

På søken etter biomarkører i serum fra sau med skrapesjuka

SIV MELING¹, KJETIL BÅRDSSEN¹, ANNE BJØRNSTAD², MARTHA J. ULVUND¹

Seksjon for småfeforskning/Norges Veterinærhøgskole¹, Biomiljø/IRIS²

Introduksjon

Skrapesjuka er en prionsjukdom som er en fatal neurodegenerativ sjukdom beskrevet hos flere arter inkludert menneske. Skrapesjuka er ofte beskrevet som prototypen av prionsjukdommer. Per dags dato finnes det ingen definitiv diagnostisk test for sjukdom hos levende dyr som er i inkubasjonsperioden, sjukdommen blir bekreftet og diagnostisert post mortem ved hjelp av histopatologiske undersøkelser av hjernen, ofte i kombinasjon med Western Blot og immunhistokjemi for deteksjon av prionprotein scrapie (PrP^{Sc}) i hjernen. PrP^{Sc} er et sjukdomsfremkallende protein som er en unormal form av det vertskodede membranproteinet PrP^C. PrP^C er normalt uttrykt i flere organ og vev, blant annet hjernen, milt og lunger, og det er funnet i svette, spytt, melk og urin (Ulvund 2008).

Mottakelighet for klassisk skrapesjuka er avhengig av PrP-genotypen til sauen. Genotypen har effekt på inkubasjonstid, symptomer, spredning av PrP^{Sc} i kroppen, og infektivitet. Homozygot VRQ/VRQ (V₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁) er mest mottakelig for klassisk skrapesjuka, mens homozygot ARR/ARR er den mest resistente. Inkubasjonstiden til de fleste prionsjukdommene er gjerne fra fem år og oppover, men det er sett at sau med mottakelig genotype kan ha en inkubasjonstid så kort som ett til to år. De fleste tilfeller av klassisk skrapesjuka er trolig blitt smittet tidlig i livet. Dersom moren er smittet vil hun kunne utskille PrP^{Sc} gjennom fosterhinner, melk, urin og avføring, og dermed smitte avkom kort tid etter fødselen. Grunnet lang inkubasjonstiden vil de fleste lam som blir slaktet ved seks måneders alderen vise svært få vise symptomer (Ulvund 2008). Dette kan medføre at PrP^{Sc} fra dyr i den prekliniske fasen av skrapesjuka kan komme inn i næringskjeden. Det er ikke vist at menneske kan smittes av skrapesjuka fra sau, men en annen variant av prionproteinet (PrP^{BSE}, kugalskap) kan forårsake variant Creutzfeldt-Jakobs sjukdom (vCJD) hos menneske, og dersom denne varianten kommer over i sauen, vil den oppføre seg som scrapie og kunne forårsake human sjukdom. Det er også usikkerhet knyttet til forskjellige andre varianter av PrP^{Sc}, slik at en har ikke oversikt over hva dette kan bety i fremtiden.

På grunnlag av disse forholdene, ønsker en i dette prosjektet å finne biomarkører i serum som kan skille friske dyr fra dyr som er i den prekliniske fasen av

skrapesjuka. Ved identifisering av slike biomarkører håper en å få større innsikt i sjukdommen og også å utvikle en diagnostisk test som kan identifisere dyr med preklinisk sjukdom. I dette prosjektet leter en etter andre biomarkører enn PrP^{Sc}, da det i infektivitetsforsøk er vist at det er begrenset når og om PrP^{Sc} sirkulerer i blodbanen, konsentrasjonen er uansett liten og vanskelig å detektere, og avhenger trolig av vertens genotype og typen prionsjukdom. Det foreligger liten eller ingen kunnskap om biomarkører for prionsjukdommene, og det er også ukjent om slike spesifikke markører, om de finnes, vil være like avhengig av genotype og PrP^{Sc} variant.

En preklinisk test bør kunne utføres på kroppsvæsker som er lett tilgjengelige, som for eksempel blod, urin, spytt eller melk. Det er gjort lovende forskning på deteksjon av 14-3-3 proteiner i spinalvæske (CSF) fra pasienter med sporadisk Creutzfeld-Jakobs sjukdom (sCJD) (Green 2002). Dette er ikke like aktuelt på småfe da spinalvæske ikke er like lett tilgjengelig, men undersøkelser av sauens CSF vil likevel bli utført.

Proteomisk analyse av serumprøver.

Proteomiske analyser på jakt etter biomarkører har ført til resultater innen flere sjukdommer som for eksempel Diabetes Type 1 (Purohit and others 2006) og kreft (Petricoin, III and others 2002).

Det er flere metoder som kan benyttes for å studere proteomet, i dette prosjektet brukes SELDI-TOF-MS. Metoden er rask, effektiv, sensitiv og egnet for analyse av proteiner i løsning. Prøvematerialet kan applikeres direkte på forskjellige ProteinChip® eller det kan forbehandles før analysen. SELDI teknikken har vært brukt med gode resultater i forskning med tanke på biomarkører til flere krefttyper som prostatakreft (Petricoin, III and others 2002) og brystkreft (Li and others 2002; Paweletz and others 2001).

SELDI-TOF-MS separerer proteinene i prøven med tanke på proteinenes egne egenskaper, pI og masse (M/Z). De forskjellige proteinene i prøvene vises som topper (SELDI-topper) i et spekter (SELDI-spekter). Det er ikke mulig å måle alle proteinene i en serumprøve, men en får en god oversikt. En av utfordringene er at serum inneholder store mengder albumin og globulin, som kan overskygge resultatene. Sensitiviteten økes ved å fraksjonere prøvene før analysen. Prøvene blir separert inn i syv forskjellige fraksjoner som inneholder forskjellige proteiner. Data fra analysene må vurderes statistisk i etterkant. Målet er å finne topper som viser signifikante forskjeller mellom gruppene sjuka og friske ved hjelp av univariat og multivariat analyser. Disse toppene må deretter identifiseres ved hjelp av andre teknikker.

Materiale og metoder

Sau med den mest mottakelige genotypen (VRQ/VRQ) for klassisk skrapesjuka ble inokulert rett etter fødselen med enten hjernevev fra friske dyr (kontrollene) eller hjernevev fra sjuka dyr med bekreftet klassisk skrapesjuka (Ulvund and others 2008). I 2006 omfattet materialet fem kontroller og fem sjuka, i 2007 var det 4 kontroller og 5 sjuka. Begge gruppene ble holdt i smitteisolat frem til avliving ved 6 måneders alderen.

Blodprøver (EDTA og serum) ble tatt av alle dyrene hver 14. dag fra fødsel og frem til avliving. Alt prøvematerialet ble fordelt på alikvoter og lagret ved -80 °C til det ble brukt.

For å øke antall proteintopper ble serumprøvene fraksjonert ved bruk av ProteinChip® Q Spin Columns (Bio-Rad) til syv forskjellige fraksjoner: FT (flow trough), F1 (pH 9), F2 (pH 7), F3 (pH 5), F4 (pH4), F5 (pH 3) og F6 (organisk). Kolonnene ble preparert i henhold til anvisning fra produsent. Fraksjonene ble lagret ved -80 °C til de ble brukt.

Fraksjonene ble analysert ved bruk av SELDI-TOF-MS og forskjellige ProteinChip® typer, CM10, Q10 og IMAC30-Cu. Prøvene ble preparert og applisert i henhold til anvisning fra produsenten.

Utvelgelse av toppene i spektrene ble utført ved hjelp av Biomarker Wizard (Ciphergen ProteinChip Software 3.2.1), i området 2000 til 100 000 Dalton. Hver fraksjon og ProteinChip type ble analysert hver for seg. Detaljerte data om aktuelle topper ble eksportert til Excel for videre analyser. Alle forberedelser av MS datasettet før statistiske analyser ble utført ved bruk av Ciphergen Software. Det ble utført ved univariat, Mann-Whitney U test, (Ciphergen ProteinChip Software 3.2.1) statistiske analyser på datasettene.

Foreløpige resultater

De statistiske analysene av alle datasettene pågår. Det er flere topper som enkeltvis kan skille gruppene fra hverandre ved hjelp av univariat statistikk. De utvalgte toppene analyseres ved hjelp av Mann-Whitney U test for å finne om det er forskjell mellom gruppene. P-verdien er satt til mindre enn 0,05 for signifikant forskjell mellom gruppene. Ved strenge kriterier for utvelgelse av topper ser en at en får 95 topper som er signifikant forskjellige mellom gruppene ($p < 0,05$). Testen ser på intensiteten av toppene.

Fraksjon	M/Z	p-verdi	Gj.snitt - C	Standardavvik - C	Gj.snitt - S	Standardavvik - S
F6	2186	0,0002	24,56	5,51	42,49	6,98
F6	2264	0,0006	9,19	2,18	16,04	3,43
F6	2392	0,0003	2,79	0,63	5,16	1,12
F6	4449	0,0004	2,11	0,71	8,63	4,19
F6	4527	0,0003	2,99	0,82	10,63	4,31

Tab 1. oversikt over de 5 toppene som har lavest p-verdi etter Mann-Whitney U test på alle fraksjonene.

Ut i fra spektrene kan en se at noen av toppene får dobbel ladning, og dermed kommer opp som proteiner med halvert masse. Toppene som representerer masse på 2264 Dalton er proteiner som har fått dobbel ladning, og egentlig er 2264 det samme som 4527. Disse er ikke med videre i analysene.

En ser ut i fra tabellen at alle disse toppene har en oppregulering, det vil si at intensiteten er høyere hos gruppa med skrapesjuka enn hos kontrollene. Intensiteten er noenlunde i samsvar med konsentrasjon av proteinet i prøvematerialet (semikvantitativt).

Diskusjon/plan videre.

Det vil bli utført multivariat analyser på datasettene fra SELDI analysen for se hvilke proteiner som best forklarer variasjonen mellom gruppene. De SELDI toppene som får en p-verdi på mindre enn 0,25 ved univariat analyser vil bli med videre til multivariat analyser.

Målet er å finne et panel av flere proteiner som kan sensitivt og spesifikt kan skille friske fra smitta dyr. Metoden er meget sensitiv og individuelle variasjoner mellom dyr og teknikk rundt prøvetaking og lagring kan ha en innvirkning på resultatene. Det relativt få individer i hver gruppe og individuelle variasjoner kan skyldes forskjeller mellom kjønn, alder og biologisk status. Valideringsfasen av prosjektet blir meget viktig og tidskrevende.

Identifisering av SELDI-toppene er grunnleggende for videre arbeid i prosjektet, og vil gi oss ny kunnskap som forhåpentligvis kan brukes videre i utvikling av sensitive og spesifikke metoder som kan detektere proteinene i for eksempel serum.

Referanser

Ta kontakt med forfatter for referanseliste.