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 humanih prion bolesti i mogućnosti rane dijagnostike nove varijante Creutzfeldt-Jakobove bolesti (nv CJB)

Đemo Subašić[1)]

Uvod

Creutzfeldt i Jakob su 1920. odnosno 1921., prvi put opisali slučajeve spongioformne encefalopatije kod ljudi. Kasnije je ova pojava nazvana Creutzfeldt-Jakobova bolest (CJB). Uobičajena patološka osobenost kod CJB a i drugih sličnih oboljenja (Kuru, Gerstmann-Strassler-Scheinker sindrom ili GSS, Fatal familial insomnia ili FFI) uočena prilikom pregleda tkiva mozga svjetlosnim mikroskopom je vakuolizacija sive moždane mase (spužvasti izgled).

Davne 1954. godine Sigurdson i suradnici ova oboljenja nazvali spore virusne infekcije (slow virus infections). Već 1966. Alper je pretpostavio da bi kritična komponenta najvećeg infektivnog agensa, uzročnika spongioformne encefalopatije mogao biti protein. Prusiner je 1982. godine heretički postavio PRION teoriju, odnosno, da se radi o proteinskim infektivnim partikulama (bez prisustva nukleinske kiseline), rezistentnim na uobičajene procedure inaktivacije, različitim od svih do tada poznatih patogena. Prion protein (PrP) prisutan je naime, kod svih sisara. Kod čovjeka PrP gen, koji kodira prion protein nalazi se na 20-tom hromosomu. PrP ima 253 amino kiseline, a ekspresija PrP gena ustanovljena je u neuronima, plućima, srcu, bubrezima, pankreasu, testisima, tonzilama, leukocitima. Kako uopće dolazi do spongioformne encefalopatije? Pod do sada ne razriješenim okolnostima dolazi do stvaranja malignih PrP molekula (PrPm) koje se razlikuju od normalnih PrP molekula (PrPn) po trodimenzionalnoj strukturi (konformaciji) te ekstremnoj rezistentnosti na proteaze.

Usprkos intenzivnim istraživanjima ni do danas nije utvrđena etiologija spongioformne encefalopatije ili prion bolesti kod ljudi i životinja, niti način

[1)] Institut za mikrobiologiju, imunologiju i parazitologiju Kliničkog centra Univerziteta u Sarajevu

prevencije. Sve prion bolesti su fatalne, a glavna karakteristika je akumulacija enormnog broja PrP molekula u centralnom nervnom sistemu. PrPm molekule nastaju od PrPn molekula na za sada nepoznat način i to njihovom čudesnom interakcijom (PrPm $\longleftrightarrow$ PrPn $\longrightarrow$ PrPm). Ostala je zagonetka kako, na koji način i pod kakvim okolnostima dolazi do pojave prvih malignih PrP molekula? Neki smatraju da je to uzrokovano specifičnim mutacijama PrP gena. Međutim nije dokazana niti virusna , niti virino niti prion teorija o nastanku spongioformne encefalopatije. Danas se također pouzdano zna da prve PrPm molekule nastaju u limfnim čvorovima (tonzilama npr.) i slezeni te da se prenose na ostale dijelove organizma putem krvi i to njihovim specifičnim vezivanjem za krvni protein plazminogen. Zašto to svojstvo vezivanja nemaju PrPn molekule nije do sada razjašnjeno. Plazminogen je prekursor plazmin enzima, sintetiše se u jetri i leukocitima. Mehanizam prenošenja PrPm molekula pomoću plazminogena, sigurno je jedan od ključnih momenata bitnih za razumjevanje inicijacije i kliničkog toka spongioformne encefalopatije, jednake kao što je to i konverzija PrPn molekula u maligne isoforme otporne na proteaze (Prusiner et al., 1992.; Prusiner, 1991. Fisher et al., 2000.).

Nova varijanta CJB (nvCJB)

Klasične forme CJB (sporadična, nasljedna i patogena) su rijetke fatalne neurodegenerativne bolesti prisutne svugdje u svijetu. 1996. godine u Engleskoj je identificirana tzv. nova varijanta CJB(nvCJB) koja je za razliku od klasičnih oblika CJB karakteristična za mlađe ljude, čak i tinejdžere (od 15 do55 godina). Simptomi nvCJB su sasvim specifični a smatra se da je nastala konzumiranjem inficiranog goveđeg mesa. Dakle nvCJB i CJB spadaju u tzv.prenosive spongioformne encefalopatije.

Možda prije samo godinu dana analiza tkiva mozga (autopsija) uzetog dakle post mortem bila je jedini način da se uspostavi definitivna dijagnoza nvCJB. Međutim, danas se raspolaže sa testovima za rano otkrivanje PrPm molekula i to prije pojave bilo kakvih simptoma kod čovjeka.

Naime, otkriveno je da se prve PrPm molekule počinju nakupljati u tonzilama i to samo u slučaju nvCJB ali ne i kod klasičnih oblika. Također je i u uzorcima urina moguće utvrditi PrPm molekule pomoću odgovarajućih imunoloških testova. Sve to je omogućilo ranu dijagnostiku nvCJB što predstavlja fantastičan napredak. Naravno to podrazumjeva i analizu PrP gena i utvrđivanje specifičnih patoloških mutacija osobito kada je riječ o 129 kodonu. Razvojem metoda prečišćavanja krvi u cilju eliminacije PrPm molekula (prion bolesti se prenose transfuzijom, hirurškim zahvatima), sterilizaciji medicinskih instrumenata, pronalaženjem medikamenata koji spriječavaju PrPn $\longrightarrow$ PrPm pretvorbu stvorili bi se uslovi za kontrolu i preventivnu terapiju u

slučajevima nvCJB. Zbog velikog broja suspektnih slučajeva nvCJB u Engleskoj, Njemačkoj i Francuskoj sve ove navedene mogućnosti su u fazi istraživanja u okviru odgovarajućih istraživačkih projekata.(Kretzschmar et al., 1996. Collings et al.,1996.)

Tabela 1. *Dijagnoza nvCJB u različitim kliničkim fazama podrazumjeva interdisciplinaran pristup.*

	nvCJB	Dijagnostički kriteriji	Profil stručnjaka neophodan za konačnu dijagnozu
A	Nisu uočljivi bilo kakvi klinički simptomi	- Detekcija PrPm molekula - Mutacije PrP gena	Patolozi, imunolozi, molekularni biolozi...
B	Istražena simptomatologija	- Psihijatrijski kriteriji - Neurološki kriteriji + A	Psihijatri, neurolozi, patolozi,imunolozi, molekularni biolozi...
C	Post mortem dijagnoza	Elektronsko-mikroskopski kriterij za nvCJB +A +B	Psihijatri, neurolozi, patolozi, elektronski mikroskop, imunolozi, molekularni biolozi...

Metodologija istraživanja humanog prion proteina (PrP) i PrP gena

Analizom tkiva mozga uzetog (post mortem) biopsijom od pacijenata koji su bili oboljeli od nvCJB, pomoću elektronskog mikroskopa moguće je utvrditi specifične patološke spongioformne promjene. Međutim, pomoću imunoelektronske mikroskopije moguće je ustanoviti reakciju fibrila i membranskih struktura (plazma i vezikularne membrane) sa anti- prion protein (PrP) antitijelima.

Amiloidni fibrili su neobično usko vezani za abnormalne membrane što ukazuje na izvjestan odnos između PrP fibrilogeneze i promjena membrana. Ovi ultrastrukturalni nalazi omogućili su da se dođe do odgovarajućih kriterija za razlikovanje nvCJB od klasičnih CJB-tip specifičnih plakova. Ovi nalazi u izvjesnom smislu idu u prilog hipotezi o različitim "prion sojevima". (Fournier et al., 2000.).

Otkriće mutacija u kodirajućem regionu PrP gena navelo je naučnike na drugačiji način razmišljanja jer je ustanovljena njihova čvrsta veza sa pojavom PrPm molekula. Dakle prion bolesti nastaju kao posljedica poremećaja PrP gena iz nepoznatih razloga. Prion protein kodiran od takvog gena odgovoran je za transfer bolesti. Danas se kod svih pacijenata psihijatrijskim i neurološkim poremećajima ozbiljno uzima u razmatranje diferencijalna molekularna dijagnostika odnosno istraživanjem PrP gena.

DNA ekstrakcija

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

Sve ekstrakcione procedure se izvode prema upustvu 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'

ANU BiH АНУ БиХ

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 antitjela konjugiranih sa alkalnom fosfatazom i odgovarajućeg supstrata.

Analize mutacija

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

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.).

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'- CAGGAAACAGCTATGACCCTCAAGCTGGAAAA-AAGATTAG - 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'- CAGGAAACAGCTA TGACC - 3').

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

Institut za mikrobiologiju, imunologiju i parazitologiju -KCU Sarajevo je nosilac projekta ANUBiH pod naslovom Istraživanje humanog prion proteina (PrP) i PrP gena u okviru kojeg su planirana elektronsko-mikroskopska , imunološka i molekularno-biološka istraživanja. Realizacijom ovog projekta BiH bi zasigurno ušla u svjetske tokove iz istraživanja u oblasti priona, a također bi bila realno moguća rana dijagnostika nvCJB.

Literatura

1. **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.
2. **Fisher, M.B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H.P. and Aguzzi, A., (2000):** *Binding of disease-associated prion protein to plasminogen,* Nature 23, p479-483.
3. **Fournier, J.G., Kopp,N.,Streichenberger, N., Escaig-Haye, F., Langeveld, J. and Brown, P., 2000.:** *Elecron microscopy of brain amyloid plaques from a patient with nvCJD,* Acta Neuropathologica 99, 637-642.
4. **Kretzschmar, H.A., Ironside, J.W., DeArmond, S.J., Tateishi, J., (1996):** *Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt - Jakob disease,* Arc Neurol 53:913 - 920.
5. **Prusiner, S.B. , Collinge, J., Powel, J. and Anderton, B., (1992):** *Prion diseases of Humans end animals,* Ellis Harwood, 1992.
6. **Prusiner, S.B., (1991):** *Molecular biology of prion diseases,* Science, vol. 252, 1515-1522.

7. **Sutherland, K., Barrie, C. and Ironside, J.W., (1994):** *Automatic quantification of amyloid plaque formation in human spongioform encephalopathy,* Neurodegeneration 3, 293-300.
8. **Windl,O., Giese,A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Skworc, K., Aremdt, S., Oberdieck, C., Bodemer, M., Poser, S. and Kretzschmar, H.A. (1999):** *Molecular genetics of human prion diseases inGermany,* Human genetics 105:244-252.

ANU
ВіН
АНУ
БиХ