



Bericht der Aktivitäten

2003/4

Verantwortliche Leiter:

Prof. Dr. med. et sc. h.c. mult. Adriano Aguzzi

PD Dr. Markus Glatzel

Prof. Dr. med. Klaus Hess

Institut für Neuropathologie und Neurologische Klinik
Universitätsspital Zürich

Mitarbeiter:

Herr Mauri Peltola, Laborant

Med. pract. Gaby Schoch, biochemische Untersuchungen

Dr. med. Harald Seeger, Neuropathologie

Dr. med. Katharina Stoeck, Klinische Überwachung

Dr. med. Johannes Streffer, Genetische Untersuchungen

Prof. Dr. med. Dieter Zimmermann, Genetische Untersuchungen

Inhaltsverzeichnis

Einführung	3
Klinische Überwachung:.....	3
Bestimmung des 14.3.3 Proteins im Liquor	3
Genetische Untersuchungen	4
Molekulare Diagnostik humaner Prion-Erkrankungen	4
Wissenschaftliche Aktivitäten des NRPE im Jahr 2002	6
Erweiterte Abklärungen im Rahmen des Inzidenz-Anstieges der CJK in der Schweiz	6
Untersuchungen über Prionen-Stämme	6
Periphere Pathogenese humaner Prion-Erkrankungen	7
Verteilung von PrP ^{Sc} innerhalb des zentralen Nervensystems	7
Neue diagnostische Tests zur Unterscheidung von Prionen-Stämmen	8
Literatur.....	9

Einführung

Das Nationale Referenzzentrum für humane Prion-Erkrankungen (NRPE) wurde 1995 mit Hilfe des Bundesamtes für Gesundheit (BAG) gegründet, um in enger Zusammenarbeit mit anderen Prion-Referenzzentren in Europa die Inzidenz und Charakteristika humaner Prion-Erkrankungen in der Schweiz zu studieren. In den letzten Jahren hat sich aus dem NRPE ein Kompetenzzentrum für humane Prion-Erkrankungen entwickelt (Glatzel et al., 2003b). Neben dem Institut für Neuropathologie ist die Forschungsabteilung der Psychiatrischen Universitätsklinik Zürich sowie die Neurologische Klinik des Universitätsspitals Zürich in dieses Netzwerk eingebunden.

Zur Gruppe der humanen Prion-Erkrankungen zählen neben sporadischen Fälle der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD), vererbare (familiäre) Fälle (fCJD) sowie erworbene Fälle. Erworbene Fälle der CJD können wiederum in solche eingeteilt werden, welche durch eine unbeabsichtigte Übertragung von Prionen im Rahmen von medizinischen Eingriffen ausgelöst worden sind (iatrogene Creutzfeldt-Jakob Erkrankung, iCJD) und solche, die durch Exposition gegenüber Prionen der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) ausgelöst wurden (variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, vCJD) (Aguzzi et al., 2001).

Klinische Überwachung:

Im Jahr 2002 wurde im NRPE die klinische Überwachung von Verdachtsfällen humaner Prion-Erkrankungen intensiviert. Insgesamt wurden in dem Zeitraum von 01.01.2003 bis 30.11.2004, 40 Patienten durch einen Facharzt für Neurologie vor Ort untersucht und gemäss WHO-Diagnosekriterien in wahrscheinliche, mögliche oder unwahrscheinliche CJD-Fälle eingeteilt (Pocchiari et al., 2004). Im Rahmen dieser Einsätze wurden ansässige Kliniker sowie die Angehörigen beraten und Informationsgespräche bezüglich genetischer Untersuchungen durchgeführt. Im Rahmen der Besuche wurde auch spitalhygienische Risikosituationen erfragt und präventiv diskutiert.

Bestimmung des 14.3.3 Proteins im Liquor

14.3.3 ist ein Protein, dass hauptsächlich in Neuronen synthetisiert wird. Ein rascher Anstieg dieses Proteins im Liquor deutet auf den Zerfall von Neuronen im zentralen Nervensystem hin. Die Erhöhung des 14.3.3 Proteins im Liquor kann mit biochemischen Verfahren nachgewiesen werden. Nach Ausschluss anderer, vor allem akut-neurologischer Erkrankungen, die zu einem Anstieg dieses Proteins im Liquor führen, wie zum Beispiel Enzephalitiden, Blutungen oder Hirnischämien, ist die Sensitivität sowie die Spezifität dieser Untersuchung für die sCJD mit 94% beziehungsweise 93% relativ hoch (Zerr et al., 2000). In dem Zeitraum von 01.01.2003 bis 30.11.2004 wurden im

NRPE insgesamt 175 solcher Untersuchungen durchgeführt. Im Rahmen der 14-3-3-Bestimmung wurden klinische Daten erhoben und so mögliche CJD-Fälle frühzeitig identifiziert.

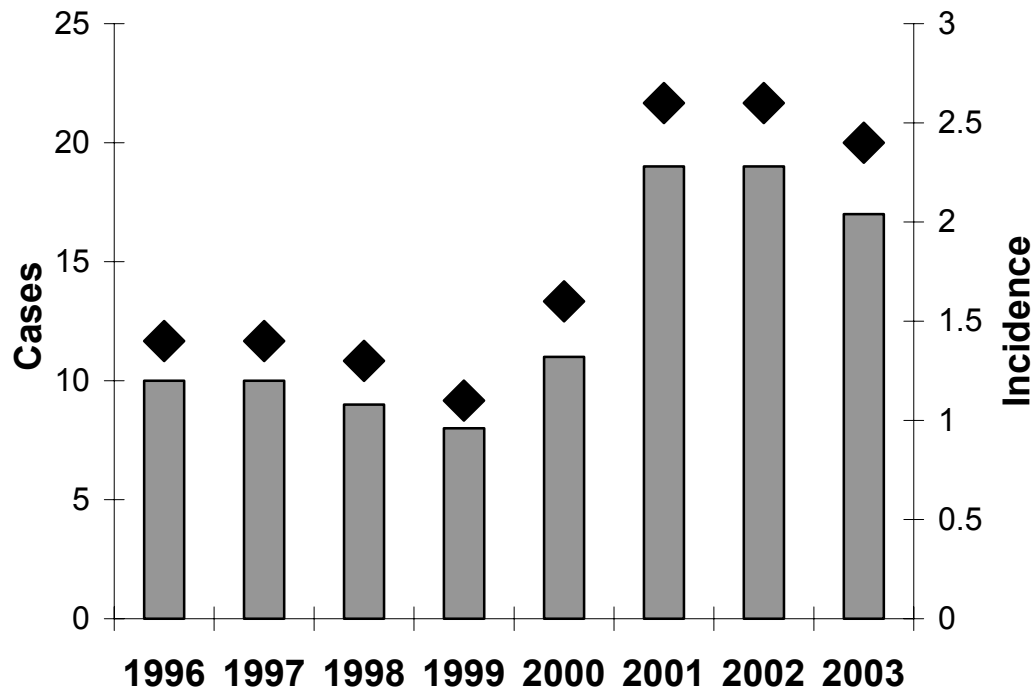


Abbildung 1: Anzahl der Fälle (graue Balken) sowie Inzidenz (schwarze Rauten) humaner Prion-Erkrankungen in der Schweiz

Genetische Untersuchungen

Die vollständige Sequenzierung des offenen Leserasters des Prion-Protein kodierenden Gens (*PRNP*) erfolgt in Zusammenarbeit mit dem Labor für Molekularbiologie (Institut für Klinische Pathologie, Universitätsspital Zürich). Im Zeitraum von 1.1.2003 bis 30.11.2004 wurden insgesamt 35 Sequenzierungen durchgeführt. Die Übermittlung der Resultate dieser Untersuchungen erfolgte unter Miteinbeziehung der behandelnden Ärzte sowie unter Miteinbeziehung des Institutes für Humangenetik der Universität Zürich. Weiterführende genetische Analysen werden in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Psychiatrische Forschung des Universitätsspitals Zürich durchgeführt.

Molekulare Diagnostik humaner Prion-Erkrankungen

Die definitive Diagnose einer humanen Prion-Erkrankungen kann nur durch die Untersuchung von zentralnervösen Gewebe, welches im Rahmen einer Autopsie oder einer Biopsie entnommen

wird, gestellt werden (Budka et al., 1995). Neben der definitiven Diagnosestellung ermöglicht die neuropathologische sowie biochemische Untersuchung eine genaue Bestimmung des molekularen CJD-Phenotypes (Hill et al., 2003; Parchi et al., 1999). Eine neuropathologische Aufarbeitung beinhaltet die histologische sowie die immunhistochemische Analyse von mindestens 27 definierten Arealen aus dem zentralen Nervensystem sowie 10 Arealen aus anderen Organsystemen. Weiterhin wird zentralnervöses Gewebe aus verschiedenen Lokalisationen biochemisch auf die Anwesenheit von pathologisch gefaltetem Prion-Protein (PrP^{Sc}) untersucht. Diese Methode dient neben dem biochemischen Nachweis von PrP^{Sc} dazu, den vorliegenden Prion-Stamm zu definieren (Parchi et al., 1999).

Im Zeitraum von 1.1.2003 bis 30.11.2004 wurden mehr als 50 solcher Aufarbeitungen durchgeführt (Abbildung 2).

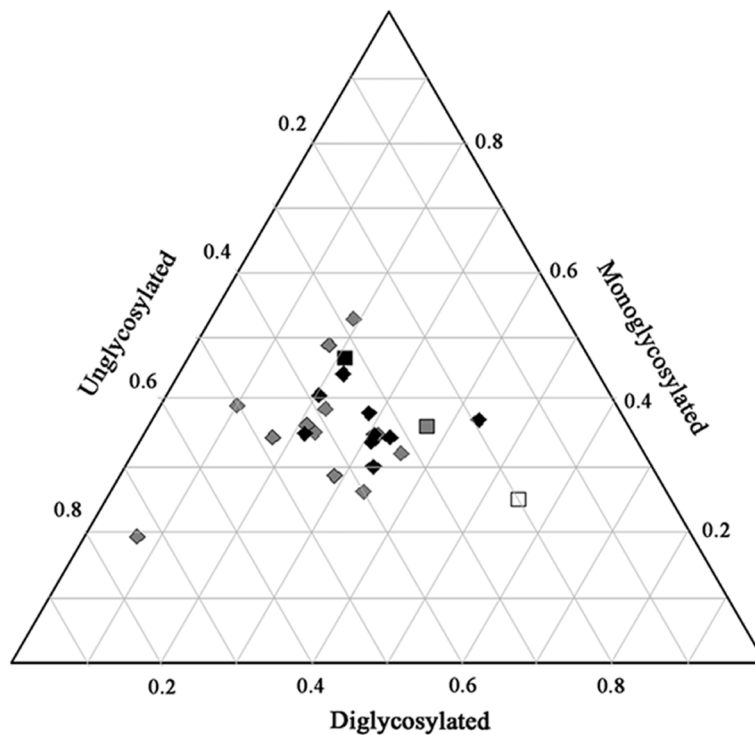


Abbildung 2: Glycoformen von sCJD Patienten.

Die triangulare Abbildung zeigt die relativen Intensitäten der oberen (diglycosylated), mittleren (monoglycosylated) and unteren (unglycosylated) Banden von PrP^{Sc} auf. Dargestellt sind Schweizer sCJD Fälle der Jahre 2002 (hellgraue Rauten), 2003 (dunkelgraue Rauten). Als Kontrollen dienen sCJD Patienten mit definierten PrP^{Sc} -Typen (MM1, schwarzer Kasten; VV2, grauer Kasten; MM2B, leere Kasten).

Wissenschaftliche Aktivitäten des NRPE im Jahr 2003/4

Erweiterte Abklärungen im Rahmen des Inzidenz-Anstieges der CJK in der Schweiz

Während sich die Inzidenz von humanen Prion-Erkrankungen in den Jahren 1996 bis 2000 um einen Wert von 1 bis 1.4 pro Jahr/10⁶ Einwohner bewegte, verzeichneten wir im Jahr 2001 einen deutlichen Anstieg der Inzidenz humaner Prion-Erkrankungen auf 2.7 pro Jahr/10⁶ Einwohner. Im den Jahren 2002/3 kam es zu keinem weiteren Anstieg der Inzidenz humaner Prion-Erkrankungen, vielmehr hat sich die Inzidenz auf dem hohen Niveau von 2.7 pro Jahr/10⁶ Einwohner stabilisiert. Im Zeitraum von 01.01.2004 bis 30.11.2004 beträgt die vorläufige Zahl der an CJD verstorbenen Patienten in der Schweiz 14 (10 autoptisch bestätigt, 4 wahrscheinliche Fälle). Ein Forschungsprojekt, welches im Jahr 2002 abgeschlossen wurde, beschäftigte sich mit der klinischen, histologischen, biochemischen sowie genetischen Charakterisierung der CJD Fälle aus den Jahren 2001 und 2002 und verglich diese mit den CJD Fällen der Vorjahre (Glatzel et al., 2002).

Nachfolgestudien zu dieser Untersuchung werden zur Zeit durchgeführt. In diesem Rahmen wurde die klinische Überwachung durch epidemiologische Datenerhebung erweitert. Hierbei geht es darum, anhand einer Fall-Kontrollstudie mögliche Faktoren zu isolieren, welche mit dem oben beschriebenen Anstieg der CJD-Inzidenz im Zusammenhang stehen könnten. Zu diesem Zweck wurden auch alle CJD-Fälle der Jahre 2002 und 2003 vertieft epidemiologisch abgeklärt. Um die Planung dieser Studie zu kontrollieren wurde eine Studienbegleitgruppe bestehend aus Vertretern des Bundesamtes für Gesundheit, des NRPE sowie des Swiss NOSO CJD Task Force gegründet. Diese Fall-Kontroll Studie wird voraussichtlich im Jahr 2005 abgeschlossen werden.

Untersuchungen über Prion-Stämme

Das Vorhandensein von verschiedenen Prion-Stämmen ist sowohl bei humanen Prion-Erkrankungen als auch bei Prion-Erkrankungen aus dem Tierreich bekannt. Tatsächlich kann das Vorhandensein von unterschiedlichen Krankheitsbildern, welche zu definierten neuropathologischen sowie biochemischen Merkmalen führen, durch die Existenz von verschiedenen Prion-Stämmen erklärt werden.

Im NRPE werden bei allen Fällen von humanen Prion-Erkrankungen Untersuchungen durchgeführt, welche dazu dienen, den vorhandenen Prionen-Stamm festzulegen. Neben immunhistochemischen Untersuchungen, welche das Ausmass der PrP^{Sc} Ablagerungen im zentralen Nervensystem bestimmen, kommen hierbei auch biochemische Verfahren zu Einsatz, die

uns Informationen über die biochemischen Eigenschaften von PrP^{Sc} geben. Diese Ergebnisse werden anschliessend mit klinischen Parametern korreliert.

Durch diese Analysen hoffen wir, neue Einsichten über Prionen-Stämme zu gewinnen. Insbesondere liegt ein Schwerpunkt darin, vorhandene Einteilungsschemata der humanen Prionenerkrankung zu hinterfragen und neue klinisch, neuropathologisch sowie biochemisch definierte Gruppen von humanen Prion-Erkrankungen zu bestimmen (Rossetti et al., 2003).

Periphere Pathogenese humaner Prion-Erkrankungen

Bei der Creutzfeldt-Jakob Krankheit kommt es zur Ablagerung von fehlgefaltetem Prion-Protein (PrP^{Sc}) im Gehirn. Die variante Form der Creutzfeldt-Jakob Krankheit wird höchstwahrscheinlich durch Aufnahme von BSE-verseuchten Produkten ausgelöst. Bis anhin wurde bei vCJD, nicht jedoch bei sCJD, im lymphatischen System PrP^{Sc} detektiert.

In einer früheren Studie haben wir in einer Subgruppe von an sCJD verstorbenen Patienten PrP^{Sc} auch in Muskel- und Milzproben mittels hochsensitiven Verfahren nachweisen können (Glatzel et al., 2003a).

Diese Untersuchungen wurden im letzten Jahr ausgeweitet. Insbesondere haben wir versucht, die Verteilung von PrP^{Sc}, in verschiedenen Muskelgruppen von an sCJD verstorbenen Patienten, näher zu untersuchen. Weiterhin überprüfen wir die Möglichkeit, ob sich Muskelbiopsien als diagnostische Testverfahren zur sicheren Diagnosestellung einer humanen Prion-Erkrankungen eignen.

Verteilung von PrP^{Sc} innerhalb des zentralen Nervensystems

Bei der Creutzfeldt-Jakob Krankheit kommt es zur hauptsächlich im Gehirn zur Ablagerung von PrP^{Sc}. Obwohl man aus histologischen Untersuchungen beobachten konnte, dass verschiedene Hirnregionen von pathologischen Veränderungen verschieden stark befallen sind, ist bis anhin über die topographische Verteilung von PrP^{Sc} innerhalb des Gehirnes wenig bekannt. In diesem Projekt wird versucht, diese Frage zu klären. Hierfür wird bei über 50 sCJD Fällen die regionale PrP^{Sc}-Verteilung mittels einer quantitativen Western-blotting Methode untersucht. Durch diese Analysen hoffen wir neue Einsichten über die regionale Vulnerabilität bei verschiedenen Prion-Stämmen zu gewinnen.

Neue diagnostische Tests zur Unterscheidung von Prion-Stämmen

Aktuell werden 6 verschiedene Subtypen der sCJD unterschieden. Diese Subtypen werden unter Einbeziehung genetischer (*PRNP* Polymorphismus Codon 129; Methionin/Valin), biochemischer (PrP^{Sc}-Typ) sowie histologischer (Ablagerungsart von PrP) Charakteristika differenziert und gehen mit spezifischen klinischen Symptomen einher (Hill et al., 2003; Notari et al., 2004).

In einem laufenden Projekt ist das Ziel, mittels neu hergestellter, monoklonaler, gegen PrP gerichteter Antikörper, eine neue und einfachere Methode der molekularen Klassifizierung humaner Prion-Erkrankungen zu untersuchen und zu etablieren.

Literatur

- Aguzzi A, Montrasio F, Kaeser PS. Prions: health scare and biological challenge. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 118-26.
- Budka H, Aguzzi A, Brown P, Brucher JM, Bugiani O, Gullotta F, et al. Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol* 1995; 5: 459-66.
- Glatzel M, Abela E, Maissen M, Aguzzi A. Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 2003a; 349: 1812-20.
- Glatzel M, Ott PM, Lindner T, Gebbers JO, Gmur A, Wuest W, et al. Human prion diseases: epidemiology and integrated risk assessment. *The Lancet Neurology* 2003b; 2: 757-63.
- Glatzel M, Rogivue C, Ghani A, Streffer JR, Amsler L, Aguzzi A. Incidence of Creutzfeldt-Jakob disease in Switzerland. *Lancet* 2002; 360: 139-41.
- Hill AF, Joiner S, Wadsworth JD, Sidle KC, Bell JE, Budka H, et al. Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 2003; 126: 1333-1346.
- Notari S, Capellari S, Giese A, Westner I, Baruzzi A, Ghetti B, et al. Effects of different experimental conditions on the PrP^{Sc} core generated by protease digestion: Implications for strain typing and molecular classification of CJD. *J Biol Chem* 2004.
- Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999; 46: 224-33.
- Pocchiari M, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Gelpi E, Collins S, et al. Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain* 2004; 127: 2348-59.
- Rossetti AO, Glatzel M, Aguzzi A, Janzer R, Bogousslavsky J. Clinical and radiological mimicry of vCJD in a valine homozygous PrP(Sc) type 1 sCJD patient. *J Neurol* 2003; 250: 491-3.
- Zerr I, Pocchiari M, Collins S, Brandel JP, de Pedro Cuesta J, Knight RS, et al. Analysis of EEG and CSF 14-3-3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2000; 55: 811-5.