

Piotr Gębski, Beata Sikorska

Received: 14.09.2010

Accepted: 20.09.2010

Published: 30.09.2010

Immunoekspresja białka LAMP2 w ośrodkowym układzie nerwowym u osób chorych na sporadyczną postać choroby Creutzfeldta-Jakoba (sCJD)

The immunoexpression of LAMP2 protein in central nervous system in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD)

Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Czechosłowacka 8/10, 92-216 Łódź, tel.: 42 679 14 77, e-mail: piotr.gebski@umed.lodz.pl
Praca finansowana ze środków własnych

Streszczenie

Wstęp: Sporadyczna postać choroby Creutzfeldta-Jakoba (sCJD) to śmiertelna choroba neurologiczna z grupy pasożwalnych encefalopatii gąbczastych (TSE). Ze względu na obecność polimorfizmu w kodonie 129. genu *PRNP* oraz typ patologicznego białka PrP^{Sc} sCJD podzielono na 6 podtypów, różniących się obrazem histopatologicznym oraz spektrum objawów klinicznych. LAMP2 to białko błonowe będące składnikiem późnych endosomów i lizosomów, stanowiące ważny element systemu endosomalno-lizosomalnego odgrywającego kluczową rolę w procesach wewnątrzkomórkowej degradacji białek. Udowodniono, iż zaburzenia w systemach wewnątrzkomórkowej degradacji białek odgrywają istotną rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. Celem pracy było określenie immunoekspresji białka LAMP2 w materiale pochodzącym od osób chorych na podtypy choroby sCJD. **Materiał i metody:** Materiałem do badań było 26 archiwalnych wycinków mózgow chorych na sCJD. Przy wykorzystaniu metod immunohistochemicznych oraz przy użyciu laserowego mikroskopu konfokalnego (Olympus FluoView 1000) oceniono immunoekspresję białek LAMP2 i PrP^{Sc} w zgromadzonym materiale. Grupę badaną podzielono na podgrupy ze względu na podtyp choroby sCJD. Wyniki półilościowej oceny siły reakcji immunohistochemicznych dla badanych białek poddano analizie statystycznej. Dokonano analizy korelacji pomiędzy średnimi wartościami siły reakcji immunohistochemicznych. Przy wykorzystaniu metody analizy wariancji oceniono różnice pomiędzy typami sCJD oraz pomiędzy grupami wiekowymi. **Wyniki:** W grupie badanej 7 przypadków stanowiły osoby z podtypem 1., 9 przypadków – osoby z podtypem 2., 2 przypadki – osoby z podtypem 3. i 1 przypadek – pacjent z podtypem 5. choroby sCJD. Wykazano istotne statystycznie korelacje pomiędzy siłą reakcji immunohistochemicznej dla białek LAMP2 i PrP^{Sc}. Znalaziono istotne statystycznie różnice pomiędzy podtypami sCJD ze względu na obecność białka LAMP2. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy przedziałami wiekowymi ze względu na obecność badanych białek. **Wnioski:** W ramach przeprowadzonych badań: 1) wykazano obecność silnej dodatniej korelacji pomiędzy nasileniem reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałami przeciw LAMP2 i PrP^{Sc}, co może być interpretowane jako pobudzenie aktywności układu endosomalno-lizosomalnego w neuronach kory czołowej; 2) stwierdzono obecność istotnych statystycznie różnic pomiędzy podtypami sCJD w zależności od nasilenia reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałami przeciw LAMP2; 3) w badaniach z użyciem mikroskopu konfokalnego potwierdzono wykazane statystycznie wzajemne relacje badanych białek.

Słowa kluczowe: LAMP2, PrP, prion, sCJD, immunoekspresja

Summary

Introduction: Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) is a fatal neurodegenerative disease. Based on the status of the codon 129 of the *PRNP* gene as well as the type of PrP^{Sc} protein, sporadic CJD is divided into 6 subtypes.

Each subtype possess both different histochemical phenotype and clinical manifestation. LAMP2 is a membrane protein limiting late endosomes and lysosomes, which acts as a key element in endosomal-lysosomal system (ELS). ELS plays an important role in all major protein degradation systems in eukaryotic cells. It has been recently suggested that disruptions in the function of protein degradation pathways are likely to be main events in almost all neurodegenerative diseases. The main aim for current work was to demonstrate immunoexpression of LAMP2 protein in subtypes of sCJD. **Material and methods:** The material for current study was 26 brain tissue samples collected from patients with sCJD. The immunoexpression of LAMP2 and PrP^{Sc} proteins was studied by immunohistochemistry and confocal laser scanning microscopy (Olympus FluoView 1000). The studied group was subdivided into subgroups based on the subtype of sCJD. Semiquantitative results of the level of LAMP2 and PrP^{Sc} immunoexpression were analysed using statistical methods. Correlation ratios between levels of immunoexpression of aforementioned proteins were assessed using the Pearson's correlation test. Group differences in sCJD subtypes and age groups were assessed using ANOVA. **Results:** The studied group consisted of 7 cases of subtype 1, 9 cases of subtype 2, 2 cases of subtype 3 and 1 case of subtype 5 of sporadic CJD. Pearson's correlation test showed statistically significant relationship between immunoexpression of LAMP2 and PrP^{Sc} proteins. ANOVA showed significant differences between sCJD subtypes regarding immunoexpression of LAMP2 protein. No significant differences regarding immunoexpression of studied proteins were observed between age groups. **Conclusions:** 1) A strong positive correlation between levels of immunoexpressions of PrP^{Sc} and LAMP2 may represent up-regulation of the protein processing by endosomal-lysosomal system. 2) Significant differences of immunoexpression of LAMP2 protein were observed between subtypes of sporadic CJD. 3) Confocal laser scanning microscopy results confirmed significant positive relationships between immunoexpression of PrP^{Sc} and LAMP2 proteins.

Key words: LAMP2, PrP, prion, sCJD, immunoexpression

WSTĘP

CHOROBY WYWOŁYWANE PRZEZ PRIONY

Pasażowalne encefalopatie gąbczaste (choroby wywołane przez priony) to choroby ośrodkowego układu nerwowego, wyróżniające się kilkoma podstawowymi cechami⁽¹⁾:

- postępującym zanikiem komórek nerwowych;
- brakiem klasycznych cech zapalenia;
- obecnością zmian gąbczastych w neuropilu;
- złogami patologicznego białka PrP^{Sc}.

Do grupy chorób wywołanych przez priony człowieka należą:

- kuru;
- CJD (*Creutzfeldt-Jakob disease*) – choroba Creutzfeldta-Jakoba;
- GSS (*Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease*) – choroba Gerstmann-Sträusslera-Scheinkera;
- FFI (*fatal familial insomnia*) – śmiertelna rodzinna bezsenność;
- sFI (*sporadic fatal insomnia*) – śmiertelna sporadyczna bezsenność;
- vCJD (variant CJD) – nowy wariant choroby Creutzfeldta-Jakoba.

Choroby wywołane przez priony u człowieka można dodatkowo podzielić na:

1. Nabyte:

- kuru – choroba, na którą chorowało plemię Fore z Papui-Nowej Gwinei – przenoszona poprzez rytualny kanibalizm;
- iCJD – jatrogena postać choroby Creutzfeldta-Jakoba – przenoszona przez interwencje lekarskie, takie jak operacje neurochirurgiczne, przeszczepy rogówki, opony twardej, podawanie hormonu wzrostu itd.;

- vCJD – wariant choroby Creutzfeldta-Jakoba – spowodowany infekcją pochodzącą od krów chorych na BSE lub przetoczeniem krwi od osób zakażonych vCJD.

2. Sporadyczne:

- sCJD – sporadyczna postać choroby Creutzfeldta-Jakoba;
- sFI – śmiertelna sporadyczna bezsenność.

W tej grupie chorób nie udaje się wykazać egzogenego czynnika zakaźnego.

3. Dziedziczne – choroby, w których udaje się wykazać obecność swoistych mutacji w genie kodującym PrP (*PRNP*), do grupy tej należą:

- gCJD – rodzinna postać choroby Creutzfeldta-Jakoba;
- GSS – choroba Gerstmann-Sträusslera-Scheinkera;
- FFI – śmiertelna rodzinna bezsenność.

Wspólnym mianownikiem dla wszystkich chorób wywołanych przez priony zarówno u człowieka, jak i u zwierząt jest patologiczna izoforma białka prionu – PrP^{Sc}. Według przyjmowanej hipotezy, za którą Stanley Ben Prusiner otrzymał w roku 1997 Nagrodę Nobla, PrP^{Sc} jest głównym i prawdopodobnie jedynym czynnikiem wywołującym pasażowalne encefalopatie gąbczaste^(2,3). Najistotniejszym, jak się wydaje, zdarzeniem w patogenezie chorób wywołanych przez priony jest wzajemna interakcja dwóch form białka prionu, skutkująca transformacją komórkowej, fizjologicznej formy białka PrP w postać patologiczną – PrP^{Sc}. Proces ten może zachodzić na błonie komórkowej lub podczas procesu endocytozy i przetwarzania białek przez układ endosomalno-lizosomalny⁽⁴⁻⁸⁾.

Większość genetycznych postaci chorób wywołanych przez priony cechuje się występowaniem punktowych mutacji w otwartej ramce odczytu *PRNP*. Istnieją również występujące rodzinie przypadki insercji w obszarze między 51. a 91. kodonem^(9,10). Dodatkowo poza mutacjami punktowymi i insercjami opisane zostały polimorfizmy charakterystyczne dla genu

PRNP. Najlepiej poznany jest polimorfizm kodonu 129. Kodon ten może kodować walinę (V) lub metioninę (M). W populacji możliwe jest więc występowanie osobników będących homozygotami MM, VV oraz heterozygotami MV. Polimorfizm ten jest o tyle ważny, że determinuje podatność na wystąpienie i fenotyp chorób wywoływanych przez priony⁽¹¹⁻¹⁵⁾. Ocenia się, że w populacji ogólnej 50% osób jest heterozygotą, 39% – homozygotą MM, natomiast homozygotyczność VV wykazuje 11% osób. Podatność na CJD wiązana jest z występowaniem homozygotyczności. Sto procent osób, u których wykryto kliniczną postać vCJD i przeprowadzono sekwencjonowanie genu *PRNP*, okazało się homozygotami MM. Jeżeli chodzi o sCJD, to występowanie homozygotyczności MM szacowane jest na około 70%. Ciekawym doniesieniem jest praca, w której stwierdzono, że 41% pacjentów poniżej 49. r.ż. posiada fenotyp VV, a 84% pacjentów powyżej 80. r.ż. posiada fenotyp MM⁽¹³⁾. U chorych z wykazaną obecnością mutacji w genie *PRNP* polimorfizm w kodonie 129. wydaje się wpływać na wiek pojawienia się objawów, długość przebiegu choroby oraz obraz histopatologiczny⁽¹⁶⁾.

Metoda immunohistochemiczna jest główną metodą diagnostyczną używaną w badaniach nad pasażowalnymi encefalopatiami gąbczastymi ze względu na możliwość detekcji PrP w utrwalonych skrawkach tkankowych. Z powodu braku przeciwciał specyficznych reagujących z PrP^{Sc}, w barwieniach immunohistochemicznych obserwuje się rozlane odczyny widoczne wewnątrz neuronów i w neuropilu, które – jak się powszechnie uważa – odpowiadają obecności fizjologicznej formy białka prionu PrP^C. Należy je odróżniać od układów typowych i charakterystycznych dla poszczególnych chorób wywoływanych przez priony, które to układy stają się wyraźnie widoczne po odpowiednim przygotowaniu preparatów⁽¹⁷⁾. Należą do nich:

- odczyn rozlany/synaptyczny (*fine deposition*) – najtrudniejszy do wykazania;
- złogi gruboziarniste (*coarse deposition*) (*granules, patchy/perivacuolar deposits*);
- blaszki amyloidowe charakterystyczne dla kuru i vCJD;
- pozbawione amyloidu depozyty przypominające blaszki (*plaque-like deposits*);
- *focal deposits* lub tak zwane mikroblaszki;
- amyloid naczyń (vascular amyloid);
- odczyn okołoneuronalny (*pericellular deposits*).

Depozyty patologicznego PrP znajdują się nie tylko w preparatach z ośrodkowego układu nerwowego, ale także w tkance limfatycznej (vCJD), w nerwach obwodowych, śledzionie (vCJD), siatkówce, nerwie wzrokowym i przysadce⁽¹⁸⁻²²⁾.

Do typowego obrazu histopatologicznego chorób wywoływanych przez priony⁽²³⁾ należą zmiany gąbczaste, ubytek neuronów oraz astro- i mikroglejoza. Zmiany gąbczaste charakteryzują się jako rozlane lub miejscowo skupione, zlewające się ze sobą wakuole w neuropilu. Blaszki amyloidowe są niezbędne do rozpoznania GSS (blaszki wielocentryczne). Występują one także w kuru i vCJD (duże blaszki otoczone wakuolami – blaszki kwitnące: *florid plaques*)⁽²⁴⁾, natomiast nie są charakterystyczne dla pozostałych typów sCJD.

Ocena histopatologiczna chorób wywoływanych przez priony jest złożona. Składa się na to kilka przyczyn⁽²⁵⁾:

- mnogość i różnorodność zmian w mózgowiu;
- różny fenotyp choroby w zależności od typu (sporadyczny, rodzinny, nabyty);
- różny fenotyp nabytej postaci choroby (kuru, postać jatrogena i wariant) zależny od wrót zakażenia;
- zmiany genetyczne (mutacje w *PRNP*) wpływają na rodzaj zmian obserwowanych w mózgowiu.

Jednym z czynników branych pod uwagę w aktualnie obowiązującej klasyfikacji chorób wywoływanych przez priony jest polimorfizm w kodonie 129. genu *PRNP*. Drugim rozważanym czynnikiem jest typ patologicznego białka PrP^{Sc}.

Pierwszy typ białka prionu posiada fragment odporny na trawienie proteinazą K o masie cząsteczkowej około 21 kDa. Proteinaza K odcina ten fragment najczęściej w okolicy 82. kodonu. Drugi typ białka prionu posiada fragment odporny na trawienie proteinazą K o masie cząsteczkowej około 19 kDa. Proteinaza K odcina ten fragment najczęściej w okolicy 97. kodonu⁽²⁶⁾. Zauważono, że fenotyp choroby jest zazwyczaj różny w zależności od występującego u pacjenta typu białka PrP^{Sc}.

BIALKO LAMP2

Choroby wywoływane przez priony, w tym sporadyczna postać choroby Creutzfeldta-Jakoba, jak również występujące znacznie częściej w populacji choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Parkinsona czy choroba Alzheimera, posiadają przynajmniej jeden wspólny mianownik – w ich patogenezie główną rolę odgrywa obecność patologicznych białek⁽²⁷⁾. Nie dziwi więc fakt, że procesy odpowiedzialne za wewnątrzkomórkową degradację białek stanowią jeden z głównych celów badawczych zmierzających do pełnego poznania i zrozumienia patogenezy tych chorób.

Do podstawowych mechanizmów odpowiedzialnych za usuwanie nieprawidłowych białek należą:

- system ubikwitynowo-proteasomalny (*ubiquitin-proteasome system, UPS*);
- system autofagiczno-lizosomalny.

System ubikwitynowo-proteasomalny jest uważany za podstawowy mechanizm degradacji większości białek o krótkim czasie półtrwania. Zapewnia on między innymi istotną precyzję w kontroli wielu białek regulatorowych. Katabolizm białek w UPS odgrywa istotną rolę w zabezpieczeniu puli aminokwasowej w przypadkach nagłego niedoboru czynników odżywczych dla komórki. System ubikwitynowo-proteasomalny odgrywa także niebagatelną rolę w usuwaniu patologicznych, błędnie złożonych białek z wnętrza komórki⁽²⁸⁻³¹⁾.

Z kolei **system autofagiczno-lizosomalny** uważany jest za system odpowiedzialny przede wszystkim za usuwanie białek o długim czasie półtrwania, a także organelli komórkowych. Zapewnia on komórce pulę aminokwasową potrzebną do syntezy nowych białek w przypadku przewlekłych niedoborów czynników odżywczych. System ten na równi z UPS bierze udział w usuwaniu patologicznych wewnątrzkomórkowych białek⁽³²⁾.

Poza dwoma wspomnianymi głównymi systemami degradacji białek ważny wydaje się również proces **autofagii zależny od chaperonów** (*chaperone-mediated autophagy*, CMA)⁽³³⁾.

W procesie tym dochodzi do bezpośredniego przechodzenia białek przeznaczonych do degradacji do lizosomów. Tak zdegradowane mogą być jedynie białka posiadające motyw KFERQ. Jest on swoiście rozpoznawany przez chaperony (np. białko hsc70). W kolejnym etapie dochodzi do połączenia chaperonu z białkiem błonowym lizosomu LAMP2A (*lysosome-associated membrane protein 2A*), po czym następuje przemieszczenie wadliwego białka do wnętrza lizosomu^(33,34).

Szacuje się, iż około 30% wszystkich białek cytoplazmatycznych posiada motyw KFERQ i może być usuwana przez CMA^(33,35). Do działania opisanych procesów degradacji białek niezbędne jest prawidłowe działanie **systemu endosomalno-lizosomalnego** (ELS). Jego głównymi składnikami są wczesne i późne endosomy oraz lizosomy⁽³⁶⁾.

System ELS pełni wiele funkcji wewnątrzkomórkowych, należą do nich⁽³⁷⁾:

- uczestniczenie w endocytozie;
- degradacja składników wewnątrzkomórkowych;
- regulacja objętości cytoplazmy;
- przebudowa kompartmentów wewnątrzkomórkowych.

Wydaje się, że system endosomalno-lizosomalny odgrywa też istotną rolę w patogenezie chorób wywoływanych przez priony. W badaniach prowadzonych na liniach komórkowych wykazano, iż ELS jest związany z dojrzewaniem prawidłowej, komórkowej, formy białka prionu – PrP^C^(38,39), jak również pośredniczy w endocytozie patologicznego białka PrP^{Sc}⁽⁴⁰⁻⁴⁴⁾. Proteazy lizosomalne mogą być związane z proteolityczną obróbką obu form białka prionu, a zastosowanie inhibitorów proteaz cysteinowych ogranicza akumulację PrP^{Sc}^(5,45). Układ ELS to potencjalne miejsce transformacji prawidłowej formy PrP^C w patologiczną formę PrP^{Sc}^(5,40,41,43,44). Badania prowadzone na materiale pochodzącym od osób chorych na sCJD wydają się potwierdzać istotną rolę ELS w patogenezie tej choroby. Spekuluje się, iż w patogenezie chorób wywoływanych przez priony dochodzi do bezpośredniego zablokowania systemu endosomalno-lizosomalnego przez PrP^{Sc}, co skutkuje przeładowaniem systemu endosomalno-lizosomalnego, zablokowaniem autofagii i wewnątrzkomórkowym gromadzeniem niezdegradowanych elementów wewnątrzkomórkowych, takich jak patologiczne białka, glikozaminoglikany czy lipofuscyna. Efekt interakcji PrP^{Sc} z ELS przypominałby zatem następstwa chorób określanych zbiorczą nazwą *lysosomal storage disorders*⁽⁴⁶⁾. Co istotne, akumulację lipofuscyny obserwuje się w neuronach osób chorych na CJD, jak również w komórkach nerwowych zwierząt zarażonych CJD⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾.

Białko LAMP2 (*lysosome-associated membrane protein 2*) to białko błonowe będące składnikiem późnych endosomów i lizosomów. Odgrywa ono istotną rolę w funkcjonowaniu całego systemu. U myszy pozbawionych genu dla tego białka obserwuje się zaburzenie powstawania lizosomów, znaczne zaburzenia w kierowaniu enzymów do lizosomów oraz, w konsekwencji, niewydolność mechanizmu autofagii. W tkankach pozbawionych ekspresji LAMP2 dochodzi do gromadzenia

się wakuoli autofagicznych, co może być przejawem zaburzenia ostatniego etapu procesu usuwania białek przez autofagię – fuzji autofagosomów z lizosomami.

U człowieka brak LAMP2 prowadzi do rozwoju choroby Danona – śmiertelnej kardiomiopatii i miopatii powiązanej z upośledzeniem psychicznym. Dokładny patomechanizm tej choroby nie jest jeszcze dokładnie znany⁽⁵⁰⁾.

CELE

Celem niniejszej pracy było zbadanie immunoekspresji białka LAMP2 w materiale histopatologicznym pochodzącym od osób chorujących na sporadyczną postać choroby Creutzfeldta-Jakoba.

MATERIAŁ

Materiałem do badań immunohistochemicznych było 26 archiwalnych wycinków mózgów chorych ze sporadyczną postacią choroby Creutzfeldta-Jakoba (sCJD), pobranych w czasie autopsji. Sekcje mózgów były prowadzone po utrwaleniu w 10% zbuforowanej formalinie przez 14 dni. W każdym przypadku dokonano powtórnej oceny histopatologicznej. Dane kliniczne przedstawiono w tabeli 1.

Do badań mikroskopowych z każdego przypadku wybrano po 2 bloki, jeden z kory mózdzku oraz jeden z kory czołowej.

METODYKA BADAŃ IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH

Skrawki o grubości 5 μm , skrojone z bloków parafinowych zostały odparafinowane w szeregu alkoholi o malejącym stężeniu i umieszczone na szkiełkach podstawowych o zwiększonej adhezji (Superfrost, DAKO). Następnie przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne z odpowiednimi przeciwciałami. Listę przeciwciał przedstawiono w tabeli 2.

Wzmocnienie i wizualizację reakcji immunohistochemicznych dla białek PrP^{Sc} oraz LAMP2 uzyskano z użyciem systemu polimerowego o wysokiej swoistości (EnVision+ System, HRP, DAKO), którego podstawę stanowi polimer znakowany peroksydazą chrzanową (HRP) sprzężony z przeciwciałami wtórnymi. System przeznaczony jest do pracy z przeciwciałami mysimi.

Preparaty oceniono w mikroskopie świetlnym Nikon Eclipse 800i, wyposażonym w kamerę cyfrową DSM 1200C oraz oprogramowanie NIS-Elements, Nikon.

ANALIZA OBRAZÓW MIKROSKOPOWYCH W CELU OKREŚLENIA TYPU sCJD

W każdym przypadku sCJD po wykonaniu reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałem przeciw PrP dokonano dwukrotnej oceny (przez dwie niezależne osoby) preparatów pochodzących z kory mózgowej, jąder podkorowych i mózdzku w mikroskopie świetlnym w celu oceny typu choroby Creutzfeldta-Jakoba według kryteriów opisanych w 2003 roku przez Gambettiego i wsp.⁽²⁵⁾

Przypadek sCJD	Wiek	Czas trwania choroby (lata)	Płeć
35_1	51	4	M
35_2	39	Brak danych	M
42	72	Brak danych	K
55	59	Brak danych	M
131	70	Brak danych	K
181	66	Brak danych	M
306	68	1	M
333	68	1	M
383	72	1	M
372	36	1	K
381	70	Brak danych	M
318	56	1	K
440	53	1	K
459	69	2	K
490	65	1	K
458	72	1	M
542	53	2	K
552	40	1	M
586	61	1	M
583	68	1	M
571	48	1	K
531	47	1	K
605	61	1	M
503	76	1	K
561	74	1	K
545	56	1	M

Tabela 1. Podstawowe dane dotyczące przypadków sCJD

**ANALIZA OBRAZÓW MIKROSKOPOWYCH
W CELU OKREŚLENIA SIŁY REAKCJI
IMMUNOHISTOCHEMICZNEJ
Z PRZECIWCIAŁAMI PRZECIW BIAŁKOM
PRP^{Sc} I LAMP2**

Dokonano podziału osób badanych na 5 kategorii wiekowych przedstawionych w tabeli 6.

Dla każdego przypadku sCJD, po przeprowadzeniu reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałami przeciw PrP i LAMP2, wybrano po 2 bloki, które zostały poddane ocenie.

Nasilenie reakcji immunohistochemicznych mierzono półilościowo, stosując pięciostopniową skalę przedstawioną w tabeli 3.

Dla każdego przypadku oceniano siłę reakcji immunohistochemicznych w 10 lokalizacjach podsumowanych w tabeli 4.

Na rys. 1-4 przedstawiono przykładowe obrazy mikroskopowe z mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse 800i wykonane przy powiększeniach 400× i 600×, pokazujące różnice w wartościach intensywności reakcji immunohistochemicznych z poszczególnymi przeciwciałami.

Każdy przypadek był analizowany dwukrotnie w odstępie czasowym jednego tygodnia. Do obliczeń wybrano wartości średnie z 2 pomiarów dla każdej z wymienionych w tabeli 4 lokalizacji.

Dodatkowo stworzono 4 indeksy złożone będące sumą wartości siły reakcji immunohistochemicznych w preparatach pochodzących z kory czołowej i mózdzku. Lista indeksów złożonych została przedstawiona w tabeli 5.

W tabeli 6 przedstawiono listę stworzonych kategorii wiekowych.

**ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW
BADAŃ IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH**

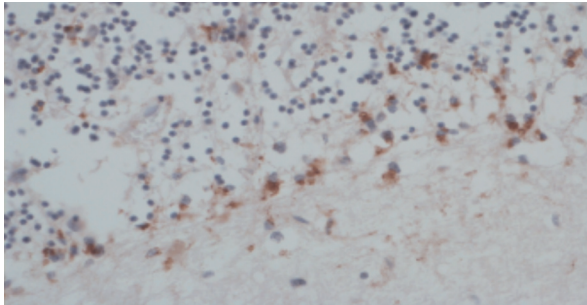
Do oceny statystycznej danych wykorzystano oprogramowanie SPSS (SPSS, Inc.).

Dokonano analizy korelacji (przy wykorzystaniu współczynnika korelacji liniowej Pearsona) pomiędzy średnimi wartościami siły reakcji immunohistochemicznej dla każdego badanego białka w każdej z wymienionych w tabeli 4 lokalizacji a wartościami indeksów złożonych przedstawionych w tabeli 5. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p=0,05$. Współczynnik Pearsona równy +1 oznacza całkowitą dodatnią korelację między porównywanymi zmiennymi, natomiast współczynnik Pearsona równy -1 – całkowitą ujemną korelację między porównywanymi zmiennymi.

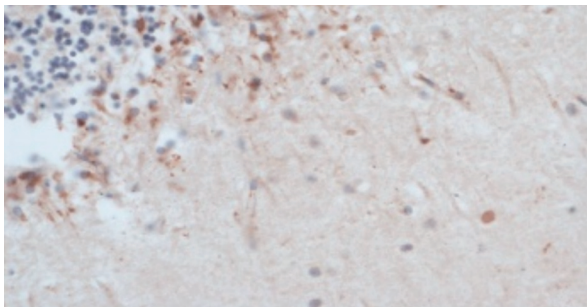
Różnice pomiędzy typami sCJD były oceniane na podstawie średnich wartości siły odczynu immunohistochemicznego w lokalizacjach przedstawionych w tabeli 4 oraz na podstawie

Wśród badanych przypadków nie znalazł się żaden zakwalifikowany do tej grupy.

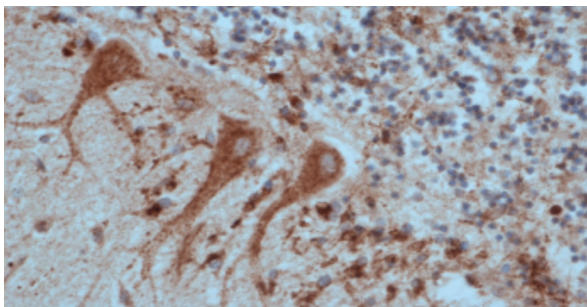
Brak odczynu (0)



Słaby odczyn (1)



Średnio nasilony odczyn (2)



Silny odczyn (3)

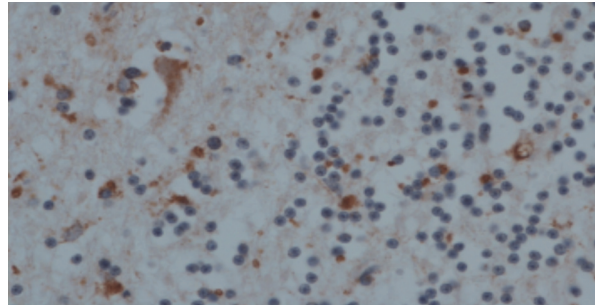
Wśród badanych przypadków nie znalazł się żaden zakwalifikowany do tej grupy.

Bardzo silny odczyn (4)

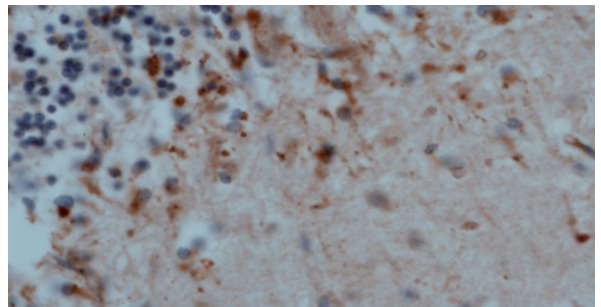
Rys. 1. Przykładowe zdjęcia obrazujące poszczególne wartości siły reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałem przeciw LAMP2. Wybrane zdjęcia pochodzą z preparatów mózdzku i zostały wykonane przy powiększeniu 400×

Wśród badanych przypadków nie znalazł się żaden zakwalifikowany do tej grupy.

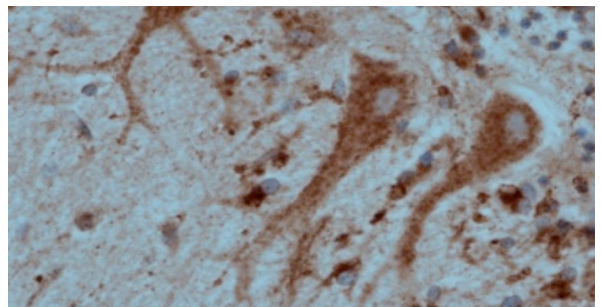
Brak odczynu (0)



Słaby odczyn (1)



Średnio nasilony odczyn (2)



Silny odczyn (3)

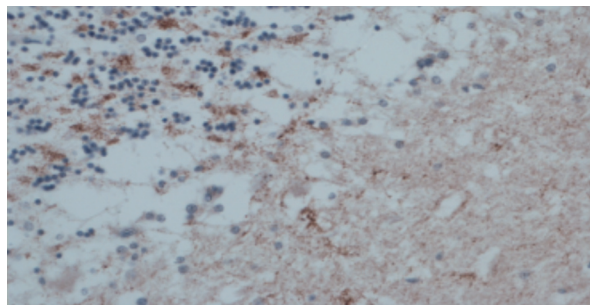
Wśród badanych przypadków nie znalazł się żaden zakwalifikowany do tej grupy.

Bardzo silny odczyn (4)

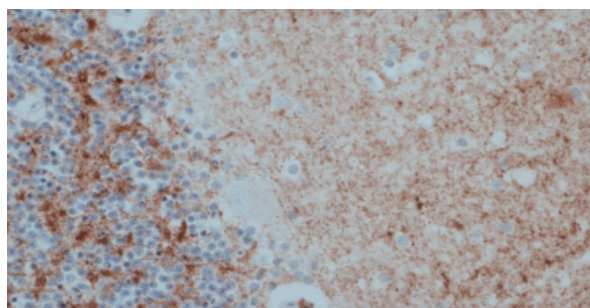
Rys. 2. Przykładowe zdjęcia obrazujące poszczególne wartości siły reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałem przeciw LAMP2. Wybrane zdjęcia pochodzą z preparatów mózdzku i zostały wykonane przy powiększeniu 600×

Wśród badanych przypadków nie znalazł się żaden zakwalifikowany do tej grupy.

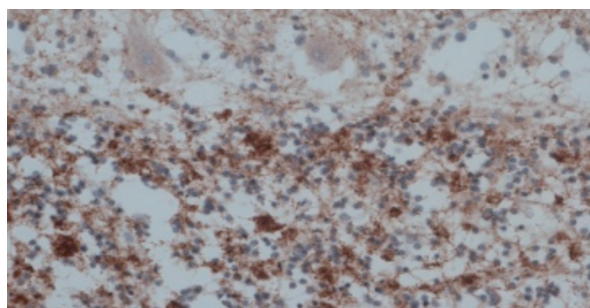
Brak odczynu (0)



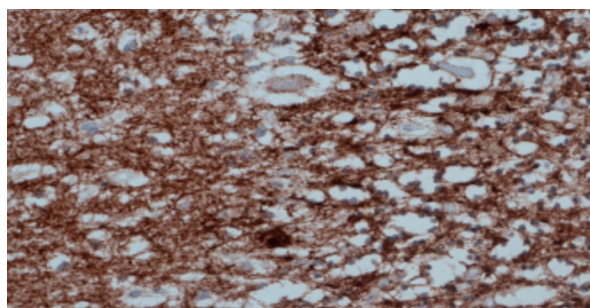
Słaby odczyn (1)



Średnio nasilony odczyn (2)



Silny odczyn (3)

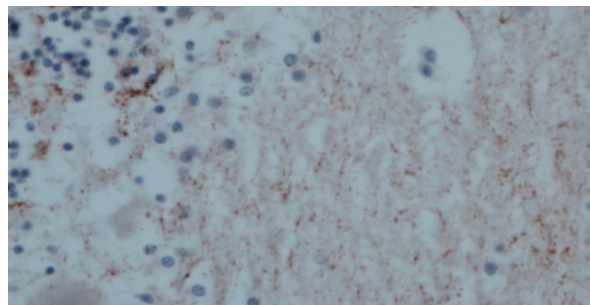


Bardzo silny odczyn (4)

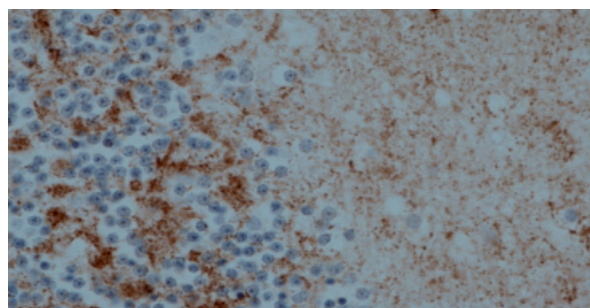
Rys. 3. Przykładowe zdjęcia obrazujące poszczególne wartości siły reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałem przeciw PrP. Wybrane zdjęcia pochodzą z preparatów mózdzku i zostały wykonane przy powiększeniu 400×

Wśród badanych przypadków nie znalazł się żaden zakwalifikowany do tej grupy.

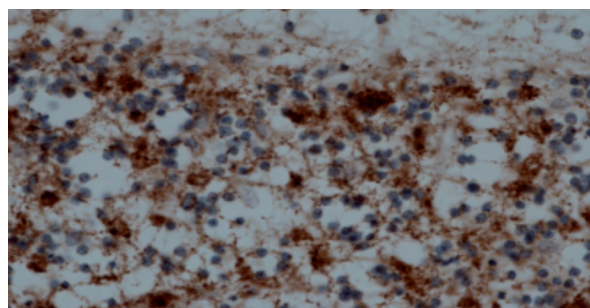
Brak odczynu (0)



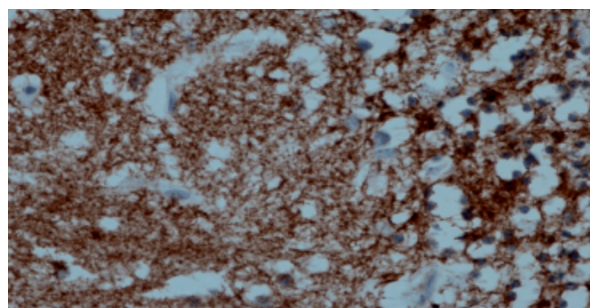
Słaby odczyn (1)



Średnio nasilony odczyn (2)



Silny odczyn (3)



Bardzo silny odczyn (4)

Rys. 4. Przykładowe zdjęcia obrazujące poszczególne wartości siły reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałem przeciw PrP. Wybrane zdjęcia pochodzą z preparatów mózdzku i zostały wykonane przy powiększeniu 600×

Przeciwciało	Producent	Klon	Gatunek gospodarza	Rozcieńczenie	Odmaskowanie antygeny
LAMP2	Santa Cruz	Monoklonalne	Mysz	1:100	Buf. cytrynowy pH 6,0 + łaźnia wodna 20 min
PrP(12F10)	Cayman	Monoklonalne	Mysz	1:1000	Autoklaw 30 min + kw. mrówkowy 5 min

Tabela 2. Lista przeciwciał użytych do badań immunohistochemicznych

wartości indeksów złożonych przedstawionych w tabeli 5. Do oceny istotności statystycznej różnic wartości siły reakcji immunohistochemicznych pomiędzy podtypami sCJD wykorzystano metodę analizy wariancji (ANOVA). Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p=0,05$. W celu określenia wielkości efektów eksperymentalnych zaobserwowanych za pomocą testu ANOVA dla każdej statystycznie istotnej różnicy wyliczono współczynnik ETA kwadrat.

Dokonano oceny różnic pomiędzy grupami wiekowymi przedstawionymi w tabeli 6 na podstawie średnich wartości siły odczynu immunohistochemicznego w lokalizacjach przedstawionych w tabeli 4 oraz na podstawie wartości indeksów złożonych przedstawionych w tabeli 5. Do oceny istotności statystycznej różnic wartości siły reakcji immunohistochemicznych pomiędzy podtypami sCJD wykorzystano metodę analizy wariancji (ANOVA). Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p=0,05$.

BADANIA W LASEROWYM MIKROSKOPIE KONFOKALNYM

Materiał do badań konfokalnych stanowiły wycinki, których użyto do tradycyjnych badań immunohistochemicznych. Reakcje immunofluorescencji przeprowadzono na skrawkach skrojonych do badań immunohistochemicznych. Listę przeciwciał pierwszorzędowych wykorzystanych do badań w mikroskopie konfokalnym przedstawiono w tabeli 7.

METODYKA BADAŃ IMMUNOFLUORESCENCYJNYCH

W tej części badań wykonano podwójne reakcje immunofluorescencyjne. Po odmaskowaniu antygeny inkubowano skrawki z odpowiednimi przeciwciałami pierwotnymi. Przeciwciała dobierano tak, aby w reakcji nie występowały przeciwciała tego samego gatunku gospodarza, lub wykorzystywano przeciwciała monoklonalne różnych klas Ig. Inkubację przeprowadzano w komorze wilgotnej, pozostawiając skrawki na noc w temperaturze 4°C.

W celu wizualizacji reakcji użyto fluorochromów sprzężonych z odpowiednimi przeciwciałami wtórnymi. Zostały one przedstawione w tabeli 8. Reakcję prowadzono, inkubując skrawki przez 1-2 godziny w ciemni, w temperaturze pokojowej.

Kontrole negatywne wykonano przez ominięcie pierwotnego przeciwciała. Ponadto wykonano pojedyncze barwienia, aby wykluczyć nakładanie się sygnałów.

Preparaty oceniano w trójkanałowym laserowym skanującym mikroskopie konfokalnym Olympus FluoView 1000. Większość zdjęć została wykonana z użyciem obiektywu olejowego Plan Achromat 40×/1,4 w trybie sekwencyjnym, aby uniknąć nakładania się sygnałów.

WYNIKI

PODTYPY sCJD

Ocena preparatów z kory mózgu, jąder podstawy i mózdzku doprowadziła do podzielenia przypadków sporadycznej formy choroby Creutzfeldta-Jakoba na podtypy. W grupie badanej liczącej 26 osób stwierdzono, iż:

- 7 przypadków stanowiły osoby z podtypem 1.;
- 9 przypadków – osoby z podtypem 2.;
- 2 przypadki – osoby z podtypem 3.;
- 1 przypadek – pacjent z podtypem 5.

Niestety, z powodu braków w materiale histopatologicznym, szczególnie w przypadkach nadesłanych z innych ośrodków, u 7 osób nie udało się jednoznacznie ocenić typu sCJD. Wyniki zostały zebrane w tabeli 9.

ANALIZA KORELACJI POMIĘDZY ŚREDNIMI WARTOŚCIAMI SIŁY REAKCJI IMMUNOISTOCHEMICZNYCH DLA BIAŁEK LAMP2 I PrP^{Sc}

Wykorzystując współczynnik korelacji liniowej Pearsona, uzyskano wyniki korelacji siły reakcji immunohistochemicznych dla badanych białek (LAMP2 i PrP) oraz dla indeksów złożonych przedstawionych w tabeli 5. Zbiorcze wyniki obserwowanych, istotnych statystycznie, dodatnich korelacji przedstawiono w tabeli 10.

Najsilniejsze dodatnie korelacje białka LAMP2 i PrP wystąpiły w przypadku:

- indeksu złożonego LAMP2 w korze mózgu z indeksem złożonym PrP w korze mózgu – 0,618 ($p=0,001$);
- indeksu złożonego LAMP2 w korze mózgu z siłą reakcji immunohistochemicznej na PrP w neuropilu kory mózgu – 0,618 ($p=0,001$);
- nasilenia reakcji immunohistochemicznej na LAMP2 w neuropilu kory mózgu z indeksem złożonym PrP w korze mózgu – 0,604 ($p=0,001$);

Siła reakcji immunohistochemicznej na przeciwciało	Wartość liczbową
Brak odczynu	0
Słaby odczyn	1
Średnio nasilony odczyn	2
Silny odczyn	3
Bardzo silny odczyn	4

Tabela 3. Skala używana do oceny siły reakcji immunohistochemicznych

- nasilenia reakcji immunohistochemicznej na LAMP2 w neuropilu kory mózgu z siłą reakcji immunohistochemicznej na PrP w neuropilu kory mózgu – 0,604 (p=0,001);
- nasilenia reakcji immunohistochemicznej na LAMP2 w neuronach warstwy molekularnej mózdzku z siłą reakcji immunohistochemicznej na PrP w neuropilu warstwy molekularnej mózdzku – 0,464 (p=0,019).

**ANALIZA RÓŻNIC MIĘDZY PODTYPAMI sCJD
NA PODSTAWIE WARTOŚCI SIŁY REAKCJI
IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH
Z PRZECIWCIAŁAMI PRZECIW BIAŁKOM
LAMP2 I PrP^{Sc}**

Korzystając z analizy wariancji (ANOVA), znaleziono istotne statystycznie różnice pomiędzy podtypami sCJD ze względu na ekspresję białka LAMP2. Wyniki przedstawiono w tabeli 11.

Nasilenie reakcji na LAMP2 w neuropilu warstwy ziarnistej mózdzku było najistotniejszą z badanych lokalizacji. Istotność statystyczną w tym miejscu oceniono na 0,001 (df=3). Wskaźnik ETA podniesiony do kwadratu pozwala na stwierdzenie, że podział na podtypy sCJD (w tak dobranej grupie badawczej) może być tłumaczony aż w 63,7% przypadków obecnością białka LAMP2 w tej lokalizacji.

Nasilenia reakcji immunohistochemicznej na LAMP2 w komórkach glejowych kory mózgu oraz neuropilu warstwy molekularnej kory mózdzku były równie istotnymi wartościami. Istotność statystyczna wyniosła odpowiednio 0,002 (df=3) i 0,006 (df=3).

Wskaźnik ETA podniesiony do kwadratu pozwala stwierdzić, że nasilenie reakcji immunohistochemicznej na LAMP2 w komórkach glejowych kory mózgu tłumaczy w 60,4% przypadków (w tak dobranej grupie badawczej) różnicę między podtypami sCJD oraz że podział na podtypy sCJD może być tłumaczony w 55,1% przypadków siłą reakcji immunohistochemicznej w neuropilu warstwy molekularnej mózdzku.

Okolica anatomiczna, z której pochodził preparat	Szczegółowa lokalizacja
Kora czołowa	Neurony
	Neuropil
	Komórki glejowe
Mózdzek	Komórki Purkiniego
	Neurony warstwy ziarnistej
	Neurony warstwy molekularnej
	Neuropil warstwy ziarnistej
	Neuropil warstwy molekularnej
	Komórki glejowe
	Włókna istoty białej

Tabela 4. Lista lokalizacji, w których oceniano siłę reakcji immunohistochemicznej

**ANALIZA RÓŻNIC MIĘDZY
GRUPAMI WIEKOWYMI CHORYCH NA sCJD
NA PODSTAWIE WARTOŚCI SIŁY REAKCJI
IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH
Z PRZECIWCIAŁAMI PRZECIW BIAŁKOM
LAMP2 I PrP^{Sc}**

W tabeli 12 podano liczbę osób zakwalifikowanych do przedziałów wiekowych.

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy przedziałami wiekowymi ze względu na średnie wartości siły reakcji immunohistochemicznych w ocenianych lokalizacjach.

**WYNIKI BADAŃ PRZY WYKORZYSTANIU
LASEROWEGO MIKROSKOPU KONFOKALNEGO**

Reakcja immunofluorescencyjna z przeciwciałami przeciw LAMP2 i PrP^{Sc} wykazała obecność depozytów białka LAMP2

Nazwa indeksu złożonego	Składniki indeksu złożonego
LAMP2: kora mózgowia (indeks złożony)	- Neurony kory mózgowej - Neuropil kory mózgowej - Komórki glejowe kory mózgowej
LAMP2: mózdzek (indeks złożony)	- Komórki Purkiniego mózdzku - Neurony warstwy ziarnistej mózdzku - Neurony warstwy molekularnej mózdzku - Neuropil warstwy ziarnistej mózdzku - Neuropil warstwy molekularnej mózdzku - Komórki glejowe mózdzku - Włókna istoty białej mózdzku
PrP: kora mózgowia (indeks złożony)	- Neurony kory mózgowej - Neuropil kory mózgowej - Komórki glejowe kory mózgowej
PrP: mózdzek (indeks złożony)	- Komórki Purkiniego mózdzku - Neurony warstwy ziarnistej mózdzku - Neurony warstwy molekularnej mózdzku - Neuropil warstwy ziarnistej mózdzku - Neuropil warstwy molekularnej mózdzku - Komórki glejowe mózdzku - Włókna istoty białej mózdzku

160 Tabela 5. Lista stworzonych indeksów złożonych

zlokalizowanych wokół złożeń PrP^{Sc}-dodatnich. Przykładowy obraz wzajemnych relacji obu białek przedstawiono na rys. 5.

OMÓWIENIE

Sporadyczna postać choroby Creutzfeldta-Jakoba (sCJD) to śmiertelna choroba neurologiczna z grupy pasażowalnych encefalopatii gąbczastych (TSE), której częstość występowania w populacji światowej szacuje się na około 1:1 000 000⁽⁵¹⁾.

Na podstawie badań prowadzonych w naszym ośrodku udało się oszacować częstość występowania sCJD w populacji polskiej, która w chwili obecnej wynosi około 0,86:1 000 000 (dane własne).

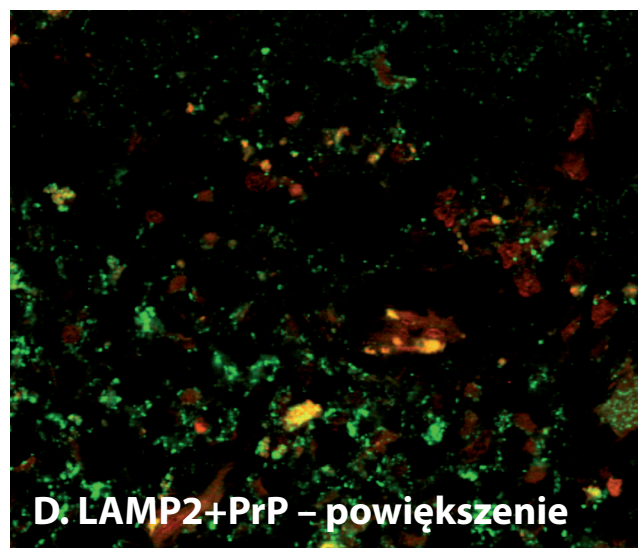
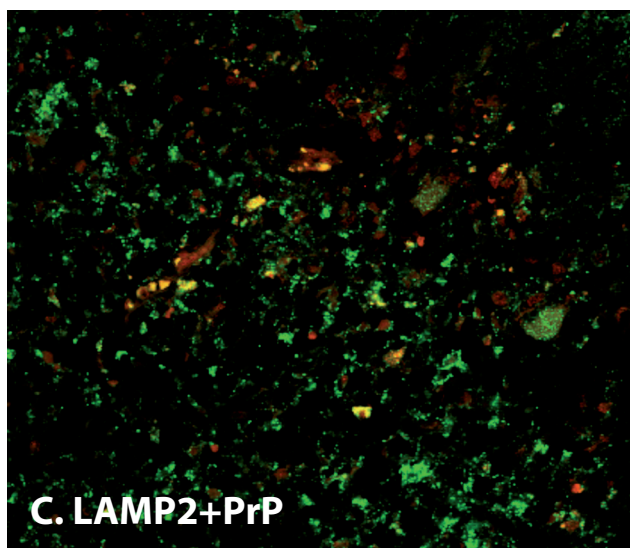
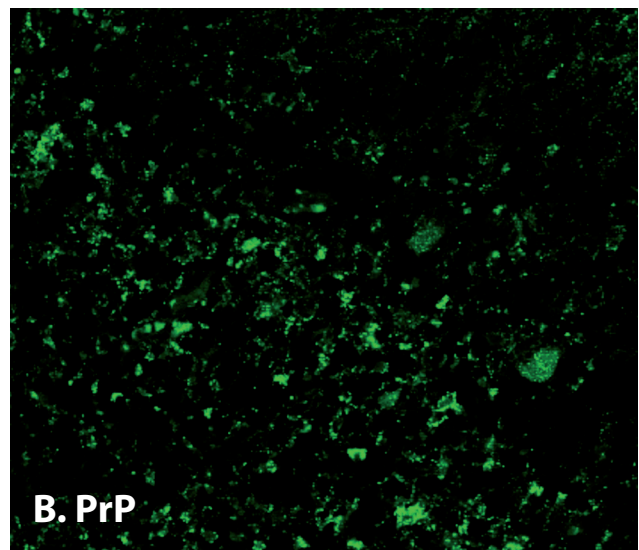
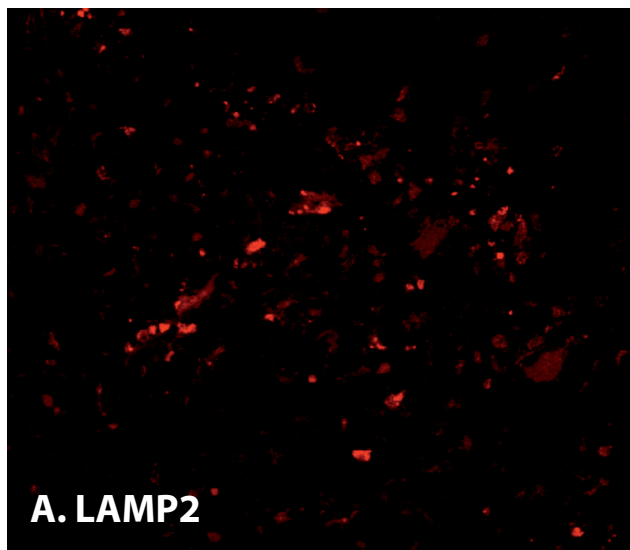
PODTYPY sCJD W GRUPIE BADANEJ

Po dokonaniu oceny podtypów choroby sCJD okazało się, iż w grupie badanej znalazło się 16 przypadków najczęściej wy-

Przedział wiekowy	Nazwa kategorii
30-39	1
40-49	2
50-59	3
60-69	4
70-79	5

Tabela 6. Lista kategorii wiekowych

stępujących w populacji podtypów 1. i 2. Stanowiły one 16/19 (84,2%) wszystkich przypadków, w których udało się ocenić podtyp. Podtyp 3. sCJD był reprezentowany w grupie badanej w 2 przypadkach na 19 (10,5%), natomiast podtyp 5. sCJD wystąpił 1 raz (1/19 – 5,26%). Uzyskane wyniki korespondują z wynikami przedstawionymi przez Gambettiego i wsp.⁽²⁵⁾, gdzie sumaryczną częstość występowania podtypu 1. i 2. sCJD oceniono na 76-86%, podtypu 3. sCJD na 9%, a podtypu 5. na 1% w populacji chorych na sporadyczną postać choroby Creutzfeldta-Jakoba.



Rys. 5. Reakcja immunofluorescencyjna z przeciwciałami przeciw LAMP2 i PrP^{Sc} w mózdzku

Przeciwciało	Producent	Klon	Gatunek gospodarza	Rozcieńczenie	Odmaskowanie antygeny
LAMP2	Santa Cruz	Monoklonalne	Mysz	1:50	Buf. cytrynowy pH 6,0 + łaźnia wodna 20 min
PrP(12F10)	Cayman	Monoklonalne	Mysz	1:300	Buf. cytrynowy pH 6,0 + łaźnia wodna 20 min + kw. mrówkowy 2 min

Tabela 7. Lista przeciwciał użytych do badań immunofluorescencyjnych

Zbieżność wyników reprezentacji poszczególnych podtypów sCJD w grupie badanej z ich częstością występowania w populacji ogólnej pozwala mieć nadzieję, że mimo stosunkowo małej liczebności grupy badanej zaobserwowane wyniki mogą odzwierciedlać procesy zachodzące w populacji ogólnej. Nadmienić jednakże należy, iż w grupie badanej ujawniła się nad-reprezentacja występowania podtypu 2. sCJD (9/19 – 47,4%) w stosunku do danych dostępnych w piśmiennictwie, gdzie częstość populacyjną występowania tego podtypu sCJD oceniono na 16%⁽²⁵⁾. Obserwacja ta może być tłumaczona innym rozkładem częstości występowania podtypów sCJD w populacji polskiej. Nie można jednak wykluczyć, iż stanowi ona artefakt wynikający z oceny statystycznej wyników uzyskanych na grupie badanej o małej liczebności.

ROLA SYSTEMÓW WEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ DEGRADACJI BIAŁEK W PATOGENEZIE CHORÓB NEURODEGENERACYJNYCH

Produkcja białek jest podstawową i niezbędną funkcją każdej komórki. Produkty białkowe regulują wszystkie aspekty jej funkcjonowania. Nie dziwi więc fakt, że w komórkach istnieją precyzyjne mechanizmy odpowiedzialne za kontrolę jakości powstających białek. Fizjologicznie białka, w których procesie syntezy doszło do powstania błędów, są szybko usuwane, co zapobiega ich negatywnym oddziaływaniom na inne procesy przebiegające w komórce.

Wewnątrzkomórkowe systemy degradacji białek (system ubikwitynowo-proteasomalny – UPS, makroautofagia – MA, autofagia mediowana przez chaperony – CMA, i system endosomalno-lizosomalny – ELS) są ze sobą ściśle połączone. Te wzajemne interakcje wydają się odgrywać niebagatelną rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych.

Poniżej zestawiono kilka kluczowych informacji dotyczących wzajemnych relacji pomiędzy wspomnianymi systemami degradacji białek oraz skutki ich wadliwego działania w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych:

- w wielu chorobach neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, choroba Creutzfeldta-Jakoba)

obserwuje się nagromadzenie wakuoli autofagicznych, co może być przejawem zablokowania fuzji autofagosomów z lizosomami⁽⁵²⁻⁵⁴⁾;

- w chorobie Parkinsona istotną rolę odgrywa zmutowana α -synukleina, która gromadząc się przy powierzchni lizosomów, blokuje aktywność procesu CMA i MA^(55,56);
- w badaniach przeprowadzonych na eksperymentalnych modelach chorób neurodegeneracyjnych wykazano, iż zahamowanie procesu autofagii skutkuje pogorszeniem przebiegu choroby^(57,58);
- w chorobach pierwotnie związanych z dysfunkcją lizosomów (*lysosomal storage disorders*) występują zmiany neurodegeneracyjne, a histopatologicznie obserwuje się nagromadzenie w komórkach wakuoli autofagicznych⁽⁵⁹⁾;
- w badaniach prowadzonych na muszkach owocowych oraz myszach wykazano, iż ekspresja zmutowanej postaci enzymu lizosomalnego – katepsyny D, lub jego wyeliminowanie prowadzi do wewnątrzkomórkowej akumulacji autofagosomów i lizosomów⁽⁶⁰⁻⁶²⁾.

W świetle powyżej przedstawionych faktów uzasadniona wydaje się hipoteza, iż system endosomalno-lizosomalny będący istotnym elementem szlaków wewnątrzkomórkowej degradacji białek może odgrywać ważną rolę w patogenezie chorób wywoływanych przez priony.

ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY INTENSYWNOŚCIĄ REAKCJI IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH BIAŁEK LAMP2 I PrP^{Sc}

Wykazano bardzo silną dodatnią korelację między intensywnością reakcji immunohistochemicznej na LAMP2 i PrP^{Sc} w neuropilu kory czołowej mózgu, a także istotną dodatnią korelację siły reakcji immunohistochemicznej na LAMP2 w neuronach warstwy molekularnej kory mózdzku z siłą reakcji immunohistochemicznej na PrP^{Sc} w neuropilu warstwy molekularnej mózdzku.

Powyższe obserwacje mogą być tłumaczone jako przejaw nadaktywności układu endosomalno-lizosomalnego w badanych lokalizacjach.

Fluorochrom	Przeciwciało	Producent	Rozcieńczenie	Inkubacja
Alexa Fluor 488	Kozie antymysie	Molecular Probes	1:100	1 godzina
Alexa Fluor 546	Kozie anty-świnka morska	Molecular Probes	1:100	1 godzina
Alexa Fluor 546	Kozie antykrólicze	Molecular Probes	1:100	1 godzina
Cy7 ^{M5}	Kozie antykrólicze	Jackson ImmunoResearch	1:100	1 godzina

Tabela 8. Fluorochromy użyte do reakcji immunofluorescencyjnych

Uzyskana obserwacja wydaje się zgodna z wynikami badań przeprowadzonych przez Kovácsa⁽⁴⁶⁾, który wykazał, iż w komórkach neuronów kory czołowej u chorych na sCJD zwiększa się reaktywność na Rab5 (marker wczesnych endosomów). W tym samym badaniu wykazano także, iż w neuronach kory czołowej dochodzi do gromadzenia się złożeń PAS-dodatnich (w tym lipofuscyny). Po zestawieniu tych informacji autorzy wyciągają wniosek, iż w opisywanym rejonie mózgowia dochodzi do zwiększonej aktywności układu ELS z cechami jego niewydolności, o czym świadczy wewnątrzkomórkowe gromadzenie się złożeń.

Możliwe jest także, że obecność LAMP2 dodatnio koreluje z PrP^{Sc} jest bezpośrednim przejawem procesów uszkadzających neurony, podobnie jak to wykazano w przypadku badania obecności katepsyny D w mózгах osób chorych na sCJD⁽⁴⁶⁾.

**INTENSYWNOŚĆ REAKCJI
IMMUNOHISTOCHEMICZNEJ
Z PRZECIWCIAŁEM PRZECIWI LAMP2
JAKO CZYNNIK RÓŻNICUJĄCY PODTYPY sCJD**

Wykazano istotne statystycznie zróżnicowanie pomiędzy określonymi podtypami sCJD ze względu na obecność białka LAMP2 w neuropilu warstwy molekularnej i ziarnistej oraz w komórkach glejowych mózdzku. Uzyskany wynik może być odzwierciedleniem istotnego zaangażowania systemu ELS w patogenezę choroby Creutzfeldta-Jakoba. W grupie badanej znalazły się głównie osoby reprezentujące podtyp 1. i 2. sCJD.

Podtyp sCJD	Liczba przypadków wśród grupy badanej
1	7
2	9
3	2
5	1
Nieokreślony	7

Tabela 9. Podtypy sCJD wśród osób badanych

Pomiędzy tymi podtypami występują istotne różnice w stopniu nasilenia zmian w mózdzku⁽²⁵⁾. Możliwe, że zaobserwowane zróżnicowanie wiąże się z tym, iż w podtypie 1. zmiany w mózdzku są mniej nasilone, natomiast w podtypie 2. dominują. Obecność PrP^{Sc} mogłaby przekładać się na obecność białka LAMP2 w mózdzku. Dokładny mechanizm tej zależności nie jest jednak możliwy do wytłumaczenia w oparciu o dane zebrane w przeprowadzonym doświadczeniu.

**IMMUNOEKSPRESJA I WZAJEMNE RELACJE
BIAŁEK LAMP2 I PrP^{Sc} W BADANIACH
Z WYKORZYSTANIEM LASEROWEGO
MIKROSKOPU KONFOKALNEGO**

Uwidoczniona silna immunoekspresja LAMP2 i PrP^{Sc} w materiale pochodzącym z mózdzku chorych na sCJD oraz wykazanie, iż złoże LAMP2 lokalizują się blisko złożeń PrP^{Sc}, wydają się potwierdzać zaobserwowane, istotne statystycznie, dodatnie korelacje siły reakcji immunohistochemicznych pomiędzy tymi białkami.

Korelacja		Współczynnik Pearsona	Istotność statystyczna
PrP: kora mózgu (indeks złożony)	LAMP2: kora mózgu (indeks złożony)	0,618	0,001
LAMP2: kora mózgu (indeks złożony)	PrP: kora mózgu (neuropil)	0,618	0,001
PrP: kora mózgu (indeks złożony)	LAMP2: kora mózgu (neuropil)	0,604	0,001
PrP: kora mózgu (neuropil)	LAMP2: kora mózgu (neuropil)	0,604	0,001
PrP: kora mózgu (indeks złożony)	LAMP2: kora mózgu (komórki gleju)	0,593	0,001
PrP: kora mózgu (neuropil)	LAMP2: kora mózgu (komórki gleju)	0,593	0,001
PrP: kora mózgu (indeks złożony)	LAMP2: mózdzek, neurony w warstwie molekularnej	0,59	0,002
PrP: kora mózgu (neuropil)	LAMP2: mózdzek, neurony w warstwie molekularnej	0,59	0,002
PrP: kora mózgu (indeks złożony)	LAMP2: kora mózgu (neurony)	0,582	0,002
PrP: kora mózgu (neuropil)	LAMP2: kora mózgu (neurony)	0,582	0,002
PrP: kora mózgu (indeks złożony)	LAMP2: mózdzek (indeks złożony)	0,493	0,012
LAMP2: mózdzek (indeks złożony)	PrP: kora mózgu (neuropil)	0,493	0,012
PrP: mózdzek (indeks złożony)	LAMP2: mózdzek, neurony w warstwie molekularnej	0,487	0,014
PrP: mózdzek, neuropil warstwy molekularnej	LAMP2: mózdzek, neurony w warstwie molekularnej	0,464	0,019
LAMP2: mózdzek (indeks złożony)	PrP: mózdzek, neuropil warstwy molekularnej	0,463	0,02
PrP: mózdzek (indeks złożony)	LAMP2: kora mózgu (indeks złożony)	0,432	0,031
PrP: mózdzek (indeks złożony)	LAMP2: kora mózgu (neuropil)	0,431	0,031
PrP: mózdzek (indeks złożony)	LAMP2: kora mózgu (komórki gleju)	0,423	0,035
PrP: mózdzek, neuropil warstwy molekularnej	LAMP2: mózdzek, neurony w warstwie ziarnistej	0,403	0,046
PrP: mózdzek, neuropil warstwy ziarnistej	LAMP2: kora mózgu (komórki gleju)	0,398	0,049

Tabela 10. Istotnie statystycznie dodatnie korelacje ($p < 0,05$) pomiędzy średnimi wartościami siły reakcji immunohistochemicznych dla badanych białek w poszczególnych lokalizacjach oraz pomiędzy wartościami indeksów złożonych

Lokalizacja	Liczba stopni swobody	Istotność statystyczna	ETA2
LAMP2: mózdzek, neuropil warstwy ziarnistej	3	0,001	0,637
LAMP2: kora mózgu (komórki gleju)	3	0,002	0,604
LAMP2: mózdzek, neuropil warstwy molekularnej	3	0,006	0,551
LAMP2: mózdzek (indeks złożony)	3	0,018	0,478
LAMP2: kora mózgu (indeks złożony)	3	0,04	0,416

Tabela 11. Istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) pomiędzy podtypami sCJD ze względu na średnie wartości siły reakcji immunohistochemicznych w ocenianych lokalizacjach oraz wartości indeksów złożonych (ANOVA)

WNIOSKI

W ramach przeprowadzonych badań:

- wykazano obecność silnej dodatniej korelacji pomiędzy intensywnością reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałami przeciw LAMP2 i PrP^{Sc}, co może być interpretowane jako pobudzenie aktywności układu endosomalno-lizosomalnego w neuronach kory czołowej;
- stwierdzono obecność istotnych statystycznie różnic pomiędzy podtypami sCJD w zależności od intensywności reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałami przeciw LAMP2;
- w badaniach z użyciem mikroskopu konfokalnego potwierdzono wykazane statystycznie wzajemne relacje badanych białek.

PODSUMOWANIE

Choroby degeneracyjne ośrodkowego układu nerwowego są dziś istotnym problemem społecznym – szacuje się, że w 2010 roku na całym świecie żyje około 35,6 miliona osób chorych na otępienie, co gorsza, liczba ta może ulec podwojeniu w ciągu najbliższych 20 lat. Nie dziwi więc fakt, że w wielu ośrodkach trwają intensywne prace zmierzające do dokładnego poznania i zrozumienia patomechanizmu chorób neurodegeneracyjnych. Wraz z dokonywanym na tym polu postępem przekonujemy się, że podstawy molekularne tych chorób, pomimo częstokroć różnorodnego obrazu klinicznego, są bardzo zbliżone. Niezależnie od tego, czy pierwotna patologia dotyczy białka huntingtyny, tau, synukleiny czy białka prionu, białka te mają zmienioną konformację (stąd nazwa – choroby konformacyjne) i odkładają się w postaci patologicznych złogów. W świetle ostatnich badań, w tym również przedstawionych wyżej wyników, wydaje się, że śmierć neuronów w tych chorobach jest związana z uszkodzeniem systemów degradujących patologicznie zwinięte białka. W naszych badaniach stwierdziliśmy dodatnią korelację między odkładaniem się patologicznej postaci białka prionu a zwiększeniem aktywności układu endosomalno-lizosomalnego. Utrata komórek nerwowych w danym obszarze mózgu stanowi punkt

Przedział wiekowy	Liczba osób należących do przedziału
30-39	2
40-49	3
50-59	6
60-69	8
70-79	7

Tabela 12. Liczba osób należących do przedziału wiekowego

wyjścia, dający początek wszystkim objawom klinicznym chorób degeneracyjnych ośrodkowego układu nerwowego. Aby w przyszłości móc poważnie myśleć na temat potencjalnej profilaktyki lub leczenia osób dotkniętych tymi chorobami, trzeba zrozumieć działanie systemów wewnątrzkomórkowej degradacji białek.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Kovacs G.G., Budka H.: Molecular pathology of human prion diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10: 976-999.
2. Prusiner S.B.: Prions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1998; 95: 13363-13383.
3. Legname G., Baskakov I.V., Nguyen H.O. i wsp.: Synthetic mammalian prions. *Science* 2004; 305: 673-676.
4. Caughey B., Raymond G.J.: The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 18217-18223.
5. Caughey B., Raymond G.J., Ernst D., Race R.E.: N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J. Virol.* 1991; 65: 6597-6603.
6. Borchelt D.R., Taraboulos A., Prusiner S.B.: Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 16188-16199.
7. Borchelt D.R., Scott M., Taraboulos A. i wsp.: Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell Biol.* 1990; 110: 743-752.
8. Caughey B., Baron G.S.: Prions and their partners in crime. *Nature* 2006; 443: 803-810.
9. Goldfarb L.G., Brown P., McCombie W.R. i wsp.: Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the *PRNP* gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1991; 88: 10926-10930.
10. Prusiner S.B.: The prion diseases. *Brain Pathol.* 1998; 8: 499-513.
11. Pocchiari M., Puopolo M., Croes E.A. i wsp.: Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain* 2004; 127: 2348-2359.
12. Windl O., Giese A., Schulz-Schaeffer W. i wsp.: Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum. Genet.* 1999; 105: 244-252.
13. Alperovitch A., Zerr I., Pocchiari M. i wsp.: Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1999; 353: 1673-1674.
14. 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.

15. Windl O., Dempster M., Estibeiro J.P. i wsp.: Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the *PRNP* gene. *Hum. Genet.* 1996; 98: 259-264.
16. Gambetti P., Parchi P., Petersen R.B. i wsp.: Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: clinical, pathological and molecular features. *Brain Pathol.* 1995; 5: 43-51.
17. Kovács G.G., Head M.W., Hegyi I. i wsp.: Immunohistochemistry for the prion protein: comparison of different monoclonal antibodies in human prion disease subtypes. *Brain Pathol.* 2002; 12: 1-11.
18. Peden A.H., Ritchie D.L., Head M.W., Ironside J.W.: Detection and localization of PrP^{Sc} in the skeletal muscle of patients with variant, iatrogenic, and sporadic forms of Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Pathol.* 2006; 168: 927-935.
19. Peden A.H., Ritchie D.L., Uddin H.P. i wsp.: Abnormal prion protein in the pituitary in sporadic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Gen. Virol.* 2007; 88: 1068-1072.
20. Glatzel M., Abela E., Maissen M., Aguzzi A.: Extranuclear pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 1812-1820.
21. Hainfellner J.A., Budka H.: Disease associated prion protein may deposit in the peripheral nervous system in human transmissible spongiform encephalopathies. *Acta Neuropathol.* 1999; 98: 458-460.
22. Peden A.H., Ironside J.W.: Review: pathology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Folia Neuropathol.* 2004; 42 suppl. A: 85-91.
23. Budka H.: Histopathology and immunohistochemistry of human transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). *Arch. Virol. Suppl.* 2000; (16): 135-142.
24. Ironside J.W., McCardle L., Horsburgh A. i wsp.: Pathological diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *APMIS* 2002; 110: 79-87.
25. Gambetti P., Kong Q., Zou W. i wsp.: Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br. Med. Bull.* 2003; 66: 213-239.
26. Parchi P., Zou W., Wang W. i wsp.: Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97: 10168-10172.
27. Taylor J.P., Hardy J., Fischbeck K.H.: Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 2002; 296: 1991-1995.
28. Ciechanover A., Orian A., Schwartz A.L.: Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 2000; 22: 442-451.
29. Ciechanover A., Brundin P.: The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 2003; 40: 427-446.
30. Vabulas R.M., Hartl F.U.: Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science* 2005; 310: 1960-1963.
31. Wheatley D.N., Inglis M.S.: An intracellular perfusion system linking pools and protein synthesis. *J. Theor. Biol.* 1980; 83: 437-445.
32. Nedelsky N.B., Todd P.K., Taylor J.P.: Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1782: 691-699.
33. Dice J.F.: Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 2007; 3: 295-299.
34. Cuervo A.M., Dice J.F.: A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 1996; 273: 501-503.
35. Dice J.F.: Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 1990; 15: 305-309.
36. Vellodi A.: Lysosomal storage disorders. *Br. J. Haematol.* 2005; 128: 413-431.
37. Nixon R.A., Cataldo A.M.: The endosomal-lysosomal system of neurons: new roles. *Trends Neurosci.* 1995; 18: 489-496.
38. Harris D.A.: Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12: 429-444.
39. Harris D.A.: Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br. Med. Bull.* 2003; 66: 71-85.
40. Laszlo L., Lowe J., Self T. i wsp.: Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J. Pathol.* 1992; 166: 333-341.
41. Arnold J.E., Tipler C., Laszlo L. i wsp.: The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J. Pathol.* 1995; 176: 403-411.
42. Schätzl H.M., Laszlo L., Holtzman D.M. i wsp.: A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J. Virol.* 1997; 71: 8821-8831.
43. Fournier J.G., Grigoriev B.: Prion diseases: contribution of high-resolution immunomorphology. *J. Cell. Mol. Med.* 2001; 5: 367-377.
44. Porto-Carreiro I., Février B., Paquet S. i wsp.: Prions and exosomes: from PrP^{Sc} trafficking to PrP^{Sc} propagation. *Blood Cells Mol. Dis.* 2005; 35: 143-148.
45. Doh-Ura K., Iwaki T., Caughey B.: Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J. Virol.* 2000; 74: 4894-4897.
46. Kovács G.G., Gelpi E., Ströbel T. i wsp.: Involvement of the endosomal-lysosomal system correlates with regional pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2007; 66: 628-636.
47. Timperley W.R., Mann D.M., Neary D., Davies S.: Creutzfeldt-Jakob disease: a histochemical study with microdensitometric assay of some enzymes. *Acta Neuropathol.* 1973; 26: 207-215.
48. Manuelidis E.E., Gorgacz E.J., Manuelidis L.: Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease with scrapie-like syndromes to mice. *Nature* 1978; 271: 778-779.
49. Boellaard J.W., Schlote W., Tateishi J.: Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. *Acta Neuropathol.* 1989; 78: 410-418.
50. Blanz J., Walkley S.U., Saftig P.: Role of LAMP2 in neuronal autophagy. *Abstracts/Molecular Genetics and Metabolism* 2009; 96: 12-47.
51. EURO-CJD. The European and Allied Countries Collaborative Study Group of CJD (<http://www.eurocjd.ed.ac.uk/>). 2010.
52. Anglade P., Vyas S., Javoy-Agid F. i wsp.: Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* 1997; 12: 25-31.
53. Nixon R.A., Wegiel J., Kumar A. i wsp.: Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immunoelectron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005; 64: 113-122.
54. Sikorska B., Liberski P.P., Giraud P. i wsp.: Autophagy is a part of ultrastructural synaptic pathology in Creutzfeldt-Jakob disease: a brain biopsy study. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36: 2563-2573.
55. Cuervo A.M., Stefanis L., Fredenburg R. i wsp.: Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2004; 305: 1292-1295.
56. Massey A.C., Kaushik S., Sovak G. i wsp.: Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006; 103: 5805-5810.
57. Pandey U.B., Nie Z., Batlevi Y. i wsp.: HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 2007; 447: 859-863.
58. Pickford F., Masliah E., Britschgi M. i wsp.: The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 2190-2199.

59. Nixon R.A., Yang D.S., Lee J.H.: Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* 2008; 4: 590-599.
60. Koike M., Nakanishi H., Saftig P. i wsp.: Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *J. Neurosci.* 2000; 20: 6898-6906.
61. Myllykangas L., Tyynelä J., Page-McCaw A. i wsp.: Cathepsin D-deficient *Drosophila* recapitulate the key features of neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurobiol. Dis.* 2005; 19: 194-199.
62. Shacka J.J., Klocke B.J., Young C. i wsp.: Cathepsin D deficiency induces persistent neurodegeneration in the absence of Bax-dependent apoptosis. *J. Neurosci.* 2007; 27: 2081-2090.

W dniach 7-8 kwietnia 2011 r. Katedra Neuropsychologii Klinicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy oraz Wydawnictwo FORUM organizują konferencję naukową:

Neuropsychiatria i Neuropsychologia w Medycynie

Kierownikiem Komitetu Naukowego konferencji jest **Prof. Alina Borkowska**.

- Podczas konferencji zostaną omówione m.in. następujące zagadnienia:
 - Neurobiologia funkcji psychicznych
 - Neuropsychologia w neurochirurgii
 - Neuropsychologia w chorobach somatycznych
- Neuropsychologiczne aspekty chorób układu sercowo-naczyniowego
 - Neuropsychologia procesów decyzyjnych
- Farmakoterapia dysfunkcji poznawczych w chorobach neurologicznych

Szczegóły dotyczące konferencji znajdują Państwo na stronie internetowej:
www.neuropsychologia2011.pl

Komitet naukowy:

Prof. Alina Borkowska
 Prof. Marek Harat
 Prof. Jerzy Samochowiec
 Prof. Andrzej Tretyn
 Prof. Marcin Wojnar
 Prof. Jerzy Vetulani

Biuro organizacyjne:

Wydawnictwo FORUM Sp. z o.o.
 ul. Polska 13
 60-595 Poznań
 tel.: 61 66 55 800
 faks: 61 66 55 888
 e-mail: infolinia@e-forum.pl

