

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Klinická variabilita vzácných demencí a její možné příčiny

MUDr. et Mgr. Adam Tesař

2021

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Neurovědy

Předseda oborové rady: prof. MUDR. Ján Laczo, PhD.

Školící pracoviště: Neurologická klinika 1. LF UK a VFN

Školitel: doc. MUDr. Robert Rusina, PhD.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Abstrakt:

Klinické varianty demencí vnáší do jejich diagnostiky omezení a mohou vést k poddiagnostikování, nebo záměně dvou rozdílných onemocnění při stejné symptomatologii. Tato práce, proto zkoumá faktory podílející se na klinické variabilitě vzácných demencí. Jako modelová onemocnění jsou užitá progresivní supranukleární obrna a Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom způsobený mismatch mutací P102L v genu pro prionový protein (*PRNP*). V rámci této práce prokazujeme vliv distribuce neuropatologie a jejího šíření na klinický fenotyp nemoci. Přestože postižení jedním neurodegenerativním onemocněním zvyšuje riziko neurodegenerativní komorbidity, tato neuropatologie neovlivňuje fenotypickou prezentaci primárního onemocnění. Monogenně vázané proteinopatie mohou mít rozličnou klinickou prezentaci, která není podmíněna pouze polymorfismy kauzálního proteinu, ale naopak může být ovlivněna wild type alelou kauzálního proteinu. Přesnější pochopení symptomatické variability demencí umožní lepší zaměření lékových studií a výhledově i léčbu, i lepší pochopení patogeneze neurodegenerativních nemocí.

Abstract:

Clinical variants of dementia are limiting their diagnosis and can lead to underdiagnosing or substitution of two different diseases with the same symptomatology. The aim of this study is a better understanding of a factors involved in the clinical variability of rare dementias. Progressive supranuclear palsy and Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome caused by mismatch mutation P102L in the prion protein (*PRNP*) gene are used as model diseases. In this thesis, we demonstrate the influence of the distribution of neuropathology and its spread on the clinical phenotype of the disease. Although a single neurodegenerative disease increases the risk of neurodegenerative comorbidity, this other neuropathology does not affect the phenotypic presentation of the primary disease. Monogenetically inherited proteinopathies can have different clinical subtypes, which is not only conditioned by causal protein polymorphisms, but can be influenced by the wild type allele of the causal protein.

Obsah:

1. Úvod	6
2. Hypotézy a cíle práce	6
2.1. Cíl studie.....	6
2.2. Hypotézy	7
3. Materiál a metodika.....	7
3.1. Studium anatomické distribuce	7
3.2. Studium souběžné neuropatologie.....	8
3.3. Studium monogenně vázaných neurodegenerací	8
3.4. Studium vlivu wild type alely/nemutované varianty proteinu	9
3.5. Statistické metody	10
4. Výsledky.....	10
4.1. Anatomická distribuce.....	10
4.2. Souběžné neuropatologie.....	11
4.3. Monogenně vázané neurodegenerace.....	11
4.4. Vliv wild type alel/nemutované varianty proteinu	13
5. Diskuse	14
5.1. Rozdílná klinická prezentace jednotlivých fenotypů je způsobena anatomickou distribucí neurodegenerativní patologie.....	14
5.2. Příčinou atypické prezentace onemocnění může být souběžná (konkomitantní) neuropatologie	16
5.3. Monogenně vázané neurodegenerace mohou mít atypické klinické prezentace	17
5.4. Atypická prezentace může být ovlivněna wild type alelou/nemutovanou variantou proteinu.....	18
6. Závěry.....	19
7. Použitá literatura	20

1. Úvod

Předkládaná studie na dvou modelových onemocněních (progresivní supranukleární obrně – PSP, a Gerstmannově–Sträusslerově–Scheinkerově syndromu – GSS) analyzuje možné faktory zapříčiňující variabilitu klinické symptomatologie demencí.

Variabilita onemocnění záleží na stavu tkáně (respektive míře jejího poškození, tzv. mozková rezerva) jednak na množství vytvořených nervových sítí (např. kognitivní rezerva). Individuální je i rezistence/vulnerabilita vůči patologickému procesu, která se odvíjí od genetického profilu pacienta. Prezentace příznaků se mění během progresu nemoci a zejména v jejím počátku nemusíme úplně přesně predikovat její časový vývoj. Kromě samotné individuální variability mezi jedinci existuje i variabilita intra-individuální, tedy v rámci výkonů/projevů jednotlivce samotného.

V současné době velmi diskutovanou je role neurodegenerativních komorbidit, tedy rozvoj dvou a více neurodegenerativních patologií v mozku zároveň [Matej R. *et al.*, 2019]. Komorbidity většinou zapříčiňují rychlejší progresi nemoci, ale kazuisticky jsou popsány i případy se zcela odlišnou symptomatikou, než by odpovídalo zapříčiňující patologii.

Poslední příčinou rozdílné klinické prezentace určitého onemocnění jsou různé klinické fenotypy, tedy varianty téhož onemocnění s rozdílnou symptomatikou. Pacienti s různými variantami projevují jiný soubor příznaků a/nebo stejný soubor příznaků s různým časovým sledem. Definice fenotypu je jistým zjednodušením klinického obrazu. Jelikož díky již uvedeným faktorům variability v míře jednotlivých symptom se určitý fenotyp rozšiřuje o šedou zónu případů ne zcela naplňující jeho charakteristiku. Často pak dochází k prolínání těchto zón ve splývající fenotypické spektrum.

2. Hypotézy a cíle práce

2.1. Cíl studie

Atypické prezentace neurodegenerativních onemocnění vnášejí do diagnostiky demencí dvě zásadní omezení. Jednak mohou vést k možné záměně dvou zcela rozdílných onemocnění, tedy odlišných proteinopatií s podobnou symptomatologií, např. frontální varianta AN a bvFTD. Možnost nesprávné diagnózy pak limituje výsledky klinických studií cílených na určitý patogenetický proces a mohou vést k nerozpoznání dané nemoci, kdy

pacientovy obtíže neodpovídající klasickým projevům. Atypické prezentace neurodegenerativních onemocnění by také mohly být slibným *locus minoris resistentiae* ve zkoumání patofyziologie těchto onemocnění, jelikož se musí vyskytovat další faktor zapříčínující odlišný průběh nemoci interagující s patofyziologickým mechanismem onemocnění.

Cílem této práce je lepší pochopení fenotypické variability vzácných neurodegenerací – tedy pokusit se definovat faktory zapříčínující fenotypickou variabilitu vzácných neurodegenerací.

2.2. Hypotézy

- 1) Rozdílná klinická prezentace jednotlivých fenotypů je způsobena anatomickou distribucí neurodegenerativní patologie
- 2) Příčinou atypické prezentace onemocnění může být souběžná (konkomitantní) neuropatologie
- 3) Monogenně vázané neurodegenerace mohou mít atypické klinické prezentace
- 4) Atypická prezentace může být ovlivněna wild type alelou/nemutovanou variantou proteinu

3. Materiál a metodika

3.1. Studium anatomické distribuce

K testování závislosti atypické prezentace na rozdílné anatomické distribuci neuropatologie jsme užili jako modelové onemocnění PSP. Testovali jsme 18 pacientů (13 mužů a 5 žen) s histopatologicky verifikovanou PSP. Příbuzní podepsali s testováním informovaný souhlas schválený multicentrickou etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny a Fakultní Thomayerovy nemocnice (pořadové číslo: G1827). Podmínkou zařazení pacienta byla absence komorbidního neurodegenerativního onemocnění a přítomnost významných cévních změn.

Tkáň byla nejprve 3-4 týdny fixována v 10 % formaldehydu a následně byl vzorek zalit do parafinu a v oblastech zájmu rozřezána na 4 μ m řezy. Vzorky byly na barveny hematoxylin-eosinem a luxol-eosinem. Následně byla doplněna imunohistochemie užitím protilátek proti hyperfosforylovanému tau proteinu (klon AT8, ředění 1:500, výrobce Thermo

Scientific) a jeho izoformám 4R (klon 1E1/AG, ředění 1:200, výrobce Upstate) a 3R (klon 8E6/C11, ředění 1:500, Upstate). Dále byly testovány proteiny p62 (clone GP62, 1:4000, PROGEN), a ubiquitin (polyclonal, 1:500, Dako). Primární protilátky byly následně označeny systémem křenové peroxidázy (horseradish peroxidase) a diaminobenzidinu (Envision FLEX/HRP, polyclonal rabbit-anti-guinea pig; Dako). V rámci diferenciální diagnostiky byly vzorky barveny i na amyloid-beta (klon 6F/3D, 1:100, Dako). Vzorky pacientů tak splňovaly charakteristiku konkomitantní alzheimerovské patologie, synukleinopatie a primární na věku závislé tauopatie (PART) a na věku závislé astrogliopatie (ARTAG).

Dva zkušení neuropatologové (MUDr. Rohan, MUDr. Stejskalová) Ústavu patologie a molekulární medicíny 3. LF UK a Fakultní Thomayerovy nemocnice provedli morfometrické skórování tau protein immunoreaktivních globulárních struktur, inkluzí podobných neurofibrilárním klubkům (NCIs) cytoplasmatických inkluzí oligodendogrií (GCIs), astrogliálních cytoplasmatických inkluzí (TA) a vláken a teček tau proteinu neuropilu v těchto definovaných lokalizacích: 1) primární motorická kůra, 2) frontální kůra, 3) capsula interna, 4) striatum, 5) mozečkové pedunkly, 6) báze pontu, 7) nucleus dentatus mozečku, 8-10) přední a zadní rohy míšni a laterální kortikospinální dráha, 11) přední a zadní spinální nervy. Tau patologie byla semikvantitativně škálována jako 0 – nepřítomna, 1 – lehká, 2 – střední, a 3 – těžká. Retrospektivním studiem dokumentace pacientů byla určena délka onemocnění, doba nástupu, PSP subtyp a detailně zhodnoceny příznaky z horního i dolního motorického neuronu.

3.2. Studium souběžné neuropatologie

V rámci testování vlivu neuropatologie na klinickou variantu nemoci jsme použili rozšířený soubor pacientů z předchozí sekce na 21 pacientů (tyto pacienti nebyli zahrnuti v původním souboru, jelikož u nich nebyly histopatologická data ve všech studovaných lokalizacích). Porovnali jsme klinickou prezentaci nemoci (phenotyp, délku, dobu nástupu) mezi izolovanou PSP patologií a PSP s konkomitantní patologií.

3.3. Studium monogenně vázaných neurodegenerací

U sedmi doposud v ČR zachycených pacientů s neuropatologicky a geneticky potvrzenou diagnózou GSS a kauzální mutací P102L jsme analyzovali klinická data a MRI. Autopsie a genetická analýza byly provedeny v Národní referenční laboratoři pro lidská prionová onemocnění v Ústavu patologie a molekulární medicíny Fakultní Thomayerovy

ynemocnice v Praze mezi roky 1999-2018. MRI snímky byly popsány specializovaným radiologem na neurodegenerativní onemocnění (MUDr. J. Keller, Ph.D., Oddělení radiologie Nemocnice na Homolce v Praze). Dále jsme v rámci retrospektivní analýzy zahrnuli data od roku 1992 získaná z publikovaných kazuistik P10L GSS v dostupné literatuře dle databází Scopus a Web of Science Core Collection Nutnou podmínkou zahrnutí pacientů do analýzy byla genetická, či genealogická verifikace mutace P102L. Pouze dva články v japonštině s ohledem na riziko misinterpretace překladem nebyly zahrnuty [Sugai F. et al., 2000; Misumi Y. et al., 2006] a jeden článek se nám nepodařilo získat v plném rozsahu [Kulczycki J. et al., 2001]. Studovali jsme pohlaví, věk při prvních projevech a dobu trvání onemocnění, nástup demence, trvání kognitivního deficitu, nástup ataxie, abnormality v bazálních gangliích, kortexu a mozečku na MRI/CT snímcích, polymorfismus v kodonech 129 a 219, změny v šlachově okosticových reflexech a v taktilním čítí, a nález v mozkomíšním moku (základní likvorologický obraz, protein 14-3-3, tau, fosfotau a beta amyloid). Pro rozdílnou kvalitu publikovaných údajů bylo obtížné v některých případech stanovit nástup ataxie/demence (v některých článcích nebyl zmíněn vznik příznaku, ale pouze neurologický nález při kontrolách např. v 1. a 2. roce nemoci). V těchto případech jsme určili dobu nástupu jako aritmetický průměr (tedy ve zmíněném příkladu 1,5 roku) a takto jsme byli schopni u všech pacientů definovat nástup demence a ataxie. U pacientů, kteří během svého života neměli demenci ani ataxii, jsme určili jako dobu nástupu příznaků dobu trvání nemoci. Ke srovnání výsledků zobrazovacích metod jsme definovali čtyři zájmové oblasti (mozkovou atrofii, hyper/hypointenzity, atrofii mozečku a změny intenzity signálu v bazálních gangliích). Jelikož většina kazuistik obsahovala pouze popis MRI/CT ve smyslu normální/abnormální v daných zájmových parametrech, jsme vymezili příznak jako pozitivní, nebo negativní, nebo nedefinovaný.

3.4. Studium vlivu wild type alely/nemutované varianty proteinu

Dle údajů o příbuzenských vztazích pacientů z předchozí sekce jsem definovali podskupiny dvojic sourozenců, skupinu párů rodič a dítě a podskupinu náhodných dvojic pacientů. Následně jsme srovnali rozdíl v době nástupu nemoci, v trvání nemoci a dominujícím příznaku, tak jak byl určen autory kazuistiky (ataxie, demence, parestézie, psychiatrické projevy a insomnie).

3.5. Statistické metody

K statistickému zpracování dat jsme použili software Matlab R2018a (MathWorks, Massachusetts). Nejprve jsme u obou souborů pacientů provedli test normality Shapiro-Wilk test (hypotéza 1,2) a Mardia multivarietní analýza (hypotéza 3,4). Pro soubor PSP pacientů neměli jednotlivé proměnné normální distribuci. Pro pacienty s GSS P102L jsme obdrželi p-skew a p-kurt < 0.001 . Tedy data neměla normální distribuci a pro testování hypotéz musel být užit neparametrický test.

Užili jsme dvojvýběrový Wilcoxon-Mann-Whitneyův (WMW) rank-sum test s hladinou významnosti $p = 0.05$. V případě PSP jsme testovali jak celkovou sumu (pro různé domény a různé patologické znaky), tak sumu skóre v jednotlivých doménách a následně užili false discovery rate (FDR) metody ke korekci pro mnohočetné porovnání. S průkazem kritické p hodnoty větší než 0,019. K analýze klastrů jsme užili analýzy hlavních komponent (PCA) jako metody k možné redukci dimenze problému. Celý soubor byl podle PCA popsán 14 dimenzemi (přičemž první tři vystihovaly 62,74 % rozptylu a prvních sedm 90,19 %).

Následně jsme užili Density-Based Sequential Cluster Analysis (DBSCAN) ke clusterové analýze souboru a definování tak možných klinických prezentací. Tato metoda byla zvolena s ohledem na výbornou reprodukovatelnost a tvorbu klastrů s hustým jádrem. Další výhodou byla možnost nedefinovat předem počet klastrů a detekce outlierů. DBSCAN záleží na dvou parametrech. První z nich je minimum pacientů tvořících jeden klastr, kterou jsme definovali jako 3, abychom umožnili vznik i malých klastrů, ale zamezili definování jako clusteru náhodných blízkých párů. Druhou proměnnou je prahová hodnota epsilon určující kritickou vzdálenost jednotlivých prvků klastru. V našem případě bylo epsilon nalezeno experimentálně, tak aby počet outlierů nepřevyšoval 5 % souboru. Větší počet outlierů by mohl vést k rozpadu velmi atypických fenotypů a možná variance v rámci klastru by byla redukována.

4. Výsledky

4.1. Anatomická distribuce

Wilcoxon-Mann-Whitneyovým testem jsme srovnávali medián skóre PSP-RS pacientů a PSP-nonRS v průběhu pyramidové dráhy (motorický kortex, capsula interna, crura cerebri, přední i zadní rohy míšni, postranní kortikospinální dráha a zadní fascikly). Pro sumu skoré

přes celou oblast jsme zaznamenaly signifikantní rozdíl pro motorický kortex medián pro PSP-RS 9 R(4-11) vs. medián pro PSP – non RS 3 R(0-10), $p=0,019$. Dále pro celkové neuropatologické skóre (sumu napříč všemi vyjmenovanými etážemi pyramidové dráhy jsme obdrželi p -hodnotu 0,016 při mediánu skóre 36 R (34,8-43) pro PSP-RS a medián 22 R (23,4-45) pro PSP-non RS. Naopak porovnání pro zbylé domény bylo nesignifikantní.

4.2. Souběžná neuropatologie

Díky podrobné neuropatologické analýze, popsané detailně v metodice, jsme měli k dispozici údaje o zachycených komorbidních patologiích u 21 pacientů (u 3 z nich nebyla provedeno histopatologické vyšetření míchy). Medián doby propuknutí nemoci byl 67 let R (58-83) s délkou nemoci 60 měsíců (24-360). U osmi pacientů byla histopatologicky verifikována pouze PSP; u 4 byla PSP v komorbiditě s AN a u dalších dvou byla v komorbiditě k PSP a AN ještě mozková amyloidová angiopatie (CAA). Další 4 pacienti měli PSP v komorbiditě s nějakou z forem FTLD. U posledních tří byla vždy jednotlivě PSP v komorbiditě s SCA (typ neurčen), ARTAG a nespecifikovaná tauopatie. Nejprve jsme testovali vliv izolované PSP patologie a komorbidní PSP (PSP a další patologie) na nástup věku a délku onemocnění. Pro nástup onemocnění bylo $p=0,885$ a pro délku nemoci $p=0,912$. Přestože všichni pacienti s PSP-CBS měli patologický nález jiné další neurodegenerace, obecně izolovaná patologie a patologie v komorbiditě neměly statisticky významný vliv na fenotypickou prezentaci ($p=0,665$). Poté jsme testovali případný rozdíl ve fenotypu mezi izolovanou formou a PSP v komorbiditě s AN ($p=0,592$) a izolovanou formou PSPS a PSP+FTLD ($p=0,5212$).

4.3. Monogenně vázané neurodegenerace

Jako model monogenního neurodegenerativního onemocnění jsme zvolili GSS způsobené mismatch mutací v kodonu 102 vedoucí k záměně prolinu za leucin (P102L). Pacientů s touto formou onemocnění bylo doposud v ČR diagnostikováno 7 (mezi rokem 2008-2018) k vyhodnocení možné fenotypické variability jsme připojili data z publikovaných kazuistik od roku 1992 do konce roku 2018.

Celkově jsme tedy hodnotili data 94 pacientů, z nich 64 bylo v době publikování kazuistik po smrti a 30 z nich bylo naživu (v jednom případě nebyla délka nemoci v textu zmíněna) Medián nástupu onemocnění byl 49 let (IQR 37,25–57,83) a medián trvání nemoci byl 48 měsíců (IQR 36–72) u zemřelých, a 48 měsíců (IQR 24–72) pro celý soubor, tedy

zahrnutí/vynechání žijících pacientů nemělo vliv na délku trvání nemoci ($p = 0,4274$). Poměr mužů a žen byl (38:49) – u sedmi pacientů nebylo pohlaví v textu definováno.

Demence byla zaznamenána u 63 pacientů (67,02 %); s mediánem nástupu nemoci v 50,83 letech (IQR 38,08-58,75) a mediánem trvání demence 24 měsíců (IQR 12-46,5), ataxii mělo 84 pacientů (89,36 %); medián nástupu od propuknutí nemoci byl 2 měsíce (IQR 0-12), a 10 pacientů (10,64 %) s dominujícími psychiatrickými symptomy (paranoia, schizofrenie u 3 pacientů, vizuální a sluchové halucinace u 4, a změnou chování u 3 pacientů).

Změna v reflexech byla u 44 pacientů (46,81 %); areflexie byla u 25 pacientů (26,60 %); hyperreflexie u 10 pacientů (10,64 %). Změna cití na dolních končetinách byla u 32 pacientů (34,04 %); dysestézie u 20 pacientů (21,28 %); parestézie u pěti (5,32 %); a hypostézie u 7 pacientů (7,45 %). Dysestézie provázela areflexii na dolních končetinách ve většině případů ($p = 6,134 \times 10^{-9}$) a byla spojena s pozdějším nástupem onemocnění (59 let v porovnání s 47 lety, $p = 0,004$).

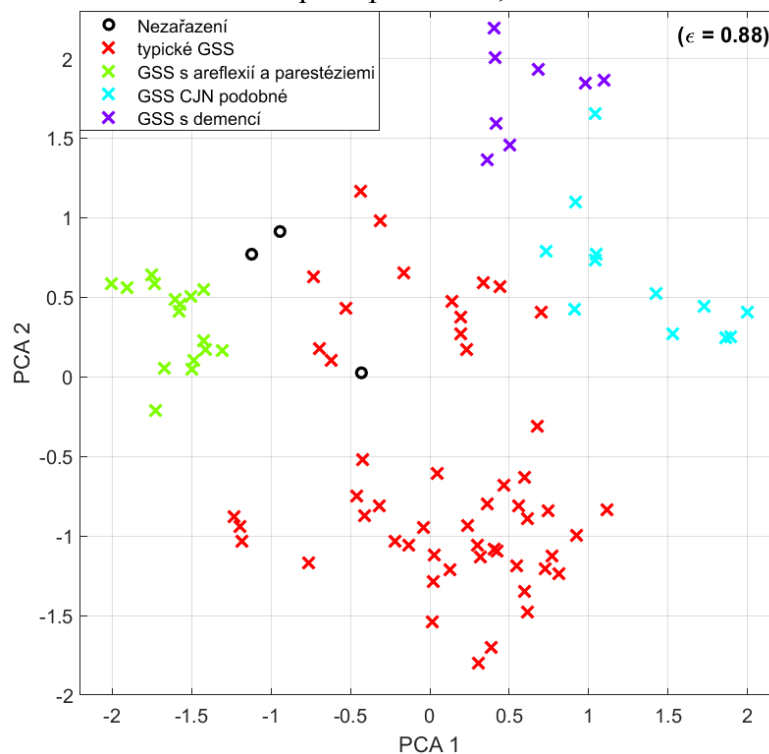
Snažili jsme se i upřesnit diagnostickou senzitivitu/specificitu jednotlivých metod. EEG bylo provedeno u 57 pacientů s nálezem trifázických generalizovaných komplexů pouze u tří pacientů a jen u dvou periodické synchronní aktivity. Zobrazení mělo 69 pacientů (4 měli CT mozku s kortikální atrofií u dvou, 1 měl atrofii mozečku a jedno CT bylo normální) a 65 mělo provedenu MRI s nálezem změn u 51 pacientů (78,46 %), kortikální atrofie na CT/MRI u 38 pacientů (55,07 %); MRI kortikální hyperintenzity u 21 pacientů (32,32 %); MRI hypersignály bazálních ganglií u 14 pacientů (21,54 %); CT/MRI mozečková atrofie u 29 pacientů (42,03 %). Likvorologická analýza tau proteinu a beta-amyloidu byla provedena pouze u 31 pacientů (7 s elevací celkového tau, 1 s elevací beta-amyloidu, hyperproteinorachie u 3 pacientů a u 17 pacientů byl nález normální). Protein 14-3-3 byl pozitivní u 6 z 12 vyšetřovaných pacientů. RT-QuIC test nebyl proveden u nikoho.

DBSCAN klastrová analýza nevyžaduje předchozí definici počtu klastrů. Postupně jsme snižovali parametr epsilon, který v této metodě odpovídá stanovení podmínky podobnosti prvků v klastru (viz. statistické metody). Při postupné restrikci epsilon 0,88 jsme obdrželi čtyři clustery. První obsahoval 52 pacientů s časným nástupem nemoci (medián 46 versus 56 let, $p = 0,035$), delším průběhem (medián 48 měsíců versus 7 měsíců, $p = 1,548 \times 10^{-6}$) a pozdním nástupem demence (medián 30 měsíců, $p = 1,609 \times 10^{-7}$).

Druhý klastr obsahoval 16 pacientů s dominující areflexií ($p = 6,435 \times 10^{-10}$) a bolestivými parestéziemi/dyestéziemi ($p = 8,654 \times 10^{-12}$) a pozdním nástupem ataxie (medián nástupu 12 měsíců, $p = 0,003$). Třetí klastr zahrnoval 13 pacientů s rychlým projevem demencí a ataxie (medián nástupu 0 měsíců) a krátkým trváním nemoci (medián 7 měsíců). Čtvrtý klastr se skládal z 9 pacientů s brzkým nástupem (medián 35 let) a trváním nemoci (medián 48 měsíců), pozdním nástupem ataxie po 36 měsících ($p = 1,085 \times 10^{-6}$) a brzkým nástupem demence 0 měsíců, ($p = 1,115 \times 10^{-6}$). Další snižování epsilon vedlo k nárůstu outlierů a tedy narušení prvotně definované podmínky v metodice.

Výsledné fenotypy jsme **označili následovně: 1) „typický GSS“; 2) „GSS s areflexií a parestéziemi“; 3) „GSS podobný CJD“; a 4) „GSS s demencí“**.

Obr.1 Výsledek DBscan klastrování pro Epsilon = 0,88



Vysvětlivky: PCA 1 první komponenta analýzy hlavních komponent, PCA 2 druhá komponenta analýzy hlavních komponent

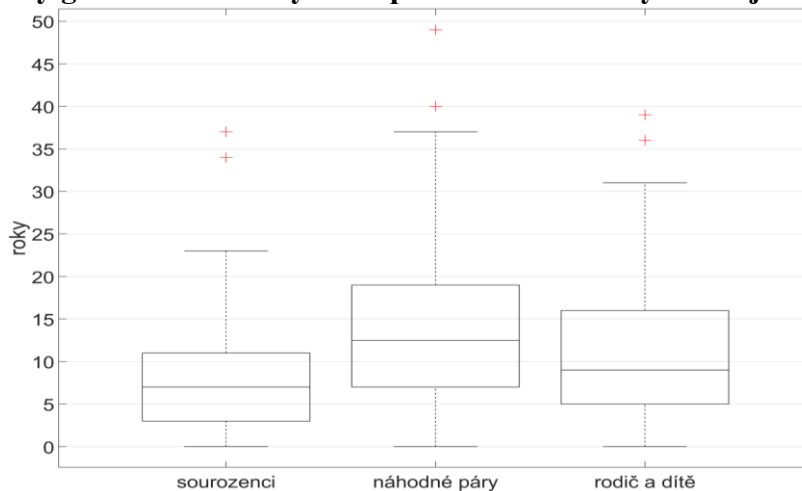
4.4. Vliv wild type alely/nemutované varianty proteinu

U pacientů z našeho souboru jsme porovnali polymorfismus methionu (Met) a valinu (Val) na kodonu 129 a v lysinu (Lys) a glutamátu (Glu) na kodonu 219. Polymorfismus kodonu 129 byl definován u 78 pacientů (Met/Met – 53, Met/Val – 22, Val/Val – 2, Met/? – 1) a kodonu 219 určený u 50 pacientů s absolutní převahou Glu/Glu – 48 (Glu/Lys – 2). Pro

kodon 129 při polymorfismu Met/Met měli pacienti pozdější nástup nemoci (medián 54 let ku 43,5 $p = 0,011$) a změnami reflexů na DKK ($p = 0,025$). K ověření tohoto pozorování jsme soubor rozšířili ještě o 46 pacientů shrnutých ve Webbově studii [Webb T. E. F. et al. 2008]. Pro takto rozšířený soubor pro homozygoty Met/Met kodonu nebyl statisticky významný rozdíl $p = 0,366$, ani změny v reflexech na DK jsme statisticky nepotvrdili ($p = 0,074$).

Následně jsme porovnali variabilitu doby nástupu, délky onemocnění i fenotypické prezentace v rámci příbuzných prvního stupně (rodič-dítě, dvojice sourozenců) a náhodnými dvojicemi pacientů. Rozdíl v době nástupu onemocnění byl menší mezi sourozenci (medián 7 let) než mezi náhodnými páry (medián 13 let), $p = 0,002$. Mezi dětmi a rodiči a náhodnými páry byl také nižší rozdíl (medián 9 let versus 13 let), ale bez statistické významnosti $p = 0,106$. Rozdíl doby nástupu mezi sourozenci vs. rodičem a dítětem také nebyl statisticky významný $p = 0,201$. Rozdíly v délce trvání nemoci a fenotypické prezentaci nebyly významné (Obr. 2.).

Obr. 2 Krabicový graf rozdílu doby nástupu mezi definovanými dvojicemi



Vysvětlivky: Box (krabice) odpovídá rozmezí mezi 1 a 3 kvartilem, uprostřed je vyznačen medián (šedivá úsečka), Y úsečky značí variabilitu mimo rozmezí 1-3 kvartilu, červeně jsou vyznačeny odlehlé hodnoty (outliers)

5. Diskuse

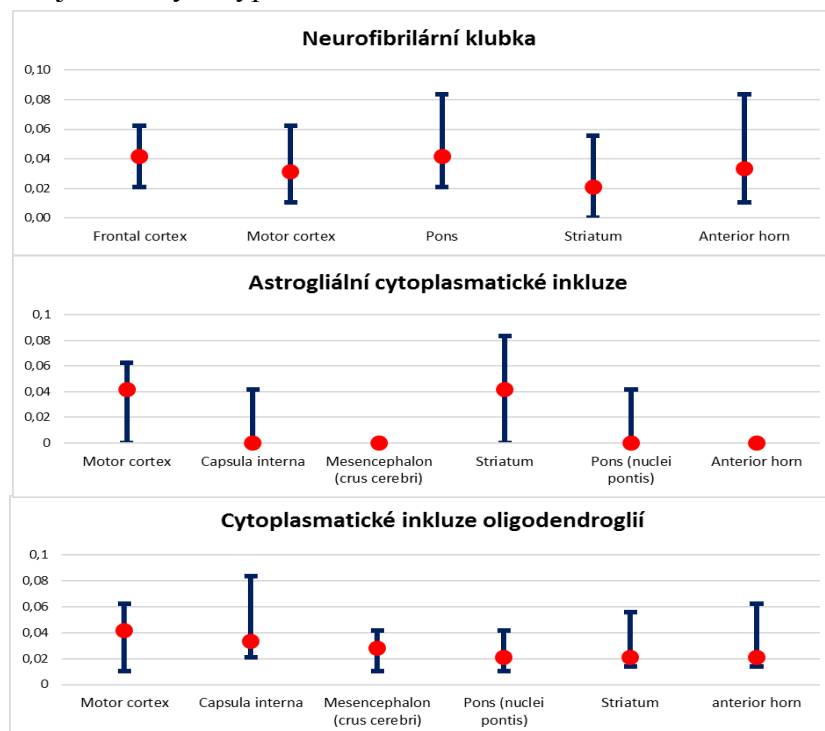
5.1. Rozdílná klinická prezentace jednotlivých fenotypů je způsobena anatomickou distribucí neurodegenerativní patologie

Míra rozvoje patologie a celkové množství tau proteinu je výrazně vyšší u PSP-RS než u PSP-P [Williams D. R. et al., 2007]. Odlišný závěr byl naopak získán pro porovnání

PSP-RS a PSP-CBS (u PSP-CBS byla vyšší akumulace tau v předním i posteriorním frontálním kortexu, u PSP-RS dominovala akumulace tau v basálních gangliích a v kortikospinální dráze) [Ling H. *et al.*, 2014]. Dle Ling et al. je celkově těžší postižení kortikálně a mikroglialní odpověď v pyramidové dráze u PSP-CBS [Ling H. *et al.*, 2014]. Tento rozdíl může být způsoben omezeným počtem PSP CBS pacientů v našem souboru.

Variabilita klinické prezentace jednotlivých fenotypů je podmíněna i šířením patologie zapříčiňujícím postupný rozvoj příznaků. U PSP – RS jsou na počátku nemoci popisovány v úrovni mozku kmene (supranukleární oftalmoparéza, posturální instabilita). Je proto překvapivé dominantní postižení v oblasti motorického kortexu. To může být spíše projevem rozšíření patologie z kmene do kortexu při pokročilém stavu nemoci. Proto jsme pro jednotlivé typy inkluzí (neurofibrilární klubka (NCIs), cytoplasmatické inkluze oligodendroglíí (GCI) a astroglialní cytoplasmatické inkluze (TA) jsme určili medián hodnoty postižení v průběhu pyramidové dráhy, BG a eventuálně i frontálního kortexu vztahovaný na délku nemoci pacienta (Obr. 3).

Obr. 3. Distribuce jednotlivých typů inkluzí u PSP RS vztahovaná na délku nemoci



Vysvětlivky: Vynášeno medián hodnoty a range (min-max), BG znamená úroveň v oblasti basálních ganglií, ale samotná jádra basálních ganglií pitvána nebyla. Anterior horn - přední roh míšni

Na základě těchto výsledků pak můžeme předpokládat, že neuronální postižení počíná v kmeni a šíří se následně rostrálně do frontálního kortexu a kcaudálně do míchy. Naopak astrogliální postižení je výrazné v motorickém cortexu a striatu (ale capsula interna a pons jsou také postiženy). Oligodendroglie jsou nejvíce postiženy v motorické kůře, capsula interna a mesencephalu, ale jejich postižení je nejvyrovnanější ve všech doménách.

Tyto nálezy jsou v souladu s nedávnou histopatologickou studií Kovace et al. [Kovacs G.G. et al., 2020]. V této studii byla prokázána závislost jednotlivých fenotypů na postižení jednotlivých buněčných typů v různých částech centrální nervové soustavy. Na základě výsledků pak definovaly 6 stádií rozvoje PSP RS, která rozlišuje dominantní postižení pro různé typy buněk (neurony, astroglie, oligodendroglie), které je v dobré shodě s naším pozorování.

5.2. Příčinou atypické prezentace onemocnění může být souběžná (konkomitantní) neuropatologie

Příčina rozdílného šíření patologie může být podmíněna individuální vulnerabilitou jednotlivých oblastí mozku a míchy zapříčiněnou geneticky. Ta může být ovlivněna také i postižením další neurodegenerativní patologií.

Komorbidity dvou a více neurodegenerací mohou být relativně časté v závislosti na typu primárního onemocnění [Kovacs G. G., 2019], a tyto patologie se navzájem potencují. Byla zaznamenána synergie proteinopatií (například α -synukleinopatie spouští fibrilaci tau), nebo jinak podporovat agregaci druhého proteinu například ovlivněním mechanismus clearance [Matej R. et al., 2019]. Stejně tak byl ukázán různý výskyt komorbidní neuropatologie u různých forem AD. Nejednalo se ale o různé klinické fenotypy, ale o různé formy dle doby nástupu. (early onset Alzheimer disease s propuknutím před 65 rokem věku a late onset AD) [Spina S. et al. 2021].

Námi testovanou souvislost mezi fenotypickou variantou nemoci a komorbiditami dle našeho vědomí nikdo doposud netestoval. Není pravděpodobné, že by kopatologie zapříčiňovala určitý fenotyp nemoci. Jednak souběžná patologie nemusí být plně vyjádřena, tudíž se pravděpodobně rozvíjí po kratší dobu než patologie primární, a proto by mohla mít vliv na klinickou variantu až v pozdní fázi vývoje klinického obrazu. Zadrugé byly popsány jednotlivé fenotypické varianty onemocnění i bez komorbidní patologie, tedy se může jednat maximálně o přídatný mechanismus. Nicméně průkaz sdružení určit fenotypické varianty s

jistou komorbiditou/komorbiditami by mohl značit společný patologický mechanismus napří pro různé kmeny primárního patologického proteinu, a tak vést k lepšímu pochopení neurodegenerace.

5.3. Monogenně vázané neurodegenerace mohou mít atypické klinické prezentace

Klinická variabilita proteinopatií bývá vysvětlena různými formami patologického proteinu (protein strains) zapříčiňujícího onemocnění (různá agresivita a distribuce šíření proteinu). Právě polymorfismy *PRNP* pravděpodobně vedou k odlišným prionovým kmenům.

Také v případě P102L GSS byla klinická variabilita v minulosti vysvětlována různými polymorfismy kodonu 129 *PRNP*. Tato hypotéza ovšem nevedla k plnému vysvětlení variability klinické prezentace. Pro „GSS podobný CJN” byla prokázána existence proteázám odolného PrP o velikosti fragmentů 21 kDa rychle se šířícího pod obrazem spongioformní degenerace. Dále byl pokázán 8kDa dlouhý proteázám odolný PrP tvořící amyloidu podobné plaky přítomný u všech pacientů s GSS [Parchi P. *et al.*, 1998]. Anatomická distribuce patologie je pro “typické GSS” [Collins S. *et al.*, 2001], tak pro „GSS podobný CJN” [Majtényi C. *et al.*, 2000] popisována dominantně kortikálně a výjimečně talamicky a v bazálních gangliích; v obou případech byla také přítomna cerebelární atrofie. U pacientů s „GSS s areflexií a parestéziemi” byla naopak popsána infiltrace amyloidovými plaky PrP dominantně v zadních rožích míšních a mohlo by se tak jednat primárně o míšní formu [Yamada M. *et al.*, 1999]. Fenotyp označený jako „GSS s izolovanou demencí” byl námi popsán nově, a tedy doposud nebyl pro něj definován specifický kmen prionového proteinu. U pacientů z tohoto klastru byly popsány minimální spongioformní změny kortikálně i v mozečku [Ishizawa K. *et al.*, 2002].

Amyloidové plaky PrP byly detekovány v temporálních lalocích (hipokampus a gyrus dentatus), která může být vysvětlující pro dominující demenci. V jednom případě byla detekována výrazná depozita fosfotau v okolí plak PrP [Ishizawa K. *et al.*, 2002]. Takto definované fenotypy se nelišily v polymorfismu kodonu 129 ani 219 a neprokázali jsme ani vliv polymorfismů na nástup onemocnění, na rozdíl od Webbova pozorování dřívějšího nástup nemoci pro methionin/methionin homozygoty na kodonu 129 [Webb T.E.F. *et al.*, 2008]. Vzhledem k tomu, že u pacientů v metaanalýze nebyl uveden podrobný popis

distribuce depozit PrP, nemohli jsme potvrdit rozdílné postižení nervové tkáně pro jednotlivé fenotypy.

5.4. Atypická prezentace může být ovlivněna wild type alelou/nemutovanou variantou proteinu

Možná existence doposud neznámého polymorfismu, který by fenotypické spektrum GSS P102L vysvětlovala by měla zapříčinit dědičnost fenotypů v postižených rodinách. Rozdíl v době nástupu mezi sourozenci a náhodnými páry byl prokazatelně menší. Rozdíl byl i mezi dvojicí rodič-dítě a náhodným párem, ale nebyl signifikantní, stejně tak rozdíl mezi sourozenci a rodičem a dítětem. Tedy existuje dědičný faktor nejvíce vyjádřený mezi sourozenci, který má vliv na dobu propuknutí onemocnění. Musí se jednat o faktor, který sourozenci sdílejí častěji společně než s rodiči. Sourozenci sdílejí kromě alely pro mutovaný *PRNP* v 50 % i wild-type alelu od zdravé matky. Význam wild-type alely *PRNP* na šíření nemoci je i ve shodě s imunochemickou studií, která pozorovala, že asi 10% plak PrP je tvořeno wild-type alelou [Wadsworth J.D. *et al.*,].

6. Závěr

Klinická variabilita neurodegenerativních onemocnění je ne zcela pochopenou problematikou neurodegenerativních onemocnění komplikující diagnostiku a určení prognózy. V této práci jsme se pokusili na dvou modelových onemocněních (PSP a GSS) studovat faktory podílející se na rozvoji této variability. Ukázali jsme, že jednotlivé subtypy mají specifickou anatomickou distribuci. Rychlost šíření i lokalizace proteinopatie může být různá pro jednotlivé buněčné typy. Je proto možné, že bude nutné hledat nejen léčbu ovlivňující progresi neurodegenerace neuronální, ale zvláště i gliální.

Přestože byla opakovaně prokázána vyšší afinita pacientů s neurodegenerací k další komorbiditní neurodegenerativní patologii (občas až s plným rozvojem komorbidity), pravděpodobně nemění tato doprovodná neuropatologie fenotyp primárního onemocnění. Naopak jednotlivé varianty nemoci mohou být podmíněny geneticky danou predispozicí různých buněčných subpopulací k vyšší vulnerabilitě respektive rezistenci vůči rozvíjející se neurodegeneraci.

U monogenně podmíněných onemocnění můžeme pozorovat rozdíly ve fenotypu napříč generacemi, což umožňuje lépe zkoumat genetické vlivy na klinickou variabilitu. Monogenně dědičná onemocnění nemají nutně uniformní prezentaci, naopak mohou mít i několik odlišných fenotypů (jak jsme to dokázali pro GSS P102L). V minulosti předpokládaný vliv polymorfismů mutovaného proteinu není obecně platným mechanismem tvorby těchto subtypů. Naopak rozdíl v prezentaci napříč generacemi jedné rodiny poukazuje na možný vliv zdravé alely kauzálního proteinu na klinickou variabilitu nemoci. Tedy i nemutovaný protein může modulovat patologii způsobenou mutací postiženého proteinu.

7. Použitá literatura

- Ishizawa K., Komori T., Shimazu T. et al. Hyperphosphorylated tau deposition parallels prion protein burden in a case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome P102L mutation complicated with dementia. *Acta Neuropathologica*, 2002,104.342–50.
- Kovacs G. G., Lukic M. J., Irwin D. J. et al. Distribution patterns of tau pathology in progressive supranuclear palsy. *Acta neuropathologica*, 2020, 140, 99-119.
- Kulczycki J., Collinge J., Łojkowska W. et al. Report on the first Polish case of the Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome. *Folia Neuropathologica*,2001;39(1):27-31
- Ling H., De Silva R., Massey L. A., Courtney R. et al. Characteristics of progressive supranuclear palsy presenting with corticobasal syndrome: a cortical variant. *Neuropathology and applied neurobiology*, 2014, 40(2),149-163.
- Majtényi C., Brown P., Cervenáková L. et al. A three-sister sibship of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with a CJD phenotype. *Neurology*, 2000,54,2133-7.
- Matej R., Tesar A., Rusina R. Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias in comorbidity: a clinical and neuropathological overview. *Clinical biochemistry*, 2019, 73, 26-31.
- Misumi Y., Nishida Y., Araki S. A patient with Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS P102L) presenting high intensity lesions in the cerebral cortex on diffusion weighted MRI. *Clinical Neurology*. 2006,46(4),291-3.
- Parchi P., Chen S. G., Brown P. et al. Different patterns of truncated prion protein fragments correlate with distinct phenotypes in P102L Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(14), 8322-8327.
- Spina S., La Joie R., Petersen C. et al. Comorbid neuropathological diagnoses in early versus late-onset Alzheimer's disease. *Brain*, 2021
- Sugai F., Nakamori M., Nakatsuji Y. et al. A case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (P102L) accompanied by optic atrophy. *Clinical Neurology*,2000,40,926-8.
- Wadsworth J. D., Joiner S., Linehan J. M. et al. Phenotypic heterogeneity in inherited prion disease (P102L) is associated with differential propagation of protease-resistant wild-type and mutant prion protein. *Brain*, 2006, 129(Pt 6),1557-69.
- Webb T. E. F., Poulter M., Beck J. et al. Phenotypic heterogeneity and genetic modification of P102L inherited prion disease in an international series. *Brain*, 2008,131(10),2632-46.
- Williams D. R., Holton J. L., Strand C. et al Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain*, 2007, 130(6), 1566-1576
- Yamada M., Tomimitsu H., Yokota T. et al. Involvement of the spinal posterior horn in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (PrP P102L). *Neurology*, 1999,52,260–5

Seznam publikací doktoranda v tomto uspořádání:

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s IF:

Stejskalova Z., Rohan Z., Rusina R. et al. Pyramidal system involvement in progressive supranuclear palsy - a clinicopathological correlation. BMC neurology, 2019, 19(1), 1-8. – impact factor 2,35

Tesar A., Matej R., Kukul J. et al Clinical Variability in P102L Gerstmann–Sträussler–Scheinker Syndrome. Annals of neurology, 2019, 86(5), 643-652. – impact factor 9,496

Matej R., Tesar A., Rusina R. Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias in comorbidity: a clinical and neuropathological overview. Clinical biochemistry, 2019, 73, 26-31. – impact factor 2,584

b) bez IF: 0

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s IF:

Tesar A., Kopecky Jr V., Kocisova E. et al. Dynamics of lipid layers with/without bounded antimicrobial peptide halictine-1. Vibrational Spectroscopy, 2017, 93, 42-51. impact factor .1,861

Dall'Antonia I., Dusek P., Tesar A. et al. Olfactory dysfunction in a cohort of Czech patients with idiopathic REM sleep behaviour disorder. Ceska a slovenska neurologie a neurochirurgie, 2019, 82(4), 415-419. . – impact factor 0,355

b) bez IF: 0