

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 616.98:578.89

## **ПРИОНЫ - НОВЫЙ, ОСОБЫЙ ТИП ИНФЕКЦИОННЫХ БЕЗНУКЛЕИНОВЫХ АГЕНТОВ**

**Ա.Տ. ԱԳԱԲԱԼՅԱՆ**

*Երևանский государственный медицинский университет, 375025*

Работа посвящена биохимической, генетической и инфекционной характеристике нового безнуклеинового класса инфекционных агентов, поражающих центральную нервную систему человека и животных. Показано, что основной инфекционной единицей, вызывающей медленные инфекции, является белковая молекула, названная "прион". Выявленные инфекционные и инфицирующие свойства прионных белков предполагают новые подходы к вопросам этиологии многих нейродегенеративных заболеваний и возможности их профилактики и терапии.

Աշխատանքը նվիրված է կենսաքիմիական, գենետիկ, ինֆեկցիոն բնութագրով նոր, առանց նուկլեինաթթվային ինֆեկցիոն ազդակով դասերին, որոնք կաթնասուններում են մարդու ու կենդանիների կենտրոնական նյարդային համակարգը: Ցույց է տրված, որ հիմնական վարակման միավորը, որը առաջ է բերում դանդաղ մոլեկուլային ինֆեկցիա, համարվում է սպիտակուցի մոլեկուլը «պրիոն» անվանումով: Պրիոնային սպիտակուցների բացահայտված ինֆեկցիոն և վարակիչ հատկությունները ենթադրում են նոր մոտեցումներ բազմաթիվ նեյրոդեգեներատիվ հիվանդությունների ծագումնաբանության հարցերի և նրանց կանխարգելման ու թերապիայի նկատմամբ:

Information on prion diseases caused by a new class of agents-nucleic free molecules of mammals, acquiring manifestation of infective properties as a result of conformations is presented. Molecular organization of priones and the conformational-cellular protein changes underlying the infectious activation of the cell homologue of prions is demonstrated. The main conclusion of the paper is that protein prionization is a common biological phenomenon and the diseases caused by these processes will increase in the near future.

*Прионы - прионовые болезни - медленные инфекции - инфекционные безнуклеиновые агенты - инфекционный прионный белок*

В последние годы наблюдается неуклонный рост инфекционной заболеваемости, вызванный возвращением или оживлением циркуляции ранее известных инфекций или появлением новых инфекционных агентов [3]. В конце 20-го столетия расшифрована этиология нейродегенеративных заболеваний. Установлено, что причиной их возникновения является инфекционный белок, обозначенный термином "ПРИОН", открытие которого тесно связано с открытием медленных инфекций [7]. В середине прошлого столетия Сигурдсон опубликовал результаты своих наблюдений массовых заболеваний среди овец [14]. Несмотря на явные клинические различия и неодинаковую локализацию повреждений органов и тканей, среди изученных заболеваний были обнаружены четыре одинаковых признака, отличающих медленные инфекции:

- необычно продолжительный (месяцы и годы) инкубационный период,
- медленно прогрессирующий характер течения,
- необычность поражения органов и тканей.

- неизбежность смертельного исхода.

Массовый характер медленных инфекций естественно поднимал вопрос об их происхождении. Было показано, что одна из классических медленных инфекций овец – “висна” вызывается вирусом, по всем своим свойствам сходным с представителями онкорнавирусов. Это открытие способствовало укреплению представления о вирусной этиологии всех медленных инфекций человека и животных и на многие годы предопределило поиски в этом, казалось бы, единственно правильном направлении [7].

За короткое время был накоплен большой фактический материал, анализ которого показал, что очень многие вирусы, хорошо известные как возбудители острых заболеваний, способны при определенных условиях вызывать в организме медленный инфекционный процесс, полностью отвечающий всем четырем признакам медленных инфекций. К ним относят вирусы кори, краснухи, герпеса, клещевого энцефалита, лимфоцитарного хориоменингита, бешенства, вирусы группы папова, гриппа, ВИЧ и др. [6, 7]. В литературе постепенно накапливались данные об особой группе медленных инфекций человека и животных, поражающих ЦНС, где на основе первично-дегенеративных процессов развивается характерная картина формирования губкообразного состояния серого и/или белого вещества головного, а иногда и спинного мозга [4, 6]. Такое своеобразие патоморфологической картины обусловило название этой группы болезней, как *“трансмиссивные губкообразные энцефалопатии”* (ТГЭ). Хотя инфекционная природа ТГЭ была доказана многочисленными экспериментами по передаче заболеваний различным животным, однако обнаружить возбудителей ТГЭ не удавалось.

При разностороннем изучении инфицированной мозговой ткани, в которой было обнаружено наиболее высокое содержание инфекционного агента, было выявлено, что предполагаемый инфекционный агент:

- проходит через бактериальные фильтры с диаметром от 25 до 100 нм,
- не способен размножаться на искусственных питательных средах,
- воспроизводит феномен титрования (вызывает гибель животных при высокой множественности заражения),
- накапливается до титров  $10^3$ - $10^{11}$  ИД<sub>50</sub> на 1 г мозговой ткани,
- способен первоначально репродуцироваться в селезенке и других органах ретикулоэндотелиальной ткани, а затем в мозговой,
- адаптируется к новому хозяину, что нередко сопровождается укорочением инкубационного периода,
- имеет специфический круг хозяев,
- может изменять патогенность и вирулентность для различного круга хозяев,
- способен к персистенции в культуре клеток, полученных из органов и тканей зараженного организма [10].

Перечисленные выше свойства дают основание рассматривать возбудителей ТГЭ, как *“необычные вирусы”*, почему и в течение некоторого времени эти заболевания подразделяли на медленные инфекции, вызываемые обычными вирусами и медленные инфекции, вызываемые *“необычными вирусами”* [8].

В то же время Прузинер, используя новые подходы к накоплению и очистке инфекционного начала в мозговой ткани зараженных агентом “скрепи” хомяков, показал, что возбудителем скрепи является *“безнуклеиновый низкомолекулярный (27-30 кД) белок”* [7]. Автор назвал этот низкомолекулярный белок “инфекционным прионным белком”, а в качестве инфекционной единицы было предложено наименование “прион”. Слово прион представляет собой анаграмму английских слов “белковая инфекционная (частица) – Proteinaceous infectious (particles) Прион как инфекционная единица состоит из молекул инфекционного прионного белка. Другая формулировка гласит, что прионы – это белковые инфекционные агенты, кодирующиеся в нормальной или мутантной форме геномом хозяина, не обладающие автономными механизмами репликации, вызывающие в процессе развития инфекционного процесса накопление фибриллярных белков [8].

Вследствие того, что результаты исследований последних 15-20 лет полностью

подтвердили прионную природу возбудителей ТГЕ, эти заболевания теперь называют "прионными болезнями" [10, 11]. Сегодня очевидно, что открытие прионов как инфекционных агентов поставило под угрозу фундаментальные основы генетики. С пониманием структуры и механизмов репликации прионов в инфекционной патологии появились новые взгляды и понятия, что, естественно, будет отражаться на давно открытых и прочно устоявшихся понятиях таких, как инфекционный вирус, инфекционная РНК или ДНК, репликация вирусных нуклеиновых кислот, и, как следствие, трансляция вирусспецифических белков и сборка вирусных частиц [1, 2, 5].

Было показано, что прионный белок может существовать в двух формах. Его нормальная или клеточная форма, обозначенная как PrP<sup>c</sup>, обнаруживается в организме всех млекопитающих, в том числе и человека. Ген, кодирующий синтез PrP<sup>c</sup>, высокоактивен, и очень высокие уровни его экспрессии выявляются в нейронах, где концентрация иРНК для PrP<sup>c</sup> в 50 раз выше, чем в глии. Показано, что нормальный прионный белок PrP<sup>c</sup> играет чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности организма: участвует в передаче нервных импульсов, играет определенную роль в поддержании циркадных ритмов, регулируя суточные циклы активности и покоя в клетках, органах и в организме целом [11-12].

В организме людей и животных, страдающих прионными заболеваниями, прионный белок обнаруживается в другой форме, обозначаемой как PrP<sup>sc</sup> [9].

Конверсия PrP<sup>c</sup> в PrP<sup>sc</sup> - посттрансляционный процесс, включающий глубокое конформационное изменение, лежащее в основе размножения инфекционных прионов. Инфекционный прионный белок, в отличие от нормального (PrP<sup>c</sup>), обладает высокой устойчивостью к нагреванию до 80°, УФ-облучению, проникающей радиации и действию протеазы К. Выявленные свойства позволили в лаконичной форме сформулировать понятие "прион", определив его как *"малую белковую инфекционную частицу, устойчивую к инактивирующим воздействиям, которые модифицируют нуклеиновые кислоты"*. Перечисленные свойства инфекционного прионного белка однозначно свидетельствуют о том, что прионы являются новым классом инфекционных агентов, принципиально отличающихся от мира простейших, бактерий, грибов, вирусов.

Хотя механизм накопления инфекционного прионного белка в зараженном организме окончательно не выяснен, имеющиеся о нем сведения и представления о том, что это посттрансляционный процесс, позволяют предположить, что инфицирующий прионный белок может вызывать в здоровом организме трансформацию нормального прионного белка в его инфекционную форму в результате конформационных изменений. Становится понятным, что процесс накопления инфекционного прионного белка происходит не в результате синтеза в зараженном организме молекул PrP<sup>sc</sup> de novo, а вследствие конформационных изменений уже синтезированных молекул PrP<sup>c</sup> под влиянием инфекционного прионного белка PrP<sup>sc</sup>.

Нужно сказать, что структурная близость инфекционного прионного белка PrP<sup>sc</sup> и его нормальной изоформы PrP<sup>c</sup> не дает возможности обнаружить антитела на прионный белок PrP<sup>sc</sup> при развитии прионных заболеваний людей и животных, так как этот белок воспринимается иммунной системой как "свой".

Представляют определенный интерес данные, полученные при клонировании комплементарной ДНК из клонотекки, приготовленной на основе очищенной матричной РНК из мозга хомяков, инфицированных вирусом скрепи. В результате последующего секвенирования кДНК была раскрыта структура этого загадочного инфекционного агента на уровне гена и белка. Было установлено, что последовательность кДНК вируса скрепи включает в себя 1918 аминокислот. *Важнейший факт*, установленный в этом исследовании, состоит в том, что *инфекционные прионы практически не содержат нуклеиновой кислоты, способной кодировать их первичную структуру*, т.е. впервые в истории исследования инфекционных агентов выявлен новый класс инфекционных частиц, лишенных генетического материала - прионов [13].

Прион является вариантом нормального белка, вырабатываемым нервными клетками

и имеющим молекулярную массу 35 кД. Описаны также другие молекулярные формы прионов, представленные более короткими полипептидами с молекулярной массой 27-31 кД [12, 29], являющиеся по-видимому протеолитическими фрагментами предшественника. Они представляют собой белок-прион, обладающий свойством, проникая в клетку, направлять вместо естественного белка (PrP<sup>c</sup>, 35 кД) синтез себе подобных инфекционно-активных прионов. Можно констатировать, что, появившись в результате генетических мутаций или других обстоятельств, белок приобретает свойства инфекционной единицы и вызывает патологический, а затем и эпидемический процесс.

Ранее было показано, что прионы активно взаимодействуют с митохондриальной ДНК, причем это взаимодействие высокоспецифично, так как связывание прионов наблюдается только с началом репликации митохондриальной ДНК с участком, ответственным за контроль репликации митохондриальной ДНК. Связывание прионов с участком, ответственным за контроль репликации митохондриальной ДНК, может приводить к блокаде репродукции митохондрий, что для большинства тканей и, в особенности клеток ЦНС, может закончиться трагично. ДНК-связывающие или РНК-связывающие функции прионов позволяют сформулировать представления о молекулярных механизмах репродукции прионов в пораженных клетках. Предполагается, что свойство прионов взаимодействовать с митохондриальной ДНК в определенной степени объясняет механизм их цитоплазматической передачи и имеет непосредственное отношение к открытию прионов и прионизации у дрожжей [15].

Согласно гипотезе Викнер [16], прионы являются естественными компонентами всех эукариотических клеток. В клетках они существуют в двух молекулярных формах: в нативной или глобулярной, когда 4 основных альфа-спиральных домена организованы в плотную структуру, и в развернутой форме, когда наблюдается раскрытие гидрофобного "кора" белка. Первая форма способна выполнять функции транскрипционного репрессора на уровне транскрипции собственной иРНК. Вторая молекулярная форма регуляторно неактивна. В связи с этим синтез деспирализованной формы приона сопровождается накоплением белка и неконтролируемой трансляцией матричной РНК, кодирующей клеточный прион. Такой механизм синтеза и накопления белка не противоречит основным законам генетики, объясняет патогенез заболевания, а также длительность инкубационного периода.

Изучение локализации прионов в тканях животных и человека показало, что после внутримозгового заражения болезнью Крейтцфельда - Якоба прионы обнаруживаются в ЦНС, лимфоузлах, селезенке, тимусе, почках, печени, спинномозговой жидкости и в периферической крови, где они размножаются. Все пораженные органы содержат до 10 млн инфекционных единиц на 1 г ткани, однако эти органы, за исключением головного мозга, не подвергаются никаким патологическим изменениям.

Таким образом, изучение прионов и связанных с ними заболеваний является новой быстро развивающейся областью биомедицинских исследований, с широким применением молекулярно-биологических методов изучения структуры прионных белков. Результаты этих исследований позволяют в определенной степени обосновать новое направление дальнейших подходов к терапии прионных болезней, а также способствуют выяснению причин таких распространенных нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона и др. Благодаря исследованиям прионов и прионных болезней, уже сейчас существует возможность определить группу риска по возникновению врожденных прионных болезней еще до появления неврологических нарушений.

В тоже время, несмотря на определенные успехи в изучении природы прионов и прионных болезней, лечение прионных заболеваний все еще зависит от дальнейших успехов молекулярной и клеточной биологии и химии белка, что может привести к расшифровке процессов репликации прионов и понять патогенетические механизмы этих заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агабян А.С. Биолог. журн. Армении, 5, 31-38, 1973.
2. Агабян А.С. Биолог. журн. Армении, 6, 40-46, 1974.
3. Агабян А.С., Авакян Т.А. и др. Сб. научн. трудов ассоциации врачей-интернистов, выпуск 4, 15-19, Ереван, 2002
4. Агабян А.С., Аветисян И.В., и др. Нейрохимия, 2, 207-209, 1998.
5. Агабян А.С. Аюкян С.М. Журн. клин. и эксп. медицины, 4, 12-17, 1974.
6. Завалишин И.А., Верещагин Н.В. и др. Вестник РАМН, 9, 50-56, 1997.
7. Зуев В.А. Медленные вирусные инфекции человека и животных, М., "Медицина", 256с., 1988.
8. Тер-Аванесян М.Д., Паушкин С.В. и др. Молекул. биология, 32, 32-42, 1998.
9. Deslys J.P, Lasmez C.I. et al. Lancet, 349, 30-31, 1997.
10. Gajdusek D.C. Subviral pathogenesis of plants and animals: Viroids and Prions, New York, 483-544, 1985.
11. Hill A.E., Desbruztais M., Joines S., et al, Nature, 389, 448-450, 1997.
12. Laftus B, Rogers M. Gene, 185, 215-219, 1997.
13. Prusiner S.B. Annual Rev., Microbiol, 48, 655-686, 1994.
14. Sigurdsson B. Brit. Vet. J., 110, 255-270, 1954.
15. Taylor D.M. Brit. med., Bull, 49, 810-821, 368-381, 1993.
16. Wickner R.B., Marison D.C., Edskes H.K. Seminars in virol, 7, 215-223, 1997.

Поступила 10.IV.2002