



Doctoral Thesis

Characterization of soluble and membrane-attached forms of the recombinant prion protein

Author(s):

Eberl, Heike

Publication Date:

2003

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004494239> →

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. 14986

**Characterization of
soluble and membrane-attached forms of the
recombinant prion protein**

A dissertation submitted to the

Swiss Federal Institute of Technology Zürich

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

Presented by

Heike Eberl

Diplom-Biochemikerin (Universität Regensburg, Germany)

Born on April 30, 1974

Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Rudi Glockshuber (examiner)

Prof. Dr. Kurt Wüthrich (co-examiner)

2003

1. Abstract

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are a group of infectious disorders, among which are scrapie in sheep, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and Creutzfeldt-Jakob disease in humans. According to the “protein-only” hypothesis the infectious agent of all TSEs consists mainly, if not entirely, of an abnormal isoform, PrP^{Sc}, of the benign, cellular prion protein, PrP^C. PrP^C and PrP^{Sc} have identical covalent structures, but differ in their conformations. The molecular mechanism of the conversion process from PrP^C to PrP^{Sc} is still unknown today.

The main parts of this thesis were dedicated to elucidate the influence of selected environmental conditions on the structure and stability of the recombinant murine prion protein produced in *E. coli* and variants thereof. The recombinant PrP is considered structurally equivalent to PrP^C.

In the first part of the thesis the intrinsic stabilities of deletion variants of the C-terminal domain of PrP, PrP(121-231), the only part of the protein with a defined tertiary structure, were investigated. The question of whether parts of the structure of PrP^C are sufficiently stable to be retained in PrP^{Sc} was directly addressed with the help of two deletion variants of the C-terminal domain of PrP. One of the variants, H2-H3, comprised only the last two α -helices of the C-terminal domain. In the other variant, PrP(121-231)- Δ H1, the first α -helix of the C-terminal domain was deleted and replaced by the β -turn dipeptide Asn-Gly introduced between the strands of the single β -sheet of the C-terminal domain. Although both deletion constructs still showed α -helical circular dichroism spectra, they were more disordered and thermodynamically strongly destabilized compared to the intact C-terminal domain, with free energies of folding close to zero. These data demonstrated that the tertiary structure context is critical for the conformation of the segment 170-231, comprising α -helices 2 and 3 in the solution structure of recombinant PrP. This suggests that the tertiary structure of this segment in PrP^{Sc} subunits could well differ from that observed in PrP^C, in contrast to present theoretical models for the tertiary structure of PrP^{Sc} subunits.

In the second part of this thesis the effect of a membrane environment on the structure and stability of PrP was investigated. The cellular prion protein is attached to the cell membrane via its C-terminal GPI-anchor *in vivo*, which directs the prion protein to certain microdomains in the cell membrane, so-called rafts. The influence

of this particular membrane attachment on the structure and stability of recombinant, full-length PrP was investigated by use of a PrP variant containing a C-terminal linker to which a phospholipid was covalently coupled via a cysteine residue. This PrP variant was incorporated into liposomes and served as a model to study possible changes in structure and stability of recombinant PrP upon membrane attachment. Covalent coupling of PrP to liposomes did not result in significant structural changes observable by far-UV circular dichroism. Moreover, limited proteolysis experiments could not detect any changes in the stability of liposome-bound PrP relative to soluble, recombinant PrP. These data suggest that a membranous environment has no significant influence on the structure and stability of recombinant PrP. A direct influence of raft lipids on the structure of membrane-bound PrP^C molecules therefore seems rather unlikely.

In the third part of the thesis, the influence of certain point mutations in the PrP gene, associated with genetic forms of human TSEs, on the reducibility of the single disulfide bond in the resulting prion protein variants was investigated, as reduction of PrP had been suggested to be a potential step in the formation of PrP^{Sc}. It could be demonstrated that PrP variants with unaltered thermodynamic stabilities relative to the wildtype protein show the same reduction kinetics as observed for the wildtype, whereas PrP variants with lowered thermodynamic stability are reduced at faster rates than the wildtype. Furthermore increased tendencies of the prion proteins to form a small fraction of disulfide-bonded dimers seem to be correlated with facilitated reducibility of the disulfide bond. However, a concerted behaviour of all investigated PrP variants that would indicate a correlation between reducibility of the disulfide bond, covalent dimer formation and development of prion disease was not observed. These results argue against the involvement of a transient reduction step and/or formation of intermolecular disulfide bonds in the pathogenesis of prion diseases.

In the last part of this thesis, expression in *E. coli* of an open reading frame (ORF) on the antisense strand of the prion protein gene was tried. Expression of several antisense ORF constructs failed, however, possibly due to instability or folding-incompetence of the resulting amino acid sequence and a resulting high susceptibility to digestion by proteases.

2. Zusammenfassung

Übertragbare spongiforme Enzephalopathien (TSEs, von englisch: transmissible spongiform encephalopathies) stellen eine Gruppe von infektiösen Erkrankungen dar, zu denen „Scrapie“ beim Schaf, die „Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)“ beim Rind und die Creutzfeldt-Jakob Krankheit beim Menschen gehören. Gemäss der „Protein only“-Hypothese besteht das infektiöse Agens all dieser Erkrankungen hauptsächlich, wenn nicht gänzlich, aus einer abnormalen Isoform (PrP^{Sc}) des normalen, zellulären Prionproteins (PrP^{C}). Beide Isoformen besitzen identische, kovalente Strukturen, unterscheiden sich jedoch in ihrer Konformation. Der molekulare Mechanismus, der dem Umwandlungsprozess von PrP^{C} zu PrP^{Sc} zugrunde liegt, ist bis heute unbekannt.

Die Hauptteile der vorliegenden Doktorarbeit zielten darauf ab, die Auswirkungen ausgesuchter, äusserer Bedingungen auf die Struktur und Stabilität des rekombinanten Prionproteins der Maus, sowie Varianten desselben, zu beleuchten. Rekombinantes PrP wird in struktureller Hinsicht als der zellulären Form des Prionproteins, PrP^{C} , äquivalent erachtet.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die intrinsische Stabilität von Deletionsvarianten der C-terminalen Domäne des Prionproteins untersucht. Diese C-terminale Domäne, PrP(121-231), stellt den einzigen Teil des Prionproteins dar, der eine definierte Tertiärstruktur besitzt. Die Frage, ob Teile der Struktur von PrP^{C} ausreichend stabil sind, um in PrP^{Sc} -Untereinheiten erhalten zu bleiben, wurde direkt mit Hilfe zweier Deletionsvarianten der C-terminalen Domäne von PrP angegangen. Eine dieser Varianten, H2-H3, bestand nur aus den letzten beiden α -Helices der C-terminalen Domäne. In der anderen Varianten, PrP(12-231)- Δ H1, wurde die erste α -Helix der C-terminalen Domäne deletiert und durch das β -Turn-Dipeptid Asn-Gly ersetzt, das zwischen die Stränge des einzelnen β -Faltblattes der C-terminalen Domäne eingefügt wurde. Obwohl beide Deletionskonstrukte noch α -helikale Circular dichroismus-Spektren im Fern-UV-Bereich zeigten, waren sie im Vergleich zur intakten C-terminalen Domäne schwächer strukturiert und mit freien Faltungsenergien um Null stark destabilisiert. Diese Daten zeigten, dass der Tertiärstrukturkontext für die Konformation des Segments 170-231, das in der Struktur des rekombinanten Prionproteins Helix 2 und 3 umfasst, eine kritische Rolle spielt. Dies lässt vermuten, dass die Tertiärstruktur dieses Segments in PrP^{Sc} -

Untereinheiten sich sehr wohl von der Tertiärstruktur, die in PrP^C beobachtet wurde, unterscheiden könnte, im Widerspruch zu theoretischen Modellen, die derzeit zur Tertiärstruktur von PrP^{Sc}-Untereinheiten existieren.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer Membrenumgebung auf die Struktur und Stabilität des Prionproteins näher untersucht. Das Prionprotein ist *in vivo* mit der Zellmembran über einen C-terminalen GPI-Anker verknüpft, der das Protein zu bestimmten Mikrodomänen in der Zellmembran lenkt, sogenannten „rafts“. Der Einfluss dieser speziellen Membrenumgebung auf die Struktur und Stabilität des rekombinanten, Volllängen-Prionproteins wurde mit Hilfe einer PrP-Variante untersucht, die einen C-terminalen Linker besitzt, an den ein Phospholipid über einen Cysteinrest kovalent gekoppelt werden kann. Dieses PrP-Konstrukt wurde in Liposomen integriert und diente als Modell, um mögliche Auswirkungen auf Struktur und Stabilität von rekombinatem PrP bei Verknüpfung mit Membranen zu untersuchen. Kovalente Kopplung von PrP an Liposomenmembranen resultierte in keiner signifikanten Strukturveränderung, die mittels Fern-UV Circular dichroismus hätte verfolgt werden können. Weiterhin konnten auch mit limitierten Proteolyseexperimenten keine Veränderungen in der Stabilität von liposomengebundenem PrP im Vergleich zu löslichem, rekombinatem PrP festgestellt werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine Membrenumgebung keinen signifikanten Einfluss auf die Struktur und Stabilität von rekombinatem PrP hat. Ein direkter Einfluss von Raftlipiden auf die Struktur von membrangebundenen PrP^C Molekülen ist deshalb eher auszuschließen.

Im dritten Teil der Arbeit wurde der Einfluss bestimmter Punktmutationen des Prionproteingens, die genetisch bedingte Prionerkrankungen beim Menschen auslösen, auf die Reduzierbarkeit der einzelnen Disulfidbrücke in den entsprechenden Proteinvarianten untersucht, da vermutet worden war, die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} könne über einen transienten Reduktionsschritt verlaufen. Es konnte gezeigt werden, dass Proteinvarianten mit einer unveränderten thermodynamischen Stabilität relativ zum Wildtyp-Protein dieselben Reduktionskinetiken wie der Wildtyp besitzen, während PrP-Varianten mit einer verringerten thermodynamischen Stabilität schneller reduziert werden als der Wildtyp. Weiterhin scheinen erhöhte Dimerisierungstendenzen bei einigen der untersuchten Prionproteine von einer erleichterten Reduzierbarkeit der Disulfidbrücke in den entsprechenden Proteinen abzuhängen. Ein konzertiertes Verhalten aller PrP-

Varianten, das auf eine Verbindung zwischen Reduzierbarkeit der Disulfidbrücke, sowie der Ausbildung kovalenter Dimere und dem Ausbruch einer Prionerkrankung hinweisen würde, konnte allerdings nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen gegen das Auftreten eines transienten Reduktionsschrittes und/oder der Formation von intermolekularen Disulfidbrücken in der Pathogenese von Prionerkrankungen.

In einem weiteren Teil der Doktorarbeit wurde versucht, einen offenen Leserahmen (ORF, von englisch: open reading frame), der auf dem Antisense-Strang des Prionproteingens zu finden ist, rekombinant in *E. coli* zu exprimieren. Expressionsversuche für verschiedene aus dem Antisense-ORF abgeleitete Konstrukte schlugen jedoch fehl, was vermutlich auf eine hohe Instabilität oder Faltungsinkompetenz der resultierenden Aminosäuresequenz und eine sich daraus ergebende hohe Anfälligkeit für den Abbau durch Proteasen zurückzuführen ist.