

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra genetiky a mikrobiologie

PRIONY

Bakalářská práce

Zdeňka Sněhotová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně, s použitím veškeré citované literatury. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejňováním.

V Praze dne 22. 4. 2007

.....

Zdeňka Sněhotová

ABSTRAKT

Priony jsou infekční patogeny, jež způsobují smrtelná neurodegenerativní onemocnění savců, tzv. transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE). Smutně proslulými TSE jsou zejména bovinní spongiformní encefalopatie (BSE, „nemoc šílených krav“), scrapie ovcí a Creutzfeldt-Jakobova choroba (CJD) lidí. Prionové choroby jsou charakterizovány akumulací abnormální izoformy prionového proteinu (PrP^{Sc}) v centrální nervové soustavě infikovaných jedinců. Výzkum prionů je soustředěn na zkoumání mechanismu změny konformace prionového proteinu (PrP) z normální, buněčné izoformy (PrP^C) na abnormální izoformu (PrP^{Sc}) a hledání nových strategií v prevenci a léčbě TSE.

Tato práce je literárním přehledem, jenž si klade za cíl shrnout dosavadní poznatky a hypotézy týkající se prionového proteinu. V práci je shrnuta nomenklatura izoform prionového proteinu a uvedena klasifikace prionových chorob. Problematika prionů je zde nazírána převážně z pohledu, dnes mezi vědci nejuznávanější, prionové teorie. Zmíněny jsou však i alternativní hypotézy: hypotéza neznámého viru a „virino“ hypotéza. Nastíněn je též fenomén prionů u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a houby *Podospora anserina*.

Klíčová slova:

prion, prionový protein (PrP), struktura a funkce prionů, prionová teorie, prionové choroby, transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE), Creutzfeldt-Jakobova choroba (CJD), bovinní spongiformní encefalopatie (BSE), scrapie, priony kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a houby *Podospora anserina*

ABSTRACT

Prions are infectious pathogens that cause a group of fatal neurodegenerative diseases in mammals, so-called transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). Bovine spongiform encephalopathy (BSE), scrapie of sheep, and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) of human belong to the most notable prion diseases. TSEs are characterized by the accumulation of an abnormal isoform of the prion protein (PrP^{Sc}) in the central nervous system of infected individuals. The research on prions is focused on understanding of the mechanism of prion protein (PrP) conversion from the normal, cellular isoform (PrP^C) to the abnormal isoform (PrP^{Sc}). Such information should open up new approaches to both prevention and therapy of TSEs.

This work is a review aimed at summarizing the up-to-date knowledge and hypothesis concerning the prion protein. In this work, I have brought together the information about the nomenclature of PrP isoforms and the classification of prion diseases. Prions are presented in the view of the most plausible prion theory. The virino hypothesis and the unknown conventional virus hypothesis are noticed too. The phenomenon of prions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Podospora anserina* is mentioned.

Keywords:

prion, prion protein (PrP), structure and function of prions, prion theory, prion diseases, transmissible spongiform encephalopathy (TSE), Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), bovine spongiform encephalopathy (BSE), scrapie, prions of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Podospora anserina*

OBSAH

Seznam zkratk.....	5
1 Úvod.....	6
2 Historie, hypotézy o původci TSE.....	7
3 Prionový protein (PrP).....	9
3.1 Nomenklatura izoform PrP.....	9
3.2 Struktura a vlastnosti PrP ^C	10
3.3 Biosyntéza a vnitrobuněčný transport PrP ^C	12
3.4 Výskyt PrP ^C	14
3.5 Funkce PrP ^C	14
3.6 Struktura a vlastnosti PrP ^{Sc}	15
4 Prionová teorie.....	17
4.1 Patogeneze TSE – úloha PrP ^C a PrP ^{Sc} ; minipriony.....	17
4.2 Základní činnost PrP ^{Sc} – změna konformace PrP ^C v konformaci PrP ^{Sc}	18
4.3 Modely „sebepublikace“ prionů.....	18
4.4 Mechanismus přeměny PrP ^C PrP ^{Sc}	20
4.5 Místo přeměny PrP ^C v PrP ^{Sc}	21
5 Transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE).....	24
5.1 Charakteristika TSE.....	24
5.2 Přenos TSE – způsoby nákazy a její šíření.....	25
5.3 Mezidruhová bariéra a vCJD.....	26
5.4 Klasifikace TSE.....	27
5.5 Prionové kmeny.....	29
6 Priony kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a houby <i>Podospora anserina</i>	31
6.1 Kvasinkový protein Sup35p.....	32
7 Závěr.....	33
Použitá literatura.....	35

SEZNAM ZKRATEK

AMK	aminokyselina, resp. aminokyseliny
CNS	centrální nervová soustava
Dpl	Doppel protein
ER	endoplazmatické retikulum
GA	Golgiho aparát
GPI kotva	glykosylphosphatidylinositolová kotva
PK	proteináza K
PrP	prionový protein
PrP ^C	buněčný prionový protein, normální izoforma prionového proteinu
PrP ^{res}	abnormální izoforma prionového proteinu vytvořená in vitro
PrP ^{Sc}	přírozeně vzniklá abnormální izoforma prionového proteinu související s TSE
TSE	transmisivní spongiformní encefalopatie

Aminokyseliny:

Gly (G)	glycin	Met (M)	methionin
Ala (A)	alanin	Asp (D)	kyselina asparagová
Val (V)	valin	Glu (E)	kyselina glutamová
Leu (L)	leucin	Asn (N)	asparagin
Ile (I)	isoleucin	Gln (Q)	glutamin
Phe (F)	fenylalanin	Lys (K)	lysin
Ser (S)	serin	Arg (R)	arginin
Thr (T)	threonin	His (H)	histidin
Tyr (Y)	tyrosin	Trp (W)	tryptofan
Cys (C)	cystein	Pro (P)	prolin

Zkratky jednotlivých prionových onemocnění jsou uvedeny v kapitole 5.4 Klasifikace TSE (tab. 1) a také vysvětleny při prvním použití v textu.

1 ÚVOD

Již v 18. století bylo v Anglii známo onemocnění ovčí zvané scrapie, projevující se poruchami chůze a rovnováhy a nesnesitelným svěděním kůže, na něž zvířata reagují intenzivním drbáním. Od té doby bylo rozpoznáno mnoho dalších, zřídka se vyskytujících, přenosných, smrtelných, neurodegenerativních onemocnění některých druhů zvířat (zejména domestikovaných savců) i člověka, sdružovaných do skupiny chorob nazývaných transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE) (viz kap. 5 Transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE)). V posledních dvaceti letech dosáhly TSE zvýšeného zájmu médií a to zejména díky výskytu bovinní spongiformní encefalopatie (BSE), zvané též „nemoc šílených krav“. Kvůli možnému přenosu nemoci ze skotu na člověka BSE silně ovlivnila zdravotnictví, hospodářství, ekonomiku i politiku Evropy. Severní Amerika byla ušetřena epidemií BSE, avšak vzrůstá zde znepokojení způsobené vysokým výskytem „chronic wasting disease“ (CWD, chronická vysilující choroba, nemoc chronického vyčerpání) u jelenů a losů žijících jak v divočině, tak chovaných v zajetí (Chesebro, 2003).

TSE jsou aktuálním problémem, proto jsem se rozhodla věnovat molekulární podstatě (zejména popisu původce) těchto onemocnění svou bakalářskou práci. Ačkoliv se objevilo mnoho hypotéz, jež se pokoušely vysvětlit patogenezi a charakterizovat původce TSE (viz kap. 2 Historie, hypotézy o původci TSE), většina současných výsledků molekulární biologie a experimentů s transgenními organizmy podporuje tzv. prionovou teorii. Z tohoto důvodu bývají TSE často označovány jako prionové choroby (Liemann a Glockshuber, 1998). Prionovou teorii formuloval americký neurolog a biochemik Stanley B. Prusiner, který roku 1982, po první úspěšné purifikaci infekčního agens z mozku křečka infikovaného scrapie, představil termín prion (Prusiner, 1982). Priony byly definovány jako infekční částice postrádající nukleovou kyselinu, složené převážně (pokud ne úplně) z konformačně upraveného normálního buněčného prionového proteinu (viz kap. 3 Prionový protein (PrP)) (Prusiner, 1998).

Jak již název této práce napovídá, i já nahlížím na kontroverzní problematiku TSE převážně z pohledu radikálních názorů Stanleyho B. Prusinera. Hlavním cílem mé práce je shrnout dosavadní poznatky a hypotézy týkající se prionového proteinu a jeho úlohy v patogenezi TSE; přiblížím prionovou teorii, charakterizuji TSE, uvedu přehled prionových chorob a zmíním se o fenoménu prionových kmenů. Nakonec nastíním dnešní obecnější chápání pojmu prion, když představím priony kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a houby *Podospora anserina*, které mohou být, na rozdíl od prionů savců, pro své hostitele prospěšné.

2 HISTORIE, HYPOTÉZY O PŮVODCI TSE

Na Islandu roku 1954 vytvořil Bjorn Sigurdsson termín „pomalé virové infekce“, aby jím charakterizoval onemocnění ovčí scrapie a visnu¹, jež se projevují dlouhou latentní periodou mezi nákazou a propuknutím nemoci (Sigurdsson, 1954). O pět let později, na základě mikroskopických pozorování, přišel William Hadlow s tím, že „pomalý virus“ je též příčinou kuru, nemoci, kterou trpěli domorodci na Nové Guineji. Hadlow si totiž všiml podobnosti mezi patologickými obrazy centrální nervové soustavy (CNS) ovčí infikovaných scrapie a domorodců nakažených kuru (Hadlow, 1959). Díky podobným pozorováním zařadil Igor Klatzo mezi choroby způsobované „pomalými viry“ i Creutzfeldt-Jakobovu chorobu (CJD) (Klatzo *et al.*, 1959).

V letech 1966–1967 zjistil kolektiv vědců vedený Tikvahem Alperem, že původce scrapie je extrémně rezistentní k inaktivaci působením UV a ionizujícího záření. Tato radiobiologická data vyvolala proud hypotéz týkajících se chemického složení původce scrapie. Návrhy sahaly od malých DNA virů po membránové fragmenty, polysacharidy nebo proteiny (Prusiner, 1998). Roku 1967 Alper navrhl, že by původce scrapie mohl postrádat nukleovou kyselinu (Alper *et al.*, 1967). Téhož roku formuloval John S. Griffith „protein only“ hypotézu, jež předpokládá, že se původce scrapie skládá pouze z proteinu, a navrhuje možný mechanismus jeho samoreplikace (Griffith, 1967).

Roku 1972, zaujat případem pacienta umírajícího na CJD, se o záhadného původce scrapie začal zajímat Stanley B. Prusiner. Prusiner přišel na to, že infekčnost scrapie může být snížena postupy, které hydrolyzují nebo modifikují proteiny; postupy měnící nukleovou kyselinu byly neúčinné. Cestou purifikace infekčního agens se Prusiner roku 1982 dostal až k určení molekulární struktury původce scrapie – makromolekule proteinu, který pojmenoval prion (Prusiner, 1982). Název prion byl vytvořen přesmyčkou z anglického *proteinaceous infectious particle*, aby odlišil toto nové agens od tradičních patogenů (jakými jsou např. bakterie, viry nebo viroidy) a zdůraznil požadavek proteinu pro infekci (Liemann a Glockshuber, 1998). Prusiner vytvořil prionovou teorii (viz kap. 4 Prionová teorie), podle které je jedinou známou složkou infekční prionové částice abnormální izoforma prionového proteinu (PrP^{Sc}), jež má schopnost vyvolávat onemocnění zakódováno ve své terciární struktuře (Dormont, 2002). Prion je unikátním patogenem, který postrádá nukleovou kyselinu a díky zcela novému mechanismu způsobuje smrtelná neurodegenerativní onemocnění – transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE)

¹ Bylo prokázáno, že původce visny, na rozdíl od původce scrapie, patří mezi retroviry (Georgsson *et al.*, 1991).

(Prusiner, 1998). Za výzkum prionových onemocnění získal Stanley B. Prusiner roku 1997 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství.

Mezi další hypotézy pokoušející se vysvětlit patogenezi a charakterizovat původce TSE patří např. „virino“ hypotéza či hypotéza neznámého viru (Dormont, 2002). Podle „virino“ hypotézy se původce TSE skládá z nukleové kyseliny, která kóduje geny jen pro jeho vlastní replikaci a je obklopena prionovým proteinem kódovaným hostitelem (Dormont, 2002). V purifikovaných vzorcích scrapie se sice našly malé molekuly nukleové kyseliny, což by mohlo podporovat virovou (i „virino“) hypotézu, nepodařilo se však identifikovat neporušenou molekulu nukleové kyseliny velikosti virového genomu. Přítomnost viru u TSE nelze vyloučit na základě rezistence vzorku k inaktivaci působením tepla a kyselin – byly objeveny bakteriální viry žijící v kyselých geotermálních pramenech při pH 1,0 a teplotách vyšších než 93 °C, což změnilo smýšlení o schopnosti virů přežít a replikovat se za extrémních podmínek. Jednou z námitek proti viru jako původci TSE je jeho nejasná úloha u dědičných TSE. Virovou hypotézu, jako jednu z možností vysvětlení původu TSE, je těžké dokázat nebo vyvrátit. Protože neexistují přímé důkazy pro její podporu, je v současnosti většinou vědců považována za málo pravděpodobnou. (Chesebro, 2003)

3 PRIONOVÝ PROTEIN (PrP)

Prusinerův objev prionového proteinu (PrP) v 80. letech 20. století významně urychlil poznávání biologie a patogeneze TSE. PrP je glykoprotein, jehož izoforma nazývaná buněčný prionový protein (PrP^C) je normální součástí živočišných těl. PrP však může existovat také ve formě abnormálního konformačního izomeru (PrP^{Sc}), který je infekční a u savců patrně způsobuje TSE (Clarke *et al.*, 2001). Pozoruhodné je, že ačkoliv mají obě izoformy PrP identickou sekvenci aminokyselin (AMK), liší se svými sekundárními a terciárními strukturami (Armstrong, 2006).

3.1 Nomenklatura izoforem PrP

V průběhu vývoje názorů na TSE se objevovala různá označení (zejména abnormální izoformy) prionového proteinu a ani v současnosti není zavedena jednotná, závazná a jednoznačná nomenklatura izoforem PrP.

Buněčný prionový protein bývá označován PrP^C (*Cellular Prion Protein*); zřídka se objevuje též označení PrP^{sen}, protože je senzitivní k působení proteáz (*protease-sensitive*). Pro abnormální izoformu PrP se v literatuře nejčastěji objevují označení PrP^{Sc} a PrP^{res}.

PrP^{Sc} je zkratkovým slovem původně označujícím abnormální konformery PrP, které byly nalezeny ve frakcích mozku křečka infikovaného Scrapie (Prusiner, 1982). Ve většině prací se však tento pojem používá k obecnému označení abnormální izoformy PrP, jež souvisí s kterýmkoliv z onemocnění sdružovaných pod zkratkou TSE. Například Lawson *et al.* (2005) definují PrP^{Sc} jako k proteázám rezistentní izoformu PrP, jež přímo souvisí s některou TSE a nachází se zejména v CNS infikovaného jedince.

Označení PrP^{res} vypovídá o rezistenci abnormálních konformerů k působení proteáz (*protease-resistant*). Některými autory (např. Chesebro, 2003; Collins *et al.*, 2004) je chápáno jako pojem nadřazený všem transmisivním spongiformním encefalopatiím, užívaný pro označení jak přirozených, tak uměle vytvořených abnormálních konformerů PrP. Collins *et al.* (2004) uvádějí, že PrP^{res} je všeobecně použitelný termín označující abnormální konformery prionového proteinu, jež souvisí např. se scrapie nebo CJD, pro něž je možné též označení PrP^{Sc} či PrP^{CJD}. Chesebro (2003) dle onemocnění, které daný PrP^{res} způsobuje, navrhuje označení abnormálního konformeru PrP^{Sc} pro scrapie, PrP^{CJD} pro CJD nebo PrP^{BSE} pro BSE. Naproti tomu jiní autoři

(např. Lawson *et al.*, 2005) pomocí PrP^{res} označují pouze izoformy PrP vytvořené *in vitro*, které nemusí být nutně infekční.

Brown a Cervenakova (2005) ve svém článku „A prion lexicon (out of control)“ kriticky hodnotí vývoj terminologie a navrhují univerzální označení PrP^{TSE} pro konformery spjaté s jakýmkoliv onemocněním ze skupiny TSE. Informují také o nedávném návrhu zkratkového slova PrP^{sc}, jakožto označení pro „disease-causing“ izoformu PrP.

Ve své práci budu buněčný PrP označovat PrP^C. Pro přirozeně vzniklou abnormální izoformu PrP související s TSE budu používat označení PrP^{Sc} a zkratkovým slovem PrP^{res} budu označovat abnormální konformery vytvořené uměle. Rozhodla jsem se tak zejména proto, že takováto nomenklatura se nejčastěji vyskytuje v publikované literatuře. Ve snaze o zachování názvoslovné jednotnosti této práce a pro snazší orientaci čtenáře v textu budou zkratková slova PrP^C, PrP^{Sc} a PrP^{res} použita i tam, kde byla v citované literatuře užita jiná označení, jež uvedu v závorce.

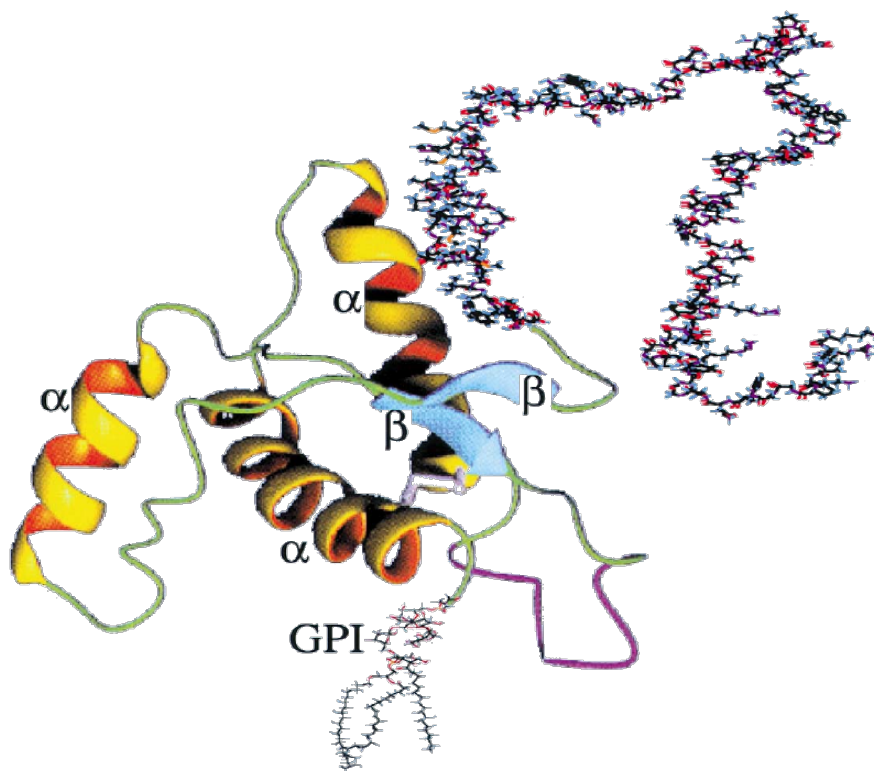
3.2 Struktura a vlastnosti PrP^C

PrP^C je monomerní, glykosylovaný protein o molekulové hmotnosti 33–35 kDa (Bousset a Melki, 2002). Pomocí glykosylphosphatidylinositolové (GPI) kotvy je uchycený v plazmatické membráně (Eghiaian, 2005). PrP^C je rozpustný v detergentech a senzitivní k působení proteáz (Liemann a Glockshuber, 1998).

PrP^C je kódovaný genem PRNP, což je malý „housekeeping“ gen ležící u člověka na krátkém rameni 20. chromozomu (Prusiner, 1998). Myši mají gen pro PrP uložený na 2. chromozomu. Gen PRNP má jen 3 exony a úplný otevřený čtecí rámec leží v jednom z nich (Collins *et al.*, 2004). U lidí projevuje gen pro PrP polymorfismus na kodónu 129 – zakódován může být buď valin nebo methionin; 50 % populace jsou homozygoti. Homozygotnost na kodónu 129 je spojována s náchylností ke sporadické, iatrogenní a variantní CJD (Domont, 2002).

PrP^C je syntetizován jako polypeptidový řetězec s 253 aminokyselinami (AMK) u lidí (Collins *et al.*, 2004) a 254 AMK u hlodavců (Prusiner, 1998). Sekvence AMK je v PrP^C savců vysoce konzervována (Zahn, 2003). Mezi zbytky 51–91 se u člověka normálně nachází nonapeptid (51–59: PQGGGGWGQ), následovaný čtyřmi charakteristickými, opakujícími se oktapeptidy (60–91: PHGGGWGQ) (Zahn, 2003). Větší počet kopií oktapeptidů může vzniknout mutacemi a souvisí s dědičnými TSE (viz kap. 5.4 Klasifikace TSE). Různé živočišné druhy mohou mít různý počet kopií oktapeptidů.

Metody Fourierovy transformační infračervené spektroskopie a cirkulárního dichroizmu prokázaly, že PrP^C má vysoce helikální uspořádání (kolem 40 %) a jen malou část (asi 3 %) tvoří β -skládaný list (Prusiner, 1998). Nukleární magnetická rezonance ukázala, že rekombinantní PrP myši, křečka a člověka mají podobnou strukturu. PrP^C sestává z globulární domény (zbytky 121–231 u křečka, resp. 121–230 u člověka) a dlouhého flexibilního N-konce (zbytky 23–120). Globulární doména se skládá ze tří α -helixů (H1–3; H2–H3 jsou spojené disulfidickým můstkem Cys179–Cys214) a dvou krátkých antiparalelních vláken β -skládaného listu (viz obr. 1 a obr. 2) (Liemann a Glockshuber, 1998). Konformace neuspořádaného N-konce závisí na biofyzikálních parametrech prostředí (Zahn, 2003).



Obrázek 1: 3D struktura PrP^C. Molekula PrP^C obsahuje tři α -helixy (označeny α) a krátkou oblast antiparalelního β -skládaného listu (β). Pomocí glykosylphosphatidylinositolové kotvy (GPI) je prionový protein uchycený v plazmatické membráně. Převzato z Dormont (2002).

Krystalografické studie podporují tuto strukturu monomeru. Ve formě dimeru však dochází k neobvyklému přesunu části řetězce helixu tři a přemístění disulfidické vazby, což má za následek tvorbu nové krátké oblasti antiparalelního β -listu. Oligomerizace by proto mohla být důležitým krokem při přeměně PrP^C v PrP^{Sc} a vzniku TSE (viz kap. 4.1 Patogeneze TSE – úloha PrP^C a PrP^{Sc}; minipriony). (Knaus *et al.*, 2001)

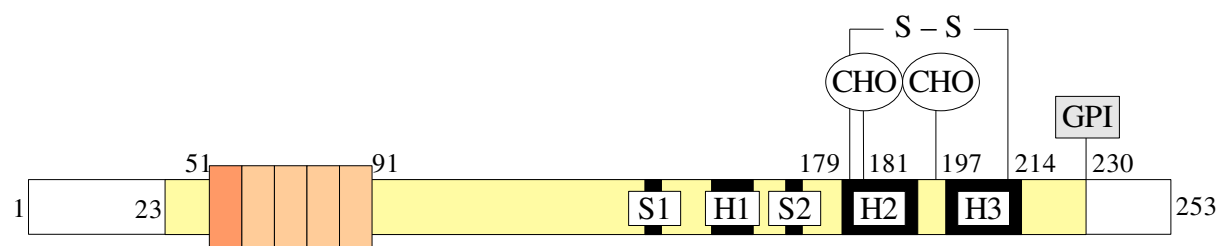
Zatím byl nalezen pouze jeden protein, který je strukturně podobný PrP^C. Jedná se o Doppel protein (Dpl) a zkoumá se, jaký je funkční vztah mezi ním a PrP^C. Dpl při nadprodukci indukuje v mozku transgenních myší neuropatologii, jíž lze potlačit působením PrP(23–231). Dpl nemá (na rozdíl od PrP^C) vliv na tvorbu PrP^{Sc} a postup prionového onemocnění, zdá se však, že je nezbytný pro spermatogenezi. (Behrens, 2003)

3.3 Biosyntéza a vnitrobuněčný transport PrP^C

PrP^C je, stejně jako jiné membránové proteiny, syntetizován na ribosomech drsného endoplazmatického retikula (ER). Signálním peptidem je nasměrován do lumen ER (Collins *et al.*, 2004), kde dle Prusiner (1989) dochází k následujícím posttranslačním modifikacím:

- ♦ odštěpení signálního peptidu (tj. 22 N-koncových AMK),
- ♦ tvorbě disulfidického můstku – u člověka oxidací páru cysteinových zbytků 179 a 214 (Zahn, 2003),
- ♦ N-glykosylaci jednoduchými oligosacharidy – u člověka a syrského křečka na zbytcích AMK Asn181 a Asn197 (Zuegg a Gready, 2000),
- ♦ připojení GPI kotvy k C-konci – u člověka k Ser230 (Collins *et al.*, 2004), u křečka k Ser231 (Prusiner, 1998),
- ♦ odštěpení C-koncového hydrofobního peptidu (tj. 23 C-koncových AMK).

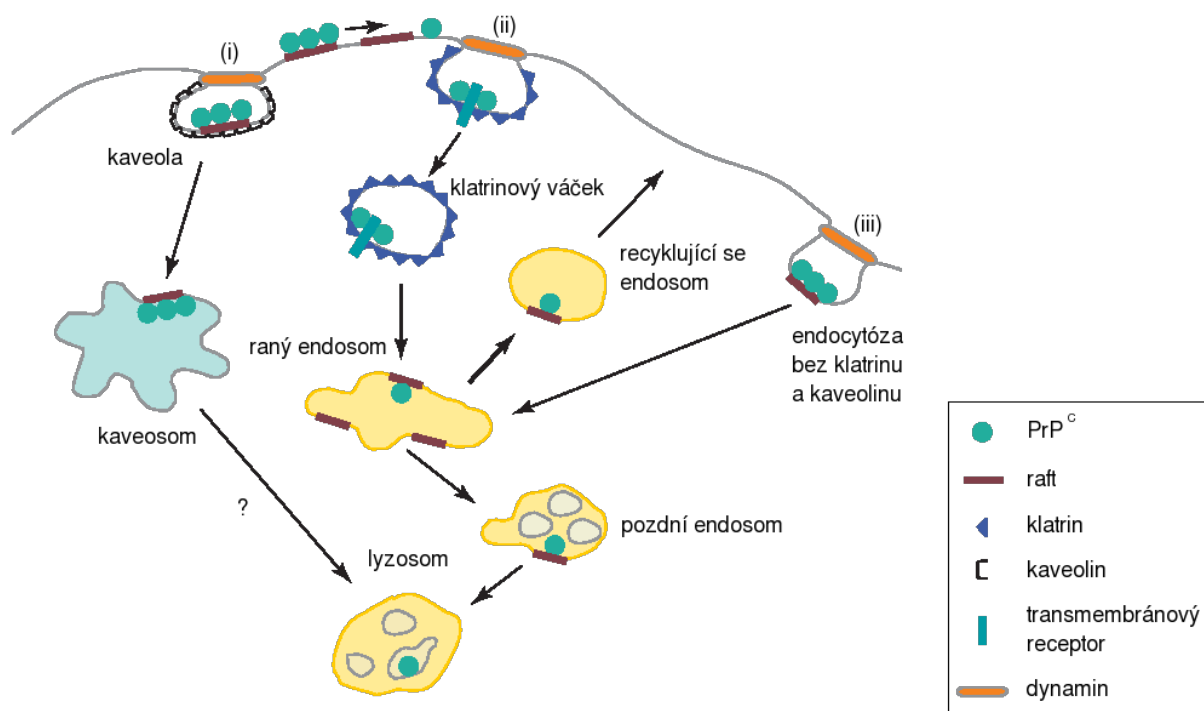
Po úpravě N- a C-konce sestává PrP křečka z 209 AMK (Prusiner, 1998). V ER je kontrolována i správnost složení – chybně svinutý nebo mutantní PrP je transportován do cytosolu a částečně degradován proteasomem.



Obrázek 2: Schéma primární struktury lidského PrP. Prekurzor PrP zahrnuje 253 AMK. Signální sekvence (N-koncové zbytky 1–22) je odštěpena v ER, 23 C-koncových zbytků je nahrazeno GPI kotvou. Výsledný PrP(23–230) je znázorněn žlutou barvou. N-koncová oblast (zbytky 51–91) obvykle obsahuje nonapeptid následovaný čtyřmi identickými oktapeptidy (znázorněno jedním tmavě a čtyřmi světle oranžovými obdélníčky). Sekundární struktury jsou prezentovány černými obdélníčky (H1–3 = α -heli-xy; S1, S2 = β -skládaný list). V C-koncové části PrP se nachází dvě místa N-glykosylace označená CHO (Asn181, Asn197) a disulfidická vazba S–S (Cys179–Cys214). Nakresleno podle Liemann a Glockshuber (1998) a Zahn (2003).

Poté, co je v ER zkontrolována kvalita PrP^C, cestuje přes Golgiho aparát (GA) k povrchu buňky. Díky GPI kotvě a N-konci molekuly se na buněčném povrchu stává součástí membránových mikrodomén (tzv. „rafts“, rafty). Tyto k detergentu rezistentní mikrodomény plazmatické membrány jsou obohaceny nasycenými fosfolipidy, sfingoglykolipidy, cholesterolem a některými bílkovinami (např. kaveoliny) a zapojují se do receptorové signalizace. Jsou důležité pro správné složení PrP^C, a proto by mohly hrát významnou roli v tvorbě PrP^{Sc} (viz kap. 4.5 Místo přeměny PrP^C v PrP^{Sc}). (Campana *et al.*, 2005)

PrP^C se pohybuje mezi buněčným povrchem a endocytickými kompartmenty, a to buď standardně přes klatrinové váčky (Harris, 2003), nebo díky váčkům odvozeným od kaveol². Hlavní způsob internalizace PrP^C je u nervových buněk patrně spojený s klatrinem. Internalizace zprostředkovaná váčky odvozenými od kaveol byla pozorována jen u speciálních buněk (např. buněk vaječníků čínské křečka, které exprimují kaveolin-1). Byla též navržena endocytická cesta nespojující ani s klatrinem, ani s kaveolinem. (Campana *et al.*, 2005)



Obrázek 3: Vnitrobuněčný transport PrP^C. Internalizace PrP^C zprostředkovaná váčky odvozenými od kaveol (i), klatrinovými váčky (ii) a cesta nespojující s klatrinem ani s kaveolinem (iii). Znárodněny jsou též recyklace PrP^C přes raný endosom a možné cesty vedoucí k odbourání PrP^C v lyzozomu. Upraveno podle Campana *et al.* (2005).

² Kaveoly jsou malé vchlípeniny plazmatické membrány, které obsahují proteiny kaveoliny a vznikají shlukováním raftů (Simons a Ehehalt, 2002). Tyto invaginace lahvicovitého tvaru se účastní mnoha buněčných procesů, včetně endocytózy, transcytózy a regulace signálních kaskád (Campana *et al.*, 2005).

Osudy PrP^C se po vstupu do endosomu různí. Většina se vrací zpět do původní oblasti plazmatické membrány – doba recyklace PrP^C je asi 60 minut (Shyng *et al.*, 1993). Další molekuly cestují do lyzosomů, kde jsou odbourány – poločas života PrP^C je asi 5 hodin (Collins *et al.*, 2004). Některé molekuly PrP^C se transcytózou dostávají k jiné doméně plazmatické membrány (Campana *et al.*, 2005).

3.4 Výskyt PrP^C

Prionový protein je nedílnou součástí mnoha typů buněk v různých orgánech. Nejvíce je exprimován v CNS (v neuronech) a lymforetikulárním systému (v leukocytech) (Campana *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2001). Množství PrP^C v mozku je padesátkrát větší než v jiných orgánech, což může být kritickým parametrem pro vznik a rozvoj TSE (Dormont, 2002).

Užitím různých technik bylo zkoumáno přesné umístění PrP^C v neuronech. Bylo zjištěno, že se nachází jak v plazmatické membráně (především na synaptické membráně axonu), tak ve všech biosyntetických a endocytických membránových strukturách. Obě izoformy PrP (tzn. jak PrP^C, tak PrP^{Sc}) byly nalezeny v raných a pozdních endosomech a v lyzosomech, kde dochází k jejich částečné (PrP^{Sc}) nebo úplné (PrP^C) degradaci (Campana *et al.*, 2005). Nečekaně byl PrP nalezen také v cytosolu neuronů hippocampu, neokortexu a thalamu, nikoliv však mozečku. Cytosolický PrP je náchylný k agregaci; neurony, ve kterých se nachází, mohou hrát důležitou roli v patogenezi prionových onemocnění (Mironov *et al.*, 2003). Doposud není jasné, zda nesprávné umístění PrP^C je příčinou či důsledkem špatného složení a/nebo chybné funkce PrP (Campana *et al.*, 2005).

3.5 Funkce PrP^C

Primární i terciární struktury PrP jsou u savců zachovány, což napovídá, že by se prionový protein mohl účastnit základního biologického procesu (např. nervového přenosu). Patrně však není životně nezbytný, protože PrP-deficientní myši (PRNP 0/0) jsou schopné života a normálního vývoje (Eghiaian, 2005).

Biologická funkce PrP^C zřejmě souvisí s metabolismem mědi v neuronech (Collins *et al.*, 2004). *In vivo* může PrP^C existovat jako přenašeč Cu²⁺ (Harris, 2003); navázání mědi podporuje internalizaci PrP^C (Burns *et al.*, 2002). Pomocí spektroskopické analýzy bylo zjištěno, že polypeptidy založené na sekvenci PrP^C selektivně poutají atomy Cu²⁺; čtyři ionty mědi se mohou

vázat na vysoce konzervativní oblasti prionového proteinu, tvořené opakujícími se oktapeptidovými sekvencemi v N-koncové části PrP^C, páté vazebné místo bylo nalezeno ve flexibilní části molekuly mezi oktapeptidovými repetitivy a globulární C-koncovou doménou (PrP(92–96)) (Burns *et al.*, 2003). Afinita mědi k PrP je závislá na pH (Burns *et al.*, 2002). Vazba mědi k HGGGW (nebo GGGTH) PrP^C (tzv. glycinový chelát) by mohla usnadňovat rozpoznávání prionových proteinů, a proto by mohla mít vliv na transmembránovou signalizaci a možná i na přeměnu PrP^C v PrP^{Sc} (Burns *et al.*, 2002). Po částečné denaturaci PrP^{Sc} pomáhá navázání mědi obnově jeho rezistence k proteináze K (PK) a zvyšuje infekčnost (McKenzie *et al.*, 1998).

Další návrh na funkci PrP^C pochází ze studia neuspořádaného N-konce. U myši exprimujících PrP(121–231) dochází k fenotypickým abnormalitám, jež by mohly být důsledkem de-regulace funkce PrP při delecii N-konce (Shmerling *et al.*, 1998). Zahn (2003) ukázal, že repetice oktapeptidů (motivy HGGGW a GWGQ) jsou místem, kde se může vytvářet a hromadit struktura β -skládaného listu, což může způsobovat reverzibilní, na pH závislou oligomerizaci prionového proteinu. Eghiaian (2005) předpokládá, že tvorba oligomerů je funkčně důležitá pro endocytózu nebo hraje roli v mezibuněčné soudržnosti. Ačkoliv tyto hypotézy nebyly potvrzeny, možnost, že biologická funkce PrP^C vyplývá ze struktury jejího N-konce nebo z oligomerizace na buněčném povrchu, je pravděpodobná. Mnoho neuspořádaných polypeptidů totiž nabývá svých biologických vlastností, až když se správně složí.

Některé výsledky, získané hlavně z experimentů s transgenními organizmy, ukazují, že by PrP^C mohl hrát roli v dlouhodobém přežívání Purkyněho neuronů (Sakaguchi *et al.*, 1996), v interakcích s extracelulární matrix (PrP^C se může vázat k prekurzoru lamininového receptoru) (Gauczynski *et al.*, 2001), v regulaci cirkadiálního rytmu a spánkové fyziologii (Tobler *et al.*, 1996), v apoptóze (Dormont, 2002) a v signální transdukci (Mouillet-Richard *et al.*, 2000). Bylo také publikováno zjištění interakcí mezi PrP a nukleovou kyselinou retrovirů (Gabus *et al.*, 2001).

Navzdory různým domněnkám o funkci PrP^C, jeho přesná úloha v buňce zatím zůstává neznámá.

3.6 Struktura a vlastnosti PrP^{Sc}

PrP^{Sc} (PrP^{Sc}) je kódován stejným genem jako PrP^C (PrP^C). Proto mají oba proteiny stejnou primární strukturu, liší se však ve vyšších strukturách. Rozdíly mezi nimi jsou způsobeny post-translačně – izoformy mají různou konformaci a mohou se lišit i glykosylací (Armstrong, 2006).

Sekundární strukturu PrP^{Sc} tvoří asi z 30 % α -helix a z 45 % β -skládaný list (Prusiner, 1998). Díky změně konformace se PrP^{Sc} (PrP^{res}) snadno shlukuje do stabilních vysokomolekulárních oligomerů (Bousset a Melki, 2002). Velikost prionu byla pomocí ultrafiltrace odhadnuta na 15–40 nm (Dormont, 2002).

PrP^{Sc} je jen částečně degradován proteinázou K (PK) v koncentracích, které úplně degradují PrP^C. Působením 50 g/ml PK při 37 °C po dobu 2 hodin nedochází k degradaci C-konce PrP^{Sc}, ani k poklesu infekčnosti titru (Aguzzi a Polymenidou, 2004). PK odštěpuje z PrP^{Sc} proměnný počet N-koncových AMK (kolem 60-ti zbytků). Zbývající rezistentní fragment se označuje PrP 27–30 (molekulová hmotnost 27–30 kDa), zachovává si infektivitu a je schopen se shlukovat a vytvářet amyloidní fibrily (Liemann a Glockshuber, 1998).

Abnormální, patogenní PrP^{Sc} je mimořádně odolný vůči různým fyzikálním a chemickým vlivům. Priony odolávají běžným sterilizačním a dekontaminačním metodám jako jsou UV záření, ionizující záření, teploty do 300 °C, oxid chloričitý, manganistan draselný, peroxid vodíku, ethanol, formalín, aceton, střední (zvláště neionogenní) detergenty, alkoholy, aldehydy a ethylenoxid. Doporučenými postupy pro snížení infekivity jsou autoklávování asi 1 hodinu při standardních autoklávovacích teplotách či namočení nástrojů do 1M NaOH nebo koncentrovaného chlornanu sodného (více než 5000 ppm) na 1 hodinu (Collins *et al.*, 2004). Procesy inaktivujícími původce scrapie jsou ty, které denaturují nebo hydrolyzují bílkoviny, např. působení velkých dávek PK, trypsinu nebo dodecylsulfátu sodného. Postupy, které ovlivňují nukleové kyseliny, nemění účinnost infekce (Dormont, 2002). Jsou vyvíjeny enzymatické proteolytické inaktivační metody (samotné i v kombinaci s detergenty) (Collins *et al.*, 2004).

Přítomnost izoformy PrP^{Sc} nevyvolává imunitní reakci hostitele. *In vivo* nebyly prokázány kvantitativní ani funkční změny B i T lymfocytů a ostatních imunitních buněk a nebyly objeveny žádné protilátky proti PrP u přirozených nebo experimentálně vyvolaných onemocnění. (Dormont, 2002)

4 PRIONOVÁ TEORIE

Podle prionové teorie je hlavní, možná jedinou, složkou prionu abnormální konformer prionového proteinu (PrP^{Sc}), jež má ve své terciární struktuře zakódovánu schopnost vyvolat TSE. Priony se šíří patrně díky tomu, že infekční PrP^{Sc} je schopný přimět normální buněčný prionový protein (PrP^{C}) k strukturální přeměně v PrP^{Sc} (viz kap. 4.2 Základní činnost PrP^{Sc} – změna konformace PrP^{C} v konformaci PrP^{Sc}). Proces přeměny PrP^{C} v PrP^{Sc} může být spuštěn interakcí infekční a buněčné izoformy prionového proteinu, ale může být i následkem mutace genu PRNP ³. Podle Campany *et al.* (2005) navíc nelze vyloučit potřebu nějaké další, dosud neznámé částice (protein X nebo lipochaperon) či kovalentní modifikace PrP k přeměně v PrP^{Sc} a vyvolání onemocnění.

Doposud je známo jen velmi málo o samotné infekční částici vyvolávající TSE. Otázka, zda je PrP^{Sc} sám infekčním agens nebo jen jeho složkou, zatím není vyřešena. Jedna infekční jednotka odpovídá asi 10^5 molekulám PrP^{Sc} (Clarke *et al.*, 2001). Není jasné, zda toto znamená, že pro nakažlivost je nutný velký agregát nebo že pouze jedna z těchto molekul je skutečně infekční.

4.1 Patogeneze TSE – úloha PrP^{C} a PrP^{Sc} ; minipriony

Stejně jako u jiných neurodegenerativních onemocnění se v CNS jedince s TSE nachází shluky proteinů. Extrakty z infikovaných mozků obsahují amyloidní fibrily z polymerů PrP^{Sc} (PrP-sc), tzv. prionové „tyčinky“ („scrapie-associated fibrils“, „prion rods“), které jsou prokazatelné pomocí elektronové mikroskopie (Dormont, 2002). Patogeneze TSE je spojena se současnou expresí normálního buněčného prionového proteinu PrP^{C} (PrP^{C}) a akumulací strukturálně odlišného, k proteázám rezistentního konformeru PrP^{Sc} (PrP^{res}) v CNS infikovaného jedince (Collins *et al.*, 2004). Prionová teorie předpokládá, že přeměna proteinu z benigního PrP^{C} na maligní PrP^{Sc} je způsobena posttranslační změnou prostorového uspořádání molekuly, jež způsobí, že PrP^{Sc} získá vyšší obsah β -listu (Prusiner, 1998). Podle Eghiaiana (2005) jsou rozdíly mezi PrP^{C} a PrP^{Sc} omezeny na aminokyselinové zbytky 90–176. Zbytky 177–231 zaujímají u obou izoform stejnou konformaci. Díky přítomnosti β -struktury má pak PrP^{Sc} (PrP-sc) větší tendenci vytvářet v mozkové tkáni nerozpustné fibrilární agregáty (Dormont, 2002).

³ Transgenní živočichové s mutací Pro102Leu (tato mutace je spojena s Gerstmann-Sträussler-Scheinkerovým syndromem, tj. familiární TSE člověka), spontánně projevují spongiformní encefalopatii, která je za určitých podmínek přenosná (Liemann a Glockshuber, 1998).

V rozvoji neuropatologie TSE hraje klíčovou roli exprese PrP^C. Studie s transgenními organizmy, tkáňovými kulturami a bezbuněčné („cell-free“) testy jasně ukázaly, že PrP^C je nutný pro vyvolání nemoci. Transgenní myši, jimž chybí exprese genu PRNP (tzn. „knockout“ myši netvořící žádné PrP), nejsou vnímavé k nákaze priony. Dojde-li však k opětovnému zavedení genu pro PrP, obnovuje se vnímavost (Clarke *et al.*, 2001). Inkubační doba onemocnění souvisí s množstvím exprimovaného PrP^C (Liemann a Glockshuber, 1998). Citlivost na infekci a šíření prionů tedy závisí na množství dostupného PrP^C v hostiteli. Priony se nešíří v mozcích, které postrádají PrP^C; PrP^{Sc} v nich není schopný přenášet chorobu a způsobovat neuropatologické změny.

Zajímavostí jsou tzv. minipriony, mutantní molekuly PrP složené pouze ze 106 AMK (označení PrP106), jež byly vytvořeny delecí zbytků 23–89 a 141–176 (Prusiner, 1998). I přes rozsáhlou delecí AMK si minipriony zachovávají infekčnost a umožňují utváření PrP^{Sc}.

4.2 Základní činnost PrP^{Sc} – změna konformace PrP^C v konformaci PrP^{Sc}

Na rozdíl od patogenů obsahujících nukleovou kyselinu, jež mají své specifické vlastnosti zakódovány v genech, priony mají schopnost změnit konformaci PrP^C díky své terciární struktuře. PrP^{Sc} funguje jako vzor, podle kterého se „přeskládá“ molekula PrP^C a nově vzniklý PrP^{Sc} se stejným způsobem může množit a šířit dál.

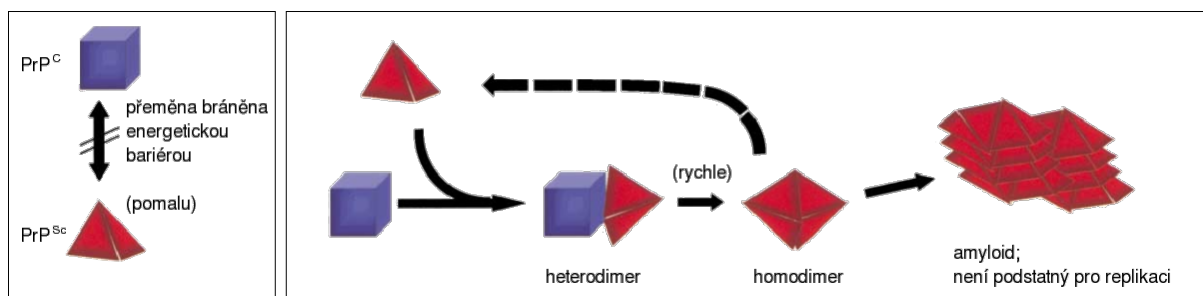
Ve snaze toto dokázat, Kocisko *et al.* (1994) inkubovali ³⁵S-PrP^C s neoznačeným PrP^{Sc}. Vzorek pak nechali štěpit PK, aby zjistili, zda byl nějaký ³⁵S-PrP^C přeměněn na ³⁵S-PrP^{Sc}. PrP označený ³⁵S, vykazující charakteristickou částečnou rezistenci k PK (tj. ³⁵S-PrP^{Sc}), byl vytvořen pouze u vzorků obsahujících PrP^{Sc}, nikoliv však pokud vzorek PrP^{Sc} neobsahoval, nebo obsahoval-li PrP^{Sc}, jenž byl denaturován. Tato „cell-free“ přeměna poskytla přímý důkaz toho, že díky interakci PrP^{Sc} – PrP^C může PrP^{Sc} přeměňovat normální, fyziologický PrP^C na patogenní PrP^{Sc}, a tak se pomnožovat.

4.3 Modely „sebepřekopce“ prionů

Prionová teorie nabízí dva možné modely „sebepřekopce“ prionů: „konformační model“ a „polymerační model závislý na tvorbě jader“.

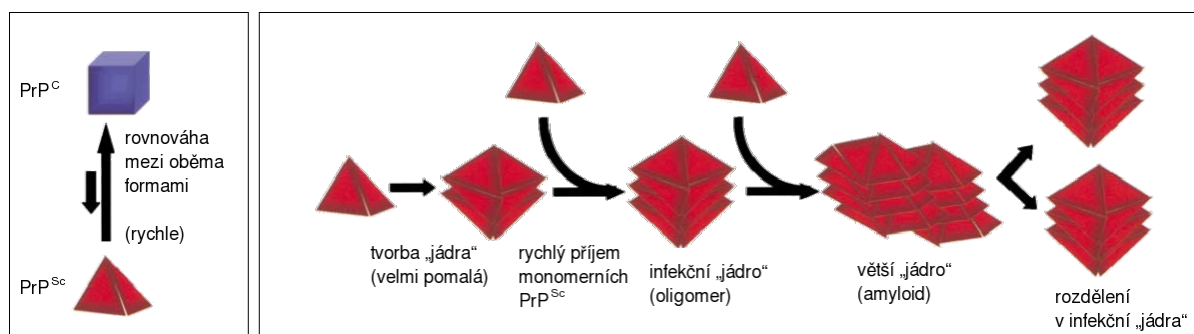
Podle „konformačního modelu“ (nazývaného také „templátový“) jsou PrP^C a PrP^{Sc} dva stabilní, monomerní, konformační izomery prionového proteinu. Propuknutí onemocnění je

kineticky bráněno velmi pomalou konformační změnou PrP^C v PrP^{Sc}. Jakmile je však vytvořena molekula PrP^{Sc}, interaguje s PrP^C a vznikne heterodimer, který je následně rychle přeměněn ve dvě infekční molekuly PrP^{Sc}. Bariéra vysoké aktivační energie počáteční tvorby PrP^{Sc} může být překonána za pomoci chaperonů nebo v případě dědičných TSE díky mutacím. Tento model předpokládá, že tvorba PrP^{Sc} je autokatalytická. PrP^{Sc} má úlohu vzoru, podle něhož dochází k přeuspořádání molekuly PrP^C (Liemann a Glockshuber, 1998). Podle Aguzziho a Polymenidou (2004) změnou určité domény (nebo celého proteinu) se PrP^C stane schopným vyvolávat stejnou strukturální přeměnu dalších monomerů PrP^C.



Obrázek 4: „Konformační model“ („templátový“). Interakce PrP^{Sc} s PrP^C vyvolává přeměnu konformace PrP^C v PrP^{Sc}. Vysoká energetická bariéra brání spontánní konverzi PrP^C v PrP^{Sc}. Upraveno podle Aguzzi a Polymenidou (2004).

„Polymerační model závislý na tvorbě jader“ předpokládá, že PrP^C je v rychlé termodynamické rovnováze s monomerním prekurzorem PrP, který má konformaci jako PrP^{Sc} a je stabilní pouze, je-li agregován. Za fyziologických podmínek je rovnováha silně posunuta směrem k PrP^C. Současně s PrP^C existuje jen nepatrné množství prekurzoru PrP^{Sc}. Monomerní prekurzor PrP^{Sc} je neškodný, pokud však jeho koncentrace díky posunu rovnováhy převyší tzv. kritickou koncentraci, dojde k agregaci a tvorbě oligomeru PrP^{Sc}. Oligomer PrP^{Sc} hraje roli „jádra“, do něhož se začleňují další monomerní prekurzory PrP^{Sc}, a představuje infekční jednotku. Krokem limitujícím rychlost je tvorba oligomeru kritické velikosti. Vytvoření oligomerního „jádra“ je následováno rychlým šířením PrP^{Sc}. Velikost shluku se přidáváním dalších molekul prekurzoru PrP^{Sc} zvětšuje, až dosáhne meze soudržnosti, za níž se odehrává rozklad poskytující nová infekční „jádra“. Mutace PrP spojené s dědičnými prionovými chorobami mohou ovlivňovat rovnováhu mezi PrP^C a monomerním prekurzorem PrP^{Sc} a urychlit proces tvorby „jader“. Na rozdíl od „konformačního modelu“ tento model nepožaduje přímý kontakt PrP^C a PrP^{Sc}. (Aguzzi a Polymenidou, 2004; Liemann S. a Glockshuber R., 1998)



Obrázek 5: „Polymerační model závislý na tvorbě jader“. PrP^C a PrP^{Sc} jsou v reverzibilní termodynamické rovnováze. Pokud několik molekul monomeru PrP^{Sc} vytvoří uspořádané „jádro“, může do něj být začleněn další monomer PrP^{Sc} a může se tak vytvořit agregát (amyloid). PrP^{Sc} je stabilní pouze je-li součástí „jádra“. Rozdělením agregátu PrP^{Sc} se vytvoří nová „jádra“, do nichž se mohou začleňovat další molekuly PrP^{Sc}. Upraveno podle Aguzzi a Polymenidou (2004).

4.4 Mechanismus přeměny PrP^C v PrP^{Sc}

Přeměna PrP^C (PrP-sen) v PrP^{Sc} (PrP-res) je závislá na koncentraci obou forem prionového proteinu a je velmi specifickou reakcí. Náhraza PrP^{Sc} (PrP-res) jiným fibrilárním amyloidním proteinem, např. Alzheimerovým beta amyloidem, nevede k přeměně PrP^C (PrP-sen) (Caughey, 2001). Pokusy prováděné s PrP^{Sc} z různých hostitelských druhů vedly pouze k velmi malé nebo žádné konverzi PrP^C (Kocisko *et al.*, 1995). Z těchto zjištění vyplývá, že pro přeměnu PrP^C je nutná homologie určité sekvence AMK hostitelského a infekčního PrP. Analýzy s PrP^C (PrP-sen), PrP^{Sc} (PrP-res) a chimérickými PrP myši a křečka ukázaly, že účinné utváření PrP^{Sc} (PrP-res) *in vivo* a v buněčných kulturách závisí na homologii PrP^C (PrP-sen) a PrP^{Sc} (PrP-res) v centrální třetině molekuly PrP (hlavně aminokyselinové zbytky 112–138) (Caughey, 2001). Změna jediné AMK na 138. místě PrP dramaticky snižuje tvorbu PrP^{Sc} (PrP-res) (Caughey, 2001). Tato sekvenční specifita je molekulárním základem bariéry mezidruhového přenosu TSE *in vivo* (viz kap. 5.3 Mezidruhová bariéra a vCJD).

Podle Collinse *et al.* (2004) je pro změnu PrP^C (PrP^c) v PrP^{Sc} (PrP^{res}) nutná alespoň dočasná dimerizace obou izoform PrP. Kinetické analýzy konverzních reakcí naznačily, že přeměna prionového proteinu je spjata s interakcí PrP^C (PrP-sen) a PrP^{Sc} (PrP-res), kdy počáteční vazba a krok přeměny mohou proběhnout odděleně. Studie PrP křečka a myši *in vitro* ukázaly, že ač je jejich konverzní reakce neúčinná, proteiny se váží relativně efektivně (Horiuchi *et al.*, 2000).

Dosud byli vědci schopni zjistit infekčnost spjatou pouze s agregáty PrP^{Sc}, nikoliv s jejich monomery. Dormont (2002) tvrdí, že vazba PrP^C (PrP-c) na agregáty PrP^{Sc} (PrP-sc), se kterými zůstává v průběhu přeměny spojen, má za následek změnu jeho konformace. Transformace PrP^C

(PrP^c) v PrP^{Sc} (PrP-sc) je reverzibilní a PrP^{Sc} (PrP-sc) zůstává stabilní jen, je-li agregován. Caughey *et al.* (1997) prokázali, že celková disagregace a denaturace PrP^{Sc} současně snižují jeho infekčnost a schopnost měnit konformaci PrP^c. Také redukce disulfidické vazby v molekule PrP^c (PrP-sen) nebo PrP^{Sc} (PrP-res) potlačuje konverzi PrP^c (PrP-sen) (Herrmann a Caughey, 1998). Konverze PrP^c může být naproti tomu stimulována buď částečnou denaturací PrP^{Sc} nebo působením určitých chaperonů, např. GroEL nebo Hsp104 (heat shock protein 104) (DeBurman *et al.*, 1997).

Přestože bylo navrženo mnoho modelů a provedena řada experimentů, mechanismus množení prionů není na molekulární úrovni stále plně objasněn. Začátek konverzní reakce může být vyvolán vystavením prionového proteinu shluku PrP^{Sc} tvořícímu „jádro“ nebo může být zahájen díky vytvoření dimeru PrP^c-PrP^{Sc}. Tvorba PrP^{Sc} by případně mohla být následkem exprese mutantního PrP^c, který je náchylný k utváření PrP bohatého na strukturu β-listu. Monomer PrP^{Sc} může být stabilizován asociací s jinou molekulou PrP^{Sc} a tvorbou oligomeru, který by mohl napomáhat konverzi PrP^c. Je pravděpodobné, že ke změně konformace PrP^c v PrP^{Sc} jsou třeba ještě neznámé buněčné faktory. (Dormont, 2002)

4.5 Místo přeměny PrP^c v PrP^{Sc}

Důležitou otázkou ve výzkumu prionů je, kde se odehrává přeměna PrP^c v PrP^{Sc}. Utváření PrP^{Sc} může v případě infekční nákazy probíhat buď na plazmatické membráně, kde pravděpodobně dochází k prvnímu kontaktu endogenního PrP^c s exogenním PrP^{Sc} (Campana *et al.*, 2005), nebo po přijetí PrP^{Sc} v endolysosomálním kompartmentu buňky (Borchelt *et al.*, 1992). Další možností by mohlo být, že dochází k zpětnému transportu PrP^{Sc} do GA a/nebo ER, čímž se naruší biosyntéza nových molekul PrP^c a spustí tvorba PrP^{Sc} z prekursoru PrP^c (Campana *et al.*, 2005).

Beranger *et al.* (2002) ukázali, že stimulace zpětného transportu a akumulace PrP^c v ER zvyšuje produkci PrP^{Sc} v infikovaných buňkách. To naznačuje, že ER má důležitou úlohu v přeměně PrP^c. Hlavní význam ER tkví v tom, že je místem s velkým množstvím substrátu potřebným ke konverzní reakci. Navíc je snazší změnit konformaci nascentního polypeptidu, než strukturu správně složeného proteinu. Podle Campany *et al.* (2005) má ER dvě možné úlohy ve změně konformace PrP^c:

- ♦ u dědičných prionových onemocnění, jež mají původ v mutantním PrP, je ER přímo zahrnuto do přeměny PrP a tvorby prionů,

- ♦ u infekčních prionových onemocnění může ER představovat místo amplifikace PrP^{Sc} vytvořeného dříve jinde v buňce.

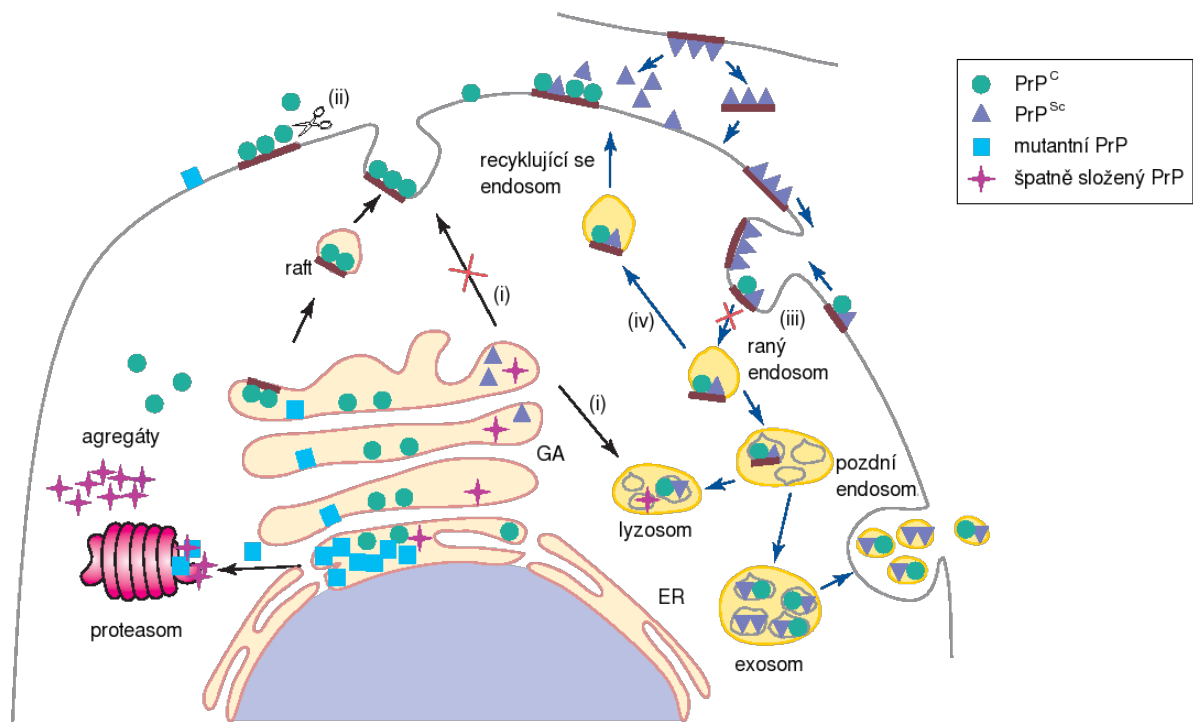
Tyto dvě různé úlohy ER odráží možné mechanismy tvorby PrP^{Sc}, kdy se v prvním modelu mutantní molekuly PrP spontánně mění v PrP^{Sc}, zatímco ve druhém modelu exogenní PrP^{Sc} funguje jako katalyzátor přeměny PrP^C (Campana *et al.*, 2005).

Jiné studie (např. Borchelt *et al.*, 1992; Taraboulos *et al.*, 1992) uvádějí, že k přeměně PrP^C dochází posttranslačně během endocytického cestování buňkou, poté co protein dosáhl povrchu buňky. Snížení teploty na 18 °C blokuje endocytózu a brání tvorbě PrP^{Sc} (Borchelt *et al.*, 1992). Pokud je zabráněno transportu PrP^C k plazmatické membráně, nebo je-li PrP^C z membrány uvolněn, sníží se tvorba PrP^{Sc} (Borchelt *et al.*, 1992). Proč musí PrP^C dosáhnout plazmatické membrány před svou konverzí není známo. Jednou možností je, že pro přeměnu jsou nutné posttranslační modifikace. Dále by PrP^C mohl fungovat jako receptor, který zprostředkovává přijetí PrP^{Sc} do buňky. Eventuálně by mohlo být důvodem to, že prostředí lipidů a proteinů je příznivé pro interakci a přeměnu PrP^C→PrP^{Sc} nebo že pro změnu konformace je nutný faktor, který je specificky lokalizován právě na buněčné membráně. (Campana *et al.*, 2005)

Z buněk infikovaného myšího mozku byly získány membránové mikrodomény (rafty) s PrP^C i s PrP^{Sc}. Rafty mohou být priony používány ke vstupu do buňky a mohou též pomáhat při tvorbě a/nebo amplifikaci PrP^{Sc} (Naslavsky *et al.*, 1997). Campana *et al.* (2005) navrhuje čtyři způsoby, jakými by rafty mohly regulovat tvorbu PrP^{Sc}. Rafty by mohly:

- ♦ ovlivňovat nasměrování PrP^C do specifického kompartmentu buňky, kde se odehrává jeho přeměna v PrP^{Sc},
- ♦ obsahovat faktory (protein X, lipochaperony), jež jsou nezbytné pro utváření PrP^{Sc},
- ♦ poskytovat příznivé prostředí pro setkání a akumulaci molekul PrP^C a PrP^{Sc} a mohly by napomáhat jejich vhodnému uspořádání, jež je důležité pro správnou interakci a přeměnu,
- ♦ specifické rafty by mohly stabilizovat konformaci PrP^C; pokud by PrP^C raft opustil, byl by nesprávně složen a mohl by snadněji podlehnout přeměně. (Campana *et al.*, 2005)

Na otázku, kde přesně se odehrává přeměna PrP^C v PrP^{Sc} zatím nelze jednoznačně odpovědět. Shrnutím hypotéz je možno vyvodit závěr, že ER by mohlo hrát hlavní roli v přeměně mutantního PrP u dědičných forem TSE, zatímco transport PrP^C k plazmatické membráně a jeho následná endocytóza jsou patrně nutné pro tvorbu PrP^{Sc} u infekčních forem TSE. Zdá se, že také rafty jsou důležité v procesu změny konformace PrP^C.



Obrázek 6: Vnitrobuněčné cestování PrP a možné cesty tvorby PrP^{Sc}. PrP^C je syntetizován v ER, kde dochází k jeho posttranslačním modifikacím a kontrole kvality. Dále se přes GA dostává na buněčný povrch a stává se součástí raftů. Molekuly špatně složeného a mutantního PrP jsou částečně degradovány proteasomem. PrP^C a agregáty špatně složeného PrP byly nalezeny i v cytosolu neuronů. Je-li zabráněno transportu PrP^C k plazmatické membráně (i) a je-li přeměřován do lysosomů k degradaci (i) nebo je-li PrP^C uvolněn z buněčného povrchu (ii), je zamezeno tvorbě PrP^{Sc}. Omezení internalizace PrP^C (iii) také snižuje utváření PrP^{Sc}. Obě izoformy PrP (PrP^C i PrP^{Sc}) byly nalezeny v raných a pozdních endosomech a v lysosomech, kde jsou částečně (PrP^{Sc}) nebo úplně (PrP^C) degradovány. Část PrP^C je recyklována a vrací se zpět k plazmatické membráně (iv). PrP^C i PrP^{Sc} byly nalezeny v extracelulárním prostoru infikovaných buněk. Upraveno podle Campana *et al.* (2005).

5 TRANSMISIVNÍ SPONGIFORMNÍ ENCEFALOPATIE (TSE)

5.1 Charakteristika TSE

Transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE) tvoří biologicky jedinečnou skupinu řídce se vyskytujících neurodegenerativních onemocnění postihujících CNS člověka a dalších savců (Liemann a Glockshuber, 1998). Tyto choroby se vyskytují jako infekční, genetické (dědičné) a sporadické (Prusiner, 1998) (viz kap. 5.4 Klasifikace TSE).

Přenosnost (transmisivnost) je vlastností, která odděluje TSE od ostatních neurodegenerativních onemocnění, jakými jsou např. Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba (Collins *et al.*, 2004). Přenos je snadný v rámci stejného druhu, ale je možný i mezi různými druhy.

TSE jsou těžké, bez výjimky letální choroby. Jsou charakterizovány dlouhou asymptomatickou inkubační dobou, která v případě člověka může dosahovat až několika desítek let, a nedetekovatelnou protilátkovou odpovědí (Dormont, 2002). Onemocnění probíhají pomalu a jsou nevléčitelná. Klinickými příznaky bývají demence, poruchy až ztráta paměti, prohlubující se projevy motorických dysfunkcí (poruchy chůze a rovnováhy), poruchy smyslů a kožní citlivosti, změny v chování. Některé orgány (zvláště mozek, mícha a sítnice) jsou těžce infikovány dříve, než se objeví klinické projevy nemoci (Dormont, 2002). V průběhu onemocnění není rozpoznatelný zánětlivý proces v krvi ani v mozkomíšním moku. U nakaženého jedince není pozorován žádný z obvyklých imunohistologických příznaků chronické virové infekce. V mozku pacientů není identifikovatelná žádná struktura podobající se viru, bakterii nebo jinému mikroorganismu (Dormont, 2002). Na biochemické úrovni jsou TSE popisovány hromaděním proteinů v nervových buňkách. Tím dochází k vytváření amyloidů (tj. fibrilárních, k detergentu rezistentních a na strukturu β -listu bohatých proteinových polymerů). Dochází též k vakuolizaci neuronů, čímž mozková tkáň získává charakteristický houbovitý vzhled, jež je neuropatologickým znakem onemocnění (Chesebro, 2003). Poruchy nervové funkce jsou způsobeny nemožností odstranit z mozku hromadící se proteiny (Collins *et al.*, 2004).

Klinické příznaky vedou k podezření na výskyt TSE. V diagnostice se používají metody založené na detekci PK-rezistentního PrP^{Sc} (Aguzzi a Polymenidou, 2004). TSE jsou dokazovány na základě histopatologických testů CNS, které demonstrují měnící se stupeň spongiformní degenerace neuronů, gliózu astrocytů a tvorbu amyloidních plaků (Liemann a Glockshuber, 1998).

V současnosti neexistuje účinný způsob léčby TSE. Mnoho léků prodloužilo život zvířatům infikovaným scrapie, žádný však nebyl úspěšný v léčbě TSE po objevení symptomů. Do budoucna by nadějnými mohly být směsi obsahující tetrapyroly, sulfonová barviva, lysosomotropní aminy a inhibitory cysteinových proteáz, jež zabraňují utváření PrP^{res} (PrP-res) v neuroblastomových buňkách infikovaných scrapie (Caughey, 2001).

5.2 Přenos TSE – způsoby nákazy a její šíření

Už roku 1936 uskutečnili Jean Cuillé a Paul-Louis Chelle experimentální důkaz přenosné povahy scrapie, když intraokulární inokulací suspenze míchy z nemocných ovcí nakazili zdravé ovce a kozy (Cuillé a Chelle, 1936). Roku 1966 Daniel Carleton Gajdusek *et al.* oznámili přenos kuru na šimpanze intracerebrální inokulací (Gajdusek *et al.*, 1966). O dva roky později se Clarence J. Gibbs *et al.* podařilo stejným způsobem nakazit šimpanze i CJD (Gibbs *et al.*, 1968).

Možnost přenosu TSE přirozenou cestou mezi jedinci téhož druhu byla prokázána např. v 50. letech 20. století při šíření onemocnění kuru skrze rituální kanibalismus mezi příslušníky kmene Fore na Papui Nové Guineji (Liemann a Glockshuber, 1998), dále při propuknutí epidemie iCJD (iatrogenní CJD) mezi pacienty léčenými hormony získanými z lidských hypofýz (růstový hormon, gonadotropin), či při objevu BSE, která zasáhla hovězí dobytek ve Velké Británii uprostřed 80. let 20. století (Dormont, 2002). Epidemie BSE propukla pravděpodobně díky konzumaci masa a masokostní moučky kontaminované scrapie nebo BSE. Po roce 1988, po zákazu krmení dobytka masem a masokostní moučkou, prudce klesl počet postižených zvířat (Liemann a Glockshuber, 1998).

Z výše uvedeného je zřejmé, že TSE lze přenést jak inokulací materiálu kontaminovaného infikovanou tkání, tak orálně (např. příjmem infikované potravy nebo léku). Ačkoli se patologie TSE omezuje převážně na mozek, k nákaze dochází nejčastěji v důsledku vniknutí infekčního materiálu do periferie – intraperitoneálně, intravenózně, intraokulárně nebo perorálně. Na experimentálních modelech bylo prokázáno, že nejefektivnějším způsobem nákazy je intracerebrální inokulace, nejméně efektivní je perorální cesta. V přirozených podmínkách, zejména např. u BSE, však může být periferní infekce mnohem účinnější, než se předpokládalo (Dormont, 2002).

Po periferní nákaze je PrP^{Sc} brzy po inokulaci prokazatelný v lymfatickém systému nakaženého zvířete, později se objeví v CNS a byl detekován také v kosterních svalech (Aguzzi

a Polymenidou, 2004). Po intraperitoneální infekci bylo množení prionů zaznamenáno nejprve ve slezině, pak v hrudní části míchy a nakonec v bederní míše a v mozku. PrP^{Sc} se šíří skrze autonomní nervová zakončení přítomná v lymfatických orgánech do CNS infikovaného jedince. Lymfatický systém hraje důležitou roli v periferní infekci – imunitní buňky, nejpravděpodobněji dendritické buňky a makrofágy, mohou být prvním místem množení PrP^{Sc}. V sekundárních lymfatických strukturách je infektivita spojená s folikulárními dendritickými buňkami, jež jsou kritickými pro neuroinvasivní proces. (Dormont, 2002)

5.3 Mezidruhov^á bariéra a vCJD

Přenos prionů z jednoho živočišného druhu na jiný vyžaduje delší inkubační dobu ve srovnání s přenosem na hostitele stejného druhu a v určitých případech je nemožný (Liemann a Glockshuber, 1998). Například BSE není přenosná na křečka, ačkoliv může být snadno přenesena na myš (Caughey, 2001). Tento jev se označuje jako mezidruhov^á bariéra. Aktuální otázkou je především možnost jejího překročení mezi zvířaty alidmi.

Síla mezidruhov^é bariéry je různá. Hlavním molekulárním činitelem ovlivňujícím mezidruhov^{ou} bariéru je homologie mezi genem PRNP dárce a příjemce. Ostatní geny hrají méně důležité role ve vnímavosti k prionům (Dormont, 2002). Čím bližší je tedy pořadí AMK v infekčním PrP^{Sc} hostitelskému PrP^C, tím větší je šance na přeměnu PrP^C v PrP^{Sc} a tím snadněji dojde k překročení mezidruhov^é bariéry. Rozhodující je patrně oblast PrP(112–138) (Caughey, 2001) (viz kap. 4.4 Mechanismus přeměny PrP^C v PrP^{Sc}). Mezidruhov^{ou} bariéru zásadním způsobem ovlivňuje rozdílnost sekvencí AMK v PrP donora a hostitele. Dále by mohly mít vliv prionový kmen (viz kap. 5.5 Prionové kmény) a interakce PrP^C se (zatím neznámým) faktorem hostitele, označovaným protein X (Liemann a Glockshuber, 1998).

V několika posledních letech zemřelo více než 25 lidí na novou variantu CJD (variantní CJD, vCJD). Tato forma CJD se svými vlastnostmi liší od ostatních typů CJD. Propuká u mladých lidí a svými projevy připomíná BSE. Experimentální data poskytla důkazy, že vCJD je lidskou formou BSE – obě onemocnění způsobuje stejný prionový kmen. To bylo prokázáno při přenesení prionů z mozku skotu s BSE a mozku člověka s vCJD na myši, kdy vzniklé myši PrP^{Sc} byly od sebe nerozeznatelné. Jejich vznik měl stejnou inkubační dobu, byl spojen se stejnou neuropatologií, PrP^{Sc} měly stejnou glykosylaci i citlivost k PK (Clarke *et al.*, 2001). První případy vCJD se vyskytly roku 1994 ve Velké Británii (Prusiner, 1998). Až do února roku 2006 bylo potvrzeno 160 případů nákazy vCJD u obyvatel Velké Británie; dalších 28 pacientů pochází z jiných zemí

světa a někteří z nich Británii nikdy nenavštívili (Collee *et al.*, 2006). Výskyt vCJD naznačuje překročení mezidruhové bariéry mezi hovězím dobyt看em a člověkem. Spekuluje se o tom, zda k infekci lidí došlo díky konzumaci masa kontaminovaného BSE.

5.4 Klasifikace TSE

Prionové choroby mohou být podle příčiny rozděleny do tří skupin: infekční (získané), genetické (dědičné, familiární) a sporadické.

Infekční TSE souvisí s přenosem PrP^{Sc} (viz kap. 5.2 Přenos TSE – způsoby nákazy a její šíření). Jsou mezi ně řazeny i iatrogenní choroby, jež mohou být vyvolány přenosem infekční částice přes léky (např. hormonální léčbou pomocí preparátů připravených z lidských hypofýz), použitím infikovaných nástrojů (např. nesprávně sterilizovaných elektrod) při neurochirurgických operacích nebo transplantací rohovky či štěpu tvrdé mozkové pleny od pacienta s TSE. Infekční TSE zahrnují kuru, vCJD a iCJD lidí a všechny TSE zvířat. Inkubační doba získaných TSE je dlouhá, v rozsahu od 2 do více než 10 let (Chesebro, 2003).

Asi 15 % lidských TSE je dědičných (Clarke *et al.*, 2001). Jedná se o fCJD (familiární CJD)⁴, Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův syndrom (GSS) a fatální familiární insomni (FFI). Tato onemocnění jsou spojována s autosomálně dominantními mutacemi genu PRNP (Chesebro, 2003), jichž bylo rozpoznáno více než 20. První objevenou mutací PrP geneticky související s dysfunkcemi CNS byla Pro102Leu u GSS (Prusiner, 1998). Nejčastější mutací u fCJD je Glu200Lys, u FFI Asp178Asn. Kromě bodových mutací genu PRNP byly v souvislosti degenerativními onemocněními mozku zjištěny inserce 2, 4, 5, 6, 7, 8 a 9 oktapeptidů v oblasti kódující charakteristické opakující se oktapeptidy (P(Q/H)GGG(G/-)WGQ) (Liemann a Glockshuber, 1998). Familiární TSE mohou být diagnostikovány na základě analýzy genu PRNP (Clarke *et al.*, 2001). Doba propuknutí onemocnění a jeho trvání závisí na dané mutaci. Klinická fáze obvykle začíná v raném věku. Variabilita v klinických a patologických nálezech (pozorovaná i mezi pacienty ze stejné rodiny) naznačuje, že onemocnění ovlivňují i jiné geny či negenetické faktory (Chesebro, 2003). Onemocnění je pravděpodobně vyvoláno destabilizací PrP^C (díky mutaci), což usnadňuje jeho spontánní konverzi v PrP^{Sc} a činí molekulu prionového proteinu náchylnou k agregaci. Mutace by mohla také usnadňovat interakci PrP^{Sc} s PrP^C nebo by mohla mít vliv na navázání nějakého dalšího ligandu (Clarke *et al.*, 2001).

4 Zvýšený výskyt fCJD byl v minulosti zaznamenán na některých místech na Slovensku (např. na Oravě) a u Libyjských Židů žijících v Izraeli (Prusiner, 1998).

Sporadické TSE nesouvisí se získanými ani s dědičnými prionovými onemocněními. Vyskytují se náhodně. Ročně dojde k nákaze asi jednoho jedince ze dvou milionů; muži a ženy jsou nakaženi se stejnou frekvencí. Průměrný věk propuknutí onemocnění je 50–70 let. Klinická fáze trvá pouze 1–12 měsíců a končí, stejně jako v případě jiných forem TSE, smrtí. Příčina těchto onemocnění dosud není známa. Existuje však několik hypotéz snažících se vysvětlit jejich vznik – např. vliv dosud neidentifikovaného viru, spontánní somatická mutace PrP, náhodná iniciace samovolné tvorby PrP^{Sc} (PrP^{res}) bez mutace PrP. (Chesebro, 2003)

Prionová choroba (TSE)	Hostitel	Příčina
Scrapie (klusavka)	ovce	infekční
Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE, „nemoc šílených krav“)	skot	infekční
Transmisivní encefalopatie norků (TME)	norek	infekční
Chronic wasting disease (CWD, nemoc chronického vyčerpání, chronická vysilující choroba)	jelenovití (jelenec, los)	infekční
Felinní spongiformní encefalopatie (FSE, spongiformní encefalopatie koček)	kočkovitá šelma	infekční
Exotická encefalopatie kopytníků	kudu, nyala, přímorožec	infekční
Kuru	člověk	infekční
Creutzfeldt-Jakobova choroba (CJD):		
- iatrogenní (iCJD)	člověk	iatrogenní
- sporadická (sCJD)	člověk	sporadická
- familiární (fCJD)	člověk	genetická
- variantní (vCJD)	člověk	infekční
Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův syndrom (GSS)	člověk	genetická
Fatální familiární insomnie (FFI, fatální familiární nespavost)	člověk	genetická
Fatální sporadická insomnie (FSI)	člověk	sporadická

Tabulka 1: Přehled prionových chorob zvířat a člověka. Upraveno podle Liemann a Glockshuber (1998) a Prusiner (1998).

5.5 Prionové kmeny

Zajímavou otázkou ve výzkumu prionů je problematika prionových kmenů, jež vyvolávají onemocnění lišící se klinickými příznaky, oblastmi napadení mozku a dobou inkubační fáze. Virová hypotéza vysvětluje tyto odlišnosti na základě mutací v genomu viru (Chesebro, 2003). Podle prionové teorie se prionové kmeny liší fyzikálně chemickými vlastnostmi PrP^{Sc} – různou citlivostí k PK, konformací a glykosylací.

Prionová teorie předpokládá, že kmenová specifita je zakódována v terciární struktuře PrP a daný PrP^{Sc} hraje roli vzoru pro konverzi PrP^C. Tuto myšlenku podpořily pokusy, ve kterých byla na zlaté syrské křečky přenesena transmisivní encefalopatie norků (TME) (Bessen a Marsh, 1992a; Bessen a Marsh, 1992b). Jako původce onemocnění pak byly u křečků identifikovány dva různé prionové kmeny. Tyto kmeny byly označeny HY („hyper“) a DY („drowsy“). Bessen a Marsh (1992a) prokázali, že křeččí TME s HY a DY se liší:

- ◆ klinickými projevy,
- ◆ inkubační dobou – TME s HY má inkubační dobu 65 ± 1 den, s DY 168 ± 2 dny,
- ◆ místy poškození mozku,
- ◆ rychlostí replikace – HY se u křečka množí rychleji než DY,
- ◆ schopností vyvolat onemocnění u norka – při přenosu křeččí TME zpět na norka se ukazuje, že si schopnost vyvolat onemocnění uchovává pouze DY.

Z těchto výsledků lze usuzovat, že DY je hlavním patogenem u norka a po delší době vyvolává onemocnění i u křečka, na rozdíl od HY, který se u křečka sice množí rychleji, ale sám není schopen u norka nevyvolat TME (Bessen a Marsh, 1992a). V dalším pokusu Bessen a Marsh (1992b) ukázali, že ačkoliv mají oba kmeny TME stejnou sekvenci AMK, liší se:

- ◆ citlivostí k PK – DY je citlivější k PK než HY,
- ◆ sedimentací v N-lauroylsarkosinu,
- ◆ migrací v polyakrylamidových gelech,

což naznačuje, že DY a HY mají různou konformaci (Bessen a Marsh, 1992a).

Přesvědčivý důkaz, že kmenově specifická informace je zakódována v terciární struktuře PrP^{Sc}, byl získán přenosem PrP^{Sc} dvou různých dědičných prionových onemocnění – FFI (mutace Asp178Asn) a fCJD (Glu200Lys) – na transgenní myši. PrP^{Sc} u FFI má po deglykosylaci molekulovou hmotnost 19 kDa, zatímco PrP^{Sc} u fCJD (a většiny sporadických prionových onemocnění) 21 kDa. Rozdíl v molekulové hmotnosti je dán různými místy proteolytického odštěpení N-konce, což odráží odlišné terciární struktury PrP^{Sc}. Odlišnost konformací je pochopi-

telná, protože se oba PrP^{Sc} liší sekvencí AMK. Když byly transgenní myši inokulovány extrakty z mozků pacientů s FFI, po 206 ± 7 dnech od inokulace se v jejich mozcích tvořily 19 kDa PrP^{Sc}, zatímco myši inokulované fCJD produkovaly po 170 ± 2 dnech 21 kDa PrP^{Sc}. Po další inokulaci transgenních myší, tentokrát PrP^{Sc} z myší nakažených předcházející inokulací, se inkubační doby zkrátily na 136 ± 1 den u myší tvořících 19 kDa PrP^{Sc} a 167 ± 3 dny u myší tvořících 21 kDa PrP^{Sc}. Tento experiment ukázal, že PrP^{Sc} může při identické sekvenci AMK (myši exprimovaly stejný transgen) nabývat dvou různých konformací. Dále bylo demonstrováno, že PrP^{Sc} má úlohu vzoru podle něhož dochází k přeměně PrP^C. (Prusiner, 1998)

Kromě různě dlouhé inkubační fáze jsou prionové kmeny charakterizovány i rozdíly ve spongiformních změnách různých oblastí mozku. U transgenních myší inokulovaných FFI priony byl výskyt PrP^{Sc} omezen převážně na talamus (stejně jako v případě FFI u lidí) (Prusiner, 1998). Naproti tomu transgenní myši inokulované fCJD priony produkovaly PrP^{Sc} široce rozšířené v celém kortikálním plášti a mnoha hlubokých strukturách CNS (obdobně jako u fCJD lidí). (Prusiner, 1998)

Za účelem zjištění vlivu glykosylace na uložení PrP^{Sc} byly vytvořeny transgenní myši exprimující PrP mutovaný na místě jedné nebo obou glykosylací. Tyto mutace měly za následek nenormální neuroanatomickou topologii PrP^C v CNS. Mutanty, mutované v místě pro druhou glykosylaci PrP, vykazovaly inkubační dobu vyšší než 500 dní a neobvyklé uložení PrP^{Sc} (Prusiner, 1998). Na základě těchto zjištění se Prusiner (1998) domnívá, že glykosylace může modifikovat konformaci PrP^C a ovlivňovat jeho sklon k tvorbě určitého PrP^{Sc} se specifickou lokalizací ukládání PrP^{Sc}.

6 PRIONY KVASINKY *Saccharomyces cerevisiae* A HOUBY *Podospora anserina*

Jak již bylo řečeno, prionové proteiny jsou unikátní tím, že se mohou vyskytovat přinejmenším ve dvou konformačních stavech. Jedním je prionová konformace, která může stimulovat druhou, neprionovou konformaci k přeměně v prionovou. Ačkoliv byly priony původně definovány jako infekční patogeny savců způsobující TSE, v širším slova smyslu se dnes pojem prion používá pro označení jakéhokoliv proteinu, který existuje alespoň ve dvou stabilních konformačních stavech, z nichž jeden je schopen vyvolávat prostorovou změnu u dalších konformerů, a tím katalyzovat tvorbu sama sebe (Uptain a Lindquist, 2002). Díky takto rozšířené definici prionu mohla revoluční prionová teorie pomoci objasnit záhadné genetické vlastnosti kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a houby *Podospora anserina*.

Přeměna konformace proteinu v prionovou má za následek změnu funkce proteinu, a tím pádem i změnu fenotypu buňky. Změna fenotypu se šíří z generace na generaci – protein v prionovém stavu se nemendelovsky, cytoplazmaticky přenáší z mateřské buňky na dceřinou (Bousset a Melki, 2002). Priony kvasinek působí jako geneticky dominantní proteinové elementy, které vyvolávají biologicky důležité fenotypové změny, aniž by jakkoliv měnily nukleovou kyselinu (Uptain a Lindquist, 2002).

Doposud byly objeveny tři priony u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*: [PSI⁺], [URE3], [RNQ⁺] a jeden u vláknité houby *Podospora anserina*: [Het-s]. Jedná se o prionové fenotypy endogenních buněčných proteinů Sup35p, Ure2p, Rnq1p a HET-s. Tyto proteiny ovlivňují různé biologické procesy (např. terminaci translace či metabolismus dusíku). Patrně nejsou homology ani prionového proteinu savců, ani sebe navzájem (Uptain a Lindquist, 2002). Proteiny Sup35p, Ure2p, Rnq1p a HET-s jsou kódovány chromozomálními geny SUP35, URE2, RNQ1 a het-s. Prionové fenotypy kvasinkových proteinů se však vyskytují řádově dvakrát častěji, než by odpovídalo bodovým mutacím. Fenotypy [PSI⁺] a [URE3] navíc zmizí, pokud buňky rostou v přítomnosti denaturujícího guanidinia chloridu a mohou se opět objevit aniž by byla vnesena nová DNA. (Bousset a Melki, 2002)

Priony kvasinek se mnoha svými vlastnostmi podobají prionovému proteinu savců – např.:

- ◆ vytváří infekční proteinové agregáty,
- ◆ v jejich molekulách se nachází opakující se oligopeptidy – u Sup35p bohaté na Gln, u Ure2p bohaté na Asn a Gln,
- ◆ mají neuspořádanou N-koncovou doménu a uspořádanou C-koncovou doménu,
- ◆ tvoří amyloidní fibrily,

- ♦ vykazují změnu v rezistenci k proteolýze,
- ♦ u proteinu Sup35p byly popsány fenomény prionového kmene i mezidruhové bariéry.

Na druhou stranu priony kvasinek a savců se v některých vlastnostech liší – např.:

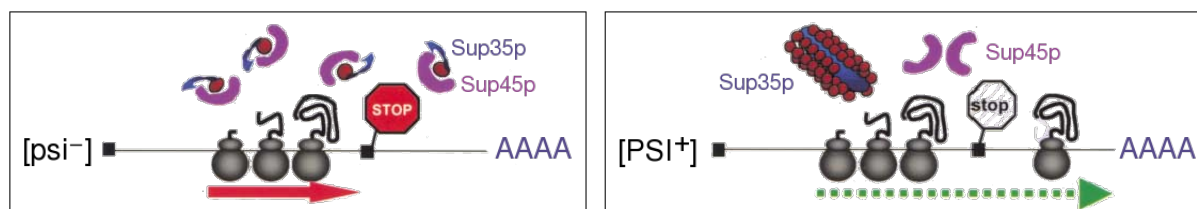
- ♦ u kvasinek se jedná o cytosolové proteiny, na rozdíl od membránového PrP^C,
- ♦ vznik prionového fenotypu je u kvasinek reverzibilní (kvasinky mají schopnost „přepínat“ mezi oběma konformačními stavy). (Bousset a Melki, 2002)

6.1 Kvasinkový protein Sup35p

Sup35p je esenciálním proteinem kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a ovlivňuje přesnost terminace translace. Bývá označován také jako eRF3, neboť je podjednotkou translačního terminačního uvolňovacího faktoru (Tuite a Lindquist, 1996). Spolu s proteinem Sup45p vytváří komplex, který se váže na ribozom a v místě stop kodónu zprostředkovává terminaci translace.

Sup35p může existovat ve dvou konformačních stavech: buď jako neprionový [psi⁻], nebo jako prionový [PSI⁺]. Stav [PSI⁺] je geneticky dominantní, protože setkání [PSI⁺] a [psi⁻] dá vzniknout [PSI⁺]. [PSI⁺] se množí autokatalytickou konverzí normální neprionové formy [psi⁻] (Tuite a Lindquist, 1996).

Pokud se Sup35p fenotypově projevuje jako [psi⁻] dojde na stop kodónu na konci čtecího rámce k terminaci translace a uvolnění hotového proteinu z ribozomu. V buňkách s fenotypem [PSI⁺] většina proteinů Sup35p přijímá prionovou konformaci. [PSI⁺] spontánně agreguje za tvorby amyloidních fibril, jež brání ukončení translace, což má za následek pokračování čtení řetězce i za stop kodónem. U kvasinek s [PSI⁺] fenotypem vzrůstá pravděpodobnost, že dojde k „downstream“ překlada nesmyslných („nonsense“) kodónů a tvorbě proteinů s prodlouženým C-koncem. Zisk [PSI⁺] může vést k překlada normálně nepřekládaných oblastí, což se jeví jako evoluční výhoda. [PSI⁺] poskytuje mechanismus fenotypové diverzity v odpovědi na měnící se podmínky prostředí. (Uptain a Lindquist, 2002)



Obrázek 7: Funkce proteinu Sup35p. Ve stavu [psi⁻] je Sup35p nutný pro úspěšné ukončení translace. V buňkách s fenotypem [PSI⁺] vytváří Sup35p fibrilární agregáty. To narušuje terminaci translace a má za následek tvorbu delšího polypeptidového řetězce. Zisk [PSI⁺] může vést k objevení nových fenotypů a tudíž ke zvýšení genetické variability. Upraveno podle Aguzzi a Polymenidou (2004).

7 ZÁVĚR

Ačkoli se v posledních desetiletích zabývalo mnoho vědců z různých oborů hledáním a charakterizací původce prionových onemocnění, TSE nadále zůstávají v mnoha ohledech tajemstvím. Informace o struktuře a složení infekční částice jsou nedostatečné. Existence proteinu způsobujícího onemocnění, jenž je schopen se „samoreplikovat“, a s tím spjatá prionová teorie jsou nadále kontroverzními tématy. Nejdůležitějším důkazem podporujícím prionovou teorii je zjištění, že PrP^{Sc} je převládající makromolekulou nalezenou v purifikovaných infekčních frakcích. Hlavní námitkou proti této teorii je, že díky přítomnosti agregátů PrP je těžké vyčistit infekční agens a i ty nejčistší frakce stále obsahují detekovatelná množství nukleových kyselin a dalších složek, jež by mohly být důležité pro infektivitu. Byly publikovány alternativní modely navrhuující „virino“ nebo virus jako původce TSE.

I když vědci doposud nebyli schopni prokázat prionovou hypotézu a vyvolat přenosnou neuropatologickou chorobu s PrP^{res} vytvořeným za definovaných podmínek *in vitro* a ačkoliv zůstává mnoho nejasností ohledně struktury infekční formy PrP, je dnes uznávána úloha prionového proteinu v patogenezi nemoci. U jedinců nakažených TSE má PrP rozhodující vliv na dobu inkubace a mezidruhovou bariéru (Dormont, 2002). Nadále však zůstávají nejasnosti v otázkách týkajících se funkce PrP^C, místa a způsobu jeho přeměny v PrP^{Sc}. Přesný mechanismus vysvětlující spongiformní změny neuronů vedoucí až k jejich smrti taktéž není znám.

Díky studiu prionů je nyní jasné, že jeden polypeptidový řetězec může zaujímat více různých prostorových konformací. Porozumění molekulárním mechanismům strukturní přeměny PrP^C v PrP^{Sc} je nutné pro volbu vhodných postupů léčení TSE. Slibnými přístupy v boji s prionovými chorobami by mohly být např. prevence přeměny PrP^C v PrP^{Sc} díky stabilizaci konformace PrP^C či ochrana některých zvířat před TSE delecí jejich genu pro PrP. Prionů prosté hovězí maso není hubbou příliš vzdálené budoucnosti, protože v lednu roku 2007 bylo publikováno, že genovou manipulací byl vytvořen a následně charakterizován PrP^C-deficientní skot. Po více než 20 měsících je klinicky, fyziologicky, histopatologicky, imunologicky a reprodukčně normální. Homogenáty jeho mozkové tkáně jsou rezistentní k šíření prionů *in vitro* (Richt *et al.*, 2007). Přerušení tvorby PrP^C tedy nemá za následek zjevné vývojové abnormality. Geneticky modifikovaný skot se patrně stane důležitým modelem ve výzkumu prionů a je možné, že rozhodujícím způsobem ovlivní masný průmysl.

Objev prionů u nižších eukaryot ukázal, že fenomén prionů je v přírodě široce rozšířený. Priony kvasinek by mohly být jedním z modelů, vhodných pro výzkum prionů. Hlavními výhodami studia prionů kvasinek oproti prionům savců jsou jejich dostupnost (kvasinky *S. cerevisiae* jsou modelovým organizmem molekulárně genetických studií) a možnost provádět rychlé a bezpečné experimenty (jejich priony nejsou pro člověka nebezpečné). Studium prionů kvasinek může významně přispět k pochopení molekulárních mechanismů přeměny proteinu do prionového stavu a může pomoci našemu poznávání biologické úlohy fenoménu prionů všeobecně.

POUŽITÁ LITERATURA

- Aguzzi, A. a Polymenidou, M. (2004): Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* 116(2): 313-27.
- Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., Clarke, M.C. (1967): Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214(90): 764-6.
- Armstrong, R.A. (2006): Creutzfeldt-Jakob disease and vision. *Clin Exp Optom* 89(1): 3-9.
- Behrens, A. (2003): Physiological and pathological functions of the prion protein homologue. *Dpl. Br Med Bull* 66: 35-42.
- Béranger, F., Mangé, A., Goud, B., Lehmann, S. (2002): Stimulation of PrP(C) retrograde transport toward the endoplasmic reticulum increases accumulation of PrP(Sc) in prion-infected cells. *J Biol Chem* 277(41): 38972-7.
- Bessen, R.A. a Marsh, R.F. (1992a): Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J Gen Virol* 73 (Pt 2): 329-34.
- Bessen R.A., a Marsh, R.F. (1992b): Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol* 66(4): 2096-101.
- Borchelt, D.R., Taraboulos, A., Prusiner, S.B. (1992): Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* 267(23): 16188-99.
- Bousset, L. a Melki, R. (2002): Similar and divergent features in mammalian and yeast prions. *Microbes Infect* 4(4): 461-9.
- Brown, P. a Cervenakova, L. (2005): A prion lexicon (out of control). *Lancet* 365(9454): 122.
- Burns, C.S., Aronoff-Spencer, E., Dunham, C.M., Lario, P., Avdievich, N.I., Antholine, W.E., Olmstead, M.M., Vrieling, A., Gerfen, G.J., Peisach, J., Scott, W.G., Millhauser, G.L. (2002): Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein. *Biochemistry* 41: 3991–4001.
- Burns, C.S., Aronoff-Spencer, E., Legname, G., Prusiner, S.B., Antholine, W.E., Gerfen, G.J., Peisach, J., Millhauser, G.L. (2003): Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry* 42: 6794–803.
- Campana, V., Sarnataro, D., Zurzolo, C. (2005): The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends Cell Biol* 15(2): 102-11.
- Caughey, B., Raymond, G.J., Kocisko, D.A., Lansbury, P.T. Jr. (1997): Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie-associated prion protein in guanidine denaturation studies. *J Virol* 71(5): 4107-10.
- Caughey, B. (2001): Prion protein interconversions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1406): 197-200; discussion 200-2.
- Chesebro, B. (2003): Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br Med Bull* 66: 1-20.
- Clarke, A.R., Jackson, G.S., Collinge, J. (2001): The molecular biology of prion propagation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1406): 185-95.

- Collee, J.G., Bradley, R., Liberski, P.P. (2006): Variant CJD (vCJD) and bovine spongiform encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 2. *Folia Neuropathol* 44(2): 102-10.
- Collins, S.J., Lawson, V.A., Masters, C.L. (2004): Transmissible spongiform encephalopathies. *The Lancet*, Volume 363(9402): 51-61.
- Cuillé, J. a Chelle, C. L. (1936): La maladie dite tremblante du mouton, est-elle inoculable? *C. R. Seances Acad. Sci. (Paris)* 203: 1552-1554.
- DeBurman, S.K., Raymond, G.J., Caughey, B., Lindquist, S. (1997): Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(25): 13938-43.
- Dormont, D. (2002): Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Letters*, Volume 529(1): 17-21.
- Eghiaian, F. (2005): Structuring the puzzle of prion propagation. *Curr Opin Struct Biol* 15(6): 724-30.
- Gabus, C., Auxilien, S., Péchoux, C., Dormont, D., Swietnicki, W., Morillas, M., Surewicz, W., Nandi, P., Darlix, J.L. (2001): The prion protein has DNA strand transfer properties similar to retroviral nucleocapsid protein. *J Mol Biol* 307(4): 1011-21.
- Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., Alpers, M. (1966): Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209(5025): 794-6.
- Gauczynski, S., Peyrin, J.M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmézas, C.I., Weiss, S. (2001): The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J* 20(21): 5863-75.
- Georgsson, G., Andresdottir, V., Palsson, P.A., Petursson, G. (1991): Visna and AIDS - various comparative aspects. *Nord Med* 106(4): 112-5.
- Gibbs, C.J., Gajdusek, D.C., Asher, D.M., Alpers, M.P., Beck, E., Daniel, P.M., Matthews, W.B. (1968): Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161(839): 388-9.
- Griffith, J.S. (1967): Self-replication and scrapie. *Nature* 215(105): 1043-4.
- Hadlow, W.J. (1959): Scrapie and kuru. *Lancet* 2: 289-290.
- Harris, D.A. (2003): Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull* 66: 71-85.
- Herrmann, L.M. a Caughey, B. (1998): The importance of the disulfide bond in prion protein conversion. *Neuroreport* 9(11): 2457-61.
- Horiuchi, M., Priola, S.A., Chabry, J., Caughey, B. (2000): Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(11): 5836-41.
- Klatzo, I., Gajdusek, D.C., Zigas, V. (1959): Pathology of Kuru. *Lab Invest.* 8(4): 799-847.
- Knaus, K.J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W.K., Yee, V.C. (2001): Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol* 8: 770-74.

- Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T., Caughey, B. (1994): Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370(6489): 471-4.
- Kocisko, D.A., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T., Caughey, B. (1995): Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(9): 3923-7.
- Lawson, V.A., Collins, S.J., Masters, C.L., Hill, A.F (2005): Prion protein glycosylation. *J Neurochem* 93(4): 793-801.
- Liemann, S. a Glockshuber, R. (1998): Transmissible spongiform encephalopathies. *Biochem Biophys Res Commun* 250(2): 187-93.
- McKenzie, D., Bartz, J., Mirwald, J., Olander, D., Marsh, R., Aiken, J. (1998): Reversibility of scrapie inactivation is enhanced by copper. *J Biol Chem* 273: 25545-47.
- Mironov, A. Jr., Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R.A., Burton, D., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Peters, P.J. (2003): Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci* 23(18): 7183-93.
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J.L., Lehmann, S., Launay, J.M., Kellermann, O. (2000): Signal transduction through prion protein. *Science* 289(5486): 1925-8.
- Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G., Taraboulos, A. (1997): Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* 272(10): 6324-31.
- Prusiner, S.B. (1982): Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216(4542): 136-44.
- Prusiner, S.B. (1989): Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prions. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 3(1-2): 52-78.
- Prusiner, S.B. (1998): Prions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(23): 13363-83.
- Richt, J.A., Kasinathan, P., Hamir, A.N., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., Sathiyaseelan, J., Wu, H., Matsushita, H., Koster, J., Kato, S., Ishida, I., Soto, C., Robl, J.M., Kuroiwa, Y. (2007): Production of cattle lacking prion protein. *Nat Biotechnol* 25(1): 132-8.
- Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T., Noda, T. (1996): Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380(6574): 528-31.
- Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blättler, T., Brandner, S., Götz, J., Rüllicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mering, C., Hangartner, C., Aguzzi, A., Weissmann, C. (1998): Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93(2): 203-14.
- Shyng, S.L., Huber, M.T., Harris, D.A. (1993): A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 268(21): 15922-8.
- Sigurdsson, B. (1954): Observations on three slow infections of sheep. *Br. Vet. J.* 110: 341-54.

Simons, K. a Eehalt, R. (2002): Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 110(5): 597-603.

Taraboulos, A., Raeber, A.J., Borchelt, D.R., Serban, D., Prusiner, S.B. (1992): Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol Biol Cell* 3(8): 851-63.

Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A., Manson, J.C. (1996): Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380(6575): 639-42.

Tuite, M.F. a Lindquist, S.L. (1996): Maintenance and inheritance of yeast prions. *Trends Genet* 12(11): 467-71.

Uptain, S.M. a Lindquist, S. (2002): Prions as protein-based genetic elements. *Annu Rev Microbiol* 56: 703-41.

Zahn, R. (2003): The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J Mol Biol* 334(3): 477-88.

Zuegg, J. a Gready, J.E. (2000): Molecular dynamics simulation of human prion protein including both N-linked oligosaccharides and the GPI anchor. *Glycobiology* 10(10): 959-74.