

## Strukturen von Peptidaggregaten erforscht mit dem neuen Freie-Elektronen-Laser des Fritz-Haber-Instituts

### Structures of peptide aggregates investigated with the new Fritz Haber Institute free electron laser

von Helden, Gert; Schöllkopf, Wieland; Pagel, Kevin

Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin

Korrespondierender Autor

E-Mail: [helden@fhi-berlin.mpg.de](mailto:helden@fhi-berlin.mpg.de)

---

#### Zusammenfassung

Durch die Kombination von verschiedenen Trennmethoden konnten mithilfe des Freie-Elektronen-Lasers des Fritz-Haber-Instituts Infrarotspektren von gröbenselektierten Aggregaten von Peptidionen in der Gasphase gemessen werden. Die Spektren erlauben Rückschlüsse auf den Faltungszustand der Peptide, der von helikal zu  $\beta$ -Faltblatt variiert. Dieser Ansatz zur Faltungsbestimmung in Peptid- und Proteinaggregaten könnte zukünftig zum besseren Verständnis von Protein-Fehlfaltung und Aggregation und von den dadurch verursachten Krankheiten beitragen.

#### Summary

The combination of several separation methods with the Fritz Haber Institute free electron laser has allowed to measure infrared spectra of size selected peptide-ion aggregates in the gas phase. The spectra reveal information on the peptides' folding states, varying between helical and  $\beta$ -sheet. In the future, this approach of determining folding in peptide and protein aggregates can, potentially, contribute to the better understanding of protein misfolding, aggregation and the hereby caused diseases.

#### Einleitung

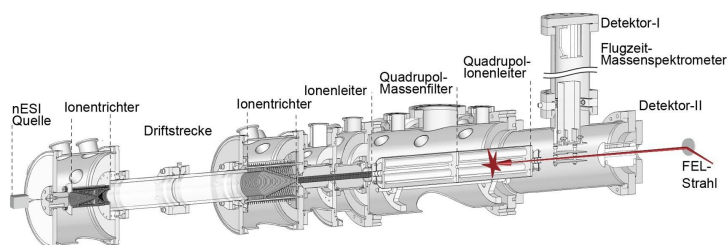
Das chemische und physikalische Verhalten von Molekülen und Materialien ist nicht allein durch deren Zusammensetzung, sondern maßgeblich auch durch die räumliche Anordnung der enthaltenen Bausteine bestimmt. Dies gilt besonders für biologische Moleküle wie zum Beispiel Proteine, bei denen die Funktion kritisch von der Faltung des Moleküls abhängt. Sollte es aus verschiedenen Gründen vorkommen, dass sich Proteine falsch falten, können diese entweder ihre Funktion verlieren oder es kommt zu schädlichen Auswirkungen und Krankheiten. Dies ist besonders bei einer Reihe von sogenannten *misfolding diseases* der Fall, zu denen Alzheimer, Parkinson und eine Reihe weiterer neurodegenerativer Erkrankungen zählen [1]. Wie es zu Fehlfaltungen kommt und was genau deren Auswirkungen sind ist Gegenstand von Untersuchungen in vielen Laboratorien weltweit. Oft wird beobachtet, dass sich die beteiligten Proteine aneinander lagern, aggregieren und unlösliche Fasern – sogenannte Fibrillen – bilden. Dies geht einher mit einer drastischen

Änderung der Proteinstruktur von einer primär helikalen Anordnung vor der Aggregation zu einer Faltblatt-Struktur in den Fibrillen. Während sowohl die Ausgangsproteine als auch die Fibrillen gut mit etablierten Methoden untersucht werden können, ist es schwierig die bei der Aggregation auftretenden Vor- und Zwischenstufen selektiv zu erforschen. Dabei sind es gerade diese aus nur wenigen Proteineinheiten bestehenden Zwischenprodukte, die im Verdacht stehen, die wahren neurotoxischen Spezies z. B. in der Alzheimer Krankheit zu sein.

Der Hauptgrund für die experimentellen Schwierigkeiten bei der Untersuchung von Zwischenprodukten ist, dass die Aggregate meist nicht in einer definierten Größe vorliegen. Stattdessen findet man meist eine dynamische Verteilung von Aggregaten mit unterschiedlicher Größe und Form für die mit etablierten experimentellen Methoden nur Durchschnittswerte ermittelt werden können. In einer Arbeitsgruppe am Fritz-Haber-Institut (FHI) werden neue experimentelle Methoden entwickelt, mit deren Hilfe Peptid- und Proteinaggregate mit definierter Größe und Form selektiv untersucht werden können. Ziel ist es dabei, die molekularen Grundlagen der Aggregation und Strukturbildung besser zu verstehen und so den Weg für neue Ansätze zur Verhinderung der Fehlfaltung zu ebnet.

## Methoden

Den Kern der Entwicklungen bildet eine neuartige Kopplung von Massenspektrometrie (MS), Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) und dem FHI Freie-Elektronen-Laser (FHI FEL) [2]. Die Kombination von IMS und MS erlaubt es, die Größe (genauer den Kollisionsquerschnitt) der Teilchen durch Messung ihrer Gasphasenmobilität zu bestimmen. Gerade für Aggregate lassen sich aus diesen Daten sowohl Aussagen über die allgemeine Form von Teilchen, als auch über die Formänderungen im Wachstumsprozess ableiten [3]. IMS und MS sind jedoch nicht unmittelbar empfindlich gegenüber strukturellen Details wie zum Beispiel der Sekundärstruktur und ermöglichen deshalb keine Aussagen darüber ob z. B. die Zwischenprodukte der Aggregation eine Helikale- oder eine Faltblatt-Struktur besitzen. Um diese Lücke zu schließen kommt der FHI FEL zum Einsatz, mit dessen Hilfe Infrarotspektren (IR-Spektren) gemessen werden können. In der IR-Spektroskopie wird die Wellenlänge und die Intensität von Absorptionsbanden genutzt, um Informationen über die Sekundärstruktur zu erlangen. Für Peptide und Proteine sind insbesondere die C=O-Streckschwingung (Amid I) und die N-H-Biegeschwingung (Amid II) von großer Bedeutung, da ihre IR-Signaturen durch das lokale Wasserstoffbrücken-Netzwerk beeinflusst werden. Aus diesem Grund wird die Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen in Lösung routinemäßig durch IR-Spektroskopie untersucht. Die Kopplung der drei Techniken IMS, MS und IR-Spektroskopie erlaubt es damit erstmals, direkte Informationen über die Sekundärstruktur von Aggregaten mit genau bekannter Zusammensetzung und Größe zu erlangen.



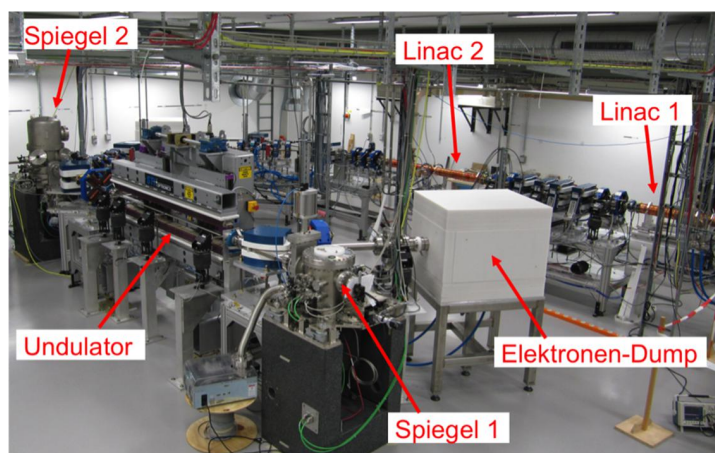
**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Apparatur mit der IR-Spektren von Peptid- und Proteinaggregaten mit definierter Größe und Form selektiv untersucht werden können.  
© Fritz-Haber-Institut

Ein Schema der Apparatur ist in **Abbildung 1** gezeigt. Die zu untersuchenden Aggregate werden aus wässriger Lösung mithilfe der nano-Elektrosprayionisation (nESI) als geladene Teilchen in die Gasphase gebracht und in

einen Iontrichter transferiert. Im Anschluss erfolgt der erste Separationsschritt: In der Driftstrecke werden die elektrisch geladenen Teilchen bis zum Erreichen des zweiten Iontichters mittels IMS nach ihrer Ladung, Größe und Form getrennt. Der nächste Separationsschritt erfolgt im Quadrupol-Massenfilter in dem die Aggregate durch MS nach dem Verhältnis von Masse zu Ladung sortiert werden. Nach beiden Trennungen ist sowohl die geometrische Größe, als auch die Masse der untersuchten Spezies genau definiert. Im Anschluss werden die Teilchen im Quadrupol-Ionenleiter mit der infraroten (IR) Strahlung des FHI FELs bestrahlt. Wird die IR-Strahlung absorbiert zerfallen die Aggregate und die entstehenden Bruchstücke können im Flugzeitmassenspektrometer nachgewiesen werden. Trägt man nun die Anzahl der Zerfälle gegen die Wellenlänge des genutzten Lichts auf, so erhält man ein IR-Spektrum, das diagnostisch für die Struktur des entsprechenden Aggregats ist.

## Der FHI Freie-Elektronen-Laser

Zur Durchführung der Experimente wird eine intensive, gepulste und über einen breiten Wellenlängenbereich durchstimmbare IR-Strahlungsquelle benötigt. Der Freie-Elektronen-Laser, der am Fritz-Haber-Institut seit 2013 in Betrieb ist, bietet diese Voraussetzung. Im FHI FEL werden Elektronenpakete in einem Linearbeschleuniger (*Linac*) auf nahezu Lichtgeschwindigkeit beschleunigt und anschließend durch einen Undulator gelenkt [4]. Die starken und in ihrer Orientierung alternierenden Magnetfelder im Undulator üben eine Lorentzkraft auf die Elektronen aus, welche sie – wie bei einem Slalom – auf eine oszillierende Bahn zwingen.



**Abb. 2:** Der Freie-Elektronen-Laser am Fritz-Haber-Institut in Berlin ist seit November 2013 in Betrieb und erzeugt intensive gepulste Infrarotstrahlung, die über einen weiten Wellenlängenbereich von 3 bis 50  $\mu\text{m}$  durchstimmbare ist. Rechts im Hintergrund sind die beiden Stufen des Elektronen-Linearbeschleunigers (Linac 1 und Linac 2) zu erkennen. In der linken Bildhälfte ist der 2 m lange Undulator zu sehen, dessen Anordnung von Permanentmagneten ein starkes Magnetfeld von alternierender Orientierung erzeugt. Die vom Beschleuniger erzeugten relativistischen Elektronen, deren Geschwindigkeit nahezu Lichtgeschwindigkeit beträgt, erzeugen beim Durchlaufen des Undulators infrarote Strahlungspulse, welche von zwei Resonator-Spiegeln reflektiert werden. Die Spiegel befinden sich in den im Bild zu sehenden Vakuumkammern. Die Elektronen werden nach Durchlaufen des Undulators im sogenannten Dump (rechts der Bildmitte) aufgefangen.

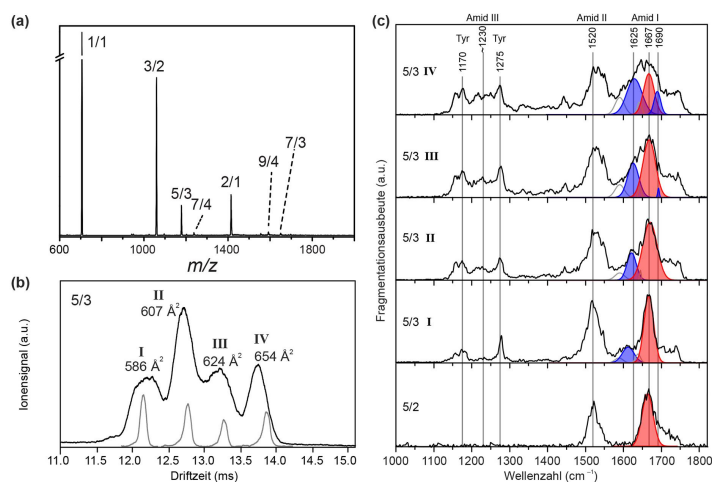
© Fritz-Haber-Institut

Das hat zur Folge, dass ein Puls elektromagnetischer Strahlung (Synchrotron-Strahlung) abgegeben wird. Im

Gegensatz zu einer Synchrotron-Strahlungsquelle wird der Strahlungspuls im FEL durch einen hinter dem Undulator befindlichen Spiegel (**Abb. 2**) reflektiert und läuft dem Elektronenstrahl entgegen zur anderen Seite des Undulators. Dort wird der Strahlungspuls durch den zweiten Spiegel des FEL-Resonators (*cavity*) erneut zum Vorwärtsdurchlauf durch den Undulator reflektiert. Gleichzeitig wird ein neues Elektronenpaket aus dem Beschleuniger eingespeißt, sodass sich Strahlungspuls und Elektronenpaket überlagern und gemeinsam durch den Undulator laufen. Wieder wird Synchrotron-Strahlung von den Elektronen abgegeben, wodurch der Strahlungspuls verstärkt wird. Nach hunderten von Umläufen bildet sich so ein sehr intensiver Strahlungspuls aus, dessen Wellenlänge im Wesentlichen von der Elektronenenergie und der Magnetfeldstärke im Undulator abhängt. Beim FHI FEL kann die Elektronenenergie auf einen beliebigen Wert zwischen 15 und 50 MeV eingestellt werden. Zusätzlich kann die Magnetfeldstärke im Undulator durch präzises Verfahren der Permanentmagnetanordnung variiert werden. Das erlaubt es, Strahlungspulse einer jeden Wellenlänge im Bereich von 3 bis 50  $\mu\text{m}$  zu erzeugen. Sie werden durch ein kleines Loch in einem der beiden Resonator-Spiegel ausgekoppelt und mit einem System von Spiegeln (*IR Beamline*) zum Experiment geführt.

## Resultate: Peptidaggregate

Wie schon oben ausgeführt ist die Struktur von Peptid- oder Proteinaggregaten von besonderem Interesse, da sie einen direkten Einfluss auf deren biologische Funktion hat. In einer ersten Studie wurden Aggregate eines aus sechs Aminosäuren bestehenden Peptids mit der Sequenz Tyr-Val-Glu-Ala-Leu-Leu untersucht. Wird dieses Peptid in Wasser gelöst und mit nESI in die Gasphase überführt, erhält man mit der in Abbildung 1 vorgestellten Apparatur das in **Abbildung 3(a)** gezeigte Massenspektrum. Erkennbar sind dort Aggregate verschiedener Größe, die mit dem Verhältnis der Anzahl von Peptideinheiten zur Gesamtladung  $n/z$  gekennzeichnet sind.  $n/z = 1/1$  steht z. B. für ein Monomer mit einer Ladung und  $n/z = 3/2$  für ein Trimer mit zwei Ladungen.



**Abb. 3:** (a) Massenspektrum von Aggregaten des Peptids mit der Sequenz Tyr-Val-Glu-Ala-Leu-Leu. Die Zahlen in der Abbildung geben das Verhältnis der Anzahl der Peptideinheiten zur Ladung an (z. B. steht 3/2 für das Trimer mit zwei Ladungen). (b) Ankunftszeitverteilung (Arrival Time Distribution, ATD) des Pentamers mit drei Ladungen (5/3). Deutlich zu erkennen sind mindestens vier Komponenten, welche von 5/3-Aggregaten mit unterschiedlichen geometrischen Strukturen herrühren. (c) IR-Spektren der 5/3-Aggregate aus (b) sowie des 5/2-Aggregates. Zwischen 1.600  $\text{cm}^{-1}$  und 1.700  $\text{cm}^{-1}$  befindet sich die Amid-I-Bande, welche charakteristisch für die Struktur ist. Komponenten in rot können helikalen und Komponenten in blau Faltblatt-Sstrukturen zugeordnet werden. Deutlich zu erkennen ist, dass der Faltblatt-Anteil von unten nach oben zunimmt.  
© Fritz-Haber-Institut

Mithilfe von IMS können nun Aggregate eines bestimmten  $n/z$ -Verhältnisses auf deren Größe bzw. Größenverteilung untersucht werden. Hierzu werden die geladenen Teilchen unter dem Einfluss eines schwachen elektrischen Feldes durch eine gasgefüllte Driftstrecke geleitet. Am Ende dieser Strecke wird die Anzahl der eintreffenden Teilchen als Funktion der Zeit gemessen, woraus sich eine sogenannte Ankunftszeitverteilung (*Arrival Time Distribution*, ATD) ergibt. Kompaktere Strukturen werden dabei ähnlich wie in einem Windkanal weniger stark vom Gas abgebremst als ausgedehnte Strukturen und erscheinen deshalb bei kürzeren Zeiten in der ATD. Aus den Ankunftszeiten lassen sich die über alle Orientierungen gemittelten Kollisionsquerschnitte bestimmen. Sollten die Teilchen bei gleicher Zusammensetzung in verschiedenen dreidimensionalen Strukturen (Konformeren) vorliegen, können diese über IMS getrennt werden. Abbildung 3(b) zeigt exemplarisch solch eine ATD für das Pentamer mit drei Ladungen ( $n/z = 5/3$ ). Deutlich sind hier vier Peaks zu erkennen, welche von Peptidaggregaten mit jeweils unterschiedlichen räumlichen Strukturen herrühren. Die aus diesen Daten gewonnenen Kollisionsquerschnitte lassen Aussagen über die ungefähre Form des Aggregates zu. So kann man z. B. feststellen, dass das kompakteste Konformer I aus der 5/3-Serie eine sehr dichte, fast sphärische Struktur besitzt, während die Strukturen der anderen Konformere deutlich ausgedehnter sind. Was dieser Unterscheid in der Form des Aggregats für Auswirkungen auf die Sekundärstruktur hat kann anschließend durch IR-Spektroskopie geklärt werden.

In Abbildung 3(c) sind die IR-Spektren von verschiedenen Pentameren gezeigt. Das unterste Spektrum stammt vom doppelt geladenen Pentamer, die darüber liegenden von den dreifach geladenen Spezies, deren ATDs in Abbildung 3(b) gezeigt sind. Die Bande um 1.650  $\text{cm}^{-1}$  ist auf C=O-Streckschwingungen (Amid I), die um 1.520  $\text{cm}^{-1}$  auf N-H-Biegeschwingungen (Amid II) und die zwischen 1.100  $\text{cm}^{-1}$  und 1.300  $\text{cm}^{-1}$  auf Schwingungen von Seitenketten zurückzuführen. Bei Untersuchungen in Lösung wird besonders die Amid-I-Bande zur

Bestimmung der Sekundärstruktur genutzt. In Abbildung 3(c) sind Amid-I-Banden wie sie typisch für helikale (rot) und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (blau) sind hervorgehoben. Es ist deutlich zu erkennen, dass 5/2 keinen Faltblatt-Anteil aufweist, wohingegen dieser bei 5/3 I einsetzt und in seinem relativen Anteil bis 5/3 IV stark ansteigt. Dies geht einher mit einem Anstieg in relativer Größe (Abb. 3(b)), da  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen einen starken zweidimensionalen Charakter haben und damit weniger kompakte Strukturen bilden.

## Ausblick

So unscheinbar die kleine blaue Bande in Abbildung 3(c) auch erscheinen mag, so ist sie doch von enormer Bedeutung. Sie stellt den ersten direkten Nachweis von  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen in Peptidaggregaten dar und legt die Grundlage für ein deutlich verbessertes Verständnis des Aggregationsprozesses. Das hier untersuchte Peptid ist ein Modellsystem, das so in der Natur nicht vorkommt; es ist jedoch sehr gut geeignet, um die entwickelten Methoden zu testen und für zukünftige Untersuchungen an biologisch relevanten Peptiden und Proteinen nutzbar zu machen.

## Literaturhinweise

[1] Knowles, T. P. J.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.

### **The amyloid state and its association with protein misfolding diseases**

Nature Reviews Molecular Cell Biology **15**, 384–396 (2014)

[2] Warnke, S.; Seo, J.; Boschmans, J.; Sobott, F.; Scrivens, J. H.; Bleiholder, C.; Bowers, M. T.; Gewinner, S.; Schöllkopf, W.; Pagel, K.; von Helden, G.

### **Protomers of Benzocaine: Solvent and Permittivity Dependence**

Journal of the American Chemical Society **137**, 4236–4242 (2015)

[3] Bleiholder, C.; Dupuis, N. F.; Wyttenbach, T.; Bowers, M. T.

### **Ion mobility–mass spectrometry reveals a conformational conversion from random assembly to $\beta$ -sheet in amyloid fibril formation**

Nature Chemistry **3**, 172–177 (2011)

[4] Schöllkopf, W.; Gewinner, S.; Junkes, H.; Paarmann, A.; von Helden, G.; Bluem, H.; Todd, A. M. M.

### **The new IR and THz FEL facility at the Fritz Haber Institute in Berlin**

In: Advances in X-ray Free-Electron Lasers Instrumentation III, Sandra G. Biedron (Ed.), Proceedings of SPIE **9512**, 95121L (2015)