

Wykrywanie białka prionu w płynach ustrojowych – nowe perspektywy w diagnostyce choroby Creutzfeldta-Jakoba

Detection of prion protein in body fluids: new perspectives in Creutzfeldt-Jakob disease diagnostics

¹ Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

² Instytut Nauk o Zdrowiu, Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Płocku

Adres do korespondencji: Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, tel.: 42 675 76 29, 42 675 76 15, e-mail: ewa.golanska@umed.lodz.pl

Praca finansowana w ramach projektu Demtest/JPND/2012 „Diagnoza szybko postępujących otępień na podstawie biomarkerów – optymalizacja protokołów diagnostycznych”

Streszczenie

Choroba Creutzfeldta-Jakoba (*Creutzfeldt-Jakob disease*, CJD) należy do grupy chorób wywołanych przez priony, których diagnostyka nastęca trudności ze względu na brak nieinwazyjnych metod umożliwiających przyżyciowe definitywne rozpoznanie. Rutynowe badania laboratoryjne wspomagające diagnostykę polegają na oznaczaniu obecności białka 14-3-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym. Białko to jest jednak jedynie nieswoistym markerem rozpadu neuronów. Również badania obrazowe oraz EEG są niewystarczające do pewnego potwierdzenia rozpoznania. Obecnie duże nadzieje wiąże się z rozwojem czułych i swoistych metod wykrywania śladowych ilości nieprawidłowych konformerów białka PrP^{Sc} – markera jednoznacznie związanego z chorobami wywołanymi przez priony – znajdujących się w płynie mózgowo-rdzeniowym lub krwi chorych z CJD. W artykule omówiono opracowane w ostatnich latach metody, w których wykorzystuje się zdolność białka prionu do indukowania przekształcenia struktury przestrzennej cząsteczek PrP^c w patologiczną izoformę PrP^{Sc}. Największe nadzieje na praktyczne zastosowanie budzi obecnie metoda konwersji indukowanej przez wytrząsanie (*quaking-induced conversion*, QuIC), oparta na amplifikacji nieprawidłowych konformerów białka prionu w warunkach *in vitro* z zastosowaniem oczyszczonego zrekombinowanego białka PrP^c jako substratu. Omówiono zasadę metody, wyniki najnowszych badań nad jej optymalizacją oraz perspektywy wykorzystania w celach diagnostycznych i naukowych.

Słowa kluczowe: choroba Creutzfeldta-Jakoba, markery diagnostyczne, amplifikacja białka prionu, cykliczna amplifikacja nieprawidłowej struktury białka (PMCA), konwersja indukowana przez wytrząsanie (QuIC)

Summary

The diagnostics of prion diseases, including Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), is still challenging as none of currently available tests, including magnetic resonance imaging, electroencephalogram and detection of 14-3-3 protein in cerebrospinal fluid, are sufficient for definite *premortem* diagnosis. This paper presents sensitive methods based on the ability of PrP^c protein to induce the PrP^c to PrP^{Sc} conversion *in vitro* which have been developed within the last few years in order to detect trace amounts of the abnormal prion protein in cerebrospinal fluid or blood. Among those methods, the quaking-induced conversion (QuIC) with the use of purified recombinated PrP^c protein as a substrate seems to be the most promising. We discuss the current research in optimization of the method as well as the perspectives of its possible applications in diagnostics and scientific investigations.

Key words: Creutzfeldt-Jakob disease, diagnostic markers, prion protein amplification, protein misfolding cyclic amplification (PMCA), quaking-induced conversion (QuIC)

Choroba Creutzfeldta-Jakoba (*Creutzfeldt-Jakob disease, CJD*) należy do grupy pasażowalnych encefalopatii gąbczastych – śmiertelnych chorób neurodegeneracyjnych, u podłoża których leży przekształcenie komórkowego białka prionu PrP^c, kodowanego przez gen *PRNP*, w patologiczną izoformę PrP^{Sc}, która różni się od prawidłowego białka jedynie konformacją przestrzenną. Charakterystyczna dla izoformy PrP^{Sc} przewaga struktury β-fałdowej powoduje, że białko to staje się nierozpuszczalne i niewrażliwe na trawienie proteazami, a jego złogi gromadzą się w ośrodkowym układzie nerwowym. Wielu badaczy sądzi, że białko PrP^{Sc} jest ponadto czynnikiem zakaźnym – posiada zdolność indukowania przekształcenia struktury przestrzennej cząsteczek PrP^c w patologiczną izoformę PrP^{Sc}(1).

CJD może występować w postaci sporadycznej (sCJD), która uważana jest za samoistną, oraz rodzinnej (fCJD), uwarunkowanej obecnością mutacji w genie *PRNP*. Postać jatrogena (iCJD) jest z kolei wynikiem przeniesienia choroby z pacjentów z sCJD przez stosowanie hormonu wzrostu otrzymywanego z przysadek ze zwłok oraz przeszczepy opony twardej i rogówki, natomiast wariant CJD (vCJD) spowodowany jest spożyciem mięsa krów zarażonych encefalopatią gąbczastą bydła (BSE)(2-4).

Najczęstszą spośród chorób wywołanych przez priony jest sporadyczna CJD – zwykle notuje się rocznie 1–2 przypadki zachorowań na milion osób(5). W Polsce częstość występowania sCJD jest nieco niższa od średnich wartości obserwowanych w innych krajach i rocznie wynosi 0,3–0,9 zachorowania na milion osób, co może sugerować, że część przypadków pozostaje nierozpoznana.

Sporadyczna CJD charakteryzuje się szybko postępującym otępieniem oraz obecnością mioklonii, objawów mózdkowych, objawów piramidowych lub pozapiramidowych, a także mutyzmu akinetycznego. Z reguły zgon następuje w czasie krótszym niż dwa lata, często w ciągu kilku miesięcy od wystąpienia pierwszych objawów. Na podstawie klinicznego przebiegu chorobę można zaklasyfikować jako możliwą, zgodnie z kryteriami diagnostycznymi zalecanymi przez Światową Organizację Zdrowia (tabela 1). Na rozpoznanie prawdopodobnej sCJD, oprócz objawów klinicznych, pozwala zapis EEG z okresowo występującymi zespołami fali wolnej z ostrą (*periodic sharp wave complexes, PSWC*) i/lub obecność białka 14-3-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym. Od 2010 roku do kryteriów diagnostycznych prawdopodobnej sCJD zalicza się również badanie mózgu za pomocą rezonansu magnetycznego metodą obrazowania zależnego od dyfuzji (*diffusion-weighted, DWI*) lub tłumienia sygnału wolnego płynu (*fluid attenuated inversion recovery, FLAIR*). Hiperintensywny sygnał w jądrach kresomózgowia (w jądrze ogoniastym i w skorupie) lub przynajmniej w dwóch regionach kory (skroniowym, ciemieniowym, potylicznym) – podobnie jak charakterystyczny zapis EEG oraz dodatni wynik testu na obecność białka 14-3-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym – pozwala

na zmianę rozpoznania z możliwego na prawdopodobne(6,7). Aby definitywnie potwierdzić rozpoznanie CJD, konieczne jest jednak badanie neuropatologiczne mózgu, w celu potwierdzenia charakterystycznych zmian gąbczastych oraz obecności złogów białka PrP^{Sc}. Badania takie możliwe są dopiero po wykonaniu autopsji. Alternatywą może być ewentualnie biopsja mózgu, którą jednak rzadko się wykonuje, ponieważ obarczona jest dużym ryzykiem.

Należy zaznaczyć, że wymienione dostępne obecnie rutynowe badania wspomagające przyżyciową diagnostykę CJD nie dają wyników charakterystycznych wyłącznie dla tej choroby. Białko 14-3-3 jest nieswoistym markerem rozpadu neuronów – jego pojawienie się w płynie mózgowo-rdzeniowym świadczy o postępującym procesie obumierania komórek w ośrodkowym układzie nerwowym, nie dostarcza jednak informacji na temat przyczyn tego procesu. Poza chorobami wywołanymi przez priony dodatnie wyniki tego testu stwierdzano w wielu różnych chorobach, takich jak bakteryjne lub wirusowe stany zapalne w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, udar niedokrwienne, krwotoki domózgowe czy – rzadziej – choroby neurodegeneracyjne niezwiązane z prionami(8-11). Z kolei u około 10% potwierdzonych neuropatologicznie przypadków sCJD nie wykrywa się białka 14-3-3(12), a zatem wynik dodatni testu nie pozwala na ostateczne potwierdzenie CJD, podobnie jak wynik ujemny nie wyklucza takiego rozpoznania. Ogółem test na obecność białka 14-3-3 uważany jest za przydatny w diagnostyce, o ile podejrzenie sCJD jest rzeczywiście uzasadnione. Badanie to nie jest jednak zalecane jako przesiewowe w przypadkach niespełniających pozostałych kryteriów diagnostycznych lub przy braku wystarczających danych na temat historii choroby lub wyników innych badań(13,14). Co istotne, dodatni wynik w takich przypadkach nie powinien prowadzić do zaniechania poszukiwań alternatywnej diagnozy ani wykluczać rozpoznania innych, odwracalnych przyczyn otępienia(15). Dodatkowo sCJD jest chorobą heterogenną klinicznie. Niekiedy może przebiegać z nietypowymi objawami, a jej czas trwania może być wydłużony. W nietypowych przypadkach istnieje większe prawdopodobieństwo uzyskania wyniku fałszywie ujemnego(16,17). Na stężenie białka 14-3-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) (i zarazem możliwość jego wykrycia za pomocą metody *western blotting*) może mieć wpływ także faza choroby, w której wykonano nakłucie lędźwiowe(18), przy czym w literaturze opisywano zarówno wzrost, jak i spadek wykrywalności tego białka w trakcie przebiegu choroby(8,19,20). Z kolei w wariantach CJD białko 14-3-3 jest znacznie mniej użytecznym markerem diagnostycznym niż w sCJD – wyniki dodatnie otrzymuje się tylko u około 50% chorych(21).

Podobnie jak w przypadku badań białka 14-3-3, wynik EEG charakterystyczny dla sporadycznej postaci CJD może być uzależniony od wieku chorego i/lub długości trwania choroby. Stwierdzono, że typowe zmiany w EEG,

I. Szybko postępujące otępienie
II. Inne objawy kliniczne: a. mioklonie b. zaburzenia widzenia lub mózdkowe c. objawy piramidowe lub pozapiramidowe d. mutyzm akinezyzny
III. Wyniki badań: a. EEG z okresowymi występującymi falami wolnymi i ostrymi (niezależnie od czasu trwania choroby) b. dodatni wynik badania białka 14-3-3 w płynie mózgowo-rdzeniowym (przy chorobie trwającej poniżej 2 lat) c. wzmocniony sygnał w jądrze ogoniastym i skorupie lub przynajmniej w dwóch regionach korowych (skroniowy – ciemieniowy – potyliczny) w rezonansie magnetycznym w sekwencji FLAIR lub DWI
Rozpoznanie definitywne: Typowy obraz neuropatologiczny <i>i/lub</i> stwierdzenie złożeń PrP (immunohistochemicznie), <i>i/lub</i> PrP opornego na proteinazę K (<i>western blotting</i>), <i>i/lub</i> włókienek związanych ze <i>scrapie</i>
Rozpoznanie prawdopodobne: I. <i>i</i> przynajmniej 2 objawy z punktu II, <i>i</i> przynajmniej 1 wynik dodatni z punktu III, <i>i</i> rutynowe badania nie wskazują na inne rozpoznanie
Rozpoznanie możliwe: I. <i>i</i> przynajmniej 2 objawy z punktu II, <i>i</i> czas trwania choroby poniżej 2 lat, <i>i</i> rutynowe badania nie wskazują na inne rozpoznanie

Tabela 1. Kryteria diagnostyczne w sporadycznej chorobie Creutzfeldta-Jakoba, zalecane przez Światową Organizację Zdrowia^(6,7)

zwykle obserwowane u około 2/3 chorych z sCJD⁽²²⁾, widoczne są rzadziej, jeśli choroba trwa dłużej niż 6 miesięcy (w takich przypadkach prawdopodobieństwo wystąpienia PSWC spada poniżej 50%), a także u chorych przed 50. rokiem życia⁽²³⁾. Z drugiej strony zmiany typu PSWC w EEG opisywano także w 5–7% przypadków szybko postępującego otępienia o etiologii niezwiązanej z prionami, na przykład w chorobie Alzheimera, otępieniu naczyniopochodnym czy otępieniu z ciałami Lewy'ego^(22,24).

Badania obrazowe za pomocą rezonansu magnetycznego (FLAIR i DWI), jako element składowy kryteriów diagnostycznych sCJD, charakteryzują się wysoką (sięgającą ponad 90%) czułością i swoistością i stanowią użyteczne narzędzie w różnicowaniu sCJD z innymi szybko postępującymi otępieniami, szczególnie we wczesnych stadiach choroby^(25,26). Nadal jednak nie ma nieinwazyjnych metod pozwalających na przyżyciowe ustalenie definitywnego rozpoznania.

Najlepszym markerem pozwalającym na jednoznaczne potwierdzenie CJD jest niewątpliwie białko PrP^{Sc}, którego obecność w organizmie wiąże się wyłącznie z chorobami wywołanymi przez priony. Białko to występuje w dużych ilościach w tkankach mózgu, w których może być identyfikowane na przykład za pomocą immunohistochemii. Aby jednak możliwe było wykonanie badania przyżyciowego, analizom należałoby poddawać materiał łatwy do pobrania, na przykład PMR lub krew. Udowodniono eksperymentalnie, że *czynnik zakaźny scrapie jest obecny we krwi – możliwe jest przeniesienie scrapie z chorych owiec na zdrowe zwierzęta przez podanie leukocytów oraz osocza*⁽²⁷⁾. W sporadycznej postaci CJD

białko PrP^{Sc} gromadzi się głównie w tkankach ośrodkowego układu nerwowego i gałki ocznej, zakaźny jest również PMR⁽²⁸⁾. W wariantcie CJD z kolei właściwości zakaźne posiadają również inne tkanki, w tym limfatyczne. W Wielkiej Brytanii zanotowano przypadki jatrogenne przeniesienia vCJD w wyniku transfuzji krwi⁽²⁹⁾, przy czym zakażenia były skutkiem podania preparatów krwiopochodnych pochodzących od dawców, u których objawy vCJD rozwinęły się dopiero kilka lat później. Czynniki zakaźny musiał się zatem znajdować we krwi w okresie przedklinicznym. Przyżyciowe, możliwe wczesne wykrywanie chorób wywołanych przez priony pozwoliłoby zapobiegać ich jatrogennemu przeniesieniu. Niestety, niskie stężenie białka PrP^{Sc} w płynie mózgowo-rdzeniowym czy krwi uniemożliwia jego wykrywanie za pomocą metod identyfikacji białek opartych na immunodetekcji. Stwierdzenie obecności czynnika zakaźnego w płynach ustrojowych do niedawna wymagało wykonywania czasochłonnych i kosztownych testów na zwierzętach laboratoryjnych⁽³⁰⁾. Krew i PMR mogłyby być dobrym materiałem do celów diagnostycznych, jednak pod warunkiem opracowania odpowiednio czułych metod detekcji białka PrP^{Sc}.

Aby wyeliminować problem dotyczący progu wykrywalności, w różnych ośrodkach naukowych prowadzone są intensywne prace nad możliwością praktycznego wykorzystania zdolności białka PrP^{Sc} do indukowania konwersji prawidłowej izoformy PrP^C w PrP^{Sc}. Dzięki tej właściwości niewielkie ilości białka PrP^{Sc} obecne w materiale pobranym od chorych mogą odgrywać rolę matrycy zapoczątkowującej zmianę struktury cząsteczek PrP^C – w efekcie konformery PrP^{Sc} mogą zostać „namnożone”

w warunkach laboratoryjnych do uzyskania stężenia wykrywalnego dostępnymi metodami analitycznymi.

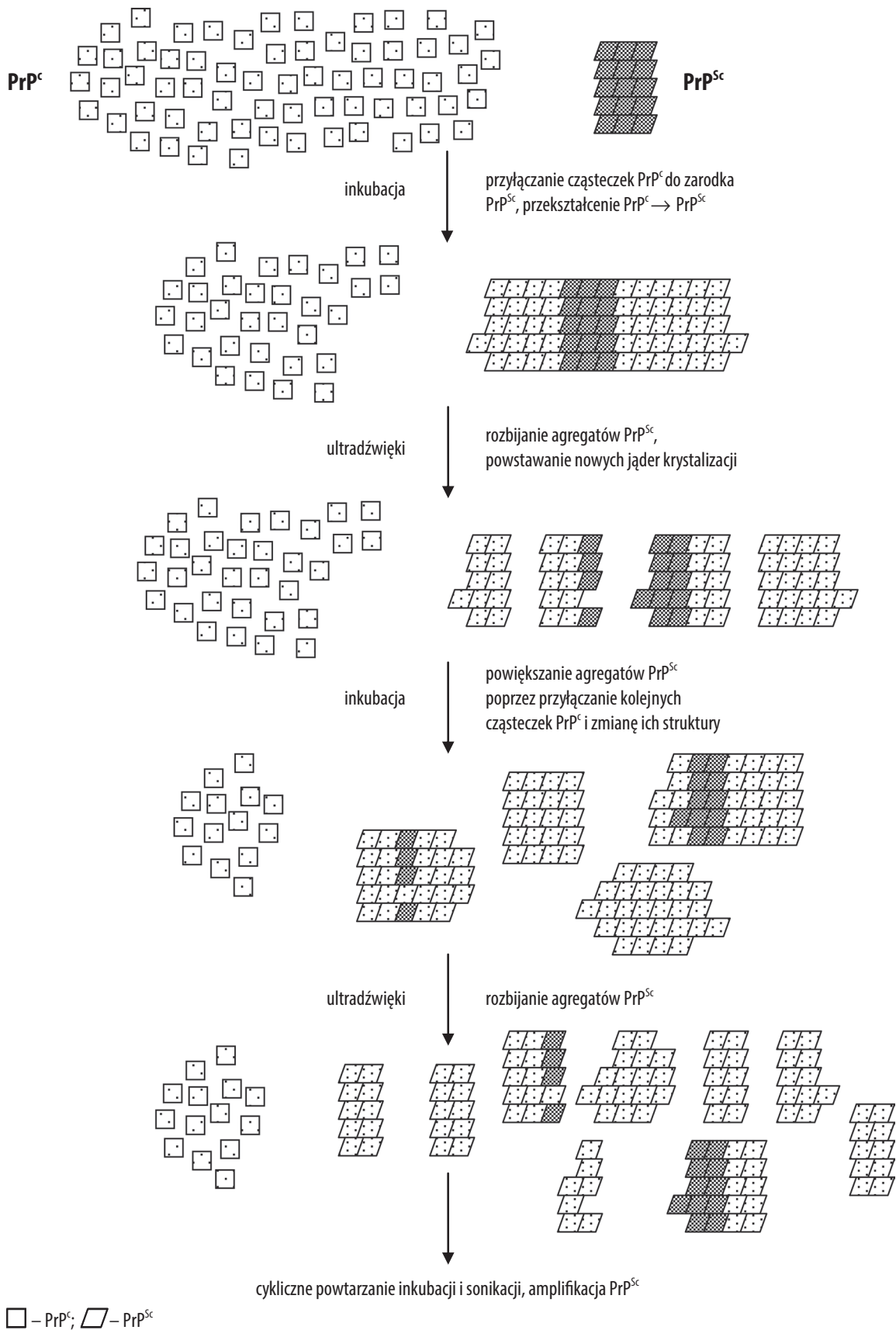
Pierwsze doniesienia dotyczące możliwości przekształcenia PrP^c w PrP^{Sc} w warunkach *in vitro* pochodziły z lat 90.^(31,32), jednak początkowe eksperymenty były mało wydajne – przy dużym nadmiarze cząsteczek PrP^{Sc} uzyskano konwersję niewielkiej ilości PrP^c w PrP^{Sc}.

W tworzeniu *in vitro* włókien amyloidowych zbudowanych z białka PrP^{Sc} można wyodrębnić dwie fazy: najpierw zachodzi proces nukleacji (nazywany także zarodkowaniem, *seeding*), w którym cząsteczki białka prionu łączą się w oligomery i równocześnie uzyskują nieprawidłową konformację. Proces ten przebiega stosunkowo powoli i ogranicza ogólną prędkość powstawania agregatów białka PrP^{Sc}. W drugiej fazie oligomery PrP^{Sc} odgrywają rolę jąder krystalizacji, „zarodków” (*seeds*), do których przyłączają się kolejne cząsteczki, a rosnące agregaty PrP^{Sc} uzyskują formę włókien amyloidowych. W końcu proces wydłużania włókien osiąga fazę *plateau*⁽³³⁾. Znaczne przyspieszenie i zwiększenie wydajności procesu tworzenia agregatów PrP^{Sc} uzyskano dzięki zastosowaniu metody zwanej **cykliczną amplifikacją nieprawidłowej struktury białka** (*protein misfolding cyclic amplification*, PMCA). Metoda polega na powielaniu konformerów PrP^{Sc}, powstających z dodanych do mieszaniny reakcyjnej prawidłowych cząsteczek PrP^c, dzięki cyklicznemu powtarzaniu dwóch etapów: inkubacji i sonikacji mieszaniny białkowej. W pierwszym etapie badana próbka zawierająca niewielkie ilości PrP^{Sc} (określane także jako PrP-res – niewrażliwe na trawienie proteazami) inkubowana jest w obecności nadmiaru cząsteczek PrP^c (PrP-sen – wrażliwe na proteazy), co skutkuje przyłączeniem do oligomerów PrP^{Sc} cząsteczek PrP^c, ich konwersją w PrP^{Sc} i powiększaniem się agregatów zbudowanych z białka PrP^{Sc}. W drugim etapie powstałe agregaty PrP^{Sc} rozbijane są za pomocą ultradźwięków na mniejsze fragmenty, które stają się nowymi jądrami krystalizacji – przyłączają kolejne cząsteczki PrP^c i przekształcają je w PrP^{Sc}. Naprzemienne etapy inkubacji i sonikacji powtarzane są wielokrotnie. Każda kolejna fragmentacja dużych agregatów PrP-res dostarcza nowych zarodków i w efekcie umożliwia przyspieszenie procesu amplifikacji (rys. 1)^(33,34). Należy zaznaczyć, że nie mamy tutaj do czynienia z powielaniem białka w dokładnym znaczeniu tego słowa, ponieważ ogólna liczba cząsteczek (monomerów) pozostaje bez zmian, następuje jednak przyrost liczby konformerów PrP^{Sc} kosztem cząsteczek PrP^c, z których powstają.

W eksperymentach prowadzonych z wykorzystaniem szczepu *scrapie* 263K otrzymanego z mózgu zakażonych doświadczalnie chomików Saborio i wsp. uzyskali wykładniczy wzrost stężenia PrP^{Sc} w reakcji zapoczątkowanej przez niewielkie ilości tego białka. Jako źródło substratu wykorzystany został homogenat mózgu chomika zawierający prawidłowe białko PrP^c. Reakcja prowadzona była w probówkach, zaś sonikację wykonywano

w regularnych odstępach czasu, umieszczając sondę emitującą ultradźwięki w mieszaninie reakcyjnej. Po zakończonym procesie PMCA badane próbki poddawane były trawieniu proteinazą K w celu usunięcia cząsteczek PrP^c, zaś niewrażliwe na proteolizę białko PrP^{Sc} uwiadczone było za pomocą metody *western blotting*. Autorzy wykazali, że do przekształcenia PrP^c w PrP^{Sc} dochodzi w obecności matrycy – cząsteczek PrP^{Sc}, które zapoczątkowują proces konwersji, i odwrotnie – ilość białka PrP^{Sc} w analizowanym materiale nie wzrasta przy braku odpowiedniego substratu w postaci PrP^c⁽³⁴⁾. Eksperymenty te odegrały ważną rolę w badaniach nad biologią prionów jako czynników zakaźnych, nadzieje budziła również możliwość potencjalnego zastosowania metody PMCA do wykrywania niewielkich ilości białka prionu w celach diagnostycznych⁽³³⁾. W następnych latach prowadzone były dalsze badania nad ulepszaniem metody oraz jej wykorzystaniem do amplifikacji białka PrP^{Sc} pochodzącego z rozcieńczonych homogenatów mózgu gryzoni i owiec zakażonych *scrapie*, bydła z BSE oraz ludzi chorych na CJD⁽³⁵⁻³⁷⁾. Ukazały się ponadto doniesienia dotyczące zastosowania PMCA do wykrywania białka PrP^{Sc} we krwi chomików i owiec ze *scrapie*, w tym nie tylko u zwierząt w zaawansowanej fazie choroby, lecz także w okresie przedobjawowym⁽³⁸⁻⁴⁰⁾. Ogółem dzięki amplifikacji PMCA możliwa jest detekcja białka PrP^{Sc} obecnego w badanym materiale w bardzo niewielkich ilościach – nawet rzędu attogramów (10⁻¹⁸ g) – z użyciem substratu w postaci homogenatu tkanek mózgu lub rekombinowanego białka PrP^c otrzymywanego w hodowlach bakterii^(41,42). Zastosowanie białka rekombinowanego stwarza dodatkowe możliwości łatwego oczyszczania i zagęszczania PrP-sen, tak aby otrzymać preparat pozbawiony innych białek, lipidów czy kwasów nukleinowych obecnych w homogenacie tkankowym. Umożliwia także wprowadzanie do sekwencji białka celowych modyfikacji (mutacji) lub przyłączanie znaczników⁽⁴²⁾. Za wadę metody można uznać długi czas trwania procesu amplifikacji (kilka dni).

Kolejna próba opracowania czułego testu diagnostycznego polegała na zastosowaniu wytrząsania zamiast ultradźwięków w procedurze cyklicznej amplifikacji białka PrP^{Sc}. Wytrząsanie jest zarówno technicznie łatwiejsze niż sonikacja, jak i bardziej dogodne do standaryzacji. Nowa metoda, **konwersja indukowana przez wytrząsanie** (*quaking-induced conversion*, QuIC)⁽⁴³⁾, pozwoliła na wykrycie białka PrP^{Sc} obecnego w ilości femtogramów (10⁻¹⁵ g) w homogenizowanych tkankach mózgu oraz na potwierdzenie eksperymentalnego zakażenia *scrapie* u chomików na podstawie analizy bardzo niewielkiej objętości (2 μl) PMR, w czasie jednego dnia⁽⁴³⁾. Następne eksperymenty obejmowały amplifikację PrP^{Sc} w rozcieńczonych preparatach homogenatu mózgu pochodzących od owiec ze *scrapie* oraz ludzi z vCJD w procedurze trwającej 1–2 dni, z czułością 10–100 fg PrP^{Sc}⁽⁴⁴⁾. Metodę QuIC zastosowano także z pozytywnym skutkiem do



212 Rys. 1. Schemat przebiegu amplifikacji PrP^{Sc} metodą PMCA; według Soto i wsp.⁽³³⁾

detekcji białka PrP^{Sc} w PMR owiec zakażonych *scrapie*. Jako źródło substratu wykorzystano oczyszczone rekombinowane białko PrP^c chomika, owcy i człowieka⁽⁴⁴⁾.

W obydwu opisanych metodach po zakończonej amplifikacji konieczne jest potwierdzenie – za pomocą odrębnej techniki – czy minimalna ilość konformerów PrP^{Sc}, znajdująca się początkowo w analizowanej próbce, zwiększyła się do wykrywalnego poziomu. Do tego celu zwykle wykorzystuje się metody oparte na immunodetekcji, głównie *western blotting*, z reguły po uprzednim usunięciu prawidłowych cząsteczek PrP^c za pomocą trawienia proteinazą K. Konieczność wykonania detekcji białka jako dodatkowego i czasochłonnego etapu badania wydłuża i komplikuje przeprowadzenie testu na obecność PrP^{Sc} w badanym materiale. Ponadto *western blotting* nie jest metodą ilościową – umożliwia stwierdzenie, czy poszukiwane białko znajduje się w badanej próbce (to jest czy jego stężenie przekracza próg wykrywalności), nie pozwala jednak na wiarygodną ocenę jego ilości. Optymalnie należałoby zatem opracować metodę wykrywania amplifikowanych cząsteczek białka prionu bezpośrednio w mieszaninie reakcyjnej, bez konieczności stosowania dodatkowych technik, najlepiej z możliwością monitorowania przyrostu agregatów PrP^{Sc} w czasie.

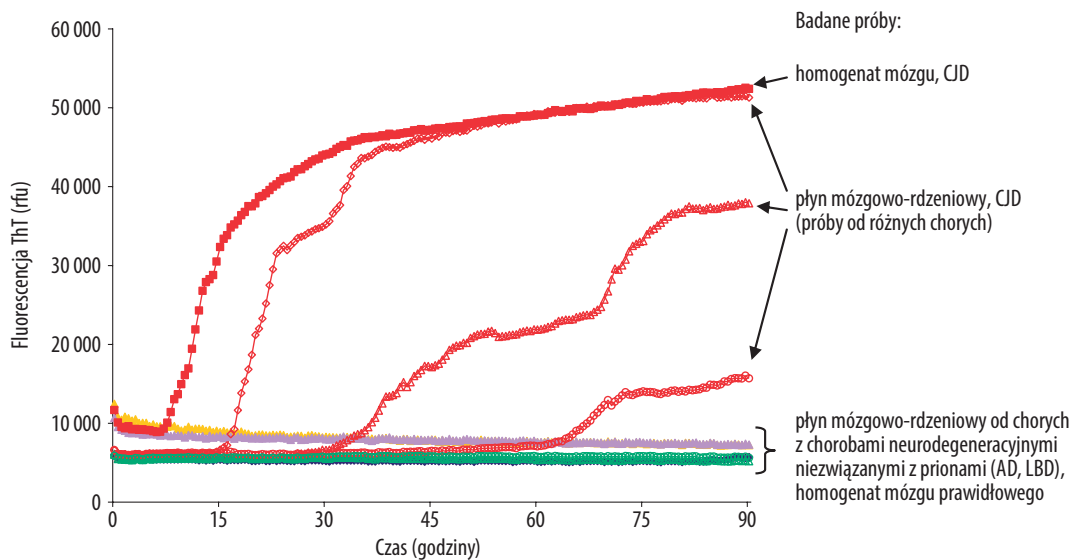
Jako alternatywę wobec trawienia prób proteinazą K i immunodetekcji można zastosować tioflawinę T (ThT) – barwnik fluorescencyjny, który w obecności włókien amyloidowych zmienia długość fali wzbudzenia/emisji światła z 342/430 nm na 442/482 nm. Fluorescencję o określonej długości fali można łatwo mierzyć, dlatego też ThT może być użytecznym znacznikiem umożliwiającym wykrywanie konformacyjnych zmian białek w roztworze, w tym detekcję powstających w procesie amplifikacji *in vitro* agregatów PrP^{Sc}. Colby i wsp. wykorzystali ThT jako znacznik w metodzie nazwanej *ASA* (*amyloid seeding assay*) do monitorowania tworzenia amyloidu białka prionu⁽⁴⁵⁾. Do zapoczątkowania reakcji konwersji użyto różnych szczepów prionów pasażowanych eksperymentalnie na zwierzętach laboratoryjnych, z kolei substratem było rozpuszczalne rekombinowane prawidłowe białko PrP^c myszy i chomika. Mieszaniny reakcyjne, w skład których wchodziły badane próby (zawierające lub niezawierające białka PrP^{Sc}), roztwór substratu (PrP^c) oraz ThT, inkubowano z ciągłym wytrząsaniem; przyrost amyloidu PrP^{Sc} oceniano na podstawie pomiaru fluorescencji. W przeprowadzonych eksperymentach najmniejsza ilość białka prionu możliwa do wykrycia mierzona była w fg, przy tym wykazano, że czułość metody zależała od badanego szczepu prionu. Stwierdzono ponadto, że reakcja konwersji i tworzenie się amyloidu były możliwe również wówczas, gdy białko prionu pełniące funkcję jądra krystalizacji oraz substrat pochodziły z różnych gatunków zwierząt (mysz, chomik). Za pomocą tej samej metody uzyskano również amplifikację białka PrP^{Sc} pochodzącego z homogenatów tkanek mózgu od osób ze sporadyczną postacią CJD, z zastosowaniem rekombinowanego

białka PrP^c człowieka jako substratu⁽⁴⁵⁾. Równocześnie zaobserwowano, że w metodzie ASA włókna amyloidowe mogą powstawać spontanicznie z białka substratu, bez udziału PrP^{Sc} jako zarodka, co stanowi utrudnienie w praktycznym zastosowaniu tej techniki^(30,45).

Najnowsza modyfikacja metody amplifikacji konformerów PrP^{Sc} *in vitro* została nazwana **QuIC w czasie rzeczywistym** (*real-time QuIC*, RT-QuIC) przez analogię do metody *real-time* PCR, w której można śledzić amplifikację DNA na bieżąco w trakcie trwania reakcji PCR. Metoda RT-QuIC łączy zalety konwersji indukowanej przez wytrząsanie z odczytem fluorescencji ThT, znanym z metody ASA, z tym że tutaj – dzięki odpowiednio dobranemu składowi mieszaniny reakcyjnej oraz zastosowaniu intensywnego wytrząsania w odstępach czasu (zamiast w sposób ciągły) – ograniczone zostało spontaniczne tworzenie włókien amyloidowych z rekombinowanego białka substratu PrP-sen. Ponadto dzięki prowadzeniu reakcji w 96-dółkowych płytkach (zamiast w probówkach) można analizować wiele prób równocześnie. Metoda ta jest także bardziej bezpieczna niż PMCA, ponieważ próbki zawierające materiał zakaźny pozostają w zamkniętej płytce przez cały czas trwania procedury^(30,46). Przyrost agregatów PrP-res monitoruje się za pośrednictwem pomiaru fluorescencji prowadzonego w czasie reakcji (rys. 2).

RT-QuIC może być również metodą ilościową. W tym celu wykonuje się serię rozcieńczeń badanego materiału i określa, przy jakim rozcieńczeniu próba zachowuje zdolność zapoczątkowania procesu amplifikacji w 50% powtórzeń reakcji (*50% seeding dose*, *SD₅₀*), w sposób analogiczny do ustalania 50% dawki śmiertelnej, *LD₅₀*, w testach z wykorzystaniem zwierząt⁽³⁰⁾.

Skuteczność metody RT-QuIC jest porównywalna do testów na eksperymentalnie zakażonych zwierzętach. Dzięki wysokiej czułości tej metody możliwe było potwierdzenie obecności nieprawidłowych konformerów białka prionu w PMR i wydzielinie z nosa chomików zakażonych *scrapie*⁽³⁰⁾. Dalsze ulepszenia metody polegały na optymalizacji warunków procesu – modyfikowano pH i skład buforu, w którym prowadzi się reakcję, oraz dobierano intensywność wytrząsania⁽⁴⁷⁾. Jedną z analizowanych kwestii było także źródło białka PrP-sen stosowanego jako substrat. Zaobserwowano, że reakcja amplifikacji może zachodzić, jeśli zarodek krystalizacji i substrat pochodzą z różnych organizmów, na przykład PrP-res od chorego z sCJD może zapoczątkować reakcję konwersji i agregacji białka PrP-sen krowy lub chomika – w takim przypadku wydajność reakcji jest jednak niższa niż przy zgodności gatunków⁽⁴⁷⁾. Inni autorzy stwierdzili z kolei większą czułość oraz mniejszą skłonność do spontanicznego tworzenia włókien w reakcji amplifikacji zapoczątkowanej przez homogenat mózgu chorego z vCJD, jeśli jako substrat wykorzystano rekombinowane białko chimerowe PrP-sen owcy i chomika (w porównaniu z homologicznym białkiem PrP-sen człowieka)⁽⁴⁸⁾.



Rys. 2. Przykładowy wynik RT-QuIC. Amplifikacja nieprawidłowych konformerów PrP^{Sc} z zastosowaniem białka PrP chomika jako substratu, monitorowana za pośrednictwem pomiaru intensywności fluorescencji tioflawiny T. Wzrost fluorescencji obserwuje się w próbach, które zawierały białko PrP^{Sc} zdolne do zapoczątkowania reakcji konwersji. W kontrolach ujemnych (próbach pozbawionych PrP^{Sc}) fluorescencja pozostaje na poziomie tła. Wykres otrzymano dzięki uprzejmości dr Alison Green i dr Lynne McGuire z National CJD Research & Surveillance Unit w Edynburgu

W kolejnych eksperymentach wykazano, że czas, po jakim następuje wzrost fluorescencji, oraz osiągnięte maksimum fluorescencji, na podstawie których wnioskuje się o szybkości przebiegu i ogólnej wydajności reakcji, uzależnione są od podtypu molekularnego białka PrP^{Sc} użytego jako zarodek krystalizacji. Dla przykładu reakcja konwersji zachodziła wolniej, jeśli została zapoczątkowana przez PrP^{Sc} typu MM2 i VV1 w porównaniu z pozostałymi podtypami sCJD. Z kolei białko PrP^{Sc} otrzymane z homogenatu mózgu chorych na vCJD było mniej wydajnym jądrem krystalizacji w porównaniu z analogicznym preparatem pochodzącym z sCJD. Przyczyny tego zjawiska nie zostały jednoznacznie wyjaśnione⁽⁴⁹⁾.

Testując możliwość diagnostycznego zastosowania RT-QuIC, Atarashi i wsp. analizowali próby płynu mózgowo-rdzeniowego pobrane od chorych z sCJD oraz ze schorzeniami neurologicznymi niezwiązanymi z prionami (np. z chorobą Alzheimera). Jako substrat do amplifikacji zastosowano rekombinowane białko PrP-sen człowieka. W badaniach obejmujących ponad 200 próbek PMR autorzy wykazali ponad 80-procentową czułość metody RT-QuIC w rozpoznawaniu sCJD oraz 100-procentową swoistość (nie stwierdzono wyników fałszywie dodatnich w próbach niepochodzących z CJD)⁽⁴⁶⁾.

Metoda RT-QuIC okazała się przydatna do wykrywania białka prionu w różnego rodzaju materiale biologicznym. Wykazano jednak, że reakcja może być hamowana w niektórych rodzajach próbek, takich jak krew pełna, osocze czy tkanki zawierające domieszkę krwi. Aby rozwiązać ten problem, Orru i wsp. opracowali nową modyfikację metody, zwaną **wzmocnionym QuIC** (*enhanced*

QuIC, eQuIC). W metodzie tej, w celu zwiększenia czułości, przed rozpoczęciem reakcji amplifikacji stosuje się immunoprecypitację PrP^{Sc} – kulki opłaszczone przeciwciałami monoklonalnymi wychytującymi oligomery PrP^{Sc} inkubowane są z badanym materiałem biologicznym, a po związaniu białka PrP^{Sc} umieszczane są wraz z substratem w dołkach, w których następnie prowadzi się reakcję RT-QuIC. Dodatkowo w trakcie trwania procesu częściowo zużyty roztwór PrP-sen wymienia się na nową porcję substratu. Dzięki tym modyfikacjom w metodzie eQuIC udało się osiągnąć czułość wyższą o kilka rzędów wielkości niż w standardowej metodzie RT-QuIC. Wyniki dodatkowo uzyskiwano, na przykład stosując do zapoczątkowania reakcji homogenat mózgu lub osocze od chomików zakażonych *scrapie*, rozcieńczone w stosunku 10¹⁴. Przygotowane w ten sposób rozcieńczenia zawierały attogramowe ilości białka PrP-res, przy czym 1 ag odpowiada masie około 20 cząsteczek PrP-res^(48,50).

Spośród wszystkich omówionych technik, opartych na amplifikacji nieprawidłowych konformerów PrP^{Sc}, największe szanse na zastosowanie w celach diagnostycznych ma obecnie metoda RT-QuIC. Dotychczasowe próby oszacowania przydatności tej metody w diagnostyce sCJD, na podstawie analizy PMR, wykazały porównywalną czułość (85–91%), ale znacznie większą swoistość (98–100%) niż dla innych biomarkerów^(46,47,51). Jak dotąd dodatni wynik w metodzie RT-QuIC otrzymano tylko w jednej spośród analizowanych w różnych pracach prób kontrolnych. PMR pochodził od chorego z podejrzeniem otępienia naczyniopochodnego, chociaż na podstawie objawów klinicznych rozpoznanie CJD nie

zostało całkowicie wykluczone. Ponieważ jednak w tym przypadku nie wykonano autopsji, ostateczne neuropatologiczne potwierdzenie rozpoznania nie było możliwe – nie wiadomo zatem, czy próbę tę istotnie można uznać za kontrolę ujemną⁽⁵²⁾.

Badania wykonane u 56 osób z rodzinnymi chorobami wywołanymi przez priony również wykazały wysoką czułość metody RT-QuIC. Wyniki dodatnie uzyskano w 78% przypadków choroby Gerstmann-Sträusslera-Scheinkera (GSS), w 87% przypadków rodzinnej postaci CJD z mutacją E200K oraz we wszystkich analizowanych przypadkach śmiertelnej rodzinnej bezsenności (FFI), a także fCJD z mutacją V203L. Dla porównania w tej samej badanej grupie chorych czułość testu na obecność białka 14-3-3 w PMR była znacznie niższa i wynosiła zaledwie 11% dla GSS, 73% dla fCJD E200K, 67% dla fCJD V203L i 0% dla FFI⁽⁵³⁾. W badaniach innej grupy chorych z rodzinnymi postaciami chorób wywołanych przez priony wykazano obecność białka PrP^{Sc} w PMR u ponad 80% chorych z mutacjami E200K, M232R i P102L oraz w 39% przypadków z mutacją V180I. Ci sami autorzy zaobserwowali, że negatywny wynik badania PMR metodą RT-QuIC był związany z późniejszym wiekiem zachorowania⁽⁵²⁾. Można przypuszczać, że najnowsza modyfikacja metody – eQuIC – umożliwi dalsze zwiększenie czułości w odniesieniu do rozpoznawania chorób wywołanych przez priony. Szczególne nadzieje wiąże się z potencjalną możliwością zastosowania tej techniki do wczesnego diagnozowania chorych z vCJD.

Pomimo obiecujących wyników metoda RT-QuIC nadal pozostaje na etapie badań naukowych i nie została jeszcze włączona do rutynowej diagnostyki. Aby mogła być powszechnie stosowana, konieczna jest dalsza optymalizacja technicznych warunków wykonywania reakcji oraz jej standaryzacja, tak aby w różnych laboratoriach zajmujących się badaniami naukowymi i diagnostycznymi w CJD analizy wykonywane były w porównywalny sposób. Warunkiem wykorzystania RT-QuIC jako testu diagnostycznego jest również łatwa komercyjna dostępność rekombinowanego białka PrP^{Sc} jako substratu do reakcji. Poza zastosowaniem diagnostycznym metoda RT-QuIC może być również przydatna w badaniach nad mechanizmem powstawania agregatów PrP^{Sc}, w tym nad znaczeniem zgodności sekwencji aminokwasowej zarodka i substratu. W konsekwencji metoda ta może pomóc w zrozumieniu molekularnych podstaw szerzenia się chorób wywołanych przez priony⁽⁴⁷⁾.

PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

1. Prusiner S.B.: Molecular biology of prion diseases. *Science* 1991; 252: 1515–1522.
2. Will R.G., Ironside J.W., Zeidler M. i wsp.: A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 347: 921–925.
3. Blättler T.: Implications of prion diseases for neurosurgery. *Neurosurg. Rev.* 2002; 25: 195–203.
4. Kovács G.G., Puopolo M., Ladogana A. i wsp.: Genetic prion disease: the EUROCDJ experience. *Hum. Genet.* 2005; 118: 166–174.
5. Will R.G., Alperovitch A., Poser S. i wsp.: Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six European countries, 1993–1995. EU Collaborative Study Group for CJD. *Ann. Neurol.* 1998; 43: 763–767.
6. National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance diagnostic criteria. Adres: www.cjd.ed.ac.uk/criteria.htm.
7. CDC's Diagnostic Criteria for Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD), 2010, Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA. Adres: www.cdc.gov/ncidod/dvrd/cjd/diagnostic_criteria.html.
8. Van Everbroeck B., Quoilin S., Boons J. i wsp.: A prospective study of CSF markers in 250 patients with possible Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2003; 74: 1210–1214.
9. Lemstra A.W., van Meegen M.T., Vreyling J.P. i wsp.: 14-3-3 testing in diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease: a prospective study in 112 patients. *Neurology* 2000; 55: 514–516.
10. Huang N., Marie S.K., Livramento J.A. i wsp.: 14-3-3 protein in the CSF of patients with rapidly progressive dementia. *Neurology* 2003; 61: 354–357.
11. Cuadrado-Corrales N., Jiménez-Huete A., Albo C. i wsp.: Impact of the clinical context on the 14-3-3 test for the diagnosis of sporadic CJD. *BMC Neurol.* 2006; 6: 25.
12. Zerr I., Pocchiari M., Collins S. i wsp.: Analysis of EEG and CSF 14-3-3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2001; 56: 1422–1423.
13. Muayqil T., Gronseth G., Camicioli R.: Evidence-based guideline: diagnostic accuracy of CSF 14-3-3 protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2012; 79: 1499–506.
14. Parchi P., Capellari S.: Prion disease: diagnostic value of cerebrospinal fluid markers. *Nat. Rev. Neurol.* 2013; 9: 10–11.
15. Chitravas N., Jung R.S., Kofskey D.M. i wsp.: Treatable neurological disorders misdiagnosed as Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 2011; 70: 437–444.
16. Zerr I., Schulz-Schaeffer W.J., Giese A. i wsp.: Current clinical diagnosis in Creutzfeldt-Jakob disease: identification of uncommon variants. *Ann. Neurol.* 2000; 48: 323–329.
17. Green A.J.: Use of 14-3-3 in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Biochem. Soc. Trans.* 2002; 30: 382–386.
18. Boesenberg-Grosse C., Schulz-Schaeffer W.J., Bodemer M. i wsp.: Brain-derived proteins in the CSF: do they correlate with brain pathology in CJD? *BMC Neurol.* 2006; 6: 35.
19. Giraud P., Biacabe A.G., Chazot G. i wsp.: Increased detection of 14-3-3 protein in cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease during the disease course. *Eur. Neurol.* 2002; 48: 218–221.
20. Geschwind M.D., Martindale J., Miller D. i wsp.: Challenging the clinical utility of the 14-3-3 protein for the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Neurol.* 2003; 60: 813–816.
21. Green A.J., Thompson E.J., Stewart G.E. i wsp.: Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2001; 70: 744–748.
22. Steinhoff B.J., Zerr I., Glatting M. i wsp.: Diagnostic value of periodic complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 2004; 56: 702–708.
23. Collins S.J., Sanchez-Juan P., Masters C.L. i wsp.: Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 2006; 129: 2278–2287.
24. Tschampa H.J., Neumann M., Zerr I. i wsp.: Patients with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies mistaken

- for Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2001; 71: 33–39.
25. Young G.S., Geschwind M.D., Fischbein N.J. i wsp.: Diffusion-weighted and fluid-attenuated inversion recovery imaging in Creutzfeldt-Jakob disease: high sensitivity and specificity for diagnosis. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 2005; 26: 1551–1562.
 26. Heinemann U., Krasnianski A., Meissner B. i wsp.: Molecular subtype-specific clinical diagnosis of prion diseases. *Vet. Microbiol.* 2007; 123: 328–335.
 27. Hunter N., Foster J., Chong A. i wsp.: Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.* 2002; 83: 2897–2905.
 28. WHO Tables on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies. Updated 2010. Adres: www.who.int/bloodproducts/tablestissueinfectivity.pdf.
 29. Editorial team. Fourth case of transfusion-associated vCJD infection in the United Kingdom. *Euro Surveill.* 2007; 12: E070118.4. Adres: www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3117.
 30. Wilham J.M., Orrú C.D., Bessen R.A. i wsp.: Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1001217.
 31. Kocisko D.A., Come J.H., Priola S.A. i wsp.: Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 1994; 370: 471–474.
 32. Kocisko D.A., Priola S.A., Raymond G.J. i wsp.: Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1995; 92: 3923–3927.
 33. Soto C., Saborio G.P., Anderes L.: Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 390–394.
 34. Saborio G.P., Permanne B., Soto C.: Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 2001; 411: 810–813.
 35. Bieschke J., Weber P., Sarafoff N. i wsp.: Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2004; 101: 12207–12211.
 36. Soto C., Anderes L., Suardi S. i wsp.: Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett.* 2005; 579: 638–642.
 37. Jones M., Peden A.H., Prowse C.V. i wsp.: *In vitro* amplification and detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease PrP^{Sc}. *J. Pathol.* 2007; 213: 21–26.
 38. Castilla J., Saá P., Hetz C., Soto C.: In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 2005; 121: 195–206.
 39. Saá P., Castilla J., Soto C.: Presymptomatic detection of prions in blood. *Science* 2006; 313: 92–94.
 40. Thorne L., Terry L.A.: *In vitro* amplification of PrP^{Sc} derived from the brain and blood of sheep infected with scrapie. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 3177–3184.
 41. Saá P., Castilla J., Soto C.: Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 35245–35252.
 42. Atarashi R., Moore R.A., Sim V.L. i wsp.: Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat. Methods* 2007; 4: 645–650.
 43. Atarashi R., Wilham J.M., Christensen L. i wsp.: Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat. Methods* 2008; 5: 211–212.
 44. Orrú C.D., Wilham J.M., Hughson A.G. i wsp.: Human variant Creutzfeldt-Jakob disease and sheep scrapie PrP^{res} detection using seeded conversion of recombinant prion protein. *Protein Eng. Des. Sel.* 2009; 22: 515–521.
 45. Colby D.W., Hang Q., Wang S. i wsp.: Prion detection by an amyloid seeding assay. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007; 104: 20914–20919.
 46. Atarashi R., Satoh K., Sano K. i wsp.: Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat. Med.* 2011; 17: 175–178.
 47. Atarashi R., Sano K., Satoh K. i wsp.: Real-time quaking-induced conversion: a highly sensitive assay for prion detection. *Prion* 2011; 5: 150–153.
 48. Orrú C.D., Wilham J.M., Raymond L.D. i wsp.: Prion disease blood test using immunoprecipitation and improved quaking-induced conversion. *MBio* 2011; 2: e00078–11.
 49. Peden A.H., McGuire L.I., Appleford N.E. i wsp.: Sensitive and specific detection of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease brain prion protein using real-time quaking-induced conversion. *J. Gen. Virol.* 2012; 93: 438–449.
 50. Orrú C.D., Wilham J.M., Vascellari S. i wsp.: New generation QuIC assays for prion seeding activity. *Prion* 2012; 6: 147–152.
 51. McGuire L.I., Peden A.H., Orrú C.D. i wsp.: Real time quaking-induced conversion analysis of cerebrospinal fluid in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 2012; 72: 278–285.
 52. Higuma M., Sanjo N., Satoh K. i wsp.: Relationships between clinicopathological features and cerebrospinal fluid biomarkers in Japanese patients with genetic prion diseases. *PLoS One* 2013; 8: e60003.
 53. Sano K., Satoh K., Atarashi R. i wsp.: Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QuIC assay. *PLoS One* 2013; 8: e54915.