

Razvoj zaživiljske diagnostike bolezenskih beljakovinskih odlag v možganih: prionske bolezni

Development of in vivo diagnosis of pathologic protein deposits in the brains of prion disease patients

Lojze M. Šmid,^{1,2} Mara Bresjanac¹

¹ Laboratorij za regeneracijo in plastičnost živčevja, Inštitut za patološko fiziologijo, MF UL, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

² Klinični oddelek za gastroenterologijo, Interna klinika UKC Ljubljana, Japljeva 2, 1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

Mara Bresjanac,
Laboratorij za regeneracijo in plastičnost živčevja, Inštitut za patološko fiziologijo, MF UL, Zaloška 4, 1000 Ljubljana, e-pošta: maja.bresjanac@mf.uni-lj.si

Ključne besede:

amiloid, FDDNP, konformacijske bolezni, nevrodegeneracija, PET

Key words:

amyloid, FDDNP, conformational diseases, neurodegeneration, PET

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2011;
80: 971–4

Izvleček

Translacijska medicina obsega sistematična prizadevanja za ustrezno preverbo in prenos raziskovalnih spoznanj temeljnih raziskav v uporabno medicinsko prakso. Prispevek opisuje raziskave diagnostične uporabnosti pozitronske izsevne tomografije z radioizotopsko označenim molekulskim sledilcem [¹⁸F]FDDNP za zgodnjo zaživiljsko prepoznavo bolezenskih beljakovinskih odlag v možganih bolnikov s prionskimi boleznimi. Raziskave, v katerih imajo pomembno vlogo tudi slovenski znanstveniki, so peljale od laboratorijskih poskusov do klinične študije in predstavljajo dober primer translacijske nevroznanosti.

Prionske bolezni (prenosljive spongiformne encefalopatije) so skupina neizbežno smrtnih nevrodegenerativnih bolezni. Čeprav so po nastanku, poteku in klinični sliki raznolike, je za vse prionske bolezni značilno in patogenetsko pomembno odlaganje konformacijsko spremenjene prionske beljakovine (priona) v bolnikovih možganih. Prion je poglavitni, če ne celo izključni, nosilec prenosljivosti (kužnosti) prionskih bolezni. Postavitev gotove diagnoze je navedeno mogoča šele po bolnikovi smrti z dokazom prionov v možganih. Razvoj zanesljive metode za prepoznavo prionskih odlag, ki bi pripomogla k zgodnji zaživiljski diagnozi, je zato eno vročih raziskovalnih področij v

Abstract

Translational medicine is a term describing systematic efforts for adequate testing and transfer of basic research findings into clinical practice. The paper outlines a series of studies aimed at evaluating a diagnostic potential of positron emission tomography with a radioisotope probe [¹⁸F]FDDNP for early recognition of pathologic protein deposits in the brains of prion disease patients. Slovene scientists contributed significantly to all studies in this bench-to-bedside sequence of translational neuroscience.

Nedavno je skupina slovenskih raziskovalcev v sodelovanju z raziskovalnima skupinama v Kaliforniji ter Indiani, ZDA, uspešno uporabila pozitronsko izsevno tomografijo (*angl.* positron emission tomography, PET) z molekulskim označevalcem amiloidnih odlag v centralnem živčevju ([¹⁸F]FDDNP) za prikaz bolezenskih odlag v možganih bolnikov z dedno prionsko boleznijo, imenovano Gerstmann-Sträussler-Scheinkerjev sindrom (GSS).¹

Prionske bolezni se lahko pojavijo sporadično zaradi neznane posttranslacijske spremembe, ki spodbudi pretvorbo normalne prionske beljakovine v prion (najpogostejša je sporadična Creutzfeldt-Jakobova

bolezen, sCJB); nekatere oblike so dedne in so posledica ene izmed številnih mutacij v genu za prionsko beljakovino, ki so podlaga konformacijske spremembe prionske beljakovine v prion (med njimi tudi GSS), možen pa je tudi prenos prionov – in s tem bolezn – z bolnih ljudi ali živali na zdravo osebo. V slednjo skupino sodita tako prva opisana prionska bolezen, kuru, kot tudi najbolj znana med njimi, različica Creutzfeldt-Jakobove bolezni (vCJB), ki se je v devetdesetih letih dvajsetega stoletja v Angliji pojavila v povezavi s spongiformno encefalopatijo govedi. Poti prenosa konformacijsko spremenjene prionske beljakovine in nastanka pridobljenih oblik bolezni so raznolike: od zaužitja prionov s hrano (kuru, vCJB) do vnosa v organizem s presadkom dure, človeškim rastnim hormonom, transfuzijo krvi ali z nevrokirurškimi in elektrofiziološkimi instrumenti (iatrogene oblike bolezni), saj so prioni odporni na običajne postopke sterilizacije.

Zanesljivo prepoznavanje prionskih bolezni za časa bolnikovega življenja bi omogočilo vpogled v potek bolezni in odprlo možnost za razvoj zdravljenja, hkrati pa bi imelo tudi javnozdravstveno vrednost pri prepoznavanju tveganju za prenos bolezni (npr. pri presaditvi ali transfuziji krvi). Z izjemo dokaza mutacije gena pri dednih prionskih boleznih imajo trenutne zaživiljenjske preiskovalne metode, ki so v klinični rabi, omejeno občutljivost in specifičnost. Razvili so konformacijsko specifična protitelesa,² ki bi načeloma omogočala hitro prepoznavo prionov v vzorcih telesnih tekočin. Ovira je bodisi nizka vsebnost prionov ali njihova neprepoznava oblika v telesnih tekočinah. Vprašljiva je tudi zanesljivost prepoznavne zgodnjih oblik bolezni, saj bi lahko bile bolj ali manj omejene na centralni živčni sistem bolnikov in prionov v perifernih tkivih ali krvi praviloma ne bi bilo lahko najti. Zato je nedavni razmah različnih slikovnih metod (npr. magnetnoresonančno slikanje, PET), ki omogočajo neinvazivno preiskovanje možganov, ponudil nove diagnostične možnosti tudi za prionske bolezni. Posebno obetavna je uporaba majhnih radioizotopsko označenih molekul, ki se vežejo na patološke beljakovinske odlage,

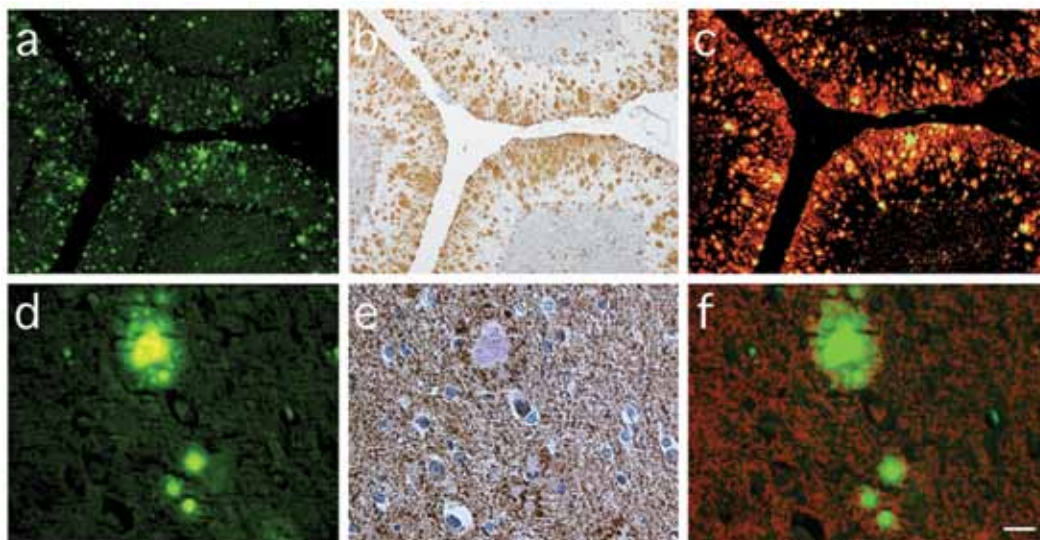
njihovo vezavo in razporeditev v možganih pa zaznamo z uporabo slikanja s PET. Pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo (AB) je tak pristop omogočil zaživiljenjsko prepoznavo in spremljanje sprememb v možganih bolnikov z razvijajočo se demenco. Med tovrstnimi molekulami je bila prva, ki je bila uspešno uporabljena *in vivo*, 2-(1-{6-[(2-[F-18]fluoroetil) (metil)amino]-2-naftil} etiliden)malononitril, znana po kratki FDDNP. FDDNP je majhna, hidrofobna molekula, ki dobro prehaja krvno-možgansko pregrado. Ker je FDDNP fluorescentna molekula, ki po vezavi na beljakovinske agregate močno poveča svojo fluorescenco, je primerna tudi za raziskave *in vitro* z različnimi metodami, ki zaznavajo emitirano svetlobo.

Glede na izkušnje z uporabo FDDNP kot označevalca amiloida in amiloidu podobnih odlag pri AB smo preverili njegovo morebitno uporabnost pri prionskih boleznih. Sprva smo *in vitro* ugotovili, da FDDNP na tkivnih rezinah možganov označuje prionske odlage pri sCJB, GSS in vCJB.³ V naslednji raziskavi smo sistematično primerjali označevanje amiloidnih in amiloidu podobnih odlag različnega beljakovinskega izvora v histoloških vzorcih možganov umrlih za različnimi nevrodegenerativnimi boleznimi, ki bi bile diferencialnodiagnostično pomembne pri obravnavi bolnikov s sumom na prionske bolezni.⁴ Ugotovili smo, da se poleg senilnih plakov pri AB prav prionski plaki označujejo najbolj zanesljivo in ponovljivo. Ti izsledki so napovedovali potencialno uporabnost FDDNP pri sumu na prionske bolezni.

Odlaganje prionov se v možganih prične pred nastopom klinične bolezni, gostota odlag pa je domnevno sorazmerna stopnji prizadetosti bolnika. Zato je bil za odločitev o raziskavi uporabnosti FDDNP *in vivo* pomemben rezultat slepe analize na tkivnih rezinah možganov, ki je pokazala, da je FDDNP označil prepoznavne prionske plake tudi v možganih v nezgodi umrlega predsimptomatskega nosilca mutacije za GSS, vendar je bilo pomembno več prionskih odlag označenih na tkivnih rezinah možganov umrlih z napredovalo boleznijo.

GSS je avtosomno dominantno dedna prionska bolezen. Zaradi visoke penetrance

Slika 1: Histološki rezini malih možganov (a - c) in skorje velikih možganov (d - f) bolnika, ki je umrl za prionsko boleznijo Gerstmann-Straussler-Scheinker. Vsaka rezina je bila zaporedno označena s fluorescentnim sledilcem FDDNP (zeleno v a in d) in z imunohistokemičnim postopkom za prikaz bolezenskih odlag prionov (rjavo v b, rdeče v c) ter hiperfosforilirane beljakovine tau (rjavo v e, rdeče v f). Analiza soupadanja fluorescence FDDNP s specifično označenimi odlagami obeh bolezensko spremenjenih beljakovin (c in f) pokaže, da FDDNP najmočnejše označuje mesta najgostejših odlag prionov (rumeno-oranžno v c), medtem ko se signala FDDNP in tau prekrivata le na obrobju plakov. Merilo: 100 mikrom (a-c), 20 mikrom (d-f).



mutacije gena za prionski protein (PRNP) je zanesljivo diagnozo mogoče postaviti že začasa bolnikovega življenja. Genetsko testiranje omogoča prepoznavo nosilcev mutiranega gena pri bolnikovih sorodnikih dolgo pred nastopom znakov bolezni, amiloidne prionske odlage v možganih bolnikov pa so obilne in imajo značilno razporeditev. Zaradi teh lastnosti je bil GSS primerna bolezen za raziskavo, katere namen je bil preveriti, ali je [^{18}F]FDDNP-PET uporaben za zgodnjo zaživiljenjsko diagnostiko in sledenje razvoja prionskih bolezni.

V raziskavo smo vključili šest nosilcev patogenih mutacij gena PRNP, štiri z razvito klinično sliko GSS (nosilci mutacij PRNP P102L, A117V in F198S) in dva brez znakov bolezni (nosilca F198S) ter primerjalni skupini, ki so ju sestavljali zdravi preiskovanci in bolniki z AB. [^{18}F]FDDNP-PET je pri preiskovancih z izraženim GSS pokazal obsežno vezavo [^{18}F] FDDNP v bazalnih ganglijah in talamusu, malih možganih (z izjemo nosilca mutacije A117V s telencefalno različico bolezni) in v različnih področjih skorje velikih možganov. Razporeditev signala je bila v skladu s klinično sliko (t.j. ekstrapiramidni znaki, motnje koordinacije gibov in hoje, upad spoznavnih sposobnosti). Pri enem asimptomatskem nosilcu mutacije se vezava [^{18}F]FDDNP ni pomembno razlikovala od tiste, izmerjene pri zdravih preiskovancih, medtem ko smo pri drugem izmerili pomebno višje kopičenje označevalca v repatem jedru (*n. caudatus*). Slednji

preiskovanec je bil tudi eden od dveh, ki sta bila slikana večkrat. V času opazovanja se pri njem bolezen ni razvila in tudi vezava [^{18}F]FDDNP se po 12 oz. 28 mesecih od prvega slikanja ni zvišala. Drugače pa je bilo pri bolniku z mutacijo P102L v PRNP, kjer smo po 12 oz. 28 mesecih izmerili višje vezavne vrednosti [^{18}F]FDDNP zlasti v skorji senčenga in temenskega režnja, ker je bila v skladu s hkratnima kognitivnim in nevrološkim upadom. Ker je raziskava vključevala tudi spremljanje presnove v možganih istih bolnikov s fluorodeoksiglukozo ([^{18}F]FDG) in PET, so rezultati ponudili tudi vpogled v odnos med kopičenjem prionskih odlag (vezava [^{18}F]FDDNP) in presnovo (vezava [^{18}F]FDG) v istih predelih možganov. Pokazalo se je, da področja z višjim signalom [^{18}F]FDDNP kažejo zmanjšano vezavo [^{18}F]FDG: obilnejše odlage so sovpadale z bolj okrnjeno presnovo.¹

Pri GSS z mutacijo F198S v PRNP spremljajo prionske odlage v možganih tudi obilne odlage hiperfosforiliranega tau (hT). Pri AB se tudi del odlag hT označuje s FDDNP.⁵ Zato je obstajala verjetnost, da pri nosilcih mutacije F198S v PRNP signal [^{18}F]FDDNP-PET izvira predvsem ali tudi iz vezave FDDNP na odlage hT. Kolokalizacijska analiza fluorescentnega označevanja odlag s FDDNP in imunohistokemijsko prepoznanih beljakovin ugotovili, da področja, označena s FDDNP, prostorsko sovpadajo z odlagami prionov in ne hT. Na podlagi te ugotovitve smo sklepali, da je tudi signal [^{18}F]FDDNP

izmerjen *in vivo* z uporabo PET predvsem posledica vezave [^{18}F]FDDNP na prionski amiloid. To potrjuje tudi obilna vezava [^{18}F]FDDNP pri bolnikih, ki imajo v možganih le odlage prionov.

Izsledki opisane serije raziskav uporabnosti FDDNP so dober primer translacijske nevroznanosti, ki spoznanja iz bazičnih raziskav pripelje do klinično uporabnih rezultatov. Ugotovitve so pomembne za morebitno uporabo [^{18}F]FDDNP-PET pri sumu na prionske bolezni, ki niso dednega izvora, npr. vCJB. Kažejo namreč, da je s [^{18}F]FDDNP-PET mogoče zgodaj v razvoju bolezni zaznati prionske odlage v možganih, da razporeditev teh odlag na [^{18}F]FDDNP-PET slikah pri razviti bolezni sovпада z področji zmanjšane presnove v možganih in klinično sliko bolezni in da napredovanje bolezni spremlja tudi obilnejša vezava [^{18}F]FDDNP v možganih.

Zlasti dragocena utegne biti možnost spremljanja količine amiloidnih odlag v možganih bolnikov med razvojem morebitnih antiagregacijskih pristopov k zdravljenju tovrstnih neurodegenerativnih bolezni.

Literatura

1. Kepe V, Ghetti B, Farlow MR, Bresjanac M, Miller K, Huang S, et al. PET of brain prion protein amyloid in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *Brain Pathol* 2010; 20: 419–430.
2. 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: 3694–3698.
3. Bresjanac M, Smid LM, Vovko TD, Petric A, Barrio JR, Popovic M. Molecular-imaging probe 2-(1-[6-[(2-fluoroethyl)(methyl amino)-2-naphthyl]ethylidene) malononitrile labels prion plaques in vitro. *J Neurosci* 2003; 23: 8029–8033.
4. Smid LM, Vovko TD, Popovic M, Petric A, Kepe V, Barrio JR, et al. The 2,6-disubstituted naphthalene derivative FDDNP labeling reliably predicts Congo red birefringence of protein deposits in brain sections of selected human neurodegenerative diseases. *Brain Pathol* 2006; 16: 124–130.
5. Mohorko N, Bresjanac M. Tau protein and human tauopathies: an overview. *Zdrav Vestn* 2008; 77 Suppl 2 :II-35–41.