

Konformačně specifické protilátky a diagnostika prionových chorob

Conformation Specific Antibodies and Diagnosis of Prion Diseases

Souhrn

Transmisivní spongiformní encefalopatie neboli prionová onemocnění jsou smrtelné neurodegenerativní choroby s dlouhou inkubační dobou a rychlým průběhem. K definitivní diagnóze dochází obvykle až post mortem detekcí prionů v mozkové tkáni. Klíčovým krokem diagnostiky prionových chorob bývá použití proteinázy K, která rozštěpí fyziologické proteiny a umožní následnou imunochemickou detekci proteáza-rezistentního prionového proteinu. V posledních pěti letech se celosvětově objevuje stále více případů prionopatií zapříčiněných proteáza-senzitivními priony, které jsou běžnými metodami vyhodnocovány falešně negativně. Řešením problému by mohla být příprava diagnostického testu založeného na použití monoklonálních protilátek konformačně specifických pro patologický prionový protein, které by umožnily potvrzení diagnózy bez použití proteolýzy. Náš text shrnuje dostupné informace o připravených konformačně specifických protilátkách a diskutuje o jejich použití v diagnostice prionových chorob.

Abstract

Transmissible spongiform encephalopathies, or prion diseases, are fatal neurodegenerative disorders with long incubation period and short clinical phase. The diagnosis is usually confirmed from post mortem detection of prions in the brain tissue. Most diagnostic methods are based on treatment with Proteinase K that cleaves out physiological proteins and makes the resistant form of pathological prion protein detectable with anti-prion antibodies. Over the last five years, there is a growing evidence of prionopathies caused by protease-sensitive prions escaping detection with the standard diagnostic methods. Conformation-specific monoclonal antibodies to the pathological prion proteins could overcome the problem simply by detecting the pathological conformation of both prion isoforms without the need for proteolysis. Our review summarizes available information on conformation-specific prion antibodies and discusses their use in the diagnosis of prion diseases.

E. Dvořáková, K. Holada

Ústav imunologie a mikrobiologie,
1. LF UK a VFN v Praze



Ing. Karel Holada, Ph.D.

Ústav imunologie a mikrobiologie
1. LF UK v Praze
Studničkova 7
128 00 Praha 2
e-mail: Karel.Holada@lf1.cuni.cz

Přijato k recenzi: 4. 10. 2011

Přijato do tisku: 28. 11. 2011

Klíčová slova

transmisivní spongiformní encefalopatie – prionový protein – konformačně specifické protilátky – Creutzfeldtova-Jakobova nemoc

Key words

transmissible spongiform encephalopathy – prion protein – conformation-specific antibodies – Creutzfeldt-Jakob disease

Zdroj podpory: grant IGA MZ NS10335-3

Autoři děkují dr. Olze Janouškové (1. LF UK v Praze) za poskytnutí obrázku western blotu.

Úvod

Prionové choroby neboli transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE) jsou neurodegenerativní onemocnění spojené s úbytkem neuronů, spongiformními změnami, gliózou a ukládáním patologické formy prionového proteinu v mozku [1]. Onemocnění se projevuje například jako klusavka („scrapie“) ovcí

a koz, bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) skotu nebo chronické chřadnutí (CWD) jelenovitých. První lidská prionová choroba byla popsána v letech 1920 a 1921 Hansem Creutzfeldtem a Alfonsem Jakobem [2,3]. V 50. letech 20. stol. došlo na Nové Guinei k epidemii kuru, která se rozšířila u příslušníků domorodého kmene Fore během rituálního ka-

nibalizmu [4]. Celosvětově je nejčastější lidskou prionovou chorobou Creutzfeldtova-Jakobova nemoc (CJN) s incidencí onemocnění 1–2 případy na milion obyvatel ročně. Onemocnění většinou vzniká bez známých příčin (85 % případů), může ale být i dědičné (10–15 % případů) nebo získané (2–3 % případů). Vzácněji se vyskytuje dědičný Gerstmann-Sträussler-

-Scheinkerův syndrom (GSS) a fatální familiární insomnie (FFI) [5]. V současnosti velkou pozornost poutá variantní CJN (vCJN), která vznikla s největší pravděpodobností alimentárním přenosem BSE prionů na člověka. Na rozdíl od klasické CJN postihuje především mladé lidi, vCJN priony se akumulují i v orgánech imunitního systému a choroba je přenosná krevní transfuzí [6,7].

Podle prionové hypotézy je infekčním agens prionových chorob patologicky složený prionový protein (PrP^{TSE}, někdy též značený PrP^{Sc}), který se množí přímým kontaktem s buněčným prionovým proteinem (PrP^C), jemuž dokáže vnutit svoji patologickou, na strukturu β skládaného listu bohatou konformaci [1]. PrP^C se vyskytuje na povrchu většiny buněk v těle [1,8] a jeho fyziologická funkce zatím nebyla objasněna. Uvažuje se například o jeho úloze v metabolismu mědi, regulaci apoptózy, v procesu učení a paměti, signální transdukcii, přenosu vzruchu na synaptické membráně, ovlivnění cirkadiálního rytmu, buněčné diferenciaci, antioxidantní ochraně, neuroprotektivních procesech a dalších buněčných dějích [9]. Molekula PrP^C obsahuje ve své sekundární struktuře vysoký podíl α šroubovice, což ji činí dobře štěpitelnou proteázami. Počas života molekuly PrP^C v buňce se odhaduje na 3–6 hod [10,11]. Oproti tomu molekula PrP^{TSE} je v průběhu konformačních změn obohacena o strukturu β skládaného listu (z pouhých 3 % u PrP^C na 34 % u PrP^{TSE}) [12,13], která ji činí částečně odolnou vůči proteolýze. PrP^{TSE} navíc agreguje za tvorby amyloidových fibril a vytváří v mozku depozita, která se podílí na rozvoji onemocnění. Konaformační změny prionového proteinu zároveň zvyšují afinitu PrP^{TSE} k PrP^C, čímž usnadňují další kontakt obou molekul, a tím i propagaci patologické konformace [14,15].

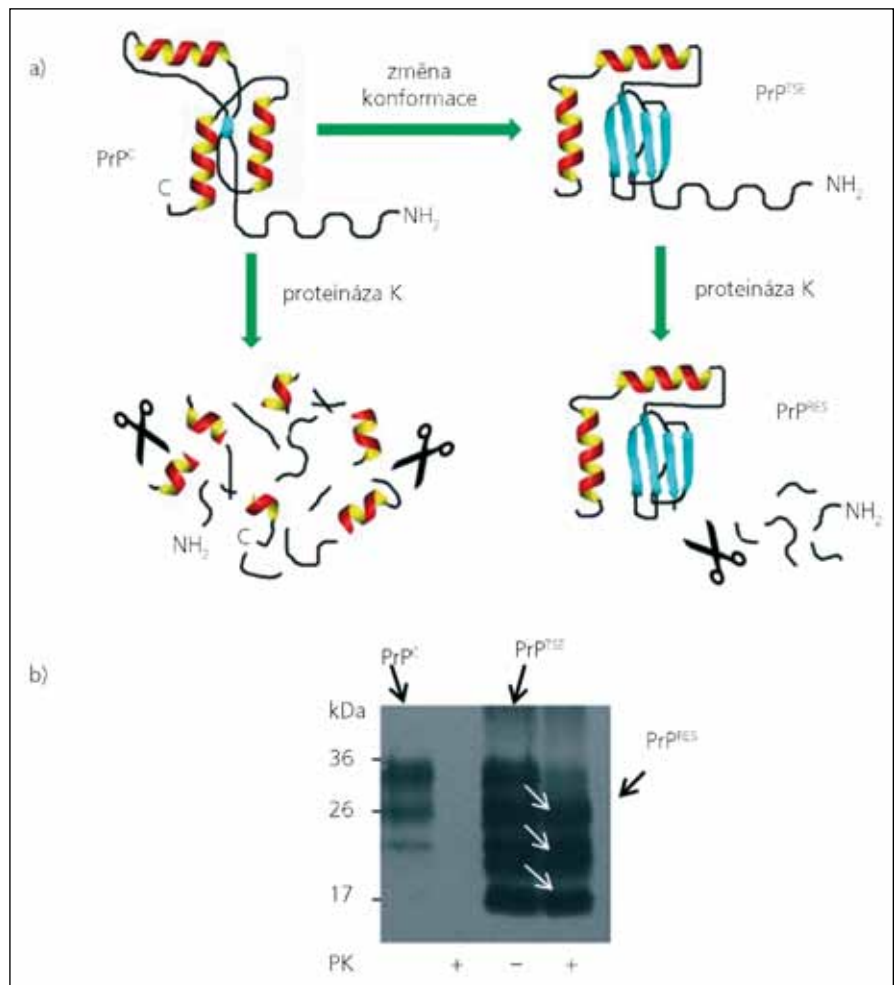
V této fázi již onemocnění nelze zastavit, po dlouhé inkubační době bez příznaků dojde k propuknutí choroby s rychlým koncem. Smrt nastává za 5–7 měsíců po prvním projevu příznaků u většiny sporadických a dědičných případů a za 9–22 měsíců u vCJN. Byla nalezena řada látek schopných interferovat s propagací prionů a odléčit prionem infikované tkáňové kultury [přehled v 16], avšak snahy o vyléčení nebo alespoň pozastavení průběhu onemocnění u lidí se ukázaly být dosud neúspěšné [17,18]. Nejnaděj-

nější výsledky poskytlo použití doxycylinu, který vedl k signifikantnímu prodloužení doby přežití CJN pacientů – medián 292 dnů (n = 51) oproti 167 dnům u historických kontrol [19]. Vzhledem k identické primární struktuře obou forem prionového proteinu a jen velmi slabé imunogenicitě patologické konformace PrP^{TSE} se v organizmu protilátky specifické pro prionová onemocnění v relevantních titrech netvoří [význam IS u prionových chorob v 20]. Ne-

dávno provedené studie na větším souboru infikovaných myší (143 a 117 jedinců) ukázaly, že jen zhruba 5 % sér odebraných v terminálním stadiu vykazovalo mírně zvýšené titry protilátek proti prionovému proteinu [21]. U lidí se zvýšené titry protilátek proti PrP^{TSE} zatím detekovat nepodařilo.

Diagnostika prionových chorob

Přítomnost PrP^{TSE} je jediným známým specifickým znakem prionových chorob.



Obr. 1. Detekce patologického prionového proteinu na základě jeho odolnosti vůči proteolytickému štěpení.

Obr. 1a) Patologický prionový protein (PrP^{TSE}) se od normálního buněčného prionového proteinu (PrP^C) liší konformací s vysokým obsahem struktur β skládaného listu, která ho činí odolným vůči proteolýze. Po inkubaci s proteinázou K dochází ke kompletnímu rozštěpení PrP^C, zatímco u PrP^{TSE} dojde odštěpení pouze nestrukturovaného fragmentu z N konce a zbytek molekuly je vůči štěpení rezistentní (PrP^{RES}).

Obr. 1b) Detekce PrP^C a PrP^{TSE} v myším mozgovém homogenátu pomocí western blotu. Bez inkubace s proteinázou K (PK) detekujeme v normálním myším mozku tři izoformy PrP^C (neglykosylovanou, monoglykosylovanou a diglykosylovanou), proteolýza pak vede ke kompletnímu vymizení signálu. Proteolýza PrP^{TSE} v homogenátu myší infikované RML kmenem „scrapie“, vede pouze k charakteristickému zvýšení elektroforetické pohyblivosti jednotlivých izoform PrP^{RES} (bílé šipky), které je způsobené snížením molekulové hmotnosti izoform po odštěpení jejich N terminálů.

K diagnostice nelze z výše uvedených důvodů použít běžné sérologické metody. Detekce je ve většině případů založena na rozdílech odolnosti PrP^{TSE} a PrP^C vůči štěpení proteinázou K (obr. 1). Zatímco molekula PrP^C se působením proteáz zcela rozštěpí, z molekuly PrP^{TSE} se odštěpí pouze N konec a rezistentní C koncová část (PrP^{RES}) je imunochemicky detekována některou z protilátek proti prionovému proteinu [přehled detekčních metod v 22]. Tyto testy vycházejí z předpokladu, že rezistentní forma PrP^{TSE} je původcem onemocnění, a tedy i v organizmu přítomna a posléze detekována. V mozku je ale většina molekul PrP^{TSE} proteáza-senzitivních (senPrP^{TSE}), PrP^{RES} tvoří pouhých 10–30 % [23–25]. V některých tkáních pacientů s CJN, jako třeba v krvi, se PrP^{TSE} pravděpodobně vyskytuje jen jako senPrP^{TSE} [26]. Detekce PrP^{TSE} v krvi je navíc komplikována přítomností velkého množství PrP^C [27–29].

Až donedávna měla prionová komunita za to, že senPrP^{TSE} tvoří mezistupeň při tvorbě PrP^{RES} a je součástí průběhu onemocnění [30,31]. SenPrP^{TSE} izolovaný gradientovou centrifugací z infikovaného křeččího mozkuvého homogenátu byl dokonce schopen konvertovat PrP^C na proteáza-rezistentní PrP^{TSE} [32]. V poslední době se ale začínají objevovat případy prionových chorob zvané „proteáza-senzitivní prionopatie“, které mohou, ale nemusí, mít klinické příznaky podobné klasickým prionovým chorobám [33]. U těchto případů při běžných testech nebyl prokázán PrP^{RES}, ale při použití šetrnějších metod byl prokázán senPrP^{TSE} [34–36]. Celosvětově se objevují stále další případy proteáza-senzitivních prionopatií, často po reevaluaci starších případů vyhodnocených jako „blíže nespecifikované demence“ nebo „atypická Alzheimerova choroba“ [37]. Jaká je četnost těchto atypických prionopatií, není v současné době známo.

Problémy s přípravou konformačně specifických protilátek

Nevýhodou diagnostických testů založených na štěpení prionového proteinu proteázou K je to, že detekci proteáza-senzitivních prionopatií neumožňují. To by umožnila například konformačně specifická protilátka proti PrP^{TSE}, která by zároveň nereagovala s PrP^C. Snahy o přípravu takové protilátky existují již od 90. let

minulého století [38], zdaleka ne vždy se ale setkávají s úspěchem. Problémů s přípravou konformačně specifických protilátek je hned několik. Zprv je to slabá imunogenita PrP^{TSE}, daná shodou primární struktury s fyziologicky se vyskytujícím PrP^C. Vzhledem k vysoce mezidruhové konzervativní primární struktuře prionového proteinu tento problém neumožňuje obejít ani xenogenní imunizace. Někteřím autorům se sice povedlo imunitní reakci podpořit silnými adjuvanty [39,40], problém se nicméně podařilo vyřešit až přípravou geneticky upravených myší, kterým byl odstraněn gen pro prionový protein (*Prnp*^{0/0} myši) [41,42] a které po běžné imunizaci vykazovaly dobrou imunitní odpověď. Druhým úskalím při přípravě konformačních protilátek je skutečnost, že dosud není známa prostorová struktura PrP^{TSE}, a nelze tedy s přesností určit epitopy specifické pro patologický prionový protein. Během konformačních změn sice dochází u prionového proteinu k odhalení epitopů, které jsou v molekule PrP^C nedostupné [43,44], jejich imunogenita ovšem nemusí být – a nebývá – vysoká. Po imunizaci *Prnp*^{0/0} myší prionovým proteinem tak dojde ke tvorbě celé řady protilátek proti PrP, konformačně specifické se mezi nimi ale běžně nevyskytují [45,46]. Jednotlivé laboratoře se tento problém pokusily řešit různě. Korth et al použili k imunizaci agregovaný rekombinantní prionový protein, který umožnil tvorbu protilátek proti oligomerům PrP, jež se běžně vyskytují v agregátech PrP^{TSE}, ale ne u rozpustného PrP^C [38]. Paramithiotis et al a Jones et al imunizovali peptidem molekuly PrP, který vybrali s ohledem na předchozí studie konformačních změn při přechodu z α šroubovice na β helix, k nimž dochází i u PrP^{TSE} [43,47]. Jiné laboratoře zase izolovaly a purifikovaly PrP^{TSE} z mozkuvého homogenátu infikovaných myší a použily jej jako antigen pro imunizaci a následně i pro selekci protilátek [48,49]. Náš text shrnuje dostupné informace o připravených konformačně specifických protilátkách a diskutuje o jejich použití v diagnostice prionových chorob.

Konformačně specifické protilátky 15B3

První konformačně specifická protilátka byla připravena v roce 1997 imunizací

Prnp^{0/0} myší rekombinantním bovinním prionovým proteinem. Jedná se o monoklonální protilátka 15B3, třídy IgM, která reaguje s bovinním, myším a lidským PrP^{TSE} [38]. 15B3 je schopna z infikovaných mozkuvéch homogenátů imunoprecipitovat PrP^{TSE} různě citlivý ke štěpení proteázou K. Při bližší charakterizaci epitopu protilátky 15B3 spektrem peptidů byly identifikovány vazebné sekvence 142–148, 162–170 a 214–226 bovinního PrP (tab. 1). Jedná se tedy o epitop složený, který podle autorů vzniká buď asociací dvou nebo více molekul prionového proteinu, nebo strukturálními změnami v rámci jedné molekuly PrP [38]. Protilátka byla patentována, nicméně se od té doby neobjevila ani na trhu s diagnostickými testy, ani v jiné vědecké práci zaměřené na použití v diagnostice. Až v roce 2008 Biasini et al ve studii na mutantních formách PrP konformačně specifickými protilátkami uveřejnili, že protilátka 15B3 má mnohem širší reaktivitu, než se původně myslelo [50]. Vedle proteáza rezistentních i senzitivních forem PrP^{TSE} z infikovaných vzorků je 15B3 schopna imunoprecipitovat i neinfekční prionové agregáty, které se spontánně tvoří u neinfikovaných transgenních myší s nadprodukcí PrP a s inserčními, delečními nebo substitučními mutacemi genu pro PrP. Autoři ve své studii šli ještě dále a zjistili, že 15B3 je schopna detekovat i uměle precipitovaný PrP^C z mozkuvéch homogenátů zdravých „wild type“ myší nebo agregovanou formu rekombinantního (neinfekčního) PrP [50].

Hybridní IgG protilátky

V roce 2004 Moroncini et al připravili dvě hybridní protilátky obsahující peptidy PrP^C schopné specificky vázat PrP^{TSE} [51]. Autoři nejprve identifikovali sekvence, kterými se PrP^C váže na molekulu PrP^{TSE} [52]. Vazebné sekvence 89–112 a 136–158 myšího PrP^C pak vložili do recipientní protilátky IgG1 12b [53] v oblasti determinující komplementaritu na těžkém řetězci. Takto připravené rekombinantní protilátky IgG 89–112 a IgG 136–158 imunoprecipitovaly myší, lidský a křeččí PrP^{TSE}, ale ne rozpustný PrP^C [51]. O několik let později se stejná laboratoř pokusila zmapovat vazebná místa PrP^C na PrP^{TSE} přípravou hybridních protilátek obsahujících postupně peptidy celé sekvence myšího prionového proteinu (moPrP23–231) [54]. Z 20 při-

mogenáty ani s homogenáty z jiných neurologických případů (např. AD) nereagovaly. Protilátka OCD4 byla schopná detekovat jak různé kmeny lidských prionů (sporadickou, dědičnou i získanou formu CJN a případy GSS), tak i různé zviřecí prionové kmeny (bovinní, ovčí, jelení, křeččí a myší). Zhruba 20 % PrP^{TSE} imunoprecipitovaného pomocí OCD4 bylo proteáza-senzitivní [57].

P1:1

Jones et al použili k přípravě protilátek agregovaný peptid 106–126 lidského PrP [47]. Jedná se o centrální část prionového proteinu, která je u savců mezidruhově vysoce konzervovaná (tab. 1) a která během konformačních změn mění svoji strukturu z neuspořádané na strukturu β skládaného listu. Imunizací *Prnp*^{0/0} myší agregovaným peptidem 106–126 sekvence lidského PrP byla získána monoklonální protilátka P1:1 třídy IgM, která v nativních podmínkách selektivně imunoprecipitovala PrP^{TSE} z lidských tkání. S negativními kontrolami ani s tkáněmi pacientů s jinými neurologickými diagnózami P1:1 nereagovala. Protilátka byla navíc schopna rozlišovat mezi typem 1 a 2 lidských prionových onemocnění charakterizovaných rozdílnou elektroforetickou mobilitou PrP^{RES} [59]. Autoři nicméně neprovedli testy reaktivity P1:1 s agregovaným rekombinantním (neinfekčním) prionovým proteinem ani s uměle agregovaným neinfekčním PrP^C v homogenátech zdravých mozků.

6H10

Horiuchi et al připravili monoklonální protilátka třídy IgG imunizací *Prnp*^{0/0} myší nedenateurovaným PrP^{TSE}, purifikovaným z infikovaného myšího mozku homogenátu. Jedna z protilátek, 6H10, reagovala s nedenateurovaným myším PrP^{TSE}, ale ne s rekombinantním myším PrP ani s denaturovaným PrP^{TSE} [48]. 6H10 specificky imunoprecipitovala PrP^{TSE} z myších, ovčích a bovinních mozkových homogenátů před štěpením proteinázou K i po něm, zatímco s neinfikovanými homogenáty nereagovala. V reakci na Biasiniho studii otestovali autoři protilátka 6H10 i s agregovaným rekombinantním prionovým proteinem a jeho C terminálním fragmentem (PrP23–231, resp. PrP89–231), se kterými protilátka nereagovala. 6H10 reagovala s mozkovou tkání infikovaných

myší na histoblotu před štěpením proteinázou K i po něm. Reaktivita 6H10 byla výrazně redukována autoklávováním histoblotu, během kterého došlo pravděpodobně ke zrušení PrP^{TSE} specifického epitopu. Podobně reaktivita 6H10 postupně slábla se zvyšující se koncentrací denaturačního činidla guanidin hydrochloridu. Při snaze o bližší charakterizaci vazebného epitopu autoři prokázali, že se jedná o složený, PrP^{TSE}-konformačně specifický epitop (tab. 1), jehož částí jsou některé aminokyseliny C konce molekuly PrP (sekvence 215–228).

W261

Purifikovaný PrP^{TSE} k přípravě konformačně specifických protilátek použili i Petsch et al v roce 2011 [49]. Autoři izolovali PrP^{TSE} z infikovaných myších mozkových homogenátů vysrážením s kyselinou fosforečnou-wolframovou a použili ho k imunizaci *Prnp*^{0/0} myší. Jedna z připravených protilátek, W261, třídy IgG, selektivně imunoprecipitovala PrP^{TSE} z myších, křeččích, ovčích, jeleních a lidských mozkových homogenátů, zatímco se vzorky tkání zdravých jedinců nereagovala. Izolovaný PrP^{TSE} byl částečně odolný vůči štěpení proteinázou K. Autoři ve snaze ukázat použitelnost protilátky W261 k diagnostickému testování zavedli sendvičovou ELISU, kde jako vyvazující protilátka použili W261 a k detekci běžně používanou anti-PrP protilátka 6H4 konjugovanou s peroxidázou. Následnou chemiluminiscencí byl bez použití proteinázy K detekován prionový protein z infikovaných ovčích (scrapie) a lidských (variantní CJN) mozkových homogenátů, ale ne ze zdravých kontrolních vzorků. Autoři však nevylučují, že by W261 mohla vázat i neinfekční agregáty prionového proteinu [49].

PRIOC

Další skupina se pokusila připravit PrP^{TSE} specifické protilátka imunizací *Prnp*^{0/0} myší infikovaným myším mozkovým homogenátem štěpeným proteinázou K a adsorbovaným na magnetické mikropartikelky (Dynabeads). Byly tak připraveny monoklonální protilátka PRIOC 1–4, třídy IgM, schopné detekovat rozpustné oligomery PrP^{TSE} a dalších amyloidogenních proteinů, ale ne jejich monomery [60]. Při bližším určování epitopu nebyly protilátka schopny vázat rekombinantní ani buněčný PrP, ale byly schopny vázat kratší syntetické

peptidy. PRIOC 1 a 2 rozeznávaly sekvenci PrP90–109 a PRIOC 3 a 4 sekvenci PrP170–189 (tab. 1). Protilátka selektivně vyvazovaly nativní (nedenateurovaný) PrP^{TSE} z myších (RML) a lidských (vCJN) mozkových homogenátů před proteolýzou i po ní, zatímco se zdravými kontrolami nereagovaly. Žádná z protilátek překvapivě nereagovala s tkáněmi případů sporadické CJN. Autoři dále vyvinuli sendvičovou ELISU k detekci oligomerů PrP^{TSE} v nedenateurojících podmínkách. PRIOC protilátka ukotvili na stěnu desičky a po vyvázání antigenu z RML infikovaného mozku homogenátu použili tutéž protilátka k detekci v biotinylované formě. Všechny čtyři protilátka dobře detekovaly oligomery PrP^{TSE}, ale s monomery PrP nedávaly žádný signál. Stejný systém byl použit i k testování rekombinantního prionového proteinu, protilátka detekovaly pouze rozpustné oligomery recPrP, s monomery ani s nerozpustnými fibrilami recPrP nereagovaly. Podobných výsledků bylo za použití PRIOC protilátek dosaženo i při detekci oligomerů peptidu amyloidu β (A β) a α synukleinu [60]. Protilátka schopné rozeznat rozpustné oligomery amyloidogenních proteinů byly připraveny i jinou skupinou v roce 2003. Kaye et al připravili oligomer-specifické polyklonální sérum imunizací králíků syntetickými oligomery peptidu A β [61]. Sérum nereagovalo s monomery ani s fibrilami amyloidu β , ale reagovalo s oligomery α synukleinu, amylinu (IAPP), polyglutaminu, lysozymu, lidského inzulinu a prionového peptidu 106–126. Autoři ve studii uvedli, že všechny výše zmíněné rozpustné oligomery sdílejí stejnou konformačně-dependentní strukturu, která je nezávislá na sekvenci [61].

Závěr

Použití konformačně specifických protilátek by vedle detekce proteáza-rezistentního PrP^{RES} umožnilo detekovat i proteáza-senzitivní formy PrP^{TSE}, které se u některých případů prionových onemocnění zdají být jediným zdrojem patogeneze i diagnostické informace. Protilátek schopných rozeznat proteáza-senzitivní PrP^{TSE} byla za posledních 15 let vyvinuta celá řada (tab. 2), nicméně otázkou zůstává jejich využití v praxi. Jejich užití pro detekci senPrP^{TSE} v mozkové tkáni při post mortem diagnostice prionových chorob je limitováno nutností pou-

Tab. 2. Přehled konformačně-specifických protilátek proti PrP^{TSE}.

Název protilátky	Třída	Specifická (PrP)	Epitop	Autor	Citace
15B3	IgM	bo, mo, hu	diskontinuální, 142–148, 162–170, 214–226	Korth et al	38
IgG 19–33	IgG	mo, hu, ha	23–33	Solfrosi et al	54
IgG 89–112	IgG	mo, hu, ha	89–112	Moroncini et al	51
IgG 136–158	IgG	mo, hu, ha	136–158	Moroncini et al	51
Tyr-Tyr-Arg protilátky	IgG, IgM	mo, hu, ha, bo, ov	149–151, 162–164, 225–227	Paramithiotis et al	43
V5B2	IgG	hu, bo, ov	214–226	Curin Serbec et al	55
OCD4		mo, hu, ha, bo, ov, d	DNA-PrP ^{TSE}	Zou et al	57
P1:1	IgM	hu	106–126	Jones et al	47
6H10	IgG	mo, bo, ov	diskontinuální, obsahuje 215–228	Horiuchi et al	48
W261	IgG	mo, hu, ha, ov, d	C terminus	Petsch et al	49
PRIOC 1 a 2	IgM	mo, hu	90–109	Tayebi et al	60
PRIOC 3 a 4	IgM	mo, hu	170–189	Tayebi et al	60

bo – bovinní, mo – myší, hu – lidské, ha – křeččí, ov – ovčí, d – jelení

žití nenedaturujících technik zachovávajících konformaci senPrP^{TSE}. Bohužel tyto techniky, např. imunoprecipitace, jsou často méně robustní a mohou vést k falešným výsledkům. Vše navíc komplikují vlastnosti buněčného prionového proteinu, PrP^C, a jeho ochota tvořit po solubilizaci membrán agregáty v nenedaturujícím prostředí. U většiny konformačních protilátek proti PrP^{TSE} bylo prokázáno, že vážou také agregovaný neinfekční PrP, a tudíž mohou poskytnout falešně pozitivní výsledky. Zdá se tedy, že širšímu použití konformačně specifických protilátek v diagnostice prionových chorob stojí v cestě především vývoj odpovídající detekční techniky. Za nadějně lze považovat v publikacích popsané ELISA testy [51,61], ale i ty čeká důsledná validace s klinickými vzorky. Za v současné době nejpropracovanější metodu schopnou detekce senPrP^{TSE} lze považovat „Conformation Dependent Immunoassay – CDI“ vyvinutý Jiřím Šafářem et al [23,24]. Metoda CDI je založena na opačném přístupu, využívá protilátku 3F4, která rozeznává PrP^C, ale v molekule PrP^{TSE} je její epitop skryt. Epitop v molekule PrP^{TSE} lze odhalit denaturací vzorku. Rozdíl signálu mezi denaturovaným a nativním vzorkem pak odpovídá množství PrP^{TSE} včetně senPrP^{TSE} ve vzorku. Pro vzorky normálních tkání je tento rozdíl nulový. Alternativou ke konformačně specifickým testům by mohlo být nalezení kovalentní modifikace prionového proteinu, která by byla specifická pro PrP^{TSE} a u PrP^C by se nevyskytovala. Kandidátem

takové modifikace je glykace, neenzymatická reakce redukcujících cukrů s volnými aminokupinami proteinů, jež pro svou pomalou rychlost může preferenčně modifikovat stabilní amyloidová depozita PrP^{TSE}, zatímco PrP^C zůstává pro svůj krátký buněčný poločas neglykovaný [62,63]. Protilátky specifické pro glykovaný PrP^{TSE} by pak mohly být použitelné pro jeho detekci i za denaturujících podmínek [64], např. pomocí western blotu. Obrovským pokrokem, který by mohly přinést konformačně specifické protilátky, by byla rutinní detekce senPrP^{TSE} v krvi nebo mozkomíšním moku pacientů umožňující potvrzení diagnózy před smrtí pacienta. Tyto tkáně zřejmě obsahují jen nepatrné množství PrP^{RES}, avšak obsah senPrP^{TSE} by v nich mohl být vyšší [26]. Včasná diagnóza je nezbytným předpokladem pro vývoj a posléze i implementaci dnes neexistující účinné terapie. V současnosti se v diagnostice prionových chorob začínají uplatňovat vysoce rozlišující zobrazovací metody, jako jsou různé formy magnetické rezonance [65,66], avšak ani ty se neobejdou bez potvrzení nálezu konfirmačním testem. Další oblastí, kde by spolehlivý pre mortem test měl hrát důležitou úlohu, je prevence možného zoonózního šíření prionových chorob v rámci invazivních lékařských zákroků, například v neurochirurgii. V naší republice jsou na přítomnost PrP^{TSE} povinně vyšetřováni všichni dárci oční rohovky, všechny vyšetřené vzorky byly zatím negativní [67]. Na druhou stranu zavedení uni-

verzálního testování dárců krve se nezdá být ve většině států světa za současné situace praktické. Epidemiologická data nenaznačují, že by transfuze krve hrála důležitou úlohu v přenosu klasické CJN a počet úmrtí na vCJN ve Velké Británii se od roku 2005 drží na pěti a méně případech ročně. Navíc přes prokázanou přenositelnost vCJN krevní transfuzí [7] zatím nedochází k nárůstu počtu takto způsobených případů. Kromě vysokých nákladů by univerzální testování přineslo i nemalé etické problémy spojené s informováním zdravého dárce o možnosti, že má neléčitelnou neurodegenerativní chorobu. Nicméně to v žádném případě neznamená, že by se vědecká komunita neměla snažit o co nejrychlejší vývoj preklinického testu pro prionová onemocnění. Probíhající epidemie chronického chřadnutí (CWD) jelenovitě zvěře v Severní Americe a obavy z možného přenosu CWD na hospodářská zvířata a člověka naznačují, že s prionovými chorobami je nutné počítat i do budoucna.

Samostatnou kapitolou tvoří otázka možného terapeutického použití PrP^{TSE} specifických protilátek. Řada protilátek proti různým epitopům PrP^C byla schopna inhibovat propagaci prionů in vitro a vyléčit priony infikované buněčné kultury [68]. Některé z protilátek byly navíc schopné prodloužit dobu přežití experimentálně infikovaných zvířat, zejména pokud byly podány profylakticky [69]. Předpokládá se, že vazba protilátky na PrP^C ovlivňuje dynamiku jeho interakce

s PrP^{TSE}. Tím dojde k zpomalení propagace PrP^{TSE} a buňka získá čas na jeho odbourání. Terapeutické použití protilátek proti PrP^C je však spojeno s nebezpečím, že vyvázání buněčného PrP^C povede vzhledem k jeho nejasné fyziologické úloze k nepředvídatelné a potenciálně nebezpečné reakci organismu. Intracerebrální aplikace PrP^C protilátek, ale i jejich F(ab)₂ a Fab fragmentů vedla u transgenních myší k neurodegeneraci [70]. Toto nebezpečí by mohlo pomoci překlenout právě použitím PrP^{TSE} specifických protilátek, které se na normální PrP^C v těle neváží. Samozřejmě i v tomto případě by komplikujícím faktorem terapie zůstala nutnost překonání hematoencefalické bariéry. Přes tyto problémy zůstává vývoj imunoterapie pro prionové choroby, ale i pro ostatní neurodegenerativní proteinopatie velmi nadějnou a atraktivní možností [71].

Závěrem lze shrnout, že konformačně specifické protilátky detekující senPrP^{TSE} představují perspektivní nástroj, který by měl pomoci nejen s diagnostikou proteáza-senzitivní prionopatií, ale i s detekcí prionů u preklinických případů CJN, a umožnit tak prevenci nozokomiálního přenosu prionových chorob a zároveň získat čas pro aplikaci dnes chybějící účinné terapie.

Literatura

- Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(23): 13363–13383.
- Creutzfeldt HG. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Vorläufige Mitteilung. Z ges Neurol und Psychiat* 1920; 57: 1–18.
- Jakob A. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Vorläufige Mitteilung. Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* 1921; 70: 132–146.
- Gajdusek DC, Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* 1957; 257(20): 974–978.
- Matěj R, Rusina R, Koukolík F. 5 let činnosti Národní referenční laboratoře lidských prionových onemocnění při Oddělení patologie a molekulární medicíny FTNSP: naše zkušenosti a přehled literatury. *Cesk Slov Neurol N* 2007; 70/103(6): 637–642.
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 347(9006): 921–925.
- Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, Will RG. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. *Vox Sang* 2006; 91(3): 221–230.
- Holada K, Simak J, Brown P, Vostal JG. Divergent Expression of Cellular Prion Protein (PrP^C) on Blood Cells of Human and Non-human Primates. *Transfusion* 2007; 47(12): 2223–2232.
- Aguzzi A, Baumann F, Bremer J. The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* 2008; 31: 439–477.
- Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner SB. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 1990; 110(3): 743–752.
- Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Cheesebro B. Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol* 1989; 63(1): 175–181.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(23): 10962–10966.
- Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ jr. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* 1993; 268(27): 20276–20284.
- Hobzová K, Janoušková O. Tkáňové kultury pro studium prionových chorob. *Cesk Slov Neurol N* 2010; 73(4): 379–386.
- Horiuchi M, Caughey B. Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J* 1999; 18(12): 3193–3203.
- Hobzová K, Janoušková O. Tkáňové kultury pro studium prionových chorob. *Cesk Slov Neurol N* 2010; 73(4): 379–386.
- Collinge J, Gorham M, Hudson F, Kennedy A, Keogh G, Pal S et al. Safety and efficacy of quinacrine in human prion disease (PRION-1 study): a patient-preference trial. *Lancet Neurol* 2009; 8(4): 334–344.
- Tsuboi Y, Doh-Ura K, Yamada T. Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases. *Neuropathology* 2009; 29(5): 632–636.
- Zerr I. Therapeutic trials in human transmissible spongiform encephalopathies: recent advances and problems to address. *Infect Disord Drug Targets* 2009; 9(1): 92–99.
- Glierová H, Holada K. Úloha imunitního systému v prionových chorobách. *Alergie* 2006; 8(2): 143–148.
- Sassa Y, Kataoka N, Inoshima Y, Ishiguro N. Anti-PrP antibodies detected at terminal stage of prion-affected mouse. *Cell Immunol* 2010; 263(2): 212–218.
- Holada K. Prionové choroby a pokrok ve vývoji testu pro preklinickou detekci abnormálního prionového proteinu (PrP^{Sc}). *Klin Mikrobiol Inf Lék* 2005; 11(5): 151–160.
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M et al. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 1998; 4(10): 1157–1165.
- Safar JG, Geschwind MD, Deering C, Didorenko S, Sattavat M, Sanchez H et al. Diagnosis of human prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(9): 3501–3506.
- Thackray AM, Hopkins L, Bujdosó R. Proteinase K-sensitive disease-associated ovine prion protein revealed by conformation-dependent immunoassay. *Biochem J* 2007; 401(2): 475–483.
- Yakovleva O, Janiak A, McKenzie C, McShane L, Brown P, Cervenakova L. Effect of protease treatment on plasma infectivity in variant Creutzfeldt-Jakob disease mice. *Transfusion* 2004; 44(12): 1700–1705.
- Holada K, Glierová H, Simak J, Vostal JG. Expression of cellular prion protein on platelets from patients with gray platelet or Hermansky-Pudlak syndrome and the protein's association with alpha-granules. *Haematologica* 2006; 91(8): 1126–1129.
- Holada K, Simak J, Vostal JG. Transmission of BSE by blood transfusion. *Lancet* 2000; 356(9243): 1772.
- Holada K, Simak J, Risitano AM, Maciejewski J, Young NS, Vostal JG. Activated platelets of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria express cellular prion protein. *Blood* 2002; 100(1): 341–343.
- Daude N, Lehmann S, Harris DA. Identification of intermediate steps in the conversion of a mutant prion protein to a scrapie-like form in cultured cells. *J Biol Chem* 1997; 272(17): 11604–11612.
- Horiuchi M, Priola SA, Chabry J, Caughey B. Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(11): 5836–5841.
- Pastrana MA, Sajani G, Onisko B, Castilla J, Morales R, Soto C et al. Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrP^{Sc} fraction. *Biochemistry* 2006; 45(51): 15710–15717.
- Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alshekhlee A et al. A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol* 2008; 63(6): 697–708.
- Jansen C, Parchi P, Jelles B, Gouw AA, Beunders G, van Spaendonck RM et al. The first case of fatal familial insomnia (FFI) in the Netherlands: a patient from Egyptian descent with concurrent four repeat tau deposits. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37(5): 549–553.
- Rodríguez-Martínez AB, Garrido JM, Zarranz JJ, Arteagaotia JM, de Pancorbo MM, Atarés B et al. A novel form of human disease with a protease-sensitive prion protein and heterozygosity methionine/valine at codon 129: Case report. *BMC Neurol* 2010; 10: 99.
- Head MW, Knight R, Zeidler M, Yull H, Barlow A, Ironside JW. A case of protease sensitive prionopathy in a patient in the UK. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009; 35(6): 628–632.
- Zou WQ, Puoti G, Xiao X, Yuan J, Qing L, Cali I et al. Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol* 2010; 68(2): 162–172.
- Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R et al. Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 1997; 390(6655): 74–77.
- Spinner DS, Kascak RB, Lafauci G, Meeker HC, Ye X, Flory MJ et al. CpG oligodeoxynucleotide-enhanced humoral immune response and production of antibodies to prion protein PrP^{Sc} in mice immunized with 139A scrapie-associated fibrils. *J Leukoc Biol* 2007; 81(6): 1374–1385.
- Bainbridge J, Jones N, Walker B. Multiple antigenic peptides facilitate generation of anti-prion antibodies. *Clin Exp Immunol* 2004; 137(2): 298–304.
- Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 1992; 356(6370): 577–582.
- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 1994; 8(2–3): 121–127.
- Paramithiotis E, Pinard M, Lawton T, LaBoissiere S, Leathers VL, Zou WQ et al. A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nat Med* 2003; 9(7): 893–899.
- Hedlin PD, Cashman NR, Li L, Gupta J, Babuik LA, Potter A et al. Design and delivery of a cryptic PrP(Sc) epitope for induction of PrP(Sc)-specific antibody responses. *Vaccine* 2010; 28(4): 981–988.

45. Thackray AM, Madec JY, Wong E, Morgan-Warren R, Brown DR, Baron T et al. Detection of bovine spongiform encephalopathy, ovine scrapie prion-related protein (PrP^{Sc}) and normal PrP^C by monoclonal antibodies raised to copper-refolded prion protein. *Biochem J* 2003; 370(1): 81–90.
46. Polymenidou M, Moos R, Scott M, Sigurdson C, Shi YZ, Yajima B et al. The POM monoclonals: a comprehensive set of antibodies to non-overlapping prion protein epitopes. *PLoS One* 2008; 3(12): e3872.
47. Jones M, Wight D, McLoughlin V, Norrby K, Ironside JW, Connolly JG et al. An antibody to the aggregated synthetic prion protein peptide (PrP106–126) selectively recognizes disease-associated prion protein (PrP) from human brain specimens. *Brain Pathol* 2009; 19(2): 293–302.
48. Horiuchi M, Karino A, Furuoka H, Ishiguro N, Kimura K, Shinagawa M. Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity. *Virology* 2009; 394(2): 200–207.
49. Petsch B, Müller-Schiffmann A, Lehle A, Zirdum E, Prikulis I, Kuhn F et al. Biological effects and use of PrP^{Sc}- and PrP-specific antibodies generated by immunization with purified full-length native mouse prions. *J Virol* 2011; 85(9): 4538–4546.
50. Biasini E, Seegulam ME, Patti BN, Solfrosi L, Medrano AZ, Christensen HM et al. Non-infectious aggregates of the prion protein react with several PrP^{Sc}-directed antibodies. *J Neurochem* 2008; 105(6): 2190–2204.
51. Moroncini G, Kanu N, Solfrosi L, Abalos G, Telling GC, Head M et al. Motif-grafted antibodies containing the replicative interface of cellular PrP are specific for PrP^{Sc}. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(28): 10404–10409.
52. Williamson RA, Peretz D, Pinilla C, Ball H, Bastidas RB, Rozenshteyn R et al. Mapping the prion protein using recombinant antibodies. *J Virol* 1998; 72(11): 9413–9418.
53. Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW et al. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* 1994; 266(5187): 1024–1027.
54. Solfrosi L, Bellon A, Schaller M, Cruite JT, Abalos GC, Williamson RA. Toward molecular dissection of PrP^C-PrP^{Sc} interactions. *J Biol Chem* 2007; 282(10): 7465–7471.
55. Curin Serbec V, Bresjanac M, Popovic M, Pretnar Hartman K, Galvani V, Ruprecht R et al. Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob's disease-affected and normal brain tissue. *J Biol Chem* 2004; 279(5): 3694–3698.
56. Kosmač M, Koren S, Giachin G, Stoilova T, Gennaro R, Legname G et al. Epitope mapping of a PrP(Sc)-specific monoclonal antibody: identification of a novel C-terminally truncated prion fragment. *Mol Immunol* 2011; 48(5): 746–750.
57. Zou WQ, Zheng J, Gray DM, Gambetti P, Chen SG. Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(5): 1380–1385.
58. Cordeiro Y, Machado F, Juliano L, Juliano MA, Brentani RR, Foguel D et al. DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem* 2001; 276(52): 49400–49409.
59. Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999; 46(2): 224–233.
60. Tayebi M, Jones DR, Taylor WA, Stileman BF, Chapman C, Zhao D et al. PrP(Sc)-specific antibodies with the ability to immunodetect prion oligomers. *PLoS One* 2011; 6(5): e19998.
61. Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003; 300(5618): 486–489.
62. Choi YG, Kim JI, Jeon YC, Park SJ, Choi EK, Rubenstein R et al. Nonenzymatic glycation at the N terminus of pathogenic prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *J Biol Chem* 2004; 279(29): 30402–30409.
63. Panigaj M, Brouckova A, Glierova H, Dvorakova E, Simak J, Vostal JG et al. Underestimation of the expression of cellular prion protein on human red blood cells. *Transfusion* 2011; 51(5): 1012–1021.
64. Dvorakova E, Prouza M, Janouskova O, Panigaj M, Holada K. Development of monoclonal antibodies specific for glycosylated prion proteins. *J Toxicol Environ Health A* 2011; 74(22–24): 1469–1475.
65. Tschampa HJ, Zerr I, Urbach H. Radiological assessment of Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur Radiol* 2007 May; 17(5): 1200–1211.
66. Sheardová K, Matěj R, Rektorová I. Hyperintenzivní léze reagující na steroidy u pacienta s Creutzfeldt-Jakobovou nemocí. *Cesk Slov Neurol N* 2010; 73/106(1): 76–79.
67. Jirsova K, Krabcova I, Novakova J, Hnathova I, Koukolik F, Kubesova B et al. The assessment of pathogenic prions in the brains of eye tissue donors: 2-years experience in the Czech Republic. *Cornea* 2010; 29(9): 996–999.
68. Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G et al. Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* 2001; 412(6848): 739–743.
69. White AR, Enever P, Tayebi M, Mushens R, Linehan J, Brandner S et al. Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* 2003; 422(6927): 80–83.
70. Lefebvre-Roque M, Kremmer E, Gilch S, Zou WQ, Féraudet C, Gilles CM et al. Toxic effects of intracerebral PrP antibody administration during the course of BSE infection in mice. *Prion* 2007; 1(3): 198–206.
71. Wisniewski T, Goñi F. Immunomodulation for prion and prion-related diseases. *Expert Rev Vaccines* 2010; 9(12): 1441–1452.

www.ambitmedia.cz