

№4 1998 год СУЩЕСТВУЕТ ЛИ АССОЦИИРОВАННЫЙ С ПРИОНАМИ ПАТОГЕННЫЙ АГЕНТ?

С начала 60-х годов нашего столетия накапливаются данные о вялотекущих заразных губчатых энцефалопатиях (ГЭ). Болеет как домашний скот, так и люди.

Еще в XVIII веке была известна болезнь скрэпи у овец, характерными симптомами которой являлись дрожание и зуд. Болезнь была эндемична, однако в 1938 г. J.Cuille и P.L.Chelle из Тулузской ветеринарной школы привили ее козам.

В 1957 г. С.Gajdusek в США исследовал племя Fore, в котором была распространена болезнь куру (озноб). Изучая родственные связи больных, он предположил генетическую обусловленность болезни, однако затем установил связь с ритуальным каннибализмом (родственники поедали мозг умершего). В 1959 г. W.J.Hadlow отметил схожесть картин болезни скрэпи и куру.

В 1966 г. С.Gajdusek опубликовал результаты эксперимента по внутримозговой прививке культур куру шимпанзе. Обезьяны заболели губчатой энцефалопатией только через 30 мес., вследствие чего появилась гипотеза о «медленных» вирусах. За эти работы С.Gajdusek получил Нобелевскую премию по медицине в 1976 г.

С.Gajdusek же обнаружил связь куру с синдромом Крейцфельда-Якоба. В 1968 г. С.Gajdusek привил синдром Крейцфельда-Якоба шимпанзе, тогда как до того это заболевание заразным не считалось. При поисках инфекционного агента куру выяснилось, что искомый вирус не вызывает воспалительных процессов, что характерно для инфекционных болезней, а также не была обнаружена специфическая иммунная реакция.

В 1985–1986 гг. появились случаи заболевания синдромом Крейцфельда-Якоба после медицинских манипуляций, таких как лечение препаратом гормона роста, сделанного из гипофизов человеческих трупов, а также пересадки твердой мозговой оболочки. В те же годы появились «бешеные» коровы в Великобритании и новые варианты синдрома Крейцфельда-Якоба у людей.

Имеются предположения, что 900 тыс. коров, находившихся в инкубационном периоде болезни, были съедены в основном в Великобритании до марта 1996. В этой связи предсказывают от 70 до 80 тыс. новых случаев проявления синдрома Крейцфельда-Якоба.

В лабораториях исследовались различные способы инфицирования. Наиболее успешно заражение происходило при прямой инъекции зараженной ткани в мозг. Искомый агент очень плохо поддавался разрушению под действием нуклеаз, ионизирующего излучения, с помощью которых эффективно разрушаются нуклеиновые кислоты. В начале 60-х J.S.Griffith, а также R.Lartaget по косвенным данным высказали гипотезу, что агент – исключительно белковой природы. В 1982 г. S.Prusiner (Прузинер) изучал возбудитель скрэпи в университете Сан-Франциско на хомячках и получил из их центральной нервной системы устойчиво инфекционный белковый препарат. Он также высказался за гипотезу об инфекционном белке и предложил название PRION (PROteinaceous Infectious particle).

В 1985 г. обнаружили, что PrP-форма приона кодируется в геноме заражаемого субъекта. Ген PrP очень консервативен и имеется у всех млекопитающих (грызунов, жвачных, приматов). У человека он находится на коротком плече 20-й хромосомы. Формы нормального и инфекционного белка кодируются одним геном и имеют одинаковую последовательность аминокислот. Зато их 3-мерная форма различна. В нормальной форме больше *alpha*-спиралей, в инфекционной – больше *beta*-листов. Эти формы частей молекулы PrP можно видеть на рисунке. По гипотезе Прузинера [1] инфекционная форма прионов состоит из PrP белка в аномальной конформации, и эта конформация может передаваться другим молекулам PrP.

Хотя эта схема противоречит классической генетике (ее «центральной догме»), она, однако, стала общепринятой благодаря энергии Прузинера. По симптоматике ввели некоторые обозначения разных форм прионового белка: PrP^C – нормальная клеточная форма, PrP^{sen} – чувствительная к протеазам. PrP^{sc} – форма скрэпи, PrP^{res} – нечувствительная к протеазам форма. Матричная РНК с гена приона найдена в легких, селезенке, мышцах, но в 10–15 раз меньше, чем в мозге. Белок приона PrP найден в центральной нервной системе (ЦНС), в основном в нейронах, и в особенности в синапсах [2]. Помимо ЦНС, PrP находят в секреторном эпителии (слизистой) слюнных желез, кишечника. Тем не менее роль его неизвестна. Трансгенные мыши (knock-out mice), у которых ген PrP не экспрессируется, не имеют нарушений в развитии и нормально существуют.

Патогенный белок накапливается в амилоидных бляшках в мозге больных с соответствующими синдромами. После очистки детергентами и протеолизом и после ультрацентрифугирования в бляшках наблюдают формы в виде волокон или палочек. Эти формы называют SAF (scrapie associated fibrils) и prion rods, которые соответствуют разным полимерам приона [3]. В течение болезни не наблюдается изменений природы или количества мРНК PrP. Поскольку в гене имеется единственный экзон, то не может быть и альтернативного сплайсинга.

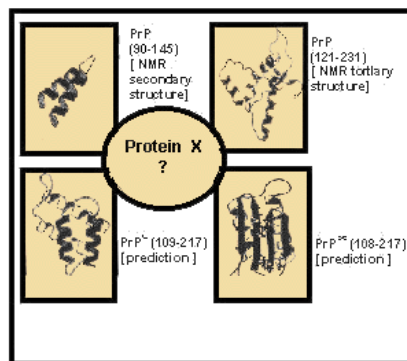
Другой вариант (помимо гипотезы Прузинера) объяснения инфекционности прионов: PrP^{sc} является зародышем кристаллизации для цепочечной полимеризации нормальных PrP [4]. В своей работе M.Laurent [5] показывает, что для реализации схемы PrP^C + PrP^{sc} > 2 PrP^{sc} требуются нереальные значения параметров, тогда как предположение, что катализ проходит через мультимерные ансамбли патогенных изоформ прионовых протеинов хорошо согласуется с экспериментальными данными.

Третий вариант: шапероны по какой-то причине не помогают PrP складываться в нормальную третичную структуру [6]. PrP^c найден на клеточной мембране, тогда как PrP^{sc} находится внутри клетки [7]. Удаление PrP^c с поверхности инфицированных прионами клеток нейробластомы блокирует появление PrP^{sc} внутриклеточно [8]. То есть PrP^c на клеточной поверхности – есть необходимый предшественник PrP^{sc}, и это означает, что конверсия клеточной изоформы в скрепи-изоформу происходит либо на мембране клетки, либо из-за клеточного эндоцитоза PrP^c.

Наконец, возможно существование некоего инфекционного агента, который вмешивается на каком-то этапе в цикл воспроизведения приона, вызывая появление аномальной формы, от которой клетка не может избавиться. По крайней мере утверждается существование видоспецифичного прион-связывающего белка (белок X на рисунке), имеющего отношение к размножению прионов. Аргументом за это предположение служит то, что мышь не может быть заражена человеческим прионом, и инокуляция трансгенных мышей, несущих (Hu)PrP, приводит к болезни менее чем в 10% случаев [6].

Таким образом, мы имеем следующие контраргументы к теории чисто белкового инфекционного агента:

1. У мышей были детально проанализированы методом количественной картографии повреждений 20 штаммов инфекционных агентов, вызывающих ГЭ. Карты повреждений оказались различными (в зависимости от штаммов). Если принять гипотезу Прузинера, то все 20 модификаций инфекционности должны быть закодированы в пространственной структуре приона, тогда как наличие даже 2-х разных пространственных модификаций в одном окружении противоречит «догме» структурной биологии.
2. Коровья ГЭ (распространяется эпидемически) не ограничена генетически (разные породы болеют одинаково), хотя для скрепи овец генетическая составляющая весьма существенна. Овцы, генетически нечувствительные к скрепи, могут заразиться коровьим бешенством (по данным J.Brugere-Picoux из Ecole veterinaire de Maison-Alfort [9]).
3. Не найдены эпидемиологические связи между скрепи у овец и синдромом Крейцфельда-Якоба у человека, тогда как коровье бешенство остается единственным правдоподобным объяснением появления новой формы синдрома Крейцфельда-Якоба в Великобритании [10, 11]. Кроме того, там же, от коровьих туш, были заражены пищевым путем тигр, пумы, оцелоты и гепарды.
4. При заражении мышей коровьим бешенством у них наблюдали симптомы болезни, тогда как не находили PrP^{sc} прионов. При этом мозг мышей заразен, и им можно инфицировать других животных, хотя PrP^{sc} отсутствует [9].



Литература

1. S.B.Prusiner, Science. 1991. 252. P. 1515.
2. J.-G.Fournier et al., C.R.Acad.Sci. 1995. 318. P.339.
3. P.A.Merz et al., Acta Neuropathol (Berl.). 1981. 54. P. 63.
4. C.Gajdusek, Neuroimmunol. 1988. 20. P. 95.
5. M.Laurent. Autocatalytic processes in cooperative mechanisms of prion diseases. FEBS Letters. 1997. 407. P. 1-6.
6. Telling G.C., Scott M., Mastrianni J. et al. Prion propagation in mice expressing human and chimaeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. Cell. 1995. 83:79-90.
7. McKinley M.P., Taraboulos A., Kenaga L. Ultrastructural localisation of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. 1991. Lab.Invest. 65: 622-630.
8. Borchelt D.R., Taraboulos A., Prusiner S.B. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. J.Biol. Chem. 1992. 267: 16188-16199.
9. C.-I.Lasmezas, J.-Ph.Deslys, O.Robain & D.Dormont. L'agent secret des maladies a prions. La Recherche N°299, June 1997. P. 46-53.
10. C.-I.Lasmezas, J.-P.Deslys, O.Robain et al., Nature. 1996. V. 381. P. 743.

11. J.Collinge et al., Nature. 1996. V. 383. P. 685.

Ю.Г.Матушкин,
к.б.н., зав. сектором молекулярной эволюции,
ИЦиГ СО РАН, Новосибирск