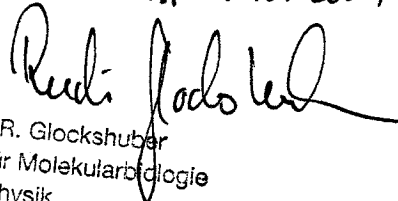


Diss ETH Nr. 14053

**Copper binding and thermodynamic stability
of the recombinant
murine prion protein PrP(23-231)
and its variants**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Zürich, 2. 10. 2001


Prof. Dr. R. Glockshuber
Institut für Molekularbiologie
und Biophysik
ETH Hönggerberg HPK
CH-8093 Zürich

presented by
Grazia Maria Cereghetti
Dipl. Natw. ETHZ
born on Juny 17, 1974
Switzerland

accepted on the recommandation of:
Prof. Dr. Rudi Glockshuber, examiner
Prof. Dr. Arthur Schweiger, co-examiner
2001

Abstract

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in mammals and humans are progressive neurodegenerative diseases supposed to be caused by an infectious agent, PrP^{Sc}, the prion, consisting exclusively of a cellular host protein, PrP^C, in its changed conformation. The innovative view of infectivity transmitted by alteration of the overall fold of a protein, without nucleic acid components, is known as "protein-only" hypothesis.

PrP^C is a cell-surface, GPI anchored protein which is strongly expressed in cells of the central nervous system; it consists of 209 amino acids and is covalently modified by the addition of several high mannose glycans. The structures of PrP^Cs from mouse, hamster, human and bovine are known and show a similar fold, characterised by an N-terminal, disordered tail, residues 23-120, and a C-terminal domain, residues 121-231, consisting of three α -helices and a short antiparallel β -sheet. The single disulfide bridge lies in the buried core of the structured domain and is solvent-inaccessible. The structure of PrP^{Sc}, the abnormal, oligomeric form of PrP is not known, but Fourier transform infrared spectroscopy shows an increased β -sheet content at the expenses of α -helical regions compared to PrP^C. Moreover, proteinase K digestion of PrP^{Sc} generates protease resistant subunits denominated PrP27-30 which comprise residues 90-231 of the full-length protein, suggesting that the region 90-120 is no longer unstructured in PrP^{Sc}. The mechanism underlying the conformational change from PrP^C to PrP^{Sc} is until now unknown.

In this work, the recent question about copper(II) binding to the prion protein is approached using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy on recombinant PrP(23-231) and PrP(121-231) samples. It was found that also the C-terminal, structured domain of the protein, and not only the histidine rich N-terminal region, is able to bind up to four copper(II) ions. Six additional Cu(II) ions are found to bind to the N-terminal tail, in accordance with previous results. Copper(II) binding was shown to be pH dependent. The finding that the structured region of PrP binds Cu(II) opens new questions about a possible involvement of copper(II) ions in PrP^{Sc} formation and infectivity.

To investigate the role of Cu(II) binding on the structure of the N-terminal region of PrP(23-231), limited proteolysis of the protein was performed with several proteases, in the absence and presence of copper(II), and the digestion patterns compared to identify the possible formation of structures in the disordered domain that could impede the proteolytic attack. The experiments show that copper(II) binding does not induce increased proteolytic resistance due to tertiary structure formation within the segment 23-120.

Furthermore, the conditions favouring the formation of the previously identified, scrapie-like folding intermediate found at acidic pH in urea-induced unfolding transitions for PrP(121-231) were investigated. It was shown that intermediate formation at pH 4.0 also occurs at the level of full-length PrP(23-231). In addition, formation of the intermediate is strongly dependent on protein concentration and is only observed at concentrations above 15 μ M. This suggests an oligomeric, most likely dimeric state of the folding intermediate. Ionic strength was found to be another critical factor. The intermediate was not formed at ionic strengths below 50 mM, but well populated at physiological ionic strength (~150 mM). The finding that formation of this PrP^{Sc}-like intermediate requires oligomerization is a good argument supporting the nucleation-condensation model proposed for PrP^{Sc} formation.

Finally, the thermodynamic stability of PrP(23-231) and PrP(121-231) wild-type and some variants thereof was analysed at pH 4.0 and 7.0 under the conditions that favour formation of the scrapie-like unfolding intermediate described above. The selected variants bear point mutations that cause spontaneous formation of infectivity in inherited human TSEs. It should be clarified whether these variants are thermodynamically less stable than the wild-type, or perhaps more prone to the formation of the folding intermediate at acidic pH. We found that no general pathway of destabilisation can be found for the variants investigated with respect to the wild-type, nor a particular propensity to the formation of the scrapie-like intermediate during folding. The increased tendency of the variants to form PrP^{Sc} spontaneously *in vivo* therefore must have another origin, perhaps the better interaction with other factors involved in the conformational change leading to the infectious isoform, faster kinetics of PrP^{Sc} formation or higher stability of PrP^{Sc}.

Sommario

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) nei mammiferi e negli uomini sono malattie neurodegenerative progressive e fatali causate presumibilmente da un agente infettivo, PrP^{Sc}, il prione, consistente esclusivamente di una proteina cellulare, PrP^C, in una conformazione modificata. La visione innovativa della possibilità di trasmissione di una malattia attraverso la conformazione alterata di una singola proteina, senza la collaborazione di altre entità quali gli acidi nucleici, è conosciuta come "protein-only hypothesis" (ipotesi di solo proteina).

PrP^C è una proteina espressa principalmente in cellule del sistema nervoso centrale e situata sulla superficie cellulare, a cui è ancorata per mezzo di una unità di GPI; è composta di 209 aminoacidi ed è modificata covalentemente dall'aggiunta di alcuni residui zuccherini. Sono finora note le strutture delle PrP^C del topo, del criceto, dell'uomo e della mucca, e tutte presentano una conformazione simile, caratterizzata da una coda amoniterminale disordinata, comprendente gli aminoacidi 23-120, e un dominio carbossiterminale (residui 121-231) consistente di tre alfa-eliche e un corto foglietto beta antiparallelo. L'unico ponte disulfurico giace in una tasca nascosta del dominio strutturato ed è inaccessibile al solvente. La struttura della PrP^{Sc}, la forma oligomerica anormale della PrP^C, non è nota, ma dati di spettroscopia infrarossa con trasformata di Fourier evidenziano un accresciuto contenuto di foglietti beta alle spese di parti alfa-elicali rispetto alla struttura della PrP^C. Perdipiù, la digestione con la proteinase K della PrP^{Sc} genera subunità resistenti all'attacco della protease denominate PrP27-30: queste comprendono i residui 90-231 della proteina intera, suggerendo che la regione 90-120 nella PrP^{Sc} non è priva di struttura come nella PrP^C. Il meccanismo alla base della conversione da PrP^C a PrP^{Sc} non è finora noto.

In questo lavoro, abbiamo avvicinato il recente dibattito a proposito del legame dello ione di rame(II) alla proteina del prione applicando la spettroscopia paramagnetica elettronica (EPR) a campioni di PrP(23-231) e PrP(121-231) ricombinante. Abbiamo trovato che anche la parte carbossiterminale, dominio strutturato della proteina, e non solo la regione aminotermineale ricca di istidine, è in grado di legare fino a quattro ioni di rame(II). Sei ioni Cu(II) aggiuntivi si legano poi alla parte aminotermineale, in accordo con

i risultati precedenti. Abbiamo inoltre mostrato che il modo di legame del rame(II) è dipende dal pH. La scoperta che la parte strutturata della PrP lega Cu(II) apre un nuovo dibattito a proposito di un possibile coinvolgimento degli ioni di rame(II) nella formazione della PrP^{Sc} e nell'infettività.

Per indagare il ruolo del legame di Cu(II) nella struttura della parte aminoterminale di PrP(23-231), abbiamo approntato digestioni limitate della proteina con diverse proteasi in assenza e presenza di ioni di rame e abbiamo confrontato i modi di digestione per identificare un'eventuale formazione di strutture all'interno del dominio disordinato, che potrebbero ostacolare l'attacco proteolitico. Gli esperimenti mostrano che il rame(II) non induce un aumento della resistenza alla proteolisi a causa di formazione di struttura terziaria nel segmento 23-120.

In seguito sono state indagate le condizioni che favoriscono la formazione dello stato intermedio, con proprietà caratteristiche di PrP^{Sc}, trovato precedentemente a pH acido durante l'unfolding di PrP(121-231) indotto da crescenti concentrazioni di urea. Abbiamo innanzitutto mostrato che lo stato intermedio viene formato anche durante l'unfolding dell'intera proteina, PrP(23-231). Inoltre, abbiamo trovato che la formazione dello stato intermedio è strettamente dipendente dalla concentrazione della proteina ed è possibile solo a concentrazioni superiori a 15 μ M. Questo suggerisce che lo stato intermedio è oligomerico, molto probabilmente un dimerico. La forza ionica è pure un fattore determinante in questo ambito: lo stato intermedio non è osservato a forze ioniche inferiori a ~50 mM, ma è molto popolato a una forza ionica fisiologica (~150 mM). La scoperta che la formazione di questo stato intermedio con caratteristiche della forma infettiva del prione richiede oligomerizzazione della proteina è un buon argomento a favore del modello di nucleazione-condensazione proposto per la formazione della PrP^{Sc}.

Infine, abbiamo analizzato la stabilità termodinamica della forma selvatica e di alcune forme mutanti di PrP(23-231) e PrP(121-231) a pH 4 e pH 7, nelle condizioni che favoriscono durante l'unfolding la formazione dello stato intermedio descritto sopra. Le mutanti utilizzate contengono mutazioni puntiformi che causano spontaneamente infettività nelle forme ereditarie di TSE. Lo scopo era di chiarire se queste mutanti sono da un punto di vista termodinamico meno stabili della forma selvatica, o eventualmente più predisposte alla formazione dello stato intermedio a pH acido. Abbiamo trovato che

non esiste una regola universale di destabilizzazione termodinamica delle mutanti rispetto alla forma selvatica della proteina, né un'accresciuta tendenza generale alla formazione dello stato intermedio. In conclusione, dobbiamo assumere che l'osservata predisposizione delle mutanti alla formazione della PrP^{Sc} *in vivo* deve essere attribuita ad altri fattori, come per esempio a una migliore interazione con altri elementi coinvolti nel processo di cambiamento conformazionale della PrP^C, a un'accelerata cinetica di formazione della PrP^{Sc}, o a una accresciuta stabilità termodinamica della PrP^{Sc} stessa nelle forme mutanti.