

¹ Département Régulations
Développement et Diversité
Moléculaire, Muséum National
d'Histoire Naturelle,
UMR 5154 CNRS-MNHN,
Chimie et Biochimie des Substances
Naturelles, UMR 5154 CNRS-MNHN,
63 rue Buffon, F-75005 Paris

² Laboratoire d'Etude des Interactions
des Molécules Alimentaires, INRA,
rue de la Géraudière, F-44026 Nantes

³ Département Régulations
Développement et Diversité
Moléculaire, Muséum National
d'Histoire Naturelle, UMR 5153 CNRS-
MNHN Régulation et dynamique des
génomés, 43 rue Cuvier, F-75005 Paris

Courriel : rebuffat@mnhn.fr

Approche physicochimique de la structure de la protéine prion PrP^C : Plasticité conformationnelle de peptides de la région 121-170 (H1-S2) de la protéine prion ovine

Résumé

Le passage de la forme non pathogène de la protéine prion normalement présente chez l'individu sain (PrP^C) vers la forme pathogène (PrP^{Sc}) se traduit par une augmentation de la proportion de feuillet bêta dans la protéine, favorisant son agrégation, la formation de fibrilles et la résistance à la protéinase K. La structure tridimensionnelle de PrP^C, déterminée pour quatre espèces, est extrêmement conservée. Elle comporte un segment désordonné et très flexible à l'extrémité N-terminale et une partie globulaire, constituée de deux brins bêta (S1, S2) et de trois hélices alpha (H1 à H3) associés par des boucles (L1 à L5). Le fragment de la protéine correspondant à l'hélice H1 se structure en hélice de façon autonome. En revanche, le peptide comportant la région H1-L3-S2 (PrPH1-L3-S2) montre, comme la protéine, une capacité à adopter différentes conformations. Ces résultats contribuent à proposer l'hélice H1 comme l'un des motifs structuraux de la protéine capables d'initier la transconformation, c'est-à-dire la transformation de la protéine prion normale en protéine prion pathogène. Le rôle clé de l'hélice H1 dans la transconformation a été étayé par une série d'études physicochimiques, détaillées dans l'article, réalisées à l'aide d'une série de peptides de tailles variées (9 à 33 résidus, séquence ovine) ciblés sur la région [133-165] qui comporte la succession des motifs structuraux L2-H1-L3-S2. Les principaux résultats de cette étude montrent la grande stabilité de l'hélice H1, en particulier en présence de la boucle L2 ou des deux boucles L2 et L3. L'absence de la boucle L2 et la présence du brin bêta S2 sont en revanche des facteurs de déstabilisation de l'hélice H1. La boucle L2 pourrait d'ailleurs jouer un rôle tout particulier comme le suggère l'observation d'une interaction entre cette boucle et la protéine PrP^C. Une telle interaction pourrait être mise en jeu dans les mécanismes intervenant dans l'interaction protéine prion saine/protéine prion pathogène impliquée dans la propagation de la maladie. Ces résultats, qui devront être confirmés et développés, conduisent à proposer la boucle L2 et le feuillet S2 comme deux régions assurant la « régulation » de la stabilité de l'hélice H1, qui apparaît comme une région clef dans les processus de conversion pathogène.

Introduction

L'accumulation dans le cerveau d'une protéine cellulaire (PrP^C) qui subirait une conversion vers une conformation pathogène (PrP^{Sc}) serait à l'origine des Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST). Selon l'hypothèse « protein-only » de S. Prusiner (Prusiner 1982), la forme PrP^{Sc} serait elle-même l'agent infectieux, catalysant la transconformation de la protéine normale de l'hôte en protéine anormale et pathogène. PrP^{Sc} est caractérisée par une proportion plus importante de feuillet β , une tendance accrue à l'agrégation et une forte résistance aux protéases. Plusieurs mécanismes sont proposés pour cette transconformation, qui tous supposent le passage par une forme partiellement dépliée (revue : Zahn 1999, Kelly 2000).

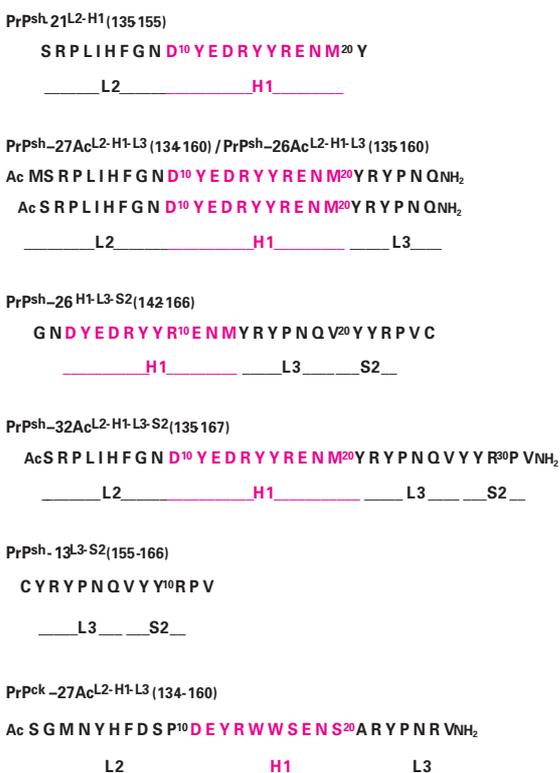
Dans ce contexte, la structure tridimensionnelle de la protéine prion revêt une importance majeure. La forme non pathogène, PrP^C, montre chez quatre espèces (souris, hamster, bovin et homme) une organisation commune en deux domaines, l'un N-terminal, flexible, non structuré, renfermant des régions de séquences répétitives, les « octarepeats », et l'autre globulaire, C-terminal [125-228] (numérotation de la protéine humaine) (Zahn 1999, Liu *et al* 1999, Garcia *et al* 2000, Zahn *et*

al 2000, Wille et al 2002). Ce dernier renferme trois régions en hélice, H1 : [144-154], H2 : [173-194], H3 : [200-228] et deux courts brins en structure étendue associés en un feuillet β antiparallèle, S1 : [128-131] et S2 : [161-164]. Des boucles, L1, L2, L3, L4 et L5 relient ces différentes régions. La structure tridimensionnelle de la forme pathogène n'a jamais été déterminée.

Le peptide correspondant à l'hélice H1 se structure en hélice de façon autonome (Liu et al 1999). En revanche, le peptide comportant la région H1-L3-S2 (PrP^{H1-L3-S2}) montre, comme la protéine, une capacité à adopter différentes conformations (Kozin et al 2001, Bertho et al 2001). Ces résultats contribuent à proposer l'hélice H1 comme l'un des motifs structuraux de PrP^C capables d'initier la transconformation, c'est-à-dire la transformation de la protéine prion normale en protéine prion pathogène.

Notre objectif a consisté, par une approche essentiellement physicochimique, à identifier

Figure 1. Séquences des peptides conçus pour l'étude et qui dérivent de la région [131-167] (numérotation humaine) et renferment les éléments de structure L2-H1-L3-S2 de la protéine prion ovine ou de la protéine prion de poulet (les acides aminés de la séquence sont présentés selon le code à une lettre). La nomenclature utilisée (exemple PrPsh-21 L2-H1 (135-155)) indique successivement l'origine de la séquence, ovine (PrPsh = PrP^{sheep}) ou de poulet (PrP^{ck} = PrP^{chicken}), le nombre de résidus du peptide, les hélices ou feuillettes de la protéine correspondant à ces régions et les positions séquentielles pour la protéine entière, en numérotation humaine.



les régions de la protéine prion impliquées dans la conversion pathogène pour en élucider certains des mécanismes moléculaires et à utiliser les régions clés identifiées pour isoler des partenaires cellulaires de la protéine, agonistes ou antagonistes.

Résultats

1 / Séquences et nomenclature peptides d'intérêt

Les séquences des peptides faisant l'objet de l'étude ont été sélectionnées dans la région [131-167] (numérotation humaine) renfermant la région L2-H1-L3-S2 de la protéine prion ovine (PrP^{sh} = PrP^{sheep}) (figure 1) afin de renfermer les différentes régions structurées nécessaires. La nomenclature utilisée « PrP^{sh}-21^{L2-H1}(135-155) » indique successivement le nombre de résidus du peptide (ici 21), les régions de la protéine correspondant à la séquence (ici L2 et H1) et les positions séquentielles pour la protéine en numérotation humaine (ici région [135-155]). Le peptide PrP^{ck}-27^{L2-H1-L3}(135-160), dont la séquence dérive de celle de la protéine prion de poulet (PrP^{ck} = PrP^{chicken}), a été synthétisé pour comparer sa structure à celle de PrP^{sh}-27^{L2-H1-L3}(135-160), dans la mesure où cette espèce ne développe pas de maladie à prion. Son étude structurale n'a pas encore débuté.

Une première série de peptides dont les extrémités étaient libres a tout d'abord été synthétisée. A l'exception de PrP^{sh}-21^{L2-H1}(135-155), ils se sont tous révélés impropres aux études physicochimiques en raison de leur insolubilité. Une deuxième série, dont les résidus N- et C-terminaux ont été respectivement acétylés et amidés, a alors été synthétisée. Leur solubilité dans les tampons ou les mélanges en proportions variables MeOH/H₂O ou TFE/H₂O s'en est trouvée considérablement améliorée, autorisant les études structurales. Seules les séquences des peptides ayant donné les résultats décrits figurent ci-dessous, à l'exception de PrP^{ck}-27^{L2-H1-L3}(135-160). Les modalités pratiques de la synthèse peptidique sont présentées en encadré 1.

2 / Etudes structurales par Dichroïsme Circulaire (DC), Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et modélisation moléculaire

En milieu tamponné entre pH 7,5 et 2,5, PrP^{sh}-21^{L2-H1}(135-155), PrP^{sh}-26^{L2-H1-L3}(135-160), PrP^{sh}-27^{L2-H1-L3}(134-160) et PrP^{sh}-32^{L2-H1-L3-S2}(135-167) sont essentiellement en structure aléatoire, le taux d'hélice pouvant être estimé au maximum à 10 %. En présence de 20 à 80 % de trifluoroéthanol ou de méthanol, deux solvants organiques structurants, le taux d'hélicité peut être estimé à environ 30 % pour PrP^{sh}-21^{L2-H1}(135-155), PrP^{sh}-26^{L2-H1-L3}(135-160) et PrP^{sh}-27^{L2-H1-L3}(134-160). Celui de PrP^{sh}-32^{L2-H1-L3-S2}(135-167) apparaît inférieur. Pour tous les peptides, l'observation d'un point isodichroïque à 206 nm reflète une transition entre la popula-

Encadré 1. Synthèse peptidique.

La synthèse peptidique a été réalisée sur support solide. La résine utilisée varie selon la nature de la fonction C-terminale du peptide d'intérêt : résine Wang de type p-hydroxyméthylphénoxy-méthyl pour les peptides non amidés, résine Rink Amide pour les peptides à fonction C-terminale amidée. Les acides aminés utilisés sont protégés respectivement au niveau de la fonction N-terminale et des chaînes latérales par le groupement Fmoc (fluorénylméthoxy-carbonyl) et par les groupements tBu (t-Butyl), Trt (Trityl), Pmc (2,2,5,7,8-pentaméthyl-chromane-6-sulfonyl). L'étape de couplage est réalisée par activation avec le mélange HOBt /HBTU (N-hydroxybenzotriazole / 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate). Une réaction supplémentaire d'acétylation est effectuée en fin de synthèse pour l'obtention des peptides présentant une fonction N-terminale acétylée. En fin de synthèse, le peptide est clivé et déprotégé de manière concomitante par l'acide trifluoroacétique additionné de scavengers (phénol, éthanedithiol,

thioanisol). Après filtration, les peptides sont précipités par ajout d'éther diéthylique froid. Les précipités sont séchés puis purifiés par plusieurs étapes d'HPLC en phase inverse. L'homogénéité des peptides a été contrôlée par HPLC et spectrométrie de masse (MALDI-TOF Voyager DE-Pro, et Q-STAR-PULSAR.1, Applied Biosystems-Applera) ; leur pureté est estimée à 98 %.

De fortes difficultés ont été rencontrées pour l'obtention de peptides renfermant un résidu proline ou arginine C-terminal en raison respectivement de la rigidité de structure de l'acide aminé cyclique Pro et de l'encombrement stérique de la chaîne latérale de l'arginine ; ceci nous a conduits dans ces cas à augmenter de 1 à 2 résidus la longueur des peptides initialement conçus. Le peptide PrP^{ck}-27^{L2-H1-L3}(135-160) correspondant à une région de la protéine prion de poulet a été obtenu avec de très mauvais rendements en raison de la présence de deux résidus tryptophane sensibles à l'oxydation.

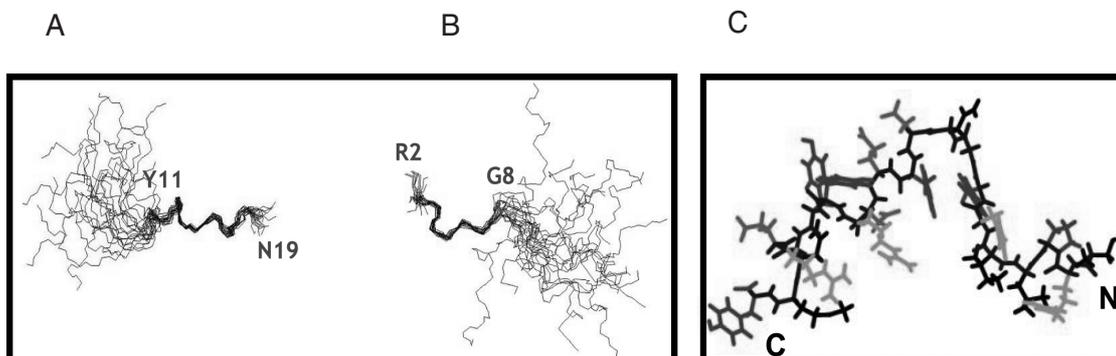
tion d'hélice et une forme en structure aléatoire. La méthionine N-terminale de PrP^{sh}-27^{L2-H1-L3}(134-160) n'apporte ni stabilisation ni modification conformationnelle particulière.

Les conformations de ces quatre peptides ont été analysées par RMN. Les paramètres conformationnels (constantes de couplage ³J_{NHCAH}, chemical shift deviations (CSD), coefficients de température des protons amide (Δδ/ΔT) et effets nucléaires Overhauser (NOEs) ont été collectés, puis analysés en termes de structures protéiques caractéristiques (hélices, feuilletts, tours β, structure aléatoire). Pour deux cas, PrP^{sh}-21^{L2-H1}(135-155) à pH 2,5 dans l'eau et PrP^{sh}-27^{L2-H1-L3}(134-160) dans un mélange méthanol deutérié/eau à 50 % (CD₃OH/H₂O 50 : 50), les structures tridimensionnelles ont été calculées à partir des distances et des angles dièdres déduits des

données RMN (NOEs, constantes de couplage). A titre d'exemple, les résultats sont présentés figure 2 pour PrP^{sh}-21^{L2-H1}(135-155).

PrP^{sh}-21^{L2-H1}(135-155) est structuré dans l'eau, même dans des conditions extrêmes (51°C, pH 2,3). Il s'organise en une série de tours bêta, assimilable à une hélice irrégulière de type 310, dans la région [11-19] attendue pour l'hélice H1. La région N-terminale peut adopter plusieurs orientations par rapport à l'hélice H1. Elle forme une structure plus irrégulière mais comporte aussi des tours bêta. L'orientation des chaînes latérales fait apparaître des secteurs de polarité ou de charges différentes autour de l'hélice : les résidus porteurs de charges positives, R14, R17 sont sur la même face, les résidus acides D10, E12 et D13 forment un cluster sur un autre secteur et les résidus aromatiques Y11,

Figure 2. Structure tridimensionnelle hélicoïdale de PrP^{sh}-21^{L2-H1}(135-155) à 50°C, pH 2,5 dans l'eau : A) superposition des 20 meilleures structures sélectionnées sur la région 11-19, B) superposition des 20 meilleures structures sélectionnées sur la région 2-8 ; C) structure tridimensionnelle de PrP^{sh}-21^{L2-H1}(135-155) montrant l'orientation des chaînes latérales : les résidus chargés positivement apparaissent en gris clair et les résidus aromatiques en gris foncé.



Y15, Y16 sont également localisés sur une autre face. Une telle situation est proche de celle observée sur la structure de la protéine entière (code PDB : 1QLX), en particulier pour les résidus basiques. Le peptide de 27 acides aminés, PrP^{sh}-27^{L2-H1-L3}(134-160) présente une structure également très stable, incluant une hélice dans la région de l'hélice H1. Il comporte une proportion variable d'hélice selon le milieu. En présence de méthanol/eau 8/2, sa structure tridimensionnelle apparaît similaire à celle de ces mêmes régions dans PrP^c, et en particulier en ce qui concerne l'hélice H1, le repliement de la boucle L2 et l'orientation des chaînes latérales. L'ensemble des résultats montre que l'hélice H1 est stabilisée en présence des boucles L2 et L3, suggérant l'existence d'interactions intramoléculaires spécifiques entre ces régions de la protéine.

3 / Etude des interactions exercées par les différentes régions sélectionnées, entre elles et avec PrP^c

Les interactions engagées par les différentes régions ciblées par notre étude avec les autres régions de la protéine prion recombinante PrP^c ont été examinées par résonance plasmonique de surface, à l'aide d'un BIAcore 3000. Cette technique permet en effet l'observation en temps réel d'interactions spécifiques de type protéine/ligand, protéine/peptide ou même peptide/peptide, si l'on utilise la dernière génération d'instruments comme le BIAcore 3000. Une interaction impliquant L2 a été détectée. Deux séries d'expériences ont été réalisées en greffant

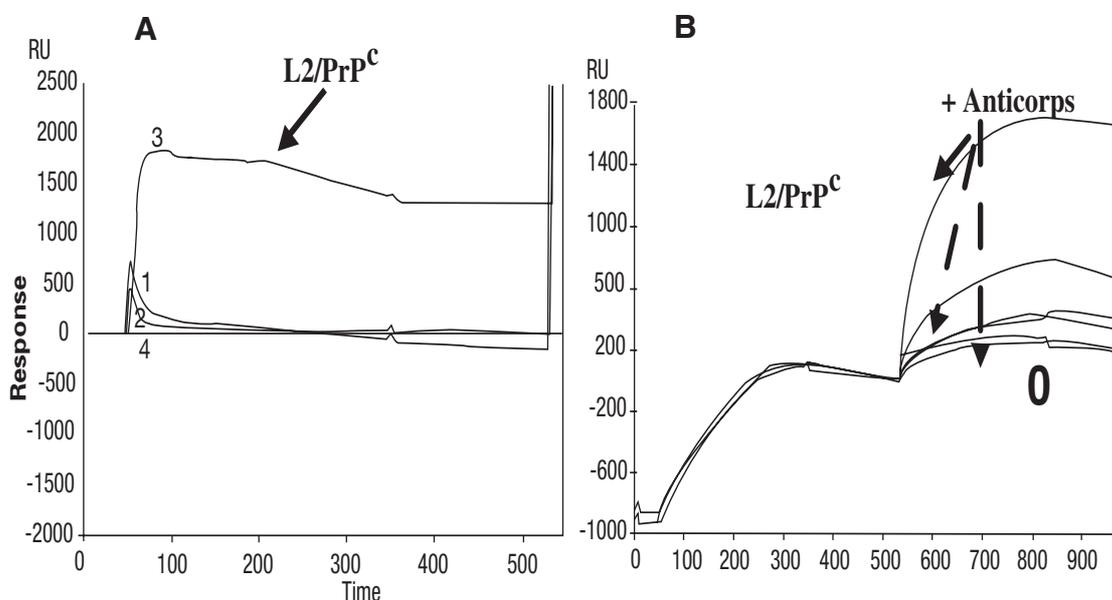
respectivement les peptides S2 et L2 sur la matrice du Biacore, le premier par biotinylation à l'aide du peptide Biot-GSGS-MSR-PLIHFG (don de H. Rezaei et J. Grosclaude) et le second par thiol-ligation à l'aide de la cystéine N-terminale portée par PrP^{sh}-13L3-S2(155-166). La capacité d'interaction de S2 ou L2 avec des peptides correspondant aux différentes régions isolées du domaine globulaire de PrP^c, ou avec la protéine entière PrP^c et la protéine tronquée PrP^{ct} (sans la région flexible N-terminale) ont été successivement examinées à pH 7,3 (figure 3A).

Une augmentation significative de signal, indicatrice d'une interaction, a été observée entre L2 et PrP^c. Elle n'est pas retrouvée avec la protéine tronquée PrP^{ct}. Des anticorps spécifiques de différentes régions de PrP^c ont été ajoutés pour préciser la spécificité de l'interaction observée entre L2 et PrP^c (figure 3B). Les anticorps spécifiques de la région des octarepeats du domaine N-terminal flexible ne procurent pas d'augmentation supplémentaire du signal, suggérant soit que cette région est directement impliquée dans l'interaction, soit que l'interaction L2/PrP^c perturbe l'approche de l'anticorps dans la région des octarepeats. Cette étude sera développée par microcalorimétrie de titration isotherme (ITC).

4 / Capture des partenaires cellulaires de PrP^c à l'aide des régions sélectionnées

La stratégie choisie pour la capture de partenaires cellulaires de la protéine prion

Figure 3. Étude par résonance plasmonique de surface (Biacore 3000) des interactions moléculaires impliquant les régions S2 et L2 : A) interaction des régions H1, L2-H1, L2-H1-L3, L3-S2, L2-H1-L3-S2, de PrP^c et PrP^{ct} avec les régions S2 et L2 (Hepes 10 mM, pH 7,3, NaCl 0-0.15 M) ; l'intensité du signal de résonance (RU) dont l'augmentation caractérise l'interaction observée est portée en fonction du temps (min) ; B) ajout de différents anticorps après interaction L2/PrP^c : les anticorps dirigés contre la région des octarepeats sont repérés par un cercle.



consiste à utiliser comme ligands des peptides présentant les régions de PrP^c (S2 et L2) pour lesquelles nous avons émis l'hypothèse qu'elles pouvaient intervenir dans la transconformation. Ces peptides sont greffés de façon covalente sur des billes magnétiques portant des chaînes alkylamine, puis les billes greffées sont mises au contact d'extraits cellulaires. Des extraits de cellules ROV9 exprimant ou non PrP^c par induction à la doxycycline ont été préparés. PrP^{sh}-13^{L3-S2}(155-166) a été greffé sur les billes. Différentes expériences ont été réalisées pour optimiser i) le greffage des billes et la détection des peptides greffés, ii) la température et la durée de mise en présence des billes avec les extraits, iii) les conditions de détection des partenaires capturés par électrophorèse mono- et bidimensionnelle. Les premiers résultats révèlent une protéine de 20-25 kDa capturée dans les extraits exprimant PrP^c et absente des contrôles.

Conclusions

Dans le cadre de l'identification de régions importantes pour la conversion pathogène de la protéine prion PrP^c, nous avons focalisé

notre intérêt sur l'hélice H1 de la protéine prion et le rôle stabilisant ou déstabilisant des régions qui lui sont proches dans la protéine. Les principaux résultats de cette étude montrent la grande stabilité de l'hélice H1, en particulier en présence de la boucle L2 ou des deux boucles L2 et L3. L'absence de L2 et la présence de S2 sont des facteurs de déstabilisation de cette hélice. La boucle L2 pourrait jouer un rôle tout particulier comme le suggèrent les résultats de l'interaction L2/PrP^c qui pourrait impliquer la région N-terminale flexible des octarepeats. Ces résultats, qui devront être confirmés et développés, conduisent à proposer la boucle L2 et le feuillet S2 comme deux régions assurant la « régulation » de la stabilité de l'hélice H1, qui apparaît comme une région clef dans les processus de transconformation pathogène.

Remerciements

Nous remercions respectivement J. Grosclaude et H. Laude (Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA, Jouy-en-Josas) pour le don de protéine prion cellulaire ovine recombinante et l'accès au Biacore 3000 et pour le don de cellules ROV9.

Références

- Bertho G., Kozin H., Debey P., Hui Bon Hoa G., Girault J.-P., 2001. Solution structure of the Sheep Prion PrP[142-166]: a possible site for the conformational conversion of prion protein. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, 4, 739-743.
- Garcia F.L., Zahn R., Riek R., Wüthrich K., 2000. NMR structure of the bovine prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97, 8334-8339.
- Kelly J.W., 2000. Mechanisms of amyloidogenesis. *Nature, Structural Biology*, 7, 824-826.
- Kozin S.A., Bertho G., Mazur A.K., Rabesona H., Girault J.-P., Haertlé T., Takahashi M., Debey P., Hui Bon Hoa G., 2001. Sheep prion protein synthetic peptide spanning helix 1 and beta-strand 2 (residues 142-166) shows beta-hairpin structure in solution. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 46364-46370.
- Liu H., Farr-Jones S., Ulyanov N.B., Llinas M., Marqusee S., Groth D., Cohen F.E., Prusiner S.B., James T.L., 1999. Solution structure of Syrian hamster prion protein rPr(90-231). *Biochemistry*, 38, 5362-5377.
- Liu A., Riek R., Zahn R., Hornemann S., Glockshuber R., Wüthrich K., 1999. Peptides and proteins in neurodegenerative disease: helix propensity of a polypeptide containing helix 1 of the mouse prion protein studied by NMR and CD spectroscopy. *Biopolymers*, 51, 145-152.
- Prusiner S.B., 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-144.
- Wille H., Michelitsch M.D., Guénebaut V., Suppatapone S., Serban A., Cohen F.E., Agard D.A., Prusiner S.B., 2002. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99, 3563-3568.
- Zahn R., 1999. Prion propagation and molecular chaperones. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 32, 309-370.
- Zahn R., Liu H., Luhrs T., Riek R., von Schroetter C., Lopez Garcia F., Billeter M., Calzolari L., Wider G., Wüthrich K., 2000. NMR solution structure of the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97, 145-150.

Abstract

A physicochemical approach to the structure of the PrP^c prion protein:

Conformational plasticity of peptides of the 121-170 (H1-S2) region of the ovine prion protein

The conversion of the prion protein from the normal non-pathogenic cellular form (PrP^c), to the pathogenic

misfolded isoform (PrP^{sc}) involves an increase of the amount of beta sheet in the protein structure, which favours aggregation, formation of fibrils and resistance to proteinase K. The three-dimensional structure of PrP^c, which has been determined for four species, is extremely conserved. It contains a flexible segment at the N-terminus and a globular part composed of two beta-strands (S1, S2) and three alpha-helices (H1 to

H3) associated by loops (L1 to L5). The protein fragment corresponding to helix H1 is an autonomous region that can adopt a helical structure by itself. By contrast, the peptide that contains region H1-L3-S2 (PrPH1-L3-S2) adopts different conformations, as also shown for the protein. These results allow proposing helix H1 as one of the structural motifs of the prion protein able to initiate the transconformation, i.e. the conversion of the benign prion protein into its pathogenic isoform. The key role played by helix H1 in the transconformation was analysed in a physicochemical study using a series of peptides of different sequences and lengths (9 to 33 residues, sheep sequence) designed in the [133-165] region that contains the structural motifs L2-H1-L3-S2. The main results, which are

described here, show the great stability of helix H1, particularly in the presence of either loop L2 or loops L2 and L3. The absence of loop L2 associated to the presence of beta-strand S2 decreases the stability of helix H1. It is possible that loop L2 could play a special role, as suggested by the fact that this loop can interact with PrP^C. Such an interaction could contribute to the mechanisms that are involved in the interaction benign prion protein / pathogenic prion protein, which is implicated in the propagation of the disease. These results, which should be confirmed and developed, lead to propose loop L2 and strand S2 as two regions that could assume a "regulation" of the stability of helix H1, which appears as a key region in the pathogenic conversion process.