

Raziskovalni prispevek/Research article

ISKANJE GENETSKIH SPREMEMB TER POLIMORFIZEM KODONA 129 GENA *PRNP* V ZDRAVI SLOVENSKI POPULACIJI IN SPORADIČNIH PRIMERIH CREUTZFELDT-JAKOBOVE BOLEZNI

SCREENING FOR GENETIC CHANGES AND CODON 129 POLYMORPHISM IN *PRNP*
GENE IN HEALTHY SLOVENIAN POPULATION AND SPORADIC CASES OF
CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE

Sava Smerkolj, Mara Popović, Damjan Glavač

Oddelek za molekularno genetiko, Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Korytkova 2, 1000 Ljubljana

Prispelo 2004-06-23, sprejeto 2004-08-21; ZDRAV VESTN 2004; 73: 803-6

Ključne besede: prionske bolezni; *PRNP*; kodon 129; tihe genske spremembe; dovzetnost za *CJB*

Izvleček – Izhodišča. Prionski protein ima pomembno vlogo pri nastanku prionskih bolezni, usodnih nevrodegenerativnih obolenj. Genotip kodona 129 gena za prionski protein (*PRNP*) je znan dovzetnostni dejavnik za te bolezni, zato smo želeli določiti njegovo razporeditev v zdravi slovenski populaciji in pri sporadičnih primerih Creutzfeldt-Jakobove bolezni (*sCJB*). Poleg tega smo želeli pregledati celoten *PRNP*, da bi ugotovili prisotnost genetskih sprememb.

Metode. Pregledali smo 350 vzorcev DNK zdravih krvodajalcev in 12 vzorcev DNK bolnikov, umrlih za *sCJB*. Gen smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo in mu po konformacijski analizi z avtomatskim sekvencatorjem določili zaporedje.

Rezultati. V zdravi populaciji je bilo 46,8% metioninskih homozigotov, 12,1% valinskih homozigotov, 41,1% heterozigotov. Od 12 bolnikov s *sCJB* pa je bilo 10 metioninskih homozigotov (83,3%), 1 valinski homozigot (8,3%) in 1 heterozigot (8,3%).

Tako v zdravi populaciji kot pri enem bolniku smo našli tihe spremembe enega nukleotida:

kombinacija spremembe na kodonu 76 (228C > T) in kodonu 84 (252T > C) pri enem vzorcu zdrave populacije, kombinacija spremembe na kodonu 68 (204T > C) in kodonu 76 (228C > T) pri dveh vzorcih zdrave populacije ter sprememba na kodonu 117 (351A > G) pri enem vzorcu zdrave populacije in pri enem bolniku.

Zaključki. V primerjavi s povprečjem evropske populacije rahlo povečana frekvenca genotipa M/M na račun zmanjšane frekvence genotipa M/V v zdravi slovenski populaciji kaže na nekoliko povečano tveganje za novo različico *CJB* (*vCJB*), pri kateri so vsi doslej ugotovljeni primeri, razen enega heterozigota, metioninski homozigoti. Razporeditev pri bolnikih kaže na razporeditev, specifično za *sCJB*. Na podlagi odsotnosti patogenih mutacij smo potrdili, da gre pri bolnikih za nedružinsko, sporadično obliko bolezni.

Key words: prion diseases; *PRNP*; codon 129; silent genetic changes; *CJD* susceptibility

Abstract – Background. Prion protein has an important role in development of prion diseases, fatal neurodegenerative disorders. As the codon 129 genotype of the prion protein gene (*PRNP*) is a known susceptibility factor for the diseases, we wanted to determine its distribution in healthy Slovenian population and also in cases of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (*sCJD*). Furthermore, we wanted to screen the whole gene in order to establish the presence of genetic changes.

Methods. We screened 350 DNA samples of healthy blood donors and 12 DNA samples of patients deceased of *sCJD*. After the amplification and conformation analysis had been done, the gene was sequenced using an automatic sequencer.

Results. Methionine homozygotes comprised 46.8% of healthy population, valine homozygotes 12.1% and heterozygotes 41.1%; out of 12 *sCJD* patients 10 were methionine homozygotes (83.3%), 1 was valine homozygote (8.3%) and 1 was heterozygote (8.3%).

Found SNPs were combination of codon 76 change (228C > T) and codon 84 change (252T > C) in a single sample of healthy population, combination of codon 68 change (204T > C) and codon 76 change (228C > T) in two samples of healthy population and codon 117 change (351A > G) in a healthy population sample and in a valine homozygote patient.

Conclusions. In comparison to the pooled Caucasian population is genotype M/M frequency slightly increased on account of decreased genotype M/V frequency in healthy Slovenian population, suggesting a little higher risk for acquiring a new variant of *CJD* (*vCJD*), because up to date all confirmed *vCJD* cases except one heterozygote were methionine homozygotes. Codon 129 genotype distribution in *sCJD* can be described as disease-specific. The absence of pathogenic mutations in *sCJD* patients confirms the non-familial, sporadic disease form.

Uvod

Prionske bolezni ali prenosljive spongiformne encefalopatije so bolezni živčnega sistema, ki se kažejo v sporadični, družinski oz. dedni ter prenosljivi obliki. Inkubacija teh bolezni je lahko zelo dolga (1).

Creutzfeldt-Jakobova bolezen (CJB), najpogostejša oblika prionskih bolezni pri človeku, se lahko pojavlja v vseh treh etioloških oblikah. Gerstmann-Sträussler-Scheinkerjev sindrom (GSS) in usodna družinska nespečnost (FFI, Fatal Familial Insomnia) sta dedni obliki prionskih bolezni pri človeku, opisana pa je tudi sporadična oblika FI (2). Dedovanje vseh treh dednih oblik je avtosomno dominantno, bolezen pa je posledica raznolikih točkovnih in insercijskih mutacij v kodirajoči regiji *PRNP* (3). Gen se nahaja na krajši ročici kromosoma 20 ter kodira celični prionski protein (PrP^C), ki se najbolj intenzivno izraža na celični membrani nevronov. Normalna funkcija PrP^C še ni popolnoma razjasnjena, vendar je znano, da sodeluje pri prenosu bakra. Vezava bakra poteka preko okta-peptidnega zaporedja, ki ne kaže homologije z drugimi znanimi vezavnimi motivi (4).

PrP^C se lahko s posttranslacijskim procesom preoblikuje v patološko, amiloidogeno izoobliko, PrP^{Sc}. Po konformacijski spremembi PrP^C, ki je sicer bogata z vijačnicami a in občutljiva za detergente in proteaze, pridobi večjo vsebnost struktur β in postane netopna v nedenaturirajočih detergentih ter delno odporna proti proteolizi (5). Kopičenje PrP^{Sc} v možganih povzroči propadanje živčnih celic, reaktivno astrogliozo, spongiformno degeneracijo nevrotila, pri manjšem številu bolnikov s sCJB (10%) pa tudi nastanek amiloidnih lež s posledičnim razvojem bolezni s sliko hitro napredujoče demence (6). V normalni populaciji se pojavljajo v *PRNP* različni polimorfizmi, med katerimi je najpomembnejši polimorfizem kodona 129, ki kodira metionin in/ali valin. V normalni populaciji kavkaške rase je približno 40% metioninskih homozigotov, 10% valinskih homozigotov in 50% heterozigotov (7). Omenjeni polimorfizem ima pomembno vlogo v patogenezi dednih prionskih bolezni, in sicer vpliva na obliko bolezni, starost pri nastopu bolezni ter njeno trajanje (8, 9). Poleg tega so pokazali, da polimorfizem določa dovzetnost za sporadično in druge nedružinske oblike (iatrogeno in novo različico) CJB (10-12), sCJB pa so povezali tudi s polimorfizmi nekodirajočega eksona 1 *PRNP* (13). Homozigotnost pomeni večje tveganje za pridobitev CJB (14), ker je prehod iz normalne v patološko obliko lažji pri molekulah z identičnim aminokislinskim zaporedjem (10).

V naši študiji smo želeli ugotoviti frekvenco posameznih genotipov kodona 129 v zdravi slovenski populaciji ter pri bolnikih s sCJB, primerjati naše podatke z že znanimi rezultati drugih populacij in potrditi vpliv homozigotnosti kodona 129 na razvoj bolezni. Poleg tega smo želeli ugotoviti morebitno prisotnost genetskih sprememb v kodirajoči regiji *PRNP* in na ta način natančneje etiopatogenetsko opredeliti bolezen pri 12 bolnikih s CJB.

Metode

Vzorci

Zdrava slovenska populacija je vključevala 350 vzorcev krvi krvodajalcev, vzorcev krvi in/ali možganskega tkiva bolnikov s sCJB pa je bilo 12. Po smrti bolnikov s kliničnim sumom na CJB so bili možgani fiksirani v formalinu najmanj 14 dni, nato so bili vzorci različnih predelov možganov po eni uri namakanja v 96-odstotni mravljični kislini, ki uniči kužnost prionov, vklopljeni v parafin po standardnem postopku. Pet mikronov debele histološke rezine smo barvali s hematoksilin-eozinom, paralelne pa obdelali s peroksidazno imunohistokemijsko metodo ob uporabi nespecifičnega monoklonskega protitelesa

proti PrP^{Sc}, 3F4 (Senetec, USA). Prej smo histološke rezine obdelali s postopki, ki so uničili PrP^C in obenem razkrili epitop na PrP^{Sc}, na katerega se je vezalo protitelo (15).

Osamitev DNK

DNA iz krvi krvodajalcev smo osamili po standardnem postopku z obarjanjem s soljo in etanolom, DNK iz krvi in/ali možganov bolnikov s sCJB pa z Nucleonovim kitom (BACC za kri in ST za možgane) za osamitev genomske DNA (Tepnel Life Sciences PLC).

Pomnoževanje gena

PRNP smo pomnožili v treh prekrivajočih se fragmentih z verižno reakcijo s polimerazo (PCR, Polymerase Chain Reaction) v volumnu 10 μ l. Uporabili smo 30 ng genomske DNK, 0,72 pmol vsakega od začetnih oligonukleotidov, 10-kratni puffer PCR z 1,5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems, USA), 6,7 nmol dNTP-jev, 0,25 U polimeraze AmpliTaqGold (Applied Biosystems, USA). Dobljene fragmente PCR smo označili PrP1, PrP2 in PrP3.

Konformacijska analiza in določanje nukleotidnega zaporedja

Za iskanje sprememb v nukleotidnem zaporedju posameznih pomnoženih fragmentov gena pri zdravi populaciji smo uporabili analizo enoverižnih konformacij (SSCA, Single-Stranded Conformation Analysis). Poleg iskanja posameznih sprememb smo s pomočjo treh različnih vzorcev migracije sredinskega fragmenta, PrP2, določili tri različne genotipe kodona 129. Omenjenim trem vzorcem in drugim vzorcem, ki so pokazali spremenjeno migracijo, smo določili nukleotidno zaporedje.

SSCA smo izvedli na 10-odstotnem poliakrilamidnem gelu z 2,6-odstotnim zamreženjem. Na gel smo nanесли produkte PCR, ki smo jih prej zmešali z nanašalnim pufrom in denaturirali. Elektroforeza je potekala v pufru TBE pri 5°C pri moči od 37 do 50W, odvisno od dolžine potujočega produkta PCR. Po končani elektroforezi smo vzorce prikazali s srebrenjem. Za določitev nukleotidnega zaporedja smo ponovno pomnožili fragmente z reakcijo PCR v volumnu 50 μ l, očistili produkte, izvedli sekvenčno reakcijo, očistili produkte sekvenčne reakcije ter jih raztopili v pufru TSR (Template Suppression Reagent). Tako pripravljenim vzorcem smo določili nukleotidno zaporedje z avtomatskim sekvenatorjem ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, USA).

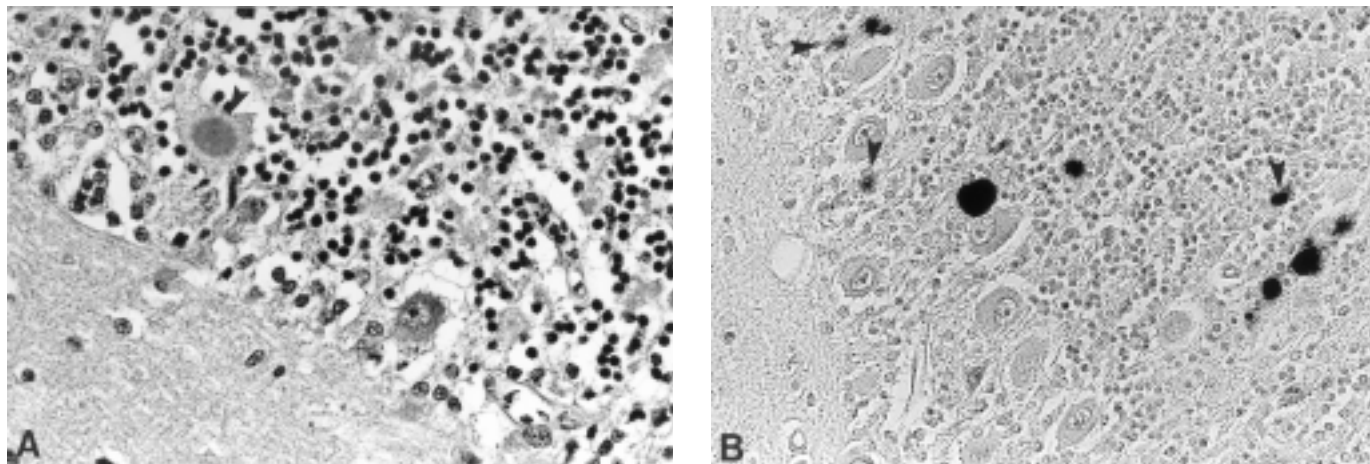
Rezultati

V možganih 12 kliničnih sumov na CJB so bile histološke spremembe značilne za to bolezen. Le pri enem so bili v skorji malih možganov agregati PrP^{Sc} vidni v standardnih preparatih, obarvanih s HE v obliki plakov kuru, ki so bili močno označeni s protitelesi proti PrP (sl. 1a, b).

Imunohistokemijski vzorec odlaganja PrP^{Sc} je bil v ostalih primerih sinaptičen (sl. 2). Določili smo razporeditev genotipa kodona 129 v zdravi slovenski populaciji in jih primerjali z rezultati dosedanjih študij za skupno evropsko populacijo ter rezultati za nekatere posamične evropske populacije (razpr. 1).

Poleg tega smo določili tudi genotipe kodona 129 pri 12 bolnikih s sCJB. 10 je bilo metioninskih homozigotov (83,4%), eden je bil valinski homozigot (8,3%) in eden heterozigot (8,3%).

Skupno smo našli štiri spremembe, od tega je bila ena v dveh različnih kombinacijah, ena, že prej opisana, pa je bila samostojna. Najdene genetske spremembe so navedene v razporednici 2.



Sl. 1. A – Odlage PrP^{Sc} v obliki plakov kuru (glava puščice) v notranji granularni plasti skorje malih možganov. HE, orig. povečava 400-krat. B – Monoklonska protitelesa proti PrP označijo plake kuru in tudi manjše odlage PrP^{Sc} (majhne glave puščic), ki sicer niso vidne v preparatih HE. IHR, 3F4, Senetec, ZDA, orig. povečava 350-krat.

Figure 1. A – Kuru plaque-like deposits of PrP^{Sc} in the internal molecular layer of cerebellar cortex (arrowhead). H&E, orig. magn. 400 \times . B – Monoclonal antibodies against PrP label kuru plaques, as well as smaller plaque-like deposits, which are not otherwise visible in H&E slides (small arrowheads). IHR, 3F4, Senetec, USA, orig. magn. 350 \times .

Razpr. 1. Odstotni delež posameznega genotipa kodona 129.

Table 1. Percentage of each codon 129 genotype.

Genotip Genotype	M/M	V/V	M/V
Slovenska populacija Slovene population	46,8	12,1	41,1
Francoška populacija (21, 22) French population	39,1	9,9	50,9
Španska populacija (23) Spanish population	41,8	16,0	42,2
Avstrijska populacija (24) Austrian population	43,0	8,3	48,7
Italijanska populacija (25) Italian population	45,2	14,5	40,3
Skupna evropska populacija (6) Total European population	39,2	11,1	49,8

M/M: metionin/metionin, methionine/methionine

V/V: valin/valin, valine/valine

M/V: metionin/valin, methionine/valine

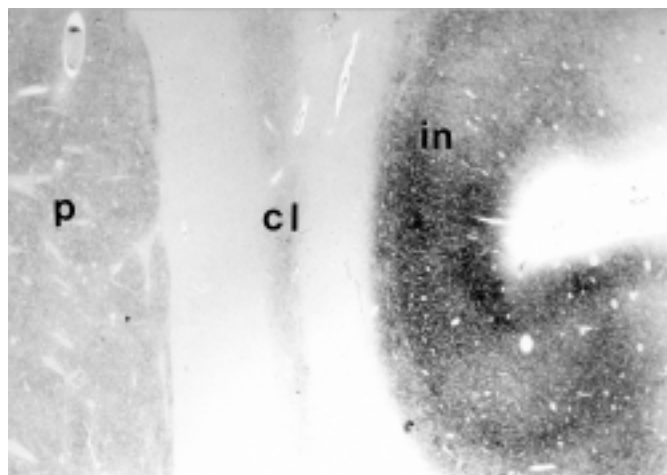
Razpr. 2. Odkrite genetske spremembe v *PRNP* v zdravi slovenski populaciji in pri bolnikih s *sCJB*.

Table 2. Discovered genetic changes in *PRNP* in healthy Slovenian population and *sCJD* patients.

Populacija	Število vzorcev s spremembo	Genotip kodona 129	Nukleotidne spremembe
Population	No. of samples	Codon 129 genotype	Nucleotide changes
Zdravi/sCJB Healthy/sCJB	1/1	Val Valine	351A > G (17)
Zdravi Healthy	1	Met Methionine	252T > C; 228C > T
Zdravi Healthy	2	Met/Val Methionine/ Valine	228C > T; 204T > C (18, 21)

Razpravljanje

Primerjava razporeditve genotipov kodona 129 v zdravi slovenski populaciji z razporeditvijo pri skupni evropski populaciji kaže, da je v slovenski populaciji rahlo povečan delež



Sl. 2. Sinaptični tip odlaganja PrP^{Sc} v insuli (in), klavstrumu (cl) in putamnu (p), medtem ko bela možganovina med temi strukturami sive ni reagirala s 3F4. IHR, orig. povečava 5-krat.

Figure 2. Synaptic type of immunoreactivity is present in insula (in), claustrum (cl) and putamen (p), while white matter in-between did not react with monoclonal antibodies 3F4. IHR, orig. magn. 5 \times .

metioninskih homozigotov na račun heterozigotov, kar kaže na nekoliko večjo dovzetnost za razvoj vseh oblik CJB.

Razporeditev genotipov kodona 129 pri bolnikih s *sCJB* lahko označimo kot specifično za bolezen. Opisali so že, da pri sporadičnih primerih CJB prevladujejo metioninski homozigoti nad valinskimi (16), kar velja tudi v primeru slovenskih bolnikov s *sCJB* (83,4% metioninskih homozigotov, 8,3% valinskih homozigotov in 8,3% heterozigotov).

Ker v kodirajoči regiji *PRNP* nismo odkrili nobenih patogenih mutacij, lahko potrdimo, da gre v naših primerih resnično za nedružinsko obliko CJB. Edino tiho najdeno spremembo, 351A > G (A117A), ki je bila prisotna v kombinaciji z valinsko homozigotnostjo kodona 129, so že prej opisali kot polimorfizem, ki se pojavlja pri 20% Evropejcev (17). Druga študija poroča o prisotnosti omenjene spremembe pri 5,4% vprašljivi-

vih nemških primerih sCJB (18). Pri naših bolnikih je bila prisotna pri 1 od 12 primerov, našli pa smo jo tudi v zdravi populaciji s frekvenco 3%.

Alanin na tem mestu je vključen v močno ohranjeno regijo, ki tvori del nevrotoksičnega amiloidogenega transmembranskega segmenta PrP^C (19). Na tem mestu je tudi prepoznavno mesto za restriksijski encim *PvuII*, omenjeni polimorfizem pa ga odpravi in povzroči nastanek CpG, ki je vroče mesto za nadaljnje mutacije. Kodon 117 je tudi mesto patogene mutacije A117V, ki je povezana z GSS (20).

V zdravi populaciji smo našli še dve spremembi, 252T > C in 228C > T (P84P in P76P), doslej še neopisani v literaturi, o spremembi 204T > C (P68P) pa so že poročali v povezavi z GSS²² in z vprašljivim primerom CJB (18), vendar ne kot o vzroku bolezni. Vse omenjene spremembe ležijo v regiji oktapeptidnih ponovitev, ki so odgovorne za vezavo bakrovih ionov. Dejanska vezava poteka preko histidinov, ki so v neposredni bližini kodonov s spremenjenimi nukleotidi.

Tihe spremembe, najdene pri bolnikih s prionskimi boleznimi, kot sta A117A in P68P, naj bi vplivale na stabilnost mRNK in posredno na učinkovitost translacije, torej bi lahko vplivale tudi na dovzetnost za bolezen. Podobno lahko sklepamo tudi za ostale tihe spremembe, kajti njihova odsotnost pri prionskih bolnikih še ne pomeni, da dovzetnosti za bolezen ni v zdravi populaciji.

Zaključki

Po pregledu kodona 129 gena *PRNP* v zdravi slovenski populaciji smo ugotovili, da ne odstopa bistveno od evropskega povprečja. Toda rahlo povečan delež metioninskih homozigotov lahko pomeni nekoliko večjo dovzetnost za CJB, med drugimi oblikami tudi vCJB. Slovenska populacija je primerjalno glede na bližnje evropske populacije najbolj podobna populaciji sosedov Italijanov.

Pri bolnikih s sCJB prevladujejo metioninski homozigoti (83,4%), zato lahko trdimo, da je razporeditev za bolezen specifična. Odsotnost patogenih mutacij pomeni izključitev družinske oblike CJB. Najdene tihe spremembe preko vpliva na stabilnost mRNK ter translacijo lahko pomenijo povečano dovzetnost za bolezen tako pri zdravi populaciji kot pri bolnikih.

Literatura

- Brown P. Transmissible human spongiform encephalopathy (infectious cerebral amyloidosis): Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrome, and Kuru. In: Calne DB ed. Neurodegenerative diseases. Philadelphia: W. B. Saunders 1994: 839-76.
- Parchi P, Giese A, Capellari S et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999; 46: 224-33.
- Brown P, Cathala F, Raubertas RF, Gajdusek DC, Castaigne P. The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology* 1987; 37: 895-904.
- Lehmann S. Metal ions and prion diseases. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6: 187-92.
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wütrich K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* 1997; 413: 282-8.
- Oesch B, Westaway D, Walchli M et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985; 40: 735-46.
- Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M. Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1999; 353: 1673-4.
- Baker HE, Poulter M, Crow TJ, Frith CD, Lofthouse R, Ridley RM. Amino acid polymorphism in human prion protein and age at death in inherited prion disease. *Lancet* 1991; 337: 1286-6.
- Dlouhy SR, Hsiao K, Farlow MR et al. Linkage of the Indiana kindred of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease to the prion protein gene. *Nat Genet* 1992; 1: 64-7.
- Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 1991; 352: 340-2.
- Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ. Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1991; 337: 1441-2.
- Brown P, Cervenkova L, Goldfarb LG et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: an example of the interplay between ancient genes and modern medicine. *Neurology* 1994; 44: 291-3.
- Mead S, Mahal SP, Beck J, Campbell T, Farral M, Fisher E, Collinge J. Sporadic - but not variant - Creutzfeldt-Jakob disease is associated with polymorphisms upstream of PRNP exon 1. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1225-35.
- Owen F, Poulter M, Collinge J, Crow TJ. Codon 129 changes in the prion protein gene in Caucasians. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 1215-6.
- Bell JE, Ironside JW. Neuropathology of spongiform encephalopathy in humans. *Brit Med Bull* 1993; 49: 738-77.
- Will RG, Alperovitch A, Poser S. Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six European countries. 1993-1995. *Ann Neurol* 1998; 43: 763-7.
- Wu Y, Brown WT, Robakis NK, Dobkin C, Devine-Gage E, Merz P, Wisniewski HM. A *PvuII* RFLP detected in the human prion protein (PrP) gene. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 3191-1.
- Windl O, Giese A, Shulz-Shaeffer W et al. Molecular genetics of human prion disease in Germany. *Hum Genet* 1999; 105: 244-52.
- Mastrangelo P, Westaway D. The prion gene complex encoding PrP(C) and Doppel: insights from mutational analysis. *Review. Gene* 2001; 275: 1-18.
- Doh-ura K, Tateishi J, Sasaki H, Kitamoto T, Sakaki Y. Pro => Leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 163: 974-9.
- Mastrianni JA, Curtis MT, Oberholtzer JC et al. Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia. *Neurology* 1995; 45: 2042-50.
- Laplanche J-L, Delasnerie-Lauprêtre N, Brandel JP et al. Molecular genetics of prion disease in France. *Neurology* 1994; 44: 2347-51.
- Deslys JP, Marcé D, Dormont D. Similar genetic susceptibility in iatrogenic and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Gen Virol* 1994; 75: 23-7.
- Combarros O, Sanchez-Guerra M, Lorca J et al. Polymorphism at codon 129 of the prion protein gene is not associated with sporadic AD. *Neurology* 2000; 55: 593-5.
- Zimmermann K, Turecek PL, Schwarz HP. Genotyping of the prion protein gene at codon 129. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999; 97: 355-8.
- Salvatore M, Genuardi M, Petraroli R, Masullo C, D'Alessandro M, Pocchiari M. Polymorphisms of the prion protein gene in Italian patients with Creutzfeldt-Jakob. *Hum Genet* 1994; 94: 375-9.