

ПРИОНЫ

Лекция профессора Бойченко М.Н.

История открытия

- * 1933г. Ирландия закупила в Германии большую партию овец
- * Начало заболевания под названием скрепи (scrapie- лоскутный)
- * 1954г. Sigurdsson В. Прочитал цикл лекций в Лондонском университете. Ввел термин «медленные инфекции»

Медленные инфекции

- * 1. Продолжительный инкубационный период
- * 2. Медленный прогрессивный характер течения
- * 3. Необычность поражения органов и тканей
- * 4. Неизбежность смертельного исхода

История открытия

- * 1957г. - Gaidusek D.C. Описывает заболевание, которое встречается в горных районах острова Новая Гвинея среди папуасов, известное под названием «куру»
- * Середина 80-годов 20 столетия- **болезни человека:**
- * 1. Крейтцвальда-Якоба
- * 2. Герстманна-Штреусслера-Шейнкера
- * 3. смертельная семейная бессоница

История открытия

- * **Болезни животных:**
- * 1. трансмиссивная энцефалопатия норок
- * 2. хроническая изнуряющая болезнь оленей и лосей
- * 3. скрепи у овец
- * 4. спонгиозная энцефалопатия крупного рогатого скота

История открытия

- * **Своеобразные патоморфологические изменения в нервной ткани дали название этой группы болезней, как «губкообразные трансмиссивные энцефалопатии»**

Возбудитель ГТЭ

- * 1. Не размножается на искусственных питательных средах
- * 2. Проходит через бактериальные фильтры
- * 3. Не виден в световой микроскоп
- * 4. устойчив к УФ, кипячению, нуклеазам

Возбудитель ГТЭ

- * Prusiner S.B. Показал, что этиология связана с инфицированием низкомолекулярным белком, не содержащим нуклеиновых кислот, который был назван **ПРИОНОМ**



Лауреат Нобелевской
премии за 1997г –
Prusiner S.B.

**Установил этиологию
трансмиссивных
губчатообразных
энцефалопатий**

Прионы

- * **ПРИОНЫ** – ЭТО БЕЛКОВЫЕ ЧАСТИЦЫ, ВОЗБУДИТЕЛИ КОНФОРМАЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, КОТОРЫЕ РАЗВИВАЮТСЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ НПРАВИЛЬНОГО СВРАЧИВАНИЯ (НАРУШЕНИЯ КОНФОРМАЦИИ) КЛЕТОЧНОГО БЕЛКА, НЕОБХОДИМОГО ДЛЯ НРМАЛЬНОГО ФУНКЦИОНИРОВАПНИЯ ОРГАНИЗМА

прионы

- * Название произошло от словосочетания: proteinaceous infectious particles- белковые инфекционные частицы.

ПРИОНЫ

- * Прионовый протеин PrP^c (cellular prion protein) – нормальная изоформа прионного белка с молекулярной массой 33-35 кД, детерминируется геном прионного белка (PrNP), расположенного на 20 хромосоме человека.
- * Является сialogликопротеином.
- * Локализован на поверхности клетки, закорен в богатую холестеролом мембрану клетки через гликопротеин

ПРИОН

- * Синтезируется главным образом в нейронах.
- * Обнаружен в селезенке, лимфатических узлах, коже, ЖКТ, фолликулярных дендритных клетках, роговице глаза, дрожжах.
- * Главной особенностью является **ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ к ПРОТЕАЗЕ**

ПРИОНЫ

функции клеточного приона

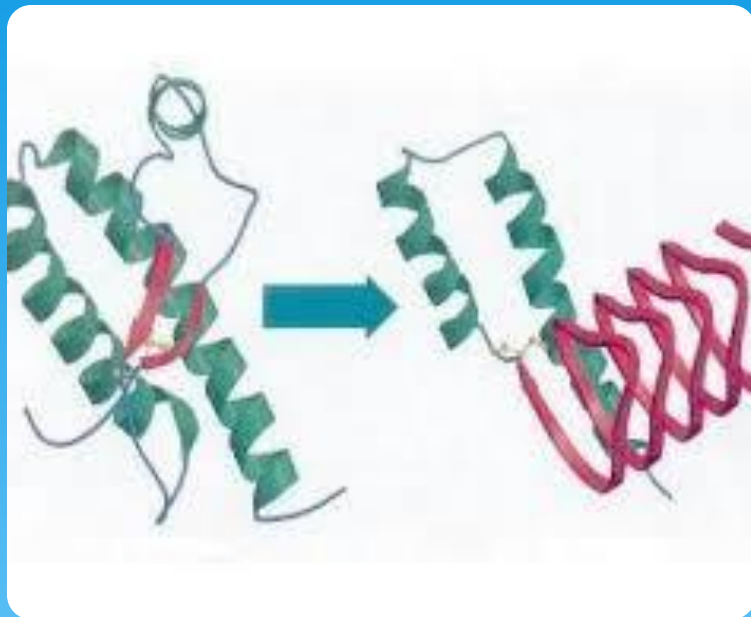
- * Поддерживает качество миелиновой оболочки
- * Регулирует передачу нервных импульсов, суточные циклы, процессы окисления,
- * Участвует в метаболизме меди в ЦНС
- * Участвует в регуляции деления стволовых клеток костного мозга.
- * Необходим для нормальной синаптической передачи
- * Возможно подавляет процессы старения

Строение клеточного приона

- * Молекула нормального приона состоит из 4 альфа-спиральных доменов, стабилизированных междоменными электростатическими взаимодействиями и S-S1 – связью

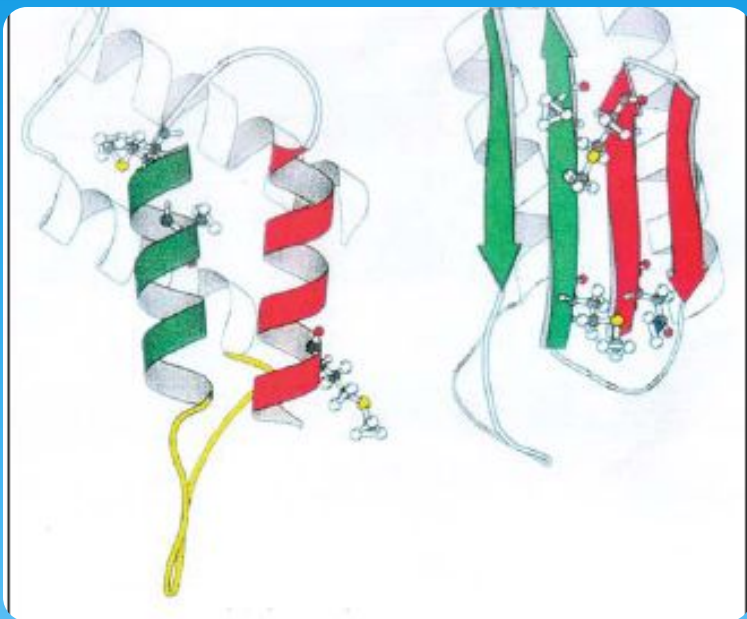
Изоформа приона

- * В модифицированной изоформе приона PrP^{Sc} (scrapie prion protein) в отличие от нормального прионного белка PrP^C первоначальную спиралевидную форму сохраняют только 2 домена: H3 и H4. Остальные 2 домена: **H1 и H2** превращаются в бета-тяжи, связанные друг с другом и доменам H3 и H4



Образование новой
конформационной
формы приона

Конформационные
изменения связана с
расплетением С-
концевого участка PrP^c
альфа-спирали, в
результате чего
происходит замена на
бета-тяжи



Преобразование PrP^c
в PrP^{sc}

Изоформа приона

- * Именно С-терминальный участок конформационно измененной формы, PrP^{Sc} , становится **резистентным к протеазе**

Свойства PrPsc

- * **Измененные прионы устойчивы :**
- * **1. к протеолизу**
- * **2. к излучениям**
- * **3. к высокой температуре**
- * **4. к формальдегиду**
- * **5. к глутаральдегиду**
- * **6. к бета-пропиолдактону**
- *

Свойства PrP^{sc}

- * Способны к агрегации в амилоидные фибриллы, обладающие гидрофобностью, что приводит к формированию нерастворимых агрегатов различных размеров
- * Структурная близость PrP^{sc} с PrP^c не приводит к образованию антител при развитии прионных заболеваний.
- * PrP^{sc} воспринимается иммунной системой, как «СВОЙ»

Свойства PrPsc

- * Накопление конформационно измененного белка сопровождается его агрегацией,
- * образованием высоко упорядоченных фибрилл (**амелоидов**),
- * приводя к гибели клетки

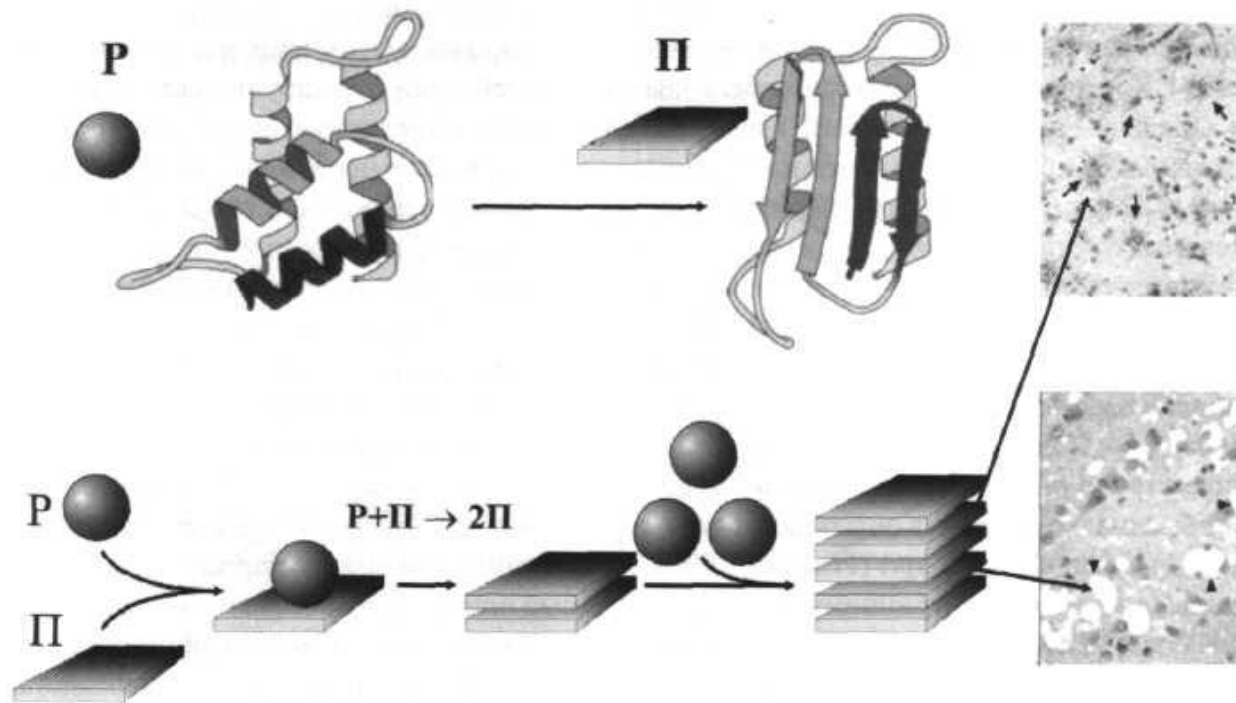
Свойства PrP^{sc}

- * Процесс усиливается при возрастании количества патологического приона, который образует агрегаты с собой и с PrP^c на поверхности клетки
- * В результате PrP^c превращается в прион PrP^{sc} и далее цикл продолжается

Механизмы образования конформационно измененного приона

- * 1. Спонтанная конверсия нормального клеточного приона PrP^c в инфекционную изоформу
- * 2. Конформационные изменения в результате мутации прионного гена (PRNP)
- * 3. «Классический механизм» конверсии PrP^c в изоформу PrP^{sc}, использующий PrP^{sc} в качестве матрицы
- * 4. Предполагаемый механизм индукции PrP^{sc} аномальными прионными структурами

Механизмы образования конформационно измененного приона



Инфицирование аномальными изоформами

- * 1. При употреблении недостаточно термически обработанных продуктов животного происхождения: мяса, мозга КРС, больного губкообразной энцефалопатией
- * 2. При трансплантации тканей (роговицы глаза, твердой мозговой оболочки)
- * 3. при переливании крови и применении гормонов от лиц, инфицированных аномальными прионами

Инфицирование аномальными изоформами

- * 4. При введении в организм человека биологически активных веществ животного происхождения
- * 5. Использовании контаминированных и недостаточно простерилизованных инструментов
- * 6. Через иммунобиологические препараты, не подвергшиеся соответствующей обработке

Патогенез

- * Попад в кишечник патологические прионы транспортируются в кровь и лимфу
- * После репликации в селезенке, аппендиксе, миндалинах они переносятся в мозг по периферическим нервам (нейроинвазия) или через кровь через гематоэнцефалический барьер.
- * Накопление PrP^{sc} происходит в мозге и в селезенке за счет фолликулярных дендритных клеток

патогенез

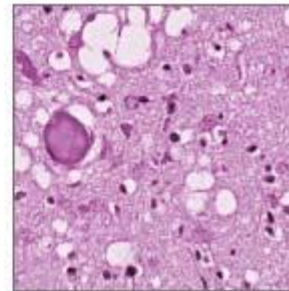
- * Накопившись в большом количестве в мозге, прионы вызывают образование:
- * **амилоидоза** (отложение амилоида с развитием атрофии и склероза ткани) и
- * **астроцитоз** (разрастание астроцитарной нейроглии, гиперпродукцию глиальных волокон)

патогенез

- * Происходит формирование агрегатов белка и амилоида и губкообразное изменение мозга
- * PrP^{sc}, накапливаясь в нейронах, придает ткани губкообразный вид
- * После репликации в ЦНС, происходит распространение прионов по периферическим нервам к другим тканям, где происходит вторичная прионная репликация

патогенез

Изменения в головном мозге



патогенез

- * Секреция прионов из инфицированного организма происходит с мочой, слюной, калом, грудным молоком, формируя источники прионов в окружающей среде, где они сохраняются в неизменной состоянии в течение 16 лет, создавая стойкие очаги заражения, например, на пастбищах

Прионы дрожжей

- * Наличие прионов в дрожжах было установлено в 80х годах
- * Дрожжевой транскрипционный ко-репрессор Ure-2p может существовать в 2 стабильных конформационных формах:
 - * 1. активной как ко-репрессор (связывает и удаляет 2 транскрипционных активатора)
 - * 2. нерастворимой неактивной конформационной форме

Прионы дрожжей

- * Неактивная конформация обладает способностью быть матрицей для превращения протеина того же типа, с той же аминокислотной последовательностью в его собственную прионоподобную конформацию**

Прионы дрожжей

- * У *Saccharomyces cerevisiae* 7 различных по аминокислотной последовательности белков действуют как прионы.
- * Наиболее изучены RNQ, PST, URE3
- * Предполагается, что способность изменять конформацию и приобретать новый фенотип обеспечивает приспособление к изменяющимся условиям окружающей среды

Прионы дрожжей

- * Существует гипотеза, что PST представляет эволюционный конденсатор, который усиливает адаптация дрожжей к изменяющимся условиям окружения

Предупреждение инфицированности прионами

- * 1. Предварительная обработка инструментов и другого подозрительного материала 1 N NaOH в течение 1 часа
- * 2. Инструменты обезвреживают автоклавированием при 134 C -18мин
- * 3. Сжигание подозрительного биологического материала

Предупреждение инфицированности прионами

- * 4. Ограничение на использование лекарственных препаратов животного происхождения без их предварительной обработки
- * 5. Ограничение на трансплантацию твердой мозговой оболочки и роговицы глаза

Изучение конформационных изменений

- * Для изучения конформационных изменений используют 3 экспериментальных подхода:
- * 1. Мониторинг конформационных изменений в прионных белках дифференциацией растворимости и резистентности к протеазе
- * 2. Определение амилоидных конформаций в методе SDD-AGE
- * 3. Выявление прионных белков микроскопической техникой

SDD-AGE

- * **SDD-AGE** –semi denaturing-detergent agarose-gel-electrophoresis или **filter retardation assay**
- * Клеточные лизаты обрабатывают SDS – буфером (додецилсульфат натрия – буфером)
- * При этом растворяются большинство молекулярных комплексов и агрегатов за исключением амилоид-подобных агрегатов

SDD-AGE

- * Образцы разделяют в агарозном геле и переносят :
- * 1. на мембрану блотинга для SDD-AGE
- * Или
- * 2. целлюлозо ацетат с вакуумным приспособлением для фильтрационного retardation assay
- * 3. проводят определение антител
- *

Выявление прионных белков микроскопической техникой

- * 1. флюоресцентная микроскопия, с использованием антител против прионов определенного белка
- * 2. флюоресцентная спектроскопия (FCS) с высоким уровнем разрешения выявляет агрегационные единицы
- * 3. окрашивание на амилоид прионных агрегатов флюоресцентной краской , которая связывает амилоид *in vivo* с последующей микроскопией

CDI

- * **Conformation-dependent immunoassay (CDI)**
- * Подвергают прионный белок (PrP^{Sc}) денатурации и экспонируют с мечеными европием антителами к эпитопам, спрятанным в нативной конформации.
- * При увеличении концентрации денатурирующего агента PrP^{Sc} денатурирует и раскручивается из бета-ленточной структуры, при этом больше эпитопов становится доступно к связыванию антителами