



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Spin-label EPR on Disordered and Amyloid Proteins

Hashemi Shabestari, M.

Citation

Hashemi Shabestari, M. (2013, April 16). *Spin-label EPR on Disordered and Amyloid Proteins*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20749>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/20749>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20749> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Hashemi Shabestari, Maryam

Title: Spin-label EPR on disordered and amyloid proteins

Issue Date: 2013-04-16

SAMENVATTING

Het werk beschreven in dit proefschrift betreft nieuwe methoden om de aggregatie van eiwitten te onderzoeken met elektron-paramagnetische-resonantie (EPR) spectroscopie, in het bijzonder van eiwitten die fibrillen vormen. Daartoe zijn zowel experimenten met continue microgolffexcitatie (cw) als experimenten met gepulste microgolffexcitatie uitgevoerd. Als paramagnetische sensoren zijn nitroxide spinlabels gebruikt. In hoofdstuk 1 worden de gebruikte EPR methoden beschreven. De hoofdstukken 2 tot en met 4 betreffen de aggregatie van het amyloid β ($A\beta$) peptide. In hoofdstuk 5 wordt de structuur van het α -Synuclein (αS) eiwit in het corresponderende fibril beschreven. Hoofdstuk 6 betreft de conformatie van een ongeordend gebied in een eiwit, hoofdstuk 7 de spin-spin wisselwerking in een reeks van modelpeptiden.

In hoofdstuk 2 tot en met 4 beschrijven wij de aggregatie van het $A\beta$ peptide. Dit peptide speelt een rol bij de ziekte van Alzheimer. In deze hoofdstukken komen twee aspecten aan de orde: de invloed van het membraan, dat wij nabootsen met natrium dodecyl sulfaat (SDS), en de rol van kortere $A\beta$ fragmenten. Met behulp van EPR kunnen wij de veranderingen in het reactiemengsel ten gevolge van de aanwezigheid van verschillende hoeveelheden SDS op de tijdschaal van aggregatie volgen.

In hoofdstuk 2 laten wij zien dat de $A\beta$ aggregaten, die aanwezig zijn in de afwezigheid van SDS, steeds kleiner worden naarmate de concentratie van SDS toeneemt, totdat bij SDS concentraties boven de kritische-micel-concentratie (CMC) een monomeer, micel-gebonden vorm van $A\beta$ als enige overblijft, de "één $A\beta$ /micelle" toestand.

In hoofdstuk 3 richten wij ons op SDS concentraties onder de CMC. Door gebruik te maken van twee verschillende posities van het label, wordt het effect van de lokale mobiliteit van het spin label geëlimineerd. Dit is belangrijk voor de interpretatie van de resultaten bij deze SDS concentraties. Bij de laagste concentraties SDS draagt de N-terminus van $A\beta$ bij aan de oplossing van $A\beta$ aggregaten door zich te positioneren aan het deeltje/water-grensvlak. Bij hogere concentraties van SDS veranderen de $A\beta$ aggregaten in een SDS-opgeloste toestand, die een voorloper is van de " één $A\beta$ / micelle" toestand boven de CMC. In dit hoofdstuk laten we zien hoe uit parameters die de lokale mobiliteit reflecteren, globale eigenschappen van de $A\beta$ aggregaten kunnen worden afgeleid.

In hoofdstuk 4 beschrijven wij de mogelijkheid van aggregatie van twee kortere fragmenten, $A\beta_{15}$ en $A\beta_{16}$, en hun invloed op $A\beta_{40}$. De kortere $A\beta$ fragmenten

trekken veel aandacht, in het bijzonder in relatie tot het zoeken naar remmers van A β aggregatie. De rol van deze kortere fragmenten in de aggregatie van A β 40 staat echter nog ter discussie. In hoofdstuk 4 laten wij zien dat geen van de korte fragmenten, A β 15 noch A β 16, op zichzelf aggregeren en dat zij geen invloed hebben op de aggregatie van A β 40.

Bij het gebruik van EPR zijn hoge peptide concentraties niet te vermijden. Bij deze hoge concentraties vormen A β 40 peptiden binnen enkele minuten aggregaten en fibrillen. Maar zelfs deze sterke neiging tot aggregeren kan door SDS worden onderdrukt. Bovendien komt boven de CMC het A β voor als monomeer. Daarnaast hebben wij geleerd dat de globale eigenschappen van A β aggregaten afhankelijk zijn van de SDS concentratie.

In hoofdstuk 5 onderzoeken wij het α S eiwit, dat soortgelijke fibrillen kan vormen als A β . Dit eiwit speelt een rol bij de ziekte van Parkinson. In dit hoofdstuk richten wij ons op de fibril vorm van α S. Een reeks van α S eiwitten wordt gebruikt met twee spin labels op verschillende posities. Na de vorming van de fibrillen wordt de afstand tussen die paren in het fibril gemeten in een gepulst EPR experiment met gebruikmaking van de zogenoemde DEER methode. Uit onze resultaten bleek dat de N-terminus van het α S eiwit tot aan residue 27 ongestructureerd is en zich uitstrekt weg van de kern van het fibril. Gebaseerd op drie van de gemeten intramoleculaire afstanden stellen wij een model op voor de vouwing van een aanzienlijk deel van de kern van het fibril.

In hoofdstuk 6 onderzoeken wij het “light-harvesting” complex CP29 met behulp van cw EPR en gepulste EPR. Het CP29 eiwit speelt een belangrijke rol in de fotosynthese, het proces waarbij zonne-energie wordt omgezet in chemische energie. Dit eiwit heeft een ongeordend deel van ongebruikelijke lengte, ongeveer 100 aminozuren aan het N-terminale deel van het eiwit. Onlangs is de kristalstructuur van dit eiwit bepaald met behulp van Röntgen-diffractie, maar de structuur van de N-terminus bleef onbepaald.

In hoofdstuk 6 laten wij zien dat de N-terminus van CP29 gedeeltelijk gestructureerd is en dat daarin vijf gebieden herkend kunnen worden die verschillen in hun dynamiek. Twee gebieden zijn relatief meer immobiel, en een van de immobiele gebieden heeft het karakter van een α -helix, en is in contact met de bulk van het eiwit. Dit immobiele deel wordt geflankeerd door meer dynamische gebieden (“loops”). Wij speculeren dat de verschillende conformaties belangrijk zijn voor de interacties met andere “light-harvesting” complexen, waardoor het eiwit tussen verschillende gebieden van het fotosynthetisch membraan kan schakelen om de plant te helpen zich aan verschillende lichtomstandigheden aan te passen.

In hoofdstuk 7 adresseren wij de spin-spin interactie in vloeibare oplossing bij kamertemperatuur. Hier gebruiken wij een reeks van rigide modelpeptiden voorzien van paren van TOAC spin labels. De paren van spin labels zijn gescheiden door drie, vier of vijf aminozuren.

Met behulp van deze rigide biradicaal peptiden kunnen wij de spin-spin interactie in deze peptiden systematisch karakteriseren en die interactie vergelijken met de structuur van het peptide. Wij bepalen de exchange-wisselwerking J van de twee spins. Voor geselecteerde peptiden meten wij ook de dipolaire interactie. De waarde van J neemt af met toenemende afstand van de twee TOAC residuen. Onze resultaten laten zien dat in deze spiraalvormige peptiden de “through-bond” bijdrage tot J groter is dan de “through-space” bijdrage; hierdoor heeft J nog een aanzienlijke grootte, zelfs bij een scheiding van de residuen van 12 Å. Hoewel voor biologische systemen studies in vloeibare oplossing geschikter zijn dan in de bevroren toestand, zien wij dat de informatie die wij kunnen krijgen in vloeibare oplossing niet eenduidig is. In het bijzonder geeft de exchange-wisselwerking geen directe afstands-informatie, dit in tegenstelling tot de dipolaire interactie. Meer informatie kan verkregen worden in de bevroren toestand, zoals aangetoond in de hoofdstukken 5 en 6 van dit proefschrift. Een combinatie van beide benaderingen is nodig om verschillende aspecten van de eiwitstructuur te begrijpen.

In dit proefschrift hebben wij laten zien hoe met behulp van EPR informatie kan worden verkregen met betrekking tot de structuur van eiwitten die moeilijk op een andere manier toegankelijk is. Daarmee dragen wij bij aan de bepaling van de moleculaire structuur van eiwitten.

