



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Electron paramagnetic resonance approaches to study biologically relevant reactions: examples from amyloid aggregation to enzymes

Passerini, L.

Citation

Passerini, L. (2025, September 2). *Electron paramagnetic resonance approaches to study biologically relevant reactions: examples from amyloid aggregation to enzymes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4259362>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4259362>

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

Samenvatting

Elektronenspinresonantie (EPR) spectroscopie is al lange tijd een waardevol hulpmiddel voor het bestuderen van biologische systemen. In enzymen – eiwitten die chemische reacties katalyseren – maakt EPR directe inzichten mogelijk in de elektronische en geometrische structuur van het actieve centrum en in het reactiemechanisme. De komst van *site-directed spin labeling* (SDSL), een techniek die spinlabels op specifieke posities van eiwitten aanbrengt, heeft de toepasbaarheid van EPR verder uitgebreid. Dit maakt onderzoek naar eiwitdynamica en structurele conformaties mogelijk, met name dankzij de vooruitgang in EPR-technieken en op maat gemaakte spinlabels. Dit proefschrift onderzoekt de toepassing van EPR-spectroscopie op biologische systemen, waarbij zowel technische als biochemische uitdagingen worden aangepakt.

Hoofdstuk 2 onderzoekt een lang over het hoofd geziene nevenreactie bij SDSL: de dimerisatie van het nitroxide-spinlabel MTSL. Eiwitlabeling wordt uitgevoerd door een mengsel van eiwit- en labeloplossing te incuberen. Onder gangbare labelomstandigheden kunnen twee MTSL-moleculen een dimeer vormen dat de labelingefficiëntie vermindert en leidt tot verspilling van het spinlabel. Door EPR te combineren met massaspectrometrie – een techniek die het mogelijk maakt om de moleculaire massa en chemische samenstelling van stoffen in oplossing te bepalen – worden de structuur en het vormingsmechanisme van het dimeer opgehelderd. De resultaten tonen aan dat dimerisatie via een disulfidebrug tot een covalent gekoppeld dimeer leidt. Dit proces is onomkeerbaar in de zin dat het label niet kan worden teruggewonnen. Deze nevenreactie, die al decennialang via haar EPR-signaal werd waargenomen maar nooit volledig werd begrepen, is nu duidelijk gekarakteriseerd en verklaard. Dit werpt licht op een hardnekkig probleem binnen het vakgebied van spinlabeling.

Hoofdstuk 3 onderzoekt met behulp van EPR de aggregatie van het eiwit α -Synucleïne (α S), een proces dat in neuronen plaatsvindt en dat in verband wordt gebracht met de ziekte van Parkinson. Er wordt aangenomen dat de toxische deeltjes bij deze ziekte oligomere intermediären zijn, die zich in de vroege stadia van α S-aggregatie vormen. Deze transiënte en structureel heterogene intermediären zijn moeilijk te bestuderen. Met behulp van SDSL-EPR werden α S-mutanten op specifieke residuen gelabeld en gevolgd tijdens de aggregatie. Door gebruik te maken van een standaard fluorescentie-assay die doorgaans wordt gebruikt om α S-aggregatie te monitoren, toont deze studie aan dat EPR het mogelijk maakt om de aggregatie *in situ* te volgen en om structurele veranderingen tijdens de vorming van intermediären tot aggregaten vast te leggen. Dit is bijzonder waardevol, aangezien traditionele assays deze intermediären niet kunnen detecteren. Deze aanpak vormt een veelbelovende methode om de moleculaire mechanismen van amyloïdevorming te bestuderen en om informatie over de structuur van aggregaten te verkrijgen.

Hoofdstuk 4 richt zich op de uitdagingen die zich voordoen bij het bestuderen van kortlevende reactie-intermediären in enzymen. Dit zijn overgangstoestanden die ontstaan terwijl een enzym een reactie uitvoert en die soms slechts enkele seconden of zelfs

milliseconden duren, wat de studie ervan uitdagend maakt. *Rapid freeze-quench* (RFQ)-technieken, waarbij een reactiemengsel snel wordt ingevroren, worden vaak gebruikt om deze tussenproducten te vangen en te stabiliseren, aangezien de meeste reacties bij lage temperatuur stoppen. De toepassing van RFQ op bepaalde EPR-technieken is een uitdaging, omdat een capillair van slechts 0,3 mm buitendiameter moet worden gevuld met een reactiemengsel bij lage temperatuur en daarna in een spectrometer moet worden overgebracht zonder opwarming. Dit hoofdstuk presenteert een reproduceerbare methode om monsters bij lage temperatuur voor te bereiden en in een zeer hoog veld EPR-spectrometer (275 GHz) te laden zonder ze bloot te stellen aan warmte, om de vorming van intermediären te voorkomen. Deze methode wordt aangetoond door gebruik te maken van het *small laccase*-enzym SLAC, dat reageert met zuurstof. Het enzym wordt onder stikstofatmosfeer bereid, gemengd met een zuurstofverzadigde oplossing en snel ingevroren. De oplossing wordt in een capillair overgebracht en vervolgens in de EPR-spectrometer geplaatst, waarbij de temperatuur laag wordt gehouden om verdere reactie te voorkomen. Deze methode blijkt te werken en levert reproduceerbare spectra op uit verschillende batches. De verkregen EPR-data, gecombineerd met conventionele technieken en simulaties, geven uiteindelijk een volledig beeld van de elektronische structuur van het SLAC-reactie-intermediär.

Hoofdstuk 5 behandelt de toepassing van DEER (*double electron-electron resonance*), een EPR-techniek, op twee supramoleculaire complexen die respectievelijk zes en acht Cu(II)-ionen bevatten. DEER wordt met name gebruikt om dipolaire interacties en de afstand tussen twee paramagnetische centra te meten, in dit geval Cu(II)-ionen. Het gebruik van DEER bij metaalionen brengt echter extra uitdagingen met zich mee, onder andere zwakkere signalen en snellere relaxatie. De systemen die in dit hoofdstuk worden bestudeerd, bevatten meerdere Cu(II)-ionen en dus ook meerdere interacties, wat kan leiden tot artefacten in de gemeten afstanden en fouten in structuurbepaling. Dit hoofdstuk biedt een uitgebreide analyse van deze uitdagingen en toont aan dat, ondanks zwakke signalen en spectrale complicaties, betrouwbare afstanden kunnen worden verkregen die overeenkomen met structurele modellen. Het onderzoek toont voor het eerst aan dat complexe multi-kopersystemen met DEER kunnen worden geanalyseerd, en dat de toepasbaarheid van deze methode kan worden uitgebreid naar enzymen en katalysatoren met meerdere metaalcentra.

Dit proefschrift lost enkele langbestaande problemen in de EPR op en biedt veelbelovende methodes voor de studie van (bio)chemische problemen in de toekomst.