

Struktur und Dynamik intrinsisch ungeordneter Proteine

Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

MALTE DRESCHER

Intrinsisch ungeordnete Proteine können je nach Umgebung verschiedenste Konformationen annehmen („Chamäleon-Proteine“). Häufig spielt intrinsische Unordnung eine Rolle bei Proteinen, die mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung stehen, beispielsweise das Parkinson-Protein Alpha-Synuclein. Klassische hochauflösende Methoden der Strukturklärung wie NMR-Spektroskopie oder Röntgenstrukturanalyse sind für intrinsisch ungeordnete Proteine nicht immer gut geeignet. Eine hervorragende Alternative bietet die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) in Kombination mit ortsspezifischer Spinmarkierung. Die rasante aktuelle Entwicklung dieser Methode wird zusammengefasst und ihre Leistungsfähigkeit am Beispiel des Alpha-Synucleins dargestellt.

Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) ist eine hochempfindliche, hochselektive und hochauflösende Methode zur Charakterisierung von Systemen mit ungepaarten Elektronen [1–3]. Für eine kurze Darstellung ihrer physikalischen Grundlagen und ihre Einordnung in das Gebiet der magnetischen Resonanzspektroskopie sei auf den Infokasten auf Seite 153 verwiesen.

Entwicklung der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Veraltet und entbehrlich?

Die ESR besitzt im Vergleich zur Kernspinresonanz-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance, NMR) eine höhere Empfindlichkeit, und die Spektren weisen im Vergleich zur optischen Spektroskopie und Schwingungsspektroskopie einen höheren Informationsgehalt auf. Trotzdem ist ESR vergleichsweise wenig verbreitet. Dies liegt daran, dass ESR nur ungepaarte Elektronen detektieren kann, die jedoch selten vorkommen, da chemische Bindung gerade auf der Bildung von Elektronenpaaren beruht.

Systeme mit ungepaarten Elektronen bezeichnet man als paramagnetisch, so dass im englischen Sprachgebrauch statt ESR häufig auch electron paramagnetic resonance

spectroscopy (EPR) synonym verwendet wird. Dementsprechend galten die ersten Experimente in der ESR insbesondere der Untersuchung von Reaktionsmechanismen über beteiligte instabile und reaktive Zwischenprodukte mit ungepaarten Elektronen.

In den 60er, 70er und 80er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde, wenn auch nur von wenigen Gruppen weltweit, umfangreiche Arbeit auf dem Gebiet der Methodenentwicklung geleistet. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die Bereiche Spinmarkierung, bei der stabile freie Radikale als Sonden verwendet werden, und gepulste Experimente zu nennen. Gepulste ESR-Experimente sind aufgrund der um Größenordnungen schnelleren Relaxation technisch ungleich schwieriger umzusetzen als in der NMR.

Diese wichtigen Entwicklungen blieben in der Chemie jedoch weitgehend unbemerkt, so dass sich ESR-Spektroskopie um 1990 den Ruf einer veralteten, etwas sonderbaren Methode, die nur auf einige ausgewählte Systeme angewendet werden könne, eingehandelt hatte. Viele Chemiefakultäten hielten ESR für entbehrlich.

Ideal für intrinsisch ungeordnete Proteine

Auf den Grundlagen, die vor über zwanzig Jahren gelegt wurden, beruht die momentane, rasante Entwicklung von ESR und das stetig wachsende Interesse an der Methode. Ansätze aus der gepulsten NMR werden in die ESR übertragen, so dass eine Vielzahl von Experimenten zur Verfügung steht, die es erlauben, unterschiedliche Wechselwirkungen des Elektronenspins mit seiner Umgebung voneinander zu trennen [3].

In der Strukturbiologie werden mit ortsspezifischer Spinmarkierung (site-directed spin labeling, SDSL) diamagnetische (d. h. keine ungepaarten Elektronen enthaltende) Proteine der Untersuchung mit ESR zugänglich gemacht [4]. Letzteres führt dazu, dass die Einschränkung, nur ungepaarte Elektronen detektieren zu können, in einen Vorteil umgemünzt werden kann, denn auch in komplexen Systemen kann der Ursprung des Signals so zweifelsfrei zugeordnet werden.

Gezielte Spinmarkierung ist analog auch für Lipide, DNA oder RNA, aber auch für synthetische Makromoleküle etabliert [5]. Nichtsdestotrotz ist das momentan größte Anwendungsgebiet der SDSL-ESR die Biostrukturforschung.

Die wichtigsten Methoden auf diesem Gebiet sind Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie. Beide liefern die beeindruckenden, hoch aufgelösten Strukturen, die unsere Vorstellung von biologischen Makromolekülen geprägt haben. Können diese beiden Methoden jedoch nicht angewendet werden, stehen nur wenige Informationen zur Verfügung. Dies ist beispielsweise für Membranproteine, die schwierig zu kristallisieren und aufzukonzentrieren sind, der Fall. Da ESR keine kristallinen Proben und nur geringe Konzentrationen benötigt, ist die Strukturaufklärung von Membranproteinen eine wichtige ESR-Anwendung.

Die hochauflösenden Methoden der Strukturaufklärung wie Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie beruhen auf dem Paradigma, dass jedes Atom seinen wohldefinierten Platz in der Struktur hat. Sie eignen sich deshalb weniger gut für intrinsisch ungeordnete Proteine (IDPs, siehe Kasten), deren Struktur stark von der Umgebung abhängt [6]. SDSL-ESR Spektroskopie ist gerade für die Untersuchung von IDPs eine äußerst leistungsstarke Methode, wie hier nach einer allgemeinen Einführung in das Gebiet der SDSL-ESR am Beispiel des IDP Alpha-Synuclein erläutert werden soll.

Ortsspezifische Spinmarkierung

Besonders verbreitete Spinmarker sind Nitroxide der allgemeinen Form $\cdot\text{O-NR}_1\text{R}_2$ [7]. Das ungepaarte Elektron, das für die ESR-Spektroskopie benötigt wird, ist dabei über die N-O-Bindung delokalisiert, wobei etwa 60 % der Spindichte auf das Sauerstoffatom entfallen.

Nitroxide sind sehr stabil, so können sie beispielsweise monatelang ohne besondere Vorkehrungen gelagert werden. Diese Stabilität wird vor allem durch die sterische Abschirmung des ungepaarten Elektrons durch Methylgruppen erreicht. Andere Teile des Moleküls können so modifiziert werden, dass der Spinmarker an das zu untersuchende Makromolekül angebunden werden kann. Ist dieses Makromolekül, was häufig der Fall ist, diamagnetisch, also ohne weiteres paramagnetisches Zentrum, wird das ESR-Spektrum allein durch den Spinmarker erzeugt.

Beispielhaft sei eine weit verbreitete Strategie zur ortsspezifischen Spinmarkierung von Proteinen dargestellt. Sie setzt auf den gezielten Einbau von Cysteinen mittels Mutagenese und anschließende Modifizierung der charakteristischen Sulfhydrylgruppe mit spezifischen Markern wie MTSSL (Methanthsulfonat-Spinlabel, Abbildung 1). Die Erfahrung von Markierungen unzähliger Sequenzpositionen in vielen Proteinen zeigt, dass dieser kleine Nitroxidspinmarker nur minimalen Einfluss auf Proteinstruktur und -funktion ausübt, gleichzeitig aber äußerst sensitiv auf die lokale Umgebung reagiert. Dennoch sind wie bei allen Untersuchungen mit Markern Kontrollexperimente unerlässlich.

Spinmarker und was man mit ihnen messen kann

Mittels ESR-Experimenten an spinmarkierten Makromolekülen sind folgende Parameter direkt zugänglich [8]:

- die Polarität der Umgebung des Spinmarkers

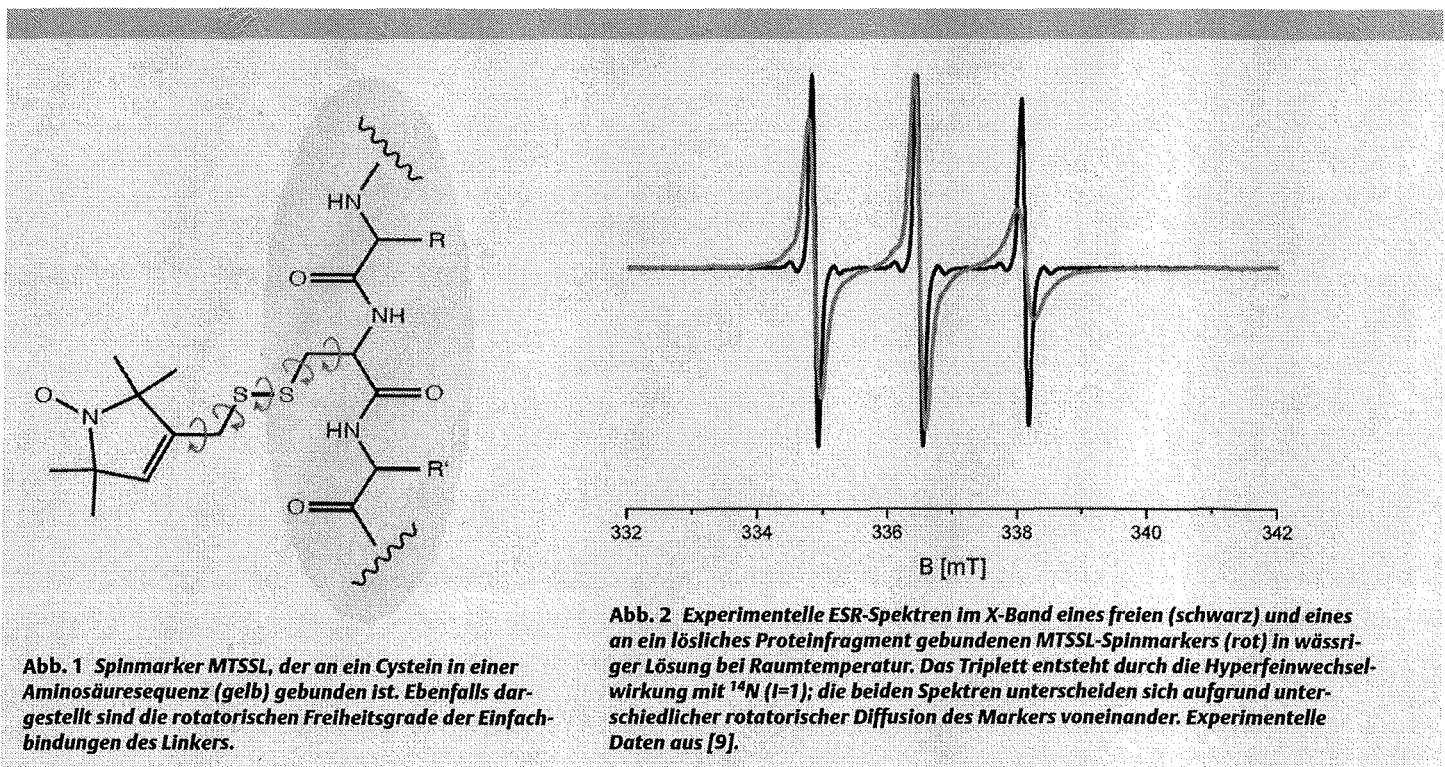


Abb. 1 Spinmarker MTSSL, der an ein Cystein in einer Aminosäuresequenz (gelb) gebunden ist. Ebenfalls dargestellt sind die rotatorischen Freiheitsgrade der Einfachbindungen des Linkers.

Abb. 2 Experimentelle ESR-Spektren im X-Band eines freien (schwarz) und eines an ein lösliches Proteinfragment gebundenen MTSSL-Spinmarkers (rot) in wässriger Lösung bei Raumtemperatur. Das Triplett entsteht durch die Hyperfeinwechselwirkung mit ^{14}N ($I=1$); die beiden Spektren unterscheiden sich aufgrund unterschiedlicher rotatorischer Diffusion des Markers voneinander. Experimentelle Daten aus [9].

- die Mobilität der Seitenkette
- die Lösemittel- oder Sauerstoffzugänglichkeit
- die Abstände zu anderen paramagnetischen Zentren – seien es ein zweiter Spinmarker oder ein Metallion, entweder im selben oder in einem benachbarten Makromolekül

Das typische ESR-Spektrum eines Nitroxid-Spinmarkers wird durch die Hyperfeinwechselwirkung mit dem Stickstoffkern ^{14}N geprägt. Aufgrund dessen Kernspin ($I = 1$) stellt sich das Spektrum im X-Band, d. h. bei einer Frequenz von $\nu \approx 10$ GHz, in wässriger Lösung bei Raumtemperatur als Triplett dar (Abbildung 2). ESR-Spektren werden mit einer Lock-in-Technik aufgenommen. Dazu wird das statische Magnetfeld moduliert und das ESR-Signal über einen schmalbandigen Bandpassfilter detektiert, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Deshalb wird das Spektrum oft – wie auch in der Abbildung – als erste Ableitung des Absorptionssignals dargestellt.

Die Hyperfeinwechselwirkung des ungepaarten Elektrons des Nitroxids mit dem Stickstoffkern, die sich im Spektrum in der Aufspaltung zwischen den drei Linien widerspiegelt, ist in guter Näherung proportional zur Spindichte am Stickstoffatom. Da der mesomere Grenzzustand, bei dem das ungepaarte Elektron am Stickstoffatom lokalisiert ist, einem großen Bindungsdipolmoment entspricht, wird dieser in polarer Umgebung stabilisiert. Deshalb führt eine polare Umgebung zu einer größeren Stickstoffhyperfeinkopplung.

Im üblicherweise verwendeten homogenen externen magnetischen Feld ist das ESR-Signal unabhängig von der

räumlichen Position des Nitroxids, so dass translatorische Bewegung und Diffusion nicht beobachtet werden. Da aber besonders die Hyperfeinwechselwirkung anisotrop ist, hängt die Form des ESR-Spektrums stark von der Orientierung des Nitroxids relativ zum externen Magnetfeld ab. Deshalb ist es im Allgemeinen möglich, rotatorische Diffusion der Spinsonde zu beobachten. In Abbildung 2 können so leicht das Spektrum des freien Spinmarkers in Lösung (schwarz) und das des an ein lösliches Proteinfragment gebundenen Markers (rot) mit geringerer rotatorischer Diffusion unterschieden werden.

Die Kollisionsrate mit paramagnetischen Löschern ist über deren Einfluss auf die Relaxation des Nitroxidlabels zugänglich. So kann über die Zugänglichkeit von hydrophoben oder hydrophilen Löschern auf die Sekundärstruktur von Proteinen geschlossen werden. Ein allgegenwärtiger Löcher ist Triplett-Sauerstoff, der viel besser in apolarer Umgebung wie Lipid-Doppelschichten als in Wasser löslich ist. Über Relaxationsmessungen kann so zwischen membran- und lösemittel-exponierten Residuen unterschieden werden.

Besonderes Aufsehen erregt hat in den letzten Jahren die Möglichkeit, Abstände zwischen Spinmarkern zu vermessen [10]. Mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen können Abstände zwischen einem und zehn Nanometern gemessen werden. Bei geeigneter Datenanalyse sind auch Abstandsverteilungen zugänglich, so dass flexible Strukturen oder parallel vorliegende Konformationen untersucht werden können. Während für die komplementäre Technik

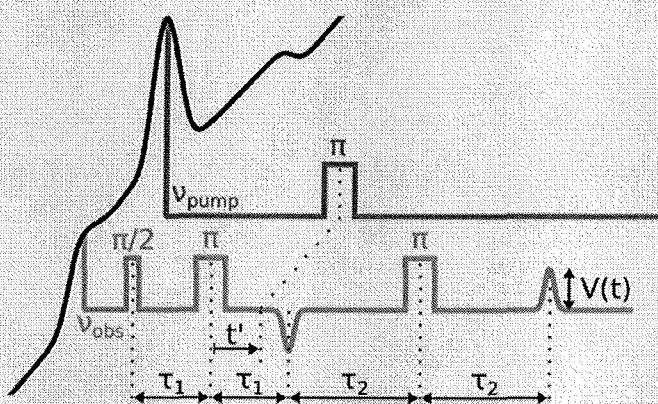


Abb. 3 Pulssequenz für das totzeitfreie Vierpuls-DEER-Experiment. Innerhalb des Nitroxidspektrums (schwarz, links) werden Spins auf einer Beobachterfrequenz (A-Spins, rot) und einer Pumpfrequenz (B-Spins, blau) angeregt. Die Intensität $V(t)$ des refokussierten Echos in Abhängigkeit von der zeitlichen Position t (mit $t = t' - \tau_1$) des Pumpimpulses ist mit der Dipol-Dipol-Wechselwirkungsfrequenz zwischen A- und B-Spins moduliert.

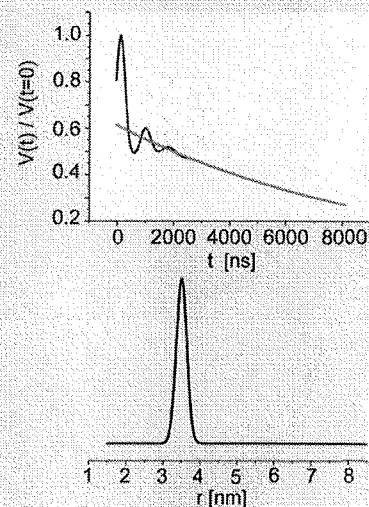


Abb. 4 Oben: Simulierte DEER-Kurve, bei der die normierte Echointensität $V(t)/V(t=0)$ über der zeitlichen Position des Pumpimpulses t aufgetragen ist. Deutlich sichtbar ist die Modulation des Signals aufgrund der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen A- und B-Spins. Intermolekulare Wechselwirkungen führen zu einem überlagerten Abfall (orange). Unten: Zugehörige Abstandsverteilung.

FRET (Förster Resonanzenergietransfer), die zur Abstandsmessung in Proteinen weit verbreitet ist, zwei unterschiedliche, vergleichsweise große Chromophore benötigt werden, die darüber hinaus noch entsprechend dem erwarteten Abstand ausgewählt werden müssen, kommen ESR-Abstandsmessungen mit zwei kleinen, identischen Spinmarkern aus, die über einen großen Abstandsbereich präzise Messungen ermöglichen. Je nach Fragestellung und experimenteller Strategie sind intra- und intermolekulare Abstände zugänglich. So können doppelt-markierte Makromoleküle zur Messung von intramolekularen Abständen genutzt werden, für Abstandsmessungen zwischen Molekülen verwendet man eine Einfachmarkierung.

Die Grundlage der Abstandsmessungen mit ESR ist die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Elektronenspins, die proportional zu $1/r^3$ vom Abstand r abhängt. Darüber hinaus ist sie jedoch auch vom Winkel zwischen externem Magnetfeld und Spin-Spin-Verbindungsvektor abhängig. Schnelle Orientierungsänderung des Spin-Spin-Vektors, also beispielsweise schnelle rotatorische Diffusion des doppelt-spinmarkierten Proteins in Lösung, mittelt über alle Orientierungen und damit die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zu null. Deshalb werden Abstandsmessungen nahezu ausschließlich in gefrorener, glasartiger Lösung durchgeführt, nämlich an einem Schnappschuss der makromolekularen Konformationen, der durch Schockgefrieren erhalten wird. Dadurch eröffnet sich zudem die Möglichkeit, die Temperatur im Hinblick auf die ESR-Relaxationszeiten zu optimieren. In solchen glasartigen Lösungen, z. B. wässrige Lösung mit Glycerol, beobachtet man eine zufällige Verteilung der Molekülorientierungen, so dass das dipolare Spektrum aus einer Überlagerung aller Orientierungen des Spin-Spin-Vektors besteht.

Für Abstände unterhalb von zwei Nanometern übersteigt die Dipol-Dipol-Kopplung die inhomogene Linienbreite des ESR-Spektrums. Eine Verbreiterung der Spektren ist die Folge, so dass es möglich ist, Abstände direkt aus dem Spektrum abzuleiten. Für Abstände, die größer sind als zwei Nanometer, ist die Dipol-Dipol-Kopplung zu klein, um zu einer signifikanten Verbreiterung der ESR-Spektren zu führen. In diesem Fall muss die Dipol-Dipol-Wechselwirkung von konkurrierenden Wechselwirkungen getrennt werden, was üblicherweise durch gepulste Experimente geschieht. Das mit Abstand verbreitetste Verfahren ist Doppel-Elektron-Elektron-Resonanz (DEER), gelegentlich auch als PELDOR für pulsed electron double resonance bezeichnet.

DEER war ursprünglich als Drei-Puls-Sequenz eingeführt worden, die später auf eine totzeitfreie Vierpuls-Variante erweitert wurde, die heutzutage nahezu ausschließlich verwendet wird [11]. Die Pulssequenz ist in Abbildung 3 gezeigt. Das Nitroxidspektrum in gefrorener Lösung weist eine spektrale Breite von etwa 180 MHz auf, so dass spektral nicht überlappende Pulse bei zwei Frequenzen eingestrahlt werden können, die die in der Probe vorhandenen Spins in A- und B-Spins aufteilen. Daher kann ein System bestehend aus Elektronenspins A (Beobachterspins) und B (gepump-

te Spins), die die Resonanzfrequenzen ν_{obs} beziehungsweise ν_{pump} aufweisen, diskutiert werden. Dementsprechend adressiert die Pulssequenz bei ν_{obs} nur die A-Spins, der Puls mit der Frequenz ν_{pump} klappt nur die B-Spins. Mit der Beobachter-Frequenz wird zunächst eine Zwei-Puls-Hahn-Echo-Sequenz eingestrahlt; das resultierende Echo ist mit negativer Phase dargestellt. Ein dritter Puls mit gleicher Frequenz führt zu einem refokussierten Echo der A-Spins. Um die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zu den B-Spins zu messen, wird zwischen den beiden π -Pulsen der Beobachtersequenz ein Pump-Puls eingestrahlt, der die B-Spins invertiert. Diese Invertierung führt zu einer Änderung des lokalen Magnetfelds am Ort der A-Spins. Strahlt man nun den Pump-Puls zu verschiedenen Zeiten t ein, wird die Intensität des refokussierten Echos $V(t)$ mit der Frequenz der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen A- und B-Spin ω_{dd} moduliert. Üblicherweise wird die Intensität $V(t)$ gegen die Zeit t aufgetragen und als DEER-Kurve bezeichnet (Abbildung 4).

MAGNETISCHE RESONANZ

Viele Atome und insbesondere alle elementaren Materieteilchen, z. B. Elektronen, besitzen einen Eigendrehimpuls, einen sogenannten Spin. Eine korrekte Beschreibung gelingt nur im Rahmen der Quantenmechanik, im Prinzip jedoch bewirkt dieser Spin, dass sich die Teilchen zum einen wie Kreisel verhalten und darüber hinaus mit einem magnetischen Dipolmoment ausgestattet sind, also mit Miniaturstabmagneten zu vergleichen sind.

Aufgrund des magnetischen Dipolmoments können sich die Spins in einem von außen angelegten Magnetfeld ausrichten. Die Orientierung eines Spins parallel beziehungsweise antiparallel zum Magnetfeld entspricht dabei zwei energetisch unterschiedlichen Zuständen, deren Energiedifferenz direkt proportional zur Stärke des angelegten Magnetfelds ist und von der Art des spintragenden Teilchens abhängt. Übergänge können durch die Einstrahlung einer elektromagnetischen Welle induziert werden, deren Frequenz gemäß der Resonanzbedingung $\Delta E = h\nu$ dieser Energiedifferenz entspricht.

Absorptionsmessungen können deshalb ganz analog zu optischen Experimenten zum Nachweis der magnetischen Resonanz eingesetzt werden und werden als continuous-wave-Experimente bezeichnet. Bei gepulsten Experimenten werden kurze Strahlungspulse eingesetzt, deren Trägerfrequenz die Resonanzbedingung näherungsweise erfüllt. Ein solcher Strahlungspuls klappt die Spins aus ihrer Gleichgewichtslage, danach beginnen die Spins im Magnetfeld mit einer Präzessionsbewegung, vergleichbar mit schnell rotierenden Kreiseln, die man etwas in Schiefelage bringt. Diese hochfrequente Präzessionsbewegung kann für eine gewisse Zeit – man spricht von Relaxationszeit – detektiert werden. Die Präzessionsfrequenz (Larmorfrequenz) und diejenige der detektierten elektromagnetischen Welle entspricht – bei unverändertem Magnetfeld – wiederum der des Anregungspulses.

In der Kernspinresonanz-(NMR-)Spektroskopie sind die spintragenden Teilchen die Atomkerne, meist die der Wasserstoffatome. Nutzt man Elektronen, spricht man von Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie. Zwei wesentliche Unterschiede lassen sich zwischen der NMR- und der ESR-Spektroskopie festmachen: Zum einen liegen bei gleicher Magnetfeldstärke die zur Erfüllung der Resonanzbedingung notwendigen Frequenzen in der ESR um knapp drei Größenordnungen über denen der Protonenkernspinresonanz. Zum zweiten kann die Relaxationszeit der Wasserstoffkerne im Idealfall einige Sekunden betragen, die Elektronen antworten oft nur für Millionstel Sekunden. Insbesondere die kurzen Relaxationszeiten begründen die im Vergleich zur NMR-Spektroskopie weit hinterherhinkende Entwicklung der gepulsten ESR-Spektroskopie.

In der ESR verwendet man meist Magnetfelder, bei denen die Resonanzbedingung durch eine Mikrowelle erfüllt wird. Durch die Radartechnologie ist die Mikrowellentechnik im sogenannten X-Band ($\nu \approx 10$ GHz) besonders ausgereift und deshalb auch in der ESR weit verbreitet. Wie in der NMR geht die Entwicklung jedoch auch in der ESR zu höheren Feldern und Frequenzen.

In vielen Fällen ist man daran interessiert, den Abstand zweier Spin-Label innerhalb eines „Objekts“ zu bestimmen, beispielsweise zwischen zwei Spinsonden eines doppelt spinmarkierten Proteins. Dann müssen die dipolaren Wechselwirkungen zu den Spinmarkern benachbarter Moleküle eliminiert werden. Dies kann durch diamagnetisches Verdünnen, also Mischen mit nicht markierten Molekülen erreicht werden. Dennoch muss das Hintergrundsignal aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen bei der Auswertung der DEER-Kurve berücksichtigt werden. DEER-Kurven von Messungen an einfach spinmarkierten Molekülen oder theoretisch berechnete Funktionen, die von einer homogenen Verteilung der Moleküle ausgehen (Abbildung 4, oben, orange Kurve), können zur Korrektur verwendet werden. Die Daten nach dieser Korrektur werden häufig als Formfaktor bezeichnet.

Die Abstandsverteilung zwischen den Spinmarkern erhält man mittels Analyse des Formfaktors. Sie kann entweder modellfrei oder auf Grundlage eines Modells der Abstandsverteilung erfolgen. Einfache Modelle für Abstandsverteilungen sind beispielsweise eine oder mehrere Gaußkurven. Da es sich um ein zumindest leicht unterbestimmtes Problem handelt, muss für den modellfreien Ansatz ein mathematisches Verfahren verwendet werden, das als Tikhonov-Regularisierung bezeichnet wird und über die Wahl eines Regularisierungsparameters einen Kompromiss zwischen einer Glätte der Abstandsverteilung und Anpassung an die (verrauschten) experimentellen Daten optimiert.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass der Abstand der Spindichten der Nitroxide, der mittels DEER sehr genau bestimmt werden kann, vom entsprechenden Abstand des Protein-Rückgrats abweicht. Grund dafür ist, dass die verwendete Spinmarkierung MTSSL einen Linker mit mehreren Einfachbindungen besitzt, der mehrere Rotamere ermöglicht und deshalb keine eindeutige Konformation aufweist (Abbildung 1). Dies verkompliziert Rückschlüsse auf die Konformation des Proteins, kann aber durch eine Modellierung näherungsweise kompensiert werden.

Typische Probenvolumina für Abstandsmessungen im X-Band sind einige zehn Mikroliter bei Mindestkonzentrationen von einigen zehn Mikromol pro Liter. Die Messzeit für ein DEER-Experiment beträgt typischerweise mehrere Stunden. Abstandsmessungen mittels ESR-Spektroskopie sind also vergleichsweise aufwendig, da eine DEER-Messung im Gegensatz zu NMR-Experimenten üblicherweise nur *einen* Abstand liefert. Dementsprechend lohnt sich ihr Einsatz nur, wenn Informationen gewonnen werden können, die mit anderen Methoden nicht zugänglich sind. Dies soll im Folgenden am Parkinson-Protein Alpha-Synuclein erläutert werden.

Das Parkinson-Protein Alpha-Synuclein: Ein Chamäleon

Ein Paradebeispiel für IDPs ist das aus 140 Aminosäuren aufgebaute Alpha-Synuclein, das den Hauptbestandteil der für die Parkinsonsche Krankheit charakteristischen Lewy-

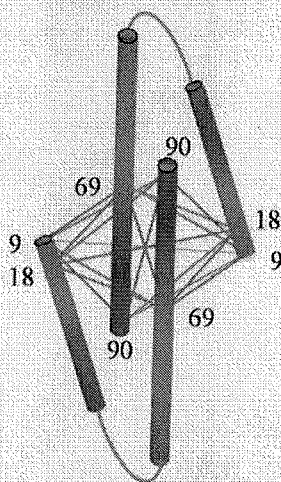
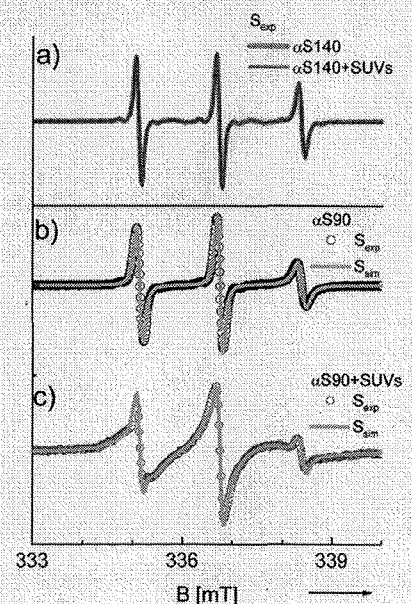


Abb. 5 Einfaches Modell für ein Alpha-Synuclein-Dimer im Fall lipid-induzierter Aggregation [14]. Eingezeichnet sind die zugrunde liegenden inter- und intramolekularen Abstände, die mit DEER-Experimenten erhalten wurden. Der Übersichtlichkeit wegen ist der an der Lipidbindung nicht beteiligte C-Terminus nicht dargestellt.

Abb. 6 Continuous-wave-ESR-Spektren von spinmarkiertem Alpha-Synuclein bei Raumtemperatur im X-Band. a): Die ESR-Spektren von an Rest 140 (C-Terminus) spinmarkiertem Alpha-Synuclein frei in Lösung (rot) und im membrangebundenen Zustand (blau) sind unverändert. b), c): Bei an Residuum 90 spinmarkiertem Alpha-Synuclein sind die experimentellen ESR-Spektren (blau) frei in Lösung (b)) und nach Membranbindung (c)) aufgrund der Unterschiede in der rotatorischen Diffusion des Spinmarkers deutlich verschieden. Eine spektrale Simulation (orange) kann zur quantitativen Auswertung verwendet werden. Daten aus [15].



Körperchen bildet [12]. Parkinson ist die häufigste altersbedingte Bewegungsstörung und die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit überhaupt. Alpha-Synuclein mit seiner Aggregationsneigung und seiner hohen konformativen Flexibilität ist nicht nur ein Modellsystem für IDPs, sondern auch gut geeignet, um die molekularen Prozesse von Parkinson und ähnlichen Krankheiten zu untersuchen.

Alpha-Synuclein nimmt je nach Umgebung unterschiedlichste Konformationen an, darunter den intrinsisch ungefaltete Zustand in Lösung sowie verschiedene α -helikale Konformationen und β -Faltblattstrukturen. Die exakte physiologische Funktion des Proteins ist noch unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass sie mit Membranbindung zusammenhängt. Alpha-Synuclein bindet bevorzugt an negativ geladene Membranen.

Aggregation

Verschiedene neurodegenerative Krankheiten sind mit der Aggregation von Proteinen in amyloide Fibrillen verbunden. Man vermutet, dass die Aggregation von Alpha-Synuclein über Zwischenprodukte in amyloide Fibrillen der toxische, die Krankheit auslösende Mechanismus ist.

Zur Aufklärung der Struktur von Alpha-Synuclein-Fibrillen wurden einfach spinmarkierte Alpha-Synuclein-Derivate verwendet. Menschliches Alpha-Synuclein enthält keine Cysteine, so dass einfach sowie doppelt spinmarkierte Alpha-Synuclein-Varianten erhalten werden können, indem Cysteine gezielt durch Mutagenese eingebracht und anschließend mit MTSSL spinmarkiert werden. Spinmarkiertes

Alpha-Synuclein weist nach der Aggregation die gleiche Fibrillen-Morphologie wie nicht modifiziertes Alpha-Synuclein auf, und Mischen beider Spezies zeigt, dass beide die gleichen Konformationen innerhalb einer Fibrille annehmen. Dies bestätigt die Beobachtung, dass amyloide Fibrillen generell Spinmarkierung mit MTSSL gut tolerieren.

Intermolekulare Abstandsmessungen an einem umfangreichen Satz verschiedener einfach spinmarkierter Alpha-Synuclein-Moleküle belegen, dass der Kern von Alpha-Synuclein-Fibrillen aus parallel angeordneten Molekülen besteht, bei denen die gleichen Residuen jeweils direkt übereinander gestapelt sind [13]. Dieser Kernbereich wird durch die Aminosäuren 36 bis 98 gebildet und ist dicht gepackt, während der N-Terminus strukturell heterogen und der C-Terminus komplett ungefaltet ist.

Alpha-Synuclein kann die Membranstruktur beeinflussen und kleine, unilamellare Vesikel sogar zerstören. Inter- und intramolekulare Abstandsmessungen unter solchen Bedingungen erlauben den Rückschluss, dass Alpha-Synuclein Aggregate bildet, sobald es mit den Vesikeln in Kontakt kommt. Auf Grundlage solcher Abstandsmessungen wurde ein einfaches Modell für lipidinduzierte Aggregate vorgeschlagen, das aus zwei Alpha-Synuclein-Molekülen in engem Kontakt besteht, aber auch Baustein für größere Aggregate sein könnte (Abbildung 5) [14].

Protein-Membran-Wechselwirkung

Bei der Aufklärung der physiologischen Funktion von Alpha-Synuclein steht jedoch nicht die Aggregation, sondern viel-

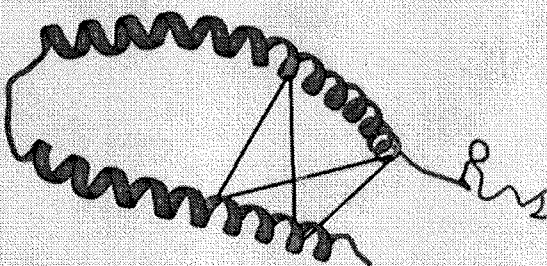


Abb. 7 NMR-Struktur von Mizellen-gebundenem Alpha-Synuclein (Hufeisenkonformation). Die beiden antiparallelen Alpha-Helices sind im Kontakt zur Mizelle, der 40 Aminosäuren lange C-Terminus (ganz rechts) ist ungebunden. DEER-Messungen (schwarze Linien) können zur Bestimmung des Helix-Helix-Abstands herangezogen werden.

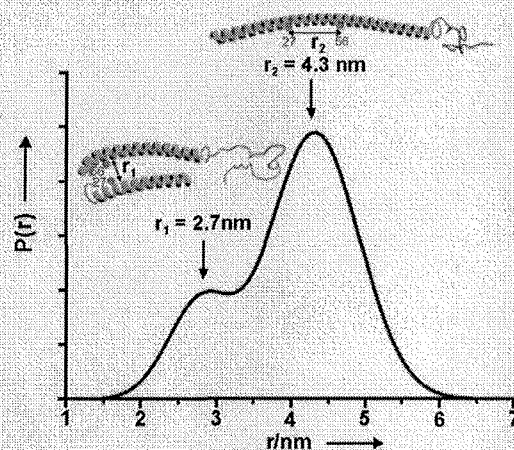


Abb. 8 Abstandsverteilung zwischen Spinmarkern an Residuum 27 und 56 von Alpha-Synuclein, das an eine Phospholipidmembran gebunden ist. Die bimodale Abstandsverteilung zusammen mit weiteren Abstandsmessungen belegt das gleichzeitige Vorhandensein der Hufeisenkonformation und einer ausgestreckten Helix. Abbildung aus [17].

mehr die Wechselwirkung mit Membranen im Fokus. Oft werden künstliche Phospholipid-Membranen für ESR-Experimente verwendet.

Der N-Terminus von Alpha-Synuclein enthält sieben Wiederholeinheiten mit jeweils elf Aminosäuren. Nach Binden an negativ geladene Membranen ändert sich das ESR-Spektrum von Spinsonden an Residuen innerhalb dieses Bereichs deutlich, während keine Änderungen für Spinmarkierungen an den letzten 40 Aminosäuren beobachtet werden (Abbildung 6). Dies belegt, dass der C-terminale Teil des Proteins an der Membranbindung nicht beteiligt ist (Abbildung 7). Wertet man die spinmarkierten Residuen der Reihe nach bezüglich Lösemittelzugänglichkeit und rotatorischer Mobilität aus, kann zwischen Residuen auf der Membran- und auf der Wasserseite der Membran-Wasser-Grenzfläche unterschieden werden und so die Bildung einer Helix, bei der jeweils elf Aminosäuren drei helikale Windungen bilden, nachgewiesen werden.

Eine quantitative Beschreibung der Spektren von spinmarkiertem Alpha-Synuclein (Abbildung 6) mittels numerischer Simulation benötigt eine spektrale Simulation mit zwei Komponenten: $S = (1-a)S_1 + aS_2$.

Eine Komponente entspricht dem Spektrum des spinmarkierten Residuums in Abwesenheit von Membranen S_1 , eine zweite Komponente S_2 mit reduzierter rotatorischer Mobilität beschreibt das membrangebundene Residuum. Während S_1 in einem separaten Versuch experimentell bestimmt werden kann, erhält man a und S_2 durch Anpassen an die experimentellen Daten. a spiegelt die lokale Bindungsaffinität wider, so dass bei systematischer Variation der Oberflächenladungsdichte der Membran eine ortsaufgelöste Beschreibung der Membran-Protein-Wechselwirkung möglich ist.

So kann gezeigt werden, dass die Bindung von Alpha-Synuclein an künstliche Phospholipidmembranen durch den N-Terminus initiiert wird [15]. Ein komplementärer ESR-Ansatz, auf den hier nur am Rande hingewiesen wer-

den soll, nutzt spinmarkierte Lipide, um Alpha-Synuclein-Membran-Wechselwirkungen zu untersuchen [16].

Konformationen von membrangebundenem Alpha-Synuclein

Die bekannte hufeisenförmige Struktur von lipidgebundenem Alpha-Synuclein wurde mittels NMR erhalten (Abbildung 7). Da NMR bezüglich der Größe des untersuchten Komplexes limitiert ist, wurde die Studie an Alpha-Synuclein auf Mizellen mit einem Durchmesser von etwa fünf Nanometern durchgeführt. Wie erwähnt weicht die Geometrie von Mizellen deutlich von der organellischer Membranen ab. So könnte es allein der typische Mizellendurchmesser von nur fünf Nanometern sein, der die Hufeisen-Form von Alpha-Synuclein erzwingt, denn eine ausgestreckte Einzelhelix benötigte eine Länge von etwa fünfzehn Nanometern.

Tatsächlich konnte durch Abstandsmessungen mittels DEER gezeigt werden, dass der Abstand der beiden antiparallelen α -Helices der Hufeisen-Konformation von der Mizellen-Geometrie abhängt [17]. Da DEER nicht bezüglich der Größe des zu untersuchenden Komplexes limitiert ist, können DEER-Experimente auch an Alpha-Synuclein, das an künstliche Phospholipidmembranen gebunden ist, durchgeführt werden.

So wurde mit ESR-Abstandsmessungen gezeigt, dass für mehrere doppelt spinmarkierte Alpha-Synuclein-Varianten der jeweilige mittlere Abstand einer ausgestreckten Alpha-helix übereinstimmt. Die Möglichkeit von DEER, nicht nur mittlere Abstände, sondern auch Abstandsverteilungen zu messen, konnte verwendet werden, um einen direkten Nachweis für die Koexistenz der Hufeisenform und der ausgestreckten Helix für membrangebundenes Alpha-Synuclein zu erbringen (Abbildung 8) [18]. Dies zeigt, dass auf wenig gekrümmten Membranen die ausgestreckte Helix die überwiegend vorliegende Konformation ist, die Hufeisenkonformation jedoch kein reines Artefakt aufgrund der Mizellengeometrie.

Intrazelluläre ESR?

Da die Faltung von Alpha-Synuclein so sensibel von seiner Umgebung abhängt, ist es von großem Interesse, die Konformationen in der lebenden Zelle zu bestimmen.

Dem trägt die aktuelle Methodenentwicklung in der ESR-Spektroskopie Rechnung: Erst vor kurzem ist es gelungen, an Modellsystemen mittels DEER Abstände zu messen, um Konformationen in lebenden Zellen aufzuklären [19–21]. Dabei wurden spinmarkierte Moleküle mittels Mikroinjektion in die Zelle eingebracht und anschließend vermessen.

Gegenüber der bekannten In-Cell-NMR bietet intrazelluläre ESR zwei Vorteile: Man detektiert kein Hintergrundsignal von diamagnetischen Makromolekülen in der Zelle und es können physiologische Konzentrationen von Alpha-Synuclein eingesetzt werden.

Falls es gelingt, intrazelluläre ESR-Spektroskopie auf Alpha-Synuclein anzuwenden, so sollte man mit dieser neuen

INTRINSISCH UNGEORDNETE PROTEINE

Intrinsisch ungeordnete Proteine (intrinsically disordered proteins, IDPs) werden aufgrund ihrer strukturellen und funktionalen Besonderheiten als eigene Proteinklasse betrachtet, deren Bedeutung zunehmend wächst.

Mehr als 30 % der eukaryotischen Proteine sind IDPs. Sie besitzen keine klar definierte dreidimensionale Faltung, sondern weisen eine bemerkenswerte Flexibilität hinsichtlich ihrer Konformation auf. In Lösung unter physiologischen Bedingungen sind sie ungefaltet, wechselwirken sie mit anderen zellulären Komponenten wie Membranen oder anderen Proteinen, falten sie sich in geordnete Konformationen. Es liegt nahe, dass diese Eigenschaft es ihnen ermöglicht, vielfältige Wechselwirkungen einzugehen und ihre Konformation der jeweils benötigten Funktion anzupassen, weshalb sie auch als Chamäleon-Proteine bezeichnet werden.

Intrinsische Unordnung ist häufig bei Proteinen anzutreffen, die in Verbindung mit neurodegenerativen Krankheiten stehen. Berühmte Vertreter der IDPs sind das Alzheimer Peptid A β , das Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) oder das in diesem Artikel besprochene Alpha-Synuclein.

Technik der Aufklärung der physiologischen und pathophysiologischen Funktion dieses intrinsisch ungeordneten Proteins den vielleicht entscheidenden Schritt näherkommen können.

Danksagung

Der Autor bedankt sich bei Dr. Martina Huber und Prof. Vinod Subramaniam für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit auf dem Gebiet der intrinsisch ungeordneten Proteine. Der DFG wird für finanzielle Unterstützung (DR 743/2-1, SFB 969) gedankt.

Zusammenfassung

ESR hat während der letzten zwei Jahrzehnte einen enormen methodischen und instrumentellen Fortschritt erfahren, insbesondere in den Bereichen gepulste ESR und Doppelresonanztechniken. Oft kombiniert mit ortsspezifischer Spinmarkierung finden diese Methoden Anwendungen in verschiedensten Gebieten der Chemie und vor allem der Biostrukturforschung. Am Beispiel des intrinsisch ungeordneten Parkinson-Proteins Alpha-Synuclein wird die Leistungsfähigkeit moderner ESR-Spektroskopie illustriert.

Summary

During the last two decades electron paramagnetic resonance (EPR) witnessed a tremendous methodological and instrumental development, in particular in the areas of pulsed EPR and double resonance techniques. Often in combination with site-directed spin-labeling these techniques are applied within different subdisciplines in chemistry and in particular in biostructure research. Applications on the intrinsically disordered protein Alpha-Synuclein associated with Parkinson's disease are used to illustrate the potential of modern EPR spectroscopy.

Schlagwörter

Elektronenspinresonanzspektroskopie, intrinsisch ungeordnete Proteine, DEER, Ortsspezifische Spinmarkierung, Alpha-Synuclein

Literatur

- [1] J. A. Weil, J. R. Bolton und J. E. Wertz, *Electron Paramagnetic Resonance*, Wiley, New York, 1994.
- [2] N. M. Atherton, *Principles of Electron Spin Resonance*, Ellis Horwood, New York, 1993.
- [3] A. Schweiger und G. Jeschke, *Principles of pulse electron paramagnetic resonance*, Oxford University Press, Oxford, 2005.
- [4] z. Bsp. W. L. Hubbell und C. Altenbach, *Curr Opin Struct Biol* 1994, 4:566 oder J. Feix und C. Klug, *Site-directed spin labeling of membrane proteins and peptidemembrane interactions*, in: *Biological magnetic resonance*, Band 14 (Hrsg: L. J. Berliner), Plenum Press, New York, 1998.
- [5] z. Bsp. L. J. Berliner und J. Reuben, *Spin labeling – theory and application*, in: *Biological magnetic resonance*, Band 8. Academic, New York, 1989.
- [6] z. Bsp. P. Tompa, *Trends Biochem. Sci.* 2002, 27, 527.
- [7] z. B. G. I. Likhtenshtein, J. Yamauchi, S. Nakatsuji, A. I. Smirnov und R. Tamura, *Nitroxides*, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- [8] z. Bsp. EPR-Spectroscopy, Applications in Biology and Chemistry (Hrsg. M. Drescher, G. Jeschke), Springer-Verlag, Heidelberg, 2012.
- [9] S. Domingo Köhler, A. Weber, S. P. Howard, W. Welte und M. Drescher, *Prot. Sci.* 2010, 19, 625.
- [10] z. B. L. J. Berliner, S. S. Eaton und G. R. Eaton, *Distance measurements in biological systems by EPR*, in: *Biological magnetic resonance*, Band 19, Academic, New York, 2002.
- [11] A. D. Milov, A. B. Ponomarev und Y. D. Tsvetkov, *Chem Phys Lett* 1984, 110:67 und M. Pannier, S. Veit, A. Godt, G. Jeschke und H. W. Spiess, *J. Magn. Reson.* 2000, 142, 331.
- [12] z. Bsp. M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M. Y. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes und M. Goedert, *Nature* 1997, 388, 839.
- [13] z. Bsp. I. Karyagina, S. Becker, K. Giller, D. Riedel, T. M. Jovin, C. Griesinger und M. Bennati, *Biophys J.* 2011, 101, L1.
- [14] M. Drescher, B. van Rooijen, G. Veldhuis, V. Subramaniam und M. Huber, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 4080.
- [15] M. Drescher, F. Godschalk, G. Veldhuis, B. van Rooijen, V. Subramaniam und M. Huber, *ChemBioChem* 2008, 9, 2411.
- [16] z. Bsp. M. Ramakrishnan, P. H. Jensen und D. Marsh, *Biochemistry* 2003, 42:12919.
- [17] P. Borbat, T. F. Ramlall, J. H. Freed und D. Eliezer, *J Am Chem Soc* 2006, 128, 10004.
- [18] M. Robotta, P. Braun, B. van Rooijen, V. Subramaniam, M. Huber und M. Drescher, *ChemPhysChem* 2010, 12, 267.
- [19] R. Igarashi, T. Sakai, H. Hara, T. Tenno, T. Tanaka, H. Tochio und M. Shirakawa, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 8228.
- [20] I. Krstic, R. Hansel, O. Romainczyk, J. W. Engels, V. Dötsch und T. F. Prisner, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 5070.
- [21] M. Azarkh, O. Okle, V. Singh, I. T. Seemann, J. S. Hartig, D. R. Dietrich und M. Drescher, *Chembiochem* 2011, 12, 1992.

Der Autor



Malte Drescher, 1975 in Kiel geboren, schloss nach dem Studium der Physik an der Universität Karlsruhe (TH) dort 2005 seine Promotion zum Thema „Ortsaufgelöste Elektronenspinresonanz“ mit Auszeichnung ab. Mit einem DFG-Forschungsstipendium wandte er sich während eines Postdoc-Aufenthalts bei Prof. Edgar Groenen am Institut für Molekülphysik der Universität Leiden, Niederlande, biologischen Systemen zu. 2008 wurde er mit einem Emmy-Noether-Stipendium ausgezeichnet, seitdem leitet er eine Arbeitsgruppe in der Physikalischen Chemie an der Universität Konstanz. In Konstanz ist Malte Drescher Mitglied im Zukunftskolleg und arbeitet im Vorstand der Graduiertenschule Chemische Biologie.

Korrespondenzadresse:

Dr. Malte Drescher
Universität Konstanz
Fachbereich Chemie
Universitätsstraße 10
78457 Konstanz
E-Mail: Malte.Drescher@uni-konstanz.de