene (*gstrain*), tre for A-verdiene (*Astrain*), og tre for de eventuelle hyperfine interaksjonene som ikke gjøres rede for gjennom A-tensorene (*Hstrain*). Et eksempel på skriptet som ble benyttet er inkludert i vedlegg 9.6

I EasySpin ble funksjonen ”*pepper*” brukt for simulering av eksperimentelle data, en funksjon som implementerer tre ulike metoder: diagonalisering av en $n \times n$ -matrise som representerer spinn Hamilton-operatoren (ulike algoritmer basert på størrelsen og innholdet til/i matrisen); første- og/eller andreordens perturbasjonmetoder; eller, hybride metoder som tar i bruk begge. Førstnevnte metode er den definitivt mest nøyaktige, men krever mye tid å gjennomføre. Perturbasjonsmetoder er mindre nøyaktige, men langt raskere enn førstnevnte, og er derfor best tilpasset større systemer med flere kjerner involvert (for eksempel metallkomplekser), hvor spinn Hamilton-operatoren domineres av kun én av interaksjonene involvert (for eksempel Zeeman-effekten i elektronet til sentralatomet) [82, 83]. Hybride metoder behandler først de sterke interaksjonene ved hjelp av matrise-diagonalisering, deretter de svake interaksjonene ved hjelp av perturbasjonsmetoder; fungerer derfor best i tilfeller hvor styrken til interaksjonene i systemet er todelt [82, 83]. Matrise-diagonalisering og hybride metoder ble tatt i bruk på EPR-spekteret hentet fra standarden med toverdug kobber, mens perturbasjon- og hybride metoder ble tatt i bruk på spektra fra prøvene med protein.

Én global og én lokal søkemethode ble brukt for å finne optimale sammensetninger av parametre: henholdsvis ”Monte Carlo”- og ”Nelder/Mead *downhill simplex*”-metoden.

5.5 UV-vis Spektroskopi

En bølgeskann (*wavescan*) i området 200-900 nm ble gjennomført på de samme prøvene som gjennomgikk EPR-spektroskopi, med en 10 mm kvartskyvette i et IMPLEN *NanoPhotometer*[®] C40 spektrofotometer. Lagringsbufferen ble brukt som blank.

5.6 Røntgen-krystallografi

5.6.1 Krystallisering

Dampdiffusjon gjennom ”hengende-dråpe”-teknikken ble brukt for å krystallisere proteinene. Plater fra *Hampton research*, rundt 18 mm høye og med en brønndiameter rundt 14.4 mm, ble tilført 300 μL reservoarløsning. Fra proteinløsningen ble det deretter påført 1 μL på et silanisert dekkglass; 1 μL fra den tilførte reservoarløsningen ble overført og blandet med den første dråpen (proteinløsningen), og dekkglasset ble forsiktig vendt om og lagt over brønnen - forbehandlet med et forseglende middel. Denne prosedyren ble utført på to-og-to brønner, for å begrense fordampning av reservoarløsningen underveis.

Reservoarløsningen bestod av 15 % polyetylen glykol (PEG), med en gjennomsnittlig molekylærvekt på 3350 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$, og 0.1 M magnesium diformat dihydrat, blandet med ultrarent vann (Milli-Q). Proteinonsentrasjoner i området 15-25 $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ ble forsøkt.

Brettene med de hengende dråpene ble lagret ved rundt 20 °C i lysfattige omgivelser over flere uker.

5.6.2 Nedfrysing av krystaller

For å begrense omfanget av skadene som oppstår i krystallene under bestråling, og for å opprettholde den opprinnelige strukturen lengst mulig, foregår datainnsamlingen under røntgen-krystallografi ved temperaturer under 120 Kelvin [7].

Vann opptar store deler av proteinkrystallene, og siden vann i væskefase har høyere tetthet enn vann i fast fase (is), er det svært lite gunstig for den opprinnelige krystallstrukturen at vannet fryser til is. Dessuten har is et karakteristisk diffraksjonsmønster som fører til økt bakgrunnsstøy og lavere oppløsning i diffraksjonsmønsteret til proteinene [7]. I tillegg til hastigheten på nedkjølingen av proteinkrystallene, for å bringe disse langt under frysepunktet og forbi overgangstemperaturen for dannelsen av vannholdig glass, er komponenter som PEG (med lav molekylærvekt), glukose og

uorganiske salter i løsningsmiddelet, med på å redusere temperaturintervallet som fører til isdannelse, og å øke hastigheten til nedkjølingen [84].

Krystaller ble plukket ved hjelp av *cryp-loops*, plassert på et dekkglass og tilført kryobeskyttende løsning (0.183 mM glukose i reservoarløsning - 33 mg glukose per 75 μ L løsning), før de igjen ble plukket og overført til en ”puck” plassert i en *styrofoam*-beholder med flytende nitrogen for hurtig nedkjøling til glassfase. Deretter ble pucken plassert i en annen beholder med flytende nitrogen, konstruert for lagring og frakt. Utvalgte krystaller ble i tillegg til kryobeskyttende løsninger - også tilført løsninger med reduserende stoffer og/eller nitritt (10 mM), laget under anoksiske betingelser. Vedlegg 9.4 gir en oversikt over det endelige innholdet i lagrings-/frakt-beholderen; hver av de anvendte puckene hadde en kapasitet på seksten krystaller.

5.6.3 Røntgen-diffraksjon og databehandling

Diffraksjon, innhenting- og behandling av data fra proteinkrystallene foregikk ved strålelinje ID30B ved *The European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF). Puckene med krystaller ble plassert i et magasin, og hver av krystallene ble til sin tid automatisk hentet frem og plassert i en strøm av kald nitrogengass mellom detektoren og strålingskilden; tiden krystallene oppholdt seg i fravær av flytende nitrogen eller kald nitrogengass var minimal. En EIGER2 X 9M 450 μ m Si sensor samlet diffrakterte fotoner, og data ble automatisk prosessert på stedet.

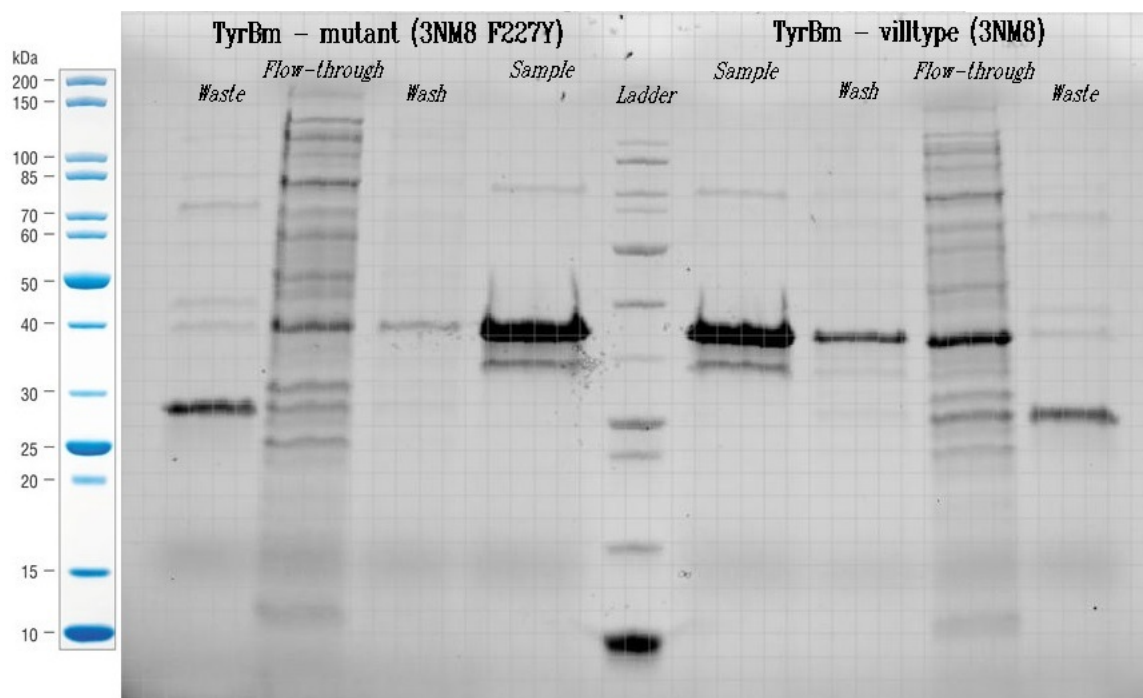
5.6.4 Modellbygging - fasing og raffinering

Programvaren ”PHENIX” og ”Coot” lå til grunne for alle beregningene som ledet opp til de ferdige modellene. Datasettene ble først faset gjennom *molecular replacement* i modulen *phaser* i PHENIX (basert på ”*maximum likelihood*”-estimer). Deretter fulgte gjentatte runder med raffinering, hvor manuell behandling i ”Coot”, inkludert innsetting av ligander og redigering av posisjoner til hver enkelt aminosyre i forhold til ” F_o-F_c ”- og ” $2F_o-F_c$ ”-differanse kart (F_o : observerte F-verdier; F_c : kalkulerede F-verdier), ledsaget den automatiske behandlingen - beregninger av nye F_c -verdier - i modulen *refine* (også i PHENIX).

6 Resultater

6.1 Utrykk-, rensing- og klargjøring av TyrBm-variantene

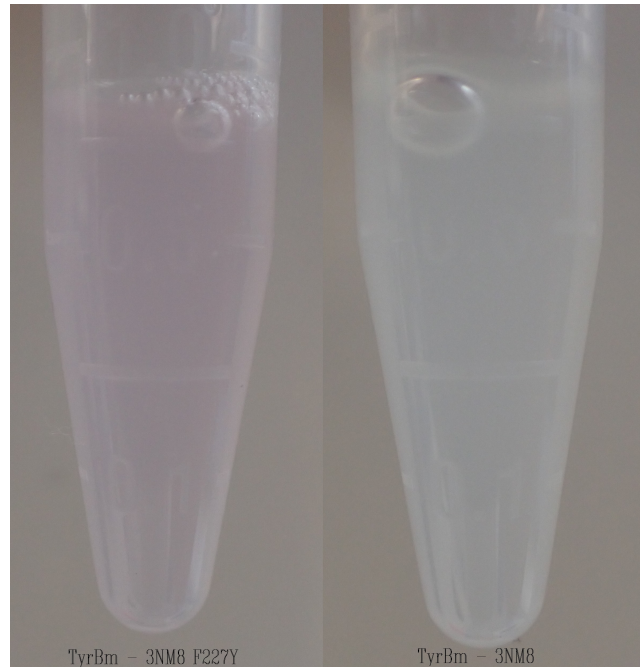
Dyrking av *E. coli*-transformanter, induksjon- og rensing av proteiner, resulterte - i de fleste tilfellene - i *batch*-løsninger med konsentrasjoner et sted mellom 20-40 $\frac{mg}{mL}$. Unntak ble observert i enkelte tilfeller hvor metallioner ble forsøkt tilsatt samtidig med induksjon av proteiner i cellene. SDS-PAGE ble utført - hovedsaklig som en kontroll av de ulike fraksjonene fra renseprosedyren, men også - til dels - som en identifikator av proteinet (for forsøkene som involverte spektroskopi).



Figur 17. Avbildningen fra SDS-PAGE med markerte referanseverdier til venstre. De fire fraksjonene fra rensingen flankerer hver side av referansebåndet i sentrum, med proteinfraksjonene nærmest.

Avbildningen i figur 17 viser de ulike fraksjonene fra rensingen av de to TyrBm-variantene senere målt ved EPR- og UV-vis spektroskopi, og er representativ for alle gjennomføringer av IMAC (med noe ulik intensitet for de ulike båndene). Samtlige brønner viser en tetthet rundt 34 kDa - molekylærvekten til TyrBm 3NM8; noe mer intensitet for brønnene med villtypen enn mutantene. Brønn nr. 4 og 6 (fra venstre; merket "sample") viser et bånd rundt 70 kDa og et noe tydeligere bånd ved 30 kDa - like under båndet antatt å være TyrBm.

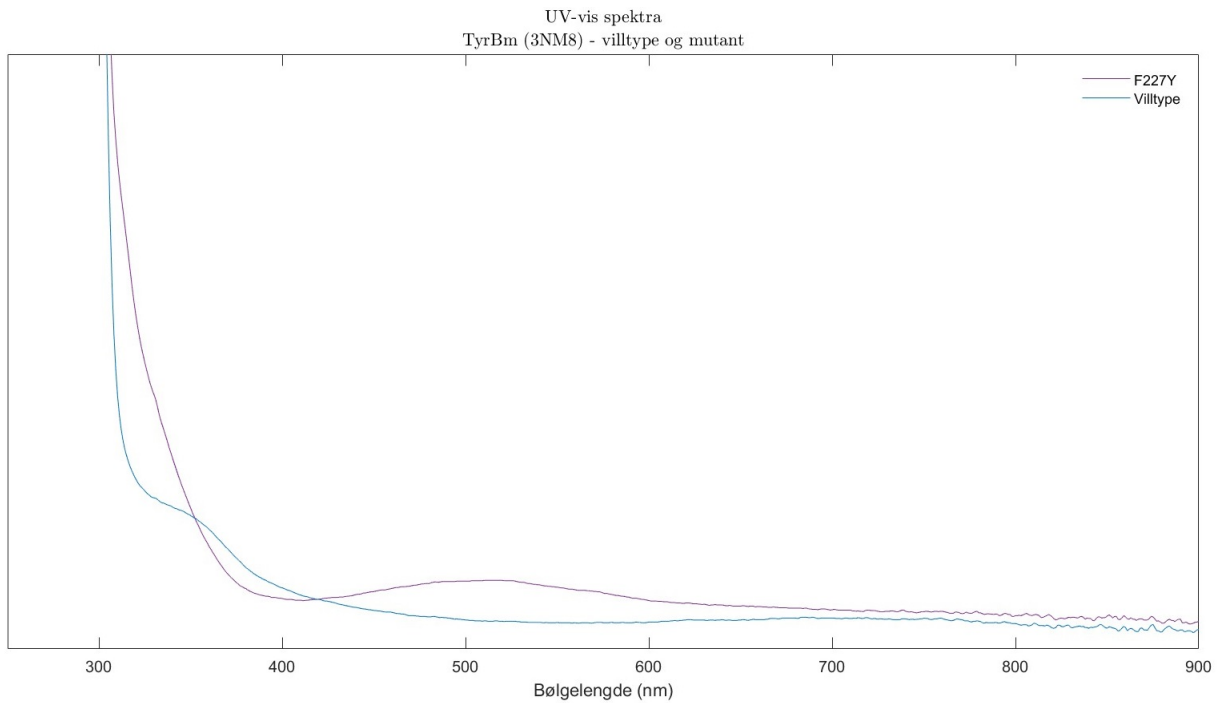
Kun kobber - og ikke nikkel - ble tilsatt i proteinløsningene før krystalliseringen fant sted; kobber og nikkel ble begge tilført i de ferdige krystallene. Figur 18 viser resultatet av kobbersatureringen for de to TyrBm-variantene. Mutanten F227Y ga en karakteristisk lilla farge, mens villtypen fikk en grønn-toning, begge med noe uklarhet grunnet aggregering av proteinet.



Figur 18. Proteinløsningene med henholdsvis mutant og villtype (fra venstre), saturert med kobber. Den matte fargen skyldes trolig aggregering av proteiner, og ble fjernet ved sentrifugering før bruk.

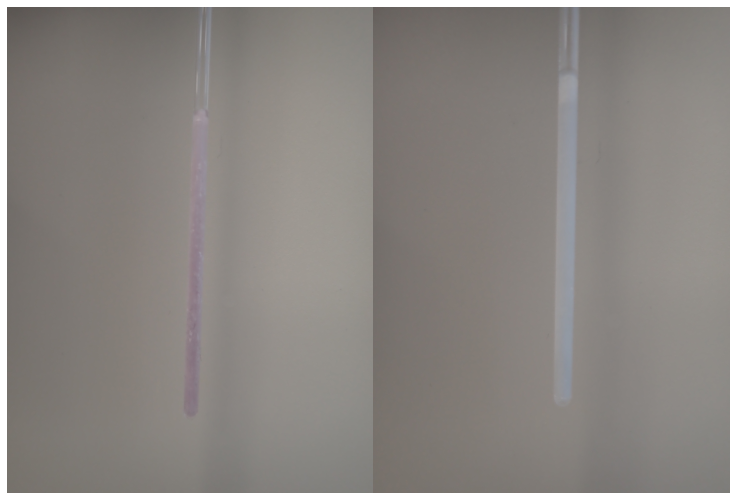
6.2 Spektroskopi

I sammenheng med gjennomføringen av EPR-spektroskopi ble det utført en bølgeskann i området 200-900 nm av prøvene for å korrelere dem med de to protein-variantene.



Figur 19. UV-vis spekter av villtype (i blått) og mutant (i lilla). En skulder er synlig ved rundt 350 nm i spekteret fra villtypen, mens en bred topp indikerer absorpsjonen fra mutanten.

Figur 19 viser spektere av TyrBm 3NM8- villtype i blått og mutant i grønt. Området under 300 nm er forholdsvis likt i begge grafene, mens områdene rundt 350 nm og 500 nm er karakteristisk for henholdsvis villtypen og mutanten.

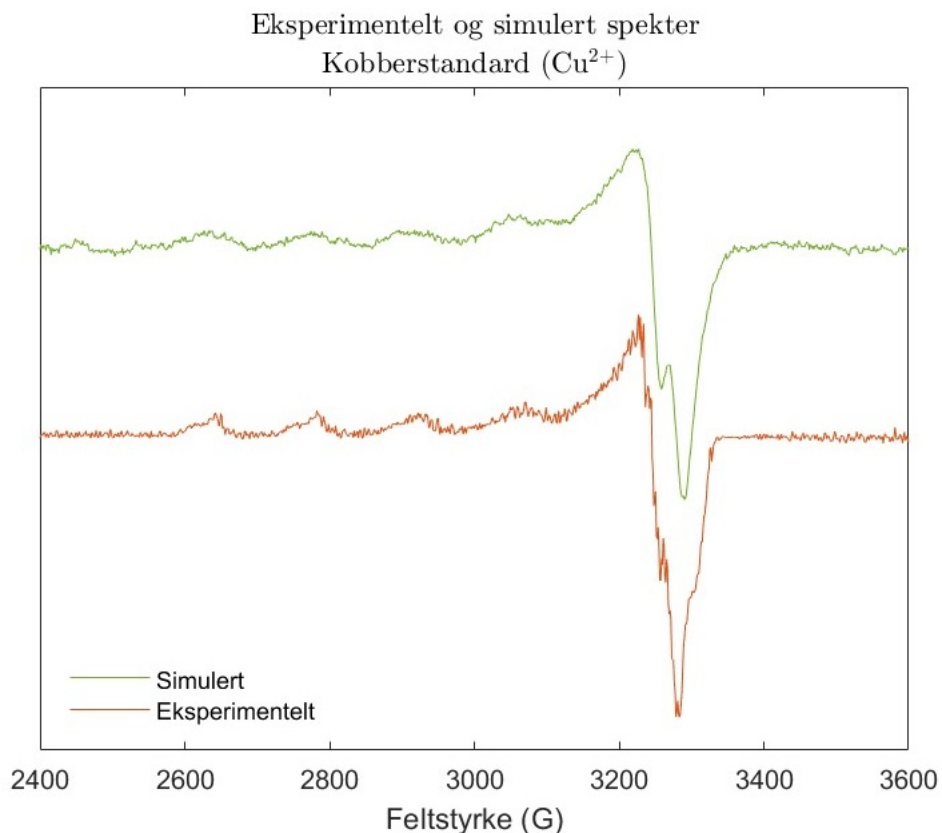


Figur 20. Nedfryste EPR-prøver med mutant (til venstre) og villtype (til høyre) av TyrBm.

Siden EPR-parametrene (hovedsaklig g-verdier og A-verdier) som forventes av kobber-komplekser

er anisotropiske av natur, ble målingene gjennomført på prøver i fast fase - i fryst tilstand. Figur 20 viser prøvene av de to proteinen-variantene, mutanten til venstre (med den karakteristiske lilla fargen) og villtypen til høyre, i EPR-rør etter hurtigavkjøling (*flash-cooling*) i flytende nitrogen. I villtypen kan man se det som trolig er et kondenslag helt øverst (et hvitt lag som utgjør den øverste tiendelen av det fylte røret).

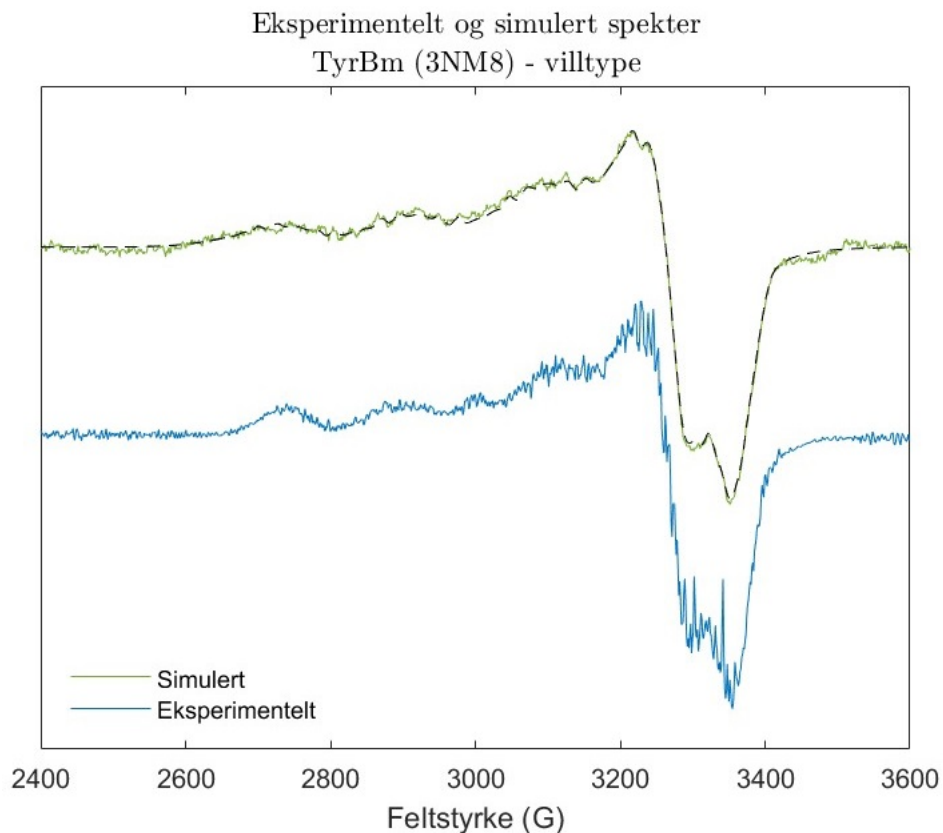
Alle EPR-spektre som fremkommer i dette avsnittet ble innhentet under tilnærmet like eksperimentelle parametre, tilsvarende *X-band*, med en frekvens på rundt 9.42 GHz og en effekt på 0.51 mW (se eksakte verdier i vedlegg 9.5).



Figur 21. Simulert (på toppen) og eksperimentelt spekter hentet fra kobberstandarden.

Standarden med 1 M perklorsyre og 500 μM kobber(II)klorid resulterte i det eksperimentelle og simulerte spekteret vist i figur 21, som inneholder fire tilnærmet like topper med tiltagende og avtagende absorpsjon (en oppdeling; splitting), etterfulgt av et kraftigere signal ved høyere feltstyrke. Det simulerte spekteret, vist i grønt, ble simulert som forklart under metoder (4.3), med integralet av spekteret som mål, og hadde en relativt høy error på 0.6463 (*RMSD*). Det

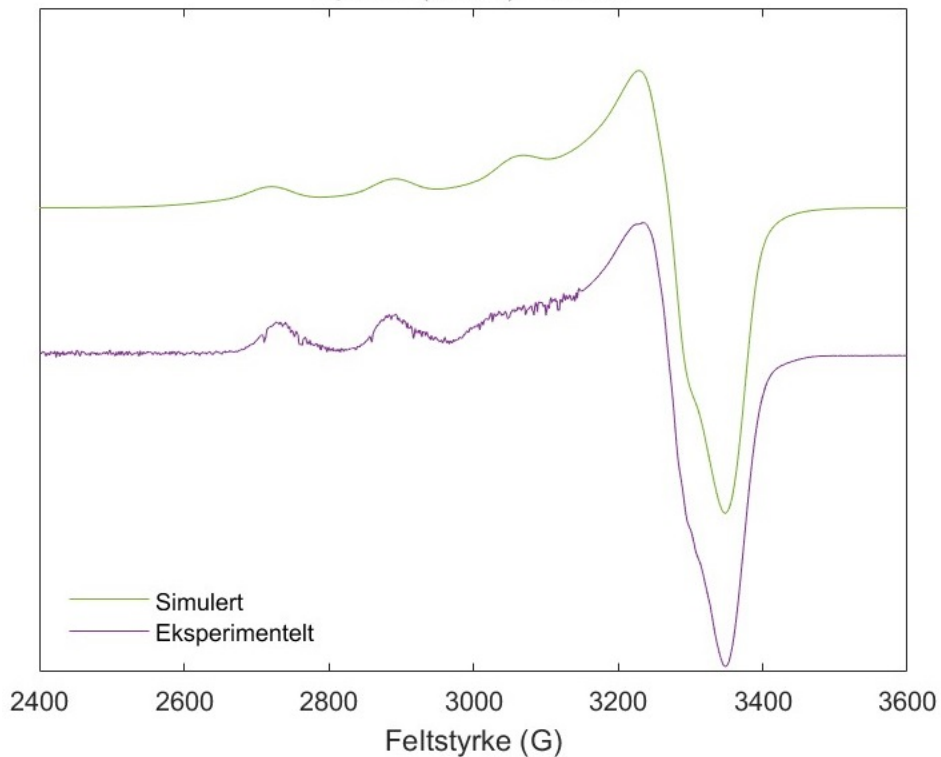
eksperimentelle spekteret ble noe støyfullt.



Figur 22. Simulert (på toppen) og eksperimentelt spekter hentet fra villtypen. Sort, stiplet linje er lagt til det simulerte spekteret for å fremheve konturene.

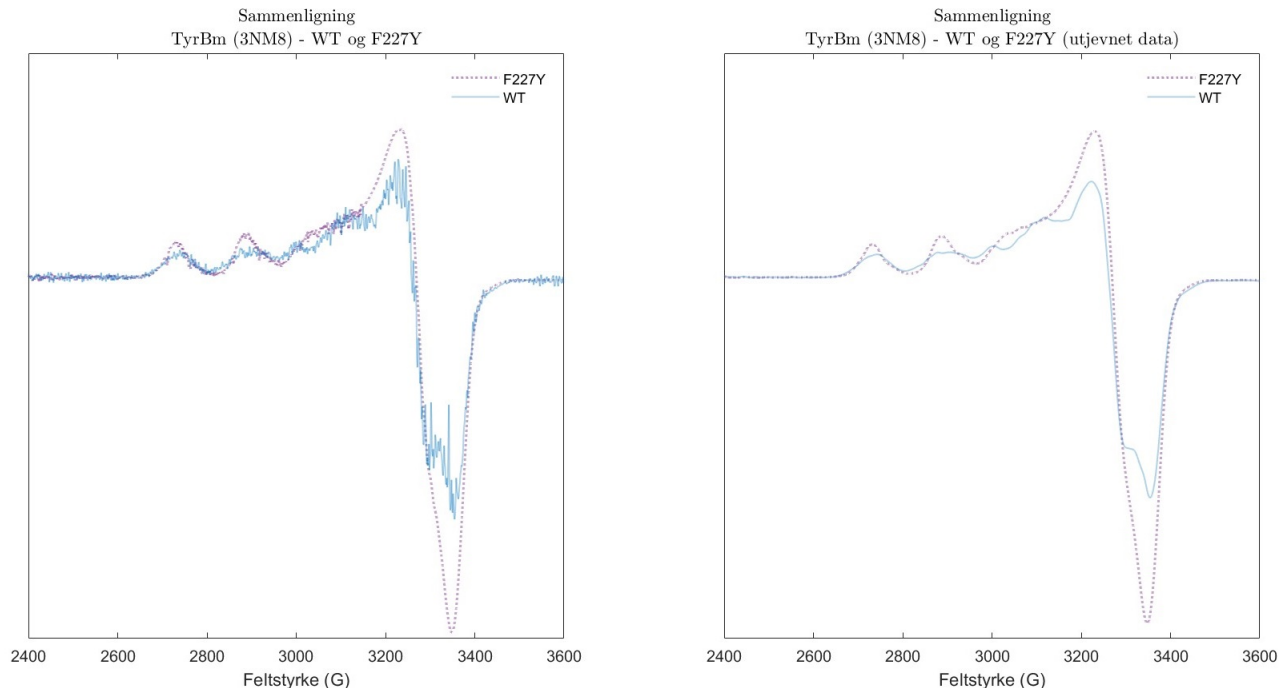
Spekteret fra villtypen av TyrBm (3NM8) (figur 22) viser tydelig to av de fire mindre toppene som er synlig i spekteret fra kobber-standarden. Absorpsjonen ved den høyeste feltstyrken er noe bredere og ser ut til å "kollidere" med de gjenværende toppene fra det oppdelte signalet. Dette spekteret inneholdt mye støy, særlig ved den sterkeste absorpsjonen. Noe av dette ble fjernet ved bruk av *smoothing averages* gjennom funksjonen *datasmooth* i EasySpin, før simuleringen (vist i grønt) ble gjennomført. Den mørke, stiplede linjen i det øverste plottet viser det simulerte spekteret uten tilført støy. Simuleringen hadde en langt lavere error i dette spekteret, 0.3309 (*RMSD*), enn den til kobberstandarden (også her ble integralet av spekteret tilnærmet).

Ekspimentelt og simulert spekter
TyrBm (3NM8) - F227Y



Figur 23. Simulert (på toppen) og eksperimentelt spekter hentet fra mutanten.

Spekteret fra TyrBm (3NM8) mutanten (figur 23) ligner det som ble tatt opp av villtypen, men med langt mindre støy. To av de fire toppene fra det oppdelte signalet i kobberstandarden er også her tydelig differensiert fra det sterkeste signalet. Den samme prosedyren ble fulgt for simulering av spekteret som for de to andre. Integralet av det eksperimentelle spekteret ble tilnærmet, med en error på 0.2760 (*RMSD*).



Figur 24. Til venstre: Eksperimentelt spekter fra mutant (lilla, prikket linje) og villtype (blå linje). Til høyre: eksperimentelle spektra med noe datareduert støy.

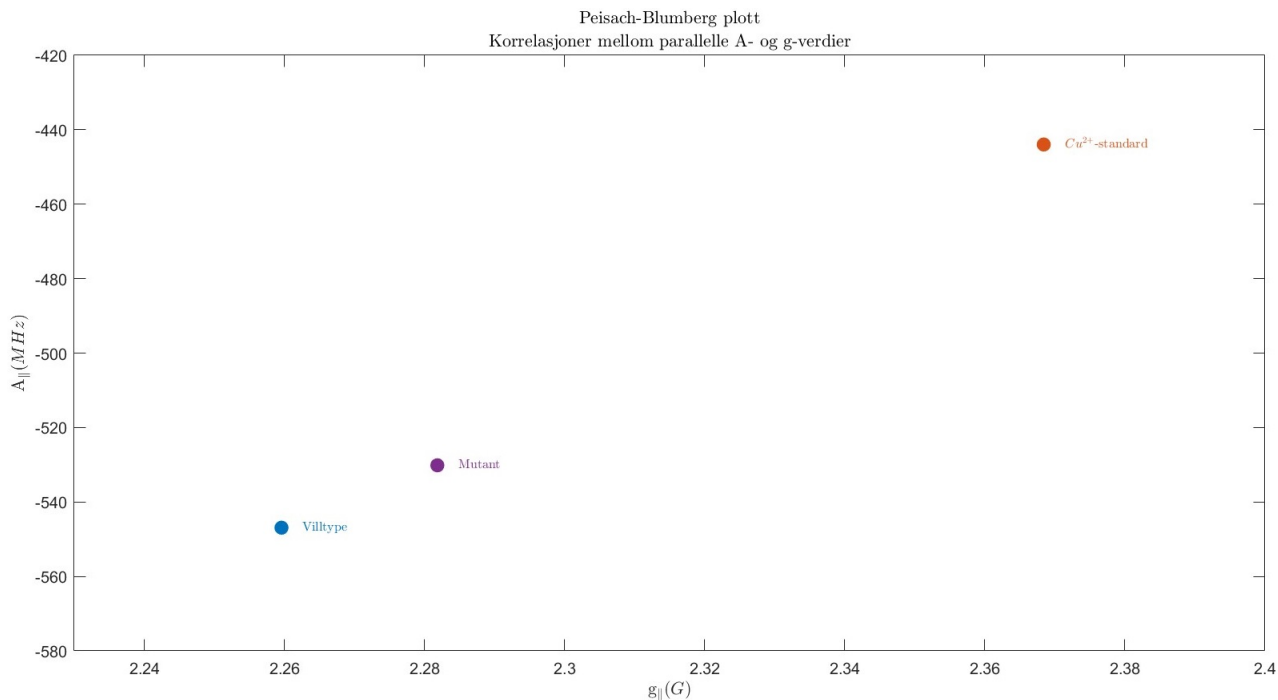
Figur 24 viser en sammenligning av rådata fra de to TyrBm-variantene. Noen bemerkningsverdige ulikheter kan observeres i området ved den dypeste dalen, og stigningen - fra venstre og opp, til den høyeste toppen. Som tidligere nevnt er signal-til-støy forholdet og intensiteten noe ulik mellom de to.

Tabell 3. Simulerte g - og A -verdier for hver av de tre eksperimentelle spektrene.

Simulerte EPR-parametre.						
Prøve	g (Gauss)			A (MHz)		
	g_x (g_{\perp})	g_y (g_{\perp})	g_z (g_{\parallel})	A_x	A_y	A_z
Cu^{2+} -standard	2.07160	2.07180	2.36841	-10.0869	43.9585	-443.968
Villtype	2.05807	2.08973	2.25959	3.74751	57.8138	-546.901
Mutant	2.04653	2.07460	2.28184	33.7101	56.6834	-530.140

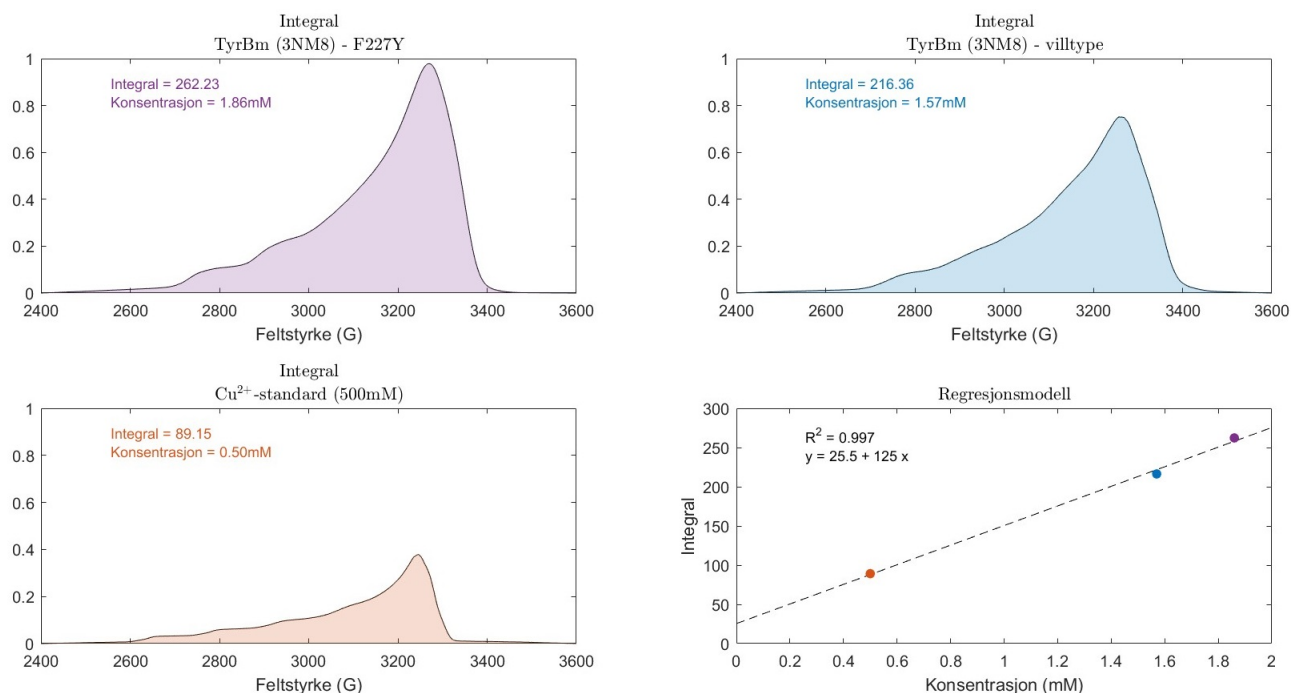
De simulerte parametrene fra de tre spektrene er vist i tabell 3. For alle tre er den aksiale symmetrien som er forventet fra et kobberkompleks synlig: $g_x \approx g_y \neq g_z$ (for aksiale symmetrier brukes formalismen g_{\perp} for g_x og g_y , og g_{\parallel} for g_z). For de to proteinene er det en merkbar ulikhet mellom de to A_z -verdiene, og en noe større ulikhet mellom A_x -verdiene (som grunnet overlapp

med A_y kommer med en høyere usikkerhet). Verdiene av g_{\parallel} har en prosentvis ulikhet på 0.98 %, noe høyere enn de to g_{\perp} -verdiene - på henholdsvis 0.56 % og 0.73 % for g_x og g_y . Dette kommer tydeligere frem i Peisach-Blumberg plottet vist i figur 25. Andre verdier inkludert i simuleringene er å finne i vedlegg 9.7.



Figur 25. Peisach-Blumberg plott fra de tre simulerte datamengdene.

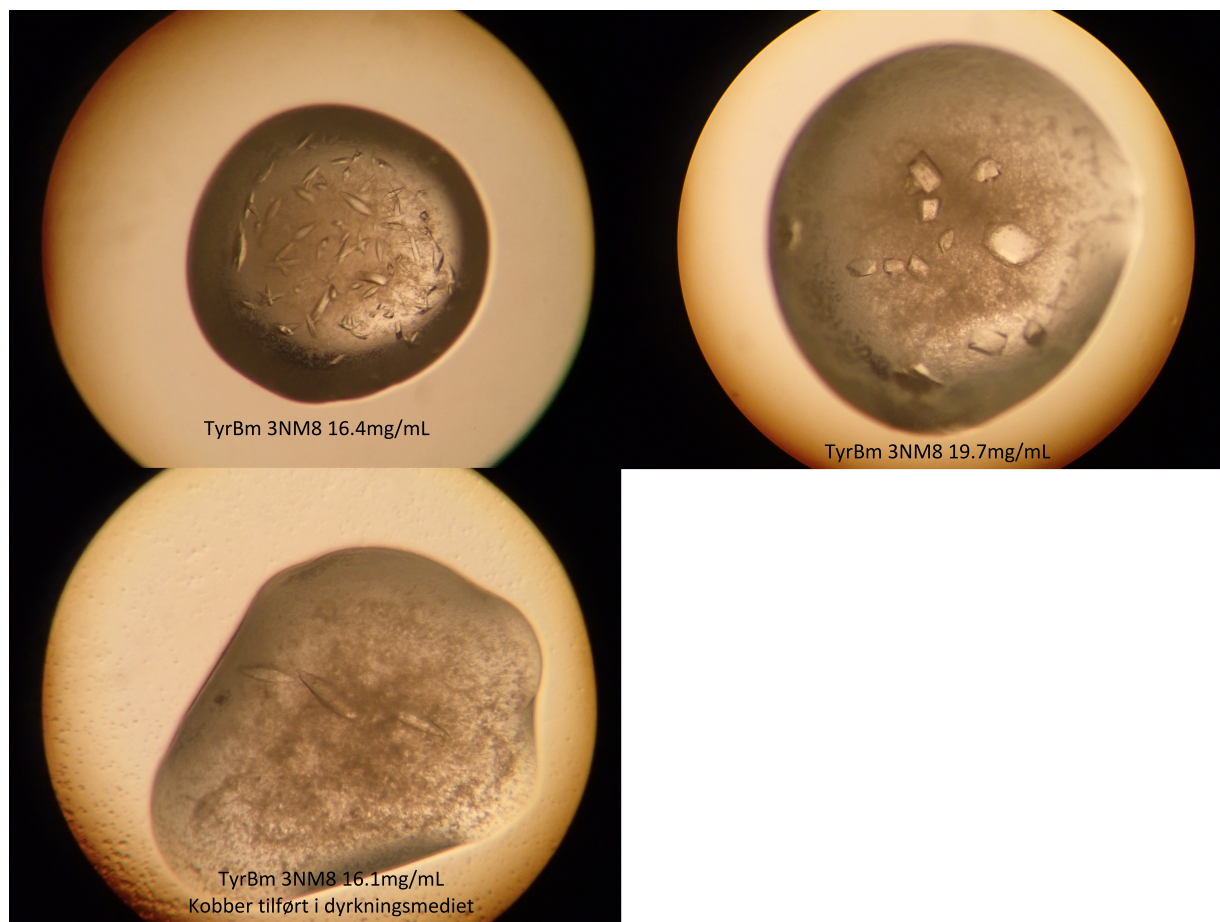
Spinn-konsentrasjonen i en EPR-prøve er proporsjonal med integralet av absorpsjonskurven. Figur 26 inneholder konsentrasjonene av kobber tilført hver av spektrene, gitt med sine respektive integraller. Noe usikkerhet er knyttet opp til hvorvidt spinn-konsentrasjonen er den samme som konsentrasjonen av kobber i prøvene, siden det ikke er sikkert at alt kobberet var bundet til det aktive setet. Integralet til spekteret av mutanten er høyest, etterfulgt av det til villtypen, og til slutt kobberstandard. Dette er i overenstemmelse med størrelsen av kobberkonsentrasjonene i prøvene, noe som også fremkommer av den enkle regresjonsmodellen nederst til høyre i figuren.



Figur 26. Absorpsjonskurver med integralene til hver av de tre EPR-spektrene. En enkel regresjonsmodell er lagt til for å fremheve den tilsynelatende lineariteten mellom integralene og konsentrasjonene.

6.3 Krystallisering

Bildene i figur 27 og 28 ble tatt noen få dager før hurtigavkjøling og lagring. Krystallene fremkommer derfor i en mer eller mindre "ferdig" tilstand; potensialet for ytterligere vekst var trolig svært begrenset gitt tiden de allerede hadde tilbragt under de bestemte vekstforholdene. Kun et lite utvalg av krystallene er her vist.

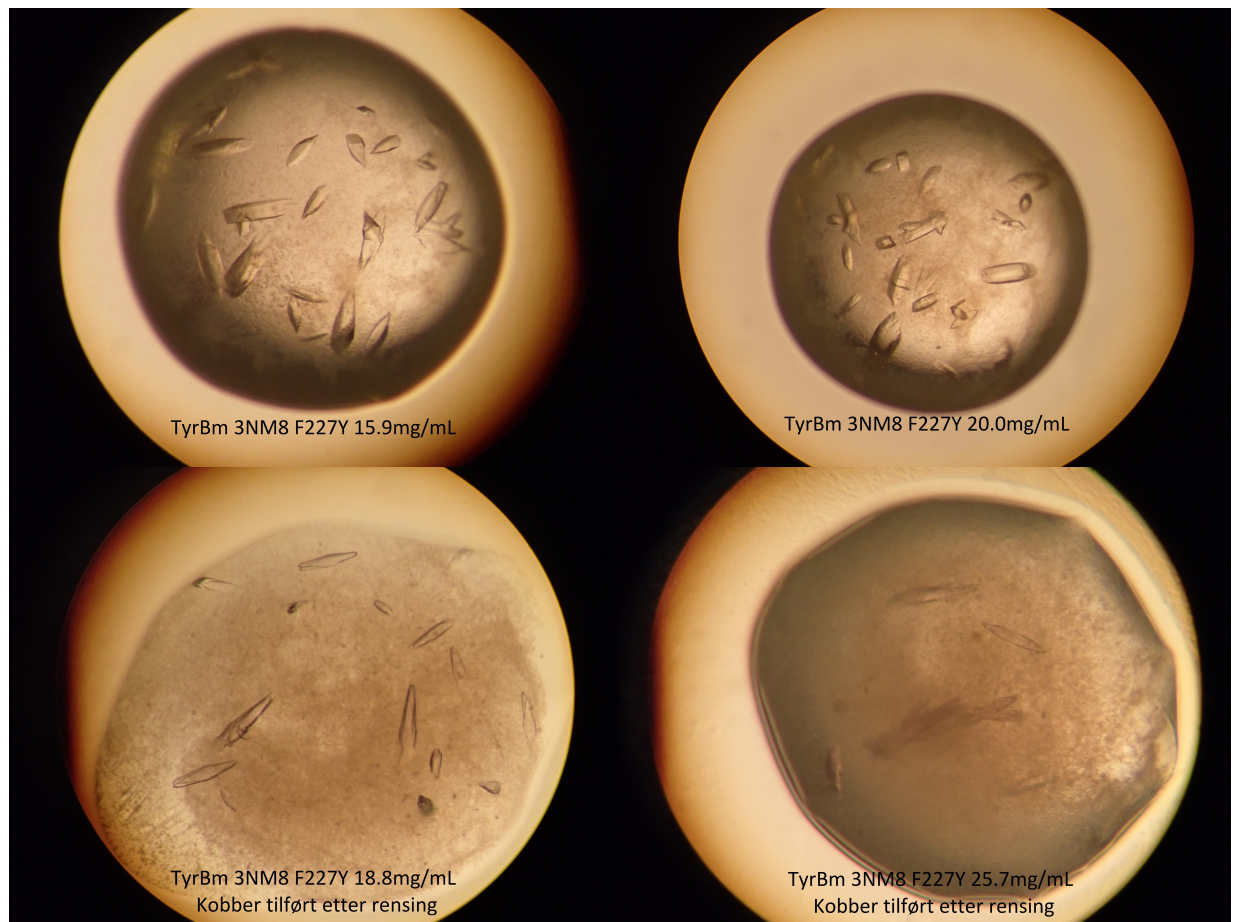


Figur 27. Krystaller av TyrBm villtypen, dannet fra tre ulike utgangskonsentrasjoner. Det nederste bildet viser krystaller fra proteiner som fikk tilført kobberkofaktor direkte etter IPTG-induksjon under celleveksten av uttrykksverten.

Betingelsene som viste seg mest gunstige for villtypen er inkludert i figur 27. Inkludert forsøkene som ikke er tatt med i figuren, var det de tilfellene hvor kobberioner ble tilført samtidig med proteininduksjon under vekstfasen som ga de største krystallene. Flere av disse vokste til et punkt hvor de fragmenterte. Både proteiner med og uten kofaktor, tilført før krystallisering ble igangsatt, varierte i morfologi - hovedsaklig mellom de (tilnærmet) kubiske og rektangulære krystallene i bildet til høyre og de rombiske vist i bildene til venstre.

For mutanten (figur 28) var et større antall av krystallene tydelig rektangulære eller rombiske. Størrelsen var noe mindre enn for enkelte tilfeller av villtypen, men i de fleste tilfellene var de like. I tilfellene hvor kobberioner ble tilført etter rensing av proteinene, fremkom krystallene langt mer homogene i forhold til morfologi - hovedsaklig som smale og lange rombiske strukturer. Den

karakteristiske, utstrålte fargen var også synlig i krystallene, som vist i de to nederste bildene av figur 28.



Figur 28. Krystaller av TyrBm mutanten, dannet fra fire ulike utgangskonsentrasjoner. De to nederste bildene fikk tilført kobberkofaktor etter renseprosedyren.

6.4 Datainnsamling og modeller

Et utvalg av verdier fra datainnsamlingen og modellbyggingen, basert på valideringsparametrene forklart i seksjon 4.8, er inkludert i tabellene nedenfor. Siden dataanalysen innebar en oppdeling basert på oppløsning (i totalt ti "resolution shells") er verdiene fra gruppen med høyest oppløsning inkludert sammen med verdiene for hele datamengden.

Tabell 4. Oppsummeringsdata fra røntgen-diffraksjon i krystaller av TyrBm mutant F227Y. Verdiene a/b/c viser til lengdene på enhetscellene, mens $\alpha/\beta/\gamma$ viser til vinklene mellom retningene til de tre lengdene. Alle verdier gitt i parantes viser til statistikk fra det høyeste (av ti) oppløsningsintervaller.

Krystalldata og statistikk fra røntgen-diffraksjon - TyrBm mutant F227Y						
	<i>Cu</i> ²⁺ -mettet; oksidert		<i>Cu</i> ²⁺ -mettet; redusert		<i>Ni</i> ²⁺ -mettet; oksidert	
Krystalldata						
Romgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁		P2 ₁ 2 ₁ 2		P12 ₁ 1	
a/b/c (Å)	47.63/78.07/150.28		78.04/150.08/47.51		48.04/78.97/86.22	
$\alpha/\beta/\gamma$ (°)	90/90/90		90/90/90		90/106/90	
Datainnsamling						
Bølgelengde (Å)	0.8731		0.8731		0.8731	
Oppløsning (Å)	1.88-75.20 (1.88-1.95)		1.88-75.10 (1.88-1.94)		1.83-46.21 (1.83-1.90)	
Obs. refl./unike refl.	52567/26284 (480/240)		87850/44365 (5820/2962)		99153/52937 (10118/5293)	
Wilson B-faktor (Å ²)	21.87		27.01		25.30	
	min/maks		min/maks		min/maks	
<i>Completeness</i> (%)	5.2/100	56.5 (5.2)	64.4/100	95.1 (64.4)	94.1/98.5	96.8 (97.9)
Signalstyrke ($\frac{S}{N}$) (%)	1.4/17.5	8.4 (1.4)	0.9/14.7	5.2 (0.9)	1.3/15.5	6.1 (1.3)
<i>R</i> _{merge} (%)	0.019/0.409	0.071 (0.409)	0.022/0.633	0.053 (0.593)	0.042/0.446	0.077 (0.446)
<i>R</i> _{meas} (%)	0.027/0.578	0.100 (0.578)	0.031/0.896	0.074 (0.839)	0.060/0.631	0.109 (0.631)

Tabell 4 inneholder parametre fra krystallene av TyrBm mutanten. De to kobbermettede variantene er begge krystallisert med kobberionene i løsningen. Den nikkelmettede varianten er tilført nikkellioner etter krystallisering. Dette er synlig ut ifra romgruppene til de tre variantene, som for de kobbermettede tilhører et ortorombisk krystalsystem, mens den nikkelmettede tilhører det monokline krystalsystemet. Sistnevnte ligner dermed mer på villtypene, vist i tabellen under (som alle er mettet etter krystallisering).

For den oksiderte, kobbermettede varianten er komplettheten oppsiktsvekkende lav, på kun

56.5 %; kun en liten andel av de tilgjengelige observasjonene innen hver unike refleksjonen er altså målt.

Alle de tre krystallene av TyrBm villtypen (tabell 5) tilhørte det monokline krystalsystemet. Også her var oppløsningen høy og R-verdiene forholdsvis lave for hele datamengden samlet, med én kritisk lav verdi av kompletthet observert for den reduserte, kobbermettede varianten.

Tabell 5. Oppsummeringsdata fra røntgen-diffraksjon i krystaller av TyrBm villtype. Verdiene a/b/c viser til lengdene på enhetscellene, mens $\alpha/\beta/\gamma$ viser til vinklene mellom retningene til de tre lengdene. Alle verdier gitt i parantes viser til statistikk fra det høyeste (av ti) oppløsningsintervaller.

Krystalldata og statistikk fra røntgen-diffraksjon - TyrBm villtype						
	Cu^{2+} -mettet; oksidert		Cu^{2+} -mettet; redusert		Ni^{2+} -mettet; oksidert	
Krystalldata						
Romgruppe	P12 ₁ 1		P12 ₁ 1		P12 ₁ 1	
a/b/c (Å)	47.96/78.27/85.24		54.88/78.73/82.89		48.12/78.96/86.03	
$\alpha/\beta/\gamma$ (°)	90/106/90		90/106/90		90/106/90	
Datainnsamling						
Bølgelengde (Å)	0.7749		0.7749		0.8731	
Oppløsning (Å)	1.54-82.06 (1.54-1.59)		1.65-52.82 (1.65-1.71)		1.91-57.18 (1.91-1.98)	
Obs. refl./unike refl.	166648/88373 (15995/8509)		92760/52408 (452/280)		95760/48264 (9471/4778)	
Wilson B-faktor (Å ²)	19.91		17.29		20.57	
	min/maks		min/maks		min/maks	
<i>Completeness</i> (%)	93.5/99.7	98.2 (95.0)	3.4/97.7	64.2 (3.4)	99.8/100	100 (100)
Signalstyrke ($\frac{S}{N}$) (%)	1.3/19.7	8.1 (1.3)	1.4/14.7	7.1 (1.4)	2.3/29.4	11.3 (2.3)
R_{merge} (%)	0.034/0.608	0.047 (0.608)	0.045/0.290	0.084 (0.290)	0.024/0.340	0.053 (0.340)
R_{meas} (%)	0.049/0.860	0.067 (0.860)	0.064/0.410	0.119 (0.410)	0.034/0.480	0.075 (0.480)

Fasing og raffinering av datamengdene ble utført i henhold til seksjon 5.6.4 under metoder. Parametrene som er inkludert i tabell 6 og 7 er forklart i seksjon 4.8. R-verdiene gir en indikasjon på hvor godt modellen er tilpasset de eksperimentelle dataene, men bør betraktes i lys av de

resterende parametrene.

Tabell 6. Oppsummeringsverdier for modellbyggingen av diffraksjonsdata fra TyrBm mutant F227Y. Alle verdier gitt i parentes viser til statistikk fra det høyeste (av ti) oppløsningsintervaller.

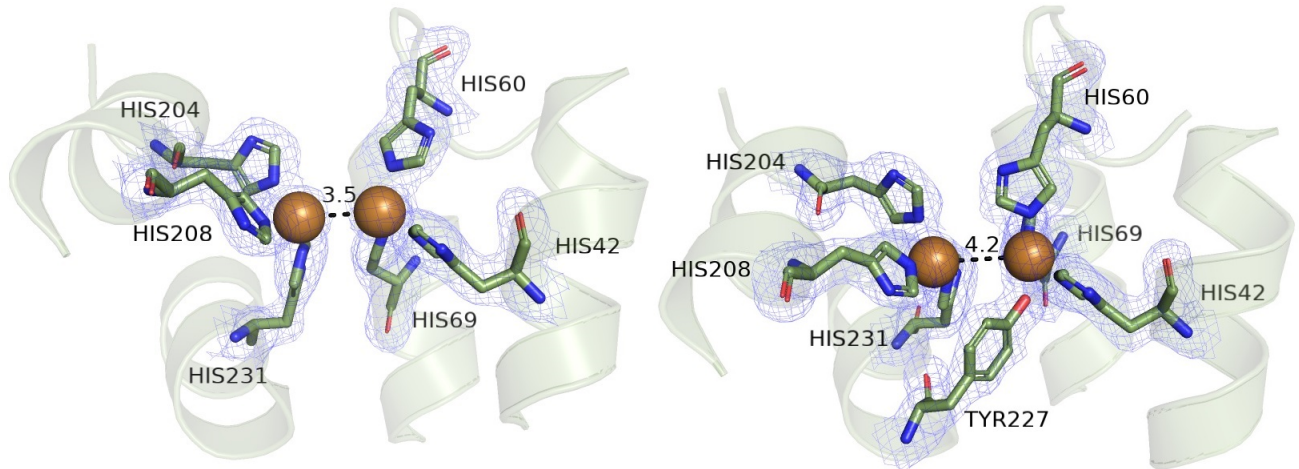
Statistikk fra raffinering - TyrBm mutant F227Y						
	Cu^{2+} -mettet; oksidert		Cu^{2+} -mettet; redusert		Ni^{2+} -mettet; oksidert	
R_{work}	0.2048 (0.3220)		0.2487 (0.4411)		0.2388 (0.2909)	
R_{free}	0.2772 (0.3503)		0.2923 (0.4560)		0.2985 (0.3273)	
<i>RMSD</i> - bindinger (Å)	0.0086		0.0081		0.0085	
<i>RMSD</i> - vinkler (°)	1.09		1.09		1.07	
Ramachandran-plott						
- <i>favored</i> (%)	95.23		96.09		97.00	
- <i>allowed</i> (%)	4.06		3.55		3.00	
- <i>outliers</i> (%)	0.71		0.36		0.00	
Rotamer <i>outliers</i> (%)	0.81		0.83		1.21	
	min/maks		min/maks		min/maks	
B-faktor (Å ²)	10.46/77.76	26.47	21.81/84.87	41.40	13.61/93.75	32.66

Når det gjelder R-verdier havnet modellene laget av TyrBm villtypen noe lavere enn de fra mutanten. For høye oppløsninger regnes R_{work} -verdier under 0.25 og R_{free} -verdier under 0.40 som tilstrekkelig [77]. De geometriske parametrene er forholdsvis gode for dem begge, og - som forventet, er B-faktorene steget noe i forhold til de opprinnelige faktorene, vist i tabell 4 og 5.

Tabell 7. Oppsummeringsverdier for modellbyggingen av diffraksjonsdata fra TyrBm villtype. Alle verdier gitt i parentes viser til statistikk fra det høyeste (av ti) oppløsningsintervaller.

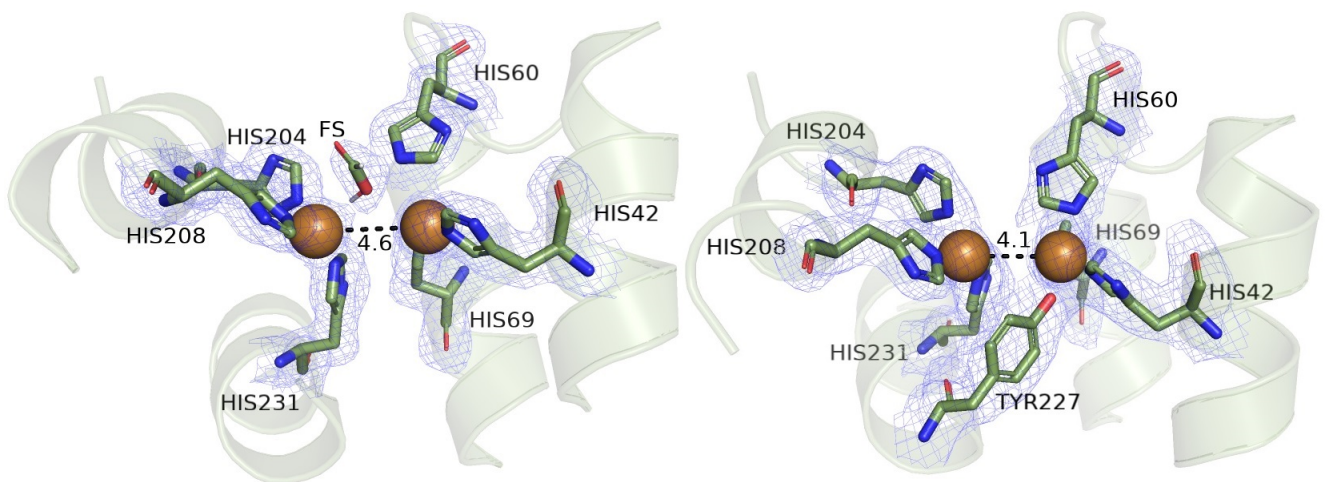
Statistikk fra raffinering - TyrBm villtype						
	Cu^{2+} -mettet; oksidert		Cu^{2+} -mettet; reduisert		Ni^{2+} -mettet; oksidert	
R_{work}	0.2094 (0.2785)		0.1977 (0.2966)		0.1746 (0.2349)	
R_{free}	0.2698 (0.3544)		0.2392 (0.3394)		0.2231 (0.2644)	
<i>RMSD</i> - bindinger (Å)	0.0086		0.0077		0.0076	
<i>RMSD</i> - vinkler (°)	0.96		0.99		0.99	
Ramachandran-plott						
- <i>favored</i> (%)	95.94		96.11		97.35	
- <i>allowed</i> (%)	4.06		3.89		2.47	
- <i>outliers</i> (%)	0.00		0.00		0.18	
Rotamer <i>outliers</i> (%)	2.01		0.60		0.40	
	min/maks		min/maks		min/maks	
B-faktor (Å ²)	13.00/95.53	32.01	9.16/91.61	32.00	11.07/77.10	25.03

Ferdig raffinerte modeller ble redigert ved hjelp av programvaren PyMol for å gi strukturene vist i figurene under. På bakgrunn av spørsmålene som ble lagt til grunne for denne oppgaven (seksjon 1.4), er det kun det aktive setet som her er inkludert. ” $F_{obs.} - F_{kalk.}$ ”-kartet, vist i blått, er innstilt på 1.0 for aminosyrene og 2.5 for kobberatomene.



Figur 29. Det aktive setet i modellene fra de oksiderte variantene av henholdsvis villtype og mutant (fra venstre). Elektrontettheten er indikert i blått, og avstandene mellom kobberet er synlig som en sort, stiplet linje.

Den oksiderte, kobbermettede varianten av TyrBm, som beskriver den tidligere nevnte (seksjon 1.2.1) *oxy*- og *met*-tilstanden. Modellen av villtypen, vist til venstre i figur 29, er i det øvre sjiktet av hva som er en forventet avstand mellom kobberatomene, med rundt 3.5 Å. Til høyre i figuren vises mutanten, med tyrosinet orientert inn mot det ene kobberatomet. Avstanden mellom kobberatomene i modellen av mutanten er på rundt 4.2 Å.



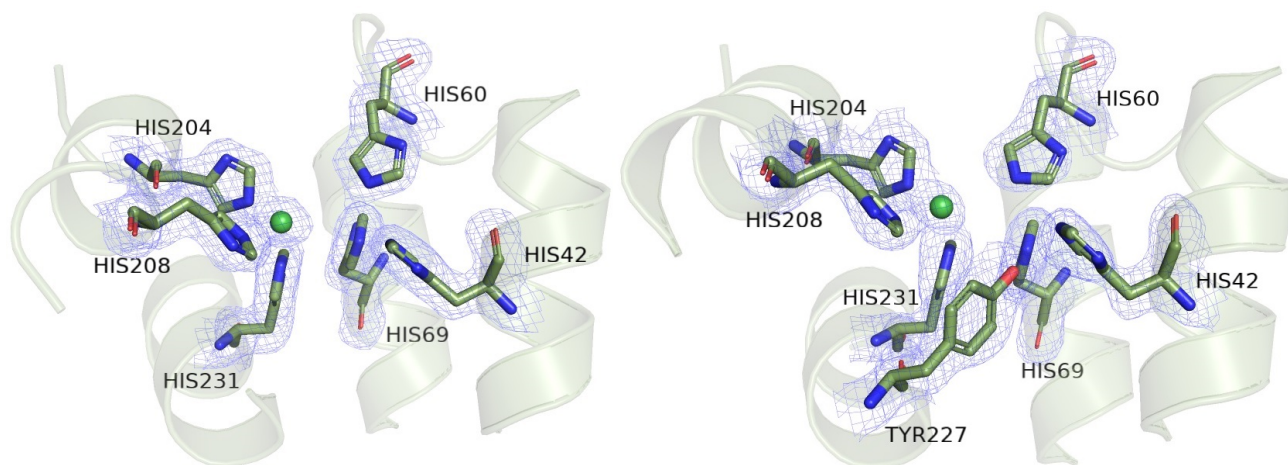
Figur 30. Det aktive setet i modellene fra de reduserte variantene av henholdsvis villtype og mutant (fra venstre). Elektrontettheten er indikert i blått, og avstandene mellom kobberet er synlig som en sort, stiplet linje.

Den reduserte, kobbermettede varianten av TyrBm, beskriver *deoxy*-tilstanden. Også her befinner modellen av villtypen seg i det øvre sjiktet av forventet avstand mellom kobberatomene. I motsetning til modellene av de oksiderte variantene, er avstanden mellom CuA og CuB tilsynelatende større for villtypen enn mutanten i de reduserte variantene, med approksimerte 4.6 Å mot 4.1 Å. Den reduserte villypmodellen inneholdt en tetthet som kan være formsyre/format fra reservoarløsningen i det aktive setet.

Tabell 8. Avstander mellom kobberatomene og de koordinerte aminosyrene i de reduserte TyrBm-variantene.

Distanser (Å) mellom ligander og sentralatom i reduserte TyrBm-varianter					
		Oksidert		Redusert	
Aminosyre	Kobber	villtype	mutant F227Y	villtype	mutant F227Y
His204	CuA	2.3	2.2	2.1	2.2
His208	CuA	2.2	2.0	2.0	1.9
His231	CuA	2.1	1.9	2.0	1.8
His42	CuB	2.2	2.1	1.9	2.1
His60	CuB	2.1	2.1	2.8	2.2
His69	CuB	2.4	2.1	2.0	1.9
Tyr227	CuB	-	2.0	-	1.8

Tabell 8 viser forholdsvis like avstander hos de to variantene, mellom kobberatomene og aminosyrene i setet med CuA. I setet med CuB er det derimot en signifikant forskjell mellom de to His60-ligandene i de reduserte variantene, plassert på den andre siden av sentralatomet fra tyrosinet i mutanten.



Figur 31. Det aktive setet i modellene fra de oksiderte variantene av henholdsvis villtype og mutant (fra venstre), tilført nikkell som kofaktor. Elektrontettheten er indikert i blått.

Begge modellene av de oksiderte, nikkelmattede TyrBm-variantene, har en tetthet i det aktive setet som kan være nikkell. Figur 31 viser ett nikkellatom i det aktive setet, som en grønn sfære, med tre histidiner koordinert rundt seg. Tyrosinet i mutanten ser ikke ut til å interagere med dette området.

7 Diskusjon og avsluttende kommentar

Konstruksjon av et enzym som aktiverer og transformerer karbondioksid til verdifulle varer er et ambisiøst prosjekt som trolig vil kreve langt mer enn en enkelt aminosyre-substitusjon. Det er likevel gjennom denne type forskning og ingeniørarbeid - grobunnen for nye, viktige teknologier blir dannet. Kanskje i helt andre retninger enn den som opprinnelig var tenkt. Metalloenzymer katalyserer et bredt spekter av kjemiske reaksjoner - ofte med høye energibarrierer - på en svært energieffektiv måte, og bærer med seg et potensiale til å endre flere av de miljø- og klimafiendtlige industrielle løsningene det moderne samfunnet har gjort seg avhengig av - til det bedre. Utvikling av ny kunnskap om disse enzymene kan derfor tjene formål langt forbi kun det å belyse interessante biokjemiske aspekter på en laboratoriebenk.

For å i størst mulig grad forstå og bedømme resultatene av forsøk som utføres i hensikt av å utvikle denne kunnskapen, er det viktig å forstå hva som måles og hvordan dette måles. En intensjon med denne oppgaven var derfor å utdype noen av de teoretiske aspektene ved instrumentene og metodene som ble tatt i bruk. Siden teorien bak de tre teknikkene som utgjorde metodegrunnlaget

for oppgaven - rekombinant genteknologi, (EPR) spektroskopi og røntgen-krystallografi - hver for seg danner store felter - utviklet gjennom svært lang tid, ble omfanget simpelthen for stort til å kunne dekkes i tilstrekkelig grad. Seksjonene i oppgaven som inneholder teori rundt disse tre feltene er likevel fulle av gode referanser, som i langt større grad evner å formidle essensen og rekkevidden til disse teknikkene.

Denne seksjonen vil først, på bagrunn av resultatene, ta for seg de ulike delmålene som ble oppført i introduksjonen, for deretter å se på hvorvidt resultatene kan besvare de stilte spørsmålene.

Tillaging av proteiner gjennom fremdyrking av transformerte *E. coli* celler, etterfulgt av uttrykk, lysering og rensing, ble utført gjentatte ganger, med mer eller mindre like resultater. Avbildningen etter SDS-PAGE som vist i resultatdelen inneholder prøver fra rensing av proteinene som senere ble undersøkt med spektroskopi. Siden forsøkene som ble utført i denne oppgaven ikke stilte høyere krav til mengde, anses rensesprosedyren som tilstrekkelig, på tross av den tydelige tilstedeværelsen av proteinet i de andre fraksjonene. Denne tilstedeværelsen kan skyldes slitasje på brønnene som ble brukt og kunne trolig vært utbedret ved å øke antall rensetrinn og/eller bytte/vedlikeholde brønnene.

Båndet som gjør seg synlig ved rundt 70 kDa er trolig TyrBm homodimerer, som tidligere er kjent for å dannes av TyrBm (3NM8) ved høyere konsentrasjoner [30] (krystallene dannes for det meste av homodimerer). Dette, i tillegg til den lave intensiteten til dette båndet gjorde at ytterligere rensetrinn for å fjerne det ble regnet som overflødig.

Båndet som dukket opp like under proteinet, i nærheten av 30 kDa, var derimot vanskeligere å gjøre rede for. Ytterligere rensetrinn (størrelses eksklusjons kromatografi) ble forsøkt uten nevneverdig suksess, og forsøkene ble til slutt utført uten utbedring av denne urenheten. En mulig forklaring av båndet er en uspesifikk kløyving av CPD-proteinene, men siden krystalliseringen var vellykket ble ikke dette undersøkt ytterligere.

Som det ble nevnt i innledning har de to TyrBm-variantene karakteristiske UV/vis-signaturer, som ligger til grunn for de sterke fargene som utstråles fra proteinene i løsning. UV/vis-spekteret som ble tatt opp i forbindelse med denne oppgaven bekrefter binding av kofatorer i villtype og mutant i forkant av EPR-målingene, da det tydelig fremkommer en topp på rundt 500 nm i spekteret

fra mutanten og 350 nm i spekteret fra villtypen.

EPR-målingene og den tilknyttede simuleringen av spektrene ble utført med enkelte mangler, men resulterte likevel i interessante data. En referanse med tilsvarende kobberkonsentrasjon til hver av prøvene ble opprinnelig tillaget for å kunne utlede spinnkonsentrasjonene i prøvene, men ble ikke inkludert i resultatene da signalet var utilstrekkelig grunnet det som trolig skyldtes utfelling av kobber i løsninger som ble laget med feil pH-verdier. Kobberatomene som ble tilført forble i en oksidert tilstand etter binding til de aktive setene, noe som utelukket aktivering av molekylært oksygen og dannelsen av broer mellom de to kobberatomene. I tillegg dukket det opp problemer med koking i prøvebeholderen (den kalde fingeren) underveis, noe som resulterte i lavere signal-til-støy forhold enn det optimale, særlig i villtypen og kobberstandarden. Dette medførte suboptimale betingelser for simulering av spektrene og for sammenligning av signaturen til mutant og villtype.

Betingelsene brukt for krystalliseringen var tidligere blitt optimalisert gjennom screening-metoder. Konsentrasjonene til PEG og proteinene ble likevel variert i noe grad, men med tilnærmet like utfall. Resultatet var flere krystaller av tilsynelatende høy kvalitet, både for villtypen og mutanten.

Diffraksjonsdataene inneholdt informasjon langt under 2.0 Å for de fleste krystallene. Av de datamengdene som ble inkludert i denne oppgaven lå informasjonen med høyest oppløsningen et sted mellom 1.54-1.91 Å. De gjennomsnittlige B-faktorene var forholdsvis lave, med verdier rundt tjue (over femti regnes som kritisk). B-verdiene steg noe i de ferdig raffinerte modellene, noe som indikerer at de har tatt opp feil som ikke nødvendigvis skyldes uorden i krystallene, og dermed kan vise til feil i modellene. Maksimum- og minimum-verdiene tilsier at fordelingen av B-verdier i modellen var skjevfordelt mot lavere verdier, og kun inneholdt enkelte tilfeller av kritisk høye verdier. Flere av modellene hadde lav kompletthet, særlig den reduserte villtypen og den oksiderte, kobbermettede mutanten. Den høye oppløsningen i disse to sistnevnte datamengdene er derfor noe mindre meningsfull, siden komplettheten ved de høyeste oppløsningene bidro mest i å trekke ned den samlede komplettheten. På tross av de nevnte (og ikke nevnte) feilene, var R-verdiene forholdsvis lave, både for datainnsamlingen og raffineringen; modellene av mutanten lå noe høyere enn de fra villtypen, noe som svarer til forventningene basert på kvaliteten og størrelsen av krystallene.

7.1 Avstanden mellom kobberkofaktorene

For å aktivere og transformere karbondioksid til oksalat i det aktive setet av TyrBm er en av forutsetningene, blant annet underbygget av det organometallise komplekset til Bouwman et al., at det er tilstrekkelig med plass mellom de to kobberatomene. Dette ledet til det første spørsmålet - formulert i introduksjonen, knyttet til effekten av mutasjonen F227Y på kobberkofaktorene.

Underbygget av statistikk fra datainnsamlingen og modellbyggingen (som i sin helhet viste seg å være lovende), i tillegg til differansekartet mellom de observerte og kalkulerte strukturfaktorene i området rundt det aktive setet, er det observert en signifikant forskjell i avstanden mellom CuA og CuB i mutanten og villtypen av TyrBm 3NM8 - redusert og oksidert. I de reduserte variantene ser det ut til at tyrosinet i mutanten har ført til en kortere avstand mellom kobberet og His60; at kobberet "dyttes" oppover. Villtypen befinner seg i det øvre sjiktet av det som er forventet, både i den reduserte og oksiderte tilstanden.

Mutantene ser ut til å opprettholde den samme avstanden mellom kofaktorene i den reduserte og oksiderte varianten. I forhold til villtypen har dermed avstanden økt i den oksiderte- og sunket i den reduserte varianten. Siden aktivering av karbondioksid innebærer at kofaktorene er reduserte idet CO_2 binder til det aktive setet, kan dette være et problem - avhengig av hvordan CO_2 koordinerer til metallene. Med tanke på dannelsen av oksalat i det aktive setet er det derimot et steg i riktig retning, dersom premisset om avstanden mellom kobbersetene basert på funnet til Bouwman et al. er korrekt.

7.2 EPR-aktivitet

EPR-aktiviteten til villtypen skyldtes trolig fravær av oksygenbroen som dannes fra et redusert kobbersete, ettersom kobberet ble tilført som oksidert, toverdige kobber. Spinnkonsentrasjonen til villtypen ser ut til å tilsvare den til kobberet tilført, selv om disse resultatene - som tidligere nevnt - har noe usikkerhet knyttet til seg.

Effekten av F227Y-mutasjonen, om ikke knyttet opp til avstander mellom kofaktorene, var likevel synlig i spektrene fra de to variantene. De to spektrene som er tatt opp fra prøver med villtypen og mutanten (figur 24) er av ulik intensitet og har ulike signal-til-støy forhold, men enkelte deler av spektrene er likevel så vesentlig ulike at en sammenligning kan rettferdiggjøres.

Dette gjelder særlig den dypeste "dalen" i spektrene, som korresponderer til g_{\perp} og A_{\perp} . I

villtypen fremkommer det tydelig en oppdeling av spekteret i dette området, mens mutanten kun viser små antydninger til oppdeling. De simulerte A-verdiene tydeliggjør denne ulikheten, med en differanse mellom A_x -verdiene på hele 30 MHz (avrundet). Videre er oppstigningen etter de to første toppene, dersom grafen følges fra venstre til høyre, ulik ved at den fremstår som jevn for mutanten og ujevn for villtypen. Ujevnheten kan skyldes de to resterende toppene fra $A_{||}$, som er forventet å telle fire. Denne observasjonen underbygges av de simulerte $g_{||}$ -verdiene, som er i underkant av 1 % høyere i villtypen: Gitt at de simulerte verdiene er riktige vil denne differansen kunne gi et litt mindre komprimert spekter fra villtypen enn fra mutanten, og dermed en litt tydeligere hyperfin oppdeling.

Effekten av mutasjonen og annen aktivitet - både i villtypen og mutanten - ville trolig ha fremkommet langt tydeligere dersom en reduktant hadde vært tilført prøvene i forkant av målingene, siden fraværet av en oksygen-/hydroksid-bro trolig resulterte i aktivitet fra alt kobberet som var bundet i det aktive setet. Den økte avstanden mellom kobberatomene i mutanten kunne da kanskje også ha vært påvist fra EPR-data og dermed underbygget resultatene fra røntgen-kryсталlografien.

7.3 Utbytting av metallkofaktorer

Toverdig nikkell i tetragonale komplekser kan i prinsippet brukes for å aktivere CO_2 [15]. Saturering av ferdig krystalliserte proteiner med nikkell ble derfor utført, for først å undersøke om det aktive setet i TyrBm 3NM8 kan binde nikkell.

Modellen av både villtypen og mutanten viste indikasjoner på nikkell i det aktive setet. De tre histidin-residuene, som normalt er koordinert rundt CuA - His204, His208 og His231, ser altså ut til å være koordinert til én nikkellkjerne. Fravær av nikkell i det andre potensielle bindingsområdet - i begge variantene, kan - analogt med opptaksmekanismene for kobber [32] - skyldes en svakere interaksjon med de tre andre histidinene. Høyere konsentrasjoner av nikkell, kombinert med lengre inkubasjonstid, kunne kanskje ha løst dette.

7.4 Koordinering av nitritt

Diffraksjonsdataene fra krystallene tilført nitritt var ikke av tilstrekkelig kvalitet for å undersøke dette punktet.

7.5 Veien videre

Resultatene som her er presentert utgjør kun en liten fraksjon av prosjektet i sin helhet, og inneholder informasjon som tilsier at arbeidet ennå ikke er ved sin ende. Reproduksjon av suksessfulle forsøk og videre arbeid med de som viste seg mindre suksessfulle, er essensen av den hypotetisk deduktive metode, og er det første steget videre med TyrBm mutant F227Y. I et lengre perspektiv er det helt nødvendig, for å kunne bedømme resultatene av disse forsøkene i lys av den overhengende hensikten, å utføre assayer av målproteinene under anoksiske forhold med muligheter for deteksjon av katalytisk aktivitet, ideelt sett ved å observere eventuelle endringer i konsentrasjonen av karbondioksid tilstede.

8 Referanser

- [1] Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: Principles of biochemistry*. 7th ed. New York: Macmillan International, Higher Education; 2017.
- [2] Dewick PM. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. 3rd ed. Chichester: Wiley; 2009.
- [3] Frey PA. Advances in Research on Metalloproteins. *Methods in Molecular Biology* 2014;1122:1–3. doi:10.1007/978-1-62703-794-5_1.
- [4] Takisawa H, Morishima Y, Soma S, Szilagyi RK, Fujisawa K. Conversion of Carbon Dioxide to Oxalate by α -Ketocarboxylatocopper(II) Complexes. *Inorganic Chemistry* 2014;53:8191–3. doi:10.1021/ic5006242.
- [5] Moser CC, Page CC, Farid R, Dutton PL. Biological Electron Transfer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1995;27:263–74. doi:10.1007/bf02110096.
- [6] The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Inner-sphere electron transfer. IUPAC. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/I03052>.
- [7] The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Outer-sphere electron transfer. IUPAC. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/O04351>.
- [8] Schwarz WH. The Full Story of the Electron Configurations of the Transition Elements. *Journal of Chemical Education* 2010;87:444–8. doi:10.1021/ed8001286.
- [9] Rayner-Canham G, Overton T. *Descriptive Inorganic Chemistry*. 6th ed. New York: W.H. Feeman and Company, a Macmillan Higher Education Company; 2014.
- [10] Rubino JT, Franz KJ. Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2012;107:129–43. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024.
- [11] Appel AM, Bercaw JE, Bocarsly AB, Dobbek H, DuBois DL, Dupuis M, et al. Frontiers, opportunities, and challenges in biochemical and chemical catalysis of CO_2 Fixation. *Chemical Reviews* 2013;113:6621–58. doi:10.1021/cr300463y.

- [12] [12] review of fixation and transformation of carbon dioxide. *Energy Environ Sci* 2010;3:43–81. doi:10.1039/B912904A.
- [13] The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Hapticity (η). IUPAC. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/H01881>.
- [14] The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Bridging ligand. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/B00741>.
- [15] Amanullah S, Saha P, Nayek A, Ahmed ME, Dey A. Biochemical and artificial pathways for the reduction of carbon dioxide, nitrite and the competing proton reduction: Effect of 2nd sphere interactions in catalysis. *Chemical Society Reviews* 2021;50:3755–823. doi:10.1039/d0cs01405b.
- [16] Fuchs G. Alternative Pathways of Carbon Dioxide Fixation: Insights into the Early Evolution of Life? *Annual Review of Microbiology* 2011;65:631–58. doi:10.1146/annurev-micro-090110-102801.
- [17] Vong K, Nasibullin I, Tanaka K. Exploring and Adapting the Molecular Selectivity of Artificial Metalloenzymes. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 2021;94:382–96. doi:10.1246/bcsj.20200316.
- [18] Rosati F, Roelfes G. Artificial metalloenzymes. *ChemCatChem* 2010;2:916–27. doi:10.1002/cctc.201000011.
- [19] Davis HJ, Ward TR. Artificial Metalloenzymes: Challenges and opportunities. *ACS Central Science* 2019;5:1120–36. doi:10.1021/acscentsci.9b00397.
- [20] Farrugia LJ, Lopinski S, Lovatt PA, Peacock RD. Fixing carbon dioxide with copper: crystal structure of [LCu(μ -C₂O₄)CuL][Ph₄B]₂(L=N,N',N''-Triallyl-1,4,7-triazacyclononane). *Inorganic Chemistry* 2000;40:558–9. doi:10.1021/ic000418y.
- [21] Angamuthu R, Byers P, Lutz M, Spek AL, Bouwman E. Electrocatalytic CO₂ Conversion to Oxalate by a Copper Complex. *Science* 2010;327:313–5. doi:10.1126/science.1177981.

- [22] Pretzler M, Rompel A. What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the Art Perspective. *Inorganica Chimica Acta* 2018;481:25–31. doi:10.1016/j.ica.2017.04.041.
- [23] Panis F, Rompel A. The Novel Role of Tyrosinase Enzymes in the Storage of Globally Significant Amounts of Carbon in Wetland Ecosystems. *Environmental Science & Technology* 2022;56:11952–68. doi:10.1021/acs.est.2c03770.
- [24] Faccio G, Kruus K, Saloheimo M, Thöny-Meyer L. Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochemistry* 2012;47:1749–60. doi:10.1016/j.procbio.2012.08.018.
- [25] Fairhead M, Thöny-Meyer L. Bacterial tyrosinases: Old enzymes with new relevance to biotechnology. *New Biotechnology* 2012;29:183–91. doi:10.1016/j.nbt.2011.05.007.
- [26] Goldfeder M, Kanteev M, Isaschar-Ovdat S, Adir N, Fishman A. Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. *Nature Communications* 2014;5. doi:10.1038/ncomms5505.
- [27] Olivares C, Solano F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2009;22:750–60. doi:10.1111/j.1755-148x.2009.00636.x.
- [28] Claus H, Decker H. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology* 2006;29:3–14. doi:10.1016/j.syapm.2005.07.012.
- [29] Solomon EI, Lowery MD. Electronic Structure Contributions to Function in Bioinorganic Chemistry. *Science* 1993;259:1575–81. doi:10.1126/science.8384374.
- [30] Sendovski M, Kanteev M, Ben-Yosef VS, Adir N, Fishman A. First Structures of an Active Bacterial Tyrosinase Reveal Copper Plasticity. *Journal of Molecular Biology* 2011;405:227–37. doi:10.1016/j.jmb.2010.10.048.
- [31] Shuster V, Fishman A. Isolation, Cloning and Characterization of a Tyrosinase with Improved Activity in Organic Solvents from *Bacillus megaterium*. *Microbial Physiology* 2009;17:188–200. doi:10.1159/000233506.

- [32] Kanteev M, Goldfeder M, Chojnacki M, Adir N, Fishman A. The mechanism of copper uptake by tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2013;18:895–903. doi:10.1007/s00775-013-1034-0.
- [33] Kanteev M, Goldfeder M, Fishman A. Structure-function correlations in tyrosinases. *Protein Science* 2015;24:1360–9. doi:10.1002/pro.2734.
- [34] Paradisi A, Johnston EM, Tovborg M, Nicoll CR, Ciano L, Dowle A, et al. Formation of a Copper(II)–Tyrosyl Complex at the Active Site of Lytic Polysaccharide Monooxygenases Following Oxidation by H_2O_2 . *Journal of the American Chemical Society* 2019;141:18585–99. doi:10.1021/jacs.9b09833.
- [35] Bornscheuer UT, Buchholz K. Highlights in Biocatalysis - Historical Landmarks and Current Trends. *Engineering in Life Sciences* 2005;5:309–23. doi:10.1002/elsc.200520089.
- [36] Lodish HF, Berk AJ, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular cell biology* 4th edition. W H Freeman & Co; 2000.
- [37] Willey JM, Sherwood L, Woolverton CJ. *Prescott's Microbiology*. 10th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2014.
- [38] Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 2014;5. doi:10.3389/fmicb.2014.00172.
- [39] Watson JD, Baker TA, Gann A, Levine M, Bell SP, Losick R. *Molecular Biology of the Gene*. 7th ed. Boston: Pearson; 2014.
- [40] Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods in Enzymology* 2000:245–54. doi:10.1016/s0076-6879(00)26058-8.
- [41] Sheahan K-L, Cordero CL, Satchell KJ. Autoprocessing of the *Vibrio cholerae* RTX toxin by the cysteine protease domain. *The EMBO Journal* 2007;26:2552–61. doi:10.1038/sj.emboj.7601700.
- [42] Shen A, Lupardus PJ, Morell M, Ponder EL, Sadaghiani AM, Garcia KC, et al. Simplified, Enhanced Protein Purification Using an Inducible, Autoprocessing Enzyme Tag. *PLoS ONE* 2009;4. doi:10.1371/journal.pone.0008119.

- [43] Tipler PA, Mosca G. *Physics for scientists and engineers*. 6th ed., New York: W.H. Freeman and Company; 2008, p. 1082–3.
- [44] Townsend JS. *Quantum Physics: A Fundamental Approach to Modern Physics*, Sausalito, Calif: University Science Books; 2010, p. 103–4, 155-6, 201-3, 212-4.
- [45] Zeeman P. On the Influence of Magnetism on the Nature of the Light Emitted by a Substance. *The Astrophysical Journal* 1897;5. [doi:10.1086/140355](https://doi.org/10.1086/140355).
- [46] Kox AJ. The discovery of the electron: II. The Zeeman effect. *European Journal of Physics* 1997;18:139–44. [doi:10.1088/0143-0807/18/3/003](https://doi.org/10.1088/0143-0807/18/3/003).
- [47] Preston T. Radiation Phenomena in the Magnetic Field. *Nature* 1899;59:224–9. [doi:10.1038/059224c0](https://doi.org/10.1038/059224c0).
- [48] Uhlenbeck GE, Goudsmit S. Spinning electrons and the structure of Spectra. *Nature* 1926;117:264–5. [doi:10.1038/117264a0](https://doi.org/10.1038/117264a0).
- [49] Uhlenbeck GE. Fifty years of spin: Personal reminiscences. *Physics Today* 1976;29:43–8. [doi:10.1063/1.3023519](https://doi.org/10.1063/1.3023519).
- [50] Friedrich B, Herschbach D. Stern and Gerlach: How a Bad Cigar Helped Reorient Atomic Physics. *Physics Today* 2003;56:53–9. [doi:10.1063/1.1650229](https://doi.org/10.1063/1.1650229).
- [51] Hanneke D, Fogwell S, Gabrielse G. New Measurement of the Electron Magnetic Moment and the Fine Structure Constant. *Physical Review Letters* 2008;100. [doi:10.1103/physrevlett.100.120801](https://doi.org/10.1103/physrevlett.100.120801).
- [52] Weil JA, Bolton JR. *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*. 2nd ed., Hoboken: Wiley-Interscience; 2007, p. 520–9.
- [53] Chechik V, Carter E, Murphy D. *Electron Paramagnetic Resonance*, Oxford (Oxford Univ Press): 2016, p. 10-4,18-21, 87–8.
- [54] Stoll S, Schweiger A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *Journal of Magnetic Resonance* 2006;178:42–55. [doi:10.1016/j.jmr.2005.08.013](https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013).

- [55] Que L. Chapter 3: Electron Paramagnetic Resonance of Metalloproteins. *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism*, Sausalito, CA: Univ. Science Books; 2010.
- [56] McPherson A, Gavira JA. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* 2013;70:2–20. doi:10.1107/s2053230x13033141.
- [57] McPherson A. Protein Crystallization. *Methods in Molecular Biology* 2017:17–50. doi:10.1007/978-1-4939-7000-1_2.
- [58] Lattman EE, Loll PJ. *Protein crystallography: A concise guide*. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2008.
- [59] Cooper RI. Symmetry in Crystallography. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* 2016:401–7. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.12140-7.
- [60] Nespolo M, Aroyo MI, Souvignier B. Crystallographic shelves: space-group hierarchy explained. *Journal of Applied Crystallography* 2018;51:1481–91. doi:10.1107/s1600576718012724.
- [61] Blow DM. *Outline of Crystallography for Biologists*. Oxford: Oxford University Press; 2002.
- [62] Weber PC. Physical Principles of Protein Crystallization. *Advances in Protein Chemistry* 1991;41:1–36. doi:10.1016/s0065-3233(08)60196-5.
- [63] Vekilov PG, Feeling-Taylor AR, Yau S-T, Petsev D. Solvent entropy contribution to the free energy of protein crystallization. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 2002;58:1611–6. doi:10.1107/s0907444902014312.
- [64] Coquerel G. Crystallization of molecular systems from solution: Phase diagrams, supersaturation and other basic concepts. *Chem Soc Rev* 2014;43:2286–300. doi:10.1039/c3cs60359h.
- [65] Forsythe EL, Maxwell DL, Pusey M. Vapor diffusion, nucleation rates and the reservoir to crystallization volume ratio. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 2002;58:1601–5. doi:10.1107/s0907444902014208.

- [66] Bragg WH, Bragg L. The Reflection of X-rays by Crystals. Proceedings of the Royal Society of London Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character 1913;88:428–38. [doi:10.1098/rspa.1913.0040](https://doi.org/10.1098/rspa.1913.0040).
- [67] Hersleth H-P, Andersson KK. How different oxidation states of crystalline myoglobin are influenced by X-rays. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 2010;1814:785–96. [doi:10.1016/j.bbapap.2010.07.019](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.07.019).
- [68] Abad-Zapatero C. Notes of a protein crystallographer: The legacy of J.-B. J. Fourier – crystallography, time and beyond. Acta Crystallographica Section D Structural Biology 2021;77:703–11. [doi:10.1107/s205979832100293x](https://doi.org/10.1107/s205979832100293x).
- [69] IX. Bakerian Lecture.— X-rays and Crystal Structure. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character 1915;215:253–74. [doi:10.1098/rsta.1915.0009](https://doi.org/10.1098/rsta.1915.0009).
- [70] Bragg L. X-ray Crystallography. Scientific American 1968;219:58–70. [doi:10.1038/scientificamerican0768-58](https://doi.org/10.1038/scientificamerican0768-58).
- [71] Patterson AL. A Fourier Series Method for the Determination of the Components of Interatomic Distances in Crystals. Physical Review 1934;46:372–6. [doi:10.1103/physrev.46.372](https://doi.org/10.1103/physrev.46.372).
- [72] Green DW, Ingram VM, Perutz MF. The Structure of Haemoglobin - IV. Sign Determination by the Isomorphous Replacement Method. Proceedings of the Royal Society of London Series A Mathematical and Physical Sciences 1954;225:287–307. [doi:10.1098/rspa.1954.0203](https://doi.org/10.1098/rspa.1954.0203).
- [73] Hodgkin DC, Kamper J, Lindsey J, MacKay M, Pickworth J, Robertson JH, et al. The Structure of Vitamin B12. I. An Outline of the Crystallographic Investigation of Vitamin B12. Proceedings of the Royal Society of London Series A Mathematical and Physical Sciences 1957;242:228–63. [doi:10.1098/rspa.1957.0174](https://doi.org/10.1098/rspa.1957.0174).
- [74] Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC. A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. Nature 1958;181:662–6. [doi:10.1038/181662a0](https://doi.org/10.1038/181662a0).

- [75] Scapin G. Molecular replacement then and now. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 2013;69:2266–75. doi:10.1107/s0907444913011426.
- [76] Evans P, McCoy A. An introduction to molecular replacement. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 2007;64:1–10. doi:10.1107/s0907444907051554.
- [77] Kleywegt GJ. Validation of protein crystal structures. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 2000;56:249–65. doi:10.1107/s0907444999016364.
- [78] Miller JM. *Chromatography: Concepts and Contrasts*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley; 2009.
- [79] Walker JM. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *The Protein Protocols Handbook* 2002:61–8. doi:10.1385/1-59259-169-8:61.
- [80] Evans DRH, Romero JK, Westoby M. Concentration of Proteins and Removal of Solutes. *Methods in Enzymology* 2009:97–120. doi:10.1016/s0076-6879(09)63009-3.
- [81] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook* 2005:571–607. doi:10.1385/1-59259-890-0:571.
- [82] Stoll S. Computational Modeling and Least-Squares Fitting of EPR Spectra. *Multifrequency Electron Paramagnetic Resonance* 2014:69–138. doi:10.1002/9783527672431.ch3.
- [83] Stoll S. CW-EPR Spectral Simulations: Solid State. *Methods in Enzymology* 2015:121–42. doi:10.1016/bs.mie.2015.06.003.
- [84] Pflugrath JW. Practical macromolecular cryocrystallography. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* 2015;71:622–42. doi:10.1107/s2053230x15008304.

9 Vedlegg

9.1 Produkt-til-sum identitetene

$$\sin(\alpha)\sin(\beta) = \frac{1}{2}[\cos(\alpha - \beta) - \cos(\alpha + \beta)]$$

$$\cos(\alpha)\cos(\beta) = \frac{1}{2}[\cos(\alpha - \beta) + \cos(\alpha + \beta)]$$

$$\sin(\alpha)\cos(\beta) = \frac{1}{2}[\sin(\alpha - \beta) + \sin(\alpha + \beta)]$$

9.2 Vekstmedium

Tabell 9. Innholdet i de ulike vekstmediene.

Vekstmedium (0.5L) - <i>LB</i> og <i>TB</i>					
	Gjærekstrakt (g)	Trypton (g)	NaCl (g)	Fosfatbuffer (mL)	50% glyserol (mL)
LB	2.5	5	5	-	-
TB	12	6	-	100	4

Begge mediene fyltes med ultrarent vann til et totalvolum på 0.5L

9.3 Buffere

Tabell 10. Innholdet i de ulike bufferløsningene.

Bufferløsninger							
	MOPS	Imidazol	NaCl	Glyserol	Fytinsyre	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄
Lyseringsbuffer	20mM	20mM	500mM	5%	-	-	-
CPD kløyvingsbuffer	20mM	20mM	500mM	5%	1mM	-	-
Elueringsbuffer	20mM	500mM	500mM	5%	-	-	-
Lagringsbuffer	20mM	-	-	-	-	-	-
Fosfatbuffer	-	-	-	-	-	170mM	720mM

Alle løsningene ble tilberedt med ultrarent vann og pH-justert til 7.4.

9.4 Magasininnhold

Tabell 11. Det totale antallet av- og betingelsene til de ulike krystallene som ble sendt til bestråling.

Innholdet i hver av de fire puckene sendt til røntgen-krystallografi

#	Nr. 1				Nr. 2				Nr. 3				Nr. 4			
1	Mu	Cu	Oks	-	Mu	Cu	Red	-					Mu	Ni	Red	NO ₂
2	Mu	Cu	Oks	-	Mu	Cu	Red	-					VT	Cu	Red	-
3	Mu	Cu	Oks	-	Mu	Ni	Red	-					VT	Cu	Oks	-
4	Mu	Cu	Oks	-	Mu	Ni	Red	-					Mu	Cu	Oks	-
5	Mu	Ni	Oks	-	VT	Ni	Red	-								
6	Mu	Ni	Oks	-	VT	Ni	Red	-								
7	Mu	Ni	Oks	-	VT	Cu	Red	-								
8	Mu	-	-	-	VT	Cu	Red	-								
9					Mu	Cu	Red	-	Mu	Ni	Oks	NO ₂				
10					Mu	Cu	Red	-	Mu	Ni	Oks	NO ₂				
11					Mu	Ni	Red	-	VT	Ni	Oks	NO ₂				
12					VT	Ni	Red	-	VT	Ni	Oks	NO ₂				
13					VT	Cu	Red	-	Mu	Cu	Oks	NO ₂				
14					Mu	Cu	Oks	-	Mu	Cu	Oks	NO ₂				
15					VT	Ni	Oks	-	Mu	Cu	Oks	NO ₂				
16					VT	-	-	-	VT	Cu	Oks	-				

Mu: mutant F227Y; VT: villtype; Cu: kobbersaturert; Ni: nikkelsaturert; Oks: tilført oksidasjonsmiddel;
Red: tilført reduksjonsmiddel; NO₂: tilført KNO₂. Blanke felter inneholdt krystaller fra andre prosjekter.

9.5 Eksperimentelle EPR-parametre

Tabell 12. Frekvensen av mikrobølgene og effekten for de ulike EPR-målingene.

Eksperimentelle EPR-parametre		
	Mikrobølgefrequens (GHz)	Effekt (mW)
Kobberstandard	9.416437	0.5048
TyrBm villtype	9.418172	0.5069
TyrBm F227Y	9.416836	0.5084

9.6 Simulering av EPR-spektra

```
%% Tilpasning og simulering av EPR-spektra.

clear all, clc

[B,spkt,spkt_info] = eprload('spekter.DTA'); % Laster eksperimentelt spekter.
%spkt_smooth = datasmooth(spkt,10); % Utjevner eventuell stoy.

Exp.nPoints = numel(B); % Antallet maalinge/datapunkter i mengden.
Exp.mwFreq = 9.416836; % Frekvensen til mikrobolgene.
Exp.Range = [min(B)*0.1 max(B)*0.1];
% Rekkevidden med omgjoring fra Gauss til mT.

FitOpt.nTrials = 10^8; % Termineringskriteriet; antallet utregninger.
%FitOpt.Method = 'montecarlo int'; % Spesifisert i grafisk brukergrensesnitt.
%FitOpt.Method = 'simplex int'; % Spesifisert i grafisk brukergrensesnitt.
%FitOpt.Scaling = 'lsq0'; % Spesifisert i grafisk brukergrensesnitt.

%Opt.Method = 'hybrid'; % Metode.
Opt.Method = 'perturb'; % Metode.
Opt.nKnots = [19 0];
% Inkrementer mellom 0 og 90 grader. "19" tilsvare 5 graders okninger.

Sys.Nucs = 'N,N,N,Cu'; % Kjente atomkjerner i komplekset.

Sys.HStrain = [0.5 100 30]; % Uoppklarte hyperfine interaksjoner.
Sys.gStrain = [0.01 0.06 0.07]; % Varasjon knyttet til g.
Sys.AStrain = [0.01 200 200]; % Variasjon knyttet til A.

% Diagonalene i A-tensorene til hhv. N,N,N,Cu.
Sys.A = [0.46 98.29 41.30; 32.14 26.76 52.21;...
         51.16 20.39 58.08; 12.83 72.26 -517.86];
Sys.g = [2.048 2.072 2.269]; % Diagonalen til g-tensoren.

% Storrelsen paa sokerommet.
Vary1.g = [0.02 0.02 0.02];
Vary1.A = [20 20 20; 20 20 20; 20 20 20; 20 20 20];
Vary1.HStrain = [0.5 50 50];
Vary1.gStrain = [0.01 0.06 0.07];
Vary1.AStrain = [0.01 50 50];

esfit('pepper',spkt, Sys, Vary1, Exp, Opt, FitOpt);
% Initierer det grafiske brukergrensesnittet med tilpasning/simulering.
```


9.7 Simulerte EPR-verdier

```
%% Simulerte verdier - kobberstandard

g = [2.07160, 2.07180, 2.36841];
A = [-10.0869, 43.9585, -443.968];

gStrain = [0.00996519, 0.0466167, 0.0486354];
AStrain = [0.122607, 179.961, 179.615];
HStrain = [2.56879, 87.8964, 0.185970];

%% Simulerte verdier - TyrBm villtype

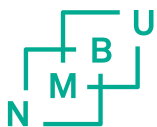
g = [2.05807, 2.08973, 2.25959];
A1 = [39.5336, 109.721, 105.350]; %N
A2 = [35.6440, 32.1673, 97.9807]; %N
A3 = [33.3121, -8.23581, 68.4055]; %N
A4 = [3.74751, 57.8138, -546.901]; %Cu

gStrain = [0.0129910, 0.0999702, 0.0392411];
AStrain = [0.0122114, 495.664, 149.380];
HStrain = [0.0336135, 61.6004, 34.1236];

%% Simulerte verdier - TyrBm mutant F227Y

g = [2.04653, 2.07460, 2.28184];
A1 = [3.54863, 100.995, 81.2835]; %N
A2 = [20.3653, 7.58798, 23.0554]; %N
A3 = [46.7662, 26.4076, 53.5483]; %N
A4 = [33.7101, 56.6834, -530.140]; %Cu

gStrain = [0.0114539, 0.0487411, 0.0976192];
AStrain = [0.0139183, 343.215, 259.513];
HStrain = [0.527856, 25.7108, 25.6644];
```



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway