

Etiologia maladiilor prionice

POMPILIA APOSTOL, FLORINA RAICU, GABRIELA BORDEIANU, IONELA MOANȚĂ, D. CIMPONERIU, L.O. POPA

Institutul de Genetică al Universității din București, Aleea Portocalilor Nr.1-3 Sector 6 București

Introducere

Prionii sunt particule infecțioase care cauzează un grup de maladii neurodegenerative caracterizate prin degenerarea sistemului nervos central. Sunt lipsiți de orice tip de acid nucleic și pot induce o serie de maladii atât la om cât și la animale. La om, cele mai cunoscute sunt: maladia Creutzfeld-Jacob (CJD), sindromul Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), insomnia fatală familială (FFI), maladia Kuru și sindromul Alpers (întâlnit numai la copii), iar la animale: scrapie (la oi și capre), encefalopatia spongiformă bovină (BSE) sau “boala vacilor nebune”, encefalopatia spongiformă a felinei, a cervidelor, etc.

Procesul care declanșează boala este reprezentat de conversia unei proteine normale, sintetizată în mod natural în creierul tuturor mamiferelor (PrP^c), într-una mutantă, anormală (PrP^{Sc}). În funcție de factorul care induce conversia PrP^c în PrP^{Sc} , natura acestor afecțiuni poate fi genetică (în cazul unei mutații punctiforme a genei pentru PrP , transmisă autozomal dominant), infecțioasă (ca urmare a consumului alimentelor contaminate, a folosirii unor instrumente chirurgicale nesterile, injectării unor hormoni derivați din hipofiza prelevată de la cadavre), sau sporadică (datorată unor mutații spontane ale genei PrP , care intensifică rata conversiei proteinei prionice, cât și unor factori necunoscuți).

Maladiile prionice reprezintă un grup heterogen de disfuncții neurodegenerative cunoscute ca encefalopatii spongiforme transmisibile (TSE), ce au în comun leziuni cerebrale, produse prin degenerescența vacuolară a neuronilor. Post-mortem se constată un aspect spongios al creierului, aspect datorat prezenței vacuolelor care se găsesc în special la nivelul substanței cenușii, corespunzător corpilor neuronali.

Perioada de latență a acestor maladii este variabilă (luni sau chiar zeci de ani). Odată instalată, boala evoluează spre debilitate mintală, demență, pierderea controlului motor, imobilizare etc.

Interesul crescut față de aceste afecțiuni este datorat unor particularități legate de structura, modul de transmitere și patologia indusă, intra sau interspecific, de către prion.

Toate aceste maladii sunt asociate cu alterarea conformațională determinată de conversia formei normale a proteinei prionice, sensibilă la protează (PrP^c), la o formă rezistentă la protează (PrP^{Sc}), marker specific TSE-urilor; această modificare are loc doar după ce proteina prionică a fost ancorată la nivelul membranei celulare.

Atunci când la nivelul genei care codifică proteina prionică normală, au loc mutații punctiforme, se realizează sinteza unei izoforme anormale, denumită, după numele bolii la care a fost studiat “ PrP scrapie” sau PrP^{Sc} . Aceasta proteină scrapie mai este cunoscută și sub numele de prion. Conceptul de prion a fost introdus de Prusiner în urma studierii scrapiei la oi (encefalopatia spongiformă a ovinelor). Prionii reprezintă o categorie de agenți

infecțioși, considerându-se ca sunt un mister din punct de vedere biologic, deoarece, în structura lor intră doar o moleculă proteică. Fiind lipsiți de genom, diferă de toate categoriile de agenți infecțioși cunoscute până în prezent, prin faptul că nu conțin nici un tip de acid nucleic (ADN sau ARN). Este interesant de relatat faptul că prionii rezistă la acțiunea multor factori fizico-chimici, printre care amintim: formol 10% (timp de 28 de luni), caldură (rezistă la fierbere timp de 3 ore), factori inhibitori ai acizilor nucleici, precum și la acțiunea radiațiilor UV (activitate infecțioasă 100%).

Prin analogie, forma normală a acestei proteine, prezentă în condiții normale în celulă, a fost desemnată PrP^C (proteina prionică ceulară).

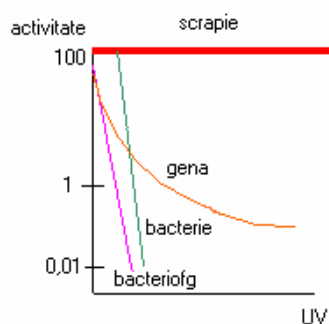


Figura 1. Reprezentarea activității infecțioase a prionului și a organismelor cu grad diferit de organizare a ADN, sub acțiunea UV.

În încercarea de a descifra cauza care stă la baza apariției acestor maladii, au fost formulate mai multe teorii. Imposibilitatea de a descoperi pe preparate provenite de la pacienți cu TSE, un agent infecțios reprezentat de un acid nucleic, precum și rezistența foarte mare a acestor maladii la tratamente, care de obicei distrug acidul nucleic, conduce la formularea ipotezei proteinei prionice infectante. Această ipoteză a fost postulată în 1982, de către Stanley Prusiner care susține etiologia proteică a TSE, și presupune că PrP^{Sc} acționează ca matriță în conversia izoformei PrP^C normale, în PrP^{Sc} asociată cu boala. Astfel, în această viziune, proteina prionică se autopropagă prin contactul cu proteina normală, pe care o determină într-un anumit fel să adopte o conformație diferită față de cea inițială, luând forma prionică. Aceste modificări se propagă în lanț, astfel încât noile particule infecțioase modifică în continuare alte proteine prionice normale cu care vin în contact. S-a demonstrat că în absența acestei proteine normale, PrP^{Sc} este incapabilă de a determina apariția bolii. Una din lacunele acestei ipoteze este faptul că nu poate explica cum o moleculă proteică poate determina proprietăți biologice diferite precum și diferite forme de TSE. S-ar părea, totuși, că diferitele forme de TSE ar fi determinate de diferite conformații și/sau de nivelul diferit de glicozilare al proteinei prionice.

O altă ipoteză incriminează un agent infecțios asemănător virusurilor, numit *virino*, ale cărui copii ar permite dezvoltarea diferitelor variante ale bolii neurodegenerative și, ocazional, schimbarea caracteristicilor prin mutație. Acesta este un agent infecțios subviral alcătuit dintr-o moleculă mică de acid nucleic, asociat cu o proteină codificată de celula gazdă. În aceste condiții se pare că *virino* este asociat cu izoforma scrapie a proteinei prionice.

Totuși, ipoteza cea mai vehiculată este că PrP^{Sc} ar fi ea însăși principalul și chiar singurul component al agentului infecțios. Această ipoteză, "protein only", propusă de Griffith în anul 1967, arată că propagarea prionilor ar avea loc prin intermediul PrP^{Sc} care se replică cu înaltă fidelitate prin recrutarea PrP endogene. În absența acestei forme, s-a arătat

că PrP^{Sc} este incapabilă de a se replica și de a induce boala. Pentru a fi infecțioasă, PrP^{Sc} trebuie să găsească în celula infectată molecule identice din punct de vedere chimic, pentru a le modifica structura.

Structura PrP^C

Proteina prionică celulară este exprimată la nivelul sistemului nervos central și periferic, în țesutul limfatic și la nivelul joncțiunilor neuromusculare, ca o proteină situată la suprafața celulei, fiind ancorată de membrana celulară prin intermediul unei ancore glicolipidice. În mod normal, această formă este produsă în creierul tuturor mamiferelor și este inofensivă, însă, în anumite condiții poate adopta o formă alterată, care reprezintă agentul infecțios implicat în dezvoltarea TSE. Odată instalat la nivelul creierului, acest agent transformă moleculele proteice normale într-un număr mare de copii infecțioase, care sunt depozitate extracelular ca plăci amiloide sau intracelular ca fibrile sau "fășii" prionice (agregate de prioni).

Proteina structurală este o glicoproteină hidrofobă, cu o greutate moleculară de 28KDa, având în compoziția sa 208-220 de aminoacizi, în funcție de specie. Prezintă un capăt NH₂-terminal, o regiune centrală și un capăt COOH-terminal. Domeniul NH₂-terminal conține 80-100 de aminoacizi, o regiune alcătuită din cinci copii ale unei octarepetiții, existând cazuri în care acest număr este mai mare (de exemplu la bovine unde există șase astfel de copii). Numeroase studii au arătat că aceste repetiții au un grad înalt de conservare în seria animală, ceea ce înseamnă că îndeplinesc un rol important în funcționarea proteinei. La nivelul acestor repetiții se găsește un situs de legare pentru ionii unor metale, în special pentru ionii de cupru și se presupune că activitatea proteinei ar depinde de prezența acestor ioni.

Acest domeniu se caracterizează printr-o plasticitate deosebită și prin prezența unor structuri helicale, sugerând că este implicat în conversia PrP^C → PrP^{Sc}.

Capătul COOH-terminal conține 120 de aminoacizi, o secvență semnal pentru atașarea unui glicofosfatidil inozitol care reprezintă "ancora" cu care PrP este prinsă de membrana celulară, și o regiune conservată, reprezentată de două resturi de cisteină unite prin două punți disulfidice. Proteina este procesată post-translațional astfel încât are loc o rearanjare a unui număr variabil de aminoacizi la nivelul ambelor domenii terminale.

Forma patogenă sau "scrapie" (PrP^{Sc}) este identică din punct de vedere al compoziției în aminoacizi cu proteina prionică normală, însă există diferențe marcante la nivelul structurii secundare și terțiare. Metodele biofizice, cum ar fi analizele RMN și dicroismul circular, au arătat că există diferențe între cele două izoforme la nivelul structurii secundare, care constau în faptul că PrP^C este bogată în structuri α-helix, regiuni în care scheletul proteic se răsuște sub forma specifică a unei spirale, în timp ce PrP^{Sc} este bogată în legături β-pliate, în care proteina este desfășurată. Miezul proteic al PrP conține 3 α-helixuri și o structură β-pliată scurtă, restul moleculei prezentând o mobilitate crescută. Originea diferențelor conformaționale dintre cele două forme este necunoscută. Ele ar putea fi determinate fie de organizarea terțiară a monomerilor PrP^{Sc}, fie ar putea rezulta din structura cuaternară diferită a polimerilor PrP^{Sc}.

Funcția PrP^C este încă necunoscută, însă și din acest punct de vedere există o serie de ipoteze. Numeroase studii au fost realizate pentru a stabili rolul fiziologic al PrP la suprafața celulei și s-a constatat că poate acționa ca un receptor celular pentru un ligand extracelular care nu a fost încă identificat. O altă ipoteză sugerează că PrP, la suprafața celulei, leagă ionii de cupru, fiind implicată în transportul și metabolizarea acestora. Prin izolarea unei octarepetiții din domeniul NH₂-terminal, s-a observat că prin legarea ionilor de cupru se

formează o structură helicală ceea ce ar favoriza formarea proteinei anormale. Ionii metalelor tranziționale redox-active cum sunt cupru și fierul, prezintă o importanță semnificativă în procesul neurodegenerării, deoarece intră în structura unor enzime, iar deficiența lor poate duce la apariția unor disfuncții la nivelul sistemului nervos central, generate de producerea de radicali liberi de oxigen și stress-ul oxidativ. Există numeroase dovezi în sensul că PrP are activitate superoxid dismutazică (SOD), concluzie rezultată din faptul că celulele lipsite de PrP au o sensibilitate crescută la stress-ul oxidativ datorită activității scăzute sau chiar absente a SOD. Această activitate este facilitată de legarea ionilor de cupru iar celulele în care proteina prionică este trunată și nu prezintă capătul NH₂-terminal, prezintă o deficiență a SOD, deoarece ionii de cupru se leagă în special de acest capăt.. În plus, ionii altor metale (în special ionii metalelor grele), pot media, prin fixarea lor la nivelul unui situs specific din proteină, neurotoxicitatea, favorizând formarea de agregate și, implicit, apariția bolii. De asemenea, s-a sugerat că această proteină joacă un rol important în reglarea apoptozei, cu distrugerea nivelului celular normal al PrP în cursul infecției, conducând ireversibil la moarte celulară.

Mecanismul formării PrP^{Sc}

Formarea PrP^{Sc} este rezultatul procesului de conversie al structurilor α -helicale prezente în structura secundară a proteinei celulare, în structuri β -pliate caracteristice proteinei scrapie. Studii realizate cu peptide sintetice au sugerat că o regiune din PrP, cuprinsă între resturile de aminoacizi 108-121, poate determina formarea de legături β -pliate în izoforma patogenă, PrP^{Sc}. Această regiune pare a fi necesară pentru formarea PrP^{Sc}, deoarece deleția ei previne formarea PrP^{Sc} în timp ce deleția altor regiuni situate în amonte sau în aval de această regiune, permite formarea acesteia. Procesul de conversie implică doar o schimbare în topologia proteinei, fără a avea vreun efect asupra compoziției în aminoacizi. În acest proces de conversie, s-a dovedit că, din întreaga structură a proteinei celulare, un rol important îl are, datorită plasticității sale crescute, domeniul NH₂-terminal, care permite formarea unor structuri helicale. În ceea ce privește identitatea factorului care determină acest proces, există mai multe ipoteze, mai mult sau mai puțin argumentate.

Dintre toate modele propuse, cel mai vehiculat este acela că proteina nativă se găsește în mod normal într-un echilibru cu un ansamblu de de proteine care prezintă modificări conformaționale minore – precursori monomerici ai PrP^{Sc}. Acești precursori pot interacționa între ei cu eficiență scăzută și reversibil, până când se formează un miez oligomeric infecțios și stabil. Când este atinsă o mărime critică, precursorii monomerici ai PrP^{Sc} se pot adăuna la această structură într-un mod ireversibil, pentru a permite mărirea particulei PrP^{Sc}. Particula infecțioasă se poate apoi “reproduce” prin ruperea în particule mai mici și stabile. Cele patru etape (a) starea de echilibru dintre PrP^c și PrP^{Sc}, b) interacția precursorilor, c) “reproducerea” și d) formarea unei particule stabile) ale acestui proces sunt schematizate în figura de mai jos.

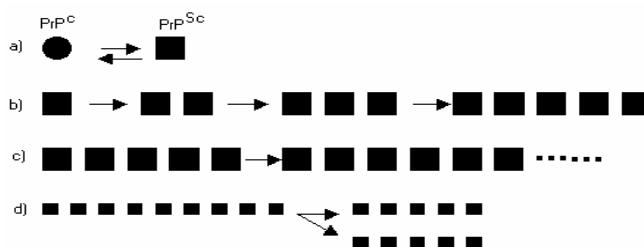


Figura 2. Etapele propagării prionului.

Când cantitatea de PrP^{Sc} depozitată atinge un nivel critic, se declanșează o cascadă autocatalitică, care de obicei este ireversibilă și care determină modificarea proteinelor normale nou sintetizate. În cazul maladiilor prionice, aceste depozite nu sunt distruse, ceea ce duce la acumularea lor în celule, determinând vacuolizarea și necroza acestora. S-a constatat că în acest proces de conversie, PrP^{Sc} funcționează ca matriță pentru formarea unor noi molecule PrP^{Sc}.

Graham S. Jackson și colab. (2000), au urmărit experimental schimbarea conformației proteinei PrP^C în cursul procesului de conversie. Pentru aceasta, ei au incubat PrP^C, marcată cu ³²S, cu un exces de PrP^{Sc} și au observat că se produce o proteină de novo, rezistentă la proteinaza K, pe care au desemnat-o PrP^{RES}. După digestia cu protează, se observă că mobilitatea PrP^{RES} în gel de electroforeză SDS-PAGE este crescută, ceea ce indică o scădere a masei moleculare, punând în evidență faptul că are loc o schimbare conformațională în proteina prionică celulară, în cursul procesului de conversie.

Unii autori sugerează că procesul de conversie poate fi indus și de factori fiziologici, cum ar fi valoarea pH-ului, creșterea temperaturii sau nivelul diferit de glicozilare al proteinei normale. De asemenea, există unele supoziții, precum că în procesul de conversie PrP^C→PrP^{Sc} ar fi implicați anumiți cofactori, unii dintre aceștia aparținând familiei de proteine chaperone. Telling și colab. (1996), arată că există un alt factor auxiliar, numit "proteina X", care facilitează această conversie prin legarea sa la un epitop discontinuu de la nivelul PrP^C.

Se știe cu siguranță faptul că formarea PrP^{Sc} este un proces posttranslațional, care are loc doar după atașarea PrP^C la membrana neuronală. Daude și colab. (1997) au arătat că în cazul formelor ereditare, acest proces are loc chiar la nivelul reticulului endoplasmic, înainte ca proteina normală să fie ancorată de membrană. Indivizii respectivi moștenesc direct forma mutantă, ceea ce explică absența plăcilor amiloide la nivelul țesutului cerebral.

Alte ipoteze

Au fost propuse variate ipoteze pentru a explica mecanismul care determină distrugerea celulelor neuronale și aspectul spongios al creierului. Acestea includ printre altele: efectul neurotoxic manifestat de o regiune a proteinei prionice, care cuprinde resturile de aminoacizi 106-126, precum și stress-ul oxidativ crescut la nivelul neuronilor ca urmare a depleției PrP^C, care se presupune că funcționează ca un antioxidant.

În cazul celor mai multe proteine globulare are loc o pliere a monomerilor care duce la formarea unei conformații stabile. Când plierea este incorectă sau când apare o schimbare conformațională, ca urmare a substituției unui aminoacid, a unei modificări chimice, sau a unor factori necunoscuți, proteinele nu pot fi degradate și se agregă sub forma unor plăci amiloide.

Maladiile prionice apar ca urmare a unor fenomene destabilizatoare a structurii proteinei prionice normale, care o predispun la formarea de agregate. Interacția dintre PrP^C și PrP^{Sc} ar putea fi facilitată de o mutație, de legarea unui ligand sau a unei co-proteine.

Studii realizate pe șoareci transgenici au arătat că nici o deleție care are loc în amonte de aminoacidul din poziția 106 a PrP^C, nu determină apariția unei maladii prionice, șoarecele manifestând un fenotip normal, în timp ce orice deleție (mutație punctiformă) apărută în orice poziție după situs-ul 106, conduce la ataxie severă precum și pierderea celulelor neuronale, simptome (și patologie) complet absente la șoarecii **ablated** (șoareci care prezintă o alogenă cu deleție înaintea situs-ului 106). Aceste dovezi conduc la ipoteza că PrP și o structură omoloagă sunt în competiție pentru un același ligand.

Gena PrP

Proteina prionică normală este sintetizată pe baza informației genetice conținută într-un fragment de ADN care se găsește atât în celulele normale cât și în cele infectate, unde determină sinteza unei proteine normale, neprionice. Această genă, la om, este localizată pe brațul scurt al cromozomului 20.

La mamifere, gena are trei exoni și un ORF (open reading frame) care este implicat în codificarea acestei proteine. Inactivarea sau deleția acestui ORF, în cele mai multe cazuri, are un efect nesemnificativ în dezvoltarea pre și neonatală a șoarecilor, deși se știe că expresia PrP este o condiție necesară, dar nu suficientă, pentru propagarea particulelor infecțioase.

La hamsterul sirian, gena prezintă doi exoni separați de un intron de 10 kb. Exonul 1 codifică o porțiune din secvența leader, situată la capătul 5', care va fi netranslată, în timp ce exonul 2 codifică pentru un ORF și secvența 3' netranslatată. La șoarece, oi și șobolan, gena conține trei exoni, exonul trei fiind analog exonului doi de la hamster. Promotorii genei de la hamster și șoarece conțin regiuni bogate în G-C, repetate de un număr mare de ori și sunt de lipsiți de cutia TATA. Acești nonameri G-C, reprezintă un motiv care poate funcționa ca un sit de legare pentru factorul transcripțional Sp1. Analiza comparativă a cromozomului 20 la om (brațul scurt), pe care se găsește gena, și a cromozomului 2 la șoarece, a scos în evidență faptul că cele două regiuni sunt omoloage, ceea ce înseamnă că această genă este conservată în evoluție.

La păsări, gena conține un singur exon la nivelul căruia se găsește un ORF, ceea ce elimină posibilitatea formării PrP^{Sc} printr-un splicing alternativ.

Gena umană PRNP conține un singur ORF care codifică o proteină de 253 de aminoacizi. Această proteină este procesată posttranslațional, astfel încât are loc o rearanjare a unei secvențe de 22 de aminoacizi de la capătul NH₂-terminal. Același lucru se întâmplă la capătul COOH, unde 23 de aminoacizi sunt rearanjați în cursul adăugării unui glicofosfatidil inozitol (GPI) care ancorează proteina de membrana celulară. Au fost studiate o mulțime de variante ale proteinei PrP, din punct de vedere al compoziției chimice, la mai multe specii și s-a constatat că doar secvența proteinică de la pui diferă considerabil de cea umană. Din acestea se trage concluzia că există un grad înalt de conservare în seria animală și că anumite funcții s-au păstrat de-a lungul evoluției.

Maladii prionice la om pot fi considerate afecțiunile în care fiecare individ prezintă un progresiv declin subacut sau cronic al funcțiilor cognitive și motorii. De obicei, pacienții cu vârsta cuprinsă între 40-80 de ani, manifestă trăsături clinice care permit stabilirea diagnosticului premorbid al maladiilor prionice, în special cei cu CJD.

Faptul că 10% din aceste maladii sunt ereditare, duce la concluzia că fondul genetic joacă un rol important. Mutațiile au loc la nivelul ORF-ului sau în regiunea codificatoare a genei, iar acest lucru a fost observat la toți pacienții cu maladii prionice moștenite. Ipoteza că sindromul GSS ar putea fi transmis la maimuțe, a fost emisă prima dată când s-a presupus că scrapia, CJD și alte maladii prionice ar fi determinate de un virus. Când s-a descoperit că mutația la nivelul codonului 102 din gena umană, în urma căreia prolina este înlocuită cu leucina este legată de apariția maladiei GSS, s-a formulat ipoteza că maladiile prionice sunt atât infecțioase cât și genetice. Această mutație poate fi cauzată de deaminarea, în linia germinală, a unei insule CpG metilate, ceea ce duce la substituția unei timine cu o citozină.

S-a constatat, atât la om cât și la animale, că mutațiile au loc în anumite poziții și că fiecare din aceste mutații este asociată cu un anumit fenotip. De exemplu, mutația la nivelul codonului 102 din gena umană este asociată cu inducerea GSS, mutația aminoacidului din poziția 129 a secvenței proteinice predispune la CJD atât sporadic cât și ereditar, dubla

mutație din pozițiile 178 și 200 este asociată cu un alt fenotip GSS etc. De asemenea, s-a observat că un fenotip de CJD poate fi cauzat de inserțiile unor octarepetiții. Adiția a 2, 4, 5, 6, 7, 8 și chiar 9 repetiții la cele cinci prezente în mod normal, au fost identificate la indivizi care prezentau CJD ereditar; deleția unei asemenea repetiții nu este corelată cu apariția bolilor neurodegenerative. Mutația punctiformă de la nivelul codonului 178 este corelată cu instalarea FFI (insomina familială fatală).

Analizele de genetică moleculară au scos în evidență polimorfismele de la nivelul genei PrP. Polimorfismul din poziția 129 pare a fi capabil să influențeze expresia maladiilor prionice nu numai în formele ereditare dar și în cele sporadice sau infecțioase.

Formele sporadice se referă în special la cazurile de CJD și posibil, (într-o mică măsură), la cele de GSS. În cazul acestor pacienți nu s-au identificat mutații la nivelul genei. Modul de apariție a maladiei la acești indivizi nu este cunoscut; se presupune că ar putea avea loc o transmitere a factorului etiologic pe orizontală (între indivizii aceleiași specii sau aparținând la două specii diferite), ca urmare a unor mutații somatice la nivelul ORF-ului genei PrP sau prin conversia spontană a PrP^c în PrP^{Sc}. Toate mutațiile punctiforme identificate la nivelul genei PrP, au loc fie în secvențe din interiorul, fie din apropierea unei regiuni din structura secundară a PrP, și, în felul acesta, determină destabilizarea structurii proteinei prionice.

Concluzii

Deși cunoscute de sute de ani, maladiile prionice reprezintă încă un domeniu puțin cunoscut din punct de vedere biologic și medical fiind necesare, încă, numeroase studii și cercetări pentru stabilirea cu exactitate a cauzelor și a mecanismului care determină apariția acestor boli. Faptul că există numeroase variante ale acestor boli, și că pot fi de natură diferită, reprezintă o barieră în realizarea acestui obiectiv.

Ipotezele formulate pentru descifrarea mecanismului acestor boli arată că acesta este comun atât la om cât și la animale și că la baza lui se află procesul de conversie a PrP^c în PrP^{Sc}.

Acest proces de conversie poate fi indus de o serie de factori, atât endogeni cât și exogeni, și constă în schimbarea conformațională a proteinei normale (conversia structurilor α -helix în β -pliate) fără a afecta în nici un fel compoziția chimică a acestor proteine.

Un rol important în acest proces îl au mutațiile de la nivelul genei care codifică proteina normală; acestea au loc în poziții fixe și sunt corelate cu anumite fenotipuri.

Deși PrP este implicată în procesul neurodegenerativ, rămâne neclar dacă neurotoxicitatea PrP^{Sc} sau pierderea funcției PrP^c (de exemplu activitatea superoxid dismutazică), este determinantul major al manifestărilor clinice.

Există multe întrebări la care nu s-au găsit încă răspunsuri în ceea ce privește relația dintre structura și funcția acestei proteine prionice.

Bibliografie

- 1) Brookes P.J., - *Topics in prion cell biology*, Current Opinion in Neurobiology, 1999, 571-577.
- 2) Daggett V., - *Structure-function aspects of prion proteins*, Current Opinion in Biotechnology, 1998, 9: 359-365.

- 3) Daude N, Lehmann S, Harris DA, - *Identification of intermediate steps in the conversion of a mutant prion protein to a scrapie-like form in cultured cell*, J Biol. Chem. 1997, 272: 11604-11612.
- 4) Foster J., Hunter N., - *Transmissible spongiform encephalopathies: transmission, mechanism of disease, and persistence*, Current Opinion in Microbiology, 1998, 1: 442-447.
- 5) Hope J., - *Prions and neurodegenerative diseases*, Current Opinion in Genetics & Development, 2000, 10: 568-574.
- 6) Gee H., - *Molecular Evolution of Prions*, Nature, 1996.
- 7) Graham SJ., Collinge J., - *Prion disease-the propagation of infectious protein topologies*, Microbes and Infection, 2000, 2: 1445-1449.
- 8) Graham SJ, Clarke AR., - *Mammalian prion proteins*, Current Opinion in Structural Biology, 2000, 10: 69-74.
- 9) Markus G., Aguzzi A., - *Peripheral pathogenesis of prion diseases*, Microbes and Infection, 2000, 2: 613-619.
- 10) Prusiner SB., Scott MR., - *Genetics of Prions*, Annu. Rev. Genet., 1997, 31: 139-175.
- 11) Rezaie P, Lantos PL, - *Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies*, Brain Research Reviews, 2001, 35:55-72.
- 12) Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Prusiner SB, - *Evidence for the conformational of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity*, Science, 1996, 274, 2079-2082.
- 13) Wadsworth JDF, Graham SJ, Collinge J., Hill AF., - *Molecular biology of prion propagation*, Current Opinion in Genetics & Development, 1999, 9: 338-345.
- 14) Wickner RB, Edskes HK, Maddelein ML – *Prions: Portable prion domains*, Current Biology, 2000, 10: 335-337.