



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Parkinson's protein α -synuclein : membrane interactions and fibril structure

Kumar, P.

Citation

Kumar, P. (2017, June 27). *Parkinson's protein α -synuclein : membrane interactions and fibril structure*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/50076>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/50076>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/50076> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Kumar, Pravin

Title: Parkinson's protein α -synuclein : membrane interactions and fibril structure

Issue Date: 2017-06-27

Samenvatting

Het eiwit α -Synuclein (α S) speelt een rol bij de ziekte van Parkinson. Als een zogenaamd 'intrinsically disordered' eiwit, heeft α S in oplossing geen gedefinieerde structuur. Wel kan het eiwit een α -helix structuur aannemen, wanneer het bindt aan membranen, en β -sheets vormen, wanneer het aggregereert tot amyloid fibrillen. Tevens ondergaat het eiwit modificaties zoals fosforylering, wat belangrijk is voor het functioneren van het eiwit. Om eiwitten te bestuderen, die niet volledig gestructureerd zijn, voldoen de meeste beschikbare methoden niet. Wij hebben electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopie gebruikt en de toepasbaarheid voor dit doel onderzocht. In hoofdstuk 1 wordt het α S eiwit geïntroduceerd en worden de EPR methodes beschreven, die in dit proefschrift zijn gebruikt.

Het eiwit α S functioneert via interactie met vesicles/membranen in zenuwcellen in de hersenen, wat verondersteld wordt cruciaal te zijn voor zowel de pathologische als de fysiologische functies van het eiwit. Onderzoek suggereert dat modificaties zoals fosforylering een rol spelen bij de ziekte van Parkinson, omdat deze modificaties de binding van α S aan membranen moduleren. In hoofdstukken 2 en 3 beschrijven we de binding van α S aan membranen. Membranen worden gebruikt in de vorm van vesicles van verschillende grootte en samenstelling, om zoveel mogelijk de omstandigheden in cellen na te bootsen. We plaatsen een spin-label op de gewenste posities op het eiwit en na mengen met vesicles volgen we de lokale membraanbinding. Wanneer membraanbinding optreedt wordt het spin-label geïmmobiliseerd en gedetecteerd door middel van 9 GHz EPR.

Hoofdstuk 2 beschrijft de studie van de interactie van α S met twee nagebootste natuurlijke membranen, namelijk het binnenste mitochondriële membraan (IMM)

Samenvatting

en het neuronale plasma membraan (NPM). We stellen vast dat α S goed bindt aan de twee natuurlijke membranen, wat verrassend is gezien hun lage ladingsdichtheid op het oppervlak. Het blijkt dat het deel van het eiwit dat zwak bindt aan modelmembranen, juist goed bindt aan deze natuurlijke membranen. Dit verrassende resultaat was aanleiding om te kijken of de membraangebonden vorm van α S de langgerekte of de hoefijzer conformatie heeft. Om dergelijke structurele informatie te verkrijgen, hebben we de afstand gemeten tussen twee posities op het α S eiwit, in feite tussen twee paramagnetische labels, door middel van gepulsde EPR technieken. Het merendeel van het eiwit blijkt de langgerekte conformatie te hebben. De hoefijzer conformatie vertoont bij binding aan natuurlijke membranen een grotere openingshoek dan eerder gevonden voor modelmembranen.

In hoofdstuk 3, bespreken we het effect van fosforylering op de binding van α S aan modelmembranen. Het effect van fosforylering op de posities S87 en S129, waarvan eerder vastgesteld was dat deze een effect hebben op membraanbinding en aggregatie van α S, is onderzocht door dezelfde methode van spin-labeling te gebruiken als beschreven in hoofdstuk 2. We laten zien dat fosforylering op positie S87 tot gevolg heeft dat α S niet volledig, maar alleen op bepaalde posities op het eiwit, loslaat van het membraan; fosforylering op positie S129 vertoont geen effect op membraanbinding.

De hoofdstukken 4 en 5 zijn gewijd aan bestudering van de kenmerkende eigenschap van α S om fibrillen te vormen. Fibrillen van α S worden vooral aangetroffen in Lewy bodies, die karakteristiek zijn voor de ziekte van Parkinson. In fibrillen is de α S eiwitketen op een speciale manier gevouwen. Kennis van deze vouwing is van belang om er achter te komen welke aminozuren cruciaal zijn voor fibrilvorming. Dit is het onderwerp waarop we focuseren in hoofdstuk 5. Om de

Samenvatting

interne vouwing van α S in fibrillen te bepalen, vormen we fibrillen van α S eiwit, dat we op twee posities voorzien hebben van spin labels. Vervolgens meten we de afstand tussen de labels door middel van een gepulste EPR methode, double electron-electron resonance (DEER) genoemd. We gebruiken voor de fibrilvorming een reeks α S eiwitten, waarbij paren van spin-labels op specifieke posities, verspreid over de aminozuurketen, aangebracht zijn. We hebben, door negatieve kleuring toe te passen, met transmissie elektronen microscopie (TEM) bekeken of alle eiwitconstructen leiden tot fibrillen met vergelijkbare morfologie, zoals beschreven is in hoofdstuk 4. De fibrillen van alle eiwitconstructen blijken inderdaad vergelijkbare morfologie te hebben. Voor de vouwing van α S in fibrillen hebben we acht lange-afstands vouwingscriteria gevonden, verdeeld over het gehele β -sheet vormende deel van de α S eiwitketen, van aminozuur 42 tot 90. Op basis van deze resultaten kunnen we in de toekomst een model creëren van de interne vouwing van α S, zoals deze voorkomt in fibrilvorm.

Een ander aspect, dat beschreven wordt in hoofdstuk 6, focuseert op peptiden die een rol spelen bij membraanfusie. Membraanfusie kan bewerkstelligd worden door constructen, die bestaan uit een lipide-anker segment en een coiled-coil zipper ('rits') segment. We richten ons op het coiled-coil segment van het fusiecomplex. We maken gebruik van twee kleine peptiden, K and E, met helix structuur. De twee peptiden vormen coiled-coil structuren, wanneer ze samengevoegd worden. We onderzoeken de structuur en de oriëntatie van de individuele peptiden door EPR methodes toe te passen. We concluderen dat de E/K peptiden in een parallelle oriëntatie in de heterodimeer vorm voorkomen, en dat de K peptiden een parallelle homodimeer vormen. Dit laatste resultaat is niet eerder gevonden. Dit onderzoek opent de weg om de moleculair eigenschappen van het gehele membraanfusiesysteem in de toekomst in kaart te brengen.

Samenvatting

Dit proefschrift laat zien dat EPR geschikt is om de structuur van niet volledig gevouwen eiwitten te bepalen, wat met andere methoden moeilijk te realiseren is. Omdat de aanwezigheid van vesicles geen belemmering is, is EPR ook geschikt om biologische processen, zoals membraanfusie, op te helderen.