

DISS. ETH NO. 23134

Solid-State NMR Studies of Liquid Crystals
and of the HET-s(218-289) Prion

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

EMILIE TESTORI

Ing. Bioing. & Biotech. Dipl. EPF

born on 22.08.1985

Citizen of

Les Montets FR

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Beat H. Meier

Prof. Dr. Roland Riek

2015

Abstract

Prions are infectious proteins with the ability to spread through self-replication of an altered conformation. Prions are responsible of a number of diseases including scrapie in sheep, bovine spongiform encephalopathy in cattle, and Creutzfeld-Jakob in humans. The diseased form of prions is characterized by a β sheet-rich molecular aggregate called amyloid fibrils. The presence of amyloid fibrils has also been observed in the fungus *Podospora anserina*, where the HET-s prion triggers a programmed cell death. The HET-s molecule is composed of an N-terminus globular domain and a C-terminus prion forming domain, represented by residues 218 to 289 [HET-s(218-289)]. HET-s is a model of choice to study amyloid fibrils because of its suggested similarities with mammalian prions, as well as its well-defined structure at physiological pH, which does not show polymorphism, and the ease to express, purify and fibrilize the HET-s(218-289) monomers. The structure of HET-s(218-289) fibrils has been measured with solid-state nuclear magnetic resonance (NMR). Solid-state NMR does not require crystalline nor soluble samples, which are a prerequisite for X-ray crystallography and solution-state NMR, respectively. Solid-state NMR is therefore an appropriate technique to study amyloid fibrils at atomic resolution. In solid-state NMR flexible residues of proteins are measured with the INEPT transfer, whereas the CP sequence is used to obtain signal from the more rigid residues. The HET-s(218-289) fibrils show resonances in both CP- and INEPT-based spectra.

In this thesis the Rotational-Echo DOuble-Resonance (REDOR) sequence was tested on liquid crystals (LCs) displaying very small residual dipolar couplings (RDCs) in order to determine whether REDOR could be used to measure RDCs in very flexible residues of proteins. With our sample, RDCs around 60 Hz could be measured with REDOR with an accuracy of ± 5 Hz. HET-s(218-289) fibrils were then studied with solid-state NMR using INEPT-based experiments. It was suggested that the signals observed in INEPT-based spectra originate either from flexible residues framing the β -sheets or from HET-s(218-289) monomers. A series of experiments was performed to test these hypotheses. REDOR experiments and spectra measured at an angle different than the “magic angle” showed that the RDCs of the residues displaying resonances in INEPT spectra have a value close to 0 Hz. Furthermore a NMR diffusion experiment indicated that these residues are part of very big units. These resonances were assigned using HNCA and HNC0 experiments and showed striking spectral similarities with a sample containing HET-s(218-289) monomers in solution. The resonances observed in INEPT-based spec-

tra of HET-s(218-289) fibrils therefore probably belong to HET-s(218-289) monomers attached to the fibrils, which would explain the very slow diffusion coefficient. A limited proteolysis with the enzyme Proteinase K was then carried out in order to remove the HET-s(218-289) monomers, while keeping the fibrils intact. After optimization of the enzyme:substrate ratio, as well as of the incubation time, it was impossible to eliminate all the signals from the INEPT spectra without cleaving off the fibrils. The intensity of CP spectra was used as reference to evaluate the amount of fibrils in the sample. The resonances remaining after limited proteolysis likely originate from parts of HET-s(218-289) monomers less accessible to the enzyme for cleavage. The possibility that these signals come from flexible residues of HET-s(218-289) fibrils was therefore excluded.

In the second part of this work, a dynamic analysis of the HET-s(218-289) fibrils was performed by recording CP-based experiments. The timescales and amplitudes of motion of the ^1H - ^{15}N and $^1\text{H}\alpha$ - $^{13}\text{C}\alpha$ bonds were characterized by measuring R_1 , $R_{1\rho}$, and REDOR experiments. The presence of two timescales of motion was observed: a faster timescale (ps-ns range) and a slower timescale (μs range). The faster timescale describes a very localized motion, which makes the interpretation of the results difficult. The slower timescale of motion suggests that the entire molecule sees a single motion.

Résumé

Les prions sont des protéines contagieuses qui se propagent en répliquant une conformation anormale. Les prions sont responsables d'un nombre de maladies comprenant la tremblante du mouton, l'encéphalopathie spongiforme bovine, aussi appelée "maladie de la vache folle", ainsi que la maladie de Creutzfeldt-Jakob. La forme infectieuse du prion est caractérisée par un agrégat de protéines adoptant la structure typique du feuillet β , aussi appelé fibres amyloïdes. La présence de fibres amyloïdes a également été observée chez le champignon *Podospora anserina*, où le prion HET-s déclenche une mort cellulaire programmée. La molécule HET-s est composée d'une extrémité N-terminale formant un domaine globulaire et d'une extrémité C-terminale où est située la séquence codant pour le prion, représentée par les résidus 218 à 289 [HET-s(218-289)]. HET-s est un modèle de choix pour l'étude des fibres amyloïdes grâce à ses similitudes suggérées avec les prions mammifères, ainsi qu'à sa structure bien définie à pH physiologique, exempt de polymorphisme, et à la facilité à exprimer, purifier et fibriliser les monomères de HET-s. La structure des fibres de HET-s(218-289) a été mesurée par résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide. La RMN du solide n'exige pas d'avoir des échantillons cristallins ou solubles, qui sont un prérequis pour la cristallographie à rayons X et la RMN en solution, respectivement. La RMN du solide est par conséquent une technique de choix pour l'étude des fibres amyloïdes. En RMN du solide, le transfert de magnétisation INEPT est habituellement utilisé pour mesurer les résidus flexibles alors que le transfert CP est employé pour obtenir le signal des résidus plus rigides. La présence de résonances est visible sur les spectres des fibres de HET-s(218-289) utilisant le transfert CP ainsi que le transfert INEPT.

La séquence REDOR a été testée sur des cristaux liquides présentant de petits couplages dipolaires résiduels afin de déterminer si REDOR pouvait être utilisé pour mesurer les couplages résiduels de résidus très flexibles de protéines. Avec notre échantillon, des couplages résiduels d'environ 60 Hz ont pu être mesurés avec REDOR avec une précision de ± 5 Hz. Les fibres de HET-s(218-289) ont ensuite été mesurées avec la RMN du solide en utilisant des expériences employant le transfert INEPT. L'hypothèse a été émise que les signaux observés sur les spectres INEPT proviennent soit des résidus entourant les feuillets β , soit de monomères de HET-s(218-289). Une série d'expériences a été réalisée dans le but de tester ces hypothèses. Les expériences REDOR et les spectres mesurés à un angle de rotor différent de l'"angle magique" ont montré que les couplages résiduels

des résidus montrant des signaux dans les spectres INEPT sont très petits. De plus, les expériences mesurant le coefficient de diffusion de ces résonances ont indiqué que ces résidus font partie d'unités de grande taille. Ces résonances ont été attribuées en utilisant les séquences HNCA et HNC(O) basées sur le transfert INEPT et ont montré des similitudes saisissantes avec un échantillon contenant uniquement des monomères de HET-s(218-289) en solution. Les résonances observées dans les spectres INEPT appartiennent donc très probablement aux monomères de HET-s(218-289) attachés aux fibres, ce qui expliquerait la très lente diffusion des monomères. Une protéolyse limitée avec l'enzyme Proteinase K a ensuite été effectuée afin de digérer les monomères de HET-s(218-289) tout en gardant les fibres intactes. Après optimisation du ratio enzyme:substrat ainsi que du temps d'incubation, il était impossible d'éliminer tous les signaux des spectres INEPT sans détruire les fibres de HET-s(218-289). L'intensité des spectres utilisant un transfert CP a été utilisée pour l'évaluation de la quantité de fibres dans l'échantillon. Les résonances restantes après protéolyse limitée appartiennent probablement aux parties des monomères de HET-s(218-289) moins accessibles au clivage par l'enzyme. La possibilité que ces signaux proviennent des résidus flexibles des fibres de HET-s(218-289) a donc été exclue.

Dans la deuxième partie de ce travail, une analyse de la dynamique des fibres de HET-s(218-289) a été effectuée par l'enregistrement d'expériences utilisant un transfert CP. Les échelles de temps ainsi que les amplitudes de mouvement des liaisons ^1H - ^{15}N et $^1\text{H}\alpha$ - $^{13}\text{C}\alpha$ ont été caractérisées en mesurant des expériences R_1 , $R_{1\rho}$, et REDOR. La présence de deux échelles de temps de mouvement a été observée: une plutôt rapide (échelle de la ps-ns) et une plutôt lente (échelle de la μs). La première échelle de temps décrit un déplacement très localisé, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats dans leur ensemble. La deuxième suggère que la molécule entière est soumise à un seul mouvement.