

PRIONÓZY — NEURODEGENERAČNÉ CHOROBY VYVOLANÉ PRIÓNMI, NÁKAZLIVÝMI MOLEKULAMI PROTEÍNOVEJ POVAHY

^{1,2}FERENČÍK M., ^{1,3}NOVÁK M., ^{1,4}MIKULA I., ³SOKOL J.

PRIONOSES — NEURODEGENERATIVE DISEASES INDUCED BY PRIONS, PROTEINACEOUS INFECTIOUS MOLECULES

Prionoses are a group of human and animal neurodegenerative diseases caused by prions, infectious pathogens that differ from bacteria, fungi, parasites, viroids, and viruses. Despite intensive searches over the past three decades, no nucleic acid has been found within prions and considerable experimental data argue that prions are composed exclusively of proteins (glycoproteins). Normal prion protein (PrP^C) is encoded by a gene present in all nuclear cells of humans and other mammals but is constitutively expressed mainly in neurons. PrP^C is protease sensitive and nonpathogenic but it can be modified to the pathological and protease resistant form designated PrP^{Sc} which is essential for infectivity. Prion diseases are manifested as infectious, genetic, or sporadic disorders and are also named as transmissible spongiform encephalopathies (TSE). TSE culminate with a progressive and fatal degeneration of the CNS. The human prionoses include Creutzfeldt—Jakob disease (CJD), kuru, Gerstman—Sträusler—Scheinker syndrome (GSS), and fatal familial insomnia (FFI). In mammals, more than 15 different species have been described to suffer from prion disorders till now. Scrapie of sheep and goats is the oldest and the most studied of the prion diseases. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and transmissible mink encephalopathy are thought to result from the feeding of scrapie-infected animal products, whereas BSE has been identified in transmission to mice, domestic cats, two exotic species of ruminant, and monkey. More than 20 cases of clinically and pathologically atypical form of CJD, referred to as „new variant“ CJD (vCJD) have been recognized in unusually young people in the United Kingdom. There is a strong evidence that the same prion strain is involved in both BSE and vCJD. It suggest the breaking of

Prionózy sú skupinou ľudských a zvieracích neurodegeneračných chorôb vyvolaných priónmi, infekčnými patogénmi, ktoré sa líšia od baktérií, húb, parazitov, vírusov a viroidov. Napriek intenzívnemu výskumu v posledných troch desaťročiach sa v priónových časticiach nenašli žiadne nukleové kyseliny a množstvo experimentálnych údajov dokazuje, že sa skladajú výlučne z proteínov (glykoproteínov). Normálny priónový proteín (PrP^C) je kódovaný génom, ktorý je prítomný vo všetkých jadrových bunkách človeka a ostatných cicavcov. Konštitutívne sa však exprimuje najmä v neurónoch. PrP^C je nepatogénna molekula citlivá na proteolytické enzýmy. Môže sa však modifikovať na patologickú a proteolyticky rezistentnú formu, ktorá sa označuje PrP^{Sc} a má zásadnú úlohu pri infekčnosti týchto agensov. Priónové choroby sa manifestujú infekčnou, geneticky podmienenou alebo sporadickou formou a označujú sa aj ako prenosné špongiformné encefalopatie (TSE). Prionózy vyúsťujú do progresívnej a fatálnej degenerácie CNS. Medzi ľudské prionózy patrí Creutzfeldtova—Jakobova choroba (CJD), kuru, Gerstmanov—Sträusslerov—Scheinkerov syndróm (GSS) a fatálna familiárna insomnia (FFI). Priónové choroby boli doteraz opísané pri viac ako 15 druhoch cicavcov. Z nich klusavka oviec a kôz patrí medzi najstaršie a najviac študované. Považuje sa za dokázané, že bovinná špongiformná encefalopatia (BSE) a prenosná encefalopatia norky farmovej vznikla po skrmovaní krmiva obsahujúceho materiál z oviec uhynutých na klusavku ako dôsledok prelomenia medzidruhej bariéry. Podobne BSE sa preniesla na myši, mačku domácu, dva druhy exotických prežúvavcov v zoologických záhradách a experimentálne na opice. Nedávno vo Veľkej Británii sa u neobyčajne mladých ľudí diagnostikovalo viac ako 20 prípadov klinicky aj patologicky atypickej CJD, ktorá sa preto označila ako nový variant CJD (vCJD). Existujú silné dôkazy, že BSE a vCJD vyvoláva ten istý kmeň priónov. To znamená, že vCJD mohla vzniknúť opäť prelomením medzidruhej bariéry po expozícii ľudí výrobkom z mäsa hovädzieho dobytku nakazeného BSE. Pochopenie funkcie priónových proteínov a ich konverzie na patologickú formu určite prinesie nové pohľady aj na etiológiu a patogenetické mechanizmy vzniku ďalších chorôb s účasťou iných aberantných proteínov vrátane Alzheimerovej choroby, amyotrofickej laterálnej sklerózy a Parkinsonovej choroby. (Tab. 4, obr. 3, lit. 76.)

Kľúčové slová: prión, prenosné špongiformné encefalopatie (TSE), klusavka, bovinná špongiformná encefalopatia

¹Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied v Bratislave, ²Imunologický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, ³Laboratórium veterinárnej biomedicíny Štátnej veterinárnej správy Slovenskej republiky v Bratislave a ⁴Univerzita veterinárneho lekárstva v Košiciach

¹Neuroimmunological Institute of Slovak Academy of Sciences, Bratislava; ²Department of Immunology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava; ³Laboratory of Veterinary Biomedicine, State Veterinary Administration of Slovak Republic, Bratislava, and ⁴University of Veterinary Medicine, Košice

Address for correspondence: M. Ferenčík, PhD, DSc, LFUK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia.

Phone: +421.7.365 403, Fax: +421.7.5357 578, Internet: ferencik@fmed.uniba.sk

species barrier which results by spreading of BSE to humans, putatively by dietary exposure. Understanding the function of prion proteins and their modification to the pathological form may give new insight into the etiologic and pathogenic mechanisms also other diseases caused by aberrant proteins, including Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and Parkinson's disease. (Tab. 4, Fig. 3, Ref. 76.)

Key words: prion, transmissible spongiform encephalopathies (TSE), scrapie, bovine spongiform encephalopathy (BSE), Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), new variant CJD, Gerstman-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS), fatal familial insomnia (FFI), kuru.

Bratisl Lek Listy 1998; 99:486–498

Prionózy sú skupinou neurodegeneračných chorôb postihujúcich človeka a iné cicavce. Môžu vznikáť spontánne (sporadická forma), geneticky podmienené (dominantný spôsob dedičnosti) alebo pôsobením infekčných agensov. O povahe týchto agensov sa diskutuje už viac ako dve desaťročia. V súčasnosti sa prevažná väčšina odborníkov prikláňa k názoru, že príčinnými agensmi prionóz sú **prióny**, glykoproteínové častice alebo presnejšie molekuly. Za ich objav Stanley B. Prusiner, profesor neurológie, virológie, biochémie a biofyziky Kalifornskej univerzity v San Franciscu, bol roku 1997 vyznamenaný Nobelovou cenou za medicínu.

Prióny sú agensy, ktoré na rozdiel od baktérií, húb, parazitov, vírusov a viroidov neobsahujú nukleové kyseliny, a preto nemajú schopnosť rozmnožovať sa spôsobom typickým pre mikroorganizmy alebo vírusy. Vyskytujú sa v normálnej (fyziologickej) alebo infekčnej (patologickej) forme. V normálnej (neinfekčnej) forme ich kódujú osobitné gény, ktoré sú prítomné v jadrových bunkách všetkých doteraz študovaných cicavcov vrátane človeka. Konštitutívne sa však exprimujú najmä v bunkách nervového systému (neurónoch). Ich fyziologická funkcia nie je známa. Po biosyntéze sa doteraz nie presne známym mechanizmom môžu niekedy zmeniť na patologickú formu, ktorá je infekčná a odolná proti pôsobeniu proteolytických enzýmov. Takáto forma sa preto nemôže v neurónoch fyziologicky degradovať, čo vedie k ich degenerácii až lýze prejavujúcej sa prenosnými (infekčnými) špongioformnými encefalopatiami — prionózami. Najznámejšou chorobou tohto typu u zvierat je klusavka (*scrapie*) oviec a kôz a boviná špongioformná encefalopatia (BSE). U človeka do tejto kategórie patrí kuru, Creutzfeldtova—Jakobova choroba (CJD), Gerstmannov—Sträusslerov—Scheinkerov syndróm (GSS) a fatálna familiárna insomnia (nespavosť — FFI) (Prusiner, 1991, 1996; Prusiner a Hsiao, 1994; Vrtiak a spol., 1997).

Priónové choroby kulminujú progresívnou a fatálnou degeneráciou CNS. Histopatologické zmeny, ktoré sa pri nich zisťujú, vyúsťujú do špongioformných zmien zapríčinených napučaním a vakuolizáciou degenerujúcich sa neurónov a v menšej miere astrocytov, proliferáciou a bunkovou hypertrofiou astroglie a premenlivým výskytom extracelulárnych amyloidových vlákien utvorených z nedegradovateľných priónov (VandenBerg, 1996).

Čo sú prióny?

Názov „prión“ zaviedol do odbornej literatúry Prusiner (1982) a snažil sa ním vyjadriť ich povahu — že sú to *proteínové infekčné častice*, čiže podstatne jednoduchšie agensy ako baktérie alebo

(BSE), Creutzfeldtova—Jakobova choroba (CJD), nový variant CJD, Gerstmanov—Sträusslerov—Scheinkerov syndróm (GSS), fatálna familiárna insomnia (FFI), kuru.

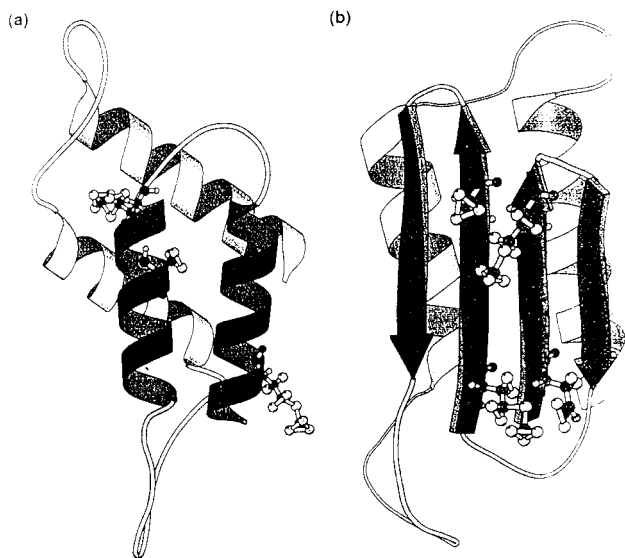
Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 8–9, s. 486–498

vírusy. Aj mechanizmus, ktorým vyvolávajú choroby — prenosné špongioformné encefalopatie (*transmissible spongiform encephalopathies* — TSE), je potom odlišný od patogenézy chorôb vyvolaných klasickými replikujúcimi sa agensmi obsahujúcimi DNA alebo RNA.

Priónovú časticu tvorí glykoproteín, ktorý okrem aminokyselín obsahuje aj premenlivé množstvo sacharidov. Gén pre priónový proteín (**PrP**) sa u človeka nachádza na krátkom ramene chromozómu 20 (Robakis a spol., 1986; Puskett a spol., 1991) a u myši na homológnom chromozóme 2 (Sparkes a spol., 1986). Gén pre ľudský PrP kóduje polypeptidový reťazec s 253 aminokyselinovými jednotkami, kým gény pre PrP myši a škrečkov kódujú proteíny obsahujúce 254 aminokyselín, gény oviec, kôz a hovädzieho dobytku proteíny s 256 aminokyselinovými jednotkami. Všetky tieto PrP majú až 90 % homológnosť v sekvencii aminokyselín. Väčšie rozdiely sú len v prípade PrP kurčiat, ktorý má 273 aminokyselín (Gabriel a spol., 1992). Gény človeka a ostatných cicavcov kódujú priónové proteíny s relatívnou molekulovou hmotnosťou 33—35 tisíc a označujú sa **PrP^C**. PrP^C je citlivý na pôsobenie proteolytických enzýmov, kým jeho časť (jadro) s relatívnou molekulovou hmotnosťou 27—30 tisíc je rezistentná a známe proteázy ju nedokážu degradovať. Toto proteolyticky rezistentné jadro sa označuje ako *špecifický chorobný proteín* — **PrP^{Sc}** (Oesch a spol., 1985; Meyer a spol., 1986).

Gén pre PrP^C v mozgu sýrskych škrečkov kóduje proteín obsahujúci 254 aminokyselinových jednotiek. Z nich sa počas posttranslačného opracovania odstráni prvých 22 aminokyselinových jednotiek z N-konca polypeptidového reťazca, ktoré predstavujú signálny peptid. V ďalšom priebehu sa pri jeho zakotvení do cytoplazmovej membrány neurónu prostredníctvom glykozylfosfatidylinozitolových proteínov proteolyticky odštiepi 23 aminokyselinových jednotiek z C-konca. Po infekcii škrečkov priónmi vyvolávajúcimi klusavku oviec sa z N-konca odštiepi ďalší peptid obsahujúci 67 aminokyselín. Tým sa pôvodný reťazec skráti a ostane proteolyticky rezistentné jadro skladajúce sa zo 142 aminokyselinových jednotiek — PrP^{Sc}.

Premena PrP^C na PrP^{Sc} je potom podstatou patogenézy prionóz. Vyplýva to zo skutočnosti, že všetky proteíny, ktoré sa tvoria v tele človeka a ostatných organizmov majú určitý čas existencie (životnosť). Po ich opotrebovaní sa proteolyticky rozložia na peptidy až jednotlivé aminokyseliny, ktoré sa využijú na tvorbu nových plne aktívnych proteínov. Ak sa tento biologický obrat poruší, začnú sa v bunkách hromadiť poškodené alebo nefunkčné proteíny — to je práve prípad PrP^{Sc}. Aj väčšina buniek má však svoj biologický obrat, počas ktorého staré bunky aj s prípadne nedegradovateľnými proteínmi zaniknú a nahradia ich nové bunky vzniknuté rozmnožením príslušných kmeňových buniek. Dôležitou výnimkou sú nervové bunky — neuróny, ktoré nemajú schopnosť sebaobnovy. Preto nemajú ani možnosť pri svojom rozmnožovaní zbaviť sa alebo aspoň „zriediť“ množstvo nedegradovateľných proteínov, ktoré sa v nich vytvorili. Tieto potom postupne zaplnia



Obr. 1. Priestorový model molekuly PrP^C (a) a PrP^{Sc} (b) (upravené podľa Prusiner, 1996). Alfa-helix znázorňuje špirálový útvar (molekula PrP^C ich má štyri, kým molekula PrP^{Sc} dva), beta-štruktúry sú znázornené širokými šípkami (v molekule PrP^{Sc} sú štyri).

Fig. 1. Plausible models for the tertiary structure of PrP^C (a) and PrP^{Sc} (b) (arranged according to Prusiner, 1996). α -helix is shown as a spiral structure (in the molecule of PrP^C there are four α -helices), β -sheet structures are shown as broad arrows (PrP^{Sc} contains four β -sheets).

vnútro neurónov, čím znemožnia vykonávanie ich normálnej fyziologickej funkcie. Prejaví sa to vakuolizáciou a spongiovým vzhľadom mozgu — typickým pre toto neurodegeneračné ochorenie. Ak takýmito nedegradovateľnými proteínmi v neurónoch sú prióny (PrP^{Sc}), hovoríme o **prionózach** (Prusiner a DeArmond, 1987), ak sú to *tau* proteíny, označujú sa ako **tauózy**, ktoré sa patogeneticky uplatňujú pri Alzheimerovej chorobe (Novák, 1997). PrP^C z jednotlivých živočíšnych druhov majú veľmi homológne (podobné) aminokyselinové zloženie. Napr. ovčí PrP^C sa od boviného PrP^C líši len v siedmych aminokyselinových jednotkách, kým ľudský PrP^C má v porovnaní s myšacím PrP^C rozdielne aminokyseliny na 28 pozíciách a v porovnaní s boviným má rozdiely na 30 pozíciách. Medzi PrP^C a jeho infekčným nedegradovateľným jadrom označovaným ako PrP^{Sc} sa v aminokyselinovom zložení nepozorovali žiadne rozdiely. Predpokladá sa, že segment obsahujúci aminokyseliny medzi pozíciami 81 až 231 je dostatočný pre vznik a rozmnožovanie PrP^{Sc} (Glockshuber a spol., 1997). Mechanizmus, ktorým sa PrP^C mení na PrP^{Sc} nie je zatiaľ známy. Teoreticky sú možné dva spôsoby: postupná konverzia PrP^C na PrP^{Sc} alebo jednoducho čiastočná (limitovaná) proteolytická degradácia PrP^C za vzniku PrP^{Sc}. Dokázalo sa, že ak sa do normálnej bunky dostane PrP^{Sc}, vyvolá premenu prítomného PrP^C alebo jeho prekursora na patologický PrP^{Sc} (Prusiner, 1991). To je podstata infekčnosti PrP^{Sc}.

Ani mechanizmus tejto premeny nie je zatiaľ známy. Preto sa intenzívne hľadajú rozdiely v štruktúre oboch **izoforiem** — PrP^C a PrP^{Sc}, ktoré by pomohli vysvetliť ich vznik a tým aj rôzne vlastnosti. Opakovane sa zistilo, že postupnosť (sekvencia) aminokyselín je v oboch proteínoch rovnaká, z čoho vyplýva, že za rôznu

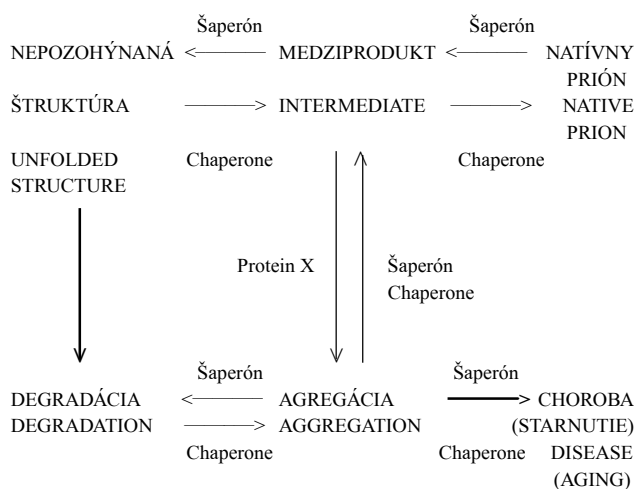
proteolytickú degradovateľnosť musia zodpovedať rozdiely v priestorovom usporiadaní ich reťazcov, čiže rôzne konformačné štruktúry. Na základe náročných fyzikálno-chemických analýz sa ukazuje, že izoforma PrP^C má polypeptidový reťazec priestorovo usporiadaný tak, že obsahuje 42 % α -helixu a len 3 % β -štruktúry. Naproti tomu až 43 % molekuly PrP^{Sc} má tvar skladaného listu (β -štruktúra) a 30 % tvar α -helixu (obr. 1) (Prusiner, 1996). Pri denaturácii PrP^{Sc} sa so znižovaním jeho infekčnosti znižovalo aj percento prítomnej β -štruktúry. To znamená, že na získanie odolnosti proti pôsobeniu proteolytických enzýmov sa musí zúčastňovať najmä β -štruktúra. Nedávna analýza pomocou nukleárnej magnetickej rezonančnej spektroskopie však ukázala, že C-koncová doména (aminokyseliny 121—231) priónového proteínu má inú trojrozmernú štruktúru, ako by vyplývala z tohto modelu (Glockshuber a spol., 1997).

Predpokladá sa, že po kontakte PrP^C a PrP^{Sc} vznikne nestabilný komplex, v ktorom PrP^{Sc} prinúti PrP^C uskutočniť také konformačné zmeny, ktoré zapríčinia, že komplex PrP^C-PrP^{Sc} sa rozpadne na dve molekuly PrP^{Sc}. Je to úplne nová cesta rozmnožovania infekčných častíc na úrovni modifikácie už hotových molekúl. Jej účinnosť je veľmi vysoká, keď si uvedomíme, že jedna infekčná molekula, ktorá sa dostane do neurónu, premení jeden normálny prión na infekčný patogénny prión, dva takto vzniknuté PrP^{Sc} dajú vznik štyrom, tie zase ôsmim atď.

Fenómén tejto samoreplikácie infekčných priónov sa snažia vysvetliť dve hypotézy (Masters a Beyreuther, 1997): Prvou je už spomenutý vznik nestabilného komplexu PrP^C-PrP^{Sc} a jeho následný rozpad na dve molekuly PrP^{Sc}. Uplatňuje sa pritom hypotetický proteín X, pravdepodobne vo funkcii šaperónu. Šaperóny (*chaperones*) sú proteíny, ktoré pomáhajú iným proteínom zaujať správnu (biologicky aktívnu konformáciu). Toxický účinok má potom buď vznikajúci PrP^{Sc} alebo metastabilný komplex PrP^C-X. Polymérizácia tohto komplexu môže vyústiť do tvorby amyloidových vlákien. To je *templátový* model. Podstatou druhej hypotézy je *nukleárny kryštalizačný* model. Predpokladá, že pri kontakte PrP^C a PrP^{Sc} vznikne samopliadiaci oligomérený komplex, ktorý prinúti aj ďalšie dvojice PrP^C vytvoriť takéto toxické diméry alebo agregáty (kryštalizačné jadrá) a súčasne poskytuje možnosť ich polymerácie za vzniku amyloidových vlákien (Caughey a spol., 1995). V oboch prípadoch sa prevažne α -helixová a na proteázy citlivá molekula PrP^C mení na formu s prevahou β -štruktúry a rezistenciou na proteolytickú degradáciu — PrP^{Sc}. Preto sa forma PrP^C novšie označuje aj PrP-sen (senzitívna na proteázy) a forma PrP^{Sc} ako PrP-res.

Takáto premena je spočiatku veľmi pomalá a jej rýchlosť sa zvyšuje až po mnohých rokoch. To je vysvetlením toho, že spontánne prionózy, ako napr. CJD, sa objavujú až v pokročilom veku. Na druhej strane konformačné zmeny medzi PrP^C a PrP^{Sc} sú termodynamicky regulované, a preto teoreticky reverzibilné (Aguzzi a Weissmann, 1997).

Nedávno sa ukázalo (Welch a Gambetti, 1998), že nielen pri prionózach, ale aj pri ďalších neurodegeneračných chorobách na patologickú zmenu priónového, prípadne iného proteínu, sa významným spôsobom zúčastňujú molekulové šaperóny (obr. 2). Šaperóny tu môžu pôsobiť na viacerých úrovniach. Môžu udržiavať rovnováhu medzi natívnym PrP, jeho intermediátom, ktorý ešte nemusí byť toxický a nepozohýbanou štruktúrou, ktorá nie je biologicky aktívna a ľahko podlieha proteolytickej degradácii. Iné typy šaperónov (substrátovo špecifické šaperóny) uľahčujú premenu



Obr. 2. Funkcia molekulových šaperónov pri premene priónového proteínu na agregovanú formu vyvolávajúcu neurodegeneračné ochorenie. Podobný mechanizmus sa pravdepodobne uplatňuje aj pri starnutí (upravené podľa Welcha a Gambettiho, 1998).

Fig. 2. The role of molecular chaperones in the transformation of prion protein to the aggregation form causing neurodegenerative disease. Similar mechanism is probably involved also in ageing (arranged according to Welch and Gambetti, 1998).

intermediátu na agregovanú, nerozpustnú a na proteázy rezistentnú formu. Takúto funkciu pri prionózach plní zatiaľ nie presne definovaný proteín X (obr. 2), pri tauózach, ktorých predstaviteľom je Alzheimerova choroba, takto pôsobí pravdepodobne apolipoproteín E a presenilíny.

Okrem toho premenu netoxického medziproduktu na toxické agregáty môže vyvolať aj chýbanie potrebného šaperónu. Premenu PrP-sen na PrP-res podmieňujú dve štruktúrne zmeny. Prvou je skrátenie molekuly PrP-sen (odštiepenie polypeptidového fragmentu z jeho molekuly) a druhou premena priestorového usporiadania zvyšku molekuly. To by mohlo poukazovať na možnosť, že odštiepený fragment má funkciu vnútromolekulového šaperónu, ktorý stabilizuje neinfekčnú a nepatogénnu konformáciu celej molekuly. Po jeho proteolytickom odštiepení sa zvyšok molekuly spontánne premení na PrP-res. Túto našu teóriu podporuje skutočnosť, že pri niektorých iných proteínoch sa existencia takéhoto odštiepiteľného vnútromolekulového šaperónu už dokázala (Shinde a Inouye, 1993, 1997).

Syntéza a infekčnosť priónov

Priónové proteíny sa syntetizujú ako normálne proteíny a patologickými sa stávajú až následkom potrasylačnej úpravy, ktorej podstatou je už spomenuté skrátenie polypeptidového reťazca a zmena jeho priestorového usporiadania (terciárnej štruktúry). Biosyntéza PrP^C je veľmi rýchla, kým akumulácia PrP^{Sc} v neurónoch je pomalý proces, a preto sa tento typ ochorenia dávnejšie označoval aj ako *pomalé infekcie vyvolané nekonvenčnými vírusmi*, pravda, dnes je jasné, že vírusy nie sú ich príčinou. Obe izoformy PrP prechádzajú cez Golgiho aparát, kde sa modifikujú ich oligosacharidové jednotky nadviazaním kyseliny sialovej

(Manuelidis a spol., 1985). PrP^C sa potom v sekrečných lyzozómoch transportuje do cytoplazmovej membrány, kde sa zakotví prostredníctvom glykozylfosfatidylinozitolových proteínov. Naproti tomu PrP^{Sc} sa ukladá do sekundárnych lyzozómov v cytoplazme neurónov. Pri potrasylačnej modifikácii sa k molekule priónových proteínov pridávajú najmä oligosacharidy viazané na asparagín. Tieto však pravdepodobne neovplyvňujú infekčnosť PrP^{Sc}, prispievajú však k ich konečnej relatívnej molekulovej hmotnosti.

Mnoho rokov sa experimentovalo najmä s priónmi vyvolávajúcimi klusavku oviec a kôz. Na tomto modeli sa zistilo, že inkubačná doba po experimentálnej infekcii bola 1–3 roky, pričom mnohé z infikovaných zvierat vôbec neochoreli. Z chorých zvierat sa izolovali prióny, ktoré sa mierne líšili svojimi vlastnosťami, najmä dĺžkou inkubačnej doby potrebnej na vyvolanie infekcie u ďalších zvierat. Z toho vyplynulo, že prióny vyvolávajúce určitú špongiformnú encefalopatiu nie sú zo všetkých izolátov identické. Ak sa rôznym kmeňom myši injikovali prióny vyvolávajúce klusavku oviec, zistilo sa, že existuje kmeň, ktorý má krátky inkubačný čas, ale aj kmeň, ktorý má dlhý inkubačný čas. Pri genetickej analýze sa dokázalo, že tieto rozdiely sú zapríčinené existenciou génov, ktoré určujú a modulujú inkubačné časy potrebné na vyvolanie tejto choroby (Carlson a spol., 1986). Gény pre priónové proteíny určujúce krátky a dlhý inkubačný čas sa líšili len v kódónoch určujúcich aminokyseliny na pozíciách 108 a 189 (Prusiner, 1991). Okrem genetickej vyvolanej rozdielov v dĺžke inkubačného času zo strany hostiteľa, rozdielny inkubačný čas môžu mať aj rôzne izoláty priónov od toho istého biologického druhu. Možno ich považovať za rôzne kmene (Prusiner, 1995), aj keď pojem kmeňov sa doteraz spájal len s tými infekčnými agensmi, ktoré obsahujú nukleové kyseliny (baktérie, vírusy).

Malé rozdiely vo vlastnostiach (najmä v dĺžke inkubačného času) môžu v prípade priónov vyplývať z rôznych konformačných štruktúr toho istého proteínu. Skutočnosť, že jeden proteín môže zaujať dve alebo viac priestorových štruktúr líšiacich sa svojimi biologickými vlastnosťami bola objavená len nedávno aj pri iných proteínových molekulách, ako sú prióny. Tým sa do nového svetla postavilo jedno zo základných pravidiel modernej biochémie, že totiž priestorová štruktúra proteínov určuje len sekvencia aminokyselín v polypeptidovom reťazci, čiže ich primárna štruktúra. Ukazuje sa, že okrem nej pri tomto deji spolupôsobia aj sprievodné proteíny — šaperóny.

Prióny a medzidruhovú bariéru

Pokusy s infikovaním myši a sýrskych škrečkov priónmi izolovanými z mozgu oviec ukázali, že pri týchto infekciách existuje medzidruhovú bariéru, ktorej prejavom bolo, že myši a škrečkovia sa nakazili len veľmi zriedkavo a inkubačný čas medzi aplikáciou infekčných priónov a začiatkom ochorenia bol dlhší ako vtedy, keď sa priónmi nakazil ten istý živočíšny druh (ovce). Ak sa potom prióny z mozgu chorých škrečkov inokulovali myšiam, inkubačný čas vzniku ochorenia bol dlhší ako po inokulácii zdravým škrečkom. Okrem toho prióny, ktoré sa novo syntetizovali po takejto infekcii, mali aminokyselinovú sekvenciu hostiteľského PrP^C a nie infikujúceho PrP^{Sc} nachádzajúceho sa v inokule. Napr. PrP^{Sc} z mozgu myši po inokulácii PrP^{Sc} škrečkov mali aminokyselinovú sekvenciu priónov myši a nie škrečkov. Pri ďalšej pasáži (infekcii)

Tab. 1. Špongiformné encefalopatie človeka a zvierat (upravené podľa Vrťiaka a spol., 1997).

Hostiteľ	Choroba	Rok zistenia	Poznámka
Človek	Creutzfeldtova-Jakobova choroba (CJD) — sporadická	1920/21	
	Gerstmannov-Sträusslerov-Scheinkerov syndróm (GSS)	1928	
	Kuru	1959	A
	Iatrogénna CJD	1985	B
	Familiárna CJD	1985	
	Smrteľná familiárna insomniá (nespavosť)	1986	
	Nový variant CJD	1995	D
	Nový variant CJD	1995	D
Ovca domáca, koza domáca	Klusavka (<i>scrapie</i>)	1738	
Norka farmová	Prenosná encefalopatia noriek	1947	C
Jeleník červený, los mokradový	<i>Chronic wasting disease</i> (chronické chudnutie)	1967	
		1979	
Hovädzí dobytok	Bovinná špongiformná encefalopatia (BSE)	1985	C
Antilopa nyala	Choroba podobná klusavke	1986	
Kudu veľký	Choroba podobná klusavke	1989	
Muflón	Klusavka muflónov obyčajný	1992	
Puma americká	Špongiformná encefalopatia púm	1992	
Mačka domáca	Felinná špongiformná encefalopatia	1993	C
Leopard	Špongiformná encefalopatia leopardov	1993	

A — vznikla ako dôsledok kanibalizmu.

B — následkom liečenia rastovým hormónom pripraveným z ľudských hypofýz kontaminovaných priónmi vyvolávajúcimi CJD.

C — prelomenie medzidruhovej bariéry po skrmovaní častí tiel zvierat postihnutých klusavkou.

D — dôsledok prelomenia medzidruhovej bariéry priónmi vyvolávajúcimi BSE.

na jedincoch toho istého živočíšneho druhu sa inkubačný čas paradoxne skrátil (Bockman a spol., 1987).

Predpokladalo sa, že nielen inkubačnú dobu, ale aj medzidruhovú bariéru určujú malé rozdiely v nukleotidovej sekvencii génov pre priónové proteíny. Za účelom overenia tejto hypotézy sa génovými manipuláciami pripravili transgénné zvieratá. Takými boli myši, ktorým sa implantoval gén kódujúci priónový proteín syrských škrečkov (HaPrP). Priónové proteíny myši a škrečkov sa líšia len v 16 aminokyselinových pozíciách. Ak sa myši s HaPrP génom infikovali priónmi z normálnych myši (mali len gén pre myšie prióny — MoPrP) predtým nakazenými priónmi klusavky oviec, inkubačný čas potrebný na vyvolanie ochorenia sa predĺžil asi na 500 dní v porovnaní

Tab. 1. Spongiform encephalopathies of humans and animals (arranged according to Vrťiak et al., 1997).

Species	Disease	Date of the first	Note report
Humans	Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)	1920/21	
	Gerstmann-Sträussler-Scheinker's syndrome (GSS)	1928	
	Kuru	1959	A
	Iatrogenic CJD	1985	B
	Familial CJD	1985	
	Fatal familial insomnia (FFI)	1986	
	New variant CJD (vCJD)	1995	D
Sheep, goat	Scrapie	about 1738	
Mink	Transmissible encephalopathy of mink	1947	C
Mule deer, elk	Chronic wasting disease	1967 1979	
Cattle	Bovine spongiform encephalopathy (BSE)	1985	C
Nyala	Scrapie-like disease	1986	
Greater kudu	Scrapie-like disease	1989	
Mouflon	Scrapie	1992	
Puma	Spongiform encephalopathy	1992	
Cat	Feline spongiform encephalopathy	1993	
Cheetah	Spongiform encephalopathy	1993	

A — It was originated as a consequence of cannibalism.

B — A consequence of treatment with the growth hormone isolated from human pituitaries contaminated with CJD prions (before recombinant growth hormone became available).

C — Disruption of species barrier after the feeding of food contaminated with scrapie prions

D — Disruption of species barrier by BSE prions

s infekciou normálnych myši (bez génu pre HaPrP), keď priemerný inkubačný čas bol asi 140 dní (Prusiner, 1991). Pri analýze mozgov z klinicky chorých transgénnych HaPrP myši sa zistilo, že myši inokulované infekčnými myšimi priónmi produkovali len myšie prióny, ale nie aj prióny škrečkov. Ak sa však myši inokulovali priónmi škrečkov, výsledkom bola len syntéza škrečkových priónových proteínov. Z toho vyplýva, že nová syntéza priónov u transgénnych myši (MoPrP/HaPrP) je druhovo špecifická a odráža genetický pôvod inokulovaných priónov.

Okrem transgénnych myši sa pripravili aj „knock-outované“ myši, ktorým chýbal priónový gén — myši Prnp^{0/0} (Büeler a spol., 1992). Tieto myši v priebehu dvoch rokov pozorovania nevykazovali žiadne fyziologické odchýlky okrem abnormálnych cirkadiálnych rytmov. Prnp^{0/0} myši sú však rezistentné proti infekcii priónmi klusavky a nemôžu sa v nich rozmnožovať ani injikované prióny myši (Sailer a spol., 1994; Prusiner, 1996).

Ďalšie pokusy s transgénymi myšami majúcimi implantovaný gén pre ľudský prión (HuPrP) ukázali, že ak sa týmto myšiam aplikovali prióny z mozgu ľudí zomretých následkom Creutzfeldtovej—Jakobovej choroby, degenerácia ich CNS sa nevyvinula rýchlejšie ako u pôvodného kmeňa myši bez tohto génu. Ak sa však pripravili transgénne myši exprimujúce chimérový „ľudsko-myšací“ prión (Hu/MoPrP), tieto boli na infekciu ľudskými priónmi citlivejšie a pozoroval sa u nich aj kratší inkubačný čas (Telling a spol., 1994). Príčinou je zrejme to, že ľudský PrP sa od myšieho PrP líši aminokyselinovými jednotkami na 28 pozíciách (z 254), kým chimérový Hu/MoPrP sa od ľudského líši len deviatimi aminokyselinami.

Keď sa myši bez priónového génu (Prnp^{0/0}), ktoré nie sú citlivé na ľudské prióny, skrížili s myšami majúcimi gén pre ľudský prión (HuPrP), vznikol kmeň citlivý na infekciu ľudskými priónmi (Telling a spol., 1995).

Prenosné špongiformné encefalopatie (TSE)

Sú to choroby, ktoré vyvolávajú prióny (Weissmann, 1996; Caughey a Chesebro, 1997). Názov je odvodený od morfológického vzhľadu poškodeného mozgu postihnutých jedincov. Ide o fatálne ochorenia spojené so stratou koordinácie pohybov, demenciou a neodvratným smrteľným koncom. Prvým známym takýmto ochorením bola klusavka (*scrapie*) oviec a kôz opísaná r. 1738, ale opis príznakov tejto choroby možno nájsť už v antickej literatúre (cit. Narang, 1996). Klusavka patrí medzi najrozšírenejšie TSE živočíchov. Okrem Austrálie a Nového Zélandu sa vyskytuje prakticky vo všetkých krajinách. Od r. 1947 je známa prenosná encefalopatia noriek, ktorá je prvým prípadom prekonania medzidruhovej bariéry. Vznikla skrmovaním krmiva pripraveného z oviec uhynutých na klusavku norkami domácimi. V súčasnosti sa najviac diskutuje o bovinej špongiformnej encefalopatii (BSE), ktorej prvé príznaky sa vyskytli v Anglicku r. 1985 a ktorá je ďalším príkladom prelomenia medzidruhovej bariéry, lebo príčinou jej vzniku bolo kŕmenie dobytku mäsovokostnou múčkou pripravenou zo zvierat uhynutých na klusavku (Dealer a Kent, 1995). Doteraz sa TSE zistila najmenej u 12 druhov prežúvavcov chovaných v zajatí alebo voľne žijúcich v prírode a u troch druhov mačkovitých šeliem (Vrtiak a spol., 1997). Prehľad niektorých z nich je v tabuľke 1.

Najstaršou známou prionózou postihujúcou človeka je **Creutzfeldtova—Jakobova choroba (CJD)**. Môže sa vyskytnúť v sporadickej, familiárnej alebo získanej (iatrogénnej) forme. Sporadickú formu opísal už r. 1920 Creutzfeldt a nasledujúci rok Jakob (1921) ako progresívnu demenciu. CJD je relatívne rozšírená (približne jeden prípad na milión obyvateľov), pričom existujú oblasti s jej vyšším výskytom ako je celosvetový priemer — aj u nás na Slovensku (Mitrová, 1991, 1997). Sporadická CJD postihuje ľudí najmä v 6. a 7. dekáde života. Neurologické príznaky trvajú niekoľko mesiacov až poldruha roka, u menšieho počtu pacientov však len niekoľko dní až týždňov. Prejavuje sa najmä stratou pamäti a u väčšiny pacientov aj motorickými abnormalitami (Richardson a Masters, 1995; VandenBerg, 1996).

Klatzo a spol. (1959) si všimli neuropatologické podobnosti medzi CJD a **kuru**, degeneračným mozgovým ochorením domorodcov (nazývali ho „smejúca sa smrť“) na Novej Guinei. Prenosnú povahu kuru neskôr dokázali Gibbs a Gajdusek (1969). Neuropatologické podobnosti sa zistili aj medzi kuru a klusavkou (Han-

dlow, 1959), čo viedlo k predstave, že kuru by sa mohla dať experimentálne preniesť na zvieratá po dostatočne dlhej inkubačnej dobe. Skutočne o pár rokov neskôr sa podarilo nakaziť šimpanzov tak kuru (Gajdusek a spol., 1966), ako aj Creutzfeldtovou—Jakobovou chorobou (Gibbs a spol., 1968).

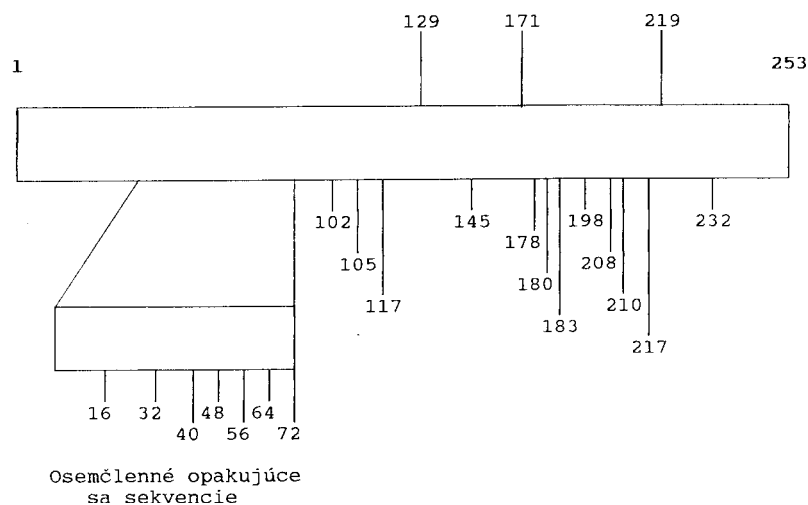
Príčinou vzniku kuru bol rituálny kanibalizmus domorodcov, ktorí jedli mozgy svojich zomretých príbuzných obsahujúce infekčné prióny. Podobne vzniklo niekoľko iatrogénnych prípadov CJD, a to po inokulácii priónov znečisťujúcich terapeuticky injikované preparáty ľudského rastového hormónu, ktoré sa používali v minulosti pred vyriešením jeho prípravy rekombinantnou technológiou (Gibbs a spol., 1985), ďalej po transplantácii priónmi kontaminovanej rohovky alebo implantovanej cerebrálnej elektróde (Prusiner a spol., 1987). V poslednom čase sa hovorí o novom variante CJD, ktorý sa pozoroval u podstatne mladších ľudí ako ostatné prípady spontánnej CJD a o ktorom sa s veľkou pravdepodobnosťou predpokladá, že je výsledkom prelomenia medzidruhovej bariéry po konzumácii mäsa a vnútornosti hovädzieho dobytku s BSE (Collinge a spol., 1996; Almond a Pattison, 1997; Hill a spol., 1997). Prehľad známych špongiformných encefalopatií človeka je v tabuľke 1.

Všetky známe prionózy postihujú CNS a majú množstvo rovnakých príznakov. Ich inkubačná doba po infekcii je medzi dvoma mesiacmi až tromi desiatkami rokov. Klinický priebeh choroby môže trvať od niekoľkých týždňov až po niekoľko rokov a vždy vedie k smrti postihnutého. Zdá sa, že všetky ľudské priónové choroby sú variantmi toho istého poškodenia (Prusiner a DeArmond, 1987, 1994). Choroba kuru, na ktorú zomrelo v minulosti okolo 3000 domorodcov, po zakázaní rituálneho kanibalizmu dnes už neexistuje.

Sú špongiformné encefalopatie dedičné?

Ukázalo sa, že Gerstmannov—Sträusslerov—Scheinkerov syndróm (GSS) a fatálna familiárna insomnia (nespavosť — FFI) sú geneticky podmienené ochorenia, pričom aj asi 10—15 % prípadov CJD má genetický základ. Tieto choroby sú spôsobené bodovými mutáciami v géne pre ľudský priónový proteín (obr. 3, tab. 2). Prírodné (divoké) gény pre ľudský priónový proteín majú 253 kodónov. Medzi kodónmi 51 až 91 sa vyskytuje 5 osemčlenných opakujúcich sa sekvencií kódujúcich oligopeptid bohatý na glycín: -Pro-(Gln/His)-Gly-Gly-Gly-(Gly/—)-Trp-Gly-Gln-. Mutácia kodónov na pozíciách 117 (Ala->Val), 129 (Met->Val), 171 (Asn->Ser) a 219 (Glu->Lys), ako aj delécia (vynechanie) jednej osemčlennej sekvencie zodpovedá za polymorfizmus (rozdiely medzi jednotlivými alelami) génu pre ľudský priónový proteín. Homozygotnosť pre metionín (Met) alebo valín (Val) v kodóne 129 zvyšuje citlivosť na vznik sporadickej aj dedičnej CJD.

Mutácie v kodónoch 102 (Pro->Leu), 117 (Ala->Val), 198 (Phe->Ser) a 217 (Glu->Arg) sa našli u pacientov s familiárnym **Gerstmannovým—Sträusslerovým—Scheinkerovým syndrómom**, pričom mutácia v kodóne 102 bola u členov všetkých desiatich testovaných rodín z deviatich rôznych krajín (Hsiao a spol., 1989). Neskôr sa u pacientov s GSS identifikovali ďalšie bodové mutácie v kodónoch 105 (Pro->Leu), 145 (Tyr->stop), 180 (Val->Ile) a 232 (Met->Arg) (Prusiner, 1996). Výskyt GSS je menší ako dva prípady na sto miliónov obyvateľov. Aj klinické príznaky sa mierne odlišujú od CJD. Klinický priebeh choroby je dlhší (až



Obr. 3. Gén pre ľudský priónový proteín (PRNP). Čísla označujú kodóny, v ktorých sa zistili bodové mutácie charakteristické pre polymorfizmus (hore) alebo pre dedičné priónové choroby (dolu) (upravené podľa Prusiner, 1996).
Fig. 3. Human prion protein gene (PRNP). Numbers indicate codons in which point mutations characteristic for polymorfism (above) or for hereditary prion diseases (below) were found out. (Arranged according to Prusiner, 1996).

Tab. 2. Mutácie génu pre priónový proteín vyvolávajúce ľudské priónózy.

Tab. 2. Prion protein gen mutations inducing human prionoses.

Choroba Disease	Kodón Codon	Mutačná zmena Mutation change
Familiárna Creutzfeldtova-Jakobova choroba Familial Creutzfeldt-Jakob disease	51-91	Vsunutie kodónov pre nadbytočné oktapeptidy Insertion of codons for extra octapeptide repeats
	178	Asp→Asn
	200	Glu→Lys
	208	Arg→His
	210	Val→Ile
Fatálna familiárna insomniia Fatal familial insomnia	178	Asp→Asn spolu s Met haplotypom v kodóne 129 Coupled to Met haplotype at codon 129
Gerstmannov-Sträusslerov-Scheinkerov syndróm	102	Pro→Leu
Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrom	105	Pro→Leu
	117	Ala→Val
	145	Tyr→stop
	180	Val→Ile
	198	Phe→Ser
	217	Glu→Arg
	232	Met→Arg

10 rokov). Vyúsťuje však tiež do demencie a pestrej motorickej dysfunkcie.

Histopatologický obraz je rôzny podľa bodovej mutácie u daného pacienta. Takmer vždy je prítomná priónová amyloidóza vo forme extracelulárnych plakov (Ghetti a spol., 1995; VandenBerg, 1996).

Patogenetickú úlohu týchto bodových mutácií potvrdzuje napr. aj skutočnosť, že u transgénnych myší s mutovaným génom GSS v kodóne 102 (Pro→Leu) sa spontánne vyvinie prenosné neurodegeneračné ochorenie bez inokulácie exogénnym PrP^{Sc}.

Bodové mutácie v kodónoch 178 (Asp→Asn), 200 (Glu→Lys), 208 (Arg→His) a 210 (Val→Ile) sú typické u pacientov s **familiárnou CJD**. Okrem toho s familiárnym výskytom CJD segregujú aj osemčlenné sekvencie bohaté na glycin. Normálne gény pre ľudský PrP^C kódujú päť kópií takýchto sekvencií, kým gény chorých na familiárnu CJD obsahujú navyše ďalšie 2–9 takýchto kópií, čiže kódujú 16–72 nadbytočných aminokyselinových jednotiek. Kodóny pre tieto nadbytočné osemčlenné sekvencie sú umiestené za kodónmi 67, 75 alebo 83 normálneho génu (obr. 3).

Fatálna familiárna insomniia sa geneticky viaže na mutáciu kodónu 178 (Asp→Asn), pričom sa zdá, že táto mutácia v prípade FFI je spojená s prítomnosťou Met v kodóne 129, kým pri familiárnej CJD kodón 129 kóduje Val (Goldfarb a spol., 1992). Pri FFI sa zisťuje degenerácia talamu s premenlivým postihnutím bazálnych ganglií a mnohopočetných kortikálnych štruktúr. To vedie k progresívnej nespavosti, hypertenzii, dysautónií, hyperadrenalizmu a motorickej dysfunkcii. Výsledkom je smrť v priebehu 1–3 rokov od objavenia sa klinických príznakov (Gambetti a spol., 1995; VandenBerg, 1996).

Tieto skutočnosti dokazujú, že okrem spontánneho vzniku môžu byť viaceré špongioformné encefalopatie podmienené aj geneticky. Ich príčinou sú určité bodové mutácie prejavujúce sa len veľmi malými zmenami v aminokyselinovej sekvencii prióno-

vých proteínov. Tieto malé zmeny však uľahčujú vznik proteolyticky rezistentných a preto patogénnych foriem.

Okrem toho sa zdá, že niektoré kodóny, osobitne kodón 129, majú v ľudskom priónovom géne kľúčový význam pre konverziu normálneho (neinfekčného) priónového proteínu na infekčný a proteolyticky rezistentný PrP^{Sc} (Palmer a spol., 1991; Raymond a spol., 1997).

Bovinná špongiiformná encefalopatia — masívne prelomenie medzidruhovej bariéry

Začiatkom roku 1986 sa vo Veľkej Británii epidemiologicky rozšírila predtým neznáma priónová choroba — boviná špongiiformná encefalopatia (BSE), ktorú najmä novinári označili ako „chorobu šíalených kráv“ (Wells a spol., 1987). Treba však povedať, že takto postihnutý hovädzí dobytok (HD) nie je v pravom zmysle slova šíalený. Choroba sa klinicky prejavuje najmä motorickou precitlivosťou na dotyk, svetlo a zvuk a vyúsťuje do uhybnutia postihnutého zvierata v priebehu niekoľkých týždňov až mesiacov. Kravu chorú na BSE, osobitne v začiatkových klinických štádiách, nie je pre neodborníka jednoduché na prvý pohľad rozpoznať od zdravej kravy. Možno tak zatiaľ bezpečne urobiť len po jej uhybnutí a vyšetrení mozgu. Názov „šíalený“ je prekladom anglického slova *mad*, ktoré však osobitne vo Veľkej Británii neznamena len „šíalený“, ale aj „krivajúci“. V mozgu postihnutých kráv sa zistila prítomnosť PrP rezistentného na proteolytické enzýmy (Hope a spol., 1988). Pri tejto masívnej epidémii uhynulo viac ako 160 000 kusov dobytka (Anderson a spol., 1996).

Dnes sa pokladá za dokázané, že za vznik epidémie BSE zodpovedá masívne prelomenie medzidruhovej bariéry, ktoré nastalo po skrmovaní mäsovokostnej múčky pripravovanej z kadaverov uhybnutých zvierat, vrátane oviec postihnutých klusavkou. Prispeli k tomu najmä tri skutočnosti. Prvou bolo zníženie teploty v deštruktoroch väčšiny anglických kafilérií, kde sa takáto mäsovokostná múčka vyrábala, čo viedlo k nedostatočnej dekontaminácii prítomných priónov schopných vyvolať TSE. Takáto zmena technológie bola výsledkom snahy o zlacnenie výroby. Druhým faktorom bola určitá obdoba kanibalizmu (aj keď v tomto prípade zvierat), ktorý sa uplatnil aj pri epidémii kuru na Novej Guinei, lebo mäsovokostná múčka, ktorou sa krmil dobytok, obsahovala aj materiál z uhybnutých kráv. Nezanedbateľný je aj tretí faktor, že PrP oviec sa od PrP hovädzieho dobytka líši len v siedmich aminokyselinových jednotkách, čiže je mu relatívne veľmi podobný.

Epidémia BSE vo Veľkej Británii vrcholila r. 1992, keď uhynulo asi 40 000 kusov HD. Odvtedy je na ústupe a r. 1995 uhynulo už len asi 15 000 kusov. Na druhej strane sa prípady BSE objavili v ďalších viac ako 10 štátoch Európy (napr. vo Švajčiarsku, Francúzsku, Holandsku, Španielsku, Nemecku) a nákaza podobná BSE sa sporadicky vyskytuje aj v Severnej Amerike (osobitne v USA). Toto bolo príčinou, že štáty Európskeho spoločenstva zakázali dovoz hovädzieho mäsa a živých zvierat z Veľkej Británie. Okrem biologického, epidemiologického a ekologického problému s touto epidémiou súvisia aj obrovské ekonomické straty, keď si uvedomíme, že vo Veľkej Británii sa chová asi 11 miliónov kusov HD, z ktorých neznáme, ale dosť vysoké percento je nakazené BSE. Táto choroba má inkubačnú dobu až 10 rokov a zatiaľ sa nedá zistiť pred vypuknutím klinických príznakov. Okrem toho sa dokázalo, že asi 10 % prípadov BSE vzniklo tak, že sa od chorej

matky nakazili už teľatá (Skegg, 1996). Ozdraviť chov HD vo Veľkej Británii sa dá pravdepodobne len usmrtením žijúcich zvierat. Čo však urobíš s mäsom, ako dekontaminovať pasienky, maštale a ostatné zariadenia? A hlavne: kto to zaplatí tisícom postihnutých farmárov?

Aká je situácia u nás? V SR sa zatiaľ nevyskytol žiadny prípad BSE a od 1. januára 1993 sa z Veľkej Británie nedováža živý HD, jeho mäso, iné výrobky, ani mäsovokostná múčka.

Vznik BSE súvisí s objavením sa nového kmeňa priónov, ktorý má v porovnaní s typickými ovčimi kmeňmi vyvolávajúcimi klusavku vyššiu patogenitu a virulenciu a je nákazlivý nielen pre myši, ovce a kozy (Fraser a spol., 1988; Foster a spol., 1993), ale aj pre také druhy živočíchov, na ktoré sa infekcia inými priónmi vyvolávajúcimi TSE nedarí preniesť, ako napr. na primátov (Lasmézas a spol., 1996). Prión BSE je uniformný (netvorí kmene ako prión klusavky) a okrem toho na rozdiel od priónov oviec, myši a škrečkov, ktoré infikujú iné živočíšne druhy podstatne ľahšie po intracerebrálnej ako po perorálnej inokulácii, prión BSE ľahko infikuje mačky a ďalšie zvieratá perorálne (Aguzzi, 1996).

Je nový variant CJD ľudskou BSE?

Úspešnosť prenosu BSE na primátov bola veľmi znepokojujúcou skutočnosťou, lebo poukázala na potenciálnu možnosť jej prenosu aj na človeka. Ďalším varovným signálom je skutočnosť, že medzidruhová bariéru neovplyvňujú rozdiely v aminokyselinovej sekvencii celých molekúl priónových proteínov, ale len v oblasti medzi aminokyselinovými pozíciami 96 a 167 a práve v tejto oblasti je väčšia podobnosť medzi boviným a ľudským PrP ako medzi boviným a ovčím PrP (Kraakauer a spol., 1996). To by teoreticky mohlo nasvedčovať, že prelomenie bariéry medzi HD a človekom môže byť ľahšie ako medzi ovcou a HD, a to i napriek tomu, že celkový počet rozdielnych aminokyselín medzi priónmi oviec a HD je len 7 a medzi priónmi HD a človeka až 30 (Prusiner, 1996).

Doslova poplach vyvolalo oznámenie britského ministra zdravotníctva r. 1996, že vo Veľkej Británii sa diagnostikovalo 10 prípadov **nového variantu Creutzfeldtovej—Jakobovej choroby (vCJD)**, ktoré by mohli byť v príčinnom vzťahu s epidémiou BSE (Will a spol., 1996; Collinge a spol., 1996). V súčasnosti je takýchto prípadov už viac ako 20 a ďalší sa diagnostikoval vo Francúzsku, kde sa vo veľkom množstve dovážal živý HD a jeho mäso z Veľkej Británie (Skeg, 1997). CJD sa od vCJD líši klinickým obrazom aj mozgovou patológiou (tab. 3). Nový variant CJD postihuje mladšie osoby ako ostatné typy CJD a patologický obraz mozgu, ktorý pri ňom vzniká, je podobný tomu, ktorý sa pozoruje po prenose BSE na myši, domáce mačky a opice (Collinge a spol., 1996). Opäť veľmi znepokojujúcim je zistenie, že patológia mozgu pacientov s vCJD je rovnaká ako patológia mozgu makakov nakazených priónmi BSE. Naproti tomu, ak sa makakovia nakazili mozgovým extraktom pacientov so sporadickou formou CJD, patologický obraz bol iný a totožný s obrazom typickým pre sporadickú formu CJD (Aguzzi, 1996).

Najnovšie molekulové analýzy, pokusné infekcie experimentálnych zvierat a histopatologický obraz CNS postihnutých jedincov dokázali, že priónový kmeň vyvolávajúci vCJD je totožný s kmeňom, ktorý vyvoláva BSE (Hill a spol., 1997; Raymond a spol., 1997; Bruce a spol., 1997). To znamená, že vCJD je vlastne ľudskou BSE (Almond a Pattison, 1997). Ide teda o ďalšie pre-

Tab. 3. Niektoré rozdiely medzi sporadickou formou CJD a novým variantom CJD (upravené podľa Aguzziho a Weissmanna, 1996). Tab. 3. Differences between sporadic and new variant CJD (arranged according to Aguzzi and Weissmann, 1996).

Ukazovateľ Indicator	Sporadická CJD Sporadic CJD	Nový variant CJD New variant CJD
Typický vek začiatku ochorenia Typical age of disease onset	55-70 r.	19-39 r.
Typické klinické príznaky Typical clinical symptoms	Demencia, myoklonia Dementia, myoclonus	Zmeny v správaní, ataxia, porucha citlivosti Behavioural changes, ataxia, dysaesthesia
Klinický priebeh Clinical course	Rýchlo progredujúci Rapidly progressive	Pomalý začiatok, predĺžený priebeh Insidious onset, Prolonged course
Genotyp PrP (kodón 129) PrP genotype (codon 129)	Väčšinou homozygotný Predominantly homozygous	Met/Met homozygotnosť všetkých doterajších prípadov Met/Met homozygosity in 100 % so far
PrP ^{Sc} depozity v CNS PrP ^{Sc} deposits in CNS	Synapsie, vzácné tvorba plakov Synaptic deposits, rarely plaques	Množstvo načervenalých plakov Prominent florid plaques

lomenie medzidruhovej bariéry — teraz medzi hovädzím dobytkom a človekom. Toto zistenie je neobyčajne dôležité z epidemiologického hľadiska, aj keď na vyslovenie kvalifikovanej prognózy nie je ešte dost podkladov.

Dealer a Kempt (1995) uvádzajú, že po roku 1983 asi 1,8 milióna kusov hovädzieho dobytká nakazeného BSE mohlo vstúpiť do potravinového reťazca len obyvateľov vo Veľkej Británii. Anderson a spol. (1996) odhadujú tento počet asi na 800 000 kusov. Počet ľudí, ktorí mohli byť teoreticky exponovaní príónu BSE, sa odhaduje na 34 miliónov. Títo všetci dostali dávku asi 1000 IU (IU = inokulačná jednotka, ktorú predstavuje také množstvo príónov BSE, ktorým možno vyvolať ochorenie jednej myši po intracerebrálnej aplikácii). Dávku 10⁴ IU mohlo dostať 0,4 milióna obyvateľov a dávku 10⁶, čiže takú, ktorá je schopná nakaziť jeden milión myší, ešte asi 0,14 milióna ľudí. Dá sa predpokladať, že to záležalo najmä od množstva hamburgerov a iných foriem hovädzieho mäsa, ktoré v danom období zjedli, hoci ani iný spôsob nákazy sa nedá vylúčiť.

Je pritom veľmi pravdepodobné, že nie všetky časti zvierat sú rovnako infekčné. Infekčnosť jednotlivých tkanív a orgánov je zatiaľ dobre známa u oviec postihnutých klusavkou. Vzhľadom na infekčnosť sa v tomto prípade rozoznávajú štyri kategórie. Do prvej s vysokou infekčnosťou patrí mozog, miecha a oči; v druhej a tretej so strednou a nízkou infekčnosťou sú zaradené niektoré

vnútorné orgány, vrátane čriev, sleziny a pečene; vo štvrtjej kategórii je kostrové svalstvo, mlieko, krvná zrazenina, srdce, obličky a niektoré ďalšie tkanivá, pri ktorých sa zatiaľ experimentálne nedokázala infekčnosť pre iný živočíšny druh (Vrtiak a spol., 1997). Pravda, infekčnosť pre človeka možno len odhadovať, rovnako ako jej rozdiel pri intracerebrálnej a perorálnej aplikácii.

Sledovanie výskytu CJD, ktoré sa vo Veľkej Británii po vzniku BSE povinne zaviedlo, ukázalo, že kým r. 1980 sa zistilo 30 prípadov CJD (incidencia 0,5 prípadu na milión obyvateľov), r. 1994 to už bolo 54 prípadov (incidencia 0,94). Výskyt CJD u ľudí mladších ako 40 rokov má celosvetový priemer 1:20 miliónom. Keď sa v rokoch 1995 a 1996 objavilo 14 takýchto prípadov len vo Veľkej Británii, niet divu, že to vyvolalo nemalú pozornosť nielen odborníkov, ale aj svetových masmédií (Dealer a Kent, 1995; Vrtiak a spol., 1997).

Napriek pomerne presvedčivým dôkazom, že príčinným agensom BSE aj vCJD je ten istý príónový kmeň, nedá sa predvídať počet nových prípadov vCJD, ktoré sa v budúcnosti vyskytnú vo Veľkej Británii, prípadne inde. Rýchlosť vzniku nových prípadov vCJD sa nezvyšuje (zatiaľ asi 10 ročne), čo poskytuje určitú nádej, že vCJD ostane relatívne ojedinelou chorobou a nerozšíri sa do masívnej epidémie. To sa však môže potvrdiť alebo vyvrátiť až o niekoľko rokov. Bude to závisieť najmä od priemerného inkubačného času vCJD, ktorý zatiaľ nie je známy. Odhaduje sa však na roky až desaťročia. Čím však bude dlhší, tým väčší bude počet postihnutých (Skegg, 1997).

Významnú úlohu môže mať aj to, že všetky doteraz diagnostikované prípady vCJD boli homozygoti v kodóne 129. To znamená, že obidve alely ich príónového génu kódovali v tomto kodóne metionín. Toto by mohlo nasvedčovať, že homozygoti, ktorí majú v tomto mieste kodóny pre valín (11 % obyvateľov Veľkej Británie), alebo heterozygoti s kodónmi pre metionín a valín (51 % obyvateľov Veľkej Británie) sú na infekciu príónmi BSE relatívne rezistentní, môžu mať dlhší inkubačný čas, alebo odlišné symptómy. Na poslednú možnosť môže poukazovať zistenie Samaiaovej a spol. (1997), ktorí analyzovali 17 členov jednej rodiny a u 9 z nich diagnostikovali schizofréniu alebo psychiatrické ochorenie podobné schizofréni. Všetci postihnutí mali mutáciu v 171. kodóne príónového proteínu, ktorá vyústila do výmeny asparagínu za serín na rovnakej pozícii príónového proteínu. Okrem toho boli všetci homozygoti v kodóne 129, ktorý v oboch alelách kódoval valín! V každom prípade sa zdá, že pri vzniku vCJD okrem infekčného príónu BSE spolupôsobí aj genetická predispozícia jedinca. Potvrdzujú to aj experimenty uskutočnené *in vitro*, v ktorých sa dokázalo, že keď sa inkuboval izolovaný ľudský PrP^C obsahujúci v pozícii 129 metionín s izolovaným príónom BSE (PrP^{BSE}), vznikli patologické príóny PrP^{vCJD} trikrát častejšie ako v prípade ľudského PrP^C obsahujúceho v tejto pozícii valín (Raymond a spol., 1997).

Treba však povedať, že spôsob akým sa postihnutí jedinca infikovali príónmi BSE nie je známy. Možno len predpokladať, že to bolo následkom konzumu kontaminovaného hovädzieho mäsa alebo jeho produktov. Nemožno však vylúčiť ani iné cesty infekcie, ako napr. prenos príónov BSE na ľudí prostredníctvom medzičlánku reprezentovaného iným biologickým druhom. Nedávno sa vo Veľkej Británii diagnostikoval vCJD u jedenáastročného vegetariána. Aj keď je možné, že predtým, ako sa stal vegetariánom, konzumoval potraviny z hovädzieho mäsa, môže to poukazovať na zlo-

žitosť prenosu infekčného agensu BSE a vCJD (Almond a Pattison, 1997).

Na možnosť prenosu priónu BSE na človeka prostredníctvom takéhoto medzičlánku poukazujú niektoré najnovšie experimentálne výsledky. Zistilo sa, že BSE po intracerebrálnej alebo perorálnej aplikácii sa dá preniesť na myši, ovce, kozy, ošípané, domáce mačky, norky a množstvo exotických zvierat, ale nie na škrečkov a kurčatá. Ak sa však po inokulácii škrečkov alebo kurčiat PrP^{BSE} nevyskytnú klinické príznaky TSE, neznamená to, že pre iný biologický druh potenciálne infekčné prióny nemôžu v mozgoch týchto rezistentných zvierat perzistovať (Aguzzi a Weissmann, 1998). Elegantným pokusom to dokázali Race a Chesebro (1998), ktorí vopred infikovali škrečkov priónmi klusavky, a potom tieto „škrečkové“ prióny klusavky injikovali myšiam kmeňa rezistentného proti priónovej infekcii (nemajú gén pre vlastný priónový proteín). To znamená, že u týchto myši sa žiadne klinické príznaky neobjavili. Ak sa však myši po 204—782 dňoch (hranica ich životnosti) usmrtili, ich mozgy obsahovali ešte stále infekčné prióny klusavky pre škrečkov, ale nie pre myši. Napriek tomu, že prenos BSE z takéhoto rezistentného druhu (napr. hydiny) na citlivý druh (napr. človeka) sa zatiaľ nedokázal, treba uvažovať so zákazom skrmovania mäsovokostných múčok a iných produktov pripravených z prežúvavcov iným druhom zvierat, osobitne tým, ktoré sú súčasťou potravinového reťazca človeka, a to bez ohľadu na to, či sú na infekciu priónmi BSE citlivé alebo rezistentné.

Prečo nás pred priónovou infekciou nechráni imunitný systém?

Odpoveď na túto otázku zatiaľ nikto presne nepozná. V jej pozadí však môže byť to, že aminokyselinové zloženie priónových proteínov z rôznych živočíšnych druhov je veľmi podobné. Imunitný systém človeka sa naučil vlastný priónový proteín tolerovať (nerozpoznáva ho ako cudzí antigén). Ak preto príde do kontaktu s cudzím, ale veľmi podobným PrP (odlišujúcim sa len v niekoľkých aminokyselinových jednotkách), tiež ho nevie rozpoznať ako cudzí a navodí proti nemu imunitnú odpoveď. Ešte jednoznačnejšia je odpoveď v prípade patologicky zmeneného (odolného proti proteolytickým enzýmom) vlastného PrP. Vieme, že v tomto prípade ide len o konformačnú (priestorovú) zmenu molekuly, ktorej výsledkom nemusí byť vznik nového epitopu (miesta v molekule antigénu, ktoré imunitný systém špecificky rozpoznáva). Následkom toho imunitný systém nie je schopný takúto zmenu rozpoznať. Konečne hlavným dôvodom je zrejme skutočnosť, že patogénny PrP^{Sc} je rezistentný na proteolýzu, a preto aj po jeho prípadnom pohltení makrofágmami alebo inými bunkami prezentujúcimi antigén nemôžu z neho vzniknúť imunogénne fragmenty, ktoré sú nevyhnutné na zahájenie špecifickej imunitnej odpovede tak protilátkového, ako aj bunkového typu. Podobne ani bunky infikované PrP^{Sc} ho nedokážu bez proteolytickej fragmentácie prezentovať cytotoxickým T-lymfocytom.

Ďalšou príčinou neprítomnosti imunitnej odpovede pri priónózach môže byť neschopnosť patologicky zmenených priónov navodiť u hostiteľa tvorbu mediátorov spúšťajúcich zápalovú reakciu, ako sú rôzne cytokíny (faktor nekrotizujúci nádory — TNF- α , interleukín-1 — IL-1, IL-6), chemotaktické faktory (fragment aktívovaného komplementu C5a, IL-8), ani zvýšenie expresie adhezívnych molekúl na leukocytoch a endotelových bunkách a pod. (Mitrová, 1997; Ferenčík a spol., 1997). To vysvetľuje aj

známu skutočnosť, že pri TSE sa nepozoruje infiltrácia tkaniva leukocyty.

S neschopnosťou imunitného systému navodiť odpoveď proti priónom súvisia aj značné problémy s **včasnou diagnostikou** prenosných spongiformných encefalopatií. V súčasnosti sa pomocou gémovej analýzy dajú diagnostikovať len tie TSE, ktoré sú asociované s mutáciou priónového génu. Diagnóza ostatných sa môže potvrdiť až histopatologickým vyšetrením mozgu postihnutých jedincov.

Zlepšiť diagnostiku by určite pomohli špecifické protilátky. Ich príprava, vzhľadom na neodpovedavosť imunitného systému, je však veľmi obťažná. Zatiaľ boli pripravené monoklonové protilátky proti priónovým proteínom niekoľkých biologických druhov (Kascsak a spol., 1987; Barry a spol., 1988), ale žiadna z nich nie je špecifická proti ľudskému PrP, pričom užitočná by bola osobitne taká protilátka, ktorá by dokázala rozlíšiť jeho patologickú formu od normálnej formy. Okrem toho pripravené protilátky krížovo reagujú s priónovými proteínmi viacerých druhov, čo veľmi obmedzuje ich špecifickosť. Groschup a spol. (1997) pripravili syntetické peptidy z rôznych úsekov priónových proteínov viacerých druhov cicavcov a tieto použili na prípravu protilátok. Tieto protilátky rozpoznávali jednotlivé epitopy (na molekule PrP^C oviec ich bolo celkovo 16), ale opäť žiadny epitop nebol typický pre normálny ani patologický fenotyp priónového proteínu.

Prvá protilátka proti ľudskému PrP bola pripravená len nedávno (Kraseman a spol., 1996), a to pomocou úplne novej stratégie, pri ktorej sa na imunizáciu namiesto ľudského priónového proteínu použil jeho gén (príslušný úsek DNA), ktorým sa imunizovali myši kmeňa PrP^{0/0}, čiže tie, ktoré nemajú vlastný gén pre PrP. V tomto prípade bola imunizácia úspešná a získali sa myšie protilátky proti rôznym epitopom ľudského PrP. Ak sa však takto imunizovali normálne myši, žiadne protilátky nevznikli. Dá sa predpokladať, že touto cestou by sa v budúcnosti mohli dať pripraviť monoklonové protilátky špecificky rozpoznávajúce len patologický ľudský PrP, čo by bolo veľmi významné pre včasnú diagnostiku spongiformných encefalopatií.

Zdá sa však, že imunitný systém sa pri TSE predsa len angažuje, ale v negatívnom zmysle. Ukázalo sa totiž, že priónový proteín vyvolávajúci vCJD sa nachádza nielen v neurónoch, ale aj v periférnych tkanivách, ako je slezina, lymfatické uzliny a tonzily. Dokázala sa jeho replikácia v slezine. Predpokladá sa preto, že slezina, prípadne iný lymfoidný orgán, je primárnym miestom, kde sa začína priónová infekcia. Na vznik TSE u myši po ich infekcii priónmi klusavky je nevyhnutne potrebná prítomnosť B-lymfocytov alebo folikulových dendritových buniek. SCID myši s defektnou funkciou lymfocytov T a B sú rezistentné na infekciu priónmi klusavky (Mabbott a spol., Immunol. Today, 19, 1998, s. 201—203). To naznačuje, že imunitný systém namiesto obrannej funkcie by pri priónózach mohol pôsobiť opačne — jeho bunky by boli primárnymi účastníkmi vzniku infekcie a následných neurodegeneračných zmien.

Záver a ďalšie perspektívy

Uvedené skutočnosti jednoznačne dokazujú, že okrem tradičných infekčných agensov, ako sú viroidy, vírusy, baktérie, patogénne huby, prvoky a viacbunkové parazity, existujú ďalšie, ktoré vznikajú modifikáciou už existujúcich molekúl proteínov — prió-

Tab. 4. Neurodegeneračné choroby s účasťou nerozpustných proteínových agregátov (upravené podľa Welcha a Gambettiho, 1998).
Tab. 4. Aggregate-forming and insoluble proteins as a cause of neurodegenerative diseases (arranged according to Welch and Gambetti, 1998).

Choroba Disease	Proteín Protein	Agregát Aggregate	Lokalizácia Location
Prionózy Prionoses	Prión Prion	β-štruktúra rezistentná na proteázy β-pleated protease resistant	Extracelulárna Extracellular
Alzheimerova Alzheimer's	β-amyloid Amyloid-β Protein tau	β-štruktúra β-pleated Neurofibrilárne klbká rezistentné na proteázy Neurofibrillary tangles, protease resistant	Extracelulárna Extracellular Intracelulárna Intracellular
Parkinsonova Parkinson's	α-synukleín α-synuclein	β-štruktúra? Lewyho telieska nerozpustné	Cytoplazma Cytoplasmic
Huntingtonova Huntington's	Huntingtín Huntingtin	β-štruktúra? nerozpustná β-pleated? insoluble	Jadro, cytoplazma? Nuclear, cytoplasmic?
Spinocerebe- lárna ataxia 1 a 3 Spinocerebe- llar ataxia 1 and 3	Ataxín 1 a 3 Ataxin 1 and 3	β-štruktúra? nerozpustná β-pleated insoluble	Jadro Nuclear

ny. Sú príčinou najmä viacerých neurodegeneračných chorôb človeka a zvierat označovaných ako prenosné špongiformné encefalopatie (*TSE -- transmissible spongiform encephalopathies*). Týmto sa otvára nová oblasť pre pochopenie príčiny vzniku chorôb a možností ich prevencie a terapie.

To navodzuje množstvo otázok, na ktoré súčasná veda a medicína intenzívne hľadá odpoveď. Na záver aspoň štyri z nich:

1. Dá sa predpokladať, že prióny sú netradičné, ale pritom ojedinelé infekčné častice, ktoré vyvolávajú len uvedené špongiformné encefalopatie? Pravdepodobne nie, lebo okrem priónov sú známe aj ďalšie proteolyticky rezistentné patologické molekuly proteínovej povahy (tab. 4). Medzi najviac študované patrí β-amyloid a najmä **tau proteín**, ktorý je s veľkou pravdepodobnosťou príčinným patologickým agensom *Alzheimerovej choroby*. Táto choroba je v USA a mnohých krajinách západnej Európy 4. až 5. najčastejšou príčinou smrti — po kardiovaskulárnych chorobách,

zhubných nádoroch, otravách a úmrtiach po dopravných nehodách (Novák, 1997). Pravdou však je, že infekčný prenos patologicky modifikovaného tau proteínu sa zatiaľ nedokázal, ale schopnosť jeho samomontáže do proteolyticky rezistentných a neurotoxických párových špirálových vlákien áno. Je však celkom možné, že iné proteíny s mechanizmom účinku podobným priónom alebo tau proteínom by sa mohli významným spôsobom zúčastňovať na patogenéze aj na ďalších neurodegeneračných chorobách, ako je napríklad Parkinsonova choroba (takéto vlastnosti má α-synukleín), Huntingtonova choroba (huntingtín), spinocerebelárna ataxia 1 a 3 (ataxín 1 a 3) a amyotrofická laterálna skleróza. Aj keď intenzívny výskum v tejto oblasti sa očakáva len v najbližšej budúcnosti, už dnes je veľmi pravdepodobné, že všetky tieto abnormálne proteíny majú jednu spoločnú vlastnosť a tou je ich rezistencia proti proteolytickej degradácii a z toho vyplývajúca schopnosť tvoriť nerozpustné agregáty. U väčšiny z nich je to spojené so zmenou konformačnej štruktúry, v ktorej namiesto α-helixu prevláda štruktúra skladaného listu (β-štruktúra).

2. Vyskytujú sa prióny len u cicavcov? Odpoveď je: pravdepodobne nie. Napriek tomu, že ich normálna fyziologická funkcia nie je známa, existujú už experimentálne doklady o tom, že proteíny s podobnými vlastnosťami sa nachádzajú u vtákov a dokonca aj u nižších organizmov, ako sú kvasinky (Prusiner, 1995, 1996).

3. Odrazia sa doterajšie poznatky o prionózach a možných cestách prenosu ich infekčných agensov — priónov v zmenách predpisov a opatrení pri výrobe a kontrole potravín pre človeka a krmív pre hospodárske zvieratá? Odpoveď by mala byť: jednoznačne áno. Viaceré z týchto opatrení sa už realizovali aj u nás.

4. Môže existencia priónov zmeniť naše základné názory na vznik života na Zemi? Aj keď je to hypotetická otázka, možno na ňu odpovedať, že pravdepodobne áno. Na vznik života v tej forme, ako ho poznáme na Zemi, sú nevyhnutne potrebné najmä štyri základné funkcie: 1. Schopnosť replikácie molekúl nesúcich genetický kód, a tým udržiavanie genetickej informácie jedinca i biologického druhu. To zabezpečujú molekuly deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) a pri niektorých vírusoch aj ribonukleovej kyseliny (RNA). 2. Schopnosť katalyticky urýchľovať priebeh biochemických reakcií v určitom systéme, aby sa zabezpečila replikácia molekúl DNA a RNA. Za to zodpovedajú proteíny s enzýmovou funkciou. 3. Existencia molekúl s makroergickými chemickými väzbami, ktoré poskytujú energiu využiteľnú na poháňanie biochemických reakcií v rámci každej bunky, ktorá je najmenšou jednotkou samostatného života. 4. Existencia biologických membrán, ktoré selektívne regulujú prestup živín a iných látok do vnútra a von z bunky. Túto funkciu zabezpečujú najmä fosfolipidy. Dlhú dobu sa myslelo, že prvé dve funkcie boli rozdelené medzi nukleové kyseliny a proteíny. Pred dvoma desiatkami rokov sa ukázalo, že aj niektoré RNA môžu pôsobiť ako enzýmy, čiže môžu mať katalytickú funkciu. Teraz sa zdá, že prióny, typické proteíny, by mohli mať samoreplikačnú funkciu. To poukazuje na možnosť, že život sa na Zemi mohol začať vyvíjať, v dvoch základných molekulových formách. Jedna z nich spočívala na ribonukleových kyselinách, ktoré spočiatku zabezpečovali replikačnú aj katalytickú funkciu. Základom druhej boli proteíny, ktoré tiež mohli byť schopné v dávnych dobách zabezpečiť obe funkcie. Až spojením oboch foriem však vznikol systém, ktorý viedol k utvoreniu funkčných prvotných buniek až dnešných organizmov. Podľa tejto hypotézy by potom prionózy boli vlastne akýmsi reliktom jednej z prvotných funkcií proteínov.

Literatúra

1. **Aguzzi A.**: Between cows and monkeys. *Nature*, 381, 1996, s. 734—735.
2. **Aguzzi A., Weissmann C.**: A suspicious signature. *Nature*, 383, 1996, s. 666—670.
3. **Aguzzi A., Weissmann C.**: Prion research: the next frontiers. *Nature*, 389, 1997, s. 795—798.
4. **Aguzzi A., Weissmann C.**: The prion's perplexing persistence. *Nature*, 392, 1998, s. 763—764.
5. **Almond J., Pattison J.**: Human BSE. *Nature*, 389, 1997, s. 437—438.
6. **Anderson R.M., Donnelly C.A., Ferguson N.M., Woolhouse M.E.J., Watt H.J., Udy H.J. a spol.**: Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, 382, 1996, s. 779—788.
7. **Barry R.A., Vincent M.T., Kent S.B.H., Hood L.E., Prusiner S.B.**: Characterization of prion proteins with monospecific antisera to synthetic peptides. *J. Immunol.*, 140, 1988, s. 1188—1193.
8. **Berg J.L.**: Insight into the role of the immune system in prion diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1994, s. 429—432.
9. **Bockman J.M., Prusiner S.B., Tateishi J., Kingsbury D.T.**: Immunoblotting of Creutzfeldt—Jakob disease prion proteins: host species—specific epitopes. *Ann. Neurol.*, 21, 1987, s. 589—595.
10. **Bruce M.E., Will R.G., Ironside J.W., McConnell I., Drummond D., Suttle A., McCardle L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H., Bostock C.J.**: Transmissions to mice indicate that „new variant“ CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389, 1997, s. 448—501.
11. **Büeler H., Fischer M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H.P., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Aquet M., Weissmann C.**: Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, 356, 1992, s. 577—582.
12. **Carlson G.A., Kingsbury D.T., Goodman P.A., Coleman S. Marschall S.T. DeArmond S. Westaway D., Prusiner S.B.**: Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell*, 46, 1986, s. 503—511.
13. **Caufhey B., Chesebro B.**: Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathies. *Trends Cell Biol.*, 7, 1997, s. 56—62.
14. **Caughy B., Kocisko D.A., Raymond G.J., Lansbury P.T.**: Aggregates of scrapie associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem. Biol.*, 2, 1995, s. 807—817.
15. **Collinge J., Sidle K.C.L., Meads J., Ironside J., Hill A.F.**: Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of „new variant“ CJD. *Nature*, 383, 1996, s. 685—690.
16. **Creutzfeldt H.G.**: Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.*, 57, 1920, s. 1—8.
17. **Dealer S.F., Kemt T.J.**: BSE an update on the statistical evidence. *Brit. Food J.*, 97, 1995, s. 3—19.
18. **Ferenčík M., Štvrtinová V., Bernadič M., Jakubovský J., Hulín I.**: Zápal — horúčka — bolesť. Bratislava, Slovart GTG — SAP 1997, 215 s.
19. **Foster J.D., Hope J., Fraser H.**: Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet. Rec.*, 133, 1993, s. 339—341.
20. **Fraser H., McConnell I., Wells G.A.H., Dawson M.**: Transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *Vet. Rec.*, 123, 1988, s. 472.
21. **Gabriel J.-M., Oesch B.B., Kreutzchmar H., Scott M., Prusiner S.B.**: Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, s. 9097—9101.
22. **Gajdusek D.C., Gibbs J.C.Jr., Alpers M.**: Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzee. *Nature*, 209, 1966, s. 794—796.
23. **Gambetti P., Parchi P., Peterson R.B., Chen S. G. Lugaresi E.**: Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt—Jakob disease: Clinical, pathological and molecular features. *Brain Pathol.*, 5, 1995, s. 43—51.
24. **Ghetti B., Dlouhy S.R., Giaccone G., Bugiani O., Frangione B., Farlow M.R., Tagliavini F.**: Gerstmann—Sträussler—Scheinker disease and the Indiana kindred. *Brain Pathol.*, 5, 1995, s. 61—75.
25. **Gibbs Jr. C.J., Gajdusek D.C., Asher D.M., Alpers M.P., Beck E., Daniel P.M., Matthews W.B.**: Creutzfeldt—Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science*, 161, 1968, s. 388—389.
26. **Gibbs C.J.Jr., Joy A., Heffner R., Franko M., Miyazaki M., Asher D.M., Parisi J.E., Brown P.W., Gajdusek D.C.**: Clinical and pathological features and laboratory confirmation of Creutzfeldt—Jakob disease in a recipient of pituitary-derived human growth hormone. *New Engl. J. Med.*, 313, 1985, s. 734—738.
27. **Glockhuber R., Hornemann S., Riek R., Wider G., Billeter M., Wüthrich K.**: Three-dimensional NMR structure of a self-folding domain of the prion protein PrP(121-231). *Trend Biochem. Sci.*, 22, 1997, s. 241—242.
28. **Goldfarb L.G., Petersen R.B., Tabaton M., Brown P., LeBlanc A.C., Montagna P., Cortelli P., Julien J., Vital C. et al.**: Fatal insomnia and familial Creutzfeldt—Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science*, 158, 1992, s. 806—808.
29. **Groschup M.H., Harmeyer S., Pfaff E.**: Antigenic features of prion proteins of sheep and of other mammalian species. *J. Immunol. Meth.*, 207, 1997, s. 89—101.
30. **Hadlow W.J.**: Scrapie and kuru. *Lancet*, 2, 1959, s. 289—290.
31. **Hill A.F., Desbruslais M., Joiner S., Sidle K.C.L., Gowland I., Collinge J., Doey L. J., Lantos P.**: The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 389, 1997, s. 448—450.
32. **Hope J., Reekie L.J., Hunter N., Multhaup G., Beyreuther K., White H., Scott A.C., Stack M.J., Dawson M., Wells G.A.**: Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein. *Nature*, 336, 1988, s. 390—392.
33. **Hsiao K., Baker H.F., Crow T. J., Paulter M., Owen F., Terwillinger J.D., Westaway D.**: Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann—Sträussler syndrome. *Nature*, 338, 1989, s. 342—345.
34. **Jakob A.**: Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunde (spatische Pseudosclerose-encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 70, 1921, s. 132—138.
35. **Kascak R.J., Rubenstein R., Merz P.A., Tonna-DeMasi M., Fersko R., Carp R.I., Wisniewski H.M., Diringier H.**: Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.*, 61, 1987, s. 3688—3693.
36. **Klatzo I., Gajdusek D.C., Zigas V.**: Pathology of kuru. *Lab. Invest.*, 8, 1959, s. 799—786.
37. **Krakaer D.C., Pagel M., Southwood T.R.E., deZanott P.M.**: Phylogenesis of prion protein. *Nature*, 380, 1996, s. 675.

- 38. Krasemann S., Proschup M., Hunsmann G., Bodeme W.:** Induction of antibodies against human prion proteins (PrP) by DNA-mediated immunization of PrP⁰ mice. *J. Immunol. Meth.*, 199, 1996, s. 109–118.
- 39. Lasmézas C.I., Deslys J.P., Demaimay R., Adjou K.T., Lamoury F., Dormont D., Robain O., Ironside J., Hauw J.J.:** BSE transmission to macaques. *Nature*, 381, 1996, s. 743–744.
- 40. Manuelidis L., Valley S., Manuelidis E.E.:** Specific proteins associated with Creutzfeldt–Jakob disease and scrapie share antigenic and carbohydrate determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1985, s. 4263–4267.
- 41. Masters C.L., Beyreuther K.:** Tracking turncoat prion proteins. *Nature*, 388, 1997, s. 228–229.
- 42. Meyer R.K., McKinley M.P., Bowman K.A., Barry R.A., Prusiner S.B.:** Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1986, s. 2310–2317.
- 43. Mitrová E.:** Some new aspect CJD in epidemiology Slovakia. *Europ. J. Epidemiol.*, 7, 1991, s. 439–449.
- 44. Mitrová E.:** Prenosné špongiformné encefalopatie: neuroinfekcie s nekonvenčnými imunitnými reakciami. *Bratisl. lek. Listy*, 98, 1997, s. 209–211.
- 45. Narang H.:** Origin and implications of bovine spongiform encephalopathy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 211, 1996, s. 306–322.
- 46. Novák M.:** Neuroimunológia Alzheimerovej choroby. *Bratisl. lek. Listy*, 98, 1997, s. 303–314.
- 47. Oesch B., Westaway D., Walchli M., McKinley M., Kent S.B.H., Aebersold R., Barry R.A. et al.:** A cellular gene encodes scrapie PrP^{27–30} protein. *Cell*, 40, 1985, s. 735–746.
- 48. Palmer M.S., Dryden A.J., Hughes J.T., Collinge J.:** Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. *Nature*, 352, 1991, s. 340–342.
- 49. Prusiner S.B.:** Novel proteinaceous infection particles cause scrapie. *Science*, 216, 1982, s. 136–144.
- 50. Prusiner S.P.:** Molecular biology and transgenetics of prion diseases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 26, 1991, s. 397–438.
- 51. Prusiner S.B.:** Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252, 1991, s. 1515–1522.
- 52. Prusiner S.B.:** The prion diseases. *Sci. Amer.*, 1995, s. 30–37.
- 53. Prusiner S.B.:** Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. *Trends Biochem. Sci.*, 21, 1996, s. 482–487.
- 54. Prusiner S.B., DeArmond S.J.:** Biology of disease. Prions causing nervous system degeneration. *Lab. Invest.*, 56, 1987, s. 349–363.
- 55. Prusiner S.B., DeArmond S.J.:** Prion diseases and neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17, 1994, s. 311–339.
- 56. Prusiner S.B., Hsiao K.K.:** Human prion diseases. *Ann. Neurol.*, 35, 1994, s. 385–395.
- 57. Puckett C., Concannon P., Casey C., Hood L.:** Genomic structure of the human prion protein gene. *Amer. J. Hum. Genet.*, 49, 1991, s. 320–329.
- 58. Race R., Chesebro B.:** Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature*, 392, 1998, s. 770.
- 59. Raymond G.J., Hope J., Kocisko D.A., Priola S.A., Raymond L.D., Bossers A., Ironside J., Will R.G., Chen S.G., Petersen R.B., Gambetti P., Rubenstein R., Smits M.A., Lansbury P.T., Caughey B.:** Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature*, 388, 1997, s. 285–288.
- 60. Richardson E.P., Masters C.L.:** The nosology of Creutzfeldt–Jakob disease and condition related to the accumulation of PrP^{CJD} in the nervous system. *Brain Pathol.*, 5, 1995, s. 33–41.
- 61. Robakis N.K., Devine-Gage E.A., Jenkins E.C., Kacsak R.J., Brown W.T., Krawczum M.S., Silverman W.P.:** Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the *p* arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 140, 1986, s. 758–765.
- 62. Sailer A., Bueler H., Fischer M., Aguzzi A., Weissmann C.:** No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell*, 77, 1994, s. 967–968.
- 63. Samaia H.B., Mari de Jesus J., Vallada H.P., Moura R.P., Simpson A.J.G., Brentani R.R.:** A prion-linked psychiatric disorder. *Nature*, 390, 1997, s. 241.
- 64. Shinde U.P., Inouye A.R.:** Intramolecular chaperones and protein folding. *Trends Biochem. Sci.*, 18, 1993, s. 442–446.
- 65. Shinde U.P., Inouye A.:** Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature*, 389, 1997, s. 520–522.
- 66. Skegg D.C.G.:** Sacred cows, science and uncertainties. *Nature*, 382, 1996, s. 755–756.
- 67. Skegg D.C.G.:** Epidemic or false alarm? *Nature*, 385, 1997, s. 200.
- 68. Sparkes R.S., Simon M., Cohn V.H., Fournier R.E.K., Lem J., Klisak I., Heinzman C. et al.:** Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1986, s. 7358–7362.
- 69. Telling G.C., Scott M., Hsiao K.K., Foster D., Yang S.L., Torchia M., Sidle K.C., Collinge J., DeArmond S.J., Prusiner S.B.:** Transmission of Creutzfeldt–Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1994, s. 9936–9940.
- 70. Telling G.C., Scott M., Mastrianni J., Gabizon R., Torchia M., Cohen F.E., DeArmond S.J., Prusiner S.B.:** Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, 83, 1995, s. 79–90.
- 71. VandenBerg S.R.:** The pathology of central nervous system degenerative diseases. S. 501–534. In: Sirica A.E. (Ed.): *Cellular and Molecular Pathogenesis*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publ. 1996.
- 72. Vrtiak O.J., Cabadaj R., Mikula I., Sokol J.:** Špongiformné encefalopatie (prionózy) živočíchov. *Bratisl. lek. Listy*, 98, 1997, s. 212–216.
- 73. Weissmann C.:** Molecular biology of transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS Lett.*, 389, 1996, s. 3–11.
- 74. Welch W.J., Gambetti P.:** Chaperoning brain diseases. *Nature*, 392, 1998, s. 23–24.
- 75. Wells G.A.H., Scott A.C., Johnson C.T., Gunning R.F., Hancock R.D., Jeffrey M., Dawson M., Bradley R.:** A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, 121, 1987, s. 419–420.
- 76. Will R.G., Ironside J.W., Zeidler M.:** A new variant of Creutzfeldt–Jakob disease in UK. *Lancet*, 347, 1996, s. 921–925.

Do redakcie došlo 22.5.1998.