

Wciąż fascynujące priony

PAWEŁ P. LIBERSKI

Samodzielna Pracownia Biologii Nowotworów Katedry Onkologii Akademii Medycznej, ul.Paderewskiego 4, 93-509 Łódź

Jednym z najbardziej fascynujących problemów współczesnych nauk biomedycznych jest problem czynnika infekcyjnego scrapie i choroby Creutzfeldta-Jakoba. Problem ten stał się również dodatkowo ważny ze względu na pasaż choroby szalonych krów (encefalopatii gąbczastej bydła) na człowieka i nieznanych dotąd rozmiarów epidemii. Teorią, która zyskała obecnie największe poparcie eksperymentalne jest teoria "prionu" - czynnika zakaźnego utworzonego jedynie z białka PrP^{Sc}, będącego patologicznym konformerem prawidłowego białka PrP^C. W artykule omówione są teorie prionu oraz teorie alternatywne - teoria wirino, czyli hybrydy utworzonej z małego kwasu nukleinowego i płaszczka białkowego, kodowanego przez gen komórkowy oraz teoria wirusowa.

Dwadzieścia pięć ofiar w większości poniżej 30 roku życia zmarłych na rzadki zespół otępienny tzw. nowy wariant choroby Creutzfeldta-Jakoba (nvCJD) stanowiło pierwszy dowód, że encefalopatia gąbczasta krów (choroba szalonych krów; BSE) zainfekowała ostatecznie człowieka [36]. Panika, która wybuchła z tego powodu spowodowała, że grób jednej z ofiar był głęboki na 9 stóp a nie jak zwykle na 6 zaś grabarze zostali wyposażeni w ochronne ubrania i rękawice chirurgiczne. Nie po raz pierwszy choroby wywołane przez priony, do których należy CJD i encefalopatia gąbczasta bydła (*bovine spongiform encephalopathy* - BSE), poruszyły media. Już w 1985r., gdy brytyjska telewizja podała sensacyjną wiadomość iż chory, który zmarł prawdopodobnie na CJD, został zakażony podczas podawania hormonu wzrostu otrzymanego z przysadek człowieka, wśród biorców hormonu i lekarzy wybuchło przerażenie. U ludzi przyjmujących hormon wzrostu nie zaobserwowano jednak epidemii CJD jednak około 100 pacjentów przyjmujących hormon wzrostu zostało zakażonych [2]. Co stanie się teraz nie wiadomo.

Choroba Creutzfeldta-Jakoba a tajemnica "kuru"

Obraz kliniczny nvCJD jest odmienny od obrazu sporadycznego CJD (żaden z przypadków nvCJD nie zostałyby rozpoznany jako „prawdopodobny CJD” na gruncie klinicznym). U 9 z 10 pierwszych chorych [36] stwierdzono zaburzenia zachowania (lęk, agresja) jako objawy prodromalne; u czterech wystąpiły ciągle dysestezje, ból w stopach utrzymywał się przez cały okres choroby. U dziewięciu chorych, ataksja stanowiła wczesny objaw. Otępienie, stwierdzone u wszystkich chorych, pojawiło się w późnym okresie choroby; jedynie u dwóch chorych zaburzenia pamięci były objawem wstępnym. W żadnym przypadku nie odnotowano typowego dla CJD zapisu EEG pod postacią synchronicznych fal wolnych i ostrych.

Obraz neuropatologiczny nvCJD jest charakterystyczny. Elementem patognomicznym jest obecność blaszek amyloidowych otoczonych wianuszkami wakuoli (ang. *florid plaques*). Blaszkę taką są rozsiane w korze mózgu i mózdzku, jądrach kresomózgowia, wzgórzu i podwzgórzu. Nie występują one w innych odmianach CJD człowieka stwierdzono je natomiast po pasażu BSE na makaki [27]. Immunohistochemia z użyciem przeciwciał przeciwko białku prionu (*prion protein* - PrP), wykazuje w mózgach chorych z nvCJD obecność bardzo licznych blaszek Kuru i blaszek „wielordzeniowych” różnej wielkości oraz PrP-dodatnich złogów około-komórkowych i wokół wakuoli a także linijnie ułożone złogi w istocie szarej. Molekularnie, wszystkie przypadki nvCJD wykazują polimorfizm 129^{Met} genu dla PrP (patrz niżej).

Choroba Creutzfeldta-Jakoba, która została opisana przez dwóch niemieckich neuropatologów (Hansa Gerharda Creutzfeldta i Alfonsa Jakoba) w latach dwudziestych tego wieku, występuje ze stałą częstością 1 na milion mieszkańców na całym świecie. Od 1968 roku, kiedy to Clarence J. Gibbs junior i D. Carleton Gajdusek przeszczepili ten zespół na szympansy [15], było wiadomo, że przyczyną jest tajemniczy czynnik infekcyjny, mniejszy niż najmniejsze dotąd znane wirusy i wiroidy. Wcześniej D. Carleton Gajdusek odkrył kuru, zwaną przez dziennikarzy od jednego z towarzyszących tej chorobie objawów, „śmiejącą się śmiercią” a występującą endemicznie w niedostępnych górach Papua Nowej Gwinei u członków grupy lingwistycznej (plemienia) Fore [11,13,14,28] (ryc. 1). Kuru szerzyła się poprzez rytualny kanibalizm uprawiany przez Fore w dowód szacunku dla zmarłych krewnych [28]. Wyciągnięty z rozłupanej czaszki mózg gotowano w bambusowym cylindrze a następnie zjadano bądź rozsmarowywano na skórze. Czynnikiem infekcyjnym zawarty w ogromnej ilości w gramie mózgu przenikał do

organizmu przez uszkodzone śluzówki i przewod pokarmowy. Po długim okresie czasu (od kilkunastu miesięcy do 40 lat) rozpoczynał się powolny proces umierania, zaburzenia równowagi, drżenie ("kuru" oznacza drżenie, np. z zimna lub dreszcze podczas gorączki), przymusowy płacz i śmiech; charakterystycznie nie występuje zespół otępienny nawet w końcowej, terminalnej fazie choroby. W ostatnim stadium, wyniszczeni i niezdolni do poruszania chorzy oczekiwali śmierci głodowej lub ginęli wskutek zachłystowego zapalenia płuc. "Nawet kompletnie pijany" powie potem Gajdusek, "mógł zauważyć, że choroba występująca endemicznie wśród kanibali prawdopodobnie szerzy się przez jedzenie trupów". Gajdusek od początku zresztą podejrzewał, że kuru jest chorobą zakaźną (praktycznie każda choroba występująca endemicznie jest zawsze chorobą zakaźną; wyjątek stanowią pojawiające się nagle zatrucia, których na Papua Nowej Gwinei nie ma). Ale zakażane gryzonie i króliki nie zachorowały na kuru... Dziś wiemy, że czas obserwacji był zbyt krótki.

W 1959 William Hadlow, patolog weterynaryjny pracujący w Narodowych Instytutach Zdrowia, w Rocky Mountain Laboratory, Hamilton, zdecydował się na opublikowanie w naukowym piśmie "Lancet" listu [12], będącego wynikiem wcześniejszej korespondencji z Gajdusekiem, stwierdzając że zmiany w mózgu



Ryc. 1. Dwoje dzieci w początkowej fazie kuru. Dzięki uprzejmości dr. D. Carletona Gajduska, Frederick, MD, USA.

chorych na kuru przypominają chorobę owiec i czasem kóz, zwaną scrapie. Scrapie (polska nieużywana nazwa trzęsawka lub kołowaczka), występująca endemicznie w Anglii od XVIII wieku, jest wywoływana przez tajemniczy wirus („czynniki przesycające”), o którego istnieniu po raz pierwszy doniosło dwóch francuskich badaczy, J. Cuille i P.-L. Chelle w 1936 roku [8]. Scrapie charakteryzuje się długim okresem inkubacji (czasem jaki upływa od zainfekowania zwierzęcia aż po wystąpienie objawów choroby) sięgającym wielu lat. Gajdusek już wiedział dlaczego pierwsze próby zakażenia małych zwierząt laboratoryjnych były nieudane, po prostu należało dłużej czekać zatem ... czekał. Pierwsze szympansy zakażone kuru zachorowały w 1965 [14]. W 1976 Daniel Carleton Gajdusek uzyskał najwyższy zaszczyt jaki może spotkać uczonego, Nagrodę Nobla [11].

CJD przypomina kuru i na całym świecie występuje z tajemniczo identyczną częstością jednego przypadku na milion mieszkańców. Do 1985 znanych było tylko kilka przypadków tej choroby, która rozwinęła się w wyniku błędnych działań medycznych - przeszczepienia rogówki i wykonywania badań elektrofizjologicznych elektrodami igłowymi wkłuwanymi do mózgu chorego [2]. Skąd biorą się pozostałe przypadki - nie wiadomo. Liczba chorych po podawaniu hormonu wzrostu zaczęła rosnąć (obecnie ponad stu chorych), wkrótce pojawili się chorzy po podawaniu gonadotropin (także izolowanych z przysadek), wreszcie po przeszczepie liofilizowanej opony twardej, pobranej od chorego z CJD; około 70 chorych. Cały czas ryzyko dotyczyło jednak minimalnej liczby chorych, przede wszystkim tych którym podaje się hormon wzrostu (obecnie zresztą otrzymywany metodami inżynierii genetycznej a więc całkowicie bezpieczny).

Choroba szalonych krów

W 1986 roku, Gerald A.H. Wells, wybitny patolog weterynaryjny pracujący w Central Veterinary Laboratory (CVL) brytyjskiego Ministerstwa Rolnictwa, Rybołówstwa i Żywności w New Haw koło Londynu badał mózg krowy, padłej z powodu nieznanego dotąd choroby neurologicznej. Obraz przypominał scrapie. W rzeczywistości Gerald Wells odkrył właśnie nową jednostkę chorobową - "chorobę szalonych krów" (BSE) [35]. Od pojedynczych przypadków w końcu lat osiemdziesiątych choroba zaczęła szerzyć się lawinowo wśród populacji brytyjskich krów, w 1994 było już łącznie 138 359 przypadków. BSE jest jednak nadal chorobą niezbyt częstą występując z częstością 1 - 2 % w danym stadzie a tak duża liczba przypadków jest wynikiem dużej populacji bydła w Wielkiej Brytanii. Pierwsze pytanie, które zadał sobie Gerald Wells brzmiało, dlaczego epidemia wybuchła wśród krów właśnie teraz. Tutaj odpowiedź była względnie prosta.

Krowy, zwłaszcza krowy mleczne, są karmione bogatobiałkowym pokarmem (tzw. „*meat and bone meal*” lub „*cow cake*”) a uzyskiwanym z odpadów owiec i krów, taki proces nazywa się po angielsku „*rendering*” (od słowa, *to render* - topić, np. tłuszcz). Kilka lat przed pojawieniem się pierwszych przypadków klinicznych zmieniono procedurę otrzymywania tego produktu. Zmiana technologii spowodowała, iż czynnik infekcyjny (prion) zawarty w owczych (lub krowich) odpadach nie został zniszczony i zakażał krowy. W drugiej fazie epidemii, krowy były już zakażane odpadami pochodzącymi z krów zakażonych BSE. Innymi słowami, została zlikwidowana tzw. „bariera gatunkowa” (czynnik infekcyjny ma trudności z zakażaniem organizmów innego gatunku). Ale drugie pytanie brzmiało bardziej złowieszczo...czy czynnik ten może teraz zakażać człowieka...czy grozi nam druga, tym razem znacznie większa, epidemia kuru? W międzyczasie BSE zaatakowała inne gatunki zwierząt: antylopy (np. Kudu), kota domowego (pierwszy odnotowany przypadek nosił imię Max, stąd nazwano go „Mad Max”), geparda, pumę, ocelota, tygrysa syberyjskiego i bizona. Wszystkie te zwierzęta otrzymywały pokarm wzbogacony w białka uzyskiwane z odpadów. Wszystkie...poza antylopą Kudu, która, podobnie jak ma to miejsce w naturalnej scrapie, przekazuje infekcję pionowo, z matki na potomstwo.

Kuru i CJD łatwo eksperymentalnie zakażać duże naczelne (np. szympany) oraz tzw. małpy Starego i Nowego Świata np. małpę wiewiórkowatą (*Squirrel monkey*) lub pająkowatą (ang. *Spider monkey*), znacznie trudniej zaś myszy; hodowany w domach chomik syryjski jest najłatwiej zakaźny CJD [11]. Ze scrapie jest dokładnie odwrotnie, stosunkowo łatwo jest zakażać myszy czy chomiki, trudniej małpy Starego i Nowego Świata, szympany są zaś całkowicie odporne. Do marca tego roku wydawało się, poprzez analogię ze scrapie, że człowiek, który jest najbliższy genetycznie szympanom, nie powinien lękać się BSE. Pozostawało tylko jedno „ale”. Wiąże się ono z odkryciem dokonany w połowie lat sześćdziesiątych przez Alana G. Dickinsona i Hugh Frasera z Edynburga; czynnik infekcyjny scrapie nie jest biologicznie jednolity, istnieją jego odmiany zwane szczepami (zwykle wirusy np. grypy też występują pod postacią szczepów) [9]. Jedne szczepy wywołują chorobę u pewnych odmian myszy szybko (mówimy wówczas, że okres inkubacji jest krótki), inne wolno a inne wcale. Szczepy różnią się także nasileniem i dystrybucją zmian wywoływanych w mózgu. Pytanie brzmiało. Czy szczep czynnika infekcyjnego, który wywołał epidemię BSE nie jest odmienny od pozostałych, innymi słowami, czy epidemię zapoczątkował bardziej złośliwy szczep, który został wyselekcjonowany po zakażeniu krów. W październiku 1997 Moira Bruce i wsp. [3] oraz Hill i wsp. [19] opublikowali odpowiedź twierdzącą na to pytanie: szczep, który wywołuje nvCJD i BSE jest identyczny i odmienny od znanych szczepów scrapie.

W Wielkiej Brytanii trwają intensywne badania problemu, między innymi wszystkie przypadki CJD są rejestrowane w specjalnym ośrodku stworzonym w tym celu w Edynburgu a kierowanym przez dr Roberta Willa. Odnotowano śmierć na CJD trzech farmerów, którzy hodowali krowy zakażone BSE ale ta mała liczba może wynikać jedynie z przypadku. Rzeczywiście, farmerzy ci chorowali na sporadyczną formę CJD a nie na nvCJD [3]. Wcześniej już stwierdzono objawy CJD u kilku nastolatków (najmłodszy miał 19 lat), wydawało się jednak, że są to nieistotne zbiegi okoliczności...dziś wiemy, że zwiastowały one nadciągającą burzę.

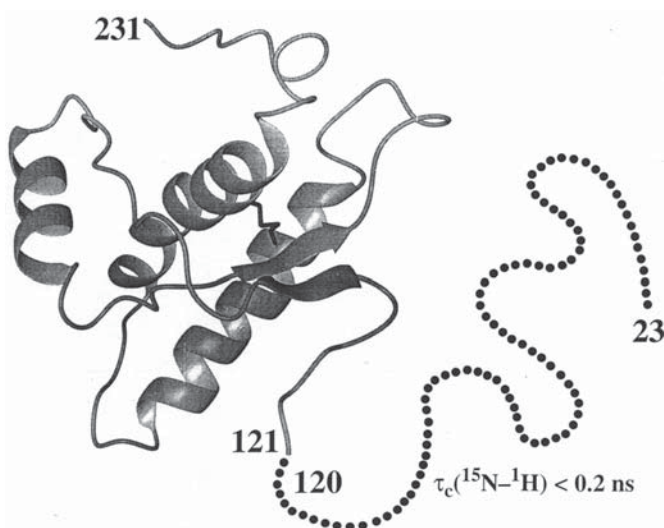
Priony - nowe czynniki infekcyjne

Co wiemy o budowie czynnika infekcyjnego scrapie zwanego obecnie „prionem” [32]. Wirusy są to patogeny zwierząt, owadów, roślin a nawet bakterii. W odróżnieniu od wszystkich organizmów żywych zawierają tylko jeden kwas nukleinowy, DNA lub RNA (wszystkie inne organizmy zawierają zawsze oba kwasy nukleinowe) oraz płaszcz białkowy; najmniejsze wirusopodobne twory (wiroidy roślin) nie zawierają już białek a tylko kolistą cząsteczkę RNA. Według Stanleya B. Prusnera, któremu otrzymał tego roku Nagrodę Nobla za tą właśnie koncepcję, czynnik infekcyjny scrapie (prion –akronim od *proteinaceous infectious particle*, z przestawionymi samogłoskami) jest jeszcze prostszy i nie zawiera już nawet kwasu nukleinowego.

W latach sześćdziesiątych nieżyjąca już Tikvah Alper badała wrażliwość czynnika scrapie na inaktywację promieniowaniem jonizującym [1]. Wyniki były zaskakujące; czynnik ten był tak odporny na działanie tego promieniowania, iż Alper jako pierwsza zaproponowała, że musi być on pozbawiony kwasu nukleinowego. Istotnie, procedury dezynfekcyjne, które niszczą kwasy nukleinowe nie powodują inaktywacji wirusa scrapie zaś te które niszczą białka, inaktywują go. Dane te skłoniły Stanleya B. Prusnera z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco do wysunięcia w 1982 roku hipotezy prionu. Hipoteza ta sugeruje, że czynnik wywołujący scrapie jest utworzony wyłącznie z białka. W następnym kroku Prusiner i jego współpracownicy istotnie oczyścili białko (uwidoczniając je w postaci prążka na żelu poliakryloamidowym). Ilość tego białka nazwanego PrP (białkiem prionu, *prion protein*) była ściśle powiązana z infekcyjnością scrapie; im więcej PrP tym materiał był bardziej zakaźny. Kiedy współpracujący z Prusinerem Leroy Hood z California Institute of Technology (CalTech) uzyskał sekwencję 15 N-końcowych aminokwasów PrP [33], oligonukleotydy o homologicznej sekwencji użyto jako „sondy” celem sklonowania genu dla PrP. Bomba wybuchła w 1985 roku. Wówczas Bruno Oesch pracujący w jednym z najlepszych laboratoriów biologii molekularnej w Europie, u Charlesa Weissmanna w Zurichu, sklonował gen dla PrP i stwierdził, że...jest

to gen komórkowy (a więc nie gen czynnika scrapie czyli prionu), który posiadają wszystkie ssaki oraz prawdopodobnie ptaki, muszka owocowa *Drosophila* i robak *C. elegans* [30]. Gen tak...ale białko u zdrowych ludzi, mimo, że wszystkie jego aminokwasy są dokładnie takie same jak białko chorych na CJD, posiada szereg właściwości innych niż to samo białko występujące u ludzi zakażonych CJD czy u owiec chorych na scrapie. Między innymi, białko komórkowe "zdrowe" (nazwane przez Prusinerą PrP^c) zostaje całkowicie strawione za pomocą pewnych enzymów, zaś białko "scrapie" (PrP^{sc}) zostaje strawione jedynie częściowo, pozostawiając oporny na trawienie "rdzeń" o ciężarze cząsteczkowym 27-30 kDa (tzw. PrP 27-30) Gdzie zatem jest klucz odróżniający "zdrowe" PrP^c od "zakaźnego" PrP^{sc}. Badania Prusinerą sugerują, iż w jego konformacji przestrzennej. Pierwszym, który wykazał, że PrP^c ma inną konformację przestrzenną niż PrP^{sc} był *Byron Caughey* z Rocky Mountain Laboratory, Hamilton, w USA, który stwierdził, że PrP^c zawiera liczne domeny tzw. α -helikalne (łańcuch aminokwasów skręcony jest przestrzennie na kształt helikoidy) zaś PrP^{sc} zawiera przewagę tzw. struktur β -fałdowych (tutaj łańcuchy aminokwasów układają się równolegle lub przeciw-równolegle) (ryc.2) [6, 34]. Pozostaje jednak kilka podstawowych pytań. W jaki sposób białko normalne nabiera cech "wirusa" czyli staje się infekcyjne? Prusiner i jego proponenci sugerują, że w wyniku zakażenia, PrP^{sc} jako matryca narzuca PrP^c swój patologiczny kształt, innymi słowami, cząsteczka PrP^{sc} zmienia cząsteczkę zdrowego białka PrP^c w kolejną cząsteczkę zakaźnego PrP^{sc}. O takim zjawisku pisał metaforycznie Kurt Vonnegut (którego brat był zresztą znanym

amerykańskim krystalografem) w książce "Kocia Kołyska", gdzie lód-9 w zetknięciu z wodą przekształca ją całkowicie w lód-9, niszcząc w wyniku wszystkie zapasy wody na świecie. A co ze szczepami scrapie. Prusiner uważa, że PrP^{sc} może mieć wiele różnych konformacji przestrzennych. Cząsteczki PrP o odmiennej konformacji przestrzennej byłyby właśnie szczepami scrapie. Laureat Nagrody Nobla, D.C. Gajdusek podobnie jak *Byron Caughey* czy *Peter Lansbury* z Uniwersytetu Harvarda sądzą inaczej. Zakaźną nie jest pojedyncza cząsteczka lub dimer PrP^{sc} lecz jej agregat, „kryształ”. Początkowo PrP^{sc} tworzy jądro krystalizacji (ang. „a seed”), wokół którego odkładają się kolejne cząsteczki PrP^{sc}. Tak jak z tej samej zamrożonej wody można stworzyć nieskończenie wiele form płatków śniegu, tak ta sama cząsteczka PrP^{sc} może utworzyć różniące się „kształtem” kryształy szczepów scrapie. Niestety nikt nigdy nie obserwował mechanizmu, który umożliwiłby tworzenie takich odmiennych kryształów w komórce, nie znaczy to jednak że mechanizmu takiego nie ma, może po prostu nie został on jeszcze odkryty. Pomimo nagrody Nobla dla Stanleya B. Prusinerą, istnieją jednak i inne hipotezy. Jeden z najwybitniejszych badaczy scrapie, *Richard H. Kimberlin* jest autorem hipotezy *wirino* [23]. Głosi ona, że wirus scrapie jest hybrydą (chimerą) molekularną składającą się z małego (wielkości właśnie wspomnianego wyżej wiroidu) kwasu nukleinowego oraz płaszcza białkowego. Tego pierwszego, ze względu na małą wielkość nie udało się dotychczas znaleźć. Ponieważ infekcja scrapie nie powoduje żadnych zmian w układzie immunologicznym (nie pojawiają się przeciwciała, nie tworzą się uczulone limfocyty itd) to taki płaszcz białkowy powinien być "ukradziony" (ang. *pirated*) komórce gospodarza i traktowany przez komórkę jako "własny" (na ogół nie wytwarzamy przeciwciał przeciwko własnym tkankom). Płaszczem tym mógłby właśnie być...PrP^{sc}. Która z hipotez jest ostatecznie prawdziwa wykażą zapewne najbliższe lata i Nagroda Nobla dla Stanleya B. Prusinerą nie przesądza ostatecznego rozwiązania problemu. Jak widzimy hipoteza prionu nie jest jedyną. Być może pole scrapie czeka na trzecią Nagrodę Nobla.



Ryc. 2. Pełna struktura przestrzenna rekombinowanego PrP^c o długości 23 - 231 aminokwasów. Zwraca uwagę globularny C-koniec zawierający trzy α -helisy i dwie struktury β -fałdowe. N-koniec (aminokwasy 120-231) wykazuje właściwości „random-coil peptide”. Dzięki uprzejmości prof. R. Glockshubera, Zurich, Szwajcaria.

Genetyka prionów

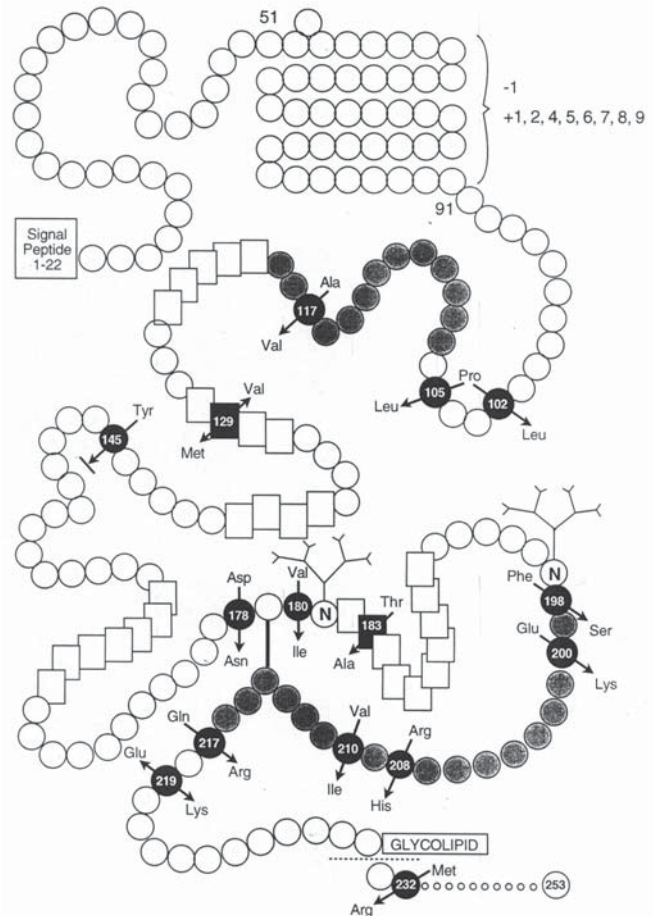
O tym, iż PrP jest ściśle powiązane z infekcją scrapie czy CJD, świadczą także dane genetyczne. Od lat trzydziestych wiadomo, że 10-15% przypadków CJD oraz, *ex definitione*, wszystkie przypadki choroby Gerstmann-Sträusslera-Scheinkera (GSS) i śmiertelnej rodzinnej bezsenności (ang. *fatal familial insomnia, FFI*), dwóch bardzo rzadkich chorób wywołanych przez priony, występują rodzinnie dziedzicząc się autosomalnie dominująco. Z klasycznych badań Alana G. Dickinsona i wsp. z Edynburga wiadomo, że okres inkubacji (a zatem replikacja) czynnika scrapie znajduje się pod ścisłą

kontrolą genu *Sinc* (od *incubation period*) tożsamego z *Prn-p* (analog genu *PRNP* u człowieka). Gen dla PrP (*PRNP*) na chromosomie 20 u człowieka stał się zatem oczywistym celem poszukiwań zmian ko-segregujących z fenotypową ekspresją choroby. Pierwsza mutacja wykryta w obrębie *PRNP* była mutacją kodonu 102 stwierdzona w GSS i prowadząca do substytucji proliny leucyną [21]. Mutacje te (Leu^{102}) wykryto w wielu rodzinach GSS na całym świecie (łącznie z oryginalną austriacką rodziną, w której po raz pierwszy opisano ten zespół w 1936 roku, [26]). W niezwyklej rodzinie (Indiana kindred) z GSS ze stanu Indiana, USA, charakteryzującej się obecnością typowych dla choroby Alzheimera, tau-pozytywnych dystroficznych neurytów współwystępujących ze zmianami specyficznymi dla GSS, występuje mutacja kodonu 198 prowadząca do substytucji fenyloalaniny seryną zaś w podobnej fenotypowo rodzinie ze Szwecji występuje mutacja kodonu 217 prowadząca do substytucji kwasu glutaminowego arginina [10,21].

Mutacje w obrębie genu dla PrP (*PRNP*) wykryto także w rodzinnych przypadkach CJD w tym w historycznie pierwszym rodzinnym przypadku CJD z rodziny Backer w Niemczech opisanym przez Meggendorfera [25]. Mutacja kodonu 200 prowadząca do substytucji glutaminy lizyną wykryto we wszystkich trzech ogniskach endemicznej CJD: w Izraelu u Żydów Sefardyjskich pochodzenia libijskiego (“a wandering Jew of the Diaspora”), w Czechosłowacji (“Oravske kuru”) oraz w Chile [16, 18]. W fińskich, holenderskich, francuskich i amerykańskich (pochodzenia holenderskiego i węgierskiego) rodzinach z CJD wykryto mutacje kodonu 178 prowadząca do substytucji asparaginy kwasem asparaginowym [29]. Tą właśnie mutację wykryto w rodzinie Backer [25]. Identyczna mutacja występuje w przypadkach FFI, znanych w klasycznej literaturze neuropatologicznej jako “demencje wzgórzowe” (thalamic dementias) [17]. Na marginesie, pierwszym, który „opisał” rodzinę z FFI był Gabriel Garcia Marquez w książce „Sto lat samotności”. Mutacja Leu^{105} występuje w przypadkach rodzinnej spastycznej paraparezy z mnogimi PrP-pozytywnymi blaszkami w korze ruchowej zaś nielicznymi w mózdku [24]. Fenotyp ten może być także wariantem GSS.

Wszystkie wymienione mutacje występowały w przypadkach rodzinnych. Występująca endemicznie kuru, podobnie jak sporadyczne przypadki CJD, nie wiąże się z istnieniem żadnej mutacji. Natomiast sporadyczne przypadki CJD występują przede wszystkim u ludzi będących homozygotami dla polimorfizmu kodonu 129 *PRNP* [7,31]. W sporadycznych przypadkach CJD (w tym przypadkach jatrogennych - po podawaniu ludzkiego hormonu wzrostu) przeważają homozygoty $129^{\text{Met Met}}$ lub $129^{\text{Val Val}}$ w odróżnieniu od dominującej heterozygotycznej populacji $129^{\text{Met Val}}$. Co szczególnie

interesujące, Val^{129} występuje powiązana z Ser^{198} lub Arg^{217} w GSS z tau-pozytywnymi dystroficznymi neurytami [10, 21] zaś z Asn^{178} w rodzinnych przypadkach CJD. Obecność genotypu $\text{Val}^{129} \text{Asn}^{178}$ prowadzi do wystąpienia fenotypu CJD natomiast $\text{Met}^{129} \text{Asn}^{178}$ jest powiązana fenotypowo z FFI [17]. Wszystkie przypadki nwCJD są homozygotami $129^{\text{Met Met}}$. Całość zmian genetycznych przedstawia ryc. 3.



Ryc. 3. Schemat zmian genetycznych w genie dla PrP (*PRNP*) człowieka. Dzięki uprzejmości dr P. Browna, LCNSS, NINDS, Bethesda, MD, USA.

Należy zaznaczyć, iż obecność mutacji w obrębie ludzkiego genu dla PrP częściowo warunkuje fenotyp kliniczny CJD [16]. Dla przykładu, w 74% przypadków CJD z mutacją kodonu 200 występuje typowy zapis EEG. W odróżnieniu, zapis ten prawie nigdy nie pojawia się w przypadkach CJD z mutacją kodonu 178. Przypadki CJD z mutacją kodonu 178 cechuje znacznie wcześniejszy niż w przypadkach sporadycznych wiek zachorowania i znacznie dłuższy czas trwania choroby. Jeszcze wcześniej manifestują się przypadki CJD, w których gen dla PrP zawiera dodatkowe wstawki. Przypadki GSS zajmują ekstremalną pozycję, manifestując się najwcześniej i trwając najdłużej.

Myszy transgeniczne jako nowe źródło wiedzy o prionach

W dalszym kroku, badacze z laboratorium Weissmanna skonstruowali myszy, które wcale nie posiadają PrP, ponieważ gen dla tego białka został uszkodzony (takie myszy nazywają się „knock-outy”). Myszy te są w zasadzie zdrowe (a więc PrP^C nie jest niezbędne dla życia) [5] lecz nie można ich zarazić scrapie [4]. Czy jest to jednoznaczne ze stwierdzeniem, że PrP i czynnik scrapie to jedno i to samo. Niekoniecznie. Jeśli wyobrazimy sobie, że PrP jest receptorem dla czynnika scrapie (sytuacja analogiczna dla wszystkich wirusów) to jego brak uniemożliwia zainfekowanie komórki. Istnieje jednak pojedynczy eksperyment, którego nie da już się wytłumaczyć w taki sposób. Karen Hsiao skonstruowała w 1990 myszy transgeniczne (są to myszy, które zawierają dodatkowo „obcy” dodatkowy gen, np. człowieka, tzw. transgen) zawierające gen dla PrP obciążony taką samą mutacją jak mutacja występująca w GSS [22]. U myszy tych rozwinęła się spontanicznie choroba przypominająca scrapie. Co więcej, Prusiner i Hsiao twierdzą, że choroba ta jest również zakaźna, to jest można ją przeszczepić na transgeniczne myszy o niskim poziomie ekspresji transgenu. Jeżeli nie jest to jednak interakcja transgen: transgen to hipoteza prionu zostanie ostatecznie udowodniona.

Istotnie, Jane Manson, NPU, Edynburg, przedstawiła w ubiegłym roku myszy transgeniczne, z mutacją P101L, ale z pojedynczą kopią transgenu. Myszy takie nie wykazują cech „spontanicznej” choroby zwyrodnieniowej, i z ich mózgu nie można dokonać pasażu na mózgi innych zwierząt. Innymi słowy, „spontaniczna” choroba neurozwyrodnieniowa jest jedynie artefaktem nadekspresji transgenu.

Czy czeka nas nowa epidemia ?

Jakie jest więc ryzyko epidemii CJD. Młodzi ludzie, zmarli ostatnio na CJD, zakazili się BSE prawdopodobnie w latach osiemdziesiątych jako dzieci. Na początku epidemii BSE nie tylko nie zdawano sobie sprawy z rozmiarów epidemii ale i nie było przepisów prawnych zabraniających używania odpadów bydlęcych w łańcuch pokarmowym człowieka. Zakaz taki wprowadzono w lipcu 1988 roku i należy przypuszczać, że mięso krów urodzonych po tej dacie powinno być bezpieczne. Istotnie epidemia BSE zdaje się powoli wygasać. W 1994 roku obserwowano około 23 000 przypadków BSE a w 1995 roku jedynie 14 000. Natomiast zupełnie nie wiadomo ile osób zakaziło się BSE przed lipcem 1988 rokiem. Tylko kilkanaście, kilkadziesiąt a może nawet kilka milionów. Na to ostatnie pytanie odpowie jedynie czas.

Podziękowania: prace badawcze prowadzone w laboratorium P.P.L sa finansowane z II funduszu Marii Skłodowskiej-Curie i grantu KBN.

Piśmiennictwo

- Alper T., Cramp W.A., Haig D.A., Clarke M.C.: Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid ? Nature 1967; 214: 764-766.
- Brown P.: Human growth hormone therapy and Creutzfeldt-Jakob disease: a drama in three acts. Pediatrics 1988; 81: 85-92.
- Bruce M.E., Will R.G., Ironside J.W., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCordle., Chree A., Hope J., Brikett C., Cousens S., Fraser H., Brrostock C.: Transmission of mice indicate that „new variant” CJD is caused by the BSE agent. Nature 1997; 389: 498-501.
- Bueler H., Aguzzi A., Sailer A., Greiner R.A., Autenried P., Aguet M., Weissmann C.: Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. Cell 1993; 73: 1339-1347.
- Bueler H., Fischer M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H.P., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Aguet M., Weissmann C.: Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature 1992; 356: 577-582.
- Caughey B., Dong A., Bhat K.S., Ernst D., Hayes S.F., Caughey W.S.: Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. Biochemistry 1991; 30: 7672-7680.
- Collinge J., Palmer M.S., Dryden A.J.: Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet 1991; 337: 1441-1442.
- Cuille J., Chelle P-L.: La maladie dite tremblante du mouton est-elle inculable ? Comptes rendus des Seances de l'Academie des Sciences (Paris) 1936; 203: 1552-1554.
- Dickinson A.G., Meikle V.M.H., Fraser H.: Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. J. Comp. Pathol. 1968; 78: 293-299.
- Dlouhy S.R., Hsiao K., Farlow M.R., Foroud T., Conneally P.M., Johnson P., Prusiner S.B., Hodes M.E., Ghetti B.: Linkage of the Indiana kindred of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease to the prion protein gene. Nature Genetics 1992; 1: 64-67.
- Gajdusek D.C.: Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. W: Les Prix Nobel en 1976, Nobel Fdn, PA Norstedt & Soner, Stockholm 1967: 167-216.
- Gajdusek D.C.: Kuru and scrapie. W: Prion diseases of humans and animals (Prusiner S.B. i wsp. red). Ellis Horwood, New York, London, Toronto, Sydney, Singapore 1993: 47-52.
- Gajdusek D.C.: Kuru in childhood: implications for the problem of whether bovine spongiform encephalopathy affects humans. W: Transmissible subacute spongiform encephalopathies: prion disease. IIIrd International Symposium on transmissible subacute spongiform encephalopathies: prion disease (Court, L., Dodet, B., red). Elsevier, Amsterdam-Oxford-Paris: 15-26.
- Gajdusek D.C., Gibbs C.J., Alpers M.P.: Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. Nature 1966; 209: 794-796.

15. Gibbs C.J. Jr, Gajdusek D.C., Asher D.M., Alpers M.P., Beck E., Daniel P.M., Matthews W.B.: Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to chimpanzee. *Science* 1968; 161: 388-389.
16. Goldfarb L., Brown P., Mitrova E., Cervenakova L., Goldin L., Korczyn A.D., Chapman J., Galvez S., Cartier L., Rubenstein R., Gajdusek D.C.: Creutzfeldt-Jakob disease associated with PRNP codon 200^{Lys} mutation: an analysis of 45 families. *Europ. J. Epidemiol.* 1991; 7: 477-486.
17. Goldfarb L.G., Petersen R.B., Tabaton M., Brown P., LeBlanc A.C., Montagna P., Cortelli P., Jullien J., Vital C., Pendelbury W.W., Haltia M., Wills P.R., Hauw J.J., McKeever P.E., Monari L., Schrank B., Swergold G.D., Autillo-Gambetti L., Gajdusek D.C., Lugaresi E., Gambetti P.: Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 1992; 258: 806-808.
18. Goldfarb L.G., Korczyn A.D., Brown P., Chapman J., Gajdusek D.C.: Mutation on codon 200 of scrapie amyloid protein gene linked to Creutzfeldt-Jakob disease in Sephardic Jews of Libyan origin and non-Libyan origin. *Lancet* 1990; 336: 637.
19. Hill A.F., Desbruslais M., Joiner S., Sidle K.C.L., Gowland I., Collinge J., Doey L.J., Lantos P.: The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 1997; 389: 448-450.
20. Hsiao K., Baker H.F., Crow T.J., Poulter M., Owen F., Terwilliger J.D., Westaway D., Ott J., Prusiner S.B.: Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* 1989; 338: 342-345.
21. Hsiao K., Drough S.R., Farlow M.R., Cass C., Da Costa M., Conneally P.M., Hodes M.E., Ghett B., Prusiner S.B.: Mutant prion proteins in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nature Genetics* 1992; 1: 68-71.
22. Hsiao K., Scott M., Foster D., Groth D.F., DeArmond S.J., Prusiner S.B.: Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* 1990; 250: 1587-1590.
23. Kimberlin R.H.: Scrapie and possible relationships with viroids. *Sem. Virol.* 1990; 1: 153-162.
24. Kitamoto M., Amano M., Terao Y., Nakazato Y., Isshiki T., Mizutani T., Tateishi J.: A new inherited prion disease (PrP P105L mutation) showing spastic paraparesis. *Ann. Neurol.* 1993; 34: 808-813.
25. Kretzschmar H.A., Neumann M., Stavrou D.: Codon 178 mutation of the human prion protein gene in a German family (Backer family): sequencing data from 72-year-old celloidin-embedded brain tissue. *Acta Neuropathol.* 1995; 89: 96-98.
26. Kretzschmar H.A., Honold G., Seitelberger F., Feucht M., Wessely P., Mehraein P., Budka H.: Prion protein mutation in family first reported by Gerstmann, Straussler, and Scheinker. *Lancet* 1991; 337: 1160.
27. Lasmez C.I., Deslys J.P., Demaimay R., Adjou K.T., Hauw J.-J., Dormont D.: BSE transmission to macaques. *Nature* 1996; 381: 743-744.
28. Liberski P.P., Gajdusek D.C.: Kuru: forty years later. *Brain Pathol.* 1997; 7: 555-560.
29. Nieto A., Goldfarb L.P., Brown P., McCombie W.R., Trapp S., Asher D.M., Gajdusek D.C.: Codon 178 mutation in ethnically diverse Creutzfeldt-Jakob disease families. *Lancet* 1991; 337: 662-663.
30. Oesch B., Westaway D., Walchli M., McKinley M.P., Kent S.B.H., Aebersold R., Barry R.A., Tempst P., Teplow D.B., Hood L.E., Prusiner S.B., Weissmann C.: A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985; 40: 735-746.
31. Palmer M.S., Dryden A.J., Hughes J.T., Collinge J.: Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 1992; 352: 340-342.
32. Prusiner S.B.: Prions. W: Fields Virology. Vol. 2 (Fields, B.F., Knipe, D.M., Howley, P.M., red). Lippincott-Raven 1996: 2901-2950.
33. Prusiner S.B., Groth D.F., Bolton D.C., Kent S.B., Hood L.E.: Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 1984; 38: 127-134.
34. Riek R., Hornemann S., Wider G., Billeter M., Glockshuber R., Wuthrich K.: NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121-231). *Nature* 1996; 382: 180-182.
35. Wells G.A.H., Scott A.C., Johnson C.T., Gunning R.F., Hancock R.D., Jeffrey M., Dawson M., Bradley R.: A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 1987; 121: 419-420.
36. Will R.G., Ironside J.W., Zeidler M., Counsels S.N., Estibeiro K., Alprovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A., Smith R.G.: A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in UK. *Lancet* 1996; 347: 921-925.

Still fascinating prions

PAWEŁ P. LIBERSKI

Summary

Transmission of bovine spongiform encephalopathy (BSE) or "mad cow disease" to humans resulted in a new variant of Creutzfeldt-Jakob disease and raised both fear in media and a new wave of interest in prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies. "Prions" (according to a widely accepted definition) are proteinaceous infectious particles composed of an abnormal conformer of prion protein (PrP). Indeed, scrapie and cellular isoforms of PrP are identical in amino acid sequence but different in conformation (a relative proportion of alpha-helices and beta-sheets). Prions are transmissible agents of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, scrapie and several other "transmissible spongiform encephalopathies". However, these agents may not only be prions but also viruses or virinos (a viroid-like nucleic acid embedded in a host-encoded protein shell).