

**PROTEIN DYNAMICS:  
LOCAL AND COLLECTIVE MOTIONS  
INVESTIGATED BY FLASH PHOTOLYSIS AND  
DYNAMICS SIMULATIONS**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
**Yu Weiming**  
M.Sc. Academia Sinica  
B.Sc. University of Science and Technology at Shanghai  
born May 17th, 1964  
citizen of The People's Republic of China

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. K.H. Winterhalter, examiner  
Prof. Dr. W.F. van Gunsteren, co-examiner  
Dr. E.E. Di Iorio, co-examiner



CatE

# SUMMARY

The dynamics of some heme proteins in relation with their functional properties have been investigated. Flash photolysis measurements over broad temperature ranges have been carried out in the presence of 75% glycerol on the myoglobin from the buccal muscle of *Aplysia limacina* and on two structurally related mutants of sperm whale (*Physeter catodon*) myoglobin mutants, namely the *His(E7)Val* and *His(E7)Val-Thr(E10)Arg* Mb. The mutants are obtained by site directed mutagenesis to mimic the structure of the heme pocket of *Aplysia* myoglobin.

The flash photolysis data have been analyzed in terms of multiple kinetic components. At temperatures below the solvent glass transition, two activation enthalpy distributed processes are needed to fit the experimental traces in all three proteins. The thermal evolution of the fitting parameters, namely the peak position and the width of the enthalpy distributions as well as the relative amplitude for each kinetic process, show that the two mutants are quite different, in terms of low and high temperature kinetic behavior, from *Aplysia* myoglobin. We attribute this to differences in the balance between local structure at the active site and global motions in the three systems investigated.

Molecular dynamics simulations have also been performed on the isolated human hemoglobin subunits in the CO bound state, using sperm whale myoglobin, also in the carbonyl form, as reference. From the last 100 ps of simulations, out of a total of 150 ps, three structural elements have been analyzed in detail, namely the iron out of heme plane displacement, the azimuthal angle  $\phi$ , i.e. the angle formed by the projection of the imidazole plane of the proximal histidine on the heme with the axis going through the nitrogen atoms N(I) and N(III) of the tetrapyrrole ring, and the tilting angle  $\theta$ , formed by the plane of the proximal histidine with the heme plane. These structural elements had been previously proposed to play an important role in regulating heme reactivity [Friedman et al., 1990]. Also the global dynamic properties of the three proteins have been carefully analyzed, particularly for what concerns the collective behavior of atomic motions. There is a remarkable agreement between the outcome of the simulations and previous flash photolysis data referring to the same proteins.

## Zusammenfassung

Die Moleküldynamik einiger Hämproteine wurde im Zusammenhang mit ihren funktionalen Eigenschaften untersucht. Experimente mit Blitzlichtphotolyse wurden über einen weiten Temperaturbereich in der Gegenwart von 75% Glycerin an Myoglobin aus der Backenmuskulatur von *Aplysia limacina* ausgeführt. Des Weiteren wurden zwei strukturverwandte Myoglobinmutanten des Pottwals (*Physter catodon*) untersucht. Es handelte sich dabei um das *His(E7)Val* und *His(E7)Val-Thr(E10)Arg* Myoglobin. Diese Mutanten, welche die Struktur der Häm-Tasche von *Aplysia* Myoglobin nachahmen, wurden durch ortsspezifische Mutagenese erhalten.

Die Daten der Blitzlichtphotolyse wurden unter dem Gesichtspunkt von multiplen kinetischen Komponenten untersucht. Bei Temperaturen unterhalb des Flüssigkeits-Glass Überganges benötigt man zwei aktivierungsenergieverteilte Prozesse, um die experimentellen Ergebnisse von allen drei Proteinen annähern zu können. Die thermische Evolution der Näherungsparameter wie die Peakposition, die Breite der Enthalpieverteilung, so wie die Amplitude für jeden kinetischen Prozess zeigen, daß die beiden Mutanten im Vergleich zu dem *Aplysia* Myoglobin ein sehr unterschiedliches Verhalten in der Hoch- und Tieftemperaturkinetik aufweisen. Wir führen dies auf Unterschiede im Gleichgewicht zwischen lokalen Strukturen der aktiven Stelle und den globale Bewegungen in den drei untersuchten Systemen zurück.

Simulationen der Moleküldynamik wurden ebenfalls an einer isolierten menschlichen Hämoglobinuntereinheit, an der Kohlenmonoxid gebunden war, durchgeführt. Als Referenz wurde ebenfalls carbonylgebundenes Myoglobin des Pottwales verwendet. Von den letzten 100 ps der Simulation, bis hin zu einer Totalzeit von 150 ps, wurden drei Strukturelemente im Detail analysiert. Es handelt sich hierbei um den azimutalen Winkel  $\phi$ , der durch die Projektion der Imidazolebene vom benachbarten Histidin des Häms und der Achse, die durch die beiden Stickstoffatome N(I) und N(III) geht, aufgespannt wird. Des Weiteren wurde der Neigungswinkel  $\theta$  bestimmt, der durch die Ebene des benachbarten Histidines mit der Hämebene gebildet wird. Diese Strukturelemente wurde bereits schon früher für eine wichtige Rolle in der Regulierung der Hämaktivität vorgeschlagen [Friedman et al., 1990]. Ebenfalls sind die globalen dynamischen Eigenschaften der drei Proteine sorgfältig untersucht worden, insbesondere was das kollektive Verhalten der Atombewegungen anbelangt. Es ergab sich eine bemerkenswerte Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Simulationen und den zuvor erwähnten Resultaten der Blitzlichtphotolyse, welche den gleichen Proteinen entsprachen.