



Doctoral Thesis

The recombinant murine prion protein and its carboxy-terminal domain biophysical and structural characterization

Author(s):

Hornemann, Simone

Publication Date:

1998

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-002017464> →

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 Nr. 12790

**The recombinant murine
prion protein and its carboxy-
terminal domain:
Biophysical and structural
characterization**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Simone Hornemann
Diplom-Chemikerin (Universität zu Köln, Germany)
born on October 17, 1968
Federal Republic of Germany

accepted on the recommendation of:
Prof. Dr. Rudi Glockshuber, examiner
Prof. Dr. Kurt Wüthrich, co-examiner
1998

Zusammenfassung

Übertragbare spongiforme Enzephalopathien (TSE) wie Scrapie in Schafen, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) in Rindern und die Creutzfeldt-Jakob Erkrankung im Menschen werden durch einen neuartigen Erreger, das Prion, hervorgerufen. Entsprechend der "Nur-Eiweiss"-Hypothese wird angenommen, dass das Prion weitestgehend, wenn nicht sogar ausschliesslich aus einer abnormalen Form, PrP^{Sc}, des gutartigen, wirtskodierten zellulären Prionproteins, PrP^C, besteht. PrP^C und PrP^{Sc} scheinen in ihrer kovalenten Struktur identisch zu sein, sich jedoch in ihrer dreidimensionalen Struktur voneinander zu unterscheiden. Im Gegensatz zu PrP^C, das ein Monomer ist und hauptsächlich aus α -Helices besteht, stellt PrP^{Sc} ein unlösliches Oligomer dar, das im Vergleich zu PrP^C einen erhöhten β -Faltblattanteil aufweist.

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} zugrundeliegen, ist die Kenntnis des Faltungsverhaltens, der thermodynamischen Stabilität und der dreidimensionalen Struktur von PrP^C und PrP^{Sc}. Aufgrund der geringen Löslichkeit von PrP^{Sc} einerseits und der geringen Verfügbarkeit von natürlichem PrP^C andererseits waren physikalische und strukturelle Untersuchungen an PrP^C bis zum Beginn dieser Arbeit grösstenteils unmöglich.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde deshalb ein effizientes System für die funktionelle, sekretorische Expression eines N-terminal verkürzten Segments des Mausprionproteins entwickelt. Dieses Segment umfasst die C-terminalen 111 Reste des gesamten, zellulären Mausprionproteins und wurde als *mPrP*(121–231) bezeichnet. Die exakte Grösse dieser Domäne wurde aus der Beobachtung abgeleitet, dass die Reste 121–231 vor dem Abbau durch periplasmatische *E. coli* Proteasen geschützt sind. *mPrP*(121–231) ist ein lösliches Protein, das in grossen Mengen aus periplasmatischen *E. coli* Extrakten mittels konventioneller Methoden gereinigt werden kann. Erste biochemische und biophysikalische Studien ergaben, dass das rekombinante Protein ein Monomer und reich an α -helikaler Sekundärstruktur ist und somit die selben Charakteristiken aufweist wie natürliches PrP^C. Entfaltungs- und Rückfaltungsexperimente zeigten, dass *mPrP*(121–231) reversibel und kooperativ faltet und eine autonome Faltungseinheit bildet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine Expressions- und Reinigungsmethode für das rekombinante Vollängenprionprotein der Maus,

mPrP(23–231), etabliert. Zirkulardichroismus- und Fluoreszenzmessungen deuteten darauf hin, dass das amino-terminale Polypeptidsegment 23–120 im Vergleich zu *mPrP*(121–231) keine definierte dreidimensionale Struktur annimmt.

In Kollaboration mit R. Riek, Dr. G. Wider und Dr. M. Billeter in der Gruppe von Prof. Dr. Wüthrich wurden die dreidimensionalen Strukturen von *mPrP*(121–231) und *mPrP*(23–231) mittels kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR) in Lösung bestimmt. Zu diesem Zweck wurden ¹⁵N- und ¹³C-markierte Proteinproben hergestellt. Im Gegensatz zu früheren theoretischen Strukturvorhersagen für PrP^C weist *mPrP*(121–231) ein neues Faltungsmotif auf, das aus drei α -Helices und einem zweisträngigen, antiparallelen β -Faltblatt besteht. Die strukturelle Analyse von *mPrP*(121–231) erlaubte sowohl die Identifizierung von möglichen Stellen in PrP^C, die für die Speziesbarriere bei TSE-Übertragungen wichtig sein könnten, als auch Vorhersagen über die Auswirkung von vererblichen Aminosäureaustauschen im menschlichen Prionprotein auf die Stabilität von PrP^C. Die NMR-Struktur von *mPrP*(23–231) zeigte, dass die globuläre Faltung der C-terminalen Domäne im kompletten Mausprionprotein erhalten bleibt, und dass das N-terminale Polypeptidsegment 23–120 in Lösung tatsächlich flexibel und ungeordnet ist.

Anhand von denaturierungsmittelinduzierten Gleichgewichtsübergängen wurde gezeigt, dass *mPrP*(23–231) and *mPrP*(121–231) reversibel falten, und dass die thermodynamische Stabilität beider Proteine mit verringertem pH-Wert abnimmt. *mPrP*(121–231) bildet bei pH 4.0 ein säureinduziertes Gleichgewichtsentfaltungsintermediat mit einem erhöhten β -Faltblattanteil. Dieses Intermediat ist auch in Abwesenheit von Denaturierungsmitteln zu 0.2% populiert. Da es strukturelle Ähnlichkeiten zu PrP^{Sc} aufweist, könnte es einen monomeren Vorläufer von PrP^{Sc} darstellen, der auch *in vivo* während der Endozytose von PrP^C bei saurem pH auftreten könnte. Wie die Entfaltungsstudien ferner zeigen, besitzt *mPrP*(23–231) eine geringfügig niedrigere thermodynamische Stabilität als *mPrP*(121–231), die möglicherweise auf Wechselwirkungen zwischen Resten des N- und C-terminalen Teils von *mPrP*(23–231) im entfalteten Zustand zurückzuführen ist. Dies könnte ebenfalls erklären, warum das säureinduzierte Gleichgewichtsintermediat für *mPrP*(23–231) nicht so signifikant populiert wird.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sollten zu einem besseren Verständnis des Vermehrungsmechanismus von Prionen führen und die Grundlage für die rationale Planung zukünftiger *in vitro* und *in vivo* Experimente bilden.