

# GENETICKÁ FORMA HUMÁNNÝCH PRIONOVÝCH CHORÔB

MUDr. Eva Mitrová, DrSc.

Národné Referenčné Centrum Prionových chorôb, Slovenská zdravotnícka univerzita – Vedecko-výskumná báza ÚPKM, Bratislava

Prionové choroby tvoria skupinu smrteľných, prenosných neurodegeneratívnych chorôb, kontrolovaných prionovým génom, v ktorom je zakódovaný prionový proteín bez ktorého nemôže prionová choroba vzniknúť. Mutácie prionového génu majú špecifický vplyv na vývoj genetickej formy ochorenia, nosiči mutácií (s klinickými príznakmi aj asymptomatickí) môžu byť prameňom exogénnej nákazy. Polymorfizmy prionového génu vznik a priebeh prionovej choroby ovplyvňujú nešpecificky, v súhre s ďalšími rizikovými faktormi. Praktické využitie molekulárnej genetickej metódy sa v súčasnosti uplatňuje v diagnostike a v prevencii humánných prionových chorôb.

**Kľúčové slová:** prionový gén, mutácia, polymorfizmus, prionové choroby, prevencia.

Neurol. pro praxi, 2006; 2: 76–79

Transmisívne spongioformné encefalopatie (TSE) – prionové choroby (PCH) – reprezentujú ojedinelú skupinu neurodegeneratívnych, konformačných chorôb, ktoré sú rozhodujúcim spôsobom kontrolované geneticky, ale súčasne sú aj prenosné. Genetickú predispozíciu viacerých neurodegeneratívnych ochorení naznačovali klinicko-genealogické štúdie už v minulosti, ale identifikovať zodpovedný gén a charakterizovať jeho vplyv umožnil až rozvoj molekulárnej genetiky.

Medzi geneticky kontrolovanými neurodegeneratívnymi chorobami tvoria prionové choroby (PCH) výnimočnú skupinu, nakoľko ohrozujú okrem postihnutého pacienta aj ďalších jedincov a to dvoma cestami: endogennou (riziko vertikálneho prenosu genetickej predispozície) a exogennou (horizontálne riziko prenosu nákazy).

K PCH patria: prvá a najvýznamnejšia Creutzfeldtova-Jakobova choroba (CJch) (3), kuru – následok rituálneho kanibalizmu s epidemickým výskytom na Novej Guiney, zriedkavejší Gerstmannov-Sträusslerov-Scheinkerov syndróm (GSS) (6) a fatálna familiárna insomnia (FFI) (5). Od r. 1996 ku 3 klasickým formám (sporadická, iatrogénna, genetická), pribudol aj

nový variant CJch (nvCJch). Je to prvá prionová zoonóza – následok prelomenej druhovej bariéry a prenosu nákazy z chorých kráv na človeka (20).

PCH sa z hľadiska etiopatogenézy radia ku konformačným chorobám. V prionovom géne (PRNP), ktorý je u človeka na 20. chromozóme, je zakódovaný fyziologický, bunkový prionový proteín (PrP<sup>C</sup>), ktorý sa podieľa na viacerých významných funkciách neurónu (napr. synaptický prenos vzruchu, antioxidantný a antiapoptotický účinok) (13).

Zmenou konformácie (terciárnej štruktúry) sa menia biochemické vlastnosti (rozpuštnosť, senzitivita na proteínázy) a súběžne aj funkcia prionového proteínu a vzniká patologická izoforma – PRION. Na rozdiel od bunkového prionového proteínu je PRION nerozpustný, na proteínázy je čiastočne rezistentný (PrP<sup>Sc</sup>) a významne sa podieľa na vzniku smrteľného, prenosného ochorenia (18).

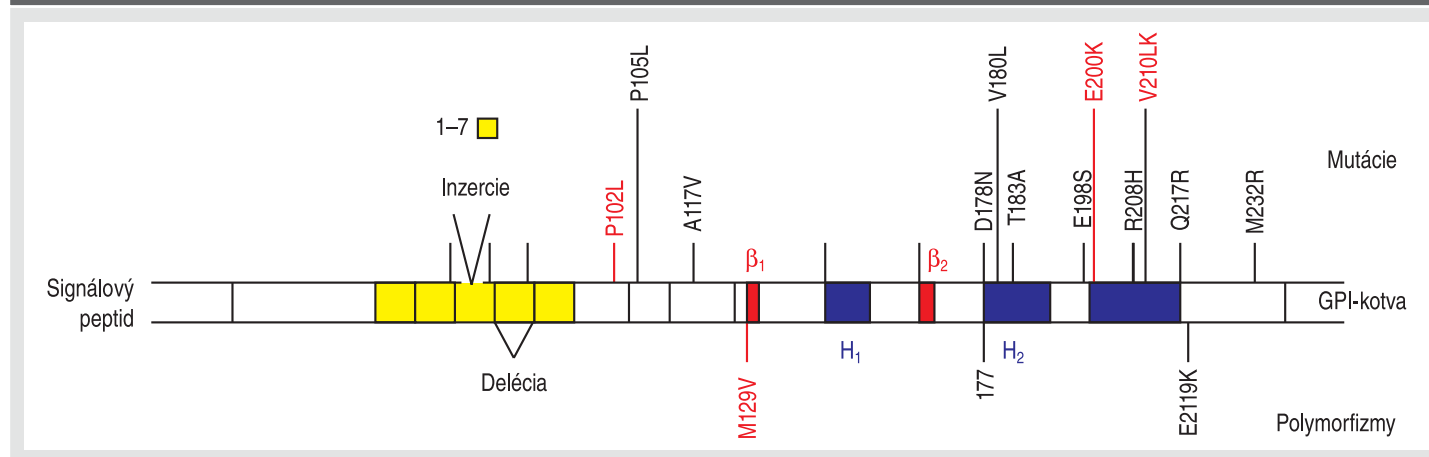
Najvýznamnejšia a najpočetnejšia humánna PCH je **sporadická forma** CJch, u ktorej príčina premeny bunkového na patologický prionový proteín nie je známa. Vyskytuje sa na celom svete a tvorí 85% všetkých prípadov CJch, ktorých ročný výskyt je 1–1,5 CJch/mil. obyvateľov.

K nákazám exogénneho pôvodu patrí **iatrogénna forma**, ktorá vzniká vniknutím prionu do hostiteľského organizmu najmä pri invazívnych liečebných zákrokoch (kontaminované nástroje, transplantácia, kontaminovaný rastový hormón) a perorálna nákaza (kuru a pravdepodobne nv-CJch). Po vniknutí prionu do mozgu hostiteľa sa bunkový PrP<sup>C</sup> podľa vzoru exogénneho prionu zmení na patologický PrP<sup>Sc</sup>, tj. hromadenie prionu sa na rozdiel od iných prenosných chorôb ne deje skutočným množením, ale premenou vlastnej, „dobrej“ prionovej bielkoviny na „zlú“ – tj. prion (18).

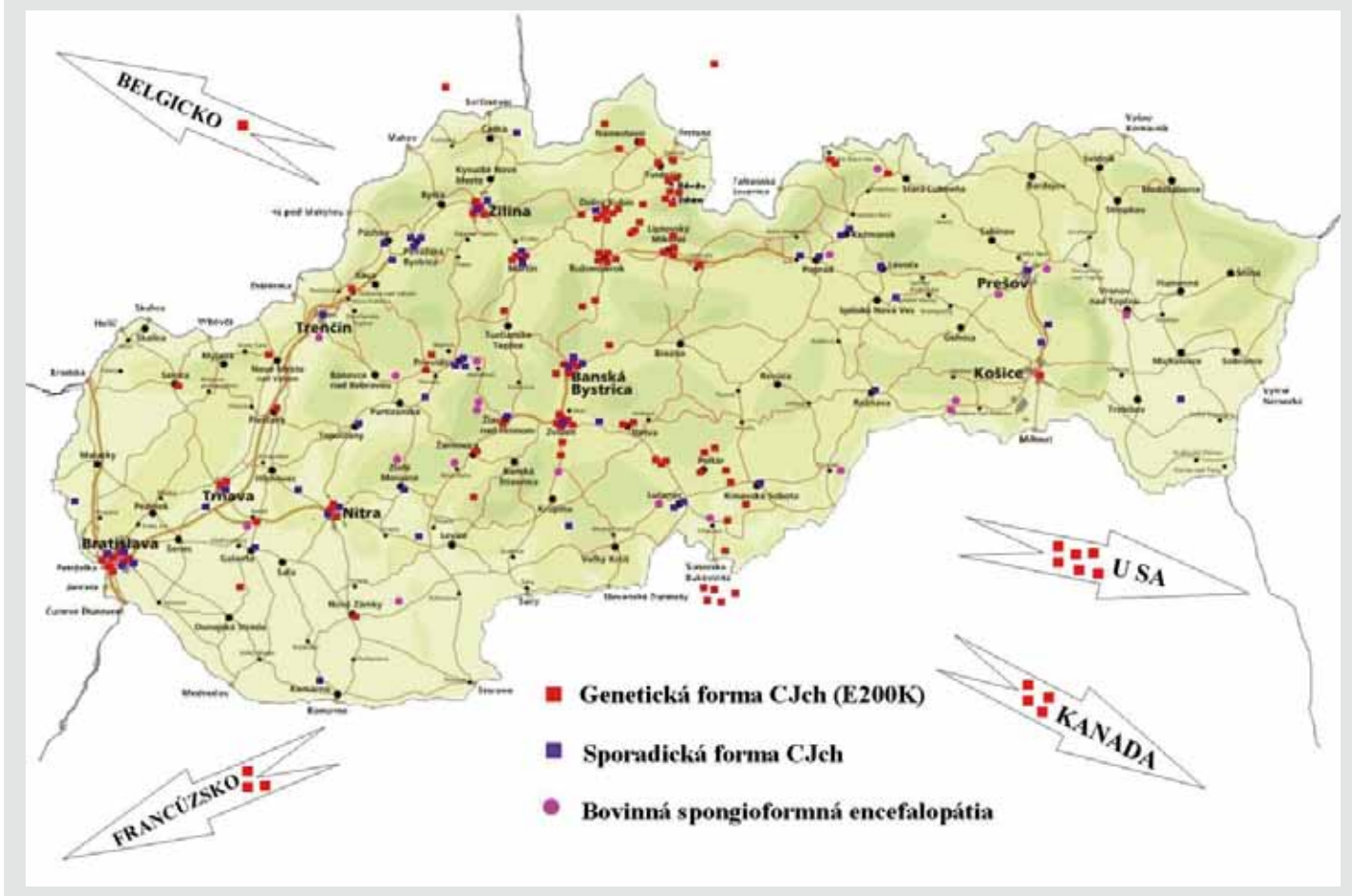
Špecifický a nešpecifický vplyv genetickej rizikových faktorov na vznik a priebeh PCH človeka.

Experimentálne bolo dokázané, že (z vyššie uvedeného dôvodu) **organizmus, ktorý nemá v genetickej výbave zakódovaný bunkový prionový proteín** (napr. geneticky modifikované, transgénne PrP<sup>0/0</sup> myši) **nemožno nakaziť prionovou chorobou (16)**. Okrem priamej závislosti na PRNP, postupne sa odкрývajú ďalšie mechanizmy, ktorými tento gén špecificky, alebo nešpecificky ovplyvňuje samotný vznik, aj klinický priebeh PCH.

Obrázok 1.



Obrázok 2. Geografický výskyt Creutzfeldtovej-Jakobovej choroby podľa miesta posledného bydliska



**Genetická forma PCH** vzniká v dôsledku zmeny v primárnej štruktúre (zámene amino-kyselín) prionového proteínu, ktorá je zakódovaná v PRNP. Zvyčajne jedna alela kóduje aminokyselinu, ktorá za normálnych okolností na danom kodóne nie je zakódovaná. Vzniká *mutácia – patologická zmena, ktorá patrí ku špecifickým genetickým rizikovým faktorom*, lebo charakteristicky ovplyvňuje vznik, klinické príznaky a trvanie určitej PCH.

Ďalšie, *nešpecifické genetické riziko reprezentujú polymorfizmy PRNP*. Polymorfizmus je normálny stav, keď na určitom kodóne môžu byť zakódované alternatívne dve aminokyseliny (napríklad metionín a valín na kodóne 129 pri polymorfizme M129V). Za fyziologických okolností nachádzame na kodóne 129 buď homozygotu, tj. na oboch alelách je metionín (Met/Met), alebo valín (Val/Val), alebo heterozygotu, keď je na jednej alele metionín a na druhej valín (Met/Val). Ktorákoľvek z uvedených 3 možností sa vyskytuje u zdravých jedincov a všetky 3 sú normálnym nálezom.

Rozdiel medzi pôsobením mutácie a polymorfizmu spočíva v tom, že kým mutácia samotná ovplyvňuje vznik a priebeh ochorenia, polymorfizmus naň vplýva v kombinácii buď s iným genetickým (mutácia), alebo exogénnym (nákaza) rizikom.

Počet TSE-špecifických mutácií stále rastie s počtom molekulárne geneticky vyšetrovaných pacientov.

U CJch sa dokázal vzťah k ochoreniu u mutácií PRNP na kodónoch 145, 171, 178, 183, 200, 210. Pestrá škála mutácií je známa u GSS, sú to napr. mutácie na kodónoch: 102, 105, 117, 198, 217. U FFI je mutácia PRNP na kodóne 178, pričom na kodóne 129 tej istej alely je metionín (5) (obrázok 1).

Penetrancia (percento chorých z celkového počtu nosičov) sa u jednotlivých mutácií líši. U GSS a FFI je vysoká, takmer kompletná, tj. takmer každý pacient – proband má v rodine ďalšieho postihnutého pokrvného príbuzného. Ide o familiárny výskyt PCH.

**Familiárny výskyt humánnych PCH** je dávno známy, dokumentovali ho genealógie rodín s početným nálezom CJch, GSS a FFI. Viedli k označeniu podskupiny „familiárna forma CJch“, ktorá v jednotlivých štátoch tvorí 5–15% prípadov všetkých CJch. Molekulárne genetické vyšetrovanie suspektných prípadov PCH ukázalo, že všetky familiárne prípady mali mutáciu PRNP. Prekvapujúci bol nález chorých nosičov mutácie, u ktorých ani dôkladný prieskum nedokázal nájsť ďalšieho postihnutého člena rodiny, čiže nedokázal sa familiárny výskyt ochorenia. Vznikla nutnosť diferencovať medzi: genetickou for-

mou, ku ktorej sa radia všetci nosiči TSE-špecifickej mutácie PRNP (širší pojem) a familiárnou formou, kam patrí výskyt viacerých postihnutých CJch v rodine (užší pojem). Viaceré analýzy dokázali, že približne iba 49–51% genetickej formy patrí k familiárnym prípadom (1, 8, 11).

Okrem mutácií menia genetickú predispozíciu k PCH aj delécie a inzercie PRNP. Tieto sú podstatne zriedkavejšie ako mutácie.

Zo známych mutácií PRNP je najviac rozšírená CJch-špecifická mutácia na kodóne 200 (mutácia E200K). Ojedinele sa vyskytuje na celom svete. Malé skupinky pacientov s touto mutáciou (CJchE200K) boli diagnostikované v Taliansku, Francúzsku, Chile a v Japonsku. Nápadné etnické zoskupenie CJchE200K sa zistilo u Líbyjských vyšetrovacov v Izraeli (7) a unikátne geografické zoskupenie sa vyskytuje na Slovensku (9, 10), kde sa vôbec po prvý raz potvrdil špecifický vzťah mutácie E200K ku vzniku CJch (1991) (4).

Ako dokumentuje analýza genetickej formy PCH v 15 štátoch (11 štátov EÚ a Švajčiarsko, Austrália, Kanada, USA) z rokov 1993–2002, najvyššie percento genetických prípadov (64,5%) sa vyskytuje na Slovensku (8, 11), čo je výrazný rozdiel v porovnaní s ostatnými štátmi hodnotenými v štúdiu (2–18%).

Mimoriadne vysoký nález genetickej formy CJCh v slovenskom súbore spôsobuje výskyt nosičov mutácie PRNP na kodóne 200. Ukázalo sa, že mutácia E200K má multifokálny pôvod a možno rozlíšiť najmenej 3 rozdielne typy – západoeurópsky, stredoerópsky a stredozemný. Podľa doterajších poznatkov je najväčšia koncentrácia pacientov CJChE200K stredoerópskeho typu (11) práve na Slovensku. Prevaha genetickej formy v SR prirodzene spôsobuje odlišný percentuálny výskyt ostatných foriem CJCh, predovšetkým neobvykle nízke percento (36 %) sporadickej formy. Zoskupenie CJChE200K súčasne sprevádza nález asymptomatických, „zdravých“ nosičov mutácie, ktorí reprezentujú 36 % vyšetrených príbuzných pacientov s CJCh. Penetrancia mutácie E200K je 60 %, tj. cca 60 zo sto nosičov ochorenie na CJCh (11).

Nakoľko v súčasnosti nie sú k dispozícii žiadne laboratórne metódy, ktorými by sa dala diagnostikovať CJCh vo včasnom, alebo v predklinickom štádiu ochorenia, čiže nedajú sa odlíšiť nosiči, ktorí po dosiahnutí určitého veku ochorejú a budú prameňom nákazy, všetci asymptomatickí nosiči tvoria „genetickú rizikovú skupinu CJCh“ v populácii SR.

Nosiči mutácie E200K („zdraví“, aj pacienti) tvorili pôvodne pomerne dobre ohraničené zoskupenia (clustery) v severnej a južnej časti stredného Slovenska. K šíreniu mutácie mimo spomenuté oblasti dochádzalo v menšej miere pri emigrácii najprv zo sociálnych, neskôr z politických dôvodov (Francúzsko, Belgicko, Kanada, USA) a hromadnejšie pri sťahovaní v rámci Rakúsko-Uhorska na „dolnú zem“ (Sarvaš, Slovenský Komlôš, Békešská Čaba). V súčasnosti to dokumentujú postihnutí CJChE200K slovenského pôvodu v blízkom aj ďalekom zahraničí. (obrázok 2) V poslednom období, v dôsledku zintenzívnenej vnútroštátnej migrácie obyvateľstva sa nosiči mutácie E200K rozšírili z pôvodných ohraničených oblastí na celé územie Slovenska.

Z polymorfizmu PRNP je najviac preštudovaný polymorfizmus na kodóne 129 (M129V). Početné štúdie dokázali, že sa jedná o významný nešpecifický genetický rizikový faktor CJCh. Ukázalo sa, že u homozygotov Met/Met je výrazne zvýšené riziko exogénnej nákazy a to tak u iatrogénnej formy CJCh (2), ako aj u nvCJCh, kde dosiaľ všetci pacienti s manifestným ochorením sú homozygoti Met/Met. Rovnako analýzy súborov sporadickej CJCh dokázali, že je najviac postihnutých medzi homozygotmi Met/Met

(1,17). Vplyv polymorfizmu M129V sa zistil aj u genetickej CJCh. Konkrétne u CJChE200K sa spája s homozygotitou Met/Met nielen najvyšší počet postihnutých, ale aj najkratšia klinická fáza ochorenia (11). Najnápadnejší je vplyv polymorfizmu M129V u mutácie PRNP na kodóne 178. Ak je táto mutácia na alele s metionínom na kodóne 129, vyvinie sa FFI. Ak je na alele s mutáciou na kodóne 129 valín, vzniká klasická CJCh (5).

Všetky doterajšie štúdie dokumentujú, že najvyššie riziko CJCh sa spája s homozygotitou Met/Met, menšie s Val/Val a najmenšie s heterozygotitou Met/Val (1, 2, 8, 11, 17). Z toho vyplýva, že nešpecifické genetické riziko CJCh v danej populácii úzko súvisí s distribúciou opísaného polymorfizmu PRNP. Prvé populačné genetické štúdie v Anglicku, ktoré analyzovali pomerne malé súbory (cca 100 osôb) priniesli relatívne optimistické závery, podľa ktorých najväčšiu časť vyšetrených kontrolných súborov tvoria heterozygoti, s najmenším rizikom CJCh (14, 17). Postupne pribúdajúce analýzy ďalších súborov poukázali tak na etnickú rozdielnosť v polymorfizme M129V (Japonci, Turci), ako aj na nerovnaké nálezy v samotnej Európe, najmä ak sa vyšetrovali väčšie, početnejšie súbory (12, 15).

Analýza polymorfizmu M129V u 613 jedincov nasvedčuje, že v populácii Slovenska tvoria najpočetnejšiu skupinu homozygoti Met/Met (48,1 %), čo signalizuje pomerne vysoké nešpecifické genetické riziko CJCh (12).

Praktické využitie molekulárne genetických vyšetrení prionových chorôb

V súčasnosti molekulárne genetické metódy nachádzajú uplatnenie vo dvoch oblastiach praktickej medicíny – v diagnostike a v prevencii PCH.

### Diagnostika:

1. Nález TSE-špecifických mutácií u pacientov so suspektnými klinickými príznakmi umožňuje včas oddiferencovať TSE od neprenosných neurodegeneratívnych chorôb. Aj keď súčasné kritériá Svetovej zdravotníckej organizácie (SZO) dovoľujú stanoviť na základe mutácie len pravdepodobnú a nie definitívnu diagnózu (19), naša dlhodobá skúsenosť dokazuje, že u všetkých pacientov kde sme na základe charakteristických klinických príznakov a prítomnej mutácie stanovili pravdepodobnú diagnózu CJCh

in vivo, autopsia definitívnu diagnózu CJCh vždy potvrdila.

2. Vyšetrenie polymorfizmu umožňuje predvídať priebeh (dĺžku) klinickej fázy, pričom heterozygoti prežívajú signifikantne dlhšie ako homozygoti.

### Prevencia:

1. Dôkaz výskytu „genetickej rizikovej skupiny“ v populácii SR viedol k praktickým opatreniam, medzi ktoré patrí povinné preventívne vyšetrenie výskytu mutácie E200K u všetkých darcov rohoviek. Z doteraz vyšetrených cca 970 darcov sa mutácia našla u dvoch, čo potvrdilo opodstatnenie zavedeného genetického testovania.

2. Vyšetrovanie pokrvných príbuzných pacientov s CJChE200K nadobúda stále väčší aktuálny aj perspektívny význam. Identifikovanie nosičov mutácie umožní:

- 2.1 ich preventívne vyradenie z akéhokoľvek darcovstva tkanív a orgánov
- 2.2 predmanželské poradenstvo a prevenciu rodičovstva dvoch nosičov mutácie
- 2.3 cieleňú prevenciu v predklinickom štádiu ochorenia, akonáhle sa vyvinie molekulárne biologická metóda nezaškrtenia účinku mutácie.

Na záver treba zdôrazniť, že molekulárne-genetické metódy prispeli nielen k presnejšiemu charakterizovaniu a urýchleniu diagnostiky humánnych PCH, naznačili možnosti a viedli k prvým pokusom o ich prevenciu, ale tiež významne posunuli vpred aj poznatky o ich etiopatogenéze. Pri ich rýchlom zdokonaľovaní a vývoji sa očakáva, že jeden z najbližších prínosov bude zameraný na asymptomatických nosičov TSE-špecifických mutácií u ktorých preventívne zablokuje jej vplyv skôr, ako dôjde ku klinickej manifestácii smrteľného prionového ochorenia.

### MUDr. Eva Mitrová, DrSc.

Národné Referenčné Centrum Prionových chorôb,  
Slovenská zdravotnícka univerzita – Vedecko-výskumná  
báza ÚPKM, Limbová 12, 833 03 Bratislava  
e-mail: mitrova@upkm.sk

### Literatúra:

1. Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M, Mitrova E, de Pedro Cuesta J, Collins S, Kretzschmar H, van Duijn C, Will RG. Codon 129 prion protein genotype and sporadic CJD. *Lancet* 1999; 353 (9165): 1673–1674.
2. Collinge J, Palmer M, Gryden A. Genetic predisposition to iatrogenic CJD. *Lancet* 1991; 337: 1441–1442.

3. Creutzfeldt H.G. Über eine eigenartige Erkrankung des Zentralnervensystems. In: *Histologische und Histopathologische Arbeiten über die Grosshirnrinde*. Edit.: Nissl F. and Alzheimer A., Jena, Gustav Fischer 1921; 1–48.
4. Goldfarb L, Mitrová E, Brown P, Toh B and Gajdusek DC. Mutation in codon 200 of scrapie amyloid gene in two clusters of CJD in Slovakia. *Lancet* 1990; 336: 514.

5. Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, Cortelli P. Fatal familial insomnia and familial CJD: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 1992; 258: 806–808.
6. Hsiao K, Baker H, Crow T at al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrom. *Nature* 1989; 338: 342–345.
7. Kahana E, Alter M, Braham J, Sofer D. Creutzfeldt-Jakob Disease: focus among Libyan Jews in Israel. *Science* 1974; 183: 90–91.
8. Kovács GG, Puopulo M, Ladogana A, Pocchiari M, van Duijn C, Collins SJ, Brandel JP, Zerr I, Will R, Mitrová E. Genetic prion disease: the EURO-CJD experience. *Hum Genet* 2005; 113: 439–448.
9. Mitrová E. Focal accumulation of CJD in Slovakia. In: Search for the cause of MS and other chronic CNS diseases. Edit.: Boese H., Frankfurt.1980; 356–366.
10. Mitrová E: Some new aspects of CJD epidemiology in Slovakia. *Eur J Epidemiol* 1991; 7 (5): 439–450.
11. Mitrová E, Belay G. Creutzfeldt-Jakob disease with E200K mutation in Slovakia: characterization and development. *Acta Virol* 2002; 46: 31–39.
12. Mitrová E, Mayer V, Jovankovičová V, Slivarichová D, Wsóllová L. CJD risk and PRNP codon 129 polymorphism: necessity to revalue current data. *Europ J Neurol* 2005; 12:1–4.
13. Morot-Gaudry-Talarmain Y, Rezaei H, Guernonprez E. Selective prion protein binding to synaptic components is modulated by oxidative and nitrosative changes induced by copper (II) and peroxynitrite in cholinergic synaptosomes, unveiling a role for calcineurin B. *J Neurochem* 2003; 87: 1456–1470.
14. Owen F, Poulter M, Collinge J, Crow TJ, Risby D, Prusiner S. Codon 129 changes in prion protein gene in Caucasians. *Lancet* 1990; 46: 1215–1216.
15. Nurmi MH, Bishop M, Strain L. The normal population distribution of PRNP codon 129 polymorphism. *Acta Neurol Scand* 2003; 108: 374–378.
16. Nunziante A, Sabine G, Schätzl H M. Prion diseases: From molecular biology to intervention strategies. *Cem Bio Chem* 2003; 4: 1268–1284.
17. Palmer M, Dryden A, Hughes J. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic CJD. *Nature* 1991; 352: 340–342.
18. Prusiner SB. Shatuck lecture – neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med* 2001; 344: 1516–1526.
19. WHO manual for surveillance of human transmissible spongiform encephalopathies including vCJD. 2003; 1–90.
20. Will R. New variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *Biomed and Pharmacother* 1999; 53: 9–13.