



朊病毒蛋白 prion 的研究进展

林东海^{①②*}, 文祎^②

① 厦门大学化学化工学院化学生物学系 结构生物学实验室, 厦门 361005

② 中国科学院上海药物研究所 生物核磁共振实验室, 上海 201203

* 通讯作者, E-mail: dhlin@xmu.edu.cn

收稿日期: 2011-01-01; 接受日期: 2011-02-15

doi: 10.1360/032011-10

摘要 传染性海绵状脑病是一类致死性的神经系统退行性疾病, 其发病机制与朊病毒蛋白 prion 的异常构象有关. 迄今为止, prion 致病的构象变化机制依然是一个未解之谜. 国内外研究人员从不同切入点着手, 采用物理、化学、生物等多种学科的技术手段, 发现并积累了大量与 prion 构象转变相关的有价值的信息. 本文综述了近年来人们在 prion 蛋白的三维结构、动力学、去折叠以及相互作用等方面取得的研究进展, 并简要地介绍了本实验室在兔 prion 蛋白溶液结构和动力学方面的研究工作.

关键词

传染性海绵状脑病
朊病毒蛋白
构象转变

1 引言

传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathy, TSE)是一类致死性的神经系统退行性疾病. 在哺乳动物中常见疯牛病、羊瘙痒症、鹿慢性消耗病、猫海绵状脑病以及传染性水貂脑软化病等; 在人身上则发现了库鲁病、致死性家族失眠症、克雅氏病以及格斯特曼综合症等^[1]. 患病的人和动物, 大脑皮层的神经元细胞会发生进行性空泡化, 星形胶质细胞不断增生, 造成灰质变薄而白质相对明显, 最后变成海绵状态(图 1). 临床上表现出震颤、痴呆、共济失调, 并随病情加重逐渐丧失运动能力, 直至大脑功能衰竭而死亡. 人 TSE 病例中, 有大约 85% 属于散发性的, 另外 15% 则是因为基因突变或获得性感染^[2]. 该疾病潜伏期长, 目前尚无有效手段进行发病前的检测和诊断, 一旦感染, 死亡率 100%, 人们的健康和生活受到了严重的威胁.

美国神经生物学家 Prusiner^[3, 4]通过多年的研究, 找到了致病因子并将其命名为 prion, 他本人也因为在 prion 研究工作上的卓越贡献获得了 1997 年诺贝尔

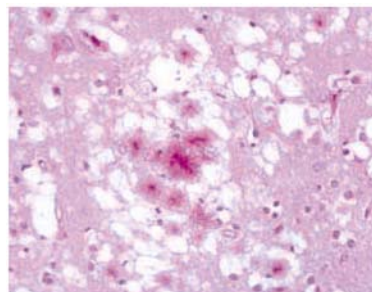


图 1 人克雅氏病组织病理切片(图片来自参考文献[1])

生理医学奖. 与细菌、真菌及病毒等病原体不同, prion 是一种不含核酸的蛋白质, 普遍存在于人和动物细胞内并由宿主自身基因编码. 正常的细胞型构象 PrP^{C} 没有致病性, 但在一定的条件下可以转化成瘙痒型 PrP^{Sc} 这种异常构象, 从而引起 TSE 的发生. PrP^{C} 和 PrP^{Sc} 虽然具有完全相同的一级序列, 但因构象上的差异导致生化性质显著不同: PrP^{C} 是可溶的单体, 以 α 螺旋为主, 易被蛋白水解酶 K 降解; PrP^{Sc} 高度不溶, β 折叠含量高, 极易形成抗蛋白酶 K 水解的多聚体.

细胞型 PrP^{C} 主要在中枢神经系统表达. 不同种

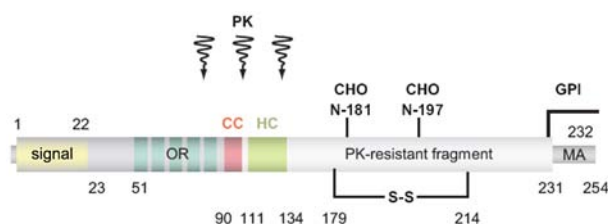


图2 prion 一级结构示意图(图片来自参考文献[6])

属的天然 PrP^C 肽链长度为 250~260 个氨基酸残基, N 端前 22 个残基与 C 末端约 23 个残基为信号肽序列, 跨膜时被剪切掉。成熟的 PrP^C 蛋白全长约 210 个氨基酸残基, 含有一对分子内二硫键和两个糖基化位点, 并通过 C 端的糖基化磷脂酰肌醇(GPI)锚定在细胞膜表面^[5, 6](图 2)。序列比对发现, 不同哺乳动物中 PrP^C 序列同源性达到 70% 以上。其中, 形成二硫键的 Cys 位点、糖基化位点以及由 108~126 位残基构成的跨膜疏水区序列最保守; 处于 60~90 位的八肽重复区也极为保守, 均为 P(Q/H)GGGWGQ, 只是重复拷贝数在不同物种之间略有差异^[7]。

由于 PrP^C 的错误折叠将导致 TSE, 因此, 关于 prion 的构象转变过程一直是国际上研究的重点和热点, 也是争议最多的研究领域之一。对于存在多年的“唯蛋白”假说, 肯定的声音和否定的质疑一直争锋相对^[8, 9]。迄今为止, prion 致病的构象转变机制依然是一个未解之谜。长期以来, 国内外研究人员从不同切入点着手, 采用物理、化学、生物等多种学科的技术手段, 发现并积累了大量有价值的信息。本文综述了近年来人们在 prion 蛋白构象转变和相关生物学功能等研究领域取得的主要进展, 并简要地介绍了本实验室在兔 prion 蛋白溶液结构和动力学方面的研究工作。

2 Prion 的三维结构

2.1 PrP^C 的溶液结构

Prion 的构象转变是引发 TSE 最关键的分子生物学事件, 所以, 对 prion 三维结构的研究是揭示 TSE 致病机制的一个可能的突破口。Wüthrich 小组利用液态 NMR 技术确定了第一个 prion 蛋白——小鼠 mPrP^C (121~231) 的溶液结构^[10](图 3)。其后 10 多年里, 人们相继解析了人、牛、猪、狗、猫、马、鹿、绵羊、田鼠、袋鼠、叙利亚大颊鼠等许多物种 PrP^C 的溶液结

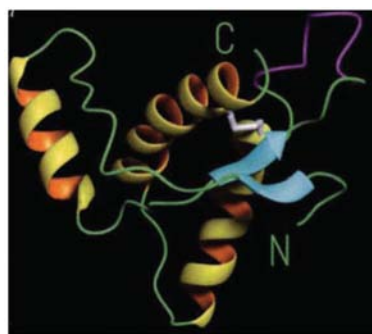


图3 小鼠 PrP^C (121~231) 的溶液结构(图片来自参考文献 [10])

构^[11~21]。结果表明, 所有 PrP^C 在溶液中都以单体形式存在, 不同种属 PrP^C 的三维结构非常相似(以人 hPrP^C 的氨基酸残基进行编号): N 端残基 23~120 呈无规卷曲状态, C 端残基 121~230 形成了一个折叠完好的球状结构域; C 端结构域包含三个特征的 α 螺旋(H1: 144~154, H2: 173~194, H3: 200~228)和一对反平行的 β 折叠片(S1: 128~131, S2: 161~164), 二硫键 C179~C214 连接并稳定两个 α 螺旋 H2 和 H3。

尽管不同的 PrP^C 整体骨架高度相似, 研究人员仍然发现了局部结构上的差异。差异最大的地方是连接第二个 β 折叠片和第二个 α 螺旋之间的无规卷曲片段 165~172, 常被称作 $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop。相对而言, 这段氨基酸序列在不同哺乳动物中的变化最大, 反映了种属的差异性。小鼠、人、牛、狗、猫、绵羊等 PrP^C 的 $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 中某些氨基酸残基由于构象化学交换现象引起谱峰显著展宽, 在 NMR 谱中观测不到相应的共振信号而无法指认^[10, 14, 15, 18]。因此, 这些种属的 $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 在溶液中表现出较大的无序度。相反, 猪、马、鹿、田鼠、袋鼠等 PrP^C 的 $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop, 由于与第三个 α 螺旋末端残基存在着远程 NOE 相互作用, 在溶液中相对有序, 其 NMR 信号也得到了很好地归属^[17~21](图 4)。将人 hPrP^C 170 位点的 Ser 突变成 Asn^[22], 或者将小鼠 mPrP^C 的 V166 换成 Ala^[20], 原本没有 NMR 共振信号的 $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 也可凭长程 NOE 得到完全归属。因此, $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 与第三个 α 螺旋末端的相互作用, 可能决定着 $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 在溶液中的无序度或柔性。值得一提的是, $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 与第三个 α 螺旋末端位于 PrP^C 的溶剂可及表面, 对外界环境变化敏感, 而且还可能包含转化因子 X 蛋白的识别位点^[22~24]。 $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 在溶液中的无序度或柔性可能直接影响着 PrP^C 蛋白与 X 蛋白或别的分子伴侣的相互作用, 进

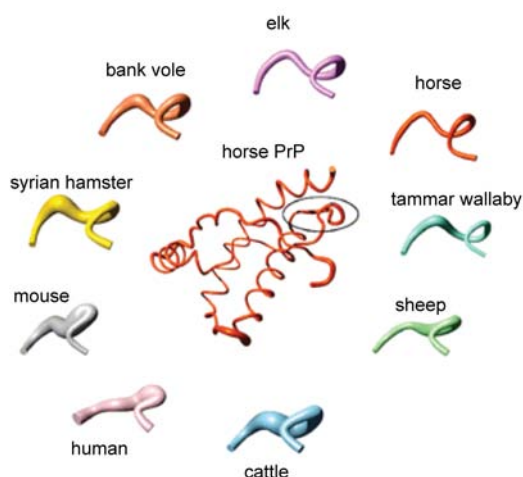


图 4 不同种属 PrP^{C} 的 $\beta 2\text{-}\alpha 2$ loop(参考文献[21]提供给 JMB 的封面图)

而影响到构象转变过程. 从这个意义上讲, $\beta 2\text{-}\alpha 2$ loop 与第三个 α 螺旋之间的长程分子内相互作用, 可能调控着 PrP^{C} 生物学功能的特异性.

从疾病易感性的角度分析, 绝大多数 $\beta 2\text{-}\alpha 2$ loop 共振信号不能得到很好指认的种属, 包括小鼠、人、牛、猫、绵羊, 都会感染 TSE; 但狗却例外, 迄今为止尚无狗感染 TSE 的报道. 猪、马、袋鼠等 PrP^{C} 的 $\beta 2\text{-}\alpha 2$ loop 共振信号可以完全归属, 这些物种对 TSE 表现出很强的抵抗性; 不过, 同样具有有序 $\beta 2\text{-}\alpha 2$ loop 的鹿和田鼠却对疾病无耐受能力. 因此, 单从 $\beta 2\text{-}\alpha 2$ loop 的无序度来关联不同物种对疾病的易感性还不足以阐明 TSE 的致病机制. 通过将马和袋鼠的 PrP^{C} , 与鹿和田鼠的 PrP^{C} 进行仔细的结构比较, 发现后两个种属 PrP^{C} 的 170 位点由于受第三个 α 螺旋空间位置的影响, 更易接近蛋白质表面, 暗示残基 N170 的侧链极可能对鹿和田鼠感染 TSE 起着决定性的作用^[21]. 对人 hPrP^{C} 的多个突变体的三维结构进行比较, 发现 Y169 在不同突变体中或包埋在内部, 或直接朝外伸向溶剂^[25]. 绵羊抗病型 ARR 和易病型 ARQ 突变体中, 同样位点 R167 的取向明显不同^[26]. 由此推测, 除了 $\beta 2\text{-}\alpha 2$ loop 的无序状态或柔性外, 其他氨基酸残基的溶剂可及性或者疏水相互作用, 也对 prion 的构象变化有贡献. Sigurdson 等人在转基因小鼠中接种了 5 个种属的 PrP^{C} , 包含了有序或无序的 $\beta 2\text{-}\alpha 2$ loop. 实验发现, 如果接种源和宿主 PrP^{C} 的 170 位点残基相同, 即同为 Ser 或 Asn, 则有较高的感染效率和很低的种属屏障作用, 提示 170 位点可能扮

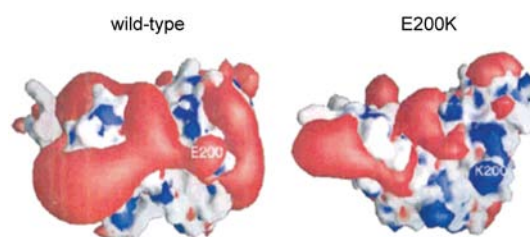


图 5 人 PrP^{C} 野生型与家族性 CJD 突变体的表面静电势分布比较(图片来自参考文献[29])

演了分子开关的角色^[27]. 分子动力学模拟也表明, S170 可以影响 $\beta 2\text{-}\alpha 2$ loop 的构象多样性^[28]. 尽管 $\beta 2\text{-}\alpha 2$ loop 参与调控 prion 构象转变的分子机制仍然不清楚, 但是大量实验结果都提示它与 TSE 的发生密切相关.

Prion 蛋白的溶液结构研究同时指出了另一个可能影响 prion 构象变化的因素, 那就是蛋白质分子的表面静电势分布. 人 hPrP^{C} 的 E200K 突变是导致克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD)最常见的一种内源性变异. hPrP^{C} (E200K)突变体的三维结构与野生型几乎一样. 但是, 其静电势分布却表现出显著的差异, 一个位点的突变打断了野生型蛋白中的连续正电势表面^[29](图 5). 狗 cPrP^{C} 的 177 位点呈现独特的正电势, 不同于猫和绵羊等 PrP^{C} 同样位点的负电势^[18], 这或许是狗不感染 TSE 的一个原因. 173 位点是转化因子 X 蛋白的识别位点之一, 牛 bPrP^{C} 在该位置处的残基是带负电荷的 Asn, 而猪 scPrP^{C} 则是电中性的 Ser^[18]. 如果只考察 $\beta 2\text{-}\alpha 2$ loop 和第三个 α 螺旋 C 末端位于蛋白质表面的残基网络, 小鼠、人、绵羊 PrP^{C} 的静电势总和分别为 -1、-3 和 0^[30]. 此外, 绵羊 ovPrP^{C} (R168)突变体对 TSE 高度耐受, ovPrP^{C} (Q168)则高度易感, 而 ovPrP^{C} (H168)介于两者之间; 168 位点暴露在溶剂环境中, 其静电势对 $\beta 2\text{-}\alpha 2$ loop 等区域有着决定性的影响^[18]. 表面静电势分布本身不太可能直接引起 prion 自发进行构象转变, 但是却可能显著地影响 PrP^{C} 与其他分子伴侣、配体底物等专一性的识别和结合. 与转化因子或抑制因子作用时, 不同的表面电势分布有可能导致 PrP^{C} 经历根本不同的生物学过程.

2.2 PrP^{C} 的晶体结构

Knaus 等人报道了人 hPrP^{C} 的 C 端结构域 119~226 的晶体结构^[31](图 6). 与溶液结构相比最大

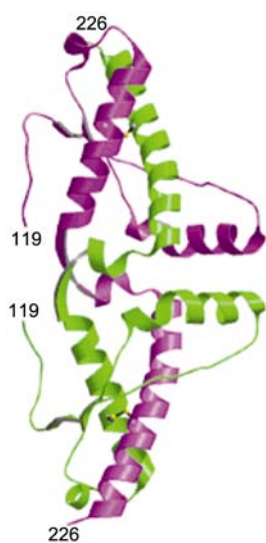


图6 人 PrP^C 的晶体结构(图片来自参考文献[31])

的区别在于, 人 hPrP^C 晶体结构以二体形式存在: 第一个 α 螺旋(S143-Y157)构成了二体相互作用的界面; 其中一条多肽链的第二个 α 螺旋(N171-T188), 与另一条多肽链的第三个 α 螺旋(T199-Y225)形成了一对分子间二硫键; 两条多肽链的第三个 α 螺旋发生了交换(swapping), 互相插入对方结构区而形成新的结构域。此外, 在溶液结构中连接第二、三两个 α 螺旋的无规卷曲片段, 在晶体结构中变成了一段 β 折叠片和一个短的 α 螺旋; 溶液中无序的片段 G119-G124 也因与第二个 α 螺旋的堆积作用, 结构变得稳定。人 hPrP^C 晶体结构提示了 prion 构象转变起因的另一条线索: 二硫键的还原和重构, 导致结构域发生交换, 由此引发肽链错误折叠。Taboret 等人指出, 二硫键在 PrP^C 中可处于低能态的稳定 LHS 构型, 也可处于高能态的 RHH 构型; 两种构型下蛋白质的溶剂可及表面大不一样, 可能与 prion 的聚集状态有关^[32]。

随后, 易致病的 ARQ 型绵羊 ovPrP^C(123~230)蛋白的晶体结构也得到了解析^[33]。该晶体结构显示, ovPrP^C 以单体形式存在, 与溶液中的状态一致。通过对 ovPrP^C 晶体结构的分析, Haire 等人指出有两簇潜在的 β 折叠多聚化起始区域。其中之一位于反平行 β 折叠片(129~131和161~163)处。两个分子相应的 β 折叠片可以形成一个四层的折叠。这样构成的二聚体分子, 接触面相对比较柔性且具有较大的极性。最重要的接触位点是 M129, 人类新型变种克-雅氏病, 与该位点直接相关。第二个重要的区域处于位点 188~201, 分子模拟显示这段无规卷曲片段中的某些残基

可以转变为 β 折叠。事实上, 这种情况在人 hPrP^C 晶体结构中已经出现。新形成的 β 折叠片可以作为另一个二聚体相互作用的界面。这样, ovPrP^C 可以形成一个四聚体(图 7), 进一步进行构象转变。显然, 多聚体状态极大地增加了 PrP^C 构象错误变化的可能性。

2.3 PrP^{Sc} 的结构

人们对 PrP^C 三维结构的理解日益加深, 但对 PrP^{Sc} 的三维结构的认识却进展缓慢。由于 PrP^{Sc} 不可溶, 使 X 射线晶体衍射和液态 NMR 这两种最主要的结构测定技术变得无能为力。Prusiner 研究小组利用冷冻电镜对 PrP^{Sc} 的三维结构进行了探索性的研究, 获得了分辨率为 7 Å 的结构数据; 将已知的蛋白质折叠模式和实验获得的约束条件相结合, 重构出包含平行 β 螺旋折叠形式的最合理的结构模型^[34]。进一步的研究提示: PrP^{Sc} 以三聚体形式存在, 残基 89~175 形成左手 β 螺旋的构象, 在 PrP^C 中由二硫键相连的第二、三两个 α 螺旋依然保持了原来的构象(图 8); 而多个三聚体 PrP^{Sc} 通过氢键等作用堆积在一起,

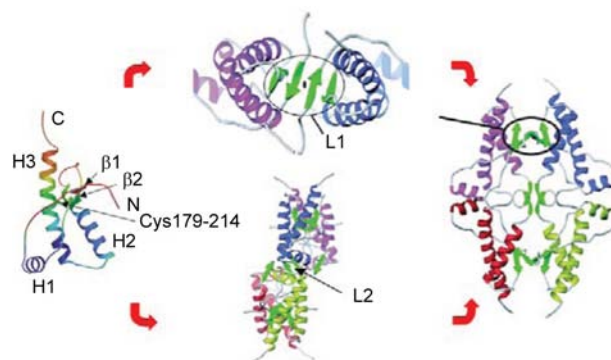


图7 绵羊 PrP^C 的晶体结构及其四聚化(图片根据参考文献[33]得到)

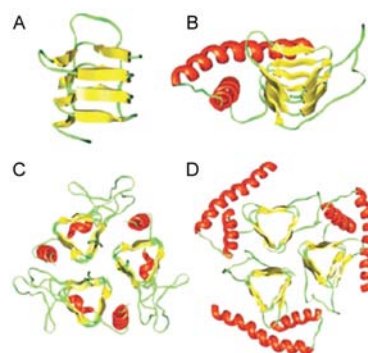


图8 PrP^{Sc} 的电镜三维结构重构(图片来自参考文献[35])

可以导致纤维的形成^[35].

Surewicz 研究小组利用 H-D 交换手段, 对人 hPrP^C (91~231) 淀粉样纤维束的 β 片层核心区进行了分析, 指出纤维核心区从残基 169 一直延伸到 221 位点^[36]. 也就是说, 原来 PrP^C 中的第二个 α 螺旋、第三个 α 螺旋 N 端大部分区域以及两个螺旋间的无规卷曲片段, 都可能经历转变为 β 片层的构象变化过程. 随后, 该小组通过定点自旋标记和顺磁共振技术, 揭示人 hPrP(91~231) 淀粉样纤维的残基 160~220 形成了单分子 β 片层; 多个单分子层平行排列进而构成更长的纤维^[37] (图 9). 这个结构模型与 Prusiner 小组提出的模型存在显著的差异, 尤其在 C 末端是否还保留着两个 α 螺旋的问题上, 两者的观点截然相反.

最近几年, 有的研究小组尝试采用固体 NMR 技术对类似 PrP^{Sc} 的淀粉状纤维丝的结构特征进行研究. 由于技术难度较大, 目前还只能对小肽段形成的短纤维丝做一些初步的探究. 尽管如此, 关于 P101L 突变体小鼠 mPrP(89~143) 片段^[38, 39]、酵母 prion 蛋白 Sup35p 的 GNNQQNY 片段^[40]、叙利亚大颊鼠 ShPrP (109~122) 片段形成的纤维丝^[41]以及鹅柄孢壳菌 (*fungus podospira anserina*) prion 蛋白 HET-s 淀粉样构象^[42]等研究工作, 仍然为人们提供了许多新的线索和思路. 期望在不远的将来, 固体 NMR 技术可以发挥更大的作用, 可以解析 PrP^{Sc} 的三维结构.

3 Prion 的动力学

3.1 基于 NMR 的动力学

Dyson 小组曾经利用异核稳态 NOE 技术, 对叙利亚大颊鼠全长 ShPrP^C (23~231) 蛋白以及截短型 ShPrP^C (90~231) 蛋白的主链动力学进行了初探, 发现以 G124 位点为分界线, N 端残基 NOE 全为负值,

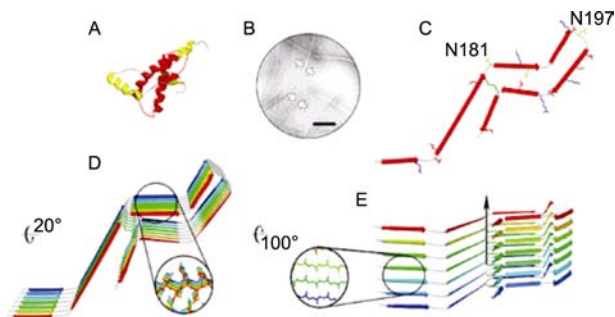


图 9 PrP^{Sc} 形成纤维的模型 (图片来自参考文献[37])

而 C 端 NOE 全是正值^[11]. 随后, James 和 Wüthrich 两个小组利用自旋弛豫实验研究 ShPrP^C (90~231) 和牛 bPrP^C (23~231) 动力学, 也获得了类似的结果^[13, 14], 表明 PrP^C 的 N 端是高度无序的无规卷曲片段, NOE 为正值, C 端才是结构域. 这一时期关于 PrP^C 的动力学研究主要为了辅助三维结构解析, 还没有真正深入到阐述蛋白质分子内运动的层面.

Wright 小组利用约化谱密度函数映射的方法, 对叙利亚大颊鼠 ShPrP^C 各个氨基酸残基的内运动特性进行了分析^[43]. 结果显示, β 折叠片表现出 μ s-ms 时间尺度的慢构象化学交换现象, 第二、三两个 α 螺旋比第一个 α 螺旋更刚性 (图 10(a)), 暗示 C 末端两个 α 螺旋在 PrP^C 错误折叠过程中可能不发生构象转变. 该小组还尝试通过 Modelfree 方法进行分析, 但终因目标蛋白 N 端较长的无规卷曲严重影响弛豫过程而没能成功. 另一方面, James 小组借助 CPMG 弛豫扩散实验等手段研究 ShPrP^C 的慢构象交换运动特性, 指出具有 μ s-ms 慢运动的残基主要位于第二、三两个 α 螺旋上 (图 10(b)), 提示这两个 α 螺旋在一定条件下极有可能发生了构象转变, 引起中间态 PrP^{*} 的增加, 进一步加剧向致病型 PrP^{Sc} 的发展^[44]. 显然, 目前这两个研究小组尚未获得完全一致的研究结果.

Viles 小组将小鼠 mPrP^C 的 N 端无规卷曲片段截短, 构建了 mPrP^C (113~231) 重组子, 发现截短型 mPrP^C 的 N 端无序片段对弛豫的影响明显减弱; 研究人员借助约化谱密度函数成功得到了各个氨基酸残基近似的广义序参数 S^2 , 结果显示 3 个 α 螺旋的刚性非常相似. 动力学分析还表明, mPrP^C 中具有慢构象交换运动的残基, 主要位于 β 2- α 2 loop 和第三个 α 螺旋末端^[45]. Bae 等人对野生型小鼠 mPrP^C、两个致

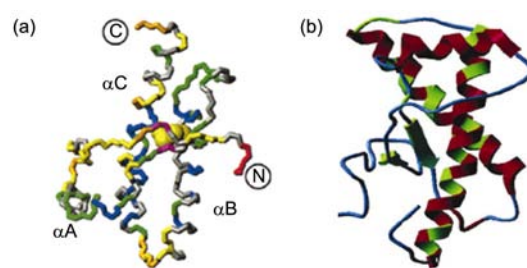


图 10 叙利亚大颊鼠 ShPrP^C 的 NMR 动力学分析. (a) ShPrP^C 各氨基酸残基的 $J(0)$ 值. 红: $J(0) < 2$, 橙: $2 < J(0) < 3.5$, 黄: $3.5 < J(0) < 4.5$, 绿: $4.5 < J(0) < 5.5$, 蓝: $J(0) > 5.5$, 紫: G131 和 V161 存在构象交换. (b) ShPrP^C 各氨基酸残基的 τ_{ex} 值. 绿: $\tau_{ex} > 0.01$ s 的氨基酸残基. (图片根据参考文献[43]、[44]得到)

病型突变体(P101L 和 H186R)以及两个抗病型突变体(Q167R 和 Q218K)采用了分段进行 Modelfree 拟合的策略, 首次成功将 Modelfree 方法用于 prion 蛋白的动力学分析. 结果表明, 致病突变和保护突变对 prion 蛋白的动力学行为没有造成显著的差异, 而连接第二、三两个 α 螺旋之间的无规卷曲片段可能作为起始位点触发 PrP^C 的错误折叠^[46].

3.2 分子动力学模拟

在 PrP^C 转变成 PrP^{Sc} 的过程中, C 末端的两个 α 螺旋究竟有没有发生结构变化? 为此, 多个实验室进行了分子动力学模拟分析. Demacro 等人^[47]的模拟模型表明, PrP^{Sc} 的 β 结构核心包括一个由残基 116~119、119~132 和 160~164 构成的三层折叠片, 以及一个独立的片层(残基 135~140); 其他 3 个天然状态下的 α 螺旋完整保留着. 与此相反, Dima 等人^[48]动力学模拟的结果则表明 C 末端的两个 α 螺旋最有可能转变成 β 结构.

有的研究小组试图从第一个 α 螺旋上寻找答案, 指出中性 pH 环境下该螺旋的大部分残基都带电荷, 并基于动力学模拟结果指出该螺旋的稳定性由静电作用主导^[49]. 此外, 第一个 α 螺旋缺乏长程作用, 且含有大量溶剂可及的氢键^[50]. 这些结果提示第一个 α 螺旋相对于其他两个 α 螺旋亲水性更高, 稳定性更低, 容易转变成 β 结构. 然而, Schwarzsinger 和 Derreumaux 两个研究小组进行的动力学模拟分析, 却发现: 第一个 α 螺旋对外界环境的扰动表现得非常稳定, 不太可能早于其他 α 螺旋发生构象变化^[51, 52]. 显然, 目前这几个实验室进行的分子动力学模拟工作尚未获得完全一致的研究结果.

4 Prion 的去折叠研究

4.1 PrP^C 的结构稳定性

目前已知的所有人类遗传性 TSE, 都与人 hPrP^C 的突变有关^[1, 53]. 其中, 有 8 个突变位点位于 C 端的球状结构域内. 人们猜测, 突变导致 hPrP^C 的结构稳定性下降, 从而更容易发生错误折叠. 由于人 hPrP^C 和小鼠 mPrP^C 的 C 端结构域序列一致性高达 94%, 更重要的是这 8 个突变位点完全一致, 于是, Liemann 等人^[54]用 mPrP^C 代替 hPrP^C, 利用 CD 考察野生型和多种致病突变体蛋白的热稳定性. 研究表明, 相对于

野生型蛋白而言, 并非所有致病突变体都变得不稳定. 类似的结果也被 Swietnicki 等人^[55]观察到. Kirby 等人^[56]从 PrP^C 164 位点的基因多态性入手, 研究蛋白质的稳定性与疾病易感性的关系. 结果显示, 不同基因编码产物的热稳定性与蛋白质构象转化的难易呈现出负相关性. 然而, Ribinson 等人^[26]却发现, 抗病型突变体 mPrP^C(Q167R)的热稳定性, 与野生型相比反而下降了不少.

Surewicz 小组^[57]对人 hPrP^C(90~231)在不同 pH 值下加入盐酸胍变性剂, 发现 hPrP^C 的构象特征和折叠路径有着很强的 pH 依赖性. Calzolari 等人^[58]考察了 pH 对 hPrP^C 球状结构域的影响, 结果表明, hPrP^C (121~230)的 NMR 结构在 pH 7.0 和 4.5 时高度相似, 但是在 pH 7.0 条件下其热稳定性明显高于后者. Zou 等人^[59]的研究工作表明, 在酸性 pH 条件下加去垢剂, 很容易使 hPrP^C 转化成类似 PrP^{Sc} 的形式.

4.2 中间态

从 PrP^C 到 PrP^{Sc} 的构象转变过程中, 可能存在一种比较罕见的部分折叠的中间体 PrP^{*}. PrP^{*}产生的难易程度及其稳定性, 直接关系到 PrP^{Sc} 的生成效率. 人们在对人 hPrP^C 和小鼠 mPrP^C 的脲变性研究中, 发现在中性 pH 条件下, 变性过程只出现天然态和去折叠态两种形式; 在酸性 pH 条件下, PrP^C 除了前两种形式外, 还出现了第三种状态即中间态, 这种状态在 CD 谱上显示以 β 折叠为主^[60]. 由于 prion 的构象转变很可能发生在溶酶体等偏酸性的生理环境中, 所以微酸条件下利用变性剂诱导产生中间态或许可以模拟生理条件下的构象转变过程. 不同研究小组借助 CD、荧光光谱等多种手段, 获得了许多在 prion 折叠过程中存在中间态的证据^[61, 62].

Martins 等人^[63]发现 prion 的折叠中间态可以被高压和低温所稳定. Viles 小组^[64]利用 NMR 分析了 pH 4.0 条件下小鼠 mPrP^C 的 β 中间态的性质, 指出原来 N 端的无规卷曲片段在中间态依然表现出高度的柔性, 并没有形成更多的二级结构. 最近, Khan 等人^[65]在 CD 分析中引入双波长法, 对叙利亚大颊鼠、小鼠、兔、马和狗 5 个种属 PrP^C 形成 β 中间态的难易程度进行了考察. 结果发现, ShPrP^C 最容易形成中间态, 其次是 mPrP^C, 然后才是其他 3 个种属的 PrP^C(图 11). 值得注意的是, 在这 5 个种属中, 叙利亚大颊鼠最容易感染 TSE, 而兔、马和狗这 3 个物种目前被认为能抵抗

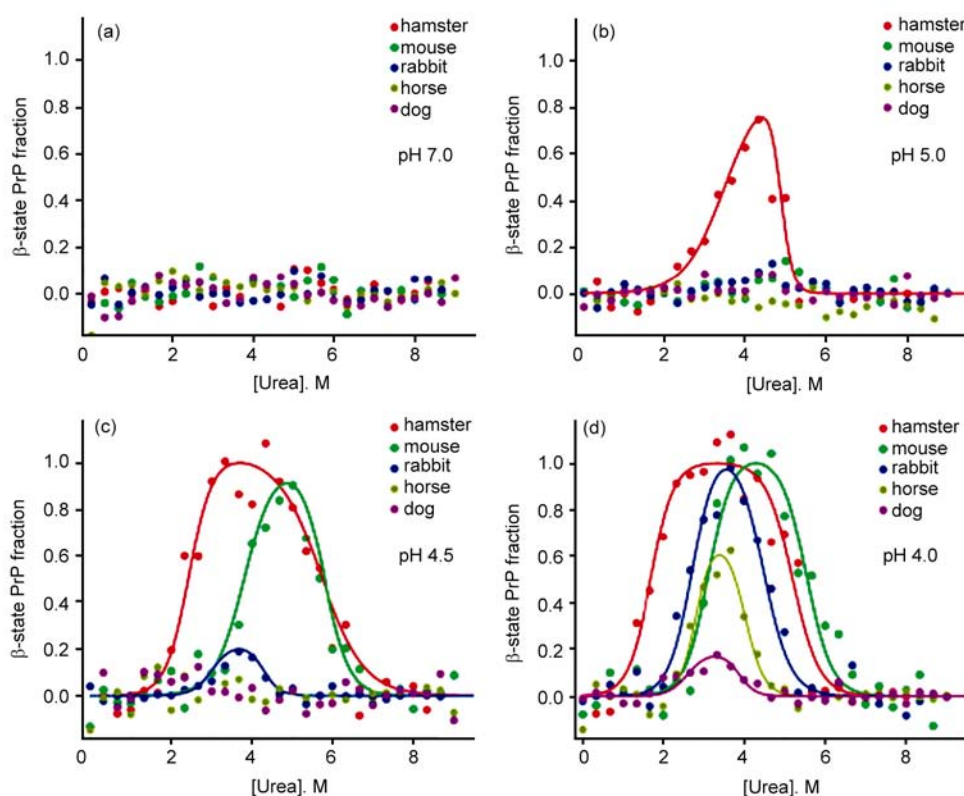


图 11 不同种属 PrP^C 形成 β 中间态的难易程度(图片来自参考文献[65])

TSE, 小鼠则介于两种情况之间. 这样, 不同种属 PrP^C 形成 β 中间态的难易程度与疾病易感性很好地关联起来, 为人们深入理解 prion 的致病机制提供了非常有价值的线索.

5 Prion 的相互作用研究

5.1 与 X 蛋白的相互作用

Telling 等人在转基因小鼠中表达了人及嵌合体 PrP^C, 它们对致病因子不同的感染效率, 提示 PrP^C 可能通过靠近 C 末端的残基与一种未知蛋白 X 发生了相互作用, X 蛋白可能扮演了分子伴侣的角色^[23]. Kaneko 等人^[24]提供了新的证据, 表明在 PrP^{Sc} 的增殖过程中, 需要 X 蛋白结合到 PrP^C 的一个不连续表位, 包括残基 167、171、214 和 218 四个位点, 否则 PrP^{Sc} 的转化将受到抑制.

由于 X 蛋白可以通过与 PrP^C 的结合来调控 prion 的构象转化, 所以许多实验室都在努力寻找 X 蛋白. 目前, 已经发现许多能与 PrP^C 发生相互作用的蛋白质,

比如小鼠 STLi^[66, 67]、Synapsin、Grb 2、Pint 1^[68]、人 37/67kD LRP^[69, 70]、 α B-crystalline^[71]和 tetraspanin-7^[72]等. 这些潜在的 X 蛋白是否真正具有转化因子的特性, 还需要更多的实验数据支持. 值得一提的是, 在体内广泛存在的热休克蛋白家族中, Hsp104 和 Hsp70 似乎都能与 PrP^C 发生相互作用, 然而, 前者引起 prion 向抗蛋白酶 K 水解的状态转化, 后者则对类似 PrP^{Sc} 形式的聚集有抑制作用^[73, 74]. Prion 构象转变过程中或许存在着一种平衡调控或反馈机制.

5.2 与 A β 的相互作用

TSE 和阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是两种破坏性的功能失调性脑病, 前者致病因子是错误折叠的 PrP^{Sc}, 后者则由 A β 的聚集引起. 这两种疾病的发生都涉及了蛋白质的构象变化, 提示分子水平上可能经历了相同的信号通路或类似的生物学事件.

Strittmatter 小组^[75]将 A β 注射入小鼠体内, 检测大脑记忆恢复过程中的电生理变化. 但是, 当使用 PrP^C 缺陷的小鼠时, 电生理指标没有任何改变(图 12(a)), 暗示 PrP^C 介导了 A β 引起的突触塑性的损伤.

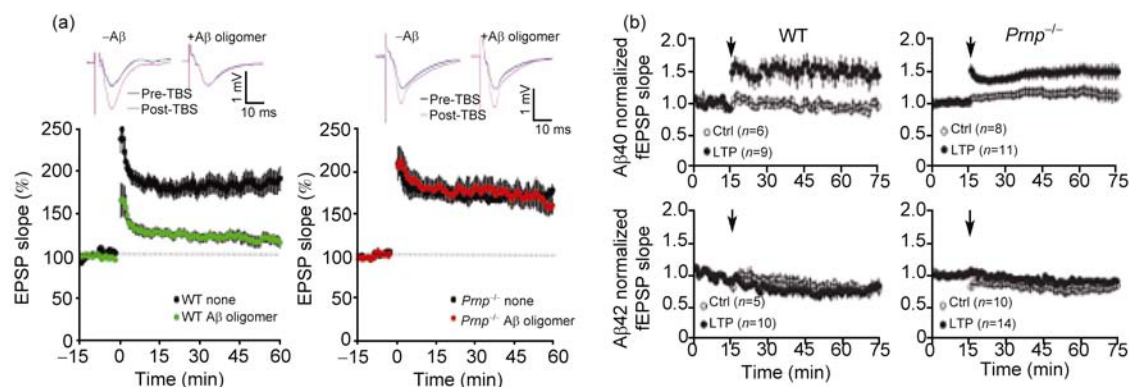


图 12 PrP^C 是 Aβ 的受体? Aβ 对海马 LTP 的抑制: (a) 需要 PrP^C 的参与; (b) 不需要 PrP^C 的参与(图片根据参考文献[75]、[78] 得到)

体内实验表明 PrP^C 和 Aβ 共定位, 体外实验证明 PrP^C 可以通过片段 95~110 很容易地结合到 Aβ 上. 结合多项实验结果, 他们推断 PrP^C 可能作为一个受体引发了一系列连锁反应, 最终导致神经元的损毁. 由于此前针对靶标 Aβ 直接进行治疗的策略和尝试全部宣告失败, 因此该项研究工作让人们看到了通过阻断 PrP^C 通路来抑制 AD 发生的可能性. 然而, 随后的一系列实验工作却使得这一研究思路变得不那么光明了. Forloni 小组^[76]研究发现, 即使不存在 PrP^C, 注射了 Aβ 的小鼠仍然会遭受大脑记忆损伤. Aguzzi 小组^[77]在能产生大量 Aβ 的基因工程小鼠中, 观察到了与 Forloni 小组一致的现象. Malinow 等人^[78]尝试重复 Strittmatter 小组的实验, 但最终只得到了阴性结果(图 12(b)). 虽然 Strittmatter 小组^[79]在最新的工作中报道了 PrP^C 的缺失可以缓解 Aβ 过量积累小鼠的记忆损害, 支持了自己之前的研究结果; 然而, 由于实验数据出自同一实验室, 可能带有一定的倾向性, 缺乏足够强的说服力. 就在 Strittmatter 小组的研究结果疑云密布之时, Rowan 小组最近在欧洲神经科学的一次会议上, 报告了用抗体阻断 PrP^C 可以降低 Aβ 对与大脑记忆相关的电生理改变的影响, 支持了 Strittmatter 小组的结论. Bitel 等人^[80]发现在糖尿病兔子模型中, PrP^C 和 Aβ 等与神经退行性疾病有关的蛋白质出现聚集并共定位, 从另一个侧面说明 PrP^C 和 Aβ 存在着相互作用的可能性. PrP^C 和 Aβ 在疾病发生过程中究竟有无关联, 现在下结论恐怕还为时过早.

5.3 与核酸的相互作用

“唯蛋白”假说认为, 致病的瘙痒因子是一种不含核酸的蛋白质, 在一定条件下可以进行自我复制. 然而, 从 PrP^C 转变成 PrP^{Sc} 的这一过程, 受到许多因素的调控. 在众多潜在的调控因子当中, 人们并没有充足的理由将核酸排除在外. 蛋白质与核酸的结合, 有特异性和非特异性之分; 结合能力的强弱, 取决于多种相互作用, 包括: 静电相互作用、范德华力、疏水作用和氢键, 等等. 而温度、盐浓度及 pH 等外部环境, 也可以影响结合能力. 不同的蛋白-核酸结合模式, 可能导致下游通路截然不同的历程.

Deleault 等人^[81]在被感染的脑组织匀浆中加入各种限制性酶, 发现凡是经 RNA 酶或者能够作用于单链的酶处理后, 将不能新扩增出可以抵抗蛋白酶 K 水解的 prion 即 PrP^{res}; 同时, 能否扩增出 PrP^{res} 还取决于 RNA 来源的种属. 该研究表明, 特异性的 RNA 分子可以促进 prion 的转化. 马继延研究小组^[82]用大肠杆菌表达的 PrP^C 为模板, 成功扩增出了具有感染性的 PrP^{Sc}, 首次从实验上证实了“唯蛋白”假说; 他们在转化孵育体系中加入了总 RNA 作为促进因子. Silva 小组^[83]发现 PrP^C 对序列特异性的 DNA 具有很高的亲和力; DNA 一方面可以将 PrP^C 转化成可溶的β 折叠构象, 另一方面又可以抑制 prion 大量的聚集. 他们认为作为宿主的核酸起到了平衡 prion 不同构象比例的作用. 随后, 该研究小组利用小角衍射和 NMR 方法, 证明 DNA 主要结合在 PrP^C 的 C 端球状结构域, 无规卷曲片段 90~121 则对此结合起着辅助

作用^[84]. Tjong 等人^[85]开发了 DISPLAR 算法, 预测出一致的结合位点.

6 兔 prion 蛋白研究

6.1 研究背景

兔子是极少数能抵抗 TSE 感染的哺乳动物之一. 从小鼠、绵羊等体内分离得到的致病因子接种兔子, 兔子没有表现出任何 TSE 的临床特征^[86]. 一种可能的解释是, 兔子的细胞环境中可能缺乏某种转化因子, 或者额外表达了一些抑制因子, 从而可以防止具有神经毒性的异构体生成. 然而, 将绵羊、小鼠以及田鼠的重组 PrP^C在兔子 RK13 上皮细胞中表达, 并用各物种自身的致病型 prion 进行感染, 3 种 PrP^C全部转化成了 PrP^{Sc}, 说明兔子细胞含有 prion 转变所需的各种因子^[87, 88]. 而兔 RaPrP^C以及兔-鼠 PrP^C嵌合体, 在富集 PrP^{Sc}的小鼠成神经细胞瘤(Sc⁺-MNB)细胞中却并不转变成抗蛋白酶 K 水解的异构体^[89]. Fernandez-Funez 等人^[90]首次在不含内源性 prion 的转基因果蝇中表达了叙利亚大颊鼠、小鼠及兔子 PrP^C的全长肽段, 消除了各物种的背景差异. 研究结果表明, 兔 RaPrP^C没有转化成致病构象, 不能诱导出神经毒性; 叙利亚大颊鼠 ShPrP^C转变成了 PrP^{Sc}型, 诱导了果蝇早期的运动失调以及头部海绵状病变; 小鼠 mPrP^C则介于两者间, 即可以发生构象变化并引起果蝇运动失调, 但不导致海绵状退化. Nisbet 等人^[91]利用计算机软件预测出 RaPrP^C的 ω 位点比 mPrP^C提前了大约 10 个氨基酸残基, 但随后的实验结果却表明, 两个物种的 PrP^C不仅 ω 位点一致, 而且 GPI 锚定形式和细胞定位等都极其相似. 此外, 序列比对发现, 兔 RaPrP^C和小鼠 mPrP^C在一级序列上有 22 个氨基酸残基不同. 把 mPrP^C中的多个氨基酸残基突变成 RaPrP^C对应位点的残基, 得到的一系列 mPrP^C的单点突变体, 均不再发生构象转变^[89]. 这些研究结果提示: 兔子具有抵抗 TSE 感染的能力, 可能缘于 RaPrP^C蛋白质分子自身的结构特点. 因此, 对兔 RaPrP^C三维结构及其动力学特性进行探讨, 将有助于人们理解兔子不感染 TSE 的分子机制.

6.2 兔 RaPrP^C的溶液结构及其动力学

我们利用异核多维核磁共振技术对 RaPrP^C

(91~228)及其 S173N、I214V 两个单点突变体进行了溶液结构解析, 并通过 ¹⁵N 弛豫实验对它们 C 端球状结构域(121~228)的主链动力学行为进行了考察^[92, 93].

6.2.1 兔 RaPrP^C的溶液结构

包括小鼠、人、牛、狗、猫、绵羊在内的许多哺乳动物 PrP^C, 其 β 2- α 2 loop 由于化学构象交换引起谱线展宽, 在 NMR 谱中观测不到相应的信号^[10, 14, 15, 18]; 一些哺乳动物, 诸如猪、马、鹿、田鼠、袋鼠, 其 PrP^C中这段无规卷曲片段则可以完全指认^[17~21]. 由于存在来自第三个 α 螺旋 C 末端残基的长程 NOE, 兔 RaPrP^C的 β 2- α 2 loop 结构得到了很好地约束, 其共振信号也得到了完全的指认^[94](图 13).

兔 RaPrP^C的球状结构域包含两个短的反平行的 β 折叠片(S1: 128~130, S2: 160~162)和 3 个 α 螺旋(H1: 144~153, H2: 173~186, H3: 199~227), 第二、三两个 α 螺旋通过残基 C178 和 C213 形成一对二硫键, 片段 91~126 因为缺少 NOE 而高度无序, 整体结构与其他哺乳动物的 PrP^C类似(图 14(a)). 由于小鼠 mPrP^C的 N173S 和 V214I 突变体不能转变成异常构象^[89], 因此, 预期 S173N 和 I214V 突变会对 RaPrP^C的三维结构或多或少产生一些影响. 用 NMR 技术解析得到的两个 RaPrP^C突变体的溶液结构与野生型的整体结构骨架几乎一致(图 14(b), (c)). 不过, 它们在局部结构上存在着一些细小的差异: S173N 突变体第一个 α 螺旋的取向发生了变化, 与野生型比较大约偏离了 24°角;

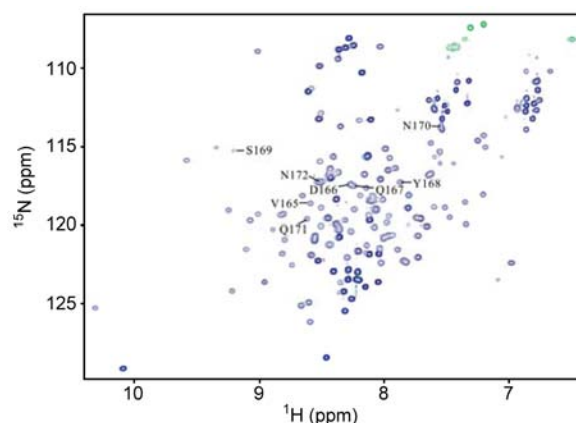


图 13 兔 RaPrP^C蛋白的二维 ¹H-¹⁵N 异核单量子相干谱. 构成 β 2- α 2 loop 的所有氨基酸残基都得到了指认.

S173N 突变体第三个 α 螺旋末端表现出更为剧烈的不规则弯曲(图 14(b)). I214V 突变体的第一个 α 螺旋比野生型稍长, 但第二、三两个 α 螺旋的长度则相对野生型略短(图 14(c)).

由于 RaPrP^C、hPrP^C、mPrP^C 和 bPrP^C 的溶液结构都是在含 20 mM 醋酸钠、pH 4.5 的缓冲液中解析的, 所以对这几个哺乳动物 PrP^C 的表面静电势分布进行了分析. 令人惊讶的是, RaPrP^C 分子表面拥有一大片连续的正电势区域(图 15(a)), 与其他 PrP^C 显著不同(图 15). 这种独特的静电势分布将极大影响 PrP^C 与其他分子的相互作用. 目前已证实 PrP^{Sc} 是引起 TSE 的致病因子. 转基因实验表明 PrP^{Sc} 的扩增需要 PrP^C 的结合^[95]. PrP^{Sc} 能识别 PrP^C 上的片段 90~144 和 180~205^[4]. 而 RaPrP^C 分子表面这一连续正电势区域大致覆盖了残基 125~135, 150~160 和 180~190. 因此, PrP^{Sc} 和 PrP^C 的相互作用有可能被 RaPrP^C 特有的表面电势分布所抑制, 从而有效地阻断了 PrP^{Sc} 的扩增. 此外, DNA 和 RNA 都能促进 PrP^C 的构象转变^[81, 83]. 研究报告 DNA 主要结合在 PrP^C 的 C 端球状结构域, 无规卷曲片段 90~121 对这种结合起到了辅助的作用^[84, 85]. 静电相互作用是蛋白质识别核酸最重要的因素之一. RaPrP^C 独特的表面静电势分布可能显著地影响了



图 14 RaPrP^C 野生型及其 S173N、I214V 突变体的溶液结构. (a) 野生型; (b) 野生型(灰)与 S173N 突变体(绿)叠合; (c) 野生型(灰)与 I214V 突变体(粉红)叠合.

RaPrP^C 分子与特异性核酸的结合, 使 RaPrP^C 不经历错误折叠过程.

进一步分析 RaPrP^C 突变体的表面静电势分布发现: 在 S173N 突变体中, 原本在野生型中呈电中性的 173 位点变成了负电势, 219 位点的电势则从野生型的负电荷变成了电中性(图 16(a), (b)); I214V 突变没有引起取代位点 214 明显的电荷变化, 但是其他一些非突变位点如 124、164 等残基, 静电势却发生了显著的改变(图 16(c), (d)). 如果这些残基是某种底物的结合位点, 那么静电势分布的改变有可能造成蛋白质对该底物的亲和力及特异性发生显著的改变.

RaPrP^C 野生型及其突变体的氢键网络也进行了比较. 由 NMR 结构测定方法得到的 15 个最低能量的构象中, 在至少 9 个构象中均存在的氢键才是稳定的氢键. 野生型 RaPrP^C 具有 55 个氢键, S173N、I214V 突变导致氢键数目分别下降为 47 和 41 个, 表明这两个位点的突变明显地降低了结构稳定性. 特别要指

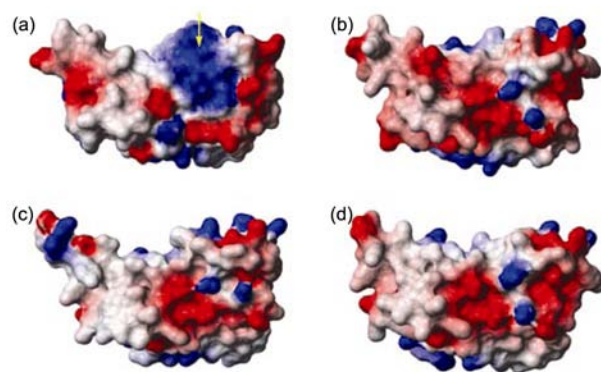


图 15 不同种属 PrP^C 表面静电势分布. (a) 兔; (b) 人; (c) 小鼠; (d) 牛. (图片来自参考文献[93])

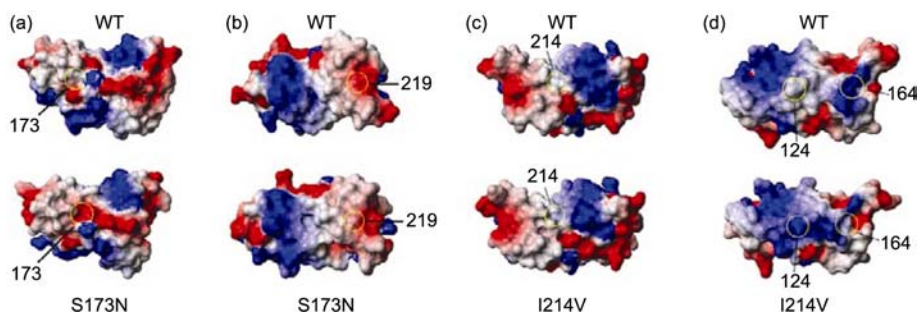


图 16 RaPrP^C 野生型与突变体的表面静电势分布. 野生型与 S173N 突变体的 173 位点(a)、219 位点(b)比较; 野生型与 I214V 突变体的 214 位点(c)、124 和 164 位点(d)比较

出的是, 野生型 RaPrP^C 中有 8 个氢键维持三级结构, 突变之后维持三级结构的氢键下降到 4 个, 并且氢键分布也发生了一些变化. 由此推测: 由其他伴侣因子诱导的 RaPrP^C 的结构变化, 在突变后将更容易发生.

6.2.2 兔 RaPrP^C 的动力学

Modelfree 拟合是目前最广泛应用的分析蛋白质分子内运动的方法. 利用 r2r1_diffusion 程序计算出野生型 RaPrP^C 转动扩散张量在两个主轴的比值 $D_{\parallel}/D_{\perp}$ 为 1.31 ± 0.01 , 表明可以使用轴对称模型拟合弛豫数据, 并且由此得到了 RaPrP^C 每个残基的序参数 S^2 . 序参数 S^2 定量描述 ps-ns 时间尺度内运动的幅度, 其理论值在 0 到 1 之间. 结果表明, S^2 低于 0.7 的残基主要位于 3 个柔性的无规卷曲片段上, 包括残基 121~126、138~141 和 190~198. 然而, 连接第二个 β 折叠片和第二个 α 螺旋的 $\beta 2-\alpha 2$ loop, 却具有极高的 S^2 值, 超过了 0.85, 表明片段 165~172 高度有序. 该片段被认为与 TSE 的发生密切相关. mPrP^C 中对应的这段卷曲, 由于没有主链共振信号, 所以没能得到有效的 S^2 值. RaPrP^C 中首次成功地获得了 $\beta 2-\alpha 2$ loop 的 S^2 值, 为 TSE 传播种属屏障研究提供了重要的线索. 处于二级结构单元的残基具有相对较高的 S^2 值, 通常都高于 0.8. 3 个 α 螺旋的平均 S^2 值分别为 0.93、0.94 和 0.85. 图 17(a) 在 RaPrP^C 蛋白的三级结构上显示了获得的 S^2 值.

S173N 和 I214V 突变体转动扩散张量在两个主轴的比值 $D_{\parallel}/D_{\perp}$ 分别为 1.46 ± 0.01 和 1.24 ± 0.01 , 表明可以使用轴对称模型来进行 Modelfree 拟合. 计算获得了 S173N、I214V 突变体各个残基的 S^2 值, 并显示在蛋白质的结构上(图 17(b), (c)). 出人意料的是, 两个突变体第三个 α 螺旋末端残基的 S^2 值居然低于 0.8, 与野生型比较明显降低. 推测突变可能影响了 $\beta 2-\alpha 2$ loop 与第三个 α 螺旋的分子内相互作用, 从而

导致第 3 个 α 螺旋末端的柔性增加. 局部高柔性区域发生结构改变的能垒通常较低. 事实上, 即使图 17 所示 3 个结构的某些区域显示了同样的颜色, 但是从 S^2 的绝对数值来看, 突变体中的氨基酸残基与野生型相比也普遍偏小, 提示突变后 RaPrP^C 分子的结构稳定性有所下降. 约化谱密度函数映射分析和脲变性实验数据进一步表明 RaPrP^C 突变后结构稳定性确实下降了. 此外, 分子动力学模拟也指出野生型 RaPrP^C 具有更高的结构稳定性^[96]. 因此, RaPrP^C 分子在构象上的刚性, 可能很大程度上起到了抵抗其他分子诱导的构象转化的作用.

野生型 RaPrP^C 与其 S173N、I214V 突变体的结构差异, 提示 RaPrP^C 蛋白独特的表面电势分布、 $\beta 2-\alpha 2$ loop 与第三个 α 螺旋的相互作用和动力学行为, 是抑制 RaPrP^C 向异常构象转变的主要因素.

6.3 兔 RaPrP^C 的晶体结构

最近, Khan 等人^[65]发表了兔 RaPrP^C(121~230)的晶体结构(图 18). 这个结构与 hPrP^C 晶体结构类似, 形成了一个二聚体. 不同的是, RaPrP^C 二聚体没有出现结构域交换的现象, 其相互作用界面是连接第二、三两个 α 螺旋的无规卷曲片段; 分子内的二硫键也没有发生错配. 将 RaPrP^C 晶体结构与绵羊 ovPrP^C 晶体结构的主链原子进行比较, RMSD 仅 0.8 Å, 表明 RaPrP^C 与绵羊 ovPrP^C 的空间结构很相近. RaPrP^C 残基 165~175 的电子云密度清晰可辨, 因而 $\beta 2-\alpha 2$ loop 的结构可以很好地确定. D166 和 Q167 暴露在蛋白质表面, 而 V165 与第三个 α 螺旋中的 Y217 存在疏水相互作用, 从而稳定了 $\beta 2-\alpha 2$ loop. 此外, N170 和 S173 残基之间形成了两个几乎平行的氢键, 这在小鼠或叙利亚大颊鼠等其他 PrP^C 中是不存在的; 加上 Y168 和 F174 的疏水相互作用, $\beta 2-\alpha 2$ loop 构成了一个螺旋-帽结构组件(helix-capping motif), 增加了第二个 α 螺

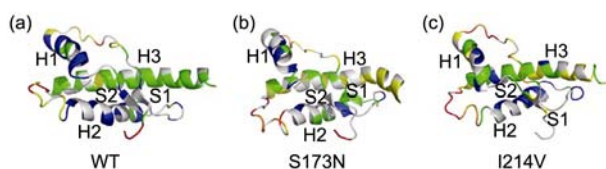


图 17 RaPrP^C 的 NMR 动力学分析. 野生型(a)、S173N 突变体(b)、I214V 突变体(c)的序参数 S^2 . 红: $S^2 < 0.6$, 橙: $0.6 \leq S^2 < 0.7$, 黄: $0.7 \leq S^2 < 0.8$, 绿: $0.8 \leq S^2 < 0.9$, 蓝: $0.9 \leq S^2 < 1.0$, 灰: 实验数据缺失或无法拟合出有效的 S^2 值

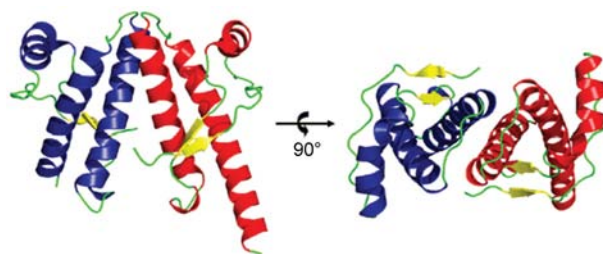


图 18 RaPrP^C 的晶体结构(图片来自参考文献[65])

旋 N 端的稳定性. 研究人员发现 S173N 突变破坏了 $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 的螺旋-帽结构组件, 引起 RaPrP^C 更容易向 β 折叠中间态转变.

将 RaPrP^C 平均溶液结构与晶体结构的其中一个单体分子进行比较(图 19), 可以发现在局部结构上, 晶体结构中三个 α 螺旋的长度都更长些, 并且第一个 α 螺旋出现了非常明显的不规则扭曲; $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 中部分氨基酸残基形成了一个额外的小的 3_{10} 螺旋. 不过, 两者的主体骨架结构依然高度一致, $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 结构也都得到了很好地确定. 有趣的是, 在探究兔子不感染 TSE 的分子机制时, 溶液结构研究和晶体结构研究在一定程度上殊途同归地将焦点对准 RaPrP^C 的 $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop.

6.4 兔 RaPrP^C 的研究总结

通过对兔 RaPrP^C 的深入研究, 人们获得了许多新的发现和有价值的信息, 为更好理解兔 RaPrP^C 不经历 PrP^C $\rightarrow$ PrP^{Sc} 的构象变化、从而不感染 TSE 的分子机制, 以及异常型 PrP^{Sc} 形成机理的探明, 提供了重要的线索. 主要发现和结论包括:

(1) 兔子细胞含有 prion 发生构象转变所需的全部因子; 兔 RaPrP^C 的 GPI 锚定形式和细胞定位等与小鼠 mPrP^C 极其相似; 兔子能抵抗 TSE 感染是缘于 RaPrP^C 蛋白质分子自身的结构特点.

(2) RaPrP^C 的 $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 结构高度有序, 可被确定; 其特有的螺旋-帽结构组件以及与第三个 α 螺旋的相互作用, 可以有效抑制 RaPrP^C 分子的结构转变; $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 或可作为 TSE 传播的一个种属屏障.

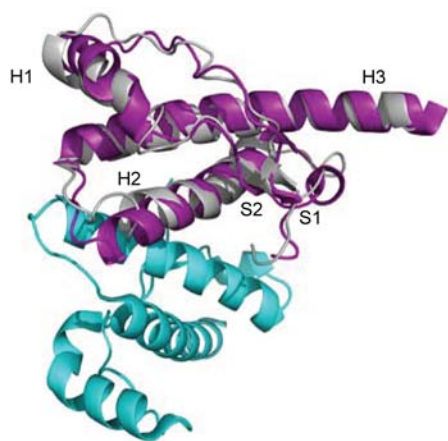


图 19 RaPrP^C 的溶液结构和晶体结构比较. 灰: 平均溶液结构; 紫和青: 晶体结构中的两个单体分子

(3) RaPrP^C 分子独特的表面电势分布, 对潜在底物的相互作用过程影响极大, 可能作为 TSE 传播的另一个种属屏障.

7 总结和展望

科学工作者投入大量的时间和精力, 对 prion 开展了广泛而深入的研究, 取得了许多令人振奋的进展. 众多不同种属正常型 PrP^C 的三维空间结构成功获得解析, 其动力学特性也不断得到深入的考察和挖掘. 人们发现, 不少关键片段和氨基酸残基可以决定 PrP^C 分子整体或局部的氢键、稳定性和表面静电势分布等结构特征, 从而显著影响 PrP^C 的构象变化, 尤其发现 $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop 与 TSE 的发生密切相关. PrP^C 与 X 蛋白或核酸等其他因子的相互作用, 使人们对 PrP^C 的生理功能和构象变化原因有了新的认识和理解. 人们还对致病型 PrP^{Sc} 的结构以及淀粉样纤维丝的核心结构区进行了大胆的探索.

然而不可否认的是, 关于 prion 的结构研究也面临了不少问题. 首先, 不同实验室得到的研究结果不尽一致, 甚至出现了完全矛盾的情况. 其次, 人们目前尚不能得到 PrP^{Sc} 的可靠的结构信息, 导致从 PrP^C 获得的许多与构象变化相关的结论只能停留在推测的层面, 其正确性无法获得有效的检验. 再次, PrP^C 的生物学功能至今依然不清楚, 这使得结构和功能两个原本紧密相连的研究方向变得相对独立, 难以形成统一的有机整体.

因此, 今后 prion 的研究工作应该侧重于两个方面: 一是 PrP^{Sc} 三维空间结构的测定, 二是 PrP^C 生理功能的发现. 事实上, 这正是当前 prion 研究领域最高难度的两个方向; 它们之中任何一个的突破都将极大地推进 prion 的研究. 尽管任务异常艰巨, 但是, 电镜、固体 NMR 等技术的不断创新和发展, 使 PrP^{Sc} 的高分辨三维结构有望得到最终解析; 结合多种分子生物学方法和谱学手段, 进一步深入研究与 PrP^C 相互作用的生物大分子等因子及其参与的各种通路, 将有助于人们找出 PrP^C 的生物学功能. 随着各种行之有效的新思路、新方法和新技术的不断涌现, 相信在不远的将来, prion 的神秘面纱将被揭开, prion 异常构象转变的分子机制和 TSE 致病机制等难题也将被阐明.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(30730026, 30570352)、上海市优秀学科带头人计划(2009ZX09301-001)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-YW-R-104)以及国家重点基础研究发展计划(973)蛋白质重大研究计划项目(2007CB914304)资助, 特此致谢。

参考文献

- 1 Prusiner SB. Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, 1997, 278: 245–251
- 2 Sweeting B, Khan MQ, Chakrabarty A, Pai EF. Structural factors underlying the species barrier and susceptibility to infection in prion disease. *Biochem Cell Biol*, 2010, 88: 195–202
- 3 Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, 216: 136–144
- 4 Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 13363–13383
- 5 Wuthrich K, Riek R. Three-dimensional structures of prion proteins. *Adv Protein Chem*, 2001, 57: 55–82
- 6 Aguzzi A, Sigurdson C, Heikenwaelder M. Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 2008, 3: 11–40
- 7 van Rheede T, Smolenaars MM, Madsen O, de Jong WW. Molecular evolution of the mammalian prion protein. *Mol Biol Evol*, 2003, 20: 111–121
- 8 Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*, 2004, 116: 313–327
- 9 Soto C, Castilla J. The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat Med*, 2004, 10 Suppl: S63–67
- 10 Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121–231). *Nature*, 1996, 382: 180–182
- 11 Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehlhorn I, James TL, Cohen FE, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29–231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 13452–13457
- 12 James TL, Liu H, Ulyanov NB, Farr-Jones S, Zhang H, Donne DG, Kaneko K, Groth D, Mehlhorn I, Prusiner SB, Cohen FE. Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 10086–10091
- 13 Liu H, Farr-Jones S, Ulyanov NB, Llinas M, Marqusee S, Groth D, Cohen FE, Prusiner SB, James TL. Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90–231). *Biochemistry*, 1999, 38: 5362–5377
- 14 Lopez Garcia F, Zahn R, Riek R, Wuthrich K. NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 8334–8339
- 15 Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 145–150
- 16 Hornemann S, Schorn C, Wuthrich K. NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO Rep*, 2004, 5: 1159–1164
- 17 Gossert AD, Bonjour S, Lysek DA, Fiorito F, Wuthrich K. Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 646–650
- 18 Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, von Schroetter C, Fiorito F, Herrmann T, Guntert P, Wuthrich K. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 640–645
- 19 Christen B, Perez DR, Hornemann S, Wuthrich K. NMR structure of the bank vole prion protein at 20 degrees C contains a structured loop of residues 165–171. *J Mol Biol*, 2008, 383: 306–312
- 20 Christen B, Hornemann S, Damberger F F, Wuthrich K. Prion protein NMR structure from tammar wallaby (*Macropus eugenii*) shows that the beta2-alpha2 loop is modulated by long-range sequence effects. *J Mol Biol*, 2009, 389: 833–845
- 21 Perez DR, Damberger FF, Wuthrich K. Horse prion protein NMR structure and comparisons with related variants of the mouse prion protein. *J Mol Biol*, 2010, 400: 121–128
- 22 Calzolari L, Lysek DA, Guntert P, von Schroetter C, Riek R, Zahn R, Wuthrich K. NMR structures of three single-residue variants of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 8340–8345
- 23 Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, 1995, 83: 79–90
- 24 Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE, Prusiner SB. Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 10069–10074
- 25 Ilc G, Giachin G, Jaremko M, Jaremko L, Benetti F, Plavec J, Zhukov I, Legname G. NMR structure of the human prion protein with the pathological Q212P mutation reveals unique structural features. *PLoS One*, 2010, 5: e11715
- 26 Robinson PJ, Pinheiro TJ. The unfolding of the prion protein sheds light on the mechanisms of prion susceptibility and species barrier. *Biochemistry*, 2009, 48: 8551–8558

- 27 Sigurdson CJ, Nilsson KP, Hornemann S, Manco G, Fernandez-Borges N, Schwarz P, Castilla J, Wuthrich K, Aguzzi A. A molecular switch controls interspecies prion disease transmission in mice. *J Clin Invest*, 2010, 120: 2590–2599
- 28 Gorfe AA, Caflisch A. Ser170 controls the conformational multiplicity of the loop 166–175 in prion proteins: implication for conversion and species barrier. *Faseb J*, 2007, 21: 3279–3287
- 29 Zhang Y, Swietnicki W, Zagorski MG, Surewicz WK, Sonnichsen FD. Solution structure of the E200K variant of human prion protein. Implications for the mechanism of pathogenesis in familial prion diseases. *J Biol Chem*, 2000, 275: 33650–33654
- 30 Billeter M, Riek R, Wider G, Hornemann S, Glockshuber R, Wuthrich K. Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7281–7285
- 31 Knaus KJ, Morillas M, Swietnicki W, Malone M, Surewicz WK, Yee VC. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol*, 2001, 8: 770–774
- 32 Tabrett CA, Harrison CF, Schmidt B, Bellingham SA, Hardy T, Sanejouand YH, Hill AF, Hogg PJ. Changing the solvent accessibility of the prion protein disulfide bond markedly influences its trafficking and effect on cell function. *Biochem J*, 2010, 428: 169–182
- 33 Haire LF, Whyte SM, Vasisht N, Gill AC, Verma C, Dodson EJ, Dodson GG, Bayley PM. The crystal structure of the globular domain of sheep prion protein. *J Mol Biol*, 2004, 336: 1175–1183
- 34 Wille H, Michelitsch MD, Guenebaut V, Supattapone S, Serban A, Cohen FE, Agard DA, Prusiner SB. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 3563–3568
- 35 Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 8342–8347
- 36 Lu X, Wintrode PL, Surewicz WK. Beta-sheet core of human prion protein amyloid fibrils as determined by hydrogen/deuterium exchange. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 1510–1515
- 37 Cobb NJ, Sonnichsen FD, McHaourab H, Surewicz WK. Molecular architecture of human prion protein amyloid: A parallel, in-register beta-structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 18946–18951
- 38 Laws DD, Bitter HM, Liu K, Ball HL, Kaneko K, Wille H, Cohen FE, Prusiner SB, Pines A, Wemmer DE. Solid-state NMR studies of the secondary structure of a mutant prion protein fragment of 55 residues that induces neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 11686–11690
- 39 Lim KH, Nguyen TN, Damo SM, Mazur T, Ball HL, Prusiner SB, Pines A, Wemmer DE. Solid-state NMR structural studies of the fibril form of a mutant mouse prion peptide PrP89–143(P101L). *Solid State Nucl Magn Reson*, 2006, 29: 183–190
- 40 van der Wel PC, Lewandowski JR, Griffin RG. Solid-state NMR study of amyloid nanocrystals and fibrils formed by the peptide GNNQQNY from yeast prion protein Sup35p. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 5117–5130
- 41 Lee SW, Mou Y, Lin SY, Chou FC, Tseng WH, Chen CH, Lu CY, Yu SS, Chan JC. Steric zipper of the amyloid fibrils formed by residues 109–122 of the Syrian hamster prion protein. *J Mol Biol*, 2008, 378: 1142–1154
- 42 Siemer AB, Ritter C, Ernst M, Riek R, Meier BH. High-resolution solid-state NMR spectroscopy of the prion protein HET-s in its amyloid conformation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44: 2441–2444
- 43 Viles JH, Donne D, Kroon G, Prusiner SB, Cohen FE, Dyson HJ, Wright PE. Local structural plasticity of the prion protein. Analysis of NMR relaxation dynamics. *Biochemistry*, 2001, 40: 2743–2753
- 44 Kuwata K, Kamatari YO, Akasaka K, James TL. Slow conformational dynamics in the hamster prion protein. *Biochemistry*, 2004, 43: 4439–4446
- 45 O'Sullivan DB, Jones CE, Abdelraheim SR, Brazier MW, Toms H, Brown DR, Viles JH. Dynamics of a truncated prion protein, PrP(113–231), from ¹⁵N NMR relaxation: order parameters calculated and slow conformational fluctuations localized to a distinct region. *Protein Sci*, 2009, 18: 410–423
- 46 Bae SH, Legname G, Serban A, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ. Prion proteins with pathogenic and protective mutations show similar structure and dynamics. *Biochemistry*, 2009, 48: 8120–8128
- 47 DeMarco ML, Daggett V. From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 2293–2298
- 48 Dima RI, Thirumalai D. Probing the instabilities in the dynamics of helical fragments from mouse PrP^C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 15335–15340
- 49 Morrissey MP, Shakhnovich EI. Evidence for the role of PrP(C) helix 1 in the hydrophilic seeding of prion aggregates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11293–11298
- 50 Fernandez A. Insufficient hydrogen-bond desolvation and prion-related disease. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 4165–4168
- 51 Ziegler J, Sticht H, Marx UC, Muller W, Rosch P, Schwarzinger S. CD and NMR studies of prion protein (PrP) helix 1. Novel implications for its role in the PrP^C→PrP^{Sc} conversion process. *J Biol Chem*, 2003, 278: 50175–50181
- 52 Santini S, Derreumaux P. Helix H1 of the prion protein is rather stable against environmental perturbations: molecular dynamics of mutation and deletion variants of PrP(90–231). *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 951–960

- 53 Prusiner SB. Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 482–487
- 54 Liemann S, Glockshuber R. Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. *Biochemistry*, 1999, 38: 3258–3267
- 55 Swietnicki W, Petersen RB, Gambetti P, Surewicz WK. Familial mutations and the thermodynamic stability of the recombinant human prion protein. *J Biol Chem*, 1998, 273: 31048–31052
- 56 Kirby L, Agarwal S, Graham J F, Goldmann W, Gill A C. Inverse correlation of thermal lability and conversion efficiency for five prion protein polymorphic variants. *Biochemistry*, 2010, 49: 1448–1459
- 57 Swietnicki W, Petersen R, Gambetti P, Surewicz WK. pH-dependent stability and conformation of the recombinant human prion protein PrP(90-231). *J Biol Chem*, 1997, 272: 27517–27520
- 58 Calzolari L, Zahn R. Influence of pH on NMR structure and stability of the human prion protein globular domain. *J Biol Chem*, 2003, 278: 35592–35596
- 59 Zou WQ, Cashman NR. Acidic pH and detergents enhance *in vitro* conversion of human brain PrPC to a PrPSc-like form. *J Biol Chem*, 2002, 277: 43942–43947
- 60 Hornemann S, Glockshuber R. A scrapie-like unfolding intermediate of the prion protein domain PrP(121-231) induced by acidic pH. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 6010–6014
- 61 Apetri AC, Surewicz WK. Kinetic intermediate in the folding of human prion protein. *J Biol Chem*, 2002, 277: 44589–44592
- 62 Jenkins DC, Sylvester ID, Pinheiro TJ. The elusive intermediate on the folding pathway of the prion protein. *FEBS J*, 2008, 275: 1323–1335
- 63 Martins SM, Chapeaurouge A, Ferreira ST. Folding intermediates of the prion protein stabilized by hydrostatic pressure and low temperature. *J Biol Chem*, 2003, 278: 50449–50455
- 64 O'Sullivan DB, Jones CE, Abdelraheim SR, Thompson AR, Brazier MW, Toms H, Brown DR, Viles JH. NMR characterization of the pH 4 beta-intermediate of the prion protein: the N-terminal half of the protein remains unstructured and retains a high degree of flexibility. *Biochem J*, 2007, 401: 533–540
- 65 Khan MQ, Sweeting B, Mulligan VK, Arslan PE, Cashman NR, Pai EF, Chakrabarty A. Prion disease susceptibility is affected by {beta}-structure folding propensity and local side-chain interactions in PrP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 19808–19813
- 66 Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *Embo J*, 2002, 21: 3317–3326
- 67 Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, de Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo J*, 2002, 21: 3307–3316
- 68 Spielhauer C, Schatzl HM. PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J Biol Chem*, 2001, 276: 44604–44612
- 69 Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S. The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J*, 2001, 20: 5863–5875
- 70 Hundt C, Peyrin JM, Haik S, Gauczynski S, Leucht C, Rieger R, Riley ML, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S. Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *Embo J*, 2001, 20: 5876–5886
- 71 Sun G, Guo M, Shen A, Mei F, Peng X, Gong R, Guo D, Wu J, Tien P, Xiao G. Bovine PrPC directly interacts with alphaB-crystalline. *FEBS Lett*, 2005, 579: 5419–5424
- 72 Guo M, Huang T, Cui Y, Pan B, Shen A, Sun Y, Yi Y, Wang Y, Xiao G, Sun G. PrPC interacts with tetraspanin-7 through bovine PrP154-182 containing alpha-helix 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365: 154–157
- 73 DeBurman SK, Raymond GJ, Caghey B, Lindquist S. Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 13938–13943
- 74 Fernandez-Funez P, Casas-Tinto S, Zhang Y, Gomez-Velazquez M, Morales-Garza MA, Cepeda-Nieto AC, Castilla J, Soto C, Rincon-Limas DE. *In vivo* generation of neurotoxic prion protein: role for hsp70 in accumulation of misfolded isoforms. *PLoS Genet*, 2009, 5: e1000507
- 75 Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature*, 2009, 457: 1128–1132
- 76 Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Scip A, Biasini E, Tapella L, Colombo L, Manzoni C, Borsello T, Chiesa R, Gobbi M, Salmona M, Forloni G. Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 2295–2300
- 77 Calella AM, Farinelli M, Nuvolone M, Mirante O, Moos R, Falsig J, Mansuy IM, Aguzzi A. Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol Med*, 2010, 2: 306–314
- 78 Kessels HW, Nguyen LN, Nabavi S, Malinow R. The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature*, 2010, 466: E3–4; discussion E4–5
- 79 Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, Gunther EC, Lauren J, Gimbel ZA, Strittmatter SM. Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci*, 2010, 30: 6367–6374

- 80 Bitel CL, Feng Y, Souayah N, Frederikse PH. Increased expression and local accumulation of the prion protein, Alzheimer Abeta peptides, superoxide dismutase 1, and nitric oxide synthases 1 & 2 in muscle in a rabbit model of diabetes. *BMC Physiol*, 2010, 10: 18
- 81 Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*, 2003, 425: 717–720
- 82 Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J. Generating a Prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science*, 2010, 327: 1132–1135
- 83 Cordeiro Y, Machado F, Juliano L, Juliano MA, Brentani RR, Foguel D, Silva JL. DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem*, 2001, 276: 49400–49409
- 84 Lima LM, Cordeiro Y, Tinoco LW, Marques AF, Oliveira CL, Sampath S, Kodali R, Choi G, Foguel D, Torriani I, Caughey B, Silva JL. Structural insights into the interaction between prion protein and nucleic acid. *Biochemistry*, 2006, 45: 9180–9187
- 85 Tjong H, Zhou HX. DISPLAR: an accurate method for predicting DNA-binding sites on protein surfaces. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: 1465–1477
- 86 Gibbs CJ Jr., Gajdusek DC. Experimental subacute spongiform virus encephalopathies in primates and other laboratory animals. *Science*, 1973, 182: 67–68
- 87 Vilette D, Andreoletti O, Archer F, Madelaine MF, Vilotte JL, Lehmann S, Laude H. *Ex vivo* propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 4055–4059
- 88 Courageot MP, Daude N, Nonno R, Paquet S, Di Bari MA, Le Dur A, Chapuis J, Hill AF, Agrimi U, Laude H, Vilette D. A cell line infectible by prion strains from different species. *J Gen Virol*, 2008, 89: 341–347
- 89 Vorberg I, Groschup MH, Pfaff E, Priola SA. Multiple amino acid residues within the rabbit prion protein inhibit formation of its abnormal isoform. *J Virol*, 2003, 77: 2003–2009
- 90 Fernandez-Funez P, Zhang Y, Casas-Tinto S, Xiao X, Zou WQ, Rincon-Limas DE. Sequence-dependent prion protein misfolding and neurotoxicity. *J Biol Chem*, 2010, 285: 36897–36908
- 91 Nisbet RM, Harrison CF, Lawson VA, Masters CL, Cappai R, Hill AF. Residues surrounding the glycosylphosphatidylinositol anchor attachment site of PrP modulate prion infection: insight from the resistance of rabbits to prion disease. *J Virol*, 2010, 84: 6678–6686
- 92 Wen Y, Li J, Xiong M, Peng Y, Yao W, Hong J, Lin D. Solution structure and dynamics of the I214V mutant of the rabbit prion protein. *PLoS ONE*, 2010, 5: e13273
- 93 Wen Y, Li J, Yao W, Xiong M, Hong J, Peng Y, Xiao G, Lin D. Unique structural characteristics of the rabbit prion protein. *J Biol Chem*, 2010, 285: 31682–31693
- 94 Li J, Mei FH, Xiao GF, Guo CY, Lin DH. ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of rabbit prion protein (91–228). *J Biomol NMR*, 2007, 38: 181
- 95 Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, Mirenda C, Torchia M, Yang SL, Serban D, Carlson GA, Hoppe PC, Westaway D, DeArmond SJ. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, 1990, 63: 673–686
- 96 Zhang J. Studies on the structural stability of rabbit prion probed by molecular dynamics simulations of its wild-type and mutants. *J Theor Biol*, 2010, 264: 119–122

Progresses on prion proteins

LIN DongHai^{1,2} & WEN Yi²

1 Laboratory of Structural Biology, Department of Chemical Biology, College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

2 Bio-NMR Laboratory, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

Abstract: Transmissible spongiform encephalopathies are a family of fatal neurodegenerative disorders. The pathogen has been identified as the abnormal isoform of the host-derived prion protein. The molecular mechanism of the conformational conversion of the prion protein is unclear so far. However, much valuable information closely related to the conformational change has been obtained by means of physical, chemical and biological techniques. Recent progresses on three-dimensional structures, dynamics, unfolding and intermolecular interactions of prion proteins are reviewed herein, together with novel results about the solution structure and dynamics of the rabbit prion protein achieved from our laboratory.

Keywords: transmissible spongiform encephalopathies, prion, conformational conversion