

# Die Verteilung gebundener Fettsäuren enthüllt die funktionelle Struktur von menschlichem Serumalbumin\*\*

Matthias J. N. Junk, Hans Wolfgang Spiess und Dariush Hinderberger\*

Albumin (human serum albumin, HSA) ist das häufigste Protein im menschlichen Blutplasma und dient als Transportprotein für viele endogene Substanzen und Wirkstoffe.<sup>[1,2]</sup> Seine Fähigkeit zur Bindung und zum Transport von Fettsäuren (fatty acids, FA) war Gegenstand umfangreicher Studien.<sup>[3,4]</sup> Untersuchungen an HSA waren durch die Komplexität des Proteins erschwert, profitierten dann aber von der Verfügbarkeit hochauflöster Kristallstrukturen. Die erste Kristallstruktur von HSA wurde vor fast 20 Jahren durch He und Carter bestimmt,<sup>[5]</sup> und mittlerweile ist eine Vielzahl von HSA-Kristallstrukturen in der Protein Data Bank hinterlegt.

Noch wichtiger für das Verständnis der Bindungseigenschaften dieses Proteins sind Cokristallstrukturen von HSA-Komplexen mit den transportierten Molekülen. Vor allem den bahnbrechenden Arbeiten von Curry et al. ist es zu danken, dass heute eine Vielzahl von Kristallstrukturen von HSA-Fettsäure-Komplexen verfügbar ist.<sup>[6-8]</sup> Die Kristallstrukturen zeigen, dass die Fettsäuremoleküle hochgradig unsymmetrisch im Proteinkristall verteilt sind, obwohl HSA selbst eine symmetrische Primär- und Sekundärstruktur hat. Für langketige Fettsäuren wurden bis zu sieben verschiedene Bindungsstellen in HSA gefunden, von denen die meisten eine ionische Ankergruppe und lange, hydrophobe Kavitäten aufweisen.<sup>[8,9]</sup> Die Positionen der zwei bis drei Bindungsstellen mit hoher Affinität für Fettsäuren<sup>[3,10]</sup> wurden durch Korrelation der Kristallstruktur mit den Befunden aus NMR-Untersuchungen zur Verdrängung von <sup>13</sup>C-markierten Fettsäuren durch konkurrierende Wirkstoffmoleküle bestimmt.<sup>[11,12]</sup> Die Bindungsstellen 2, 4 und 5 binden Fettsäuren mit einer hohen Affinität, während die Bindungsstellen 1, 3, 6 und 7 eine etwas geringere Affinität für Fettsäuren zeigen (Abbildung 1a).

In einem allgemeineren Kontext wird schon seit langem eine Debatte darüber geführt, in welchem Umfang Protein-Kristallstrukturen die dynamischen und funktionellen Strukturen von Proteinen in Lösung widerspiegeln. Offensichtliche Diskrepanzen zwischen kristallographischen Daten und Er-

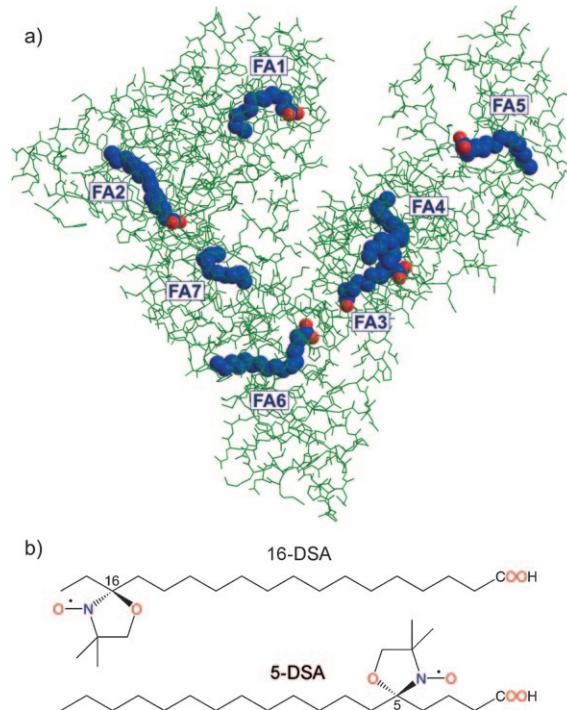


Abbildung 1. a) Kristallstruktur (PDB 1e7) von HSA im Cokristall mit sieben Stearinsäuremolekülen.<sup>[8]</sup> Blau: C, rot: O, grün: Proteingerüst. b) Strukturformeln der EPR-aktiven Moleküle 16-Doxyldsteinsäure (16-DSA) und 5-Doxyldsteinsäure (5-DSA).

gebnissen von Methoden, die Proteine in Lösung charakterisieren (z.B. NMR- und andere Spektroskopiearten sowie Neutronenstreuung), oder von Simulationen der Moleküldynamik heizen diese Debatte immer wieder an. Des Weiteren setzt sich immer stärker die Erkenntnis durch, dass die Dynamik eines Proteins in Lösung eng mit seiner biologischen Funktion verknüpft ist. Jüngere NMR-Studien zeigen, dass viele Proteine eine ausgeprägte dynamisch-konformativen Flexibilität aufweisen, die sich auf ihre Funktion auswirkt.<sup>[13-15]</sup>

In diesem Zusammenhang merken wir an, dass die oberflächennahen Teile von HSA ein hohes Maß an Flexibilität aufweisen und dies ein Schlüssel zu den vielseitigen Bindungseigenschaften des Proteins gegenüber einer Vielzahl von Molekülen ist. Schon in den 1950er Jahren entwickelte Karush ein Konzept, das diese „konformativen Adaptivität“ der Bindungsstellen berücksichtigt.<sup>[16,17]</sup> Des Weiteren wurde ein Modell entwickelt, das die konformativen Entropie aufgrund der Flexibilität der Fettsäurealkylketten berücksichtigt.<sup>[18]</sup>

[\*] M. J. N. Junk, Prof. Dr. H. W. Spiess, Dr. D. Hinderberger  
Max-Planck-Institut für Polymerforschung  
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)  
Fax: (+49) 6131-379-100  
E-Mail: dariush.hinderberger@mpip-mainz.mpg.de

[\*\*] Wir danken Gunnar Jeschke (ETH Zürich) und Marcos Gelos (St. Augustinus-Krankenhaus Düren) für aufschlussreiche Diskussionen sowie Christian Bauer für technische Unterstützung. M.J.N.J. dankt dem Fonds der chemischen Industrie (FCI) und der Graduate School of Excellence „Materials Science in Mainz“ (MAINZ) für die finanzielle Förderung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201003495> zu finden.

Das Ziel dieser Studie war die Aufklärung der funktionellen Struktur des fettsäurebeladenen HSA aus dem Blickwinkel der gebundenen Fettsäuremoleküle. Erreicht wurde dies mittels Elektronenspinresonanz(EPR)-Spektroskopie an spinmarkierten Fettsäuren, die aufgrund der eingebundenen stabilen Nitroxidradikale EPR-aktiv sind. Mit dieser Methode gelingt es, die Verteilung der FA-Bindungsstellen ohne einen Beitrag des komplexen Proteins zu detektieren (Abbildung 1) – vielmehr werden die Strukturinformationen über die Abstandsverteilungen zwischen den Fettsäuren in der eingefrorenen Lösung gewonnen. Die Abstandsverteilungen (im Bereich einiger Nanometer) werden durch Elektron-Elektron-Doppelresonanz (DEER) erhalten, eine Puls-EPR-Methode, die sich die inhärente Abstandsabhängigkeit dipolärer Kopplungen zwischen ungepaarten Elektronenspins zunutze macht.<sup>[19–21]</sup> In den letzten Jahren wurde DEER in zunehmendem Maße für Strukturuntersuchungen sowohl synthetischer<sup>[22,23]</sup> als auch biologischer Systeme<sup>[24]</sup> genutzt, insbesondere von (Membran-)Proteinen und Nukleinsäuren.<sup>[25–28]</sup>

Um Abstandsinformationen von verschiedenen Positionen entlang der Fettsäure-Alkylkette in den jeweiligen Bindungsstellen zu erhalten, wurden Fettsäuren mit unterschiedlichen Markerpositionen verwendet. Das ungepaarte Elektron von 5-Doxylstearinsäure (5-DSA) befindet sich nahe der Carboxy-Ankergruppe, während es sich im Fall von 16-DSA nahe dem Alkylkettenende befindet (Abbildung 1b). Daher können Informationen sowohl über die Verteilung der Ankergruppen im Protein als auch über die Verteilung der Zugänge zu den vom Protein gebildeten Fettsäurekanälen erhalten werden.

Alle unsere Experimente erfordern die Zugabe von bis zu sieben Fettsäuren je HSA-Molekül, damit alle Bindungsstellen im Protein besetzt werden. Um Artefakte zu vermeiden und um eine quantitative Interpretierbarkeit der Daten zu gewährleisten, ist es von Nutzen, die Zahl an EPR-aktiven, spinmarkierten Fettsäuren auf zwei je Proteinmolekül zu beschränken. Auf diese Weise können Komplikationen aufgrund von Multispineffekten vermieden werden.<sup>[29]</sup> Durch eine simultane Zugabe von diamagnetischen Fettsäuren lässt sich der Beladungsgrad von HSA in solchen spinverdünnten Systemen variieren, da die diamagnetischen Fettsäuren die gleichen Bindungsstellen wie DSA besetzen, ohne jedoch EPR-aktiv zu sein. Bei einer geeigneten Abstimmung des Verhältnisses der diamagnetischen FA und der DSA werden dann zwei Bindungsstellen, die statistisch unter allen Bindungsstellen verteilt sind, von EPR-aktiven Molekülen besetzt. Eine artefaktfreie Abstandsverteilung mit einem kompletten Satz von Abständen aller Fettsäure-Bindungsstellen kann somit erhalten werden.

Die diamagnetischen FA wurden durch Reduktion der entsprechenden DSA zum EPR-inaktiven Hydroxylamin (rDSA) erzeugt (Hintergrundinformationen, Abschnitt S0). Die erhaltenen Moleküle sind strukturell eng verwandt mit der paramagnetischen DSA, und mittels CW-EPR-Spektroskopie wurden vergleichbare Bindungsaffinitäten bestätigt (Abschnitt S2). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit Stearinsäure als spinverdünner Spezies erzielt (Abschnitt S0).

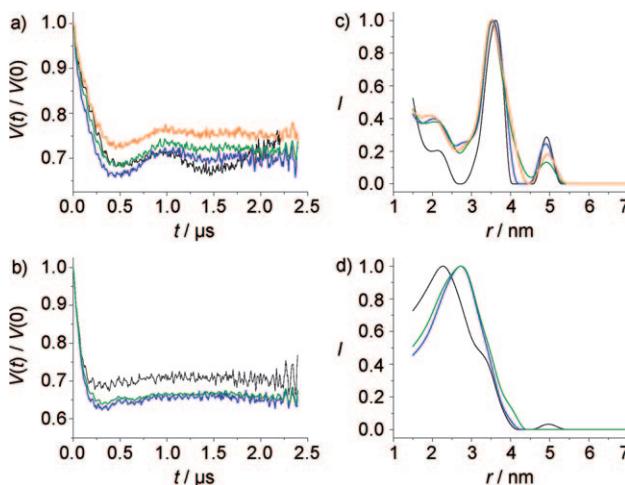
Vor Durchführung der Abstandsmessungen musste geprüft werden, dass die spinmarkierten FA (5-DSA und 16-DSA) und ihre diamagnetischen Analoga (rDSA) an HSA gebunden hatten (Abschnitt S1). Dies gelang anhand der CW-EPR-Signaturen der gebundenen und freien DSA, die zeigen, dass bei HSA-FA-Verhältnissen von bis zu 1:6 mehr als 99 % aller Fettsäuren mit dem Protein komplexiert sind. Dies beweist eine weitgehend quantitative Aufnahme beider DSA-Arten und bestätigt ferner, dass die Fettsäureaufnahme nicht durch die Spinmarkierung gestört wird (Abbildung S1). Des Weiteren zeigen die spinmarkierten Fettsäuren Bindungsaffinitäten, die mit denen von Stearinsäure vergleichbar sind. Damit steht fest, dass weder die sterischen noch die elektronischen Modifizierungen der spinmarkierten Fettsäuren signifikante Änderungen der Bindungseigenschaften herbeiführen. Mit Blick auf die Vielzahl gesättigter und ungesättigter FA, die von HSA gebunden werden können,<sup>[3,8]</sup> ist es daher nicht verwunderlich, dass die Bindung unserer DSA-Moleküle mit der Bindung anderer langkettiger Fettsäuren vergleichbar ist.

Aus den CW-EPR-Spektren kann auch der Rotationsfreiheitsgrad der Nitroxideinheit abgeschätzt werden (Abschnitt S1).<sup>[30,31]</sup> 5-DSA ist bezüglich seiner Rotation stärker eingeschränkt als 16-DSA, das eine etwa dreimal kürzere Rotationskorrelationszeit aufweist. Dieser Trend war zu erwarten, da sich die Nitroxideinheit in 5-DSA in den engen hydrophoben Bindungskanälen nahe dem Ankerpunkt befindet. Hingegen befindet sich die Nitroxidgruppe von 16-DSA am Ende eines solchen Kanals oder ragt sogar aus diesem heraus. Tatsächlich wurde dieser höhere Rotationsfreiheitsgrad der Nitroxidgruppe von 16-DSA in CW-EPR-Studien zur Bindung spinmarkierter Fettsäuren an Albumin aufgezeigt.<sup>[32–34]</sup>

Um die gewünschten Informationen über die funktionelle Struktur von Albumin zu erhalten, wurden die HSA-Fettsäure-Komplexe durch DEER-Spektroskopie untersucht. Der intramolekulare Anteil der Zeitbereichsdaten und die extrahierten Abstandsverteilungen sind in Abbildung 2 aufgetragen. Für 16-DSA werden wohldefinierte dipolare Modulationen beobachtet, die von einer engen Abstandsverteilung mit einem Hauptabstand bei 3.6 nm und zwei kleineren Beiträgen bei 2.2 nm und 4.9 nm stammen.

Das Fehlen einer solch ausgeprägten Modulation im Falle von 5-DSA deutet auf eine breite Abstandsverteilung hin. In der Tat wird ein einziger breiter Abstandspeak erhalten, der sich über einen Bereich von 1.5 nm (der unteren mittels DEER detektierbaren Grenze) bis 4 nm erstreckt und ein Maximum bei ca. 2.5 nm aufweist.

Bemerkenswerterweise ändert sich weder die Abstandsverteilung von 5-DSA noch die von 16-DSA, wenn das Protein mit unterschiedlichen Zahlen von Fettsäuremolekülen beladen wird. Eine höhere Beladung führt nicht zur Bildung neuer Abstandspeaks, sondern nur zu einer leichten Verbreiterung der schon bei kleinen Beladungen vorhandenen Peaks. Dies weist darauf hin, dass die Bindungsaffinitäten der Fettsäuren für verschiedene Bindungsstellen im Protein recht ähnlich sind. Die Bindungsstellen werden folglich nicht streng konsekutiv aufgefüllt. Viel eher sind sogar schon bei kleinen Verhältnissen von Fettsäure zu HSA alle Bindungsstellen zu



**Abbildung 2.** a,b) Intramolekularer Anteil der DEER-Zeitbereichsdaten und c,d) extrahierte Abstandsverteilungen der HSA-gebundenen spinmarkierten Stearinsäuren bei wechselnder Zahl von reduzierten und EPR-aktiven Fettsäuren je Proteinmolekül: schwarz (0:2), blau (2:2), grün (4:2), orange (6:2). Oben: Daten für 16-DSA (a, c); unten: Daten für 5-DSA (b, d).

einem bestimmten Grad besetzt (wobei natürlich die Bindungsstellen mit hoher Affinität entsprechend der relativen Gleichgewichtskonstanten zu einem größeren Anteil besetzt werden). In diesem Fall führt eine Änderung des HSA-Fettsäure-Verhältnisses neben der Veränderung der absoluten (Gesamt-)Besetzung nur noch zu einer Veränderung der relativen Besetzung. Diese Erklärung ist in Einklang mit den Ergebnissen von NMR-Studien mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Fettsäuren: Bei Zunahme des Fettsäureanteils änderten sich die relativen Verhältnisse der NMR-Peaks nur gering.<sup>[11,12]</sup>

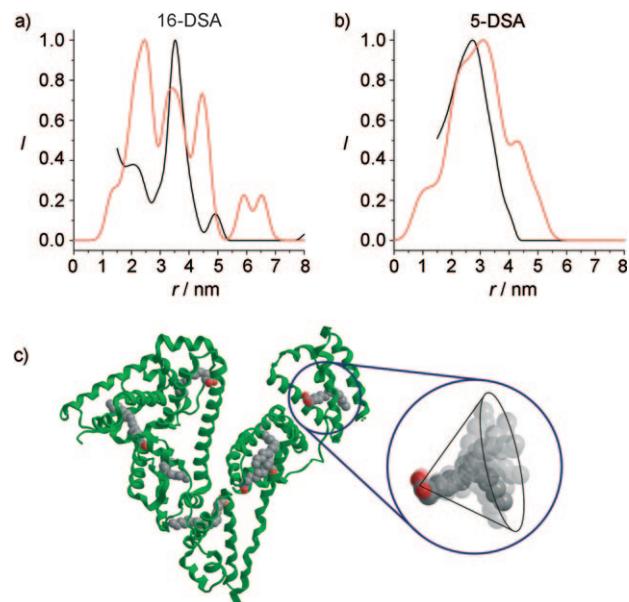
Die DEER-Messungen wurden bei 50 K durchgeführt. Hierfür wurden die flüssigen Lösungen der HSA-FA-Komplexe zu glasartig erstarrten Lösungen schockgefroren, sodass man eine Momentaufnahme eines Proteinensembles in Lösung bei der Glasübergangstemperatur von ca. 170 K erhielt.<sup>[35,36]</sup> Um die glasartigen Proben zu erhalten, wurden der wässrigen Pufferlösung 20 Vol.-% Glycerin zugesetzt – dies ist ein Standardverfahren in der Puls-EPR-Spektroskopie von Proteinen. Eine Vielzahl von Hinweisen belegt, dass diese kleine Menge nichtwässrigen Lösungsmittels die Proteinstruktur nicht stört, sondern vielmehr sogar die native Struktur des Proteins in gefrorener Lösung stabilisiert.<sup>[25,37]</sup> Diese Annahme wird durch CW-EPR-Messungen bestätigt, die keinerlei Veränderungen der Fettsäurebindung in Abhängigkeit von der Glycerinzugabe zeigen.

Durch die unterschiedlichen Markerpositionen in 5-DSA und 16-DSA bieten sich zwei unterschiedliche Blickwinkel auf die funktionelle Struktur des Proteins. Das ungepaarte Elektron in 5-DSA ist in der Nähe der Carboxygruppe der Fettsäure lokalisiert, die mit den positiv geladenen Seitengruppen des Proteins wechselwirkt. In diesem Fall charakterisieren die DEER-Messungen die räumliche Verteilung der Ankergruppen. Demgegenüber untersucht man bei der Verwendung von 16-DSA die Zugänge zu den Fettsäurekanälen. Informationen über deren räumliche Verteilung sind wichtig

für das Verständnis der Aufnahme- und Abgabeeigenschaften des Proteins.

Die Verteilung von 5-DSA (und damit der Kopfgruppen) in Lösung ist wesentlich breiter als die Verteilung von 16-DSA (und damit der Zugänge). Trotz der größeren Flexibilität der Doxylgruppe in 16-DSA wird eine sehr homogene Verteilung mit einem wohldefinierten Hauptabstand beobachtet. Dies lässt den Schluss zu, dass die Zugänge zu den Fettsäurebindungsstellen sehr symmetrisch auf der Oberfläche des Proteins verteilt sind.

In Abbildung 3 werden die experimentellen Abstandsverteilungen in Lösung mit den Verteilungen auf Grundlage der Kristallstruktur verglichen. Die Verteilungen wurden



**Abbildung 3.** Vergleich der mit DEER gemessenen Abstandsverteilungen (schwarz) und der berechneten Abstandsverteilungen auf Grundlage der Kristallstruktur (rot) für die a) C16-Position und b) C5-Position. Die Kristallstrukturverteilungen wurden unter Annahme der vollständigen Besetzung aller sieben Bindungsstellen erhalten. Abstände über 6 nm können unter den hier angewandten Bedingungen der DEER-Messung nicht detektiert werden. c) Bandstrukturmodell von HSA, das die beobachtete Flexibilität der Zugänge zu den FA-Bindungsstellen illustriert. Dies führt zu einer sehr viel homogeneren und symmetrischen Verteilung der Bindungsstellen auf der Proteinoberfläche als auf Grundlage der Kristallstruktur vermutet. Eine der Bindungsstellen ist in Vergrößerung gezeigt.

unter der Annahme der vollständigen Besetzung aller Bindungsstellen berechnet (Abschnitte S6 und S7). Da die Fettsäuren in den Bindungsstellen 1 und 7 nicht bis zum C16-Atom ihrer Alkylkette aufgelöst sind, wurden sie bis zu dieser Position extrapoliert.

Die experimentelle Verteilung von 5-DSA stimmt sehr gut mit der Verteilung auf Grundlage der Kristallstruktur überein (Abbildung 3b). In beiden Fällen ergeben sich breite Verteilungen, die um einen Abstandswert von 3 nm zentriert sind. Für 5-DSA wird somit die hochgradig unsymmetrische Verteilung der Ankerpunkte der Fettsäurebindungsstellen, wie sie aus der Kristallstruktur abgeleitet wurde, durch die

DEER-Daten bestätigt. Dies belegt zum einen, dass die mit DEER erhaltenen Abstandsverteilungen verlässlich sind. Zum anderen lässt sich folgern, dass die Verteilung der Ankerpunkte in Lösung den inneren, starren Teil des Proteins widerspiegelt, der im Kristall und in Lösung sehr ähnlich sein sollte.

Im Fall von 16-DSA weicht dagegen die Abstandsverteilung der Zugänge zu den Bindungsstellen deutlich von der Verteilung anhand der Kristallstruktur ab. Die Abweichungen treten am deutlichsten in dem Bereich hervor, der durch DEER-Messungen am verlässlichsten abgebildet werden kann (2–5 nm). Abstände über 6 nm werden von DEER unter den angewandten Messbedingungen nicht erfasst. Die Verteilung anhand der Kristallstruktur zeigt drei größere Peaks bei 2.5, 3.5 und 4.5 nm. Während die Peakpositionen grob mit den DEER-Daten übereinstimmen, weichen die relativen Peakintensitäten stark davon ab. Der Peak bei 3.6 nm dominiert deutlich alle anderen Peaks der DEER-Verteilung. Dies führt zu einer bemerkenswerten Vereinfachung der DEER-Abstandsverteilung im Vergleich zur Kristallstruktur-Verteilung, gleichbedeutend damit, dass die Zugänge zu den Bindungsstellen sehr viel symmetrischer und homogener auf der Proteinoberfläche verteilt sind als von der Kristallstruktur vermutet.

Eine homogene Abstandsverteilung von sechs Bindungsstellen ist ein Indiz für eine hohe Symmetrie. Betrachtet man sich die sechs Ecken eines regulären Oktaeders, so erkennt man zwölf Abstände mit Kantenlänge  $r$  und drei Diagonalabstände mit Länge  $\sqrt{2}r$ . Bei einem dominierenden Abstand (= einer Kantenlänge) von  $r = 3.6$  nm wird somit ein Diagonalabstand von 5.1 nm erwartet. Dies ist in Einklang mit dem gemessenen Abstand bei 4.9 nm. In der Tat bildet ein Oktaeder die günstigste Verteilung von Zugängen zu sechs Fettsäurebindungsstellen auf einer Kugeloberfläche. Zum einen ist das Protein damit sehr leicht von jeder Seite zugänglich, zum anderen nehmen die einzelnen Zugänge den maximalen Abstand zueinander ein. Natürlich darf man diese Überlegung nicht überinterpretieren. Die Kristallstruktur von HSA (die mit der beobachteten Verteilung von 5-DSA in Einklang ist) weist auf keine Kugelform hin, sondern auf eine herzförmige Struktur des Proteins, das somit eher einem abgeflachten Ellipsoid gleicht. Die Verteilung der Zugänge lässt sich somit besser mit einem gestauchten Oktaeder beschreiben. Nimmt man an, dass sich ein Diagonalabstand von  $\sqrt{2}r$  auf  $r$  verringert, erhält man fünf Abstände der Länge  $r$ , acht Abstände verringern sich von  $r$  auf  $(\sqrt{3})/2r$ , und zwei Abstände verbleiben bei  $\sqrt{2}r$ . Die geringfügige ( $\approx 13\%$ ) Abweichung zwischen den zwei dominierenden Abständen  $r$  und  $(\sqrt{3})/2r$  ist in diesem Fall zu klein, um im experimentell gefundenen Peak bei  $r = 3.6$  nm aufgelöst zu werden (Halbwertsbreite von ca. 0.7 nm).

Gleichwohl kann solch ein gestauchtes Oktaeder nur die Verteilung der Zugänge von sechs Bindungsstellen erklären, jedoch nicht von allen sieben Bindungsstellen, wie sie mittels Röntgenbeugung bestimmt wurden. Diese siebte Bindungsstelle könnte allerdings den kurzen Abstandswert bei 2.2 nm verursachen, der nicht mit dem Oktaedermodell erklärt werden kann. Hierbei ist zu beachten, dass sich die siebte Bindungsstelle in der Peripherie des gestauchten Oktaeders

befinden muss und nicht in dessen Zentrum, da nur ein kleiner Anteil dieser kurzen Abstände von 2.2 nm beobachtet wird.

Die aus dem Vergleich der DEER-Daten mit der Kristallstruktur abgeleitete Interpretation ist in Abbildung 3c illustriert. Es ist naheliegend, die bemerkenswert symmetrische Verteilung der Zugänge der konformativen Flexibilität von HSA zuzuschreiben. Auch kann es gut sein, dass diese Verteilung die Optimierung des Proteins für eine schnelle Aufnahme und Abgabe der Fettsäuren widerspiegelt: Diese Prozesse würden sowohl durch eine homogene (mittlere) Verteilung der Zugänge zu den Fettsäurekanälen als auch durch eine große konformativen Flexibilität erleichtert (Abbildung 3c). Eine große Flexibilität auf oder nahe an der Proteinoberfläche könnte auch entropisch begünstigt sein. Der Entropiegewinn durch kleine konformativen Änderungen ist an der Oberfläche viel größer als im Inneren des Proteins.

Eine symmetrische Verteilung der Bindungsstellen auf einem gestauchten Oktaeder ist auch in Einklang mit dem Befund, dass sich die DEER-Abstandsverteilungen mit steigendem Fettsäureanteil kaum ändern. Selbst wenn die Bindungsstellen konsekutiv besetzt werden würden, würden sie alle aufgrund ihrer symmetrischen Verteilung auf der Proteinoberfläche zu ähnlichen Abständen führen. Um die Wahrscheinlichkeit einer solchen symmetrischen Verteilung und unsere vorläufige Interpretation eines gestauchten Oktaeders für die FA-Zugangspunkte zu überprüfen, haben wir eine Simulation der Moleküldynamik (MD) der Kristallstruktur (1e7i) über einen Zeitraum von 6.5 ns durchgeführt (Abschnitt S8). Obwohl insgesamt keine erheblichen Abweichungen von der Kristallstruktur gefunden wurden, ist die C16-Position der Fettsäuren in einem stärkeren Maße von den kleinen Änderungen der Sekundärstrukturelemente betroffen als die C5-Position. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die Ankerregionen des Proteins starr sind, während die Zugänge zu den Fettsäurekanälen einen wesentlich größeren Freiheitsgrad und eine größere Flexibilität haben. Es ist zu berücksichtigen, dass eine potentiell geringere kristallographische Auflösung der konformativ ungeordneten Kettenenden der Fettsäuren die Zuverlässigkeit der Kristallstrukturdaten für diese Orte herabsetzt. Dies könnte auch zu den Abweichungen zwischen der Kristallstruktur und der von den DEER-Daten abgeleiteten funktionellen Struktur beitragen.

HSA in Lösung ist optimiert für seine Funktion als Fettsäuretransporter. Unsere EPR-Studie legt nahe, dass die Aufnahme und Abgabe von Fettsäuren durch eine homogene und symmetrische Verteilung der Zugänge zu den Bindungsstellen erleichtert wird. Die hier gefundene Verteilung unterscheidet sich signifikant von der Verteilung, die anhand der Kristallstruktur erwartet wurde (Abbildung 3). Daraus lässt sich ein Bild der funktionellen Proteinstruktur mit einem starren, unsymmetrischen inneren Teil und einer Oberfläche mit einer viel größeren Strukturflexibilität ableiten.

Es gibt eine steigende Zahl von Hinweisen (z. B. aus NMR-Studien),<sup>[13–15]</sup> wonach die konformative Flexibilität von Proteinen oft eine Grundvoraussetzung für deren Funktion ist, und wir vermuten deshalb, dass sich auch die funktionellen Lösungsstrukturen anderer (Transport-)Proteine von den entsprechenden Kristallstrukturen unterscheiden

können (manchmal auch sehr stark). Unser selektiver Spinsondenansatz liefert ausschließlich Signale der transportierten Spezies (in diesem Fall Fettsäuren), die in direktem Bezug zu der interessierenden Funktion des Proteins stehen. Jenseits der Bedeutung dieses speziellen Proteins bietet unser spektroskopischer Ansatz, der auf etablierten Spinmarkern und Abstandsmessungen im Nanometerbereich basiert, die Möglichkeit, Transportproteine im Allgemeinen zu charakterisieren. Die vorgestellte Methode führt zum einen zu einer enormen Vereinfachung der strukturellen Charakterisierung und ermöglicht zum anderen eine vollständige Charakterisierung der Funktionalität des Proteins in seiner nativen Umgebung.

### Experimentelles

Materialien: Nicht-denaturiertes Albumin des menschlichen Blutsrums (HSA, >95%, Calbiochem), 5- und 16-Doxylstearinsäure (DSA, Aldrich) und 87 Gew.-% Glycerin (Fluka) wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. DSA-Derivate wurden durch Zugabe von Phenylhydrazin (97%, Aldrich) zu den EPR-inaktiven Hydroxylaminen (rDSA) reduziert (Abschnitt S0).

Probenpräparation: HSA-Fettsäure-Komplexe in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) wurden durch Mischen von 0.2 M Phosphatpuffer (pH 6.4) mit und ohne 2 mM HSA und 6.7 mM DSA- und rDSA-Lösungen in 0.1 M KOH erhalten. Die Gesamtkonzentration von DSA und rDSA betrug konstant 2 mM, ihre relativen Verhältnisse wurden von 2:0 bis 2:6 pro Proteinmolekül variiert. Dieses Vorgehen gewährleistet isolierte Spinaare in Kombination mit einer variierten Belegung der Fettsäurebindungsstellen. Für die DEER-Experimente wurden 20 Vol.-% Glycerin zu den fertigen Lösungen gegeben, um eine Kristallisation während des Einfrierens zu verhindern. Die Lösungen wurden in Quarzröhren (Außendurchmesser 3 mm) gefüllt und in N<sub>2</sub>(fl)-gekühltem Isopentan schockgefroren.

EPR-Messungen: Details zu den CW-EPR- und DEER-Messungen und zur Datenauswertung sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Eingegangen am 8. Juni 2010  
Online veröffentlicht am 30. September 2010

**Stichwörter:** Albumin · EPR-Spektroskopie · Fettsäuren · Nanostrukturen · Proteinstrukturen

- [1] T. Peters, *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, 1995.
- [2] D. C. Carter, J. X. Ho, *Adv. Protein Chem.* **1994**, *45*, 153–203.
- [3] A. A. Spector, *J. Lipid Res.* **1975**, *16*, 165–179.
- [4] J. A. Hamilton, D. P. Cistola, J. D. Morissett, J. T. Sparrow, D. M. Small, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3718–3722.
- [5] X. M. He, D. C. Carter, *Nature* **1992**, *358*, 209–215.
- [6] S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. P. Franks, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 827–835.
- [7] S. Curry, P. Brick, N. P. Franks, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1999**, *1441*, 131–140.
- [8] A. A. Bhattacharya, T. Grüne, S. Curry, *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 721–732.
- [9] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, *IUBMB Life* **2005**, *57*, 787–796.
- [10] J. A. Hamilton, S. Era, S. P. Bhamidipati, R. G. Reed, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2051–2054.
- [11] J. R. Simard, P. A. Zunszain, C. E. Ha, J. S. Yang, N. V. Bhagavan, I. Petitpas, S. Curry, J. A. Hamilton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17958–17963.
- [12] J. R. Simard, P. A. Zunszain, J. A. Hamilton, S. Curry, *J. Mol. Biol.* **2006**, *361*, 336–351.
- [13] K. Henzler-Wildman, D. Kern, *Nature* **2007**, *450*, 964–972.
- [14] O. F. Lange, N.-A. Lakomek, C. Farès, G. F. Schröder, K. F. A. Walter, S. Becker, J. Meiler, H. Grubmüller, C. Griesinger, B. L. de Groot, *Science* **2008**, *320*, 1471–1475.
- [15] L. Salmon, G. Bouvignies, P. Markwick, N. Lakomek, S. Shownalter, D.-W. Li, K. Walter, C. Griesinger, R. Brüschweiler, M. Blackledge, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4218–4221; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4154–4157.
- [16] F. Karush, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2705–2713.
- [17] F. Karush, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 5536–5542.
- [18] N. Laiken, G. Nemethy, *Biochemistry* **1971**, *10*, 2101–2106.
- [19] A. D. Milov, K. M. Salikhov, M. D. Shirov, *Fiz. Tverd. Tela* **1981**, *23*, 975–982.
- [20] M. Pannier, S. Veit, A. Godt, G. Jeschke, H. W. Spiess, *J. Magn. Reson.* **2000**, *142*, 331–340.
- [21] R. E. Martin, M. Pannier, F. Diederich, V. Gramlich, M. Hubrich, H. W. Spiess, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2994–2998; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2834–2837.
- [22] G. Jeschke, *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23*, 227–246.
- [23] D. Hinderberger, O. Schmelz, M. Rehahn, G. Jeschke, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4716–4721; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4616–4621.
- [24] O. Schiemann, T. F. Prisner, *Q. Rev. Biophys.* **2007**, *40*, 1–53.
- [25] C. Dockter, A. Volkov, C. Bauer, Y. Polyhach, Z. Joly-Lopez, G. Jeschke, H. Paulsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18485–18490.
- [26] D. Hilger, H. Jung, E. Padan, C. Wegener, K. P. Vogel, H.-J. Steinhoff, G. Jeschke, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1328–1338.
- [27] O. Schiemann, N. Piton, J. Plackmeyer, B. E. Bode, T. F. Prisner, J. W. Engels, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 904–923.
- [28] O. Schiemann, P. Cekan, D. Margraf, T. F. Prisner, S. T. Sjöstrandsson, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3342–3345; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3292–3295.
- [29] J. D. Morissett, H. J. Pownall, A. M. Gotto, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 2487–6591.
- [30] S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 42–55.
- [31] D. J. Schneider, J. H. Freed in *Biological Magnetic Resonance Vol. 8* (Hrsg.: L. J. Berliner, J. Reuben), Plenum, New York, 1989.
- [32] J. D. Morissett, H. J. Pownall, A. M. Gotto, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 2487–2494.
- [33] S. J. Rehfeld, D. J. Eatough, W. Z. Plachy, *J. Lipid Res.* **1978**, *19*, 841–849.
- [34] V. A. Livshits, D. Marsh, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2000**, *1466*, 350–360.
- [35] K. Kawai, T. Suzuki, M. Oguni, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 3732–3738.
- [36] C. Inoue, M. Ishikawa, *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 1187–1193.
- [37] R. V. Rariy, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 13520–13523.