

人朊病毒蛋白及其突变体的溶剂可及性和模拟分析*

孙桂鸿^{1,2}, 郭明雄¹, 龚睿¹, 梅芳华¹, 万云莲³, 肖庚富^{1**}, 田波¹

(1. 武汉大学生命科学院, 湖北武汉 430072; 2. 武汉大学医学院, 湖北武汉 430071; 3. 湖北中医学院计算机室, 湖北武汉 430061)

Solvent Accessibility and Computer Modeling Analysis on the Native and the Mutants of Human Prion ProteinSUN Gui-hong^{1,2}, GUO Ming-xiong¹, GONG Rui¹, MEI Fang-hua¹, WAN Yun-lian³, XIAO Geng-fu^{1**}, TIAN Bo¹

(1. College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Medical College, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 3. Computer Room, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

Abstract: Prions are unprecedented infectious pathogens that cause a group of invariably fatal neurodegenerative diseases by an entirely novel mechanism. Prion diseases result from abnormally folded isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein (PrP^C). In order to investigate the molecular mechanisms of the conversion of PrP^C into PrP^{Sc}, we calculated the solvent accessibility of amino acid residues in native HuPrP and its single amino acid residual mutants, such as M166V, S170N, E200K and R220K. We also modeled structural overlaps of native PrP and its mutants, analyzed their root mean squared (RMS) deviations. Results showed that the local conformation is intensely different between the native PrP and its mutants owing to the variation of M166V etc. The single amino acid residual mutant not only lead to great changes of the solvent accessible surface area (SASA) and positions of part residues, but also influence the distribution of the protein surface charges. These changes may adapt well to the local surroundings of the secondary interactions. We also conclude that there is some difference between PrP and normal globular protein, indicating that PrP can't form a stable globular protein; it's only a folding intermediate.

Key words: Prion; Accessibility; Conformational stability; Structural superposition; RMS deviations

摘要: 朊病毒是一种全新类型的致病因子, 以一种全新的致病机制造成许多神经退化性疾病。它的致病性主要由于 PrP^C 向 PrP^{Sc} 构象转变而造成。为了探讨 PrP^C 向 PrP^{Sc} 转变过程中 PrP 分子构象变化的机制, 我们计算分析了人天然 PrP 分子及不同的单残基突变体 (如 M166V, S170N, E200K 和 R220K) 的氨基酸残基溶剂可及性, 并对天然 PrP 分子及其突变体进行了结构重叠模拟和 RMS 偏量分析。结果表明: 由于 166 位等单个残基的突变, 造成 PrP 突变体与天然蛋白的局部结构出现较大差别, 使得部分残基的溶剂可及表面积发生了较大变化, 并且部分残基改变了它们的位置, 同时也影响蛋白质表面的电荷分布, 这些改变是为了更好地适应次级相互作用的局部环境。分析表明 PrP 与一般球蛋白在性质上有一定的差异, 说明 PrP 分子并不是一种稳定的球蛋白结构, 只是一种折叠中间物。

关键词: 朊病毒; 可及性; 构象稳定性; 结构重叠; RMS 偏量

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)02-0158-05

朊病毒蛋白(Prion Protein, PrP)与可转移性海绵
脑病(Transmissible Spongiform Encephalopathies, TSEs)

密切相关, 如人的克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease,
CJD)、羊搔痒病(Scrapie)、牛海绵脑病(Bovine

收稿日期: 2003-09-12, 修回日期: 2003-09-24

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370054)

作者简介: 孙桂鸿 (1970-), 女, 湖北黄冈籍, 讲师, 博士生, 主要从事朊病毒生理功能及其致病机理的研究。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 027-87166272. E-mail: gxiao@whu.edu.cn

Spongiform Encephalopathy, BSE)等^[1,2]。“唯蛋白”假设认为, TSEs 的病因是细胞型 PrP(PrP^C)向致病型 PrP(PrP^{Sc})构象转变造成的^[3,4]。PrP^C 为一可溶性蛋白, 其 N 末端为无规卷曲的柔性尾巴, 而 C 端 125-228 位残基为一个球状结构域, 主要由 α 螺旋构成, 仅含有少量的 β 折叠^[5,6]; 结构模拟分析表明, PrP^{Sc} 是一个不可溶性蛋白, 主要由 β 折叠构成^[2,7]。但是, 对于 PrP^C 向 PrP^{Sc} 转变的机制, 目前仍不太清楚。

溶剂可及表面积(Solvent accessible surface area, SASA)是指溶剂即水分子所接触到的蛋白质表面^[8]。蛋白质表面溶剂可及性(Accessibility)是描述蛋白质疏水性的重要手段, 氨基酸残基的疏水性是影响蛋白质折叠的重要物理作用。通过 SASA 的计算, 可分析蛋白质和核酸的疏水自由能及其结构稳定性^[9-12]。迄今为止, 还未见通过 SASA 计算和结构重叠模拟分析朊蛋白的报道。

本工作计算了人朊病毒蛋白(Human Prion Protein, HuPrP)天然结构及其突变体的所有残基的 SASA, 分析了人朊病毒蛋白及其突变体疏水性变化和构象稳定性; 分别对 HuPrP 天然结构与突变体、HuPrP 突变体与鼠病毒朊蛋白(Murine PrP)和叙利亚仓鼠朊蛋白病毒(Syrian hamster PrP)进行了结构重叠研究。通过以下几个参数——可及表面积、包围残基的变化、RMS 偏量(Root mean squared deviations, RMSD)等计算与分析, 对突变前后 PrP 的构象变化进行了有益的探讨。

1 方法

1.1 蛋白质结构数据

从 PDB 数据库^[13]获取以下几种蛋白的结构数

据: HuPrP (PDB 代码为 1QM0)^[14]及其突变体 1E1J (M166V)^[15]、1E1S (S170N)^[15]、1FKC(E200K)^[16]、1E1W (R220K)^[15]和鼠朊蛋白(1AG2)^[17]、叙利亚仓鼠朊蛋白(1B10)^[15]。

1.2 SASA 的计算

利用 MSMS 软件^[18]计算 HuPrP 及其突变体所有原子和残基的 SASA。

1.3 包围残基的计算

以 α -C 原子代表蛋白质的氨基酸残基, 根据相应残基 α -C 原子的坐标, 利用 Swiss-PDB Viewer 软件^[19], 计算与突变残基之间距离小于 8 Å 的残基数。当氨基酸残基之间的距离小于 8 Å 时, 相互之间才有影响^[20]。

1.4 结构重叠模拟和 RMS 偏量分析

利用 Swiss-PDB Viewer 软件进行结构重叠模拟和计算 RMS 偏量。

2 结果

2.1 HuPrP 及其突变体氨基酸残基的溶剂可及性

根据文献^[21,22], 如果一个原子的相对可及性低于 5%, 那么该原子被认为是疏水的(埋藏的); 高于 5%, 则认为该原子是亲水的(暴露的)。我们计算和分析了 HuPrP 及其突变体的所有原子和残基的 SASA(文中未用图表显示), 计算结果表明: (1)第二、三个 α 螺旋的残基可及性呈现出有规则的两个残基 SASA 高、两个残基 SASA 低的起伏变化的特征, 而第一个 α 螺旋并无比较明显的规律; (2)四个突变位点 Met166、Ser170、Glu200、Arg220 的可及性均高于 5%, 即完全暴露在蛋白质表面。表 1 给出了几种蛋白质总的和平均 SASA。

表 1 分别处于埋藏和表面部位残基的总的和平均的溶剂可及表面积(Å²)

Table 1 The total and average SASA (Å²) in interior and surface parts

Protein code	Interior				Surface			
	%	SASA ^a	N ^b	SASA ^c	%	SASA ^a _{tot}	N ^b	SASA ^c
1QM0(Native)	19	37.0938	20	1.8547	81	6961.2581	84	82.8721
1E1J(M166V)	19	40.3346	20	2.0167	81	6951.6429	84	82.7577
1E1S(S170N)	17	37.8354	18	2.102	83	6729.5637	86	78.2507
1FKC(E220K)	14	36.0435	15	2.4029	86	7109.1272	92	77.2731
1E1W(R220K)	16	20.3831	17	1.199	84	7046.8343	87	80.9981
Average				1.9151				80.4303

a., The total SASA ; b, The interior or surface amino acid residues; c, Average SASA and % shows the percentage of the interior or surface amino acid residues.

我们将残基分为 SASA 低于 5%(埋藏)或高于 5%(暴露)两类。表 1 显示: 对于 HuPrP(1QM0), 19% 的残基为埋藏残基, 平均 SASA 为 1.8547, 81% 的残基为暴露残基, 平均 SASA 为 82.8721。对于

HuPrP 及其突变体, 总的来看, 14%-19% 的残基埋藏在蛋白质里面, 81%~86% 的残基暴露在外面, 平均 SASA 分别为 1.9151 和 80.4303。而一般球蛋白埋藏残基约为 31%, 暴露残基约为 69%, 平均

SASA 分别为 0.70、58.85^[10]。由此看出, PrP 与一般球蛋白在性质上有一定差异, 说明 HuPrP 不是一种稳定的球蛋白结构, 相对其它球蛋白, 更易发生构象转变, 这几种 HuPrP 突变体也不是一种稳定的球蛋白结构, 只是折叠中间物。这与 Nicholson 等推测的“H 交换后的 PrP 可能只是 PrP^{Sc} 形成过程中的一种折叠中间物”结论相符^[23], 同时也与 Capellari 等的推论“突变后的 PrP^C 经历一定的修饰后变成 PrP^{Sc}”相符^[24]。

2.2 HuPrP 不同位点突变对结构的影响

表 2 给出的是天然和突变体蛋白每一个突变位点的 8Å 范围内的包围残基。结果显示, 天然 PrP 分子 Met166、Ser170、Glu200、Arg220 残基分别有 6~9 个其它残基包围; 而经过氨基酸置换后, 虽然突变残基的少数相邻残基发生变化, 而大部分无变化, 但是却正是这少数包围残基的变化改变了相应残基的可及性。

表 2 天然和突变体中突变位点的 8Å 范围内的包围残基
Table 2 The surrounding residues within 8Å of mutant sites in native and mutant proteins

PDB code	Center residues	Surrounding residues
1QM0(Native)	Met166	Arg164, Pro165, Asp167, Glu168, Ser170, Glu221, Ser222
	Ser170	Met166, Asp167, Glu168, Tyr169, Asn171, Gln172, Asn174, Phe175
	Glu200	Phe198, Thr199, Thr201, Asp202, Val203, Lys204
	Arg220	Ile215, Thr216, Gln217, Tyr218, Glu219, Glu221, Ser222, Gln223, Ala224
1E1J(M166V)	Val166	Tyr169(Additional, with respect to Native), Glu221, Ser222 (Missed)
	Ser170	Pro165 (Additional)
	Glu200	No change
	Arg220	No change
1E1S(S170N)	Met166	Tyr169(Additional) Glu221, Ser222(Missed)
	Asn170	Pro165(Additional)
	Glu200	No change
	Arg220	Ile215 (Missed)
1FKC(E200K)	Met166	Ser222(Missed)
	Ser170	Asn174, Phe175 (Missed)
	Lys200	No change
	Arg220	Ile215(Missed)
1E1W (R220K)	Met166	Tyr169(Additional), Glu221(Missed)
	Ser170	No change
	Glu200	No change
	Lys220	Ile215(Missed)

表 3 显示, 在 166、170、200、220 位残基分别由 Met、Ser、Glu、Arg 突变为 Val、Asn、Lys、Lys 后, 有 3-6 个残基改变了它们的埋藏或暴露状态。特别应该注意的是: Pro158、Val176、Val180 和 Ile184, 这些残基本身为非极性氨基酸, 但它们却从原来的埋藏状态变成了暴露状态; 而 Asp147、His187, 它们本身为极性氨基酸, 却从原来的暴露状态变成了埋藏状态。说明由于单个残基的突变, PrP 的局部构象发生了非常大的变化。

从以上可以看到: 少数包围残基的变化, 以及残基埋藏或暴露状态的改变, 都说明有部分残基比较容易改变它们的位置, 而这种变化是为了更好地适应次级相互作用的局部环境。

2.3 天然 PrP 蛋白与突变 PrP 蛋白的结构重叠模拟及 RMS 偏量分析

利用 Swiss-PDB Viewer 软件, 我们对 HuPrP 天

表 3 PrP 分子氨基酸残基点突变后部分残基行为的改变

Table 3 The behavior of amino acid residues with point mutations

Protein code	Buried to surface	surface to Buried
1E1J(M166V)	Pro158, Asp202	Ile139, His187
1E1S(S170N)	Pro158, Val180, Thr191, Asp202	Asp147, Met154
1FKC(E200K)	Pro158, Val176, Val180, Ile184, Thr191	Tyr162
1E1W(R220K)	Val176, Asp202, Gln217	

然蛋白 1QM0 及其突变体 1E1J(M166V)、1E1S(S170N)、1FKC(E200K)和 1E1W(R220K)的整体结构进行了结构重叠(Superposition)模拟(彩版图 1-A、B、C、D), 并分别对模拟比较后的结构进行了 RMS 偏量分析(图 2- A、B、C、D)。另外, 由于 HuPrP 的 1E1J(M166V)和 1E1W(R220K)突变后的残基与鼠朊蛋白(1AG2)的相应残基(V166、K220)一致,

1E1S(S170N)突变后的残基与叙利亚仓鼠朊蛋白(1B10)的相应残基(N170)一致^[15], 因此, 我们也分别对 1A2 与 1E1J、1E1W 和 1B10 与 1E1S 进行了

结构重叠模拟(彩版图 1-E、F、G)及其 RMS 偏差分析(图 2-E、F、G)。

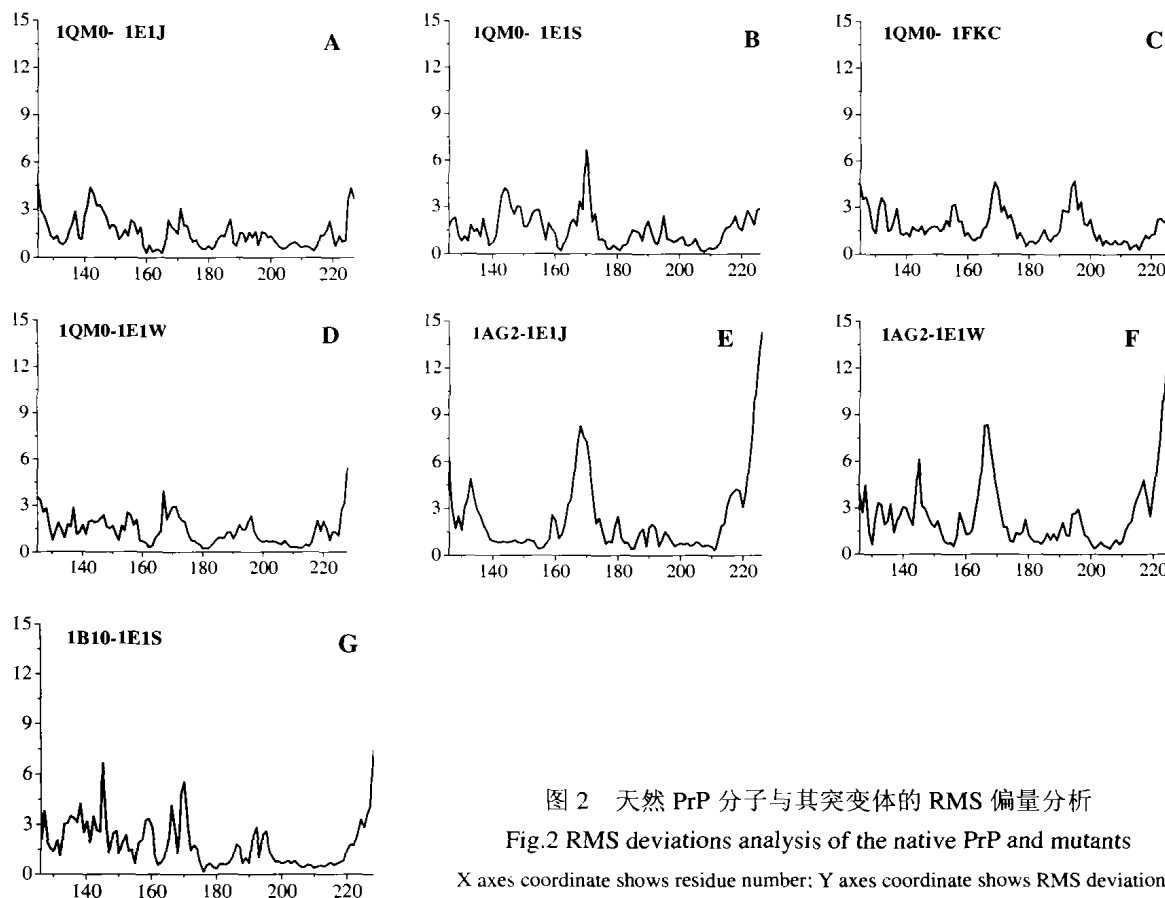


图 2 天然 PrP 分子与其突变体的 RMS 偏差分析

Fig.2 RMS deviations analysis of the native PrP and mutants

X axes coordinate shows residue number; Y axes coordinate shows RMS deviations.

RMS 偏差表示匹配氨基酸残基之间的平均背离度, RMS 偏差越低, 表示相匹配蛋白质氨基酸残基之间结构重叠的吻合度越高^[25]。从彩版图 1-A、B、D、F、G 中可以看到, 第一个 α 螺旋的重叠吻合度均不太好, 图 2 也显示相应 RMS 偏差均较高; 另外, 由于鼠朊蛋白分子的第三个 α 螺旋的 C 末端有一个明显的弯折, 因此, 它与 1E1J、1E1W 相应部位的结构重叠吻合得不好(彩版图 1-E、F)。

从图 2 显示的结果, 我们可以看到: (1)在图 2-A、B、C、D、E、F、G 中, 大约 166-172 位残基(相当于第一个 loop 环)之间, RMS 偏差均出现了一个非常明显的高峰区域, 这说明 PrP 分子中一旦有氨基酸残基突变或者出现可能造成构象变化的因素, 该区域表现最不稳定, 结构最容易发生变化; (2)对于第一个 α 螺旋, 相对位置约为 144-154 位残基, 它们的 RMS 偏差大都较高(图 2-C、E 除外), 特别是图 2-A、B、F、G; 但是, 在 PrP 的第二、三个 α 螺旋的部分残基, 约 178-185、200-215 位残基之间, RMS 偏差均出现了一个明显的低谷, 特别是

第三个 α 螺旋, 这说明氨基酸残基的突变, 对于第二、三个 α 螺旋不会造成比较明显的影响, 即该处可能相对是比较稳定的, 但第一个 α 螺旋有可能发生构象变化。Nicholson 等^[23]利用 H 原子交换的实验数据证实, 残基 179、181(位于第二个 α 螺旋)和 214、215、216、218、219(位于第三个 α 螺旋)处于一种过保护(super protection)状态, 而第一个 α 螺旋中, 仅有一个 151 位残基处于过保护状态, 这种非正常的过保护状态可能反应了从 PrP^C 转变为 PrP^{Sc} 过程中的某种重要结构特征, 也许, 上述的低谷正是这种重要结构特征的反映; (3)对于 1E1J(M166V)、1E1S(S170N)、1FKC(E200K)、1E1W(R220K), 分别经过突变后, 受影响最大的可能分别是: 第一个 α 螺旋、第一个 α 螺旋和 166-172 位残基的 loop 环、166-172 位残基的 loop 环和第二、三个 α 螺旋之间的 loop 环、166-172 位残基的 loop 环。这说明 loop 环具有很高的种间变异性, 暗示它与朊病毒疾病感染的种间屏障密切相关; 同时, 这也许与蛋白质 X 结合有关, 而蛋白质 X 可能是促成 PrP^C 向 PrP^{Sc} 构

象转变的分子伴侣^[2]。

3 讨论

人 PrP 的天然蛋白及其突变体的溶剂可及性研究和结构重叠模拟分析, 为研究 PrP^C 向 PrP^{Sc} 转变过程中的折叠、构象稳定提供了一些重要的信息:

(1) 由于氨基酸残基的突变, 虽然围绕中心残基的残基群大都基本保持了原有位置, 但一些残基的溶剂可及表面积发生了变化; (2) 由此造成了突变后 PrP 的局部结构(如 166-172 位残基的 loop 环、第一个 α 螺旋等)与天然蛋白出现了较大的区别; (3) 部分残基比较容易改变它们的位置, 以适应次级相互作用的局部环境; (4) 氨基酸残基的突变, 改变了蛋白质分子可及性, 导致蛋白质表面的电荷分布发生了较大变化, 从而有可能改变 PrP 与其它分子或细胞膜的作用能力; (5) 突变后的 PrP 与一般球蛋白有一定的差异, 说明突变后的 HuPrP 并不是一种稳定的球蛋白结构, 而只是 PrP^{Sc} 形成过程中的一种折叠中间物。这些理论数据将为我们进一步的实验验证提供有益的帮助。

参考文献

- [1] Prusiner S B. Novel proteinaceous particles cause scrapie [J]. *Science*, 1982, 216(4542): 136-144.
- [2] Prusiner S B. Prions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23): 13363-13383.
- [3] Alper T, Cramp W A, Haig D A, *et al*. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid [J]. *Nature*, 1967, 214(90): 764-766.
- [4] Griffith J S. Self-replication and scrapie [J]. *Nature*, 1967, 215(105): 1043-1044.
- [5] James T L, Liu H, Ulyanov N B, *et al*. Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(19): 10086-10091.
- [6] Donne D G, Viles J H, Groth D, *et al*. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(25): 13452-13457.
- [7] Huang Z, Prusiner S B, Cohen F E. Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment [J]. *Fold Des*, 1996, 1(1): 13-19.
- [8] Lee B, Richards F M. The interpretation of protein structure: Estimation of static accessibility [J]. *J Mol Biol*, 1971, 55(3): 379-400.
- [9] Rose G D, Geselowitz A R, Lesser G J, *et al*. Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins [J]. *Science*, 1985, 229(4716): 834-838.
- [10] Miller S, Janin J, Lesk A M, *et al*. Interior and surface monomeric proteins [J]. *J Mol Biol*, 1987, 196(3): 641-656.
- [11] Raghunathan G, Jernigan R L, Ting K L, *et al*. Solvation effects on the sequence variability of DNA double helical conformations [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 1990, 8(1): 187-198.
- [12] Ponnuswamy P K, Gromiha M M. On the conformational stability of folder proteins[J]. *J Theor Biol*, 1994, 166(1): 63-74.
- [13] Berman H M, Westbrook J, Feng Z, *et al*. The protein data bank [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 235-242.
- [14] Zahn R, Liu A Z, Luhrs T, *et al*. NMR solution structure of the human prion protein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(1): 145-150.
- [15] Calzolari L, Lysek D A, Guntert P, *et al*. NMR structures of three single-residue variants of the human prion protein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(15): 8340-8345.
- [16] Zhang Y B, Swietnicki W, Zagorski M G, *et al*. Solution structure of the E200K variant of human prion protein (Implications for the mechanism of pathogenesis in familial prion diseases) [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(43): 33650-33654.
- [17] Riek R, Hornemann S, Wider G, *et al*. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231) [J]. *Nature*, 1996, 382(6587): 180-182.
- [18] Sanner M F, Olson A J, Spehner J C. Reduced surface: an efficient way to compute molecule surfaces [J]. *Biopolymers*, 1996, 38(3): 305-320.
- [19] Kaplan W, Littlejohn T G. Swiss-PDB Viewer (Deep View) [J]. *Brief Bioinform*, 2001, 2(2): 195-197.
- [20] Manavalan P, Ponnuswamy P K. Hydrophobic character of amino acid residues in globular proteins [J]. *Nature*, 1978, 275(5681): 673-674.
- [21] Chothia C. The nature of the accessible and buried surfaces in proteins [J]. *J Mol Biol*, 1976, 105(1): 1-12.
- [22] Janin J, Miller S, Chothia C. Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins [J]. *J Mol Biol*, 1988, 204(1): 155-164.
- [23] Nicholson E M, Mo H P, Prusiner S B, *et al*. Differences between the Prion Protein and its Homology Doppel: A Partially Structured State with Implications for Scrapie Formation [J]. *J Mol Biol*, 2002, 316(3): 807-815.
- [24] Capellari S, Parchi P, Russo C M, *et al*. Effect of the E200K mutation on prion protein metabolism (Comparative study of a cell model and human brain) [J]. *American Journal of Pathology*, 2000, 157(2): 613-622.
- [25] Kini R M, Evans H J. Comparison of protein models minimized by the all-atom and united-atom models in the AMBER force field: correlation of RMS deviation with the crystallographic R factor and size [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 1992, 10(2): 265-279.

彩 版

孙桂鸿, 等. 人朊病毒蛋白及其突变体的溶剂可及性和模拟分析 (正文见第158页)

