



Doctoral Thesis

Structural studies of amyloid fibrils by solid-state NMR

Author(s):

Schütz, Anne Kathrin

Publication Date:

2013

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009790804> →

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. 20783

**STRUCTURAL STUDIES OF AMYLOID
FIBRILS BY SOLID-STATE NMR**

A dissertation submitted to
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
ANNE KATHRIN SCHÜTZ
Diplom Chem., Georg-August University Göttingen
born 17. 03 1984
citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Beat H. Meier, examiner
Prof. Dr. Roland Riek, co-examiner
Dr. Anja Böckmann, co-examiner

2012

Abstract

Amyloids are fibrillar protein aggregates that are a pathological hallmark of a series of prevalent neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease. It is therefore of great interest to understand the process of amyloid formation on a molecular level. A subset of amyloids can replicate by seeded nucleation and propagate as prions, infectious agents composed solely of protein. Structurally, the polypeptide chain of amyloids has folded into a cross- β structure with β -sheets running perpendicularly to the long axis of the fibril.

Amyloids do not crystallize, are mostly insoluble and thus do not constitute a promising target for the standard techniques in structural biology, X-ray crystallography and solution-state nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). In the past decade, amyloids have been extensively studied by solid-state NMR spectroscopy, a method by which proteins can be investigated even if they are in a solid yet non-crystalline state.

Sequential resonance assignment of protein spectra, which is the correlation of each observed NMR frequency with a nuclear spin of an amino acid in the primary sequence, is a prerequisite for all high-resolution NMR studies. Using the globular domain of the fungal HET-s prion from *Podospora anserina* as a model system, we evaluated a set of three-dimensional correlation experiments for this purpose. Our concept has since been applied to several *de novo* assignments, among them a prion protein of more than 350 residues.

The mammalian prion protein PrP in its infectious form is linked to bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and a variant of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans. Prion proteins have also been discovered in filamentous fungi and yeast organisms and are frequently used in biophysics and cell biology as model systems to study prion structure, propagation and infectious properties. The Sup35 protein from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) serves as such a model of prion behavior *in vivo* and *in vitro*. Since Sup35p contains almost 700 amino acid residues, it is often reduced to conveniently small fragments that are better accessible by biophysical techniques. Our results challenge the assumption that such small constructs can faithfully represent the entire structural complexity of the full-length prion. Based on the sequential resonance assignment of the amyloid core of both the full-length prion protein and a commonly used fragment

thereof, Sup35NM, we could establish that although the cores of the constructs partially overlap in the primary sequence, they are structurally distinct.

Historically, amyloids have been defined in pathology by their stainability with Congo red, a small organic dye molecule, and its resulting green birefringence under polarized light. Yet the binding mechanism and geometry of the Congo red-amyloid complex were not known in atomic detail. We developed an approach that is generally applicable to monitor how amyloids of known structure interact with small molecules and applied it to characterize the interface between Congo red and amyloid fibrils formed by the prion domain of the HET-s protein. Based on our structural model of the complex, we could predict a point mutant of the protein that reduces Congo red affinity dramatically, underlining how easily amyloids can remain undetected in conventional staining tests.

The development of amyloid markers for the reliable and selective identification of amyloids *in vivo* and *in vitro* is an active area of research. Luminescent conjugated polythiophenes (LCPs) represent optical probes capable of distinguishing between different protein aggregates with a sensitivity that can address subtle conformational variations. We were able to correlate fluorescence properties and binding modes of LCPs to fibrils formed by the prion domain of HET-s and to identify which specific topological features LCPs recognize on the fibril surface.

While Alzheimer's disease normally occurs spontaneously and with late onset, a genetic predisposition can be caused by mutations in the genes encoding for the $\alpha\beta$ precursor protein. We studied $\alpha\beta_{1-40}$ fibrils with the Osaka mutation E22 Δ and recorded NMR spectra to extract information about intra- and intermolecular order within these fibrils. Based on these experimental restraints, the three-dimensional arrangement assumed by protein monomers in these fibrils can be deduced.

This work demonstrates how solid-state NMR spectroscopy can contribute to the characterization of amyloids with information about structure, dynamics and interactions.

Zusammenfassung

Amyloide sind fibrilläre Proteinaggregate, die das pathologische Kennzeichen einer Reihe häufiger neurodegenerativer Krankheiten die Alzheimer und Parkinson sind. Es ist deshalb von grossen Interesse, den Prozess der Amyloidbildung auf molekularer Ebene zu verstehen. Eine Untergruppe der Amyloide kann sich durch Keimbildung vervielfältigen und in Form von Prionen verbreiten - infektiöse Einheiten, die nur aus Protein bestehen. Auf struktureller Ebene hat sich in Amyloiden die Peptidkette zu einer β -Faltblattstruktur zusammengelagert, in welcher die β -Stränge senkrecht zur Fibrillenlängsachse verlaufen.

Amyloide kristallisieren nicht, sie sind meist nicht löslich und stellen daher kein aussichtsreiches Studienobjekt dar für die Standardtechniken der Strukturbioogie, Röntgenkristallographie und die Lösungs-NMR (nukleare magnetische Resonanz). In den letzten Jahren sind Amyloide aber umfangreich mittels Festkörper-NMR Spektroskopie untersucht worden, einer Technik, für die Proteine auch in fester aber nicht-kristalliner Form zugänglich sind.

Die sequentielle Zuordnung jeder Resonanz im NMR Spektrum zu dem Kernspin einer Aminosäure in der Primärsequenz des Proteins ist die Voraussetzung aller hochaufgelösten Untersuchungen mittels NMR. Wir haben einen Satz dreidimensionaler Korrelationsexperimente zu diesem Zweck getestet mit der globulären Domäne eines Prionenproteins aus dem Fadenpilz *Podospora anserina* als Modellsystem. Unser Konzept ist seitdem auf eine Reihe *de novo* Zuordnungen angewendet worden, darunter die eines Prionenproteins mit mehr als 300 Aminosäuren.

Das Prionenprotein der Säugetiere, PrP, steht in in seiner infektiösen Form in Zusammenhang mit boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) in Rindern und einer Form der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung (CJD) beim Menschen. Prionenproteine sind aber auch in Fadenpilzen und Hefeorganismen entdeckt worden. Diese dienen häufig als Modellsysteme in Biophysik und Zellbiologie für Prionenstruktur, -ausbreitung und -infektiosität. Das Sup35 Protein aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein solchen Modellsystem für Eigenschaften der Prionen in *in vivo* and *in vitro*. Da Sup35p fast 700 Aminosäuren gross ist, wird es oft auf kleine Fragmente reduziert, die für biophysikalische Techniken besser zugänglich sind. Unsere Ergebnisse stellen die Annahme in Frage, dass solche Teilkonstrukte die ganze strukturelle Komplexität des Vollängenproteins detailgetreu abbilden

können. Auf Grundlage der sequentiellen Zuordnung des Amyloidkerns sowohl des Vollängenproteins als auch des häufig untersuchten Sup35NM Fragments, konnten wir zeigen, dass, obwohl die Amyloidkerne der beiden überlappen, sie doch strukturell unterschiedlich sein müssen.

Historisch wurden Amyloide in der Pathologie nachgewiesen durch Anfärben mit Kongorot, einem kleinen organischen Farbstoffmolekül, und der resultierenden grünen Doppelbrechung in polarisiertem Licht. Dennoch waren der Bindungsmechanismus und die Geometrie des Kongorot-Amyloid Komplexes nicht auf atomarer Ebene bekannt. Wir haben die Bindungsstelle zwischen Kongorot und Amyloidfibrillen der Prionendomäne des HET-s Proteins charakterisiert mit Methoden, die allgemein anwendbar sind um zu untersuchen, wie Amyloide bekannter Struktur mit kleinen Molekülen wechselwirken. Auf der Grundlage unseres Strukturmodells konnten wir eine Punktmutante des Proteins vorhergesagen, welche die Kongorot-Affinität dramatisch senkt. Dies unterstreicht, wie leicht Amyloide in konventionellen Färbetests unentdeckt bleiben können.

Die Entwicklung von Amyloid-Markern für die zuverlässige und selektive Identifikation von Amyloiden *in vivo* and *in vitro* ist ein Bereich aktiver Forschung. Lumineszierende konjugierte Polythiophene (LCPs) stellen optische Sensoren dar, die in der Lage sind, verschiedene Proteinaggregate zu unterscheiden mit einer Genauigkeit, die auf sehr subtile konformationelle Variationen anspricht. Wir konnten die Fluoreszenz-Eigenschaften und Bindungsweisen von LCPs an Fibrillen der Prionendomäne von HET-s korrelieren und zeigen, welche Topologie auf Fibrillenoberfläche die LCPs erkennen.

Während Alzheimer meistens spontan und spät entsteht, können Mutationen in den Genen des im $\alpha\beta$ -Vorläuferproteins eine genetische Veranlagung nach sich ziehen. Wir untersuchten die $\alpha\beta_{1-40}$ Fibrillen mit der Osaka Mutation E22 Δ und haben NMR Spektren gemessen, um Informationen über inter- und intramolekulare Ordnung in diesen Fibrillen zu erhalten. Auf der Grundlage unserer experimentellen Daten, kann die dreidimensionale Anordnung der Proteinmonomere in der Fibrille abgeleitet werden.

Diese Arbeit zeigt, wie die Festkörper-NMR Spektroskopie beitragen kann zur Charakterisierung der Amyloide mit Informationen zu Struktur, Dynamik und Interaktionen.