

Iva Bilandžija Kuš\*  
Nikolina Blažević\*\*  
Ana Škaričić\*\*\*  
Ivana Križić\*\*\*\*  
Igor Prpić\*\*\*\*\*  
Ksenija Fumić\*\*\*\*\*

## LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA NEURONSKE CEROIDNE LIPOFUSCINOZE TIPA 2 (CLN2) IZ SUHE KAPI KRVI NA FILTARSKOM PAPIRU I LEUKOCITA

### Sažetak

Neuronska ceroidna lipofuscinoza tipa 2 (CLN2; Battenova bolest tipa 2; OMIM, #204500) prouzročena je nedostatnom aktivnošću lizosomske serin-proteaze tripeptidil-peptidaze (TPP1). Bolest je progresivnog tijeka, a klinički simptomi najčešće se pojavljuju između druge i četvrte godine života. Bez pravodobno postavljene dijagnoze i uvođenja odgovarajućeg liječenja dolazi do brzog propadanja motoričkih i kognitivnih funkcija. Laboratorijski selektivni probir započinje mjerenjem aktivnosti enzima TPP1 iz uzorka suhe kapi krvi na filtarskom papiru, a svaka snižena aktivnost mora se potvrditi mjerenjem u homogenatu leukocita. Aktivnost TPP1 mjeri se interno razvijenom (engl. *in house*) fluorimetrijskom metodom za koju je nužno u svakom laboratoriju uspostaviti referentne intervale. Naši referentni rasponi TPP1 iz uzoraka suhe kapi krvi jesu 58,8 ( $\pm$  12,8)  $\mu$ mol/isječku/sat, a iz leukocita 624,8 ( $\pm$  153,4) nmol/sat/mg proteina. Konačna je potvrda dijagnoze nalaz patogenih mutacija u genu TPP1/CLN2. Postavljanje rane kliničke sumnje na CLN2 predstavlja izazov u vremenu kada je dostupna rana laboratorijska dijagnostika kao i odgovarajući pristup liječenju.

- 
- \* Iva Bilandžija Kuš, mag. med. biokemije, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
\*\* Nikolina Blažević, mag. med. biokemije, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
\*\*\* Ana Škaričić, spec. med. biokemije i lab. medicine, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
\*\*\*\* Ivana Križić, mag. chem, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
\*\*\*\*\* prof. dr. sc. Igor Prpić, Klinički bolnički centar Rijeka, Klinika za pedijatriju, Zavod za dječju neurologiju i dječju psihijatriju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci  
\*\*\*\*\* prof. dr. sc. Ksenija Fumić, spec. med. biokemije, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Ključne riječi: neuronska ceroidna lipofuscinoza tipa 2 (CLN2), suha kap krvi, leukociti, referentni intervali

## 1. Uvod

Neuronske ceroidne lipofuscinoze (NCLs) podskupina su lizosomskih bolesti nakupljanja koje karakterizira progresivno neurodegenerativno propadanje prouzročeno nakupljanjem ceroidnog lipofuscina u raznim tkivima, a posebice u mozgu. Za tu se skupinu bolesti često koristi i povijesni naziv Battenova bolest prema neuropatologu Fredericku Battenu koji je znatno pridonio otkriću kasnih infantilnih oblika NCLs-a (Haltia i Goebel, 2013).

Prije nego što su biokemijske metode postale dostupne, dijagnostika i podjela NCLs-a oslanjala se na nalaz unutarstaničnih autofluorescentnih pigmenata elektronskom mikroskopijom. Opisivala se morfologija nakupljenog supstrata te se uz kliničke simptome i dob pacijenta bolest svrstavala u tri osnovne podskupine: infantilni, kasni infantilni i juvenilni oblik (Mink, 2013). Metode molekularne biotehnologije omogućile su dosad otkrivanje 14 gena povezanih s raznim kliničkim fenotipovima i potvrdile izrazitu genetičku heterogenost u toj skupini nasljednih metaboličkih poremećaja. Osim toga, pokazalo se da iste mutacije u obitelji mogu dovesti do znatne fenotipske varijabilnosti. Sve to komplicira klasifikaciju NCLs-a (Nita, 2016). Klasični kasni infantilni oblik NCL-a (Battenova bolest tipa 2; Janský–Bielschowsky; CLN2; OMIM 204500) prouzročen je mutacijama u genu CLN2 koje dovode do nedostatne aktivnosti tripeptidil-peptidaze (TPP1; EC 3.4.14.9), lizosomskog enzima serin-proteaze. Patofiziološka pozadina bolesti još se uvijek istražuje. Bolest je progresivnog tijeka, a prvi se klinički simptomi najčešće pojavljuju između druge i četvrte godine života. Simptomi su u većini slučajeva nespecifični: usporen psihomotorni razvoj, epileptički napadi koji često ne odgovaraju na terapiju, s ataksijom ili bez nje, uz česte probleme s razvojem govora. Postupno se razvija sljepoća zbog atrofije mrežnice. Djeca gube motoričke funkcije i mentalne sposobnosti te se javljaju poteškoće s gutanjem. U konačnici bolest dovodi do potpune sljepoće, nepokretnosti i bolesnici ostaju bez sposobnosti komunikacije (Steinfeld, 2002). Na bolest se može posumnjati i temeljem nalaza magnetske rezonancije mozga koji upućuje na cerebelarnu atrofiju (Petersen, 1996). Zbog tako progresivnoga i podmuklog tijeka bolesti od iznimne je važnosti rano postaviti kliničku sumnju te uz specijalističku obradu započeti i odgovarajuću laboratorijsku dijagnostiku (Fietz, 2016). Pravodobna dijagnoza omogućuje optimiranje kliničke skrbi i poboljšava klinički ishod (Williams, 2017). S obzirom na to da je nedavno dostupno enzimsko nadomjesno liječenje (intratekalna infuzija cerliponase alfa Brineura™) koje može znatno usporiti tijek bolesti i da je u razvoju genska terapija, pravodobna dijagnoza još više dobiva na značenju (Schulz, 2018; Katz, 2015).

CLN2 je vrlo rijetka bolest. Procijenjena pojavnost kreće se od 1 do 8 slučajeva u 100,000 živorođene djece, no vrlo je vjerojatno da je bolest nedovoljno prepoznata (Simpson, 2009). Nažalost, u većini slučajeva dijagnoza se prekasno postavlja zbog nespecifičnih kliničkih simptoma i slabe dostupnosti dijagnostike. Nedvojbeno je da stalna izobrazba i podizanje svijesti o toj skupini nasljednih metaboličkih poremećaja povećavaju uspješnost selektivnog probira koji započinje kliničkom sumnjom. Nakon toga uputno je slijediti postupnik koji uključuje mjerenje aktivnosti lizosomskog enzima TPP1 iz uzorka suhe kapi krvi na filtarskom papiru, a svaka izmjerena snižena aktivnost enzima mora se potvrditi mjerenjem iz homogenata izdvojenih leukocita (Fietz, 2016). Konačna potvrda dijagnoze jest nalaz dviju patogenih mutacija u transpoziciji u genu TPP1/CLN2 ([www.ucl.ac.uk/ncl/mutation.shtml](http://www.ucl.ac.uk/ncl/mutation.shtml)).

U Hrvatskoj je do sada potvrđena dijagnoza CLN2 u četiri djeteta u dobi od dvije do pet godina. U posljednjem slučaju enzimska dijagnoza u leukocitima postavljena je u Hrvatskoj, a potvrda na razini gena u inozemnom laboratoriju Archimed Life Science GmbH u Beču. S obzirom na važnost mjerenja aktivnosti TPP1 u pravodobnom postavljanju dijagnoze CLN2, bilo je nužno uspostaviti referentne raspone za fluorimetrijsku interno razvijenu (engl. *in-house*) metodu tog enzima u uzorcima suhe kapi krvi na filtarskom papiru i u homogenatu leukocita.

## 2. Materijal i metode

Za uspostavu referentnog raspona TPP1 korišteno je 39 uzoraka suhih kapi krvi preostalih nakon mjerenja aktivnosti drugih lizosomskih enzima (uz priložen informirani pristanak). Bilo je 15 muških i 19 ženskih ispitanika u dobi od 1 do 29 godina. Uzorci suhih kapi krvi pristigli su poštom iz drugih bolnica, a uzorkovani su prema preporučenom protokolu. Puna je krv nakapana na standardizirani Whatman 903<sup>TM</sup> filtarski papir na koji su iscrtana četiri kruga. Svaki krug predviđen je za jednu kap krvi koja, ovisno o hematokritu, odgovara volumenu od oko 50  $\mu$ L krvi. Tako nakapane kartice ostavljene su da se potpuno osuše (najmanje tri sata na sobnoj temperaturi bez izravnog utjecaja svjetla i topline) i poslane u laboratorij u pripremljenim omotnicama.

Leukociti su izdvojeni iz 60 uzoraka krvi vađene na antikoagulans EDTA, a preostali nakon obrade u sklopu sistematskih pregleda (također uz potpisan informirani pristanak). 21 muški i 12 ženskih ispitanika bili su u dobi od 5 do 29 godina. Za pozitivnu kontrolu korišteni su uzorci prve bolesnice dijagnosticirane u našem laboratoriju (trogodišnja djevojčica s potvrđenim mutacijama: c.509-1G>C; c.614T>A). Također su izmjerene aktivnosti kod roditelja i brata bolesnice.

Aktivnost TPP1 u uzorcima suhe kapi krvi mjerena je modificiranom metodom prema (Itagaki, 2018). U postupak su uzimani uzorci koji nisu bili stariji od

jednog mjeseca (vrijeme od uzorkovanja do analize). Za svakog su ispitanika četiri isječka suhe kapi krvi (3 mm) raspoređena u jažice crne mikrotitratske pločice i na njih je dodana puferna otopina (40 mM etilendiaminotetraoctena kiselina/ 50 mM acetatni pufer, pH 4.0/Triton-X100). Na tri je isječka dodan supstrat u 0,1 M acetatnom puferu, pH 4,0 (500  $\mu$ M Alanin-Alanin-Fenilalanin-7-amido-4-metil Kumarin, Sigma A-3401). Pločica je prekrivena folijom i uzorci su inkubirani na 37 °C 20 sati na tresalici. Reakcija je prekinuta otopinom za prekidanje reakcije (0,1 M natrij kloroacetat / 30 mM acetatni pufer, pH 4,3/1mM inhibitor Alanin-Alanin-Fenilalanin-klorometil keton, Sigma A-6892), a na isječak slijepe probe dodana je još i otopina supstrata. Fluorescencija je očitana uz ekscitaciju 360 nm i emisiju 450 nm (spektrofluorimetar Varian Cary Eclipse). Aktivnosti enzima (nmol oslobođenog supstrata) izračunate su prema pripremljenoj standardnoj krivulji 7-amino-4-metil Kumarina (Sigma, A-9891).

Za mjerenje aktivnosti u leukocitima u postupak je uzimano 10  $\mu$ L homogenata leukocita (ukupni proteini 1,5 g/L), a vrijeme inkubacije bilo je 1 h na 37 °C. Svaki uzorak analiziran je u duplikatu uz slijepu probu. Za provjeru kvalitete uzoraka mjerena je aktivnost kontrolnog enzima  $\beta$ -galaktozidaze. Korištena je fluorimetrijska metoda validirana u našem laboratoriju, a modificirana prema fluorimetrijskoj metodi (Civallero, 2006).

### 3. Rezultati

Rezultati enzimske aktivnosti za homozigotne pacijente, heterozigotne nositelje i zdrave kontrolne ispitanike prikazani su u tablici 1 i slici 1 za suhu kap krvi te u tablici 2 i slici 2 za leukocite. Aktivnosti TPP1 u zdravim kontrolnim ispitanicima ( $n = 39$ ) iznosile su 46,0 – 71,6  $\mu$ mol/isječku/sat, sa srednjom vrijednosti od 58,8  $\mu$ mol/isječku/sat. Analiza nije pokazala nikakvu aktivnost u bolesnika s CLN2. Dva su heterozigotna nositelja (roditelji jednog pacijenta) imali aktivnosti TPP1 od 22,2 do 23,5  $\mu$ mol/isječku/sat i one su bile za ~ 50 % ispod srednje kontrolne vrijednosti.

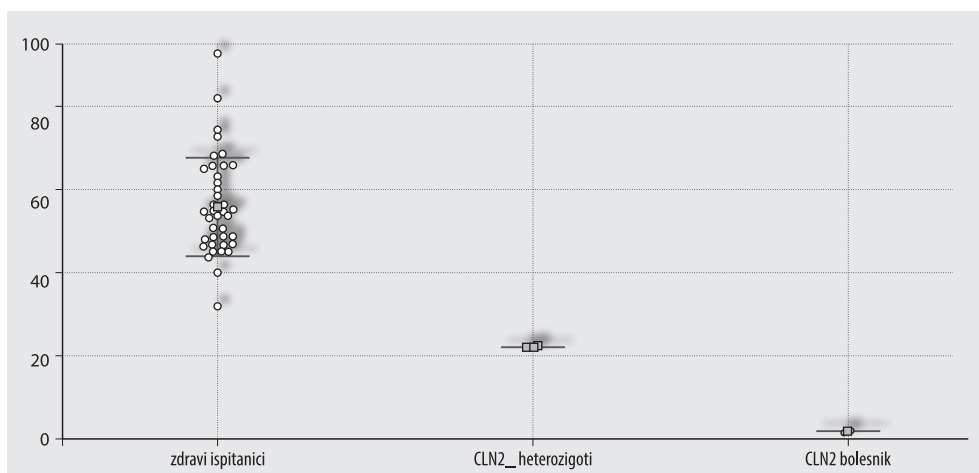
**Tablica 1.** TPP1 aktivnost enzima u suhoj kapi krvi ( $\mu$ mol/isječku/sat) u zdravim ispitanika, NCL2 heterozigota i potvrđenog NCL2 bolesnika

	Zdravi ispitanici	NCL2 heterozigoti (roditelji bolesnika)	NCL2 bolesnik ( $n=1$ )
Mean $\pm$ SD	58,8 $\pm$ 12,8	23,5	1,5
Minimum	33,6		
Maksimum	97,6		

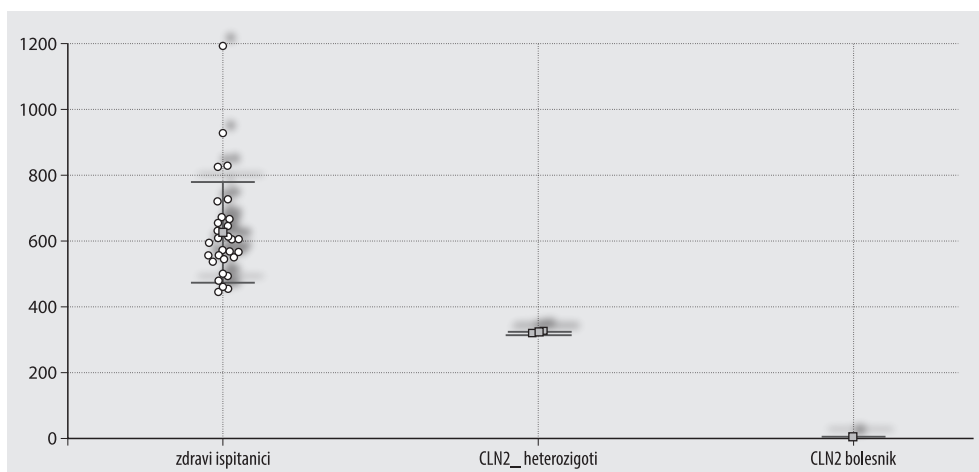
**Tablica 2.** TPP1 aktivnost enzima u leukocitima (nmol/sat/mg proteina) u zdravih ispitanika, NCL2 heterozigota i potvrđenog NCL2 bolesnika

	Zdravi ispitanici	NCL2 heterozigoti (roditelji bolesnika)	NCL2 bolesnik (n=1)
Mean ± SD	624,8 (± 153,4)	319,5	4,1
Minimum	442,5		
Maksimum	1192,5		

**Slika 1.** TPP1 aktivnost enzima u suhoj kapi krvi (μmol/isječku/sat) u zdravih ispitanika, NCL2 heterozigota i potvrđenog NCL2 bolesnika



**Slika 2.** TPP1 aktivnost enzima u leukocitima (nmol/sat/mg proteina) u zdravih ispitanika, NCL2 heterozigota i potvrđenog NCL2 bolesnika



## 4. Rasprava

Klasični oblik CLN2 ima predvidljiv, progresivan klinički tijek s brzim smrtnim ishodom (Worgall, 2007). Zbog prirode bolesti trebalo bi odmah nakon pojave prvih nespecifičnih kliničkih simptoma započeti sa selektivnim laboratorijskim probirom koji uključuje i mjerenje TPP1 za isključenje CLN2. Mjerenje aktivnosti lizosomskih enzima povezanih s NCLs dostupno je u ograničenom broju inozemnih centara. Laboratoriji u kojima se mjeri aktivnost TPP1 (suha kap krvi, leukociti, kultivirani fibroblasti) koriste se interno razvijenim fluorimetrijskim metodama. Za sada ne postoje komercijalni kompleti reagensa, a nije dostupna niti vanjska procjena kvalitete. Sve ovo dodatno komplicira usporedbu rezultata između pojedinih laboratorija. U posljednje je vrijeme razvijena metoda za mjerenje aktivnosti TPP1 tandemsom spektrometrijom masa (Liu i dr. 2017). TPP1 je lizosomska hidrolaza čija je uloga odvajanje tripeptida od aminoterminalnih peptida i lizosomske pepstatin-neosjetljive karboksi-poroteinaze (Markham, 2017). Neutralna izoforma enzima prisutna je u serumu (optimum aktivnosti pri pH 6,5) i nije snižena kod bolesnika s CLN2. Neutralna i kisela izoforma enzima prisutne su u suhoj kapi krvi, leukocitima, limfocitima i fibroblastima (optimum aktivnosti pri pH oko 4), a mutacije povezane s CLN2 prisutne su isključivo u kiseloj izoformi enzima. Spol i dob ne utječu na aktivnost enzima (Itagaki, 2018). S obzirom na to da je aktivnost enzima TPP1 u uzorcima suhe kapi krvi na sobnoj temperaturi očuvana nekoliko tjedana, ovako prikupljeni uzorci imaju niz prednosti: za uzorke suhe kapi krvi potrebne su vrlo male količine krvi, lagano se njima rukuje, a mogu se dostaviti u laboratorij na temperaturi okoline redovitom poštom uz malen rizik smanjivanja enzimske aktivnosti. Zanimljivo je da je aktivnost TPP1 u uzorcima suhih kapi krvi dodatno očuvana u odnosu na uzorke krvi s EDTA zbog činjenice da u suhom stanju nije moguća razgradnja enzima proteazama kao niti promjena (Lukacs, 2003). Ta činjenica pokazuje poboljšanu postojanost uzoraka suhe kapi krvi u usporedbi s krvi s EDTA jer se u suhom stanju ne događa ni razgradnja enzima putem proteaza ni promjene u slaganju proteina.

## 5. Zaključak

Nedvojbeno je da je rana dijagnostika NCL2 ključna u daljnjem tijeku skrbi o bolesniku. Uz pravodobno postavljenu kliničku sumnju, mjerenje aktivnosti TPP1 interno razvijenom fluorimetrijskom metodom iz uzorka suhe kapi krvi pokazalo se kao pouzdan i jednostavan način selektivnog probira. Metoda omogućuje jasno razlikovanje zdravih od bolesnih, kao i postavljanje sumnje na heterozigotnost. Međutim, svaka snižena aktivnost mora se potvrditi mjerenjem u homogenatu leukocita i analizom DNK-a gena TPP1. Zbog svega bilo bi uputno mjerenje aktivnosti TPP1 kao i

enzima palmitoil-protein tioesteraze odgovornog za rani oblik neuronske ceroidne lipofuscinoze uključiti u skup pretraga pri kliničkoj sumnji na moguće neurometaboličke poremećaje.

## Literatura

1. Civallero, C. et al. 2006. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clinica Chimica Acta*, 372: 98–102.
2. Fietz, M. et al. 2016. Diagnosi od neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 (CLN2 disease): Expert recommendations for early detection and laboratory diagnosis. *Mole Gen Metab*, 119: 160–167.
3. Haltia, H. i Goebel, H. 2013. The neuronal ceroid-lipofuscinoses: A historical introduction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832: 1795–1800.
4. Katz, M. L. et al. 2015. AAV gene transfer delays disease onset in a TPP1-deficient canine model of the late infantile form of Batten disease. *Science Translational Medicine*, 11, 7 (313): 180–201.
5. Liu, Y. et al. 2017. Multiplex tandem mass spectrometry enzymatic activity assay for newborn screening of the mucopolysaccharidoses and type 2 neuronal ceroid lipofuscinosis. *Clinical Chemistry*, 63 (6): 1118–1126.
6. Lukacs, Z. 2003. Rapid and simple assay for the determination of tripeptidyl peptidase and palmitoyl protein thioesterase activities in dried blood spots. *Clinical Chemistry*, 49 (3): 509–511.
7. Markham, A. 2017. Cerliponase alfa: first global approval. *Drugs*, 77 (11): 1247–1249.
8. Mink, J. W. et al. 2013. Classification and natural history of the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Journal of Child Neurology*, 28 (9): 1101–1105.
9. Nita, D. A. et al. 2016. Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Epileptic Disord*, 1, 18 (S2): 73–88.
10. Petersen, B. et al. 1996. Neuroradiological findings in classical late infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Pediatric Neurology*, 5: 344–347.
11. Schulz, A. et al. 2018. CLN Study Group, Study of Intraventricular Cerliponase Alfa for CLN2 Disease. *The New England Journal of Medicine*, 378 (20): 1898–1907.
12. Simpson, N. A. et al. 2014. Screening, diagnosis and epidemiology of Batten disease. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 2: 903–910.
13. Steinfeld, R. et al. 2002. Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: quantitative description of the clinical course in patients with CLN2 mutations. *American Journal of Medical Genetics*, 112: 347–354.
14. Williams, R. E. et al. 2017. Management strategies for CLN2 disease. *Pediatric Neurology*, 69: 102–12.
15. Worgall, S. et al. 2007. Neurological deterioration in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurology*, 69: 521–535.



## **Laboratory diagnostics of neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 (CLN2) from a dry blood spot on filter paper and leukocytes**

### **Abstract**

Neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 (CLN2; Batten disease type 2; OMIM, #204500) is caused by insufficient activity of lysosomal serine protease tripeptidyl peptidase 1 (TPP1). The disease is characterized by progressive course and clinical symptoms most often occur between the second and the fourth year of life. Without timely diagnosis and introduction of adequate treatment, rapid degradation of motoric and cognitive functions ensues. Laboratory selective screening begins with determination of enzyme TPP1 activity from a dry blood spot on filter paper, and every reduced activity must be confirmed by measurement in leukocyte homogenate. TPP1 activity is determined by using an in-house fluorimetric method that entails establishment of reference ranges in each laboratory. Our reference ranges for TPP1 from dry blood spot samples are 58,8 ( $\pm$  12,8)  $\mu$ mol/punch/hour, and from leukocytes 624,8 ( $\pm$  153,4) nmol/hour/mg proteins.

The final confirmation of the diagnosis is finding pathogenic mutations in the TPP1/CLN2 gene. Early clinical suspicion of CLN2 is a challenge at the present time when early laboratory diagnostics and adequate therapy approach are accessible.

Keywords: neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 (CLN2), dry blood spot, leukocytes, reference ranges