

NAGY STABILITÁSÚ TOXIKUS FEHÉRJESZERKEZETEK A NEURODEGENERATÍV BETEGSÉGEKBEN: PRIONOK ÉS AMILOIDOK

MAGYAR TUDOMÁNY ÜNNEPE

Penke Botond,
Szegedi Tudományegyetem,
Orvosi Vegytani Intézet

2012. november 8.

A PRIONOK CSAK FEHÉRJÉKBŐL ÁLLÓ FERTŐZŐ ANYAGOK

Gajdusek, Alper, Griffith (1966-1967)

A surlókor (scrapie) ill. a kuru betegség fertőző ágense nukleinsav nélkül is replikálódik!
(Először „lassú vírusnak” gondolták)

D. Griffith (1967):

„...subunits can polymerize only in the presence of polymeric >>condensation nuclei<<„
(seeding-nucleation modell)

Prion: proteinaceous infectious particle vagy protein only

Prion protein (PrP): a sejtmembrán külső részén helyezkedik el, a központi idegrendszer és a limforetikuláris rendszer sejtjeiben. A betegségért nem a natív konformációjú PrP^C, hanem a specifikus konformációváltással kialakuló PrP^{Sc} a felelős.

A PRIONOK JELLEGZETES TULAJDONSÁGAI

PrP^{Sc}: misfolding eredménye, hihetetlenül stabilis konformációjú, érzéketlen hőkezelésre, UV besugárzásra, formaldehid fixálásra
főleg β -szerkezetű fertőző izoforma: ez viszi tovább a betegséget

PrP^C→PrP^{Sc} átalakulás történhet de novo az élő szervezetben is!

A PrP^{Sc} katalizálja a PrP^C átalakulását, konformáció változását

A fertőző prion protein nem homogén! Különböző „törzsei” (konformációs változatai) vannak

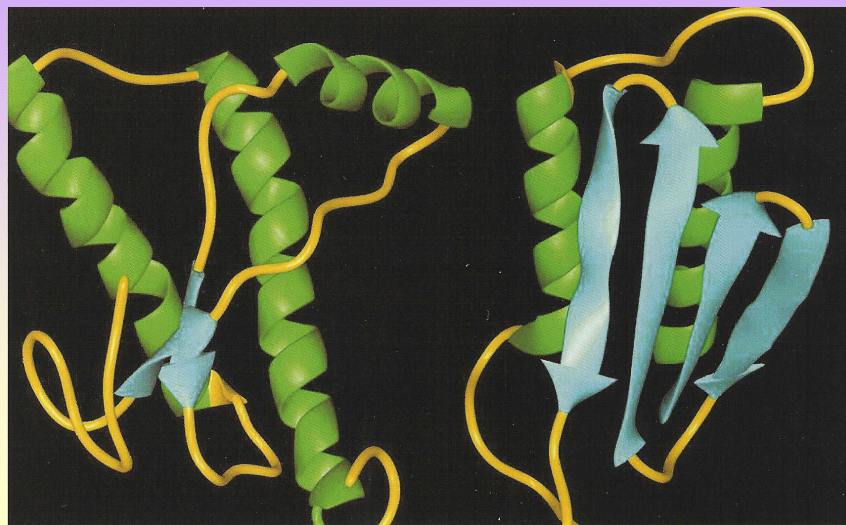
A különböző **PrP^{Sc}** törzsek egymástól kicsit eltérő prion betegséget okoznak:

- inkubációs idő
 - klinikai megjelenés
 - az agyi sérülés mintázata
- } különböznek

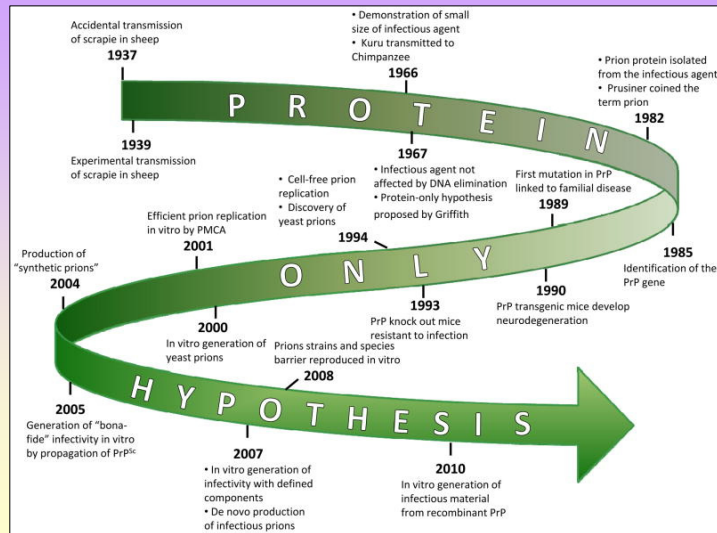
PRION PROTEINEK

PrP^C

PrP^{Sc}



A PRION HIPOTÉZIS MÉRFÖLDKÖVEI



C. Soto: Trends in Biochemical Sciences March 2011, Vol. 36, No. 3

ÁLLATI ÉS EMBERI PRION BETEGSÉGEK

Table 1 Etiology of prion diseases

Animal prion diseases			
Disease	Host	Etiology	Year of Description
Scrapie	Sheep, Goats	Infection with Prions of unknown origin	1732
TME	Mink	Infection with Prions of either sheep or cattle origin	1947
CWD	Cervids	Infection with Prions of unknown origin	1967
BSE	Cattle	Infection with Prions of unknown origin	1986
EUE	Nyala, Kudu	Infection with Prions of BSE origin	1986
FSE	Cats	Infection with prions of BSE origin	1990
NHP	Lemurs	Infection with Prions of BSE origin	1996
Human prion diseases			
Disease	Host	Etiology	Year of Description
Kuru	Human	Ritualistic Cannibalism or "Transumption"	1900s
sCJD	Human	Spontaneous PrP ^C → PrP ^{Sc} conversion or somatic mutation	1920
fCJD	Human	Mutations in <i>PRNP</i>	1924
GSS	Human	Mutations in <i>PRNP</i>	1936
iCJD	Human	Infection with Prions of human origin by cadaveric corneal grafts, hGH or dura mater	1974
FFI	Human	<i>PRNP</i> haplotype 178N-129M	1986
vCJD	Human	Infection with Prions of BSE origin	1996
sFI	Human	Spontaneous PrP ^C → PrP ^{Sc} conversion or somatic mutation	1999
VPSPr	Human	Spontaneous PrP ^C → PrP ^{Sc} conversion or somatic mutation	2008

M. Imron, S. Mahmood: Virol. J. 2011.

A PRION BETEGSÉGEK TERJEDÉSE, FAJOK KÖZÖTTI GÁTÁK

Creutzfeld-Jacob kór: ember – ember
ember – csimpánz

Surlókor (scrapie): juh → kecske ✗ ember, csimpánz

Szarvasmarha prion betegség (BSE): szarvasmarha → ember
(kisszámú eset)

(élelmiszer ellenőrzési probléma)

Általánosítható: könnyű a terjedés egy fajon belül ill. közeli rokon fajok között

A fajok közötti terjedés gátja a **PrP^{Sc}** aminosav sorrend különbözősége!

KÜLÖNBÖZŐ EMLŐS PRION FEHÉRJÉK AMINOSAV SORRENDJE

Mammalian PrP protein

	23		94
human		KKRFKPGG-WNTGGSRYPGQGSFPGGNRYPPQGGGQWGQPHGGGQWGQPHGGGQWGQPHGGGQWGQPHGGGQWGQ-----GGG	
bovine	G.....PHGGGGWGQ..	
sheep	G.....GWGQ..	
mouse		
hamster		
	95	129	175
human		THSQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYRENMHRYPNQVYRPMDEYSNQNNF	
bovine		..G.....V.....L.....	
sheep		S.....V.....L.....N.....V.....R.....	
mouse		..N.....L.....V.....M.....N.....W.....Y.....V.....Q.....	
hamster		..N.....N.....S.....ML.....N.....W.....N.....V.....Q.....N.....	
	176	254	
human		VHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYYQ--RGSSMVLFSPPFVILLISFLIFLIVG	
bovine	V.....E.....I.....Q.....A.....VI.....	
sheep	V.....I.....I.....Q.....A.....VI.....	
mouse	V.....I.....I.....V.....OK.....DGR.....S.....T.....	
hamster	V.....I.....I.....V.....QK.....DGR.....A.....	

E. G. Afanasieva et al,
Biochemistry M. 2011.

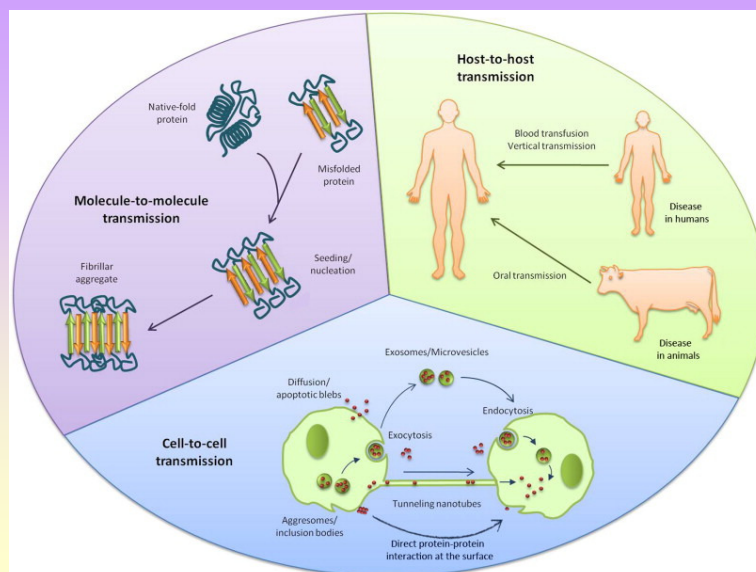
PRION BETEGSÉGEK ÁTVITELE (FŐEMLŐS KÍSÉRLETEK)

Table 1. Time line of prion transmission experiments to non-human primates

Year	Main finding	Reference
1966	Transmission of kuru to chimpanzees First transmission of a prion disease to non-human primates	[27]
1967	A second passage into chimpanzees with shortened incubation time of kuru hinting to adaptation	[29]
1968	Transmission of sCJD to chimpanzees by intracerebral inoculation	[36]
1972	Transmission of scrapie to cynomolgus monkeys	[35]
1972	Transmission of kuru to rhesus monkey with very long incubation time	[26]
1980	Oral transmission of kuru, sCJD and scrapie to squirrel monkeys	[33]
1981	Transmission of GSS to squirrel and spider monkeys	[69]
1994	Transmission of sCJD to a chimpanzee via brain electrodes used in a sCJD patient	[34]
1996	BSE is transmissible to cynomolgus macaques and presents like vCJD in humans	[59]
2001	A second passage of "primate" BSE shortened incubation time hinting to adaptation; i.e. inoculation is almost as efficient as i.c. infection	[60]
2001	vCJD transmit to primates; incubation time is shorter than with BSE	[60]
2004	Oral transmission of macaque adapted BSE to cynomolgus macaques	[48]
2004	Widespread detection of primate adapted BSE PrP ^{Sc} in peripheral tissues	[48]
2005	Oral transmission of cow BSE to cynomolgus macaques	[58]
2005	Transmission of CWD to squirrel monkeys	[67]
2008	L-BSE is transmissible to cynomolgus macaques with shorter incubation time than classical BSE	[21,73]
2010	vCJD PrP ^{Sc} in peripheral tissues can be detected at preclinical time points	[57]
2012	Oral transmission of L-BSE to mouse lemur	[70]

(S. Krasemann: *Folia Neuropathol.* 50 (1) 60; 2012)

PRION TRANZMISSZIÓS UTAK



Moreno-Gonzalez, C. Soto/ *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22(2011) 482-487

MIÉRT VOLT HIHETETLEN A PRION (PRIONOID) HIPOTÉZIS?

A prion nem a természet szeszélye, nem ritka esemény!

A „lassú vírus” hipotézist könnyen elfogadták, mert a vírus mégiscsak tartalmaz DNS-t vagy RNS-t –de a prionok-prionoidok egyszerűen csak fehérjék.

Hihetetlen tulajdonságaik:

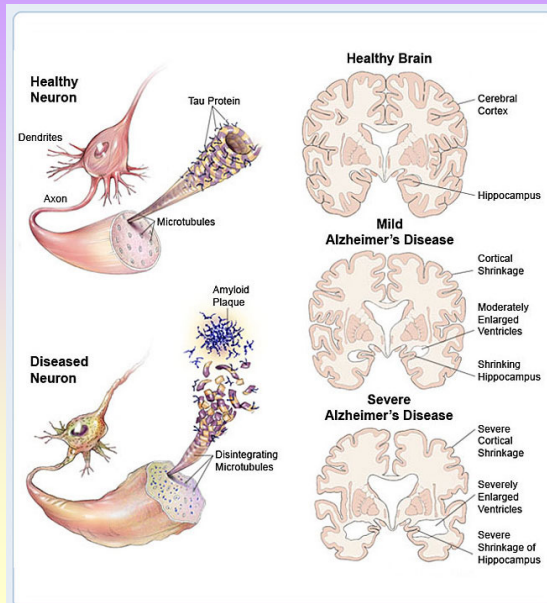
- 1) A protein úgy viselkedik, mint egy mikroorganizmus
- 2) Különböző úton-módon fertőz (akár szájon át is), sejtről-sejtre terjed
- 3) Nem bomlik le az emésztőcsatornában
- 4) „Sokszorozódásra” képes (self replication) –hozott anyagból!
PrP^C, PrP^{Sc} konverzió: seeding nucleation
- 5) Elindít egy olyan neurodegenerációs utat, ami elpusztítja a neuront

A prion-hipotézis mára bizonyítottnak tekinthető, de vannak homályos pontok (pl. kellene-e in vivo kofaktorok a prion-szerkezet stabilizálására, a clearance csökkentésére, a fertőzőképesség növelésére, stb.)

NEURODEGENERÁCIÓK MINT PRION BETEGSÉGEK: A NEURODEGENERATÍV BETEGSÉGEK NAGY RÉSZE FEHÉRJE AGGREGÁTUMOK KÉPZŐDÉSÉVEL JÁR

<u>BETEGSÉG</u>	<u>FEHÉRJE AGGREGÁTUM</u>
1. Alzheimer kór	β -amiloid (plakkok) tau (neurofibrilláris kötegek)
2. Parkinson kór	α -synuclein / ubiquitin
3. Lewy-testes demencia	α -synuclein
4. FTDP-17	tau (Pick-testek)
5. Huntington kór	poli-glutamin / ubiquitin
6. Prion betegség (Creutzfeld-Jacob kór)	prion protein
7. Pick betegség	tau (Pick-testek)
8. Amiotróf lateral sclerosis	ubiquitin
(9. Amyloid (2. típusú) diabetes	amylin)

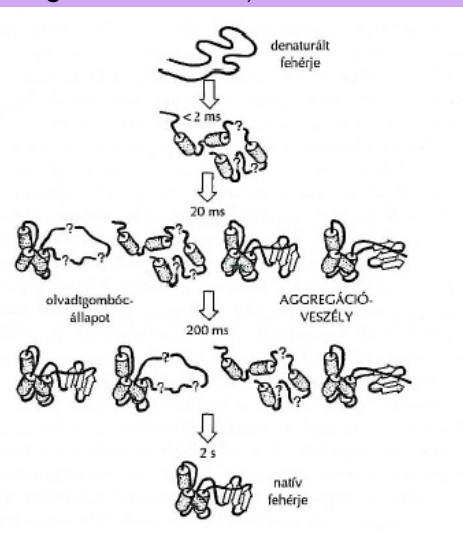
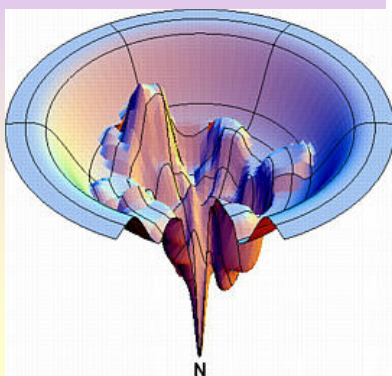
AZ ALZHEIMER-KÓR PATOLÓGIÁJA



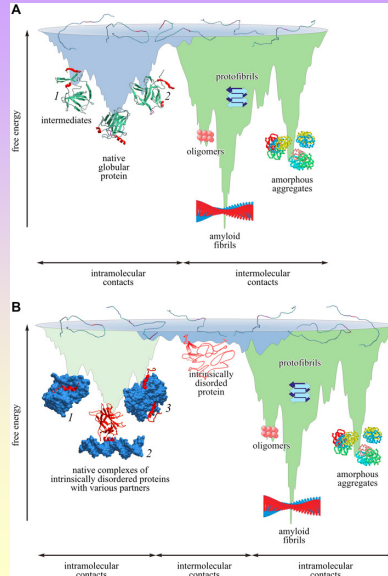
PROTEIN FOLDING

(„Our life is on the edge” –Luheshi 2008)

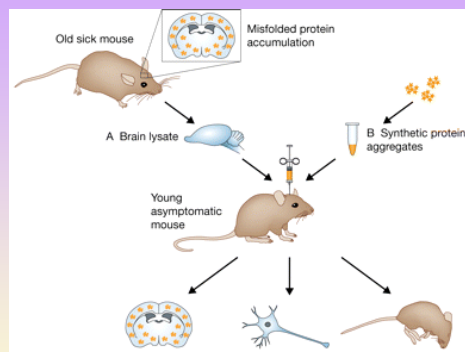
- Lab experiment
- Steps of folding



Protein folding és IDP szerkezetek (Uversky 2010)



A SEJTRŐL-SEJTRE TERJEDÉS BIZONYÍTÉKAI



	Induction of aggregation		Neuronal loss		Fatal disease	
	Lysate	Synthetic	Lysate	Synthetic	Lysate	Synthetic
PrP ^{Sc}	Yes ¹	Yes ²	Yes ¹	Yes ²	Yes ¹	Yes ²
Aβ	Yes ³	No ³	Yes ³	No ³	No ³	No ³
α-synuclein	Yes ^{4,5}	Yes ⁵	Yes ^{4,5}	Yes ⁵	Yes ^{4,5}	Yes ⁵
Tau	Yes ⁶	n.d.	Yes ⁶	n.d.	No ⁶	n.d.

¹Initially by Chandler 1961 and replicated by many; ²Wang et al. 2010; ³Meyer-Luehmann et al. 2006; ⁴Mougenot et al. 2011; ⁵Luk et al. 2012; ⁶Clavaguera et al. 2009

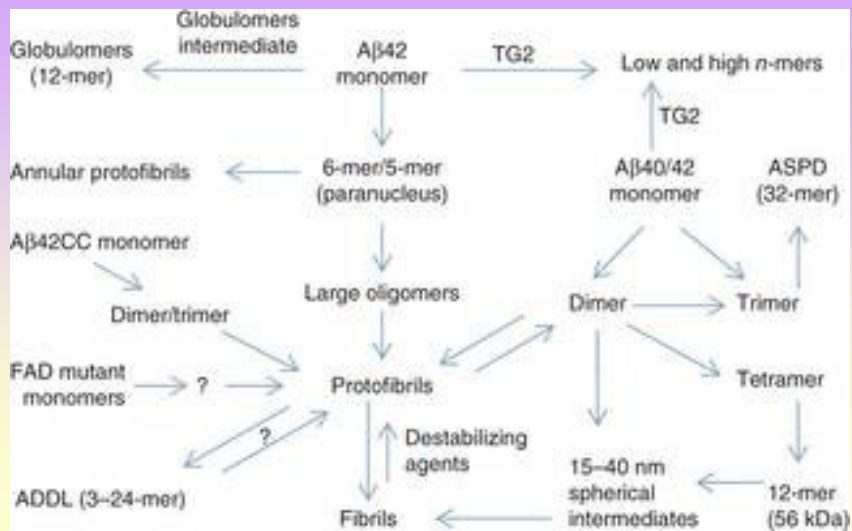
AZ ALZHEIMER-KÓR PRION BETEGSÉG JELLEGÉNEK BIZONYÍTÉKAI: A KÓR INOKULÁCIÓVAL ÁTVIHETŐ

Aguzzi (2009,2012): prionoids= self propagating, transmissible proteins
Protein Misfolding Cyclic Amplification: PMCA (Soto 2002, Saá 2006, Moreno-Gonzalez 2011)
Eisele Y.S. et al.: peripherally applied A β containing inoculates induce cerebral β -amyloidosis (Science 330: 980, 2010)
Jucker M, Walker LC: common molecular mechanism of neurodegenerative disorders - corruptive protein templating (Ann. Neurol. 70: 532, 2011)
Stöhr J. et al.: successful application of purified brain A β and synthetic A β prions for AD mouse model (PNAS 109: 11025, 2012)
Nath S. et al.: microinjection of oligomeric A β 1-42 into primary rat hippocampal neurons induces A β -transmission via direct neuron-to-neuron transfer (J. Neurosci. 32: 8767, 2012)
Nussbaum J.M. et al.: GlpA β 3-42 acts as prion in mice (Nature 485: 651, 2012)
Novak P.: Tauons and prions: infamous cousins? (JAD 26: 413, 2011)

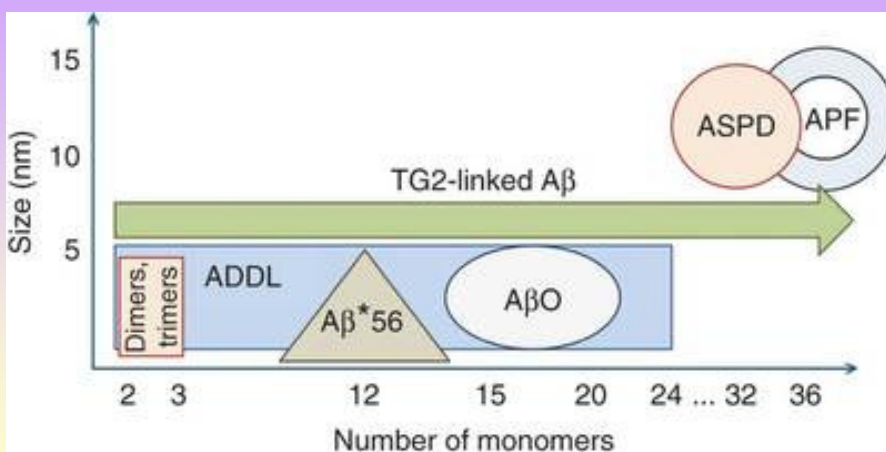
MIÉRT TOXIKUS A β -AMILOID 1-42?

**Asp¹-Ala²-Glu³-Phe⁴-Arg⁵-His⁶-Asp⁷-Ser⁸-Gly⁹-
-Tyr¹⁰-Glu¹¹-Val¹² -His¹³-His¹⁴-Gln¹⁵-Lys¹⁶-
-Leu¹⁷-Val¹⁸-Phe¹⁹-Phe²⁰-Ala²¹-Glu²²-Asp²³-
-Val²⁴-Gly²⁵-Ser²⁶-Asn²⁷-Lys²⁸-Gly²⁹-Ala³⁰-
-Ile³¹-Ile³²-Gly³³-Leu³⁴-Met³⁵-Val³⁶-Gly³⁷-Gly³⁸-
-Val³⁹-Val⁴⁰-Ile⁴¹-Ala⁴²-OH**

A β -AMILOID AGGREGÁCIÓS FORMÁI: MILYEN KONFORMÁCIÓVAL JELLEMEZHETŐ A PRIONOID A β ?



KÜLÖNBÖZŐ A β -OLIGOMEREK – KÜLÖNBÖZŐ PRION TÖRZSEK?



Irina Benilova Nature Neurosci 2012

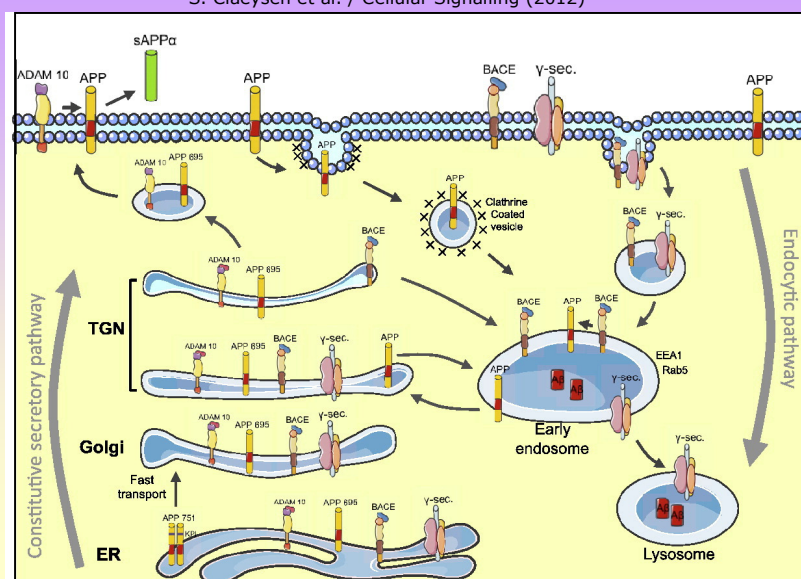
AZ ALZHEIMER-KÓR GENETIKAI HÁTTERE

R. E. Tanzi, Gold Spring Harbor Pers. Med. 2012.

Gene	Protein	Location	Risk change (%)	Proposed molecular phenotype
APOE	Apolipoprotein E	19q13	~400%-1500%	Clearance of A β ; lipid metabolism
CD33	CD33 (Siglec 3)	19q13.3	~10%	Innate immunity; degradation of A β
CLU	Clusterin	8p21.1	~10%	Clearance of A β ; innate immunity
CR1	Complement component (3b/4b) receptor 1	1q32	~15%	Clearance of A β ; innate immunity
PICALM	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly molecule	11q14	~15%	Production and clearance of A β ; cellular signaling
BIN1	Bridging integrator 1	2q14	~15%	Production and clearance of A β ; cellular signaling
ABCA7	ATP-binding cassette subfamily A member 7	19p13.3	~20%	Lipid metabolism; cellular signaling
CD2AP	CD2-associated protein	6p12.3	~10%	Cellular signaling
EPHA1	EPH receptor A1	7q34	~10%	Cellular signaling; innate immunity
MS4A6A/MS4A4E	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, members 6A and 4E	11q12.1	~10%	Cellular signaling
ATXN1	Ataxin 1	6p22.3	NA	Production of A β

HOL KÉPZŐDIK A PRIONOID A β ?

S. Claeysen et al. / Cellular Signalling (2012)



MÁS PRIONOID FEHÉRJÉK: TAU, α -SZINUKLEIN

Az IDP szerkezetű protein aggregátumok prion-szerűen terjednek neuronról neuronra

A. Aguzzi: The trans cellular spread of cytosolic amyloids, prions and prionoids Neuron **64**, 783-790, 2009

A. de Calignon et al: Propagation of tau-pathology in early AD model Neuron **73**, 685-697, 2012

L- Liu et al.: Transsynaptic spread of tau-pathology in vivo (AD) PLoS ONE 7:e31302, 2012

K.C. Luk et al.: Intracerebral inoculation of pathologic α -synuclein initiates α -synucleinopathy J. Exp. Med. **209**, 975-86, 2012 (PD)

AZ IDEGSEJTEK SPECIÁLIS SÉRÜLÉKENYSÉGE NEURODEGENERÁCIÓS BETEGSÉGEKBEN: PRIONOIDOK DE NOVO KÉPZŐDÉSE

Saxena és Caroni, 2011

Alzheimer-kór: n. raphe dorsalis → entorinális kéreg → hippocampus → neocortex
Különösen a gyenge vérellátású agyi területek érintettek
 O_2 és glükóz hiány → β -szekretáz \uparrow → A β képződés + pTau

Parkinson-kór: feketetest (s.nigra) → striatum (→ neocortex)
A s. nigra sejtjei különösen érzékenyek mitokondriális mérgekre
Mitokondriális diszfunkció → sejthalál

Amiotróf laterális szklerózis (ALS), motoneuron betegség
Gerincvelői motoneuronokban alacsony GABA_A,
igen alacsony Ca²⁺-puffer → ez indíthatja a neuronhalált

STRESSZOR – KÜSZÖB (THRESHOLD) MODELL:

Egy adott betegségnél adott neuron szubpopuláció különösen érzékeny a változásokra, a betegség ezek degenerációjával kezdődik, s innen elindulhat a prion-fázis – **de ez elvileg leállítható!**

TÉNYEK, TERVEK, AZ OPTIMIZMUS ALAPJA

- 1) Eddig csak a prion betegségekről mutatták ki, hogy fertőzés-szerűen terjedhet emberről-emberre, az AD, PD, HD, ALS nem!
- 2) Az IDP (misfolded) prionoidok egyetlen szervezeten belül maradnak, de ott sejtről-sejtre terjednek.
- 3) A prionoid-alapú neurodegenerációs betegségeknek közös alapmechanizmusa van –lehet közös a gyógyítás/kezelés is.
- 4) Az utolsó 5 évben megvalósult a fertőző PrP^{Sc} in vitro preparálása (PMCA technika) –hasonló módon előállíthatók majd nagy mennyiségben a kémiaiilag homogén, fertőző prionoidok (A β , α -szinuklein, ptau, poli-Gln, stb.) Ez lehetővé teszi a gyógyszerjelöltek exakt screenelését.

GYÓGYSZERCÉLPONT LEHETŐSÉGEK ALZHEIMER- ÉS PARKINSON-KÓR ESETÉN

- 1, Alzheimer-kór:
 - APP-ből A β képződés leállítás (enzim inhibitorok, APP trafficking)
 - A β clearance növelése (ApoE: Bexarotene®; endotél aktiválás)
 - toxikus A β kialakulás gátlása
 - A β natív szerkezet stabilizálás
 - A β aggregáció gyorsítás nemtoxikus fibrillumá
 - A β aggregáció moduláció nemtoxikus oligomerekké
 - Tau hiperfoszforileződés gátlása
 - A toxikus tau-oligomerek képződésének gátlása
 - A prionoid (A β , tauon) sejt-sejt transzmisszió leállítás
- 2, Parkinson-kór:
 - Az α -szinuklein toxikus oligomer kialakulás gátlása
 - Az α -syn prionoid sejt-sejt transzmisszió blokkolása



Slow Science movements

Good Science Needs Time to Mature and Ripen!

Photo: J. F. F. F.