



Doctoral Thesis

## Solid-state NMR approaches for protein structure determination

**Author(s):**

Huber, Matthias

**Publication Date:**

2012

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007309303> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 20258

# Solid-State NMR Approaches for Protein Structure Determination

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

MATTHIAS HUBER

Master of Science ETH in Chemistry

Eidgenössische Technische Hochschule Zürich

born December 29, 1982

citizen of Schenkon LU

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Beat H. Meier, examiner

Prof. Dr. Roland Riek, co-examiner

Dr. Anja Böckmann, co-examiner

2012

# Abstract

Proteins are biological macromolecules consisting of a chain of amino acid residues. Knowing their structure is a key step towards understanding their function. Since the three-dimensional structure of proteins can usually not be easily and reliably predicted from the amino acid sequence experimental methods for its determination are needed. The most common methods to determine protein structure are x-ray crystallography and solution NMR. Proteins that do not form crystals of good diffraction quality and that are at the same time not soluble are more difficult to study. Solid-state NMR does not suffer from those limitations and is thus an attractive alternative, particularly for the study of fibrils, membrane proteins or large protein complexes.

Structure calculations based on NMR data combine chemical information of the protein (amino acid sequence, bond lengths and bond angles) with experimentally measured restraints. For solid-state NMR the most common restraint classes are torsional angle restraints and distance restraints that are derived from correlation spectra, that have in the simplest case two dimensions. Since such 2D spectra for distance-restraints of proteins suffer from severe resonance overlap, we analyze in the first part of the thesis the potential of higher-dimensional (3D and 4D) proton-detected experiments, which show an increased number of unambiguous distance restraints for solid-state structure determination.

Sensitivity is a limiting factor in NMR measurements of proteins. Detection of protons instead of carbons or nitrogens offers a significant gain in sensitivity. In solid-state NMR narrow  $^1\text{H}$  line-widths can only be achieved if the strong homonuclear dipolar couplings are eliminated. This can most easily be done by partial deuteration. To maintain good resolution on  $^{13}\text{C}$  in such samples the J-coupling to deuterium needs to be decoupled. We established a simple and reversible way to expand a commercial 1.3 mm HCN MAS probe with a  $^2\text{H}$  channel with sufficient field strength for scalar deuterium decoupling (i.e. 2-3 kHz). A supplementary coil is placed at the outside of the stator and requires no significant modifications to the probe. The performance and the realizable gains in sensitivity and resolution are demonstrated using perdeuterated ubiquitin with selectively  $^{13}\text{CHD}_2$ -labeled methyl groups.

We then demonstrate on microcrystalline ubiquitin that a non-uniformly-sampled 4D  $H^{\text{methyl}}-H^{\text{methyl}}$  spectrum can be measured on just 2 mg of protein in 3 days with sufficient sensitivity to extract unambiguous distance restraints that permit successful structure calculation in combination with  $H^N-H^N$  restraints from a 3D spectrum and TALOS+ torsional angle restraints.

In the second part of the thesis solid-state NMR methods are applied to amyloid fibrils. Amyloid fibrils play a role in various neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease, the most common form of dementia. We present chemical shift assignments for fibrils formed by highly pure recombinant  $A\beta$  1-40 with the Osaka E22 $\Delta$  mutation that is found in familial Alzheimer's disease. Amyloid  $\beta$  1-40 E22 $\Delta$  fibrils are highly ordered and yield line widths in the order of 0.5 ppm. The fibrils consist of parallel in-register  $\beta$ -sheets and all regions of the peptide are rigid, including the N-terminal part which is believed to be flexible in  $A\beta$  wt. Seeding experiments suggest that the same fold can be induced in  $A\beta$  wt.

Finally we analyze structural features of fibrils and show how calculations of symmetric fibrils can be implemented in CYANA. In contrast to NMR based structure determination of globular proteins where peaks from spatial correlation spectra are mostly due to contacts between different parts of the primary sequence of one protein molecule, intermolecular interactions play an important role for fibrils. Amyloid fibrils have a characteristic cross-beta structure consisting of extended  $\beta$ -sheets perpendicular to the fibril axis that contain  $\beta$ -strands from different protein molecules. In the direction of the fibril-axis a network of hydrogen bonds connects different  $\beta$ -strands to the extended  $\beta$ -sheet. Laterally the fibril is stabilized by side-chain interactions. Both axial and lateral contacts can be intra- or intermolecular. A segment of the fibril is calculated that consists of several monomers. The features for the calculation of symmetric dimers have been extended to allow restraining several molecules in the transverse plane of the fibril into a symmetric arrangement as well as periodic repeats along the fibril axis.

# Zusammenfassung

Proteine sind biologische Makromoleküle, die aus einer Kette von Aminosäuren bestehen. Um die Funktion von Proteinen zu verstehen, ist es wichtig, ihre Struktur zu kennen. Weil man die dreidimensionale Struktur von Proteinen normalerweise nicht einfach und zuverlässig aus ihrer Aminosäuresequenz vorhersagen kann, braucht man experimentelle Methoden um sie zu bestimmen. Die bekanntesten Methoden zur Strukturbestimmung sind die Kristallografie und die Lösung NMR. Proteine, die keine Kristalle von guter Diffraktionsqualität bilden und gleichzeitig nicht löslich sind, sind schwieriger zu untersuchen. Festkörper NMR leidet nicht unter diesen Einschränkungen und ist deshalb eine attraktive Alternative, besonders um Fibrillen, Membranproteine oder grosse Proteinkomplexe zu untersuchen.

Strukturrechnungen, die auf NMR Daten basieren, kombinieren chemische Information über das Protein (Aminosäuresequenz, Bindungslängen und Bindungswinkel) mit experimentell bestimmten Daten. Mit Festkörper NMR werden in der Regel erlaubte Bereiche für Torsionswinkel bestimmt oder es werden Distanzobergrenzen zwischen zwei Atomen aus Korrelationsspektren extrahiert, die im einfachsten Fall zwei Dimensionen haben. Da die Signale in solchen 2D Spektren stark überlappen, untersuchen wir im ersten Teil dieser Arbeit die Möglichkeit, mit höher dimensionalen (3D und 4D) Protonen-detektieren Spektren die Anzahl eindeutig bestimmbarer Distanzobergrenzen für die Strukturbestimmung zu erhöhen.

Die Sensitivität ist ein limitierender Faktor in NMR Messungen an Proteinen. Die Detektion von Protonen statt Kohlenstoff- oder Stickstoffkernen ermöglicht eine signifikante Steigerung der Sensitivität. In der Festkörper NMR können scharfe  $^1\text{H}$  Linien nur erreicht werden, wenn man die starken homonuklearen dipolaren Kopplungen entfernt. Am einfachsten erreicht man dies durch teilweise Deuterierung. Um in der Kohlenstoffdimension eine gute Auflösung zu behalten, müssen in solchen Proben die skalaren Kopplungen zu Deuterium entkoppelt werden. Wir haben eine einfache und reversible Methode entwickelt, um einen kommerziellen 1.3 mm HCN MAS Probenkopf mit einem zusätzlichen Deuteriumkanal aufzurüsten, der 2-3 kHz Feldstärke für die skalare Entkopplung liefern kann. Dazu wird eine zusätzliche Spule ausserhalb des Stators installiert, wozu keine signifikante Modifikation des

Probenkopfes nötig ist. Die Funktion und die erzielbaren Gewinne bezüglich Empfindlichkeit und Auflösung demonstrieren wir auf einer perdeuterierten Probe von Ubiquitin mit selektiv  $^{13}\text{CHD}_2$  markierten Methylgruppen. Wir zeigen dann auf einer mikrokristallinen Probe von Ubiquitin, dass ein nicht gleichmässig abgetastetes 4D  $\text{H}^{\text{methyl}}-\text{H}^{\text{methyl}}$  Spektrum in drei Tagen mit nur 2 mg Protein gemessen werden kann und dass die Empfindlichkeit ausreicht um eindeutige Distanzobergrenzen zu extrahieren, mit denen es dann möglich ist, in Kombination mit Distanzdaten aus einem 3D  $\text{H}^{\text{N}}-\text{H}^{\text{N}}$  Spektrum und mit TALOS+ Drehwinkeleinschränkungen, erfolgreich die Struktur zu bestimmen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden Festkörper NMR Methoden auf Amyloid Fibrillen angewendet. Amyloid Fibrillen spielen in verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. der Alzheimer-Krankheit, der häufigsten Form der Demenz, eine Rolle. Wir zeigen die sequenz-spezifische Zuordnung der chemischen Verschiebungen für Fibrillen aus hoch reinem, rekombinant hergestelltem  $\text{A}\beta$ 1-40 mit der Osaka E22 $\Delta$  Mutation, die für eine familiäre Häufung von Alzheimer Erkrankungen verantwortlich ist. Amyloid- $\beta$  1-40 E22 $\Delta$  Fibrillen sind hochgeordnet und geben Linienbreiten in der Grössenordnung von 0.5 ppm. Die Fibrillen bestehen aus parallelen in-Register  $\beta$ -Faltblättern und alle Bereiche des Peptids sind unbeweglich, inklusive dem N-terminalen Teil, der im Wildtyp  $\text{A}\beta$  als beweglich angenommen wird. Weiter zeigen wir, dass durch animpfen mit  $\text{A}\beta$ 1-40 E22 $\Delta$  Fibrillisationskeimen die gleiche Faltung auch in Wildtyp  $\text{A}\beta$  induziert werden kann.

Schliesslich analysieren wir die Strukturelemente von Fibrillen und zeigen, wie Strukturrechnungen von symmetrischen Fibrillen in CYANA implementiert werden können. Im Gegensatz zur NMR-basierten Strukturbestimmung von globulären Proteinen, wo Signale in räumlichen Korrelationsspektren hauptsächlich durch Kontakte zwischen verschiedenen Teilen der Primärstruktur eines Proteinmoleküls verursacht werden, spielen intermolekulare Wechselwirkungen eine wichtige Rolle für Fibrillen. Amyloid Fibrillen haben eine charakteristische Kreuz-beta Struktur, die rechtwinklig zur Fibrillenachse aus ausgedehnten  $\beta$ -Faltblättern besteht, welche  $\beta$ -Stränge von verschiedenen Protein Molekülen enthalten. In Richtung der Fibrillenachse verbindet ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken die  $\beta$ -Stränge zu einem ausgedehnten  $\beta$ -Faltblatt. Lateral wird die Fibrille durch Seitenkettenwechselwirkungen stabilisiert. Sowohl axiale wie auch laterale Kontakte können intra- oder intermolekular sein. Berechnet wird ein Segment der Fibrille, das aus mehreren Monomeren besteht. Die Funktionen zur Strukturrechnung von symmetrischen Dimeren wurden ausgebaut um zu ermöglichen, dass mehrere Moleküle symmetrisch im Querschnitt der Fibrille angeordnet werden und sich gleichzeitig entlang der Fibrillenachse periodisch wiederholen.