

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

ЛЕКЦІЯ 7

Тема: Пріони

План:

1. Історія відкриття пріонів
2. Властивості пріонного білка
3. Структурна організація гена PrP
4. Структура організація білків-пріонів
5. Пріонні захворювання людини та тварин

1. Історія відкриття пріонів

Пріони – білки які можуть викликати специфічні спонгіоморфні нейродегенеративні енцефалопатії людей та тварин. Вони були відкриті ще у другій половині ХХ сторіччя. На відміну від традиційних збудників захворювань пріони не містять нуклеїнових кислот, а лишено являють собою ізоморфу звичайного білка нервових клітин, який відрізняється способом укладки поліпептидного ланцюгу.

Відкриття пріонів мало величезне значення не тільки для теоретичної науки, але й з'ясування природи низки тяжких захворювань центральної нервової системи людини. З їх ідентифікацією у якості збудника захворювань ЦНС пов'язані роботи що було відзначено двома Нобелівськими преміями.

У 1976 році Нобелівську премію з фізіології та медицини разом з Б. Блампером одержав Д. Карлтон Гайдушек – американський педіатр та вірусолог: «за відкриття нових механізмів походження та розповсюдження інфекційних захворювань».

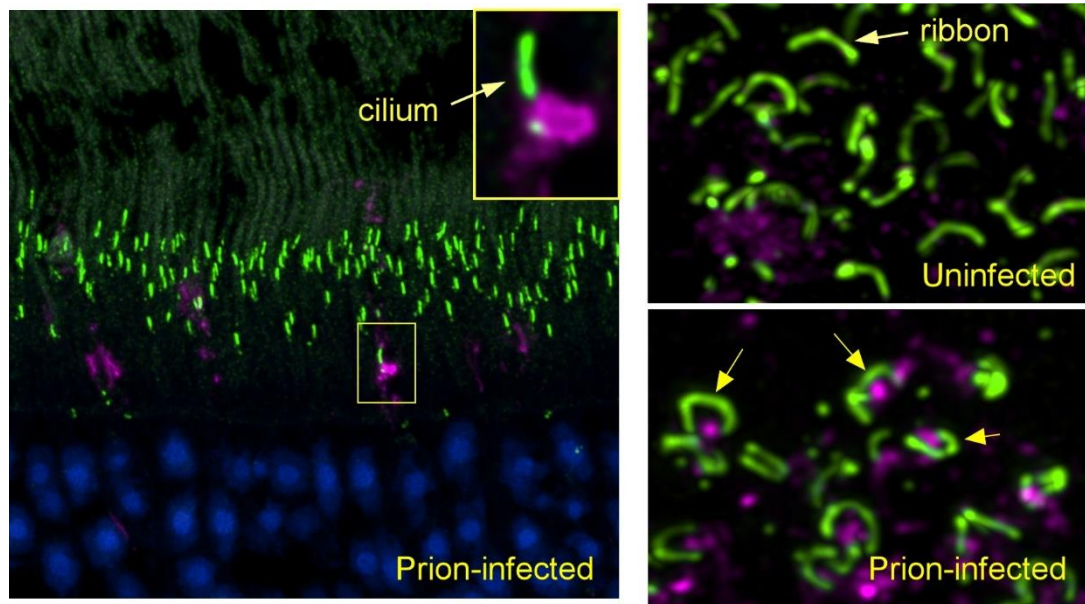
Гайдушек вивчав захворювання «куру» на яке страждали родини племені форе – мешканців високогірних районів Нової Гвінеї які досі знаходяться на вельми примітивному рівні розвитку. Спочатку науковці, що вивчали це захворювання припустили, що його викликає вірус. Проте вони не змогли виділити хвороботворний агент або викликати захворювання у тварин за допомогою традиційних вірусологічних методів. В зв'язку з тим що захворювання мало родинний характер було висловлено припущення про його складну генетичну природу.

Той же час дослідник У. Хадлоу вивчав нервові розлади у тварин і помітив що захворювання тварин скреїпі подібне за симптомами до куру. Через тривалий час від зараження до розвитку симптомів у тварин збудника цього захворювання віднесли до так званих «повільних» вірусів. Гайдушек зрозумів що і захворювання куру та може викликатись «повільним» вірусом. Годом біло виявлено та досліджено ще кілька захворювань подібної природи. Вони всі мали низку спільних рис, а саме:

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

- Вони не дають типових імунних відповідей (запалення, підвищення температури, утворення антитіл та інтерферонів)
- Не інактивуються такими лікарськими речовинами, як формальдегід, ультрафіолетовим опроміненням або високою температурою
- При електронномікроскопічному дослідженні вірусоподібні часточки не виявляються

Ці факти дозволили вченим зробити висновок що так звані «повільні» віруси – це принципово новий збудник – інфекційний білок. І, що невеличкі білкові молекули, які знаходили в інфікованому головному мозку і є причиною захворювань.



У 1997 році Нобелівську премію з фізіології та медицини отримав американський професор Стенлі Прусінер за важливі відкриття принципово нового біологічного збудника інфекційних захворювань, що отримав назви – пріон. Пріони – це нешкідливі клітинні білки які мають здатність за певних умов змінювати свою конформацію таким чином, що вони стають збудниками тяжких захворювань.

Просторова конформація пріонного білку є носієм певної біологічної інформації, що існує та реалізується поряд з класичною «нуклеїновокислотною» інформацією.

2. Властивості пріонного білка

В скрепті-інфікованому мозку було виявлено унікальний білок і ця молекула отримала назву – пріоновий білок PrP (prion protein). Стійкий до протеїназ PrP має молекулярну масу 27-30 кДа і його називають PrP²⁷⁻³⁰. Подальші дослідження швидко підтвердили його існування. Він походить від більшого білка з молекулярною масою 30-35 кДа який позначили PrP^{Sc}. В той же час було виявлено що мозок нормального та скрепті-інфікованого хом'яка

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

експресує однакові кількості PrP mРНК і протеїназо-чутливий білок який позначили PrP^c. Він чи його попередник PrP є субстратом для PrP^{Sc} який вважається основним компонентом інфекційної частки пріона.

Основні особливості цього білку такі:

1. PrP²⁷⁻³⁰ і скреїп-інфекційність очищуються разом біохімічними методами. Концентрація його пропорційна титру пріонів.
2. Кінетика протеолітичного гідролізу PrP²⁷⁻³⁰ та інфекційного агенту однакові.
3. Імуноафінна хроматографія показала синхронічне очищення PrP^{Sc} і інфекційного агенту, а PrP – антисироватка нейтралізує інфекційний агент.
4. PrP^{Sc} виявлено лише в клонах культивуємих клітин, що продукують інфекційність.
5. PrP – амілоїдні пластинки є специфічними для пріонних захворювань тварин і людини. Розміщення PrP – амілоїдів контролюється хоча б частково PrP.
6. PrP^{Sc} (чи PrP^{CJD}) є специфічним для пріонових захворювань людини і тварин.
7. Мишачий PrP^{Sc}-ген та час інкубації скреїпи генетично пов'язані. PrP-ген, що знаходиться в мишах з довгим інкубаційним періодом кодує амінокислотні заміни в кодонах 108 і 189 в порівнянні з мишами з коротким чи середнім інкубаційним періодом.
8. Точкові мутації PrP гена в кодонах 102, 178, 198 та 200 генетично пов'язані з розвитком спадкових пріонних захворювань людини.
9. Миші, що експресують пріони MoPrP з точковою мутацією в GSS, спонтанно розвивають нейрологічні розлади, губчаті дегенерацію мозку та гліоз астроцитів.
10. Видалення гену PrP у мишей попереджує скреїпи і розмноження пріонів після внутришньоцеребрального введення пріонів.
11. Трансгенні миші, що експресують химерний ген Mo/SHaPrP, продукують «штучні» пріони з новими властивостями.

На користь того, що пріони є чисто білковими структурами та не містять нуклеїнових кислот в своєму складі можна висунути наступні аргументи:

1. Разом PrP^{Sc} та інфікуюче джерело скреїпи очищуються біохімічними та імунологічними методами.
2. Незвичні властивості PrP^{Sc} аналогічні властивостям пріонів. Різноманітні процедури, модифікуючі або гідролізуючі PrP^{Sc} інактивують пріони.
3. Рівень PrP^{Sc} прямопроційний пріоновому титру. Не денатурований PrP^{Sc} невід'ємний від скреїпи-інфекційності.
4. Немає свідoctв про вірусоподібні частинки або геноми нуклеїнових кислот.
5. Накопичення PrP^{Sc} прямо пов'язане з патогенезом пріонових захворювань, включаючи формування PrP патологічних амілоїдів.
6. Мутації в гені PrP генетично пов'язані із спадковими пріоновими захворюваннями та викликають формування PrP^{Sc}.

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

7. Оверекспресія PrP^C збільшує формування PrP^{Sc} та скорочує інкубаційний період. Делеція PrP гену виключає субстрат, необхідний для формування PrP^{Sc} та запобігає, як пріоновому захворюванню, так і реплікації пріонів.

8. Видові варіації в PrP послідовності відповідальні частково за видовий бар'єр, знайдений при переносі пріонів від одного хазяїна до іншого.

9. PrP^{Sc} переважно зв'язується з гомологічним PrP^C, це призводить до формування нових молекул PrP^{Sc} та пріонової інфекції.

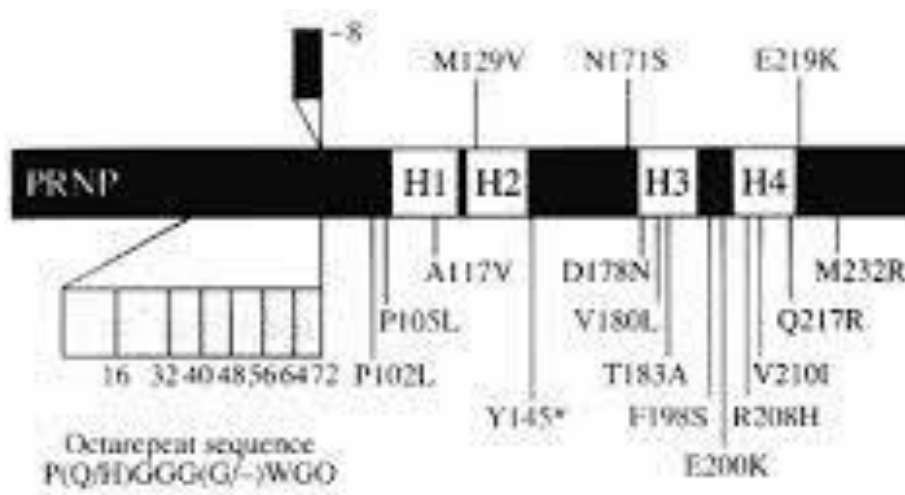
10. Химерні та частково делетовані неги PrP змінюють чутливість до пріонів з різних джерел та підтримують продукування штучних пріонів з неприродними властивостями.

11. Пріонове різноманіття визначається різною конформацією PrP^{Sc}. Конформація може складатися при проходженні крізь хазяїна з відмінними PrP генами. Пріонова укладка визначається взаємодією PrP^C/ PrP^{Sc}.

12. Пріони людини від хворих CJD (E200K) та FFS передають різні властивості трансгенним мишам Mни2M PrP, що забезпечує механізм змін конформації.

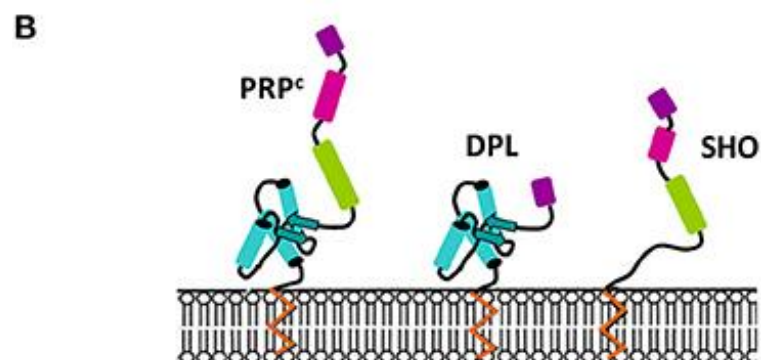
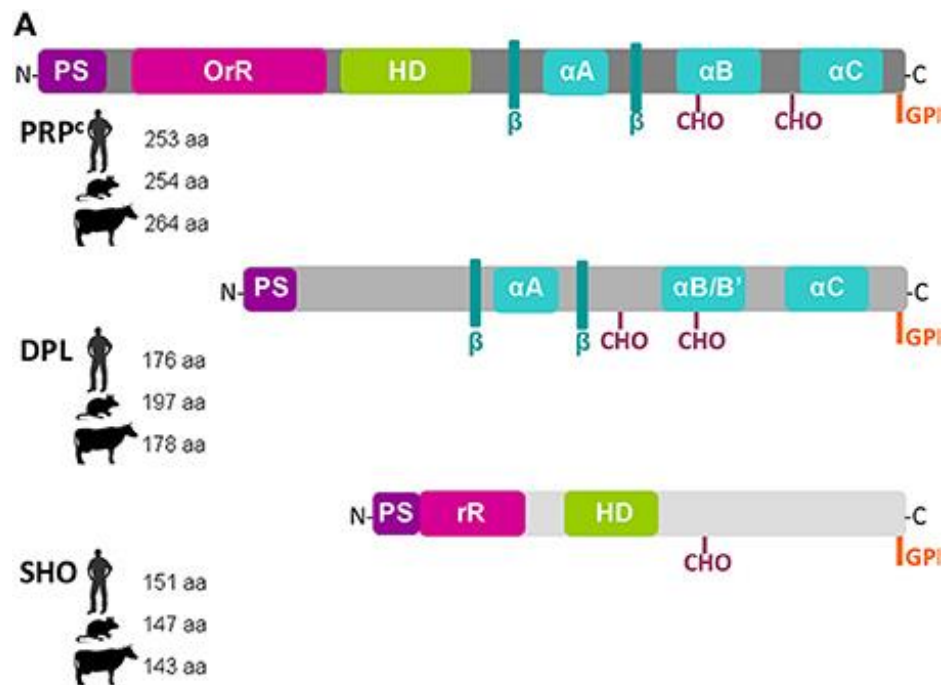
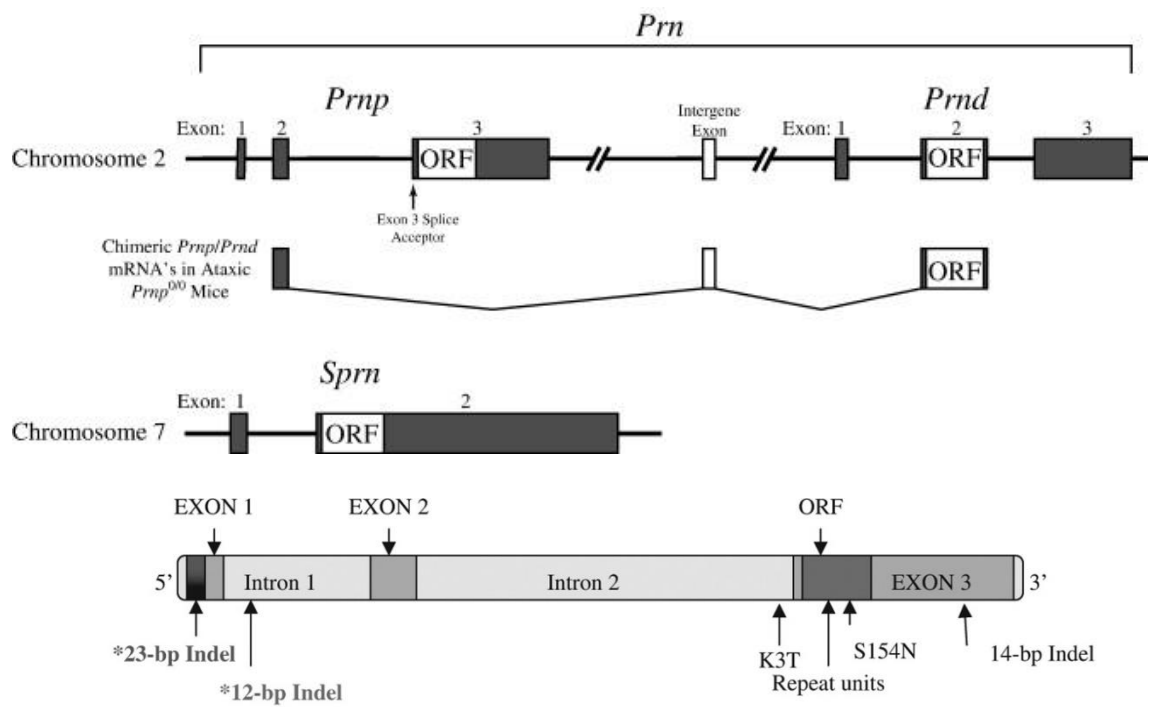
3. Структурна організація гена PrP

Оскільки нуклеїнова кислота, що могла міститись в інфекційній частинці, була б надто мізерною, щоб кодувати амінокислотні послідовності PrP єдиною її можливою функцією вважалась регуляторна. Вона могла б полягати, по-перше, в промоції експресії неактивного гена організму-хазяїна, що несе інформацію про первинну структуру пріону, і, по-друге, в активації гіпотетичних генів, що кодували б ферменти зворотньої трансляції, які за матрицею PrP синтезували б відповідну ДНК або мРНК. Останнє розглядалось як мало ймовірно, і, тому, було здійснено спроби виявити в ДНК хазяїна ген, який би відповідав амінокислотній послідовності пріона PrP. Такий ген було знайдено, проте здивувало те, що у здоровому організмі він відповідав за біосинтез нормального клітинного глікопротеїна з такою самою первинною структурою, що й у пріона.



ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

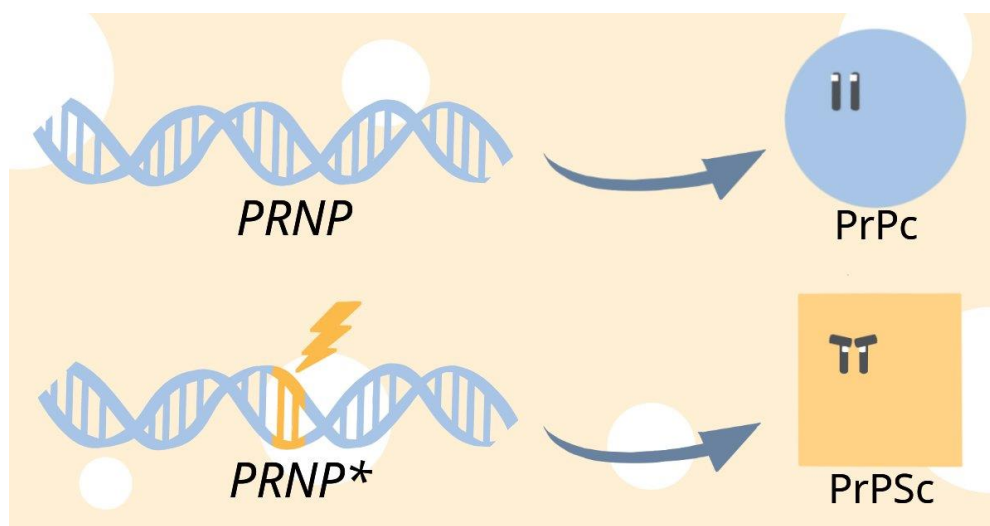
Схематичне зображення гену пріонного білку людини PRNP



ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

Ген PrP виявлено у багатьох тканинах і органах всіх ссавців: в мозку, периферійних нейронах, зачатках зубів, плаценти, метанефросі, а також у птахів. Це безперечно вказує на його важливу біологічну роль. Одержання антитіл до PrP дозволило виявити його тканеспецифічність та субклітинну локалізацію. Це мембранний білок, який експресується в незалежності від наявності пріонного захворювання. Видалення цього гену призводить до того, що тварини не сприймають пріонні інфекції.

Повна рамка зчитування відомих PrP ссавців і птахів знаходиться в межах одного екзона. Ця риса PrP-гена виключає можливість того, що PrP^{Sc} виникає в результаті сплайсингу РНК. Той факт, що гени PrP можуть бути нанесені на карту 20-ї хромосоми людини (коротке плече) і на гомологічний регіон хромосоми 2 миші свідчить про існування PrP-генів, які є специфічними саме для ссавців.



Дослідження методом гібридизації довели що ген PrP^{Sc} не є компонентом інфекційної частинки пріону. Це є основною рисою, що відрізняє пріони від вірусів, включаючи ті ретровіруси, що несуть клітинні онкогени, а також від супутніх вірусів, білки оболонки яких походять від інших вірусів, що попередньо інфікували рослинні клітини. Очищені фракції, збагачені на пріонну інфекційність, були проаналізовані на наявність пріон-специфічної нуклеїнової кислоти з використанням розроблених спеціальних методик, але таку кислоту не знайшли, що свідчить про те, що якщо така молекула все ж існує її розмір менше ніж 80 нуклеотидів.

4. Структурна організація білків-пріонів

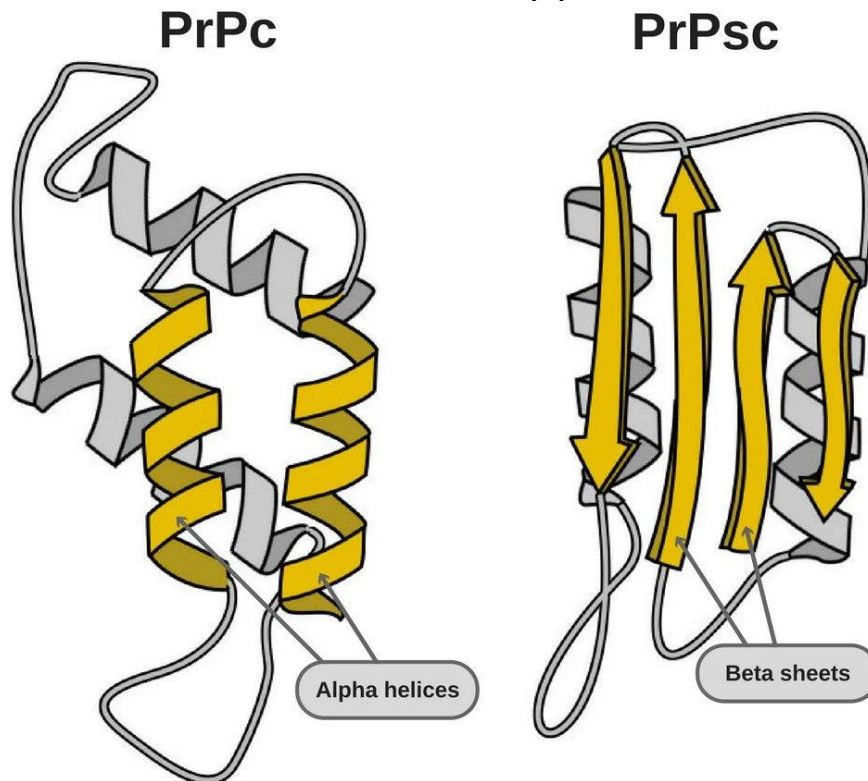
Первинну структуру біологічно активного пріону було розшифровано повністю. Молекула пріону має сигнальний пептид на N-кінці, який відсутній в активному (зрілому) білку. На C-кінці знаходиться глікозилфосфатидилінозит, який використовується для прикріплення до плазматичної мембрани клітин. Активний пріон має молекулярну масу 33-35 кДа. За допомогою антитіл до пріонового білка було показано, що вміст пріонів

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

в інфікованому мозку більший, ніж у нормальному. Нормальні тканини містять пріонові білки, які не відрізняються від інфекційних за амінокислотних складом, проте дуже чутливі до дії протеїназ і не мають інфекційних властивостей.

Нормальний білок позначають PrP^C, а інфекційний - PrP^{Sc}.

Первинна структура PrP^C у різних видів тварин досить подібна. У людини його розмір – 253, у гризунів – 254, у вівці – 256 амінокислотних залишків. Міжвидова гомологія досягає 94%. У всіх пріонних білків у 129-му положенні виявлений високий поліморфізм.



Proposed Structure of PrP^C and PrP^{Sc}

α -helix 40%
 β -sheet 3%

α -helix 30%
 β -sheet 40%



NORMAL PRION PROTEIN (PrP^C)



DISEASE-CAUSING PRION (PrP^{Sc})

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

Вважається, що більшість інфекційних агентів білкового походження – пріони скреїпі, та інших захворювань, якщо не всі їх ізоморфи, це перетворені нормальні клітинні білки PrP^C.

5. Пріонні захворювання людини та тварин

Пріонні захворювання людини:

1. **Хвороба Крейцфельда-Якоба (СJD).** Це рідкісне прогресуюче захворювання кори головного мозку, базальних гангліїв та спинного мозку. В основі патологічної картини лежить дистрофія коркової та підкоркової сірої речовини, клітин передніх рогів спинного мозку. Відмічається ураження великої кількості нейронів кори та підкорки. Інкубаційний період 4 та більше років. У 90% випадків розвиток захворювання припадає на період від 40 до 69 років, середній вік померлих – 58 років. Частота захворювання – один випадок на мільйон на рік. Близько 10% випадків захворювання – родинні.

2. **Синдром Герстмана-Штрауслера-Шенклера (GSS).** Цьому захворюванню притаманні такі симптоми: мозочкові порушення, міоклінічні судоми, втрата рефлексів нижніх кінцівок із збереженням розгинальної реакції підшви, інтенційне тремтіння, гіпотонія, дизартрія, адіадохокінез, порушення при ковтанні, латеральний та вертикальний ністагм. Майже у всіх вражених фіксуються амілоїдні бляшки. Інкубаційний період біля чотирьох років, а тривалість захворювання сягає п'яти років. Частота захворювання 10 на мільйон на рік. Середній вік померлих – 48 років.

3. **Куру.** Цю хворобу було виявлено у племені форе у Новій Гвінеї у середині 20-го сторіччя. Спочатку у хворих розвивається порушення ходьби, пізніше з'являється тремтіння тулуба, кінцівок, голови. Через 3-4 місяці розвивається дизартрія та порушення координації тонких рухів, а ще через 1-2 місяці вони переважно тільки сидять, мова стає нечіткою, спостерігається не тримання сечі та калу, косоокість. Тривалість захворювання 6-9 місяців, в рідких випадках 1-2 роки інкубаційний період 5-10 років (якщо ураження відбулось у молодому віці може збільшуватись до 25-30 років) В одному з племен захворюваність становить 8 осіб на 1000, у сусідніх – значно нижча, а в деяких племенах взагалі це захворювання відсутнє. Це може свідчити про наявність впливу генетичної складової на виникнення та розвиток захворювання.

4. **Амфіотрофічний лейкоспонгіоз (хвороба Міотча).** У світі було зафіксовано приблизно 20 доведених випадків цього захворювання. Воно характеризується слабкістю спочатку у кистях, потім у ногах, зникають сухожильні та черевні рефлексі, розвивається параліч грудних та черевних м'язів, парез м'язів ніг. Патологічні зміни торкаються як головного, так і спинного мозку. Інкубаційний період не менш ніж 3 роки.

5. **Фатальна родинна інсомія (FFI).** Вона вражає членів однієї родини і характеризується швидкою загибеллю хворого. Це захворювання характеризується тим що людина перестає спати і снодійні на неї не діють. До

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ЗАГАЛЬНОЇ ГЕНЕТИКИ

того ж підвищується температура, тиск, серцебиття, тремтять руки та з'являються галюцинації.

Частина вчених вважає що однією з причин розвитку хвороб Паркінсона та Альцгеймера також можуть виступати пріони.

До пріонних захворювань тварин відносять такі: скрейпі, трансмісивна губкоподібна енцефалопатія великої рогатої худоби (вона ж коров'ячий сказ), трансмісивна енцефалопатія норок, хронічна виснажуюча хвороба оленів та лосів, хронічна виснажуюча хвороба мулів.