Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI XCI, knj. 30.

Rezaković, Džemal

2002

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/bd15ed37-b36d-4fde-9b5a-2482564851dc

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

ISSN 1512-8245



AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA XCI

Odjeljenje medicinskih nauka

Knjiga 30

Centar za medicinska istraživanja

Knjiga 1

Redakcioni odbor

Jela Grujić-Vasić, Faruk Konjhodžić, Slobodan Loga

Urednik

Džemal Rezaković
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

SARAJEVO 2002

Istraživanje humanog prion proteina (PrP) i PrP gena

Đemo Subašić[1)], Faruk Konjhodžić[2)], Džemal Rezaković [2)], Kemal Šerić [1)], Irma Salimović[1)], Rijad Konjhodžić[1)] i Faris Gavrankapetanović[1)].

Prion protein (PrP) imaju svi sisari, uključujući i čovjeka. Molekulska masa ovoga proteina je 27 - 30 kDa (kilodaltona) pa je zbog toga označen kao PrP27-30. Normalni prion proteini (PrPn) nađeni su u neuronima (ćelije mozga). Njihova funkcija ni do danas nije razjašnjena. Elektronskomikroskopskim studijama ustanovljeno je da su PrP molekule veličine 5-9 nm, što je nekoliko puta manje od najmanjih virusa. Jedna PrP molekula je izgrađena od 253 aminokiseline čiji je slijed određen sekvencom PrP gena koji se nalazi na 20 p humanom kromozomu.

PrPn molekule mogu, pod do danas nepoznatim okolnostima, promijeniti svoju trodimenzionalnu strukturu (konformaciju) te preći u tzv. maligne forme označene kao PrPm. Posljedica toga je nastanak tzv. prion bolesti kod ljudi: Kuru, nasljedna i sporadična Creutzfeldt-Jakobova bolest (fCJB i sCJB), Gerstmann-Strussler-Scheinker sindrom ili GSS, nova varijanta CJB ili nvCJB, Fatal familial insomnia ili FFI) i životinja (scrapie bolest kod ovaca i kravlje ludilo ili mad cow disease). Biokemijska karakteristika ove bolesti se ogleda u akumulaciji velikog broja PrPm molekula u centralnom nervnom sistemu oboljelog organizma, a osnovna klinička karakteristika prion bolesti je spongioformna encefalopatija. PrPm molekule su pokazale ekstremnu rezistentnost na temperaturu, formaledehid, etanol, proteaze, deoksihalat i jonizirajuće zračenje. Senzitivne su na 90% fenol, eter, aceton, ureu, 10% SDS, te autoklaviranje (Prusiner et al., 1992). Za dekontaminaciju medicinskih pomagala i instrumenata koristi se guanidin tiocianat. Visok titar PrPm molekula prije pojave neuroloških simptoma utvrđen je u mozgu, limfnim čvorovima, koštanoj srži i oku kod oboljelih organizama.

Ni do danas nije poznato kako prioni uzrokuju tako destruktivnu bolest mozga. Usprkos intenzivnim istraživanjima u posljednjih dvadeset godina,

[1)] Klinički centar Univerziteta u Sarajevu, Institut za mikrobiologiju, imunologiju i parazitologiju

[2)] Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

nije utvrđena etiologija, niti način prevencije prion bolesti. Sve poznate prion bolesti su fatalne. Maligne PrP molekule (PrPm) nemaju svojstvo samoreplikacije, ali kontaktom sa PrPn molekulama mijenjaju ih u maligne forme, na čudesan i do danas neobjašnjiv način. Najveća zagonetka je kako, na koji način i pod kojim uslovima dolazi do pojave PRVIH malignih formi PrP molekula?

Američki naučnik Prusiner je prije dvadeset godina drsko i heretički ustvrdio da je degenerativni poremećej CNS- a kod životinja uzrokovan proteinom i ničim više. Neobična svojstva malignih PrP molekula koja su bila toliko različita u odnosu na PrPn molekule, te viruse i viroide, navela su ga da 1982. godine uvede za njih sasvim nov termin PRIONI (proteinaceous infective particle). Označeni su, dakle, kao proteinski infektivni agensi koji nisu imali nukleinsku kiselinu, nasuprot svim ostalim poznatim infektivnim agensima (Prusiner et al., 1992.; Prusiner, 1991.).

Danas se ipak smatra da prion bolesti nastaju kao posljedica mutacija PrP gena i pojave PrPm molekula odgovornih za transfer bolesti. Neosporna je krucijalna uloga PrP gena kako kod nasljednih, tako i sporadičnih humanih prion bolesti. Zbog toga se danas kod svih pacijenata sa neobičnim psihijatrijskim i neurološkim poremećajima, ozbiljno uzima u razmatranje diferencijalna molekularna dijagnostika, odnosno istraživanje PrP gena (Goldfarb et al., 1991.; Goldfarb et al., 1991K; Goldfarb et al., 1991c., Mastriani et al., 1996.; La planche et al., 1994.; Kretzschmar et al., 1996.).

Prvi slučajevi tzv. nove varijante CJB (nvCJB) ustanovljeni su 1996. godine. Oboljele osobe su bile mnogo mladje u odnosu na one oboljele od fCJB ili sCJB. Također su se razlikovali klinički fenotipovi po primarnim simptomima i patološkim karakteristikama. Smatra se da se nvCJB pojavila kod ljudi koji su konzumirali bolesno govođe meso. NvCJB se prenosi transfuzijom tako da je neobično važno sprovesti kontroliranje svih suspektnih slučajeva molekularno biološkim analizama.

U Njemačkoj i Engleskoj je ustanovljen veliki broj suspektnih slučajeva nvCJB. Zbog toga se u tim zemljama čine ogromni napori za realizaciju istraživačkih projekata sa ciljem detekcije specifičnih poznatih i nepoznatih PrP gena, te kliničke klasifikacije pacijenata na osnovu toga.

Patologija i istraživanje nvCJB

Creutzfeldt i Jakob su 1920. i 1921. godine prvi put opisali slučajeve spongioformne encefalopatije kod ljudi, te je po njima ova bolest nazvana Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJB). Od pedesetih godina XX vijeka pa do danas, znanje o ovoj bolesti je znatno uznapredovalo, osobito uvođenjem u

istraživanje molekularno-bioloških metoda. Međutim, mnoge dileme su ostale nerazjašnjene.

Prion bolesti se prenose nasljedno fCJB a također i na mnoge životinje u eksperimentalnim uslovima (nvCJB). Otkriveni slučajevi nvCJB kod ljudi u Engleskoj skoro sigurno su nastali konzumiranjem mesa goveda oboljelih od spongioformne encefalopatije. Prion bolest je uspješno prenijet na miša, kada su mu injektirali infektivni ekstrakt (inokulum) ovaca i goveda. Prion bolest se može prenijeti sa oboljelih na zdrave ljude transfuzijom krvi i derivata plazme.

Uobičajna patološka osobenost kod svih vrsta CJB, uočljiva pregledom tkiva mozga oboljelih osoba (post mortem) svjetlosnim mikroskopom je vakualizacija sive mase zbog čega ona poprima spužvasti izgled. Sve ove činjenice navele su naučnike da uvedu termin za ovu bolest *prenosiva spongioformna encofalopatija* (Bruce et al., 1997.; Collinge et al., 1996.; GibbsetaL, 1968.)

Danas su istraživački napor evropskih naučnih centara orijentirani na slijedeće "kritične tačke":

- Razvoj metoda za prečišćavanje krvi u transfuziološkim ustanovama. Naime, smatra se da je "infektivnost" PrPm molekula vezana za leukocite (najvjerovatnije je da se radi o B - limfocitima) te da su limfni čvorovi i slezina krucijalni u nastanku PrPm molekula.
- Razvoj dijagnostičkih metoda za utvrđivanje nv CJB iz uzoraka krvi.
- Praćenje incidence i potencijalnih uzroka prion bolesti. Intezivno se molekularnim metodama istražuje PrP gen kod svih suspektnih slučajeva nv CJB.
- Razvoj metoda eliminacije malignih PrP molekula po osnovi njihove interakcije sa plazminogenom.
- Ispitivanje inicijacije i kliničkog toka prenosive spongioformne encefalopatije.
- Ispitivanje trodimenzionalne strukture (konformacije) PrP molekula u cilju pronalaženja medikamenata koji bi spriječili PrPn → PrPm pretvorbu.
- Gen terapija (Fisher et al., 2000.; Brown et al., 1999.; Bayer et al., 1998).

Metodologija istraživanja PrP gena i PrP proteina

Elektronsko-mikroskopska istraživanja uzoraka mozga, uzetih post mortem, amiloidnih vlakana plakova u slučajevima prion bolesti kod ljudi u cilju definisanja kriterija za detekciju i razdvajanje nv CJB od ostalih tipova humanih prion bolesti (Streichenberger et al., 2000.).

Uzimanje uzorka krvi kod svih slučajeva odnosno suspektnih CJB slučajeva sa neuobičajenim psihijatrijskim i neurološkim simptomima, korištenjem specifičnih neuropatoloških kriterija.

DNA ekstrakcija

- QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) - za uzorke krvi.
- QIAamp Tissue Kit (Qiagen) - za uzorke tkiva.

Sve ekstrakcione procedure se izvode prema uputstvu firme proizvođača.

Detekcija mutacija

- PCR amplifikacija kodirajuće oblasti PrP gena uz korištenje specifičnih detekcionih primera.
- Detekcija PCR produkata vrši se u 1% agaroznom gelu za identifikaciju insercionih i delecionih mutacija.
- SSCP - Single Strand Conformational Polymorphism.

Elucija PCR produkata iz gela QIAEX II procedurom, reamplifikacuja 4 overlapping fragmenta korištenjem slijedećih primera:

Fragment 1.

5' - CTGACATTCTCCTCTTC - 3'
5' - CGGGTTGCCTCCAGGGCT - 3'

Fragment 2.

5' - CCTGGAGGATGGAACAC - 3'
5' - GTAGCCGCCAAGGCCCC - 3'

Fragment 3.

5' - TGGCACCCACAGTCAGT - 3'
5' - TTCTCCCCCTTGGTGGT. - 3'

Fragment 4.

5' - CGTGAAAACATGCACCG - 3'
5' - CCTCAAGCTGGAAAAG - 3'

Primeri za amplifikaciju fragmenata PrP gena 1 i 2 su neradioaktivno obilježeni sa fluorescirajućim bojama IRD - 41 dok su primeri za 3 i 4 fragment obilježeni sa digoksigeninom (DIG). Detekcija fragmenata 1 i 2 se vrši digitalnim vizueliziranjem pomoću automatskog sistema za sekvenciranje tokom elektroforeze. DIG - obilježeni produkti se blotiraju nylon membrane (kontakt bloting) i vizueliziraju pomoću anti-DIG antitijela konjugiranih sa alkalnom fosfatazom i odgovarajućeg supstrata.

ANU BiH АНУ БиХ

Analize mutacija

Kada se pomoću SSCP tehnike utvrdi prisustvo mutacija onda se te mutacije i analiziraju da bi se tačno vidjelo o kakvim se promjenama radi. To se može vršiti na slijedeće načine:

1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimorfizam restrikcionih fragmenata DNA). PCR produkti se analiziraju digestijom sa restrikcionim enzimima specifičnim za pojedine kodone PrP gena (Wu et al., 1987.).

2. Direktno sekvenciranje

Kompletna PrP kodirajuća oblast se sekvencira na slijedeći način:

Purificirani PCR produkti se reamplificiraju korištenjem 895 Wta primera (5' - TGTAAAACGACGGCCAGTTCTCCTCTTCATTTTGCAGAG - 3') i 896 Wta primera (5' - CAGGAAACAGCTATGACCCTCAAGCTGGAAAAAAGATTAG - 3').

Uslovi PCR amplifikacije su jednaki kao i za genomsku PrP amplifikaciju (genomska DNA) sa 20 ciklusa.

Purifikacija reamplificiranih PCR produkata.

Sekvenciranje pomoću Thermo sequenase i 5' IRD - 41 obilježenih primera (5' - TGTAAAACGACGGCCAGT - 3') ili rev (-29) primera (5' - CAGGAAACAGCTATGACC - 3').

Sekvenciranje pomoću automatskog sekvencera ABI PRISM (Windl et al., 1999.)

PrP genotipovi i kliničko-patološki fenotipovi humanih prion bolesti

Tabela 1. *Kliničko-patološki fenotipovi humanih prion bolesti*

prion bolesti	primarne karakteristike	trajanje	dob pacijenta	patologija
KURU	Ataksija, demencija	3 mjeseca do 1 godine	40	Kuru plakovi
sCJB	Demencija, ataksija, mioklonus	više od 1 godine	60	Vakuolizacija sive moždane mase i glioza
fCJB	Demencija, ataksija, mioklonus	1-5 godina	60	Vakuolizacija sive moždane mase i glioza
GSS	Ataksija, kasna demencija	2-6 godina	60	PrP pozitivni plakovi, glioza i vakuolizacija
FI	Insomnija, ataksija, demencija	1 godina	45	Glioza i oštećenja neurona
nvCJB	Promjene u ponašanju, kasna demencija	1,5 godina	15-55	Specifični plakovi i difuzna spongioza

Istraživanja varijabilnosti nukleotidne sekvence coding regiona humanog PrP gena, kod suspektnih slučajeva prion bolesti, pokazala su najčešće slijedeće patogene mutacije, koje su, naravno, u vezi sa određenim kliničko-patološkim fenotipovima (Windl et al., 1999.).

Tabela 2.

Tip mutacije PrP gena	Kliničko-patološki fenotip
P102L (Pro → Leu)	GSS
E200K (Gly → Lys)	CJB
D178N (Asp → Asn)*	CJB ili FFI
T183A (Thr → Ala)	CJB
V210I (Val → Ile)	CJB

* Kliničko-patološki fenotip je određen i mutacijom na 129 kodonu PrP gena

Atipične prion bolesti kod ljudi uzrokovane su mutacijama u PrP genu a mnoge od njih detektirane su genetičkim screeningom kliničkih slučajeva označenih kao "not CJD".

Nove missense mutacije i polimorfizmi mogu definisati nove subtipove prion bolesti odnosno veze PrP genotipova i njihovih kliničko-patoloških fenotipova.

Od izuzetnog značaja je izvršiti tipizaciju PrP gena na 129 kodonu jer promjena na njemu određuje čak šest varijanti sCJB ili pak ukazuje na FI (Parchi et al., 1998.).

Dijagnosticiranje nvCJB fenotipova, podrazumijeva analizu PrP gena u cilju isključivanja patogenih mutacija koje mogu lažno ukazivati na nvCJB. Neophodna je i detekcija polimorfizma na kodonu 129 (Will et al., 1996.).

Analiza PrP gena omogućava diferencijaciju humanih prion bolesti od ostalih nasljednih bolesti sa demencijom kao što je npr. Alzheimerova bolest.

Zbog velikog broja suspektnih slučajeva nvCJB kod ljudi a za koje se s pravom smatra da su uzrokovani konzumiranjem mesa goveda oboljelih od tzv. "kravljeg ludila" (mad cow disease), u Njemačkoj i Engleskoj su ustanovljeni istraživački programi čiji je cilj, između ostalog, istraživanje PrP gena, odnosno PrP genotipizacija i određivanje kliničko-patoloških fenotipova humanih prion bolesti za svaki pojedinačni slučaj.

Projekat Centra za medicinska istraživanja Odjeljenja medicinskih nauka ANUBiH pod naslovom "Istraživanje humanog Prion proteina (PrP) i PrP gena" realizirat će se u Odjelu za molekularna istraživanja i elektronsku mikroskopiju Instituta za mikrobiologiju, imunologiju i parazitologiju Kliničkog centra Univerziteta u Sarajevu. Trajanje projekta je tri godine ali

je on zbog svega navedenog svakako dugoročnog karaktera. Realizirat će se vrlo složena molekularno-biološka istraživanja PrP gena kod svih suspektnih slučajeva, kao i elektronsko-mikroskopska istraživanja uzoraka tkiva mozga uzetih post mortem. Svakako da će dobijeni rezultati kombinirani sa ostalim kliničko-patološkim nalazima dati prvu jasnu sliku o tome da li u BiH postoje slučajevi nvCJB, koje su od tipova humanih prion bolesti zastupljeni. Rezultati prvih molekularnih analiza PrP gena svakako će uključiti BiH u savremena svjetska istraživanja u ovoj izuzetno značajnoj oblasti.

LITERATURA

1. **Bayer Advisory Council on Bioethics (1998):** *Creutzfeldt Jakob disease, blood and blood products: A bioethics framework.* Bayer advisory Council on Bioethics, Ottawa 1998. Canada.
2. **Brown, P., Cervenfikov, L., McShane, I. M., Barber, P., Rubenstein, R., Drohan, W. N., (1999):** *Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongioform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit CJD in humans.* Transfusion 39, 1169-1178.
3. **Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, L, Drummond, D., Suttie, A., McCardie, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., Bostock, C. J., (1997):** *Transmissions to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent.* Nature 398: 489-501.
4. **Collinge, J., Sidle, K. C. L., Meads, J., Ironside, J., Hill, A. F., (1996):** *Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of"new variant" CJD.* Nature 383: 685-690.
5. **Fisher, M. B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H. P. and Aguzzi, A., (2000):** *Binding of disease-associated prion protein to plasminogen.* Nature 23, p4 79-483.
6. **Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., Asher, DM, Alpers, M. P., Beck, K, Daniel, P. M., Matthews, W. P., (1968):** *Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee.* Sciance 161. 388-389.
7. **Godlfarb, L. G., Brown, P., McCombie, W. R., Goldgaber, D., Swergold, G. D., Wills, P. R., Cervenakola, L., Baron, H., Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., (1991):** *Transimissible famililal Creutzfeldt - Jakob disease associated with Jive, seven, and eight extra octapeptide coding repeates in the PRNP gene.* Proc Natl Acad Sci USA 88: 10926 - 10930.
8. **Goldfarb, L. G., Haltia, M, Brown, P., Nieto, A., Kovanen, J., McCombie, W. R., Trapp, S., Gajdusek, D. C., (199 Ic):** *New mutation in crapie amyloid precursor gene (at codon 178) in Finnish Creutzfeldt - Jakob kindret.* Lancet 337: 425 - 425.

9. **Goldfarb, L. G., Brown, P., Mitrowa, E., Cervenakova, L., Goldin, L, Korczyn, A. D., Chapman, J., Galvez, S., Cartier, L, Ruberstein, R., et aL, (1991b):** *Creutzfeldt - Jakob disease asociated with the PRNP codon 200 Lysmutation. An analysis of 45 families.* Eur J Epidemiol 7: 477-486.
10. **Kretzschmar, H. A., Ironside, J. W., DeArmond, S. J., Tateishi, J., (1996):** *Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt - Jakob disease.* Arc Neurol 53: 913 - 920.
11. **Laplanche, J. L., Delasnerie-laupretre, N., Brandel, J. P., Chatelain, J., Beaudry, P., Alperovitch, A., Launay, J - M. (1994):** *Molecular genetics ofprion diseases in France.* Neurology 44: 2347 - 2351.
12. **Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr, Bernoulli C, Asher DM, (1979):** *Creutzfeldt - Jakob disease: Patterns of world wide occurence and the significance of familijal and sporadic clustering.* Ann Neurol 5: 177- 188.
13. **Mastrianni, J. A., lannicola, C, Myers, R. M., DeArmond, S., Prusiner, S. B., (1996):** *Mutation of the prion protein gene at codon 208 in familial Creutzfeldt - Jakob disease.* Neurology 47: 1305 -1312.
14. **Medori, R., Tritschler, H-J., LeBlanc, A., Villare, F., Manetto, V., Chen, H. Y., Xue, R., Leal, S., Montagna, P., Cortelli, B., Tinuper, P., Avonim, P., Moghi, M, Baruzzi, A., Hauw, J. J., Ott, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., (1992):** *Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene.* N Engl J Med 326: 444 - 449.
15. **Pocchiari, M, Salvatore, M., Cutruzzola, F., Genuardi, M., Allocatelli, C. T., Masullo, C., Maćehi, G., Alema G, Galgani S, Xi Yg, Petraroli R, Silvestrini MC, Brunori M (1993):** *A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt - Jakob disease.* Ann Neurol 34: 802-807.
16. **Prusiner, S. B., Collinge, J., Powel, J. and Anderton, B., (1992):** *Prion diseases of Humans end animals.* Ellis Harwood, 1992.
17. **Prusiner, S. B., (1991):** *Molecular biology of prion diseases.* Science, vol. 252, 1515-1522.
18. **Sutherland, K., Barrie, C. and Ironside, J. W., (1994):** *Automatic quantification of amyloid plaque formation in human spongioform encephalopathy.* Neurodegeneration 3, 293-300.
19. **Sutherland, K., Goodbrand, LA., Bell, J. E., Ironside, J. W., (1996):** *Objective quantification of prion protein of spinal cards of cases of CJD.* Analytical celular pathology, 10, 25-35.
20. **Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovich A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG, (1996):** *A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK Lancet.* 347: 921 - 925.
21. **Windl, O., Giese, A., Schub-Schaejfer, W., Zerr, I., Skworc, K., Aremdt, S., Oberdieck, C., Bodemer, M., Poser, S. and Kretzschmar, H. A. (1999):** *Molecular genetics of human prion diseases in Germany.* Human genetics 105: 244-252.