

N端八肽重复区数目对人重组 PrP 与金属离子结合后的蛋白酶抗性以及与 tau 蛋白结合能力的影响

高建梅¹, 万言珍¹, 韩俊¹, 王小凡¹, 陈岚^{1,2}, 聂凯¹, 周伟¹, 董小平¹

(1. 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所, 北京 100052;

2. 中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学基础医学院, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

摘要:人类朊病毒病中约 10%~15% 具有家族遗传特性, 其中插入或缺失突变多发生于 PrP 蛋白 N 末端的八肽重复区域。运用 PCR 成功地构建并表达了含不同八肽重复数目的 PrP 蛋白, 并观察八肽重复数目的增加对 PrP 与 Cu²⁺ 等二价离子以及 tau 蛋白的相互作用的影响。实验结果显示: 各种纯化后的 PrP 蛋白对常规浓度 PK 消化是敏感的, 而与 Cu²⁺ 共同孵育可使 PrP 蛋白的 PK 抗性增强; 八肽重复序列的数目及 Cu²⁺ 的浓度决定了 PK 抗性的出现和强弱。另外, Mn²⁺ 可诱导产生与 Cu²⁺ 相似的结果, 但其诱导效应似乎低于 Cu²⁺, 而 Zn²⁺ 对 PrP 蛋白的 PK 抗性无影响。GST-tau 包被的 ELISA 检测证实, 重组的 PrP 呈现出明显的 tau 蛋白结合能力, 并且与八肽重复序列的数量相关, 重复序列数量越多, 结合能力越强。这些结果提示, Cu²⁺ 诱导产生的 PrP 蛋白 PK 抗性是通过八肽重复序列区域产生的, 并且直接与重复序列的数量相关。另外, PrP 蛋白八肽重复序列的存在和数量直接影响 PrP 与 tau 蛋白的结合效应。除了八肽区域外, PrP 蛋白其它区域似乎也具有一定的 tau 蛋白结合能力。

关键词:重组人 PrP; N 端八肽重复区突变; 生化特性

中图分类号: R373 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2005)05-0376-08

在人类的 prion 疾病中约 10%~15% 是与遗传有关, 包括约 10% 的家族性克雅氏病 (Creutzfeldt-Jacob disease, CJD), 所有的吉-曼氏综合症 (GSS) 和家族性致死性失眠症 (FFI), 为常染色体显性遗传病, 与 20 号染色体上的 PrP 基因 (PRNP) 的点突变、插入或缺失突变有关^[1]。其中插入或缺失突变多发生在 PRNP 基因的八肽重复区, 并且已经证实 2、4~9 个额外八肽重复的插入突变与家族性 prion 疾病有关^[2]。推测这些突变可能有助于 PrP 自发转变成 PrP^{Sc} 状态, 但其确切的致病机理目前尚不清楚。此外, 来自转基因鼠^[3] 的数据也进一步显示额外的八肽重复与 TSE 发病相关。

研究证实, PrP 蛋白的八肽重复区具有结合铜离子 (Cu²⁺) 的能力^[4]。Cu²⁺ 能够诱使 PrP 构象的改变, 刺激细胞表面 PrP 的内吞以及改变突触传递^[5]。以往曾报道一些细胞蛋白具有 PrP^C 结合能力, 包括 laminin 受体前体蛋白^[6], 硫酸化的乙酰肝

素^[7], 神经元细胞黏附分子 (N-CAM)^[8] 和 Bcl2^[9]。但是到目前为止还没有证据表明这些相互作用与明确的生理功能有关。

我们先前的实验发现, 重组的人 tau 蛋白在体外能够同来自仓鼠脑中的 PrP^C 和 PrP^{Sc} 以及重组的人 PrP 蛋白相互作用, PrP 与 tau 相互作用的位点主要位于 PrP 功能区之一的八肽重复区^[10]。因此我们利用八肽重复区氨基酸序列完全相同而碱基序列有差异的特点, 运用 PCR 成功构建并表达了含不同八肽重复的 PrP 蛋白, 观察八肽重复数目的增加对 PrP 与 Cu²⁺ 等二价离子以及 tau 蛋白的相互作用的影响, 研究其生物学特性。

材料与方法

1 质粒、菌株 pGEM-T 质粒购自 Promega 公司。pQE30、pUC18、pTRE2Hyg-PrP (1-253) 为本室保存。大肠杆菌 DH5 和 M15 感受态细胞为本室保存。

2 试剂 所用各种 DNA 限制性内切酶及各种 DNA 的修饰酶均购自 TaKaRa 公司。CuSO₄、MnCl₂ 和 ZnSO₄ 均为国产分析纯试剂。BCA 蛋白浓度测定试剂盒为碧云天试剂公司生产。PrP 单克隆抗体 3F4 购自 Dako, 辣根过氧化物酶标记的小鼠二抗为 Santa Cruz 产品。

收稿日期: 2005-03-15; 修回日期: 2005-06-24

基金项目: 国家自然科学基金委项目 (30070038); 国家自然科学基金委重点项目 (30130070); 国家 863 计划项目 (2001AA215391); 欧盟项目 (QLRT 2000 01441); 国家科技攻关计划项目 (2003BA712A04-02)。

作者简介: 高建梅 (1971-), 女, 山东烟台人, 博士, 助理研究员, 专业研究方向为 TSE 发病机理和诊断方法。

联系作者: 董小平, E-mail: dongxp238@sina.com

3 八肽重复区的缺失/插入突变体-huPrP[PG(3,4,6,7,8,9)] 根据八肽重复区氨基酸序列完全相同而碱基序列不完全相同的特点,设计引物 1(PrP23 上游 *Bam*H^I): GAA GGA TCC AAG AAG CGC CCG AAG CCT G; 引物 2: TTG ACC CCA GCC ACC ACC ATG; 引物 3: CCT CAT GGT GGT GGC TGG; 引物 4(PrP231 下游, *Eco*R^I): GAA TTC TCA GCT CGA TCC TCT CTG GTA ATA。以质粒 p-TRE-2Hyg-PrP 为模板,用引物 1 和引物 2 以及高保真 Taq 酶,PCR 扩增出 PrP N 端基因序列 huPrP-N-octa2/5,长度约为 144~216bp;用引物 3 和引物 4 以及高保真的 pfu 酶,扩增出 PrP C 端基因序列 huPrP-C-octa1/4,长度约为 450~522bp。

八肽重复区完全缺失突变体-huPrP₅₁₋₉₀,设计夹板式引物 5(PrP91 位 aa 以后与 PrP51 位 aa 以前的序列的拼接): GACT GTG GGT GCC ACC TCC TGG GTA GCG GTT GCC TCC; 引物 6(PrP231 下游, *Sal*I): GTC GAC TCA GCT CGA TCC TCT CTG GTA ATA。采用不对称 PCR 的方法,以质粒 p-TRE-2Hyg-PrP 为模板扩增出 huPrP₅₁₋₉₁ 基因片段。

4 质粒的构建 将回收的 PCR 片段 huPrP-N-octa2/5 和片段 huPrP-C-octa1/4 进行相应的 DNA 修饰酶(3 端去 A 或 5 端去磷酸)和限制性内切酶 *Bam*H^I 和 *Eco*R^I 处理后,与 pUC18 载体连接成质粒 pUC-PrP(PGn)。经双酶切及测序鉴定正确后,再以此 pUC-PrP(PGn)为模板,用引物 1 和引物 6(上游 *Bam*H^I、下游 *Sal*I)进行 PCR 扩增。回收后的 PCR 产物与克隆载体 pGEM-T 连接后,用 *Bam*H^I 和 *Sal*I 双酶切回收目的片段,然后目的片段与同样双酶切的带 His-tag 的 pQE30 表达载体连接,重组转化 M15 感受态细胞诱导表达。

5 HIS-huPrP(PGn)重组蛋白的纯化 Ni-NTA Agarose 亲和层析柱的平衡,His 融合蛋白的纯化、洗脱,参见 Qiagen 公司产品使用说明及参考文献^[11]。含 8mol/L 尿素的纯化蛋白装入透析袋中,在 4℃ 条件下用 1×PBS 逐步缓慢地稀释,直至尿素的浓度为 0mol/L。12 000g 4℃ 离心 10min 后的蛋白上清,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定浓度,分装,保存在 -80℃ 冰箱备用。纯化蛋白经 15% SDS-PAGE 电泳鉴定。

6 HIS-huPrP(PGn)重组蛋白的 Western blot 鉴定 纯化的重组蛋白电泳、转膜按常规方法进行。一抗为 PrP 蛋白特异性单克隆抗体 3F4(1:4 000),二抗为辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG(1:4 000)。

7 HIS-huPrP(PGn)重组突变蛋白与二价离子的相互作用 (CuSO₄、MnCl₂、ZnSO₄) 不同突变体的 PrP 蛋白(以野生型的 PrP(PG5)1.1μg 用量为参照,其余的突变体蛋白与其摩尔数相同)分别与 50μmol/L、100μmol/L、200μmol/L 和 300μmol/L 的 Cu²⁺(CuSO₄) 在室温作用 2h 后,加入蛋白酶 K 在 37℃ 作用 1h,进行 15% SDS-PAGE 和 Western blot 分析。

8 HIS-huPrP(PGn)重组突变蛋白与人 tau 蛋白的相互作用

的 ELISA 检测 重组的原核表达的人 GST-tau 蛋白和 GST 蛋白由本室保存。具体方法参见文献^[10],即每孔用 75ng 重组的人 GST-tau 蛋白包被 ELISA 板(包被液为 0.2mol/L 的碳酸钠,0.15mol/L 氯化钠,pH9.6),4℃ 包被过夜。然后用 5% 的脱脂奶粉(含 0.05% 的 Tween20)室温封闭 2h。将溶于 PBS 中的不同八肽重复突变体蛋白加入到孔中。在 37℃ 作用 2h,用 PBS 洗 3 次后用 1:8 000 的 PrP 特异性单克隆抗体 3F4 室温孵育 1h,PBS 洗 3 次后用 1:4 000 的辣根过氧化物酶标记的二抗室温作用 45min。充分洗涤后加入 100μl 含 0.03% 的过氧化氢的显色剂 TMB(3,3',5,5'-四甲基对二氨基联苯),约 40min 后用 50μl 0.5mol/L 的硫酸终止反应。在 450nm 波长的酶标仪上测定 OD 值,同时以原核表达纯化的 GST 蛋白包被 ELISA 板做为对照。

结 果

1 N 端八肽重复区插入或缺失突变的 PrP 基因片段的获得和表达载体的构建

以本室保存的带有人 PrP 基因(编码 1~231 位氨基酸)的 p-TRE-2Hyg-PrP 质粒为模板,设计相应的引物,采用分两段定点突变扩增方法分别获得 PrP N 端基因序列 huPrP-N-octa2/5(含 2~5 个重复)和 C 端基因序列 huPrP-C-octa1/4(含 1~4 个重复)。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测证实,在预期分子量位置出现略呈弥散的扩增条带(图 1)。两种 PCR 产物经相应的处理后与 pUC18 载体连接,经限制性双酶切分析(图 2)和序列测定,成功地获得了含有不同八肽重复数的序列。

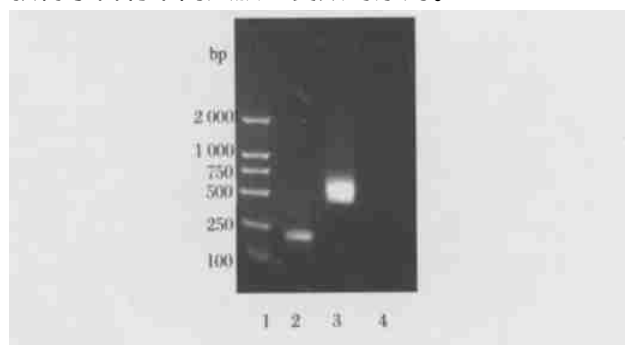


图 1 PrP N 端基因序列(huPrP-N-octa2/5)和 C 端基因序列(huPrP-C-octa1/4) PCR 产物电泳图

Figure 1 Electrophoresis patterns of the PCR products of huPrP-N-octa2/5 and huPrP-C-octa1/4

Lane1. DNA marker DL2000; Lane2. huPrP-N-octa2/5; Lane3. huPrP-C-octa1/4; Lane4. Negative control.

再以 pUC-PrP(PGn)为模板进行 PCR,得到合适酶切位点的 PrP(PGn) (*Bam*H^I 和 *Sal*I)基

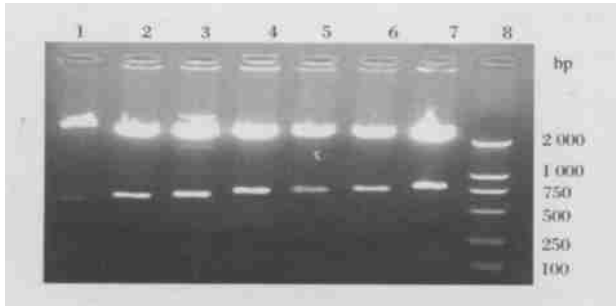


图2 突变 PrP 基因克隆质粒的酶切鉴定图
Figure 2 Restriction endonuclease identification of the cloned plasmids with zero to nine octapeptide repeat sequences

Lane 1. pT-huPrP(PG0); Lane 2. pUC-huPrP(PG3); Lane 3. pUC-huPrP(PG4); Lane 4. pUC-huPrP(PG6); Lane 5. pUC-huPrP(PG7); Lane 6. pUC-huPrP(PG8); Lane 7. pUC-huPrP(PG9); Lane 8. DNA marker DL2000.

因片段,与克隆载体 pGEM-T 连接,酶切鉴定阳性克隆。将 pT-PrP(PGn) 上的 PrP(PGn) 的基因亚克隆至 His-tag 表达载体 pQE30,构成质粒 pQE-PrP(PGn)。

2 N端八肽重复区突变的 PrP(PGn) 蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化和鉴定

常规转化、活化工程菌、IPTG 诱导,SDS-PAGE 电泳证实,插入片段在大肠杆菌中以包涵体形式表达,所表达的蛋白分子量在 18~28 kD 之间(图 3),与预期大小相符。进一步纯化显示,所表达的蛋白可与 Ni-NTA Agarose 亲和层析柱结合并被纯化,表明所表达蛋白为 His-tag 融合蛋白,纯度为 85%~90%(图 4)。Western blot 检测显示,所有纯化的 PrP(PGn) 蛋白能够被 PrP 的特异性单克隆抗体 3F4 识别(图 5),证实为所需要的目的蛋白。

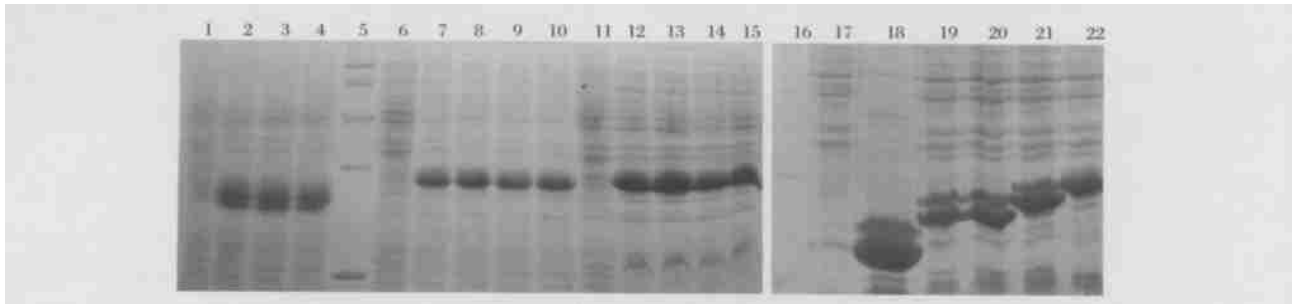


图3 PrP(PG0,3,4,6,7,8,9)蛋白表达的 SDS-PAGE 电泳图

Figure 3 SDS-PAGE analyses of the expressed PrP(PG0,3,4,6,7,8,9)

Lane 1. pQE-PrP(PG3) before inducement; Lane 2-4. pQE-PrP(PG3) after inducement; Lane 5. Middle molecular weight protein marker (97,66,43,31,20kD); Lane 6. pQE-PrP(PG7) before inducement; Lane 7-10. pQE(PrP(PG7) after inducement; Lane 11. pQE-PrP(PG9) before inducement; Lane 12-15. pQE-PrP(PG9) after inducement; Lane 16. Protein marker; Lane 17. pQE-30 after inducement as a control; Lane 18. pQE-PrP(PG0) after inducement; Lane 19-20. pQE-PrP(PG4) after inducement; Lane 21. pQE-PrP(PG6) after inducement; Lane 22. pQE-PrP(PG8) after inducement.

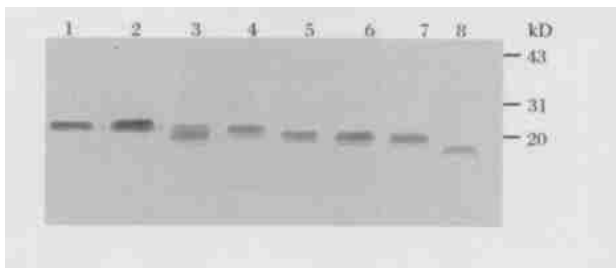


图4 纯化的各种 PrP(PGn)蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Figure 4 SDS-PAGE analyses of various purified PrP(PGn)

Lane1. PrP(PG9); Lane2. PrP(PG8); Lane3. PrP(PG7); Lane4. PrP(PG6); Lane5. PrP(PG5), wild type PrP as control; Lane6. PrP(PG4); Lane7. PrP(PG3); Lane8. PrP(PG0).

3 在 Cu²⁺ 存在条件下,表达的 PrP 蛋白 PK 抗性取决于八肽重复序列数目

为了观测基因工程表达的各种八肽重复序列插入/缺失的 PrP 蛋白对 PK 消化作用的差异,我们首

先检测各种纯化后 PrP 蛋白对常规浓度 PK 消化的敏感性。将等量的带有不同八肽重复数的 PrP 蛋白与 PK 孵育,常规电泳、电转后与 PrP 特异性单抗 3F4 进行 Western blot 检测。结果显示,各种纯化的 PrP 蛋白均不耐受常规浓度(20μg/ml)的 PK 消化(图 5)。

为了探讨 Cu²⁺ 结合是否会影响 PrP 蛋白对 PK 的消化作用,等摩尔的含不同八肽重复数的蛋白在与 Cu²⁺ 室温作用 2 h 后,进行 PK 消化处理。Western blot 检测结果发现,野生型的 PrP(PG5)在与 200μmol/L 的 Cu²⁺ 作用时出现 PK 抗性(图 6a);含 3 个八肽重复的 PrP(PG3)在与 300μmol/L 的 Cu²⁺ 作用时出现 PK 抗性(图 6b);含 9 个八肽重复的 PrP(PG9)在与 50μmol/L 的 Cu²⁺ 作用时就开始出现 PK 抗性(图 6c);而八肽重复区完全缺失的 PrP

(PG0) 蛋白未能检出有任何 PK 抗性(图 6b, c)。这些结果提示,在有 Cu^{2+} 的条件下 PrP 蛋白出现 PK 抗性,随着 Cu^{2+} 的浓度增高,PK 抗性 PrP 含量增加。 Cu^{2+} 诱导的 PrP 蛋白 PK 抗性是通过八肽重复

序列区域产生的,并且直接与重复序列的数量相关,含八肽重复数目越多,对 Cu^{2+} 的敏感性越强,产生 PK 抗性的能力越明显。另外,一份与 $300\mu\text{mol/L}$ 的 Cu^{2+} 室温作用 2 h 的样品,在进行 PK 消化前加

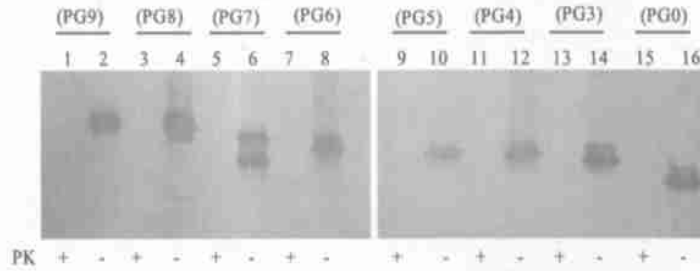


图 5 纯化的各种 PrP(PGn) 蛋白 PK 抗性的 Western blot 鉴定

Figure 5 Western blot identification of the PK resistant activities of various purified PrP(PGn)

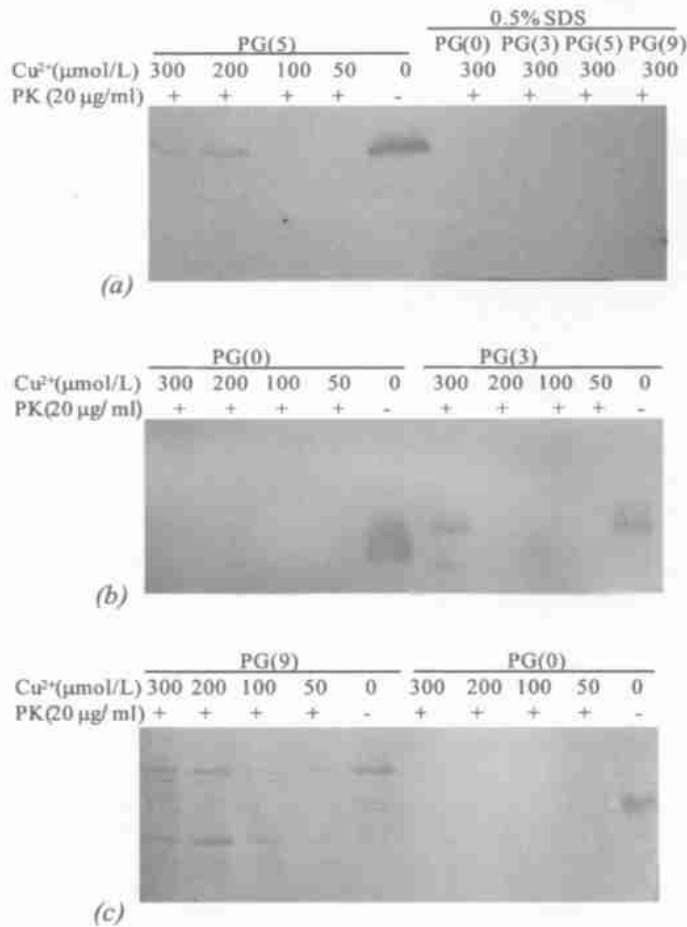


图 6 含不同八肽重复数的突变 PrP 蛋白 (PG0、3、5、9) 与 Cu^{2+} 相互作用后 PK 抗性的 Western blot 检测

Figure 6 Western blot assays for PK resistance of the mutant PrPs with different octapeptide repeats after interacted with Cu^{2+} in various concentrations.

“+”:with PK; “-”:without PK. (a). The left part was the results of PrP(PG5), wild type as a control, and the right part was the results of the Cu^{2+} -treated PrP(PG0, 3, 5, 9) that were boiled in 0.5% SDS for 10min before PK treatment; (b). PrP(PG0) and PrP(PG3); (c). PrP(PG0) and PrP(PG9).

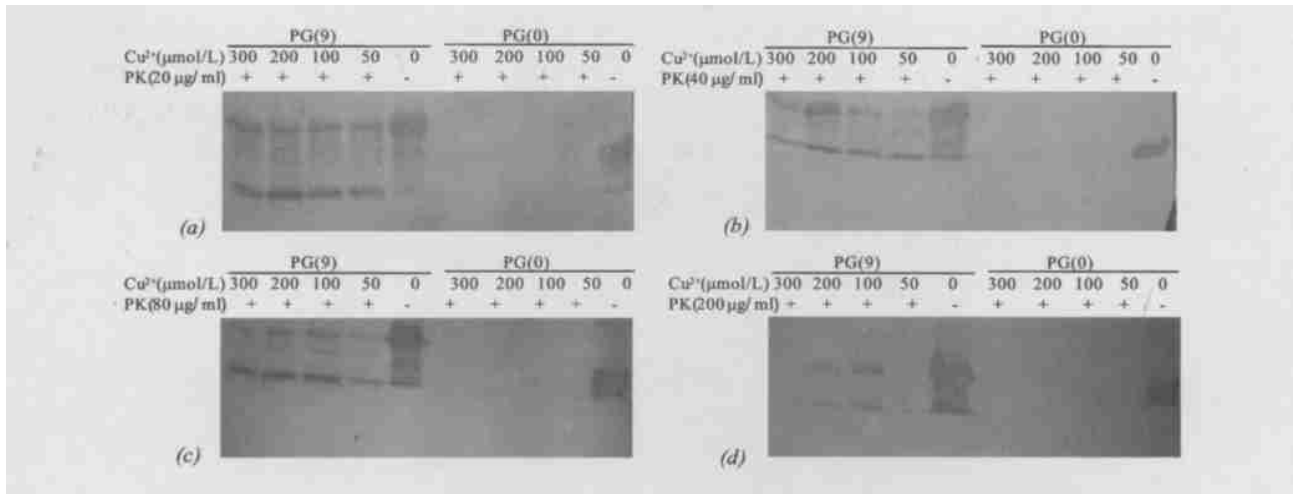


图 7 PrP(PG0)和 PrP(PG9)突变蛋白经 Cu²⁺作用后对不同浓度 PK 消化抵抗能力的 Western blot 鉴定

Figure 7 Western blot identifications for the resistant abilities of the Cu²⁺-treated mutant PrP proteins PrP(PG0) and PrP(PG9) against the digestion in different concentrated PK

(a). 20μg/ml PK. (b). 40μg/ml PK. (c). 80μg/ml PK. (d). 200μg/ml PK.

入终浓度为 0.5% 的 SDS,先 100 °C 煮沸 10min,冷却至室温后加入与上述同样量的 PK,结果发现即使 300μmol/L Cu²⁺ 也不影响 PK 的消化功能。

进一步观察 Cu²⁺ 诱导产生的 PK 抗性的稳定性,除了常规浓度 PK(20μg/ml)外,分别还使用 40、80 和 200μg/ml 浓度的 PK,对带有 9 个八肽重复序列的 PrP(PG9)和 Cu²⁺ 孵育物进行消化处理。结果显示,在 20、40 和 80μg/ml PK 的条件下,50μmol/L 的 Cu²⁺ 即可诱导 PrP(PG9) 出现明显的 PK 抗性条带(图 7a, b, c);而在 200μg/ml PK 的条件下,100μmol/L 的 Cu²⁺ 也可诱导 PrP(PG9) 出现 PK 抗性条带(图 7d)。分析 PK 抗性的 PrP 特异性信号强度显示,随着 PK 浓度的增加而逐渐降低,呈现出明显的剂量依赖相关性。这些结果表明,Cu²⁺ 诱导产生的 PrP PK 抗性条带具有良好的稳定性。

4 其它二价阳离子对 PrP 蛋白 PK 抗性的影响

一些研究显示,其它二价阳离子如 Mn²⁺、Zn²⁺ 等,也可通过八肽重复序列区域同 PrP 蛋白结合。我们将 50 ~ 300μmol/L 的 Mn²⁺ 和 Zn²⁺ 也导入上述实验体系,结果发现在 300μmol/L 的 Mn²⁺ 存在时含有 9 个八肽重复序列的 PrP(PG9) 蛋白出现明显的 PK 抗性条带,而八肽重复区完全缺失的 PrP(PG0) 无任何 PK 抗性信号(图 8a)。这一结果与 Cu²⁺ 诱导产生的结果相似,但其诱导效应似低于 Cu²⁺。加入 Zn²⁺ 后,对 PrP(PG9) 和 PrP(PG0) 的 PK 抗性均未产生影响,两种 PrP 蛋白仍保持 PK 敏感状态(图 8b)。这些结果提示,Mn²⁺ 可通过与八肽重复区结合影响 PrP 对 PK 消化的敏感性,而 Zn²⁺ 无类似效应。

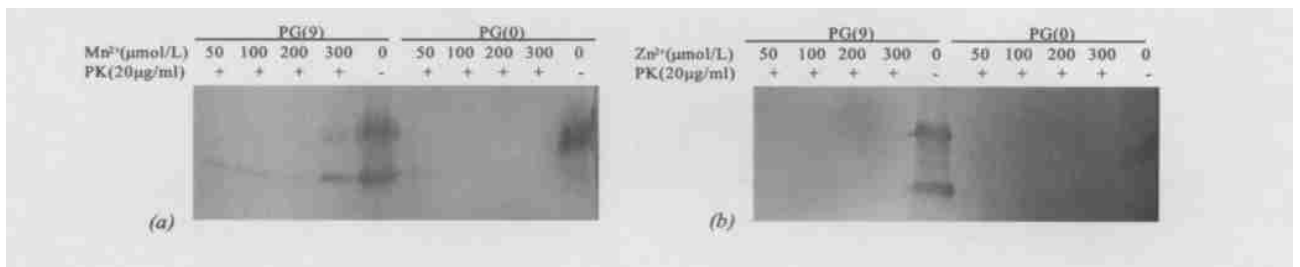


图 8 Mn²⁺、Zn²⁺ 等二价离子对 PrP(PG0) 和 PrP(PG9) 突变蛋白 PK 抗性的影响

Figure 8 The influences of Mn²⁺ and Zn²⁺ on PK resistance of mutant PrP proteins PrP(PG0) and PrP(PG9)

(a). Mn²⁺; (b). Zn²⁺. The PK concentrations used were 20μg/ml.

5 随八肽重复数增加,PrP(PGn) 同 GST-tau 融合蛋白的相互作用增加

为了观测八肽序列数量对 tau 蛋白结合能力的

影响,我们将纯化的含不同八肽重复数的 PrP(PGn) (n = 0、3、5、9),导入建立的 tau 蛋白包被的 ELISA 检测系统,以纯化的等摩尔浓度 GST 蛋白

作为阴性对照。结果显示, GST 蛋白无论在任何浓度下均不与 PrP(PGn) 蛋白发生可检测到的结合反应, 所测 OD 值在 0.1 以下(图 9)。如预期结果一样, 野生型 PrP(PG5) 呈现出明显的 tau 蛋白结合能力, 并具有明显的蛋白浓度依赖关系; 与 PrP(PG5) 蛋白结果相比, PrP(PG9) 蛋白与包被的 GST-tau 的结合作用明显增强, 在较高浓度时的 OD 值强度高于相同浓度的 PrP(PG5) 2 倍以上; 而 PrP(PG3) 与 GST-tau 的结合能力有所降低, 其产生的 OD 值约

为相同浓度的 PrP(PG5) 的 50% ~ 80% 左右; PrP(PG0) 在较低浓度时几乎同 tau 蛋白不发生结合作用, 在较高浓度时出现一定的结合效应, 但其 OD 值显著低于其它 PrP 蛋白(图 9)。这些结果提示, PrP 蛋白八肽重复序列的存在和数量直接影响 PrP 与 tau 蛋白的结合效应, 八肽重复数目越多, 其结合作用越明显。除了八肽区域外, PrP 蛋白其它区域似乎也具有次要的 tau 蛋白结合能力。

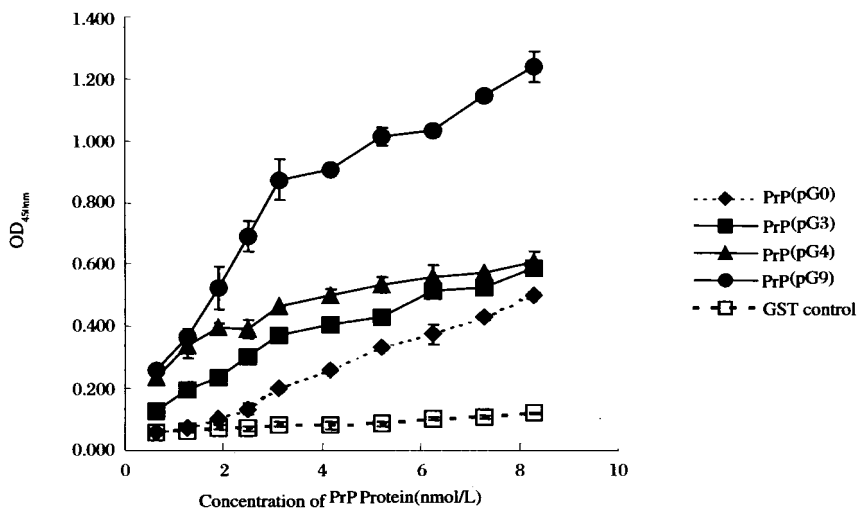


图 9 含不同八肽重复数的 PrP 蛋白与 GST-tau 融合蛋白相互作用的 ELISA 检测

Figure 9 ELISA assay of the interaction among the mutant PrPs containing different octapeptide repeats and the GST-tau protein

讨 论

先前几个研究已经显示, 铜的加入能够使来自转基因鼠和细胞表达的或者体外重组的野生型 PrP^[12-14], 或者转基因鼠表达的含 9 个额外八肽重复的 PrP(PG14)^[13], 其片层含量增加或诱导产生蛋白酶抗性和形成聚集^[13]。我们的研究证实, Cu²⁺ 能够使体外重组的人 PrP 蛋白的蛋白酶抗性增加, 八肽重复的扩展使其对 Cu²⁺ 的敏感性增强。含 4 个额外八肽重复的 PrP, 在 50 μmol/L Cu²⁺ 时就出现了蛋白酶抗性条带, 而野生型 PrP 在 200 μmol/L 的 Cu²⁺ 时才出现蛋白酶抗性条带。这与 Quaglio 等人^[13]发现的单个八肽重复就足以介导 Cu²⁺ 对 PrP 的蛋白酶抗性的结果是相一致的。

我们的实验结果对八肽重复区额外扩展的神经疾病的分子机制提供了一个可能的解释。因为铜是一种重要的氧化还原过渡金属, 是多种酶系统的关

键辅酶成分^[15]。Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 能够通过 Fenton 反应产生 ROS 分子^[16]。在氧化应激的条件下, Cu²⁺ 通过反应性氧物质(ROS)介导对蛋白的损伤有非常重要的生理或病理意义。当相关金属离子与蛋白结合时, 氧化还原反应能够在局部产生 ROS, 而 ROS 能够在蛋白本身的特异位点反应, 降低此蛋白质的活性或者导致其切割^[17]。八肽重复区的额外扩展增加了与 Cu²⁺ 的结合能力, 在临床上是一种致病性突变^[18]。我们的实验也显示了八肽重复的扩展, 使重组 PrP 对 Cu²⁺ 的敏感性同野生型相比有极大的增加。是否是这种对铜效应的改变使其在体内更容易被异常切割, 尤其是在氧化应激条件下, 从而损害了 PrP^C 的正常功能, 还需要进一步的实验去证实。

在我们实验中出现的片段 PrP 抗性蛋白能够被 3F4 抗体识别, 3F4 抗体的识别位点在仓鼠和人 PrP 的第 109 ~ 112 位氨基酸残基^[19], 因而提示了铜处理的 PrP 蛋白其切割位点发生在人 PrP 蛋白第 109 位氨基酸残基之前。这与 Quaglio 等人的结果

是一致的^[13],与 PrP^{Sc}的切割区相同^[20]。但这一切割位点与正常 PrP^C的中央疏水区(第 110~120 氨基酸残基)细胞内蛋白酶的分解位点明显不同,后者产生一个不能被 3F4 抗体所识别的 C 末端片段^[21]。这些切割位点差异的生理和病理意义仍不清楚。Cu²⁺处理的 PrP 其 PK 切割位点与 PrP^{Sc}的相似,提示我们设想,这些八肽重复区扩展的 PrP 在体内对 Cu²⁺和氧化应激的作用更为敏感,多余结合的 Cu²⁺能够使 PrP 蛋白在八肽重复区局部被异常切割,产生与 PrP^{Sc}相似的 N 端截短片段,并可能通过它们在体内发挥病理作用。

尽管一些过渡金属结合实验发现 PrP^C 高度选择性结合 Cu²⁺^[14],但有实验报道 PrP^C 也结合 Zn²⁺、Ni²⁺ 和 Mn²⁺^[22]。Pauly 等人发现,Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 均能够刺激细胞表面 PrP^C 的内吞^[23],并且这两种金属能够诱导 PrP^{Sc} 生化特征的改变^[24]。我们发现在本实验条件下,Zn²⁺ 没有增加含 9 个八肽重复的重组人 PrP 的 PK 抗性,这与 Zn²⁺ 仅能使 PrP^C 在去污剂的不溶性增加而没有使其具有蛋白酶抗性^[12,13]的结果相一致。提示铜和锌两种金属与 PrP 相互作用的亲和力、作用位点和生化影响可能有所不同。另外,在感染 scrapie 的小鼠和 CJD 患者脑中存在着 Mn²⁺ 和 Cu²⁺ 代谢的改变,Cu²⁺ 水平降低而 Mn²⁺ 的水平增加^[25]。提示了 Mn²⁺ 可能在 prion 疾病的发生中起着某些作用。我们初步的实验结果发现,Mn²⁺ 能够使体外重组的含 4 个额外重复的人 PrP 蛋白的 PK 抗性增强,而对八肽重复区完全缺失的 PrP 蛋白没有影响,在这一点上与 Cu²⁺ 的作用相似。仍需要大量的工作来证实 Mn²⁺ 使 PrP 蛋白酶抗性增加以及功能降低,与 prion 疾病发生上的关联和可能的分子机制。

另外,早在 1993 年,Duchen 等人发现有 9 个额外八肽重复的 prion 疾病其神经病理表现为 prion 疾病和 Alzheimer's 病之间的一种过渡形式,存在着含过度磷酸化 tau 和 淀粉样肽组成的神经炎性斑块和神经纤维缠结^[26]。我们的实验进一步显示八肽重复序列数量的增加促进了与 tau 这种微管相关蛋白的相互作用。是否额外增加的八肽重复与这一病理表现有关,还需要更多的证据来支持。

参考文献:

- [1] Prusiner S B. Prion [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13363 - 13383.
[2] WHO manual for surveillance of human transmissible spongiform

encephalopathies including variant Creutzfeldt-Jakob disease. P18 - 19[R]. World Health Organization Communicable Disease surveillance and Response[M]. Geneva, 2003.

- [3] Chiesa R, Drisaldi B, Quaglio E, et al. Accumulation of protease-resistant prion protein (PrP) and apoptosis of cerebellar granule cells in transgenic mice expressing a PrP insertional mutation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 5574 - 5579.
[4] Brown D R, Qin K F, Herms J W, et al. The cellular prion protein binds copper *in vivo* [J]. Nature, 1997, 390: 684 - 687.
[5] Vassallo N, Herms J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signaling at the synapse [J]. J Neurochem, 2003, 86: 538 - 544.
[6] Rieger R, Edenhofer F, Lasmezas C I, et al. The human 37-kD laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells [J]. Nat Med, 1997, 3: 1383 - 1388.
[7] Caughey B, Brown K, Raymond G J, et al. Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red [J]. J Virol, 1994, 68: 2135 - 2141.
[8] Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin M A, et al. Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein [J]. J Mol Biol, 2001, 314: 1209 - 1225.
[9] Kurschner C, Morgan J I. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1995, 30: 165 - 168.
[10] Han J, Zhang J, Yao H L, et al. Molecular interactions of recombinant neural protein Tau with recombinant and native PrP proteins *in vitro* [J]. J Biol Chem, 2004 (revised).
[11] Zhang F P, Zhang J, Zhou W, et al. Expression of PrPc as His fusion in a heterologous system and conversion of expressed PrPc into PrPSc in a cell free system [J]. Virus Res, 2002, 87, 145 - 153.
[12] Stockel J, Safar J, Wallace A C, et al. Prion protein selectively binds copper () ions [J]. Biochemistry, 1998, 37: 7185 - 7193.
[13] Quaglio E, Chiesa R, Harris D A. Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 11432 - 11438.
[14] Qin K, Yang D S, Yang Y, et al. Copper ()-induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP. Effect of protein age and deamidation [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 19121 - 19131.
[15] Lutsenko S, Petrukhin K, Cooper M J, et al. N-terminal domains of human copper-transporting adenosine triphosphatases (the Wilson's and Menkes disease proteins) bind copper selectively *in vivo* and *in vitro* with stoichiometry of one copper per metal-binding repeat [J]. J Biol Chem, 1997, 272: 18939 - 18944.
[16] Halliwell B, Gutteridge J M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview [J]. Methods Enzymol, 1990, 186: 1 - 85.
[17] Kim K, Rhee S G, Stadtman E R. Nonenzymatic cleavage of pro-

- teins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260: 15394 - 15397.
- [18] Owen F, Poulter M, Lofthouse R, et al. Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease [J]. *Lancet*, 1989, 1: 51 - 52.
- [19] Bolton D C, Seligman S J, Bablanian G, et al. Molecular location of a species-specific epitope on the hamster scrapie agent protein [J]. *J Virol*, 1991, 65: 3667 - 3675.
- [20] Jimenez-Huete A, Lievens P M, Vidal R, et al. Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153: 1561 - 1572.
- [21] Chen S G, Teplow D B, Parchi P, et al. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 19173 - 19180.
- [22] Brown D R, Hafiz F, Glasssmith L L, et al. Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance [J]. *EMBO J*, 2000, 19: 1180 - 1186.
- [23] Pauly P C, Harris D A. Copper stimulates endocytosis of the prion protein [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 33107 - 33110.
- [24] Wadsworth J D F, Hill A F, Joiner S, et al. Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions [J]. *Nature Cell Biol*, 1999, 1: 55 - 59.
- [25] Thackray A M, Knight R, Haswell S J, et al. Metal imbalance and compromised antioxidant function are early changes in prion disease [J]. *Biochem J*, 2002, 362: 253 - 258.
- [26] Duchen L W, Poulter M, Harding A E. Dementia associated with a 216 base pair insertion in the prion protein gene: clinical and neuropathological features [J]. *Brain*, 1993, 116: 555 - 567.

Influence of the Numbers of Octapeptide Repeats within N-terminus of Recombinant Human PrP Proteins on the Protease Resistance after Interacting with Metal Ions and the Binding Ability with Tau Protein

GAO Jian-mei¹, WAN Yan-zhen¹, HAN Jun¹, WANG Xiao-fan¹,
CHEN Lan^{1,2}, Nie Kai¹, ZHOU Wei¹, DONG Xiao-ping¹

(1. National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China;
2. Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract: About 10% - 15% human prion diseases are associated with inheritance, including familial CJD, GSS and FFI with insertion or deletion mutations within octapeptide repeats region of PrP gene (*PRNP*). To observe whether the number of octapeptide repeats in rHuPrPs had effects on the interactions of PrP with bivalent metal such as copper, magnesium, or GST-tau, we constructed *PRNP* mutants with different number of octapeptide repeats with PCR technique and various PrP proteins were expressed successfully in *E. coli*. The results demonstrated that all purified rHuPrPs with different octapeptide repeats were sensitive to PK digestion. However, after incubated with copper, the rHuPrPs acquired PK resistance. The number of octapeptide and the concentration of Cu^{2+} determined the acquisition and the intensity of PK resistance. In addition, PrP(Pr^{Sc}) also showed the similar PK resistance when incubated with various concentrations of Mn^{2+} but not Zn^{2+} as that induced by Cu^{2+} , but the intensity of induction by Mn^{2+} was slightly lower than that by Cu^{2+} . The tau-coated ELISA demonstrated that the recombinant PrP appeared significant ability of binding with GST-tau in a dose-dependent manner, moreover, it was associated with the number of octapeptide, the more the octapeptides the much stronger binding ability with GST-tau. These results suggested that the PK resistance of rHuPrPs induced by Cu^{2+} was mediated through octapeptide repeat domains and the intensity of the effect was related with the number of the repeats. Moreover, the efficiency of molecular interaction between PrP and tau relied on the existence and the number of octapeptide repeats. Besides the octapeptide repeat domain, other regions within PrP seems to be also responsible for binding with GST-tau protein.

Key words: recombinant human PrP; octapeptide repeat within N-terminus; biochemical characteristics

Corresponding author: Dong Xiaoping, E-mail: dongxp238@ina.com