

Какво знаем за прионите и прионовите болести?

Иван Иванов

С цел да задържат духа и жизнената сила на починалия в рамките на племето те изяждат неговата плът, включително и мозъка. Болестта започва с главоболие и обща слабост, последвани от треперене на тялото (тремор), дискоординация на движенията (атаксия), деменция, влошаване на говора (гизартрия), загуба на жизненоважни рефлекс и след около 12 месеца завършва със смърт. Тъй като тресенето на тялото на местен език се нарича „куруя“, болестта е наречена „куру“. Понеже куру понякога се съпровожда от необоснован/патологичен смях, тя е наричана още „смейшна“ болест.

Въпреки че куру е неизлечима, Лютеранската църква построява в засегнатите райони специализирана болница за палиативни грижи, която привлича епидемиолози и невролози от цял свят и така се превръща в първия научен център за изследване на болестта куру. През 1957 г. от Националните институти за здравето (NIH) в САЩ в болницата е изпратен д-р Даниел Карлтън Гайдушек (Daniel Carleton Gajdusek) – известен епидемиолог, вирусолог и педиатър. В тясно сътрудничество с австралийския лекар Майкъл Алпърс (Michael Alpers) той го-

През 50-те години на миналия век австралийските здравни служби описват епидемия от нова смъртоносна болест, разпространявана сред жителите на високотлантинското племе Форе в Нова Гвинея, известно с това, че практикува ритуален канибализъм.

казва, че куру е невродегенеративно заболяване, което по своите прояви, включително и патолого-анатомична картина, наподобява на познатата по това време болест на Creutzfeldt-Jacobs (CJD).

Последната е известна като спонгиформена енцефалопатия, тъй като мозъчната тъкан вакуолизира и придобива вид на гъба. Епидемичният характер на куру дава основание на Гайдушек да предположи, че болестта е инфекциозна, което пък противоречи на известното за CJD, смятана тогава за неинфекциозна. За да провери своята работна хипотеза, в средата на 60-те години на XX в. Гайдушек



Даниел Карлтън Гайдушек (1923 – 2008)

и Алпърс вземат проба от мозъчна тъкан на 11-годишно момиче, починало от куру, която хомогенизират и инжектират в шимпанзета. В рамките на две години едно от животните развива куру. Така те доказват инфекциозния характер на болестта, което донася на Даниел Гайдушек Нобелова награда за физиология или медицина (споделена с Барух Блумберг) през 1976 г. През 1968 г. той доказва също, че примати могат да бъдат заразени и с болестта на Creutzfeldt-Jakobs.

След доказване на инфекциозния характер на куру ритуалният канибализъм в Нова Гвинея е забранен и епидемията бързо затихва. Последният случай на починал от куру е регистриран през 2005 г. Забраната на канибализма дава възможност на учените да определят латентния (скрит) период на куру, който варира в границите на 2 – 40 години.

Освен че куру наподобява на CJD, тя прилича много и на най-старата спонгиозна енцефалопатия, описана при овцете преди повече от 200 години. Тя е известна на ветеринарните лекари като „скрепи“, от scrag off – остързвам, оскубвам. За разлика от CJD скрепи е трансмисивна (предаваща се от болно на здраво животно) болест, поради което засегнатите овце биват незабавно унищожавани.

Гайдушек доказва трансмисивния характер на куру, но не и нейния причинител. Всички опити да се идентифицира бактериален, вирусен или друг патоген в мозъчните екстракти на заразени животни и хора завършват с неуспех. Учените все повече се убеждават, че причинителят на куру, CJD и скрепи е от един и същ тип, но той е неизвестен за науката. Те са убедени също, че той може да бъде открит само с помощта на експериментални животни, но опитите на Гайдушек показват, че и това не е лесно. В своите експерименти той използва примати, като най-близки до човека, но при тях инкубационният период е твърде дълъг (две и повече години), а и цената им е твърде висока – над 150 000 щатски долара за шимпанзе. Това налага търсенето на нови биологични модели, с които да се постигне едновременно ускоряване на опитите и поевтиняване на изследванията. Първите ус-

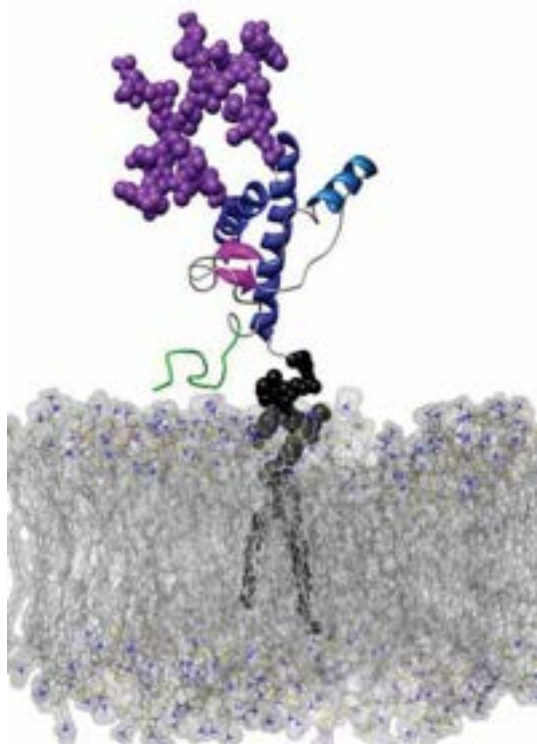
пехи идват през 1961 г., когато Ричард Чандлър (Richard Chandler) успява да прехвърли скрепи от овца на мишка. Въпреки че мишият модел понижава драстично цената на изследванията, той не ги ускорява, тъй като латентният период си остава над 1 година.

Истинските успехи идват 17 години по-късно, когато през 1978 г. Стенли Прусинер (Stanley Prusiner), също от NIH, въвежда хамстеровия модел. Хамстерите реагират значително по-бързо от мишките и развиват скрепи в рамките само на няколко седмици. Благодарение на своя модел Прусинер успява да разкрие природата на инфекциозния агент на скрепи, за което е удостоен с Нобелова награда за 1997 г.

След неуспешните опити на Гайдушек и неговите сътрудници да открият клетъчен или вирусен патоген в мозъка на заразени животни и хора Прусинер допуска, че тайнственият болестотворен агент е вирион. Вирионите са безклетъчни панто-



Стенли Прусинер



Прион, фиксиран върху външната мембрана на невроналната клетка с помощта на гликопротеиновата си котва

гени, открити в началото на 70-те години от Теодор Дайнер (Theodor Otto Diener), представляващи малка автономно реплицираща се кръгова молекула РНК. Те са известни само при растенията, но никой не знае дали не съществуват и при животните и човека. За да провери своята хипотеза, Прусинер изпраща проби на Т. Дайнер, който бързо отхвърля предположението, че причинителят на скрепи може да бъде вирус. Тогава на Прусинер не му остава нищо друго освен да предположи, че патогенът на скрепи е протеин и той го нарича прион (prion, или съкратено PrP, от proteinaceous infectious particles).

Стенли Прусинер е добър експериментатор. В търсене на тайнствения прион той фракционира мозъчни екстракти от хамстери, заразени със скрепи, и изследва от-

гелните фракции за инфекциозност върху други хамстери. Във фракциите, показали най-висока активност, той открива бързо агрегиращ гликопротеин, който под електронен микроскоп се вижда като пръчковидни квазикристали, наподобяващи амилоидните плаки на болни от Алцхаймер и CJD. Оказало се, че именно това е търсеният патоген. Държейки в ръцете си приона, той го използва за различни изследвания, едното от които е да създаде специфични антитела срещу него. Получените антитела обаче му поднасят нова изненада. Прусинер установява, че антителата реагират не само с протеина, за когото са предназначени (изолиран от болни животни), но и с подобен на него протеин от здрави контроли. Това показва, че причинителят на скрепи не е чужд на организма протеин, а негов собствен белтък. Изследванията разкриват, че и двата протеина, патогенният и нормалният, са съставени от 231 еднакво подредени аминокиселини и следователно имат еднаква първична структура. Въпреки това обаче те демонстрират различно поведение спрямо протеолитичния ензим протеиназа К, която разгражда напълно приона от здрави животни, но не и този от заразени със скрепи. За да отбележи разликата между двата белтъка, Прусинер въвежда съкращенията PrP^C за нормалния и PrP^{Sc} за прионния белтък от болни животни. С други думи, PrP^C и PrP^{Sc} са две конформационни състояния на един и същ белтък, от които второто е патогенно. Двете състояния на приона се характеризират и с различни физикохимични свойства. Докато нормалният прион е водоразтворим, то патогенният е неразтворим във вода и проявява склонност към агрегация.

Какви са функциите на прионния протеин и на какво се дължи болестотворният характер на PrP^{Sc}? Въпреки че за структурата на прионите и техните гени вече се знае твърде много, това не важи за биологичните им функции. Опити с трансгенни мишки, при които генът на прионния протеин е инактивиран, показват, че и в отсъствието на приони животните са жизнени. Единствените забелязани отклонения



Обобщена структура на клетъчен прион (PrP^{C}). Прионите на бозайниците и човека са съставени от 231 аминокиселини (ак), от които първите 22 се изрязват преди секрецията им от клетката. По-важните структурни елементи в молекулата на приона от ляво надясно са следните: повтарящи се (до 5 пъти) октапептиди, обозначени с празни кутийки; α -спирални участъци H1, H2 и H3, показани в сиво; β -структурни участъци S1 и S2, показани с черни кутийки; места за гликозилиране, обозначени с кръгчета и гликолипидна „котва“ за фиксиране на приона върху външната мембрана на невроналната клетка, отбелязана с GPI. Фрагментът 121 – 231 в патогенния прион PrP^{Sc} е устойчив към протеази!

в поведението на животните са нарушен сън и промяна в денонощния цикъл. Всичко това дава основание да се допусне, че прионите вероятно участват във фината регулация на висшата нервна дейност, а може би и в работата на биологичния часовник. Оттук следва въпросът: Защо един белтък със „съмнително биологично значение“ може да бъде смъртно опасен? Причината се крие именно във второто конформационно състояние (PrP^{Sc}) на приона, което е устойчиво на действието на клетъчните протеази. Подобно на всички други белтъци, прионите също се обменят, а обмяната включва вътреклетъчно разграждане на старите молекули и замяната им с нови. При прионите пълната подмяна на старите молекули става за около 20 часа. Ако в обмяната участват „здравни“ приони (PrP^{C}), те се разграждат напълно от клетъчните протеази, но ако прионът е патогенен (PrP^{Sc}), той остава неразграден и агрегира във вътрешността на неврона. След натрупването му до определена критична граница невронът престава да функционира и умира.

Въпросите обаче продължават: Коя е причината за превръщането на приона от нормално в патогенно състояние? Въпреки че до този момент няма общоприет механизъм, описващ това превръщане, съществуват приемливи хипотези. Най-популярната от тях е лансирана от самия Стенли Прусинер, който допуска, че при контакт с нормален прион патогенният е в състояние да индуцира превръщането му в болес-

отворен. При това за целта са необходими нанограмови количества от патогена. Веднъж започнал, процесът придобива автокаталитичен характер и с времето се ускорява поради увеличаващото се количество на патогенни молекули, които също се включват в процеса на трансформация. Подобен феномен е описан в неорганичната химия като „калаената чума“, където спонтанно възникнал аморфен калай катализира превръщането на кристалния в аморфен. Контактната хипотеза обяснява логично трансмисивния характер на прионовите болести, но търпи сериозни критики от страна на молекулярните биолози, които не могат да я потвърдят в експерименти *инвитро*. Много вероятно е превръщането на нормалния прион в патогенен да става по много по-сложен начин и с участието на все още неизвестни молекули-посредници.

Както вече беше казано, инкубационният период за болеста куру при канибалите от Нова Гвинея варира от 2 до 40 години, а има и такива, които не се разболяват, въпреки че са консумирали тъкани на починали от куру свои роднини. Оттук следва логичният въпрос: Защо някои индивиди се разболяват по-бързо от други, а трети изобщо не боледуват? Същият въпрос, преведен на езика на молекулярната биология, звучи така: Защо някои приони запазват нативната си конформация дори и след контакт с патогенни приони, а други не успяват? Отговорът на този въпрос ще стане ясен само ако познаваме молекулната структура на

прионния протеин и природните вариации в нея.

Конформационният преход на приона представлява промяна в пространствената му структура. Нормалният клетъчен прион има кълбовидна (глобуларна) форма, в която доминират т.нар. α -спирали, а патогенният е лишен от α -спирали, но за сметка на това пък съдържа β -структури. Тъй като последните не позволяват глобуларен тип организация, молекулите на патогенния прион се подреждат под формата на нишки (фибрили). За да премине прионът от едното в другото конформационно състояние, е необходимо външно въздействие, като например локалното изменение на рН, температура, силни електрически или магнитни полета или присъствието на β -структурен прион. В последния случай патогенният прион изпълнява ролята на катализатор, понижаващ енергетичната бариера, която трябва да преодолее прионът, за да се трансформира в патогенен. Необходимото за целта външно въздействие трябва да бъде толкова силно, колкото по-стабилна е структурата на нормалния прион. Оттук следва изводът, че всички фактори, които дестабилизируют нативната структура на прионния белтък, благоприятстват преминаването му в патогенен. Какви са тези фактори?

На първо място това е замяната на една аминокиселина с друга, т.е. точковите мутации. Тъй като структурата на белтъка е кодирана в ДНК, това всъщност са генетични дефекти, които се унаследяват. Многобройните изследвания върху структурата на човешкия прионен белтък и неговия ген през последните 1 – 2 десетилетия разкриха богато разнообразие от алелни варианти, някои от които са асоциирани с познатите ни вече спонгиформени енцефалопatii като куру, CJD, синдрома на Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) и фаталната фамилна инсомния (FFI). Някои от мутациите имат толкова силен дестабилизиращ ефект върху молекулата, че правят възможно и спонтанното ѝ преминаване в

патогенна конформация. Впрочем предполага се, че именно така е възникнала и болестта куру в Нова Гвинея.

След затихването на епидемията от куру през 60-те години на миналия век прионите отново привлякоха вниманието на световната общественост заради друга епидемия, добила популярност като болестта „луда крава“. Тя се появява в Англия през 1992 – 1993 г. и достига своята кулминация през 1998 г., когато са регистрирани 1 770 000 болни животни. В клинично отношение тя протича по същия начин като скрепи при овцете и завършва със смърт на засегнатите крави. Предполага се, че болестта е възникнала в резултат на подхранването им с трупно брашно от овце, заразени със скрепи.

По същото време, когато болестта „луда крава“ заема застрашителни размери, в някои европейски страни е описана нова форма на болестта CJD (vCJD). Тя се различава от класическата форма на CJD по това, че засяга млади хора и се предполага, че е свързана с консумацията на говеждо месо от заразени крави. Така бе заподозряна нова, опасна за човека хранителна верига, която се състои в пренасянето на скрепи от овце, през говеда към човек. Това стана причина за унищожаването във Великобритания на близо 2 милиона крави, с което бе сложен край на епидемията от „луда крава“.

Откриването на прионите даде основание да се преосмислят догмите в поне три области от научното познание – молекулярна биология, протеинова химия и инфектология. Съгласно централната догма на молекулярната биология, генетичната информация (в контекста на биологична информация) върви в посока ДНК $\rightarrow$ РНК $\rightarrow$ белтък. С откриването на прионите стана ясно, че белтъците могат директно да обменят помежду си структурна информация, която може да се унаследява.

Една от догмите на белтъчната химия пък е свързана със схващането, че висшите структури на полипептидната верига са еднозначно определени от нейната първич-

на структура. С откриването на прионите стана ясно, че на една и съща първична структура може да съответстват различни вторични и третични структури, които имат свършено различни биологични свойства.

Накрая, прионите, заедно с вирионите, наложиха нова класификация на инфекциозните патогени. Днес вече можем да кажем, че патогените биват клетъчни и безклетъчни, а безклетъчните от своя страна се подразделят на съдържащи и несъдържащи нуклеинови киселини. Към групата на съдържащите нуклеинови киселини спадат вируси, вирусоици и вириоди, а към тези свободни от нуклеинови киселини – прионите. Заедно с вирионите и вирусоиците прионите образуват групата на инфекциозните молекулни патогени. ■



Иван Иванов е молекулярен биолог, чл.-кореспондент на БАН (2004), професор (1990), доктор на биологичните науки (1989). Научните му интереси са в областта на молекулярната биология, биохимията, биотехнологиите, биоинформатиката, геномиката.

Прионовите болести са част от групата молекулни болести, известни като „болести на вторичната структура“, или „β-структурни болести“. Към нея спадат и болестите на Алцхаймер, Паркинсон, сърповидно-клетъчната анемия и гр. Докато последните са неинфекциозни, прионовите се предават от индивид на индивид. При човека такива са болестта на Creutzfeldt-Jacobs (CJD), синдромът на Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), болестта куру и фаталната фамилна инсомния (FFI), а при животните – скрепи при овцете, кравите, козите, елените, норките и гр. Две от спонгиозформените енцефалопatii (SEP) при човека, GSS и FFI, се смятат за наследствени, а CJD в 90 % от случаите е спорадична и в 5 – 10 % е наследствена. Заразяване на хората със SEP е наблюдавано при очни операции, трансплантация на роговица, електрошокова терапия за лечение на епилепсия с използване на стоманени електроди за многократна употреба, при консумация на заразена храна и гр. В последния случай патогенният прион достига до мозъка с посредничеството на левкоцитите. Те са следващите след невроните по съдържание на прионен белтък, който също е локализиран на клетъчната повърхност. По тази причина той може да взаимодейства с патогенния прион в храната още в устната лигавица, която е обилно кръвоснабдена. След конформационни изменения лимфоцитният прион бива отнесен до мозъчните клетки. Опитите с животни показват, че при директно въвеждане на патогенен прион в мозъка инкубационният период е много по-малък в сравнение с пероралните дози. Това от своя страна означава, че структурните промени на приона в клетките посредници (най-вероятно левкоцитите) са времеотнемащи и нискоефективни. Неслучайно прионните болести се предават лесно при очни операции, където патогенният прион попада директно в мозъка чрез ретината и очния нерв.