

## Abstrakt

Prionopatie, taktiež nazývané transmisívne spongiformné encefalopatie (TSE), a synukleínopatie predstavujú skupinu neurodegeneratívnych ochorení, ktoré sú asociované s akumuláciou nesprávne zložených proteínov (prión a  $\alpha$ -synukleín) prevažne v centrálnom nervovom systéme. Kvôli absencii spoľahlivého biomarkera je včasná a definitívna diagnostika počas života pacienta nedostupná. Zlatým štandardom preto zostáva priama *post-mortem* detekcia patologicky zložených proteínov v mozgovom tkanive pomocou western blotu a imunohistochemie. Avšak v posledných rokoch sa pre ultra-senzitívnu *ante-mortem* diagnostiku zaviedli metódy so spoločným názvom "seeding amplification assays (SSAs)" akou je aj Real-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIC). SAAs využívajú schopnosť patologicky zložených proteínov, ktoré sú prítomné v patientskej vzorke, zmeniť konformáciu a iniciovať agregáciu monomérneho rekombinantného proteínu v substráte vďaka "prion-like" mechanizmu.

V prezentovanej dizertačnej práci sme analyzovali prión konvertujúcu aktivitu v *post-mortem* TSE (n=38) a non-TSE (n=30) vzorkách cerebrospinálneho moku (CSF) a korešpondujúcich vzoriek koží pomocou druhej generácie RT-QuIC metódy (55°C, 700 rpm, cykly 1 min dvoj orbitálneho trepania a 1 min inkubácia) s využitím rekombinantného skráteného priónového proteínu škrekča zlatého (rHAPrP90-231) ako substrátu. Vo vzorkách CSF, sme boli schopní dosiahnuť 100 % senzitivitu a špecificitu až po nariedení vzoriek, ktoré odstráni efekt inhibítorov prítomných vo vzorke. Vo vzorkách kože sme dosiahli 89,5 % senzitivitu a 100% špecificitu. Prekvapivo, analýza vzoriek ukázala vyššiu priemernú prión konvertujúcu aktivitu vo vzorkách koží než v CSF. Na bližšie preskúmanie diagnostického potenciálu kože, sme analyzovali vzorky kože (z apexu hlavy a ušného laloku) z myši, ktoré boli intracerebrálne alebo subkutánne inokulované priónovým kmeňom RML. Subkutánne inokulované myši vykazovali RT-QuIC pozitívny signál v koži z apexu a ušného laloku 12 a 40 dní pred nástupom klinických príznakov. Avšak myši, ktoré boli inokulované intracerebrálne vykazovali pozitívnu prión konvertujúcu aktivitu v koži až po nástupe symptómov. Navyše sme otestovali prión konvertujúcu aktivitu u dvoch súrodencov s genetickou Creutzfeldt-Jakobovou chorobou (CJD) s novou mutáciou piatich oktapeptidových repetitívnych inzercí (5-OPRI, R1-R2-R2-R3-R4-**R2-R2-R3-R3-R4**) v *PRNP* géne. U obidvoch pacientov bola doba ochorenia dlhšia ako 10 rokov. V prvom prípade sme detegovali prión konvertujúcu aktivitu v každej testovanej vzorke (frontálny lalok, mozoček, CSF a koža). Naopak, v druhom prípade sme nedetegovali žiadnu RT-QuIC pozitivitu čo naznačuje možnú prítomnosť iného priónového kmeňa. Úspešne sme zaviedli protokol na RT-QuIC analýzu parafrínových vzoriek mozgu fixovaných vo formalíne od pacientov s TSE a demonštrovali schopnosť metódy detegovať prióny v kohorte pacientov s TSE (n=30) a kontrolných non-TSE (n=30) pacientov.

Okrem toho sme zaviedli RT-QuIC metódu adaptovanú na synukleínopatie (42°C, 400 rpm, cykly 1 min dvoj orbitálneho trepania a 1 min inkubácie). Validovali sme  $\alpha$ -syn konvertujúcu aktivitu u 15 *post-mortem* vzoriek mozgových homogenátov a CSF s definitívnou diagnózou Demencie s Lewyho telieskami (DLB, n=6), Alzheimerovej choroby s amygdala Lewyho telieskami (ALB, n=3) a Creutzfeldt-Jakobovej choroby s DLB (CJD/DLB, n=6) komorbiditou so 100 % senzitivitou a 92,9 % špecificitou. Taktiež sme reportovali detekciu vyššej  $\alpha$ -syn konvertujúcej aktivity u pár non-TSE kontrolných vzoriek. Avšak pri dvoch vzorkách bola potvrdená sekundárna synukleínopatia po neuropatologickej reanalýze na podnet našich RT-QuIC výsledkov.

**Kľúčové slová:** diagnostika, neurodegeneratívne ochorenia, prión, CJCH,  $\alpha$ -synukleín, synukleínopatia, RT-QuIC