

# Prionové proteiny a jejich interakce s těžkými kovy

Eliška Sedláčková<sup>a</sup>, Alžběta Cardová<sup>a</sup>, Vojtěch Adam<sup>a,b</sup>, René Kizek<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

<sup>b</sup> Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

## Prion proteins and its interaction with heavy metals

In this study we attempted to characterize cellular prion-like protein (PrP<sup>C</sup>) properties and its possible interactions with metal ions. In the first part of this study we described the structure of prion-like protein, its biochemical properties and its role in human or animal organism. In the next and the most important part we summarized accessible information about the metals and heavy metals which can bind prion-like protein. Especially the heavy metals could have really important role in the process of protein misfolding, but this role is still unknown. In the last section we focused on transmissible spongiform encephalopathies, their incubation period and clinical signs.

**Přijato k publikování:** 28. 2. 2014

**Klíčová slova:** kovy, prionová onemocnění; prionový protein, PrP<sup>C</sup>, PrP<sup>Sc</sup>, těžké kovy, TSE

## Úvod

Buněčný prionový protein (PrP<sup>C</sup>) je povrchový protein kotvený do buněčného povrchu glykosylfosfatidylinositolovou kotvou (GPI). Role tohoto proteinu v lidském těle není prozatím objasněna<sup>1</sup>. Protein je na buněčný povrch vázán glykosidickou vazbou se dvěma asparaginovými zbytky a disulfidovým můstkem<sup>2</sup>. PrP<sup>C</sup> je lokalizován na buněčném povrchu a podílí se na procesech příjmu ligandu a na transmembránové signalizaci<sup>3</sup>. PrP<sup>C</sup> je u savců kódován sekvencí chromozomálního genu PRNP a o daném kmenu produkovaného PrP<sup>C</sup> rozhoduje část genu, která je replikována jako poslední<sup>4</sup>. Experimenty s tkáňovou kulturou mozečku ukazují, že buňky, kterým chybí PrP<sup>C</sup> jsou mnohem náchylnější k oxidačnímu stresu a snadno podléhají buněčné smrti<sup>3</sup>. Existuje několik různých prionových kmenů, které se vyskytují u většiny živočišných druhů<sup>5</sup>. Priony jako takové vyvolaly hojnou diskuzi až v roce 1986, kdy ve Velké Británii propukla nemoc zvaná BSE – Bovinní spongiformní encefalopatie<sup>6</sup>.

## Prionový protein (PrP<sup>C</sup>)

Prionový protein může existovat ve dvou formách, buď jako přirozený buněčný protein (PrP<sup>C</sup>), nebo ve své patologické izoformě (PrP<sup>Sc</sup>). Mezi těmito dvěma formami proteinu nemohou být detekovány žádné sekvenční rozdíly, ale jejich rozdílné vlastnosti se mohou projevit rozdílnou konformací

proteinu<sup>7</sup>. Stejně jako ostatní membránové proteiny je PrP<sup>C</sup> syntetizován na drsném endoplazmatickém retikulu (ER) a transportován pomocí Golgiho aparátu na buněčný povrch<sup>8</sup>. Buněčný prionový protein (PrP<sup>C</sup>) je z převážné části tvořen  $\alpha$ -helikální strukturou a je kódován genem PRPN na 20. chromosomu. PrP<sup>C</sup> je monomerní a štěpitelný proteázou. Infekční (pozměněná) forma prionového proteinu (PrP<sup>Sc</sup>) je z 45% tvořena strukturou  $\beta$ -skládaného listu a z 30%  $\alpha$ -helixem. PrP<sup>Sc</sup> tvoří nerozpustné agregáty a je odolný vůči štěpení proteinázou K<sup>9,10</sup>.

## Patogenní forma prionového proteinu (PrP<sup>Sc</sup>)

V porovnání se znalostmi o PrP<sup>C</sup> toho o PrP<sup>Sc</sup> víme jen velmi málo. To stejné platí i o mechanismu přeměny PrP<sup>C</sup> na PrP<sup>Sc</sup>. Toxicita PrP<sup>Sc</sup> je spojována s procesem uvolňování vápníku z endoplazmatického retikula a se zrychlenou regulací několika chaperonů ER. Rozsah prionové replikace úzce koreluje se zrychlenou regulací u ER chaperonových proteinů, které podléhají stresu<sup>11</sup>. Rozdílem PrP<sup>Sc</sup> oproti PrP<sup>C</sup> je jeho již zmíněná rezistentnost vůči proteináze K, fosfolipáze C a také k vysokým teplotám. PrP<sup>Sc</sup> má stálý metabolismus, je nerozpustný v detergentech a ve vodě, také má silnou schopnost agregovat a polymerizovat. Tento protein je u infikovaných jedinců přítomen v počtu, který je úměrný stádiu infekce<sup>12</sup>. Štěpná reakce PrP<sup>Sc</sup> probíhá nejspíš v endozomech či lyzozomech. Na rozdíl od

proteolytického postranslačního štěpení PrP<sup>C</sup>, však PrP<sup>Sc</sup> narušuje amyloidogenní a neurotoxickou oblast polypeptidového řetězce<sup>13</sup>. V případě dědičných prionových chorob vznikají abnormální formy PrP<sup>Sc</sup> vlivem mutací v PRNP genu<sup>14</sup>. K identifikaci rozdílných kmenů PrP<sup>Sc</sup> slouží jejich biochemické vlastnosti jako glykosylace, elektroforetická pohyblivost, rezistence vůči proteáze či sedimentace<sup>5</sup>.

### Interakce prionových proteinů s esenciálními kovy

Ionty přechodných kovů, jako je měď, železo nebo mangan, jsou známy tím, že se obecně podílí na oxidačních a zánětlivých procesech. Tyto procesy se často vznikají při stárnutí a vývoji neurodegenerativních chorob, jako je Parkinsonova či Alzheimerova choroba a amyotrofická laterální skleróza<sup>15</sup>. V průběhu posledních tří desetiletí přitahuje úloha kovových iontů při vývoji TSE zvýšenou pozornost. Již v roce 1970 bylo zjištěno, že chelatace Cu<sup>2+</sup> může vyvolávat histopatologické změny velmi podobné scrapii<sup>16</sup>. Také je velmi dobře známo, že PrP<sup>C</sup> může tvořit vazby s mědí a dokonce může být izolován pomocí afinitní měděné kolony. Četné studie využívaly rekombinantní prionový protein k měření vazebné afinity různých sekvencí aminokyselin prionového proteinu na měď. Ačkoli se navrhované vazebné afinity liší, většina vědců se shoduje, že měď se specificky váže na oblast oktapeptidu k N-konci prionového proteinu. Doplnkové studie ukázaly, že zvýšená exprese PrP<sup>C</sup> má za následek vyšší vazby mědi v membránové frakci, což dále podporuje představu o tom, že PrP<sup>C</sup> je přenašeč mědi<sup>17</sup>. Již dříve bylo dokázáno, že měď vázaná na PrP<sup>C</sup> může být přijata do buněk<sup>18</sup>. Regulace dodávek mědi prostřednictvím endocytózy PrP<sup>C</sup> z buněčného povrchu do endozomu probíhá vlivem změn pH. Vědci se domnívají, že měďnaté ionty mohou usnadňovat nebo inhibovat a to – buď agregaci patogenních prionových proteinů, nebo konverzi PrP<sup>C</sup> na PrP<sup>Sc</sup><sup>19</sup>. Je také známo, že mědi vázané proteiny mohou často vázat i jiné dvojmocné kationty – například zinek a to pouze za určitých okolností. Schopnosti PrP<sup>C</sup> vázat další kationty jsou stále předmětem mnoha studií. Rekombinantní prionové proteiny za normálních okolností nevykazují vysokou afinitu vůči zinku<sup>18</sup>. Zinek je kromě mědi jediný kov, jenž vyvolává u PrP<sup>C</sup> endocytózu. Stejně tak jako měď může inhibovat tvorbu fibril a podporovat intermolekulární interakce<sup>11</sup>.

### Interakce prionových proteinů s těžkými kovy

Kadmium (Cd) je kov kontaminující životní prostředí a to buď přirozeně, nebo vlivem průmyslové výroby. Toxicita kadmia je historicky velmi úzce spjata s homeostázou zinku a oxidativním stresem v buňkách savců. Z tohoto důvodu je možné, že existuje jeho spojení i s prionovými proteiny, které mají taktéž svou roli v regulaci oxidativního stresu. Rozšířený výskyt kadmia v životním prostředí představuje nadále hrozbu pro lidské zdraví a to i přes snahu omezit jeho technické využití. Biologicky významná iontová forma kadmia – Cd<sup>2+</sup> váže mnoho biologických molekul a tyto interakce jsou základem mechanismu, který způsobuje toxicitu kadmia. Je také velmi pravděpodobné, že toxicita kadmia je nejčastěji zprostředkována biologickými systémy zesilovanými signály, jež se spouští přítomností Cd<sup>2+</sup> kationtů<sup>20</sup>.

### Prionová onemocnění

Prionové choroby, nazývané také přenosné spongiformní encefalopatie (TSE) jsou skupinou onemocnění, která ovlivňují mozek a nervovou soustavu člověka a zvířat<sup>10</sup>. U lidí tato skupina zahrnuje například Creutzfeldt-Jakobovu nemoc a u zvířat bovinní spongiformní encefalopatii (BSE), chronické chřadnutí jelenovitých (CWD) a scrapii<sup>9</sup>. Tyto choroby mají jedinečný mechanismus přenosu a přesto, že jsou poměrně vzácné, jsou i velmi obávané. V poslední době se objevila nová variantní forma CJD (vCJD), která byla spojena s konzumací masa kontaminovaného BSE. Tato skutečnost postavila priony do úplně nového světla<sup>7</sup>. Prionová onemocnění se mohou dále také projevit jako sporadické, genetické nebo jako infekční neurodegenerativní poruchy<sup>10</sup>. Prionová infekce je obvykle zahájena v periferních orgánech, ale mechanismy podílející se na infekci rozšířených do mozku nejsou prozatím úplně objasněny<sup>9</sup>. Hlavním rysem těchto chorob je post-translační konverze buněčného prionového proteinu PrP<sup>C</sup> do jeho abnormální izoformy označované jako PrP<sup>Sc</sup><sup>21</sup>. Stanley B. Prusiner pojmenoval tuto pozměněnou formu jako takzvaný prion, což bylo označení malé proteinové infekční částice, která postrádá genomicky kódované nukleové kyseliny<sup>10</sup>. Primárním symptomem lidského prionového onemocnění je demence. Demence je obvykle doprovázena ještě projevy motorické dysfunkce, jako je cereberální ataxie, myoklonie a pyramidální či extrapyramidální znaky<sup>8</sup>. Infekční šíření prionů

probíhá přes PrP<sup>Sc</sup> formu přeměny endogenního fondu PrP<sup>C</sup> molekul. Tento proces samostatného množení proteinů se vyskytuje analogicky i u ostatních druhů<sup>22</sup>. Jak bylo řečeno již dříve, prionová onemocnění dělíme na dva druhy-lidské a zvířecí<sup>23</sup>.

### **Prionová onemocnění člověka Creutzfeldt-Jakobova choroba (CJD)**

Creutzfeldt-Jakobova choroba (CJD) je rychlé progresivní spongiformní neurodegenerativní onemocnění centrálního nervového systému. Mezi základní symptomy této choroby patří demence, ataxie a myoklonie. V jedné třetině případů se toto onemocnění může z počátku projevovat nespecifickými psychiatrickými symptomy, jako je únava, úzkost nebo změna osobnosti<sup>24</sup>. Rozeznáváme 4 druhy CJD:

Sporadická CJD (sCJD) – spontánní proteinová transformace nebo mutace somatické buňky, která je zodpovědná za 85 % případů této choroby.

Genetická/familiární CJD (fCJD) – vzniká v důsledku familiární mutace, je dědičná a zodpovídá přibližně za 15 % případů tohoto onemocnění.

Získaná/Iatrogenní CJD (iCJD) – způsobená kontaktem s infikovanou tkání (méně jak 1% případů). Například „kuru“ – nákaza je možná rituálním kaniibalismem nebo při zdravotnických zákrocích, avšak tyto případy jsou ojedinělé.

Varietní CJD (vCJD) – po požití masa ze zvířat nakažených boviní spongiformní encefalopatií<sup>25</sup>.

### **Fatální familiární insomnie (FFI)**

Toto onemocnění bylo poprvé popsáno v roce 1986<sup>26</sup>, avšak jeho genetická podstata byla objevena až v roce 1992. FFI se projevuje nespavostí, ataxií, dysartrií, později nastupuje myoklonie a mohou se objevit i pyramidové příznaky<sup>27</sup>. Ke konci choroby nastupuje úplná insomnie s těžkou demencí, dystonií, rigiditou a mutismem. Příčinou tohoto onemocnění je mutace D178N asociovaná s methioninem v pozici<sup>129 28</sup>.

### **Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom (GSS)**

Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění, jehož příznaky se poprvé objevují zpravidla ke konci čtvrtého decennia. Onemocnění má delší dobu trvání

než například výše zmíněná CJD. Typickým symptomem pro onemocnění je ataxie s poruchami chůze. Dalšími příznaky mohou být bolestivé parestezie a dyestezie či pruritus. GSS může probíhat také atypicky. Byly popsány případy geneticky potvrzené GSS, avšak probíhající pod obrazem sporadické CJD či progresivní supranukleární obrny. První rozpoznanou mutací zodpovědnou za GSS je P102L. Tato mutace byla zjištěna rovněž u původní rodiny a popsána Gerstmannem<sup>29</sup>.

### **Prionová onemocnění u zvířat Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE)**

Tato choroba, často nazývaná jako „nemoc šílených krav“, se poprvé objevila ve Velké Británii<sup>30</sup>. Spongiformní degenerace tkání se u této choroby vyskytuje v infikovaném mozku bez zánětlivé odezvy. Z tohoto důvodu nejsou v krevním séru ani mozkomíšním moku přítomny specifické protilátky. Inkubační doba je různá a může trvat i několik let<sup>31</sup>. Bovinní spongiformní encefalopatie je chorobou, která spadá pod povinnost ohlášení v případě výskytu nákazy, a u které je pečlivě kontrolována likvidace mozků nakažených zvířat<sup>32</sup>.

### **Scrapie**

Scrapie se řadí mezi přenosné spongiformní encefalopatie (TSE), které se vyskytují převážně u ovcí a koz. Tato nemoc neurologického původu způsobuje u ovcí a koz změny chování, citlivosti a pohybu. Scrapie jako taková má spíše pomalý průběh a klinické příznaky nejsou často rozeznatelné od jiných neurologických diagnóz u malých přežvýkavců<sup>33</sup>. Sledování změn v lymforetikulárním systému ovcí se scrapíí bylo prováděné pomocí expresní profilární studie několika genů<sup>33</sup>.

### **Závěr**

Studium prionových proteinů je stále aktuální téma a v poslední době se jim věnuje zvýšená pozornost. Prionové proteiny způsobují také řadu onemocnění, jak již bylo zmíněno výše a případná léčba těchto onemocnění je stále ve fázi výzkumu. Jedná se o infekční částice, které jsou tvořeny pouze bílkovinou. Existuje spousta medikamentů, které zmírňují symptomy, avšak nemoc zcela nevyléčí. Z našeho pohledu jsou velmi důležité interakce s kovy esenciálními a těžkými. Vzhledem k tomu, že je PrP<sup>C</sup> kov-vázající protein je velmi pravděpodobné, že se budou kovy podílet na mechanismech přeměny nepatogenní formy prionů

(PrP<sup>C</sup>) na svou patogenní formu (PrP<sup>S</sup>). Interakce prionů a těžkých kovů není ještě dostatečně prozkoumána a z tohoto důvodu bychom se v budoucnu rádi věnovali právě výzkumu této problematiky. Nejen esenciální, ale i těžké kovy se mohou zapojovat do procesů probíhajících v organismu. Jejich ovlivnění těchto dějů však může být větší, než bychom očekávali. Z esenciálních kovů je velice důležitá měď, kterou PrP<sup>C</sup> váže v metabolismu přirozeně.

*Tato práce byla financována z projektu (CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068)*

## Literatura

- S. Mouillet-Richard, M. Ermonval, C. Chebassier, J. L. Laplanche, S. Lehmann, J. M. Launay, O. Kellermann, *Science* 2000, 289, 1925-1928 DOI 10.1126/science.289.5486.1925.
- S. Kralovicova, S. N. Fontaine, A. Alderton, J. Alderman, K. V. Ragnarsdottir, S. J. Collins, D. R. Brown, *Molecular and Cellular Neuroscience* 2009, 41, 135-147 DOI 10.1016/j.mcn.2009.02.002.
- D. R. Brown, W. J. SchulzSchaeffer, B. Schmidt, H. A. Kretschmar, *Experimental Neurology* 1997, 146, 104-112 DOI 10.1006/exnr.1997.6505.
- S. B. Prusiner, M. R. Scott, S. J. DeArmond, F. E. Cohen, *Cell* 1998, 93, 337-48.
- R. Morales, K. Abid, C. Soto, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 2007, 1772, 681-691 DOI 10.1016/j.bbadis.2006.12.006.
- M. E. Arnold, J. W. Wilesmith, *Preventive Veterinary Medicine* 2004, 66, 35-47 DOI 10.1016/j.prevetmed.2004.07.007.
- C. W. Yi, W. C. Xu, J. Chen, Y. Liang, *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 2013, 45, 520-526 Doi 10.1093/Abbs/Gmt052.
- D. A. Harris, *Clinical Microbiology Reviews* 1999, 12, 429-+.
- B. Fevrier, D. Vilette, F. Archer, D. Loew, W. Faigle, M. Vidal, H. Laude, G. Raposo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101, 9683-9688 DOI 10.1073/pnas.0308413101.
- Z. Zhou, G. F. Xiao, *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 2013, 45, 465-476 Doi 10.1093/Abbs/Gmt027.
- E. D. Walter, D. J. Stevens, M. P. Visconte, G. L. Millhauser, *Journal of the American Chemical Society* 2007, 129, 15440-+ Doi 10.1021/Ja077146j.
- D. Dormont, *Febs Letters* 2002, 529, 17-21 Pii S0014-5793(02)03268-4 Doi 10.1016/S0014-5793(02)03268-4.
- S. G. Chen, D. B. Teplow, P. Parchi, J. K. Teller, P. Gambetti, L. Autiliogambetti, *Journal of Biological Chemistry* 1995, 270, 19173-19180.
- E. Gaggelli, H. Kozlowski, D. Valensin, G. Valensin, *Chemical Reviews* 2006, 106, 1995-2044 Doi 10.1021/Cr040410w.
- S. Lehmann, *Current Opinion in Chemical Biology* 2002, 6, 187-192 Doi 10.1016/S1367-5931(02)00295-8.
- A. Rana, D. Gnanaswari, S. Bansal, B. Kundu, *Chemico-Biological Interactions* 2009, 181, 282-291 DOI 10.1016/j.cbi.2009.07.021.
- C. J. Choi, A. Kanthasamy, V. Anantharam, A. G. Kanthasamy, *Neurotoxicology* 2006, 27, 777-787 DOI 10.1016/j.neuro.2006.06.004.
- D. R. Brown, *Brain Research Bulletin* 2001, 55, 165-173 Doi 10.1016/S0361-9230(01)00453-1.
- S. P. Leach, M. D. Salman, D. Hamar, *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 2006, 7, 97-105 10.1017/S1466252307001181.
- J. M. Moulis, *Biomaterials* 2010, 23, 877-896 DOI 10.1007/s10534-010-9336-y.
- J. D. F. Wadsworth, J. Collinge, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 2007, 1772, 598-609 DOI 10.1016/j.bbadis.2007.02.010.
- E. Biasini, J. A. Turnbaugh, U. Unterberger, D. A. Harris, *Trends in Neurosciences* 2012, 35, 92-103 DOI 10.1016/j.tins.2011.10.002.
- M. Glatzel, E. Abela, M. Maissen, A. Aguzzi, *The New England journal of medicine* 2003, 349, 1812-20 10.1056/NEJMoa030351.
- F. Coppede, M. Mancuso, G. Siciliano, L. Migliore, L. Murri, *Bioscience reports* 2006, 26, 341-67 10.1007/s10540-006-9028-6.
- R. G. Macfarlane, S. J. Wroe, J. Collinge, T. A. Yousry, H. R. Jager, *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 2007, 78, 664-670 DOI 10.1136/jnnp.2006.094821.
- E. Lugaresi, F. Cirignotta, P. Montagna, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1986, 49, 375-80.
- R. Medori, H. J. Tritschler, A. Leblanc, F. Villare, V. Manetto, H. Y. Chen, R. Xue, S. Leal, P. Montagna, P. Cortelli, P. Tinuper, P. Avoni, M. Mochi, A. Baruzzi, J. J. Hauw, J. Ott, E. Lugaresi, L. Autiliogambetti, P. Gambetti, *New England Journal of Medicine* 1992, 326, 444-449 Doi 10.1056/Nejm199202133260704.
- L. Monari, S. G. Chen, P. Brown, P. Parchi, R. B. Petersen, J. Mikol, F. Gray, P. Cortelli, P. Montagna, B. Ghetti, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, 91, 2839-42.
- S. Collins, C. A. McLean, C. L. Masters, *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 2001, 8, 387-97 10.1054/jocn.2001.0919.
- S. B. Prusiner, *Trends in Biochemical Sciences* 1996, 21, 482-487 Doi 10.1016/S0968-0004(96)10063-3.
- T. A. Holt, J. Phillips, *British medical journal* 1988, 296, 1581-2.
- J. W. Wilesmith, G. A. Wells, M. P. Cranwell, J. B. Ryan, *The Veterinary record* 1988, 123, 638-44.
- T. Konold, L. Phelan, *Journal of visualized experiments : JoVE* 2014, 10.3791/51101.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND).

Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.