

Design and characterization of coiled coil-based amyloid forming model peptides

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Diplom-Chemiker KEVIN PAGEL

aus Werdau (Sachsen), Deutschland

Oktober 2007

1. Gutachterin: Prof. Dr. Beate Koksch

2. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Seitz

Disputation: 14. 12. 2007

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Beate Kokschi in der Zeit von Juni 2003 bis Oktober 2007 an folgenden Instituten angefertigt:

- Institut für Organische Chemie der Fakultät für Chemie und Mineralogie der Universität Leipzig (Juni 2003 – Juni 2004)
- Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin (Juni 2004 – Oktober 2007)

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel "*Design and characterization of coiled coil-based amyloid forming model peptides*", selbstständig und ohne Benutzung anderer als der zugelassenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Alle angeführten Zitate sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt.

Berlin, Oktober 2007

Kevin Pagel

Die Dissertation wurde in englischer Sprache verfasst.

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

Pagel, K.; Seri, T.; Berlepsch, H.v.; Griebel, J.; Kirmse, R.; Böttcher, C.; Kokschi, B.; How metal ions affect amyloid formation – Cu²⁺ and Zn²⁺ sensitive peptides, **2007**, in preparation.

Wagner, S.C.; Araghi, R.R.; Pagel, K.; Berlepsch, H.v.; Böttcher, C.; Kokschi, B.; De novo designed pH-switches to trigger the peptide amyloid formation, **2007**, submitted.

Pagel, K.; Wagner, S.C.; Samedov, K.; Berlepsch, H.v.; Böttcher, C.; Kokschi, B.; Random coils, β -sheet ribbons and α -helical fibers - one peptide adopting three different secondary structures at will, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, (7), 2196-2197.

Pagel, K.; Vagt, T.; Kokschi, B.; Directing polypeptide's secondary structure at will – from α -helix to amyloids and reverse?, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3843-3850. → Reviewed in: Jekyll and Hyde protein in brain disease?, *Chemistry World* **2005**, 2, (11).

Pagel, K.; Vagt, T.; Kohajda, T.; Kokschi, B.; From α -helix to β -sheet – a reversible metal ion induced peptide secondary structure switch, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2500-2502. → Reviewed in: Switching Off Neurodegenerative Diseases, *Chemistry World* **2005**, 2, (8).

Pagel, K.; Seiwert, B.; Seeger, K.; Berger, S.; Mark, A.; Kokschi, B.; Advanced approaches for the characterization of a de novo designed antiparallel coiled coil peptide, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3 (7), 1189-1194. → Cover picture: *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, (7).

Vorträge

How metal ions affect the amyloid formation – model peptides adopting different conformations in the presence of Cu²⁺ and Zn²⁺, selected short lecture, *8th German Peptide Symposium*, Heidelberg, Germany, March 16, **2007**.

Directing polypeptide's secondary structure at will - From α -helix to amyloids and reverse?, *Novabiochem Peptide Meeting*, Berlin, Germany, March 1, **2007**.

Directing polypeptide's secondary structure at will - From α -helix to amyloids and reverse?, *Autumn Symposium Metallobiomics*, Berlin, Germany, December 7, **2006**.

Design and characterization of α/β -switch peptides, *VW Foundation research group meeting*, Leipzig, Germany, March 4, **2004**.

Investigations on the folding of an α -helical coiled coil peptide, *Bioorganic chemistry junior scientists meeting*, Hamburg, Germany, September 18, **2003**.

Poster

How metal ions affect the amyloid formation – model peptides adopting different conformations in the presence of Cu^{2+} and Zn^{2+} , *20th American Peptide Symposium*, Montreal, Quebec, Canada, June 26-30, **2007**.

How metal ions affect the amyloid formation – model peptides adopting different conformations in the presence of Cu^{2+} and Zn^{2+} , *8th German Peptide Symposium*, Heidelberg, Germany, March 14-17, **2007**.

How metal ions affect the amyloid formation - de novo designed peptides adopting different conformations in the presence of Cu^{2+} and Zn^{2+} , *29th European Peptide Symposium*, Gdansk, Poland, September 3-8, **2006**. → Bert L. Schram Young Investigators Award

Directing polypeptide's secondary structure at will - From helices to amyloids and reverse?, *Autumn Symposium Metallobiomics*, Berlin, Germany, November 24-25, **2005**.

From α -helix to β -sheet – a reversible metal ion induced peptide secondary structure switch, *7th German Peptide Symposium*, Braunschweig, Germany, February 27–March 2, **2005**.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Beate Koksche danke ich für das interessante, herausfordernde und ergebnisreiche Thema und die Betreuung der Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich dabei für die gewährte Freiheit Ideen umzusetzen, die stete Hilfsbereitschaft auch in fachfremden Bereichen und die Förderung meiner Arbeit durch die Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen und Workshops.

PD Dr. Christoph Böttcher und Dr. Hans von Berlepsch danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die fortwährende Bereitschaft zur Klärung biophysikalischer Fragestellungen, welche sehr wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Mein Dank gilt des Weiteren Prof. Dr. Ulrich Abram, Prof. Dr. Reinhard Kirmse und Dipl. Chem. Jan Griebel für die Aufnahme der EPR Spektren und die Hilfe bei der Diskussion der Ergebnisse.

Dr. Gert von Helden und Dipl. Phys. Peter Kupser vom Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Möglichkeit an zukunftsweisenden massenspektrometrischen Experimenten teilzunehmen und ausgewählte Peptide hinsichtlich ihrer Gasphasenstruktur zu untersuchen. Die außergewöhnlich entspannte Arbeitsatmosphäre und die andauernde Diskussionsbereitschaft ermöglichten es mir das Thema Proteinfaltung und Wissenschaft im Allgemeinen in anderer Weise zu betrachten. Weiterhin danke ich den Mitgliedern des FOM-Institute for Plasma Physics Rijnhuizen Dr. Jos Oomens, Nick C. Polfer und Dr. Britta Redlich, ohne deren Hilfe die Durchführung der Messungen nicht möglich gewesen wäre.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Atmosphäre im Labor und die stete Unterstützung in vielen Bereichen. Mein besonderer Dank gilt dabei Dipl. Biochem. Toni Vagt, dessen Anregungen zum Design der Peptide einen wesentlichen Beitrag zum Erfolg der Arbeit leisteten. Dipl. Chem. Sara Wagner, M.Sc. Raheleh Rezaei Araghi, B.Sc. Michaela Mühlberg und Dipl. Chem. Kerim Samedov danke ich für die Unterstützung bei der Entwicklung der pH sensitiven Modellpeptide. Außerdem gilt mein Dank Dipl. Chem. Tibor Kohajda und M.Sc. Tomomi Seri, welche wesentlich zur Etablierung der metallbindenden Peptide beitrugen. Für die Unterstützung in vielen Bereichen des Labor- und Universitätsalltags danke ich weiterhin Dr. Sven Thust, Dr. Christian Jäckel, Dr. René Smits, Dipl. Biochem. Matthias Hakelberg, Dipl. Chem. Mario Salwiczek, Dipl. Chem. Jessica Scheike und Susanne von Gerdorff.

Für die finanzielle Unterstützung während des Studiums und der Promotion danke ich der Studienstiftung des deutschen Volkes, der Volkswagen Stiftung, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Universität Leipzig und der Freien Universität Berlin.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Seitz für die Übernahme der Begutachtung der Dissertation bedanken.

Für die sorgfältige Korrektur des Manuskriptes dieser Arbeit danke ich Dr. Pamela Winchester, B.Sc. Michaela Mühlberg, Dipl. Chem. Nadine Szabó und Dipl. Ing. Christian Tötzke.

Zu guter Letzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Freundin und meiner Familie, ohne deren Unterstützung und Rückhalt im privaten Bereich diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Referat

Die Fähigkeit zwei unterschiedliche, stabile Konformationen einzunehmen ist eine Gemeinsamkeit von Proteinen, die bei unterschiedlichen Erkrankungen, wie z. B. Diabetes Typ II, der Alzheimer-Krankheit und Morbus Parkinson, eine wesentliche Rolle spielen. Der Konformationsübergang von der funktionalen, meist ungeordneten oder partiell helikalen Struktur zur β -Faltblatt-reichen Amyloid Form kann dabei durch Mutationen in der Primärstruktur oder geänderte Umgebungsbedingungen, wie z.B. pH-Wert, Ionenstärke, Metallionen, Proteinkonzentration, oxidativer Stress oder die Anwesenheit einer kleinen Menge fehlgefalteten Proteins, ausgelöst werden. Eine Aufklärung der molekularen Wechselwirkungen während dieses Umfaltungsvorganges und der daraus resultierenden Bildung von Amyloiden auf molekularer Ebene stellt nach wie vor eine große Herausforderung an die moderne Wissenschaft dar. Die schlechte Löslichkeit von amyloidbildenden Proteinen, ihre starke Tendenz zur Aggregation und die meist schlechte synthetische Zugänglichkeit beschränken das Spektrum analytischer Möglichkeiten, wodurch eine genaue Charakterisierung erschwert wird. Deshalb ist die Entwicklung und Etablierung von kleinen, überschaubaren Peptidmodellen, welche als Werkzeug für solche Untersuchungen genutzt werden können, von großer Bedeutung.

In dieser Doktorarbeit wird die schrittweise Entwicklung von Modellpeptiden gezeigt, die ohne Primärstrukturmodifikationen auf pH-Wert Änderungen oder die Anwesenheit von Metallionen reagieren, indem sie unterschiedliche Strukturen und Aggregatmorphologien einnehmen. Diese *de novo* entworfenen Peptide folgen dem charakteristischen *heptad*-Wiederholungsmuster des α -helikalen *coiled coil* Proteinfaltungsmotivs. Darüber hinaus wurden β -Faltblatt bevorzugende Aminosäuren eingebaut um die allgemeine Amyloidbildungstendenz des Modellsystems zu erhöhen. Außerdem wurden durch den Einbau von räumlich benachbarten, gleichgeladenen Aminosäuren oder metallbindenden Histidin Resten pH-Wert bzw. metallsensitive Funktionalitäten erzeugt. Spektroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass geringe Änderungen der Umgebungsbedingungen die Sekundärstruktur der Peptide deutlich verändern und im Ergebnis die Aggregatmorphologie und den Verlauf der Amyloidbildung bestimmen.

Darüber hinaus werden die Gasphasen Infrarotspektren ausgewählter *coiled coil* Peptide und ihrer oligomeren Komplexe gezeigt. Diese Daten liefern wesentliche Anhaltspunkte dafür, dass Sekundärstrukturelemente von Proteinen in bestimmtem Maße in der Gasphase erhalten bleiben können.

Abstract

The common feature of proteins involved in type II Diabetes, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease is their ability to adopt at least two different stable conformations. The conformational transition that shifts the equilibrium from the functional, mostly unfolded or partially α -helical structure to the β -sheet rich amyloid isoform can be triggered by mutations in the primary structure as well as by changes of the environmental conditions such as pH, ionic strength, metal ions, protein concentration, oxidative stress, or a small quantity of misfolded protein fragments. Elucidation of the molecular interactions that occur during the structural transformation and the consecutive formation of amyloids on a molecular level is still a challenge. The low solubility of amyloid forming peptides, their intrinsically high tendency to aggregate, and a mostly poor synthetic accessibility restrict the spectrum of analytical techniques and, thus, complicate a detailed characterization. Therefore, the development of small peptide models that can serve as tools for such studies is of paramount importance.

This thesis presents the stepwise design of model peptides that, without changes in their primary structure, predictably react on either changes of pH or the presence of transition metal ions by adopting different defined conformations and aggregate morphologies. These *de novo* designed peptides strictly follow the characteristic *heptad* repeat of the α -helical coiled coil folding motif. Furthermore, residues that favor a β -sheet conformation have been incorporated to make the system prone to amyloid formation. Additionally, either charged amino acids placed in close proximity to each other or metal binding histidines were used to create functionalities which are sensitive to differing pH and metal ion conditions, respectively. Spectroscopic and electron microscopic investigations showed that subtle changes in the environmental conditions are able to vigorously alter the peptides secondary structure and, as a result, determine aggregate morphology and the course of amyloid formation.

Moreover, gas phase infrared spectroscopy experiments of selected non-amyloidogenic α -helical coiled coil peptides and their oligomeric complexes are presented. These data provide plausible evidence that protein secondary structure elements are retained to a certain degree in the gas phase.

Abbreviations

Å Angstrom (1 Angstrom = 1.0×10^{-10} m), **AA** Amino acid, **A β** Amyloid β , **Abz** 2-Aminobenzoyl, **ACN** Acetonitrile, **AD** Alzheimer's Disease, **AFM** Atomic force microscopy, **APP** Amyloid Precursor Protein, **approx.** approximately

Boc *tert*-Butyloxycarbonyl

CCD Charge coupled device, **CD** Circular dichroism, **CR** Congo red

Da Dalton, **DBU** Diaza(1,3)bicyclo[5.4.0]undecane, **DCM** Dichloromethane, **DIPEA** N,N-diisopropylethylamine, **DMF** Dimethylformamide, **DMSO** Dimethylsulfoxide

EELS Electron energy loss spectroscopy, **EM** Electron Microscopy, **eq.** equivalent, **EPR** Electron paramagnetic resonance, **ESI** Electrospray ionization

FELIX Free electron laser for infrared experiments, **Fmoc** 9-Flourenylmethoxycarbonyl, **FT-ICR** Fourier transform ion cyclotron resonance, **FTIR** Fourier transform infrared

GndHCl Guanidine hydrochloride

HCTU 2-(6-Chloro1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate, **HDX** Hydrogen deuterium exchange, **HOBt** 1-Hydroxybenzotriazole, **HPLC** High performance liquid chromatography

IAPP Islet amyloid polypeptide, **IDA** Iminodiacetic acid, **IR** Infrared, **IRMPD** Infrared multiple photon dissociation

MALDI Matrix assisted laser desorption ionization, **MS** Mass spectrometry, **MW** Molecular weight

NMP N-Methyl-2-pyrrolidinone, **NMR** Nuclear magnetic resonance

Pbf 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl, **Pip** Piperidine, **PrP^c** Cellular form of the Prion Protein, **PrP^{Sc}** Scrapie form of the Prion Protein

REM Reflection electron microscopy

SEM Scanning electron microscopy, **SPPS** Solid phase peptide synthesis, **STED** Stimulated emission depletion microscopy

TBTU 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiumtetrafluoroborate, **tBu** *tert*-Butyl, **TCTU** 2-(6-Chloro-1Hbenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborate, **TEM** Transmission electron microscopy, **TFA** Trifluoroacetic acid, **TFE** Trifluoroethanol, **ThT** Thioflavin T, **TIS** Triisopropylsilane, **ToF** Time of flight, **Tris** Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, **Trt** Trityl

UV Ultraviolet, **UV-vis** Ultraviolet and visible electromagnetic spectrum

1.	Introduction.....	1
2.	Common Characteristics of Amyloids	4
2.1	Current Structural Models – Cross- β or Nanotubes?	5
2.1.1	The Macroscopic Structure of Amyloid Fibrils	5
2.1.2	The Internal Structure of Protofilaments	7
2.2	The Process of Amyloid Formation – One Way?	13
2.2.1	Proposed Pathways Leading to Amyloids	13
2.2.2	Environmental Changes Triggering a Conformational Transition	16
2.2.3	The Molecular Recycling Hypothesis	17
3.	Concepts of Amyloid Forming Model Peptides	19
3.1	Why Models?	19
3.2	Computational Approaches.....	20
3.3	Models Based on Natural Systems	22
3.3.1	Empirical Approaches	23
3.3.2	Rational Approaches.....	24
3.4	De Novo Designed Models	28
3.4.1	β -Sheet Based Amyloid Models	29
3.4.2	Amyloid Forming Coiled Coils	37
3.5	Switch Peptides	50
4.	Applied Methods.....	53
4.1	Circular Dichroism (CD) Spectroscopy	53
4.1.1	Physical Principles	53
4.1.2	Data Analysis	55
4.1.3	Protein Structure Determination	56
4.2	Dye Binding Studies.....	58
4.3	Transmission Electron Microscopy (TEM)	61
4.3.1	Instrumentation	62
4.3.2	Formation of Contrast	64

5.	Aim of the Work	68
6.	The Coiled Coil Based Amyloid Design	69
6.1	The α -Helical Coiled Coil Folding Motif.....	69
6.2	β -Sheets and Amyloids	71
6.3	Coiled Coil versus Amyloids	74
7.	Optimization of Coiled Coil Based Amyloids.....	76
7.1	Ideal α -Helical Coiled Coils	76
7.1.1	VW01	76
7.1.2	VW02	79
7.2	The Way from β -Sheet to α -Helix.....	80
7.2.1	VW11	80
7.2.2	VW12	82
7.2.3	VW13	83
7.2.4	VW16	85
7.2.5	VW17	88
7.2.6	VW18	90
8.	Peptides that React on Environmental Changes.....	94
8.1	pH Switches	94
8.1.1	VW03	94
8.1.2	VW04	97
8.1.3	VW19	99
8.1.4	Continuative VW19 Related Peptides	106
8.2	Metal Ion Coordination as Structural Trigger	107
8.2.1	Design Concepts of Metal Ion Sensitive Functionalities	107
8.2.2	VW15	110
8.2.3	VW23 and VW24.....	115
8.2.4	VW25 and VW26.....	118
8.2.5	VW28	124
8.2.6	VW29 and VW30.....	126

9.	Applications in Gas Phase Spectroscopy.....	137
9.1	Proteins in Mass Spectrometry and Gas Phase Studies	137
9.2	Instrument Setup and Work Principles.....	140
9.3	Gas Phase Characterization of Coiled Coil Peptides.....	142
10.	Summary	146
11.	Outlook.....	150
12.	Experimental Section	152
12.1	Peptide Synthesis, Purification and Characterization	152
12.1.1	General Procedures, Reagents, and Instruments.....	152
12.1.2	Solid Phase Peptide Synthesis	154
12.1.3	Purification and Characterization	157
12.1.4	Detailed Description of the Synthesized Peptides	158
12.2	Folding Studies	162
12.2.1	General Procedures and Instruments	162
12.2.2	Concentration Determination	163
12.2.3	Circular Dichroism Spectroscopy	163
12.2.4	Thermal Denaturation Experiments	165
12.2.5	ThT Assay	166
12.3	Electron Microscopy.....	166
12.4	EPR Spectroscopy.....	167
12.5	Gas Phase IR Spectroscopy.....	167
13.	Literature	169