

DISS. ETH NO. 19484

ATOMIC-RESOLUTION STRUCTURE  
DETERMINATION OF AMYLOID FIBRILS  
BY SOLID-STATE NMR

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

CHRISTIAN WASMER

Dipl. Phys. ETH

\* 31. 08. 1980

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Beat H. Meier

Prof. Dr. Roland Riek

2010

# Abstract

Prions are infectious proteins capable of self-replicating their conformation and are best known as the agent of a number of diseases including scrapie in sheep, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, and new variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. Prions have also been found and described in yeast and filamentous fungi. The infectious form of most prions has been identified or is at least being conjectured to be a  $\beta$ -sheet-rich molecular aggregate termed amyloid fibril. Additionally, amyloid formation is eponymous for a group of diseases termed Amyloidoses that includes several highly prevalent neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease. Due to their decisive role in diseases, it is of great interest to understand the stability and formation of amyloid fibrils in detail. To achieve this, it is in turn required to determine the atomic-resolution molecular structures of such entities. However, structure determination of protein fibrils is mostly hampered by the fact that they are neither soluble nor crystallizable and therefore not amenable to the two most successful techniques of experimental structural biology—solution nuclear magnetic resonance (NMR) and X-ray crystallography. Accordingly, prior to this study no structure of a prion in the infectious amyloid state had been determined. Solid-state NMR is not limited to crystals or solutes, as even amorphous, insoluble samples may be investigated and it is therefore the method of choice for the structural characterization of amyloid fibrils. However, determination of protein structures by solid-state NMR is still a laborious process and has only been achieved for few, mostly crystalline, proteins so far.

For the determination of the structure of HET-s(218-289), the amyloid core of a prion of the filamentous fungus *Podospora anserina*, a large number of NMR samples with different isotopic labeling schemes were produced. These enabled the recording of NMR spectra that selectively reflect either the inter- or intramolecular order within the fibrils, which proved to be crucial information for the structure determination. Based on the experimental restraints, we found that HET-s(218-289) forms a left-handed  $\beta$ -solenoid, with each molecule forming two helical windings. It exhibits a compact hydrophobic core, at least 23 hydrogen bonds, three salt bridges, and two asparagine ladders per molecule. The obtained structure gives important insights on the features leading to the extraordinarily high stability of these amyloid fibrils.

The structure of the prion domain in isolation was put into the context of the full-length HET-s protein, which is the naturally occurring entity. To this purpose, a comparison of the solid-state NMR spectra of fibrils of HET-s and the prion domain (218-289) was performed. The collected data show that the C-terminal residues 218-289 within HET-s adopt the same  $\beta$ -solenoid fold as in isolation, or, in other words, the HET-s(218-289) amyloid fold is preserved in full-length HET-s fibrils. From the further analysis of the NMR spectra, a molecular model of the HET-s fibrils could be developed. Therein, the N-terminal domain adopts a poorly ordered molten-globule state, while the C-terminal part is highly organized into the amyloid fibril core observed for HET-s(218-289).

The prion domain HET-s(218-289) has recently been shown to form amyloid fibrils at a pH below 3.5 *in vitro*, which, in contrast to those formed at neutral pH, show little or no prion infectivity. This enabled us to address, on a molecular level, the differences that distinguish infectious from noninfectious polymorphs of the same polypeptide. The solid-state NMR spectra recorded on HET-s(218-289) pH 3 fibrils show that their structure differs extensively from that of the infectious pH 7 form. The structural dissimilarities of the two fibrillar species explain why the pH 3 fibrils cannot induce the prion form of HET-s, i.e. why they are not infectious.

When recombinantly expressed in *E. coli*, HET-s(218-289) readily aggregates into inclusion bodies. This is a well known phenomenon that occurs when expressing insoluble proteins in bacterial cells and is of interest because it may be closely related to the formation of amyloid deposits associated with many neurodegenerative diseases. The structure of inclusion bodies in general had not yet been investigated on an atomic scale and they were widely regarded as disordered protein aggregates. Our collected data unequivocally prove the amyloid nature of HET-s(218-289) inclusion bodies and show them to have the same highly organized structure as the *in vitro* amyloid fibrils. This shows that inclusion bodies can equal amyloid fibrils on an atomic scale.

Finally, we structurally investigated FgHET-s(218-289), a distant homologue of HET-s from the filamentous fungus *Fusarium graminearum* by solid-state NMR. The sequence-specific resonance assignment for almost all observable residues was derived from a set of NMR spectra. The chemical shifts together with the hydrogen/deuterium-exchange rates detected by solution NMR already show that the overall folds of FgHET-s(218-289) and HET-s(218-289) are indeed very similar. By recording and evaluating solid-state NMR spectra containing structural information in the form of distance restraints, we could determine the atomic-resolution structure of the amyloid fibrils formed by FgHET-s(218-289). It confirms a pronounced structural similarity to HET-s(218-289) but also some interesting differences that explain the different chemical properties of FgHET-s(218-289). Additionally, to determine this structure, an improved protocol for the structure calculation of protein fibrils by solid-state NMR was developed that greatly reduces both the required amount of protein and the number of NMR spectra to be recorded.

# Zusammenfassung

Prionen, infektiöse Proteine die in der Lage sind ihre Struktur selbst zu replizieren, sind vor allem bekannt als Erreger einiger Krankheiten, darunter die Traberkrankheit bei Schafen, bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern und die 'new variant' der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung bei Menschen. Prionen wurden aber auch schon in Hefe und Fadenpilzen entdeckt. Als ansteckende Form wird bei den meisten Prionen ein  $\beta$ -Faltblatt-reiches Aggregat vermutet, welches Amyloidfibrille genannt wird. Die Ablagerung von Amyloiden ist dabei namensgebend für eine ganze Klasse von Krankheiten, den sogenannten Amyloidosen, zu denen auch häufig vorkommende neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson gehören. Aufgrund ihrer Verbindung zu diesen Krankheiten ist die Bestimmung atomar aufgelöster Strukturen von Amyloidfibrillen von grossem Interesse, da so deren Bildung und Stabilität besser verstanden werden kann. Die Strukturbestimmung von Proteinfibrillen wird jedoch dadurch erschwert, dass diese weder löslich noch kristallisierbar, und damit auch durch die beiden erfolgreichsten Methoden der experimentellen Strukturbiologie—Lösungs-NMR (nukleare magnetische Resonanz) und Röntgenkristallografie—nicht charakterisierbar sind. Dementsprechend war auch bis jetzt noch keine Struktur eines Prions in der infektiösen Amyloidfaltung bekannt. Da Festkörper-NMR auch auf unlösliche, amorphe Proben anwendbar ist, stellt es die Methode der Wahl zur Strukturbestimmung von Amyloidfibrillen dar. Allerdings ist dies zur Zeit noch ein aufwendiger Prozess, und nur wenige, meist kristalline, Proteine wurden bis jetzt auf diese Art strukturell charakterisiert.

Zur Bestimmung der Struktur von HET-s(218-289), dem Amyloidkern eines Prions des Fadenpilzes *Podospora anserina*, wurden zahlreiche NMR-Proben mit verschiedenen Isotopenmarkierungsschemata hergestellt. Mit diesen konnten wir NMR-Spektren aufnehmen, die spezifische Informationen über die intra- und intermolekulare Ordnung der Amyloidfibrillen enthalten, welche sich für die Strukturbestimmung als unentbehrlich erwiesen. Basierend auf den experimentellen Daten konnten wir herausfinden, dass HET-s(218-289) einen sogenannten  $\beta$ -Solenoiden mit zwei Windungen pro Molekül bildet. Dieser weist einen dreieckigen hydrophoben Kern sowie mindestens 23 Wasserstoffbrücken, drei Salzbrücken und zwei Asparaginleitern pro Molekül auf und zeigt damit eindrucksvoll wie die hohe Stabilität der Amyloidfibrillen erreicht wird.

Um die Struktur des natürlich vorkommenden HET-s-Proteins ganzer Länge zu untersuchen, verglichen wir die Festkörper-NMR-Spektren von Fibrillen aus HET-s und jenen aus HET-s(218-289). Diese Daten zeigen, dass die C-terminalen Aminosäurereste 218-289 von HET-s den gleichen  $\beta$ -Solenoiden bilden wie in Isolation und damit die Struktur der Priondomäne in HET-s erhalten ist. Wir konnten ausserdem ein molekulares Modell für die HET-s-Fibrillen ableiten, in welchem sich die N-terminale Domäne in einem schlecht geordneten 'molten-globule'-Zustand befindet, der C-terminale Teil jedoch hochgeordnet ist.

Die Priondomäne (218-289) von HET-s kann, wie kürzlich gezeigt wurde, auch eine andere Art Amyloidfibrillen bilden, die bei pH-Werten von unter 3.5 entsteht und wenig oder keine der für Prionen typischen Infektiosität aufweist. Dadurch konnten wir die Unterschiede zwischen der infektiösen und der nichtinfektiösen Form des selben Polypeptids auf molekularer Ebene untersuchen. Die Festkörper-NMR-Spektren der sogenannten pH 3-Fibrillen zeigen, dass sich diese strukturell erheblich von der infektiösen pH 7-Form unterscheiden. Die Unterschiede zwischen den beiden, vom gleichen Protein gebildeten, Fibrillenarten können erklären, weshalb die pH 3-Fibrillen nicht die Prionenform von HET-s hervorrufen und nicht ansteckend sind.

Bei der rekombinanten Expression von HET-s(218-289) in *E. coli* Bakterien wird das Protein in sogenannten Einschlusskörperchen abgelagert. Dies ist ein wohl bekanntes Phänomen, das bei der rekombinanten Expression unlöslicher Proteine in Bakterien auftritt und mit der Bildung von Amyloidablagerungen im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen verwandt sein könnte. Einschlusskörperchen werden meist als amorphe Ablagerungen angesehen, wurden aber bis jetzt noch nicht mit atomarer Auflösung untersucht. Unsere Daten, aufgenommen an Einschlusskörperchen von HET-s(218-289), zeigen eindeutig, dass diese Amyloide sind und die hochgeordnete Struktur der *in vitro* gebildeten Fibrillen besitzen. Wir konnten damit zeigen, dass Einschlusskörperchen Amyloidfibrillen sein können.

FgHET-s(218-289), ein zu HET-s homologes Protein aus dem Fadenpilz *Fusarium graminearum* bildet ebenfalls Fibrillen, die wir mit Festkörper-NMR untersucht haben. Mit einem Set von Spektren konnten wir die Sequenz-spezifische Resonanzzuordnung fast aller beobachtbarer Aminosäurereste erreichen. Zusammen mit den Wasserstoff/Deuterium-Austauschraten zeigen diese Daten bereits, dass sich FgHET-s(218-289) und HET-s(218-289) in der Tat sehr ähnlich sind. Aufgrund interatomarer Abstandsbegrenzungen, die aus weiteren Festkörper-NMR-Spektren extrahiert wurden, bestimmten wir die Struktur von FgHET-s(218-289) mit atomarer Auflösung. Diese ist der von HET-s(218-289) beeindruckend ähnlich, weist aber im Detail einige Unterschiede auf, die auch die unterschiedlichen Eigenschaften dieser Fibrillen erklären können. Im Rahmen dieser Strukturbestimmung wurde zusätzlich ein verbessertes Protokoll zur Berechnung von Amyloidstrukturen basierend auf Festkörper-NMR-Daten entwickelt, welches mit einem stark reduzierten Satz an Proteinproben und NMR-Spektren durchführbar ist.