

# Patolojik Prion Proteininin Tespiti

DETECTION OF PATHOGENIC PRION PROTEIN

**Murat ŞEVİK**

*Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı*

### ÖZET

Bu makalede, prion hastalıklarının tanısında kullanılan güncel yöntemler hakkında bilgiler verilmektedir. Prion hastalıkları, patolojik prionların neden olduğu nörodejeneratif hastalıklardır. Patolojik prionlar (PrP<sup>Sc</sup>), konak tarafından kodlanan prion proteininin (PrP<sup>C</sup>), anormal izoformlarıdır. PrP<sup>C</sup>'nin, PrP<sup>Sc</sup>'e spontan dönüşümü, nöronlarda ve farklı dokularda (beyin dokusu, lenf bezleri ve tonsiller gibi) PrP<sup>Sc</sup> birikimine yol açmaktadır. Prion hastalıklarının tanı yöntemlerinin birçoğu, nöronlarda ve dokulardaki PrP<sup>Sc</sup>'nin tespitine dayanmaktadır. Güvenilir bir tanı metodunun ön koşulu, birçok örnekte PrP<sup>Sc</sup>'i yüksek oranda tespit etmesidir. Bu amaç doğrultusunda, PrP<sup>Sc</sup>'i tespit etmek için çeşitli yöntemler ve prion enfeksiyonuna duyarlı hücre hatları geliştirilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Prion, insan, hayvan, nöron, tanı yöntemleri

### SUMMARY

This article gives information about the current methods used in diagnosis of prion diseases. Prion diseases are neurodegenerative disorders caused by pathogenic prions. Pathogenic prions are abnormal isoform of prion protein (PrP<sup>C</sup>), is a host-encoded molecule. PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup> spontaneous conversion leads to PrP<sup>Sc</sup> accumulation in neurons and different tissues (such as brain tissue, lymph nodes and tonsils). Most of the diagnostic methods for prion diseases are dependent on PrP<sup>Sc</sup> detection in neurons and tissues. High rate PrP<sup>Sc</sup> detection in many different samples is a prerequisite for a reliable diagnostic method. For this purpose, several methods and cell lines that are susceptible to prion infection have been developed for detection of PrP<sup>Sc</sup>.

**Key words:** Prion, humans, animals, neuron, diagnostic methods

### Murat ŞEVİK

Veteriner Kontrol Enstitüsü

Müdürlüğü

Moleküler Mikrobiyoloji

Laboratuvarı

**Tel:** (332) 322 47 41

**Faks:** (332) 320 3798

**Gsm:** (542) 486 22 35

**e-posta:** dr\_muratak@hotmail.com

Bulaşıcı Spongiform Ensefalopatiler (TSE) olarak da bilinen prion hastalıkları, hem insanları hem de hayvanları etkileyen ölümcül nörodejeneratif hastalıklardır. Patojenik mekanizmaları farklılık göstermekle birlikte, Hüresel Prion Proteininin (PrP<sup>C</sup>), Scrapie İzoformu olan Prion Proteinine (PrP<sup>Sc</sup>) konformasyonel dönüşümü bütün

prion hastalıklarında ortak etiyolojik özelliştir (1).

PrP<sup>C</sup>, immun sistem hücrelerinde ve merkezi sinir sisteminde, yüksek konsantrasyonlarda ekspres edilen, bir membran glikoproteindir (2,3). İnsan prion proteini, 253 amino aside sahip bir protein olarak, kromozom 20'in kısa kolunda yer alan PRNP geninde üretilir (4). PrP<sup>C</sup>'nin mo-

leküler yapısı, N ve C terminal bölgelerinden oluşmaktadır. N terminal ucu, son derece esnek ve genellikle çözünür proteininin, yapısal olmayan formu olarak şekillenir. N terminal ucunun, PrP<sup>Sc</sup>'nin β tabakasının yapılındırmasında görev aldığı düşünülmektedir. C terminal ucu ise, 3 adet α heliks ve 2 adet kısa anti-paralel β ipliğinden oluşan globüler bir alandır (1). PrP<sup>C</sup>'nin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, nöronal sinyal transdüksiyon süreçlerinde ve metal metabolizmada fonksiyonlarının olduğu ileri sürülmektedir (5). PrP<sup>C</sup> ve PrP<sup>Sc</sup> izoformlarının birbirinden ayırt edilmesinde sahip oldukları moleküler yapılar dikkate alınmaktadır. PrP<sup>C</sup>'nin %42'si α heliks, %3'ü β tabaka iken, PrP<sup>Sc</sup>'nin %30'u α heliks, %43'ü β tabakasıdır (1). Ayrıca PrP<sup>C</sup>, proteinaz K'a duyarlı iken, PrP<sup>Sc</sup> proteinaz K'a karşı dirençlidir (3).

PrP<sup>C</sup>'nin, PrP<sup>Sc</sup>'e spontan olarak dönüştüğü veya PrP<sup>C</sup>'i kodlayan gende (insanlarda PRNP geni) meydana gelen mutasyonlar sonucu, PrP<sup>Sc</sup> şekillendiği varsayılmaktadır. Fakat mutasyonlar olmadan konformasyonel değişikliklerin nasıl gerçekleştiği henüz bilinmemektedir (4).

## PRİON HASTALIKLARI

TSE etiyojisinde horizontal, vertikal bulaşma ve genetik predispozisyon söz konusudur. Klinik olarak hastalığın meydana gelmesinden önce aylarca veya yıllarca süren bir inkübasyon süresi gözlenmektedir (6). Hastalık, nöronal kayıp ve beyinin spongiform dejenerasyonu ile birlikte aktive olmuş astrositler ve mikroglia ile karakterizedir (7). İnsan ve hayvanlarda belirlenen prion hastalıkları, Tablo'da gösterilmektedir (8).

İnsanlarda prion hastalıklarının en sık görülen formu, her yaşta ve etnik gruptaki, kadın ve erkekleri etkileyen, sCJD'dir. PRNP geninin, metionin ve valin polimorfik bölümlerinin, sporadik, iatrojenik ve variant CJD duyarlılığını etkilediği tespit edilmiştir. Kafkas nüfusunun %40 ile yapılan bir araştırmada, sCJD hastaların yaklaşık %60'ının, vCJD hastalarının %100'ünün metionin homozigot olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, prion hastalıklarının kalıtsal olmayan formları arasında genetik yatkınlık olabileceğini göstermektedir. sCJD'nin, genel ölüm oranı her yıl yaklaşık 1 milyon insanda 1-2 vakadır (9).

**Tablo.** Prion hastalıkları

Hastalık adı	Konak	Patogenez Mekanizması
Kuru	İnsan	Törenselleşme ile enfeksiyon
iCJD	İnsan	Prion ile kontamine HGH, dura mater grefti ile enfeksiyon
vCJD	İnsan	Sığır prionları ile enfeksiyon
fCJD	İnsan	PrP geninde germline mutasyonlar
sCJD	İnsan	Somatik mutasyon veya PrP <sup>C</sup> 'nin, PrP <sup>Sc</sup> 'e spontan dönüşümü
GSS	İnsan	PrP geninde germline mutasyonlar
FFI	İnsan	PrP geninde germline mutasyonlar
FSI	İnsan	Somatik mutasyon veya PrP <sup>C</sup> 'nin, PrP <sup>Sc</sup> 'e spontan dönüşümü
Scrapie	Koyun, Keçi	Genetik olarak duyarlı hayvanlarda enfeksiyon
BSE	Sığır	Prion ile kontamine et ve kemik unu ile enfeksiyon
TME	Vizon	Koyun veya sığır prionları ile enfeksiyon
CWD	Katır geyiği, elk	Bilinmiyor
FSE	Kedi	Prion ile kontamine sığır dokuları, et ve kemik unu ile enfeksiyon
EUE	İri ceylan, Nyala Afrika antilobu	Prion ile kontamine et ve kemik unu ile enfeksiyon

iCJD, iatrojenik Creutzfeldt- Jakob hastalığı (CJD); vCJD, varyant CJD; fCJD, familial (ailesel) CJD; sCJD, sporadik CJD; GSS, Gerstmann-Sträussler-Scheinker hastalığı; FFI, fatal familial insomnia; FSI, fatal sporadik insomnia; BSE, bovine spongiform ensefalopati; TME, transmissible mink ensefalopati; CWD, chronic wasting disease; FSE, feline spongiform ensefalopati; HGH, human growth hormone (insan büyüme hormonu); EUE, egzotik toynaklı ensefalopati

Aile içinde genetik olarak ortaya çıkan fCJD oranının yaklaşık %10 ile %20 arasında olduğu ve fCJD vakalarının PRNP geninin, kodon 200 mutasyonları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (9,10). Ayrıca Brezilya'da bir ailede, PRNP geninin kodon 183 mutasyonunun da, fCJD'e neden olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada, ailede 3 kuşak boyunca 17 kişinin hastalıktan etkilenmiş olabileceği belirlenmiştir (11).

Britanya'da, 1995 yılında BSE ile kontamine gıdaların, insanlar tarafından tüketilmesi ile vCJD vakalarının ortaya çıktığı bildirilmiştir. Deneysel çalışmalar sonucu elde edilen patolojik ve biyokimyasal kanıtlar ile vCJD ve BSE'e aynı prion ajanının neden olduğu doğrulanmıştır (12). Özellikle genç insanlarda görülen hastalığın bu formu, 20'li yaşlarında, 200 insanın ölümüne neden olmuştur (9).

Nadiren de olsa, insandan insana prion hastalıklarının nakli, cerrahi aletlerin yanlış dekontaminasyonu, insan kadavra dokularından alınan biyolojik ürünlerin kullanımı ya da kan transfüzyonu ile gerçekleşmektedir (9). Bu şekilde nakledilen iCJD, ilk kez Duffy ve ark. tarafından, korneal greft uygulamasından 18 ay sonra, otopsi bulguları ile CJD olduğu tespit edilen 55 yaşındaki bir hastada bildirilmiştir (35). Korneal greft donörünün de, CJD sonucu öldüğü, otopsi sonucu ile doğrulanmıştır. O tarihten itibaren, kornea grefti ile olası CJD nakli riski bulunan 2 vaka sırasıyla, Almanya ve Japonya'da bildirilmiştir. Alman hasta, korneal greft uygulamasından 30 yıl sonra 46 yaşında ölmüştür. Japon hastada da CJD varlığı, otopsi sonucu ile doğrulanmıştır (13).

Epidemik bulaşıcı bir hastalık olan Kuru, 1950'lerde Papua Yeni Gine'deki, Fore kabilesinde tespit edilmiştir. Hastalığın, ritüel bir ceneaze töreni sırasında ölen insanın beyininin kafatasından çıkarılıp, pişirilip yenmesi ile insanlara bulaştığı belirlenmiştir (14). Kuru, onlarca yıl süren (50 yıla kadar) inkübasyon süresine sahiptir (15).

En yaygın ailesel TSE, GSS'dir. Genellikle hayatın üçüncü veya dördüncü on yılında meydana gelir. GSS'e neden olan mutasyon (P102L) ilk kez 1989 yılında Hsiao tarafından belirlenmiştir. Daha sonra prion protein geninin farklı kodonlarında (kodon 102, 105, 117, 145, 198) meydana gelen birçok mutasyonun da, GSS'e neden olduğu tespit edilmiştir (11,15).

FFI ismi ilk kez, 1986 yılında Lugaresi ve ark. tarafından, progresif insomni, otonomik disfonksiyon, dizartri, tremor ve miyoklonusu olan 52 yaşındaki bir hastada kullanılmıştır. Hastanın beş kuşak boyunca ki akrabaları arasında yapılan çalışmada, 7 kişinin nöropatolojik inceleme sonucu FFI olduğu, 22 kişinin ise muhtemelen FFI'dan öldüğü tespit edilmiştir (11). Kalıtsal bir prion hastalığı olan FFI, PRNP geninin kodon 178'indeki missense mutasyonlar ile ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte, PRNP geninde mutasyon şekillenmeden de gelişen, sporadik FFI vakaları bildirilmiştir (16).

### HASTALIĞIN TANISI

Virüs ve bakteriler tarafından meydana getirilen hastalıklardan farklı olarak prion hastalıklarının, serolojik veya hücre kültür analizleri ve PCR gibi yöntemler ile tanımlanması güçtür. Çünkü enfeksiyöz ajan olan prionun, nükleik asit bileşeni yoktur ve normal konak prion proteininin anormal biçimi olarak meydana gelmektedir. Enfekte organizma tarafından yabancı bir organizma olarak tanımlanmadığı için, immünolojik yanıt gözlenmemektedir. Prion hastalıkları, genellikle kliniksel olarak tanımlanmakta ve beyin dokusunun post-mortem histopatolojik analizi ile doğrulanmaktadır. Prion hastalıklarının tespitinde şuan tek güvenilir moleküler belirleyici, PrP<sup>Sc</sup>'dir. Hastalığın tanısında, PrP<sup>Sc</sup>'nin merkezi sinir sisteminde ve lenforetiküler dokularda varlığı araştırılmaktadır (6).

### Tanı için Kullanılan Metotlar

1."Western Blot": İmmünolojik bir yöntem olan "western blot" tekniği, beyin ve diğer dokulardaki proteinaz K dirençli, PrP fragmentlerinin tespitine dayanmaktadır. Testin prensibi, monoklonal antikorların patolojik prionlara selektif olarak bağlanması ve takiben renk reaksiyonu vermesidir. Test prosedürüne göre beyin ya da omurilik parçaları homojenize edilerek, proteinaz K ile parçalanmakta ve poliakrilamid jele aktarılmaktadır. Örnek elektroforetif olarak ayırımından sonra bir membrana transfer edilmekte ve monoklonal antikorlar kullanılarak kemilüminesans yardımıyla patojen prion proteinleri saptanmaktadır. Patolojik prion proteinleri, proteinaz K ile parçalanmadıklarından, protein bantları immünolojik olarak işaretlenmekte ve boyanmaktadır (6, 17).

“Western blot” testinde oluşan bantların yoğunluğu, protein glikolizasyonunun miktarını gösteren bir değerdir (6,18). Collinge ve meslektaşları, bant yoğunluğunun sporadik, iatrojenik ve yeni variant CJD (nvCJD)’in ayrımında kullanılabileceğini bildirmişlerdir (36). Yaptıkları analizlerde, 4 tip bant oluşumunu tespit etmişlerdir. Bovine spongiform ensefalopati (BSE) ile nvCJD’nin aynı bant örneğini (tip-4), sCJD’nin tip-1 ve tip-2, iCJD’nin ise tip-3 bandını gösterdiklerini bildirmişlerdir (11). “Western blot” tekniği, sodyum fosfotungstik asit ile PrP<sup>Sc</sup>’nin presipitasyonu gibi ekstraksiyon metotları ile genişletilebilmektedir. Hamster beyin homojenatında, insan serebrospinal sıvısında, beyin dokusunda ve idrarında mevcut olan düşük veya yüksek konsantrasyonlardaki, PrP<sup>Sc</sup>’lerin sensitivitesinin, streptomisin presipitasyonu ile dikkat çekici şekilde arttığı tespit edilmiştir (19).

2. ELISA: Bu yöntemde, monoklonal antikorla kaplı pleytlere dilüe edilmiş örnek uygulanmakta ve antikora bağlı bir deteksiyon sistemi ile PrP<sup>Sc</sup> miktarı belirlenmektedir (18). Proteinaz ile muamele işlemini içeren örnek hazırlama aşamasını, presipitasyon ve analiti zenginleştirmek için gerçekleştirilen santrifüj adımları takip eder. Renk dönüştürücü enzim ile birleşmiş antikorun kullanıldığı sandviç ELISA ile tanımlama yapılır. Tanımlama kemilüminesans ile gerçekleşir. Kemilüminesans ile tanımlamada, “cut-off” değerleri kullanılır (6).

Sandviç ELISA yöntemi ile 1 LD<sub>50</sub> (öldürücü etkili doz) BSE enfektivitesinden daha az oranda PrP<sup>Sc</sup> içeren örneklerdeki ve klinik semptom başlangıcından önce, BSE’li sığır beyinlerindeki PrP<sup>Sc</sup> varlığı tespit edilebilmektedir (18). ELISA testleri, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olup scrapie, BSE ve CWD’in sürveyans programlarındaki çok sayıda numunenin taranması için kullanılmaktadır (12).

3. İmmunhistokimya (IHC): Amiloid plak birikimi, astrogliosis ve nöral hücrelerin kaybolması gibi prion hastalıkları için tipik olan özellikler, beyin kesitlerinin, IHC analizi ile tespit edilebilmektedir (17). IHC, formalin ile fiske edilmiş, dondurulmuş ve parafine gömülü doku örneklerindeki, PrP<sup>Sc</sup>’nin in situ belirlenmesine ve prion hastalıklarında oluşan amiloid plakların, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda oluşan nöritik plaklardan

ayrımına, imkân sağlamaktadır (6, 20). Beyindeki, PrP immunpozitif amiloid plaklar, bazı prion hastalıkları için son derece spesifik bir tanı özelliğidir. Bütün Gerstmann-Sträussler-Scheinker hastalarında ve bazı CJD hastalarında, PrP immunpozitif amiloid plaklar bulunmaktadır. vCJD’de spongiform vakuoller ile çevrelenmiş florid plaklar, diğer insan prion hastalıklarında bulunmamaktadır. Bu plaklar, vCJD’i diğer prion hastalıklarından ayıran bir patogenezdır. Benzer florid plakların, BSE ile enfekte maymunlarda bulunması, vCJD ve BSE’e aynı prion türünün neden olduğu hipotezinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (6).

IHC, sadece PrP<sup>Sc</sup>’nin varlığını tespit etmez. Aynı zamanda PrP<sup>Sc</sup>’nin beyin ve lenfoid dokulardaki dağılımını da ortaya çıkarır. Astroitik marker protein olan Glial Fibriller Asidik Proteine (GFAP), karşı antikorlar kullanılarak yapılan immunhistokimyasal boyama ile astroitik glikozun, beyin dokusundaki derecesi belirlenebilmektedir. Bazı prion türlerinin (vCJD, scrapie ve CWD), yoğun lenfotropizme sahip olması nedeniyle, immunhistokimyanın TSE’lerin prelinik tanısında kullanılması önerilmektedir. Yakın geçmişte yapılan bir çalışmada, IHC ile oral olarak CWD prionlarına maruz kalan bir geyiğin, lenfoid dokularında, 42 gün sonra patolojik PrP proteini saptanmıştır. Yapılan diğer bir çalışmada bir sığır, 100 gr BSE’li beyin ile oral olarak enfekte edilmiş ve farklı zamanlarda analizler yapılmıştır. Klinik olarak belirtilerin görülmesinden çok kısa bir süre önce histolojik olarak pozitif sonuç elde edilmiş iken, immunhistokimyasal teknikler ile 6 ay önceden, PrP<sup>Sc</sup> birikimi tespit edilmiştir (6).

4. “Bioassay”: Deneysel olarak hayvanların enfekte edilerek, diagnostik ve araştırma uygulamaları ile prion türünün tanımlanmasını amaçlayan bir metottur. Bu metot ile dokulardaki PrP<sup>Sc</sup> enfektivitesi hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. “Biyosassay” analizleri uzun sürmekte (BSE’nin, RIII faresindeki inkübasyonu 408 gündür) ve yoğun iş gücü gerektirmektedir. Sonuçları yorumlamak her zaman kolay değildir. Homolog türler arasında yapılan, “bioassay” çalışmaları en duyarlı yöntemdir. Örneğin, BSE için dana “bioassay”leri, fare “bioassay”lerinden daha duyarlıdır. Deneysel olarak enfekte edilebilecek tür çeşidinin sınırlı olması insan, koyun, geyik, elk ve büyükbaş PrP genlerini taşıyan, transgenik farelerin üretilmesini

sağlamıştır (7). Transgenik fareler, BSE prionları ile enfekte olmaya karşı, sığırlardan 10 kat, RIII farelerden 1000 kat daha duyarlı sığır PrP<sup>Sc</sup>'leri eksprese ederler (6). Ayrıca, doğal konağa genetik yakınlıklarından dolayı inkübasyon süreleri kısalmıştır (7). Bu özellikleri transgenik fareleri, insan ve sığır prionların tanımlanmasında önemli kılmaktadır (6).

5. Hücre Kültür Teknikleri: Hücre kültür modelleri, prion enfeksiyon çalışmalarında PrP<sup>Sc</sup> oluşumunun moleküler mekanizmasının ve hücre otonom modelinde PrP<sup>C</sup>'nin, PrP<sup>Sc</sup>'e dönüşümünde, PrP'nin amino asit diziliminin ve yapısal kısımlarının daha iyi anlaşılmasını sağlamak için tasarlanmaktadır. Prion enfeksiyon mekanizması çalışmalarında, farklı duyarlı hücreler (N2a; fare nöroblastoma, PC12; rat feokromositoma gibi) kullanılmaktadır. Nörohipotalmik hücre olan GT1, yüksek seviyelerdeki PrP<sup>C</sup> ekspresyonları gösterir ve prion hastalıklarına, diğer hücrelerden daha duyarlıdır. Prion hassas farklı hücrelerin bulunması, prion enfeksiyonlarının araştırılabileceği yeni hücre kültür modellerinin geliştirilmesini kolaylaştırmaktadır. Prion enfekte beyinlerden elde edilen primer kültürler, devamlı pasajlanan hücreleri kolaylıkla sağlamaktadır. Örneğin, ScHB (scrapie ile enfekte hamster beyin hücresi) ve SMB (scrapie ile enfekte fare beyin hücresi) prion ile enfekte hayvanlardan üretilmiştir. Günümüzde insan embriyonik kök hücreleri, prion hastalıklarının enfeksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasında kullanılmaya başlamıştır (17).

Enfektivite ve öldürücü etkili dozun tespit çalışmalarında, hücre kültürleri de kullanılmaktadır. Prion ile enfekte hayvanların beyin homojenatları, pasajlanmadan 1-2 gün önce kültür ortamına eklenir. Her hücrenin enfektivitesi veya PrP<sup>Sc</sup> üretimi, prion ile enfeksiyon oranına göre belirlenir. Enfektivite, hücreler intraserebral inokülasyon ile deney hayvanlarının beyinlerine enjekte edildikten sonra ölçülür. Deney hayvanları beynine enjekte edilmeden önce hücreler, tekrar eden donma-erime çevrimi ile lize edilir. 1 yıl boyunca PrP<sup>Sc</sup> tespit edilen hücreler ve hayvanlar "western blot" ile kontrol edilir. Yapılan gözlemlerden sonra LD<sub>50</sub> dozu, lizat enjekte edilen hayvanların hayatta kalma eğrisinden elde edilir (17).

6. Histo Blot: Bu yöntem ile anatomik doku korunarak,

dokulardaki duyarlı proteinler belirlenir. Bu yöntemin bir dezavantajı, fikse edilmemiş materyale ihtiyaç duyulmasıdır. Beyindeki küçük miktarlardaki, PrP<sup>Sc</sup>'nin tanımlanması için kullanışlı bir metottur. Taze, fikse edilmemiş beyin dokuları, nitroselüloz membran üzerinde kurutulur ve PrP<sup>C</sup>'i elimine etmek için proteinaz K ile muamele edilir. Guanidin hidroklorid ile proteinaz dirençli PrP<sup>Sc</sup> denatüre edilir ve immunhistokimyasal yöntemle, PrP<sup>Sc</sup> belirlenir (21, 22).

7. Cell Blot: Lamel üzerinde gelişen hücrelerin, nitroselüloz membrana transfer edilerek, proteinaz K dirençli PrP'lerin, "western blot" ile belirlenmesini kapsayan bir yöntemdir (17). Çoklu bağımsız hücre kültürlerindeki prion enfeksiyonlarının belirlenmesinde ve PrP<sup>Sc</sup> seviyelerinin karşılaştırılmasında duyarlı ve hızlı bir yöntemdir (23).

8. Slot Blot: Bu yöntemde, nitroselüloz membrandan hücre lizatı filtre edilir, anti-PrP antikorlar kullanarak, proteinaz K dirençli PrP belirlenir (17). Slot blot analizinde, amiloid reaksiyonu sırasında bölünen oligomerler ile ortamda artan oluşumların belirlenmesi için spesifik prion aptameri olan SAF-93 kullanılır (24).

9. Pet Blot: İnkübasyon süresinin erken evrelerinde, PrP<sup>Sc</sup> varlığının belirlenebildiği oldukça duyarlı ve spesifik bir yöntemdir. Deneysel olarak enfekte edilen farede, intraserebral inokülasyondan 30 gün sonra, klinik belirtiler ortaya çıkmadan 145 gün önce beyindeki PrP<sup>Sc</sup> varlığı, PET blot yöntemi ile tespit edilmiştir. Bu yöntemde formalinle fikse edilmiş, parafin bloklarda saklanan doku, yoğun biçimde proteinaz K ile muamele edilir ve daha sonra direkt olarak nitroselüloz membrana taşınır. Membrandaki PrP<sup>Sc</sup>, yüksek derecede duyarlık gösteren, spesifik antikorlar kullanılarak belirlenir (21).

10. Protein Misfolding Siklik Amplifikasyon (PMCA): Konsept olarak DNA'nın polimer zincir reaksiyonu ile amplifikasyonuna benzemektedir (17). PMCA teknolojisi, in vivo PrP<sup>Sc</sup> replikasyonunun hızlandırılmış sikluslarını içeren bir metottur. Her siklus, 2 aşamadan (inkübasyon ve sonikasyon) oluşmaktadır. İlk aşamada düşük oranda PrP<sup>Sc</sup> ve yüksek oranda PrP<sup>C</sup> içeren örnek, PrP<sup>Sc</sup> polimerlerinin gelişmesini teşvik etmesi için inkübe edilir. İkinci aşamada ise polimerleri yıkmak için örneğe ultrason uygulanarak, konvertör ünitelerin sayısı artırılır. Bu 2 aşama,

her siklusta uygulanarak, elde edilen PrP<sup>Sc</sup> miktarı artırılır (25). Siklik amplifikasyondan sonra örnekte yeni şekillenirilen proteinlerin, %97'sinden fazlası PrP<sup>Sc</sup> olduğu tespit edilmiştir (26).

Dokulardaki ve biyolojik sıvılardaki belirlenemeyen, prion proteinleri ile enfekte presemptomatik hamsterların kanındaki prion bu yöntem ile tespit edilmiştir (17). Ayrıca süt ve idrar gibi çeşitli sekresyonlardaki ve hayvanlar tarafından kontamine edildiği varsayılan toprak ve sudaki PrP<sup>Sc</sup>, PMCA yöntemi ile belirlenebilmektedir (12).

11. Konformasyon Bağlı İmmunassay (CDI): Bu yöntemde, PrP<sup>Sc</sup>'i selektif olarak çökeltmek için, doku homojenatları sodyum fosfotungstik asit ile inkübe edilir. PrP<sup>C</sup> ve PrP<sup>Sc</sup>'i birbirinden ayırmak için denatürasyon, proteinaz K yerine guanidin hidroklorid ile yapılmaktadır (27). Tespit edici antikor, enfekte olmamış formda (PrP<sup>C</sup>) her zaman görülen ama enfeksiyöz formun (PrP<sup>Sc</sup>) sadece denatürasyon sırasında görülen, konformasyon bağımlı epitopu (antijen molekülündeki kimyasal uç yapılar) belirlemek için kullanılır. Antikor bağlanma miktarı, denatüre PrP<sup>Sc</sup> ve doğal PrP<sup>Sc</sup> arasındaki sinyal farklılıklarına bağlı olarak değişir. Sinyal farklılıkları, doku homojenatlarındaki PrP<sup>Sc</sup>'nin tanımlayıcı bir kriteri olarak kullanılır (6).

12. Genişletilmiş Disosiyasyon Lanthanide Floresan İmmunassay (DELFLIA): Bu yöntemde, guanidin hidroklorür ile PrP<sup>Sc</sup> ekstraksiyonu gerçekleştirilir (17). PrP'i çözündürmek için guanidin hidroklorür, iki farklı konsantrasyonda uygulanır. Serbest PrP, monoklonal antikor ile yakalanır. Monoklonal antikor ve PrP kompleksi, europium ile işaretlenmiş olan antikorlar ile belirlenir. Zaman ayırmalı floresans kullanarak, iki farklı konsantrasyonda (çözünen ve çözünmeyen) hazırlanan örneğin kantitasyonu yapılır (28). Çözünmeyen PrP'nin, total PrP konsantrasyonuna oranı bu yöntem için belirleyici bir kriterdir (17). Bu yöntem ile 10 pikograma kadar PrP belirlenebilmektedir (28).

13. Kapiller Jel Elektroferez: Floresan işaretli sentetik PrP peptid ile doku örneklerinde mevcut olan PrP'nin, antikora bağlanmak için yaptıkları mücadeleyi belirlemeye dayanan bir yaklaşımdır. Serbest peptid ve antikor peptid pikleri, kapiller elektroferez ile birbirlerinden ayırt

edilmektedir (17). Ultrasantrifügasyon yöntemleri ile beyinden ekstrakte edilen prion proteini, sodyum lauroyl sarkozin ve proteinaz K ile muamele edilir. Son santrifüjden sonra elde edilen pelet, süspanse edilerek, sodyum dodesil sülfat ve 2-merkaptotanol ile muamele edilir ve kaynatılarak, elektroferez işlemine tabi tutulur. Schmerr ve ark. yaptıkları çalışmada bu yöntemin, scrapie teşhisi için "western blot" yöntemine göre yaklaşık 100 kat daha az örnek miktarına ihtiyaç duyduğunu bildirmişlerdir (29).

14. Floresan Korelasyon Spektroskopi (FCS): Solüsyon içinde lazer ışınları arasından geçen, floresan işaretli molekülleri belirlemeye dayanan bir metottur. Analiz solüsyonu, PrP<sup>Sc</sup> agregatlarına kuvvetli bir şekilde bağlanan, flüorofor ile işaretli anti-PrP antikorlarını içermektedir. Anti-PrP antikor veya rekombinant PrP ile işaretlenmiş PrP<sup>Sc</sup>, rölatif floresan yoğunluğuna göre tespit edilir (17, 18). Anti-PrP antikorları bağlanan PrP<sup>Sc</sup>, monomerik PrP<sup>C</sup>'nin arka planında kolayca görülebilmektedir. Bu metodun, "western blot" metodundan yaklaşık 20 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. CJD hastalarının %20'sinin serebrospinal sıvısında ilk kez bu yöntem ile PrP<sup>Sc</sup> tespit edilmiştir (18).

15. Multispektral Ultraviyole Floresan Spektroskopi (MUFS): Bu yöntemde proteinler, ultraviyole radyasyon ile uyarılarak, spesifik floresan emisyon tarzlarına göre belirlenirler. Bu şekilde hücrel prion proteinini, patolojik prion proteininden ve farklı PrP<sup>Sc</sup> formlarından ayırmak mümkün olmaktadır (18).

16. Aptamer: Aptamer, spesifik biçimde hedef proteine bağlanan DNA veya RNA molekülleridir (17). PrP<sup>C</sup> ve/veya PrP<sup>Sc</sup>'nin de, kimyasal olarak sentezlenen, stabilize ve mobilize edilen spesifik nükleik asit aptamerlerinin olduğu bildirilmiştir (30). Weiss ve ark. (1997) yaptıkları çalışmada, G kuartet motiflerine sahip RNA aptamerlerinin, PrP'nin amino ucuna bağlandığını tespit etmişlerdir (31). İn vitro prion analizlerinde, PrP<sup>Sc</sup>'nin spesifik bağlanma aptamerinin, PrP'nin proteinaz dirençli formlarının bir araya gelmesini engellediği belirlenmiştir (17). Bu tespiti dayanarak, RNA, DNA ve peptid aptamerlerinin, prion hastalıklarının tanısında ve tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmektedir (30).

17. Fourier Transform İnfrared (FT-IR) Spektroskopi:

Kan ve nöronol dokudaki patolojik prion proteinin, belirlenmesi için umut veren bir biyofiziksel yöntemdir (32). Bu yöntem, infrared spektrumundaki çok değişkenli analizlerin birleşmiş olduğu tanımlayıcı bir metottur (17). FT-IR ile prion proteinlerinin üç boyutlu yapısı belirlenmektedir. Pan ve ark. bu yöntemle yaptıkları çalışmada, PrP<sup>C</sup>'nin, %42'sinin  $\alpha$  heliks, %3'ünün  $\beta$ -sheet formunda iken PrP<sup>Sc</sup>'nin %30'unun  $\alpha$  heliks, %43'ünün  $\beta$ -sheet formunda olduğunu tespit etmişlerdir (37). Gasset ve ark. PrP<sup>Sc</sup>'nin, proteinaz dirençli çekirdeği olan PrP27-30'un, %54'ünün  $\beta$ -sheet, %25'inin  $\alpha$  heliks yapısında olduğunu bildirmişlerdir (38). FT-IR ile PrP<sup>Sc</sup> ve PrP27-30 karakterizasyonunun yapılabilmesi, antikordardan bağımsız olarak, memeli türü ve spesifik TSE kısıtlamaları olmadan, moleküler suş tiplemesinin bu yönteminle yapılmasına imkan vermektedir (32).

18. "Flow Microbead Immunoassay" (FMI): Mikroboncuklara kovalent olarak bağlanmış anti-PrP antikollarının kullanıldığı bir metottur (17). Mikroboncuklar ile bloklanan örneklerin, floresan yoğunluğu, "flow cytometer" ile belirlenir. Floresan yoğunluğu, PrP<sup>Sc</sup> konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artış gösterir (33). Bu metot ile sığır etindeki 7 pmol / 7 nmol ve kemik unundaki %0,3'den daha yüksek konsantrasyondaki rekombinant PrP/ PrP<sup>Sc</sup> belirlenebilmektedir (17).

19. Biomarkerlar: PrP<sup>Sc</sup>, TSE'nin post-mortem tanısı için uygun bir işaretidir. Çünkü enfekte insanların ve hayvanların Santral Sinir Sistemlerinde (SSS) yüksek konsantrasyonda, PrP<sup>Sc</sup> bulunmaktadır. Bununla birlikte, PrP<sup>Sc</sup> preklinik tanıda sınırlı olarak kullanılabilir. Çünkü PrP<sup>Sc</sup>, SSS dışında, özellikle vücut sıvılarında (kan, idrar gibi), oldukça düşük konsantrasyonda bulunmaktadır. Prion ile enfekte insanların ve hayvanların idrarlarında, proteinaz dirençli PrP kökenli moleküller belirlenmiştir. Fakat güvenilir rutin bir test henüz geliştirilememiştir (6).

Farklı RNA görüntüleme teknolojileri kullanılarak, yeni bir transkriptin eritroid farklılaşma faktörünü kodladığı (EDRF) ve bu faktör ekspresyonunun scrapie ile enfekte farede, hastalığın gelişimi sırasında aşamalı olarak azaldığı belirlenmiştir. BSE ile enfekte büyük baş serumlarında belirlenen nükleik asitlerin, hastalığın gelişimi ile beraber ortaya çıktığı ile ilgili benzer yaklaşımlar bulunmaktadır (6).

20. Elektrokardiyografi (EKG): TSE'lerin tanısındaki diğer bir invazif olmayan test, yüksek çözünürlükteki elektrokardiyografidir. EKG ile enfeksiyonun erken safhalarında kalp hızında belirgin değişimlerin olup olmadığı araştırılmıştır. EKG, deneysel olarak BSE ajanı ile enfekte edilen 150 sığırdan denenmiş ve 8 ay sonra ölen 2 hayvanda Solunum Sinüs Aritmi (SSA) seviyelerinin artmasına bağlı olarak, hastalık tespit edilmiştir (6).

21. Elektroensefalogram (EEG): EEG uygulaması yapılan CJD hastalarının %75-85'inde, hastalığın ileri aşamalarında tipik tanusal bulgular elde edilmiştir. Tipik EEG bulgusu periyodik, bifazik veya trifazik, senkronize keskin dalga kompleksleridir (11). Hastalığın erken evresinde, EEG ile yaygın düzensiz teta ve delta dalgaları ile birlikte bilateral alfa ve aralıklı yüksek amplitüdü ritmik delta aktivitesinin tespit edilebileceği bildirilmiştir (10).

22. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI): CJD tanısında, difüzyon ağırlıklı MRI görüntülemenin en duyarlı teknik olduğu düşünülmektedir. T2 ağırlıklı MRI ile bazal ganglion anormallikleri belirlenebilmektedir. vCJD'li hastalarda, MRI ile talamusun pulvinar çekirdeğinde, bilateral sinyal artışı tespit edilmiştir. Bu bulgu, vCJD için %78 oranında duyarlı ve %100 oranında özgül bir bulgu olarak değerlendirilmektedir (34).

## SONUÇ

Mevcut tanı yöntemleri, PrP<sup>C</sup> ve PrP<sup>Sc</sup> proteinleri arasındaki fizikokimyasal farklılıklara dayanmaktadır. Tanı yöntemleri arasındaki temel farklılık, saptama seviyelerinden kaynaklanmaktadır. Hastalığın preklinik safhasında PrP<sup>Sc</sup> birikiminin düşük bir kinetiğe sahip olması, tanı yöntemlerinin inkübasyon periyodunun erken safhalarında kullanılmasını sınırlandırmaktadır. Bu kısıtlamalar dikkate alınarak, yeni diagnostik tekniklerde, PrP<sup>Sc</sup>'nin tanımlanması için vücut sıvılarındaki duyarlılığın ve spesifitenin artırılması ve PrP<sup>Sc</sup> varlığını temsil eden yeni göstergelerin belirlenmesi hedeflenmektedir (6).

## KAYNAKLAR

1. Ji HF, Zhang HY. Beta-sheet constitution of prion proteins. Trends Biochem Sci 2010; 35: 129-134.
2. Edgeworth JA, Farmer M, Sicilia A, et al. Detection of prion infection in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a

- blood-based assay. *Lancet* 2011; 377: 487-493.
3. Velayos JL, Irujo A, Cuadrado-Tejedor M, Paternain B, Moleres FJ, Ferrer V. Cellular prion protein in the central nervous system of mammals. Anatomoclinical associations. *Neurologia* 2010; 25: 228-233.
  4. Mastrianni JA. Prion diseases. *Clin Neurosci Res* 2004; 3: 469-480.
  5. Van der Kamp MW, Daggett V. Pathogenic mutations in the hydrophobic core of the human prion protein can promote structural instability and misfolding. *J Mol Biol* 2010; 404: 732-748.
  6. Kübler E, Oesch B, Raeber AJ. Diagnosis of prion diseases. *Br Med Bull* 2003; 66: 267-279.
  7. Gavier-Widén D, Stack MJ, Baron T, Balachandran A, Simmons M. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 509-527.
  8. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 13363-13383.
  9. Pocchiari M, Poleggi A, Principe S, Graziano S, Cardone F. Genomic and post-genomic analyses of human prion diseases. *Genome Med* 2009; 1: 63.
  10. Zerr I. Clinical and therapeutic aspects of prion disease. *Handb Clin Neurol* 2008; 89: 737-764.
  11. Belay ED. Transmissible Spongiform Encephalopathies In Humans. *Annu Rev Microbiol.* 1999; 53: 283-314.
  12. Cook RW, Richards RB, Middleton DJ. Transmissible Spongiform Encephalopathies. Australian and New Zealand Standard Diagnostic Procedure 2010; 16.
  13. Belay ED, Schonberger LB. The Public Health Impact of Prion Diseases. *Annu Rev Public Health* 2005; 26: 191-212.
  14. Kalikiri PC, Sachan RG. Prions- Proteinaceous Infectious Particles, *JACM* 2003; 4: 334-336.
  15. McKintosh E, Tabrizi SJ, Collinge J. Prion diseases. *J Neurovirol* 2003; 9: 183-193.
  16. Wadsworth JDF, Collinge J. Update on human prion disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1772: 598-609.
  17. Sakudo A, Nakamura I, Ikuta K, Onodera T. Recent developments in prion disease research: diagnostic tools and in vitro cell culture models. *J Vet Med Sci* 2007; 69: 329-337.
  18. Ingrosso L, Vetrugno V, Cardone F, Pocchiari M. Molecular diagnostics of transmissible spongiform encephalopathies. *Trends Mol Med* 2002; 8: 273-280.
  19. Dong CF, Huang YX, An R, et al. Sensitive Detection of PrP (Sc) by Western Blot Assay Based on Streptomycin Sulphate Precipitation. *Zoonoses Public Health*, 2007; 54: 328-336.
  20. Kretzschmar HA, Ironside JW, DeArmond SJ, Tateishi J. Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 1996; 53: 913-920.
  21. Schulz-Schaeffer WJ, Tschöke S, Kranefuss N, et al. The paraffin-embedded tissue blot detects PrPSc early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol* 2000; 156: 51-56.
  22. Taraboulos A, Jendroska K, Serban D, Yang S-L, DeArmond SJ, Prusiner SB. Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 7620-7624.
  23. Bosque PJ, Prusiner SB. Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. *J Virol* 2000; 74: 4377-4386.
  24. Tahiri-Alaoui A, Sim VL, Caughey B, James W. Molecular heterosis of prion protein beta-oligomers. A potential mechanism of human resistance to disease. *J Biol Chem* 2006; 281: 34171-34178.
  25. Soto C, Saborio GP, Anderes L. Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci* 2002; 25: 390-394.
  26. Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 2001; 411: 810-813.
  27. McCutcheon S, Hunter N, Houston F. Use of a new immunoassay to measure PrP Sc levels in scrapie-infected sheep brains reveals PrP genotype-specific differences. *J Immunol Methods* 2005; 298: 119-128.
  28. Dabaghian RH, Barnard G, McConnell I, Clewley JP. An immunoassay for the pathological form of the prion protein based on denaturation and time resolved fluorometry. *J Virol Methods* 2006; 132: 85-91.
  29. Schmerr MJ, Jenny A, Cutlip RC. Use of capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis to detect the prion protein extracted from scrapie-infected sheep. *J Chrom B Biomed Sci Appl* 1997; 697: 223-229.
  30. Gilch S, Schätzl HM. Aptamers against prion proteins



- and prions. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2445-2455.
31. Weiss S, Proske D, Neumann M, et al. RNA Aptamers Specifically Interact with the Prion Protein PrP. *J Virol* 1997; 71: 8790–8797.
  32. Beekes M, Lasch P, Naumann D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Vet Microbiol* 2007; 123: 305-319.
  33. Murayama Y, Yoshioka M, Horii H, Takata M, Miura K, Shinagawa M. Specific detection of prion antigenic determinants retained in bovine meat and bone meal by flow microbead immunoassay. *J Appl Microbiol* 2006; 101: 369-376.
  34. Kallenberg K, Schulz-Schaeffer WJ, Jastrow U, et al. Creutzfeldt-Jakob disease: Comparative Analysis of MR Imaging Sequences. *ANJR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 1459-1462.
  35. Duffy P, Wolf J, Collins G, DeVoe AG, Streeten B, Cowen D. Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 1974; 290: 692-693.
  36. Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of ‘new variant’ CJD. *Nature* 1996; 383: 685-690.
  37. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB. Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10962-10966.
  38. Gasset M, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB. Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1-5.