

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Kontroverze prionové teorie

Bakalářská práce

Veronika Prančlová

Školitel: doc. RNDr. Daniel Růžek, PhD

České Budějovice 2016

Prančlová V., 2016: Kontroverze prionové teorie [The controversy of the protein-only theory. Bc. Thesis, in Czech] – p. 49, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Prions are protein infectious particles in absence of nucleic acid, responsible for the fatal transmissible spongiform encephalopathies. This bachelor's thesis includes the characteristic of the infectious agent, the description of human and animal prion diseases, a historical development of the protein-only hypothesis and literary analysis of data about both protein-only theory and alternative hypotheses. Equally, this work points out the issue of the potential participation of cofactors in the process of the prion replication.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích

18. 4. 2016

.....

Veronika Prančlová

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli doc. Danielu Růžkovi za to, že mi umožnil psát práci na toto téma, a také za trpělivost a ochotu. Poděkování samozřejmě patří i mým rodičům za jejich úžasnou podporu, kterou mi poskytují po celou dobu mého studia.

Obsah

1. Priony	1
1.1 Úvod.....	1
1.2 PRNP gen.....	2
1.3 PrP ^C	3
1.4 PrP ^{Sc}	5
1.5 Konverze prionového proteinu	5
1.6 Prionové kmeny	6
1.7 Priony u nižších eukaryot	7
2. Transmisivní spongiformní encefalopatie	9
2.1 Transmisivní spongiformní encefalopatie člověka	10
2.1.1 Kuru	10
2.1.2 Creutzfeldt-Jakobova choroba	11
2.1.3 Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův syndrom	12
2.1.4 Fatální familiární insomnie.....	13
2.1.5 Variabilní na proteázu senzitivní prionopatie.....	14
2.2 Transmisivní spongiformní encefalopatie zvířat	14
2.2.1 Scrapie	14
2.2.2 Transmisivní encefalopatie norků	15
2.2.3 Chronické chřadnutí jelenovitých.....	16
2.2.4 Bovinní spongiformní encefalopatie	17
2.2.5 Felinní spongiformní encefalopatie	18
3. Prionová hypotéza a teorie alternativní.....	19
3.1 Historické pozadí let 1848–1982	19
3.2 Hypotézy	25
3.2.1 Prionová hypotéza	25
3.2.2 Virová hypotéza.....	27
3.2.3 „Virino“ hypotéza.....	28
3.2.4 „Unified theory“	28
4. Konečný experiment	29

4.1	Kofaktor	31
4.1.1	RNA.....	32
4.1.2	Lipidy	33
4.2	Kofaktory a prionová hypotéza.....	35
5.	Diskuze.....	36
6.	Závěr.....	38
7.	Seznam zkratek	39
8.	Seznam literatury.....	41

1. Priony

1.1 Úvod

Transmisivní spongiformní encefalopatie (TSEs), známé také pod označením prionové choroby, představují skupinu fatálních neurodegenerativních onemocnění, která se týkají nejenom zvířat, ale také člověka. Podle příčiny lze TSEs rozdělit na sporadické, familiární a získané. Snad k nejznámějším prionovým chorobám patří bovinní spongiformní encefalopatie u hovězího dobytka a Creutzfeldt-Jakobova choroba u člověka. Ačkoliv prionové choroby nepatří mezi běžná onemocnění s vysokou incidencí, nelze je brát na lehkou váhu, neboť stále ještě existují nezodpovězené otázky, jejichž odpovědi jsou důležité nejenom z hlediska vědeckého, ale také z hlediska nastavení vhodné léčby – v současné době totiž neexistuje pro tyto neurodegenerativní choroby žádný lék.

Za původce transmisivních spongiformních encefalopatií jsou v souladu s prionovou hypotézou považovány priony jakožto proteinové infekční částice prosté kódující nukleové kyseliny, jež pravděpodobně sestávají výhradně z modifikovaného proteinu, který označujeme jako PrP^{Sc}. Předpokládá se, že tato patologická izoforma vzniká konverzí normálního prionového proteinu (PrP^C), který se běžně vyskytuje v buňkách řady savčích tkání.

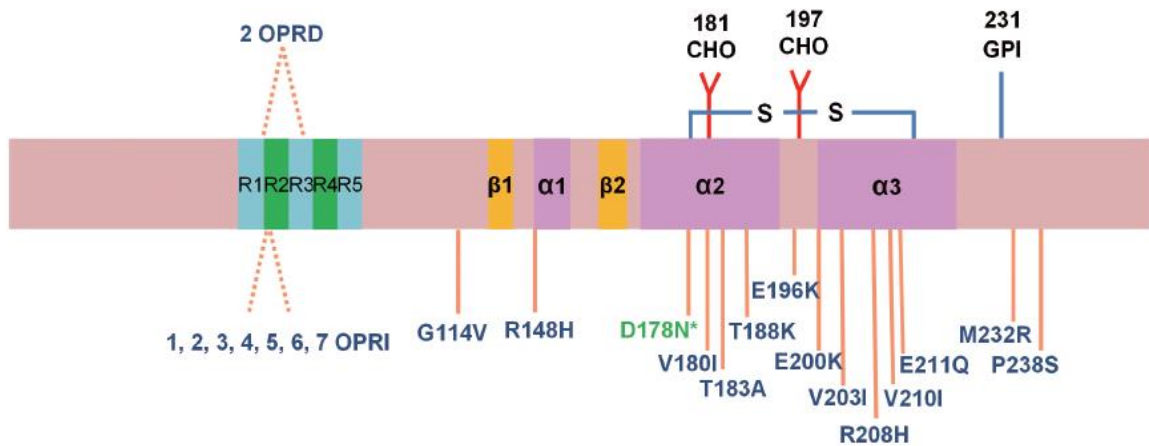
V současné době je prionová hypotéza, známá také jako „protein-only“ hypotéza, všeobecně přijímána, ačkoliv kvůli své kontroverznosti dlouhá léta čelila jisté skepsi. Byly proto navrhovány i teorie alternativní ve snaze lépe objasnit některé neobvyklé vlastnosti infekčního agens, jako je například existence prionových kmenů. Snahy o ukončení dohadů vedly ke shodnému závěru, že prionová hypotéza bude prokázána tehdy, až se podaří úspěšně vytvořit infekční agens *in vitro*.

1.2 PRNP gen

Lidský gen, který kóduje buněčný prionový protein, se nazývá PRNP a je umístěn na krátkém raménku 20. chromozomu, konkrétně v místě 20p12, a obsahuje dva exony, z nichž právě ten větší nese kompletní otevřený čtecí rámec, který kóduje prionový protein (Imran a Mahmood, 2011b; Jeong a Kim, 2014).

Dosud bylo v otevřeném čtecím rámci PRNP genu zaznamenáno více než 30 mutací a k tomu ještě mnoho polymorfismů. Tyto mutace jsou příčinou vzniku dědičných prionových chorob, mezi které řadíme familiární Creutzfeld-Jakobovu chorobu (fCJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův syndrom a fatální familiární insomni. Příkladem běžných mutací mohou být E200K a V180I, obě spojené s fCJD. Co se týká polymorfismů, velmi důležitou roli hrají tzv. jednonukleotidové polymorfismy v kodonech 129 a 219, které mají značný vliv na citlivost k prionovým chorobám. Tak například v kodonu 129 je kódován buď metionin, nebo valin, což nám poskytuje tři možné varianty – MM, MV a VV, přičemž mezi pacienty jasně převládají homozygoti. Nejvíce očividné je to u případů nové varianty Creutzfeld-Jakobovy choroby, kdy byli všichni pacienti v tomto kodonu homozygotní na metionin (Takada a Geschwind, 2013; Jeong a Kim, 2014).

V laboratorním prostředí byly vytvořeny myši s označením Prnp^{0/0}. Tyto myši postrádaly PRNP gen a kromě toho, že u nich byly zjištěny abnormality v mozkových synapsích, se ukázaly být rezistentní vůči prionovým chorobám, což naznačuje klíčovou roli PRNP genu, respektive prionového proteinu, při rozvoji prionového onemocnění (Colby a Prusiner, 2011).



Obrázek 1: Přehled mutací v PRNP genu způsobujících Creutzfeldt-Jakobovu chorobu či fatální familiární insomni. OPRI a OPRD značí inserce a delece oktapeptidových repetic, GPI značí glykosylfosfatidylinositol a CHO glykosylační místa spojená s asparaginem (Jeong a Kim, 2014).

1.3 PrP^C

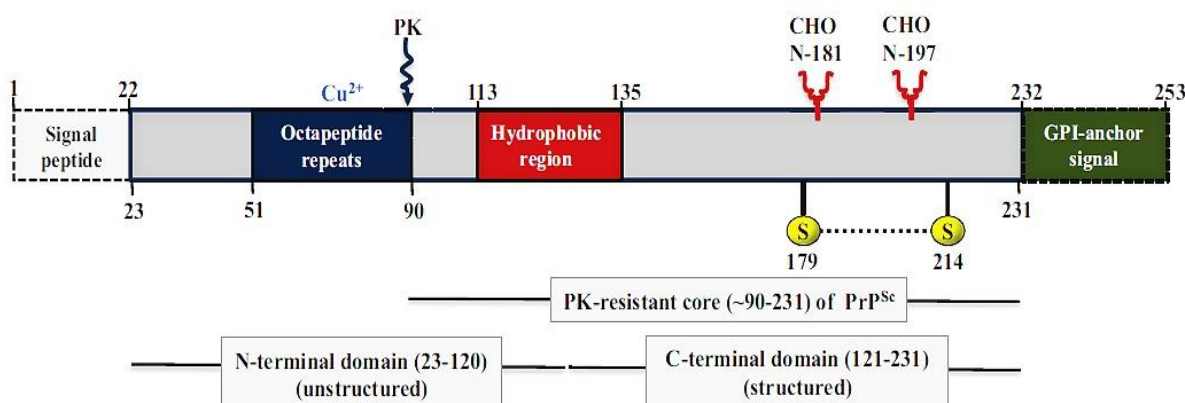
PrP^C je buněčný prionový protein, který se u dospělých savců vyskytuje v největším množství v tkáni centrálního nervového systému. V nižších koncentracích ho však lze najít i jinde, například v srdci, slezině, játrech, ledvinách či v tkáni gastrointestinálního traktu (Peralta a Eyestone, 2009). Přítomnost této izoformy prionového proteinu je tedy ve zdravém organismu běžná, pravá podstata její fyziologické funkce však vědcům stále uniká. V úvahu zatím připadá jeden či více následujících biologických procesů: metabolismus neurotransmiterů, aktivace buněk imunitního systému, buněčná adheze, signální transdukce, metabolismus mědi a ochrana buněk proti oxidativnímu stresu a apoptóze (Zomosa-Signoret *et al.*, 2007).

Z hlediska struktury jde o glykoprotein, který u člověka sestává z 253 aminokyselin, a jeho molekulová hmotnost se pohybuje mezi 35 a 36 kDa (Dormont, 2002). V rámci flexibilní a poměrně nestrukturované N-terminální domény můžeme nalézt čtyři nebo pět oktapeptidových repetic, které se vyznačují vysokou afinitou k měďnatým iontům, a N-terminální signální peptid. Prvních 22 aminokyselin N-terminální domény je z proteinu odstraněno po jeho transportu do endoplazmatického retikula. V centru proteinu se pak vyskytuje hydrofobní oblast. Strukturovaná C-terminální doména obsahuje jednu

disulfidickou vazbu mezi cysteinovými zbytky a dvě N-glykosylační místa. Posledních 23 aminokyselin této domény je odštipnuto po přidání tzv. GPI kotvy. (Imran a Mahmood, 2011b; Acevado-Morantes a Wille, 2014).

C-konec prionového proteinu proto také hraje důležitou roli v připojení k buněčnému povrchu. Prionový protein se totiž vyskytuje především na vnějším povrchu buněk, k jejichž vnějšímu listu membrány je přichycen právě prostřednictvím výše zmíněné GPI kotvy. GPI je složitý glykolipid glykosylfosfatidylinositol, k němuž je koncová aminokyselina C-konce extracelulárního proteinu vázána kovalentní vazbou (Weissmann *et al.*, 2002). Prionové proteiny ukotvené pomocí glykosylfosfatidylinositolu se koncentrují v tzv. raftových mikrodoménách neboli lipových raftech. Jedná se o části buněčné membrány, které mají ve srovnání s jejichmi neraftovými částmi poněkud jiné složení, jsou bohaté na cholesterol, lipidy a glykolipidy. Byla však detekována i subpopulace neuronů hipokampu, thalamu a neokortexu, u nichž se prionový protein nacházel převážně v cytosolu (Mironov *et al.*, 2003).

S pomocí FTIR spektroskopie (infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací) bylo zjištěno, že sekundární struktura buněčného prionového proteinu sestává ze 42 % z α -helixu a z pouhých 3 % z β -skládaného listu (Requena a Wille, 2014).



Obrázek 2: Uspořádání lidského prionového proteinu (Acevado-Morantes a Wille, 2014).

1.4 PrP^{Sc}

Nerozpustnost PrP^{Sc} společně s neúspěšnými pokusy krystalizovat jeho heterogenní multimery neumožňuje studium struktury tohoto proteinu metodami s vysokým rozlišením. I přes tento problém však bylo vytvořeno hned několik modelů navrhuujících jeho molekulární strukturu. Dosavadní návrhy se však mezi sebou neshodují a ani jeden z nich neposkytuje uspokojující vysvětlení struktury PrP^{Sc}. Z těchto důvodů toho není o struktuře tohoto patogenního proteinu ani zdaleka známo tolik jako je tomu v případě jeho normální buněčné formy (Vázquez-Fernández *et al.*, 2012; Requena a Wille, 2014).

PrP^{Sc} se liší od své fyziologické buněčné formy nejen svou sekundární a terciární strukturou, ale též tvoří agregáty, je vysoce nerozpustný v detergentech neiontového charakteru a vyznačuje se částečnou rezistencí vůči účinkům proteázy. Bylo ale zjištěno, že ne všechny PrP^{Sc} molekuly jsou takto rezistentní a že stupeň rezistence se liší u různých druhů (Colby a Prusiner, 2011; Halliday *et al.*, 2014).

S pomocí FTIR spektroskopie bylo zjištěno, že sekundární struktura PrP^{Sc} sestává z 30 % z α -helixu, přičemž β -skládaný list tvoří výrazně větší procento než v případě PrP^C, a to 43 % (Requena a Wille, 2014).

1.5 Konverze prionového proteinu

V současné době stále není osvětlen přesný molekulární mechanismus zodpovědný za tvorbu infekčních PrP^{Sc} konformací, podobně jako není objasněna terciární struktura této patologické formy prionového proteinu (Supattapone, 2014). Původní hypotéza navržená Johnem S. Griffithem a Stanleyem B. Prusinerem předpokládá, že PrP^{Sc} dokáže spustit autokatalytickou konverzi normálního PrP^C, jemuž vtiskne svou chybnou formu – PrP^C se tak přemění na patologickou formu, PrP^{Sc} (Acquatella-Tran Van Ba *et al.*, 2013).

Velký počet důkazů naznačuje, že přeměna endogenního PrP^C je katalyzována malým množstvím exogenního PrP^{Sc}. Patologický protein může jednat jako jádro, které nabírá

molekuly PrP^C, indukuje jejich konverzi na patologickou formu a posléze takto přeměněné molekuly začleňuje do rostoucího oligomeru. Tímto způsobem je PrP^{Sc} polymer postupně prodlužován, až dojde k jeho fragmentaci, kterou vznikne více jader schopných katalyzovat konverzi dalších molekul PrP^C (Soto, 2011; Morales *et al.*, 2012).

V případě familiární formy transmisivních spongiformních encefalopatií je konverze prionového proteinu usnadněna mutacemi v PRNP genu. U získaných spongiformních encefalopatií pak prionovou replikaci iniciují přenosem nabyté molekuly PrP^{Sc} a u sporadických forem dochází ke konverzi PrP^C na PrP^{Sc} spontánně (Makarava *et al.*, 2016).

1.6 Prionové kmeny

Podobně jako struktura PrP^{Sc}, i existence tzv. prionových kmenů je obestřena řadou nezodpovězených otázek. Prionové kmeny byly poprvé pozorovány v souvislosti s klusavkou, kdy se u koz infikovaných stejnou várkou scrapie agens vyvinuly odlišné klinické fenotypy. Od té doby bylo izolováno přibližně 20 různých kmenů z ovcí a koz postižených touto nákazou (Liberski a Jaskólski, 2002; Solfrosi *et al.*, 2013).

S ohledem na prionovou hypotézu, která u prionů předpokládá absenci genetické výbavy, je v současné době přijímána hypotéza, že za vznikem prionových kmenů stojí s největší pravděpodobností pouze odlišné konformace PrP^{Sc}. Protože ale zatím nejsou k dispozici informace o struktuře PrP^{Sc} ve vysokém rozlišení, usuzuje se tak pouze na základě odlišných biochemických a biofyzikálních vlastností jednotlivých kmenů (Kretzschmar a Tatzelt, 2013). Infekce různými prionovými kmeny se totiž liší různou délkou inkubační doby, klinickými symptomy i neuropatologickými znaky. Původce lze klasifikovat i na základě biochemických parametrů jako je například podíl glykosylace, míra rezistence k proteináze K (PK) či elektroforetická mobilita po štěpení PK (Solfrosi *et al.*, 2013).

Například v rámci sporadické Creutzfeld-Jakobovy choroby (sCJD) byly identifikovány dva různé fragmenty na proteázu rezistentního PrP^{Sc} – typ 1 s molekulární hmotností 21 kDa a typ 2 s molekulární hmotností 19 kDa. Další studie pak poukázaly na to,

že tyto dva typy PrP^{Sc} se mohou různě kombinovat se třemi PRNP genotypy (129 MM, 129 MV a 129 VV), což umožňuje existenci celkem šesti odlišných fenotypů – šesti různých kmenů. Tuto klasifikaci, jejíž správnost nebyla zatím definitivně potvrzena, navrhl Parchi *et al.*, kteří spojují pět těchto fenotypů s sCJD, šestý fenotyp pak se sporadickou fatální insomnií (Gambetti *et al.*, 2011; Poggiolini *et al.*, 2013).

1.7 Priony u nižších eukaryot

Brian Cox popsal v roce 1965 [PSI⁺] – nemendelistický faktor v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, který zvyšoval účinnost slabého ochre-supresoru SUQ5 vedoucí k chybnému čtení stop kodonu UAA jako kodonu kódujícího aminokyseliny. Později vyšlo najevo, že dokáže zvýšit účinnost čtení všech tří „nonsense“ kodonů, tedy UAA, UAG i UGA. Tento faktor se ukázal být dominantní a děděný nemendelistickým způsobem – faktor je fyzicky přenášen z jedné buňky do druhé prostřednictvím cytodukce čili smísením cytoplazem (Liebman a Derkatch, 1999; Wickner *et al.*, 2006; Shkundina a Ter-Avanesyan, 2007). Francois Lacroute poté o šest let později objevil u *Saccharomyces cerevisiae* další genetický element, který byl také děděn nemendelistickým způsobem a přenášen mezi buňkami cytodukcí. Tento element pojmenoval [URE3] (Masison *et al.*, 2000). V roce 1994 byl vydán článek Reeda Wicknera, v němž navrhl, že [URE3] a [PSI⁺] jsou prionové formy kvasinkových proteinů Ure2 a Sup35. Návrh to byl sice revoluční, nicméně dobře vysvětloval neobvyklou nemendelistickou povahu těchto genetických elementů. Kvasinkové priony tedy byly definovány jako proteiny, které se chovají jako nemendelistické genetické elementy, jež přenáší biologickou informaci za nepřítomnosti nukleové kyseliny (Soto a Castilla, 2004).

Kvasinkové priony hrají roli v regulaci exprese genetické informace a mohou tak nepřímo ovlivňovat širokou škálu buněčných procesů. Na rozdíl od savčích prionů však mohou být buňce i prospěšné například tím, že zvyšují životaschopnost kvasinek za nepříznivých podmínek. Například přítomnost [PSI⁺] v buňce zvyšuje její rezistenci k teplotnímu šoku (Shkundina a Ter-Avanesyan, 2007; Tuite a Serio, 2011). Stejně jako savčí priony existují ve dvou formách – rozpustné a k proteáze citlivé či nerozpustné a k proteáze rezistentní. Také bylo prokázáno, že prionový faktor může být vyléčitelný, přičemž

se ale může v téže buňce znovu spontánně objevit, a také že zvýšená exprese daného proteinu zvyšuje pravděpodobnost spontánního vzniku jeho prionové formy (Soto a Castilla, 2004).

Vedle [PSI⁺] a [URE3] byly objeveny i další kvasinkové priony, například [SWI⁺], [OCT⁺], [MOT3⁺] či [ISP⁺]. Kvasinky však nepředstavují jediného zástupce nižších eukaryot, u něhož byly nalezeny priony. U vřeckovýtrusné houby *Podospora anserina* byl nalezen prion označovaný jako [Het-s], který v případě vegetativní inkompatibility během fúze hyf zabraňuje potenciálnímu přenosu virů usmrcením vzniklého heterokaryonu (Shkundina a Ter-Avanesyan, 2007; Tuite a Serio, 2011).

Existence těchto forem prionů byla vědci využita i ke studiu savčích prionů, respektive k ověření prionové hypotézy (Soto a Castilla, 2004).

2. Transmisivní spongiformní encefalopatie

Priony jsou tedy původci přenosných spongiformních encefalopatií, jinak také prionových onemocnění, které postihují nejenom zvířata, ale i člověka (Prusiner, 1998).

Všechna prionová onemocnění spojuje dlouhá inkubační doba, rychlá progresse symptomů a nevyhnutelně fatální dopad na mozkovou tkáň. Hlavní histopatologické projevy těchto chorob se omezují na centrální nervový systém, přičemž za nejcharakterističtější znak se považuje vakuolizace mozkové tkáně, která byla vědci poprvé popsána již v roce 1898 v rámci studia ovcí nakažených klusavkou (Wang a Ma, 2013). Tento jev, který se histologicky projevuje přítomností velmi četných malých vakuol v mozkové tkáni a je zodpovědný za typický houbovitý vzhled degenerované mozkové tkáně, je důvodem, proč se tato skupina chorob nazývá spongiformní encefalopatie. Strukturální změny se týkají převážně šedé kůry mozkové, dochází i ke ztrátě neuronů a astroglióze (Field a Peat, 1969; Mačák a Mačáková, 2004). V centrálním nervovém systému se hromadí patologická forma buněčného prionového proteinu – PrP^{Sc} (Soto a Castilla, 2004). Jako klíčový klinický projev je v případě lidských prionových onemocnění shledávána demence (Caine *et al.*, 2015).

Mezi známá zvířecí prionová onemocnění patří scrapie, transmisivní encefalopatie norků (TME), chronické chřadnutí jelenovitých (CWD), bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) a její analogie u několika exotických druhů antilop a divokých kočkovitých šelem a felinní spongiformní encefalopatie u domestikovaných koček (FSE). Lidská prionová onemocnění zahrnují Creutzfeldt-Jakobovu chorobu (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův (GSS) syndrom, fatální familiární insomni (FFI), kuru a poměrně nedávno objevenou variabilní na proteázu senzitivní prionopatii (VPSPr) (Liberski, 2012).

Lidská prionová onemocnění lze rozdělit dle etiologie na sporadická, familiární a získaná. Sporadické prionové choroby jsou nejrozšířenější (tvoří 85–95 % všech případů) a pravděpodobně vznikají samovolnou změnou konformace celulárního prionového proteinu na jeho patologickou formu, v úvahu však připadá i somatická mutace v PRNP genu. Familiární onemocnění jsou geneticky podmíněná – způsobují je mutace v PRNP genu vykazující autozomálně dominantní typ dědičnosti, a tvoří asi 10–15 % všech případů.

Získaná prionová onemocnění jsou v současné době na ústupu a tvoří tak zhruba 1–3 % případů. Vznikají buď jako následek kontaminace chirurgického náčiní či lékařského materiálu, nebo jako následek konzumace tkání nemocného jedince, zejména tedy tkání bohatých na prionové bílkoviny (Imran a Mahmood, 2011b; Takada a Geschwind, 2013).

2.1 Transmisivní spongiformní encefalopatie člověka

2.1.1 Kuru

Vůbec první dokument týkající se této choroby byl vydán vědci Carletonem Gajduskem a Vincentem Zigasem v roce 1957. O 2 roky později si William J. Hadlow povšiml podobnosti mezi kuru a klusavkou, o čemž posléze korespondenčně zpravil Gajduska, kterého tato informace přiměla k návštěvě institutu v Edinburghu, v té době centra pro výzkum scrapie. V roce 1965 pak Gajdusek, Gibbs a Alpers oznámili úspěšný přenos kuru na šimpanze intracerebrální inokulací. V roce 1967 se kuru oficiálně stala první popsanou lidskou transmisivní spongiformní encefalopatií (Alpers, 2008; Liberski, 2012.)

Kuru sužovala lid kmene Fore a jeho blízké sousedy na území Papui-Nové Guineji. Postiženy bývaly nejvíce mladé dospělé ženy a děti bez ohledu na pohlaví, což, jak se později ukázalo, úzce souviselo se zvyky místního obyvatelstva. Lidé kmene Fore totiž praktikovali rituální kanibalismus, přičemž muži konzumovali převážně maso, ženy a děti naopak vnitřnosti včetně mozkové tkáně, která byla bohatá na prionové bílkoviny (Alpers, 2008).

Nejvýraznějším projevem nemoci je bezesporu tremor postihující hlavu, trup i končetiny, a ataxie. Oba tyto příznaky se prohlubují s průběhem nemoci a doplňují nápadné změny chování, nejčastěji v podobě emocionální nestability a nepřiměřených projevů veselosti. Případný intelektuální úpadek je možné pozorovat až v terminálním stádiu nemoci (Brown, 1990).

Inkubační doba se pohybuje přibližně v rozmezí od 4 do 40 let, může být však i výrazně delší. V případě dospělých mužů postižených touto chorobou byla inkubační doba

stanovena na 50 a více let. S vládním potlačením kanibalismu epidemie dle předpokladu slábla, v důsledku dlouhé inkubační doby se však několik případů kuru vyskytlo i ve 21. století (Alpers, 2008; Mathews, 2008).

2.1.2 Creutzfeldt-Jakobova choroba

Případy Creutzfeldt-Jakobovy choroby byly vůbec poprvé publikovány v roce 1920 Hansem G. Creutzfeldtem a Alfonsem M. Jakobem, a to nezávisle na sobě. O 2 roky později pak byla tato choroba pojmenována Waltherem Spielmeyerem (Triarhou, 2009).

Toto neurodegenerativní onemocnění je vzácné a často obtížně diagnostikovatelné, nicméně by mělo být bráno v úvahu v případě progresivní demence s klinickými nálezy zahrnujícími myoklonus, zrakové poruchy a také mozečkové a pyramidové či extrapyramidové příznaky, které zahrnují omezení hybnosti a abnormální držení částí těla nebo mimovolní pohyby. V pozdním stádiu dochází k rozvoji akinetického mutismu, kdy postižený sice působí bděle, není však schopen řeči ani samovolného pohybu. Smrt je nevyhnutelná a nastává často v průběhu 12 měsíců od počátku onemocnění (Mumenthaler *et al.*, 2008; Kojima *et al.*, 2013). V současné době rozlišujeme celkem čtyři různé formy Creutzfeldt-Jakobovy choroby – sporadickou (sCJD), familiární (fCJD), iatrogenní (iCJD) a novou variantu (vCJD) (Degnan a Levy, 2013).

Sporadická forma je nejdéle známou a také nejběžnější variantou Creutzfeldt-Jakobovy choroby. Její celosvětová roční incidence se udává 1–2 případy na milion obyvatel. Nemocní se nejčastěji nacházejí ve věkové skupině mezi 60 a 80 lety (Kojima *et al.*, 2013).

V 5–15 % všech případů CJD se jedná o fCJD, která vykazuje autozomálně dominantní formu dědičnosti, a je způsobena různými mutacemi v PRNP genu, z nichž asi nejznámější je bodová mutace E200K (Imran a Mahmood, 2011b; Degnan a Levy, 2013).

V případě iatrogenní formy onemocnění jde o nechtěný přenos v průběhu lékařských či chirurgických procedur, přičemž první případ, zaznamenaný v roce 1974, byl způsoben transplantací rohovky za použití štěpu z osoby trpící sCJD. Obdobný přenos byl zjištěn i při

neurochirurgických výkonech s použitím kontaminovaných nástrojů či skrze kontaminovaný lidský růstový hormon (Aguzzi a Calella, 2009).

Nová varianta Creutzfeldt-Jakobovy choroby byla poprvé popsána v roce 1996 ve Velké Británii a z hlediska etiologie jde pravděpodobně o nákazu konzumací masa z hovězího dobytka infikovaného BSE. Na rozdíl od ostatních forem nemoci se nová varianta vyskytuje u mladších osob, průběh nemoci bývá delší a v počátcích lze pozorovat poměrně výrazné psychické abnormality (Aguzzi a Calella, 2009; Atalay *et al.*, 2015).

2.1.3 Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův syndrom

Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův syndrom byl poprvé pozorován v roce 1936 u početné rakouské rodiny. Nemoc vykazovala autozomálně dominantní typ dědičnosti a v každém případě byla smrtelná (Park MJ *et al.*, 2010; Imran a Mahmood, 2011b).

Tento vzácný syndrom s roční incidencí 1 případ na 100 miliónů obyvatel se typicky projevuje pomalu postupující cerebelární ataxií, kterou následuje pozdní nástup kognitivního úpadku. Vlivem poškození mozečku se mohou objevit různé příznaky, například abnormální způsob chůze, porucha motorické realizace řeči jako celku (dysartrie), nepravidelné kmitání očních koulí v klidu po předchozím volném pohybu (okulární dysmetrie), méně četný myoklonus, který se projevuje prudkými, nepravidelnými záškuby svalů, či spastická paraparéza projevující se ochrnutím jedné poloviny těla, nejčastěji dolních končetin, přičemž svaly nejsou ochablé, ale napjaté, a kladou odpor pasivnímu ohýbání. Demence se vyvíjí v pozdním stádiu nemoci (Park MJ *et al.*, 2010; Imran a Mahmood, 2011b; Ambler, 2011; Lukáš a Žák, 2014; Vokurka a Hugo, 2015).

Počátek nemoci se nejčastěji objevuje mezi 40. a 60. rokem života, může však nastat již ve věku 25 let. Její průběh se pohybuje mezi 3 a 8 či více lety, průměrná doba trvání však bývá 5 let. Ve srovnání s CJD, průběh GSS je výrazně delší (Park MJ *et al.*, 2010; Takada a Geschwind, 2013).

Jako dědičná prionová choroba je spojena s mutacemi v PRNP genu, přičemž se hovoří přinejmenším o 15 různých mutacích. Konkrétně jde o bodové mutace v kodonech 102, 105, 117, 131, 145, 160, 187, 198, 202, 211, 212, 217, 226 a 227 a o inzerční mutace 8 a 9 oktapeptidových repetit. (Bechtel a Geschwind, 2013; Jeong a Kim, 2014). Nejběžnější příčinou GSS je mutace v kodonu 102, konkrétně P120L (Imran a Mahmood, 2011b).

Druh mutace má vliv na délku trvání nemoci i její příznaky. V některých případech byly namísto ataxie jakožto primárního znaku pozorovány změny chování a brzká demence (Takada a Geschwind, 2013; Bechtel a Geschwind, 2013).

2.1.4 Fatální familiární insomnie

Fatální familiární insomnie je velmi vzácné prionové onemocnění, které bylo popsáno v roce 1986, přičemž do roku 2011 bylo zaznamenáno téměř 40 postižených rodin z různých zemí po celém světě (Imran a Mahmood, 2011b).

Tato choroba také vykazuje autozomálně dominantní typ dědičnosti, její příčinou je však jediná bodová mutace v PRNP genu, která vede k záměně asparaginu za kyselinu asparagovou. Tato mutace je ještě navíc asociovaná s metioninovým kodonem 129 na téměř chromozomu a haplotyp tak nese označení D178N-129M (Mastrianni *et al.*, 1999; Takada a Geschwind, 2013). Existují však 2 genotypy – 129 MM (Met/Met) a 129 MV (Met/Val), mezi nimiž byly pozorovány menší rozdíly v průběhu choroby (Imran a Mahmood, 2011b).

Hlavním klinickým příznakem, jak už název nemoci napovídá, je insomnie. Tato porucha nočního spánku může být doprovázena řadou dalších symptomů, například ataxií, dysartrií, dysfagií, myoklonem či pyramidovými příznaky. V závěru onemocnění dochází k rozvoji demence a nakonec i úmrtí pacienta (Tabarnero *et al.*, 2000; Mačák a Mačáková, 2004; Jeong a Kim, 2014). V případě homozygotů (129 MM) jsou v počátku nemoci pozorovány spíše autonomní poruchy a insomnie, přičemž nemoc u nich trvá kratší dobu – často méně než 1 rok. Naopak u heterozygotů (129 MV) převažuje v počátku ataxie s dysartrií a nemoc mívá delší průběh než u homozygotních pacientů (Cortelli *et al.*, 1999).

Fatální familiární insomnie se rozvíjí mezi 20. a 72. rokem života, přičemž průměrný věk bývá 50 let. Průměrná doba trvání této nemoci je 18,4 měsíců, může se však pohybovat v rozmezí 6 až 33 měsíců (Jeong a Kim, 2014).

V roce 1999 byli poprvé zaznamenáni pacienti, kteří po klinické i neuropatologické stránce vykazovali fatální familiární insomni, postrádali však pozitivní rodinnou anamnézu a mutaci v PRNP genu. Nemoc získala název sporadická fatální insomnie (Imran a Mahmood, 2011b).

2.1.5 Variabilní na proteázu senzitivní prionopatie

V roce 2008 byla celkem u 11 pacientů zaznamenána atypická demence, přičemž všichni nemocní jedinci byli homozygotní pro valin v kodonu 129 a více než polovina z nich měla pozitivní rodinnou anamnézu, co se demence týče. V mozkové tkáni zemřelých byla navíc překvapivě zjištěna přítomnost PrP^{Sc} citlivého k proteináze K (Imran a Mahmood, 2011b; Zou *et al.*, 2013).

S novými případy přibylo poznání, že se tato prionová choroba nevyhýbá ani jedincům s genotypy 129 MM a 129 MV a že daný genotyp má vliv na míru citlivosti abnormálního PrP^{Sc} k proteolýze, což přineslo nemoci kompletní název – variabilní na proteázu senzitivní prionopatie (VPSPr). Do roku 2014 vzrostl počet případů VPSPr na 30, přičemž 62 % z nich bylo detekováno u pacientů s genotypem 129 VV (Diack *et al.*, 2014).

2.2 Transmisivní spongiformní encefalopatie zvířat

2.2.1 Scrapie

Scrapie, u nás známá také jako klusavka či drbavka, je nejdéle známá transmisivní spongiformní encefalopatie, jež byla zaznamenána ve Velké Británii již v roce 1732 (Plummer, 1946). Název scrapie, resp. drbavka, vystihuje její charakteristický příznak v podobě urputného drbání, případně hryzání a odírání se o různé předměty, čímž infikovaná zvířata reagují na podráždění kůže. Změny v chování nemocných zvířat, tremor, obtížná a

bolestivá lokomoce, ataxie, špatná koordinace a paréza, která může vyústit až v paraplegii, patří k hlavním projevům degenerace v rámci centrální nervové soustavy (Plummer, 1946; Imran a Mahmood, 2011a).

Přirozeně se klusavka vyskytuje u ovcí a koz, ve stádě je pak nemoc udržována v důsledku horizontálního přenosu, pravděpodobně prostřednictvím exkretů a sekretů, v nichž bylo PrP^{Sc} identifikováno. V případě ovcí platí, že náchylnost k této nemoci je silně závislá na ovčím PrP genotypu. U koz je tato závislost naopak výrazně menší. Choroba se v případě ovcí rozvíjí nejčastěji mezi druhým a pátým rokem života jedince, přičemž inkubační doba bývá obvykle delší než 1 rok. Smrt nastává v rozmezí 2 týdnů až 6 měsíců od počátku klinických příznaků. Etiologie této nemoci zůstává neznámá (Gavier-Widén *et al.*, 2005; Imran a Mahmood 2011a).

V roce 1998 na území Norska byl poprvé zaznamenán a popsán případ atypické klusavky, jež dostala označení Nor98. Další případy byly zachyceny ve většině zemí Evropy, na Falklandských ostrovech a v Severní Americe. Bylo zaznamenáno i několik případů této atypické formy u koz. Pozorované klinické příznaky nejsou ve všech případech jednotné, nejčastější však bývá ztráta tělesné kondice a ataxie zadních končetin. Naopak pruritus není běžný (Gavier-Widén *et al.*, 2005; Benestad *et al.*, 2007).

2.2.2 Transmisivní encefalopatie norků

Tato vzácná choroba týkající se norků určených pro kožešinový průmysl, byla poprvé popsána v roce 1947 na území Spojených států amerických, konkrétně ve Wisconsinu. Trvalo však dalších šestnáct let, než byla v roce 1963 konečně spojena se scrapie (Hadlow, 1999). TME byla zaznamenána pouze u dospělých jedinců, u mláďat se nerozvinula ani v případě, že byla v bezprostřední blízkosti a péči nakažených matek (Barlow, 1972).

V počátcích jsou u nemocných zvířat zaznamenány změny v chování zahrnující zvýšenou agresivitu, hyperestézii, neklid a zanedbávání rodičovské péče a péče o srst. Později se objevují poruchy lokomoce a ataxie, charakterizované nekoordinovaností, strnulostí a trhavými pohyby. Často je možné pozorovat sebepoškozování, zejména

okusování ocasu. Nakonec nemocní jedinci přestávají reagovat na podněty a rozvíjí se u nich somnolence. Inkubační doba přirozeně se vyskytující choroby trvá 6 až 12 měsíců, klinický průběh 2 až 8 týdnů. Mortalita bývá 100% (Barlow, 1972; Imran a Mahmood, 2011a).

Nejpravděpodobnější příčinou této nemoci se zdá být agens BSE L-typu, přičemž za hlavní zdroj nákazy je považována kontaminovaná strava (Imran a Mahmood, 2011a).

2.2.3 Chronické chřadnutí jelenovitých

V roce 1967 byl poprvé pozorován neznámý syndrom u jelence drženého v zajetí v rámci výzkumných prací týkajících se studia výživy jelenovitých. Řadu let se nepomýšlelo na možnou infekční podstatu onemocnění. Za možné příčiny byly považovány stres, nutriční nedostatky či expozice toxickým látkám. Teprve v roce 1978 byl tento syndrom zařazen mezi transmisivní spongiformní encefalopatie (Hadlow, 1999).

CWD přirozeně postihuje nejenom jedince chované v zajetí, ale i jelenovité žijící ve volné přírodě. Choroba byla zatím zaznamenána u následujících druhů: jelenec ušatý (*Odocoileus hemionus*), jelenec běloocasý (*Odocoileus virginianus*), jelenec černoocasý (*Odocoileus hemionus columbianus*), wapiti Nelsonův (*Cervus canadensis nelsoni*) a los yellowstonský (*Alces americanus shirasi*) (Imran a Mahmood, 2011a). S výjimkou několika importovaných případů v Korejské republice, syndrom chronického chřadnutí je prozatím pouze záležitostí Kanady a Spojených států. Monitoring volně žijících zvířat je však velmi komplikovanou záležitostí, přehled o situaci proto nemůže být patřičně spolehlivý (Bunk, 2004).

Mezi nespecifické, avšak přední příznaky nemoci patří změny chování a úbytek tělesné hmotnosti. Dále je možné pozorovat skřípání zubů, ataxii, tremor hlavy, nadměrnou produkci slin v důsledku potíží s polykáním, regurgitaci a aspirační pneumonii, která může být příčinou náhlé smrti postiženého jedince. Možná je i nadměrná žíznivost (polydipsie) s následným častým a vydatným močením (polyurií). Obecně lze říci, že v terminálním stádiu nemoci jsou příznaky méně zřetelné u jelena wapiti (Williams, 2005; Vokurka a Hugo, 2015).

Choroba se pravděpodobně šíří cestou horizontální a nepřímé transmise. Zdrojem infekce jsou nejspíše pastviny infikované slinami, močí a výkaly nemocných jedinců. Inkubační doba se pohybuje mezi 16 měsíci a 5 lety, přičemž smrt obvykle přichází v průběhu jednoho roku od objevení se prvních klinických projevů nemoci (Williams, 2005; Imran and Mahmood, 2011a).

2.2.4 Bovinní spongiformní encefalopatie

Bovinní spongiformní encefalopatie, u široké veřejnosti známá spíše jako „nemoc šílených krav“, byla poprvé zaznamenána v roce 1986 ve Velké Británii a brzy nato dosáhla epidemických rozměrů (Peralta, 2011).

Tato choroba se zdaleka netýká pouze hovězího dobytka. Překračuje druhovou bariéru a byla identifikována nejenom u čeledě turovití (*Bovidae*), ale i u čeledě kočkovití (*Felidae*) a u primátů. U lidí byla zaznamenána nová varianta Creutzfeld-Jakobovy choroby, jejíž původ je taktéž spojován s BSE (Gavier-Widén *et al.*, 2005).

Běžným klinickým příznakem nemoci je změna chování, projevující se nervozitou a pocity strachu. Dalšími obvyklými znaky bývají abnormální postoj a chůze, neobvyklé držení hlavy, tremor, přehnané reakce na sensorické podněty, ataxie zadních končetin a občasné pády. I přes běžnou konzumaci potravy zvíře rapidně ubývá na váze. Později se mohou nekoordinované pohyby rozvinout v parézu či paralýzu (Davis *et al.*, 1991).

Původ této nemoci dosud nebyl objasněn. Jednou z možných variant je spontánní destabilizace a konverze PrP na jeho patologickou formu. Mrtvá těla takto postižených jedinců mohla být následně zpracována na masokostní moučku a použita jako krmivo pro další dobytek, čímž se nemoc povedlo rychle rozšířit (Peralta, 2011). I přes nejasnosti v původu této transmisivní spongiformní encefalopatie, horizontální transmise nebyla potvrzena – infikované krmivo se tak zdá být nejpravděpodobnější cestou přenosu. Svědčí o tom i fakt, že po zákazu používání masokostní moučky došlo k poklesu incidence (Imran a Mahmood, 2011a). Inkubační doba je dlouhá a závisí na hostiteli – u dobytka trvá v průměru 5 let. Smrt nastává ve 100 % případů (Almond, 1998).

V roce 2004 byly v Itálii zaznamenány dva neobvyklé případy transmisivní spongiformní encefalopatie u dobytka, již byl dán název bovinní amyloidní spongiformní encefalopatie (BASE) (Watts *et al.*, 2006). Z histopatologického hlediska, rozdíl mezi BASE a BSE spočívá v přítomnosti tzv. amyloidních plaků. Zatímco u klasické BSE se tvoří jen vzácně a lze je nalézt hlavně v thalamu, u atypické varianty se vyskytují převážně v bílé hmotě mozkové. Podle výzkumů se BASE podobá sporadické formě Creutzfeld-Jakobovy choroby (Gavier-Widén *et al.*, 2005; Peralta, 2011).

2.2.5 Felinní spongiformní encefalopatie

V roce 1990 byla poprvé diagnostikována spongiformní encefalopatie u domestikované siamské kočky, a to na území Velké Británie. FSE byla později zaznamenána u dalších domestikovaných koček a mimoto i u divokých kočkovitých šelem držených v zajetí (Bradley, 2002; Bencsik *et al.*, 2009).

Příznaky zahrnují změny chování, zanedbávání péče o srst, abnormální chůzi a ataxii, zejména zadních končetin. Postižená zvířata často špatně odhadují vzdálenost a vykazují zvýšené vnímání senzitivních podnětů (hyperestézii), může se u nich objevit i tremor. Pozorována byla i nadměrná produkce slin, chorobně zvýšený příjem potravy (polyfagie), polydipsie a rozšířené zornice. V terminálním stádiu nemoci je běžná somnolence jakožto lehčí porucha vědomí se sníženou bdělostí (Pattison, 1998; Imran a Mahmood, 2011a; Lukáš a Žák, 2014; Vokurka a Hugo, 2015).

Nejpravděpodobnějším zdrojem nákazy se zdá být krmivo infikované BSE priony. Tuto teorii potvrzují nejenom studie zaměřené na podobnost obou prionových kmenů, ale i fakt, že od roku 1989, kdy bylo zakázáno používání hovězích vnitřností pro výrobu zvířecího krmiva, incidence onemocnění významně poklesla (Pattison, 1998; Imran a Mahmood, 2011a).

Inkubační doba není známa, ale věk většiny postižených zvířat se pohyboval mezi 4 a 9 lety. Smrt nastala zpravidla v rozmezí 3 až 10 týdnů od objevení klinických příznaků (Bencsik *et al.*, 2009; Imran a Mahmood, 2011a).

3. Prionová hypotéza a teorie alternativní

Stručně řečeno, prionová hypotéza vychází z předpokladu, že priony jsou proteinové infekční částice (Liberski a Jaskólski, 2002). Skutečnost, že pouhá špatně složená bílkovina bez přítomnosti nukleové kyseliny může být příčinou závažných infekčních onemocnění podobně jako viry či bakterie, činí priony velmi neobvyklými infekčními agens a objektem nebývalého vědeckého zájmu. Od té doby, co byla prionová hypotéza přednesena poprvé, bylo provedeno nesčetné množství pokusů ve snaze definitivně ji potvrdit, ale i vyvrátit.

3.1 Historické pozadí let 1848–1982

Když nastoupila na scénu klusavka, objevila se postupně celá řada návrhů týkajících se její etiologie – sexuální hyperaktivita beranů, bouře, degenerace způsobená intenzivním příbuzenským křížením či svaloví parazitě, konkrétně sarkosporidie (Pattison, 1972; Liberski a Jaskólski, 2002).

Ačkoliv se řada vědců snažila o experimentální přenos klusavky, úspěšní byli až v roce 1936 jejich francouzští kolegové Jean Cullie a Paul-Louis Chelle, kteří infikovali ovce inokulací za použití míšní anebo mozkové emulze. Také prokázali, že etiologické agens je filtrovatelné přes bakteriální Chamberlandův L3 filtr, v důsledku čehož předpokládali virový původ klusavky (Plummer, 1946; Pattison, 1972). Zdárný, ačkoliv zcela neplánovaný, přenos klusavky se povedl také veterináři Williamovi S. Gordonovi během vývoje vakcíny proti fatální encefalitidě ovcí způsobené RNA virem vrtivky rodu *Flavivirus* z čeledi *Flaviviridae*. V roce 1953 inokuloval populaci ovcí vakcínou obsahující homogenizovanou mozkovou, míšní a slezinnou tkáň, solný roztok a formaldehyd. Protože však tkáň pocházela z ovcí uhynulých na klusavku, začala některá zvířata o dva roky později vykazovat známky scrapie. Ve výsledku se jednalo zhruba o 7 % všech imunizovaných zvířat (Soto a Castilla, 2004; Kiheung, 2006; Balseiro *et al.*, 2012).

David R. Wilson byl jediný, kdo po roce 1939 poněkud samotářsky pátral po dosud neznámém „viru“. Během výzkumu si povšiml neobvyklé rezistence infekčního agens

k vysokým teplotám, formalinu, fenolu, chloroformu a také značné dávce UV záření. Zaznamenal i další skutečnosti, většina jeho práce však nebyla nikdy publikována. Též se snažil o přenos klusavky na menší laboratorní zvířata, bohužel neúspěšně (Pattison, 1972; Liberski, 2012).

V rozmezí let 1953 a 1960 pak byla potvrzena rezistence agens na teplo, formalin, DNázu i RNázu či opakované mražení a rozmrazování. Probíhaly neúspěšné pokusy o kultivaci, nalezení příslušných protilátek i odhalení agens pomocí elektronové mikroskopie. (Pattison, 1972; Kiheung, 2006). V roce 1954 představil islandský vědec Björn Sigurdsson nový koncept tzv. pomalých virových infekcí. Tyto se vyznačovaly pomalou progresí v průběhu měsíců a let a obvykle i velmi dlouhou inkubační dobou (Field, 1967; Weber, 1971). Tento koncept mnohé vědce zaujal, a tak původce klusavky získal na nějaký čas označení „pomalý virus“.

V roce 1957 započal Gordon experiment poněkud větších rozměrů s cílem prokázat důležitost genetického pozadí v citlivosti k experimentální klusavce. Po inokulaci 24 různých plemen představujících celkem 1027 ovcí, z nichž některé byly inokulovány intracerebrálně a jiné subkutánně, byla tato zvířata sledována po dva roky. Výsledky nakonec dopadly ve prospěch Gordonova cíle – incidence se skutečně velmi lišila napříč různými plemeny, přičemž nejvyšší byla u plemene Herdwick. Jako rezistentní se ukázalo být plemeno Dorset Down s nulovou incidencí (Pattison, 1972; Hadlow, 1999).

Na samotném konci tohoto období, v roce 1960, přišel Herbert B. Parry s hypotézou, že scrapie je neobvyklá genetická choroba, která vykazuje známky autozomálně recesivní dědičnosti. Nevyloučil však jiné způsoby dědičnosti jako například dominantní typ dědičnosti s variabilní expresí. Zároveň také nepopřel přenosnost choroby – navrhl, že u homozygotně recesivních jedinců dochází ke vzniku scrapie agens, které je schopné autoreplikace, nevyvolává odpověď imunitního systému, a které úzce souvisí s degenerativními změnami v některých orgánových soustavách (Parry, 1960; Liberski a Jaskólski, 2002).

V roce 1961 Iain H. Pattison a Geoffrey C. Millson odhalili při experimentálním přenosu klusavky na kozy existenci dvou odlišných forem klusavky – „drowsy“ a „scratching“. Ještě tentýž rok, Richard L. Chandler inokuloval tři kmeny myši (C57, CBA a Swiss) dvěma odlišnými formami kozí klusavky a o pár měsíců později mohl oznámit úspěšný experimentální přenos klusavky na laboratorní myši, což bylo přijato s velkým nadšením, protože tak byl umožněn a usnadněn výzkum v širším měřítku. I přes tento významný krok dopředu se však stále nedařilo agens identifikovat, což v kombinaci s jeho neobvyklými vlastnostmi začalo vyvolávat pochybnosti o jeho virovém původu i mezi těmi, kteří se k němu přikláněli. Následovaly další výzkumy. Nález Pattisona a Millsona zaujal genetika Alana G. Dickinsona, který se svými kolegy v polovině 60. let úspěšně identifikoval a izoloval celkem devět odlišných kmenů původce scrapie (Pattison, 1972; Kiheung, 2006).

Tikvah Alperová společně s Davidem A. Haigem a Michaelem C. Clarkem podrobila v roce 1966 scrapie agens ionizujícímu záření, přičemž z jeho dávky potřebné k inaktivaci odhadli velikost zkoumaného agens. Avšak odhadovaná molekulární hmotnost se ukázala být ne větší než 2×10^5 Da čili příliš malá pro virus obsahující nukleovou kyselinu. Navíc, při vystavení agens značně vysokým dávkám ultrafialového záření nedošlo k žádnému výraznému snížení jeho aktivity. Tyto závěry vedly Alperovou a její kolegy k alternativnímu závěru, že scrapie agens neobsahuje nukleovou kyselinu (Alper *et al.*, 1966).

Hned následující rok byly navrženy další možné modely, které by vysvětlily podstatu scrapie agens. D. H. Adams a E. A. Caspary sice navrhli jako možný model rezistentní jádro s nukleovou kyselinou opatřené polysacharidovým pláštěm, ovšem tento model neřešil problém s nukleovou kyselinou (Mould, 1969). Richard A. Gibbons a Gordon D. Hunter vedle sebe postavili celkem čtyři různé hypotézy, které v té době kolovaly vědeckým prostředím – virovou, proteinovou, polysacharidovou a membránovou, přičemž se nakonec vyslovili ve prospěch poslední z nich (Gajdusek, 1972; Nunnally a Krull, 2004). Navržená membránová struktura měla být podle modelu schopna autoreplikace buď přeskupením cukerných či polysacharidových molekul připojených k prostým membránám, nebo skrze autoreplikaci polysacharidů na povrchu těchto membrán (Wang a Ma, 2013). Předpoklad pro membránovou hypotézu vycházel ze zprávy o tom, že je scrapie agens úzce

spjaté s buněčnými membránami, a z marných pokusů o uvolnění scrapie agens z membránových frakcí (Prusiner, 1982). Matematik John S. Griffith se oproti tomu přiklonil k proteinové podstatě agens a předložil hned tři různé modely vysvětlující způsoby, jakými by se mohl protein replikovat bez nukleové kyseliny. V jeho druhém modelu předpokládal, že infekční agens představující proteinový dimer by mohlo přeměnit normální celulární protein s odlišnou konformací v další proteinové dimery (Wang a Ma, 2013).

Alperová v roce 1970 provedla ve spolupráci s pařížským Institut du Radium další experiment, v němž byly porovnány účinnosti různých vlnových délek ultrafialového záření v inaktivaci scrapie agens. Výsledky ukázaly, že vlnová délka 237 nm byla čtyřikrát účinnější než vlnové délky 250, 267 či 280 nm, které měly velice podobnou míru účinnosti. V porovnání s těmito výsledky, účinnost vlnové délky 240 nm v případě inaktivace virů a genových markerů byla mnohem menší než účinnost délky 237 nm v případě zkoumaného agens. Navíc jejich inaktivace byla vůbec neúčinnější při vlnových délkách 260 až 270 nm, přičemž inaktivace scrapie agens při vlnové délce 267 nm sice účinná byla, ale v porovnání s nimi méně. Výsledky Alperovou utvrdily v názoru, že zkoumané agens postrádá přítomnost nukleové kyseliny (Alper, 1972; Wang a Ma, 2013).

V roce 1972 Theodor O. Diener navrhl možnost, že molekulární struktura scrapie agens by mohla být podobná té, kterou mají viroidy – v té době nově objevené infekční částice sestávající z malé molekuly RNA. Jeho návrh vycházel z podobných vlastností PTSV (*potato spindle tuber viroid*) a scrapie agens. V roce 1974, Richard L. Ward společně s kolegy podrobil scrapie agens experimentu, kdy se ukázalo, že extrakční metody zahrnující i fenol nemají vliv na snížení infekčnosti viroidů. Předpokladem pro tento experiment tedy bylo, že pokud je scrapie agens viroid, jeho infekčnost by měla být po ošetření zachována. Protože však fenolová extrakce zapříčinila kompletní ztrátu jeho infekčnosti a protože mozková tkáň myši inokulovaných tímto extrahovaným materiálem nevykazovala po roce žádné známky nemoci, Ward a kolegové došli k závěru, že zkoumané agens viroidem pravděpodobně není (Ward *et al.*, 1974; Diener *et al.*, 1982). Později vyšly najevo další rozdíly mezi těmito agens. Zatímco viroidy byly rezistentní na proteinázu K a trypsin a DEPC (diethylpyrokarbonát) způsoboval jen mírnou inaktivaci, scrapie agens všechny tyto procedury snášelo velmi špatně. Naopak, viroidy byly na rozdíl od scrapie agens velice

citlivé k RNáze. Nutno dodat, že na rozdíl od mysteriózního agens, struktura viroidů včetně kompletních nukleotidových sekvencí byla poměrně brzy osvětlena. Navíc, jakékoliv snahy o izolaci nukleové kyseliny z mozkových homogenátů infikovaných zvířat stále nepřinášely kýžený výsledek a ani elektronová mikroskopie neposkytovala žádné poznatky týkající se jeho struktury (Diener *et al.*, 1982; Carp *et al.*, 1985).

Trojice Alperová, Haig a Clarke provedli v roce 1978 další experiment za použití ionizujícího záření. Tentokrát vycházeli z faktu, že se účinek záření obvykle v přítomnosti kyslíku zvyšuje. Poměr dvou různých dávek záření, jedné k dosažení určitého efektu na buňku v přítomnosti kyslíku a druhé k dosažení téhož efektu v jeho nepřítomnosti, vyjadřuje tzv. OER (*oxygen enhancement ratio*). Tento kyslíkový poměr se obvykle pohybuje mezi 2 a 3 u vyšších buněk a mezi 4 a 5 u některých druhů bakterií. V případě bakteriofágů (S13, T1), holé bakteriofágové DNA či bakteriální tRNA se kyslík naopak projevuje jako ochranný prvek a hodnota OER pak není větší než 1. Naopak jeho přítomnost významně zvyšuje škodlivý efekt záření na biologické membrány. Součástí experimentu byla také expozice zkoumaného agens ultrafialovému, téměř monochromatickému, záření. Vystavili tedy zředěnou vodní suspenzi zkoumaného agens ionizujícímu záření v přítomnosti i nepřítomnosti kyslíku. Ukázalo se, že OER pro zkoumané agens bylo okolo 12, což je hodnota podobná OER lysozomu s hodnotou OER v rozmezí 10 až 20. Dále se ukázalo, že „akční spektrum“ scrapie agens je velmi podobné absorpčnímu spektru bakteriálního endotoxinu, složce bakteriální membrány. Výsledky tedy poskytly další důkaz o absenci nukleové kyseliny, navíc poukázaly na možnost, že složkou nezbytnou pro replikaci agens je lipidová frakce, čímž dodatečně podpořili membránovou hypotézu Gibbonse a Huntera (Alper *et al.*, 1978; Wang a Ma, 2013).

Téhož roku přišel Richard F. Marsh společně s kolegy s experimentem, v němž se scrapie agens ukázalo být citlivé k DNáze. Ta totiž dokázala zničit více než 90 % infekčnosti materiálu pocházejícího z mozkové tkáně křečků infikovaných klusavkou. Výsledky je dovedly k závěru, že zkoumané agens obsahuje DNA, jež je nezbytná pro jeho infekčnost. Tento závěr však nebyl v souladu s rezistencí agens vůči radiaci, navíc předchozí pokusy zaměřené na vliv DNázy na scrapie agens dopadly opačně. Paul Brown se tehdy

k výsledkům tohoto experimentu vyjádřil velmi opatrně, a to ve smyslu, že před vyvozením závěru je nutné výsledky nejprve zopakovat (Marsh *et al.*, 1978; Marx, 1979).

Alan G. Dickinson a George W. Outram přišli v roce 1979 s novým návrhem. V jejich hypotéze vystupuje nízkomolekulární nukleová kyselina v kombinaci s ochranným hostitelským proteinem – toto agens nese název „virino“. Nukleová kyselina přitom nekóduje žádný protein, ale slouží jako templát, přičemž její replikace je uskutečněna enzymy hostitele. Původ proteinu by vysvětloval obtížnou separaci agens z infekčního materiálu a také proč v těle infikovaných zvířat nedochází k patřičným reakcím imunitního systému. Malá velikost nukleové kyseliny by zase vysvětlovala rezistenci agens k ozařování a též problémy s její izolací (Carp *et al.*, 1985).

V roce 1981 podrobili David T. Kingsbury a jeho kolegové T-lymfocyty získané ze sleziny myši infikované klusavkou experimentu, v němž zkoumali schopnost těchto buněk navodit imunitní odpověď v kultuře obsahující infikované i neinfikované buňky sleziny. Ačkoliv byla slezinná tkáň získána během jejího infekčního maxima, imunitní reakce nebyla pozorována. Výsledek dovedl skupinu vědců k závěru, že agens postrádá na povrchu vystavené antigeny, či je skryto uvnitř membrány (Kingsbury *et al.*, 1981). Téhož roku provedl Stanley B. Prusiner společně s kolegy experiment, jehož výsledky poskytly důkaz, že scrapie agens obsahuje protein, který má pravděpodobně hydrofobní charakter. Proteináza K zničila více než 99,9 % infekčnosti purifikovaných preparátů, taktéž i DEPC agens úspěšně inaktivovalo. Stupeň purifikace zkoumaného agens se ukázal být důležitý, neboť v méně purifikovaných preparátech se nepodařilo infekčnost redukovat ani jedním z obou jmenovaných prostředků. V případě proteinázy K záleželo i na koncentraci enzymu a teplotě i délce trvání digesce. Důkazem o hydrofobním charakteru zkoumaného agens byla jeho vysoká afinita k fenolovým skupinám navázaných na sefaroze během hydrofobní elektroforézy (Prusiner *et al.*, 1981).

V dubnu roku 1982 byl vydán článek Prusinera, v němž vůbec poprvé spatřilo světlo světa slovo „prion“. Tento zcela nový termín byl vymyšlen pro označení malé proteinové infekční částice, jež je rezistentní k inaktivaci většinami procedur, které modifikují nukleové kyseliny. Prusiner však touto definicí scrapie agens zcela nevyloučil možnou přítomnost

malé molekuly nukleové kyseliny, jež by v takovém případě byla obklopena proteinovým pláštěm, pouze podotkl, že není k dispozici žádný důkaz o jejím výskytu v agens. Navrhl tedy i poněkud odvážnou variantu, že diskutované agens je zkrátka infekční protein, částice prostá nukleové kyseliny (Prusiner, 1982).

3.2 Hypotézy

3.2.1 Prionová hypotéza

Studie ukázaly, že diskutované agens skutečně obsahuje protein, a že tento protein je zodpovědný za jeho infektivitu (Prusiner, 1984). Dále bylo zjištěno, že má tento patologický protein, označovaný jako PrP^{Sc}, stejnou aminokyselinovou sekvenci jako normální buněčný protein, označovaný jako PrP^C. Po chemické stránce nebyly mezi těmito proteiny zaznamenány rozdíly, bylo však zjištěno, že se vzájemně liší svou konformací. Také byl v savčím genomu nalezen gen (PRNP) kódující buněčný prionový protein. Tato zjištění nakonec vedla ke zformulování hypotézy, podle níž je infekční částicí právě PrP^{Sc}, který dokáže indukovat autokatalytickou konverzi PrP^C na PrP^{Sc} (Abid a Soto, 2006; Soto, 2011).

Přestože byla Prusinerova teorie nejednou označena za kacířskou, byla mu za jeho objev prionů jakožto nových infekčních agens v roce 1997 udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu. Tento významný krok sice znamenal oficiální přijetí prionové hypotézy vědeckou společností jako takovou, nestačil však na přesvědčení některých jejích odpůrců, v jejichž očích nebyla tato teorie v té době dosud uspokojivě dokázána (Coles, 1997).

Mezi důkazy podporující prionovou hypotézu patří řada pokusů o inaktivaci scrapie agens nejrůznějšími procedurami. V článku Prusinera z roku 1982 byly mimo jiné shrnuty dosavadní důkazy o rezistenci, případně citlivosti agens, k různým procedurám. Inaktivace agens s pomocí proteinázy K, trypsinu, DEPC, butandionu, PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid), SDS (dodecylsulfát sodný), chaotropními solemi, močovinou či fenolem podpořili návrh, že protein je jeho součástí. Rezistence agens k RNáze, DNáze, ultrafialovému záření o vlnové délce 254 nm, zinečnatým iontům, hydroxylaminu a

psoralenům pak mluvila ve prospěch tvrzení, že scrapie agens postrádá nukleovou kyselinu. (Prusiner *et al.*, 1981; Prusiner, 1982). Argument pro prionovou hypotézu pak představovaly také pokusy o určení velikosti diskutovaného agens, které se ukázalo být příliš malé na to, aby mohlo obsahovat nukleovou kyselinu (Narang, 1987; Soto, 2011). Další podporu představuje pokus, v němž byly použity transgenní myši, které v důsledku absence PRNP genu netvořily PrP^C. Tyto myši se ukázaly být rezistentní ke klusavce, což poukázalo na významnou roli PrP^C v prionových onemocněních (Josefson, 1997). Také objev kvasinkových proteinů, které vykazují podobné chování jako savčí prionové proteiny, posílil prionovou hypotézu. V roce 2004 se podařilo bakteriálně vyprodukované a zeleným fluorescenčním proteinem označené N-terminální fragmenty kvasinkového prionu Sup35 transformovat do amyloidních fibril skrze inkubaci s infekčními agregáty kvasinkového původu. Vytvořené fibrily byly posléze schopné propagovat příslušný fenotyp v kvasinkových buňkách (King a Diaz-Avalos, 2004). Teorii nahrává také fakt, že žádný z odpůrců dosud nepředložil nezpochybnitelné důkazy o nukleové kyselině trvale asociované s infekčními preparáty PrP^{Sc} (Soto a Castilla, 2004).

Na druhé straně však stojí existence prionových kmenů, nejčastější argument používaný oponenty prionové hypotézy. Tentýž kmen může být izolován z odlišného hostitele a tentýž hostitel může být infikován odlišným kmenem. Navíc bylo zaznamenáno, že určitý kmen může podlehnout změnám a dát vzniknout novému kmenu s novými vlastnostmi. Příkladem může být izolace mutantního kmenu 263K, jehož vlastnosti byly kompletně odlišné od původního izolátu (Liberski, 2012). Tento fenomén by byl snáze vysvětlitelný, kdyby priony disponovaly nukleovou kyselinou, neboť v případě standardních infekčních onemocnění vznikají odlišné kmeny na základě mutací či polymorfismů v genetické výbavě infekčních agens – proto také tento fenomén nahrává alternativním hypotézám. Aby byla existence prionových kmenů konzistentní s hypotézou prionovou, bylo navrženo, že podstata těchto kmenů tkví v odlišné konformaci PrP^{Sc}. Tyto odlišné varianty infekčního prionového proteinu by mohly různě katalyzovat konverzi PrP^C a cílit na různé oblasti mozkové tkáně, čímž by se vysvětlovala rozličnost klinických symptomů a neuropatologických změn (Soto a Castilla, 2004). K podpoření tohoto návrhu přispělo předvedení fenoménu prionových kmenů *in vitro* s pomocí metody cyklické amplifikace prionového proteinu (PMCA) čili v nepřítomnosti živých buněk. Bylo použito celkem 5

různých myších kmenů, přičemž vytvořený PrP^{Sc} si dokázal udržet specifické vlastnosti pro daný kmen a po inokulaci dokázal u „wild-type“ myši vyvolat onemocnění, které svými příznaky odpovídalo příslušnému kmenu (Castilla *et al.*, 2008). Výše zmíněný pokus Kinga a Diaz-Avalose z roku 2004 také mimo jiné podpořil domněnku, že rozdíly mezi prionovými kmeny vyplývají ze struktury proteinu (King a Diaz-Avalos, 2004). Nicméně fakt, že by samostatný protein mohl existovat v mnoha konformacích, je obtížné sjednotit s termodynamickými pravidly skládání proteinů. Není totiž jisté, zda by všechny požadované konformace mohly být dostatečně termodynamicky stabilní (Cancellotti *et al.*, 2013; Ma a Wang, 2014).

3.2.2 Virová hypotéza

Teorie, v níž je diskutovaným agens dosud neidentifikovaný virus, se zdála být v počátcích výzkumu pravděpodobná. Viry jsou však částice disponující nukleovou kyselinou, jež je schopná kódovat všechny či alespoň některé jejich proteiny. S přihlédnutím k tomuto faktu a vzhledem k tomu, že velké množství pokusů o odhalení nukleové kyseliny specifické pro scrapie agens či takové, která by byla dostatečně dlouhá, aby byla schopná kódovat alespoň malý protein, nedopadlo úspěšně, nezískala virová teorie příliš podpory. Navíc opakovaně selhávaly i pokusy o nalezení typických virových částic v mozkové tkáni zvířat infikovaných klusavkou, a tak nakonec virová hypotéza ustoupila do pozadí (Narang, 1987; Weissmann, 2004).

V roce 2007 však Laura Manuelidis vydala článek podporující virovou hypotézu, v němž představila fotografie z elektronového mikroskopu zachycující sférické, virům podobné částice o průměru 25 nm pocházející z mozkové tkáně křečků infikovaných CJD. Tyto nalezené částice nevázaly PrP protilátky a po oddělení od PrP neztrácely svoji infektivitu. Manuelidis tedy navrhla, že tyto částice by mohly být virovým původcem prionových onemocnění s genomem o velikosti 1–4 kb, přičemž hostitelský prionový protein by měl být pouze buněčnou strukturou, kterou virus využívá k uskutečnění infekčního procesu. Svůj návrh navíc podpořila nálezy podobných objektů ve starších publikacích jiných vědců (Manuelidis, 2007). Pro další výzkum by byla zapotřebí izolace a bližší identifikace těchto virům podobných částic, avšak sama Manuelidis tvrdí, že jejich izolace je

velmi obtížná. Někteří vědci, například Chesebro a Weissmann, reagovali na nález těchto částic tím, že data nejsou dostatečně přesvědčivá, případně že jsou nuceně interpretována tak, aby byla konzistentní s virovou hypotézou (Couzin-Frankel, 2011).

3.2.3 „Virino“ hypotéza

Tato hypotéza, zformulovaná v roce 1979 Dickinsonem a Outramem, poměrně dobře reaguje na některé neobvyklé vlastnosti infekčního agens včetně existence prionových kmenů, nedostatečné imunitní odpovědi u infikovaných zvířat, obtížnosti purifikovat agens i jeho rezistence vůči ultrafialovému záření. Navrhované agens, „virino“, disponuje nukleovou kyselinou o nízké molekulární hmotnosti, která je chráněna proteinem hostitelského původu a která není schopna kódovat žádný jiný produkt než kopie sebe samé. Replikace nukleové kyseliny infekčního agens je zajištěna hostitelskými enzymy (Carp *et al.*, 1985; Narang, 1987; Schreuder, 1993).

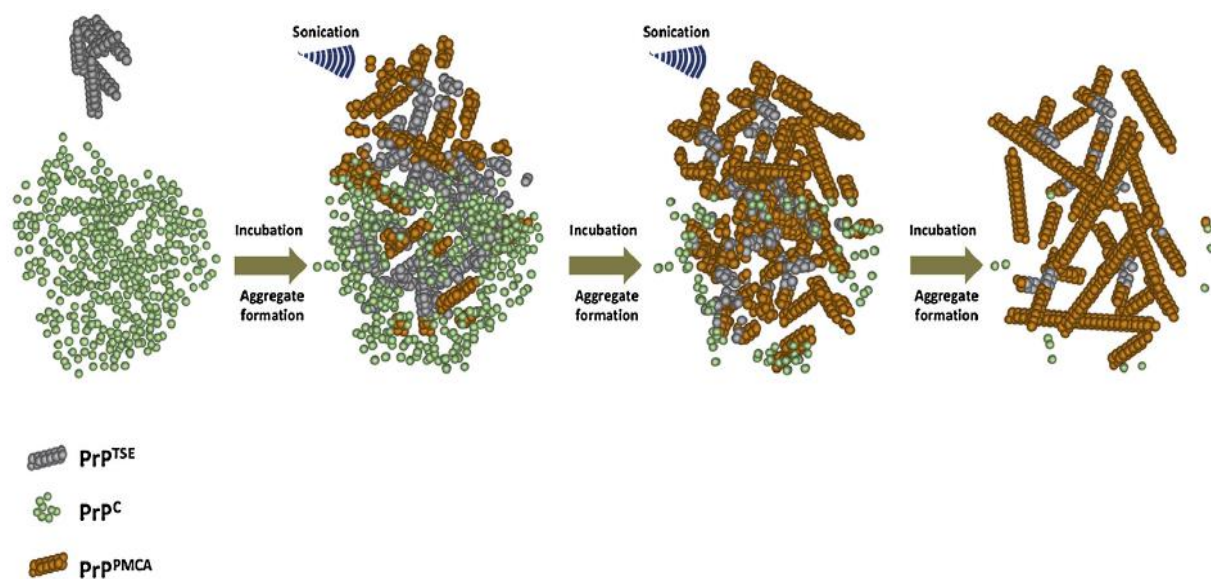
3.2.4 „Unified theory“

V roce 1991 navrhl Charles Weissmann tzv. „unified theory“, v níž je hypotetická izoforma prionového proteinu, označovaná jako PrP*, představena jako esenciální složka scrapie agens, jehož vlastnosti mohou být modifikovány asociací s malou molekulou RNA, označovanou jako „co-prion“. Weissmann navrhl jako možné kandidáty pro předpokládaný „co-prion“ malé nekódující molekuly RNA – siRNA či miRNA, jejichž replikace by probíhala v hostitelských buňkách a byla by podněcována přítomností PrP*. Tímto v podstatě skloubil „virino“ hypotézu s hypotézou prionovou. Hypotetická přítomnost molekuly siRNA lépe koresponduje s existencí prionových kmenů – odlišné kmeny by byly důsledkem odlišných molekul těchto RNA, zároveň by však nebyly zodpovědné za prionovou infektivitu. Potenciální „co-prion“ však zatím nebyl objeven (Weissmann, 1991; Weissmann, 2004; Liberski, 2012).

4. Konečný experiment

Nakonec se dospělo k závěru, že k ukončení všech dohadů je zapotřebí úspěšná syntéza plně infekčního prionového proteinu (PrP^{Sc}) *in vitro* s použitím vysoce purifikovaného syntetického PrP a v nepřítomnosti živých buněk, který by sám dokázal vyvolat příslušnou infekci u zdravých zvířat (Enserink, 2005; Diaz-Espinoza a Soto, 2010).

V roce 2001 vyvinul Claudio Soto se svými spolupracovníky systém umožňující efektivní konverzi PrP^C na PrP^{Sc} *in vitro*, nazvaný cyklická amplifikace prionového proteinu a označovaný zkratkou PMCA (z angl. *Protein Misfolding Cyclic Amplification*). Tato metoda představuje vylepšení původního bezbuněčného systému navrženého Byronem Caugheyem (Zou a Gambetti, 2005; Diaz-Espinoza a Soto, 2010). PMCA využívá mechanismus podobný polymerázové řetězové reakci (PCR). Malé množství templátu v podobě PrP^{Sc} je smícháno s velkým množstvím substrátu v podobě PrP^C. V cyklické reakci dochází k tvorbě PrP^{Sc} agregátů rostoucích na úkor substrátu, přičemž je mezi jednotlivé cykly konverze PrP^C na PrP^{Sc} vložen krok v podobě sonikace, s jejíž pomocí jsou vzniklé PrP^{Sc} agregáty rozbíjeny na menší útvary, které slouží jako nová jádra pro další přeměnu PrP^C na PrP^{Sc} v dalším procesu inkubace. Cyklus je mnohokrát opakován pro dosažení exponenciální amplifikace PrP^{Sc} (Zou a Gambetti, 2005; Saá a Cervenakova, 2014). S pomocí této metody si vzniklý materiál udržuje všechny biologické, biochemické a strukturální vlastnosti prionů produkovaných *in vivo* a je schopný vyvolat infekci u „wild-type“ jedinců (Diaz-Espinoza a Soto, 2010).



Obrázek 3: Schéma cyklické amplifikace prionového proteinu (PMCA). Templát (šedá barva) je smíchán se substrátem (zelená barva) a po inkubaci při 37 °C je vystaven sonikaci za účelem fragmentace vytvořených PrP^{Sc} agregátů (oranžová barva). Cyklus se mnohokrát opakuje pro dosažení exponenciální amplifikace nepatrného množství původního templátu (Saá a Cervenakova, 2014).

S pomocí PMCA bylo provedeno velké množství pokusů s úmyslem definitivně potvrdit prionovou hypotézu. Jeden z nejsilnějších důkazů poskytl v roce 2010 Wang *et al.* Vědci využili PMCA k vytvoření infekčních prionů s použitím myšního rekombinantního prionového proteinu purifikovaného z bakterie *Escherichia coli* v přítomnosti syntetického fosfolipidu, konkrétně POPG (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoglycerol), a kompletní jaterní RNA. Takto vytvořené priony vykazovaly všechny vlastnosti patogenní izoformy PrP a dokázaly u „wild-type“ myši vyvolat po relativně krátké inkubační době prionové onemocnění, kterému tato zvířata nakonec podlehla. Při záměně kompletní jaterní RNA za syntetickou polyriboadenylovou kyselinu, poly(rA), byl vytvořený rekombinantní prionový protein stejně infekční, a co je hlavní, použitá poly(rA) neobsahovala kódující genetickou informaci, což vyloučilo možnou zodpovědnost genetické informace nukleové kyseliny za výslednou infektivitu (Acquatella-Tran Van Ba *et al.*, 2013; Ma a Wang, 2014).

V roce 2012 se podařilo úspěšně vytvořit infekční rekombinantní PrP^{Sc} (recPrP^{Sc}) v přítomnosti jediného kofaktoru, syntetického fosfatidylethanolaminu (PE). Jiné fosfolipidy zahrnující fosfatidylcholin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol a fosfatidylglycerol však nebyly

schopné umožnit vznik PrP^{Sc} v nepřítomnosti RNA (Deleault *et al.*, 2012; Ma a Wang, 2014).

4.1 Kofaktor

Úspěšné vytvoření vysoce infekčních rekombinantních prionů *in vitro* sice podporuje prionovou hypotézu, respektive předpoklad, že za infektivitu v případě prionových chorob je zodpovědné infekční agens proteinového charakteru určité konformace, na místě však vyvstává otázka, zda v případě prionové infekivity sehrává roli i jiný faktor než prionový protein, jak naznačují experimenty. Případná existence komplexu tvořeného PrP^{Sc} a kofaktorem by například lépe vysvětlovala fenomén prionových kmenů. Představa, že jediný protein může vytvářet relativně velké množství různých kmenů (více než 20 u myši), a to pouze na základě odlišné konformace, je méně uvěřitelná, než případná spoluúčast kofaktoru na tomto fenoménu. Různorodé stabilní konformace infekčního PrP^{Sc} by mohly být tvořeny například s pomocí odlišných molekul fosfolipidů či různými poměry prionového proteinu a kofaktoru (Ma a Wang, 2014).

Zapojení buněčných kofaktorů do prionové replikace zdůraznily zejména studie využívající PMCA. K vytvoření infekčních PrP^{Sc} je v současné době kromě adekvátního PrP^C substrátu zapotřebí polyaniontů, zejména RNA. Také lipidy patří mezi možné kandidáty umožňující konverzi PrP^C na PrP^{Sc}. Protože však RNA a lipidy představují po chemické stránce velmi odlišné molekuly, je pravděpodobné, že existuje více různých molekul sloužících jako kofaktory. Takové třídy kofaktorů by mohly být zodpovědné za propagaci prionů různých kmenů či prionů pocházejících z různých druhů zvířat (Morales *et al.*, 2012; Supattapone, 2014)

Tyto molekuly se zdají být nápomocné v uchování infekční konformace PrP^{Sc} a také v určování kmenových vlastností, které dle prionové hypotézy vycházejí právě z odlišných konformací patologické formy PrP. Potenciální úloha kofaktorů by však mohla zahrnovat i účast na fragmentaci PrP^{Sc} polymerů či navyšování biologické stability prionů snižováním

jejich *in vivo* clearance. Kofaktor by také mohl jednat jako nezbytný katalyzátor pro prionovou replikaci (Soto, 2011).

4.1.1 RNA

Doposud se nepodařilo identifikovat nukleovou kyselinu, která by představovala základní, nepostradatelnou složku infekčního agens. Přesto však existuje možnost, že nukleová kyselina funguje jako kofaktor hrající roli v komplexním procesu prionové konverze, respektive v utváření a zachování specifické konformace infekčního prionu (Baskakov a Breydo, 2007; Supattapone, 2014).

Řada experimentů ukázala, že molekuly RNA umožňují *in vitro* amplifikaci infekčního PrP^{Sc}. Supattapone společně s kolegy v roce 2003 provedli experiment, jehož výsledky naznačily, že RNA může sloužit jako kofaktor pro různé kmeny křeččích prionů. Homogenní substráty z křeččí mozkové tkáně byly podrobeny různým ošetřením, která byla zaměřená na degradaci specifických tříd molekul. Posléze byl vyhodnocen efekt těchto ošetření na PrP^{Sc} amplifikaci. Ukázalo se, že selektivní degradace jednořetězcové RNA (ssRNA) vyústila v inhibici amplifikace PrP^{Sc} molekul pocházejících z několika kmenů křeččích prionů. Navíc, znovuoobnovení těchto homogenátů ochuzených o RNA vedlo i k obnovení PrP^{Sc} amplifikace (Supattapone, 2014).

Jeong *et al.* zjišťovali možnost, zda mohou být endogenní RNA molekuly zodpovědné za prionovou infektivitu. V jejich článku z roku 2009 popsali ošetření homogenátu scrapie mozkové tkáně hydridem hlinito-lithným (LiAlH₄), silným redukčním agens schopným degradovat molekuly RNA, po němž zaznamenali redukci prionové infekтивности. Avšak vzhledem k tomu, že je LiAlH₄ nespecifickým agens, které dokáže zničit i řadu dalších makromolekul včetně proteinů, nebylo možné definitivně potvrdit, že důvodem snížené infekтивности byla právě degradace RNA (Piro *et al.*, 2011; Piro a Supattapone, 2011).

O dva roky později Piro *et al.* přezkoumali potenciální roli polyaniontů v udržování prionové infekтивности s použitím rekombinantního PrP a syntetických oligonukleotidů, které

byly po začlenění do nukleoproteinových komplexů selektivně hydrolyzovány UV zářením. Priony obsahující takto degradované oligonukleotidy zůstaly infekční, což vědce dovedlo k závěru, že přítomnost polyaniontů zřejmě není pro udržení prionové infekivity vyžadována, ačkoliv i zde nelze hovořit o definitivním průkazu. V PrP^{Sc} molekulách mohl zůstat nedetekovatelné množství zářením nedotčeného oligonukleotidu, případně se jako kofaktor mohly angažovat endogenní lipidy asociované s PrP substrátem, jež byl při tomto experimentu použit (Piro *et al.*, 2011).

Deleault *et al.* v experimentu z roku 2010 došli k závěru, že nutnost RNA pro *in vitro* amplifikaci PrP^{Sc} s pomocí PMCA může být závislá na druhu, neboť zatímco tvorba PrP^{Sc} křeččího původu byla z velké části závislá na přítomnosti RNA, PrP^{Sc} myšího původu pro svou amplifikaci přítomnost RNA nevyžadoval (Saá *et al.*, 2012).

V roce 2015 pak Simoneau *et al.* publikovali data, která naznačují specifickou roli krátkých, nekódujících molekul RNA v utváření prionů. Vědci nejdříve extrahovali malé molekuly RNA z prionového infekčního agens (kmen 263K). V přítomnosti těchto molekul posléze uskutečnili konverzi neinfekčního recPrP v izoformu bohatou na β -skládaný list, která byla schopná vyvolat chorobu připomínající výchozí chorobu typickou pro 263K (Simoneau *et al.*, 2015; Daus, 2016).

Naopak, výše zmíněný experiment, v němž se podařilo vytvořit infekční recPrP^{Sc} v přítomnosti jediného kofaktoru, a to syntetického PE, naznačuje, že RNA pro prionovou infektivitu esenciální není. Nevylučuje to však možnost, že tyto molekuly hrají roli v utváření či zachování prionových kmenů. Přesná role RNA v amplifikačním procesu tedy zůstává neznámá (Saá a Cervenakova, 2014; Ma a Wang, 2014).

4.1.2 Lipidy

PrP^C je glykoprotein připojený k buněčné membráně skrze GPI kotvu a z lipidové membrány ho lze uvolnit po odštěpení GPI kotvy fosfoinositid-specifickou fosfolipázou C (PI-PCL). Oproti tomu je interakce PrP^{Sc} s lipidovými membránami mnohem pevnější a PI-

PCL digesce k uvolnění PrP^{Sc} z membrán nevede. Navíc, v upraveném bezbuněčném systému pro konverzi PrP, který vylučuje užití denaturantů a detergentů, byla přímá interakce mezi prionovým proteinem a lipidovými membránami shledána esenciální pro uskutečnění konverze (Wang a Ma, 2013).

Také Morillas *et al.* v roce 1999 poskytl další experiment poukazující na možnou důležitost lipidů v konverzi prionového proteinu. Ukázalo se, že vazba lidského recPrP se syntetickými lipozomy založená na interakci mezi pozitivně nabitými aminokyselinovými zbytky prionového proteinu a negativně nabitými fosfolipidovými skupinami vede k destabilizaci C-terminální domény recPrP. Tento proces vyústil v přeměnu recPrP na konformaci nesoucí podobné biochemické vlastnosti jako infekční PrP^{Sc}, čili bohatou na β -skládaný list a rezistentní vůči PK. Výsledky dovedly vědce k návrhu, že interakce s lipidy může recPrP uvést do reaktivního stavu, tím snížit energetickou bariéru a umožnit tak snadnější konverzi na PrP^{Sc}. I Pinheiro společně s kolegy ve svých studiích ukázali, že vazba s lipidovou membránou může vést ke změnám struktury recPrP, jeho agregaci a fibrilizaci (Wang a Ma, 2013; Ma a Wang, 2014).

V roce 2010 byl vydán článek ohledně role vysoce konzervovaného centrálního regionu prionového proteinu v PrP-lipidových interakcích. V experimentu byla využita řada recPrP mutací, s pomocí nichž se podařilo podpořit domněnku, že interakce mezi PrP a lipidy sehrává roli v patogenezi prionových chorob. Delece konzervované hydrofobní oblasti znemožnila recPrP-lipidovou hydrofobní interakci a vyústila ve ztrátu rezistence na PK. Také mutace P102L a P105L, obě spojené s lidskými spongiformními encefalopatiemi, pozměnily PrP-lipidovou interakci. Ačkoliv každá z těchto mutací měla odlišný vliv na interakci mezi recPrP a lipidy, obě ve výsledku ovlivnily PK-rezistenci – P102L ji dokonce kompletně zrušila (Wang a Ma, 2013).

Úspěšné vytvoření vysoce infekčních recPrP^{Sc} s pomocí PE jakožto jediného kofaktoru velmi podpořila roli fosfolipidů v utváření prionové infekivity. Dodatečné experimenty posléze ukázaly, že PE je schopný umožnit propagaci PrP^{Sc} molekul pocházejících z více myších kmenů a dokonce i některých křeččích kmenů, ačkoliv s menší účinností (Supattapone, 2014).

4.2 Kofaktory a prionová hypotéza

Zapojení dalších faktorů do procesu prionové replikace, jak naznačuje řada *in vitro* experimentů, představuje jistý problém z hlediska prionové hypotézy, neboť naznačuje, že PrP^{Sc} není jedinou komponentou infekčního agens. V takovém případě je třeba rozlišit mezi faktory, jež jsou nutnou součástí infekčního agens, a hostitelskými faktory zapojenými v konformační změně vedoucí k tvorbě infekčního PrP^{Sc}. Pokud by se ukázalo, že jsou případné kofaktory normálními buněčnými složkami, které se mimo svoji běžnou funkci náhodou podílejí na prionové konverzi, nemusely by být pokládány za součást infekčního agens, ale pouze za molekuly podporující účinnou prionovou replikaci (Diaz-Espinoza a Soto, 2010; Soto, 2011). Další pohled na věc je z hlediska samotné interpretace prionové hypotézy. Bude-li „protein-only“ hypotéza brána v nejstriktnějším slova smyslu, tedy že žádný další faktor není vyžadován pro propagaci infekčního PrP^{Sc}, pak zapojení jakékoliv další molekuly do tohoto procesu nemůže být konzistentní s prionovou teorií. Pokud by však byla interpretována tak, že je informace pro prionovou infektivitu nesena pouze konformací proteinu, pak by zapojení případných kofaktorů bylo s prionovou hypotézou slučitelné. Pro osvětlení této záležitosti je zapotřebí dalších studií pro specifikaci role či rolí kofaktorů v procesu prionové replikace (Ma a Wang, 2014).

5. Diskuze

Roční incidence sporadické formy Creutzfeldt-Jakobovy choroby je se svými 1–2 případy na milion obyvatel v ostrém kontrastu s odhadovaným počtem zemřelých na AIDS za rok 2014, který dle WHO činil 1,2 milionů lidí. I přes tento propastný rozdíl v počtu obětí se však stále jedná o lidské životy – výzkum na poli prionových chorob je proto žádaný, zvláště s přihlédnutím k faktu, že spongiformní encefalopatie jsou fatální ve 100 % případů. Ze stejného důvodu by neměly být podceňovány ani prionové choroby zvířat. Kupříkladu bovinní spongiformní encefalopatie nás zasáhla nejenom z hlediska ekonomického, ale ohrozila také veřejné zdraví, jak dokazuje další údaj WHO, tentokrát 224 obětí nové varianty Creutzfeldt-Jakobovy choroby za rozmezí let 1996–2011.

Za desítkami let studia infekčního agens zodpovědného za transmisivní spongiformní encefalopatie stojí nespočetné množství experimentů, velké množství poznatků, ale i mnoho dohadů. Předmětem vědeckých pří byla zejména samotná biologická podstata infekčního agens. Mezi nejvýznamnější teorie na toto téma patří hypotéza virová, „virino“ a prionová, z nich nejkontroverznější. K těmto v roce 1991 připojil Charles Weissmann ještě „unified theory“. Neshody zcela neutišilo dokonce ani udílení Nobelových cen v roce 1997. Přesto však žádný z odpůrců nedokázal předložit takový důkaz, který by prionovou teorií spolehlivě oťrásl. Nepodařilo se řádně identifikovat ani virové částice, ani kódující nukleové kyseliny asociované s infekčním agens. A tak dnes, zejména zásluhou moderní metody PMCA umožňující amplifikaci prionového proteinu *in vitro*, řada vědců považuje prionovou teorii konečně za uspokojivě dokázanou. Alternativní teorie však také mají své příznivce. Zcela jistě nejzarputilejší oponentkou prionové hypotézy a zároveň zastánkyní virového původu infekčního agens je Laura Manuelidis, jejíž práci se však v současnosti příliš podpory nedostává. Je více než zřejmé, že se všemi nashromážděnými daty, které jsou za dlouhé roky výzkumu na poli prionových chorob k dispozici, se prionová hypotéza již nezdá být tak kontroverzní jako kdysi a pravděpodobně není třeba se obávat prudkého obratu v podobě odhalení neodhalitelného viru skrývajícího se za agregáty chybně složeného proteinu. Původcům prionových chorob zřejmě jejich proteinová podstata odebrána nebude. To však neznamená, že nás priony již nemají čím překvapit.

Ačkoliv prionový výzkum zaznamenal v posledních letech významný pokrok, visí nad priony řada otázek čekajících na odpovědi. Kupříkladu nám stále není přesně známa fyziologická role PrP^C. Také zbývá určit přesnou trojrozměrnou strukturu PrP^{Sc} stejně jako mechanismus konverze PrP^C na jeho patologickou formu. Velký otazník představuje možné zapojení kofaktorů do procesu prionové replikace, které je v posledních letech velmi diskutováno. S objasněním mnohého by mohlo pomoci právě odhalení trojrozměrné struktury prionů. S nedostatkem informací ohledně specifických strukturních uspořádání, kterých diskutované infekční agens může nabývat, a že jich je mnoho, je znemožněno plně porozumět podstatě prionových kmenů, procesu konverze PrP^C na PrP^{Sc}, vyvinutí spolehlivých diagnostických metod a také stanovení účinné terapie. Jedním z předpokladů pro úspěšné stanovení struktury diskutovaného agens je systematická produkce vysokého titru infekčních prionů v takové formě, aby je bylo možné podrobit řádné strukturní analýze. Christian Schmidt se svými kolegy provedl loňského roku výzkum zaměřený právě na tuto problematiku. Ve snaze stanovit podmínky včetně případných kofaktorů, při nichž by bylo možné docílit produkce vysokého titru infekčního materiálu, dospěli k nepříliš radostnému závěru. Jejich výsledky potvrzují, že vytvoření syntetické prionové infekivity z recPrP sice není nemožné, je však obtížné, a zřejmě vyžaduje eukaryoticky exprimovaný a posttranslačně modifikovaný PrP a/nebo specifické kofaktory. Zároveň navrhuje, že o něco slibnější by mohlo být zaměření se na autentické *ex vivo* priony včetně zdokonalení technik purifikace *ex vivo* prionů a také porozumění případných kofaktorů, jež jsou běžnou součástí mozkové tkáně a jsou nezbytné pro účinnou prionovou replikaci (Schmidt *et al.*, 2015). I Martin D. Laus ve svém článku z roku 2015 upozorňuje na fakt, že chybně složený recPrP často v nepřítomnosti kofaktorů pozbývá infekivity a tudíž nemusí vhodně reprezentovat přesnou strukturu *in vivo* PrP^{Sc} (Daus, 2015). Možná právě zaměření se na způsob, jak izolovat vysoce purifikované autentické priony namísto těch vytvořených *in vitro* by pomohlo odhalit přesnou strukturu infekčního agens a využít ji k vyřešení dalších nejasností.

Ačkoliv se zdá být zaplnění mezer a vysvětlení zbývajících otázek na dosah ruky, zřejmě ještě nějakou chvíli potrvá a pravděpodobně půjde ruku v ruce se zdokonalováním některých současných technik a postupů, podobně jako před 15 lety tým Claudia Sota vylepšil bezbuněčný systém Byrona Caugheyho do podoby PMCA.

6. Závěr

Priony jsou původci transmisivních spongiformních encefalopatií – smrtelných neurodegenerativních chorob, které sužují nejenom zvířata, ale také člověka. Mezi lidské prionové choroby řadíme kuru, Creutzfeldt-Jakobovu chorobu, Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův syndrom, fatální familiární insomnií a variabilní na proteázu senzitivní prionopatii. Zvířecí prionové choroby zahrnují klusavku (scrapie), transmisivní encefalopatii norků, chronické chřadnutí jelenovitých, bovinní spongiformní encefalopatii a felinní spongiformní encefalopatii.

Pátrání po infekčním agens stojícím za těmito chorobami vedlo k vytvoření celé řady různých teorií, z nichž je v současné době všeobecně uznávána prionová neboli „protein-only“ hypotéza. Ta vychází z předpokladu, že priony jsou proteinové infekční částice prosté nukleové kyseliny, které sestávají výhradně anebo převážně z PrP^{Sc}, patologické izoformy normálního prionového proteinu (PrP^C). Ačkoliv doposud nebyla plně objasněna struktura PrP^{Sc} ani přesný mechanismus konverze PrP^C na PrP^{Sc}, předpokládá se, že PrP^{Sc} jedná jako jádro, které nabírá molekuly PrP^C a indukuje jejich konverzi na tutéž patologickou formu.

Řada experimentů zaměřená na tvorbu infekčního PrP^{Sc} *in vitro* poskytla v posledních letech velmi věrohodné důkazy podporující prionovou hypotézu, které pro mnohé vědce znamenají definitivní potvrzení správnosti prionové teorie. S použitím metody PMCA se také povedlo úspěšně reprodukovat fenomén prionových kmenů, jejichž existence je používána jako nejčastější argument proti prionové hypotéze. Zároveň však tyto studie poukázaly na možnou nutnost kofaktorů v procesu prionové replikace a na místě vyvstává další otázka. Jsou-li tyto molekuly skutečně potřebné pro prionovou infektivitu, vyvracuje to prionovou hypotézu? Bude-li prionová hypotéza brána pouze jako „PrP^{Sc}-only“, pak zapojení jakékoliv další molekuly nemůže být s teorií konzistentní. V opačném případě však případná existence kofaktoru nepopírá základní myšlenku hypotézy a to tu, že infekčním agens je částice na bázi proteinu, který podléhá konformační změně. K zodpovězení těchto otázek je v budoucnu zapotřebí objasnit přesný mechanismus konverze PrP^C a také stanovit přesné role případných kofaktorů.

7. Seznam zkratek

BASE	bovinní amyloidní spongiformní encefalopatie
BSE	bovinní spongiformní encefalopatie
CJD	Creutzfeldt-Jakobova choroba
DEPC	diethyl pyrokarbonát
fCJD	familiární Creutzfeldt-Jakobova choroba
FFI	fatální familiární insomnie
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův syndrom
iCJD	iatrogenní Creutzfeldt-Jakobova choroba
miRNA	microRNA
OER	oxygen enhancement ratio
OPRD	delece oktapeptidových repetit
OPRI	inzerce oktapeptidových repetit
PCR	polymerázová řetězová reakce
PE	fosfatidylethanolamin
PI-PCL	fosfoinositid-specifická fosfolipáza C
PK	proteináza K
PMCA	protein misfolding cyclic amplification cyklická amplifikace prionového proteinu
PMSF	fenylmetylsulfonyl fluorid
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoglycerol
PRNP	prion protein gene
PrP	prionový protein
PrP ^C	buněčný prionový protein
PrP ^{Sc}	scrapie prionový protein
PTSV	potato spindle tuber viroid viroid vřetenovitosti bramboru
recPrP	rekombinantní prionový protein
RNA	ribonukleová kyselina

sCJD	sporadická Creutzfeldt-Jakobova choroba
SDS	sodiumdodecylsulfát
siRNA	small interfering RNA
ssRNA	jednořetězcová RNA
TSEs	transmisivní spongiformní encefalopatie
vCJD	nová varianta Creutzfeldt-Jakobovy choroby
VPSPr	variabilní na proteázu senzitivní prionopatie

8. Seznam literatury

- Abid K, Soto C.** (2006). The intriguing prion disorders. *Cell Mol Life Sci.* **63**(19-20):2342-2351.
- Acevedo-Morantes C, Wille H.** (2014). The Structure of Human Prions: From Biology to Structural Models — Considerations and Pitfalls. *Viruses.* **6**(10):3875-3892.
- Acquatella-Tran Van Ba I, Imberdis T, Perrier V.** (2013). From Prion Diseases to Prion-Like Propagation Mechanisms of Neurodegenerative Diseases. *Int J Cell Biol.* **2013**:1-8.
- Aguzzi A, Calella AM.** (2009) Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases. *Physiol Rev.* **89**(4):1105-1152.
- Almond JW.** (1998) Bovine spongiform encephalopathy and new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Br Med Bull.* **54**(3):749-759.
- Alper T.** (1972). The nature of the scrapie agent. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol).* **6**:154-155.
- Alper T, Haig DA, Clarke MC.** (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun.* **22**(3):278-284.
- Alpers MP.** (2008). The epidemiology of kuru: monitoring the epidemic from its peak to its end. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **363**(1510):3707-3713.
- Ambler Z.,** c2011, *Základy neurologie: [učebnice pro lékařské fakulty]*. 7. vyd. Praha: Galén, ISBN 978-80-7262-707-3.
- Atalay FO, Tolunay S, Ozgun G, Bekar A, Zarifoglu M.** (2013). Creutzfeldt-jakob disease: report of four cases and review of the literature. *Turkish Journal of Pathology.* **31**(2):148-152.
- Balseiro A, Royo LJ, Martínez CP, Fernandez de Mera IG, Hofle U, Polledo L, Marreros N, Casais R, Marin JF.** (2012). Louping Ill in Goats, Spain, 2011. *Emerg Infect Dis.* **18**(6):976-978.
- Barlow RM.** (1972). Transmissible mink encephalopathy: pathogenesis and nature of the aetiological agent. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol).* **6**:102-109.
- Baskakov IV, Breydo L.** (2007). Converting the prion protein: What makes the protein infectious. *Biochim Biophys Acta.* **1772**(6):692-703.
- Bechtel K, Geschwind MD.** (2013). Ethics in prion disease. *Progress in Neurobiology.* **110**:29-44.

- Bencsik A, Debeer S, Petit T, Baron T.** (2009). Possible Case of Maternal Transmission of Feline Spongiform Encephalopathy in a Captive Cheetah. *PLoS One*. **4**(9):e6929.
- Benestad SL, Arsaac JN, Goldmann W, Noremark M.** (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Veterinary Research*. **39**(4):19.
- Bradley R.** (2002). Bovine spongiform encephalopathy. Update. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. **62**(3):183-195.
- Brown P.** (1990). Transmissible spongiform encephalopathies in humans: kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *Can J Vet Res*. **54**(1):38-41.
- Bunk S.** (2004). Chronic Wasting Disease—Prion Disease in the Wild. *PLoS Biology*. **2**(4): e121.
- Caine D, Tinelli RJ, Hyare H, De Vita E, Lowe J, Lukic A, Thompson A, Porter MC, Cipolotti L, Rudge P, Collinge J, Mead S.** (2015). The cognitive profile of prion disease: a prospective clinical and imaging study. *Ann Clin Transl Neurol*. **2**(5):548-558.
- Cancellotti E, Mahal SP, Somerville R, Diack A, Brown D, Piccardo P, Weissmann C, Manson JC.** (2013). Post-translational changes to PrP alter transmissible spongiform encephalopathy strain properties. *EMBO J*. **32**(5):756-769.
- Carp RI, Merz PA, Kascsak RJ, Merz GS, Wisniewski HM.** (1985). Nature of the Scrapie Agent: Current Status of Facts and Hypotheses. *J Gen Virol*. **66**(7):1357-1368.
- Castilla J, Morales R, Saa P, Barria M, Gambetti P, Soto C.** (2008). Cell-free propagation of prion strains. *EMBO J*. **27**(19):2557-2566.
- Colby DW, Prusiner SB.** (2011). Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **3**(1):a006833.
- Coles H.** (1997). Nobel panel rewards prion theory after years of heated debate. *Nature*. **389**(6651):529.
- Cortelli P, Gambetti P, Montagna P, Lugaresi E.** (1999). Fatal familial insomnia: clinical features and molecular genetics. *Journal of Sleep Research*. **8**(S1):23-29.
- Couzin-Frankel J.** (2011). The Prion Heretic. *Science*. **332**(6033):1024-1027.
- Daus ML.** (2015). Techniques to elucidate the conformation of prions. *World J Biol Chem*. **6**(3): 218-222.
- Daus ML.** (2016). Disease Transmission by Misfolded Prion-Protein Isoforms, Prion-Like Amyloids, Functional Amyloids and the Central Dogma. *Biology*. **5**(1):2.
- Davis AJ, Jenny AL, Miller LD.** (1991). Diagnostic characteristics of bovine spongiform encephalopathy. *J Vet Diagn Invest*. **3**(3):266-271.

- Degnan AJ, Levy LM.** (2013). Inherited Forms of Creutzfeldt-Jakob Disease. *American Journal of Neuroradiology*. **34**(9):1690-1691.
- Deleault NR, Piro JR, Walsh DJ, Wang F, Ma J, Geoghegan JC, Supattapone S.** (2012). Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA*. **109**(22):8546-8551.
- Diack AB, Ritchie DL, Peden AH, Brown D, Boyle A, Morabito L, Maclennan D, Burgoyne P, Jansen C, Knight RS, Piccardo P, Ironside JW, Manson JC.** (2014). Variably Protease-Sensitive Prionopathy, a Unique Prion Variant with Inefficient Transmission Properties. *Emerging Infectious Diseases*. **20**(12):1969-1979.
- Diaz-Espinoza R, Soto C.** (2010). Generation of prions in vitro and the protein-only hypothesis. *Prion*. **4**(2):53-59.
- Diener TO, McKinley MP, Prusiner SB.** (1982). Viroids and prions. *Proc Natl Acad Sci USA*. **79**(17):5220-5224.
- Dormont D.** (2002). Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Lett*. **529**(1):17-21.
- Enserink M.** (2005). Spongiform diseases: Waiting for the Final Experiment. *Science*. **310**(5755):1758.
- Field EJ, Peat A.** (1969). Structural changes in scrapie-affected brain. *Biochemical Journal*. **114**(2):19P-20P.
- Field EJ.** (1967). Invasion of the mouse nervous system by scrapie agent. *Br J Exp Pathol*. **48**(6):662-664.
- Gajdusek DC.** (1972). Spongiform virus encephalopathies. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. **6**:78-83.
- Gambetti P, Cali I, Notari S, Kong Q, Zou WQ, Surewicz WK.** (2011). Molecular biology and pathology of prion strains in sporadic human prion diseases. *Acta Neuropathologica*. **121**(1):79-90.
- Gavier-Widen D, Stack MJ, Baron T, Balachandran A, Simmons M.** (2005). Diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathies in Animals: A Review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **17**(6):509-527.
- Hadlow WJ.** (1999). Reflections on the transmissible spongiform encephalopathies. *Veterinary Pathology*. **36**(6):523-529.

- Halliday M, Radford H, Mallucci GR.** (2014). Prions: Generation and Spread Versus Neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. **289**(29):19862-19868.
- HIV/AIDS.** *World Health Organization*. [online]. [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: <http://www.who.int/hiv/data/en/>.
- Imran M, Mahmood S.** (2011a). An overview of animal prion diseases. *Virology Journal*. **8**:493.
- Imran M, Mahmood S.** (2011b). An overview of human prion diseases. *Virology Journal*. **8**(1):559.
- Jeong BH, Kim YS.** (2014). Genetic Studies in Human Prion Diseases. *Journal of Korean Medical Science*. **29**(5):623.
- Josefson D.** (1997). The prion hypothesis is finally accepted by the establishment. *BMJ*. **315**(7114):972.
- Kim KH.,** 2006, *The Social Construction of Disease: From Scrapie to Prion* [online]. Hoboken: Taylor & Francis e-Library, ISBN 02-030-0825-1.
- King CY, Diaz-Avalos R.** (2004). Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature*. **428**(6980):319-323.
- Kingsbury DT, Smeltzer DA, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC.** (1981). Evidence for normal cell-mediated immunity in scrapie-infected mice. *Infect Immun*. **32**(3):1176-1180.
- Klenková J.,** 2006, *Logopedie: narušení komunikační schopnosti, logopedická prevence, logopedická intervence v ČR, příklady z praxe* [online]. Vyd. 1. Praha: Grada, Pedagogika (Grada). ISBN 80-247-1110-9.
- Kojima G, Tatsuno BK, Inaba M, Velligas S, Masaki K, Liow KK.** (2013). Creutzfeldt-Jakob Disease: A Case Report and Differential Diagnoses. *Hawaii J Med Public Health*. **72**(4):136-139.
- Kretzschmar H, Tatzelt J.** (2013). Prion Disease: A Tale of Folds and Strains. *Brain Pathology*. **23**(3):321-332.
- Liberski PP.** (2012). Historical overview of prion diseases: a view from afar. *Folia Neuropathol*. **50**(1):1-12.
- Liberski PP, Jaskolski M.** (2002). Prion Diseases: a dual view of the prion hypothesis as seen from a distance. *Acta Neurobiol Exp*. **62**(3):197-226.
- Liebman SW, Derkatch IL.** (1999). The Yeast [PSI⁺] Prion: Making Sense of Nonsense. *The Journal of Biological Chemistry*. **274**(3):1181-1184.

- Lukáš K, Žák A.**, 2014, *Chorobné znaky a příznaky: diferenciální diagnostika*. 1. vyd. Praha: Grada, ISBN 978-80-247-5067-5.
- Ma J, Wang F.** (2014). Prion disease and the ‘protein-only hypothesis’. *Essays Biochem.* **56**:181-191.
- Mačák J, Mačáková J.**, 2004, *Patologie*. Vyd. 1. Praha: Grada Publishing, ISBN 80-247-0785-3.
- Makarava N, Savtchenko R, Alexeeva I, Rohwer RG, Baskakov IV.** (2016). New Molecular Insight into Mechanism of Evolution of Mammalian Synthetic Prions. *The American Journal of Pathology.* **186**(4):1006-14.
- Manuelidis L.** (2007). A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J Cell Biochem.* **100**(4):897-915.
- Marsh RF, Malone TG, Semancik JS, Lancaster WD, Hanson RP.** (1978). Evidence for an essential DNA component in the Scrapie agent. *Nature.* **275**(5676):146-147.
- Marx JL.** (1979). The scrapie agent: is it a viroid? *Science.* **203**(4380):532.
- Masison DC, Edskes HK, Maddelein ML, Taylor KL, Wickner RB.** (2000). [URE3] and [PSI] are prions of yeast and evidence for new fungal prions. *Curr Issues Mol Biol.* **2**(2):51-59.
- Mastrianni JA, Nixon R, Layzer R, Telling GC, Han D, DeArmond SJ, Prusiner SB.** (1999). Prion Protein Conformation in a Patient with Sporadic Fatal Insomnia. *New England Journal of Medicine.* **340**(21):1630-1638.
- Mathews JD.** (2008). The changing face of kuru: a personal perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* **363**(1510):3679-3684.
- Media centre.** *World Health Organization.* [online]. [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs180/en/>.
- Mironov Jr A, Latawiec D, Wille H, Bouzamondo-Bernstein E, Legname G, Williamson RA, Burton D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Peters PJ.** (2003). Cytosolic Prion Protein in Neurons. *J Neurosci.* **23**(18):7183–7193.
- Morales R, Duran-Aniotz C, Diaz-Espinoza R, Camacho MV, Soto C.** (2012). Protein misfolding cyclic amplification of infectious prions. *Nature Protocols.* **7**(7):1397-1409.
- Mould DL.** (1969). The chemical nature of the scrapie agent. *Biochemical Journal.* **114**(2):24P-25P.

- Mumenthaler M, Bassetti CL, Daetwyler CJ.** (2008). *Neurologická diferenciální diagnostika*. 1. české vyd. Praha: Grada, ISBN 978-80-247-2298-6.
- Narang HK.** (1987). Scrapie, an unconventional virus: the current views. *Proc Soc Exp Biol Med.* **184**(4):375-388.
- Nunnally BK, Krull IS.**, c2004, *Prions and mad cow disease* [online]. New York: Marcel Dekker, ISBN 978-0824740832.
- Park MJ, Jo HY, Cheon SM, Choi SS, Kim YS, Kim JW.** (2010). A Case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker Disease. *Journal of Clinical Neurology.* **6**(1):46-50.
- Parry HB.** (1960). Scrapie: A Transmissible Hereditary Disease of Sheep. *Nature.* **185**(4711):441-443.
- Pattison IH.** (1972). Scrapie--a personal view. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol).* **6**:110-114.
- Pattison Sir J.** (1998). The Emergence of Bovine Spongiform Encephalopathy and Related Diseases. *Emerging Infectious Diseases.* **4**(3):390-394.
- Peralta OA.** (2011). Prion biology and bovine spongiform encephalopathy. *Arch Med Vet.* **43**(2):99-109.
- Peralta OA, Eyestone WH.** (2009). Quantitative and qualitative analysis of cellular prion protein (PrP^C) expression in bovine somatic tissues. *Prion.* **3**(3):161-170.
- Piro JR, Harris BT, Supattapone S.** (2011). In Situ Photodegradation of Incorporated Polyanion Does Not Alter Prion Infectivity. *PLoS Pathog.* **7**(2):e1002001.
- Piro JR, Supattapone S.** (2014). Photodegradation illuminates the role of polyanions in prion infectivity. *Prion.* **5**(2):49-51.
- Plummer PJG.** (1946). Scrapie—A Disease of Sheep: A Review of the literature. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science.* **10**(2):49-54.
- Poggiolini I, Saverioni D, Parchi P.** (2013). Prion Protein Misfolding, Strains, and Neurotoxicity: An Update from Studies on Mammalian Prions. *International Journal of Cell Biology.* **2013**:1-24.
- Prusiner SB.** (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science.* **216**(4542):136-144.
- Prusiner SB.** (1984). Prions: novel infectious pathogens. *Adv Virus Res.* **29**:1-56.

- Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF, Bowman KA, Mock NI, Cochran SP, Masiarz FR.** (1981). Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. **78**(11): 6675-6679.
- Prusiner SB.** (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **95**(23): 13363-13383.
- Requena JR, Wille H.** (2014). The structure of the infectious prion protein: Experimental data and molecular models. *Prion*. **8**(1):60-66.
- Saa P, Cervenakova L.** (2015). Protein misfolding cyclic amplification (PMCA): Current status and future directions. *Virus Res*. **207**:47-61.
- Saa P, Sferrazza GF, Ottenberg G, Oelschlegel AM, Dorsey K, Lasmezas CI.** (2012). Strain-Specific Role of RNAs in Prion Replication. *J Virol*. **86**(19):10494-10504.
- Shkundina IS, Ter-Avanesyan MD.** (2007) Prions. *Biochemistry (Moscow)*. **72**(13):1519-1536.
- Schmidt C, Fizet J, Properzi F, Batchelor M, Sandberg MK, Edgeworth JA, Afran L, Ho S, Badhan A, Klier S, Linehan JM, Brandner S, Hosszu LLP, Tattum MH, Jat P, Clarke AR, Klöhn PC, Wadsworth JDF, Jackson GS, Collinge J.** (2015). A systematic investigation of production of synthetic prions from recombinant prion protein. *Open Biol*. **5**(12):150165.
- Schreuder BEC.** (1993). General aspects of transmissible spongiform encephalopathies and hypotheses about the agents. *Vet Q*. **15**(4):167-174.
- Simoneau S, Thomzig A, Ruchoux MM, Vignier N, Daus ML, Poleggi A, Lebon P, Freire S, Durand V, Graziano S, Galeno R, Cardone F, Comoy E, Pocchiari M, Beekes M, Deslys JP, Fournier JG.** (2015). Synthetic Scrapie Infectivity: Interaction between Recombinant PrP and Scrapie Brain-Derived RNA. *Virulence*. **6**(2):132-144.
- Solfrosi L, Milani M, Mancini N, Clementi M, Burioni R.** (2013). A closer look at prion strains: characterization and important implications. *Prion*. **7**(2):99-108.
- Soto C.** (2011). Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends in Biochemical Sciences*. **36**(3):151-158.
- Soto C, Castilla J.** (2004). The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nature Medicine*. **10**(7):S63-S67.
- Supattapone S.** (2014). Synthesis of High Titer Infectious Prions with Cofactor Molecules. *Journal of Biological Chemistry*. **289**(29):19850-19854.

- Tabarnero C, Polo JM, Sevillano MD, Munoz R, Berciano J, Cabello A, Baez B, Ricoy JR, Carpizo R, Figols J, Cuadrado N, Claveria LE.** (2000). Fatal familial insomnia: clinical, neuropathological, and genetic description of a Spanish family. *Journal of Neurology, Neurosurgery*. **68**:774-777.
- Takada LT, Geschwind MD.** (2013). Prion Diseases. *Semin Neurol*. **2013**(33):348-356.
- Triarhou LC.** (2009). Alfons Maria Jakob (1884–1931), Neuropathologist par Excellence. *European Neurology*. **61**(1):52-58.
- Tuite MF, Serio TR.** (2010). The prion hypothesis: from biological anomaly to basic regulatory mechanism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **11**(12):823-833.
- Vazquez-Fernandez E, Alonso J, Pastrana MA, Ramos A, Stitz L, Vidal E, Dynin I, Petsch B, Silva CJ, Requena JR, Baskakov IJ.** (2012). Structural Organization of Mammalian Prions as Probed by Limited Proteolysis. *PLoS ONE*. **7**(11):e50111.
- Vokurka M, Hugo J.,** 2015, *Velký lékařský slovník*. 10. aktualizované vydání. Praha: Maxdorf, Jessenius. ISBN 978-80-7345-456-2.
- Vyskot B.,** 2010, *Epigenetika*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, ISBN 978-80-244-2534-4.
- Wang F, Ma J.** (2013). Role of lipid in forming an infectious prion? *Acta Biochim Biophys Sin*. **45**(6):485–493.
- Ward RL, Porter DD, Stevens JG.** (1974). Nature of the scrapie agent: evidence against a viroid. *J Virol*. **14**(5):1099-1103.
- Watts JC, Balachandran A, Westaway D.** (2006). The Expanding Universe of Prion Diseases. *PLoS Pathogens*. **2**(3):e26.
- Weber MB.** (1971). The role of 'slow virus' infections in neurological disease. *Can Fam Physician*. **17**(4):39-41.
- Weissmann C.** (1991). A 'unified theory' of prion propagation. *Nature*. **352**(6337):679-683.
- Weissmann C.** (2004). The state of the prion. *Nat Rev Microbiol*. **2**(11):861-871.
- Weissmann C, Enari M, Klohn PC, Rossi D, Flechsig E.** (2002). Molecular biology of prions. *Acta Neurobiol Exp*. **62**(3):153-66.
- Wickner RB, Edskes HK, Shewmaker F.** (2006). How to find a prion: [URE3], [PSI⁺] and [β]. *Methods*. **39**(1):3-8.
- Williams ES.** (2005). Chronic Wasting Disease. *Veterinary Pathology*. **42**(5):530-549.

- Zomosa-Signoret V, Arnaud JD, Fontes P, Alvarez-Martinez MT, Liautard JP.** (2008). Physiological role of the cellular prion protein. *Veterinary Research*. **39**(4):09.
- Zou WQ, Gambetti P, Xiao X, Yuan J, Langeveld J, Pirisinu L.** (2013). Prions in Variably Protease-Sensitive Prionopathy: An Update. *Pathogens*. **2**(3):457-471.
- Zou WQ, Gambetti P.** (2005). From Microbes to Prions: The Final Proof of the Prion Hypothesis. *Cell*. **121**(2):155-157.