**Derleme**

# 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 (PrPSc), konak tarafından kodlanan prion proteininin (PrPC), anormal izoformlarıdır. PrPC’nin, PrPSc’e spontan dönüşümü,

nöronlarda ve farklı dokularda (beyin dokusu, lenf bezleri ve tonsiller gibi) PrPSc birikimine yol açmaktadır. Prion hastalıklarının tanı yöntemlerinin birçoğu, nöronlarda ve dokulardaki PrPSc’nin tespitine dayanmaktadır. Güvenilir bir tanı metodunun ön koşulu, birçok örnekte PrPSc’i yüksek oranda tespit etmesidir. Bu amaç doğrultusunda, PrPSc’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 **Murat ŞEVİK** diseases. Prion diseases are neurodegenerative disorders caused by pathogenic prions. Veteriner Kontrol Enstitüsü Pathogenic prions are abnormal isoform of prion protein (PrPC), is a host-encoded Müdürlüğü molecule. PrPC to PrPSc spontaneous conversion leads to PrPSc accumulation in neurons Moleküler Mikrobiyoloji and different tissues (such as brain tissue, lymph nodes and tonsils). Most of the Laboratuvarı diagnostic methods for prion diseases are dependent on PrPSc detection in neurons and **Tel:** (332) 322 47 41 tissues. High rate PrPSc detection in many different samples is a prerequisite for a **Faks:** (332) 320 3798reliable diagnostic method. For this purpose, several methods and cell lines that are **Gsm:** (542) 486 22 35susceptible to prion infection have been developed for detection of PrPSc.

 **e-posta:** dr\_muratank@hotmail.com **Key words:** Prion, humans, animals, neuron, diagnostic methods

Bulaşıcı Spongiform Ensefalopatiler (TSE) olarak da bilinen prion hastalıkları, hem insanları hem de hayvanları etkileyen ölümcül nörodejeneratif hastalıklardır. Patojenik mekanizmaları farklılık göstermekle birlikte, Hücresel Prion Proteininin (PrPC), Scrapie İzoformu olan Prion Proteinine (PrPSc) konformasyonel dönüşümü bütün prion hastalıklarında ortak etiyolojik özelliktir (1).

|  |
| --- |
| © 2012 **DEÜ** TIPFAKÜLTESİDERGİSİ CİLT 26, SAYI 2, (AĞUSTOS) 2012, 141 - 149  |

PrPC, immun sistem hücrelerinde ve merkezi sinir sisteminde, yüksek konsantrasyonlarda eksprese 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). PrPC’nin moleküler yapısı, N ve C terminal bölgelerinden oluşmaktadır. N terminal ucu, son derece esnektir ve genellikle çözünür proteininin, yapısal olmayan formu olarak şekillenir. N terminal ucunun, PrPSc’nin β tabakasının yapılandırmasında görev aldığı düşünülmektedir. C terminal ucu ise, 3 adet α heliks ve 2 adet kısa anti‐paralel β ipliğinden oluşan globüler bir alandır (1). PrPC’nin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, nöronal sinyal transdüksiyon süreçlerinde ve metal metabolizmada fonksiyonlarının olduğu ileri sürülmektedir (5). PrPC ve PrPSc izoformlarının birbirinden ayırt edilmesinde sahip oldukları moleküler yapılar dikkate alınmaktadır. PrPC’nin %42’si α heliks, %3’ü β tabaka iken, PrPSc’nin %30’u α heliks, %43’ü β tabakasıdır (1). Ayrıca PrPC, proteinaz K’a duyarlı iken, PrPSc proteinaz K’a karşı dirençlidir (3).

PrPC’nin, PrPSc’e spontan olarak dönüştüğü veya PrPC’i kodlayan gende (insanlarda PRNP geni) meydana gelen mutasyonlar sonucu, PrPSc şekillendiği varsayılmaktadır. Fakat mutasyonlar olmadan konformasyonel değişikliklerin nasıl gerçekleştiği henüz bilinmemektedir (4).

**Tablo.** Prion hastalıkları

## PRİON HASTALIKLARI

TSE etiyolojisinde horizantal, 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 yaştaki 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).

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Hastalık adı**  | **Konak**  | **Patogenez Mekanizması**  |
| Kuru  | İnsan  | Törensel yamyamlık 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 PrPC’nin, PrPSc’e spontan dönüşümü  |
| GSS  | İnsan  | PrP geninde germline mutasyonlar  |
| FFI  | İnsan  | PrP geninde germline mutasyonlar  |
| FSI  | İnsan  | Somatik mutasyon veya PrPC’nin, PrPSc’e spontan dönüşümü  |
| Scrapie  | Koyun, Keçi  | Genetiksel 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, GerstmannSträussler-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 ensefalopatisi*   |

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 araştırmada, 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 beyninin 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 araştırmada, 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, PrPSc’dir. Hastalığın tanısında, PrPSc’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 ayrımından 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 bildirmiştirler (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 PrPSc’nin presipitasyonu gibi ekstraksiyon metotları ile genişletilebilmektedir. Hamster beyin homojenatında, insan serebrospinal sıvısında, beyin dokusunda ve idrarında mevcut olan düşük veya yüksek konsantrasyonlardaki, PrP**Sc**’lerin sensitivitesinin, streptomisin presipitasyonu ile dikkat çekici şekilde arttığı tespit edilmiştir (19).

1. ELISA: Bu yöntemde, monoklonal antikorla kaplı pleytlere dilüe edilmiş örnek uygulanmakta ve antikora bağlı bir deteksiyon sistemi ile PrPSc 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 LD50 (öldürücü etkili doz) BSE enfektivitesinden daha az oranda PrPSc içeren örneklerdeki ve klinik semptom başlangıcından önce, BSE’li sığır beyinlerindeki PrPSc varlığı tespit edilebilmektedir (18). ELISA testleri, yüksek sensivite ve spesifitiye sahip olup scrapie, BSE ve CWD’in sürveyans programlarındaki çok sayıdaki numunenin taranması için kullanılmaktadır

(12).

1. 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, PrPSc’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 GerstmannSträussler‐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 patogenezdir. 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 PrPSc’nin varlığını tespit etmez. Aynı zamanda PrPSc’nin beyin ve lenfoid dokulardaki dağılımını da ortaya çıkarır. Astrositik marker protein olan Glial Fibriller Asidik Proteine (GFAP), karşı antikorlar kullanarak yapılan immunhistokimyasal boyama ile astrositik glikozun, beyin dokusundaki derecesi belirlenebilmektedir. Bazı prion türlerinin (vCJD, scrapie ve CWD), yoğun lenfotropizme sahip olması nedeniyle, immunhistokimyanın TSE’lerin preklinik 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, PrPSc birikimi tespit edilmiştir (6).

1. “Bioassay”: Deneysel olarak hayvanların enfekte edilerek, diagnostik ve araştırma uygulamaları ile prion türünün tanımlanmasını amaçlayan bir metottur. Bu metot ile dokulardaki PrPSc enfektivitesi hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. “Biyoassay” 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’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).
2. Hücre Kültür Teknikleri: Hücre kültür modelleri, prion enfeksiyon çalışmalarında PrPSc oluşumunun moleküler mekanizmasının ve hücre otonom modelinde PrPC’nin, PrPSc’e dönüşümünde, PrP’nin amino asit dizilerinin 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 PrPC ekspresyonları gösterir ve prion hastalıklarına, diğer hücrelerden daha duyarlıdır. Priona 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 PrPSc 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 PrPSc tespit edilen hücreler ve hayvanlar “western blot” ile kontrol edilir. Yapılan gözlemlerden sonra LD50 dozu, lizat enjekte edilen hayvanların hayatta kalma eğrisinden elde edilir (17).

1. Histo Blot: Bu yöntem ile anatomik doku korunarak, dokulardaki duyarlı proteinler belirlenir. Bu yöntemin bir dezavantajı, fikse edilmemiş materyale ihtiyaç duyulmasıdır.Beyindeki küçük miktarlardaki, PrPSc’nin tanımlanması için kullanışlı bir metottur. Taze, fikse edilmemiş beyin dokuları, nitroselüloz membran üzerinde kurutulur ve PrPC**‘**i elimine etmek için proteinaz K ile muamele edilir. Guanidin hidroklorid ile proteinaz dirençli PrPSc denatüre edilir ve immunhistokimyasal yöntemle, PrPSc

belirlenir (21, 22).

1. 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 PrPSc seviyelerinin karşılaştırılmasında duyarlı ve hızlı bir yöntemdir (23).
2. 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).
3. Pet Blot: İnkübasyon süresinin erken evrelerinde, PrPSc 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 PrPSc 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 PrPSc, yüksek derecede duyarlık gösteren, spesifik antikorlar kullanılarak belirlenir (21).
4. Protein Misfolding Siklik Amplifikasyon (PMCA): Konsept olarak DNA’nın polimer zincir reaksiyonu ile amplifikasyonuna benzemektedir (17). PMCA teknolojisi, in vivo PrPSc replikasyonunun hızlandırılmış sikluslarını içeren bir metotdur. Her siklus, 2 aşamadan (inkübasyon ve sonikasyon) oluşmaktadır. İlk aşamada düşük oranda PrPSc ve yüksek oranda PrPC içeren örnek, PrPSc 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 PrPSc miktarı artırılır (25). Siklik amplifikasyondan sonra örnekte yeni şekillendirilen proteinlerin, %97’sinden fazlası PrPSc 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 PrPSc, PMCA yöntemi ile belirlenebilmektedir (12).

1. Konformasyon Bağlı İmmunassay (CDI): Bu yönteminde, PrP**Sc**‘i selektif olarak çökeltmek için, doku homojenatları sodyum fosfotungstik asit ile inkübe edilir. PrPC ve PrPSc’i birbirinden ayırmak için denatürasyon, proteinaz K yerineguanidin hidroklorid ile yapılmaktadır (27). Tespit edici antikor, enfekte olmamış formda (PrPC) her zaman görülen ama enfeksiyoz formun (PrPSc) sadece denatürasyon sırasında görülen, konformasyon bağımlı epitopu (antijen molekülündeki kimyasal uç yapılar) belirlemek için kullanılır. Antikor bağlanma miktarı, denatüre PrPSc ve doğal PrPSc arasındaki sinyal farklılıklarına bağlı olarak değişir. Sinyal farklılıkları, doku homojenatlarındaki PrPSc’nin tanımlayıcı bir kriteri olarak kullanılır(6).
2. Genişletilmiş Disosiyasyon Lanthanide Floresan İmmunassay (DELFIA): Bu yöntemde, guanidin hidroklorür ile PrPSc 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 ayrımlı 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).
3. Kapiller Jel Elektroforez: 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 elektroforez 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‐merkaptoetanol ile muamele edilir ve kaynatılırarak, elektroforez 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).
4. Floresan Korelasyon Spektroskopi (FCS): Solüsyon içinde lazer ışınları arasından geçen, floresan işaretli molekülleri belirlemeye dayanan bir metottur. Analiz solüsyonu, PrPSc agregatlarına kuvvetli bir şekilde bağlanan, flüorofor ile işaretli anti‐PrP antikorlarını içermektedir. Anti‐PrP antikoru veya rekombinant PrP ile işaretlenmiş PrP**Sc**, rölatif floresan yoğunluğuna göre tespit edilir (17, 18). Anti‐PrP antikorları bağlanan PrPSc, monomerik PrPC’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 PrPSc tespit edilmiştir (18).
5. Multispektral Ultraviyole Floresan Spektroskopi (MUFS): Bu yöntemde proteinler, ultraviyole radyasyon ile uyarılarak, spesifik floresan emisyon tarzlarına göre belirlenirler. Bu şekilde hücresel prion proteinini, patolojik prion proteininden ve farklı PrPSc formlarından ayırmak mümkün olmaktadır (18).
6. Aptamer: Aptamer, spesifik biçimde hedef proteine bağlanan DNA veya RNA molekülleridir (17). PrPC ve/veya PrPSc’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, PrPSc’nin spesifik bağlanma aptamerinin, PrP’nin proteinaz dirençli formlarının bir araya gelmesini engellediği belirlenmiştir (17). Bu tespite dayanarak, RNA, DNA ve peptid aptamerlerinin, prion hastalıklarının tanısında ve tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmektedir (30).
7. 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). FTIR ile prion proteinlerinin üç boyutlu yapısı belirlenmektedir. Pan ve ark. bu yöntemle yaptıkları çalışmada, PrPC’nin, %42’sinin α heliks, %3’ünün β‐sheet formunda iken PrPSc’nin %30’unun α heliks, %43’ünün β‐sheet formunda olduğunu tespit etmişlerdir (37). Gasset ve ark. PrPSc’nin, proteinaz dirençli çekirdeği olan PrP27‐30’un, %54’ünün β‐sheet, %25’inin α heliks yapısında olduğunu bildirmişlerdir (38). FT‐IR ile PrPSc ve PrP27‐30 karakterizasyonunun yapılabilmesi, antikorlardan bağımsız olarak, memeli türü ve spesifik TSE kısıtlamaları olmadan, moleküler suş tiplemesinin bu yönteminle yapılmasına imkan vermektedir (32).

1. “Flow Microbead Immunoassay” (FMI): Mikroboncuklara kovalent olarak bağlanmış anti‐PrP antikorlarının kullanıldığı bir metottur (17). Mikro‐boncuklar ile bloklanan örneklerin, floresan yoğunluğu, “flow cytometer” ile belirlenir. Floresan yoğunluğu, PrPSc 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/ PrPSc belirlenebilmektedir (17).
2. Biomarkerlar: PrPSc, TSE’nin post‐mortem tanısı için uygun bir işarettir. Çünkü enfekte insanların ve hayvanların Santral Sinir Sistemlerinde (SSS) yüksek konsantrasyonda, PrPSc bulunmaktadır. Bununla birlikte, PrPSc preklinik tanıda sınırlı olarak kullanılabilmektedir. Çünkü PrPSc, 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).

1. 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 sığırda denenmiş ve 8 ay sonra ölen 2 hayvanda Solunum Sinüs Aritmi (SSA) seviyelerinin artmasına bağlı olarak, hastalık tespit edilmiştir (6).
2. Elektroensefalogram (EEG): EEG uygulaması yapılan CJD hastalarının %75‐85’inde, hastalığın ileri aşamalarında tipik tanısal 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 amplitüdlü ritmik delta aktivitesinin tespit edilebileceği bildirilmiştir (10).
3. 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 tesptit edilmiştir. Bu bulgu, vCJD için %78 oranında duyarlı ve %100 oranında özgül bir bulgu olarak değerlendirilmektedir (34).

## SONUÇ

Mevcut tanı yöntemleri, PrPC ve PrPSc proteinleri arasındaki fizikokimyasal farklılıklara dayanmaktadır. Tanı yöntemleri arasındaki temel faklılık, saptama seviyelerinden kaynaklanmaktadır., Hastalığın preklinik safhasında PrPSc birikiminin düşük bir kinetiğe sahip olması, tanı yöntemlerinin inkübasyon periyodunun erken safhalarında kullanılmasını sınırlandırmaktadır. Bu kısıltlamalar dikkate alınarak, yeni diagnostik tekniklerde, PrPSc’nin tanımlanması için vücut sıvılarındaki duyarlılığın ve spesifitenin artırılması ve PrPSc 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: 1336313383.
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, JIACM 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.

1. Ingrosso L, Vetrugno V, Cardone F, Pocchiari M. Molecular diagnostics of transmissible spongiform encephalopathies. Trends Mol Med 2002; 8: 273-280.
2. 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.
3. Kretzschmar HA, Ironside JW, DeArmond SJ, Tateishi J. Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Arch Neurol 1996; 53: 913-920.
4. 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.
5. 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.
6. Bosque PJ, Prusiner SB. Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. J Virol 2000; 74: 43774386.
7. 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.
8. Soto C, Saborio GP, Anderes L. Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. Trends Neurosci 2002; 25: 390-394.
9. Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of proteinmisfolding. Nature 2001; 411: 810-813.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Gilch S, Schätzl HM. Aptamers against prion proteins and prions. Cell Mol Life Sci 2009; 66: 2445-2455.
14. Weiss S, Proske D, Neumann M, et al. RNA Aptamers Specifically Interact with the Prion Protein PrP. J Virol 1997; 71: 8790–8797.
15. 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.
16. 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.

1. 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.

1. 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: 692693.

1. 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: 685690.
2. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB. Conversion of -helices into ß-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.

Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 10962-10966.

1. 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.