

NMR spectroscopy with prion proteins and prion protein fragments

Doctoral Thesis

Author(s):

Liu, Aizhuo

Publication date:

1999

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003822477>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss. ETH Nr. 13234

NMR Spectroscopy with Prion Proteins and Prion Protein Fragments

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

presented by
Aizhuo Liu
Dipl. Phys. Jilin University (China)

born on May 26, 1962
citizen of China

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Kurt Wüthrich, Referent
Prof. Dr. Rudolf Glockshuber, Coreferent
PD Dr. Gerhard Wider, Coreferent

1999

Summary

Prions are defined as proteinaceous infectious particles that lack nucleic acid. These pathogens cause a group of invariably fatal neurodegenerative diseases by an apparently entirely novel mechanism. Prion diseases (transmissible spongiform encephalopathies, TSE) include bovine spongiform encephalopathy (BSE), scrapie in sheep, and Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) in humans. The prion protein (PrP) is thought to exist in two different conformations: The normal cellular isoform, PrP^C, and the disease-related “Scrapie form”, PrP^{Sc}. Prion diseases may present as genetic, infectious or sporadic disorders, all of which involve modification of the prion protein. PrP^C, which is mostly α -helical, is converted into PrP^{Sc} through a posttranslational process during which it acquires a high β -sheet content. Prions appear to encipher strain-specific properties in the tertiary structure of PrP^{Sc}, which acts as a template upon which PrP^C is refolded into a “nascent form of PrP^{Sc}”. Knowledge about PrP structure and the structural plasticity of prion proteins is a foremost issue for understanding the conformational transition process and seeking new strategies for the prevention and treatment of prion diseases.

This dissertation contains three parts. After a general introduction, chapter 2 describes a study of the helix propensity of a polypeptide containing helix 1 of the mouse prion protein *mPrP*(143–158) by NMR and CD spectroscopy. Chapter 3 describes the solution structure determination of a globular domain in the full length human prion protein, *hPrP*(23–231), with heteronuclear NMR spectroscopy. Finally, chapter 4 describes novel triple-resonance NMR experiments which were used in chapter 3 for the resonance assignment and the characterization of the highly flexible N-terminal “tail” of *hPrP*(23–231).

The polypeptide segment corresponding to helix 1 in *mPrP* has significant intrinsic helix propensity. The helix formed by *mPrP*(143–158) is similar to helix 1 in *mPrP*(121–231), including that an N-terminal “pincette motif” is found in both structures. The polypeptide segment of helix 1 thus seems to be an initiation site for helix formation, and it is maintained as a helix in the intact protein.

The solution NMR structure of *hPrP*(23–231) consists of a well structured C-terminal domain comprising residues 126–231, which contains three α -helices (residues 144–154, 173–195 and 200–228), where the helices 2 and 3 are linked by a disulfide bond, and a short antiparallel β -sheet (residues 128–131 and 161–164). The N-terminal 104 residues are highly flexible, as indicated by a complete lack of long-range NOEs, small deviations of the chemical shifts from the “random coil” values, and negative $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE peaks. Chemical shift and tertiary structure comparisons with *hPrP*(121–231) indicate that the domain is preserved in the intact protein and that compared to the isolated domain the C-terminal parts of both helix 2 and helix 3 are stabilized in *hPrP*(23–230) under the experimental conditions used.

The N-terminal flexible segment of *hPrP*(23–231) from residues 23 to 125 contains a hydrophobic segment from residues 113 to 120 and five octapeptide repeats from residues 52 to 91. This segment gives a random-coil-like NMR chemical shift dispersion and shows extensive signal overlap, in particular for the octapeptide residues. Novel triple-resonance NMR experiments were designed that make use of the slower transverse relaxation in the flexible polypeptide to overcome signal overlap and to get unambiguous resonance assignments. These new NMR techniques may be of general use to deal with unstructured polypeptide chains, for instance, in protein folding studies.

Zusammenfassung

Als Prionen bezeichnet man infektiöse Krankheitserreger auf Proteinbasis, die keine Nucleinsäuren enthalten. Sie sind verantwortlich für eine Gruppe von ausnahmslos tödlich verlaufenden neurodegenerativen Krankheiten, die sie über einen scheinbar völlig neuen Mechanismus auslösen. Prionenkrankheiten (übertragbare spongiforme Enzephalopathien) sind unter anderem das als "Rinderwahnsinn" bekanntgewordene BSE, Scrapie bei Schafen und die Creutzfeldt-Jakob Krankheit bei Menschen. Man vermutet, dass das Prionprotein (PrP) in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen kann, einerseits als gewöhnliche zelluläre Form (PrP^C) und andererseits als abnorme, krankheitserregende Form (PrP^{Sc}). Eine Voraussetzung für das Auftreten von Prionenkrankheiten ist eine Modifikation des Prionproteins - die Krankheit kann durch Vererbung oder Ansteckung weitergegeben werden aber auch sporadisch auftreten. Das PrP^C, das eine hauptsächlich α -helikale Sekundärstruktur aufweist, wird dabei - nach der Translation - in PrP^{Sc} umgewandelt, wobei sich eine Sekundärstruktur mit hohem Gehalt an β -Faltblatt bildet. Prionproteine haben scheinbar stammspezifische Charakteristika in ihrer Tertiärstruktur sodass PrP^{Sc} als Auslöser für die Umformung von PrP^C in PrP^{Sc} fungieren kann. Die Kenntnis der räumlichen Struktur sowie der strukturellen Verformbarkeit des Prionproteins ist daher der wichtigste Punkt um diesen Umwandlungsprozess verstehen zu lernen und um neue Strategien für die Prävention und die Behandlung von Prionenkrankheiten zu entwickeln.

Diese Dissertation besteht aus drei Teilen: nach einer allgemeinen Einleitung werden in Kapitel 2 NMR und CD-Untersuchungen an einem die erste Helix des Mausprionproteins enthaltenden Peptid *mPrP*(143–158) vorgestellt, bei denen es um die intrinsische Neigung dieses Segments, eine α -Helix auszubilden, geht. In Kapitel 3 wird die Bestimmung der räumlichen Struktur der gefalteten Domäne des unverkürzten menschlichen Prionproteins *hPrP*(23–231) in Lösung mittels heteronuklearer NMR-Spektroskopie beschrieben. Kapitel 4 enthält eine Beschreibung neuartiger Tripelresonanz-NMR-Experimente, welche für die in Kapitel 3 beschriebene Resonanzzuordnung und Charakterisierung des flexiblen N-terminalen Teils des Proteins ("Schwanz") verwendet wurden.

Das der ersten Helix im *mPrP* entsprechende Peptid besitzt eine signifikante intrinsische Neigung zur Ausbildung einer α -Helix. *mPrP*(143–158) bildet eine Helix, die der ersten Helix im *mPrP*(121–231) ähnlich ist, bis hin zu einem N-terminalen “Pinzetten-Motiv”, das in beiden Strukturen vorkommt. Die Polypeptidkette der ersten Helix scheint daher die Ausbildung einer α -Helix zu initiieren und behält diese Sekundärstruktur auch im fertigen Protein bei.

Die räumliche 3D-Struktur von *hPrP*(23–231) setzt sich zusammen aus einer gut strukturierten C-terminalen Domäne und einer flexiblen, ungeordneten N-terminalen Aminosäurekette, die als “Schwanz” bezeichnet wird. Die C-terminale Domäne besteht aus den Aminosäuren 126–231 und enthält drei α -Helices (Aminosäuren 144–154, 173–195 und 200–228), wobei die zweite und die dritte Helix durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, und ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt (Aminosäuren 128–131 und 161–164). Die 104 Aminosäuren, die zum “Schwanz” gehören, sind in hohem Ausmass flexibel, was sich in einem kompletten Fehlen von NOEs über lange Distanzen, negativen $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOEs und kleinen Abweichungen der chemischen Verschiebungen von den bei völliger Abwesenheit von Sekundärstruktur erwarteten Werten äussert. Vergleiche von chemischer Verschiebung und Tertiärstruktur von *hPrP*(23–231) mit *hPrP*(121–231) ergeben, dass die Domäne erhalten bleibt und dass die C-terminalen Enden von Helices 2 und 3 unter den verwendeten experimentellen Bedingungen im *hPrP*(23–230) etwas stabiler sind.

Die N-terminale flexible Peptidkette von *hPrP*(23–231), welche aus den Aminosäureresten 23–125 besteht, enthält einen hydrophoben Abschnitt von Aminosäure 113–120 und fünf Wiederholungen eines Oktapeptids von Aminosäure 52–91. Die chemischen Verschiebungen dieser Reste weisen eine Dispersion auf, wie sie für eine Peptidkette ohne Sekundärstruktur zu erwarten wäre und sind in hohem Masse degeneriert, ganz besonders im Bereich der repetitiven Oktapeptide. Um diese überlagerten Signale aufzulösen und um Resonanzzuordnungen auch in diesem Bereich des Proteins vornehmen zu können, wurden neuartige Tripelresonanz-NMR-Experimente entwickelt, die sich die langsamere transversale Relaxation der flexiblen Teile des Proteins zunutze machen. Diese neuen NMR-Experimente können generell für Arbeiten mit ungeordneten Peptidketten verwendet werden, z.B. in Proteinfaltungsstudien.