

Biokemien bag kogalskab

Kogalskab - BSE - er en såkaldt prionsygdom. Prionproteinet er ud over at være et fascinerende eksempel på en ny type molekylær sygdomsmekanisme også grundlaget for identifikation af smitte med prionsygdomme. Her beskrives prionproteinet og sammenhængen mellem struktur og overførsel og udvikling af sygdommen

Af Peter M.H. Heegaard, Statens Veterinære Serumlaboratorium, Afdelingen for Biokemi & Immunologi, pmhh@svs.dk

Spongiforme encephalopater er en gruppe gådefulde og dødelige neurodegenerative sygdomme. De optræder normalt med ganske lav frekvens og karakteriseres ved en progressivt forløbende udvikling af neurologiske forstyrrelser sluttende med død og en række forandringer i hjernen, der omfatter dannelse af hulrum (vakuolisering) og proteinudfældning i form af proteinaflejringer (plaques).

Der ses ingen immunreaktion hos værten og inkubationstiderne er, afhængig af art og type overførbare (transmissible) spongiforme encephalopater (TSE'er), meget lange, nemlig fra ca. 1 år op til 40 år.

Et andet typisk træk er TSE'ernes artsspecificitet, som betyder at en TSE normalt kun kan medføre sygdom i den samme art. Denne artsbarriere kan ofte brydes eksperimentelt ved direkte indpodning i hjernen på en anden art, men vil da først give anledning til TSE efter længere inkubationstid end ved indpodning af værtsspecifikt smitstof.

En vigtig og enkeltstående undtagelse fra denne regel er BSE (se nedenfor). Det er vigtigt at bemærke, at nogle typer af TSE kan tilpasses til en ny art ved passage gennem den nye art, i særlige tilfælde endda uden i første omgang at give anledning til sygdom.

Disse sygdomme har fået ny aktualitet ved den epidemi af kogalskab (bovin spongiform encephalopati, BSE), der blev konstateret for første gang i England i 1986 [1]. Epidemien havde sit højdepunkt i starten af 1990'erne med op til 3000 kliniske tilfælde om måneden, og den ramte op imod 180.000 stykker kvæg i England og Nordirland i perioden 1986-2001. I Danmark er der indtil videre diagnosticeret 3 køer smittet med BSE.

Den bedst kendte TSE er scrapie, som ses hos får og geder. Scrapie har været kendt siden midten af 1700-tallet og dens overførbare (transmissibilitet) blev beskrevet allerede i 1930'erne. Sygdommen kan overføres ved indpodning af rygmarvsmateriale fra scrapie-smittede får. Scrapie er bl.a. udbredt i engelske og norske fårebestande. Den er særdeles svær at komme af med; selv efter op til 10 år uden dyr, kan nye dyr erhverve smitten ved at græsse i folde, der tidligere har huset scrapie-får.

Smitte med scrapie er ikke blevet påvist i andre arter end får, geder og muffloner. I modsætning til dette kunne man i løbet af 1990'erne fastslå, at BSE med stor sandsynlighed er den hidtil eneste kendte TSE, som er zoonotisk, dvs. smittende fra dyr til mennesker. Det skyldtes, at der med nogle års forsinkelse (i forhold til den bovine epidemi) begyndte at opstå tilfælde af en ny slags spongiform encephalopati hos mennesker. Sygdommen har fået navnet »new variant« eller »variant« Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) for at understrege slægtskabet med Creutzfeldt-Jakobs sygdom (CJD). CJD er den mest almindeli-

ge humane spongiforme encephalopati, og den har været kendt siden 1920'erne [2]. Den optræder hovedsageligt sporadisk og idiopatisk (dvs. med ukendt etiologi) med en ensartet geografisk spredning over hele verden og med en forekomst på omkring 1 tilfælde pr. 10^6 mennesker pr. år. CJD findes dog også i sjældnere forekommende arvelige former, og den er også beskrevet i en iatrogen (dvs. forårsaget af lægelig behandling) form. CJD er i sin iatrogene form en TSE, dvs. smittebåren.

Andre spongiforme encephalopater er beskrevet i andre arter (tabel 1). De fleste betragtes som TSE'er, selv om der ikke er påvist overførbare i alle tilfælde. Et særligt dramatisk eksempel er kuru, som fandtes hos visse højlandsstammer på Ny Guinea, og som kunne sættes i forbindelse med rituel indtagelse af hjerner fra afdøde ved et begravelsesritual [3]. Kuru-epidemien er sandsynligvis opstået efter indtagelsen af hjernevæv fra et sporadisk CJD-tilfælde. I forbindelse med at ritualen blev forladt, er tilfældene næsten ophørt, men de opstår stadig, hvilket antyder, at inkubationstiden for denne TSE kan være mere end 40 år.

Disse sygdomme involverer med deres bemærkelsesværdige overførselsmåder og karakteristiske neuropatologi samt deres evne til både at opstå spontant, ved smitte og være arvelig en helt ny type sygdomsmekanisme. Mekanismen har som en central komponent et normalt værtsprotein, nemlig prionproteinet, PrP^C [4,5].

Art	Sygdom	Første beskrivelse
Får, ged, mufflon	Scrapie	1700-tallet (får)
Kvæg	BSE	1986
Zoo-dyr (eksotiske klovdyr og kattedyr)	TSE'er	1987-1993
Hjorte	Chronic wasting disease	1980-1997
Mink	Transmissible mink encephalopati	1965
Kat	Felin spongiform Encephalopati	1990
Aber	TSE	1996-1999
Menneske	vCJD Kuru Iatrogen CJD	1995 1957

Tabel 1. Et udvalg af transmissible spongiforme encephalopater [27].

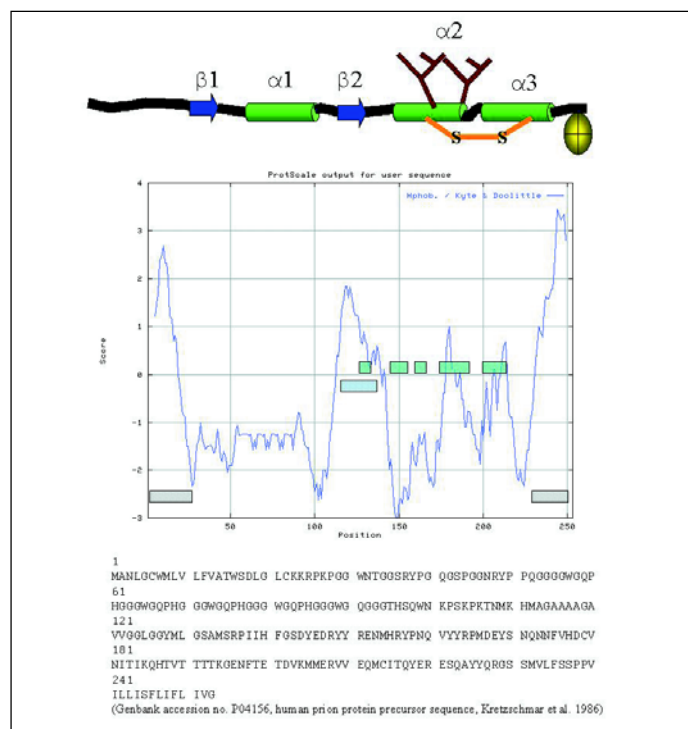
Prionproteinet

Prionproteinet blev første gang påvist som en essentiel del af de proteinaflejringer, som sås i hjernen på hamstere, der var blevet indpodet med hjernemateriale fra scrapie-smittede får, og som efter en længere inkubationstid havde udviklet spongiform encephalopati [6]. Proteinaflejringerne er sammen med vakuolisering kendetegnende for spongiform encephalopati. De viste sig at være i stand til at overføre sygdommen og infektiviteten kunne spores til proteinet i udfældningerne. Det viste sig hurtigt at være et ganske usædvanligt protein, idet det opretholdt infektivitet selv efter behandling med bredspektrede proteaser (proteinnedbrydende enzymer), efter bestråling og efter autoklavering. Desuden var det stort set uopløseligt i normale solventer og kunne kun bringes i opløsning med stærkt denaturerende midler, f.eks. 1 M guanidiniumthiocyanat [7]. Da det samtidigt var (og er) umuligt at finde spor af nucleinsyrer i disse infektiøse partikler, var det af stor interesse at karakterisere dette protein.

Under ledelse af dr. Stan Prusiner lykkedes det efter en heroisk indsats en amerikansk forskergruppe med base i San Francisco at renfremstille nok af proteinet ud fra proteinaflejringer fra scrapie-indpodede hamsterhjerter til, at der kunne bestemmes en C-terminal aminosyresekvens på proteasebehandlet PrP^{Sc} [8]. Det viste sig efterfølgende, at proteinet fra de kendetegnende og infektiøse proteinaflejringer, højest overraskende, var et hidtil ubeskrevet værtsprotein [9], som stammede fra et gen (PRNP) i værtsens eget genom, hos mennesket på kromosom 20. Prusiner døbte proteinet »prion« som et anagram af en sammentrækning af »proteinaceous infectious particle« [6].

Endnu mere overraskende var det, da det viste sig, at prionproteinet blev udtrykt og fandtes i mange forskellige normale væv og celler hos raske individer i en form som sekvensmæssigt var identisk med det prionprotein, der var blevet fundet i de sygdomsassocierede proteinaflejringer i hjernen hos syge individer. Det var især overraskende, fordi det normale prionprotein (PrP^C) opførte sig helt anderledes end det sygdomsassocierede og infektiøse prionprotein (PrP^{Sc}).

PrP^C er et normalt, proteasesensitivt, vandopløseligt og ikke-patogent eller smitteoverførende membranprotein (tabel 2). Det har siden vist sig, at PrP^C findes udtrykt som et GPI- (glyco-



Figur 1. Det humane prionprotein. Øverst en skematisk fremstilling af rækkefølgen af de kendte sekundære strukturelementer i den globulære del af proteinet, samt placeringen af kulhydrat, disulfidbro og GPI- (glycosylphosphatidylinositol) anker. Derunder et Kyte & Doolittle hydropati-plot, hvor positive værdier indikerer hydrofobe områder og negative indikerer hydrofile områder. De områder (propeptider, grå kasser) der fraspaltes under protei- nets processing i det endoplasmatiske reticulum (1-22 og 231-253) udviser den typiske hydrofobe signatur; desuden genkendes octarepeats i mønstret mellem 53 og 85. Den globulære del af proteinet, for hvilken strukturen har kunnet bestemmes (ca. 120-230), udgør ca. 60% af det mature protein, mens resten er den strukturelt uordnede N-terminale del (23-ca. 120). Placeringen af α -helixer og β -strands er angivet med de grønne kasser, mens den transmembranære α -helicale sekvens er angivet med en blå kasse.

syolphosphatidylinositol-) forankret cellemembranprotein i mange forskellige typer af celler i den normale organisme, specielt i centralnervesystemets nerveceller. Det er et kobberbindende glycoprotein på 33-35 kDa, omkring 250 aminosyrer langt og med et varierende antal gentagne otte-aminosyremønstre (octarepeats) i den N-terminale del af molekylet og en transmembran-lignende, α -helix-agtig sekvens før den globulære del af molekylet. GPI findes på den C-terminale aminosyre og er typisk for løst associerede membranproteiner (figur 1).

Genet for prionproteinet er fundet hos et utal af arter lige fra svampe til mennesker. Sekvenser fra flere end 100 arter er nu deponeret i GenBank-databasen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), og sekvensen er meget konserveret, hvilket tyder på, at dette protein har en essentiel funktion. Nogen entydig funktion er dog endnu ikke blevet fastlagt.

»Protein-only«-hypotesen

Med et elegant, konceptuelt snuptag forenede Prusiner i 1982 de tilsyneladende modstridende data om PrP^C og PrP^{Sc} i »protein-only«-hypotesen, som gjorde PrP^C og PrP^{Sc} til centrale aktører i udviklingen og overførslen af de spongiforme encephalopatier (herefter »prionsygdomme«), uden medvirken af et traditionelt infektiøst agens (virus, bakterier, svampe, parasitter) [6]. Andre har tidligere fremsat lignende teorier for proteins selv-replikation i disse sygdomme (tidligst [10]).

Hypotesen hævder, at PrP^{Sc} er en sjældent forekommende, patogen foldningstype af PrP^C, og at PrP^{Sc} alene er ansvarlig for prionsygdommens opståen og udvikling i et individ, der huser

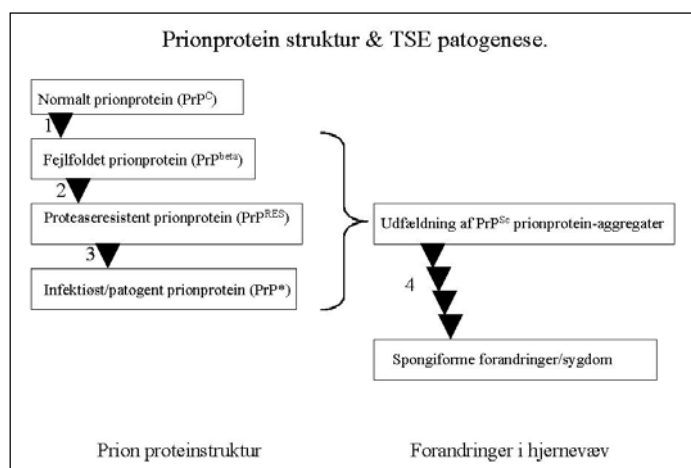
	PrP ^C	PrP ^{Sc}
Aminosyresekvens	IDENTISKE	
Kulhydratenheder	2	2
Lokalisering	Cellemembran	Udfældninger (plaques)
Recykling	Timer	År
NMR-struktur	Ja	Nej
Proteaseresistens	Normal	Høj
Rest efter proteinase K	Ingen peptider	ca. 90-230 (PrP27-30 fragment)
Varmeresistens	Normal	Høj
Opløselighed	Høj	Lav
Sekundære strukturer (circular dichroisme)	45% α , ingen β	30% α , 45% β
Patogent	Nej	Ja*

*når værten udtrykker PrP^C

Tabel 2. Egenskaber af de to strukturelle isoformer af prionproteinet.

denne PrP-type. PrP^C kan under passende (sjældne) betingelser omdannes til sin patogene isoform. Herved bliver forståelsen af betingelserne for konverteringen af PrP^C til PrP^{Sc} afgørende for forståelsen af prionsygdommens udvikling. Det centrale i hypotesen er, at den konformationelle omlejring fremmes ved interaktion mellem PrP^{Sc} og PrP^C. I sjældne tilfælde kan en mutation i PrP-sekvensen destabilisere PrP^C tilstrækkeligt til, at den spontant kan omleje (sporadisk prionsygdom), eller der kan nedarves en særligt destabiliserende sekvens (de familiære prionsygdomme). Endelig kan de overførbare prionsygdomme, TSE'erne, forklares ved, at exogent PrP^{Sc} kan introduceres via føden eller ad anden vej (f.eks. iatrogen) til de særligt sensitive nerveceller i centralnervesystemet, specielt i hjernen. I hjernen interagerer de med værtsens eget PrP^C, der omdannes til PrP^{Sc}, der så igen kan omdanne mere PrP^C osv., hvorved der sættes gang i en trinvis og accelererende proces, der resulterer i proteinaflejringer, cellehenfald og slutteligt vakuolisering, som betinger prionsygdommens sygdomsbillede (figur 2). PrP^{Sc}'s proteaseresistens er en integreret og vigtig del af sygdomsmekanismen. Den betinger ophobningen af de uedbrydelige proteinudfældninger, som anses for at være forudsætningen for udviklingen af de patologiske forandringer. Mens den strukturelle basis for PrP^{Sc}'s exceptionelle stabilitet er relativt dårligt belyst, er der efterhånden en del strukturel information, der understøtter PrP^C's omlejringstilbøjelighed, mekanismen bag omlejringen og til en vis grad, hvordan PrP^{Sc} kan fremme omlejringen (se nedenfor).

TSE-smitten er ikke »infektøs« i traditionel forstand og



Figur 2. Skematisk oversigt over sammenhængen mellem prionproteinets struktur og udviklingen af TSE-patologi. PrP^C går over en række hypotetiske trin (1-3) - ikke nødvendigvis i den viste rækkefølge - til sluttilstanden PrP^{*}, hvilket fører til udfældning af prionprotein aggregater (plaques) bestående af den proteaseresistente isoform PrP^{Sc} og herfra i et eller flere trin (4) til dannelse af de spongiforme forandringer. I diagnostisk sammenhæng er den infektiøse/patogene form (PrP^{*}) den interessante.

medfører ikke noget immunrespons hos den smittede vært, (man kan dog fremstille antistoffer mod prionproteiner ved traditionel immunisering af f.eks. mus med oprenset prionprotein). Der ses heller ikke ændringer i biosyntesen af PrP^C under udvikling af TSE. Det betyder, at man ikke kan diagnosticere disse sygdomme ud fra et bestemt respons hos det afficerede individ.

Nogle af de eksperimentelle fund, der i de senere år har understøttet hypotesen, er konstateringen af, at musestammer, der er »knock-out'ede« i PrP-genet (PrP^{0/0}) ikke kan smittes med PrP^{Sc} [11], dvs. at udvikling af sygdom kræver, at værten selv udtrykker sit normale PrP. Det er endda vist, at hvis der indsættes et stykke hjernevæv fra en normal mus i hjernen på

en PrP^{0/0}-mus, vil der ved efterfølgende injektion af PrP^{Sc} i hjernen langsomt udvikle sig en spongiform encephalopati men kun i det normale, indsatte hjernevæv [11]. Det lader faktisk til, at man kan sætte lighedstegn mellem en celles niveau for udtrykkelse af PrP^C og dens tilbøjelighed til at udvikle PrP^{Sc}-udfældninger.

Overførsel af PrP^{Sc}-struktur til PrP^C er blevet påvist *in vitro* med gensplejsede former af prionproteinerne udtrykt i *E. coli*. Forsøgene viste, at hvis en bestemt genotype af PrP^C har stor tilbøjelighed til at udvikle prionsygdom, f.eks. udtrykt ved korte inkubationstider efter eksperimentel indpodning af PrP^{Sc} vil denne type af PrP^C også have relativt let ved at omleje til PrP^{Sc} under påvirkning af det givne PrP^{Sc} *in vitro* [12,13]. I mennesker er der beskrevet hen ved 20 forskellige mutationer i PrP^C, som medfører udviklingen af karakteristiske spongiforme encephalopatis. Det tyder på en meget direkte involvering af PrP. Aminosyre nr. 129 (hos mennesker enten methionin eller valin) har vist sig at have stor betydning for modtagelighed/inkubationstid og udvikling af neuropatologi/kliniske manifestationer hos mennesker. Alle vCJD-tilfælde er indtil videre optrådt hos mennesker, der er homozygote for methionin i position 129. Homozygoti ved denne position er i det hele taget en risikofaktor for udvikling af spongiforme lidelser [14].

Man bør være opmærksom på, at selv om »protein-only«-hypotesen understøttes af alle kendte eksperimentelle og kliniske data, er der stadig mange huller i vores forståelse af disse sygdomme. Det er f.eks. uklart, hvordan en specifik prionsygdoms fænotype kan opretholdes i en ny art, som det f.eks. er tilfældet med BSE og den afledte vCJD i mennesker, når det ifølge hypotesen er værtsens eget prionprotein, der findes som PrP^{Sc} i de opståede proteinaflejringer, mens det exogent introducerede PrP^{Sc} kun udgør en minimal del af udfældningerne.

Det er også uklart, om sygdommene er en direkte følge af PrP^{Sc}-udfældninger, eller snarere skyldes mangel på PrP^C, toksiske biprodukter eller beslaglæggelse af andre proteiner. Det er heller ikke kendt, hvordan de regionale læsioner (vakuoler og nervecelledød) egentlig opstår.

Det normale prionproteins struktur

Der er intet umiddelbart specielt ved prionproteinets struktur. Det er et ca. 35 kDa protein med to glycosyleringssites, en disulfidbro samt en C-terminal-glycophosphoinositol-gruppe. Sidstnævnte forankrer proteinet i cellens dobbelt-lipidmembran og benævnes et perifert membranprotein. I den N-terminale del findes nogle karakteristiske, gentagne otte-aminosyre mønstre,



Figur 3. NMR-bestemte strukturer af det globulære domæne af PrP^C fra tre forskellige arter. C-terminal er angivet med gult, N-terminal med blåt. Disulfid, kulhydrat og GPI er ikke angivet. Som det ses er strukturerne i det store hele ens (se detaljer i teksten).

hvis antal varierer noget fra art til art, fulgt af en typisk transmembransekvens (figur 1). De to kulhydratgrupper er af den asparagin-bundne type, som kendes fra mange andre mammale glycoproteiner. Den primære sekvens er bemærkelsesværdig velbevaret fra art til art. Der er størst variation i de terminale dele af proteinet.

De første undersøgelser af dets rumlige struktur (ved cirkulær dichroisme (CD) og Fourier Transformations infrarød spektroskopi (FTIR)) viste, at α -helixer er den dominerende sekundære struktur i PrP^C, mens β -sheet-strukturer dominerer i PrP^{Sc}. Det resultat førte til publiceringen af de første modeller for henholdsvis den normale og den patologiske foldning [15]. Modellen var baseret på neurale netværk, der forudsiger de sandsynlige kombinationer af de sekundære strukturelementer.

I 1996 lykkedes det eksperimentelt at fastslå den første rumlige struktur af det normale prionprotein ved NMR af et gensplejset museprionprotein [16]. Den eksperimentelt bestemte tertiære struktur afveg på flere punkter fra Prusiners teoretiske model [15]. Strukturen afveg ved at indeholde β -sheet-struktur, ved kun at indeholde 3 α -helixer og ved et andet arrangement af disse helixer, men hovedtrækkene var som forudsagt, dvs. overvejende » α -helical« (figur 3). Mere bemærkelsesværdigt var det, at de N-terminale ca. 120 aminosyrer (inklusive octa-repeat regionen) ikke dannede en rumligt defineret struktur, hvorfor det kun er proteinet fra position ca. 120 til 230, der danner en egentligt veldefineret, rumlig struktur – et såkaldt globulært domæne. Prionproteinet består altså af en ustruktureret N-terminal del og en globulær del i de ca. 60% af resten af molekylet med strukturen $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\alpha_3$ (figur 1). Kulhydratdelene findes begge på α_1 . Den kobberbindende del af molekylet findes i den uordnede N-terminale del. Foruden strukturen af murint PrP^C er strukturerne af hamster-, human- og ko-PrP^C i forskellige forkortede, gensplejsede udgaver blevet bestemt ved NMR, og de viser alle samme principielle struktur som muse-PrP^C (figur 1 og 3). Dog har human- og hamster-PrP^C en lang α_2 -helix, mens den er kort hos mus og loop'en mellem β_2 og α_2 er lang og fleksibel hos mus og menneske, mens den i hamsterproteinet er kort og strukturelt veldefineret.

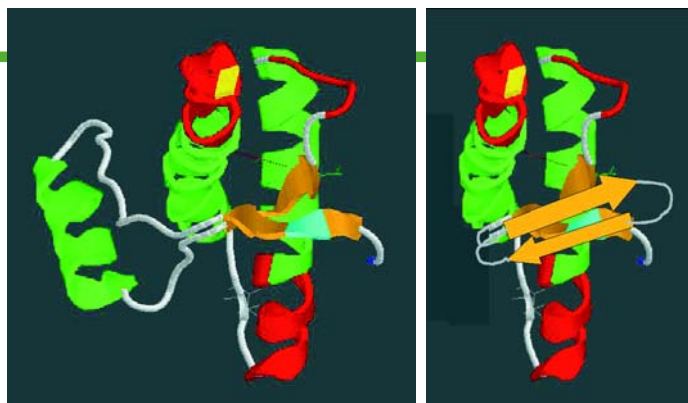
Strukturen af den patogene udgave af prionproteinet (PrP^{Sc}) er ikke bestemt, men alt tyder på, at den afgørende forskel på de to strukturer er et større indhold af β -strands i PrP^{Sc} end i PrP^C.

Det patologiske prionproteins struktur

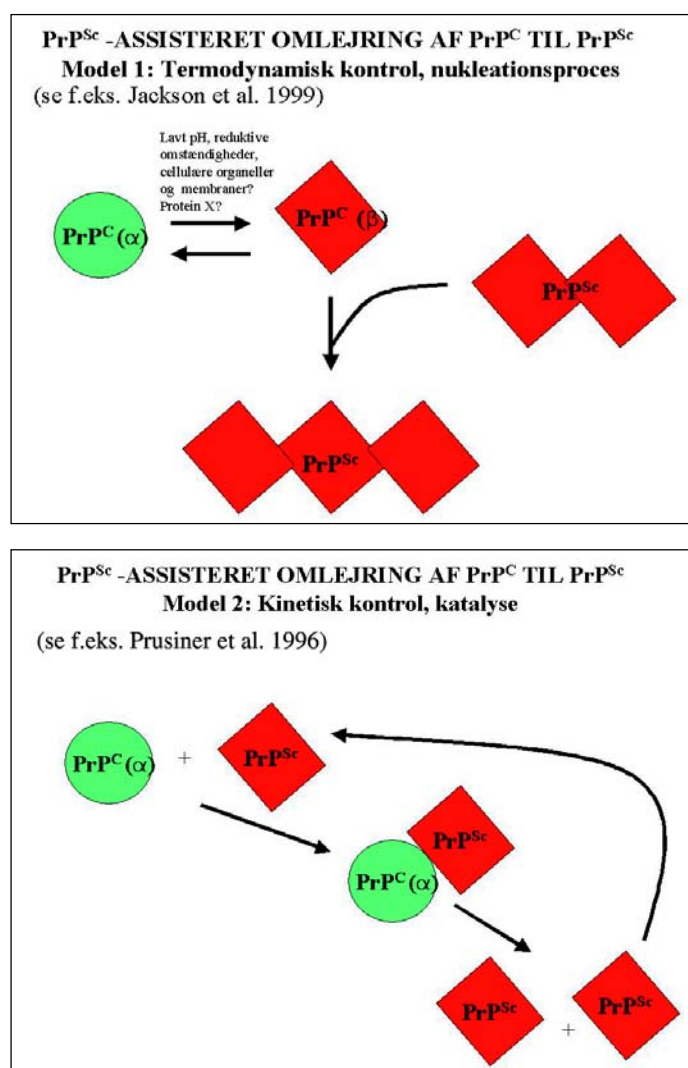
Det er ikke lykkedes at bestemme den tertiære struktur af det patologiske prionprotein (PrP^{Sc}) eksperimentelt. Den må adskille sig væsentligt fra strukturen af det normale prionprotein, for at forklare den stærkt forøgede protease-resistens og tendensen til aggregering og udfældning i fibrillignende strukturer. Samtidig skal en sådan struktur kunne opstå ud fra den samme primære sekvens; den primære sekvens skal med andre ord kunne eksistere i to forskellige foldninger.

En række eksperimentelle fund har bidraget til at belyse strukturen og har ført til en model, der til en vis grad forklarer dette paradoks. Et paradoks, der har stor betydning for forståelsen af proteinfoldning som en entydig funktion af aminosyresekvens eller, i sin yderste konsekvens, som en entydig funktion af den pågældende gensekvens.

Hornemann et al. publicerede i 1997 [17] en model baseret på bindingsstedet for det hidtil eneste rapporterede antistof, det er lykkedes at gøre specifikt for PrP^{Sc}. Bindingsstedet blev kortlagt ved at studere binding af antistoffet til overlappende syntetiske peptider, der dækkede det bovine PrP^C's sekvens. Det viste sig, at dette specielle antistof reagerede med et bindingssted, der var opbygget af områder fra tre adskilte



Figur 4. Strukturen* af det globulære domæne af humant PrP^C (til venstre) sammenlignet med Korth et al.'s model for strukturen af PrP^{Sc} (til højre) set fra en vinkel, der tydeligt viser påvirkningen af helix 1 ved den konformationelle omlejring. Områder med høj mobilitet er farvet røde og M129 er farvet lyseblå. N-terminal er blå, C-terminal er gul. Kulhydrat sidder på de to asparaginer hvis sidekæder er angivet. S-S bro er angivet ved stiplede røde linie. *Repræsentativ NMR-struktur af humant prionprotein fragment (121-230) fra rekombinant *E. coli*. Strukturen omfatter 125-228 (1QML, [26])



Figur 5. Template- og seed-model for PrP^{Sc}-assisteret omdannelse af PrP^C til PrP^{Sc}. Som det ses indebærer begge modeller mulighed for kædereaktionslignende forløb, i den øverste model (termodynamisk kontrol) tænkes omdannelsen at foregå på en voksende »krystal« af aggregeret PrP^{Sc} som proportionalt med sin størrelse er i stand til at omdanne stadigt mere PrP^C, mens der i den nederste model (kinetisk kontrol) ved interaktion med PrP^{Sc} produceres to PrP^{Sc}-molekyler ud fra et molekyle PrP^C, og begge disse molekyler kan gå tilbage og påvirke nye PrP^C molekyler. Dette kan sammenlignes med en enzymatisk reaktion (reaktionen fremmes ved at aktiveringsenergien sænkes (katalyse)), mens den foregående model kan sammenlignes med en udfældnings/krySTALLISERINGSREAKTION involverende et ustabil PrP-intermediat (PrP^b) og et stærkt stabiliseret slutprodukt (se teksten).

regioner af aminosyrekæden, som var blevet bragt sammen i PrP^{Sc}.

Ifølge modellen er strukturen af PrP^{Sc} $\beta_1\beta_2\beta_3\beta_4\alpha_2\alpha_3$, dvs. α_1 er blevet erstattet af $\beta_2\beta_3$, der sammen med de to andre β -strands udgør et velstabiliseret 4-strand β -sheet - altså en mere kompakt struktur med et højere indhold af β -sheets. Modellen passer godt med, at områder, der er defineret ved mutationer, har væsentlig betydning for PrP^C's evne til at blive omdannet til PrP^{Sc}. Områderne indgår i de smittede dele af proteinet (figur 4, side 35).

Modeller for omdannelse af PrP^C til PrP^{Sc}

En række grundlæggende observationer belyser betingelser for omdannelse af PrP^C til PrP^{Sc}:

PrP^C kræver kontakt med PrP^{Sc}, før det kan omdannes til PrP^{Sc}. PrP^{Sc} stabiliseres i kompleks med andre PrP^{Sc}, hvilket fører til protease-resistente, udfældede aggregater af PrP^{Sc} [18]. PrP^{Sc} der stabiliseres særligt er ikke i stand til at fremme omdannelsen af PrP^C til PrP^{Sc}. Denne egenskab ved PrP^{Sc} kræver en vis konformationel destabilisering [19]. Delvist udfoldede syntetiske peptider kan fremme omdannelsen, men det kan tilsvarende peptider i β -sheet ikke [18]. Helix 1, der er helt usædvanlig hydrofil, og som udelukkende stabiliseres af saltbroer, kan gennem en energetisk favorabel intermolekylær interaktion danne saltbroer med andre helix 1'ere under dannelsen af β -strand bundles. De holdes sammen af intermolekylære saltbroer, hvormed hydrofobe dele fra andre steder i molekylet føres sammen og danner det egentlige aggregat [20]. Et sådant hydrofobt sted kunne være segment 118-133 [21].

En form for PrP med et forøget indhold af β -sheet (PrP^{beta}) kan fremstilles eksperimentelt ud fra rekombinant PrP^C. Rekombinant PrP^C giver i sin grundform et stærkt aromatisk signal ved CD-spektroskopi - et tegn på, at sidekæderne i molekylet er pakket optimalt [22]. PrP^{beta} er karakteriseret ved forøget indhold af β -sheets og en dårligere pakning af sidekæder [22], hvilket er en såkaldt »molten globule«-struktur [23]. Dette betyder, at PrP^{beta} befinder sig i en quasistabil tilstand, som enten kan revertere til PrP^C-strukturen eller kan føre til en irreversibel dannelse af en mere stabil struktur (PrP^{Sc}) ved interaktion med PrP^{Sc}. Dette understøttes af, at der, når der udskiftes aminosyrer, der svarer til mutationer, der fremmer dannelsen af PrP^{Sc} ud fra PrP^C [24], ikke kan påvises nogen øget tendens til β -strand-dannelse i PrP^C. Ifølge denne model er foldningen i PrP^C derfor styret af den optimale pakning (docking) af sidekæder [22] og ikke af den enkelte sekvens' tilbøjelighed til α -, henholdsvis β -strand-dannelse. Derimod styres foldningen i PrP^{Sc} eller i hvert fald i PrP^{beta} af aminosyrekædens sekundære konformationstilbøjeligheder i højere grad, i PrP^{beta} altså på bekostning af sidekædepakningen. Mutationer, der ses ved familiære prionsygdomme, kunne derfor tænkes at virke ved at forstyrre sidekæde-pakningen i PrP^C og dermed løsne strukturen, som derved nemmere overgår til den propensity-kontrollerede PrP^{beta}-form. Disse mutationer har derimod ingen effekt på den lokale propensity i et fragment [24]. Sådanne mutationer i gensplejset PrP^C er direkte vist at medføre destabilisering af strukturen.

PrP^{Sc}-formen tænkes i denne model (figur 5 øverst, side 35) at opstå ved TSE'er, når PrP^{beta}-former stabiliseres yderligere ved binding til eksisterende (introducerede) PrP^{Sc} og i arvelige TSE'er ved at den opståede mutation har så stor effekt, at PrP^{Sc}-foldningen opstår af sig selv og derefter yderligere skaber ny PrP^{Sc} ved stabilisering af PrP^{beta}-former til PrP^{Sc}-former. De PrP^{beta}-former, der er en forudsætning for PrP^{Sc} i denne model, tænkes at opstå under den naturlige PrP^C-recykling i cellens endosomer, men vil ikke under normale omstændigheder, dvs. i fravær af PrP^{Sc} omdannes til PrP^{Sc}-formen.

En anden model (figur 5 nederst) postulerer, at PrP^{Sc} virker som katalysator for omdannelsen, enten under medvirken af PrP^{Sc} som monomer eller som multimer, men der er ikke beskrevet nogen overbevisende mekanisme for denne model.

In vivo kunne en række andre faktorer tænkes at have indflydelse på processen, især udtrykkesniveauet for PrP^C samt andre »chaperone«-lignende proteiner (protein X [5]). Desuden vil der være en effekt af, at PrP^C er et membranprotein, således at omlæjringsprocesserne foregår i tæt forbindelse med disse membraner [25].

Konklusion

Prionproteinets evne til at folde i to væsentligt forskellige strukturer er afgørende for dets dramatiske skift i patogent potentiale. Det er et fascinerende eksempel på en ny type molekylær sygdomsmekanisme, og er grundlaget for identifikation af smitte med prionsygdomme, f.eks. BSE.

En bedre forståelse af foldningsmekanismerne og foldnings- og kompleksdannelsernes sammenhæng med udvikling af sygdom er af væsentlig betydning for udvikling af bedre diagnostiske metoder, der vil muliggøre detektion af smitte mere sikkert og på et tidligere tidspunkt i forhold til sygdoms-udvikling. En sådan metode vil ideelt også tillade identifikation af typen af smitte, f.eks. mulig subklinisk smitte med BSE i får.

Der er derfor i 2001 startet et forskningsprojekt inden for dette område på Statens Veterinære Serumlaboratorium, som er Danmarks nationale overvågningslaboratorium for BSE. Projektet har som formål at udvikle følsomme diagnostiske metoder til detektion af BSE på prøvemateriale, der kan indsamles før aflivning og til detektion af BSE tidligere i inkubationsperioden.

Nomenklaturboks

PrP ^C :	Det normale, cellulære prionprotein (normale konformation).
PrP ^{Sc} :	Det protease- og varmeresistente prionprotein som det findes i prioner.
PrP*:	En teoretisk form af prionprotein, der er »infektivt«, men ikke nødvendigvis proteaseresistent.
PrP ^{RES} :	En proteaseresistent form af prionprotein, ikke nødvendigvis »infektivt«.
PrP ^{beta} :	En eksperimentelt opnåelig form af PrP ^C karakteriseret ved »molten globule«- og β -sheet karakter samt en vis proteaseresistens og en vis infektivitet.
PrP 27-30:	Den proteaseresistente kerne af PrP ^{Sc}
Prion:	Af »proteinaceous infectious particle« (Prusiner 1982), den infektiøse partikel der ses associeret med scrapie (eller anden TSE) »infektivitet«. Akkumulerer i hjernen ved disse sygdomme, men ses ikke altid som amyloide plaques.

Referencer

1. Wells, G.A.H., A.C. Scott, C.T. Johnson, R.F. Cunnings, R.D. Hancock, M. Jeffret, M. Dawson, and R. Bradley. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121:419.
2. Prusiner, S.B., J. Collinge, J. Powell, and B. Anderton. 1992. *Prion Diseases of Humans and Animals*. Ellis Horwood Limited, Chichester, West Sussex, UK.
3. Gajdusek, D.C. and V. Zigas. 1975. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea - the endemic occurrence of »kuru« in the native population. *N Engl J Med* 257:974.
4. Prusiner, S.B. 1996. Molecular biology and genetics of prion diseases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:473.

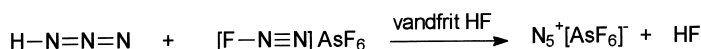
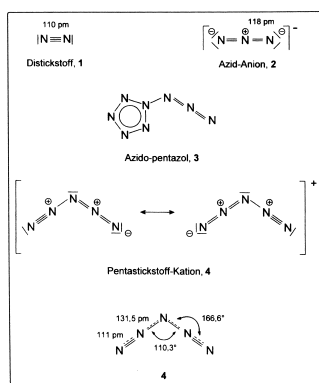
5. Prusiner, S.B. 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13363.
6. Prusiner, S.B. 1982. Novel proteinaceous particles cause scrapie. *Science* 216:136.
7. Oesch, B., M. Jensen, P. Nilsson, and J. Fogh. 1994. Properties of the scrapie prion protein: quantitative analysis of protease resistance. *Biochemistry* 33:5926.
8. Prusiner, S.B., D.F. Groth, D.C. Bolton, S.B. Kent, and L.E. Hood. 1984. Purification and structural properties of a major scrapie prion protein. *Cell* 38:127.
9. Oesch, B., D. Westaway, M. Walchli, M.P. McKinley, S.B. Kent, R. Aebersold, R.A. Barry, P. Empst, D.B. Eplow, L.E. Hood, S.B. Prusiner, and C. Weissmann. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40:735.
10. Griffith, J.S. 1967. Self-replication and scrapie. *Nature* 215:1043.
11. Blattler, T., S. Brandner, A.J. Raeber, M.A. Klein, T. Voigtlander, C. Weissmann, and A. Aguzzi. 1997. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 389:69.
12. Raymond, G.J., J. Hope, D.A. Kocisko, S.A. Priola, L.D. Raymond, A. Bossers, J. Ironside, R.G. Will, S.G. Chen, R.B. Petersen, P. Gambetti, R. Rubenstein, M.A. Smits, P.T.J. Lansbury, and B. Caughey. 1997. Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans [see comments]. *Nature* 388:285.
13. Safar, J., H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F.E. Cohen, and S.B. Prusiner. 1998. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations [see comments]. *Nat Med* 4:1157.
14. Ironside, J.W., K. Sutherland, J.E. Bell, L. McCordle, C. Barrie, K. Estebeiro, M. Zeidler, and R.G. Will. 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease: neuropathological and clinical features. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:523.
15. Huang, Z., S.B. Prusiner, and F.E. Cohen. 1995. Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold Des* 1:13.
16. Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, and K. Wuthrich. 1996. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 382:180.
17. Hornemann, S., C. Korth, B. Oesch, R. Riek, G. Wider, K. Wuthrich, and R. Glockshuber. 1997. Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett* 413:277.
18. Kaneko, K., H. Wille, I. Mehlhorn, H. Zhang, H. Ball, F.E. Cohen, M.A. Baldwin, and S.B. Prusiner. 1997. Molecular properties of complexes formed between the prion protein and synthetic peptides. *J Mol Biol* 270:574.
19. Caspi, S., M. Halimi, A. Yanai, S.B. Sasson, A. Taraboulos, and R. Gabizon. 1998. The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism. *J Biol Chem* 273:3484.
20. Morrissey, M.P. and E.I. Shakhnovich. 1999. Evidence for the role of PrP(C) helix 1 in the hydrophilic seeding of prion aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11293.
21. Come, J.H., P.E. Fraser, and P.T.J. Lansbury. 1993. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5959.
22. Jackson, G.S., L.L. Hosszu, A. Power, A.F. Hill, J. Kenney, H. Saibil, C.J. Craven, J.P. Waltho, A.R. Clarke, and J. Collinge. 1999. Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* 283:1935.
23. Tittsyn, O.B. 1995. Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.* 47:83.
24. Thompson, A.J. 2001. Title. *Biochim Biophys Acta* 1544:242.
25. Warwicker, J. 1999. Modelling charge interactions in the prion protein: predictions for pathogenesis. *FEBS Lett* 450:144.
26. Zahn, R., A. Liu, T. Luhrs, R. Riek, C. von Schroetter, G.F. Lopez, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider, and K. Wuthrich. 2000. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:145.
27. Krogsrud, J., P. Hopp, B. Bratberg, and M.J. Ulvund. 2000. Prionsjukdommer - en generell introduksjon. *Norsk Vet.Tidsskrift* 112:321.
28. Kretzschmar, H., L.E. Stowring, D. Westaway, W.H. Stubblebine, S.B. Prusiner, and S.J. DeArmond. 1986. Molecular cloning of human prion protein cDNA. *DNA* 5:315.

Nyt om raketbrændstoffer

Beregninger viser, at de i figur 1 gengivne nitrogenforbindelser er interessante kandidater til nye raketbrændstoffer.

Det er nu lykkedes at syntetisere $N_5^+[AsF_6]^-$ ved den i figur 2 viste reaktion. Det er et hvidt krystallinsk stof, der er holdbart i nogle uger ved -78°C og som kan håndteres med nogen forsigtighed, uden at det eksploderer.

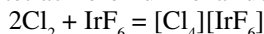
Carl Th.



Chemie in unsere Zeit 1999: 33: 304.

Nyt om tetrachloronium

Konrad Seppelt og Stefan Seidel i Berlin har oxideret dichlor med iridiumhexafluorid i fluoran ved temperaturen -80°C og fået udfældet saltet tetrachloroniumhexafluoroiridat(1-)

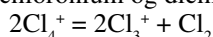


Tetrachloronium



har form som et rektangel med kantlængderne 194 pm og 294 pm.

Hvis temperaturen blot stiger et par grader, dekomponerer tetrachloronium til trichloronium og dichlor



Bos

2000, 6. november: Cold existence for Cl_4^+ . *Chemical & Engineering News*: 34.

Cassanova lever - og har det godt

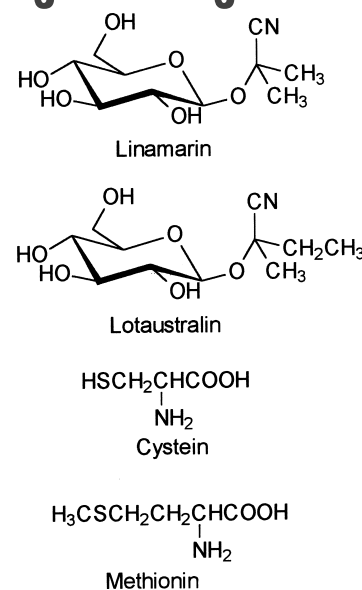
I Afrika dækkes i mange områder en stor del af kulhydratbehovet af cassavaplanten *Mahnihot esculenta*, tropernes kartoffelplante. I det tidligere Zaire 60% fra knoldene og 20% fra bladene.

Cassavaplanten er meget nøjsom og formeres blot ved, at man stikker en stump plantestængel i jorden. Cassavaen indeholder uhel-digvis også to såkaldte cyanogene glucosider *Linamarin* og *Lotaustralin*, som ved hydrolyse giver HCN.

Det er derfor vigtigt, at knoldene forarbejdes på den rigtige måde, inden de spises. De rives, udvaskes, presses, soltørres og ristes inden anvendelsen. Man regner med, at der ved denne forarbejdning frigøres 100 000 ton HCN årligt. Den restmængde af HCN, der er, omdannes i organismen til thiocyanat ved hjælp af de to svovlholdige aminosyrer cystein og methionin, hvilket ernæringsmæssigt er et stort problem for en befolkning, der lever af en sparsom animalsk føde, som er den væsentligste kilde til disse aminosyrer.

Plantebiokemisk Laboratorium på KVL har deltaget i et projekt »Cassanova« til undersøgelse af betydningen af de cyanogene glycosider for plantens forsvær mod insektangreb og undersøgelse af muligheden for at fremelske arter, der indeholder mindre eller ingen cyanogene glycosider.

Carl Th.



Cassanova-Projektet, *Naturens Verden*. 2000(4): 25.