

PRNP 基因八肽重复突变研究进展

韩露 韩俊 董小平

【摘要】 某些遗传性朊病毒病,例如,家族性 Creutzfeldt-Jakob 病(fCJD)、GSS 综合征均与 PRNP 基因八肽重复区插入突变相关。关于插入突变 PrP 分子的研究对于揭示遗传性朊病毒病发病机制具有重要意义。

【关键词】 遗传性朊病毒病; PRNP 基因; 插入突变

Advance of the Research in Octapeptide Repeat Mutation of PRNP Gene HAN Lu, HAN Jun, DONG Xiao-ping. (Department of Prion Disease, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, P. R. China)

Corresponding author: DONG Xiao-ping. E-mail: dongxp238@hotmail.com

【Abstract】 Some cases of hereditary prion diseases, which include familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler syndrome are linked to octapeptide repeat insertional mutation in the PRNP gene. Many studies of PrP molecules with insertional mutation have been carried out to understand the pathogenesis of familial forms of prion disease.

【Key words】 Hereditary prion diseases; PRNP; Insertional mutation

朊病毒病又称传染性海绵状脑病,是一类累及人和动物的慢性、致死性中枢神经系统退行性疾病。目前认为朊病毒病是由于正常膜蛋白 PrP^C 发生构象转变生成 PrP^{Sc} 所致。人类朊病毒病分为传染性、散发性和遗传性三种形式,遗传性朊病毒病包括家族性克雅病(familial Creutzfeldt Jakob disease, fCJD)、(Gerstmann-Sträussler syndrome, GSS)综合征、致死性家族性失眠症(fetal familial insomnia, FFI),均与编码 PrP 蛋白的 PRNP 基因遗传突变有关。PRNP 突变分两类:一类为点突变,造成相应氨基酸位点的替换,另一类为 N 端八肽重复区的插入或缺失突变,与家族性 CJD 和 GSS 相关^[1]。

PRNP 基因位于人染色体 20 区,在第 51~91 氨基酸位点间为 1 个九肽(R1)与 4 个具有相同氨基酸序列的八肽重复区(R2~R4),顺序为 R1-R2-R2-R3-R4,其氨基酸序列为 P(H/Q)GGG(-/G)WGQ。目前认为,具有 1~9 个插入突变和 2 个缺失的八肽突变与遗传性朊病毒病的发生有关。1%左右的人群中具有 1 个八肽缺失现象,属于正常的遗传多态性,与疾病发生无关。Croes 等^[2]对来自 22 个家系的 55

名具有八肽重复插入突变的遗传性 CJD 和 GSS 患者进行统计学分析后得出结论,八肽重复的数目与发病年龄呈线性相关,重复数目越多发病年龄越早、病程也越短。现就目前对八肽重复区插入或缺失突变与遗传性朊病毒病的研究作简要介绍。

1 八肽重复插入突变与 fCJD、GSS

人类遗传性朊病毒病的发病方式为常染色体显性遗传,目前已有欧洲、美国、日本的十多个具有不同八肽重复插入突变数目的家系报道,指示病例为遗传性 CJD 或 GSS 患者,PCR 方法检测其 PRNP 基因具有多八肽插入突变,其家族中曾有相同病例出现,或家族中其他人死于神经疾患而由于各种原因未能进行朊病毒病的检测^[3~5]。与散发性 CJD 相比,遗传性 CJD 患者发病早,发病年龄在 22~75 岁不等,散发性 CJD 平均发病年龄 65 岁,遗传性 CJD 或 GSS 患者病程更长,个别病例病程长达 18 年^[6]。

具有多八肽插入突变的遗传性 CJD 和 GSS 病人无特征性临床表现,一般为缓慢渐进性痴呆、共济失调、小脑受损症状、肌阵挛、震颤及锥体外系症状,脑部 CT、MRI 可见大脑、小脑萎缩。部分患者早期出现视力下降、定位障碍以及精神系统症状。病理表现多样,部分患者脑组织中可检测到大脑皮质广泛海绵样变,伴有反应性胶质细胞增生及神经元丢

基金项目:国家自然科学基金委项目(No. 30070038)

作者单位:100052 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所朊病毒室

通讯作者:董小平(E-mail: dongxp238@hotmail.com)

失。PrP 蛋白沉积在海绵样变处或其周围,小脑 PrP 蛋白主要沉积在颗粒细胞层。GSS 患者脑组织中可检测到多中心 PrP 斑块,小脑中斑块沉积更明显,伴有小胶质细胞增生^[7,8]。

2 八肽插入突变 PrP 的细胞生物学

为了探讨八肽插入突变相关遗传性朊病毒病的发生机制,目前已建立人、小鼠、仓鼠的人工重组多八肽插入突变 PrP 蛋白表达细胞系。虽然不同实验室、不同细胞系来源的八肽插入突变蛋白性质,如蛋白酶 K 抗性、亚细胞定位等略有不同,结果均显示八肽重复突变蛋白具有 PrP^{Sc}样异常性质:①去污剂不可溶性;②蛋白酶 K 抗性;③胞内代谢、转运延迟;④与胞膜的异常结合(经 PI-PLC 处理后无法从胞膜表面释放)。由于该区域内富含甘氨酸(G)和脯氨酸(P),将八肽重复区简称 PG,此处以 MoPG、HuPG、HaPG 分别代表小鼠、人、仓鼠来源的不同八肽重复突变体,例如, HuPG14 表示具有 14 个八肽重复(即 9 个额外插入八肽重复)的人源突变 PrP 蛋白。表 1 列举了在不同表达系统中多八肽插入突变 PrP 蛋白的表达情况及其细胞生物学特性。

为了进一步探求八肽插入突变蛋白在细胞内向 PrP^{Sc}转化的位点、时程,Washington 大学的 Harris 实验室利用放射性示踪标记、蔗糖密度梯度离心等技术对稳定表达 MoPG14 的 CHO 细胞系研究。首先, MoPG14 在示踪开始 10 分钟左右即表现出 PI-PLC (磷脂酶 C)抗性,野生型 MoPrP 蛋白经 PI-PLC 切掉 GPI 锚上的脂肪酸酰基链、烷基链失去了疏水性,全部转移至水相中,而 50% 的 MoPG14 仍保留在去污剂相中,这种疏水性质可能与 MoPG14 在胞膜表面的异常结合有关。其次,示踪开始后 20 分钟左右可检出具有去污剂抗性、沉降系数 4S 左右的 MoPG14 分子,至 1 小时达到高峰,蔗糖梯度分析发现 MoPG14 分子沉降系数集中在 4S、16.6S 两个峰值处,同时观察到相当部分处于两峰值中间的 MoPG14 分子,提示 MoPG14 聚合体的形成可能由最初几个分子逐渐聚集至更大聚合体。具有蛋白酶 K 抗性的 MoPG14 分子产生较晚,至示踪 6 小时左右才达到峰值,且早些时候可检出具有去污剂抗性但对蛋白酶 K 消化敏感的 MoPG14 分子,提示 MoPG14 分子去污剂抗性、蛋白酶 K 抗性的产生虽然在时间顺序上有先后之分,但两种性质的获得却存在某种必然联系,有可能 MoPG14 分子聚集至一定程度后促进或引发了蛋白酶 K 抗性的获得。经布雷菲德菌素(BFA,一种引起内质网与高尔基体融合的真菌代谢

物)处理后可以抑制 MoPG14 分子的去污剂抗性与蛋白酶 K 抗性的产生,说明这两种特性的产生均发生在蛋白离开高尔基体后的细胞通路中。而 BFA 对 MoPG14 分子的疏水性质没有影响,说明 MoPG14 分子在蛋白合成早期于内质网中即发生向 PrP^{Sc}性质的转化^[14,15]。

另外,对稳定表达 MoPG14 的 BHK、CHO 细胞进行超微结构观察后,发现与野生型 PrP 分子相比,八肽插入突变 PrP 分子在胞膜表面的分布明显减少,这些突变 PrP 分子滞留于内质网内。在一些人类遗传性疾病中,例如,先天性甲状腺机能减退、遗传性血色素沉着病中,突变蛋白从内质网被反转运至胞浆中,但被蛋白酶迅速降解。研究显示经蛋白酶抑制剂处理后,MoPG14 分子的半衰期、异常生化特性并未受影响,说明 MoPG14 分子并未被内质网质量控制系统降解掉,很有可能仍滞留于内质网内^[9,16]。不断聚集的突变蛋白是否会引发内质网应激反应并最终引发细胞凋亡目前还缺乏相关实验证据,不过,在 MoPG14 的转基因小鼠中除了自发神经退行性疾病外,还可检测到小脑颗粒细胞凋亡发生,提示 MoPG14 分子具有促神经元凋亡作用。

3 Tg(PG14)转基因鼠的相关研究

1998 年,Washington 大学的 Chiesa 等^[17]对具有 14 个八肽重复的 Tg(PG14)转基因小鼠进行研究,发现 Tg(PG14)鼠具有自发神经系统症状,表现为共济失调、驼背、运动功能减退、蹒跚步态等,同时伴有其他症状,如仰卧恢复为俯卧困难、体重减轻、被捉尾倒置后后肢异常紧扣在一起。发病鼠脑组织神经病理改变,包括小脑萎缩、颗粒细胞减少、小脑分子层变薄、小脑皮质星形胶质细胞增生,新皮质与海马区肥大星形细胞数目增多。发病鼠脑内 PrP 呈点状突触样沉积,主要集中在小脑、海马、嗅泡,新皮质与下丘脑有少量沉积,未发现淀粉样斑块与脑组织海绵样病变。转基因鼠脑组织内 PG14PrP 分子具有去污剂抗性,蛋白酶 K 抗性(0.5mg/mL ~ 4 μ g/mL),PI-PLC 处理后仍具有疏水性等 PrP^{Sc}样异常生化特性。

PG14PrP 分子的表达、沉积与 Tg(PG14)鼠的病程相关:①Tg(PG14)A1、A2、A3 3 个不同的转基因鼠系其 PG14PrP 的表达量分别为内源性 PrP 的 4 倍、1 倍、1 倍,而 B、C 转基因鼠 PG14PrP 的表达量为 0.15 倍,结果 A1、A2、A3 系发病鼠, B、C 系无发病鼠;② Tg(PG14)纯合子转基因小鼠发病(68 日龄),病程(49 天)明显早于杂合子转基因小鼠发病(235 日龄),病程(154 天)^[18]。

表 1 八肽插入突变 PrP 蛋白在不同表达系统中 PK 抗性及细胞定位^[9-13]

Table 1 Summary of cellular localization and proteinase K status of recombinant prion protein mutants generated by different expression systems^[9-13]

突变体	表达系统	细胞定位	蛋白酶 K 抗性
MoPG14	BHK, Sindbis Viral replicon	少量于膜表面, 主要在肉内质网中	1 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, 30min
MoPG11	CHO, pBC12/CMV	膜表面, 与胞膜异常结合	3.3 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, 10min
HaPG7, 9, 11	鼠成纤维细胞系, Retroviral vector	与膜表面异常结合	0.8 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, 10min
HaPG9, 11	MNB, Retroviral vector	膜表面	1 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, 10min
HuPG14	BHK, Semliki forest virus	胞膜、胞内	8 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, 30min

进一步研究发现, *Tg*(PG14)鼠小脑颗粒细胞丢失与凋亡有关^[18]。*Tg*(PG14)鼠早期颗粒细胞发育正常, 至 41 日龄左右, *Tg*(PG14)鼠脑内颗粒细胞数目明显减少, 至 180 日病程末, 几乎无颗粒细胞。50 ~ 100 日龄为颗粒细胞丢失的高峰期, 此期间 HE 染色可见多数颗粒细胞发生核固缩, 同时 ISEL 方法检测到神经元出现典型凋亡特征 DNA 断裂现象。在 *Tg*(PG14)转基因小鼠与 *Bax*^{-/-} 基因敲除小鼠杂交获得的 *Tg*(PG14) *Bax*^{-/-} 鼠中, 虽然 *Bax* 基因敲除对 *Tg*(PG14)转基因鼠的发病及病程无影响, 但颗粒细胞数目未见减少, 特异的凋亡检测结果也表明 *Bax* 基因敲除在一定程度上抑制了颗粒细胞凋亡发生。也说明 *Tg*(PG14)转基因鼠中颗粒细胞丢失可能是由 *Bax* 依赖的细胞凋亡途径引起的。而 *Tg*(PG14) *Bax*^{-/-} 鼠发病及病程无明显变化, 说明其神经元损伤不是由细胞凋亡的单一因素引起的, 这为朊病毒病的治疗提出了新的提示, 在进行抗凋亡药物治疗的同时还应配合其他保护神经元及突触的药物^[19]。

4 *Tg*(PG14)转基因鼠来源的 PG14PrP 分子的感染性

医源性、散发性、遗传性朊病毒病传染性不尽相同, 以患者脑组织接种后实验动物发病率来计算, 医源性 CJD 传染率为 100%, 散发性 CJD 传染率为 90%, 家族性朊病毒病的传染率为 68%^[20]。那么 *Tg*(PG14)转基因小鼠来源的 PG14PrP 分子是否具有感染性? 将发病的 *Tg*(PG14)鼠脑组织经颅内分别接种至正常对照鼠, 野生型 PrP 转基因小鼠, 及 B、C 系 *Tg*(PG14)鼠这 3 个实验组后, 所有接种小鼠至正常生存年限(2 年)均无发病。阳性对照组中, 将 RML 株的 Scrapie 因子颅内接种以上 3 组实验鼠后, 所有接种动物均发病死亡。说明 *Tg*(PG14)鼠并不能自发产生具有感染性的 PrP^{Sc} 分子, 转基因鼠来源的 PG14PrP 分子与 PrP^{Sc} 的感染性质完全不

同^[21]。

将自发病转基因鼠来源的 PG14PrP 分子 (PG14^{spoon}) 与 Scrapie 感染转基因鼠来源的 PG14PrP 分子 (PG14^{RML}) 进行比较后发现, PG14^{spoon} 与 PG14^{RML} 存在以下不同: ① PG14^{spoon} 无感染性, PG14^{RML} 接种健康鼠后, 接种鼠均发病; ② PG14^{spoon} 蛋白酶 K 抗性 (1 ~ 5 μ g/mL) 明显低于 PG14^{RML} (50 ~ 100 μ g/mL); ③ PG14^{spoon} 与 PG14^{RML} 聚集状态不同。大部分 PG14^{RML} 分子沉降系数 > 50S, 其中 30% PG14^{RML} 沉降系数 > 120S 相当于 200 个 PrP 分子的聚集体; 而 80% 的 PG14^{spoon} 分子沉降系数为 16 ~ 20S, 相当于 20 ~ 30 个 PrP 分子聚集; ④ PG14^{RML} 聚集体对尿素变性处理抗性更强, 在 3mol/L 尿素条件下, 仍有 30% 的 PG14^{RML} 未变性, 而 PG14^{spoon} 只剩下 5%。在 4mol/L 尿素条件下仍有 20% 的 PG14^{RML} 未变性。PG14^{RML} 被接种入脑组织中后将引起 PG14PrP 分子聚集, 这种聚集的发生与 PG14^{spoon} 引起的聚集在程度、聚集物状态方面有明显差异, 看来感染性 PrP 分子的产生需要体积大、紧密聚合的 PrP 寡聚物作为前提条件。这可能就是为什么 PG14^{spoon} 分子无感染性的原因^[21]。

5 PG14PrP 分子无跨膜形式

近年来, 有研究者认为存在一种异常的跨膜形式 PrP 分子, 在朊病毒病的致病过程中起到了关键的作用, 这种跨膜形式的 PrP 分子根据其跨膜形式不同而分为 CtmPrP 和 NtmPrP, 分别表示 C 端或 N 端朝胞膜外的跨膜形式 PrP 分子。细胞系和转基因鼠来源 PG14PrP 分子中均未检测到有任何形式的跨膜 PrP 分子存在, 说明八肽插入突变致病机制与跨膜形式 PrP 无关^[22]。

6 小结

综上所述, PrP 分子八肽重复区插入或缺失突变能引起人类遗传性 CJD、GSS 病的发生, 且八肽插入突变数目越多发病越早, 病程越短。对多八肽插

入突变家系进行调查后,发现家族中追溯至指示病例的曾祖母、父辈有神经疾病史,不过由于早期病例标本及相关临床病理资料缺乏,无法确诊为遗传性朊病毒病。

以目前发现病例中八肽重复区插入突变数目最多的 PG14PrP 分子作为研究对象,以表达鼠来源 MoPG14 的 CHO 细胞系、Tg(PG14)转基因鼠为研究模型,发现不论细胞系或转基因鼠来源 PG14PrP 分子均具有 PrP^{Sc} 分子的异常生化特征,转基因鼠临床症状、病理特征与人类病例相似。尽管目前细胞系、转基因动物模型是遗传性朊病毒病致病机制的理想实验平台,但 PG14^{spoon} 与 PG14^{RML} 在感染性、聚集性等朊病毒的重要特性方面仍具有很大差异,PG14^{spoon} 向 PrP^{Sc} 分子转化机制及遗传性朊病毒病的致病机制仍不明了。Tg(PG14) Bax^{-/-} 鼠中 Bax 基因敲除虽然明显抑制了颗粒细胞凋亡发生,但对转基因鼠的发病及病程无影响。这一结果为朊病毒病的药物治疗提出了新的启示,在进行抗凋亡药物治疗的同时,还应配合其他保护神经元及突触的药物。总之,八肽重复插入突变 PrP 分子细胞生物学、分子生物学、动物模型的研究为探讨 PrP^{Sc} 分子产生机制提供了一定的理论依据,对进一步揭示遗传性朊病毒病发病机制,进而揭示朊病毒病的致病机制必将起到促进作用。

参 考 文 献

- 1 Beck JA, Mead S, Campbell TA, et al. Two-octapeptide repeat deletion of prion protein associated with rapidly progressive dementia. *Neurology*, 2001, 57: 354 - 356.
- 2 Croes EA, Theuns J, Houwing-Duistermaat JJ, et al. Octapeptide repeat insertions in the prion protein gene and early onset dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2004, 75: 1166 - 1170.
- 3 Capellari S, Vital C, Parchi P, et al. Familial prion disease with a novel 144-bp insertion in the prion protein gene in a Basque family. *Neurology*, 1997, 49: 133 - 141.
- 4 Krasemann S, Zerr I, Weber T, et al. Prion disease associated with a novel nine octapeptide repeat insertion in the PRNP gene. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995, 34: 173 - 176.
- 5 Owen F, Poulter M, Collinge J, et al. A dementing illness associated with a novel insertion in the prion protein gene. *Brain Res Mol Brain Res*, 1992, 13: 155 - 157.
- 6 Oda T, Kitamoto T, Tateishi J, et al. Prion disease with 144 base pair insertion in a Japanese family line. *Acta Neuropathol*, 1995, 90: 80 - 86.
- 7 Nicholl D, Windl O, de Silva R, et al. Inherited Creutzfeldt-Jakob disease in a British family associated with a novel 144 base pair insertion of the prion protein gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1995, 58: 65 -

- 69.
- 8 Laplanche JL, Hachimi KH, Durieux I, et al. Prominent psychiatric features and early onset in an inherited prion disease with a new insertional mutation in the prion protein gene. *Brain*, 1999, 122: 2375 - 2386.
- 9 Ivanova L, Barmada S, Kummer T, et al. Mutant Prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2001, 276: 42409 - 42421.
- 10 Lehmann S, Harris DA. A mutant prion protein displays an aberrant membrane association when expressed in cultured cells. *J Biol Chem*, 1995, 270: 24589 - 24597.
- 11 Lehmann S, Harris DA. Mutant and infectious prion proteins display common biochemical properties in cultured cells. *J Biol Chem*, 1996, 271: 1633 - 1637.
- 12 Priola SA, Chesebro B. Abnormal properties of prion protein with insertional mutations in different cell types. *J Biol Chem*, 1998, 273: 11980 - 11985.
- 13 Gauczynski S, Krasemann S, Bodemer W, et al. Recombinant human prion protein mutants huPrP D178N/M129(FFI) and huPrP + 90R (fCJD) reveal proteinase K resistance. *J Cell Sci*, 2002, 115: 4025 - 4036.
- 14 Daude N, Lehmann S, Harris DA. Identification of intermediate steps in the conversion of a mutant prion protein to a scrapie-like form in cultured cells. *J Biol Chem*, 1997, 272: 11604 - 11612.
- 15 Harris DA. Cellular Biology of Prion Diseases. *Clin Microbiol Rev*, 1999, 12: 429 - 444.
- 16 Drisaldi B, Stewart RS, Adles C, et al. Mutant PrP is delayed in its exit from the Endoplasmic Reticulum, but neither wild-type nor mutant PrP undergoes retrotranslocation prior to proteasomal degradation. *J Biol Chem*, 2003, 278: 21732 - 21743.
- 17 Chiesa R, Piccardo P, Chetti B, et al. Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertion mutation. *Neuron*, 1998, 21: 1339 - 1351.
- 18 Chiesa R, Drisaldi B, Ouaglio E, et al. Accumulation of protease-resistant prion protein (PrP) and apoptosis of cerebellar granule cells in transgenic mice expressing a PrP insertional mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 5574 - 5579.
- 19 Chiesa R, Piccardo P, Dossena S, et al. Bax deletion prevents neuronal loss but not neurological symptoms in a transgenic model of inherited prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 238 - 243.
- 20 Brown P, Gibbs CJ Jr, Rodgers-Johnson P, et al. Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol*, 1994, 35: 513 - 529.
- 21 Chiesa R, Piccardo P, Ouaglio E, et al. Molecular distinction between pathogenic and infectious properties of the prion protein. *J Virol*, 2003, 77: 7611 - 7622.
- 22 Stewart RS, Harris DA. Most pathogenic mutations do not alter the membrane topology of the prion protein. *J Biol Chem*, 2001, 276: 2212 - 2220.

(收稿日期 2005-10-24)

(本文编辑 孙岩伟)