



## Doctoral Thesis

# **Chronic wasting disease (CWD) in cervids Model studies with recombinant mouse/elk hybrid prion proteins in the soluble, cellular form**

**Author(s):**

Bonjour, Sophie

**Publication Date:**

2004

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004817454> →

**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. 15419

**Chronic wasting disease (CWD) in cervids:  
model studies with recombinant mouse/elk hybrid  
prion proteins in the soluble, cellular form**

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

presented by  
**Sophie Bonjour**  
Dipl. Chem. ETH  
born on March 4, 1975  
citizen of Lignières (NE)

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

2004

## Abstract

This PhD thesis started in the Wüthrich laboratory at the ETH Zürich with work designed as a preparation for the initially intended main thesis project described in the second part of this abstract. The overexpression in *E. coli*, as well as the purification and reconstitution of the outer membrane protein A (OmpA) in dihexanoylphosphatidylcholine (DHPC) micelles was performed. Partial backbone resonance assignments of OmpA were obtained, with the remaining unassigned regions most probably undergoing conformational exchange at frequencies in the NMR chemical shift timescale, and thus being unobservable. This project, which got me acquainted with both nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and membrane proteins, is briefly described in the Appendix A1 of this thesis.

The originally intended main project of this PhD thesis, to be performed in the laboratory of Dr. H. Senn at F. Hoffmann-La Roche AG in Basel, was aimed at NMR structural studies of an integral membrane protein, the human Neurokinin-1 receptor (hNK1r). The overexpression in mammalian cells and the purification of this G-protein-coupled receptor had already been reported from previous work performed at and in collaboration with a group of Roche. My starting assignment was to develop methods for purification of milligram quantities of the protein with double or triple isotope labelling. Unfortunately, after one year, we had to conclude that the previously reported data on the preparation of the hNK1r could not be reproduced, and the project had to be abandoned. A new project at Roche related to NMR screening with the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 $\alpha$ , which was aimed at finding novel inhibitor structures, and possibly new effector binding sites, was then started. My assignment was to obtain complete NMR backbone resonance assignments of p38 $\alpha$ . In spite of promising initial results, which are summarized in the Appendix A2, this project was discontinued due to difficulties to obtain a sufficiently concentrated NMR sample.

At this point, a new project was started in the Wüthrich laboratory at the ETH Zürich in the field of transmissible spongiform encephalopathy (TSE), which then became the main thesis project. TSEs or prion diseases are fatal neurological disorders that include Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in man, scrapie in sheep, bovine spongiform encephalopathy (BSE), and chronic wasting disease (CWD) in

cervids. The BSE epidemic and its transmission to humans in the form of variant CJD (vCJD) have made TSEs a public health issue. Recently, CWD in captive and free-ranging deer and elk has attracted high attention. In contrast to BSE, CWD has not been related to the consumption of foodstuff contaminated with the prion agent. The origin of the disease is thus unknown, its transmission mode among the cervids seems to be lateral, and the potential danger for livestock and human is still unclear.

According to the "protein-only" hypothesis, the infectious agent of all TSEs consists principally, if not entirely, of an abnormal "scarpie isoform" (PrP<sup>Sc</sup>) of the benign cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>). During the disease, PrP<sup>C</sup> is converted into PrP<sup>Sc</sup> by a so far unclear molecular mechanism. While the physiological function of PrP<sup>C</sup> is yet unknown, a number of three-dimensional structures of recombinant PrPs from different species have been solved. Recombinant PrPs have been shown to represent a good structural model for PrP<sup>C</sup>. All mammalian-type PrP structures show the same global architecture, although there are subtle differences among the species in two particular regions, *i.e.* on the one hand the loop connecting the  $\beta$ -strand 2 and the  $\alpha$ -helix 2; and on the other hand, the  $\alpha$ -helix 3. These local structure variations could contribute to the species barrier of TSEs, and to the variable susceptibility of individual species towards infection with TSE.

The aim of this thesis is to relate a unique, local conformational feature of the elk PrP (ePrP) structure in the loop region connecting  $\beta$ -strand 2 and  $\alpha$ -helix 2 by introducing amino acid substitutions into the mouse PrP fragment, mPrP(121–230). The cervid PrP sequences contain a unique amino acid within this polypeptide segment, *i.e.* T174 (human numbering). In order to address the structural importance of this threonine, the NMR structure of the globular domain of a variant mouse PrP, mPrP [N174T], was solved. With this amino acid substitution, the loop still undergoes conformational exchange, as observed for all other PrPs except ePrP. Therefore, a second amino acid exchange between mouse and elk PrP in the region 165–175 was introduced into mPrP(121–231), and the NMR structure of the mPrP [S170N, N174T] was solved. It exhibited no NMR line broadening for this polypeptide segment, which coincides with the structural properties of the loop region in ePrP. A network of hydrogen bonds involving the side chains of T174 and stabilized by N170 could explain the rigidity of the loop segment observed in both ePrP and mPrP [S170N, N174T].

The molecular region investigated in this thesis, the loop region connecting  $\beta$ -strand 2 and  $\alpha$ -helix 2, has been identified as a probable epitope for interactions with a hypothetical species-specific "protein X", which has been proposed to be determinant in the conversion of PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup>. Because of the apparent species barrier between CWD and other species, it would be of great interest to determine if the uniquely structured form of this loop in ePrP plays a crucial role in TSE interspecies transmission.

## Résumé

Cette thèse a commencé dans le laboratoire du Prof. Wüthrich à l'EPF de Zürich avec un projet visant à être une préparation au sujet principal du doctorat qui est décrit dans la seconde partie de ce résumé. Ce projet a été une introduction non seulement à la résonance magnétique nucléaire (RMN), mais aussi au domaine des protéines membranaires. La protéine membranaire OmpA a pu être efficacement exprimée dans *E. coli*, puis purifiée et reconstituée dans des micelles de dihexanoylphosphatidylcholine. L'attribution des résonances du squelette de OmpA a pu être partiellement obtenue, les résonances manquantes étant probablement dues au fait que la région concernée est en échange intermédiaire, à l'échelle RMN des déplacement chimiques, entre différentes conformations. Les résultats de ce travail sont présentés en annexe (A1).

Le projet principal initial de cette thèse, qui a été effectué dans le laboratoire du Dr. H. Senn, chez Hoffmann-La Roche à Bâle, s'agissait de l'analyse structurale par RMN d'une protéine membranaire intégrale, le récepteur Neurokinin-1 (hNK1r). L'expression dans des cellules mammifères, ainsi que la purification de ce récepteur couplé à la protéine G, avaient déjà été décrites lors de précédents travaux effectués chez et en collaboration avec un groupe de Roche. Le but de ce projet était de développer un protocole permettant de purifier la protéine, uniformément marquée avec les différents isotopes régulièrement utilisés en RMN, en quantité suffisante (quelques milligrammes) pour des analyses structurales. Malheureusement, au bout d'un an, il a fallu se rendre à l'évidence que les résultats obtenus précédemment sur la préparation du hNK1r n'étaient pas reproductibles et le projet a donc été interrompu. Puis, un nouveau projet chez Roche, qui avait entrepris de cribler par RMN de nouveaux ligands pour la protéine kinase activée par le mitogène p38 (MAPK), afin de trouver de nouveaux inhibiteurs ayant des sites de liaisons différents de ceux déjà connus, a été commencé. Il s'agissait alors d'obtenir l'attribution des résonances du squelette de la MAPK p38, afin de simplifier et de soutenir la recherche de nouveaux inhibiteurs. En dépit de résultats initiaux prometteurs, qui sont résumés en annexe (A2), ce projet a été interrompu en raison des difficultés à obtenir un échantillon RMN suffisamment concentré.

A ce point, un nouveau projet, qui est devenu le projet principal de cette thèse, a été entrepris dans le laboratoire du Prof. Wüthrich à Zürich dans le domaine des encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) ou les maladies à prion, telles que la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme, la tremblante du mouton, l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et la maladie du dépérissement chronique chez les cervidés, sont des maladies neurologiques létales. L'épidémie d'ESB et sa transmission à l'homme sous la forme d'un nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, ont fait des EST une question de santé publique. Récemment, la maladie du dépérissement chronique chez les cerfs en captivité comme ceux vivants dans la nature, a attiré l'attention publique. Contrairement à l'ESB, cette EST n'est pas liée à la consommation d'aliments contaminés par un agent du prion. L'origine de la maladie est donc pour l'heure inconnue, mais sa transmission parmi les cervidés semble se produire par voie orale, lors des contacts directs entre animaux ou par contamination environnementale. De plus, le danger d'une transmission potentielle de la maladie du dépérissement chronique aux bovins ou à l'homme reste un mystère et ne peut donc être exclue.

Selon l'hypothèse de la "protéine seule", l'agent responsable des maladies à prions est une forme anormale, pathogène de la protéine prion ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ), résultant d'une conversion de la forme cellulaire et bénigne de la protéine prion ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ). Lors du développement de la maladie,  $\text{PrP}^{\text{C}}$  subit une transformation de sa structure tridimensionnelle, dont les mécanismes n'ont pas encore été élucidés. Bien que la fonction physiologique exacte de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  soit encore inconnue, les structures tridimensionnelles de protéines prion recombinantes (recPrPs) de différentes espèces ont été déterminées. L'utilisation de protéines prion recombinantes a été prouvée comme étant un model structurel représentatif de  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . Toutes les structures de recPrPs mammifères possèdent une architecture globale similaire, mais de subtiles différences entre les espèces ont été mises en avant, dans deux régions bien précises. Celles-ci sont la boucle reliant le brin  $\beta 2$  et l'hélice  $\alpha 2$ , ainsi que la partie C-terminale de l'hélice  $\alpha 3$ . Ces variations structurelles locales entre les différentes espèces pourraient contribuer à la barrière interespèce pour les EST et aux susceptibilités variables d'une espèce particulière pour les infections avec les EST.

Le but de cette thèse est d'introduire des substitutions d'acides aminés de la protéine prion du cerf, ePrP, dans la protéine prion de la souris, mPrP, afin d'établir leur rôle dans une caractéristique structurale exceptionnelle de la structure de ePrP. Cette caractéristique est la présence d'une forme structurée de la région comprenant les résidus 166–172, qui contient la boucle connectant le brin  $\beta 2$  et l'hélice  $\alpha 2$ , ce qui n'avait auparavant jamais été observé dans les autres structures PrP. Les séquences de la protéine prion des cervidés possèdent un acide aminé unique à la position 174 (numérotation de la PrP de l'homme), une thréonine (T174). Afin d'évaluer l'influence de ce résidu, la structure du mutant mPrP [N174T] a été déterminée. Celle-ci présente une forme non structurée et flexible de la boucle connectant  $\beta 2$  et  $\alpha 2$ , comme elle l'est pour toutes les autres structures de PrPs, sauf pour ePrP, où cette région est en échange intermédiaire, à l'échelle RMN, entre deux ou plusieurs conformations. La séquence de ePrP contenant une deuxième substitution d'acide aminé dans la région 165–175, une asparagine à la position 170 (N170), celle-ci a aussi été introduite dans mPrP et la structure du double mutant mPrP [S170N, N174T] a été déterminée. Pour ce mutant, toutes les résonances appartenant aux résidus concernant la boucle et les résidus adjacents ont été observées dans les spectres RMN, montrant une conformation structurée de ce segment, ainsi qu'il l'avait été vu pour ePrP. Un réseau de liaisons hydrogènes, impliquant les chaînes latérales de N174T et stabilisé par S170N, a pu être déterminé comme étant très probablement à l'origine de la rigidité de la boucle.

La région moléculaire qui a été discutée ici, la boucle connectant  $\beta 2$  et  $\alpha 2$ , a été identifiée comme participant à un épitope pour une protéine hypothétique, qui serait spécifique à chaque espèce, nommée "protéine X". Cette molécule est supposée jouer un rôle déterminant dans la conversion de PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>sc</sup>. Au vu de l'apparente barrière interespèce entre la maladie du dépérissement chronique et les autres espèces, il reste à savoir si la présence d'une forme structurée de cette boucle dans ePrP joue un rôle quelconque dans la transmission interespèce des EST.