



## Doctoral Thesis

# Liquid- and Solid-State NMR Studies on the Alzheimer's Peptide and Method Development for Structure-Based Drug Design on an Oncoprotein

**Author(s):**

Wälti, Marielle Aulikki

**Publication Date:**

2014

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010417081> →

**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. 22406

**Liquid- and Solid-State NMR Studies on the  
Alzheimer's Peptide  
and  
Method Development for Structure-Based  
Drug Design on an Oncoprotein**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCE of ETH Zürich

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

Marielle Aulikki Wälti

Master of Science, in medicinal and industrial pharmaceutical  
sciences, ETH Zürich

born on 5.7.1981

citizen of Zürich (ZH) and Unterkulm (AG)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Roland Riek, examiner  
Prof. Dr. Beat Meier, co-examiner  
Prof. Dr. Peter Güntert, co-examiner  
Prof. Dr. Anja Böckmann, co-examiner

2014

# Resümaziun

Proteins sun molecüls biologics chi consistan dad acids aminus. I'l corp uman existan tschientmilli differents proteins e blers da quels sun essenzials per la vita. Els pon avair differentas grondezzas e fuormas. Pitschens vegnan nomnats normalmaing peptids e pon dafatta avair be duos acids aminus. Il plü grond protein d'uman cognuschaint es Titin, ün protein muscular, chi consista da 30'000 acids aminus. La sequenza dals acids aminus sco eir l'ambiant local ingiò ch'ün protein as rechatta, defineschan sia structura tridimensiunala. Motivs structurals tipics da proteins sun  $\alpha$ -helices, in qualas ils acids aminus s'orienteschan in fuorma da spirala, algordond ad üna s-chala raduonda, e  $\beta$ -fögls, chi consistan da lateral colliadas chadainas cuortas d'acids aminus. Üna gronda part dals proteins nu posseda però üna structura stabila e bain descritta. La cognuschentscha da la structura e da la dinamica d'ün protein es decisiv per l'incletta da sia funcziun. I dà duos metodos principalas per determinar la structura da proteins. La prüma metoda es cristallografia radiografica, chi fa ün purtret static dal protein cun resoluziun fich ota. Tschella metoda es spectroscopia da risonanza magnetic-nucleara (RMN-spectroscopia), la metoda ütilisada in quista lavur. A man dad RMN in soluziun as survain ün purtret dinamic, chi represchainta la fuorma dal protein chattada in natüra meglder.

Illa prüma part da quista tesa (chapitels 1-4), il sistem examinà es il protein d'Alzheimer, l'amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) peptid, chi'd es collià ferm cul svilup da patologias neurodegenerativas sco per exaimpel la malatia d'Alzheimer. I consista da 42 acids aminus ed es pelplü na structurà in fuorma dissolvida. Supraplü es il peptid fich instabil e tendescha d'agregar fich svelt in fibrillas d'amyloid. Quai sun agregats indissolvibels chi consistan da  $\beta$ -fögls d'ordinaziun ota, chi s'arranschan parallel a l'axa da fibrils. Quists fibrils as rechattan eir in tscharvels da paziants cun malatia d'Alzheimer e la determinaziun da lur structura po manar infuormaziuns importantas per l'incletta da quista malatia. Chapitel 1 introdüa  $A\beta$  e la malatia d'Alzheimer. Chapitel 2 descriva l'expressiun, la purificaziun e la fibrillisaziun dals peptids. Las masüraziuns, l'analisa da datas e las calculaziuns da la structura d' $A\beta$  fibrillas, a man da RMN in soluziun e da corp solid, sun descrittas in chapitel 3. Perquai cha l'agregaziun da  $A\beta$  es decisiva pel svilup da la malatia d'Alzheimer, es examinà quist process in chapitel 4 a man da RMN in soluziun.

Illa seguonda part da quista tesa (chapitels 5-7), il protein d'interess es l'onco-protein HDM2, chi ha il potenzial da chaschunar cancer. Tenor quai es si'examinaziun da grond interess per applicaziuns farmacologicas. Nus vain calculà la structura da quist complex da protein a man d'ün ligand cognuschaint (nutlin-3a) e metodus standardisadas (chapitel 6). Ultra da quai, vaina applichà üna metoda nouva svilupada in chasa, nomnada  $NMR^2$ . Cun  $NMR^2$ , il process intensiv da transemter e determinar la structura dal protein po gnir surventschi e la structura complexa da la tas-cha da liadüra po gnir determinada. Quista procedura ans ha permiss da caracterisar la structura complexa d'ün ligand collià cun HDM2 cun affinità bassa (chapitel 7).

Finalmaing illustrescha quista tesa sco cha RMN (in soluziun e da corp solid) po spordscher infuormaziuns valablas davart la structura e dinamica da proteins d'uman importants ed associats cun malatias.

# Summary

Proteins are biological molecules composed of amino acid residues. In the human body there are more than 25'000 different proteins and many of them are essential to life. They can cover various sizes and shapes. Small ones are typically called peptides and can contain as little as two amino acids. The largest known human protein is Titin, a muscle-protein, which consists of 30'000 amino acid residues. Both the amino acid sequence and the local environment of a protein define its three dimensional structure. Typical structural motifs of proteins are  $\alpha$ -helices, where the amino acids are oriented in a spiral conformation reminiscent of corkscrew stairs, and  $\beta$ -sheets, which consist of laterally connected stretches of short amino acid chains in extended conformation. Furthermore, a large percentage of proteins does not possess a stable and well-defined structure.

The knowledge of the structure and the dynamics of a protein is crucial for the understanding of its function. There are two main methods for the determination of the structure of a protein. The first one is X-ray crystallography, which provides a static picture of the protein at high resolution. The other one is nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, the method used in this work. In solution state NMR also a dynamic picture is obtained, which better represents the state adopted by the protein found in nature.

In the first part of this thesis (Chapters 1-4), the system under study is the Alzheimer's peptide, the amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) peptide, which is strongly linked to the onset of neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's disease. It consists of 42 amino acid residues and is mostly unstructured in solution. Moreover, this peptide is very unstable and tends to aggregate very quickly into fibrillar aggregates, the so-called amyloid fibrils. These are insoluble aggregates consisting of highly ordered  $\beta$ -sheets, which align parallel to the fibril axis. Such fibrils are also found in the brains of Alzheimer's disease patients and the determination of their structure can provide important information for the understanding of this disease. Chapter 1 gives an introduction on  $A\beta$  and Alzheimer's disease. Chapter 2 describes the expression, purification, and fibrillization of the peptide. The measurements, the data analysis and structure calculation of the  $A\beta$  fibrils by solution and solid-state NMR are shown in Chapter 3. Since the aggregation of  $A\beta$  is crucial to the onset of Alzheimer's disease, this process is studied by solution state NMR in Chapter 4.

In the second part of this thesis (Chapters 5-7), the protein of interest is the human double minute 2 (HDM2), an oncoprotein, which is linked to cancer. Thus, its study is of high interests for pharmaceutical applications. We calculate the structure of the complex of this protein with a well-known ligand (nutlin-3a) using standard methods (Chapter 6). Furthermore, we applied a new method developed in house, the so-called *NMR*<sup>2</sup> (NMR molecular replacement). With *NMR*<sup>2</sup>, the time consuming process of protein resonance assignment and structure calculation of a protein-ligand complex can be overcome and the complex structure of the binding pocket can be determined. This procedure allowed us to characterize the complex structure of nutlin-3a bound to HDM2 and will be expanded on low affinity binders (Chapter 7).

In conclusion, this thesis illustrates how NMR (both solution and solid-state) can provide valuable information on the structure and dynamics of important disease-associated human proteins.

# Zusammenfassung

Proteine sind biologische Moleküle, die aus Aminosäuren zusammengesetzt sind. Im menschlichen Körper gibt es mehr als 25'000 verschiedene Proteine und viele davon sind lebenswichtig. Sie können verschiedene Größen und Formen haben. Die kleinen werden in der Regel Peptide genannt und können sogar aus nur zwei Aminosäuren bestehen. Das größte bekannte menschliche Protein ist Titin, ein Muskelprotein, das aus 30'000 Aminosäuren aufgebaut ist. Sowohl die Aminosäuresequenz, als auch die lokale Umgebung eines Proteins, definieren dessen dreidimensionale Struktur. Typische Strukturmodule von Proteinen sind  $\alpha$ -Helices, in denen sich die Aminosäuren in einer spiralförmigen Konformation anordnen, die an eine Wendeltreppe erinnert, und  $\beta$ -Faltblätter, die aus seitlich verbundenen kurzen "flachen" Aminosäureketten bestehen. Ein großer Teil der Proteine besitzt keine stabile und gut definierte Struktur. Die Kenntnis der Struktur und Dynamik von Proteinen ist entscheidend für das Verständnis ihrer Funktion. Es gibt zwei Hauptmethoden zur Bestimmung der Struktur eines Proteins. Die erste ist die Röntgenkristallographie, die ein statisches Bild des Proteins mit hoher Auflösung liefert. Die andere ist die Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie, welche in dieser Arbeit verwendet wurde. Im Lösungs-NMR kann auch ein dynamisches Bild vom Protein erhalten werden, das den Zustand des Proteins in der Natur besser beschreibt.

Im ersten Teil dieser Arbeit (Kapitel 1-4) ist das untersuchte System das Alzheimer-Peptid, das Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) Peptid, das mit dem Auftreten von neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit verbunden ist. Es besteht aus 42 Aminosäuren und ist in Lösung meist unstrukturiert. Darüber hinaus ist dieses Peptid sehr instabil und neigt dazu, sehr schnell zu fibrillären Aggregaten, den sogenannten Amyloidfibrillen zu aggregieren. Das sind unlöslichen Aggregate, die aus hoch geordneten  $\beta$ -Faltblättern bestehen, die parallel zur Achse der Fibrille ausgerichtet sind. Solche Fibrillen werden auch im Gehirn von Alzheimer-Patienten gefunden und die Bestimmung ihrer Struktur kann wichtige Informationen für das Verständnis dieser Krankheit liefern. In Kapitel 1 besteht aus einer Einführung zu dem  $A\beta$  Peptid und der Alzheimer-Krankheit. Kapitel 2 beschreibt die Expression, Aufreinigung und Fibrillierung des Peptids. Die Messungen, die Datenanalyse und die Berechnung der Struktur der  $A\beta$ -Fibrillen mittels Lösungs- und Festkörper-NMR werden in Kapitel 3 gezeigt. Da die Aggregation von  $A\beta$  entscheidend ist für das Einsetzen der Alzheimers-Krankheit, wird diese in Kapitel 4 mittels Lösungs-

NMR untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit (Kapitel 5-7), ist das Human Doppel Minute 2 (HDM2), ein Onkoprotein, welches ein krebserzeugendes Protein ist das Protein von Interesse. Daher ist dessen Erforschung für die Pharmazie von grossem Interesse. Wir berechnen die Struktur des Komplexes des Proteins mit einem bekannten Liganden (nutlin-3a) unter Verwendung von Standardverfahren in Kapitel 6. Darüber hinaus haben wir eine neue hausgeigen entwickelte Methode, das so genannte *NMR*<sup>2</sup> (NMR molecular replacement) angewendet. Mit *NMR*<sup>2</sup> kann das zeitaufwendige Verfahren der Zuordnung der chemischen Schifts zum Protein und die Berechnung der Struktur eines Protein-Liganden-Komplex umgangen werden und die Struktur des Komplexes kann bestimmt werden. Mit dieser Methode haben wir die Struktur des Komplexes von HDM2 mit nutlin-3a bestimmt und werden es auf Liganden von niedriger Affinität ausweiten (Kapitel 7).

Zusammengefasst, veranschaulicht diese Arbeit wie (Lösungs- und Festkörper-) NMR wertvolle Informationen über die Struktur und Dynamik von wichtigen krankheitsassoziierten menschlichen Proteinen liefern kann.