

# Fluorimetrijska metoda za mjerenje aktivnosti tripeptidil peptidaze 1 u homogenatu leukocita

---

**Blažević, Nikolina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:125241>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Nikolina Blažević**

**Fluorimetrijska metoda za mjerenje aktivnosti  
tripeptidil peptidaze 1 u homogenatu leukocita**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Laboratoriju za nasljedne metaboličke bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ksenije Fumić.

*Na samom kraju svog studentskog putovanja željela bih se zahvaliti svima koji su me vjerno pratili i podržavali.*

*Posebnu zahvalu upućujem svojoj mentorici koja mi je uvelike pomogla pri izvedbi i pisanju diplomskog rada.*

*Najviše bih zahvalila svojim roditeljima i bratu koji su najveći dio ovog tereta nosili zajedno sa mnom, te svim ostalim članovima obitelji koji su bili tu za motivaciju, podršku i utjehu.*

*I na kraju zahvaljujem svojim prijateljima i kolegama što su me trpili, neizmjereno cijenim što ste sa mnom dijelili i sreću i tugu.*

# KRATICE

TPP1 = tripeptidil peptidaza 1

NCL = neuronalna ceroidna lipofuscinoza

CLN2 = neuronalna ceroidna lipofuscinoza tipa 2

LSD = lizosomske bolesi nakupljanja

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Rijetke bolesti.....	1
1.2. Nasljedne metaboličke bolesti.....	1
1.3. Lizosomske bolesti nakupljanja.....	4
1.4. Neuronalne ceroidne lipofuscinoze.....	5
1.5. Klasični infantilni oblik NCL.....	7
1.5.1. Dijagnostika klasičnog infantilnog oblika NCL – Battenove bolesti.....	8
1.5.2. Liječenje klasičnog infantilnog oblika NCL – Battenove bolesti.....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Ispitanici.....	14
3.2. Uzorci.....	14
3.3. Načelo enzimske metode.....	15
3.4. Načelo metode spektrofluorimetrije.....	15
3.4.1. Spektrofluorimetar.....	16
3.5. Instrumenti.....	17
3.6. Kemikalije i reagensi.....	18
3.7. Priprema reagenasa.....	19
3.7.1. Otopina za lizu eritrocita.....	19
3.7.2. Triton X-100 za homogenizaciju.....	19
3.7.3. Radni reagens A za uzorke koji sadrže Triton X-100.....	19
3.7.4. Protein standard II.....	19
3.7.5. 0,1M acetatni pufer pH 4,0.....	19
3.7.6. 30 mM acetatni pufer pH 4,3.....	20
3.7.7. Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilkumarin (500 $\mu$ M) – supstrat.....	20
3.7.8. 7-amino-4-metilkumarin – standard.....	20
3.7.9. Ala-Ala-Phe-klorometil keton (1mM) – inhibitor.....	20
3.7.10. Natrijev kloroacetat – reagens za prekidanje reakcije.....	21
3.7.11. AAP-CMK (0,1 $\mu$ M) u natrijevom kloroacetatu.....	21
3.7.12. 50 mM acetatni pufer pH 4,0 koji sadržava 0,1% Triton X-100.....	21

3.7.13. 40 mM EDTA u 50 mM acetata pH 4.0 koji sadržava 0,1% Triton X-100.....	21
3.7.14. 0,1 M citratni pufer, pH 4,4.....	21
3.7.15. 2 mmol/L 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glukozaminid – supstrat za $\beta$ - heksozaminidazu A i B.....	22
3.7.16. 0,2 mol/L glicinski pufer, pH 10,4.....	22
3.7.17. 0,5 mmol/L 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glukozaminid – supstrat za $\beta$ - heksozaminidazu A i B.....	22
3.7.18. Standardna otopina metilumbeliferona (4-MUF).....	22
3.8. Postupak.....	22
3.8.1. Izolacija leukocita iz pune krvi.....	22
3.8.2. Mjerenje proteina u uzorcima izoliranih leukocita.....	23
3.8.3. Priprema reagenasa neposredno prije rada.....	25
3.8.4. Postupak.....	26
3.8.5. Uvjeti čitanja na fluorimetru.....	26
3.8.6. Fluorimetrijsko čitanje rezultata.....	27
3.8.7. Račun.....	27
3.8.8. Mjerenje aktivnosti $\beta$ -heksozaminidaze A i B u leukocitima – kontrolna reakcija..	27
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	29
4.1. Rezultati mjerenja.....	29
4.2. Rasprava.....	33
5. ZAKLJUČAK.....	34
6. LITERATURA.....	35
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	37

# 1. UVOD

## 1.1. Rijetke bolesti

Rijetke bolesti su bolesti koje zahvaćaju mali broj ljudi u usporedbi s generalnom populacijom i različito se definiraju ovisno o području i učestalosti (<https://www.orpha.net/>). One zahvaćaju ograničeni broj ljudi, ali broj poremećaja koji odgovara definiciji vrlo je velik (>5000 prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (Schieppati i sur., 2008.). Od rijetkih bolesti u Europi obolijeva otprilike 1 na 2000 osoba. Bolest može biti rijetka u jednoj regiji, ali česta u drugoj. Primjerice talasemije, anemije genetskog podrijetla, koje su rijetke u sjevernoj Europi, a česte u mediteranskoj regiji.

Dok su gotovo sve genetske bolesti rijetke bolesti, nisu sve rijetke bolesti genetske bolesti. Postoje i vrlo rijetki oblici zaraznih bolesti, kao što su autoimune bolesti i rijetki karcinomi. Do danas je uzrok mnogih rijetkih bolesti nepoznat.

Rijetke bolesti su ozbiljne, kronične i jako progresivne bolesti. Za mnoge rijetke bolesti znakovi se mogu opaziti već pri rođenju ili u djetinjstvu, kao što je slučaj s proksimalnom spinalnom mišićnom atrofijom, neurofibromatozom, osteogenesis imperfecta, hondrodisplazijom ili Rettovim sindromom. Međutim, više od 50% rijetkih bolesti se pojavljuje tijekom odrasle dobi, kao što su Huntingtonova, Crohnova i sl.

Ove bolesti su važan javnozdravstveni problem i izazov za medicinsku zajednicu. Nazivaju ih i „zdravstvena siročad“ zato jer su bile zanemarene dugi niz godina. Obolijevanje od ovakvih bolesti dovodi do smanjene kvalitete života i utječe na osobni potencijal svake osobe pri obrazovanju, zapošljavanju, društvenom životu i ostalim područjima. Jedan primjer su urođene greške metabolizma, od kojih je većina rijetka (učestalost između 1:1400 i 1:5000 živorođenih) (Schieppati i sur., 2008.).

## 1.2. Nasljedne metaboličke bolesti

Nasljedne metaboličke bolesti poznate su kao pojam u medicini od 1909. godine, kada je Sir Archibald Garrod opisao kliničku sliku alkaptonurije, albinizma, pentozurije i cistinurije. Na temelju proučavanja rodoslovlja obitelji i poštovanja Mendelovih pravila

nasljeđivanja donio je zaključak da su te bolesti prirodene, te da nisu uvjetovane vanjskim čimbenicima. Do danas je poznato više od 6000 monogenских nasljednih bolesti od kojih je više od 500 nasljednih metaboličkih poremećaja. Učestalost pojedinih nasljednih metaboličkih bolesti u cjelokupnoj je populaciji razmjerno niska, ali kao skupina čini važan medicinski problem. U nekim populacijama neke su od njih izuzetno česte. Tako Gaucherova bolest u Aškenazi Židova ima prosječnu učestalost 1:500, dok je u ostaloj populaciji učestalost 1:60000 živorođene djece.

Nasljedne metaboličke bolesti pripadaju skupini monogenских nasljednih bolesti. Uzrokovane su mutacijama jednoga gena i nasljeđuju se uglavnom prema Mendelovim pravilima nasljeđivanja. Od ukupno nekoliko tisuća monogenских nasljednih bolesti, patogeneza tek 10% njih se može opisati metaboličkim, odnosno biokemijskim poremećajima, pa ih zato zovemo metaboličkim bolestima. Broj otkrivenih i razjašnjenih nasljednih metaboličkih bolesti stalno raste, posebno zato jer se razvojem laboratorijskih metoda u sve većem broju monogenских nasljednih bolesti otkriva metabolički poremećaj na staničnoj ili nekoj dubljoj razini (Fumić i Bilić, 2008.).

Mutacije gena rezultiraju promjenom strukture ili nedovoljnom sintezom genskog produkta; proteina što ga kodira mutirani gen. Zbog neadekvatne funkcije tog proteina nastaju biokemijski poremećaji koji konačno dovode do razvoja određene kliničke slike. Kako u ljudskom tijelu postoji izuzetno velik broj proteina koji na različite načine sudjeluju u metaboličkim procesima, razumljivo je da su promjene njihove strukture i funkcije uzrok izuzetne brojnosti i raznovrsnosti nasljednih metaboličkih bolesti (Barić, 2016.).

Nasljedne metaboličke bolesti se dugi niz godina nisu mogle učinkovito liječiti. No, tijekom proteklog stoljeća postupno se mijenjalo i to shvaćanje. Počelo je s uvođenjem dijete s malo fenilalanina u liječenju fenilketonurije (1953., Horst Bickel), a zatim se taj princip smanjenog unosa toksičnog spoja uspješno uveo i u liječenje galaktozemije, klasične homocistinurije, nekih aminoacidopatija, organskih acidurija te poremećaja ciklusa ureje. Prije više od 20 godina presađba koštane srži se pokazala učinkovitom kod nekih lizosomskih bolesti nakupljanja. Posljednjih godina transplantacija hematopoeznih matičnih stanica, transplantacija jetre, enzimska nadomjesna terapija, nove generacije biotehnoški modificiranih lijekova, terapija „chaperonima“, genska terapija i sl. daju nove nade bolesnicima s nasljednim metaboličkim bolestima.

Spoznaje o dostupnosti terapije za sve veći broj poremećaja iz ove skupine bolesti, uvjetuju potrebu za njihovim ranim kliničkim prepoznavanjem i odgovarajućom laboratorijskom dijagnostikom. Budući da je uglavnom riječ o rijetkim bolestima s kojima



većina liječnika i laboratorijskih djelatnika ima ograničeno iskustvo, izuzetno je važna njihova dobra suradnja. U rijetkim slučajevima liječnik može već iz anamneze i kliničke slike naslutiti dijagnozu. No, u najvećem broju nasljednih metaboličkih bolesti klinička slika nije dovoljna jer su simptomi i znakovi nespecifični.

Prema načinu organizacije i pristupu laboratorijskoj dijagnostici razlikuju se sustavno i selektivno traganje za nasljednim metaboličkim poremećajima. Sustavno traganje (engl. screening, novorođenački probir) podrazumijeva ispitivanje cjelokupne populacije novorođenčadi neke zemlje, odnosno regije, na nasljedne metaboličke bolesti koje je moguće liječiti, a klinički se ne mogu dovoljno rano prepoznati.

Selektivno traganje za nasljednim metaboličkim poremećajima podrazumijeva laboratorijsku obradu simptomatskih bolesnika. Dobar putokaz za liječnika su karakteristični elementi anamneze, statusa i osnovnih laboratorijskih pretraga koji upućuju na postojanje nasljednoga metaboličkog poremećaja. Poznavanje tih čimbenika nužno je i u metaboličkom laboratoriju, jer omogućuje racionalni odabir specifičnih pretraga, kao i pravilno tumačenje dobivenih nalaza. Zbog rastućeg broja nasljednih metaboličkih bolesti, kao i nužnih metoda za njihovo otkrivanje i potvrdu, metabolički laboratoriji često nisu u mogućnosti provoditi sve analize prijeko potrebne za konačnu potvrdu dijagnoze. Zato je uobičajeno u nekoj fazi dijagnostičkog postupka slati odgovarajući biološki materijal u laboratorije koji su se usko specijalizirali za pojedine analize.

U osnovne metaboličke pretrage ubrajaju se acido-bazični status, glukoza, amonijak, laktat i metilketoni. Te pretrage upućuju na postojanje metaboličkog poremećaja, no ne otkrivaju i njihov uzrok. Za kliničara je izuzetno važno da što hitnije dobije nalaze ovih pretraga kako bi odgovarajuće zbrinuo bolesnika do dijagnostike uzroka metaboličke krize. Određene specifične metaboličke pretrage (orijentacijski testovi u urinu, aminokiseline, organske kiseline i karnitin) također pomažu u otkrivanju uzroka metaboličke krize. No, u velikome broju slučajeva na putu do dijagnoze, potrebno je napraviti i čitav niz drugih specifičnih pretraga (biotinidaza, hitotriozidaza, galaktoza, glicerol, glikogen, glukozaminoglikani...). Metode za njihovo provođenje najčešće su dugotrajne, zahtijevaju posebnu opremu i stručnu osposobljenost, te se provode u samo određenim dijagnostičkim centrima (Fumić i Bilić, 2008.).

### 1.3. Lizosomske bolesti nakupljanja

Lizosomi su organele u kojima se u kiselom okruženju obavlja najveći dio razgradnje složenih molekula. Za te procese odgovorni su hidolitički enzimi (glikozidaze, sulfataze, proteaze i elastaze) uz odgovarajuće aktivacijske i transportne proteine. Enzimi postupno razgrađuju supstrate do produkata koji su u mogućnosti proći kroz lizosomsku membranu (pasivno difuzijom ili pomoću specifičnih transportera) te se u citoplazmi uključiti u razne metaboličke puteve. Kod lizosomskih bolesti nakupljanja nedostaje ili je značajno snižena aktivnost nekog od tih proteina, što za posljedicu ima nakupljanje nerazgrađenog supstrata u organelu, oštećenje stanice i okolnog tkiva.

Do sada je poznato više od 45 lizosomskih bolesti nakupljanja čija se zajednička učestalost procjenjuje na oko jedan slučaj u 7500 živorođene djece. Neke od njih imaju izrazito visoku učestalost u pojedinim etničkim skupinama (Gaucherova bolest 1 na 855; Tay-Sachsova bolest 1 na 3900 živorođene djece u Aškenazi Židova). Njihova uobičajena podjela uglavnom se temelji na strukturi nakupljenog supstrata: mukopolisaharidoze, sfingolipidoze, lipidoze, oligosaharidoze, mukolipidoze, glikogenoze, neuronalne ceroidne lipofuscinoze i poremećaji prijenosa.

Sve lizosomske bolesti nakupljanja karakterizira progresivan klinički tijek. Brzina progresije razlikuje se ovisno o bolesti i individualnim čimbenicima svakog bolesnika. Klinički simptomi mogu se očitovati kao somatske promjene (hepatosplenomegalija, promjene na kostima, zglobovima, očima, facijalna dismorfija, respiratorni i srčani problemi i dr.) i/ili neurološke promjene (mentalne retardacije, epilepsije i dr.). Klinička slika lizosomskih bolesti nakupljanja izrazito je heterogena i može se pojaviti u svakom životnom razdoblju, a svaka od ovih bolesti klinički može varirati od sasvim blagih oblika do teške kliničke slike. Pri tome uz vrstu mutacije odgovarajućeg gena i različitih utjecaja iz okoliša, najvažniju ulogu ima preostala katalitička aktivnost zahvaćenog enzima.

Za laboratorijsku dijagnostiku potrebno je poslati odgovarajuće biološke uzorke u laboratorij koji se bavi dijagnostikom nasljednih metaboličkih bolesti. U početku laboratorijske dijagnostike od pomoći mogu biti nalazi dobiveni u biokemijskom, hematološkom i histološkom laboratoriju. Mjerenje većine katalitičkih aktivnosti lizosomskih enzima moguće je uz visokospecifične 4- metilumbeliferonske supstrate. Homogenat leukocita je najčešći biološki materijal koji se rabi za provođenje testova potvrde.

Liječenje lizosomskih bolesti nakupljanja dugo je vremena bilo isključivo

simptomatsko. Kauzalni pristup terapiji lizosomskih bolesti nakupljanja može se temeljiti na dva osnovna principa: zamjeni mutacijom izmijenjenog proteina katalitički aktivnim enzimom (transplantacija koštane srži, enzimska nadomjesna terapija, terapija genima) ili na smanjenju sinteze supstrata u lizosomima (niskomolekularni inhibitori sinteze glukoziltransferaza). Iako enzimska zamjenska terapija značajno poboljšava kvalitetu života liječenih bolesnika, nije idealan oblik liječenja. Uz visoku cijenu pripravka, isključivo intravensko davanje (do četiri puta mjesečno), te mogućnost stvaranja protutijela i umjereno djelovanje na kosti, osnovni nedostatak je nemogućnost prolaza tako priređenog enzima kroz krvno moždanu barijeru. Zato se takav oblik terapije preporuča u bolesnika koji još nemaju neuroloških simptoma (Fumić i sur., 2004.).

#### **1.4. Neuronalne ceroidne lipofuscinoze**

Neuronalne ceroidne lipofuscinoze (NCL) su nasljedne, progresivno degenerativne bolesti koje prvenstveno utječu na mozak i mrežnicu. One se smatraju lizosomalnim poremećajima skladištenja (LSD), zbog njihovog karakterističnog nakupljanja autofluorescentnih ceroidnih lipopigmenata, podjedinica C mitohondrijskih ATP sintetaza ili sfingolipidnih aktivatorskih proteina A i D u lizosomima većine stanica. Za razliku od klasičnih LSD-a uzrokovanih disfunkcionalnim lizosomalnim enzimima ili transporterima, što rezultira značajnom lizosomskom akumulacijom nerazvijenih supstrata ili metabolita, prilično heterogeni skladišni materijal kod NCL-ova nije jasno specifičan za bolest (Kollmann i sur., 2013.). NCL bolesti su genetski mnogo heterogenije nego što se mislilo. Mutacije u istom genu mogu dovesti do vrlo različitih oblika bolesti.

Tradicionalno su NCL bolesti klasificirane prema dobi u kojoj se bolest pojavila (kongenitalni, infantilni, kasni infantilni, juvenilni, odrasli oblik), a ponekad i prema autorima koji su bolest opisali (Haltia-Santavuori, Jansky-Bielschowsky, Batten, Spielmeyer-Vogt, Kufs). Međutim, kliničke značajke demencije, motoričkih smetnji, napadaja i gubitka vida, što na kraju dovodi do rane smrti i sljepoće, su zajedničke svim NCL-ima. Identificirano je 13 genetski različitih NCL varijanti, kategoriziranih prema dobi pojave i patološkim značajkama. Mutirani proteini koji uzrokuju NCL (CLN1 do CLN14) predstavljaju topljive lizosomske enzime, politopske membranske proteine lokalizirane u lizosomima ili u ER, ili proteine povezane sa sinaptičkom vezikulom.

Nova međunarodno razvijena NCL nomenklatura jasno identificira svaku NCL bolest genetski i klinički (Tablica 1); klasificira i defektni gen i dob u kojem se bolest pojavila (kongenitalni, infantilni, kasni infantilni, juvenilni, odrasli tip). Točna dijagnoza je neophodna za genetsko savjetovanje, pružanje informacija o prognozi bolesti i budućem tijeku, te za optimalnu njegu (Schulz i sur., 2013.).

**Tablica 1.** Klasifikacija NCL i gena koji ih uzrokuju (tablica preuzeta iz Schulz i sur., 2013.)

<b>Bolest</b>	<b>Gen</b>	<b>Protein</b>
<b>CLN1, infantilni</b>	CLN1/PPT1	PPT1*
<b>CLN1, kasni infantilni</b>		
<b>CLN1, juvenilni</b>		
<b>CLN1, odrasli</b>		
<b>CLN2, kasni infantilni</b>	CLN2/TPP1	TPP1*
<b>CLN2, juvenilni</b>		
<b>CLN3, juvenilni</b>	CLN3	transmembranski protein
<b>CLN4, odrasli (AD nasljeđivanje)</b>	CLN4/DNAJC5	topljivi cisteinski nitasti protein $\alpha$
<b>CLN5, kasni infantilni</b>	CLN5	topljivi lizosomalni protein
<b>CLN5, juvenilni</b>		
<b>CLN5, odrasli</b>		
<b>CLN6, kasni infantilni</b>	CLN6	transmembranski protein
<b>CLN6, odrasli (Kufs tip A)</b>		
<b>CLN7, kasni infantilni</b>	CLN7/MFSD8	transmembranski protein
<b>CLN8, kasni infantilni</b>	CLN8	transmembranski protein
<b>CLN8, EPMR</b>		
<b>CLN10, kongenitalni</b>	CLN10/CTSD	katapsin D*
<b>CLN10, kasni infantilni</b>		
<b>CLN10, juvenilni</b>		
<b>CLN10, odrasli</b>		
<b>CLN11, odrasli</b>	CLN11/GRN	progranulin
<b>CLN12, juvenilni</b>	CLN12/ATP13A2	ATPaza tip 13A2
<b>CLN13, odrasli (Kufs tip B)</b>	CLN13/CTSF	katapsin F*
<b>CLN14, infantilni</b>	CLN14/KCTD7	tetramerna domena kalijevog kanala koja sadrži protein tip 7

\* lizosomski enzimi

Klinički pristup dijagnozi NCL poremećaja počinje s dobi u kojoj se pojavljuju simptomi, a mogu se podijeliti u 4 tipične skupine:

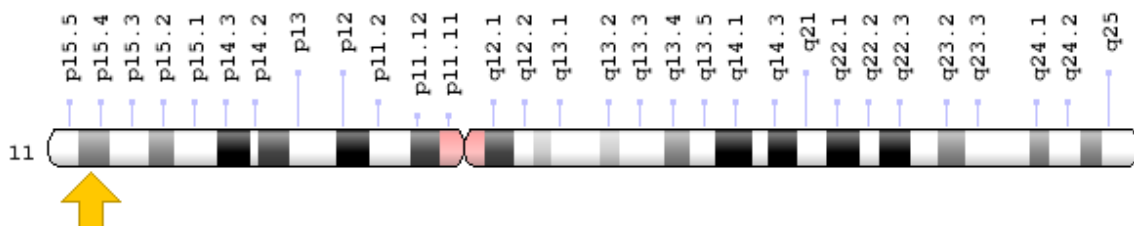
1. novorođenčad s urođenom epilepsijom i mikrocefalijom
2. mala djeca sa zastojem u razvoju ili nazadovanjem i ozbiljnom epilepsijom
3. djeca školske dobi s gubitkom vida, praćenim demencijom i epilepsijom
4. mlade odrasle osobe s nespecifičnim mentalnim, motornim i bihevioralnim abnormalnostima

U svakoj od ovih skupina se mogu očekivati karakteristični setovi NCL tipova, uzrokovani različitim mutacijama u poznatim NCL genima.

## 1.5. Klasični infantilni oblik NCL

Klasični kasni infantilni oblik NCL je uzrokovan mutacijama u CLN2 genu koji kodira lizosomalnu tripeptidil peptidazu 1. Kod bolesnika s klasičnim kasnim infantilnim oblikom NCL obično je prisutno usporavanje razvoja i psihomotorno nazadovanje, najčešće u drugoj ili trećoj godini života. Epilepsija se obično razvija između 2. i 4. godine. Epilepsija je prisutna u nekoliko oblika kod ovog tipa bolesti i često ju nije moguće odgovarajuće liječiti. Gubitak vida je povezan s abnormalnim elektroretinogramom (ERG) i vidnim evociranim potencijalom (VEP). Degeneracija retine je najvidljivija u makuli. Između trećeg i petog djetetovog rođendana dolazi do brzog i ujednačenog općeg raspada psihomotornih funkcija. Djeca kod kojih se bolest pojavi kasnije (nakon 4 godine) obično imaju blaži tijek s izraženijom ataksijom i manje izraženom epilepsijom (Schulz i sur., 2013.).

Gen CLN2 kodira tripeptidil peptidazu 1 (TPP1, CLN2). Nalazi se na kratkom kraku kromosoma 11 na poziciji 15.4 (11p15.4) (<https://ghr.nlm.nih.gov/>).



**Slika 1.** Lokacija TPP1 gena na 11. kromosomu (preuzeto s <https://ghr.nlm.nih.gov/>)

Izvorno je identificiran kao 46 kDa manoza 6-fosforiliran protein koji je odsutan u uzorcima bolesnika s kasnim infantilnim oblikom NCL-a. CLN2 gen eksprimira se posvuda u tkivu ljudi, štakora i miša. TPP1 je lizosomalna serinska proteaza koja na pH 4-4,5 uklanja tripeptide s N-terminusa malih polipeptida ( $M_r < 15000$ ). Na pH 3 sadrži endopeptidaznu aktivnost. Sintetizira se kao inaktivan 66/67 kDa prekursorski protein koji se sastoji od signalnog peptida od 19 AK, prosegmenta od 176 AK i katalitički aktivnog zrelog oblika od 368 AK (Kollmann i sur., 2013.). Gubitak aktivnosti TPP1 dovodi do lizosomalnog nakupljanja c podjedinice ATP sintaze, što je karakteristično za kasni infantilni i ostale oblike NCL. Uloga ovih biokemijskih abnormalnosti u neurodegenerativnom procesu još uvijek nije poznata (Steinfeld i sur., 2002.). Nisu poznati prirodni supstrati TPP1, ali nekoliko peptidnih hormona kao što su angiotenzin II, glukagon, supstanca P, kolekistokinin i neuromedin kao i sintetski amiloid- $\beta$ -peptidi i podjedinica C mitohondrijske ATP sintaze se cijepaju s TPP1 *in vitro*. Nijedan od ovih *in vitro* supstrata se ne nalazi u CLN2 nerazgrađenom nakupljenom supstratu (Kollmann i sur., 2013.).

### **1.5.1. Dijagnostika klasičnog infantilnog oblika NCL – Battenove bolesti**

Klasični kasni infantilni fenotip CLN2 bolesti ima predvidljiv klinički tijek obilježen epilepsijom i brzim padom psihomotoričkih sposobnosti. Najčešći početni simptomi su kašnjenje razvoja govora i napadaji, koji se obično počinju pojavljivati u dobi između 2 i 4 godine; često kašnjenje u razvoju govora prethodi napadajima. Kod bolesne djece su najčešće prisutni spontani napadaji, iako su mogući i febrilni napadaji. Nakon početnih napadaja, dolazi do brzog pogoršanja kognitivnih i motoričkih funkcija tijekom 2 do 3 godine, što dovodi do gubitka funkcije govora i gubitka voljnih pokreta do 6. godine. Razvijaju se poremećaji pokreta, uključujući mioklonus, distoniju i spastičnost. Djeca često imaju poremećaje spavanja i ponašanja. Oštećenje vida može započeti već u dobi od 4 godine ali obično nije jasno ni uznemirujuće dok se ne vidi ozbiljno pogoršanje, pa djeca s vremenom postanu slijepa do 7-10 godine života. Djeca gube sposobnost gutanja i postaju ovisna o gastrostomi. Sluh je obično pošteđen. Smrt nastupa oko srednje adolescentne dobi.

Rana dijagnoza CLN2 (neuralna ceroidna lipofuscinoza tipa 2) bolesti je presudna kako bi se osigurala optimalna skrb za bolesnike i njihove obitelji, ali je izazovna prvenstveno zbog nedostatka svijesti o bolesti i nespecifičnosti početnih simptoma. Dijagnostička procjena izoliranog kašnjenja govora kod inače „normalnog“ djeteta je

ograničena jednom kada se isključi gubitak sluha, i kontroliranje napadaja može imati prednost pred određivanjem njihove etiologije, doprinoseći kašnjenju u postavljanju dijagnoze. Osim toga, simptomi kao što je ataksija se mogu pogrešno protumačiti u početku kao nuspojava antikonvulzivnih lijekova. Većina bolesnika je dijagnosticirana oko 5. godine života kada je već došlo do značajnog gubitka funkcije. Pravovremena dijagnoza olakšava rano liječenje, smanjuje rizik od korištenja neprikladnih lijekova, i omogućuje obiteljima informirane odluke u vezi liječenja i planiranja obitelji (Williams i sur., 2017.).

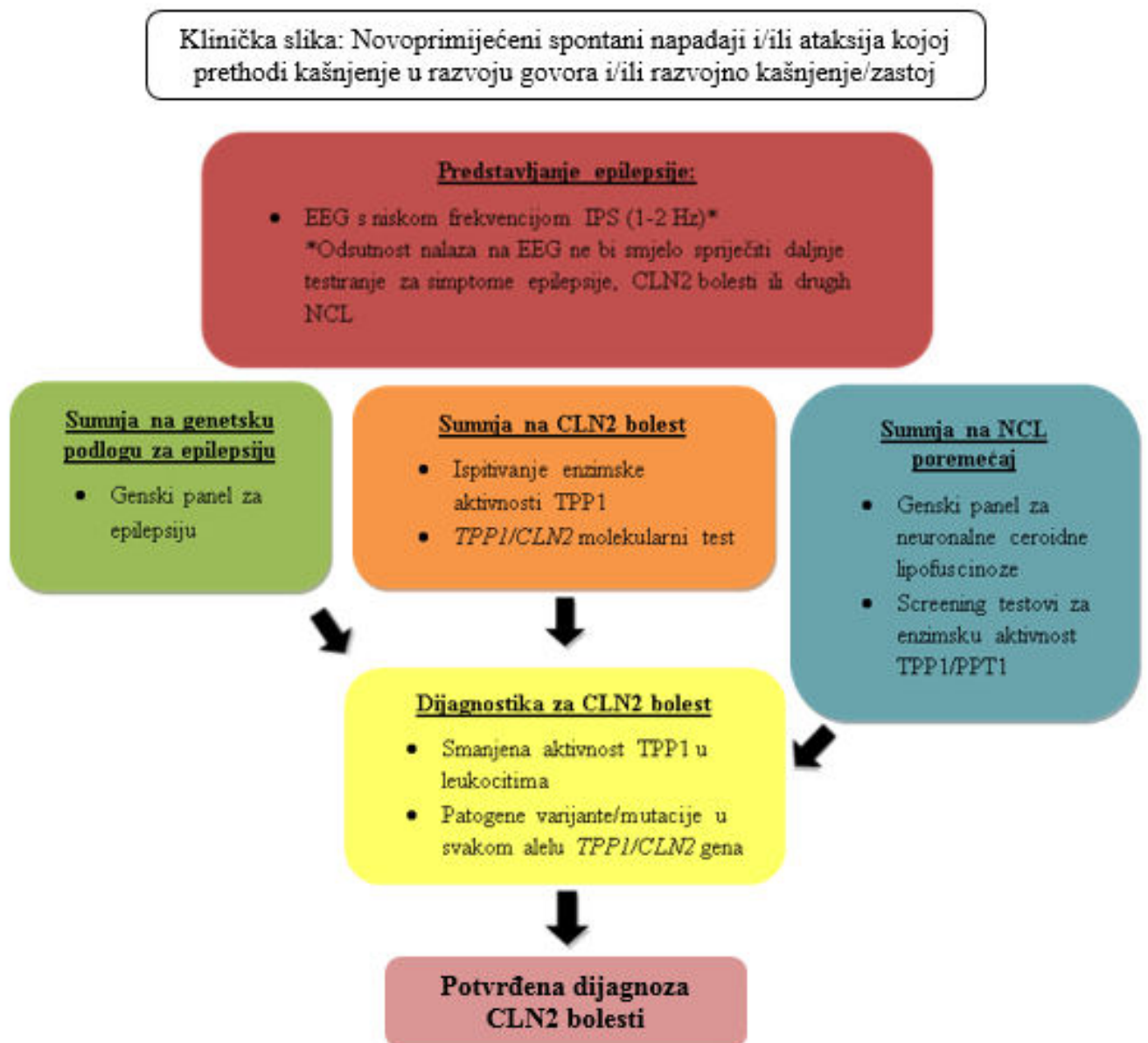
CLN2 bolest je moguće dijagnosticirati mjerenjem aktivnosti enzima TPP1. TPP1 enzim je pepstatin-nestabilna lizosomska serin egzopeptidaza s optimalnom in vitro aktivnošću u kiselom pH. Iako je nedavno razvijen kompatibilan supstrat za analizu tandemskom masenom spektrometrijom, većina dijagnostičkih laboratorija mjeri aktivnost TPP1 enzima koristeći fluorogeni supstrat, Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilkumarin. Bitno je da laboratoriji pažljivo uspostave vlastiti referentni interval za analizu aktivnosti TPP1 enzima. Preporučeni uzorak za analizu TPP1 enzimske aktivnosti su leukociti izolirani iz pune krvi. Mnogi laboratoriji su dokazali da se enzimska aktivnost TPP1 razlikuje kod zahvaćenih pojedinaca, nositelja i nezahvaćenih pojedinaca. Iako se apsolutne vrijednosti aktivnosti enzima razlikuju između laboratorija (zbog razlika u metodologiji, korištenih proteaznih inhibitora i pH testa), svaki individualni laboratorij jasno razlikuje TPP1 enzimsku aktivnost kod bolesnika s CLN2 bolešću od TPP1 enzimске aktivnosti kod zdravih pojedinaca. Osim leukocita, za analizu TPP1 enzimске aktivnosti mogu se koristiti i fibroblasti, suhe kapi krvi i slina. Enzimski test za TPP1 treba biti posebno validiran za svaki korišteni tip uzorka u kojem se dokazuje aktivnost.

Za točnu interpretaciju rezultata izmjerene TPP1 enzimске aktivnosti, neophodno je izmjeriti odgovarajuće kontrolne enzime kako bi se provjerila kvaliteta uzorka. PPT1 je prikladan kontrolni enzim jer ima sličnu stabilnost kao TPP1 enzim u uzorku suhe kapi krvi, leukocitima, fibroblastima i slini. Dodatno, evaluacija PPT1 enzimске aktivnosti ima dvojnu funkciju, u procjeni kvalitete uzorka i za isključivanje CLN1 bolesti, drugog NCL poremećaja koji se inicijalno predstavlja sličnim simptomima kao i CLN2. Drugi kontrolni enzim može biti bilo koji drugi lizosomalni enzim koji nije povezan s NCL poremećajem.

Nakupljanje unutarstaničnog nerazgrađenog supstrata u neuronalnim i ostalim stanicama je morfološko obilježje NCL poremećaja. Otkrivanje unutarstaničnog nerazgrađenog supstrata elektronskom mikroskopijom je vrlo bitna tehnika za klasifikaciju i dijagnozu NCL poremećaja.

Konačna dijagnoza CLN2 bolesti postavlja se identifikacijom 2 patogene varijante/mutacije povezane sa smanjenom aktivnošću TPP1 enzima u TPP1/CLN2 genu. TPP1/CLN2 gen sadrži 13 eksona i dugačak je 6.7 pb. Dvije najčešće opisane mutacije povezane s CLN2 bolešću su c.509-1G>C, splicing mutacija, i c.622C>T (p.Arg208Ter), koja dovodi do preuranjenog stop kodona (Fietz i sur., 2016.).

Sljedeći dijagnostički postupak nakon postavljene sumnje na Battenovu bolest može se prikazati na sljedeći način:



Slika 2. Shema dijagnostike Battenove bolesti (preuzeto iz Fietz i sur., 2016.)



EEG je često prvi klinički test koji se provodi bez obzira na razinu kliničke sumnje. U slučajevima CLN2, elektroencefalogrami mogu detektirati nepravilnu aktivnost, pokazivanje pozadinske aktivnosti, epileptične abnormalnosti. EEG s povremenom fotothermalnom stimulacijom (IPS) izveden na frekvenciji od 1 do 2 Hz je osobito informativni test. U mnogim EEG nalazima konačno dijagnosticiranih bolesnika primjećuje se karakteristični bljesak-po-bljesak odgovor (flash-per-flash) na niskoj frekvenciji stimulacije. Klasični epileptični fotoparoksizmalni odgovor je obično vidljiv na višim frekvencijama stimulacije. Iako je IPS često dio rutinske procjene nakon pojave prvih napadaja, ako se izvodi na frekvencijama većima od 2 Hz, karakteristični odgovor (na 1-2 Hz) primijećen kod mnogih bolesnika s CLN2, bit će promaknut.

Kod sumnje na moguću NCL, opravdana je primjena panela NCL gena, ako je to kliničaru dostupno. U preporučenim postupnicima na istoj razini je i procjena enzimske aktivnosti TPP1 i PPT1 kao metoda probira. Klinički slične bolesti CLN2 i CLN1 su najčešći oblici infantilnog i kasnog infantilnog NCL poremećaja, a za oba enzima postoje pouzdane enzimske metode probira. Ostale pretrage uključuju sekvenciranje uobičajeno mutiranih NCL gena i/ili korištenje elektronske mikroskopije (EM) za procjenu nakupljanja unutarstaničnog nerazgrađenog supstrata, što je opći simptom NCL poremećaja (Fietz i sur., 2016.).

### **1.5.2. Liječenje klasičnog infantilnog oblika NCL – Battenove bolesti**

Cerliponaza alfa, rekombinantni proenzim (također nazvan Zimogen) je oblik humanog TPP. To je enzimska nadomjesna terapija koja ima potencijalnu primjenu kod bolesnika s CLN2. Primjena ovako pripremljenog enzima u ventrikularni likvor mladih pasa koji su bili spontano homozigotni za deficit TPP1 je pokazala dobru raspodjelu u tkivima, prijelaz enzima u mozak, klirens nakupljenog lizosomalnog supstrata, očuvanje neuronskih morfoloških značajki i smanjenje upale mozga. Liječeni psi također su imali odgođeni početak i sporije napredovanje neuroloških znakova i atrofije mozga, očuvanu kognitivnu funkciju i produženi životni vijek ovisno o dozi.

U istraživanju koje je provedeno pokazalo se da intraventrikularna primjena cerliponaze alfa svaka 2 tjedna u dozi od 300 mg kod djece s CLN2 bolešću rezultira sporijom stopom pada motoričkih i govornih funkcija. Potencijal uporabe intraventrikularne cerliponaze alfa kako bi se spriječio nastanak simptoma kod mladih pacijenata i odgodio ili spriječio promjene vida zahtijeva daljnje proučavanje. Intraventrikularna enzimska

nadomjesna terapija je povezana s komplikacijama u obliku infekcija 3. stupnja, te povećanog broja leukocita u cerebrospinalnoj tekućini kod polovice bolesnika (Schulz i sur., 2018.).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

S obzirom da se u zadnjih 10 godina u Hrvatskoj prekasno dijagnosticiralo nekoliko pacijenata s CLN2, pokazala se potreba za uspostavljanjem metode za određivanje aktivnosti tripeptidil peptidaze 1.

Farmaceutska industrija također svakim danom sve više napreduje pa je razvijena i rekombinantna terapija za liječenje CLN2, koja je najučinkovitija kod primjene nakon pojave prvih simptoma bolesti. Bez odgovarajućeg liječenja nakon pravodobnog postavljanja dijagnoze dolazi do brzog propadanja motoričkih i kognitivnih funkcija.

Cilj rada je uvođenje metode za mjerenje aktivnosti enzima tripeptidil peptidaze 1 u uzorku leukocita izoliranih iz pune krvi.

## 3. MATERIJALI I METODE

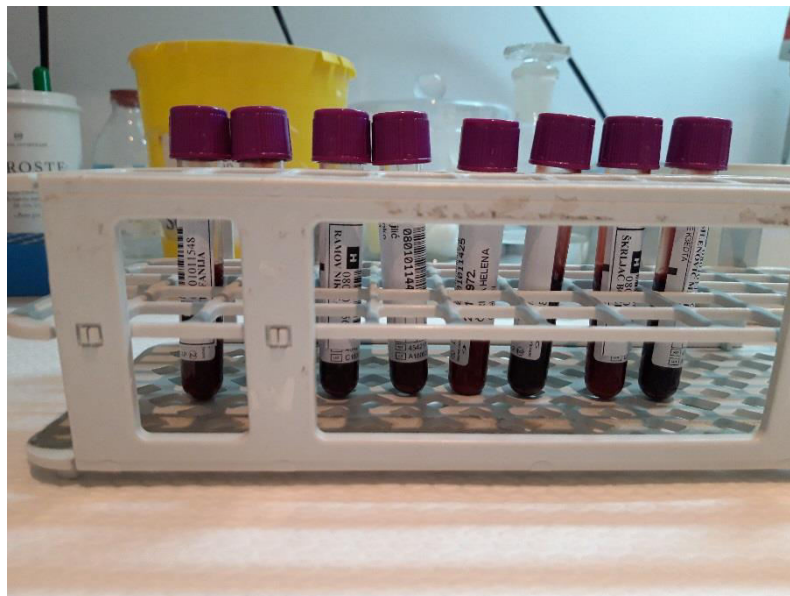
### 3.1. Ispitanici

U istraživanje je bilo ukupno uključeno 35 uzoraka (19 muških, 11 ženskih). 30 uzoraka uzeto je od zdravih ispitanika, preostalih nakon obrade u sklopu sistematskih pregleda (uz potpisan informirani pristanak). Kao pozitivna kontrola korišten je uzorak prve bolesnice dijagnosticirane u Laboratoriju za nasljedne metaboličke bolesti (trogodišnja djevojčica s potvrđenim mutacijama: c.509-1G>C; c.614T>A) te su izmjerene i aktivnosti enzima kod 4 uzorka njene obitelji (otac, majka, brat, sestra).

### 3.2. Uzorci

Leukociti su izolirani iz uzoraka venske krvi vađene na EDTA antikoagulans u epruvete od 2 mL.

Kao kontrolni uzorak koristio se uzorak poola leukocita zdravih osoba.



**Slika 3.** Prikaz uzoraka venske krvi izvađenih u epruvete s EDTA-antikoagulansom

### 3.3. Načelo enzimske metode

Metoda mjerenja aktivnosti enzima tripeptidil peptidaze 1 pripada skupini diskontinuiranih metoda određivanja enzima. Načelo diskontinuiranih metoda je da se uzorku koji sadrži analit od interesa, u našem slučaju enzim tripeptidil peptidazu 1, doda sintetski supstrat, te se nakon određenog vremena inkubacije reakcija prekine i zatim se određuje koncentracija produkta nastalog u reakcijskoj smjesi.

Sintetski supstrat za tripeptidil peptidazu 1 je Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilumarin. Leukociti su homogenizirani i odgovarajući alikvot homogenata inkubiran je uz dodatak supstrata. Reakcija se zaustavlja puferom za prekidanje reakcije koji sadrži inhibitor - Ala-Ala-Phe-klorometil keton ( $0.1\mu\text{M}$ ) u natrijevom kloroacetatu. Fluorescencija produkta 7-amino-4-metilumarina se očitava fluorimetrijski - aktivnost se računa ovisno o količini produkta nastalog tijekom jednosatne inkubacije (Sohar i sur., 2000.).

### 3.4. Načelo metode spektrofluorimetrije

Spektroskopske metode se načelno dijele na apsorpcijsku i emisijsku spektroskopiju. Spektrofluorimetrija spada u emisijsku spektroskopiju. Fluorescencija je stanje u kojem molekula apsorbira zračenje jedne valne duljine, a emitira zračenje na većoj valnoj duljini, odnosno prijelaz energije iz višeg u niže stanje je popraćen emisijom zračenja. Fluorimetrija je definirana kao mjerenje emitiranog fluorescentnog zračenja (Burtis i sur., 2012.). Molekula koja apsorbira zračenje naziva se fluorofora, a pojava emitiranja svjetlosti drukčije valne duljine od svjetlosti koja je apsorbirana naziva se Stokesovim pomakom. Apsorpcija UV/vidljivog zračenja uzrokuje prijelaz elektrona iz osnovnog (nisko energetske stanje) u pobuđeno stanje (visoko energetske stanje).

Fluorescencija se odvija u 3 stupnja:

1. Ekscitacija
2. Pobuđeno stanje
3. Emisija fluorescencije

Fluorofora se pobuđuje apsorpcijom zračenja. Kao izvor zračenja koristi se lampa ili laser. Pobuđeno elektronsko singletno stanje traje 1-10 nsec. Za vrijeme trajanja pobuđenog stanja dolazi do niza konformacijskih promjena molekule koja fluorescira te do interakcija s

ostalim molekulama iz okoliša. Zbog toga se energija pobuđenog stanja djelomično rasipa za vrijeme trajanja pobuđenog stanja te prelazi u relaksirano singletno stanje od čega potječe emisija fluorescencije. Naposljetku dolazi do emisije fluorescencije, emitira se foton i na taj način se pobuđena molekula vraća u osnovno stanje. Zbog rasipanja energije tijekom trajanja pobuđenog stanja energija emitiranog fotona je manja od apsorbirane energije, a njena valna duljina je veća (Sheehan, 2009.).

### **3.4.1. Spektrofluorimetar**

Instrumenti koji služe za mjerenje fluorescencije su spektrofluorimetri. Osnovni dijelovi fluorescentnih spektrofluorimetara su izvor ekscitacije, ekscitacijski monokromator, kivet, emisijski monokromator i detektor. Spektrofluorimetri koriste izvore svjetlosti visokog intenziteta, koji su sposobni emitirati energiju zračenja koja zahvaća gotovo cijelo spektralno područje, te kako bi bombardirali uzorak sa što više fotona, što dovodi do maksimalnog broja molekula u pobuđenom stanju u određenom trenutku. Kako bi dobili svjetlost točno određene valne duljine, ona prolazi kroz filter ili monokromator. Monokromator je optički uređaj koji propušta svjetlost samo jedne valne duljine. Sastoji se od optičke prizme, optičke rešetke ili optičkog filtra, a biranjem kuta upadne zrake svjetlosti se može odabrati točno određena valna duljina koju će monokromator propustiti na uzorak. Drugi monokromator je potreban kako bi se uklonio utjecaj potencijalnih interferencija. U svakom uzorku su uz analit prisutne i neke druge molekule koje mogu fluorescirati, pa kako bi se spriječile potencijalne smetnje, postavlja se još jedan monokromator koji će omogućiti da se propušta samo jedna valna duljina koju emitira analit od interesa. Pomoću računala i detektora se registriraju emisijski fotoni. Oni se pretvaraju u izlazni signal koji se može analizirati na računalu. Kao detektori za kvantitativne analize u spektrofluorimetrima najčešće se rabe fotomultiplikatori (Štraus i sur., 1997.).



**Slika 4.** Prikaz *Varian Cary Eclipse* spektrofotometra

### 3.5. Instrumenti

- ultrazvučni homogenizator (*Bandelin*)
- UV-VIS spektrofotometar
- fluorimetar (*Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer*)
- vorteks (*Bio Vortex VI, Biosan*)
- mješalica
- vodena kupelj (*Memmert WNB 14*)
- automatske pipete različitih volumena (*Eppendorf* pipete)
- centrifuga MPW-223E
- centrifuga 5417R (*Eppendorf*)
- pH-metar
- sonikator
- spektrofotometar (*CamSpec*)

- vaga (*Mettler toledo PB 303-S*)

### 3.6. Kemikalije i reagensi

- 0,15 mmol/L amonijev klorid (Merck A761045 704, Mr 53,49 g/mol)
- 0,01 mol/L kalij hidrogen karbonat (Kemika 1116707, Mr 100,12 g/mol)
- 0,1 mmol/L EDTA (Kompleksal III, Kemika 1136808, Mr 372,24 g/mol)
- DC PROTEIN ASSAY (Bio Rad) – Reagens A, Reagens S, Reagens B
- radni reagens A za uzorke koji sadrže Triton X-100
- Protein standard II (*bovine serum albumine*) (Bio Rad)
- koncentrirana octena kiselina (18M) (Analar BDH 10001 CU, Mr 60 g/mol)
- natrijev acetat (Analar BDH 102354X, Mr 82,03 g/mol)
- 0,1 M acetatni pufer pH 4,0
- Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilkumarin (500 $\mu$ M) (Sigma A3401, Mr 464,5 g/mol)
- 7-amino-4-metilkumarin (Sigma A9891, Mr 175,19 g/mol)
- Ala-Ala-Phe-klorometil keton trifluoroacetatna sol (Sigma A6892, Mr 453,8 g/mol)
- 30 mM acetatni pufer pH 4,3
- natrijev kloroacetat (Acros 40441-5000, Mr 116 g/mol)
- Triton X-100 (Pierce, 28314)
- DMSO
- EDTA (Analar BDH 10093, Mr 372,24 g/mol)
- limunska kiselina
- 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glukozaminid (Sigma M-2133)
- natrijev hidroksid (Mr 40 g/mol)
- koncentrirana klorovodična kiselina
- glicin (Mr 75,07 g/mol)
- fiziološka otopina
- redestilirana voda
- 4-metilumbeliferon



## **3.7. Priprema reagenasa**

### **3.7.1. Otopina za lizu eritrocita**

8,3 mg 0,15 mmol/L amonij klorida, 1 g 0,01 mol/L kalij hidrogen karbonata, 0,37 g 0,1 mmol/L EDTA se otopi u 1000 mL destilirane vode. Otopina se čuva u hladnjaku do 3 mjeseca.

### **3.7.2. Triton X-100 za homogenizaciju**

0,25 g Tritona se otopi u 100 mL redestilirane vode.

### **3.7.3. Radni reagens A za uzorke koji sadrže Triton X-100**

U 1 mL otopine A doda se 20  $\mu$ L reagensa S (Bio Rad). Priređena radna otopina stabilna je tjedan dana na temperaturi 4-8°C.

### **3.7.4. Protein standard II**

Liofilizirani standard koji nakon otapanja u 20 mL destilirane vode sadrži 1,4 mg/mL proteina. Otopljeni standard alikvotirati po 100  $\mu$ L i pohraniti na -20°C.

### **3.7.5. 0,1M acetatni pufer pH 4,0**

Potrebna koncentracija octene kiseline se dobije miješanjem 2,4 mL 18M octene kiseline s 430 mL vode (otopina A). Natrijev acetat (otopina B) se dobije miješanjem 8,2 g natrijevog acetata s 1000 mL vode. U konačnici se pomiješa 345 mL otopine A s 90 mL otopine B kako bi se dobio pufer octene kiseline koncentracije 0,1M. Izmjeri se i prilagodi pH ukoliko je potrebno.

### **3.7.6. 30 mM acetatni pufer pH 4,3**

Potrebna koncentracija octene kiseline dobije se miješanjem 1,5 mL 18M octene kiseline s 900 mL vode (otopina A). Natrijev acetat (otopina B) se dobije miješanjem 1,23 g natrijevog acetata s 500 mL vode. U konačnici se pomiješa 900 mL otopine A s 375 mL otopine B kako bi se dobio pufer octene kiseline koncentracije 30 mM. Izmjeri se i prilagodi pH ukoliko je potrebno.

### **3.7.7. Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilkumarin (500 $\mu$ M) – supstrat**

2,32 mg AAP-AMC soli je dodano u 10 mL 0,1M acetatnog pufera pH 4,0. Supstrat je podijeljen u alikvotne od 100  $\mu$ L i zamrznut na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.7.8. 7-amino-4-metilkumarin – standard**

5,2 mg 7-amino-4-metilkumarina se otopi u 1 mL DMSO (dimetilsulfoksid) zagrijavanjem na  $37^{\circ}\text{C}$ . Dopuni se destiliranom vodom do volumena od 500 mL. 2,5 mL 59,4  $\mu$ M 7-amino-4-metilkumarina se razrijedi u 20 mL vode. Uzme se 3 x 200  $\mu$ L (1,5 nmol) i doda 1 mL 0,1M Na-kloroacetata, 0,1  $\mu$ M AAP-CMK u 30 mM acetatnog pufera pH 4,3. Očita se fluorescencija prema sljedećim postavkama; ekscitacija 365 nm, emisija 450 nm. Alikvotira se po 200  $\mu$ L (1,5 nmol) u Eppendorf epruvete i zamrzava u uspravnom položaju na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Standard je ovako stabilan do godinu dana.

### **3.7.9. Ala-Ala-Phe-klorometil keton (1mM) – inhibitor**

1 mg AAP-CMK trifluoroacetatne soli se otopi u 2,2 mL deionizirane vode. Alikvotira se po 200  $\mu$ L u staklene bočice i ispari do suha s dušikom. Čuva se na  $4^{\circ}\text{C}$ . Svaka bočica se po potrebi otopi u 200  $\mu$ L vode, te se alikvotira po 20  $\mu$ L u 0,5 mL Eppendorf epruvete. Čuva se na  $-80^{\circ}\text{C}$  do godinu dana.

### **3.7.10. Natrijev kloroacetat – reagens za prekidanje reakcije**

11,6 g natrijevog kloroacetata se otopi u 1000 mL 30 mM acetatnog pufera pH 4,3. Dobiven reagens je otrovan i čuva se na sobnoj temperaturi do mjesec dana.

### **3.7.11. AAP-CMK (0,1 $\mu$ M) u natrijevom kloroacetatu**

0,01 mL AAP-CMK inhibitora (1mM) se dodaje u 100 mL reagensa za prekidanje reakcije, ostatak inhibitora se odbaci. Inhibitor je u reagensu za zaustavljanje aktivan do 3 tjedna. Čuva se na sobnoj temperaturi. Svaka 3 tjedna je potrebno napraviti svježe.

### **3.7.12. 50 mM acetatni pufer pH 4,0 koji sadržava 0,1% Triton X-100**

Pomiješa se 3 mL 0,1 acetatnog pufera pH 4,0, 3 mL deionizirane vode i 0,06 mL 10% Tritona X-100. Napraviti svježe.

### **3.7.13. 40 mM EDTA u 50 mM acetata pH 4.0 koji sadržava 0,1% Triton X-100**

Otopi se 32 mg EDTA (Etilendiaminotetraoctena kiselina (Na)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O) u 4 mL acetatnog pufera pH 4.0 / 0.1% Triton X-100. Napraviti svježe.

### **3.7.14. 0,1 M citratni pufer, pH 4,4**

Otopinu A prirediti otapanjem 21,01 g limunske kiseline u 700 mL destilirane vode i dodati 8 g natrijevog hidroksida te nadopuniti vodom do 1000 mL.

Otopinu B (0,1 mol/L HCl) prirediti dodavanjem 4,28 mL koncentrirane klorovodične kiseline u 500 mL destilirane vode.

Pomiješa se 66,4 mL otopine A i 33,6 mL otopine B do pH 4,4.

### **3.7.15. 2 mmol/L 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glukozaminid – supstrat za $\beta$ -heksozaminidazu A i B**

0,019 g supstrata se otopi u 25 mL citratnog pufera (reagens 3.7.14.) koji sadrži 10% goveđi serum albumin i 0,2% natrijev azid.

### **3.7.16. 0,2 mol/L glicinski pufer, pH 10,4**

7,5 g glicina (Mr 75,07) i 4 g natrijevog hidroksida (Mr 40) otopiti u 500 mL destilirane vode te provjeriti pH.

### **3.7.17. 0,5 mmol/L 4-metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glukozaminid – supstrat za $\beta$ -heksozaminidazu A i B**

0,019 g supstrata se otopi u 100 mL citratnog pufera (reagens 3.7.14.) koji sadrži 10% goveđi serum albumin i 0,2% natrijev azid.

### **3.7.18. Standardna otopina metilumbeliferona (4-MUF)**

Radni standard metilumbeliferona priprema se dodatkom 100  $\mu$ L metilumbeliferona u 100  $\mu$ L destilirane vode i 2,8 mL glicinskog pufera (pH 10,6).

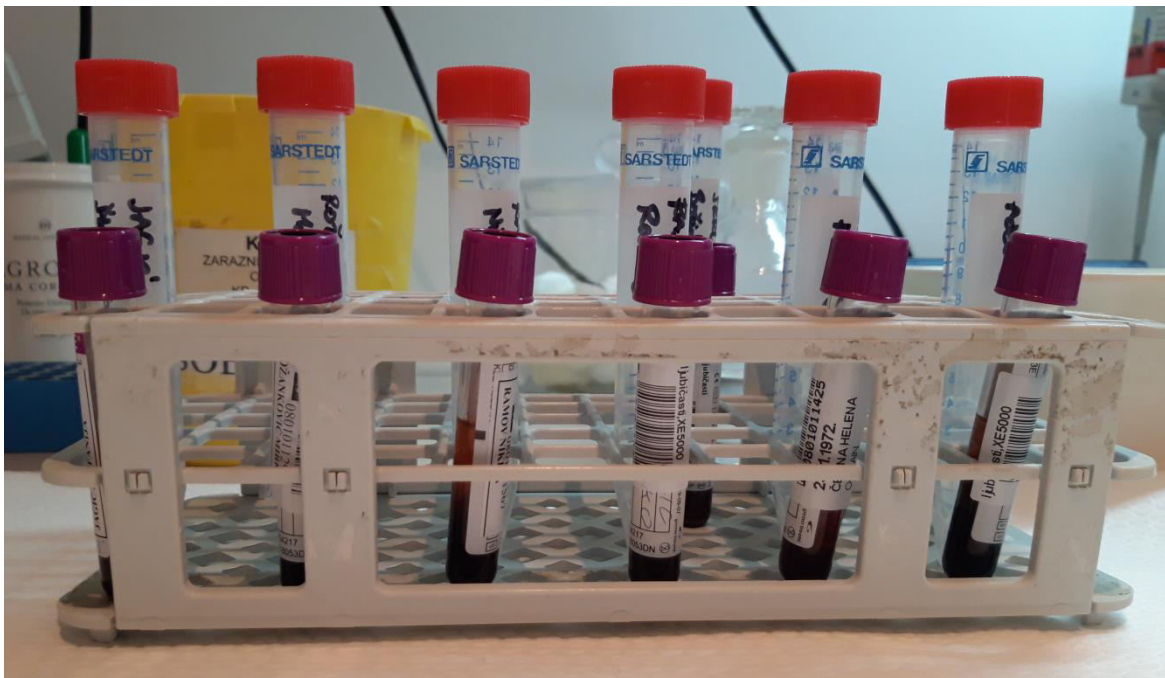
## **3.8. Postupak**

### **3.8.1. Izolacija leukocita iz pune krvi**

Leukociti se izoliraju iz pune krvi izvađene na EDTA. Sadržaj epruvete se lagano promiješa okretanjem epruvete, zatim se epruveta centrifugira na 4000 okretaja 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja se plastičnom pipetom plazma odvoji u bocu za biološki otpad, a leukocitni prsten (buffy coat) se prenese u čistu epruvetu od 15 mL. U epruvetu se doda 10 mL ranije priređene otopine za lizu (reagens 3.7.1.) te se dobro promiješa, ostavi u zamrzivaču (-20°C) 15 do 20 minuta (dok se ne smrzne). Nakon smrzavanja epruvetu s leukocitima je potrebno naglo odmrznuti, te centrifugirati na 4000

okretaja kroz 10 minuta. Nakon toga se odlije supernatant i ponovno doda 10 mL otopine za lizu, te ponovno centrifugira na 4000 okretaja kroz 10 min. Nakon centrifugiranja ostaju čisti leukociti te su tako izdvojeni spremni za homogeniziranje. Ako se ne uzimaju u postupak odmah mogu se čuvati na  $-70^{\circ}\text{C}$  do 3 mjeseca.

Na izolirane leukocite se doda otopina Tritona X-100 za homogenizaciju (reagens 3.7.2.), ovisno o količini leukocita se dodaje 200-400  $\mu\text{L}$  otopine. Zatim se uzorak homogenizira na ultrazvučnom homogenizatoru. Homogenat se prenese u mikroeprevetu sa sigurnosnim čepom od 1,5 mL i centrifugira na 12000 okretaja 5 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant se prenosi u novu mikroeprevetu sa sigurnosnim čepom od 2 mL i tako priređen homogenat je spreman za mjerenje koncentracije proteina i aktivnosti lizosomskih enzima. Ako se ne koristi odmah može se čuvati na  $-70^{\circ}\text{C}$  do 3 mjeseca.



**Slika 5.** Prikaz uzoraka venske krvi na EDTA-antikoagulansu i čistih epruveta od 15 mL neposredno prije odvajanja *buffy coat-a*

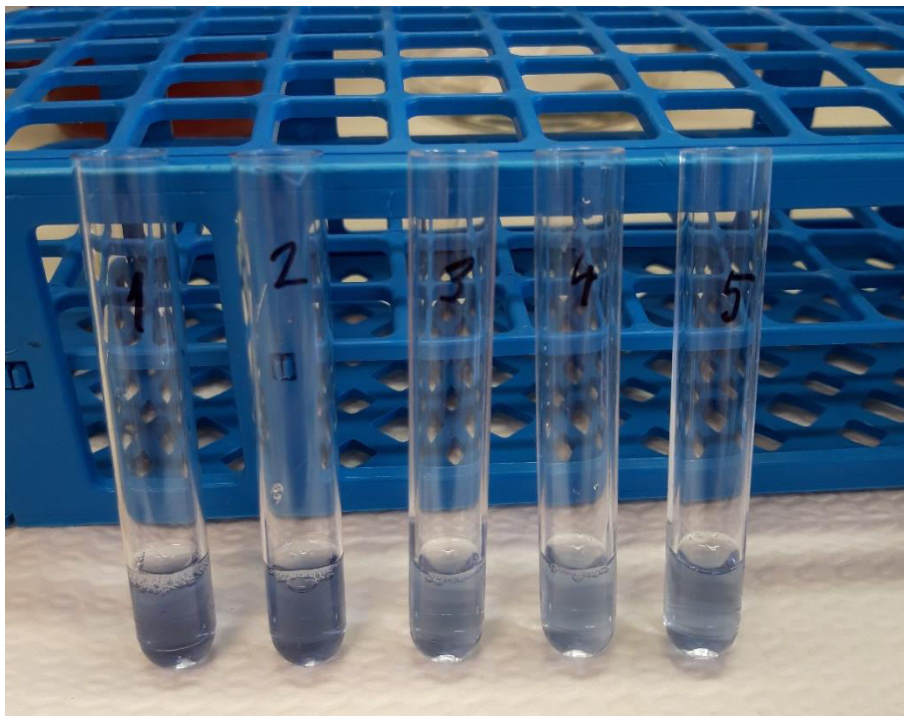
### 3.8.2. Mjerenje proteina u uzorcima izoliranih leukocita

U epruvetu 1 se doda 20  $\mu\text{L}$  ranije priređene otopine komercijalnog standarda (reagens 3.7.4.), 100  $\mu\text{L}$  reagensa A (reagens 3.7.3.) te 800  $\mu\text{L}$  reagensa B. U epruvete uzorka (homogenata) se doda 20  $\mu\text{L}$  homogenata, te također 100  $\mu\text{L}$  reagensa A (reagens 3.7.3.) i 800  $\mu\text{L}$  reagensa B. Uzorke se odmah dobro vorteksira, ostavi 15 minuta na sobnoj temperaturi i zatim se očita

apsorbancija na UV-Vis spektrofotometru na 750 nm. Nulira se s praznom kivetom.  
Koncentracija ukupnih proteina se računa prema formuli:

$$\frac{\text{apsorbancija uzorka}}{\text{apsorbancija standarda}} \times \text{koncentracija standarda } 1,48 \text{ mg/mL}$$

Koncentracija proteina u uzorku treba biti 1,0 – 3,0 mg/mL.



**Slika 6.** Prikaz uzoraka neposredno prije mjerenja proteina



Slika 7. Prikaz *CamSpec* spektrofotometra

### 3.8.3. Priprema reagenasa neposredno prije rada

- Priprema 50 mM acetatnog pufera pH 4,0 koji sadržava 0,1% Triton X-100 (reagens 3.7.12.)

Pomiješa se 3 mL 0.1 M acetatnog pufera pH 4,0 i 3 mL deionizirane vode te se u otopinu pažljivo doda 0,06 mL 10% Tritona X-100 i dobro promiješa na magnetnoj mješalici zbog velike viskoznosti Tritona X-100.

- Priprema 40 mM EDTA u 50 mM acetatnog pufera pH 4,0 koji sadržava 0,1% Triton X-100 (reagens 3.7.13.)

U 4 mL acetatnog pufera pH 4,0 koji sadržava 0.1% Triton X-100 se doda 32 mg unaprijed izvagane EDTA te se pažljivo promiješa kako bi se sva EDTA otopila.

### 3.8.4. Postupak

Za svaki uzorak se postave 2 Eppendorf epruvete koje sadrže:

- EDTA/acetat/Triton X-100 (reagens 3.7.13.) 93  $\mu$ L
- uzorak 7  $\mu$ L

Postavi se slijepa proba za supstrat u duplikatu za svaku seriju. 2 Eppendorf epruvete sadrže:

- EDTA/acetat/Triton X-100 (reagens 3.7.13.) 93  $\mu$ L
- deionizirana voda 7  $\mu$ L

U istom trenutku se u sve epruvete doda 100  $\mu$ L supstrata Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilkumarina (500  $\mu$ M) (reagens 3.7.7.), promiješa se i inkubira se 1h na 37°C. Nakon inkubacije se u sve epruvete doda 1 mL pufera za zaustavljanje koji sadrži inhibitor - Ala-Ala-Phe-klorometil keton (0,1 $\mu$ M) u natrijevom kloroacetatu (reagens 3.7.11.) te se promiješa.

Također se za svaku seriju postavi standard u duplikatu. U 200  $\mu$ L 7-amino-4-metilkumarina (standard, reagens 3.7.8.) se doda 1 mL pufera za zaustavljanje koji sadrži inhibitor - Ala-Ala-Phe-klorometil keton (0,1 $\mu$ M) u natrijevom kloroacetatu (reagens 3.7.11.).

Nakon zaustavljanja reakcije, očita se fluorescencija.

### 3.8.5. Uvjeti čitanja na fluorimetru

Ekscitacijski filter: 365 nm

Emisijski filter: 450 nm

Ekscitacijski slit: 5 nm

Emisijski slit: 5 nm

Voltaža: 550 V

Osjetljivost mjerenja se može podešavati mijenjanjem vrijednosti voltaže. Ukoliko je voltaža veća, veća je i osjetljivost mjerenja fluorescencije. Širina ekscitacijskog i emisijskog proreza mjera je veličine prozora u kojem se odvija mjerenje fluorescencije.



### 3.8.6. Fluorimetrijsko čitanje rezultata

Prvo je očitana slijepa proba u duplikatu, zatim standard u duplikatu te nakon toga svaki uzorak pojedinačno u duplikatu.

### 3.8.7. Račun

Pri izračunu fluorescencije 1 nmol standarda potrebno je uzeti u račun koncentraciju standarda; 1,5 nmol:

$$\frac{\text{Std}}{1,5} = \text{fluorescencija 1 nmol AMC}$$

Izračun se temelji na jednosatnoj inkubaciji (60 min). Za svaki uzorak posebno se uvrštava koncentracija proteina u uzorku leukocita i volumen smjese koji iznosi 1,2 mL. Enzimatska aktivnost u nmol 7-amino-4-metilkumarina oslobođenog po mg proteina po satu prikazana je sljedećom formulom:

Enzimatska aktivnost (nmol/sat/mg proteina) =

$$\frac{(T - B)}{S} \times \frac{60}{\text{vrijeme (min)}} \times \frac{1000}{\text{konc. proteina} \times \text{volumen smjese}}$$

T = apsorbancija uzorka

B = apsorbancija slijepe probe

S = apsorbancija standarda

### 3.8.8. Mjerenje aktivnosti $\beta$ -heksozaminidaze A i B u leukocitima – kontrolna reakcija

Pipetirati u duplikatu u staklene epruvete (3,5 mL) na hladnoj podlozi:

- alikvot homogenata leukocita koji odgovara 10-20 mg proteina
- do 100  $\mu$ L destilirane vode
- 100  $\mu$ L supstrata (reagens 3.7.15.)

Inkubacija 30 min na +37°C u vodenoj kupelji. Reakcija se prekida dodatkom glicinskog pufera (reagens 3.7.16.).

### Uvjeti čitanja na fluorimetru:

Ekscitacija: 365 nm

Emisija: 448 nm

Ekscitacijski slit: 10 nm

Emisijski slit: 5 nm

Voltaža: 410 V

### Račun:

$$U/L = \frac{FI - u}{FI - st} \times \frac{c - st \times \mu L - st}{\mu L - inkubacijske \text{ smjese}} \times \frac{1}{Q \times t}$$

FI-u = očitana fluorescencija uzorka

FI-st = očitana fluorescencija standarda

c-st = koncentracija MUF (radni standard)

t = vrijeme inkubacije

F = faktor

$$Q = \frac{\mu L - homogenat}{\mu L - inkubacijska \text{ smjesa}}$$

$$F = \frac{\mu L - st \times c - st}{FI - st \times t} = \frac{10 \mu L \times 100 (\mu M)}{210 \times 30} = 1,7$$

$$U/L = \frac{FI - u \times F}{\mu L - homogenat}$$

Dobivene vrijednosti (U/L) je potrebno uvrstiti uz koncentracije proteina u homogenatu u jednadžbu:

U/L / ukupni proteini x 60 (minute) = nmol/mg proteina/h

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati mjerenja

**Tablica 2.** Izmjerene koncentracije proteina, apsorbancije i aktivnosti enzima TPP1 u uzorcima leukocita

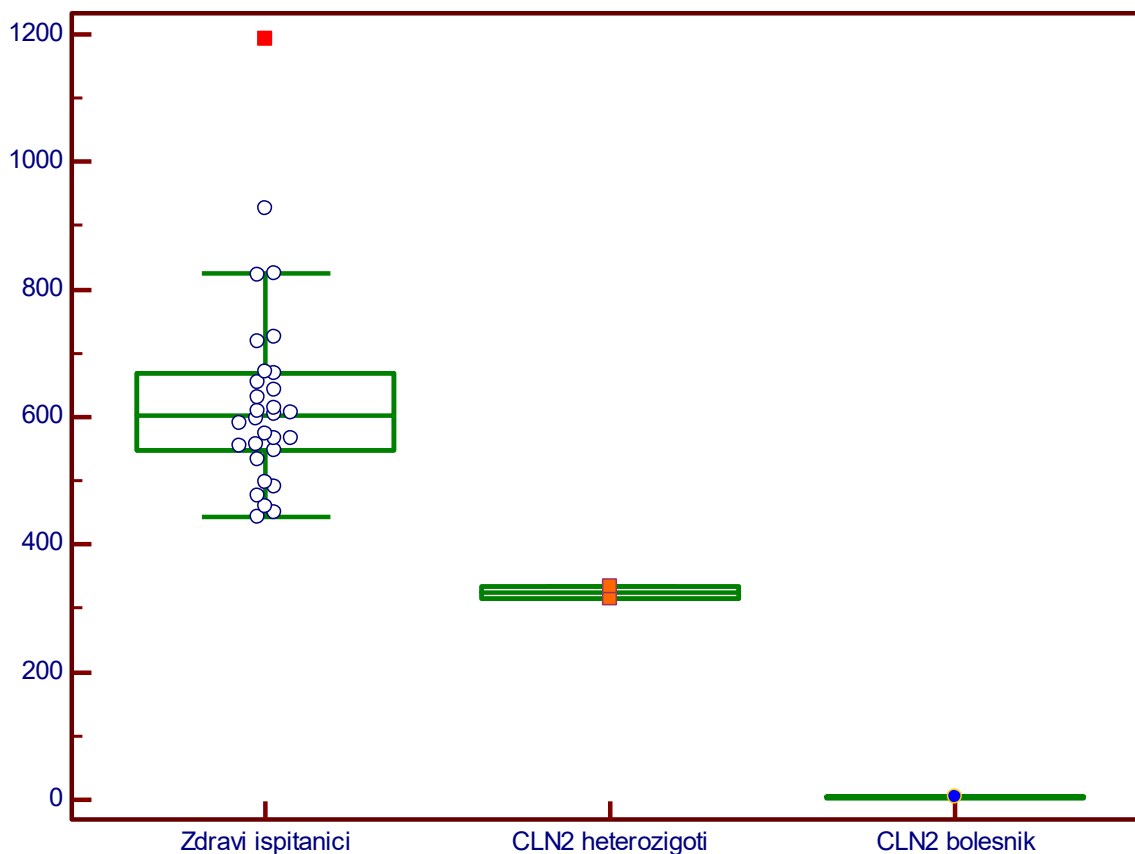
Broj uzorka	Koncentracija proteina (mg/mL)	Apsorbancija TPP1	Aktivnost TPP1 (nmol/sat/mg proteina)
1.	1,63	445,597	566,59
2.	2,25	645,113	609,40
3.	1,89	639,850	719,23
4.	1,50	439,261	606,22
5.	1,26	291,864	459,24
6.	2,50	385,735	315,97
7.	1,80	37,240	4,11
8.	3,00	465,992	323,10
9.	2,60	663,816	543,51
10.	2,50	407,310	335,06
11.	2,28	623,148	573,32
12.	2,82	413,517	725,28
13.	2,58	428,090	822,01
14.	2,69	706,618	555,11
15.	2,39	694,970	613,92
16.	2,66	495,390	928,36
17.	2,44	580,350	1192,45
18.	2,61	434,330	824,95
19.	2,39	625,250	548,89
20.	2,09	639,300	642,67
21.	2,98	405,270	672,00
22.	2,41	524,600	451,24
23.	2,10	562,028	557,58
24.	2,77	329,410	597,47

25.	2,43	241,540	490,69
26.	2,99	394,630	668,34
27.	2,22	240,440	534,50
28.	2,81	330,830	591,62
29.	2,53	244,090	476,60
30.	2,90	289,920	498,99
31.	2,95	381,310	653,63
32.	2,97	356,710	605,62
33.	2,95	332,820	567,10
34.	2,54	319,080	630,16
35.	2,42	218,460	442,51

Pod brojem 7. je uzorak bolesne djevojčice, a pod brojevima 6., 8., 9. i 10. su uzorci njene obitelji.

**Tablica 3.** TPP1 aktivnost enzima u leukocitima (nmol/sat/mg proteina) u zdravih ispitanika, NCL2 heterozigota i potvrđenog NCL2 bolesnika

	Zdravi ispitanici (n=30)	NCL2 heterozigoti (roditelji bolesnika) (n=2)	NCL bolesnik (n=1)
<b>Mean ± SD</b>	627,5 (± 155,3)	325,5	4,1
<b>Minimum</b>	442,5		
<b>Maksimum</b>	1192,5		



**Slika 8.** TPP1 aktivnost enzima u leukocitima (nmol/sat/mg proteina) u zdravih ispitanika, NCL2 heterozigota i potvrđenog NCL2 bolesnika

**Tablica 4.** Izmjerene koncentracije proteina, apsorbancije i aktivnosti enzima  $\beta$ -heksozaminidaze A i B u uzorcima leukocita

Broj uzorka	Koncentracija proteina (mg/mL)	Apsorbancija $\beta$ -heksozaminidaze A i B	Aktivnost $\beta$ -heksozaminidaze A i B (nmol/sat/mg proteina)
1.	1,63	88,83	617,63
2.	2,25	165,97	1074,85
3.	1,89	130,49	880,29
4.	1,50	119,90	815,32
5.	1,26	80,79	545,01
6.	2,50	113,48	771,66

7.	1,80	73,73	522,25
8.	3,00	131,43	744,77
9.	2,60	88,84	580,87
10.	2,50	111,80	760,24
11.	2,28	81,91	523,48
12.	2,82	163,10	983,23
13.	2,58	100,33	661,09
14.	2,69	102,88	650,17
15.	2,39	73,48	522,66
16.	2,66	130,04	831,08
17.	2,44	92,80	646,56
18.	2,61	117,78	767,15
19.	2,39	81,94	582,84
20.	2,09	78,42	546,74
21.	2,98	96,03	547,82
22.	2,41	77,88	549,36
23.	2,10	108,51	752,93
24.	2,77	120,28	738,18
25.	2,43	66,04	462,01
26.	2,99	105,91	602,16
27.	2,22	78,39	514,53
28.	2,81	115,66	699,72
29.	2,53	97,47	654,94
30.	2,90	86,37	506,31
31.	2,95	116,63	672,11
32.	2,97	99,10	567,24
33.	2,95	122,04	703,28
34.	2,54	102,69	687,30
35.	2,42	82,50	579,55

## 4.2. Rasprava

Za mjerenje aktivnosti CLN2 u homogenatu leukocita koristili smo modifikaciju fluorimetrijske metode (Sohar i sur., 2000.).

Za izolaciju leukocita odgovarajuće kvalitete potrebno je često i više od 3 mL EDTA krvi koju treba dostaviti u laboratorij unutar 24 sata od uzorkovanja. To je ponekad ograničavajući čimbenik za širu primjenu selektivnog probira na CLN2. Zbog toga bi kao prva metoda probira trebala biti dostupna i metoda mjerenja aktivnosti TPP1 iz uzorka suhe kapi krvi na filter papiru. Rezultati fluorimetrijske *in house* metode mjerenja aktivnosti TPP1 iz homogenata leukocita ovise u velikoj mjeri o kvaliteti pripremljenog homogenata koja se uvijek mora ispitati i mjerenjem nekog kontrolnog lizosomskog enzima. Uz to je potrebno ručno mjerenje ukupnih proteina i priprema niza reagensija, pa je metoda vremenski prilično zahtjevna. Kako bi dokazali da su naši uzorci kvalitetno izolirani i da su rezultati dobiveni iz njih relevantni za daljnja istraživanja, kao kontrolni enzim korištena je aktivnost  $\beta$ -heksozaminidaze A i B. S obzirom da su sve aktivnosti enzima  $\beta$ -heksozaminidaze A i B bile unutar referentnih intervala (tablica 4.), možemo biti sigurni da su uzorci homogenata leukocita u potpunosti odgovarajući za mjerenje aktivnosti tripeptidil peptidaze 1.

Kao kod svake *in house* metode, bilo je neophodno provjeriti referentne intervale za novu fluorimetrijsku metodu. Literaturni navodi također napominju da se apsolutne vrijednosti enzimske aktivnosti TPP1 razlikuju od laboratorija do laboratorija ovisno o promjenama u samoj metodi, npr. korištenju različitog inhibitora proteaze, pH same reakcije, te specifičnosti fluorimetra (Fietz i sur., 2016.).

Referentni interval je određen aritmetičkom sredinom  $\pm$  standardna devijacija na malom broju ispitanika ( $n=33$ ). No i u tako malom uzorku jasno se vidi značajno snižena aktivnost u bolesnika kao i umjereno snižena aktivnost u heterozigota (slika 8.).

## 5. ZAKLJUČAK

*In house* fluorimetrijska metoda određivanja aktivnosti enzima tripeptidil peptidaze 1 u leukocitima izoliranim iz EDTA krvi pokazala se kao pouzdana metoda za postavljanje dijagnoze CLN2. Takva se metoda može koristiti u selektivnoj laboratorijskoj dijagnostici nakon postavljene kliničke sumnje na CLN2. Međutim, prije početka liječenja dostupnom enzimskom nadomjesnom terapijom potrebna je konačna potvrda dijagnoze odgovarajućom genskom analizom.

Za primjenu u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici potrebno je proširiti ispitivanje referentnog intervala na većem broju uzoraka, prvenstveno djece do pete godine života, jer su oni ciljana populacija za buduću CLN2 dijagnostiku. Do sada u literaturi nije opisana razlika u referentnim intervalima ovisno o dobi i spolu.



## 6. LITERATURA

- About Rare Diseases, 2012., [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education\\_AboutRareDiseases.php?lng=EN](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_AboutRareDiseases.php?lng=EN), pristupljeno 05.04.2019.
- Barić I. Nasljedne metaboličke bolesti. U: Pedijatrija, osmo prerađeno i dopunjeno izdanje. Mardešić D i sur., Zagreb, Školska knjiga, 2016, str.127-181.
- Fietz M, AlSayed M, Burke D, Cohen-Pfeffer J, Cooper JD, Dvorakova L, Giugliani R, Izzo E, Jahnova H, Lukacs Z, Mole SE, Noher de Halac I, Pearce DA, Poupetova H, Schulz A, Specchio N, Xin W, Miller N. Diagnosis of neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 (CLN2 disease): Expert recommendations for early detection and laboratory diagnosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2016, 119, 160-167.
- Fumić K, Barić I, Mrić M, Maradin M. Lizosomske bolesti nakupljanja – suvremena dijagnostika i nove mogućnosti liječenja. *Paediatr Croat*, 2004; 48: 160-168.
- Fumić K, Bilić K: Laboratorijska dijagnostika nasljednih metaboličkih poremećaja. U: Klinička kemija i molekularna dijagnostika, Sertić J i sur., Zagreb, Medicinska naklada, 2008, str. 118-124.
- Genetics Home Reference, TPP1 gene, <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TPP1#location>, pristupljeno 03.06.2019.
- Kollmann K, Uusi-Rauva, K, Scifo E, Tyynelä J, Jalanko A, Baulke T. Cell biology and function of neuronal ceroid lipofuscinosis-related proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013; 1832: 1866-1881.
- Schieppati A, Henter JJ, Daina E, Aperia A. Why rare diseases are an important medical and social issue. *Lancet*, 2008; 371: 2039-2041.

Schulz A, Ajayi T, Specchio N, De Los Reyes E, Gissen P, Ballon D, Dyke JP, Cahan H, Slasor P, Jacoby D, Kohlschütter A. Study of Intraventricular Cerliponase Alfa for CLN2 Disease. *The New England Journal of Medicine*, 2018, 378, 1898-1907.

Schulz A, Kohlschütter, Mink J, Simonati A, Williams R. NCL diseases – clinical perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013; 1832: 1801-1806.

Sheehan D. Physical Biochemistry: Principles and applications. Second Edition. Chichester Wiley-Blackwell, 2009, str.53.-69.

Sohar I, Lin L, Lobel P: Enzyme-based diagnosis of classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: comparison of tripeptidyl peptidase I and pepstatin-insensitive protease assays. *Clin Chem*, 2000; 46: 1005-1008.

Steinfeld R, Heim P, Von Gregory H, Meyer K, Ullrich K, Goebel HH. Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: Quantitative description of the clinical course in patients with *CLN2* mutations. *American Journal of Medical Genetics*, 2002, 112, 347-354.

Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F i sur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju. Zagreb, Medicinska naklada, 1997, str.47.-49.

Vines DJ, Warburton MJ. Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl peptidase I. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1999; 443, 131-135.

Williams RE, Adams HR, Blohm M, Cohen-Pfeffer JL, De los Reyes E, Denecke J, Drago K, Fairhurst C, Frazier M, Guelbert N, Kiss S, Kofler A, Lawson JA, Lehwald L, Leung MA, Mikhaylova S, Mink JW, Nickel M, Shediak R, Sims K, Specchio N, Topcu M, Von Löbbecke I, West A, Zernikow B, Schulz A. Management Strategies for CLN2 Disease. *Pediatric Neurology*, 2017; 69: 102-112.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Neuronalne ceroidne lipofuscinoze (NCL) su nasljedne, progresivno degenerativne bolesti koje prvenstveno utječu na mozak i mrežnicu. One se smatraju lizosomalnim poremećajima skladištenja (LSD), zbog njihovog karakterističnog nakupljanja autofluorescentnih ceroidnih lipopigmenata, podjedinica C mitohondrijskih ATP sintetaza ili sfingolipidnih aktivatorskih proteina A i D u lizosomima većine stanica. Klasični kasni infantilni oblik NCL je uzrokovan mutacijama u CLN2 genu koji kodira lizosomalnu tripeptidil peptidazu 1. Klasični kasni infantilni fenotip CLN2 bolesti ima predvidljiv klinički tijek obilježen epilepsijom i brzim padom psihomotoričkih sposobnosti. Najčešći početni simptomi su kašnjenje razvoja govora i napadaji, koji se obično počinju pojavljivati u dobi između 2 i 4 godine.

Rana dijagnoza CLN2 (neuronalna ceroidna lipofuscinoza tipa 2) bolesti je presudna kako bi se osigurala optimalna skrb za bolesnike i njihove obitelji. CLN2 bolest je moguće dijagnosticirati mjerenjem aktivnosti enzima TPP1. TPP1 enzim je pepstatin-nestabilna lizosomska serin egzopeptidaza s optimalnom *in vitro* aktivnošću u kiselom pH. Razvijena je rekombinantna terapija za liječenje CLN2, cerliponaza alfa, koja je najučinkovitija kod primjene nakon pojave prvih simptoma bolesti.

Cilj rada je uvođenje metode za mjerenje aktivnosti enzima tripeptidil peptidaze 1 u uzorku leukocita izoliranih iz pune krvi.

*In house* fluorimetrijska metoda određivanja aktivnosti enzima tripeptidil peptidaze 1 u leukocitima izoliranim iz EDTA krvi pokazala se kao pouzdana metoda za postavljanje dijagnoze CLN2. Takva se metoda može koristiti u selektivnoj laboratorijskoj dijagnostici nakon postavljene kliničke sumnje na CLN2. Za primjenu u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici potrebno je proširiti ispitivanje referentnog intervala na većem broju uzoraka, prvenstveno djece do pete godine života, jer su oni ciljana populacija za buduću CLN2 dijagnostiku. Međutim, zbog brojnih ograničenja fluorimetrijske metode, kao prva metoda probira preporučuje se metoda mjerenja aktivnosti TPP1 iz uzorka suhe kapi krvi na filter papiru.

## SUMMARY

The neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) are inherited progressive degenerative diseases that primarily affect the brain and retina. They are considered lysosomal storage disorders (LSD), because of their characteristic accumulation of autofluorescent ceroid lipopigments, subunit c of mitochondrial ATP synthase or sphingolipid activator proteins A and D in lysosomes of most cells. The classic late infantile onset NCL is caused by mutations in CLN2 gene which encodes lysosomal tripeptidyl peptidase 1. The classic late-infantile phenotype of CLN2 disease has a predictable clinical course marked by epilepsy and rapid psychomotor decline. The most common initial symptoms are language delay and seizures, which typically begin to manifest between the ages of two to four years.

Early diagnosis of CLN2 disease is crucial to ensure optimum care for patients and their families. CLN2 disease can be diagnosed by measuring the activity of the enzyme TPP1. TPP1 enzyme is a pepstatin-insensitive lysosomal serine exopeptidase with optimal *in vitro* activity at acidic pH. Recombinant therapy for the treatment of CLN2 has been developed, cerliponase alpha, which is most effective when is applied after the first symptoms of the disease.

The aim of the study was to introduce methods for measuring the activity of the enzyme tripeptidyl peptidase 1 in a sample of leukocytes isolated from full blood.

*In house* fluorimetric method of determining the activity of the enzyme tripeptidyl peptidase 1 in leukocytes isolated from EDTA blood has proven to be a reliable method for diagnosing CLN2. Such a method can be used in selective laboratory diagnostics after clinical suspected CLN2. For routine laboratory diagnostics, it is necessary to extend the reference interval test on a large number of samples, primarily children up to the age of five, as they are a target population for future CLN2 diagnostics. However, due to the numerous limitations of the fluorimetric method, the method of measurement of TPP1 activity from the dry blood sample on filter paper is recommended as the first method of screening.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Fluorimetrijska metoda za mjerenje aktivnosti tripeptidil peptidaze 1 u homogenatu leukocita

Nikolina Blažević

#### SAŽETAK

Neuronalne ceroidne lipofuscinoze (NCL) su nasljedne, progresivno degenerativne bolesti koje prvenstveno utječu na mozak i mrežnicu. One se smatraju lizosomalnim poremećajima skladištenja (LSD), zbog njihovog karakterističnog nakupljanja autofluorescentnih ceroidnih lipopigmenata, podjedinica C mitohondrijskih ATP sintetaza ili sfingolipidnih aktivatorskih proteina A i D u lizosomima većine stanica. Klasični kasni infantilni oblik NCL je uzrokovan mutacijama u CLN2 genu koji kodira lizosomalnu tripeptidil peptidazu 1. Klasični kasni infantilni fenotip CLN2 bolesti ima predvidljiv klinički tijek obilježen epilepsijom i brzim padom psihomotoričkih sposobnosti. Najčešći početni simptomi su kašnjenje razvoja govora i napadaji, koji se obično počinju pojavljivati u dobi između 2 i 4 godine.

Rana dijagnoza CLN2 (neuronalna ceroidna lipofuscinoza tipa 2) bolesti je presudna kako bi se osigurala optimalna skrb za bolesnike i njihove obitelji. CLN2 bolest je moguće dijagnosticirati mjerenjem aktivnosti enzima TPP1. TPP1 enzim je pepstatin-nestabilna lizosomska serin egzopeptidaza s optimalnom *in vitro* aktivnošću u kiselom pH. Razvijena je rekombinantna terapija za liječenje CLN2, cerliponaza alfa, koja je najučinkovitija kod primjene nakon pojave prvih simptoma bolesti.

Cilj rada je uvođenje metode za mjerenje aktivnosti enzima tripeptidil peptidaze 1 u uzorku leukocita izoliranih iz pune krvi.

*In house* fluorimetrijska metoda određivanja aktivnosti enzima tripeptidil peptidaze 1 u leukocitima izoliranim iz EDTA krvi pokazala se kao pouzdana metoda za postavljanje dijagnoze CLN2. Takva se metoda može koristiti u selektivnoj laboratorijskoj dijagnostici nakon postavljene kliničke sumnje na CLN2. Za primjenu u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici potrebno je proširiti ispitivanje referentnog intervala na većem broju uzoraka, prvenstveno djece do pete godine života, jer su oni ciljana populacija za buduću CLN2 dijagnostiku. Međutim, zbog brojnih ograničenja fluorimetrijske metode, kao prva metoda probira preporučuje se metoda mjerenja aktivnosti TPP1 iz uzorka suhe kapi krvi na filter papiru.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 38 stranica, 8 grafičkih prikaza, 4 tablice i 16 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Neuronalna ceroidna lipofuscinoza tipa 2, tripeptidil peptidaza 1, Battenova bolest

Mentor: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Petra Turčić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2019.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of medical biochemistry and hematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Fluorimetric method for measuring activity of the tripeptidyl peptidase 1 in the leukocyte homogenate

Nikolina Blažević

#### SUMMARY

The neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) are inherited progressive degenerative diseases that primarily affect the brain and retina. They are considered lysosomal storage disorders (LSD), because of their characteristic accumulation of autofluorescent ceroid lipopigments, subunit c of mitochondrial ATP synthase or sphingolipid activator proteins A and D in lysosomes of most cells. The classic late infantile onset NCL is caused by mutations in CLN2 gene which encodes lysosomal tripeptidyl peptidase 1. The classic late-infantile phenotype of CLN2 disease has a predictable clinical course marked by epilepsy and rapid psychomotor decline. The most common initial symptoms are language delay and seizures, which typically begin to manifest between the ages of two to four years.

Early diagnosis of CLN2 disease is crucial to ensure optimum care for patients and their families. CLN2 disease can be diagnosed by measuring the activity of the enzyme TPP1. TPP1 enzyme is a pepstatin-insensitive lysosomal serine exopeptidase with optimal *in vitro* activity at acidic pH. Recombinant therapy for the treatment of CLN2 has been developed, cerliponase alpha, which is most effective when is applied after the first symptoms of the disease.

The aim of the study was to introduce methods for measuring the activity of the enzyme tripeptidyl peptidase 1 in a sample of leukocytes isolated from full blood.

*In house* fluorimetric method of determining the activity of the enzyme tripeptidyl peptidase 1 in leukocytes isolated from EDTA blood has proven to be a reliable method for diagnosing CLN2. Such a method can be used in selective laboratory diagnostics after clinical suspected CLN2. For routine laboratory diagnostics, it is necessary to extend the reference interval test on a large number of samples, primarily children up to the age of five, as they are a target population for future CLN2 diagnostics. However, due to the numerous limitations of the fluorimetric method, the method of measurement of TPP1 activity from the dry blood sample on filter paper is recommended as the first method of screening.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 38 pages, 8 figures, 4 tables and 16 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Neuronal ceroid lipofuscinosis type 2, tripeptidyl peptidase 1, Batten disease

Mentor: **Ksenija Fumić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ksenija Fumić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Petra Turčić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2019.