

SPONGIFORMNE ENCEFALOPATIJE ALI NALEZLJIVE MOŽGANSKE AMILOIDOZE

Miha Likar*

UDK 616.831:577

Zgodba o prenosnih humanih spongiformnih encefalopatijah je predstavljena v treh delih: iz preteklosti, včeraj in danes in prihodnosti. Okužbe so opredeljene, kot prenosljive amiloidoze. Spontano novo nastajanje amiloidnih vlaken je dedno nadzorovano. Amiloidogenezo olajšujejo točkaste mutacije, ob katerih nastajajo spremembe v aminokislinah. Prenosljiva amiloidna vlakna so povzročitelji subakutnih spongiformnih encefalopatij. Za povzročitelje veljajo Kochovi postulati, kajti izpolnjujejo vse, kar ti postulati zahtevajo, tj. da je agens etiološki povzročitelj bolezni.

Iz preteklosti

Leta 1920 je Hans Creutzfeldt z Alzheimerske nevrološke klinike v Breslau poročal o primeru nove in nenavadne nevrološke bolezni pri mladi ženski, ki jo je videl nekaj let prej. Bolnična mati je umrla v 54. letu starosti iz neznanih vzrokov, sestri pa sta bili slaboumni. Ženska je zbolela stara 22 let, imela je krče, hitro je izgubljala skladnost gibov in postajala vedno bolj pozabljiva in dementna. Umrla je v epileptičnem napadu 12 mesecev po začetku bolezni. Pri preiskavi njenih možganov so našli zmerno atrofijo, splošno usihanje živčnih celic, hudo razraščanje opornih celic in obojestransko izrajanje pomembnih živčnih povezav (1).

Leto dni pozneje, leta 1921, je Alfons Jakob z univerze v Hamburgu objavil primer štirih bolnikov, ki naj bi bili podobni bolnici, ki jo je opisal Creutzfeldt. Bolezen je imenoval "spastična pseudoskleroza". Med temi bolniki le eden ustreza bolezni Creutzfeldta: 42 letni moški je najprej tožil zaradi bolečin v nogah in vrtoglavice. Pozneje je dvojno videl in sam čutil, da mu pojemajo duševne zmožnosti. Imel je hude težave z govorom in tresavico obraznih mišic, pred smrtjo je zapadel v dementno otrplost. Mikroskopska preiskava njegovih možganov je pokazala podobne spremembe, kakor jih je opisal Creutzfeldt.

Opisane primere so pozneje vnovič preiskovali mikroskopsko in našli gobasto (spongiformno) luknjavost (vakuolizacijo) živčnih prepletov v možganski skorji in v eni od plasti malih možganov. Opisana bolnika sta imela očitno bolezen, ki jo danes imenujemo Creutzfeldt-Jakobova bolezen (CJB).

Skoraj ob istem času je Josef Gerstmann, ki sta se mu pridružila Ernst Sträussler in Isaack Scheinker, opisal družino, ki je zbolela za boleznijo, ki jo danes imenujemo sindrom Gerstmann-Sträussler-Scheinker (sindrom GSS). Prva je zbolela mlada ženska. Izgubila je čut za ravnovesje, postajala v svojih gibih vedno bolj okorna, govor ji je zastajal, razpoloženje se ji je nenadzorovano spreminjalo in

izgubljala je spomin. Ob preiskavi se je že težko premikala zaradi splošne hipotoničnosti, čustveno je bila silno labilna in njen intelekt je bil prizadet. Pozneje so ji ohromeli očesni živci, imela je težave pri požiranju in postajala je vedno bolj dementna. Umrla je šest let po prvih znamenjih bolezni, ki je spominjala na bolezen njenega očeta, dveh bratov in več sorodnikov. Pri obdukciji so našli atrofične možgane s splošnim izrajanjem živcev, razraščanje opornih celic v možganih in vakuolizacijo, ki je bila najbolj očitna v malih možganih, kjer so odkrili tudi plake amiloida.

Včeraj in danes

Tako so v 1920. letih spoznali družinsko in sporadično obliko spongiformne encefalopatije; v naslednjih 30 letih se ni zgodilo nič novega. Bolezni, podobne opisanim, so se izgubile med drugimi nevrodegenerativnimi boleznimi neznanega izvora. Videti je bilo, da je bil poglavitni vzrok v tem, da se patologom gobaste spremembe v možganih in nalaganje amiloida niso zdele pomembne za diagnozo. Luknje v možganih jim niso bile videti pomembne, saj vemo, da "človek uporablja le majhen odstotek svojih možganov".

V 1960 letih so odkrili osupljive novosti. Carleton Gajdusek, Američan slovaškega rodu je odkril epidemično nevrodegenerativno bolezen pri osamljenem plemenu Fore v vzhodnem pogorju Papue Nove Gvineje. Domačini so bolezen dobro poznali in jo imenovali kuru, kar pomeni "človeka, ki se trese". Raziskovalci so jo imenovali "smejajava" zaradi spačenega obraza bolnikov z encefalopatijo (2).

Spoznali so, da je kuru po patologiji podoben scrapieju (praskavici, fr. "trem-

Preglednica. Naravne spongiformne encefalopatije (4) Table. Spongiform encephalopathies occurring in nature

PRI ČLOVEKU

kuru
Creutzfeldt-Jakobova bolezen
sporadična
družinska
varijanta CJB v VB
iatrogena (s humanim rastnim hormonom in gonadotropinom hipofize, presadki trde možganske opne, sterotaktičnimi elektrodami in drugimi orodji nevrokirurgov)
Gerstmann-Sträussler-Scheinker sindrom
družinski
družinski, podoben Alzheimerjevi bolezni
smrtna družinska nespečnost
netipična demenca
spastična pareza z demenco

PRI ŽIVALIH

scrapie (praskavica ovc in koz)
nalezljiva encefalopatija nork
kronična hiravost (losov, jelenjih mul)
goveja spongiformna encefalopatija (bolezen "norih krav", BSE)
eksotične encefalopatije kopitarjev (afriškega kozobika, številnih gazel, muflona idr.)
mačje spongiformne encefalopatije (mačk, albino triga, čite)

*prof. dr., Inštitut za mikrobiologijo Medicinske fakultete, Zaloška 4, Ljubljana

144 blante"), boleznimi ovc in koz, za katero so že v tridesetih letih dokazali, da je nalezljiva. Gajdusek je sprva iskal vzroke za kuru v dednosti, pozneje pa je s svojimi sodelavci dokazal, da se kuru prenaša na opice. Poskus je postal klasičen primer znanstvene zagrizenosti, kajti opica je zbolela za kurjem šele več let po vbrizganju možganov bolnika s kurjem. Gajdusova skupina je vložila v raziskave silen trud, od leta 1954 do danes ni minilo leto, da Gajdusek ne bi obiskal domačinov plemena Fore na Novi Gvineji. Spoznali so tudi, da so se domačini s kurjem okužili zaradi obrednega uživanja tkiv umrlih svojcev. Za dokaz nalezljivosti kurja je Gajdusek dobil Nobelovo nagrado za medicino.

Raziskave so napredovale, ko so spoznali nevropatološke podobnosti med kurjem, CJB in sindromom GSS, ki jim jih je takrat uspelo prenesti na primat.

Povezava med boleznimi človeka in živali je bila videti od vsega začetka nadvse pomembna. Medicinske raziskave so v tistem času v ZDA doživljale pravo obilje sredstev (govorili so kar o "kornukopiji"). Tega obilja so bili deležni tudi veterinarji, ki so bili dotlej vedno le "revni sorodniki" medicincev. V kratkem času so prenesli spongiformne encefalopatije na glodalce, kar je povečalo možnosti za raziskovanje vseh podobnih bolezni. Število spongiformnih encefalopatij se je naglo povečalo (3).

Spongiformne encefalopatije so raziskovali teoretično in tudi iz praktičnih vidikov. Bolezni so opredelili kakor multisistemne, za katere so pri človeku značilni subakutni nastanek demence, znamenja možganske okvare, mišična krčenja in obdobja dejavnost elektroencefalograma (EEG). Oblikovale so se tri značilnosti patologije teh bolezni: gobasta luknjavost možganov (spongiformna vakuolizacija), razraščanje opornih celic v možganih (celic glije) in usihanje nevronov. Pri nekaj odstotkih bolnikov so opisovali tudi amiloidne obloge.

Pomemben napredek se je zgodil leta 1981: z elektronskim mikroskopom so našli v izvlečkih možganov živali s scrapiejem vlaknate strukture, ki so jih kmalu zatem odkrili tudi pri ljudeh s spongiformno encefalopatijo (5). Sledila je vrsta odličnih molekularno-bioloških poskusov, s katerimi so dokazali, da takšne fibrile ohranijo nalezljivost tudi očiščene drugih primesi. Posamezno vlakno sestavlja večji odlomek beljakovine, ki je odporna proti proteinazam. Njegov manjši odlomek pa je izredno zanimiv: izdelali so zaporedje njegovih aminokislin in z ustreznim cDNK tega odlomka (kakor s sondo) v "knjižnici DNK možganov" živali, inficiranih s scrapiejem, odkrili gen, ki nosi zapis za vso beljakovino – predhodnico. Raziskovalce je osupnilo, da zapisa te beljakovine ne nosi tuja molekula, temveč gostitelj gen, ki je na kromosomu 20 (6).

Nastalo je vprašanje, kaj počne gostiteljeva normalna beljakovina kot poglavitna sestavina v nalezljivih izvlečkih možganov. Poskusi za inaktiviranje "prionov", kakor so imenovali povzročitelje kurja in

CJB, so pokazali, da jih uničijo le z metodami, ki zdaleč presegajo moč navadnih sredstev za inaktiviranje virusov in drugih mikroorganizmov. Agens CJB inaktivirata le 4 odstotna solna kislina in normalni lug. Nenavadne lastnosti teh snovi so vzbudile različne domneve o njihovi naravi. Prionska hipoteza je predvidevala, da sestavlja te agense prionski protein (PrP), ki ima nukleinsko kislino, vendar z manj kakor 50 bazami. Po tej hipotezi se beljakovina spreminja in pri tem izzove podobne spremembe v drugih gostiteljevih molekulah. Po drugi "virino" zamisli, naj bi bil v kompleks PrP vključen droben genom nukleinske kisline. Tretja hipoteza je agense uvrstila med viruse. Nobena od naštetih hipotez se ni potrdila. Odgovor naj bi bil nenavaden protein amiloid, ki ga najdemo pri teh boleznih in ki ohrani nalezljivost tudi po očiščenju (7).

Tako se je vnovič porodila misel o prionu. Ime je agens kurja dobil po ptici doma na južnih morjih ali kot vzdevek za "proteinski nalezljivi delec". Prvotno ornitološko ime je bilo nadvse ustrezno, kajti ta ptica se izredno hitro prilagaja svojem okolju, ki je na Pacifiku pogosto burno.

Na tej stopnji raziskav spongiformnih encefalopatij, ki so jih začeli imenovati kar nalezljive možganske amiloidoze, se je začela epidemija "norih krav" v Veliki Britaniji. Prvi primer so opisali novembra 1986.

Epidemiološke raziskave nakazujejo, da kroži agens bovine spongiformne encefalopatije (BSE) med govedi, prišel pa naj bi od scrapije ovc ali koz v začetku 60. let. Praskavica je v Veliki Britaniji desetkalo črede ovc že več kakor 200 let. Videti je, da je epidemijo BSE pri govedu izzvala sprememba tehnologije za pripravo kostne moke in mesne hrane, ki so ju dodajali krmi za živino. Po nasvetu narovarstvenikov naj bi zmanjšali količino uporabljenih lipidnih topil, zlasti acetona, in s tem pretrgali inaktivacijo agensa scrapieja (8). V naslednjih letih so agens BSE prenašali z goved na govedo zaradi "recikliranja" živalskih trupel, ki so bila inficirana.

Napovedi o pogubnem sevu BSE, ki naj bi se spremenil ob prehajanju prek govedi in postal virulenten za človeka (v Veliki Britaniji so v zadnjih letih opazili nekaj več primerov CJB, ki jo je Svetovna zdravstvena organizacija poimenovala varianta CJB), so izzvale številne apokaliptične izjave, da bo velik del prebivalcev Otoka po dolgi inkubaciji zbolel za CJB podobno boleznijo (9, 10).

Odzivi medijev, javnosti in državnih uradnikov so vznemirljivi. Danes znanstveno ni moč dokazati, da so mračni scenariji nemogoči. Pošten znanstvenik ne more z gotovostjo trditi, da se kaj takega ne bo zgodilo. Lahko le posredno dokaže, da so grozljive napovedi zmotne (11).

Na tej stopnji raziskav spongiformnih encefalopatij so stopili na prizorišče molekularni genetiki. Njihovo zanimanje za te bolezni ni nepričakovano, saj je bilo že dolgo časa znano, da so nekatere značilnosti scrapieja dedne. Pokazalo se je, da je pri tem dejaven gen, ki nosi zapis

za novo odkrito beljakovino amiloid ali bolje za njen predhodnik. Pri družinah s spongiformnimi encefalopatijami so začeli iskati mutacije tega zanimivega gena in v kratkem času odkrili več točkastih in insertnih mutacij.

Osupljivo je, da je vsaka mutacija tega gena za proteinski predhodnik povezana z določenim kliničnim sindromom (12). Mutacije na kodonu 102 ugotavljajo pri klasičnem sindromu GSS. Tudi pri prvotno opisani družini s tem sindromom so opisali to mutacijo. Družine z mutacijo na kodonu 178 kažejo znamenja CJB podobnega sindroma, pri družinah z mutacijo na kodonu 200 pa se bolezen pogosto začne pri mlajših ljudeh. Ta oblika CJB je danes epidemična v kraju Orava na Slovaškem (13). Tudi najnovejši genetiki pa priznavajo, da ni vedno ostre meje med oblikami CJB in sindromom GSS.

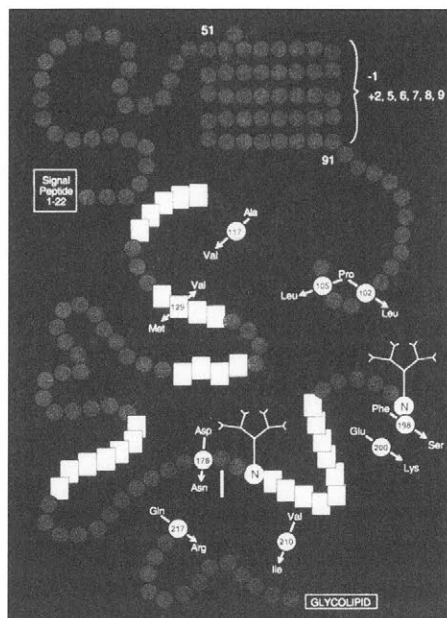
Bolezen dobi docela drugačno podobo, kadar nosi mutiran alel kodona 129 zapis za metionin: bolniki imajo zgodnje vegetativne motnje, ki se razvijajo v smrtno družinsko nespečnost. Pri treh bolnikih ugotavljajo usihanje nevronov in razraščanje opornih celic v možganih, ne pa gobastega izražanja možganov.

Opazovanja nakazujejo, da z mutacijo spremenjene aminokisline lahko in vivo spremenijo zaporedje peptidov v svoji okolici, nastajati začnejo fibrile amiloida. Spremenjena molekula naj bi fizično ovirala novonastale kopije beljakovine s samosestavljanjem. Amiloidna beljakovina se nabira v večjih količinah in je za živčevje strupena (12).

Hipoteza o citoplazemskem dedovanju ni nova. Predmolekularni biologi so ga pogosto opisovali pri nižjih organizmih in opozarjali, da nove molekule, ki vstopajo v celico, ne prihajajo v prazen prostor, temveč v strukturirano celico. Molekularne strukture pa so bistvena sestavina, ki določa namestitve in oblikovanje novih formacij molekul ali kakor pravimo, odločajo o konfiguraciji. Spremenjena struktura naj bi tako vplivala na motnje okolja v celici, da normalno oblikovane strukture ne bi več nastajale, dovolile pa bi reprodukcijo spremenjenih oblik. Hipoteza je videti zadovoljiva, vendar se ukvarja le s patogeno nastajanja amiloida, ne odgovori pa na vprašanje, kako nastane prva molekula, kaj deluje na prvo belja-



Slika 1. Izvirni prion (rod *Pachyptila*) iz družine morskih ptic južne poloble; iz knjižnice Smithsonian Institution
Figure 1. The "original" prion (genus *Pachyptila*), a family of southern hemisphere seabirds; the library of the Smithsonian Institution



Slika 2. "Novi prion", akronim za "proteinast infekcijski partikel", agens spongiformnih encefalopatij, ki se replicira; osnova je veriga 230 aminokislin z zapleteno sekundarno zgradbo; pomembna sta alfa-heliks in beta-konfiguracija; puščice kažejo mutacije, ki so specifične za bolezen; med položaji 51 in 91 so inserti značilni za bolezen in tudi ena deležja, prav tako pomembna za obliko CJB (1)

Figure 2. The "modern" prion, an acronym for "proteinaceous particle", the replicating agent of spongiform encephalopathies; the 230 amino acids backbone with a complicated secondary structure; alpha-helix and beta-configuration are significant; the arrows show mutations specific for clinical form of disease; between position 51 and 91 is the site of disease specific inserts with one deletion important for the form of CJB (1)

kovinsko molekulo, da se spremeni v obliko, ki je sposobna vzbuditi nenormalno replikacijo normalne beljakovine v izoformno.

Prihodnost

Molekularna biologija in genetika ponujata nove poti za raziskovanje nalezljivih amiloidoz pri ljudeh in živalih. Zanimive so povezave med mutacijami gena, ki nosi zapis o predhodniku beljakovine z ne- navadnimi lastnostmi. Bolniki iz družin z mutacijo kodona 200 se fenotipično ne razlikujejo od sporadičnih bolnikov, kar lahko pojasni vlogo nepravilnosti istega področja beljakovine pri sporadičnih primerih bolezni.

Raziskovanja na živalih so napredovala, ko so pripravili "transgenske miši", ki so vstavili raziskovani gen z ustreznim vektorjem. Novi gen je vplival na fenotip bolezni. Miši z mutacijo na humanem kodonu 200 zbolevajo na primer za spongiformno encefalopatijo spontano brez infekcije od zunaj. Poskuse pri miših, ki so jim inaktivirali takojenovane "knockout" miši, pa so odvisne od okužbe od zunaj, sicer ne zbolijo za spongiformno

encefalopatijo. Tako so dokazali, da je kodirana gostiteljeva beljakovina nujna sestavina bolezenskega dogajanja in hkrati nakazuje, da je beljakovina sama tudi nalezljivi agens.

Biokemiki bodo najbrž pojasnili razločke pri oblikovanju normalnih in spremenjenih predhodnikov beljakovine. Vzporedne preiskave okuženih in neokuženih celičnih kultur bodo nemara ugotovile fiziološke učinke poti normalne in spremenjene beljakovine.

Biofiziki bodo najbrž nadrobneje preučili nastajanje amiloida in vivo. Pridelali so že sintetične peptide, ki se in vitro spreminjajo v fibrile. Poskusi so bili uspešni, kadar so pomešali peptide z normalnimi in mutiranimi zaporedji. Takšni peptidi so strupeni za živčevje (14).

Naslednji korak pri raziskovanjih bo najbrž preučiti dinamiko nastajanja fibril, da bi spoznali, ali so peptidne mutante sposobne spodbuditi normalne peptide, da pridelujejo amiloidne fibrile.

Raziskovalci vseh strok želijo združiti vse podatke o tej bolezni in njenem zdravljenju. Molekularni genetiki obljublajo, da bodo lahko onesposobili gen pri človeku s praktičnimi metodami. Biokemiki in molekularni biologi bodo pripravili utemeljiti strategijo, ki bo farmakološko preprečevala spreminjanje beljakovine v nepravilno obliko in s tem pretrgali nepravilno presnovno pot. Pravijo, da smo na pragu "pogumnega novega sveta" po Shakespearju za infekcijske amiloidoze, kajti tudi z danes revnim znanjem si lahko zamislimo, kako bi se dalo preprečevati in zdraviti te redke in pogubne bolezni.

V Veliki Britaniji trdijo, da so že dosedanji ukrepi precej zajezili epidemijo "norih krav": številne izdelke iz govedi, na primer želatino, že obdelujejo s kislino in lugom in odstranjujejo nevarni agens, bolne živali uničujejo in trdijo, da je število nanovo zbolelih že bistveno manjše. Pri nas so razumljivo prepovedali uvoz govejega mesa iz dežel, kjer je BSE že odkrita, na primer Velike Britanije, Francije, Švice, Portugalske idr.

6. Brown P, Cervenakova L, Goldfarb et al. (1994). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: An example of the interplay between ancient genes and modern medicine. *Neurology* 44: 291-293.
7. Gajdusek CD (1994). New concepts in pathogenesis of slow viral infections: Infectious amyloids. 2nd UNESCO South North Human genom Conf., Beijing, 128-129.
8. Martino Di A, Safar J in Gibbs CJ jr. (1994). The consistent use of organic solvents for purification of phospholipids from brain tissue effectively removes scrapie infectivity. *Biologicals* 22: 221-225.
9. Tabrizi SJ, Scaravilli F, Howard RS in Collinge J (1996). Creutzfeldt-Jakob disease in a young woman. *Lancet* 347: 945-948.
10. WHO, Press release, 5/4, 1996.
11. Gajdusek CD (1995) Infectious amyloids: from kuru to BSE- AO Virtanen Centennial Symposium, The frontiers of contemporary science, Kuopio, Finland, June 5-7.
12. Chapman J, Brown P, Goldfarb LG et al. (1993). Clinical heterogeneity and unusual presentation of Creutzfeldt-Jakob disease in Jewish patients with PRPN codon 200 mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56: 1109-1112.
13. Gajdusek CD (1992). Genetic control of de novo conversion to infectious amyloids of host precursor proteins: kuru - CJD - scrapie. v *Current topics of biomedical research*, edit. Reinhard Kurth in Walter Schwerdfeger, Springer Verlag, 96-123.
14. Goldfarb LS, Brown P, Haltia M et al. (1993). Synthetic peptides corresponding to different mutated regions of the amyloid gene in familial CJD who enhanced in vitro formation of morphologically different amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 441-454.

Miha Likar

Spongiform Encephalopathies or Infectious Amyloidoses of the Brain

The story of transmissible human spongiform encephalopathy from its origins to the present time is presented in three parts. Origins, Yesterday, and Today and Tomorrow. These infections are now recognized as transmissible amyloidoses. It is pointed out that spontaneous de novo generation of amyloid fibrils is under genetic control. Amyloidogenesis is shown to be facilitated by amino acid changes occurring during point mutations. These infectious amyloids are the causative agents of the transmissible subacute spongiform encephalopathies for which Koch's postulates for an etiological transmissible agent have been satisfied.

1. Brown P (1994). "The brave new world" of transmissible spongiform encephalopathy (infectious cerebral amyloidosis). *Mol Neurobiol* 8: 79-87.
2. Gajdusek CD (1992). *Human Biology in Papua New Guinea*, edit. Attenborough R in Alpers M Clarendon Press.
3. Godfarl LG, Brown P (1955). The transmissible spongiform encephalopathies. *Ann Rev Med* 46: 57-65.
4. Gajdusek CD (1944). Nucleation of amyloidogenesis in infectious and noninfectious amyloidoses of brain. Slow infections of the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 724: 173-190.
5. Guirouy Don C, Liberski PP, Williams ES et al. (1994). Electron microscopic findings in brain of Rocky Mountain elk with chronic wasting disease. *Folia Neuropathol* 32: 171-173.