

# Choroby prionowe – charakterystyka, diagnostyka i terapia chorób prionowych

Arkadiusz Kazula<sup>1</sup>, Ewa Kazula<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Chorób Zwierząt Instytutu Weterynarii PAN

<sup>2</sup> Apteka Prywatna, Tarnobrzeg

Adres do korespondencji: Arkadiusz Kazula, ul. Portowa 18/4, 27-600 Sandomierz, tel. 600 950 923, e-mail: kazula.gen@wp.pl

## Prion diseases – characteristics, diagnostics and therapy

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), or prion diseases, are fatal neurodegenerative disorders in humans and animals for which no effective therapy exists. The pathogenesis of prion diseases is based on the presence of PrP<sup>Sc</sup>, a protease-resistant isoform of the normal cellular prion protein called PrP<sup>C</sup>. The emergence of acquired forms of human TSEs in younger people, such as variant CJD (vCJD) and iatrogenic CJD (iCJD), have highlighted the urgent need for effective treatments. The paper presents an overview of the current knowledge about the etiology, classification, therapeutic strategies, such as application of RNAi or other effective compounds may hold real promise for the effective therapy of prion disease. The article is based on both Polish and foreign literature, describing of prion diseases.

**Keywords:** Prion diseases, application of RNA.

© Farm Pol, 2009, 65(8): 594-604

Choroby prionowe są powolnymi, letalnymi neurodegeneracyjnymi schorzeniami ludzi i wielu gatunków zwierząt. Pomimo, że choroby prionowe u ludzi występują bardzo rzadko, to w chwili obecnej obserwuje się znaczący wzrost tego typu zachorowań szczególnie dotyczy to wariantu choroby Creutzfeldta-Jacoba, której przypadki w ostatnich latach uległy nasileniu, prawdopodobnie jako rezultat ekspozycji ludzi na priony infekcyjne wywołujące chorobę BSE u krów [1–3]. Według hipotezy białkowej infekcyjne proteiny zwane prionami składają się głównie, jeśli nie wyłącznie, ze zmienionej izomerycznej odmiany normalnego białka komórkowego [4]. Infekcyjne cząsteczki prionowe w komórce wykazują zdolność wpływania i wywoływania zmian konformacyjnych normalnie składanych białek PrP (nieinfekcyjnych) w infekcyjne formy. W ten sposób białka prionowe mogą się powielać i infekować inne

komórki organizmu. Kiedy po raz pierwszy zasugerowano, że czynnikami infekcyjnymi, powodującymi wiele neurodegeneracyjnych zaburzeń centralnego systemu nerwowego u zwierząt i człowieka są cząsteczki prostego białka, wywołało to ogromną falę sceptycyzmu i niedowierzania. Wydaje się, że cząsteczki zakaźne, zwane prionami, należą do najdziwniejszych cząsteczek białkowych wywołujących choroby zakaźne. Już w latach 60. ubiegłego wieku J.S. Griffith dowodził, że niektóre przenośne gąbczaste choroby mózgu, tzw. encefalopatie gąbczaste są wywoływane przez infekcyjne proteiny. Teoria ta wyjaśniała zagadkę czynników powodujących chorobę scarpie i Creutzfeldta-Jacoba, które były odporne na promieniowanie ultrafioletowe degradujące kwasy nukleinowe znajdujące się we wszystkich żywych patogenach [5, 6]. Teoria prionów już od chwili ogłoszenia spotykała się z dużym sceptycyzmem, ponieważ występowała przeciwko centralnemu dogmatowi biologii molekularnej, ogłoszonemu przez F. Cricka – odkrywcę struktury dwuniciowej helisy DNA, który postulował, że przepływ informacji genetycznej przebiega w kierunku DNA→RNA→białko [7]. Po odkryciu procesu odwrotnej transkrypcji, w którym informacja genetyczna jest przekazywana z RNA na DNA, wśród niektórych badaczy zakiełkowała myśl, że głoszona przez J.S. Griffith hipoteza dotycząca infekcyjnych protein może być prawdziwa. W 1982 r. Stanley B. Prusiner z University of California otrzymał materiał infekcyjny z zakażonych zwierząt, który składał się wyłącznie z protein. Prusiner wprowadził nazwę dla tych cząsteczek infekcyjnych – priony (ang. *prion*, od *proteinaceous infectious particle* – zakaźna cząsteczka białkowa). Za badania nad prionami i sformułowanie rewolucyjnej teorii, że białka prionowe wykazują charakter infekcyjny, profesor Stanley B. Prusiner otrzymał w 1997 r. Nagrodę Nobla z medycyny [8,

9]. Niezwykłość odkrytych cząsteczek wynika z faktu, że priony są samopowielającymi się strukturami proteinowymi. Nie zawierają one kwasu nukleinowego, nie wykazują metabolizmu, ale zachowują się jak białkowa forma życia. Przez wiele lat przyjmowano, że to wirusy stoją na pograniczu życia i materii nieożywionej. Bez większego oporu przyjmowano istnienie czynników chorobotwórczych, takich jak wiroidy, które są złożone wyłącznie z kwasu nukleinowego (RNA lub DNA) pozbawionego białkowej osłonki (tzw. kapsydu). To kwas nukleinowy jest nośnikiem informacji genetycznej, która wystarczy aby wykazywać naturę żywej materii. Trudno jednak było przyjąć, że czynnik zakaźny, który składa się wyłącznie z białka może mieć podobną naturę. Spory na ten temat trwają do tej pory. Jednak dla medycyny najważniejszy jest fakt, że priony są infekcyjnymi cząsteczkami białka, które powodują neurodegeneracyjne choroby układu nerwowego. Niezwykle trudno jeszcze mówić o terapii chorób prionowych, ze względu na fakt, że nie poznaliśmy do końca natury czynników wywołujących te choroby. Białkowa hipoteza chorób prionowych wywołała wiele kontrowersji i spekulacji. Wyjaśnienie patogenyzy chorób prionowych, przy jednoczesnym wykazaniu braku kwasów nukleinowych w materiale zakaźnym, spotkało się z niedowierzaniem i eksperymenty te wielokrotnie były powtarzane. Wielu badaczy nadal uważa, że choroby prionowe powodowane są przez wirus nieznanego pochodzenia. Brak reakcji układu immunologicznego wyjaśniają specyficzną budowę wirusa, który może zawierać sam kwas nukleinowy, całkowicie otoczony amyloidem, bez płaszczka białkowego, lub posiadać płaszcz białkowy, otoczony dodatkowo warstwą amyloidową. Taka budowa uniemożliwiłaby pobudzenie układu immunologicznego, a mechanizm powielania byłby podobny do wirusów [10]. W 2007 r. w *Proceedings of the National Academy of Science* ukazał się artykuł, w którym autorzy wykazali w kulturach tkankowych zainfekowanych scarpie, obecność nieznanego wirusów (25nm średnicy), które prawdopodobnie mogą powodować tę chorobę, a jeśli badania zostaną potwierdzone będzie to duża sensacja naukowa [11, 12].

### Natura prionów

Szczegółowe badania wykazały, że naturalne białka prionowe są prostymi polipeptydami zbudowanymi z około 250 aminokwasów, o masie cząsteczkowej od 30 do 37 kDa. Występują one w komórkach zdrowych organizmów zwierząt i ludzi – PrP<sup>C</sup> (prionowa

proteina komórkowa), natomiast priony infekcyjne obecne w materiale zakaźnym posiadają inną strukturę konformacyjną i wykazują oporność na proteazy – enzymy, które są zdolne do degradacji naturalnych prionów. Traktowanie PrP<sup>C</sup> proteinazą K powoduje całkowitą destrukcję tego białka, podczas gdy PrP<sup>Sc</sup> (białko infekcyjne) jest jedynie skracane w regionie aminoterminalnym, w wyniku czego powstaje cząsteczka o masie 27–30 kDa, która zachowuje zdolność zakażenia. Jest ona charakterystyczna dla wszystkich chorób prionowych i z tego względu wykorzystywana jest do celów diagnostycznych [6]. Cząsteczki PrP normalnie występują w komórkach ssaków, gdzie są zakotwiczone w błonach komórkowych. Są one rozmieszczone transbłonowo i występują w połączeniach z glikolipidami. Z połączeń tych są one uwalniane przez specyficzną fosfolipazę, która wykazuje zdolność odcinania glikolipidów od białek prionowych [13]. Ze względu na naturę białkową niemożliwy jest proces replikowania się cząsteczki prionowej bez udziału kwasu nukleinowego. Odkrycie genu PRNP u człowieka i analogicznych genów u większości zwierząt wyższych (wszystkich ssaków, gadów i ptaków) wskazało, że istnieją geny odpowiedzialne za ekspresję niepatologicznych białek prionowych. Gen PRNP obecny jest w każdej ludzkiej komórce. Białko prionowe PrP<sup>C</sup> w komórce jest syntetyzowane przez jedną kopię komórkowego genu, w którym występuje jeden ekson w pozycji 2–53. Szczegółowe mapowanie wykazało, że gen PRNP występuje u ludzi na krótkim ramieniu chromosomu 20-tego. Poziom ekspresji tego genu jest natomiast uzależniony od typu komórek [14, 15]. W badaniach na modelu zwierzęcym wykazano, że myszy z nieaktywnymi genami prionów wykazują nieprawidłowe działanie neuroprzekaźnika, kwasu  $\gamma$ -aminomastowego (GABA), co sugeruje udział naturalnych białek prionowych w przekazywaniu sygnałów w OUN. Uważa się również, że białka prionowe mogą u pewnych organizmów odgrywać rolę w anty-oksydacyjnych połączeniach z atomami Cu [16–18]. Badania prowadzone nad prionami wykazały, że cząsteczki te występują nie tylko u organizmów wyższych. W 1997 proteiny podobne do białek prionowych odkryto również u grzybów *Podospora anserina*<sup>1</sup> (drożdże) [19].

Według hipotezy białkowej infekcyjne proteiny zwane prionami składają się głównie, jeśli nie wyłącznie, ze zmienionej izomerycznej odmiany normalnego białka komórkowego Białko prionowe infekcyjne po wprowadzeniu do komórek zdrowego organizmu wywołuje chorobę, bowiem utrzymuje swoje właściwości autokatalityczne i chorobotwórcze wykazując zdolność oddziaływania na formę białka endogenego powodując zmianę ich konformacji przestrzennej w infekcyjne formy. W ten sposób infekcyjne priony mogą się powielać i zakażać inne komórki organizmu.

<sup>1</sup> Po odwirowaniu DNA z komórek drożdży, na dnie probówek z DNA zostawały mętne resztki, które zidentyfikowano jako białka prionowe. Podczas podziału komórki, DNA jest kopiowane, zaś priony ulegają podzieleniu na dwa identyczne białka, które następnie dobudowują sobie drugą część przez przemianę innej proteiny. Badacze doszli do wniosku, że priony są niezbędne w cyklu rozwojowym komórek drożdży [20]. Do tej pory nie znaleziono żadnego związku między chorobą drożdży, za którą odpowiedzialne byłoby drożdżowe białko prionowe [21].

## Terminologia

Ze względu na złożoność chorób prionowych, nomenklatura oznaczania prionów formy zjadliwej od niezjadliwej czy zmutowanej od niezmutowanej została bardzo uproszczona. Niepatologiczne białko PrP, niewywołujące choroby, produkowane konstytutywnie przez komórki ludzi i zwierząt oznacza się jako białko PrP<sup>C</sup> (C z ang. *cellular* – komórkowe), natomiast priony wywołujące choroby prionowe oznaczane są PrP<sup>Sc</sup> (od scrapie) lub PrP<sup>BSE</sup> (BSE). Indeks „Sc” pierwotnie pochodzi od nazwy scrapie, ponieważ choroba ta stanowi prototypową chorobę prionową. Ze względu na to, że we wszystkich obecnie znanych chorobach prionowych ssaków można znaleźć zmienione konformacyjnie cząsteczki PrP podobne do tych, które są obserwowane w chorobie scrapie u owiec. Używanie indeksu „Sc” jest stosowane dla wszystkich patogennych odmian izomerycznych PrP. W przypadku ludzi priony patologiczne oznacza się jako PrP<sup>CJD</sup> bez względu na typ prionowego zaburzenia, czy jest to zaburzenie wywołane sporadycznie, mutacją czy nabyte w wyniku infekcji.

Priony obecne w tkankach i komórkach w warunkach fizjologicznych i patologicznych posiadają identyczną strukturę pierwszorzędową (czyli sekwencję aminokwasową), ale różnią się strukturą drugorzędową (konformacją przestrzenną), co wiąże się z odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi. Białko PrP<sup>C</sup> jest całkowicie rozpuszczalne w wodzie i denaturujących detergentach, natomiast PrP<sup>Sc</sup> jest nierozpuszczalne w wodzie. Niepatologiczne proteiny PrP<sup>C</sup> mają w przeważającej części strukturę  $\alpha$ -helikalną, czyli spiralnie zwiniętą. Priony o właściwościach infekcyjnych mają natomiast w przeważającej części strukturę  $\beta$ -harmonijkową. W strukturze  $\beta$ -harmonijkowej łańcuchy aminokwasów układają się równolegle, co daje im postać liniową. Białko prionowe patogeniczne po wprowadzeniu do komórek zdrowego organizmu wy-

wołuje chorobę, bowiem utrzymuje swoje właściwości autokatalityczne i chorobotwórcze, wykazuje zdolność oddziaływania na formy białka endogenego, powodując zmianę ich konformacji przestrzennej [22]. Podczas tego procesu część struktury  $\alpha$ -helikalnej naturalnych PrP<sup>C</sup> ulega przemianie do postaci  $\beta$ -harmonijki, w efekcie tego procesu powstają priony PrP<sup>Sc</sup> o całkowicie odmiennych właściwościach fizykochemicznych [3, 20]. Źródłem patogennych prionów są nie tylko zmiany konformacyjne naturalnych

białek PrP<sup>C</sup> pod wpływem patologicznych form PrP<sup>Sc</sup>, ale również zmutowane geny. Mutacje genów kodujących naturalne proteiny PrP<sup>C</sup> powodują powstawanie cząsteczek białkowych o zmienionej konformacji, posiadającej właściwości zbliżone do patogennych protein PrP<sup>Sc</sup>. Patogenne białka prionowe, które dostały się do organizmu (egzogenne) oraz syntetyzowane w wyniku mutacji genów (endogenne) ulegają kumulacji we wnętrzu komórek. W czasie infekcji lokalne stężenie prionów PrP<sup>Sc</sup> w neuronach jest około 100 razy większe niż naturalnych białek PrP<sup>C</sup>. Wysokie stężenie prionów PrP<sup>Sc</sup> stymuluje ich asocjację, co powoduje tworzenie złogów przypominających złogi amyloidowe występujące w wielu chorobach neurodegeneracyjnych. Ziarnistości powstają w wyniku polimeryzacji poszczególnych infekcyjnych białek prionowych w ściśle upakowane włókna, które odkładają się w mózгах zwierząt i ludzi cierpiących na choroby prionowe [22]. W ten sposób patogenne białka prionowe powstające w dużych ilościach wywołują zaburzenia w funkcjonowaniu komórek i tkanek, prowadząc do ich degeneracji i śmierci. W obrazie mikroskopowym mózgu obserwuje się wakuolizację komórek oraz wykrywa się płytki białek prionowych, zwanych pataczkami prionowymi. Badania wykazały, że priony w formie infekcyjnej odkładają się w postaci złogów w lizosomach komórek mózgu. Dalszy mechanizm degeneracji neuronu nie został dokładnie poznany. Prawdopodobnie wypełnione prionami lizosomy pękają i uwalniają trawiące enzymy do cytozolu, powodując lizę neuronów. Postuluje się też, że „zdrowa” forma prionu chroni komórkę przed programowaną śmiercią (apoptozą) [21]. Gdy następuje lawinowy proces tworzenia form patologicznych – ochrona ta znika. Na uwagę zasługuje zagadnienie, w jaki sposób priony składające się z jednego rodzaju białka mogą wywoływać tak wiele różnych objawów chorobowych. Badania prowadzone przez H. Pattisona w Agriculture Research Council w Compton wykazały istnienie prionów patologicznych o różnych konformacjach, które wykazywały różne symptomy choroby. W badaniach zastosowano priony wyizolowane z kóz, jeden izolat powodował u zainfekowanych zwierząt senność, natomiast drugi nadpobudliwość. Wiemy obecnie, że niektóre białka prionowe powodują chorobę bardzo szybko, a niektóre po pewnym czasie. Wydaje się, że różnica wynika z faktu, że priony posiadają zdolność przybierania wielu konformacji. Prion połączony w jeden sposób może wykazywać powinowactwo do pewnej populacji neuronów w mózgu, natomiast drugi do innej, w wyniku czego pojawiają się zupełnie różne objawy chorobowe [22] (**rycina 1**).

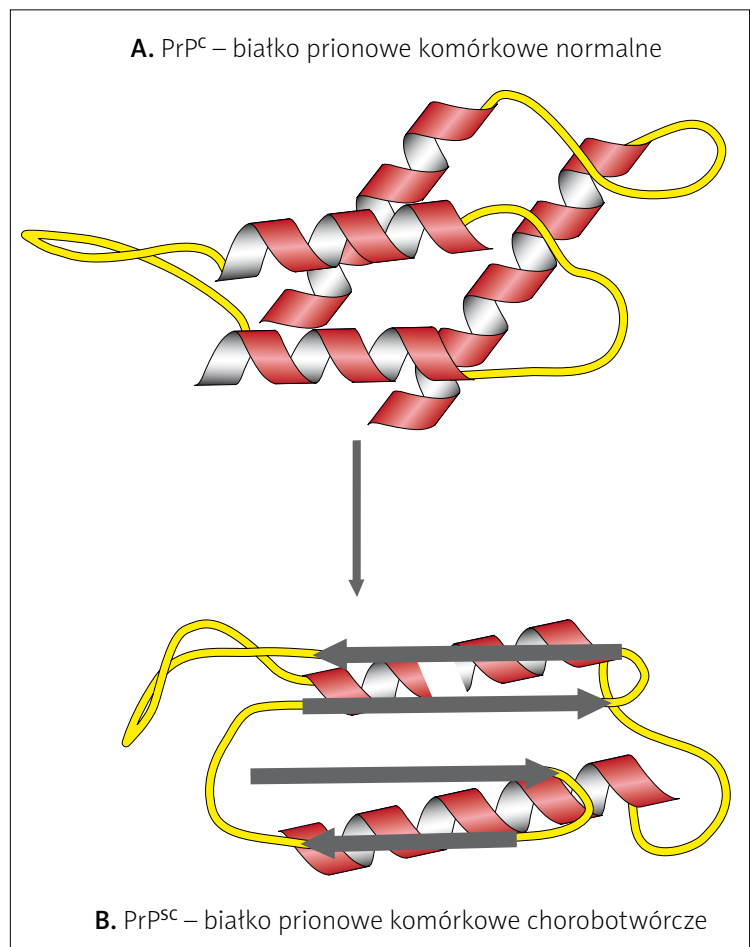
### Charakterystyka chorób prionowych

Infekcyjne białka prionowe wywołują szereg chorób o charakterze zakaźnym. Wszystkie znane do

Hipoteza wirusowa zakłada, że choroby prionowe powodowane są przez nieznanego pochodzenia wirusa. Brak reakcji układu immunologicznego wyjaśniają specyficzną budowę wirusa, który może zawierać sam kwas nukleinowy, całkowicie otoczony amyloidem, bez płaszczki białkowej, lub posiadać płaszcz białkowy, ale dodatkowo otoczony warstwą amyloidową. Taka budowa uniemożliwiałaby pobudzenie układu immunologicznego, a mechanizm powielania byłby podobny do wirusów.

tej pory choroby prionowe są śmiertelne i określane czasami terminem pasażowalnych encefalopati gąbczastych (ang. *transmissible spongiform encephalopathies* – TSE). TSE stanowią grupę kilkunastu spokrewnionych ze sobą chorób neurozwyrodnieniowych, występujących u ludzi i zwierząt. Przebieg chorób prionowych jest różny u poszczególnych gatunków. Ich wspólną cechą jest długi okres inkubacji (od kilkunastu miesięcy do kilkudziesięciu lat), letalność oraz charakterystyczny dla całej grupy chorobowej, patomorfologiczny obraz zmian w mózdzku i korze mózgowej, przypominający porowatą strukturę gąbki, będący następstwem zaniku neuronów [23]. Do grupy zwierzęcych TSE zalicza się m.in.: scarpie pojawiającą się wśród owiec, kóz i muflonów, gąbczastą encefalopatię u bydła, tzw. chorobę szalonych krów (ang. *Bovine Spongiform Encephalopathy* – BSE), przewlekłą, wyniszczającą chorobę zwierzyny płowej: łosi i jeleni (*Chronic Wasting Disease* – CWD), encefalopatię gąbczastą kotów (*Feline Spongiform Encephalopathy* – FSE) oraz pasażowalną encefalopatię norek (*Transmissible Mink Encephalopathy* – TME) [24]. Zainfekowane zwierzęta wykazują podobne objawy: drżenie, utratę koordynacji ruchowej. W ostatniej fazie porażenia nie mogą utrzymać się na nogach, stają się pobudliwe, a w niektórych przypadkach odczuwają tak intensywne swędzenie, że wydrapują ze skóry wełnę lub sierść (ang. *scrape* – drapać się), co jest powodem licznych skaleczeń skóry [24].

W przypadku ludzi najgroźniejszą z chorób prionowych (ze względu na częstotliwość występowania) jest choroba Creutzfeldta-Jacoba (CJD), która jest chorobą uwarunkowaną genetycznie oraz postacią jatrogenną przenoszoną za pośrednictwem zabiegów lekarskich. Natomiast nowy wariant choroby Creutzfeldta-Jacoba (vCJD) jest przenoszony za pomocą infekcyjnych prionów pochodzących od chorych na BSE zwierząt [25]. Choroba Creutzfeldta-Jacoba (CJD) należy do grupy neurozwyrodnieniowych chorób układu nerwowego. CJD charakteryzuje się jak wcześniej wspomniano, odkładaniem w ośrodkowym układzie nerwowym oraz niektórych innych tkankach zmienionych konformacyjnie, tzw. izoform białka prionowego (PrP<sup>Sc</sup>). Na obraz patologiczny choroby składają się gąbczenie głębokich warstw kory mózgowej oraz głojoza włóknista. Patogeneza chorób prionowych, w tym również CJD, do tej pory nasyca wiele trudności badawczych, także ze względu na samą definicję białka PrP<sup>Sc</sup>, które w klasycznym podejściu oznacza izoformę PrP częściowo odporną na proteinazę, zaś w świetle nowych badań PrP może podlegać zmianom strukturalnym związanym z chorobą, które nie nadają naturalnej odporności na proteazę [3]. Wiadomo jednak, że nieprawidłowa izoforma białka prionowego akumuluje się w komórce, prowadząc do jej zmian zwyrodnieniowych [26]. W latach 1920–1921 Creutzfeldt i Jacob opisali pierwsze objawy choroby, prowadzące



**Rycina 1.** Schemat zmian konformacyjnych podczas przekształcania naturalnego białka prionowego w prionowe białko infekcyjne. W prionowym białku infekcyjnym udział struktur  $\alpha$ -helikalnych jest mniejszy, niż w naturalnych białkach prionowych, natomiast udział struktur  $\beta$ -harmonijkowych ( $\beta$ -fałdowych) jest większy, niż w naturalnych białkach prionowych

do demencji i utraty kontroli nad ruchami. Objawami choroby były: drżenie mięśni, gwałtowne zmiany stanów emocjonalnych, zaburzenia równowagi i synchronizacji ruchów, nasilająca się utrata kontroli nad wykonywanymi ruchami, zaniki pamięci, senność, apatia, wreszcie omamy wzrokowe i słuchowe, zaburzenia mowy, śpiączka. CJD na ogół pojawia się sporadycznie, atakując jedną osobę na milion. W 10–15% przypadków jest to choroba dziedziczna.

### Mutacje genu PRNP

We wszystkich dziedzicznych przypadkach choroby następuje mutacja genu PRNP. Do tej pory zidentyfikowano wiele różnych mutacji genu PRNP. W wyniku pojedynczej mutacji powstaje nieprawidłowe białko, które może przyjąć infekcyjną konformację i stopniowo zwiększać swą ilość, aż jego stężenie przekroczy pewien określony próg, wywołując objawy chorobowe. Pierwsze mutacje genu PRNP wywołujące chorobę prionową odkryto w kodonie 102. Mutacja

wywołująca zamianę leucyny w prolinę w pozycji 102, powoduje wystąpienie na modelu zwierzęcym syndromu Gerstmann-Strauslera-Scheinkera [27, 28]. Dalsze badania molekularne doprowadziły do odkrycia nowych mutacji powodujących prionowe zaburzenia. Mutacja genu PRNP w pozycji 198, 217, może doprowadzić do objawów GSS, ale również mutacje tego typu mogą powodować powstawanie zmian neurozwyrodnieniowych podobnych do choroby Alzheimera. Podobnie jest w przypadku kodonu 178, mutacja w tej pozycji została wykryta w rodzinnej śmiertelnej bezsenności (FFI), ale również mutacja tego typu występuje w rodzinnej chorobie CJD. Pomimo, że mutacja w tych dwóch jednostkach chorobowych polega na zamianie aminokwasu Asn na Asp, to obraz chorobowy jest różny. Sporadyczna postać choroby CJD wynika prawdopodobnie z możliwości związanej z wiekiem, tj. powstawania mutacji w genie PRNP. Jeżeli powstanie mutacja prowadząca do formy PrP<sup>CJD</sup> nawet w jednym neuronie, to znając patomechanizm rozwoju chorób prionowych można przypuszczać, że w wyniku reakcji łańcuchowej choroba rozprzestrzeni się na inne neurony.

Podatność na chorobę CJD może być również uwarunkowana genetycznie. Kluczowe znaczenie ma kombinacja dwóch aminokwasów: metioniny (Met) i waliny (Val), kodowanych przez odcinek DNA zwany polimorficznym kodonem 129. Wszystkie dotychczasowe przypadki wariantu CJD charakteryzowały się kombinacją Met/Met. Kombinacja

metioniny i waliny decyduje najprawdopodobniej o długości okresu inkubacji, a nie o całkowitej odporności na chorobę. Doświadczenia z jatrogennymi przypadkami choroby Creutzfeldta-Jacoba wskazują, że osoby z układem metionina-metionina chorują jako pierwsze, później zapadają pacjenci z układem walina-walina, a jako ostatni z układem heterozygotycznym metionina-walina [30, 33]. Choroba Creutzfeldta-Jacoba pojawia się praktycznie na całym świecie, ale jej wariant vCJD występuje prawie wyłącznie w Wielkiej Brytanii (99,6% przypadków). Obraz kliniczny choroby CJD występuje najczęściej u ludzi starszych, przeciętny wiek 65 lat, natomiast w przypadku vCJD choroba może występować u ludzi młodych przeciętny wiek 29 lat, przebieg choroby jest dłuższy, dominują zaburzenia psychiczne (halucynacje, urojenia, depresje), zmiany osobowości i agresja [29, 30].

W badaniach wykazano, że vCJD można traktować jak chorobę odzwierzęcą, zoonozę, gdyż źródłem zakażenia jest przeniesienie na człowieka prionów infekcyjnych w wyniku spożycia mięsa pochodzącego od krów chorych na BSE [31]. Ze względu na długi,

typowy dla chorób prionowych okres inkubacji trudno prognozować liczbę zachorowań na vCJD. Istnieje jednak nadzieje, że ze względu na liczne obostrzenia w handlu mięsem i hodowli, choroba ta ulegnie wygaśnięciu [32]. Następną chorobą u ludzi wywoływaną przez priony jest kuru (*Curu* = kuru – drżenie, „śmiejąca się śmierć”). Choroba ta została wykryta w 1957 r. i występuje wśród mieszkańców górskich regionów Papui-Nowej Gwinei. Stwierdzono, że podczas zarażenia tą chorobą następowała utrata koordynacji ruchów (ataksja), a później narastało otępienie (demencja). Chorzy osobnicy z plemienia Fore zarażali się prawdopodobnie podczas rytualnego kanibalizmu, chcąc oddać cześć swym zmarłym, zjadali ich mózgi. Priony zawarte w ludzkich organach, głównie w mózgu przenikały do organizmu, a po długim okresie inkubacji od kilku miesięcy do 40 lat rozpoczynał się powolny proces umierania na tę chorobę. Choroba objawia się zaburzeniami emocjonalnymi, napadem śmiechu lub płaczu, drżeniem nerwowo-mięśniowym, zaburzeniami równowagi, utratą kontroli nad ruchami, wreszcie śmiercią. W obrazie histopatologicznym mózgu widoczne są zmiany zwyrodnieniowe i złogowe wywołane odkładaniem się białek prionowych. Odkąd rząd Nowej Gwinei zakazał tych praktyk, choroba kuru zanikła. Pozostałe choroby prionowe to syndrom Gerstmann-Strauslera-Scheinkera (GSS). Syndrom ten jest skrajnie rzadką, wrodzoną chorobą autosomalną dominującą, w której typowa jest przewlekła postępująca ataksja i zejściowe otępienie oraz inne objawy wskazujące na uszkodzenie mózdzku, np. utrata koordynacji ruchowej. Przebieg kliniczny utrzymuje się od 2 do 10 lat. Następną chorobą to śmiertelna dziedziczna bezsenność (ang. *Fatal Familial Insomnia* – FFI), w której po okresie trudności w zasypianiu występuje otępienie oraz objawy natury psychicznej, utrata tożsamości, halucynacje. Prowadzi się badania próbujące ocenić, czy priony infekcyjne mogą również odgrywać jakąś rolę w powszechnie występujących chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak: choroba Alzheimera, Parkinsona czy stwardnienie zanikowe boczne. Te występujące wśród ludzi choroby łączy znaczne podobieństwo. Podobnie jak w przypadku chorób prionowych mają podobne objawy histologiczne, występuje bowiem degeneracja neuronów, akumulacja białek amyloidowych w postaci płytek, powiększenie komórek glejowych, podtrzymujących i odżywiających komórki nerwowe w reakcji na uszkodzone neurony. W żadnej z tych chorób, nie ma odpowiedzi układu immunologicznego w postaci wnikania białych krwinek do mózgu, co często następuje w przypadku infekcyjnych chorób wirusowych czy bakteryjnych [34]. Dla wszystkich znanych chorób prionowych występujących u ludzi istnieją modele zwierzęce pomocne w badaniach molekularnych choroby. Eksperymenty prowadzone na modelach powinny pogłębić naszą wiedzę na temat degeneracji

Źródłem patogennych prionów są nie tylko zmiany konformacyjne naturalnych białek PrP<sup>C</sup> pod wpływem infekcyjnych form PrP<sup>Sc</sup> ale również zmutowane geny. Mutacje genów kodujących proteiny PrP<sup>C</sup> powodują powstawanie cząsteczek białkowych o zmienionej konformacji posiadającej właściwości zbliżone do patogennych protein PrP<sup>Sc</sup>.

mózgu wywołanego prionami, a także umożliwić ocenę przydatności określonych terapii przeciwprionowych.

### Drogi przenoszenia prionów

Poznanie źródła zakażenia chorób prionowych było istotne z punktu widzenia ich zapobiegania i ograniczania rozprzestrzeniania się wśród ludzi. Wydaje się, że w przeciwieństwie do chorób wirusowych czy bakteryjnych, choroby prionowe nie są zakaźne drogą powietrzną (kropelkową), czy w wyniku kontaktu z chorymi pacjentami. Choroby prionowe szczególnie CJD można podzielić ze względu na tryb przenoszenia. Wyróżniamy formę infekcyjną dla vCJD (związaną z BSE), odmianę jatrogenną iCJD (związaną z terapią hormonem wzrostu, gonadotropiną, przeszczepami twardówki, używaniem narzędzi neurochirurgicznych), kuru (związaną z rytualnym kanibalizmem wśród plemion Fore w Papui-Nowej Gwinei), formę dziedziczną dla fCJD, FFI, GSS (związaną z mutacją genu PRNP) oraz formę sporadyczną dla sCJD, której etiologia nie jest do końca wyjaśniona [35]. O możliwości zakażenia i wywołania choroby vCDJ u człowieka prionami pochodzącymi od chorych zwierząt na BSE przekonany doświadczenia Lasmezasa i wsp. w 1996 r., prowadzone na naczelnych. W przypadku vCJD obraz klinicznych i histopatologicznych zmian u naczelnych małp jest podobny do zmian obserwowanych u człowieka. W czasie badań zakażono domózkowo ekstraktami mózgowia krów chorych na BSE małpy z rodziny makakowatych. Po pewnym czasie w badaniach klinicznych zaobserwowano u małp uszkodzenia mózdzku (zaburzenia równowagi). W badaniach histopatologicznych wykryto obecność złogów białek prionowych identycznych jak u ludzi chorych na vCJD. Najwyższe miana prionów zostały znalezione w mózgu i rdzeniu kręgowym, szczególnie oponach mózgowych. W badaniach na zwierzętach wykazano również wysokie stężenie prionów w śledzionie, grasicy, węzłach chłonnych i w płucach. Ponadto obecność patologicznych prionów PrP<sup>Bse</sup> obserwowano w migdałkach, przewodzie pokarmowym, śledzionie, w zwojach grzbietowych i brzusznych nerwów czuciowych szyjnego odcinka rdzenia kręgowego [36, 37]. W dalszych badaniach potwierdzono możliwość doustnego zakażenia naczelnych czynnikiem BSE, co stanowiło silny argument potwierdzający możliwość transmisji tego czynnika na ludzi drogą pokarmową [38]. Obecnie przyjmowany jest następujący model rozprzestrzeniania się prionów drogą pokarmową. Po spożyciu zakażonego pokarmu priony infekcyjne dostają się do światła jelita, skąd przenikają do tkanki limfatycznej. Następnie naczyniami limfatycznymi przedostają się do śledziony, węzłów limfatycznych oraz migdałków. W narządach tych ulegają namnożeniu i przedostają

się do unerwiających te narządy nerwów. Następnie przez włókna nerwowe priony docierają do rdzenia kręgowego i mózgu, gdzie zachodzi ich kumulacja i tworzenie tzw. agregatów PrP<sup>Sc</sup>. Istotną rolę w rozprzestrzenianiu się prionów w obrębie układu limfatycznego i OUN odgrywają limfocyty B [39–41]. Infekcji prionowej nie towarzyszy odpowiedź układu immunologicznego, gdyż chorobotwórcze PrP<sup>Sc</sup> nie są rozpoznawane przez organizm jako obce białka [29]. Transmisja infekcyjnych prionów między różnymi gatunkami zwierząt jest ograniczona ze względu na istnienie bariery międzygatunkowej. W niektórych jednak przypadkach bariera ta nie jest wystarczająco silna, dotyczy to przeniesienia tej choroby z chorych krów na człowieka. Bariera międzygatunkowa zależy od sekwencji aminokwasowej czynnika PrP, im bardziej sekwencja aminokwasowa czynnika infekcyjnego przypomina sekwencję aminokwasową gospodarza, tym łatwiej choroba prionowa będzie ulegała transmisji z jednego gatunku na drugi [42, 43].

Ważny problem transmisji chorób prionowych związany jest z możliwością przenoszenia choroby za pomocą układu krwionośnego, co wiąże się z obecnością czynnika zakaźnego w układzie limfatycznym. Badania wykazały, że podanie krwi ludzi chorych na vCJD myszom, nie prowadziło do rozwoju choroby [44]. Wiadomo jednak, że czynnik wywołujący vCLD jest obecny we krwi i pomimo tego, że jego miano jest bardzo niskie, stwarza niebezpieczeństwo transmisji choroby w wyniku transfuzji krwi [45, 46]. Ostatnie badania donoszą o przypadkach vCJD wynikających z infekcji prionami na skutek transfuzji krwi [47, 48], co wywołuje obawy dotyczące bezpieczeństwa produktów krwiopochodnych, jak również możliwość drugiej epidemii vCJD.

Zdarzały się również przypadki, gdy choroba ta została wywołana w wyniku błędu personelu medycznego podczas zabiegów medycznych. Do jej wystąpienia dochodziło podczas transplantacji rogówki, implantacji opony twardej lub elektrod do mózgu, wskutek używania zakażonych narzędzi chirurgicznych, czy podczas iniekcji hormonu wzrostu pochodzącego z ludzkich przysadek (zanim zaczęto stosować hormon wzrostu otrzymany metodami inżynierii genetycznej [49]. Procedury postępowania z pacjentami z rozpoznaniem choroby prionowej powinny być ograniczane do minimum, ze względu na ryzyko przeniesienia prionów na pacjenta na

Choroby prionowe występujące wśród ludzi takie jak: choroba Creutzfeldta-Jacoba (CJD), syndrom Gerstmann-Straussera-Scheinkera czy kuru łączą znaczne podobieństwo. Mają one podobne objawy histologiczne, występuje degeneracja neuronów, akumulacja białek prionowych w postaci płytek, powiększenie komórek glejowych – podtrzymujących i odżywiających komórki nerwowe. W żadnej z tych chorób, nie ma odpowiedzi układu immunologicznego w postaci wnikania białych krwinek do mózgu, co często następuje w przypadku infekcyjnych chorób wirusowych czy bakteryjnych.

powierzchni narzędzi stosowanych w zabiegach medycznych. Został opisany przypadek, w którym choroba CJD została przekazana od jednego pacjenta na dwóch innych, którzy zostali poddani operacji neurochirurgicznej w tej samej sali operacyjnej w krótkim odstępie czasu. Nie ma jednak w pełni udokumentowanych dowodów na przeniesienie prionów na ludzi z krwią lub płynem mózgowo-rdzeniowym, lub przez kontakt z nienaruszoną skórą. Możliwe jest jednak wnikanie prionów przez uszkodzone nabłonki i naskórek do układu chłonnego [50].

### Filogeneza molekularna prionów

Przy wykorzystywaniu nowoczesnych technik biologii molekularnej udało się zsekwencjonować geny prionów u różnych organizmów i na ich podstawie sporządzono drzewo filogenetyczne [51]. Badania wykazały niezwyklej topologię tych genów i kodowanych przez nie białek. Ciekawym faktem jest to, że występuje ewolucja zbieżna białka prionowego ludzkiego i bydlęcego. Szczegółowa analiza sekwencji aminokwasowej wykazała, że człowiek podobnie jak goryl, szympanś i niektóre naczelnne w pozycji 143 posiada aminokwas serynę, a w pozycji 155 histydynę. W większości pozostałych organizmów w tych miejscach znajdują się aminokwasy, takie jak asparagina i tyrozyna. Jedynym gatunkiem wśród pozostałych badanych zwierząt, mających te same aminokwasy (seryna i histydyna) w tych pozycjach, jest bydło. Wydaje się, że wspólne cechy prionów ludzkich i bydlęcych mogą odpowiadać za podatność człowieka na zakażania się bydlęcą wersją choroby prionowej. Hipoteza ta wydaje się prawdopodobna gdyż, nie wykazano zakażenia ludzi przez owcze priony, powodujące chorobę scrapie u owiec. Można przypuszczać, że dzięki temu jesteśmy naturalnie oporni na owcze priony, które choć blisko spokrewnione z prionami bydlęcymi to jednak nie posiadają dwóch identycznych, co u ludzi podstawień aminokwasów w pozycji 143 i 155. Hipoteza ta jest jeszcze nieudowodniona, a jej silnym kontrargumentem jest zakażenie myszy i owiec przez BSE, choć białka tych zwierząt nie posiadają owych aminokwasów w wyżej wymienionych pozycjach [52].

### Technologia farmaceutyczna a priony

Białka prionowe charakteryzuje wyjątkowa odporność na konwencjonalne procedury inaktywujące wiele innych zarazków. Problem ten jest szczególnie ważny w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym, gdyż surowce pochodzące od bydła wykorzystuje się w tych gałęziach przemysłu. Na liście takich produktów znajdują się tysiące pozycji – leki, parafarmaceutyki, kremy, itp. Firmy farmaceutyczne starają się unikać stosowania surowców pochodzenia

bydlęcego, jednak nie zawsze jest to możliwe. Dlatego bydlęto na użytek przemysłu farmaceutycznego hodowane jest w specjalnych, zamkniętych stadach, w krajach, gdzie choroba BSE nie występuje. Pracownicy przemysłu farmaceutycznego są narażeni na styczność z materiałem zakażonym prionami, podczas wykorzystywania surowców pochodzących od bydła do produkcji leków lub szczepionek. Dotyczy to głównie żelatyny stosowanej powszechnie do produkcji kapsułek oraz albuminy otrzymywanej od bydła. Obecność prionów wykazano również w bydlęcych preparatach hormonalnych [39]. Żelatyna jest mieszaniną polipeptydów uzyskanych w wyniku częściowej hydrolyzy kolagenu zawartego w kościach i skórze. Proces technologiczny służący do otrzymywania tego produktu obejmuje odtłuszczenie, zakwaszenie, ługowanie, płukanie, filtrację, wymianę jonową i sterylizację. Istnieją przypuszczenia, że priony mogą przetrzymać te wszystkie etapy, i ze względów bezpieczeństwa należy otrzymywać żelatynę z przebadanych zwierząt, u których nie wykazano obecności czynników PrP i objawów choroby BSE [53]. O tym, że priony są zdolne do przetrzymania procesów technologicznych związanych z produkcją, np. żelatyny, świadczą dane o ich dezaktywacji, które wykazują, że priony są bardzo odporne na denaturację wywołaną proteazami, nukleazami, wysoką temperaturą, radiacją, promieniowaniem UV o długości 254 nm, hydroksylaminą i formaliną. Rozmiar 30–55 kDa powoduje, że priony nie są zatrzymywane przez większość filtrów, które są w stanie efektywnie wyeliminować bakterie i wirusy. Z powodu tworzenia agregatów różnej wielkości poddają się działaniu detergentów dopiero po denaturacji. W żadnym przypadku nie można polegać na tzw. „sterylizacji” sprzętu medycznego przez gotowanie lub stosowanie suchego gorącego powietrza. Zachowują zakaźność pomimo działania alkoholu,  $\beta$ -propiolaktonu, psoralenów, dwuwartościowych kationów, metalicznych chelatorów jonowych, kwasów o pH 3–7. W autoklawie, w temperaturze 132°C podlegają unieczynnieniu po około godzinie. Wydaje się, że jedynym skutecznym sposobem pełnej inaktywacji czynnika zakaźnego są stężone roztwory podchlorynu sodu lub gorące roztwory wodorotlenku sodu [54, 55]. Ze względu na wyjątkowo wysoką odporność prionów infekcyjnych na środki fizyko-chemiczne, konieczne jest dokładne zweryfikowanie stosowanych metod dezynfekcji i sterylizacji w stosunku do tych czynników, gdyż taka wysoka odporność prionów posiada istotne znaczenie w technologii farmaceutycznej [56].

### Diagnostyka chorób prionowych

W przeszłości kryteria diagnostyczne sporadycznej postaci CJD opierały się głównie na klinicznych objawach choroby. Cechami wspólnymi dla takich

rozpoznać były mioklonie, zaburzenia widzenia lub zaburzenia mózdkowe, zaburzenia układu piramidowego lub pozapiramidowego. Aby można było rozpoznać CJD, obok co najmniej 2 objawów wymienionych powyżej, chory musiał prezentować postępujące otępienie oraz czas trwania choroby nie krótszy niż 2 lata. W praktyce rozpoznanie pewnej CJD można było ustalić dopiero po śmierci pacjenta, na podstawie charakterystycznego obrazu neuropatologicznego. Obecnie diagnostyka chorób prionowych opiera się na swoistych przeciwciałach rozpoznających białka prionowe. Przeciwciała monoklonalne tego typu odkryto w latach 90. ubiegłego wieku. Przeciwciała monoklonalne (15B3), specyficznie wytrącają bydłęce, mysie i ludzkie PrP, co wskazuje na fakt, że przeciwciała te rozpoznają wspólny epitop (część antygeny, która kontaktuje się z miejscem wiążącym przeciwciało) prionów pochodzących od człowieka i różnych gatunków zwierząt [57]. W diagnostyce prionów niezwykle pomocne mogą być dwa białka o masie cząsteczkowej 130 kDa oraz 131 kDa, występujące w płynie mózgowo-rdzeniowym osób chorych na CJD i nieobecne u zdrowych pacjentów. Białka te są najprawdopodobniej niespecyficznym efektem uszkodzeń tkanki mózgowej przez chorobę prionową. Uzyskanie przeciwciał przeciwko białkom 130 i 131 pozwoli na optymalną diagnostykę choroby Creutzfeldta-Jacoba [58–61]. Ważną sprawą jest wykrycie obecności prionów w surowcach pochodzenia zwierzęcego użytych w technologii farmaceutycznej. Wczesne objawy choroby u zwierząt wykorzystywanych przez przemysł farmaceutyczny są mało specyficzne i obejmują zmniejszenie wydajności mlecznej oraz łekliwość. Aby uchronić się przed możliwością użycia chorych zwierząt, wprowadzono ostre rygory sanitarne, włącznie z używaniem do celów farmaceutycznych tylko zwierząt pochodzących z odpowiednich farm hodowlanych. Do wykrywania obecności prionów w tkankach zwierząt używa się specyficznych przeciwciał monoklonalnych uzyskanych technikami biologii molekularnej. Użycie przeciwciał monoklonalnych jest najczulszą metodą oznaczania obecności prionów. Do badania na zawartość prionów używa się tkanek o największej ilości białek prionowych, tj. mózgowia i rdzenia kręgowego. Najczęściej do testu na obecność prionów infekcyjnych używa się przeciwciał monoklonalnych 6H4 firmy farmaceutycznej Priones. Używane do badania białko 6H4 rozpoznaje normalne białka prionowe PrP<sup>C</sup> oraz specyficzne dla BSE białka PrP<sup>BSE</sup>. Z tego względu proces wykrywania obecności infekcyjnych prionów podzielony jest na dwa etapy. W pierwszym etapie wykorzystujemy fakt, że białka PrP<sup>BSE</sup> są odporne na działanie enzymów proteolitycznych [62]. Wykorzystując te enzymy degradujemy normalne białka PrP, podczas gdy u specyficznego białka PrP<sup>BSE</sup> odcięta zostaje jego niewielka część. Następnie do mieszaniny

reakcyjnej dodajemy przeciwciała 6H4, który przyłącza się do niestrawionego białka PrP<sup>BSE</sup>. Wykrywanie połączenia przeciwciała 6H4 z białkiem PrP<sup>BSE</sup> jest możliwe dzięki dołączonemu do przeciwciała enzymowi, który wysyła dający się zmierzyć sygnał świetlny [63]. Obecność niestrawionych białek PrP<sup>BSE</sup> można wykryć za pomocą elektroforezy żelowej. Po rozdzielaniu elektroforetycznym białka z żelu można przenieść na membranę, na której obecność białek PrP<sup>BSE</sup> można dodatkowo wykryć poprzez użycie przeciwciał monoklonalnych. Wynik dodatni testu z obecnością przeciwciał monoklonalnych stanowi niepodważalny dowód obecności choroby prionowej [64].

### Testy diagnostyczne

Standartowe testy w diagnostyce na obecność prionów infekcyjnych przeprowadza się wykorzystując istnienie fizykochemicznych różnic pomiędzy normalną a chorobotwórczą formą PrP. Najważniejszą różnicą obu form jest różna wrażliwość na działanie proteaz.

Podczas trawienia proteinazą K białko prionowe PrP jest całkowicie trawione do aminokwasów, podczas gdy w infekcyjnych prionach proteinaza K usuwa tylko 67 aminokwasów z N-końca. W wyniku tego trawienia otrzymujemy białko prionowe 27–30 kDa (PrP27–30), które nie traci na infekcyjności [65]. Pomimo faktu, że PrP27–30 jest markerem powszechnie stosowanym w diagnostyce TSE, to nie można obecności choroby prionowej diagnozować tylko na podstawie oporności na trawienie proteinazą K. Wykazano bowiem, że podczas choroby cząsteczki PrP<sup>C</sup> mogą ulegać takim modyfikacjom strukturalnym, które nie powodują zmiany w oporności na trawienie proteazą K [66]. W oparciu o te wyniki wydaje się, że najbardziej wiarygodny będzie test diagnostyczny wykrywający niewielkie ilości patogennych form PrP, bez konieczności użycia proteinazy. W tym celu do badań diagnostycznych na obecność prionowych białek infekcyjnych próbuje się zastosować specyficzne cząsteczki RNA nazywane aptamerami.

### Aptamery w diagnostyce

Aptamery to kilkunasto- lub kilkudziesięciounukleotydowe sekwencje RNA lub DNA, które wykazują zdolność wiązania określonych cząsteczek chemicznych, za pomocą wiązań wodorowych czy hydrofobowo-hydrofilowych [67]. Nazwa ich pochodzi z łacińskiego słowa aptus, oznaczającego: dopasowany, przyczepiony. Nazwę tę zawdzięczają faktowi, że posiadają strukturę przestrzenną dopasowaną do budowy cząsteczki docelowej, którą przyłączają. To dopasowanie osiągają w toku kombinatorycznego procesu syntezy i cyklicznej selekcji w warunkach *in vitro*. Wśród cząsteczek chemicznych, które są



Procedury postępowania z pacjentami z rozpoznaniem choroby prionowej powinny być ograniczane do minimum ze względu na ryzyko przeniesienia infekcyjnych prionów na pacjenta z powierzchni narzędzi stosowanych w zabiegach medycznych. Nie ma jednak w pełni udokumentowanych dowodów na przeniesienie prionów na ludzi z krwią lub płynem mózgowo-rdzeniowym, lub przez kontakt z nietkniętą skórą. Możliwe jest jednak wnikanie prionów przez uszkodzone nabłonki i naskórek do układu chłonnego.

selektywnie wiązane do aptamerów są między innymi: jony metali, barwniki organiczne, aminokwasy, witaminy, antybiotyki, nukleotydy, lipidy oraz peptydy i białka [68]. Wysokie powinowactwo i precyzyjne wiązanie się aptamerów do ściśle określonych biomolekuł wynika z danej sekwencji nukleotydowej aptameru i specyficznej konformacji przestrzennej każdego liganda [69]. Dzięki wysokiej specyficzności przyłączania oraz stosunkowo łatwej, w porównaniu do przeciwciał, zdolności chemicznej modyfikacji, jak znakowanie radioaktywnymi izotopami [67], czy koniugacji z barwnikami fluorescencyjnymi [68], aptamery mogą konkurować z przeciwciałami o miano uniwersalnych receptorów. Dzięki tym właściwościom można je wykorzystać jako narzędzie rozpoznania molekularnego w metodach diagnostycznych [10].

### Aptamery wiążące PrP

Pierwsze informacje o otrzymaniu aptamerów o strukturze RNA zdolnych wiązać białka prionowe pojawiły się w 1997 r. [70]. Analiza sekwencyjna aptamerów RNA (oznaczonych Ap1 i Ap2) wiążących specyficzną rekombinowaną cząsteczkę rPrP<sup>C</sup> wykazała obecność w aptamerze tzw. kwartetów guaninowych w ich strukturze, które biorą aktywny udział w tworzeniu wiązań aptamer-cząsteczka docelowa. Region białka prionowego, który oddziałuje z tym kwartetem guaninowym zlokalizowany jest na N-końcu (od 23 do 52 aminokwasu) [71]. Ze względu na fakt, że koniec białka PrP<sup>C</sup> może oddziaływać z szeregiem innych molekuł, w tym z kwasami nukleinowymi, wyselekcjonowano aptamer (SAF-93), który wykazywał powinowactwo do form  $\beta$ -fałdowanych niemal 10-krotnie większe niż do form  $\alpha$ -helikalnych białek prionowych. Wyniki te wskazały na istnienie dwóch miejsc wiązania w cząsteczce PrP: pierwszego znajdującego się w N-końcowym odcinku każdego PrP, odpowiedzialnego za niespecyficzne wiązanie RNA oraz drugiego, umiejscowionego w C-terminalnym,  $\beta$ -fałdowym odcinku PrP, specyficznym rozpoznawanym przez aptamer SAF-93 [72]. Zastosowanie specyficznych aptamerów rozróżniających poszczególne izoformy białka PrP umożliwi skuteczną detekcję i diagnostykę chorób prionowych [73].

### Metody terapii chorób prionowych

W chwili obecnej nie znamy sposobu leczenia farmakologicznego chorób prionowych, ani nawet

opóźnienia ich rozwoju. Odkrycie podstaw molekularnych chorób prionowych zainicjowało badania zmierzające do ich leczenia za pomocą terapii genowej lub innych technik molekularnych.

### Terapia genowa

W badaniach na modelach zwierzęcych udało się powstrzymać tworzenie się nieprawidłowych białek prionowych. Wykazano, że istnieje możliwość wyłączenia ekspresji genów kodujących priony, co w istotny sposób opóźnia rozwój choroby. Jedną z idei tego typu terapii polega na wykorzystaniu technologii „wstrzeliwania się” (*targeting*) w określony gen. W badaniach na myszach za pomocą tej techniki otrzymano szczep myszy z zablokowaną aktywnością genu PrP, niezdolny do produkcji białka PrP. Szczep ze względu na brak białka PrP był odporny na infekcję patologicznymi prionami. Ten typ terapii powiódł się dlatego, że u zwierząt którym brakuje białka PrP, nie wystąpiły żadne widoczne anormalności. Gdyby okazało się, że brak białka PrP nie jest groźny dla organizmu człowieka, można by rozpatrzyć zastosowanie terapii antysens lub terapii antygenowej w mózgu pacjentów z objawami choroby prionowej. Jak wykazały badania, obniżenie poziomu PrP<sup>C</sup> wydłuża okres przeżycia i ogranicza infekcję komórek przez chorobotwórcze priony. W celu obniżenia poziomów PrP<sup>C</sup> wykorzystano zjawisko interferencji RNAi, które jest potranskrypcyjnym wewnątrzkomórkowym mechanizmem wyciszania aktywności genów. Na modelu zwierzęcym przy wykorzystaniu wektorów wirusowych udało się zahamować w neuronach ekspresję genów i biosyntezę białek PrP<sup>C</sup>, co powodowało ograniczenie rozwoju choroby. Terapeutyczny potencjał interferencji RNA wykazano również w terapii choroby Alzheimera czy płasawicy Huntingtona [74–77]. Interferencja RNA jest bardzo konserwatywnym ewolucyjnie specyficznym potranskrypcyjnym systemem wyciszania aktywności odpowiednich genów, w którym krótkie interferencyjne odcinki podwójnego RNA–siRNA, tworzą odpowiednie wiązania komplementarne z odpowiednim mRNA, który ulega następnie degradacji, co powoduje zahamowanie ekspresji odpowiedniego genu kodowanego przez degradowaną cząsteczkę mRNA [78,79]. Cząsteczki siRNA są otrzymywane endogennie w komórce lub mogą być dostarczane za pomocą wektorów ekspresyjnych w wyniku terapii genowej. Cząsteczki te aktywują odpowiedni kompleks wyciszający o nazwie RISC, który wykazuje zdolność degradacji odpowiedniego mRNA [80, 81]. Największą przeszkodą w wykorzystaniu interferencji RNA do hamowania aktywności genów dla białek prionowych PrP związana jest z dostarczaniem terapeutycznych genów do OUN. W chwili obecnej do przenoszenia terapeutycznych genów wykorzystywane są wektory wirusowe konstruowane na bazie lentiwirusów, które należą do rodziny retrovirusów

i z tego względu mogą przenosić terapeutyczne geny bezpośrednio do genomów niedzielących się komórek nerwowych, a przenoszone przez nie terapeutyczne geny wykazują stałą i długotrwałą ekspresję siRNA w komórkach nerwowych [83, 83]. Wyniki badań prowadzone w warunkach *in vitro* i *in vivo* są bardzo optymistyczne. Przy zastosowaniu wektorów lentiwirusowych udało się wprowadzić terapeutyczny iRNA hamujący powstawanie białek PrP w komórkach zwierzęcych [84]. Zahamowanie produkcji białek PrP hamowało jednocześnie replikację prionów w liniach komórkowych. Wektory lentiwirusowe są dobrze tolerowane przez system immunologiczny i z wysoką wydajnością przenoszą terapeutyczne geny do neuronów na modelu zwierzęcym.

### Szczepionka na priony

W wielu przypadkach szczepienia są efektywną metodą w leczeniu infekcji wywołanych przez różne patogeny, takie jak wirusy czy bakterie. W przypadku chorób prionowych szczepienia mogą być skutecznym narzędziem w celu obrony naszych organizmów przed chorobami prionowymi. O skuteczności tego podejścia przekonują badania na hodowlach komórkowych, w których użyto specyficznych przeciwciał monoklonalnych. W badaniach tych udało się zahamować powielanie prionów. Dodatkowo wykazano, że dodanie do komórkowej hodowli przeciwciał (tzw. Fab D18) nie tylko zahamowało tworzenie w komórkach nowych prionów, ale i usunęło te, które już tam były. W ten sposób przy użyciu przeciwciał udało się „wyleczyć” hodowane komórki, ale czy ta metoda okaże się skuteczna w terapii vCJD okaże się w niedalekiej przyszłości [85, 86].

### Nanotechnologia

Wydaje się, że również nanotechnologia, która zajmuje się wytwarzaniem precyzyjnych struktur o wielkości kilku nanometrów będzie miała coś do powiedzenia w kwestii terapii chorób prionowych. Na początku lat 80. w Stanach Zjednoczonych po raz pierwszy zsyntetyzowano superrozgałęzione polimery, które nazwano dendrymerami, dla podkreślenia ich drzewiastej struktury. Okazuje się, że tak zbudowane związki mogą znaleźć zastosowanie w medycynie, a szczególnie są one potencjalnymi czynnikami terapeutycznymi w chorobach neurodegeneracyjnych, u podłoża których leży tworzenie się złożeń amyloidowych. Właściwości dendrymerów pozwalają im rozbijać agregaty białkowe powstające w chorobach prionowych. Prace nad tym tematem są prowadzone w wielu ośrodkach naukowych.

### Terapia białkowa

Inna idea, w której można wykorzystać nowe zdobycze inżynierii białkowej polega na możliwości syntetyzowania peptydów o różnych, przypadkowych

sekwencjach. Można otrzymać ogromną różnorodność peptydów i znaleźć odpowiedni peptyd, który wiązałby się z odpowiednią sekwencją aminokwasową prionu patologicznego. Po poznanie sekwencji tego specyficznego białka, można otrzymać fragment DNA kodujący sekwencję takiego peptydu i następnie wklonować go do odpowiedniego wektora ekspresyjnego wykorzystywanego w terapii genowej. Taki „białkowy antysens” neutralizowałby niepożądane, patologiczne priony, zapobiegając tworzeniu się złożeń w mózgu. Natomiast w kilku laboratoriach na świecie (m.in. w pracowni Stanleya Prusiner, odkrywcy prionów) trwają prace nad peptydami, mającymi zapobiegać przyjmowaniu przez prion postaci zakaźnej, próby z peptydami hamującymi tę przemianę są jednak dopiero we wstępnym etapie badań.

### Terapia chorób prionowych przy użyciu aptamerów

Wykorzystanie specyficznych aptamerów rozpoznających strukturę  $\beta$ -wałdową, typową dla infekcyjnych prionów PrP<sup>Sc</sup>, pozwoliło na skuteczną inhibicję procesu konwersji prionów naturalnych PrP<sup>C</sup> w priony infekcyjne PrP<sup>Sc</sup> w warunkach *in vitro* [21]. Wyniki pozwalają przypuszczać, że będzie można wykorzystać aptamery RNA do blokowania powielania prionów infekcyjnych w tkance mózgowej pacjentów.

### Farmakoterapia

Istnieją również nadzieje, że dzięki farmakoterapii wykorzystującej powszechnie dostępne leki można zwalczyć śmiertelną do tej pory chorobę vCJD. Zauważono, że za zmianę białek PrP w chorobotwórcze priony odpowiadają ich fragmenty, do których przyłączone są cząsteczki cholesterolu. W hodowlach komórkowych wykazano, że leki obniżające poziom cholesterolu blokują zmiany konformacyjne białek prionowych. Niestety, ich zastosowanie wiąże się ze zbyt dużym ryzykiem. Trzeba bowiem podawać je w tak dużych dawkach, że stężenie cholesterolu spadłoby w mózgu do bardzo niskich wartości, co byłoby szczególnie niebezpieczne dla komórek nerwowych. Pewne nadzieje wiąże się z lekami, które już od wielu lat są stosowane w terapii [84]. Do tych związków należy zaliczyć atabrynę – do dziś stosowaną u chorych na malarię, drugim związkiem jest chloropromazyna, znana od lat 50. jako lek psychotropowy. Związki te potrafią przekraczać barierę krew-mózg i docierać bezpośrednio do zaatakowanych przez priony tkanek, blokując bogate w cholesterol obszary normalnych białek prionowych, powodując hamowanie ich przemiany w infekcyjne priony. Badania nad lekami trwają nadal, a skuteczność terapii za pomocą tych związków nie jest jeszcze udowodniona. Pewne nadzieje budzą związki posiadające anty-prionowe działanie. Do takich substancji zaliczamy porfiryryny i pochodne ftalocyjanianów [87]. Zastosowanie

tych związków na modelu zwierzęcym umożliwiło znaczącą poprawę czasu przeżycia zwierząt podczas choroby prionowej. Związki te jednak wykazują działanie zastosowane tuż przed infekcją, zanim zakaźne priony dotrą do OUN [88]. Innym przykładem terapii jest oddziaływanie bezpośrednio na strukturę białek PrP. Poznanie struktury trójwymiarowej białek prionowych może doprowadzić do opracowania metod leczenia tej choroby. Jeśli na przykład model zakładający istnienie czterech helikalnych pętli jest prawdziwy, można zaprojektować lek, który wiązałby się z tworzoną przez nieumiejscowioną centralnie kieszonką. W ten sposób związany lek mógłby stabilizować helisy białka PrP i powodować hamowanie przekształcania struktury helisy w strukturę beta.

### Podsumowanie

Wprowadzenie efektywnych metod w terapii i diagnostyce chorób prionowych nastęrcza szereg trudności, które wynikają z natury fizykochemicznej infekcyjnych cząsteczek PrP<sup>Sc</sup>, ich struktury, sposobu replikacji oraz mechanizmu patogenezy. Wydaje się, że wprowadzenie nowoczesnych technik terapii genowej i nowych biomolekuł, tj. aptamerów pozwoli wprowadzić skuteczne metody terapii i diagnostyki tych chorób.

Otrzymano: 2009.06.02 · Zaakceptowano: 2009.06.15

### Pismienictwo

- Collinge J. Sidle K.C.: *Nature*, 1996, 383, 685–691.
- Bruce M.E.: *Nature*, 1997, 389, 498–451.
- www.doh.gov.uk/cjd/stats/sept01.htm (Department of Health. UK) 2001.
- Kodsto D.A.: *Nature*, 1994, 370, 71–84.
- Alper T., Cramp W., Haig D.: *Nature*, 1997, 214, 764–768.
- Griffith J.: *Nature*, 1997, 215, 1043–49.
- Crick F.: *Nature*, 1989, 227, 561–563.
- Prusiner S.B.: *Prions Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998, 23, 13363–13383.
- Prusiner S.B.: *Science*, 1989, 16, (45), 136–44.
- McDonnell G., Russell D.: *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12, 147–179.
- Baker R.: *Prion Disease*. New Jersey: Humana Press, 1997, 12, 342–346.
- Manuelidis L., Zhou-Xue Yu., Barquero N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007, 104, 613–623.
- Weissmann C.: *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2, 312–322.
- Harris D.A.: *Clinical Microbiology Reviews*, 1999, 12, 429–444.
- Laurenson I.F., Whyte A.S.: *Lancet*, 1999, 354, 1823–1831.
- Ou D.M., Chen C.C., Chen C.M.: *Biophysical Journal*, 2007, 92, 134–139.
- Oesch B., Westaway D.: *Cell*, 1985, 40, 735–46.
- Shyng S.L., Heuser J.E., Harris D.A.: *J Cell Biol*. 1994, 125–136.
- Coustou V., Deleu C., Saupé S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, 94(18), 9773–9778.
- Coustou V., Deleu C.: *Prions Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, 94, 9773–9778.
- Michelitsch M.D., Weissman J.S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000, 97(22), 1910–1915.
- Prusiner S.B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998, 95(23), 13363–13383.

- Tyler K.L.: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 63, 844–861.
- Aguzzi A., Heppner F.L.: *Cell*, 2000, 40 (7), 889–902.
- Will R.G., Ironside J.W.: *Lancet*, 1996, 347, 921–925.
- Aguzzi A., Heikenwalder M.: *J Clin Invest* 2004, 114, 153–160.
- Johnson C., Pederson J., Chappell R.: *Pathogens*, 2007, 3 (7), 112–122.
- Telling G., Scott M.: *Cell*, 1999, 83(1): 79–90.
- Will R.G.: *Prion related disorders*. *J. Roy. Coll. Phys. Lond.* 1999, 33, 311–315. 30. Zeidler M., Ironside J.W.: *Rev. Sci. Off. Int. Epiz.* 2000, 19, 98–120.
- Collee J.G.: *Lancet*, 1999, 354, 317–323.
- Ghani A.C., Donnelly C.A.: *Proc. R. Soc. Lond.* 2001, 267, 23–29.
- Deslys J.P., Jaegly A.: *Lancet* 1998, 351, 1251–1255.
- Liberski P.P.: *Choroba Creutzfeldta-Jacoba i inne choroby wywołane przez priony – pasażowalne encefalopatie gąbczaste człowieka*. 2003. PWN Warszawa.
- Aguzzi A., Heikenwalder M., Miele G.: *J Clin Invest*, 2004, 114, 153–160.
- Polak M.P., Żmudziński J.: *Medycyna Wet.* 2001, 1(57), 5–7.
- Lasmézas C.I., Deslys J.P.: *Nature*, 1996, 381, 743–744.
- Bons N.: *Proc. Natl Acad Sci USA*. 1999, 96, 4046–4051.
- Zużewicz M.A.: *Priony-zagrozenie biologiczne. Bezpieczenstwo pracy*, 2001, 6, 11–13.
- Adam D.: *Nature*, 2001, 409, 655–658.
- Aguzzi A.: *Nature Medicine*, 2001, 7, 289–290.
- Scott M.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999, 96, 15137–15142.
- Cohen F.E., Prusiner S.B.: *Science*, 1994, 264, 530–531.
- Tateishi J.: *Lancet* 1989, 2, 1074–1078.
- Hensen S.: *Lancet*, 1994, 343, 298–299.
- Prusiner S.B.: *Science*, 1991, 252, 1515–1522, 14VI.
- Peden A.H.: *Lancet*, 2004, 364, 527–52.
- Wroe S.J.: *Lancet*, 2006, 368, 2061–2067.
- Sivakumaran M.: *Lancet* 2000, 356, 1771–1772,
- Gronkowski M., Śpila B.: *Neurol Neurochirurg Pol* 2005, 39, 6, 520–523.
- Amores A., Force A.: 1999, *Science* 282, 1711–1714.
- Brown T.A.: *Genomy*, 2001, PWN Warszawa.
- Wells G.A., Hawkins S.: *Vet. Res.* 1999, 144, 292–294.
- Taylor D.M.: *J. Vet.* 2000, 159, 10–17.
- Qin K, O'Donnell M, Zhao R.: *Neuroscience*, 2006, 141(1), 1–8.
- Manuelidis L.: *J. Neurovirol*, 1998, 3, 62–65.
- Bruno B.: *Nature*, 1997, 665–669.
- Kulczycki J.: *Neurologia i Psychiatria*, 2004, 4, 194–197.
- Aguzzi A., Heikenwalder M., Miele G.: *J Clin Invest*. 2004, 114: 153–160.
- Safar J.G., Scott M.: *Nat Biotechnol*, 2002, 20, 1147–1150.
- Meissner B., Kortner K., Bartl M.: *Neurology*, 2004, 63: 450–456.
- Kayser O., Muller R.H.: *Biotechnologia farmaceutyczna*. PZWL, Warszawa 2003.
- Bodemer W.: *Naturwissenschaften*, 1999, 86, 212–220.
- FDA internet (2000): <http://www.fda.gov/cber/gdlns/cjdnvcj.pdf>.
- Heppner F.L.: *Cell Death Differ*, 2000, 7, 889–902.
- Safar J.G.: *Nat. Biotechnol*, 2002, 20, 1147–1150.
- Maclean D.: *Pure Appl. Chem*. 1999, 71, 2349–2365.
- Jayasena S.D.: *Clin. Chem*. 1999, 45, 1628–1650.
- Jenison R.D.: *J. Biol. Chem*. 1994, 269, 32051–32054.
- Proske D.: *Chembiochem*, 2002, 3, 717–725.
- Schatz H.M.: *J. Mol. Biol*. 1995, 71, 245, 362–372.
- Rhie A.: *J. Biol. Chem*. 2003, 278, 39697–39705.
- Sayer N.M.: *J. Biol. Chem*, 2004, 279, 102–121.
- Singer O.: *Nat. Neurosci*. 2005, 8, 1343–1349.
- Ralph G.S.: *Nat. Med*. 2005, 11, 429–433.
- Xia H.: *Nat. Med*. 2004, 10, 816–820.
- Harper S.Q.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005, 102, 5820–5825.
- Qingzhong K.: *J. Clin. Invest*. 2006, 116(12), 3101–3103.
- Sen, G.L., Blau, H.M.: *FASEB J*. 2006, 20, 1293–1299.
- Snoe O., Rossi J.J.: *Nat. Methods*, 2006, 3, 689–695.
- Xia X.G., Zhou H.: *Neurodegener. Dis*. 2005, 2, 220–231.
- Li C.X.: *Cell Cycle*. 2006, 5, 2103–2109.
- Root D.E., Hacohen N.: *Nat. Methods*, 2006, 3: 715–719.
- Ellis J.: *Hum. Gene Ther*. 2005, 16, 1241–1246.
- Pfeifer A.: *J. Clin. Invest*. 2006, 116, 3204–3210.
- Bueler H.R.: *Nature*, 1992, 356, 577–582.
- Priola SA, Raines A., Caughey W.S.: *Science* 2000, 287, 1503–1506.