

Pokrok v intravitální laboratorní diagnostice prionových onemocnění: vysoce citlivá a specifická detekce prionů v mozkomíšním moku pomocí RT-QuIC

doc. Ing. Karel Holada, Ph.D.¹, RNDr. Tibor Moško, Ph.D.¹, Mgr. Soňa Baranová¹,
prof. MUDr. Radoslav Matěj, Ph.D.²

¹Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova Praha

²Ústav patologie a molekulární medicíny, 3. lékařská fakulta a Fakultní Thomayerova nemocnice, Univerzita Karlova Praha

Diagnostika prionových onemocnění je obtížná vzhledem k jejich heterogenitě a překryvu klinických příznaků s jinými neurodegenerativními chorobami. Doposud dostupné diagnostické metody neměly dostatečnou citlivost a specifitu. V roce 2018 byla do diagnostických kritérií (WHO) zařazena metoda RT-QuIC (Real Time Quacking Induced Conformation assay), která využívá pro detekci prionů jejich schopnost agregovat nativní rekombinantní prionový protein. Agregace je sledována v reálném čase pomocí fluorescenční sondy. Metoda je extrémně citlivá a specifická. Naše výsledky potvrzují, že umožňuje detekci prionů v mozkomíšním moku pacientů za jejich života, krátce po objevení příznaků onemocnění.

Klíčová slova: Creutzfeldtova-Jakobova nemoc, priony, diferenciální diagnostika, neurodegenerativní onemocnění, amyloid.

Progress in intravital laboratory diagnostics of prion diseases: highly sensitive and specific detection of prions in cerebrospinal fluid using RT-QuIC

Diagnostics of prion diseases is difficult due to their heterogeneity and overlap of clinical symptoms with other neurodegenerative disorders. Till now utilized diagnostics methods did not have sufficient sensitivity and specificity. In 2018 WHO diagnostic criteria were updated by the inclusion of RT-QuIC assay (Real Time Quacking Induced Conformation), which utilizes the ability of prions to aggregate native recombinant prion protein for their detection. The aggregation is monitored in real time using fluorescent probe. The assay is extremely sensitive and specific. Our results confirms that it allows detection of prions in cerebrospinal fluid of living patients shortly after the appearance of symptoms.

Key words: Creutzfeldt-Jakob disease, prions, differential diagnostics, neurodegenerative diseases, amyloid.

Laboratorní diagnostika prionových nemocí

Lidská prionová onemocnění mohou mít sporadickou, genetickou a infekční etiologii. Nejčastějším prionovým onemocněním je sporadická Creutzfeldtova-Jakobova nemoc

(CJN, cca 85 % případů), která se dále dělí na 6 subtypů lišících se rychlostí progresu a neuropatologickým postižením mozku. Existuje více než 30 známých mutací genu pro prionový protein spojených s genetickými prionovými nemocemi (cca 15 % pří-

DECLARATIONS:

Declaration of originality:

The manuscript is original and has not been published or submitted elsewhere.

Ethics approval and consent to participate:

The authors attest that their study is in compliance with human studies committees and animal welfare regulations of the authors' institutions as well as with the Food and Drug Administration guidelines, including patient consent where appropriate. The authors also declare that their paper is in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki on Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects adopted by the 18th WMA General Assembly in Helsinki, Finland, in June 1964, with subsequent amendments, as well as with the ICMJE Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals, updated in December 2018.

Conflict of interest:

Podpořeno grantem AZV NU21-04-0053 a projektem Národní ústav pro neurologický výzkum LX22NP05107.

Consent for publication:

Not applicable.

Authors' contributions:

KH – interpretace výsledků a sepsání textu, TM – vývoj metody a revize textu, SB – analýza vzorků a revize textu, RM – neuropatologická diagnostika a revize textu

Cit. zkr: *Neurol. praxi.* 2024;25(1)26-29

<https://doi.org/10.36290/neu.2023.079>

Článek přijat redakcí: 27. 10. 2023

Článek přijat k publikaci: 15. 12. 2023

doc. Ing. Karel Holada, Ph.D.

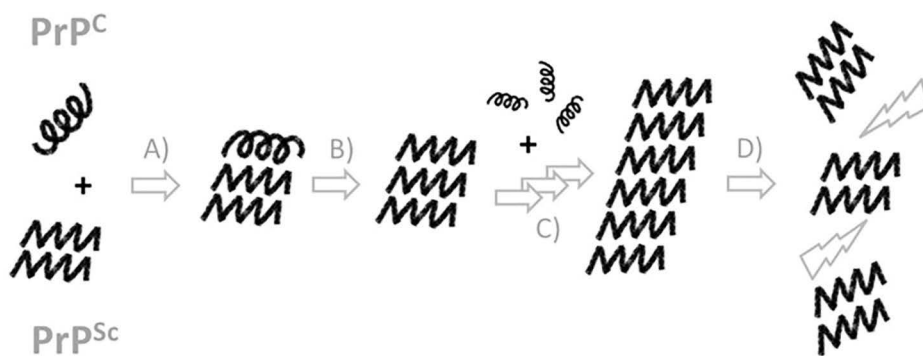
karel.holada@lf1.cuni.cz

padů), opět různorodými, co se příznaků týká. Prionová onemocnění lze navíc přenést v rámci invazivních lékařských zákroků (Watson, 2021) a mohou se pak projevit u pacientů netypického stáří. Na přelomu století vzbudila velké obavy nová varianta CJN způsobená konzumací potravin kontaminovaných priony bovinní spongiformní encefalopatie, která postihovala především mladé a měla opět odlišné příznaky (Watson, 2021). Diagnostika prionových nemocí je tak díky relativní vzácnosti a vysoké heterogenitě jejich klinického obrazu obtížná a zejména na počátku klinických příznaků může docházet k záměně s jinými neurodegenerativními onemocněními. Proto se pro zpřesnění klinické diagnózy CJN využívají pomocná vyšetření, která zahrnují nález vysokých hladin proteinu 14-3-3 a nově i tau v mozkomíšním moku, typický elektroencefalografický záznam periodických trifázických vln a zvýšení intenzity signálu některých oblastí mozku při magnetické rezonanci (Jankovská, 2021). Zvýšené hladiny 14-3-3 a tau lze však nalézt i u jiných stavů spojených s rychlým rozpadem neuronů. Typický elektroencefalogram bývá přítomen jen u části pacientů a navíc až v pozdní fázi onemocnění. Hodnocení obrazu magnetické rezonance vyžaduje zkušenost a nález zvýšené intenzity signálu nebývá u všech pacientů vyjádřen stejně. Žádná z těchto metod tak není dostatečně citlivá a specifická, aby umožnila definitivní potvrzení diagnózy prionového onemocnění za života pacienta, a ta je potvrzena až pitevním neuropatologickým vyšetřením mozkové tkáně.

Detekce prion konvertující aktivity v patientských vzorcích

Desítky let trvající výzkum věnovaný hledání více specifického biomarkeru prionových onemocnění velký pokrok nepřinesl a metody zaměřené na přímou detekci patologického prionového proteinu (PrP^{Sc} či PrP^{TSE}) v patientských vzorcích selhávaly kvůli jeho nízkým hladinám a neschopnosti těchto metod ho odlišit od vysokých hladin univerzálně přítomného normálního buněčného prionového proteinu (PrP^C). Zásadního pokroku v diagnostice bylo dosaženo až po objasnění mechanismu replikace prionů

Obr. 1. Mechanismus propagace prionů



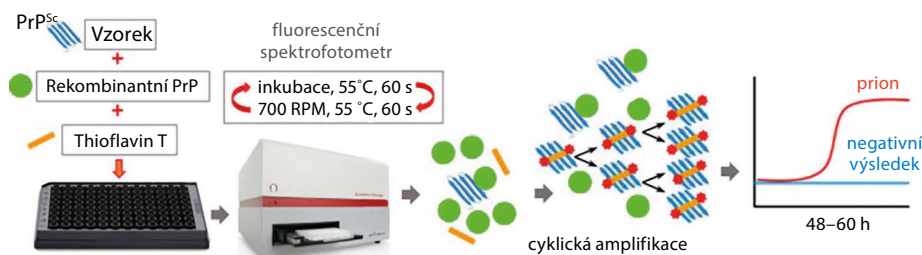
Prionová infekční částice tvořená oligomerem patologického prionového proteinu PrP^{Sc} se naváže na normální buněčný prionový protein PrP^C (A). Fyzickým kontaktem dochází ke změně alfa helikální konformace PrP^C na patologickou, bohatou na strukturu beta skládaného listu (B). Opakování procesu vede k růstu agregátu PrP^{Sc} za vzniku amyloidových fibril (C). Rozštěpení fibril uvolňuje další prionové infekční částice schopné měnit konformaci PrP^C (D). Hromadění patologického PrP^{Sc} v mozkové tkáni následně spouští rychle postupující neurodegenerativní změny.

a zopakování tohoto procesu v laboratorních podmínkách (Soto, 2011). Priony jsou infekční proteinové částice, které na rozdíl od virů a bakterií postrádají specifickou nukleovou kyselinu (DNA či RNA). Priony jsou přítomné ve tkáních pacientů nezávisle na tom, zda má prionové onemocnění sporadickou, genetickou či infekční etiologii. Informace potřebná pro množení prionů je nesena tvarem molekuly patologického prionového proteinu tvořícího infekční částici. Prionovou infekční částicí si můžeme představit jako organizovaný agregát (oligomer) molekul patologického prionového proteinu, který se od buněčného prionového proteinu liší sekundární strukturou obsahující vysoký podíl struktur beta skládaného listu. Tento oligomer PrP^{Sc} má schopnost při kontaktu s PrP^C měnit jeho nativní alfa helikální strukturu na patologickou a připojit takto pozměněnou molekulu ke stávajícímu agregátu. Dochází tak k postupnému růstu agregátů PrP^{Sc} za vzniku amyloidových fibril. Rozlomení amyloidových fibril pak umožní vznik nových infekčních částic (Obr. 1).

Zásadní pokrok v diagnostice přinesly až metody zaměřené na detekci schopnosti prionů měnit konformaci a agregovat normální prionový protein. K průlomů došlo na konci minulého století, kdy se skupině Claudia Sota pomocí techniky zvané „Protein Misfolding Cyclic Amplification“ (PMCA) podařilo mnohonásobně zvýšit množství infekčního PrP^{Sc} ve studovaném vzorku (Soto, 2011). Metoda byla založena na

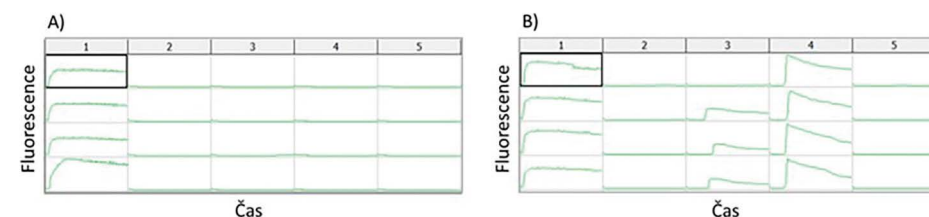
inokulaci normálního mozкового homogennatů malým množstvím vzorku obsahujícím priony a následným střídáním fází inkubace a sonikace. Inkubace vedla k růstu agregátu PrP^{Sc} a sonikace k jejich rozštěpení a tvorbě nových infekčních částic. Proces se cyklicky opakoval až několik týdnů. Vznikající PrP^{Sc} byl infekční a jeho přítomnost se detekovala pomocí western blotu po ukončení amplifikace. Metoda PMCA byla sice velmi citlivá, ale díky použití sonikace obtížně standardizovatelná a pro použití v diagnostice pomalá. Změnu této situace přinesl „Real-Time Quaking-Induced Conversion assay“ (RT-QuIC) vyvinutý skupinou Byrona Caughey (Orrů, 2015). Metoda RT-QuIC využívá jako substrát pro detekci prion konvertující aktivity v patientských vzorcích v bakteriích připravený nativní prionový protein. Opět dochází ke střídání fází inkubace a fragmentace. V průběhu inkubace rekombinantní prionový protein po kontaktu s PrP^{Sc} a změně struktury agreguje a tvorba agregátů je sledována pomocí fluorescenční sondy Thioflavinu T. Vznikající fibrily jsou následně fragmentovány intenzivním třepáním a jejich fragmenty iniciují změnu konformace a agregaci dalšího nativního substrátu (Obr. 2). Dochází tak k velké amplifikaci fluorescenčního signálu, který je sledován v reálném čase, podobně jako u kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). Metoda RT-QuIC je extrémně citlivá, schopná detekovat femtogramová (10⁻¹⁵ g) množství patologického prionového proteinu ve vzorku. Vysoká

Obr. 2. Princip vyšetření mozkomíšního moku pomocí RT-QuIC na přítomnost prionů



Malé množství vzorku moku pacienta získaného lumbální punkcí se přidá k reakční směsi obsahující rekombinantní prionový protein (PrP) a fluorescenční indikátor Thioflavin T. Destička s napipetovanými vzorky se inkubuje ve fluorescenčním spektrofotometru za pravidelného střídání inkubační fáze a fáze intenzivního třepání. Ve vzorku přítomný patologický prionový protein (PrP^{Sc}) mění konformaci rekombinantního PrP a vznikající agregáty PrP váží Thioflavin T, který po navázání produkuje fluorescenci. Třepání rozlamuje vznikající agregáty za vzniku nových agregačních center a dochází tak k amplifikaci signálu.

Obr. 3. Záznam RT-QuIC vyšetření mozkomíšního moku pacientů na přítomnost prion konvertující aktivity



Negativní výsledek (A), pozitivní výsledek (B). Vzorky jsou vyšetřovány v kvadruplikátu (sloupce). 1 – pozitivní kontrola (mozkový homogenát pacienta se sporadickou CJN, typ MM1), 2 – negativní kontrola (pufr), 3 – mok pacienta (10x ředěný), 4 – mok pacienta (neředěný), 5 – negativní kontrola (pufr). Reakce probíhala po dobu 60 hodin za teploty 55 °C, střídání 60 s inkubace v klidu s 60 s intenzivního třepání (700 RPM). Pacient B) je pozitivní ve 3 ze 4 jamek u 10x ředěného likvoru a ve 4 ze 4 jamek u likvoru neředěného.

specifita RT-QuIC je zajištěna nutností vysoké podobnosti aminokyselinové sekvence rekombinantního substrátu s priony přítomnými ve tkáních pacientů. Agregáty jiných amyloid tvořících proteinů (tau, alfa synuklein atd.) změnu tvaru rekombinantního prionového proteinu neindukují. Tyto vlastnosti umožňují detekci prionů v mozkomíšním moku a dalších tkáních pacientů za jejich života, krátce po objevení příznaků onemocnění. V případě využití mozkomíšního moku či stěru čichové sliznice se dosahuje často více než 95% senzitivity a téměř 100% specifity. Vznikající agregovaný rekombinantní protein navíc není infekční a tak se snižuje i riziko profesionální nákazy pracovníků v laboratoři. Výjimečné vlastnosti RT-QuIC vedly k jeho nedávnému zařazení do nových WHO diagnostických kritérií pro sporadickou CJN (Jankovská, 2021). K diagnóze pravděpodobné CJN tak nově stačí přítomnost neuropsychiatrického onemocnění a pozitivní RT-QuIC.

Dostupnost prionového RT-QuIC v České republice

Vyšetření RT-QuIC není v současné době dostupné komerčně, ale pouze v rámci probíhající výzkumné studie na našem pracovišti.

Naše laboratoř ve spolupráci s Národní referenční laboratoří lidských prionových onemocnění a skupinou Jiřího Šafaře (Western Case Reserve University, Cleveland, Ohio) zavedla do praxe druhou generaci prionového RT-QuIC testu. Pomocí archivních vzorků mozkomíšního moku a mozkové tkáně jsme ověřili schopnost zavedené metody detekovat všechny typy prionových onemocnění, které se vyskytují v České republice (Moško, 2021). V pilotní studii jsme navíc zjistili, že priony lze detekovat i v kůži většiny zemřelých CJN pacientů (Baranová, 2023). Aktuálně probíhá otevřená prospektivní studie, ve které ve spolupráci s klinickými neurologickými pracovišti ověřujeme diagnostickou spolehlivost metody RT-QuIC u žijících pacientů s podezřením na prionové onemocnění. Studie je otevřena pro všechny neurologické kliniky. V případě podezření na prionové onemocnění je standardně indikována diagnostická lumbální punkce pro stanovení přítomnosti proteinu 14-3-3 eventuálně dalších markerů, jako je tau protein. Při zájmu o provedení RT-QuIC vyšetření na priony je možné po získání informovaného souhlasu zaslat malý alikvot (0,5–1 ml) odebraného likvoru na naše pracoviště. Podrobnosti k transportu lze získat

mailem od autora tohoto článku. Případně lze kontaktovat pracovníky NRL, kteří z alikvotu mozkomíšního moku určeného pro analýzu proteinu 14-3-3 zajistí dopravu vzorku do prionové laboratoře. Likvor nesmí mít příměs krve, proto není vhodné použít jeho první podíl, což je ale stejné pravidlo, které platí pro vyšetřování přítomnosti proteinu 14-3-3. Mozkomíšní mok se do transportu uchovává v lednici a transport probíhá za chladu. V případě nutnosti je možné mok zmrazit a uchovávat zmražený. Vzorky se vyšetřují v kvadruplikátu, a to jak neředěné, tak 10x ředěné, aby se eliminoval vliv případných inhibitorů RT-QuIC reakce. Za pozitivní se považuje vzorek, který dá pozitivní reakci minimálně ve 2 jamkách ze 4. Z doposud vyšetřených 52 vzorků mozkomíšního moku bylo 16 RT-QuIC pozitivních. Z těchto 16 pacientů již bylo 10 neuropatologicky verifikováno a ve všech případech byla přítomnost prionového onemocnění neuropatologicky potvrzena. Příklady záznamu pozitivního a negativního RT-QuIC testu jsou na obrázku 3. Bohužel většina RT-QuIC negativních případů nebyla následně nekropticky verifikována, tudíž v naší prospektivně vyšetřené kohortě nejsme schopni určit přesnou senzitivitu a specifitu s ohledem na potenciální falešně negativní případy. Určitě by bylo vhodné všechny případy vyšetřené RT-QuIC následně neuropatologicky analyzovat. Výsledky prospektivní studie by měly posloužit jako podklad pro jednání se zdravotními pojišťovnami a ministerstvem pro získání úhrady vyšetření.

RT-QuIC – budoucnost laboratorní diagnostiky neurodegenerativních proteinopatií?

Metoda RT-QuIC představuje naději pro výrazné zrychlení pravděpodobné diagnózy prionového onemocnění, a tím otevírá možnost pro budoucí aplikaci v současnosti vyvíjených terapeutických postupů. Nicméně již nyní může včasná diagnóza prionového onemocnění omezit počet nadbytečných vyšetření a umožnit rychlé nasazení paliativní péče. To ve svém důsledku zvyšuje kvalitu života pacienta i jeho blízkých a vede k úspoře nákladů na zdravotní péči. Sledování přítomnosti prion konvertující aktivity u bezpřízna-

kových pacientů s mutací prionového genu by mohlo v budoucnu posloužit jako marker progresu onemocnění a indikovat nasazení terapie. Naopak u pacientů zařazených do experimentálních terapeutických studií by sledování prion konvertující aktivity v mozkomíšním moku mohlo přinést informaci o účinnosti použité intervence. Budoucnost metody RT-QuIC však netkví jen v diagnostice prionových onemocnění. Přesvědčivé množství studií publikovaných v renomovaných časopisech prokázalo, že mechanismus templátem indukované změny konformace je společný všem neurodegenerativním proteinopatiím, včetně Alzheimerovy choroby a Parkinsonovy nemoci (Nascar, 2023). Mechanistická podob-

nost propagace všech amyloid tvořících patologických proteinů umožnila vývoj RT-QuIC testu nejen pro synukleinopatie a tauopatie, ale již byla publikována i jeho varianta pro TDP-43 a amyloid beta (Coysh, 2022). Publikované metody většinou opět dosahují velmi vysoké senzitivity a specifity. To umožňuje použít pro diagnostiku různé typy vzorků od mozkomíšního moku, výtěru čichové sliznice, bioptického vzorku kůže či střeva a nově byla publikována i varianta testu umožňující RT-QuIC pro synukleinopatie z krve. RT-QuIC pozitivita bývá u pacientů zachycena často již v prodromálním stadiu onemocnění, někdy i roky před jeho plnou manifestací. Vysoká heterogenita neurodegenerativních pro-

teinopatií a velmi častá přítomnost komorbidit však ztěžují interpretaci dosažených výsledků a další standardizaci zaváděných metod. Nicméně se dá předpokládat, že podobně jako u prionových onemocnění dojde v průběhu několika let k zavedení robustních klinicky využitelných RT-QuIC testů pro detekci patologických forem proteinů, které umožní jejich citlivou a spolehlivou detekci u žijících pacientů, a to již na počátku jejich potíží. Detekce konformace měnící aktivity přítomné v patientských vzorcích pomocí RT-QuIC by se tak měla stát důležitým doplňkem zaváděných zobrazovacích metod schopných vizualizace amyloidových depozit v mozku pacientů.

LITERATURA

1. Baranová S, Moško T, Brůžová M, et al. Detection of prions in matching post-mortem skin and cerebrospinal fluid samples using second-generation real-time quaking-induced conversion assay. *Sci Rep.* 2023 (under revision).
2. Coysh T, Mead S. The Future of Seed Amplification Assays and Clinical Trials. *Front Aging Neurosci.* 2022;14:872629. doi: 10.3389/fnagi.2022.872629. PMID: 35813946; PMCID: PMC9257179.
3. Jankovska N, Rusina R, Bruzova M, et al. Human Prion Disorders: Review of the Current Literature and a Twenty-Year Experience of the National Surveillance Center in the Czech Republic. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(10):1821. doi: 10.3390/diagnostics11101821. PMID: 34679519; PMCID: PMC8534461.
4. Moško T, Galušková S, Matěj R, et al. Detection of Prions in Brain Homogenates and CSF Samples Using a Second-Generation RT-QuIC Assay: A Useful Tool for Retrospective Analysis of Archived Samples. *Pathogens.* 2021;10(6):750. doi: 10.3390/pathogens10060750. PMID: 34199205; PMCID: PMC8231989.
5. Nascar S, Gour N. Realization of Amyloid-like Aggregation as a Common Cause for Pathogenesis in Diseases. *Life (Basel).* 2023;13(7):1523. doi: 10.3390/life13071523. PMID: 37511898; PMCID: PMC10381831.
6. Orrú CD, Groveman BR, Hughson AG, et al. Rapid and sensitive RT-QuIC detection of human Creutzfeldt-Jakob disease using cerebrospinal fluid. *mBio.* 2015;6(1):e02451-14. doi: 10.1128/mBio.02451-14. PMID: 25604790; PMCID: PMC4313917.
7. Soto C. Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends Biochem Sci.* 2011;36(3):151-8. doi: 10.1016/j.tibs.2010.11.001. Epub 2010 Dec 3. PMID: 21130657; PMCID: PMC3056934.
8. Watson N, Brandel JP, Green A, et al. The importance of ongoing international surveillance for Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Rev Neurol.* 2021;17(6):362-379. doi: 10.1038/s41582-021-00488-7. Epub 2021 May 10. PMID: 33972773; PMCID: PMC8109225.