

Neurodegeneratív proteinopátiák klinikopatológiai elemzése

Doktori tézisek

Dr. Kapás István

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kovács Gábor Géza, Ph.D., intézetvezető főorvos

Hivatalos bírálók: Dr. Gunda Bence, Ph.D., egyetemi tanársegéd,
Dr. Áfra Judit, Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Nagy Zoltán, az MTA doktora,
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Prof. Dr. Kamondi Anita, az MTA doktora,
egyetemi tanár
Dr. Fedorcsák Imre, Ph.D., főorvos

Budapest
2015

I. BEVEZETÉS

A dolgozat témaválasztása a neurodegeneratív betegségek klinikai neurológiai gyakorlatban tapasztalt fontosságát kívánja hangsúlyozni. A neurodegeneratív betegségeken belül részletesen foglalkozunk a prionbetegségek klinikopatológiájával. A prionbetegségek egyik formája (a *PRNP* gén E200K mutációjával genetikai CJB) Magyarországon gyakrabban fordul elő, mint az az irodalmi adatok alapján várható. A klinikus orvos is gyakrabban találkozhat ilyen esetekkel és a vizsgálatok során differenciáldiagnosztikai problémákkal szembesülhet.

A neurodegeneratív betegségek progresszív lefolyást mutató neurológiai kórképek, melyekben a kórlefolyás során a neuronok működészavara, majd pusztulása figyelhető meg. E betegségekre jellemző, hogy anatómiai és élettani értelemben azonos rendszerhez tartozó neuron populációt érint. Ez a szelektív vulnerabilitás elve. A kórfolyamat kialakításban genetikus, környezeti, endogén és epigenetikus tényezők játszanak szerepet. A neurodegeneratív betegségekre jellemző a klinikai és patológiai értelemben vett diverzitás. E sokféleség ellenére a legtöbb kórkép

patomechanizmusában hasonló folyamatok játszanak szerepet: sejthalál, oxidatív károsodás, a kóros konformációjú proteinek aggregációja. Az utóbbi időszakban felvetették annak lehetőségét, hogy a neurodegeneratív kórképekben a kórosan megváltozott fehérjék sejtről-sejtre terjedhetnek. A kóros proteinek felhalmozódása hangsúlyozza a proteinek lebontásában szerepet játszó sejtszintű rendszerek szerepét. A fehérjék termelése és lebontása közötti egyensúly, a kóros proteinek degradációja alapvetően szükséges az egészséges működés fenntartásához.

A neurodegeneratív betegségeket osztályozhatjuk a klinikai tünetek, a folyamatban résztvevő kóros konformációjú proteinek alapján, valamint az aggregálódó proteinek celluláris és anatómiai eloszlása szerint. A neurodegeneratív betegségekben fontos fehérjék: amyloid- β peptid, tau protein, α -synuclein, TDPP-43 protein, FUS és FET proteinek, prion protein, polyglutamin.

Jelen dolgozat középpontjában a prionbetegségekkel kapcsolatos megfigyeléseink állnak. A humán prionbetegségeket a konformációs neurodegeneratív betegségek archetípusának tartják. E kórképeket infekciós természetük különíti el az egyéb neurodegeneratív betegségektől. A humán prionbetegségek felosztása történhet az etiológia, a klinikopatológiai fenotípus, a prion protein gén konstellációja és a prion protein fiziko-kémiai

jellemzői szerint. A prionbetegség lehet szerzett, sporadikus, genetikai. A humán prionbetegség genetikai alapjairól tudjuk, hogy a betegségek kialakulásában szubsztitúciós és inszerciós mechanizmusok vesznek részt, valamint polimorfizmusok ismertek. A prion proteint kódoló génnek (*PRNP*) legalább 30 mutációja ismert. A legismertebb és legtöbbet vizsgált mutáció az E200K-129M haplotípus. Az emberi prionbetegségek közül a leggyakoribb forma a sporadikus Creutzfeldt-Jakob betegség (CJB), az összes prionbetegség 80-85 %-át teszi ki. A génmutációhoz köthető formákat (gCJB) 10-15 %-ra becsülik. Magyarországon a genetikai formák előfordulási aránya magasabb annál, mint ami az irodalomban közöltek alapján várható lenne. A genetikai prionbetegségek közül a leggyakoribb az E200K mutációval járó forma. A prionbetegség patomechanizmusára jellemző, hogy a normál konformációjú prion protein hiányában nem jöhet létre prionbetegség. neuronális károsodáshoz vezető folyamat komplex módon és több frontvonalon alakul ki. A szöveti károsodás több egymással párhuzamos, egymással interakcióban levő vagy egymás után következő folyamatok eredménye. A prionbetegség neuropatológiai jellemzői: 1. progresszív neuronális sejtvesztés, 2. reaktív gliózis, 3. vakuolizáció a neuropilben (spongiform encephalopathia), 4.

kóros konformációjú prion protein depozitumokban történő megjelenése az agyban. A prionbetegség egyes formáiban a patológiai eltérések típusa és lokalizációja eltérő. A prionbetegségek klinikai diagnosztikájában jelentős segítséget nyújtanak a klinikus orvosnak a mágneses képalkotó eljárások, az EEG és a liquor vizsgálat (neuronális károsodás markerei: pl. a 14-3-3 protein).

Az egyes prionbetegségek eltérő klinikopatológiai fenotípussal jellemezhetők. A korszerű molekuláris felosztás alapján a betegség altípusai a 129 kodon genotípusa (MM, MV, VV) és a prion protein altípusa (PrP 1-es és 2-es) alapján különíthetők el. A mutációs eseteknél is érvényes, hogy a kórkép klinikopatológiai fenotípusát befolyásolja a *PRNP* gén 129-es kodonjának polimorfizmusa és a kóros prion protein (PrP^{Sc}) molekuláris tulajdonsága.

II. CÉLKITŰZÉSEK

1. A prionbetegségekkel összefüggő differenciáldiagnosztikai problémák elemzése

A gyakorlatban jól ismertek a prionbetegségek klinikai diagnosztikájának nehézségei. A WHO kritériumrendszere szerint

a definitív diagnózis felállítása neuropatológiai vizsgálattal és/vagy immunhisztokémiai vizsgálattal és /vagy Western blot vizsgálattal igazolt proteáz rezisztens PrP alapján lehetséges. Jelen dolgozat egyik témaköre a prionbetegségek felügyeleti rendszeréhez kerülő kórképekkel összefüggő leggyakoribb differenciáldiagnosztikai problémák aspektusainak számbavétele.

2. Az E200K mutációs esetek klinikopatológiai fenotípusainak meghatározása

Magyarországon a leggyakoribb *PRNP* mutáció az E200K. Célunk, hogy az E200K mutációs esetek klinikopatológiai fenotípusát elemezzük, meghatározzuk a korai klinikai kép prediktív értékét, illetve összehasonlitsuk a leggyakoribb sporadikus CJB molekuláris altípussal (sCJBMM-1).

3. Az E200K mutációs esetekben előforduló proteinopathiák jellemzése

Az E200K mutációs esetek komplex proteinopathiaként történő jellemzése. Azt elemeztük, hogy a kóros prionfehérje mellett milyen formában fordul elő tau-pathologia, továbbá A- β és α -synuclein lerakódás.

4. Piroglutamát A- β oligomerek elemzése E200K mutációs esetekben

Az E200K mutációs esetekben elemeztük, hogy Alzheimer kórral összehasonlítva az A β pE3 oligomerek szintén észlelhetők-e az E200K gCJB esetekben, továbbá, hogy ezek aránya az A β lerakódásokhoz viszonyítva különbözik-e az Alzheimer kórhoz képest.

5. Heredodegeneratív kórkép etiológiájának tisztázása és karakterizálása

Az örökletes neurodegeneratív kórképek elemzése során felfigyeltünk egy ritka heredodegeneratív kórképre. Egy családban két fiútestvér esetét vizsgáltuk, akiknél nagyon hasonló tünetzajlás és súlyos progresszió mutatkozott. Szisztémás neuropatológiai vizsgálatot és genetikai vizsgálatot végeztünk, hogy meghatározzuk a kórképet.

III. MÓDSZEREK

Retrospektív klinikai adatgyűjtés

Munkánk során a retrospektív klinikai adatgyűjtés módszerét alkalmaztunk, amikor a Semmelweis Egyetem Neuropatológia és

Prionbetegség Referencia Központ anyagából olyan eseteket vizsgáltunk, amelyek a genetikai vizsgálat során E200K mutációnak bizonyultak. A rendelkezésre álló klinikai adatok, eszközös vizsgálati eredmények feldolgozása, értékelése retrospektív módszerrel történt.

Immunhisztokémiai vizsgálat

Immunhisztokémiai vizsgálatot alkalmaztunk a proteinopátiák vizsgálatában a kóros konformációjú proteinek (PrP^{Sc}, tau protein, α -synuclein, TDP-43, A β pE3 oligomer, beta-amyloid) azonosítására.

Prion genetikai vizsgálat

Prion genetikai vizsgálatot (a *PRNP* gén mutációjának meghatározására). A DNS kivonása fehérvérsejtekből történt. A *PRNP*-t kódoló szakaszt PCR technika segítségével amplifikáltuk, majd szekvenáló kit használatával négy átfedő szegmensen fluoreszcensen jelölt primerekkel analizáltuk.

Statisztikai módszerek

A különböző prionbetegség csoportok életkorának, illetve a kórlefordulás időtartamának összehasonlításában nemparaméteres módszert alkalmaztunk, mivel az egyes csoportokra a normál

eloszlás nem volt feltételezhető (Mann-Whitney U-Test). Az egyes tünetek, illetve vizsgálati eredmények gyakoriságát pedig Chi^2 vizsgálattal hasonlítottuk össze.

IV. EREDMÉNYEK

Ad.1.

Prionbetegségekkel összefüggő differenciáldiagnosztikai problémák elemzése. Pellagra encephalopathia mint a CJB lehetséges differenciáldiagnózisa.

Munkánk során olyan esetek elemzését végeztük el, amelyeket a klinikai tünetek, vizsgálatok alapján Creutzfeldt-Jakob betegségre (CJB) gyanúsként utaltak a Prionbetegség Referencia Központba. Az általunk vizsgált 59 esetből, melyek nem bizonyultak CJB-nek, ötnél pellagra encephalopathia (PE) igazolódott. Az 59 esetet 5 diagnosztikus csoportba soroltuk. Elvégeztük a PE esetek részletes klinikopatológiai jellemzését. A vizsgálatok eredményei és a klinikai tünetek alapján egy eset a WHO kritériumok szerinti „valószínű” sCJB csoportba volt sorolható. Leírtuk a CJB leggyakoribb klinikai differenciáldiagnosztikai szempontjait és felhívtuk a figyelmet arra, hogy a PE is utánozhatja a CJB tüneteit.

Ad.2.

E200K mutációs esetek klinikopatológiai fenotípusának meghatározása

Munkánkban a leggyakoribb *PRNP* mutáció, az E200K mutációs esetekhez kötött prionbetegség klinikopatológiai fenotípusának meghatározását végeztük el. Kísérletet tettünk a korai klinikai tünetek prediktív értékének meghatározására. Vizsgálatunkban 75 E200K mutációs eset klinikai fenotípusát és a tüneteknek a 129-es kodon genotípusával kapcsolatos viszonyát vizsgáltuk. Eredményeink szerint a klinikai tünetek alapján –családi anamnézis hiányában- nem lehet az E200K genetikai CJB eseteket elkülöníteni a leggyakoribb sporadikus CJB molekuláris altípustól.

Ad.3.

Az E200K mutációs esetek neuropatológiai jellemzése

Ebben a munkában 39 E200K mutációs eset klinikai, neuropatológiai és biokémiai feldolgozását végeztük el. Az eseteket CJB gyanújával küldték a felügyeleti rendszerhez a klinikai kritériumok alapján történő besorolás után. A posztmortem neuropatológiai vizsgálat igazolta a CJB-t. A klinikai és neuroradiológiai vizsgálatok adatait retrospektív módon

gyűjtöttük be és összegeztük. Ismertetjük a klinikai tünetek és az eszközös vizsgálatok eredményeit, valamint a neuropatológiai elváltozások jellegét. A prion protein, a tau, az α -synuclein patológia és az amyloid- β depozitumok részletes leírását adjuk. Megállapítjuk, hogy E200K mutációs esetekben egyéb proteinopathiák gyakran jelennek meg. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy a *PRNP* más neurodegeneratív betegségek patomechanizmusában is szerepet játszhat.

Ad.4.

Piroglutamát A β depozitumok vizsgálata E200K mutációs esetekben

Mivel az E200K genetikai CJB esetekben fiatalabb korú betegeknél (60) gyakran észleltünk prionbetegség szövettani jelei mellett egyéb neurodegeneratív betegség jellemzőit, ezért a következő tanulmányban azt vizsgáltuk, hogy az E200K esetekben a A β lerakódása az Alzheimer kórhoz hasonló mértékben tartalmaz-e úgynevezett piroglutamát-oligomereket. Eredményeink szerint az E200K *PRNP* mutációs esetekben az A β plakkokban jelen vannak a piroglutamát-A β -oligomerek, továbbá előzetes megfigyeléseink szerint ezek aránya az A β plakkokon belül nagyobb lehet, mint Alzheimer kórban.

Ad.5.

Heredodegeneratív kórkép etiológiájának tisztázása és karakterizálása

(Cerebrotendinosus xanthomatosus)

Egy tanulmányunkban két fiútestvér esetét elemeztük, akiknél progresszív neurodegeneratív kórképet okozó anyagcserezavart igazoltunk genetikai és biokémiai vizsgálattal. Részletesen ismertetjük a testvérpár tüneteit, az elvégzett vizsgálatok eredményeit, a talált neuropatológiai elváltozásokat. Felhívtuk a figyelmet arra, hogy esetünkben a lipid metabolizmus zavara az agy korai öregedésének megfelelő tau patológiával társult.

V. KÖVETKEZTETÉSEK

Ad.1.

A pellagra encephalopathia (PE) mint a sporadikus CJB differenciáldiagnóza

A prionbetegségek felügyeleti rendszerében vizsgált esetek között öt beteget találtunk, akiknél a rapid progressziót mutató demencia háttérében PE igazolódott neuropatológiai vizsgálattal. Vizsgálataink szerint PE differenciál-diagnózisként merülhet fel

alkoholt rendszeresen fogyasztó betegeknél gyors progressziót mutató demencia eseteiben.

Az általunk vizsgált anyagban a következő további kórképek voltak igazolhatók: neurodegeneratív betegségek, tumor, cerebrovaszkuláris kórképek, gyulladásos, metabolikus háttérű folyamatok, kevert kórképek.

A PE feltehetően gyakrabban előforduló kórkép, mint amilyen gyakran a diagnózist megállapítják (ennek oka egyrészt a boncolási arányban keresendő).

Eseteink közül egy esetet a WHO prionbetegség surveillance kritériumok szerint mint „valószínű” sCJB-nek klasszifikáltuk a neuropatológiai vizsgálat előtt. Ez rámutat az agyi boncolás jelentőségére a gyors progressziót mutató demenciák esetén a prionbetegségek felügyeleti rendszerében.

Ad.2.

Az E200K mutációval társuló CJB klinikai fenotípusa

Eredményeink 75 beteg (gCJB E200K mutációs eset) vizsgálatának anyagából származnak. Eredményeink a klinikai tüneteket és azok előfordulási gyakoriságát illetően nem különböznek lényegesen az irodalomban közölt adatoktól. Vizsgálatunkban nem tudtunk szignifikáns kapcsolatot igazolni a

tünetek és vizsgálati adatok, valamint a kodon 129-es genotípus között. Azaz klinikai tünetek önmagukban nem bizonyultak prediktív értékűnek arra, hogy valaki a mutációt hordozza.

A klinikai fenotípus vizsgálatunkban nem különbözik alapvetően az E200K-129MM homozigóta és E200K-129MV heterozigóta esetekben. Ugyanezt az eredményt kaptuk akkor is, ha betegség lefolyásának időtartamát kora és késői periódusra osztottuk és ennek megfelelően korai és késői tüneteket különböztettünk meg. A tünetek nem bizonyultak prediktív értékűnek E200K mutációt hordozóknál a kodon 129 genotípusra nézve. Az E200K esetek és a sporadikus CJBMM1 csoport összehasonlítása során kapott eredményeink szerint a gCJB nem különíthető el a sporadikus esetektől az életkor, a betegség tartama, a klinikum alapján. Az említett szempontok és vizsgálatunk adatai kiemelik az *in vivo* genetikai vizsgálatok jelentőségét. A genetikai vizsgálat eredménye támpontot adhat, segít értelmezhetővé tenni a rendelkezésre álló klinikai adatokat.

Ad.3.

Az E200K mutációval társuló gCJB: komplex proteinopátiák

Vizsgálatainkkal azt igazoltuk, hogy a kóros PrP lerakódása, illetve egyéb neuropatológiai elváltozások és proteinopátiák

változatos formában jelennek meg *PRNP* mutációs esetekben. Legfontosabb eredményünk, hogy a prion proteinen kívül egyéb kóros fehérje lerakódás is igazolható volt.

Munkánk eredményei arra utalnak, hogy a mutáns PrP metabolizmusa és intracelluláris forgalma interferál az egyéb proteinek termelésével, feldolgozásával és ez kóros depozitumok kialakulásához vezet. Ezek alapján az E200K mutáció fontos modell lehet annak megértésében, hogy milyen molekuláris kölcsönhatások lehetnek a neurodegenerációval kapcsolatos proteinek között.

Ad.4.

Piroglutamát A β depozitumok vizsgálata E200K mutációs esetekben

Vizsgálataink azt igazolták, hogy az E200K PRNP mutációs esetekben A β pE3 oligomerek ugyanúgy jelen vannak mint AK-ban. Azonban AK-hoz képest úgy tűnik, hogy E200K mutációs esetekben az oligomer molekulák egy adott A β plakkban nagyobb arányban vannak jelen, mint AK-ban.

Ad.5.

Cerebrotendinosus xanthomatosis: a korai öregedés patológiai jegeit mutató neurodegeneratív elváltozás

Az általunk bemutatott két CTX-eset (testvérpár) klinikai fenotípus spektruma megfelelést mutat az irodalomban eddig közölt esetekkel. Munkánk során az idősebb fiútestvér cerebrumának neuropatológiai feldolgozását végeztük el. A tau-immunoreaktivitás részletes feldolgozása során kiderült, hogy a tau-patológia főképpen a limbikus rendszert érinti és az előrehaladott argyrophilic grain disease (AGD) jegeit mutatja. Mint ismert, az AGD korrrel társuló betegség.

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Kapás I**, Majtenyi K, Törő K, Keller E, Voigtländer T, Kovacs GG. (2012) Pellagra encephalopathy as a differential diagnosis for Creutzfeldt-Jakob disease. *Metab Brain Dis.* 2: 231-5
2. Kovacs GG, Seguin J, Quadrio I, Höftberger R, **Kapás I**, Streichenberger N, Biacabe AG, Meyronet D, Sciot R, Vandenberghe R, Majtenyi K, László L, Ströbel T, Budka H, Perret-Liaudet A. (2011) Creutzfeldt-Jakob disease associated

with the E200K mutation: characterization of a complex proteinopathy. *Acta Neuropathol.* 1: 39-57.

3. **Kapás I**, Katkó M, Harangi M, Paragh G, Balogh I, Kóczi Z, Regelsberger G, Molnár MJ, Kovacs GG. (2014) Cerebrotendinous xanthomatosis with the c.379C>T (p.R127W) mutation in the CYP27A1 gene associated with premature age-associated limbic tauopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* .3: 345-50

A disszertációtól független közlemények

1. Vincze A, **Kapás I**, Molnar MJ, Kovács GG. (2010) Clinicopathological variability in neurodegeneration with brain iron accumulation. *Ideggyogy Sz.* 3-4: 129-35.