

Diss. ETH Nr. 14016

**Studies on prions:
from biochemistry of the recombinant prion protein
to properties of the infectious form**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institut of Technology Zürich
for the degree of
Doctor of Natural Science

presented by

Eva Zobeley

Diplom-Biologin (Universität Karlsruhe, Germany)

Born on August 11, 1972

Federal Republic of Germany

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Rudi Glockshuber, examiner

Prof. Dr. Kurt Wüthrich, co-examiner

2000

ZUSAMMENFASSUNG

Unter Prionenerkrankungen versteht man infektiöse Krankheiten wie Scrapie bei Schafen, bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern und Creutzfeld-Jakob Krankheit (CJD) beim Menschen. Entsprechend der „Nur Eiweiss“-Hypothese wird angenommen, dass das infektiöse Agens, das Prion, nur oder hauptsächlich aus einer abnormalen Form, PrP^{Sc}, des gutartigen zellulären Prionoproteins, PrP^C, besteht. PrP^C und PrP^{Sc} zeigen keine Unterschiede in ihrer kovalenten Struktur. Jedoch ist PrP^C ein Monomer und hauptsächlich α -helikal, wohingegen PrP^{Sc} ein unlösliches Oligomer darstellt und im Vergleich zu PrP^C erhöhten β -Faltblatt-Anteil zeigt. Die Struktur von rekombinanten Prionproteinen, die PrP^C entsprechen, wurde gelöst. Sie bestehen aus einer ungefalteten N-terminalen Hälfte und einer gefalteten, überwiegend α -helikalen C-terminalen Domäne. Die hohe Aggregationstendenz von PrP^{Sc} verhinderte bisher detaillierte Strukturaufklärungen dieser Form.

Prioninfektiosität ist resistent gegenüber dem klassischen Desinfektionsmittel Formaldehyd. Ausgehend von dieser Tatsache wurde im ersten Teil dieser Arbeit versucht, die Konformation von PrP^{Sc} durch kovalente intramolekulare Vernetzung mit Formaldehyd zu stabilisieren. Der zuvor gezeigte Effekt, dass Formaldehydbehandlung Prioninfektiosität gegen Autoklavieren bei hoher Temperatur resistent macht, konnte jedoch nicht reproduziert werden. Die Behandlung von rekombinantem Prionprotein mit geringen Formaldehydkonzentrationen führte zu intramolekularen Crosslinks, und mit hohen Formaldehydkonzentrationen zu intermolekularen Vernetzungen, wobei hochmolekulare Aggregate gebildet wurden. Die optimale Konzentration für intramolekulare Crosslinks wurde auf PrP(27-30) DLPCs, eine durch Lipide und Detergens solubilisierete Form des infektiösen, proteaseresistenten Kerns von PrP^{Sc}, angewendet. Nach Denaturierung mit Guanidiniumchlorid oder SDS wurden lösliche und unlösliche Fraktionen getrennt. Anschliessende Infektiositätstests mit den löslichen Fraktionen zeigten die höchste Infektiosität nach Behandlung mit 1.3 mM Formaldehyd und Denaturierung mit 2% SDS. Dies könnte ein erster Hinweis für die Existenz einer niedermolekularen, evtl. sogar monomeren Form der infektiösen Einheit sein.

Es wird vermutet, dass PrP^C *in vivo* Kupfer bindet. Eine vorausgehende Studie zeigte, dass durch Zugabe von Kupfer die Renaturierung von denaturiertem und daher nicht-infektiösem Scrapie-Material zu infektiösen Prionen verbessert werden kann. Die

analoge Reaktion wurde im zweiten Teil dieser Arbeit mit dem rekombinanten Mausprionprotein PrP(23-231) durchgeführt, das niemals zuvor infektiös gewesen war. Das Protein aggregierte und zeigte eine gewisse Proteinase K-Resistenz, was Eigenschaften von PrP^{Sc} widerspiegelt. Jedoch wurde keine Infektiosität gefunden.

Im dritten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass die Reduktion der Disulfidbrücke von rekombinantem Mausprionprotein, mPrP(23-231), zu einer signifikanten Strukturänderung führt. Während das Protein mit intakter Disulfidbrücke hauptsächlich α -helikale Struktur zeigt, liefert das reduzierte Protein bei saurem pH CD-Spektren, die typisch sind für β -Faltblatt Strukturen. Bei erhöhter Ionenstärke kommt es zur Ausformung von fibrillären Aggregaten des reduzierten Proteins. Die reduzierte Form könnte daher prinzipiell ein Intermediat bei der Bildung von PrP^{Sc} sein. Nimmt man an, dass dieses Intermediat bei der Bildung von PrP^{Sc} beteiligt ist, so müssen mindestens drei Schritte auftreten: Reduktion, Aggregation und Reoxidation des Prionproteins. Die Geschwindigkeit der Reduktion erwies sich als extrem langsam, was damit übereinstimmt, dass eine vollständige Entfaltung des Proteins nötig ist, um die Disulfidbrücke für Reduktionsmittel zugänglich zu machen. Saurer pH, wie er in Endosomen, dem möglichen Bildungsort von PrP^{Sc}, auftritt, begünstigt jedoch die Reduktion. Bei erhöhter Ionenstärke (≥ 0.2 M) tritt anschliessend die Aggregation spontan ein. Reoxidation wurde sowohl für lösliches wie auch für aggregiertes, reduziertes mPrP(23-231) gezeigt. Bei Proteinase K-Verdau der reoxidierten Fibrillen zeigte sich jedoch nicht die für PrP^{Sc} typische Proteaseresistenz. Daher erscheint eine transiente Reduktion der Disulfidbrücke während der Bildung von PrP^{Sc} unwahrscheinlich. Falls reduziertes PrP dennoch bei der Entstehung von PrP^{Sc} eine Rolle spielt, ist eine Reduktion bei saurem pH im reduzierenden Milieu von Endosomen am wahrscheinlichsten. Dort wäre auch eine Katalyse der Reduktion durch Disulfidoxidoreduktasen denkbar. Dies wurde am Beispiel der Katalyse der Reduktion von PrP durch die bakteriellen Disulfidoxidoreduktasen DsbA, DsbC und Thioredoxin verifiziert.

Bei neutralem pH aggregiert reduziertes mPrP(23-231) unspezifisch. Die gefaltete Domäne des Prionproteins, mPrP(121-231), ist nach Reduktion bei allen pH-Werten unlöslich. Nur durch Zugabe von denaturierenden Reagenzien wie Harnstoff tritt Solubilisierung auf. Bei pH 4.0 und 2 M Harnstoff wurden durch CD-Analysen β -Faltblatt-artige Spektren für reduziertes mPrP(121-231) identifiziert, wie sie auch für

das reduzierte Vollängenprionprotein, mPrP(23-231), gefunden werden. Daher kann angenommen werden, dass sowohl bei reduziertem mPrP(121-231) als auch bei reduziertem mPrP(23-231) zumindest Teile der α -helikalen Region der entsprechenden oxidierten Proteine in β -Faltblatt-Struktur übergehen.

In einem weiteren Projekt konnte schliesslich gezeigt werden, dass Stahldraht nach Inkubation in Prion-infiziertem Hirnhomogenat von Mäusen und anschliessendem extensiven Waschen noch sehr hohe Mengen gebundener Infektiosität aufweist. Diese Experimente zeigen neben der Tatsache, dass Prionen enorm fest an rostfreien Stahl binden, dass in der Humanmedizin wesentlich effektivere Sterilisierungsmethoden für chirurgische Instrumente nötig sind, um in der Chirurgie ein Infektionsrisiko mit Prionen auszuschliessen.

SUMMARY

Prion diseases are infectious disorders like scrapie in sheep, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and Creutzfeld-Jakob disease (CJD) in humans. According to the “protein only” hypothesis the infectious agent, the prion, is believed to consist only or mainly of PrP^{Sc}, an abnormal form of the benign cellular prion protein, PrP^C. The covalent structures of PrP^C and PrP^{Sc} are identical but the two forms differ in conformation. PrP^C is a predominantly α -helical monomer whereas PrP^{Sc} represents an insoluble oligomer possessing increased β -sheet content compared to PrP^C. The high-resolution structure of recombinant PrP corresponding to PrP^C has been solved. The protein consists of an unfolded N-terminal tail and a folded, predominantly α -helical C-terminal domain. The high aggregation tendency of PrP^{Sc} hindered so far detailed structural analysis of this isoform.

Prion infectivity is resistant to formaldehyde treatment, a classical disinfection method. Therefore, in the first part of this thesis, it was tried to fix the PrP^{Sc} conformation by covalent intramolecular crosslinking with formaldehyde. The previously shown effect of strong resistance of formaldehyde treated prion infectivity against strong heat autoclaving, however, could not be reproduced. Treatment of recombinant prion protein with low concentrations of formaldehyde resulted in intramolecular crosslinks and with high concentrations of formaldehyde in intermolecularly crosslinked aggregates. The optimal concentration for intramolecular crosslinks was applied to PrP(27-30) DLPCs, a detergent-solubilized form of the infectious, protease resistant core of PrP^{Sc}. After denaturation with guanidinium chloride or SDS soluble and insoluble fractions were separated. Subsequent bioassays of the soluble fractions showed the highest infectivity after crosslinking with 1.3 mM formaldehyde and treatment with 2% SDS. This might be a first indication for the existence of a small molecular, eventually even monomeric form of the infectious unit.

It is assumed that PrP^C binds Cu²⁺ *in vivo*. A previous study has shown that the addition of Cu²⁺ enhances the renaturation of denatured, non-infectious scrapie material into infectious prions. In the second part of this thesis, a similar reaction was performed with recombinant mouse prion protein, mPrP(23-231), that was never infectious. Although the protein showed aggregation and some Proteinase K-resistance, characteristics reminiscent of PrP^{Sc}, no infectivity was gained.

In the third part of this work, it was shown that upon reduction of the single disulphide bond recombinant full-length mouse prion protein, mPrP(23-231), exhibits a significant structural change. While its structure is mainly α -helical with intact disulphide bridge, the reduced form displays β -sheet-like CD-spectra at acidic pH. At high ionic strength the reduced protein forms amyloid fibrils, perhaps suggesting that the reduced state is an intermediate during PrP^{Sc} formation. Three steps would thus seem necessary: reduction, aggregation and reoxidation of the prion protein. Reduction of mPrP(23-231) with dithiothreitol proved to be extremely slow, consistent with the requirement of complete unfolding of the protein to make the disulphide bond accessible for the reducing agent. Acidic pH, as found in endosomes, the potential sites of PrP^{Sc} formation, favors the reaction. At increased ionic strength (≥ 0.2 M) fibrillar aggregation did spontaneously occur, and reoxidation was shown for both soluble and aggregated reduced mPrP(23-231). However, upon Proteinase K digestion the reoxidized fibrils did not exhibit the PrP^{Sc}-typical protease resistance. For this reason, the proposed transient reduction of the disulphide bridge during the formation of PrP^{Sc} appears unlikely to take place. In case that reduced PrP still plays a role in the formation of PrP^{Sc}, reduction would presumably occur at acidic pH in the reducing environment of endosomes, where catalysis of the reduction by disulphide oxidoreductases is conceivable. This was exemplarily verified by catalysation of the reduction of mPrP(23-231) by the bacterial disulphide oxidoreductases DsbA, DsbC and thioredoxin.

At neutral pH reduced mPrP(23-231) aggregates non-specifically. The folded C-terminal domain of the prion protein, mPrP(121-231), is insoluble after reduction at all pH values. Solubilization occurs only upon addition of denaturing agents like urea. At pH 4.0 and 2 M urea β -sheet-like far-UV CD spectra are displayed for reduced mPrP(121-231) as for reduced full-length mPrP(23-231). It therefore seems likely that in both reduced proteins at least parts of the α -helical region of the oxidized proteins form β -sheet structure.

In a further project, stainless steel wire was incubated in prion-infected mouse brain homogenates, and then washed extensively, before bioassay for residual infectivity. The wire was found to retain very high amounts of infectivity. Besides demonstrating the fact that prions can adhere enormously firmly to stainless steel, these experiments underscore the need for more effective sterilization procedures of surgical instruments that may have been exposed to prion infectivity.