

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicině
Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Eva Šafaříková

Vlastnosti specifických protilátek prionových chorob a možnosti jejich využití

Specific prion protein antibodies characterisation and use in diagnostics

Disertační práce

Vedoucí disertační práce: doc. Ing. Karel Holada, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31.7.2014

Eva Šafaříková

Podpis

Identifikační záznam:

ŠAFAŘÍKOVÁ, Eva. *Vlastnosti specifických protilátek prionových chorob a možnosti jejich využití v diagnostice. [Specific prion protein antibodies characterisation and use in diagnostics]*. Praha, 2014. Stran 110, přílohy 4. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav imunologie a mikrobiologie. Vedoucí práce Ing. Holada, Karel, Ph.D.

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat mému školiteli doc. Karlu Holadovi za jeho odborné vedení a pomoc během celé doby studia.

Dále děkuji celému týmu prionové laboratoře, zvláště pak Dr. Olze Janouškové a Aleně Hudákové za odborné rady i pomoc v laboratoři.

Zvláštní poděkování patří i Dr. Jaroslavu Šebestíkovi a Martinu Šafaříkovi z ÚOCHB za pomoc s HPLC a za rady v oblasti organické chemie.

Poděkování patří i Dr. Radoslavu Matějovi za zhotovení imunohistologických preparátů a jejich zhodnocení a Ing. Janě Novákové za pomoc i zázemí v národní referenční laboratoři TSE-CJN na oddělení patologie ve FTN.

Ráda bych poděkovala i své rodině za jejich podporu a pomoc.

Obsah

Obsah	5
Souhrn	6
Abstract	7
Abecední seznam zkratk	8
1. Teoretická část	12
1.1. Prionová onemocnění	12
1.2. Prionový protein	15
1.3. Prionová diverzita	19
1.4. Diagnostika prionových onemocnění	21
1.5. Konformačně specifické protilátky proti PrP ^{TSE}	24
1.6. Glykovaný prionový protein	33
2. Cíle	36
3. Materiál a metody	37
3.1. Materiál	37
3.2. Příprava rekombinantního prionového proteinu	41
3.3. Příprava a využití protilátek proti glykovanému prionovému proteinu	46
3.4. Detekce fragmentu prionového proteinu PrP226* v lidském mozku	50
4. Výsledky	54
4.1. Příprava rekombinantního prionového proteinu	54
4.2. Příprava a využití protilátek proti glykovanému prionovému proteinu	67
4.3. Detekce fragmentu prionového proteinu PrP226* v lidském mozku	79
5. Diskuze	91
5.1. Diskuze k přípravě rekombinantního prionového proteinu	91
5.2. Diskuze k přípravě a využití protilátek proti glykovanému prionovému proteinu	92
5.3. Diskuze k detekci fragmentu prionového proteinu PrP226* v lidském mozku ..	96
6. Závěr	101
7. Citace	102
8. Přílohy	110

Souhrn

Transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE) jsou neurodegenerativní onemocnění charakterizovaná ukládáním patologické formy prionového proteinu (PrP^{TSE}) v mozku. V současnosti je PrP^{TSE} jediný specifický biochemický marker lidských a zvířecích TSE. Laboratorní diagnostika je založena na průkazu rezistentního jádra PrP^{TSE} (PrPres) po štěpení vzorku mozkového homogenátu proteinázou K. PrPres je posléze detekován pomocí western blotu nebo imunometodami. Obě metody jsou však obtížně standardizovatelné, časově náročné a nejsou schopné zachytit k proteolytickému štěpení senzitivní formy PrP^{TSE} . V této práci jsme se zaměřili na přípravu nového typu testů založených na průkazu PrP^{TSE} bez nutnosti štěpení proteinázou K či jiným enzymem.

Působením glukózy a jiných redukujících cukrů v organismu vzniká spektrum produktů zvaných koncové produkty glykace. Vzhledem k dlouhodobému ukládání prionových depozit v mozku dochází ke glykaci i u PrP^{TSE} . Detekce glykovaného PrP^{TSE} by tak mohla sehrát roli diagnostického markeru. V rámci první části studie jsme se zaměřili na přípravu monoklonálních protilátek specifických pro glykovaný prionový protein. Připravili jsme bakteriálně exprimovaný rekombinantní lidský prionový protein (rhPrP). Na rhPrP jsme působili kyselinou glyoxalovou za vzniku karboxymethyl modifikovaného rhPrP (rhPrP-CML), který představuje hlavní složku koncových produktů glykace v organismu. rhPrP-CML byl použit k imunizaci myši a přípravě hybridomových buněk. Screeningem buněčných supernatantů byly vybrány 4 slibné klony. Jeden z nich (EM-31) silně reaguje s lidským a myším rekombinantním PrP-CML a tři další klony navíc reagují s CML *in vitro* modifikovaným lidským a myším mozkiem.

V další části studie jsme vyvinuli sendvičovou DELFIA imunoesej pro detekci prionového fragmentu PrP226* v lidských mozkových homogenátech. Zjistili jsme, že fragment PrP226* se hromadí v prionových agregátech a po jeho uvolnění denaturací jej lze specifickou protilátkou V5B2 detekovat bez nutnosti štěpení proteinázou K. Podíl množství PrP226* měřeného v nativních a denaturovaných vzorcích byl signifikantně odlišný u vzorků mozků pacientů postižených TSE a vzorků kontrolních.

Klíčová slova: transmisivní spongiformní encefalopatie, Creutzfeldtova-Jakobova nemoc, GSS, prion, V5B2, imunoesej, DELFIA, prionový fragment 226*, proteináza K

Abstract

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are neurodegenerative diseases characterized by depositions of abnormally folded prion protein (PrP^{TSE}) in brain. PrP^{TSE} is at present the only specific biochemical marker of human and animal TSEs. Diagnostic tests are based on the detection of PrPres after proteinase K digestion of brain homogenate using Western blot or on the immunohistochemistry of fixed brain tissue, which are both difficult and time consuming. In this work we focused on development of a new type of tests based on PrP detection without need of proteinase K digestion.

As deposits of PrP^{TSE} remain in the body for a long time, there is a substantial chance of them being nonenzymatically modified by glycation. The detection of glycated PrP^{TSE} may have a potential to serve as a diagnostic marker. We prepared monoclonal antibodies specific for carboxymethyl lysine/arginine modified prion protein. Bacterially expressed and purified recombinant human prion protein (rhPrP) was modified by glyoxylic acid that introduces carboxymethyl groups on lysine and arginine residues present within the molecule of the protein. Modified rhPrP (rhPrP-CML) was used for immunization of laboratory mice and hybridoma cells were prepared. Screening of cell supernatants resulted in the selection of 4 promising clones. One of them (EM-31) strongly reacts with human and mouse recombinant PrP-CML and three other clones react also with CML *in vitro* modified human and mouse brain PrP.

Next we focused on development of DELFIA based assay for a quick and sensitive detection of the GPI-anchorless prion protein fragment, named PrP226*, in human brain tissue homogenates. By calculating the ratio between the signals of native and denatured samples applied to the assay we were able to observe significant difference between TSE affected brains and control brains. In the present study we show that the PrP226* fragment accumulates in prion aggregates and after being released from them by a denaturation procedure, it could serve as a proteinase K digestion independent biomarker for human TSEs.

Keywords: Transmissible Spongiform Encephalopathies, Creutzfeldt-Jakob disease, GSS, Prion, V5B2, Immunoassay, DELFIA, Anchorless PrP, PrP226* fragment, Proteinase K

Abecední seznam zkratek

A β	amyloid β
AD	Alzheimerova choroba
ACN	acetonitril
AGEs	„advanced glycation end products“, koncové produkty glykace
AK	aminokyselina
AP	alkalická fosfatáza
BALB/c	běžně používaný inbrední kmen albinotických laboratorních myší
BCA	„bicinchoninic acid“
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro-tetrazoliová modř
BSA	bovinní sérový albumin
BSE	bovinní spongiformní encefalopatie
C18	oktadecylový uhlíkový řetězec
C57BL	běžně používaný inbrední kmen laboratorních myší
CD	cirkulární dichroismus
cDNA	komplementární DNA
CDI	konformačně-dependentní imunoesej
CJN	Creutzfeldtova-Jakobova nemoc
CML	karboxymethyl lysin
CNS	centrální nervová soustava
DELFLIA	„Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay“
DMSO	dimethylsulfoxid
Dmob	dimethoxybenzyl chlorid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNAáza	deoxyribonukleáza
dNTP's	deoxynukleotidtrifosfáty
DWI	„Diffusion Weighted Images“, difuzně vážené obrazy
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	„Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“
fCJN	familiální Creutzfeldtova-Jakobova nemoc
FFI	fatální familiální insomnie
FLAIR	„Fluid Attenuated Inversion Recovery“, sekvence s potlačením signálu

	tekutiny
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography“
FTNsP	Fakultní Thomayerova nemocnice s poliklinikou
g5p	„gene 5 protein“
GAM-HRP	kozí anti-myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou
Gdn-HCl	guanidin hydrochlorid
Gdn-SCN	guanidin thiokyanát
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GSS	Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom
GSSG	oxidovaný glutathion
His-Tag	histidinová kotva
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
HRP	křenová peroxidáza
IAPP	„Islet Amyloid Polypeptide“, amylin
iCJN	iatrogenní Creutzfeldtova-Jakobova nemoc
IČ	infračervená oblast
IHC	imunohistochemie
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
KLH	„Keyhole Limpet Hemocyanin“, hemocyanin z děrnatky obrovské
LB	Luria-Bertani
MAb	monoklonální protilátka
MALDI-TOF	ionizace laserem za přítomnosti matrice, s detektorem doby letu
MH	mozkový homogenát
MMM	mozkomíšni mok
MRI	„magnetic resonance imaging“
MS	hmotnostní spektrometrie
MWCO	„molecular weight cut-off“
NEB	„New England Biolabs“, Massachusetts
Ni-NTA	kyselina nitriloctová saturovaná Ni^{2+} ionty
OD	optická hustota
PBS	„phosphate buffered saline“
PBS-T	„phosphate buffered saline“ + 0,05% Tween 20
PCR	polymerázová řetězová reakce
PK	proteínáza K

PLTS	krevní destičky
PMCA	„protein misfolding cyclic amplification“
PMSF	fenylmethanolsulfonylfluorid
<i>Prnp</i>	gen kódující prionový protein
<i>Prnp</i> ^{0/0}	absence genu kódujícího prionový protein
PrP	prionový protein
PrP226*	fragment prionového proteinu zakončený tyrosinem 226
PrP27-30	rezistentní fragment prionového proteinu po štěpení proteinázou K
PrP ^C	buněčný prionový protein
PrP(ΔGPI)	prionový protein bez glykosylfosfatidylinositolové kotvy
PrPres	resistentní prionový protein
PrP ^{Sc}	„scrapie“ prionový protein
PrP ^{TSE}	patologický prionový protein
PSPR	proteáza-senzitivní prionopatie
QUIC	assay „quaking-induced conversion“
RAGE	receptor pro AGEs
RBC	ghosts - membrány červených krvinek
rhPrP	rekombinantní lidský prionový protein
rmPrP	rekombinantní myší prionový protein
RML	„Rocky Mountain Laboratories“
RNA	ribonukleová kyselina
RNAáza	ribonukleáza
RP-HPLC	vysokotlaká kapalinná chromatografie na obrácených fázích
rpm	počet otáček za minutu
sCJN	sporadická Creutzfeldtova-Jakobova nemoc
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS
senPrP ^{TSE}	proteáza-senzitivní PrP ^{TSE}
TBE	„Tris-borate-EDTA“
TBS	„Tris buffered saline“
TBS-T	„Tris buffered saline“ + 0,05% Tween 20
TEMED	tetramethylethyldiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin

Tmob	trimethoxybenzyl chlorid
TRF	„Time-Resolved Fluorescence“
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSE	transmisní spongiformní encefalopatie
ÚDMP	Ústav dědičných metabolických poruch 1. LF UK
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie
UV	ultrafialová oblast
vCJN	variantní Creutzfeldtova-Jakobova nemoc
WB	western blot
WHO	Světová zdravotnická organizace
WT	„wild type“

Třípísmenné a jednopísmenné zkratky aminokyselin

A	Ala	alanin	M	Met	methionin
C	Cys	cystein	N	Asn	asparagin
D	Asp	kyselina asparagová	P	Pro	prolin
E	Glu	kyselina glutamová	Q	Gln	glutamin
F	Phe	fenylalanin	R	Arg	arginin
G	Gly	glycin	S	Ser	serin
H	His	histidin	T	Thr	threonin
I	Ile	isoleucin	V	Val	valin
K	Lys	lysin	W	Trp	tryptofan
L	Leu	leucin	Y	Tyr	tyrosin

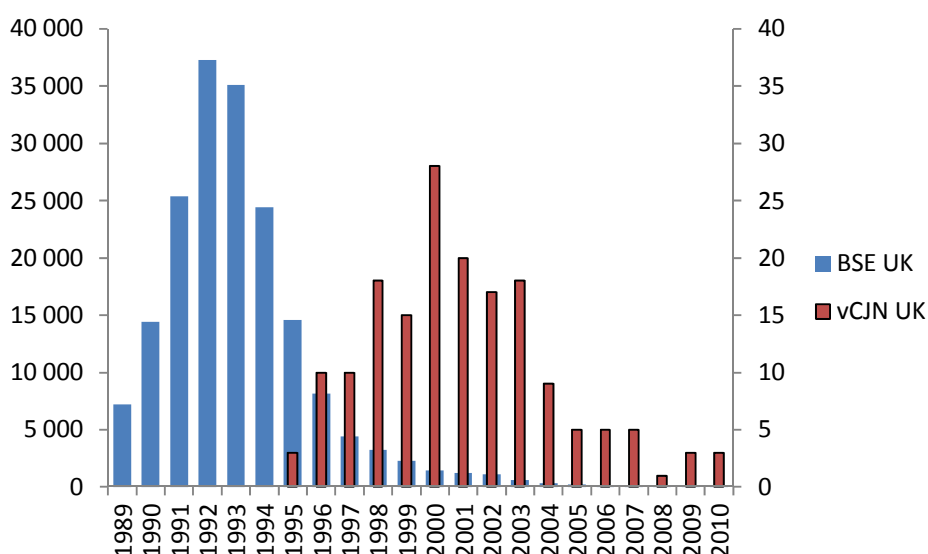
1. Teoretická část

1.1. Prionová onemocnění

Prionová onemocnění, neboli transmisivní spongiformní encefalopatie, jsou smrtelná neurodegenerativní onemocnění charakterizovaná hromaděním prionových agregátů v mozku, progresivní ztrátou neuronů, gliózou a spongiformními změnami [1]. Klinicky se projevují rychle postupující demencí, vizuálními nebo mozečkovými poruchami, pyramidálními nebo extrapyramidálními příznaky, myoklonem a akinetickým mutismem. V závislosti na klinických, genetických a neuropatologických nálezech mohou být lidská prionová onemocnění charakterizována jako sporadická (85% případů), genetická (10 – 15%) nebo získaná (2 – 3%). První lidská prionová choroba byla popsána v letech 1920 – 21 Hansem Creutzfeldtem a Alfonsem Jakobem [2, 3]. V padesátých letech 20. stol. došlo na Nové Guinei k epidemii kuru, která se rozšířila u příslušníků domorodého kmene Fore během rituálního kanibalismu [4]. Celosvětově je nejčastější lidskou prionovou chorobou Creutzfeldtova-Jakobova nemoc (CJN) s incidencí onemocnění 1 – 2 případy na milion obyvatel ročně. Vzácněji se vyskytuje dědičný Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom (GSS) a fatální familiální insomnie (FFI).

Variantní CJN

V současnosti velkou pozornost přitahuje variantní CJN (vCJN), která vznikla s největší pravděpodobností alimentárním přenosem BSE prionů na člověka (Obr. 1). Na rozdíl od klasické CJN postihuje především mladé lidi ve věku 19 – 39 let a liší se i delším průběhem onemocnění (7,5 – 22 měsíců). vCJN není asociovaná s mutacemi *Prnp* genu, nicméně všechny doposud popsané případy se týkají jedinců s Met/Met alelotypem na PrP kodonu 129. Klinicky se nemoc projevuje progresivními neuropsychiatrickými poruchami (halucinace, paranoia) vedoucími k ataxii, demenci a výskytu nevolných pohybů. Charakteristickým diagnostickým znakem jsou absence jinak přítomných změn na EEG a rozdílné neuropatologické nálezy, typicky pak velká prionová depozita floridního tvaru na imunohistochemických mozkových preparátech [5]. Při vCJN se priony akumulují i v orgánech imunitního systému a choroba je přenosná krevní transfuzí [6, 7].



Obr. 1: Počet diagnostikovaných případů BSE a vCJN ve Velké Británii od roku 1989 do současnosti. Data byla převzata ze Světové organizace pro zdraví zvířat (<http://www.oie.int/>) a britské Národní jednotky pro dohled nad CJN (<http://www.cjd.ed.ac.uk/>) a upravena v grafu. Počet případů BSE je uveden v tisících, počet vCJN v jednotkách.

Iatrogenní CJN

Iatrogenní CJN (iCJN) je způsobena přenosem prionů během lékařských nebo chirurgických zákroků. Prvním popsáním iatrogenním přenosem byla transplantace oční rohovky od dárce s nediodagnostikovanou sCJN [8]. Iatrogenní CJN byla dále předána při transplantaci dura mater a v rámci chirurgických zákroků při použití kontaminovaných elektrodových implantátů a kontaminovaných chirurgických nástrojů [9, 10]. K přenosu prionů došlo i při podávání kontaminovaného lidského růstového hormonu izolovaného z lidských hypofýz [11], 5 případů CJN bylo zaznamenáno i u žen léčených v rámci menopauzy lidskými hypofyzárními gonadotropiny [12]. Molekulárně-genetické studie ukázaly, že většina pacientů, u nichž se iCJN po podání růstového hormonu projevila, byla homozygotních pro methionin nebo valin na kodonu 129 *Prnp* genu [13]. Problémy s přenosem byly odstraněny optimální sterilizací chirurgických nástrojů a testováním tkání na výskyt prionů před transplantací. V posledním desetiletí byly zaznamenány ve Velké Británii 4 případy přenosu vCJN krví (<http://www.cjd.ed.ac.uk/TMER/results.htm>). Skutečnost, že preklinicky infikovaní

jedinci mohou přenášet vCJN, vede ke snahám vyvinout dostatečně senzitivní a spolehlivý test ke screeningu krevních elementů před transfuzí.

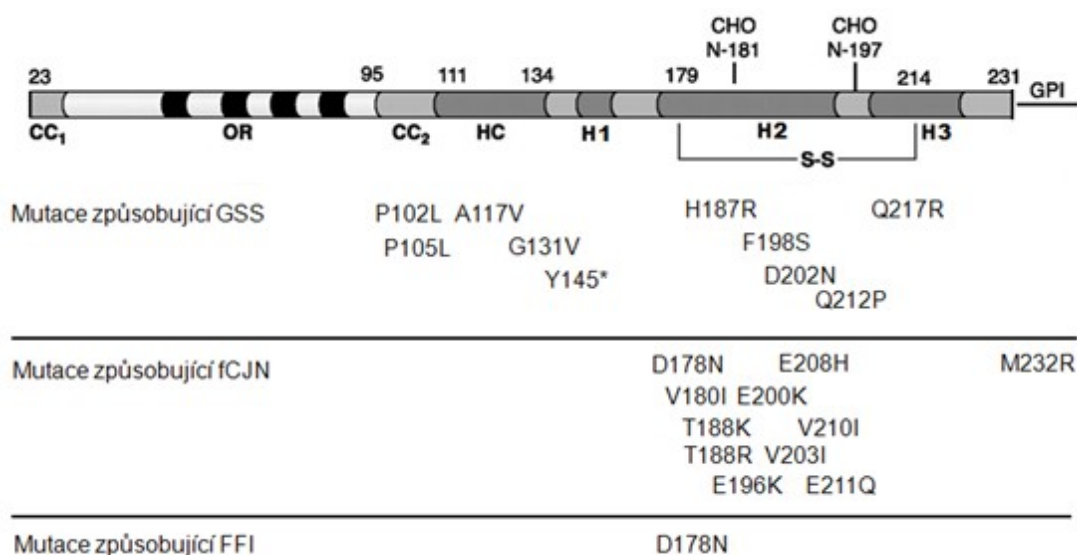
Sporadické CJN

Přibližně 85% všech lidských prionových onemocnění je sporadických (sCJN), tj. vzniká bez známých příčin. Onemocnění se objevuje u lidí ve věku 55 – 70 let a trvá v průměru 2,5 – 6,5 měsíce. U případů sCJN nejsou známy mutace *Prnp* genu ani nebyl prokázán kontakt s TSE, nicméně Met/Val heterozygota na *Prnp* kodonu 129 bývá asociována s nižší incidencí onemocnění nebo prodlouženou inkubační dobou [14]. Nedostatek rutinních laboratorních testů pro preklinickou diagnózu znesnadňuje výzkum rizikových faktorů vzniku sCJN a původ onemocnění tak dlouhodobě zůstává bez vysvětlení. Pravděpodobně se nejedná primárně o spontánní mechanismus špatného poskládání prionového proteinu, neboť tak by s narůstajícím věkem narůstala i pravděpodobnost vzniku sCJD. U lidí však k nejvyšší incidenci onemocnění dochází mezi 55. a 60. rokem života.

Dědičné CJN

Dědičná prionová onemocnění jsou asociována s autozomálně dominantními mutacemi *Prnp* genu. Klinické projevy i neuropatologické nálezy závisí na druhu mutace *Prnp* podílející se na vzniku onemocnění a zahrnují familiální CJN (fCJN), GSS a FFI (Obr. 2). fCJN se mezi dědičnými prionovými chorobami vyskytuje nejčastěji, s převažující mutací E200K. K nástupu příznaků dochází mezi 30. až 50. rokem života, průběh onemocnění trvá několik měsíců až 5 let. Klinicky se fCJN projevuje zmateností, poruchami paměti, rychle progredující demencí, myoklonem, ataxií a akinetickým mutismem. Na imunohistochemických mozkových preparátech lze nalézt synaptická depozita patologického prionového proteinu. GSS se objevuje typicky mezi 40 až 60 lety věku, nejčastější mutací bývá P102L. Klinicky se nemoc projevuje chronickou progresivní ataxií, mozečkovými příznaky, zvýšeným svalovým tonusem a pomalým průběhem onemocnění (2 – 10 let). V terminální fázi dochází k poruchám koordinace, řeči, neschopnosti polykat a k demenci [15]. Na imunohistochemických mozkových preparátech jsou typické prominentní amyloidové plaky [16]. FFI je velmi vzácně se vyskytující prionové onemocnění s typickým nástupem mezi 40 až 50 lety věku, nejčastější mutací bývá D178N [17] spolu s homozygotou pro methionin na 129. kodonu *Prnp*. FFI typicky postihuje thalamus, což má za následek i specifické klinické

projevy, jako jsou poruchy normálního spánkového cyklu a poruchy autonomních funkcí; kognitivní funkce bývají zachovány. Později nastupují poruchy zraku, řeči, ataxie a kompletní nespavost [16]. Charakteristické neuropatologické nálezy jsou atrofovaný thalamus, malé nebo žádné spongiformní změny v mozku a velmi malé množství patologického prionového proteinu v synaptické formě deponit [5].



Obr. 2: Přehled mutací asociovaných s dědičnými prionovými chorobami na lidském PrP^C. Oblasti s pozitivně nabitými AK (CC₁ a CC₂); „octapeptide repeat region“ (OR); hydrofobní oblast (HC); α -šroubovice (H1, H2, H3); glykosylfosfatidylinositolová kotva (GPI); N-vázané glykosidy (CHO N-); disulfidový můstek (S-S). Upraveno z [18].

1.2. Prionový protein

Buněčný prionový protein PrP^C

PrP^C je membránový glykoprotein kódovaný *Prnp* genem, u člověka lokalizovaném na krátkém raménku 20. chromozomu. Vyskytuje se na povrchu většiny buněk v těle [1, 19] a jeho fyziologická funkce zatím nebyla objasněna. Uvažuje se například o jeho úloze v metabolismu mědi, regulaci apoptózy, v procesu učení a paměti, signální transdukci, přenosu vzruchu na synaptické membráně, ovlivnění cirkadiálního rytmu, buněčné diferenciaci, antioxidační ochraně, neuroprotektivních procesech a dalších buněčných dějích [20]. PrP^C vykazuje afinitu k celé řadě buněčných proteinů, nejnovější

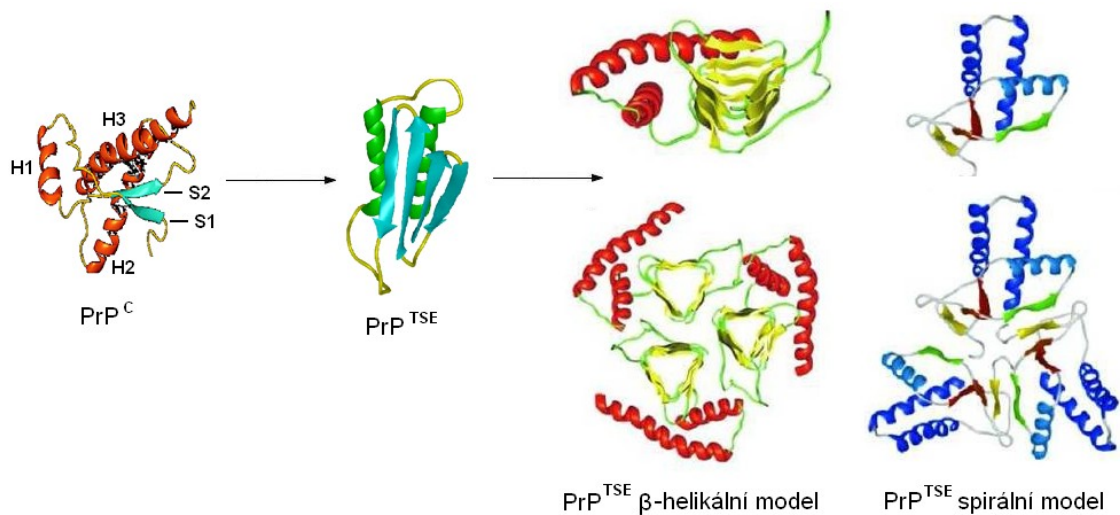
studie např. poukazují na schopnost PrP^C vázat a internalizovat oligomery amyloidu β a tím se významně podílet na rozvoji a progresi Alzheimerovy choroby [21].

Molekula PrP^C obsahuje ve své sekundární struktuře vysoký podíl α -šroubovice (40%), což ji činí dobře štěpitelnou proteázami, nejnějněji štěpitelná je nestrukturovaná N-terminální část. Poločas života molekuly PrP^C v buňce se odhaduje na 3 – 6 hodin [22, 23]. Zatímco N-proximální část molekuly nezaujímá definovanou prostorovou strukturu, C-proximální polovina je strukturována do tří α -šroubovic (AK rezidua 144–154, 173–194 a 200–228 u lidského PrP^C) a jednoho antiparalelního β -skládaného listu (β -řetězce AK reziduí 128–131 a 161–164 u lidského PrP^C) (Obr. 2 a 3). Jeden disulfidový můstek se nalézá mezi Cys₁₇₉ a Cys₂₁₄ [24, 25], ke glykosylaci dochází u lidského PrP^C na Asp₁₈₁ a Asp₁₉₇ (Obr. 2). Je nepravděpodobné, že by N-koncová část proteinu zůstávala neuspořádaná i *in vivo*, neboť studie na transgenních myších prokázaly, že právě doména obsahující rezidua 32–121 zajišťuje důležité fyziologické funkce [26].

PrP^C je do membrány zakotven GPI kotvou v místech lipidových raftů a kontinuálně cirkuluje mezi povrchem buňky a endozomem, internalizován do klathrinem povlečených vesikul [27] nebo v kaveolách [28]. Z endozomu se většina molekul PrP^C uvolňuje a translokuje do membrány, malá část podléhá štěpení a uvolňuje se do intersticia. Tato dráha představuje jednu z možností zprostředkování konverze PrP^C na PrP^{TSE}.

Patologický prionový protein PrP^{TSE}

Podle prionové hypotézy je infekčním agens prionových chorob patologicky složený prionový protein (PrP^{TSE}, někdy též značený PrP^{Sc}), který se množí přímým kontaktem s buněčným prionovým proteinem (PrP^C), jemuž dokáže vnutit svoji patologickou konformaci [1]. Molekula PrP^{TSE} je v průběhu konformačních změn obohacena o strukturu β -skládaného listu (z pouhých 3% u PrP^C na 34% u PrP^{TSE}) [29, 30], která ji činí částečně odolnou vůči proteolýze (Obr. 4). Priony navíc agregují za tvorby amyloidových fibril a vytvářejí v mozku depozita, která se podílí na rozvoji onemocnění. PrP^{TSE} nevytváří krystaly, proto jeho prostorová struktura doposud nebyla uspokojivě objasněna. Bylo však navrženo několik modelů na základě studií elektronové krystalografie a počítačové simulace konverze prionového proteinu [31, 32] (Obr. 3).



Obr. 3: Strukturální modely savčího PrP^{TSE}. V průběhu konformačních změn dochází v centrální oblasti PrP k nárůstu β -skládaného listu ze 3% u PrP^C na 34% u PrP^{TSE}. Na obrázku jsou znázorněny tři α -šroubovice (H1, H2, H3) a jeden antiparalelní β -skládaný list (S1, S2) u monomerního PrP^C. U β -helikálního modelu tvoří rezidua ~90–175 levotočivé β -šroubovice asociující do trimerů, většina C-koncových α -šroubovic monomerního PrP^C zůstává intaktních (upraveno z [31]). Spirální model PrP^{TSE} znázorňuje amyloidové jádro tvořené třemi vlákny β -skládaného listu a jednoho izolovaného β -řetězce, kde všechny tři α -šroubovice z původního PrP^C zůstávají zachovány. Upraveno z [32].

Modely konverze PrP^C na PrP^{TSE}

Propagace savčích prionů vázaná na změny konformace PrP^C na PrP^{TSE} byla prvně popsána heterodimerickou změnou konformace v matricovém modelu [33]. Tento model předpokládá, že PrP^C je termodynamicky méně stabilní než PrP^{TSE}, ale spontánní konverze je kineticky limitována. Kritickým krokem při konverzi je tvorba heterodimeru mezi PrP^C a PrP^{TSE} monomery, kde PrP^{TSE} zastává úlohu templátu a usnadňuje změnu konformace PrP^C. Stabilní monomer PrP^{TSE} nicméně zatím prokázán nebyl, změny konformace i infektivita jsou vázány na proces agregace. [34]. V souladu s těmito daty vznikl model nukleačně-polymerační, který předpokládá, že spontánní konverze probíhá a stabilizuje se přidáváním monomerů ke koncům již existujícího polymeru (jádra) složeného z PrP^{TSE}. Proces pokračuje řetězovou reakcí, jejímž výsledkem je výlučně PrP^{TSE}. Zesílení intenzity spontánní konverze se přisuzuje fragmentaci jádra, která zvyšuje počet vazebných míst pro připojení dalších monomerů

PrP^C [35].

Zásadním průlomem při studiu konverze prionového proteinu bylo vyvinutí metody zvané „protein misfolding cyclic amplification“ (PMCA), která za použití opakujících se sonikačních a inkubačních cyklů umožňuje amplifikaci konformeru PrP^{TSE} za využití PrP^C jako substrátu [36]. Sériovým ředěním produktů reakce PMCA do zdravého mozkového homogenátu obsahujícího PrP^C se původně přidané nukleační jádro PrP^{TSE} statisticky eliminuje a zbydou pouze nově syntetizované agregáty PrP^{TSE}. Novější studie ukázaly, že pro tvorbu infekčního PrP^{TSE} pomocí PMCA lze jako substrátu použít i purifikovaného PrP^C (za přítomnosti malého přídatku detergentu, polyaniontů a lipidů) [37].

Izolace PrP^C z mozkových homogenátů nebo jiného biologického materiálu je pracná a výtěžky čistého PrP^C jsou minimální. Mnoho laboratoří proto přešlo k používání bakteriálně produkovaného rekombinantního prionového proteinu (rPrP), který lze získat snadněji a ve větších množstvích (řádově desítky miligramů čistého rPrP). Přestože rekombinantní protein je produkován bez GPI kotvy i bez obou glykosylací, jeho sekundární a terciární struktura je identická se strukturou PrP^C izolovaného z mozku [38]. rPrP tak představuje užitečný nástroj pro studium fyzikálně-chemických vlastností prionového proteinu a jeho konformačních změn. Prvotní studie ukázaly, že konverze rekombinantního PrP na strukturu β -skládaného listu je nejúčinnější v mírně kyselém prostředí a v přítomnosti nízkých koncentrací chemických denaturantů [39]. Konverze α -šroubovic na β -skládaný list popsaná v těchto studiích nicméně nebyla autokatalytická a neprokazovala schopnost autopropagace infekčních prionů. Autokatalytická (nukleačně-polymerační) konverze rPrP byla prvně uskutečněna redukcí a zpětnou oxidací disulfidových můstků v molekulách PrP [40], kdy po redukcí došlo ke změně konformace rPrP vedoucí ke tvorbě fibril schopných autopropagace v roztoku. V *in vivo* systémech však nebylo prokázáno, že by redukce disulfidových můstků doprovázela konverzi PrP^C \rightarrow PrP^{TSE}. Pozdější studie již prokázaly, že rPrP lze konvertovat do klasických amyloidních fibril bez redukce nativního disulfidového můstku [41]. Zatímco v původních experimentech byla přítomnost chemických denaturantů nebo SDS pro úspěch *in vitro* konverze nezbytná [41-43], současné studie dokazují, že amyloidní fibrily rPrP se tvoří i bez přítomnosti jakýchkoliv denaturantů nebo detergentů [44, 45]. Podobně jako u ostatních amyloidogenních proteinů [46] konverze rPrP do amyloidních fibril začíná pomalou lag fází následovanou rychlou fází růstu. Lag fází lze obejít přídatkem nukleačního jádra (ve formě již hotových agregátů),

kteře umožní okamžitý autokatalytický růst agregátů bez nutnosti pomalé tvorby stabilního prionového nuklea.

1.3. Prionová diverzita

Mezidruhové bariéry

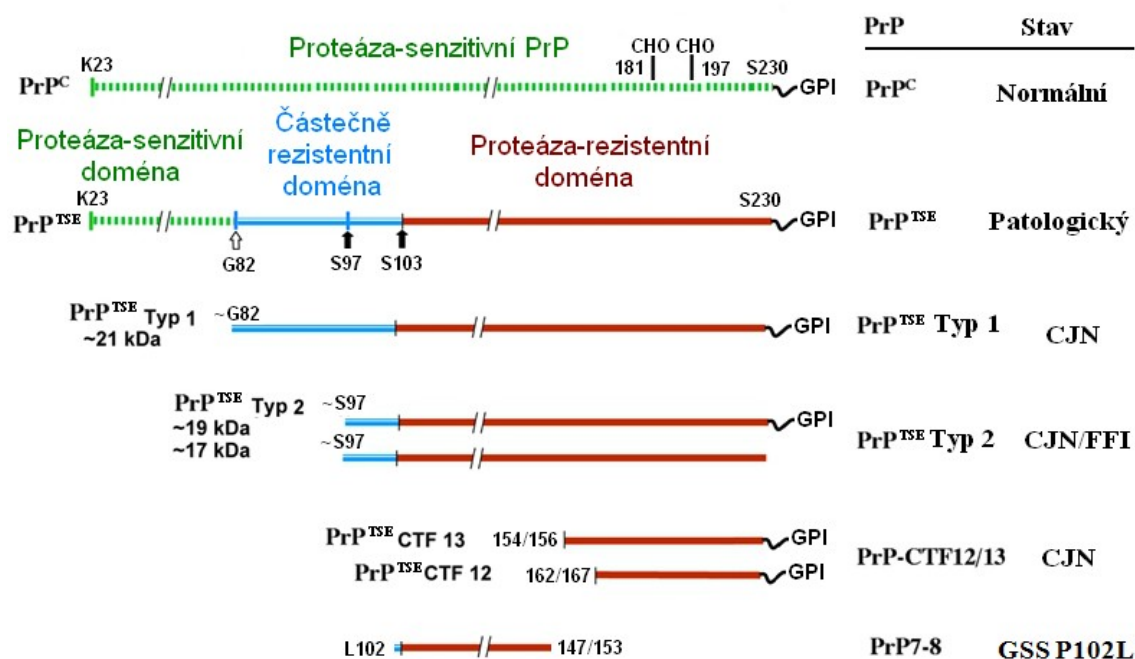
Infekce organismu priony jiného živočišného druhu často vede k opožděnému (pokud vůbec nějakému) nástupu onemocnění. Tento jev byl popsán jako tzv. „mezidruhová bariéra“ [1]. Například křeččí priony jsou pro myši v podstatě neinfekční, a podobně i přenos myších prionů na křečky – i když v tomto případě mnohem efektivnější – vede k prodloužení inkubační doby u infikovaných křečků [47]. Jakmile dojde k etablování onemocnění v cizím hostiteli, dalšími pasážemi prionů izolovaných z tohoto hostitele skrz jedince téhož druhu lze dospět k tzv. „adaptaci“ onemocnění s odpovídajícím snížením inkubační doby a zvýšením infektivity napadených tkání [1, 47]. Co je podstatou tohoto jevu? Studie na transgenních zvířatech prokázaly, že mezidruhové bariéry pro TSE jsou úzce spjaty s rozdíly v sekvencích prionového proteinu mezi organismem dárce a příjemce [48, 49]. Podobné nároky na sekvenční specifitu byly prokázány i v *in vitro* „cell-free“ konverzních esejích [50, 51] a v neuroblastomových buňkách infikovaných priony různých živočišných druhů [52]. Zásadní význam pro zabránění přenosu přitom mělo většinou jen několik specifických aminokyselinových zbytků. Zatímco tyto a mnoho dalších studií jasně poukazuje na zásadní význam aminokyselinové sekvence prionového proteinu u mezidruhových bariér, otázka přenosu TSE byla v nedávné době rozšířena o pojem prionových kmenů.

Prionové kmeny a jejich molekulová podstata

Jedním z nejzáhadnějších aspektů prionových chorob je existence různých „kmenů“ TSE asociovaných s různými fenotypy onemocnění (s odlišnou neuropatologií, klinickými příznaky a inkubační dobou) v rámci téhož živočišného druhu [53, 54]. Taková fenotypová rozmanitost u hostitele jednoho druhu bez rozdílu sekvence PrP genotypu zpochybňovala po dlouhou řadu let Prusinerovu hypotézu, podle které jsou priony pouze špatně sbalené proteiny. Řada experimentů však prokázala, že rozmanitost prionových kmenů lze vysvětlit v souladu s proteinovým modelem, kdy jednotlivé kmeny představují rozdílné konformační stavy PrP^{TSE} agregátů. Zásadní důkazy v tomto směru podaly studie na tzv. „hyper“ a „drowsy“ (ospalých) kmenech u křečků: PrP^{TSE}

asociováno s těmito kmeny je štěpeno proteinázou K na odlišných místech, což jasně poukazuje na konformační rozdíly v molekule PrP^{TSE} [55]. Konformační model byl posléze potvrzen mnoha dalšími studiemi, kdy byly kmenově-specifické rozdíly mezi PrP^{TSE} asociovány s expozicí určitých epitopů na povrchu agregátů, [56], pozicí a intenzitou IČ pásů podmíněných strukturou β-skládaného listu [23] a odolností vůči denaturaci chaotropními činidly [57].

Dalším faktorem přispívajícím k rozmanitosti savčích prionů je glykosylace asparaginových zbytků na pozici 181 a 197 (číslování dle lidské sekvence PrP). Různé TSE kmeny jsou typicky asociovány s různými glykosylačními vzorci PrP^{TSE} (tj. různými poměry zastoupení di-, mono-, a neglykosylované formy). Vzhledem k tomu, že odlišné glykosylační vzorce jsou zachovávány během opakovaných pasáží ve zvířatech, jsou jednotlivé PrP^{TSE} agregáty schopny selektivně vázat pouze PrP^C monomery s podobným poměrem jednotlivých glykoform [53]. Tento jev lze vysvětlit v rámci výše zmíněného konformačního modelu, kdy jednotlivé glykosylační formy dotvářejí strukturu PrP^{TSE} agregátů. Doposud se však nepodařilo vysvětlit, zda glykany ovlivňují konformaci samotné kostry molekuly PrP, nebo ovlivňují sbalování molekul PrP stericným bráněním. Bylo též navrženo, že glykany dotvářejí vlastnosti jednotlivých kmenů vytvářením kontaktních míst mezi monomery PrP v agregátech PrP^{TSE} [58].



Obr. 4: Formy PrP v normálním lidském mozku a v mozcích pacientů s prionovým

onemocněním. Buněčný prionový protein je glykoprotein s N-vázanými glykosidy (CHO) a GPI kotvou. Během patogeneze je PrP^C konvertován na abnormální PrP^{TSE}, který lze po štěpení proteinázou K izolovat jako proteáza-resistantní fragment (PrPres). V mozcích pacientů s prionovými nemocemi byly podle délky PrPres identifikovány různé PrP^{TSE} subtypy. Nejčastěji zastoupenými subtypy jsou PrP^{TSE} typ 1 a 2, které se navzájem liší fenotypem onemocnění, dále nedávno objevené C-koncové fragmenty o délce 12 nebo 13 kDa (PrP-CTF12/13) a PrP amyloidový peptid o velikosti 7 – 8 kDa (PrP7-8) charakteristický pro GSS. Obrázek byl upraven z: Šafář J., Prionový kongres 2011, Montréal a [59, 60].

Úloha prionových kmenů v mezidruhovém přenosu

Výsledky pokusů na laboratorních zvířatech ukázaly, že prionové kmeny mohou ovlivňovat i mezidruhový přenos TSE [53, 61, 62]. Studie přenosu lidských prionových chorob ukázaly, že zatímco sCJN priony mohou být úspěšně přeneseny na transgenní myši exprimující lidský PrP^C, přenos na „wild-type“ myši je významně omezen mezidruhovou bariérou [62, 63]. Na druhé straně vCJN priony lze na „wild-type“ myši přenést snadno, zatímco jejich přenos na transgenní myši exprimující lidský PrP^C je relativně neúčinný [62]. Zdá se tedy, že priony obsahující PrP s identickou aminokyselinovou sekvencí, ale odpovídající různým kmenům TSE, mohou být charakterizovány dalšími odlišnostmi vzhledem k účinnosti mezidruhového přenosu. Jinými slovy řečeno je prionová infektivita s největší pravděpodobností dána konformačními vlastnostmi každého prionového kmene, zatímco aminokyselinová sekvence pouze udává spektrum konformací dostupných pro prionové agregáty daného živočišného druhu. K přenosu dojde pouze tehdy, obsahuje-li toto spektrum i konformaci dárcovského prionového kmene.

1.4. Diagnostika prionových onemocnění

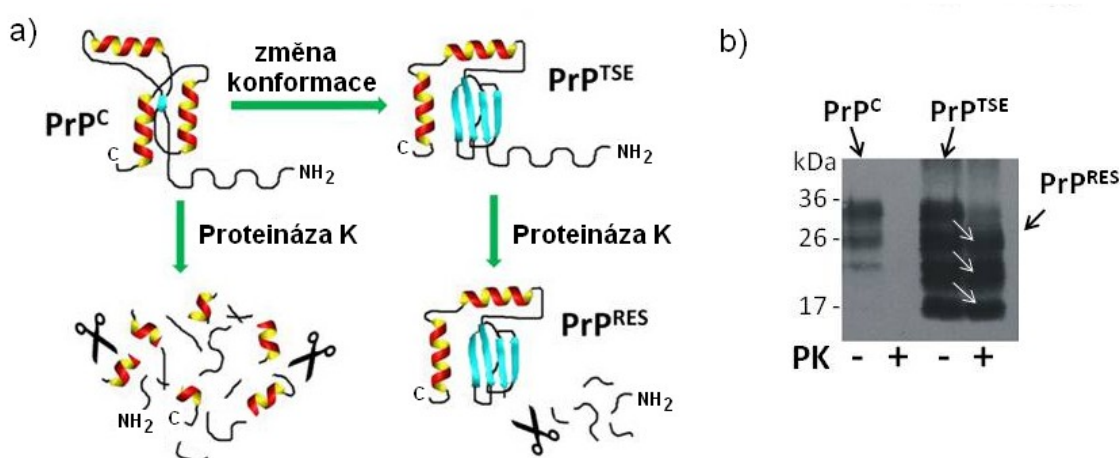
Diagnostika Creutzfeldtovy-Jakobovy nemoci dle WHO

Diagnostika TSE je založena na klinickém a histopatologickém nálezu, případně na genetickém vyšetření. S jistotou lze diagnózu CJN stanovit až *post mortem* průkazem PrP^{TSE} v mozkové tkáni, *ante mortem* se diagnóza pohybuje od možné k pravděpodobné. Dle kritérií WHO se „**možná diagnóza sCJN**“ vyznačuje progresivní demencí trvající méně než 2 roky a nejméně dvěma z následujících klinických příznaků:

myoklonus, pyramidové/extrapyrámidové příznaky, zrakové/mozečkové projevy nebo akinetický mutismus. Klinická „**diagnóza pravděpodobné sCJN**“ splňuje výše uvedená kritéria pro možnou sCJN a alespoň jeden z následujících nálezů: přítomnost proteinu 14-3-3 v likvoru, typické EEG projevy (periodické synchronní „sharp wave“ komplexy), typický nález na MRI (specifické léze v nucleus caudatus a/nebo putamenu na DWI nebo FLAIR). Definitivní diagnóza se stanovuje histologickým nálezem (spongiformní degenerací, úbytkem neuronů a gliózou) a průkazem patologického prionového proteinu v mozkové tkáni. (Zpracováno dle: Global Surveillance, diagnosis, and Therapy of Human Transmissible spongiform Encephalopathies: Report of WHO consultation, February 9-11, 1998, Geneva, Switzerland a [64]).

Princip detekce prionových onemocnění

Vzhledem k identické primární struktuře obou forem prionového proteinu a jen velmi slabé imunogenicitě patologické konformace PrP^{TSE} se v organismu protilátky specifické pro prionová onemocnění v relevantních titrech netvoří. Nedávno provedené studie na větším souboru infikovaných myši (143 a 117 jedinců) ukázaly, že jen zhruba 5% sér odebraných v terminálním stadiu nemoci vykazovalo mírně zvýšené titry protilátek proti prionovému proteinu [65]. U lidí se zvýšené titry protilátek proti PrP^{TSE} zatím detekovat nepodařilo. K diagnostice tedy nelze z výše uvedených důvodů použít běžné serologické metody a přítomnost PrP^{TSE} v současnosti zůstává jediným známým specifickým znakem prionových chorob. Detekce PrP^{TSE} je ve většině případů založená na rozdílech odolnosti PrP^{TSE} a PrP^C vůči štěpení proteinázou K (Obr. 5).



Obr. 5: Detekce patologického prionového proteinu na základě jeho odolnosti vůči proteolytickému štěpení. a) Patologický prionový protein (PrP^{TSE}) se od normálního buněčného prionového proteinu (PrP^{C}) liší konformací s vysokým obsahem struktur β -skládaného listu, která ho činí odolným vůči proteolýze. Po inkubaci s proteinázou K dochází ke kompletnímu rozštěpení PrP^{C} , zatímco u PrP^{TSE} dojde k odštěpení pouze nestrukturovaného fragmentu z N-konce a zbytek molekuly je vůči štěpení rezistentní (PrPres). b) Detekce PrP^{C} a PrP^{TSE} v myším mozgovém homogenátu pomocí western blotu. Bez inkubace s proteinázou K (PK) detekujeme v normálním myším mozku tři isoformy PrP^{C} (neglykosylovanou, monoglykosylovanou a diglykosylovanou), proteolýza pak vede ke kompletnímu vymizení signálu. Proteolýza PrP^{TSE} v homogenátu myši infikované RML kmenem „scrapie“ vede pouze k charakteristickému zvýšení elektroforetické pohyblivosti jednotlivých isoform PrPres (bílé šipky), která je způsobena snížením molekulové hmotnosti isoform po odštěpení jejich N-konců.

Zatímco molekula PrP^{C} se působením proteáz zcela rozštěpí, z molekuly PrP^{TSE} se odštěpí pouze N-konec a rezistentní C-koncová část (PrPres) je imunochemicky detekována některou z protilátek proti prionovému proteinu. Tyto testy vycházejí z předpokladu, že rezistentní forma PrP^{TSE} je původcem onemocnění a tedy i v organismu přítomna a posléze detekována. Nejčastěji používanými metodami detekce jsou imunohistochemie a western blot, popř. genetické vyšetření určující polymorfismus kodonu 129 genu *Prnp*. Kromě těchto v klinické praxi běžně používaných metod je známa celá řada metod výzkumných, které jsou sice senzitivnější, ale z různých důvodů těžko uveditelné do rutinní laboratorní praxe. Diagnostika je navíc komplikována tím, že většina molekul PrP^{TSE} v mozku je proteáza-senzitivních ($\text{senPrP}^{\text{TSE}}$), PrPres tvoří pouhých 10 – 30% [56, 66, 67]. V některých tkáních pacientů s CJN, například v krvi, se PrP^{TSE} pravděpodobně vyskytuje jen jako $\text{senPrP}^{\text{TSE}}$ [68]. Detekce PrP^{TSE} v krvi je navíc komplikována přítomností velkého množství PrP^{C} [69-71].

Proteáza-senzitivní prionopatie

Až donedávna byl v prionové komunitě přijímán názor, že $\text{senPrP}^{\text{TSE}}$ tvoří mezistupeň při tvorbě PrPres a je součástí průběhu onemocnění [72, 73]. $\text{SenPrP}^{\text{TSE}}$ izolovaný gradientovou centrifugací z infikovaného křeččího mozkového homogenátu byl dokonce schopen konvertovat PrP^{C} na proteáza-rezistentní PrP^{TSE} [74]. V poslední době

se ale začínají objevovat případy prionových chorob zvané „Proteáza-senzitivní prionopatie“ (PSPR), které mohou, ale nemusí, mít klinické příznaky podobné klasickým prionovým chorobám [75]. U těchto případů při běžných testech nebyl prokázán PrP^{Sc}, ale při použití šetrnějších metod byl prokázán senPrP^{TSE} [76-78]. Celosvětově se objevují stále další případy proteáza-senzitivních prionopatií, často po reevaluaci starších případů vyhodnocených jako „blíže nespecifikované demence“ nebo „atypická Alzheimerova choroba“ [79]. Proteáza-senzitivní priony jsou běžnými diagnostickými metodami vyhodnocovány falešně negativně a PSPR tak unikají pozornosti diagnostiků. Řešením tohoto problému by mohla být příprava testu založeného na použití monoklonálních protilátek konformačně specifických pro patologický prionový protein, které by umožnily potvrzení diagnózy bez použití proteolýzy.

1.5. Konformačně specifické protilátky proti PrP^{TSE}

Problémy s přípravou konformačně specifických protilátek

Snahy o přípravu konformačně specifické protilátky proti PrP^{TSE}, která by zároveň nereagovala s PrP^C, existují již od 90. let minulého století [80]. Zdaleka ne vždy se ale setkávají s úspěchem, problémů s přípravou konformačně specifických protilátek je hned několik. Zprv je to slabá imunogenicitá PrP^{TSE}, daná shodou primární struktury s fyziologicky se vyskytujícím PrP^C. Vzhledem k vysoce mezidruhově konzervativní primární struktuře prionového proteinu tento problém neumožňuje obejít ani xenogenní imunizace. Něktým autorům se sice podařilo imunitní reakci podpořit silnými adjuvanty [81, 82], problém se nicméně podařilo vyřešit až přípravou geneticky upravených myši, kterým byl odstraněn gen pro prionový protein (*Prnp*^{0/0} myši) [83] a které po běžné imunizaci vykazovaly dobrou imunitní odpověď. Druhým úskalím při přípravě konformačních protilátek je skutečnost, že dosud není známa prostorová struktura PrP^{TSE} a nelze tedy s přesností určit epitopy specifické pro patologický prionový protein. Během konformačních změn sice dochází u prionového proteinu k odhalení epitopů, které jsou v molekule PrP^C nedostupné [84, 85], jejich imunogenicitá ovšem nemusí být – a nebývá – vysoká. Po imunizaci *Prnp*^{0/0} myši prionovým proteinem tak dojde ke tvorbě celé řady protilátek proti PrP, konformačně specifické se mezi nimi ale běžně nevyskytují [86, 87]. Jednotlivé laboratoře se tento problém pokusily řešit různě. Korth a kol. použili k imunizaci agregovaný rekombinantní

prionový protein, který umožnil tvorbu protilátek proti oligomerům PrP, které se běžně vyskytují v agregátech PrP^{TSE}, ale ne u rozpustného PrP^C [80]. Paramithiotis a kol. a Jones a kol. imunizovali peptidem molekuly PrP, který vybrali s ohledem na předchozí studie konformačních změn při přechodu z α -šroubovice na β -šroubovici, ke kterým dochází i u PrP^{TSE} [84, 88]. Jiné laboratoře zase izolovaly a purifikovaly PrP^{TSE} z mozkového homogenátu infikovaných myší a použily jej jako antigen pro imunizaci a následně i pro selekci protilátek [89, 90]. Další text shrnuje dostupné informace o připravených konformačně specifických protilátkách a diskutuje jejich použití v diagnostice prionových chorob.

Přehled konformačně specifických protilátek

15B3. První konformačně specifická protilátka byla připravena v roce 1997 imunizací *Prnp*^{0/0} myší rekombinantním bovinním prionovým proteinem. Jedná se o monoklonální protilátku 15B3, třídy IgM, která reaguje s bovinním, myším a lidským PrP^{TSE} [80]. 15B3 je schopna z infikovaných mozkových homogenátů imunoprecipitovat PrP^{TSE} různě citlivý ke štěpení proteinázou K. Při bližší charakterizaci epitopu protilátky 15B3 spektrem peptidů byly identifikovány vazebné sekvence 142-148, 162-170 a 214-226 bovinního PrP (Tab. 1). Jedná se tedy o epitop složený, který podle autorů vzniká buď asociací dvou nebo více molekul prionového proteinu, nebo strukturálními změnami v rámci jedné molekuly PrP [80]. Protilátka byla patentována, nicméně se od té doby neobjevila ani na trhu s diagnostickými testy, ani v jiné vědecké práci zaměřené na použití v diagnostice. Až v roce 2008 Biasini a kol. ve studii na mutantních formách PrP konformačně specifickými protilátkami uveřejnil, že protilátka 15B3 má mnohem širší reaktivitu než se původně myslelo [91]. Vedle proteáza rezistentních i senzitivních forem PrP^{TSE} z infikovaných vzorků je 15B3 schopna imunoprecipitovat i neinfekční prionové agregáty, které se spontánně tvoří u neinfikovaných transgenních myší s nadprodukcí PrP a s inserčními, delečními nebo substitučními mutacemi genu pro PrP. Autoři ve své studii šli ještě dále a zjistili, že 15B3 je schopna detekovat i uměle precipitovaný PrP^C z mozkových homogenátů zdravých „wild type“ myší nebo agregovanou formu rekombinantního (neinfekčního) PrP [91].

Hybridní IgG protilátky. V roce 2004 Moroncini a kol. připravili dvě hybridní protilátky obsahující peptidy PrP^C schopné specificky vázat PrP^{TSE} [92]. Autoři nejprve identifikovali sekvence, kterými se PrP^C váže na molekulu PrP^{TSE} [93]. Vazebné

sekvence 89-112 a 136-158 myšího PrP^C pak vložili do recipientní protilátky IgG1 [94] v oblasti determinující komplementaritu na těžkém řetězci. Takto připravené rekombinantní protilátky IgG 89-112 a IgG 136-158 imunoprecipitovaly myší, lidský a křečí PrP^{TSE}, ale ne rozpustný PrP^C [92]. O několik let později se stejná laboratoř pokusila zmapovat vazebná místa PrP^C na PrP^{TSE} přípravou hybridních protilátek obsahujících postupně peptidy celé sekvence myšího prionového proteinu (mPrP₂₃₋₂₃₁) [95]. Z dvaceti připravených protilátek s PrP^{TSE} specificky reagovaly pouze tři: nově IgG 19-33 a taktéž IgG 89-112 a 136-158 identifikované již v roce 2004 Moroncinim et al (Tab. 1). Všechny tři konformačně specifické hybridní protilátky reagovaly, stejně jako 15B3, i s agregáty neinfekčního PrP^C a s agregáty neinfekčního rekombinantního PrP [91].

Tyr-Tyr-Arg protilátky. Další konformačně specifické protilátky vznikly imunizací myší peptidem obsahujícím aminokyselinový motiv Tyr-Tyr-Arg (Glu), který se nachází na třech místech molekuly PrP a je u savců mezidruhově konzervovaný (Tab. 1). Tyrosinové zbytky motivu Tyr-Tyr-Arg jsou v molekule PrP^C orientovány dovnitř, zatímco u PrP^{TSE} jsou exponovány na povrch [84] a představují PrP^{TSE}-specifický epitop. Získané protilátky selektivně imunoprecipitují PrP^{TSE} z infikovaných myších, křečích, ovčích, bovinních a lidských mozkových homogenátů, avšak vedle PrP^{TSE} rozeznávají i nefyziologicky složený a proteáza-senzitivní prionový protein [84]. Protilátky se na trhu s diagnostickými testy neobjevily, nicméně motiv konformačně specifického epitopu Tyr-Tyr-Arg využila v roce 2009 skupina S. Nappera, která se pokusila vyvinout vakcínu proti prionovým chorobám. Autoři nejprve optimalizovali epitop ovčího prionového proteinu obsahujícího motiv Tyr-Tyr-Arg tak, aby došlo k dostatečně silné imunitní odpovědi a zároveň nedošlo k aktivaci imunitního systému vůči PrP^C. Po ukončení imunizace byla u ovcí zaznamenána PrP^{TSE} specifická imunitní odpověď, specifické protilátky třídy IgG byly stanoveny v séru, mozkomíšním moku a mukózních sekretech a žádná z imunizovaných ovcí nevykazovala autoimunitní reakci proti PrP^C [85]. Nicméně účinnost této vakcíny v prevenci a léčbě prionových chorob nebyla zatím prokázána.

```

Homo sapiens      --MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGG-WNTGGSRYPGQSPGGNRY
Bos taurus        MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQSPGGNRY
Mus musculus      --MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGG-WNTGGSRYPGQSPGGNRY
                  :::*:*:*.*:**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
Homo sapiens      PPQGGGGWGQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGWQ----- 91
Bos taurus        PPQGGGGWGQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGG 100
Mus musculus      PPQGG-TWGQPHGGGWQPHGGSWGQPHGGSWGQPHGGGWQ----- 90
                  ***** .***** .***** .*****
Homo sapiens      --GGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMS
Bos taurus        WGQGGTHGQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMS
Mus musculus      --GGGTHNQWNKPSKPKTNLKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMS
                  :**** .*****:*:*.******
Homo sapiens      RPIIHFGSDYEDRYRENMHRYPNQVYYRPMDEYSNQNNFVHDCVNITIKQHTV 189
Bos taurus        RPLIHFGSDYEDRYRENMHRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDCVNITVKEHTV 200
Mus musculus      RPMIHFGNDWEDRYRENMYRPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDCVNITIKQHTV 188
                  **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
Homo sapiens      TTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYYQ--RGS
Bos taurus        TTTTKGENFTETDKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQ--RGA
Mus musculus      TTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCVITQYQKESQAYYDGRSS
                  *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
Homo sapiens      SMVLFSSPPVILLISFLIFLIVG 253
Bos taurus        SVILFSSPPVILLISFLIFLIVG 264
Mus musculus      STVLFSSPPVILLISFLIFLIVG 254
                  *:*:*:*:*:*:*:*:*:*
MABs: 15B3 ---; IgG 19-33 ---; IgG 89-112 ---; IgG 136-158 ---; YZR ---; V5B2 ---;
P1:1 ---; 6H10 ---; PRIOC1 ---, PRIOC3 ---

```

Tab. 1: Pozice epitopů známých konformačně specifických protilátek proti prionovému proteinu. Srovnané aminokyselinové sekvence lidského (Homo sapiens, NP_001073592), hovězího (Bos taurus, DAA23426) a myšního (Mus musculus, NP_035300) prionového proteinu s barevně zvýrazněnými epitopy konformačně specifických protilátek. Podtržené sekvence na začátku a konci molekuly představují signální peptidy, které jsou odštěpeny v průběhu postranlačních modifikací. Primární struktura prionového proteinu je vysoce konzervovaná, hvězdička ukazuje úplnou shodu mezi jednotlivými druhy, tečka, dvojtečka a mezera pak upozorňuje na rozdíly mezi živočišnými druhy. Většina známých epitopů konformačních protilátek se nachází na C-

koncové polovině molekuly prionového proteinu. Konformační protilátky obvykle nejsou druhově specifické a rozeznávají PrP^{TSE} více živočišných druhů (Tab. 2).

V5B2. Imunizaci konformačně specifickými peptidy využila i skupina profesorky Šerbecové k přípravě protilátky V5B2 [96]. Ze studií zaměřených na identifikaci PrP^{TSE}-specifických epitopů byly vybrány tři peptidy ze sekvence lidského PrP (P1: 214-226, P2: 167-179 a P3: 139-150), které byly použity k imunizaci BALB/c myši. Z připravených protilátek třídy IgG nejlépe reagovala protilátka V5B2 namířená proti C-koncové části lidského PrP (sekvence 214-226) (Tab. 1). V5B2 se zpočátku zdála reagovat PrP^{TSE} specificky: rozeznávala CJN mozkové homogenáty detekované dot blotem nebo ELISOU od non-CJN vzorků, se kterými nereagovala. Na rozdíl od většiny ostatních konformačně specifických protilátek nereagovala V5B2 s agregovaným ani s rozpustným rekombinantním lidským nebo bovinním PrP (23-230), reagovala pouze s peptidem P1 (214-226) [96]. V průběhu další práce s protilátkou V5B2 však bylo zjištěno, že protilátka nerozeznává PrP^{TSE} od PrP^C na základě konformačních rozdílů, ale pouze rozeznává fragment molekuly PrP^C zakončený aminokyselinou Tyr₂₂₆ [97].

OCD4 a g5p. V roce 2004 dokázali Zou a kol. specificky rozlišit PrP^{TSE} od PrP^C pomocí anti-DNA protilátek a genového proteinu 5 (g5p). Ke studii použili monoklonální protilátku OCD4 namířenou proti jaderné DNA a g5p používaný k detekci jednořetězcové DNA [98]. OCD4 a g5p rozlišovaly komplex DNA-PrP^{TSE}, který se u PrP^C nevyskytuje. Studie interakcí rekombinantního PrP s nukleovými kyselinami ukázaly, že DNA je schopna konvertovat α -helikální strukturu C-koncové části prionového proteinu do β -skládaného listu [99]. Podle autorů studie dochází v této části molekuly vlivem konformačních změn prionového proteinu ke tvorbě stabilního komplexu DNA-PrP^{TSE} a vazba není zrušena ani působením nukleázy (benzonázy), ani působením proteinázy K [98]. OCD4 a g5p specificky imunoprecipitovaly PrP^{TSE} z mozkového homogenátu případů s CJN, zatímco s negativními homogenáty ani s homogenáty z jiných neurologických případů (např. AD) nereagovaly. Protilátka OCD4 byla schopná detekovat jak různé kmeny lidských prionů (sporadickou, dědičnou i získanou formu CJN a případy GSS), tak i různé zvířecí prionové kmeny (bovinní, ovčí, jelení, křeččí a myši). Zhruba 20% PrP^{TSE} imunoprecipitovaného pomocí OCD4 bylo proteáza-senzitivní [98].

P1:1. Jones a kol. použili k přípravě protilátek agregovaný peptid 106-126 lidského PrP [88]. Jedná se o centrální část prionového proteinu, která je u savců mezidruhově vysoce konzervovaná (Tab. 1) a která během konformačních změn mění svoji strukturu z neuspořádané na strukturu β -skládaného listu. Imunizací *Prnp*^{0/0} myši agregovaným peptidem 106-126 sekvence lidského PrP byla získána monoklonální protilátka P1:1 třídy IgM, která v nativních podmínkách selektivně imunoprecipitovala PrP^{TSE} z lidských tkání. S negativními kontrolami ani s tkáněmi pacientů s jinými neurologickými diagnózami P1:1 nereagovala. Protilátka byla navíc schopna rozlišovat mezi typem 1 a 2 lidských prionových onemocnění charakterizovaných rozdílnou elektroforetickou mobilitou PrPres [100]. Autoři nicméně neprovedli testy reaktivity P1:1 s agregovaným rekombinantním (neinfekčním) prionovým proteinem ani s uměle agregovaným neinfekčním PrP^C v homogenátech zdravých mozků.

6H10. Horiuchi a kol. připravili monoklonální protilátky třídy IgG imunizací *Prnp*^{0/0} myši nedenaturovaným PrP^{TSE}, purifikovaným z infikovaného myšního mozkového homogenátu. Jedna z protilátek, 6H10, reagovala s nedenaturovaným myším PrP^{TSE}, ale ne s rekombinantním myším PrP ani s denaturovaným PrP^{TSE} [89]. 6H10 specificky imunoprecipitovala PrP^{TSE} z myších, ovčích a bovinních mozkových homogenátů před i po štěpení proteinázou K, zatímco s neinfikovanými homogenáty nereagovala. V reakci na Biasiniho studii otestovali autoři protilátku 6H10 i s agregovaným rekombinantním prionovým proteinem a jeho C-koncovým fragmentem (PrP₂₃₋₂₃₁ a PrP₈₉₋₂₃₁, resp.), se kterými protilátka nereagovala. 6H10 reagovala s mozkovou tkání infikovaných myši na histoblotu před i po štěpení proteinázou K. Reaktivita 6H10 byla výrazně redukována autoklávováním histoblotu, během kterého došlo pravděpodobně ke zrušení PrP^{TSE} specifického epitopu. Podobně reaktivita 6H10 postupně slábla se zvyšující se koncentrací denaturačního činidla guanidin hydrochloridu. Při snaze o bližší charakterizaci vazebného epitopu autoři prokázali, že se jedná o složený, PrP^{TSE}-konformačně specifický epitop (Tab. 1), jehož částí jsou některé aminokyseliny C-konce molekuly PrP (sekvence 215-228).

W261. Purifikovaný PrP^{TSE} k přípravě konformačně specifických protilátek použili i Petsch a kol. v roce 2011 [90]. Autoři izolovali PrP^{TSE} z infikovaných myších mozkových homogenátů vysrážením s kyselinou fosforečno-wolframovou a použili ho k imunizaci *Prnp*^{0/0} myši. Jedna z připravených protilátek, W261 třídy IgG, selektivně

imunoprecipitovala PrP^{TSE} z myších, křeččích, ovčích, jeleních a lidských mozkových homogenátů, zatímco se vzorky tkání zdravých jedinců nereagovala. Izolovaný PrP^{TSE} byl částečně odolný vůči štěpení proteinázou K. Autoři ve snaze ukázat použitelnost protilátky W261 k diagnostickému testování zavedli sendvičovou ELISU, kde jako vyvazující protilátku použili W261 a k detekci běžně používanou anti-PrP protilátku 6H4 konjugovanou s peroxidázou. Následnou chemiluminiscencí byl bez použití proteinázy K detekován prionový protein z infikovaných ovčích (scrapie) a lidských (variantní CJN) mozkových homogenátů, ale ne ze zdravých kontrolních vzorků. Autoři však nevylučují, že by W261 mohla vázat i neinfekční agregáty prionového proteinu [90].

PRIOC. Další skupina se pokusila připravit PrP^{TSE} specifické protilátky imunizací *Prnp*^{0/0} myši infikovaným myším mozkovým homogenátem štěpeným proteinázou K a adsorbovaným na magnetické mikropartikelky (Dynabeads). Byly tak připraveny monoklonální protilátky PRIOC 1 – 4 třídy IgM, schopné detekovat rozpustné oligomery PrP^{TSE} a dalších amyloidogenních proteinů, ale ne jejich monomery [101]. Při bližším určování epitopu nebyly protilátky schopny vázat rekombinantní ani buněčný PrP, ale byly schopny vázat kratší syntetické peptidy. PRIOC 1 a 2 rozeznávaly sekvenci PrP₉₀₋₁₀₉ a PRIOC 3 a 4 sekvenci PrP₁₇₀₋₁₈₉ (Tab. 1). Protilátky selektivně vyvazovaly nativní (nedenaturovaný) PrP^{TSE} z myších (RML) a lidských (vCJN) mozkových homogenátů před i po proteolýze, zatímco se zdravými kontrolami nereagovaly. Žádná z protilátek překvapivě nereagovala s tkáněmi z případů sporadické CJN. Autoři dále vyvinuli sendvičovou ELISU k detekci oligomerů PrP^{TSE} v nedenaturujících podmínkách. PRIOC protilátku ukotvili na stěnu destičky a po vyvázání antigenu z RML infikovaného mozkového homogenátu použili tutéž protilátku k detekci v biotinylované formě. Všechny čtyři protilátky dobře detekovaly oligomery PrP^{TSE}, ale s monomery PrP neposkytovaly žádný signál. Stejný systém byl použit i k testování rekombinantního prionového proteinu, kdy protilátky detekovaly pouze rozpustné oligomery rPrP, s monomery ani s nerozpustnými fibrilami rPrP nereagovaly. Podobných výsledků bylo za použití PRIOC protilátek dosaženo i při detekci oligomerů peptidu amyloidu β (A β) a α -synukleinu [101]. Protilátky schopné rozeznat rozpustné oligomery amyloidogenních proteinů byly připraveny i jinou skupinou v roce 2003. Kaye a kol. připravili oligomer-specifické polyklonální sérum imunizací králíků syntetickými oligomery peptidu A β [102]. Sérum nereagovalo s monomery ani s

fibrilami amyloidu β , ale reagovalo s oligomery α -synukleinu, amylinu (IAPP), polyglutaminu, lysozymu, lidského insulínu a prionového peptidu 106-126. Autoři ve studii uvedli, že všechny výše zmíněné rozpustné oligomery sdílejí stejnou konformačně-dependentní strukturu, která je nezávislá na sekvenci [102].

Název protilátky	Třída	Specifická (PrP)	Epitop	Autor	Citace
15B3	IgM	bo, mo, hu	Diskontinuální, 142-148, 162-170, 214-226	Korth a kol.	[80]
IgG 19-33	IgG	mo, hu, ha	23-33	Solforosi a kol.	[95]
IgG 89-112	IgG	mo, hu, ha	89-112	Moroncini a kol.	[92]
IgG 136-158	IgG	mo, hu, ha	136-158	Moroncini a kol.	[92]
Tyr-Tyr-Arg protilátky	IgG, IgM	mo, hu, ha, bo, ov	149-151, 162-164, 225-227	Paramithiotis a kol.	[84]
V5B2	IgG	hu, bo, ov	214-226	Šerbec a kol.	[96]
OCD4		mo, hu, ha, bo, ov, d	DNA- PrP ^{TSE}	Zou a kol.	[98]
P1:1	IgM	hu	106-126	Jones a kol.	[88]
6H10	IgG	mo, bo, ov	Diskontinuální, obsahuje 215-228	Horiuchi a kol.	[89]
W261	IgG	mo, hu, ha, ov, d	C-konec	Petsch a kol.	[90]
PRIOC 1 a 2	IgM	mo, hu	90-109	Tayebi a kol.	[101]
PRIOC 3 a 4	IgM	mo, hu	170-189	Tayebi a kol.	[101]

Tab. 2: Přehled konformačně-specifických protilátek proti PrP^{TSE}. Použité zkratky: bo: bovinní, mo: myš, hu: lidské, ha: křeččí, ov: ovčí, d: jelení.

Nové trendy ve vývoji diagnostických metod

Použití konformačně specifických protilátek by vedle detekce proteáza-rezistentního PrPres umožnilo detekovat i proteáza-senzitivní formy PrP^{TSE}, které se u některých případech prionových onemocnění zdají být jediným zdrojem patogeneze i diagnostické informace. Protilátek schopných rozeznat proteáza-senzitivní PrP^{TSE} byla za posledních 15 let vyvinuta celá řada (Tab. 2), nicméně otázkou zůstává jejich využití v praxi. Jejich užití pro detekci senPrP^{TSE} v mozkové tkáni při *post mortem* diagnostice prionových chorob je limitováno nutností použití nedenedaturujících technik zachovávajících konformaci senPrP^{TSE}. Bohužel, tyto techniky, např. immunoprecipitace, jsou často méně robustní a mohou vést k falešným výsledkům. Vše navíc komplikují vlastnosti buněčného prionového proteinu PrP^C a jeho ochota tvořit po solubilizaci membrán agregáty v nedenedaturujícím prostředí. U většiny konformačních protilátek proti PrP^{TSE} bylo prokázáno, že vážou také agregovaný neinfekční PrP a tak mohou poskytnout falešně pozitivní výsledky. Zdá se tedy, že širšímu použití konformačně specifických protilátek v diagnostice prionových chorob stojí v cestě především vývoj odpovídající detekční techniky. Za nadějně lze považovat v publikacích popsané ELISA testy [90, 101], ale i ty čeká důsledná validace s klinickými vzorky. Obrovským pokrokem, který by mohly přinést konformačně specifické protilátky, by byla rutinní detekce senPrP^{TSE} v krvi nebo mozkomíšním moku pacientů umožňující potvrzení diagnózy před smrtí pacienta. Tyto tkáně zřejmě obsahují jen nepatrné množství PrPres, avšak obsah senPrP^{TSE} v nich by mohl být vyšší [68].

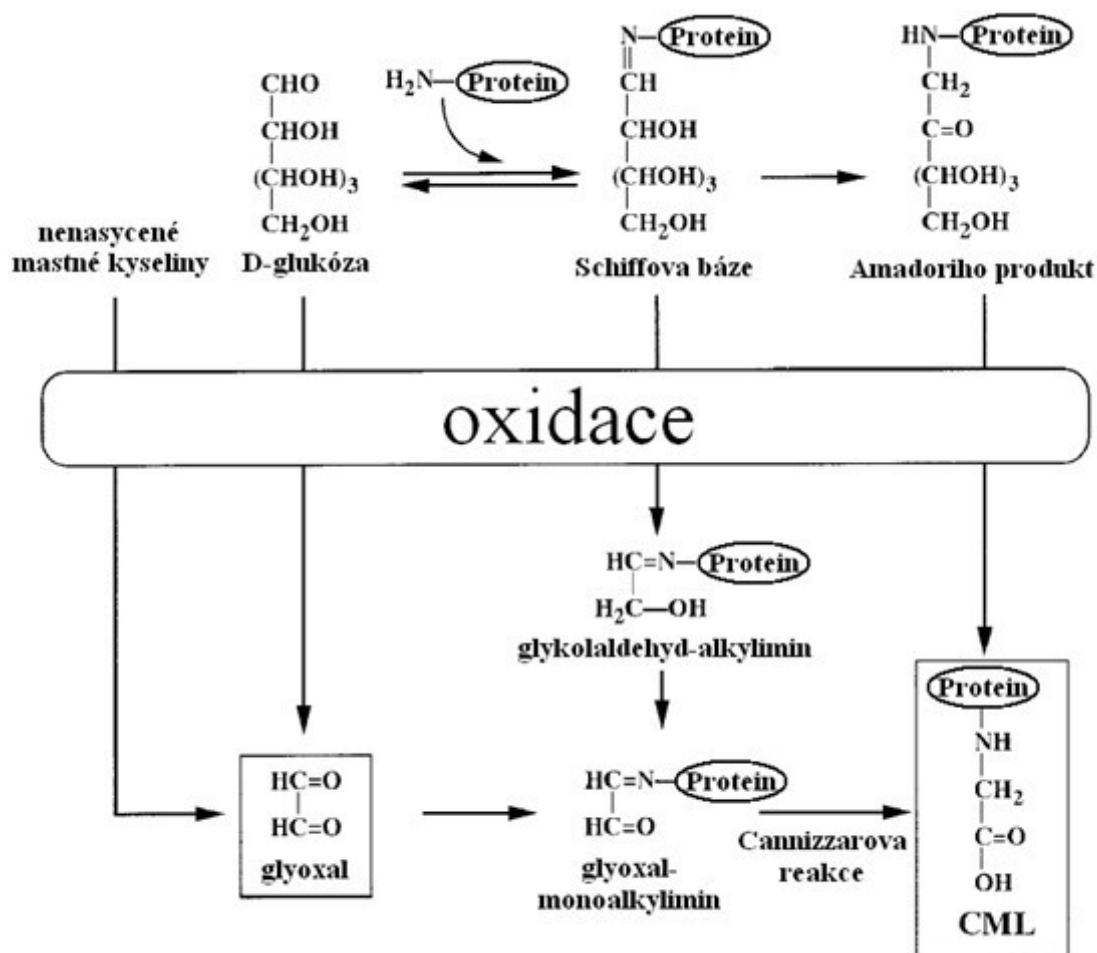
Za v současné době nejpropracovanější metodu schopnou detekce senPrP^{TSE} lze považovat „Conformation Dependent Immunoassay“ (CDI) vyvinutou Jiřím Šafářem a kol. [56, 66]. Metoda CDI je založena na využití protilátky 3F4, která rozeznává PrP^C, ale v molekule PrP^{TSE} je její epitop skryt. Epitop 3F4 v molekule PrP^{TSE} lze odkrýt denaturací vzorku. Rozdíl signálu mezi denaturovaným a nativním vzorkem pak odpovídá množství PrP^{TSE} včetně senPrP^{TSE} ve vzorku. Pro vzorky normálních tkání je tento rozdíl nulový.

Alternativou ke konformačně specifickým testům by mohlo být nalezení kovalentní modifikace prionového proteinu, která by byla specifická pro PrP^{TSE} a u PrP^C by se nevyskytovala. Kandidátem takové modifikace je glykace, neenzymatická reakce redukujících cukrů s volnými aminoskupinami proteinů, která pro svou pomalou rychlost může preferenčně modifikovat stabilní amyloidová depozita PrP^{TSE}, zatímco PrP^C zůstává pro svůj krátký buněčný poločas neglykovaný [103, 104]. Protilátky

specifické pro glykovaný PrP^{TSE} by pak mohly být použitelné pro jeho detekci i za denaturujících podmínek [105], např. pomocí western blotu.

1.6. Glykovaný prionový protein

Glukóza a jiné redukující cukry mají schopnost se v organismu neenzymaticky kovalentně vázat na postranní amino skupiny proteinů a iniciovat tak nespecifický post-translační mechanismus zvaný glykace. V prvním kroku vzniká nestabilní Schiffova báze, která po čase podléhá přesmyku na stabilní Amadoriho produkt. Dalšími neenzymatickými inter- a intramolekulárními reakcemi vzniká spektrum produktů zvaných koncové produkty glykace („advanced glycation end products“, AGEs). Glykace na proteinech probíhá na aminech v postranních řetězcích lysinu a argininu, nejčastějším koncovým produktem je N-karboxymethyl lysin (CML, Obr. 6) [106]. AGEs hrají klíčovou roli např. při patogenezi komplikací u chronického diabetu mellitus [107] a glykovaný hemoglobin HbA_{1c} je nejdůležitějším diagnostickým markerem při sledování kompenzace diabetiků. Ve snížené míře dochází ke glykaci membránových proteinů senescentních erytrocytů u jedinců s normální hladinou glukózy v krvi [108], a to včetně glykace buněčného prionového proteinu [104].



Obr. 6: Možné metabolické dráhy tvorby N-karboxymethyl lysinu (CML). Upraveno z [108].

Glykace byla ve zvýšené míře pozorována i na depozitech proteinových agregátů v mozcích pacientů s neurodegenerativními onemocněními, jako jsou Alzheimerova a Parkinsonova choroba, amyloidózy a prionová onemocnění [109]. Ke glykaci v těchto případech dochází z důvodu dlouhodobého výskytu proteinových depozit v organizmu a jejich vystavení účinkům glukózy. Přestože je studii těchto chorob celosvětově věnováno velké úsilí, mechanismus jejich vzniku stále nebyl uspokojivě objasněn. Významnou roli při patologickém skládání proteinů a iniciaci nemoci hrají dědičné mutace, většina případů proteinopatií je však sporadického původu a na jejich vzniku se pravděpodobně podílí nějaký další neznámý faktor. Studie glykace provedené na bovinním sérovém albuminu (BSA) ukazují, že glykace nejen iniciuje tvorbu amyloidových agregátů tohoto jinak dobře rozpustného proteinu, ale agregáty jsou i odolné vůči štěpení proteinázou K a mají cytotoxický efekt na tkáňové kultury

nervového původu (linie SH-SY5Y) [110]. Podobnost vzniku, vlastností a patologie agregátů BSA s prionovými agregáty vyvolává otázku, zda tímto faktorem není právě glykace. V pozdějších stadiích onemocnění může glykace hrát významnou roli při stabilizaci agregátů intermolekulárními můstky a zvyšovat tak jejich odolnost vůči proteolytickým enzymům.

V mozcích CJN pacientů byla za pomoci nespecifické protilátky proti AGEs opakovaně prokázána depozita glykovaného PrP^{TSE} [103, 111], absence monoklonální protilátky specifické pro glykovaný PrP však brání možnosti zavedení specifického diagnostického testu pro tento typ depozit. Absence protilátky též znemožňuje zabývat se podrobnějšími studii role glykace na iniciaci patologie při prionových onemocněních v *in vitro* i *in vivo* systémech.

2. Cíle

Cílem této práce bylo přispět k vývoji diagnostického testu prionových chorob založeného na jiném principu, než je průkaz k proteolýze rezistentního PrPres, který by umožnil jednodušší a lépe standardizovaný průkaz lidských i zvířecích TSE.

Konkrétní cíle práce byly následující:

1. připravit glykovaný rekombinantní prionový protein a využít ho jako imunogenu pro přípravu monoklonálních protilátek
2. provést výběr hybridomů produkujících protilátky specificky reagující s glykovaným prionovým proteinem
3. provést charakterizaci připravených vybraných a ve spolupráci získaných monoklonálních protilátek na biologickém materiálu
4. optimalizovat metodu DELFIA pro detekci prionového fragmentu PrP226* v mozcích jedinců postižených TSE
5. provést studii hladiny PrP226* ve vzorcích mozkové tkáně CJD pacientů

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Chemikálie

agaróza, Bio-Rad (Hercules, USA)
akrylamid/bis-akrylamid, Bio-Rad (Hercules, USA)
amberlit, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
ampicilin, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
aprotinin, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
Assay Buffer, PerkinElmer (USA)
avidin-HRP, Pierce (USA)
azid sodný, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
BCIP/NBT, Millipore (Watford, UK)
bromfenolová modř, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
Coomassie Brilliant Blue G250, Bio-Rad (Hercules, USA)
Cu²⁺ matrice TALON, Clontech (USA)
deoxycholát sodný, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
dihydrogenfosforečnan sodný, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
dithiothreitol, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
DMSO, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
Deep Vent DNA polymeráza, New England BioLabs (Ipswich, USA)
DNáza I, typ II, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
dNTP's, Fermentas (Burlington, Kanada)
dodecylsulfát sodný (SDS), Bio-Rad (Hercules, USA)
EDTA, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
Enhancement Solution, PerkinElmer (USA)
ethanol, Penta (Praha, ČR)
ethidium bromid, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
D-fruktóza, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
D-galaktóza, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
D-glukóza, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
glutathion, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)

glycerol, Penta (Praha, ČR)
glycin, Penta (Praha, ČR)
guanidin hydrochlorid, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
guanidin thiokyanát, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
hydrogenfosforečnan sodný, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
hydroxid sodný, Penta (Praha, ČR)
chlorid draselný, Penta (Praha, ČR)
chlorid sodný, Penta (Praha, ČR)
IPTG, Roth (Karlsruhe, Německo)
inhibitorový koktejl Complete, Roche (Švýcarsko)
izopropanol, Penta (Praha, ČR)
kyanoborohydrid sodný, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
kyselina boritá, Penta (Praha, ČR)
kyselina glyoxalová, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
kyselina chlorovodíková, Penta (Praha, ČR)
kyselina octová, Penta (Praha, ČR)
LB agaróza, Roth (Karlsruhe, Německo)
LB médium, Roth (Karlsruhe, Německo)
lysozym, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
2-merkapt ethanol, Bio-Rad (Hercules, USA)
methanol, Penta (Praha, ČR)
N,N,N,N-tetramethylendiamin, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
Ni-NTA Agarose matrice, Qiagen (USA)
octan sodný, Penta (Praha, ČR)
pepstatin, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
peroxodisíran amonný, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
PMSF, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
proteináza K, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
Rapid Ligation pufr, Fermentas (Burlington, Kanada)
restrikční endonukleáza *BamHI*, New England BioLabs (Ipswich, USA)
restrikční endonukleáza *NdeI*, Fermentas (Burlington, Kanada)
D-ribóza, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
RNáza A, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
sacharóza, Penta (Praha, ČR)

sarkosyl, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
 streptavidin-Eu, PerkinElmer (USA)
 Sulfo-NHS-LC-Biotin, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
 sušené mléko, Bio-Rad (Hercules, USA)
 T4 DNA ligáza, Fermentas (Burlington, Kanada)
 Tango pufr, Fermentas (Burlington, Kanada)
 tergitol, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
 TEMED, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
 ThermoPol pufr, New England BioLabs (Ipswich, USA)
 thrombin, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
 TMB, Pierce (USA)
 trimethoxybenzyl chlorid, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
 Tris, Roth (Karlsruhe, Německo)
 Triton X-100, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
 Tween 20, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
 urea, Penta (Praha, ČR)
 Wash Buffer, PerkinElmer (USA)

3.1.2. Laboratorní přístroje

blotovací zařízení	Trans-Blot SD System, Bio-Rad (USA)
centrifuga	Centrifuge 5810 R, Eppendorf (Německo)
centrifuga	MiniSpin plus, Eppendorf (Německo)
dokumentační systém	MiniLumi, DNR Bio-Imaging Systems (Izrael)
FPLC systém	Bio-Logic SAS (USA)
homogenizér	Mini-Beadbeater-16, Biospec Products (USA)
horizontální agarózová elektroforéza	Mini-Sub Cell GT System, Bio-Rad (USA)
inkubátor	TCH 100, Laboratorní přístroje (ČR)
inkubovaná třepačka	NB-205, N-Biotek (Korea)
kývačka	Minirocker 1, BioSan (Riga, Lotyšsko)
MS MALDI/TOF	Lasermat, Finnigan (USA)
pH metr	inoLab Level 1, WTW (Německo)
pH elektroda	Single Pore Glass, Hamilton (Švýcarsko)
RP-HPLC	1200 Series, Agilent (USA)

kolona analytická	Supelco Discovery C18, Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
kolona preparační	Poroshell 120 SB-C18, Agilent (USA)
spektropolarimetr	Jasco 815 (Japonsko)
sonikátor	Sonic dismembrator, Dynatech (USA)
termální cyklér	Mastercycler Gradient, Eppendorf (Německo)
termostaty	CH-100, Biosan (Litva); HB-2, Wealtec (Taiwan)
UV-VIS spektrofotometr	Biowave S2100, Biochrom (UK)
vertikální polyakrylamidová elektroforéza	Mini-PROTEAN, Bio-Rad (USA)
Victor 3	multilabel reader, PerkinElmer (USA)
vortex	Genie 2, Scientific Industries (USA)

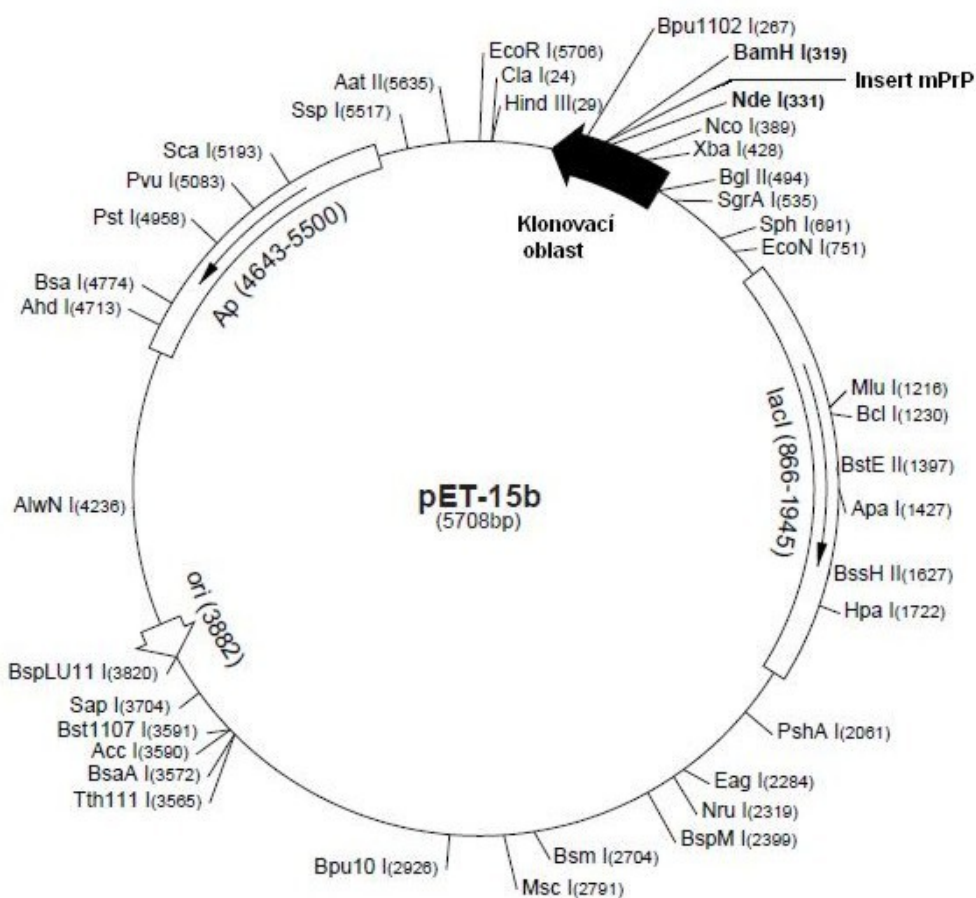
3.1.3. Ostatní použitý materiál

centrifugační filtry	Amicon Ultra-4 a Ultra-0,5, Millipore (UK)
dialyzační nádoby	Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units, Pierce (USA)
dialyzační membrána	ZelluTrans, 14 000 kDa MWCO Roth (Německo)
dialyzační membrána	Spectra Por 7, 1000 kDa MWCO Roth (Německo)
chromatografická kolona	Econo-Pac, Bio-Rad (USA)
Freundovo adjuvans	Sigma-Aldrich (Švýcarsko)
mikrotitrační destička	NUNC U96, MaxiSorp (USA)
mikrotitrační destička	GAMA (ČR)
nitrocelulosoová membrána	Bio-Rad (USA)
souprava QIAquick	Gel Extraction Kit, Qiagen (USA)
souprava JETQUICK	Plasmid Miniprep Spin Kit, Genomed (Německo)
souprava BCA	Protein Assay, Pierce (USA)
expresní <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)RIL,	Stratagene (USA)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α ,	Novagen (USA)
plazmid pET-15b,	Novagen (USA)
primery pET-UP a pET-down,	KRD (ČR)

3.2. Příprava rekombinantního prionového proteinu

3.2.1. Konstrukce plazmidu pET-15b obsahující gen pro rekombinantní myší prionový protein (rmPrP)

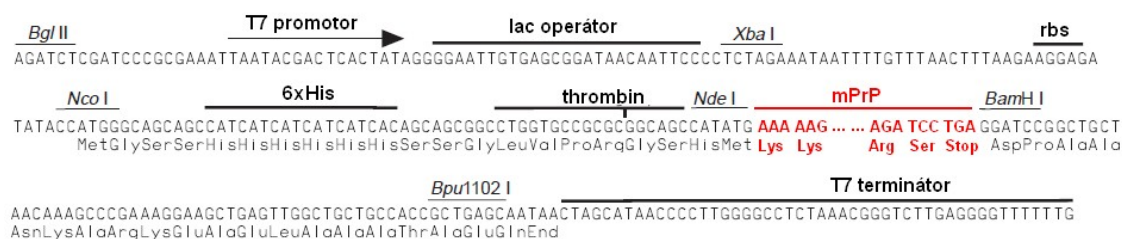
Ke konstrukci plazmidu obsahujícího příslušný gen pro myší PrP byl použit plasmid pET-15b (Obr. 7), primery pET-up a pET-down (KRD). Jako templátová DNA byla použita cDNA pro myší prionový protein 23-230 varianta A (*mPrnpa*), tj. varianta genu pro mPrP s krátkou inkubační dobou.



Obr. 7: pET-15b je plazmid pod kontrolou promotoru bakteriofága T7. Obsahuje gen pro β -laktamázu zajišťující resistenci na ampicilin a je vhodný pro expresi proteinů v hostitelích s genem pro T7 RNA polymerázu pod kontrolou laktózového operonu.

Plazmid pET-15b umožňuje expresi požadovaného proteinu v hostitelských *E. coli* obsahujících chromozomální kopii genu pro T7 RNA polymerázu (kmen *E. coli* BL21(DE3)), který je kontrolován bakteriálním laktózovým promotorem. Přidáním laktózového substrátu IPTG (izopropyl β -D-1-thiogalaktopyranozid) do média dochází

k syntéze bakteriální T7 RNA polymerázy, která nasedá na T7 promotor obsažený v plazmidu pET-15b (Obr. 8). Po zaklonování genu pro mPrP (červeně) je rekombinantní protein exprimován jako fúzní protein obsahující N-koncovou histidinovou kotvu se štěpným místem pro thrombin a mPrP. Transkripce celého proteinu začíná vazbou transkripčních regulačních proteinů na laktózový operátor a nasednutím ribozomů na ribozomální vazebné místo (rbs). T7 RNA polymeráza je natolik aktivní a selektivní, že po její plné indukci jsou téměř všechny buněčné zdroje využity k expresi cílového proteinu. Rekombinantní protein tak může již po několika hodinách po indukci IPTG tvořit více než 50% celkového buněčného proteinu (Novagen pET System Manual, 11th Edition). Plazmid pET-15b dále obsahuje gen pro β -laktamázu zajišťující resistenci na ampicilin a umožňující selekci správně transformovaných hostitelských bakterií.



Polyklonovací oblast pET-15b

Obr. 8: Polyklonovací oblast plazmidu pET-15b (Novagen) obsahující insert *mPrnpa*. V polynukleotidové sekvenci jsou v pořadí zleva tučně označena místa pro promotor T7 RNA polymerázy, laktózový operátor, ribozomální vazebné místo (rbs), sekvence 6 konsektivních histidinů (6xHis) a štěpného místa pro thrombin obsažené v His kotvě, terminátor T7 RNA polymerázy. Italicou jsou označeny unikátní sekvence restričních endonukleáz a červeně je označen začátek a konec vloženého genu pro myší prionový protein.

Navržené primery:

pET-up: 5 - CGCGGCAGCCATATGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGGAGGGTGG - 3

pET-down: 5 - CGCGGATCCTCAGGATCTTCTCCCGTCGTAATAGGCCTGGGA - 3

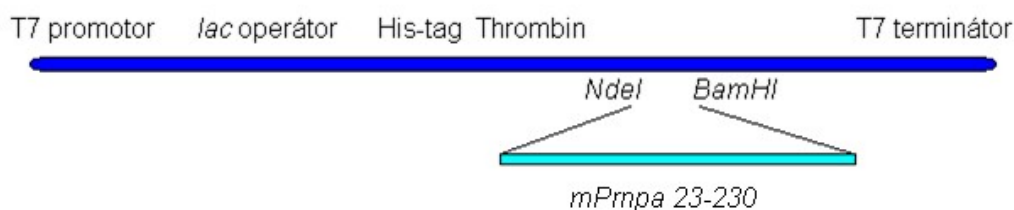
PCR směs (10x ThermoPol pufr (NEB) 5 μ l, pET-up a pET-down primery po 0,5 μ l, Deep Vent polymeráza 1 μ l (NEB), templátová DNA 1 μ l, 5 mM dNTP's 2,5 μ l, destilovaná voda 39,5 μ l) byla vložena do termálního cyklu (Mastercycler Gradient,

Eppendorf). Pracovní cyklus byl navržen pomocí kalkulátoru teploty tání na Applied Biosystems: 1. 94°C/2 min.

2. (95°C/1 min. – 62°C/1 min. – 72°C/1 min.) 30x

3. 72°C/10 min. – 4°C

Amplifikované inserty byly připraveny k ligaci štěpením restričními enzymy *BamHI* (NEB) a *NdeI* (Fermentas), odděleny od směsi na horizontální agarózové elektroforéze a purifikovány z gelu pomocí soupravy QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) dle přiloženého protokolu. Stejně byl pomocí *BamHI* a *NdeI* připraven i vektor pET-15b, do kterého byly následně inserty zaligovány pomocí T4 DNA ligázy (Fermentas) (Obr. 9). Ligace probíhala 30 min. při laboratorní teplotě. Sekvence insertu byla prověřena pomocí NEBcutter V2.0, zda neobsahuje štěpné místo pro používané restriční endonukleázy (*BamHI* a *NdeI*).



Obr. 9: Polyklonovací oblast obsahuje sekvenci pro N-koncovou His kotvu propojenou se sekvencí insertu štěpným místem pro thrombin. Exprese fúzního proteinu je pod kontrolou T7 promotoru a je řízena laktózovým operátorem.

Ligované vektory byly amplifikovány v *E. coli* kmen DH5 α (Novagen) kultivovaných v selekčním agaru obsahujícím 100 μ g/ml ampicilinu (Sigma-Aldrich). Transformace kompetentních *E. coli* probíhala tepelným šokem při 42°C po dobu 42 sekund, poté byly buňky přeneseny 1 minutu na led a kultivovány přes noc při 37°C. Po kultivaci byly vybrány 4 klony a namnožené plasmidy byly izolovány pomocí kitu JETQUICK Plasmid Miniprep Spin (Genomed) dle přiloženého protokolu. Kvalita DNA byla ověřena pomocí horizontální agarózové elektroforézy a osekvenována v laboratoři ÚDMP 1.LF UK.

3.2.2. Exprese a purifikace rmPrP

rmPrP byl připraven v expresních *E. coli* BL21(DE3) dle přiloženého protokolu (Stratagene). Tento kmen ve svém genomu obsahuje gen pro T7 RNA polymerázu pod kontrolou lac promotoru. Přídavek IPTG (izopropyl- β -D-thiogalaktopyranozid) tak indukuje tvorbu T7 RNA polymerázy, která následně zajistí transkripci genu pro rmPrP, který se nalézá v plazmidu pET-15b pod kontrolou T7 promotoru (Obr. 7, 8 a 9). Po ukončení exprese byly buňky stočeny, pelety byly rozsuspendovány v PBS s 1 mM PMSF a sonikovány. Bakteriální DNA v buněčném lyzátu byla štěpena DNázou I (výsledná koncentrace 5 μ g/ml) a následně byly odmyty membrány roztokem PBS obsahujícím 25% (w/v) sacharózu, 1% (v/v) Triton X-100 a 1 mM PMSF. Předčištěná inkluzní tělíska byla rozpuštěna v 50 mM fosfátovém pufru pH 8,0 s 8 M močovinou a 5 mM 2-merkptoethanolem jako redukčním činidlem. V tomto pufru byla suspenze ponechána přes noc na kývačce při laboratorní teplotě a stočena 1 hodinu při 18 500 g při 20°C. Močovina použitá při tomto i při následujících pokusech byla přečištěna pomocí amberlitu (směsná ionexová pryskyřice, 1 g / 100 ml roztoku močoviny). Redukovaný protein byl přečištěn vsádkovou chromatografií na afinitní Ni-NTA matici (Quiagen) v denaturujících podmínkách dle přiloženého protokolu. Metoda byla optimalizována (Obr. 16) pro eluci snížením pH pomocí 50 mM fosfátového pufru pH 4,5 s 8 M močovinou. Eluovaný rmPrP byl dialyzován do 50 mM fosfátového pufru pH 8,0 s 8 M močovinou, zředěn na koncentraci 0,1 mg/ml a oxidován glutathionem o výsledné koncentraci 2,5 mM. Protein byl následně dialyzován do 50 mM acetátu amonného pH 8,3, lyofilizován, přečištěn na RP-HPLC (Protein 8 Peptide C18 Vydac, Grace) v acetonitrilovém gradientu (5 – 55%, 70°C) a opět lyofilizován. Čistota připraveného rmPrP byla analyzována UV spektrofotometrií, RP-HPLC (Poroshell 120 SB-C18, Agilent), SDS-PAGE a MS a vzorky byly skladovány v -80°C. Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí BCA Protein Assay (Pierce).

3.2.3. Enzymatické odštěpení His kotvy

K oxidovanému a renaturovanému proteinu v 50 mM acetátu amonném pH 8,3 byl přidán thrombin na výslednou koncentraci 1 U/ml. Směs byla lehce promíchána a inkubována 2 hod. při 37°C. Poté byl vzorek zcentrifugován 15 min. při 14 000 g a supernatant připraven pro další purifikační krok.

3.2.4. Exprese a purifikace rhPrP

K přípravě rekombinantního lidského prionového proteinu byly použity plasmidy pRSET A s geneticky upraveným klonovacím místem pro odštěpení N-koncové His kotvy thrombinem [112], které byly získány od prof. Wüthricha z Ústavu molekulární biologie a biofyziky v Zürichu, Švýcarsko. Plasmidy obsahují sekvence pro lidský prionový protein 23-231 nebo pro prionové fragmenty 81-231, 90-231 a 121-231 [113]. rhPrP byl připraven jako v 3.2.2., redukovaný prionový protein byl přečištěn vsádkovou chromatografií na afinitní Cu^{2+} matrici (TALON, Clontech) v denaturujících podmínkách (8 M močovina) dle přiloženého protokolu.

3.2.5. Měření spekter cirkulárního dichroismu

CD spektra v daleké UV oblasti byla měřena na spektropolarimetru Jasco 815 (Japonsko). Měření byla prováděna při laboratorní teplotě v PBS; 20 mM a 100 mM fosfátovém pufru pH 7,0; 20 mM acetátovém pufru pH 4,5 a ve 20 mM Tris-HCl pH 8,3. Spektra v oblasti 190 až 300 nm byla získána průměrem ze dvou počítačem kontrolovaných měření s krokem 0,1 nm, rychlostí záznamu 10 nm/min. a časovou konstantou 8 sekund. Optická délka použité křemenné kyvety byla 0,1 cm. Spektrum je vyjádřeno jako závislost molární elipticity na vlnové délce přepočtené na molární koncentraci zprůměrovaného aminokyselinového zbytku. Měření byla provedena Dr. L. Bednárovou z ÚOCHB AV ČR.

3.2.6. SDS-PAGE a western blot

Vzorky byly zahřívány při 100°C po dobu 5 min. v neredukujícím vzorkovém pufru (50 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 1% SDS, 0,005% bromfenolová modř; pH 6,8), rozděleny ve 12% gelu a přebíly (1 hod. při konstantním proudu 0,1 A/gel) na 0,2 μm nitrocelulózovou membránu (BioRad). Membrána byla blokována v 5% roztoku mléka (BioRad) v TBS-T a inkubována přes noc při 4°C v 1% roztoku mléka v TBS-T s primárními protilátkami. Následující den byla membrána 4x promyta v TBS-T, 1x v 5% roztoku mléka v TBS-T a inkubována 1 hod. při laboratorní teplotě se sekundární protilátkou konjugovanou alkalickou fosfatázou (Biosource). Poté byla membrána promyta 4x v TBS a vizualizována 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro-tetrazoliovou

modří (BCIP/NBT). Membrány byly naskenovány pomocí dokumentačního systému MiniLumi, DNR Bio-Imaging Systems. Seznam anti-PrP protilátek je uveden v Tab:

Protilátka	Epitop	Výrobce
AG4	PrP ₃₇₋₅₀	TSE resource center, UK
DC2	PrP ₃₉₋₄₆	CKT, Ljubljana
E12/2	diskontinuální epitop PrP obsahující His ₁₅₅	CKT, Ljubljana
EF2	N-konec PrP	CKT, Ljubljana
FH11	PrP ₄₆₋₅₉	TSE resource center, UK
3F4	PrP ₁₀₆₋₁₁₂	Biodesign, Chemicon
12F10	PrP ₁₄₂₋₁₆₀	Prionics, Švýcarsko
EM-20	PrP ₁₂₁₋₂₃₁	EXBIO, Praha
EM-21	PrP ₁₂₁₋₂₃₁	EXBIO, Praha
EM-31	CML-PrP ₁₂₁₋₂₃₁	EXBIO, Praha
6H4	PrP ₁₄₄₋₁₅₂	Prionics, Švýcarsko
AH6	PrP ₁₅₉₋₁₇₄	TSE resource center, UK
GE8	PrP ₁₈₃₋₁₉₁	TSE resource center, UK
V5B2	PrP ₂₁₄₋₂₂₆	CKT, Ljubljana

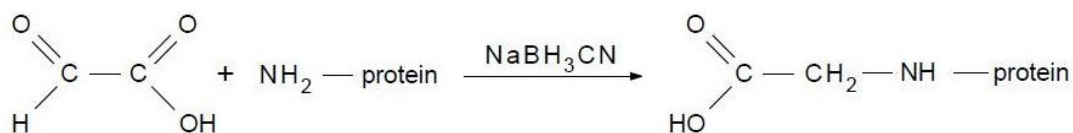
Tab. 3: Seznam použitých monoklonálních protilátek a jejich epitopy.

3.3. Příprava a využití protilátek proti glykovanému prionovému proteinu

3.3.1. Modifikace rPrP kyselinou glyoxalovou

Přečištěný rPrP byl rozpuštěn v 50 mM fosfátovém pufru pH 8,0 a modifikován 45 mM kyselinou glyoxalovou s 1 mM kyanoborohydridem sodným. Modifikace (rovnice reakce na Obr. 10) probíhala přes noc a směs byla ponechána na kývačce při 4°C. Modifikovaný protein byl centrifugován 15 min. při 14 000 g, supernatant byl analyzován na western blotu a použit k imunizaci pokusných myší (viz. 3.3.3.). rPrP lze modifikovat kyselinou glyoxalovou přímo v mikrotitrační destičce (viz 3.3.4.). rPrP byl ukotven na dno destičky v množství 1 µg/ml a modifikován 0 – 100 mM kyselinou glyoxalovou s 50 mM kyanoborohydridem sodným v 0,2 M fosfátovém pufru pH 7,4

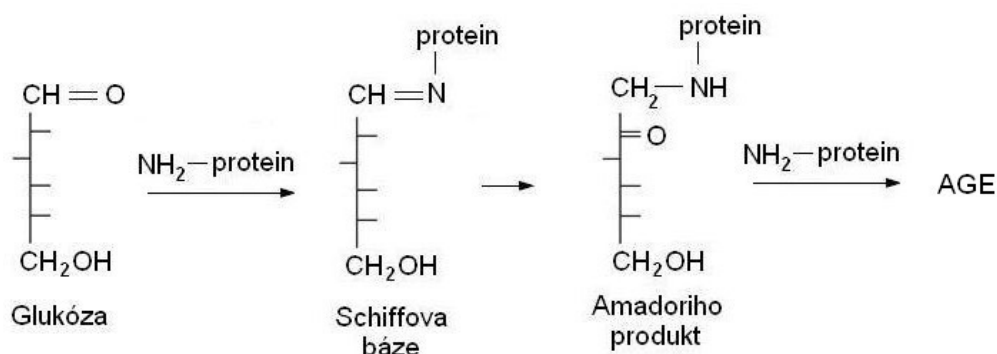
[108]. rPrP byl eventuelně modifikován přímo na nitrocelulóзовé membráně 50 mM kyselinou glyoxalovou s 50 mM kyanoborohydridem sodným 16 hod. při 4°C. Po modifikaci proteinů byla membrána promyta, blokována a inkubována 1 hod. při pokojové teplotě se supernatanty klonů ředěnými 1:10.



Obr. 10: Rovnice reakce kyseliny glyoxalové s koncovou aminoskupinou proteinu

3.3.2. Modifikace rPrP redukujícími cukry

Glykaci rPrP lze provést i redukujícími cukry (Obr. 11). Přečištěný rPrP byl rozpuštěn ve 20 mM Tris-HCl pH 8,0 a inkubován s 1 M glukózou, fruktózou, galaktózou a D-ribózou po dobu 7 dnů při 37°C v atmosféře N₂.



Obr. 11: Rovnice reakce glukózy s koncovou aminoskupinou proteinu. V prvním kroku vzniká nestabilní Schiffova báze, která po čase podléhá přesmyku na stabilní Amadoriho produkt. Dalšími neenzymatickými inter- a intramolekulárními reakcemi vzniká spektrum produktů zvaných koncové produkty glykace („advanced glycation end products“, AGEs).

3.3.3. Imunizace myši

Šest *Prnp*^{0/0} (Zürich I) myši (EMMA, Monterondo, Itálie) bylo imunizováno s.c. 30 µg rhPrP-CML v PBS s Freundovým adjuvans ve dnech 0, 14 a 28. Titry protilátek proti

hPrP a hPrP-CML v myším séru byly měřeny metodou ELISA (viz 3.3.4.) ve dnech 21 a 35, tj. v týdenním intervalu po druhé a třetí imunizaci. V den 64 byl dvěma myším s nejvyšším titrem protilátek i.v. podán finální booster 5 μg antigenu v PBS. 68. den byly myši usmrceny a sleziny obou myší byly použity k fúzi s myelomovými buňkami. Bylo připraveno 960 hybridomových buněk (EXBIO, Praha), které byly primárně screenovány metodou ELISA s využitím hPrP a hPrP-CML.

3.3.4. ELISA

K testování myších sér a k primárnímu screeningu hybridomových supernatantů byly použity rhPrP (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a rhPrP-CML (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), které byly v 50 mM uhličitanovém pufru pH 9,6 ukotveny na dno destiček (NUNC U96 MaxiSorp). K testování specificity monoklonálních protilátek byly použity rPrP, rPrP-CML, BSA a BSA-CML (vše 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a rPrP-AGE (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Destičky byly 3x promyty PBS-T a blokovány 1% BSA v PBS-T. Myší séra byla ředěna 1:5000 až 1:40 000 a monoklonální protilátky dvojkovou řadou (2 až 0,008 $\mu\text{g}/\text{ml}$) v 0,1% BSA v PBS, hybridomové supernatanty byly testovány neředěné. Konjugát (GAM IgG-HRP, Jackson ImmunoResearch nebo Caltag) byl zředěn na konečnou koncentraci 0,125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ v PBS-T a destičky byly vyvolány substrátem TMB (Amresco). Reakce byla ukončena 1 M H_2SO_4 a absorbance byla změřena při 405 nm (Victor, PE).

3.3.5. Příprava mozkových homogenátů

Myší a lidská mozková tkáň (frontální kůra) byla homogenizována (1:9) v homogenizačním pufru vychlazeném na ledu (PBS, 2 mM EDTA, 1 mM proteázový inhibitor PMSF) za pomoci homogenizéru se skleněnými kuličkami (Mini-Beadbeater-16, Biospec Products) a následnou sonikací na maximální výkon 3x 30s na ledu s pauzou mezi sonikacemi 3 min. [104]. Vzorek byl stočen 10 min. na 4 000 g při 4°C a supernatant (10%, w/v mozkový homogenát) byl zamrazen v alikvotech v -80°C. Při použití vzorků byl ihned po rozmrazení přidán 0,5% Triton X-100, 0,5% deoxycholát sodný a 1 mM PMSF nebo inhibitorový koktejl (Complete, Roche), vzorek vortexován a ponechán 10 min. stát při laboratorní teplotě.

3.3.6. Screening klonů

53 supernatantů klonů vybraných v primárním screeningu metodou ELISA bylo testováno western blotem na reaktivitu s rhPrP a rhPrP-CML. Terciární screening byl proveden western blotem a dot blotem na biologickém materiálu: 1% normální lidský mozkový homogenát (MH), 1% myši mozkový homogenát („wild type“ C57BL; *Prnp*^{0/0} a RML infikované C57BL), lidské krevní destičky (10⁹/ml), membrány po hemolýze červených krvinek (10¹⁰/ml) a BSA (0,5 mg/ml). Vzorky byly glykovány přímo na membráně (viz 3.3.1.).

3.3.7. Chemická modifikace peptidu hPrP-Cys

Syntetický peptid hPrP₁₀₀₋₁₁₃ s C-koncovým cysteinem (hPrP₁₀₀₋₁₁₃Cys, aminokyselinová sekvence NKPSKPKTNMKHMAC) byl rozpuštěn v 0,1 M fosfátovém pufru pH 8,3 na výslednou koncentraci 4 mg/ml. K ochránění cysteinové skupiny před modifikací lysinů (K) byl použit trimethoxybenzyl chlorid (Tmob, Sigma-Aldrich) v acetonitrilu v 50 násobném molárním přebytku oproti hPrP₁₀₀₋₁₁₃Cys. Roztok peptidu byl pomalu přidáván k roztoku Tmob ve výsledném poměru 1:1 (v/v), vzniklá sraženina byla rozvortexována a reakce probíhala 5 hod. 20 min. na kývačce při laboratorní teplotě. Reakce byla ukončena 6x vytřepáním nezreagovaného Tmob do etheru. Po odebrání poslední etherové (horní) frakce byl vodný roztok zakoncentrovaného hPrP₁₀₀₋₁₁₃Cys-Tmob zředěn 0,1 M fosfátovým pufrům pH 8,3 na výslednou koncentraci 2 mg/ml a glykovan 45 mM kyselinou glyoxalovou s 25 mM kyanoborohydridem sodným po dobu 18 hod. ve 4°C na kývačce. pH roztoku po přidání kyseliny glyoxalové bylo zkontrolováno a eventuálně upraveno roztokem NaOH na hodnotu > 7,0. Glykovaný hPrP₁₀₀₋₁₁₃Cys-Tmob byl dialyzován (membrána Spectra Por 7, 1000 kDa MWCO) do 50 mM acetátu amonného pH 8,3 a lyofilizován. Pro odstranění chránící skupiny z cysteinu byl modifikovaný peptid rozpouštěn v 30% kyselině trifluoroctové (TFA) s přísadkou scavengerů (89 TFA: 3 H₂O: 3 thioanisol: 3 ethandithiol: 1 TIS), které zamezily opětovnému navázání Tmob na jiné místo v sekvenci peptidu. Po 3,5 hodinách reakce byl peptid preparován na HPLC koloně a jeho čistota zkontrolována hmotnostní spektrometrií. Výtěžek modifikovaného peptidu s volnou cysteinovou skupinou pro navázání na imunogenní nosič byl 54%.

3.4. Detekce fragmentu prionového proteinu PrP226* v lidském mozku

3.4.1. Lidské vzorky

K vývoji V5B2 testu bylo použito 24 CJN/GSS pozitivních a 10 negativních (non-CJN) vzorků lidských mozkových tkání z frontální kůry. 20 CJN případů bylo sporadických, 3 genetické a jeden případ Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom (GSS). CJN/GSS vzorky byly potvrzeny v národní referenční laboratoři TSE-CJN na oddělení patologie ve fakultní Thomayerově nemocnici v Praze (Dr. R. Matěj). Pro optimalizaci testu metodou ELISA bylo použito dalších 9 sporadických CJN vzorků z frontální kůry diagnostikovaných na oddělení patologie Lékařské fakulty Univerzity Ljubljana a dalších 25 negativních mozkových tkání. Tkáně byly homogenizovány 1:9 v homogenizačním pufru (0,5% deoxycholát sodný, 0,5% Tergitol, 25 mM Tris pH 7,6) vychlazeném na ledu za pomoci homogenizéru HT1000 Potter. Mozkové homogenáty (10% MH, w/v) byly centrifugovány 10 min. na 4 000 g při 4°C a zamrazeny v alikvotech v -80°C. Při použití vzorků byl ihned po rozmrazení přidán 1 mM PMSF nebo inhibitorový koktejl (Complete, Roche).

3.4.2. Denaturace vzorků

Vzorky pro optimalizaci denaturace byly denaturovány přímo v mikrotitračních destičkách. 10% lidské MH byly v neadsorbující mikrotitrační destičce (Gama, ČR) smíchány 1:1 (v/v) s 1-6 M guanidin thiokyanátem (Gdn-SCN) v 50 mM Tris-HCl pH 8,0; s 2 – 8 M močovinou v 50 mM Tris-HCl pH 8,0 nebo s 1 – 6 M guanidin hydrochloridem (Gdn-HCl) v 50 mM Tris-HCl pH 8,0. Destičky byly přelepeny neprodyšnou izolepou a inkubovány buď 15 min. při 60°C nebo 10 min. při 85°C na kývačce. Po vychladnutí byly vzorky přeneseny do destiček s ukotvenou protilátkou V5B2 (viz 3.4.4.) a inkubovány při 37°C.

Vzorky pro měření V5B2 testem byly připraveny denaturací 10% lidských MH Gdn-SCN a následným ředěním. Alikvot 10% MH byl smíchán 1:1 (v/v) s 3 M Gdn-SCN v 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, vortexován a denaturován 15 min. při 60°C. Vzorek byl po vychladnutí krátce stočen na 500 g a supernatant byl dále 20x zředěn TBS-T na 0,25% MH. Nedenaturované MH byly po rozmrazení vortexovány, krátce stočeny na 500 g a

supernatant byl 40x zředěn TBS-T na 0,25% MH. Denaturované i nedenaturované vzorky byly ihned nanесeny do mikrotitračních destiček a inkubovány při laboratorní teplotě.

Vzorky pro měření konformačně-dependentní imunoesejí (CDI) byly připraveny podle Safar a kol. [56]. 10% MH byly smíchány 1:1 (v/v) se 4% sarkosylem v PBS, vortexovány a ponechány 10 min. při laboratorní teplotě. Směs byla poté smíchána 1:1 (v/v) s 8 M Gdn-HCl v PBS, vortexována a denaturována 5 min. při 80°C. Vzorek byl po vychladnutí krátce stočen na 500 g a supernatant byl dále 10x zředěn vodou s 5 mM PMSF, aprotininem a pepstatinem (oba 4 µg/ml) na 0,25% MH. Nedenaturované MH byly po rozmrazení smíchány 1:1 (v/v) se 4% sarkosylem v PBS, vortexovány a ponechány 10 min. při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky krátce stočeny na 500 g a supernatant byl 20x zředěn vodou s 0,4 M Gdn-HCl, 0,5 mM PMSF, aprotininem a pepstatinem (oba 4 µg/ml) na 0,25% MH. Denaturované i nedenaturované vzorky byly ihned nanесeny do mikrotitračních destiček a inkubovány při laboratorní teplotě.

3.4.3. Biotinylace protilátek

Monoklonální protilátky EM-20, E12/2, EF2 a 3F4 (1 mg/ml) byly smíchány 1:1 (v/v) se Sulfo-NHS-LC-Biotinem (Sigma-Aldrich) rozpuštěném v PBS ve 20 násobném molárním přebytku oproti protilátkám. Reakce probíhala 1 hod. při laboratorní teplotě a biotinylované protilátky byly dialyzovány (membrána Zellu Trans Roth, MWCO 14 000 kDa) do PBS s 0,05% azidem sodným a po ukončení dialýzy byl přidán BSA na výslednou koncentraci 0,1%. Protilátky byly alikvotovány a zamrazeny v -80°C.

3.4.4. Optimalizační ELISA

K optimalizaci denaturačních podmínek V5B2 testu a ke studiu stability fragmentu PrP226* byla použita monoklonální protilátka V5B2 (5 µg/ml), která byla v 50 mM uhličitanovém pufru pH 9,6 ukotvena na dno destiček (NUNC U96 MaxiSorp). Destičky byly 3x promyty PBS-T a blokovány 1% BSA v PBS-T. Vzorky 10% MH byly ředěny dvojkovou řadou na výslednou koncentraci 0 – 3 M Gdn-SCN v 50 mM Tris-HCl pufru pH 8,0 a inkubovány 15 min. při 60°C. Vzorky byly poté 10x naředěny v 50 mM Tris-HCl pufru pH 8,0 a inkubovány v destičkách 90 min. při 37°C. Po promytí

byly přidány sekundární protilátky konjugované s biotinem naředěné 0,1% BSA v PBS dle Tab. 4 a inkubovány 60 min. při 37°C. Avidin-HRP (0,2 µg/ml, Pierce) byl přidán na 30 min. při 37°C a po posledním promývacím kroku byl přidán roztok TMB (Pierce). Reakce byla zastavena 0,1 M H₂SO₄ a byla měřena absorbance při 405 nm.

3.4.5. DELFIA

Na dno NUNC U96 MaxiSorp destiček byly ukotveny monoklonální protilátky V5B2 (1 µg/ml) nebo EM-20 (1 µg/ml) v 50 mM uhličitanovém pufru pH 9,6. Destičky byly 3x promyty TBS-T a blokovány 1% BSA v TBS-T. Přípravené nativní i denaturované vzorky byly 20x naředěny v TBS-T na výslednou koncentraci 0,25% MH, naneseny do jamek a inkubovány 90 min. při pokojové teplotě. Destičky byly 3x promyty TBS-T a inkubovány se sekundární biotinylovanou anti-PrP protilátkou (ředění viz Tab. 4) 60 min. při 37°C. Destičky byly opět 3x promyty TBS-T a inkubovány 30 min. při 37°C se streptavidinem konjugovaným s europiem (Eu-SA, PE), naředěným na 0,125 µg/ml ve vazebném roztoku (Assay Buffer, PE) a filtrovaným přes 0,22 µm filtr. Destičky byly následně 6x promyty (1x Wash Buffer, PE) a byl přidán roztok uvolňující europium z navázaného streptavidinu (Enhancement solution, PE). Poté byla destička vložena na 5 min. při laboratorní teplotě na orbitální třepačku a byla měřena „time-resolved“ fluorescence při 613 nm po excitaci vzorku při 340 nm, časová prodleva mezi excitací a měřením emisní fluorescence byla 400 µs.

3.4.6. Konformačně-dependentní imunoesej (CDI)

Konformačně-dependentní imunoesej (CDI) byla provedena v sendvičovém uspořádání dle McCutcheon a kol. [114] se zavedením protilátky 3F4 v biotinylované formě a následným použitím streptavidinu konjugovaného s europiem (PE). Vzorky byly připraveny za použití 8 M Gdn-SCN (viz 3.4.2.) a DELFIA byla provedena jako v 3.4.5. s použitím monoklonální protilátky FH11 (1 µg/ml) jako kotvící protilátky a biotinylované 3F4 jako sekundární protilátky (ředění viz Tab. 4).

Biotinylovaná protilátka	Epitop	Výrobce protilátky	Ředění (μg/ml)
EM-20	PrP ₁₂₁₋₂₃₁	EXBIO, Praha	0,5
E12/2	diskontinuální epitop PrP obsahující His ₁₅₅	CKT, Ljubljana	2,0
EF2	N-konec PrP	CKT, Ljubljana	2,0
3F4	PrP ₁₀₆₋₁₁₂	Biodesign, Chemicon	0,5

Tab. 4: Ředění biotinylovaných monoklonálních protilátek v metodách ELISA (3.4.4.), DELFIA (3.4.5.) a CDI (3.4.6.).

3.4.7. Štěpení mozkových homogenátů proteinázou K

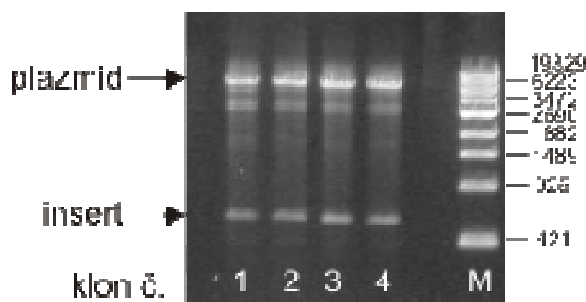
5% lidské mozkové homogenáty v PBS byly štěpeny proteinázou K (finální koncentrace 0, 10 a 50 μg/ml). Štěpení probíhalo 30 min. při 37°C, poté bylo ukončeno varem se vzorkovým pufrem (viz 3.2.6.). Vzorky štěpeného prionového proteinu byly analyzovány western blotem, membrány byly naskenovány pomocí dokumentačního systému MiniLumi, DNR Bio-Imaging Systems a densitometricky vyhodnoceny pomocí softwaru ImageJ.

4. Výsledky

4.1. Příprava rekombinantního prionového proteinu

4.1.1. Konstrukce vektoru pET-15b obsahující gen pro rekombinantní myší prionový protein (rmPrP)

Pro zaklonování insertu byly použity restriktční endonukleázy *NdeI* a *BamHI* umožňující vložení genu pro mPrP za sekvenci His kotvy (His-tagu). His-tag obsažený v plasmidu pET-15b je složen z 19 aminokyselin o sekvenci MGSSHHHHHHSSGLVPRGS a obsahuje štěpné místo pro thrombin mezi Arg₁₇ a Gly₁₈ (červeně). Palindromatická sekvence restriktázy *NdeI* (CATATG), která bezprostředně navazuje na sekvenci His-tagu a umožňuje do plazmidu zaklonovat počátek sekvence pro mPrP, vkládá navíc mezi C-konec His-tagu a N-konec mPrP dipeptid HM (Obr. 11). Po odštěpení His-tagu thrombinem tak aminokyselinová sekvence rekombinantního mPrP začíná sekvencí GSHM, která je předřazená vlastní sekvenci mPrP₂₃₋₂₃₀ (KKRPK...). Během klonování byly izolovány a zamraženy 4 klony vektoru pET-15b s nově zaklonovaným insertem *mPrnpa*. Pro kontrolu byly namnožené plazmidy zpětně štěpeny restriktázami *NdeI* a *BamHI*, přítomnost a délka insertu byla ověřena pomocí horizontální agarózové elektroforézy. Všechny 4 klony obsahovaly insert o délce cca 600 pb (přesně 636 pb) a původní plazmid o délce 5700 pb (Obr. 12). Klony 3 a 4 byly vybrány k expresnímu testu a byly osekvenovány v oblasti kódující daný fúzní protein. K sekvenaci byla použita souprava BigDye Terminator v3.1 Sequencing kit od firmy Applied Biosystems (USA) a primery navržené pro zmnožení *mPrnpa* (viz 3.2.1.). Vzorky byly analyzovány pomocí kapilárního sekvenátoru ABI Prism 3100- Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) v laboratoři ÚDMP 1.LF UK. Pro expresi proteinu byl vybrán klon 4, který podle sekvenace vykazoval 100% shodu s předlohou.

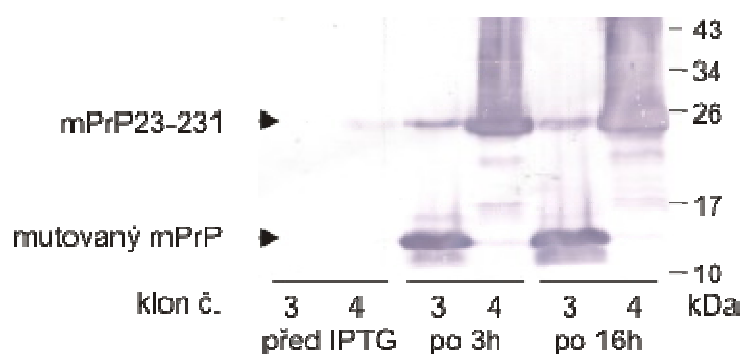


Obr. 12: Kontrola ligace insertu mPrP do plazmidu pET-15b. Čerstvě ligované vektory

byly namnoženy v *E. coli* DH5 α a kultivovány na agaru, odkud byly izolovány 4 kolonie. Po izolaci vektorů byla provedena kontrola přítomnosti insertu pomocí restričních endonukleáz *Bam*HI a *Nde*I (pozice 1, 2, 3, 4). Na pozici M byl přidán λ DNA/Eco13I (StyI) marker.

4.1.2. Příprava rekombinantního myšího prionového proteinu (rmPrP)

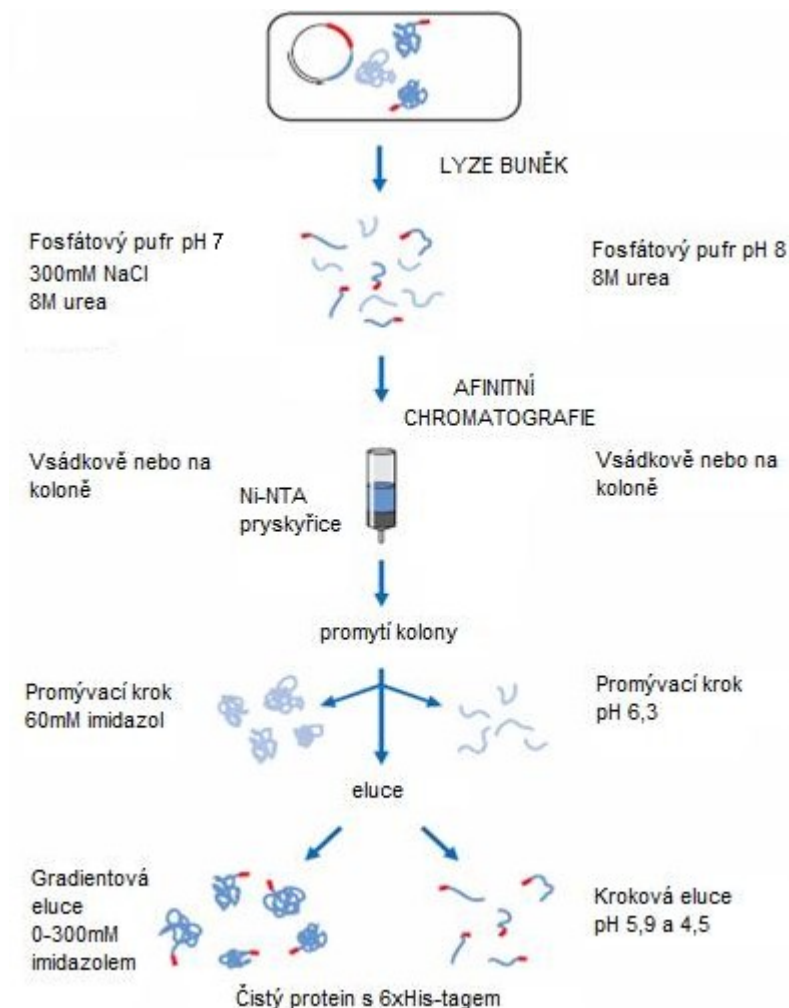
Nejprve byly pro kontrolu exprese transformovány kompetentní buňky *E. coli* BL21(DE3) vybranými vektory 3 a 4. Po transformaci byla směs buněk a vektoru přenesena na agar obsahující ampicilin, čímž se zabránilo růstu netransformovaných bakterií. Vybrané kolonie byly zaočkovány do LB média obsahujícího ampicilin pro udržení selekčního prostředí. Po přidání IPTG byla sledována hladina exprese rekombinantního mPrP. Před indukcí ke tvorbě rmPrP nedocházelo, hladina rmPrP po 3 hod. inkubace po indukci IPTG byla obdobná jako 16 hod. po indukci (Obr. 13). Z výsledků western blotu odebíraných alikvotů je patrné, že vektor č. 4 obsahuje insert pro mPrP správné molekulové hmotnosti (25,5 kDa i s His kotvou), kdežto u vektoru č. 3 došlo během procesu klonování k mutaci insertu, jež se projevila předčasným ukončením transkripce ($M_w < 17$ kDa, Obr. 13). Výsledky sekvenace (viz výše) potvrdily mutaci sekvence mPrP s tvorbou předčasného stop kodonu. Klon č. 4 podle sekvenace vykazoval 100% shodu s předlohou a byl vybrán pro následnou expresi proteinu.



Obr. 13: Čerstvě připravené klony 3 a 4 byly vybrány ke kontrolní expresi rmPrP. *E. coli* BL21(DE3) byly po transformaci kultivovány v LB médiu při 37°C a po dosažení OD 0,6 byl přidán IPTG pro indukci exprese rmPrP. Část buněk byla z média odebrána před indukcí, část po 3 hod. a část 16 hod. po indukci. Buňky byly lyzovány 1% SDS a

naneseny do jamek, western bloty byly obarveny anti-PrP protilátkou AG4 (0,25 µg/ml).

4.1.3. Příprava a purifikace rmPrP

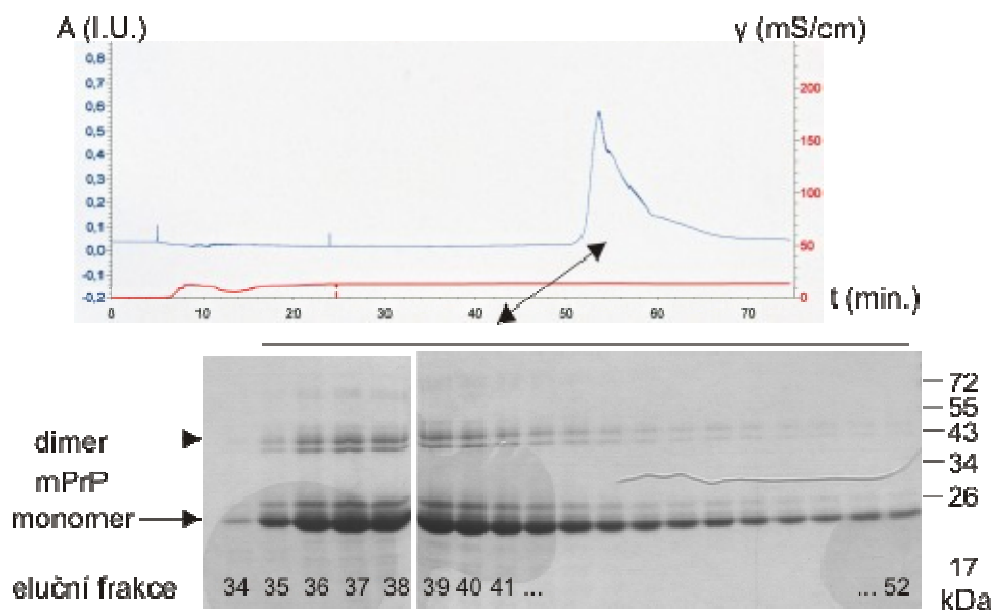


Obr. 14: Schéma izolace a purifikace rmPrP pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA pryskyřici. Schéma upraveno dle Protokolu „The QIAexpressionist“, 06/2003.

Proces izolace a purifikace rmPrP je znázorněn na Obr. 14. Po omytí vnějších membrán roztokem sacharózy jsou buňky sonikovány a uvolněná DNA je štěpena endonukleázou (DNáza I, typ II, benzonáza) pro snížení viskozity buněčného lyzátu. Prionový protein ochotně váže DNA a bez použití endonukleáz je izolát rmPrP znečištěn velkým množstvím DNA. Protein se exprimuje v cytoplazmě *E. coli* ve formě inkluzních tělísek, které lze v poměrně vysoké čistotě z buněčného lyzátu izolovat a následně denaturovat močovinou nebo guanidin hydrochloridem. Rekombinantní mPrP₂₃₋₂₃₀ je

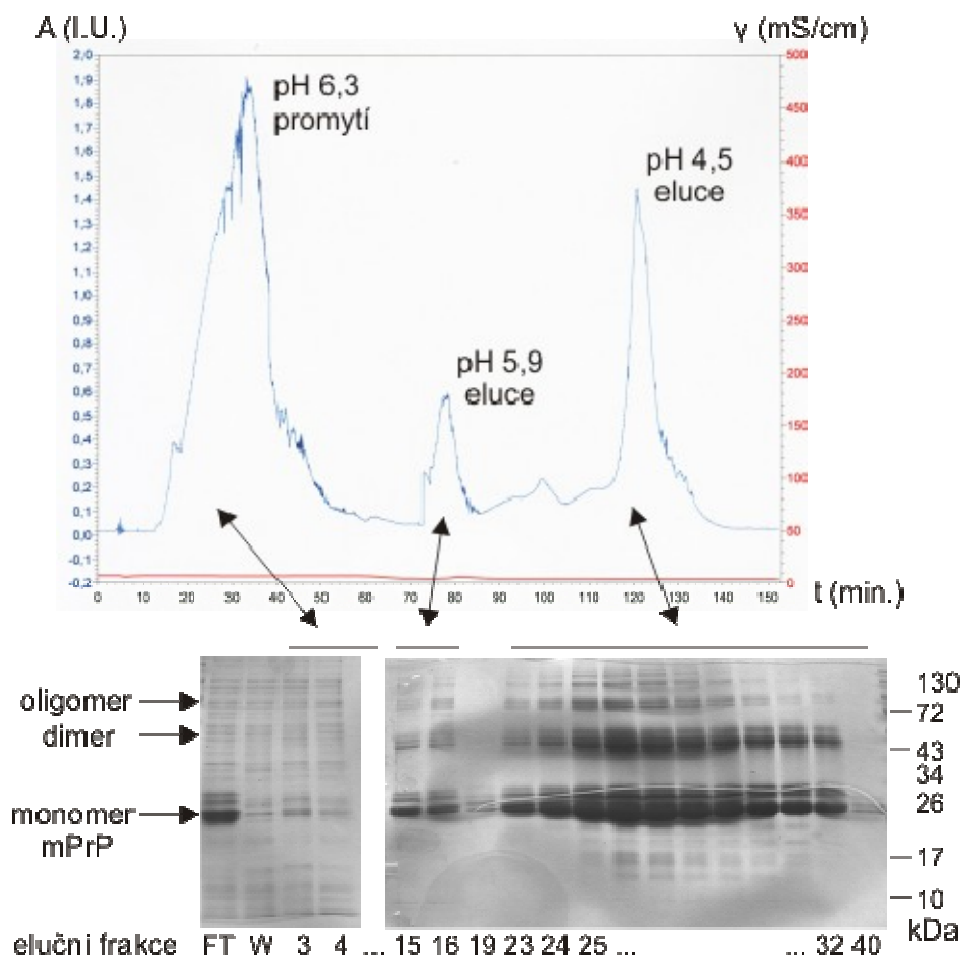
citlivý k proteolytickému štěpení, bez přídavku inhibitorů dochází během izolace ke štěpení molekuly rmPrP, především její N-koncové a centrální části [115]. Proto byly v průběhu izolace inkluzních tělísek k bakteriálnímu lyzátu přidávány inhibitory proteáz, především inhibitory serinových proteáz jako je PMSF, nebo inhibitorové koktejly. Během solubilizace inkluzních tělísek byl mPrP redukován, aby mohl být v dalších krocích správně sbalen a reoxidován se zamezením tvorby intermolekulárních disulfidických můstků. Redukovaný protein byl v denaturovaném stavu přečištěn bioafinitní chromatografií na agaróze s kyselinou nitrilotrioctovou saturevanou Ni^{2+} ionty (Ni-NTA), která má vysokou afinitu k proteinům obsahujícím 6 konsektivních histidinů na svém N- nebo C- konci (6xHis-tag) [116]. Nečistoty bez His-tagu byly odmyty a čistý rmPrP byl z kolony v denaturovaném stavu eluován.

K dosažení vysokých výtěžků čistého rmPrP bylo třeba proces purifikace na Ni-NTA pryskyřici optimalizovat. Ačkoliv samotná purifikace následně probíhala pro zjednodušení celého procesu vsádkově v 50 ml centrifugačních zkumavkách, během optimalizace byl pro sledování jednotlivých purifikačních kroků využit nízkotlaký FPLC systém (Bio-Logic SAS). Rekombinantní mPrP s His-tagem lze z kolony eluovat buď rostoucím gradientem imidazolu při pH 7,0, nebo snížením pH z 8,0 (kdy dochází k optimální vazbě His-tagu na matrici) postupně na pH 4,5. Při použití imidazolu jako elučního činidla byla nejprve většina nečistot odmyta ekvilibračním pufrém. Nečistoty s nízkou nebo nescifickou afinitou k Ni-NTA matrici byly odmyty 50 mM imidazolem a eluce rmPrP byla provedena gradientem imidazolu v rozmezí 50 – 300 mM. K eluci proteinu docházelo při koncentraci imidazolu > 100 mM (viz Obr. 15). Jednotlivé eluční frakce byly jímány v objemu 0,5 ml a ihned analyzovány na SDS-PAGE po obarvení Coomassie brilliant blue. rmPrP byl rozmyt do více jak 15 elučních frakcí, což potvrzuje i chvostující pík na záznamu absorpční křivky (Obr. 15). Z tohoto důvodu byla eluce imidazolem na Ni-NTA matrici zamítnuta.



Obr. 15: rmPrP po izolaci z expresních *E. coli* BL21(DE3) byl ve 20 mM fosfátovém pufru pH 7,0 s 300 mM NaCl a 8 M ureou vstříknut do ekvilibrované kolony naplněné Ni-NTA maticí a napojené na nízkotlaký FPLC (Bio-Logic SAS). Kolona byla promyta stejným puforem, eluce gradientem imidazolu (0 – 300 mM během 20 min., průtok 0,5 ml/min.) byla monitorována integrovaným spektrofotometrem při 280 nm (eluce 45. – 65. min.) Jednotlivé eluční frakce o objemu 0,5 ml byly analyzovány na SDS-PAGE po obarvení Coomassie brilliant blue.

Při eluci snížením pH byla nejprve většina nečistot odmyta ekvilibračním puforem. Nečistoty s nízkou nebo nescifickou afinitou k Ni-NTA matici byly odmyty při pH 6,3, eluce rmPrP byla provedena v rámci optimalizace ve dvou krocích: nejprve při pH 5,9, kdy se rmPrP eluoval nedostatečně, a při pH 4,5, kdy došlo k masivní eluci (viz Obr. 16). Jednotlivé promývací a eluční frakce byly jímány v objemu 0,5 ml a ihned analyzovány na SDS-PAGE po obarvení Coomassie brilliant blue. Eluční pík při pH 4,5 na záznamu absorpční křivky je souměrný a s úzkou základnou, většina čistého proteinu byla eluována ve vysokých koncentracích v 8 – 10 frakcích, což je při eluci proteinu adekvátní. Vzhledem k vysoké koncentraci rmPrP nebyla část oligomerů redukována (Obr. 16). Před dalším krokem přípravy bylo tedy třeba eluční frakce zředit na koncentraci $\leq 1,0$ mg/ml a ponechat přes noc v redukčním prostředí, aby došlo k rozvolnění intermolekulárních disulfidických můstků a monomery redukovaného rmPrP mohly být korektně reoxidovány a sbaleny.

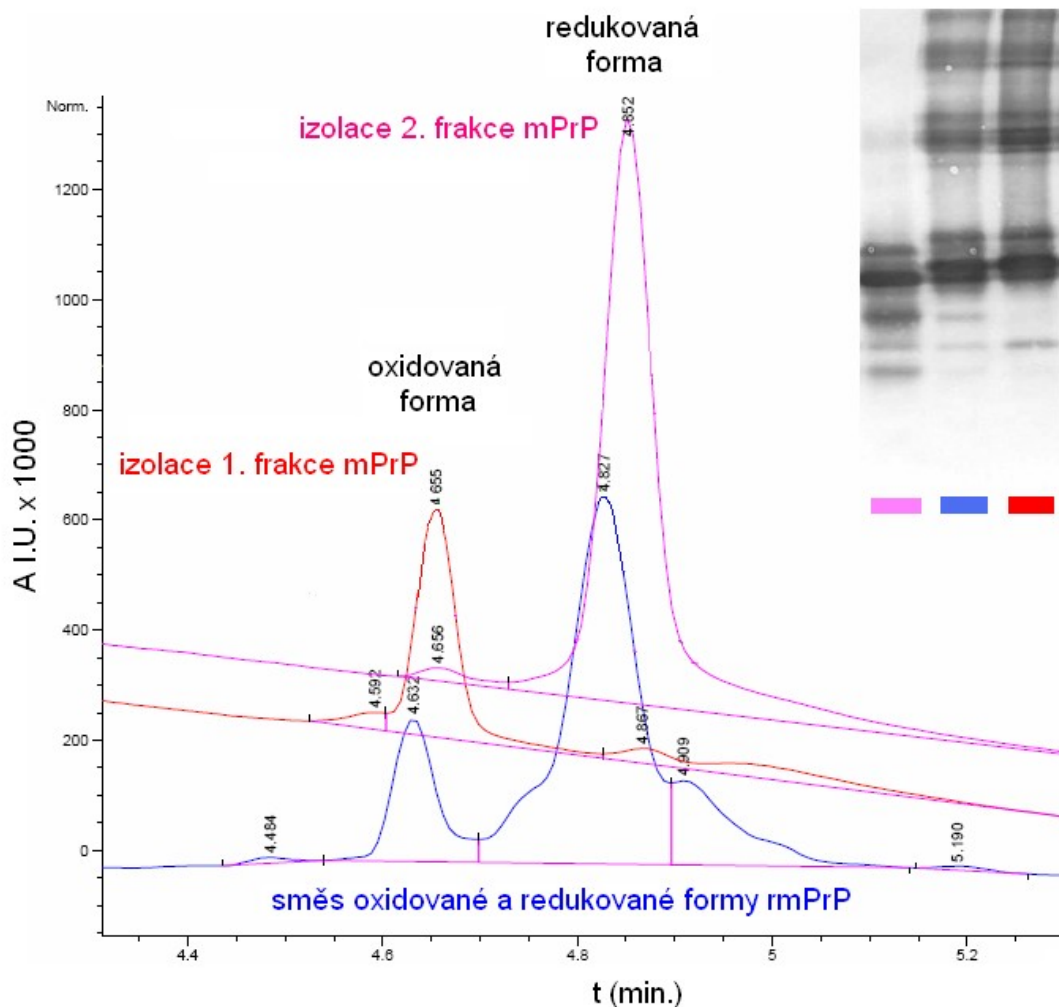


Obr. 16: rmPrP po izolaci z expresních *E. coli* BL21(DE3) byl v 50 mM fosfátovém pufru pH 8,0 s 8 M ureou vstříknut do ekvilibrované kolony naplněné Ni-NTA matricí a napojené na nízkotlaký FPLC (Bio-Logic SAS). Kolona byla promyta stejným puforem o pH 6,3 (15. – 55. min., průtok 0,5 ml/min.), eluce probíhala krokově při pH 5,9 (55. – 95. min., průtok 0,5 ml/min.) a při pH 4,5 (95. – 125. min., průtok 0,5 ml/min.). Průběh purifikace byl monitorován integrovaným spektrofotometrem při 280 nm a jednotlivé frakce o objemu 0,5 ml byly analyzovány na SDS-PAGE po obarvení Coomassie brilliant blue. Část rmPrP protekla systémem bez zachycení na koloně (FT), u promývacích frakcí je patrna řada nečistot (W, 3, 4). Eluce při pH 5,9 proběhla nedostatečně (15, 16, 19), většina proteinu byla eluována až při pH 4,5 (23-32, 40).

Za použití vektoru pET-15b v expresních *E. coli* BL21(DE3) a po přečištění na Ni-NTA matrici (eluce při pH 4,5) bylo dosaženo výtěžku 35 mg rmPrP / 1 l média.

4.1.4. Oxidace a renaturace rmPrP

Opětovné sbalení a oxidace rekombinantního mPrP jsou kritickými kroky pro získání vysokého výtěžku správně sbaleného proteinu. Renaturace rmPrP vyředěním denaturačního a redukčního činidla do vodného pufru vede k masivní agregaci proteinu a ke tvorbě intermolekulárních disulfidických můstků. rmPrP byl proto nejprve za stálého míchání oxidován glutathionem (GSSG) ještě v denaturovaném stavu a teprve potom sbalen do nativní konformace dialýzou do vodného pufru. Aby se zamezilo tvorbě intermolekulárních disulfidických můstků, byl protein oxidován v nízkých koncentracích ($\leq 1,0$ mg/ml). Průběh oxidace a tvorby disulfidických můstků lze sledovat pomocí HPLC na reverzních fázích. Připravený rmPrP byl eluován lineárním gradientem acetonitrilu ve dvou hlavních pících (Obr. 17). Nejdříve došlo k eluci monomerního rmPrP v oxidovaném stavu a následně k eluci monomerního mPrP v redukovaném stavu (Obr. 17, modře). Po separaci složek jednotlivých píků (Obr. 17, červeně a růžově) byl proveden western blot, kde se oxidovaná forma díky přítomnosti disulfidického můstku (a tím i relativně menší molekulovou délkou) projevila vyšší elektroforetickou mobilitou oproti redukované formě bez disulfidického můstku.



Obr. 17: rmPrP izolovaný v denaturujících podmínkách obsahuje směs oxidované a redukované formy (—). Vzorek byl analyzován pomocí HPLC na reverzních fázích (Agilent) v gradientu acetonitrilu 5 – 55% při 70°C, jednotlivé eluční píky byly jímány a opětovně analyzovány za stejných podmínek jako původní vzorek (1. frakce — a 2. frakce —). Obě formy i původní vzorek rmPrP byly současně analyzovány WB za použití anti-prionové protilátky AG4 (0,2 µg/ml). 1. frakce (—) je výrazně obohacena o oxidovanou formu rmPrP s nižší elektroforetickou mobilitou, 2. frakce (—) obsahuje redukovanou formu rmPrP a původní vzorek (—) obsahuje obě formy.

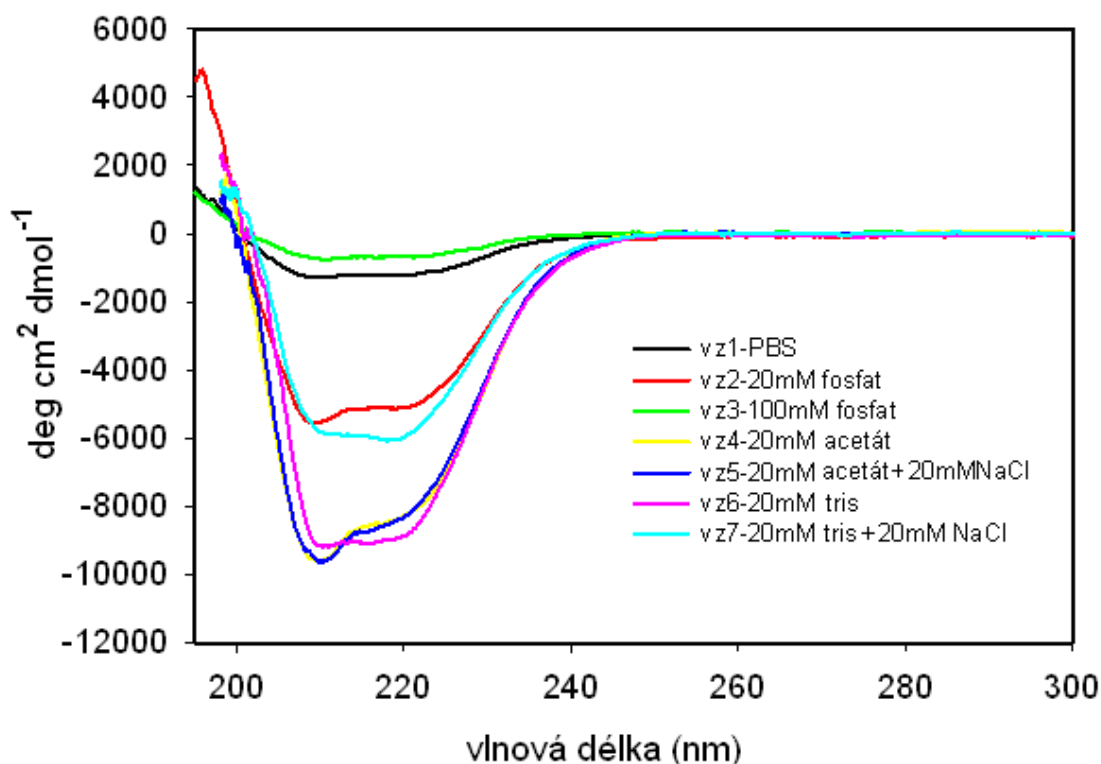
Díky HPLC analytickému systému mohl být způsob oxidace rmPrP optimalizován. Jako optimální byla vyhodnocena oxidace rmPrP o koncentraci 0,1 mg/ml 1 mM glutathionem za stálého míchání po dobu 24 hod. v denaturovaném stavu (8 M močovina nebo 6 M guanidin hydrochlorid). rmPrP byl následně zbaven denaturantu

dialýzou do vodného pufru a lyofilizován. Výťažek po purifikaci na HPLC byl 22,8 mg / 1,2 l média (tj. 19 mg/l) oxidovaného rmPrP a 19,9 mg / 1,2 l média (tj. 16,58 mg/l) redukovaného rmPrP.

Správné sbalení a stabilita rmPrP závisí na druhu pufru použitého k renaturaci, tj. na iontové síle a pH roztoku. V rámci optimalizace podmínek pro sbalení do nativní konformace (tj. α -šroubovice) byl rmPrP rozpuštěn v 7 různých pufrch, ve kterých byla pomocí cirkulárního dichroismu (CD) sledována jeho sekundární struktura a zároveň byla měřena jeho stabilita po dobu pěti týdnů ve 4°C.

4.1.5. Měření stability rmPrP

Po renaturaci rmPrP ve vodných pufrch o pH 4,5 a 8,3 došlo k mírné agregaci proteinu, kdy agregát obsahoval převážně redukovaný/znečištěný rmPrP a správně oxidovaný prionový protein v nativní konformaci zůstal v roztoku. Při použití pufru o pH 7,4 a iontové síle ≥ 100 mM došlo k masivní agregaci obou forem rmPrP, v roztoku zůstalo < 25% proteinu.



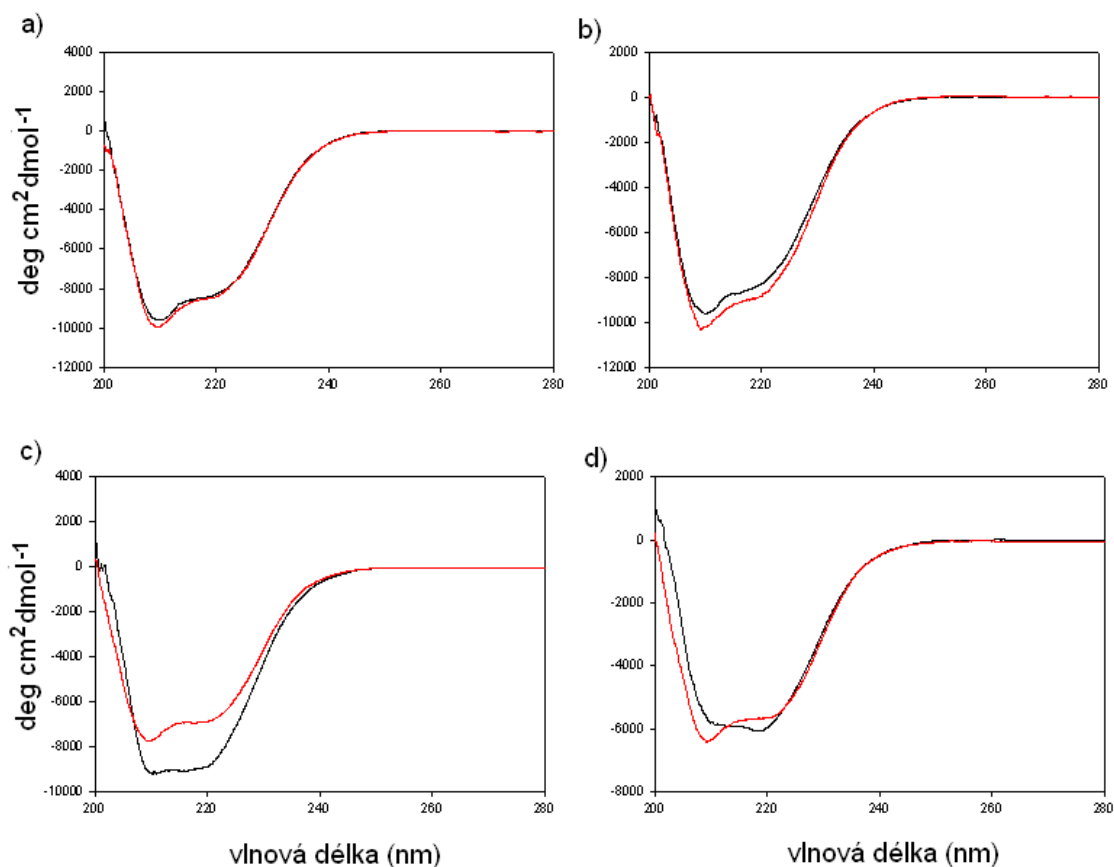
Obr. 18: CD spektra rmPrP₂₃₋₂₃₀ měřené v daleké UV oblasti při pH 4,5 – 8,3. Spektra jsou barevně odlišena podle použitých pufrů, lyofilizovaný rmPrP byl přidán v množství 1 mg/ml pufru. Spektra byla měřena ihned po renaturaci a centrifugaci agregátu na spektropolarimetru Jasco 815 (Japonsko) při laboratorní teplotě. — PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2,0 mM KH₂PO₄, pH 7,4; — 20 mM Na₂HPO₄, pH 7,4; — 100 mM Na₂HPO₄, pH 7,4; — 20 mM acetát, pH 4,5; — 20 mM acetát, 20 mM NaCl, pH 4,5; — 20 mM Tris-HCl, pH 8,3; — 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,3.

rmPrP vykazuje maximální α -helix ve 20 mM Tris-HCl pufru pH 8,3, kdy se vyskytuje dvojité minimum elipticity při cca. 210 a 220 nm a intenzita spektra je nejsilnější (Obr. 18, - 9000 deg cm² dmol⁻¹, —). Podobného výsledku bylo dosaženo i za použití 20 mM Tris-HCl pufru pH 8,3 s přídavkem 20 mM NaCl, kdy bylo dvojité minimum elipticity při ~210 a 220 nm (tj. α -helix) zachováno, pouze došlo k úbytku intenzity spektra vlivem mírného vysrážení proteinu při rozpouštění (Obr. 18, - 6000 deg cm² dmol⁻¹, —). Spektra rmPrP ve 20 mM acetátu pH 4,5 s přídavkem i bez přídavku 20 mM NaCl jsou téměř identická a obsahují pouze jedno minimum elipticity při ~210 nm, což svědčí o narůstajícím podílu neuspořádané struktury (Obr. 18, - 9500 deg cm² dmol⁻¹, — a —). Při použití fosfátových pufrů pH 7,4 o vyšší iontové síle (Obr. 18, PBS: 137 mM NaCl — a 100 mM Na₂HPO₄ —) došlo k agregaci > 80% rmPrP, což má za následek výrazné snížení intenzity spektra na hodnoty > -1000 deg cm² dmol⁻¹. Minima elipticity nejsou pozorovatelná, pravděpodobně následkem tvorby β -struktury. Při použití 20 mM fosfátového pufru pH 7,4 došlo k agregaci proteinu pouze částečně a mPrP se vyskytuje v neuspořádané struktuře (Obr. 18, - 5500 deg cm² dmol⁻¹, —).

Fosfátový pufr o pH 7,4 byl vzhledem k vysoké agregaci a neuspořádané sekundární struktuře rmPrP vyhodnocen jako nevhodný pro renaturaci a nebyl uvažován ani v následném sledování stability proteinu. Vzorky rmPrP byly ponechány ve 4°C, po 1 týdnu stání byly roztoky centrifugovány a bylo opětovně proměřeno CD spektrum v daleké UV oblasti (Obr. 19), dále spektrum v blízké UV a VIS oblasti (Obr. 20) a každých 7 dní byla proměřena koncentrace rmPrP v roztoku metodou BCA (Obr. 21).

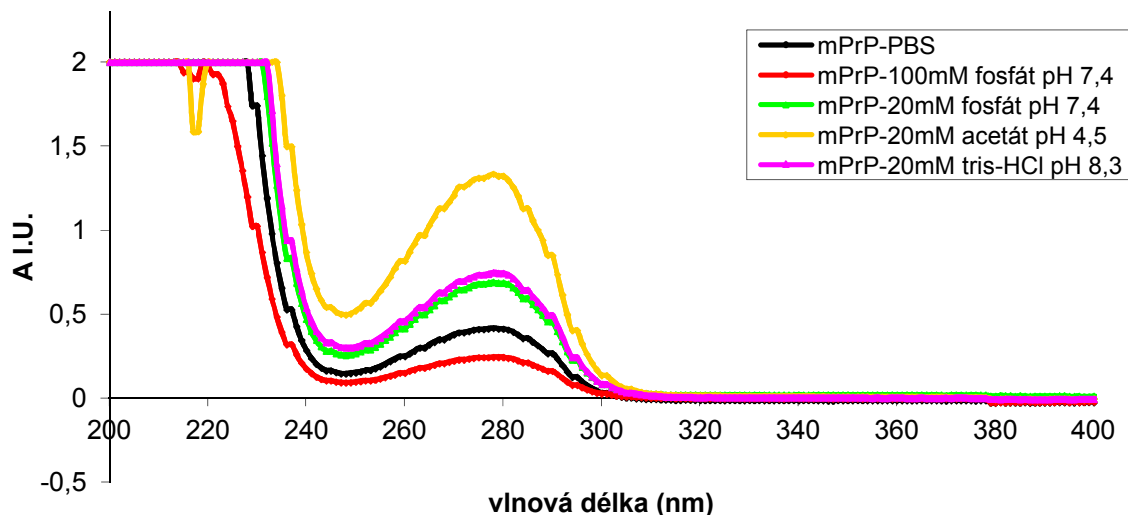
Sekundární struktura rmPrP po 1 týdnu je ve 20 mM acetátu pH 4,5 bez soli i se solí stabilní (Obr. 19 a, b), avšak ve 20 mM Tris-HCl pufru pH 8,3 přibývá s časem neuspořádaná a β - struktura (Obr. 19 c, d), což může mít za následek agregaci a

vysrážení proteinu z roztoku. Z absorpčních spekter rmPrP v UV/VIS oblasti (Obr. 20) je patrné, že protein dosahuje vysoké čistoty (maximum absorbance při 280 nm) a není kontaminován DNA (bez píku při 260 nm). Nejvyšší absorbance dosahuje rmPrP ve 20 mM acetátu pH 4,5 (Obr. 20, —), což souhlasí s výsledky sledování stability rmPrP v různých pufrch (Obr. 21), kdy koncentrace rmPrP ve 20 mM acetátu pH 4,5 po 4 týdnech ve 4°C dosahuje 0,54 mg/ml. Nižších hodnot absorbance po 4 týdnech dosahoval rmPrP ve 20 mM Tris-HCl pH 8,3 (Obr. 20, —) a ve 20 mM fosfátu pH 7,4 s 20 mM NaCl (Obr. 20, —), což opět souhlasí s naměřenou koncentrací 0,21 mg/ml rmPrP ve 20 mM Tris-HCl pH 8,3 při sledování stability (Obr. 21). Nejnižších hodnot absorbance po 4 týdnech ve 4°C dosahoval rmPrP v PBS (Obr. 20, —) a ve 100 mM fosfátu pH 7,4 (Obr. 20, —), kdy již při rozpouštění proteinu došlo k masivní agregaci rmPrP a během dalšího uchování vzorku k dodatečné pozorovatelné agregaci.

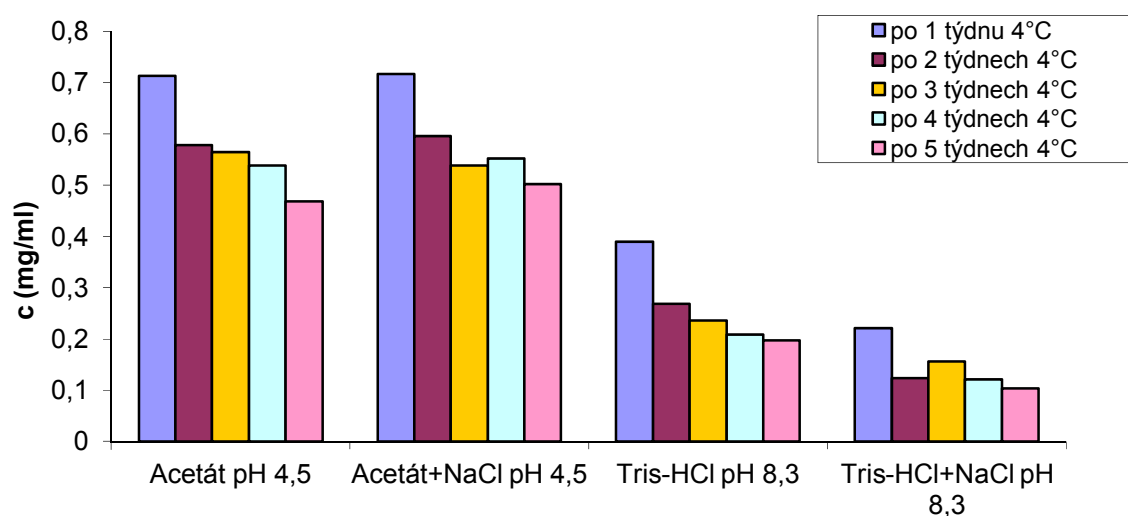


Obr. 19: CD spektra rmPrP₂₃₋₂₃₀ měřené v daleké UV-oblasti při pH 4,5 a 8,3 ihned po rozpouštění rmPrP v pufru (—) a po 1 týdnu stání ve 4°C (---). Spektra byla měřena ihned po centrifugaci případných agregátů na spektropolarimetru Jasco 815 (Japonsko)

při laboratorní teplotě. Spektra rmPrP ve 20 mM acetátu pH 4,5 bez soli **(a)** a s přidavkem 20 mM NaCl **(b)** jsou téměř identická, zatímco u rmPrP ve 20 mM Tris-HCl pH 8,3 bez soli **(c)** i s přidavkem 20 mM NaCl **(d)** dochází po 1 týdnu k úbytku α -helixu.



Obr. 20: Absorbance rmPrP v pufrách o různém pH. Vzorky rmPrP (1 mg/ml) byly po rozpuštění v pufrách ponechány 4 týdny při 4°C. Případné agregáty byly z roztoku odstaněny centrifugací. Absorbční spektra byla proměřena v oblasti 200 – 400 nm.

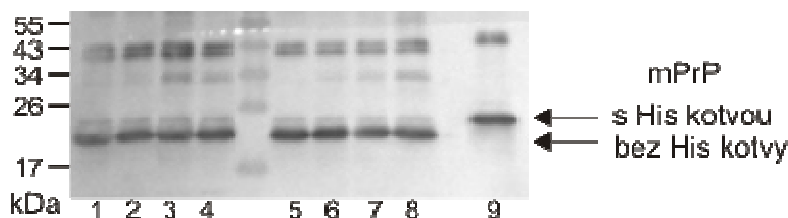


Obr. 21: Stabilita rmPrP v různých pufrách ve 4°C. Vzorky rmPrP (1 mg/ml) byly po rozpuštění v pufrách ponechány při 4°C a každých 7 dní byla měřena koncentrace

proteinu pomocí BCA kitu (Pierce). Případné agregáty byly z roztoku vždy před vlastním měřením odstaněny centrifugací.

4.1.6. Enzymatické odštěpení 6xHis-kotvy

rmPrP byl připraven jako fúzní protein obsahující N-koncový His-tag se štěpným místem pro thrombin (viz 4.1.1.). Množství thrombinu i doba štěpení byly optimalizovány (Obr. 22). Štěpení probíhalo při pH 8,3, což je pH optimální k dosažení nejvyšší aktivity thrombinu i pro dosažení vysoké rozpustnosti rmPrP ve vodném prostředí. Jako pufr byl zvolen 50 mM acetát amonný, který lze při následné lyofilizaci proteinu zcela odpařit. Průběh enzymatického štěpení His-tagu byl monitorován pomocí western blotu. K odštěpení > 90% kotvy dojde již po 1 hod. při použití 0,5 U/ml thrombinu a se zvyšující koncentrací použitého thrombinu ani při delší době štěpení se efektivita štěpení nemění (Obr. 22). Naopak dochází k přibývání nespecificky naštěpených fragmentů rmPrP (na Obr. 22 fragmenty v oblasti 34 kDa), což je jev nežádoucí. Jako optimální bylo vyhodnoceno štěpení fúzního proteinu 0,5 U thrombinu / ml vzorku rmPrP po dobu 1 – 2 hod. při 37°C.



Obr. 22: Rekombinantní mPrP obsahuje N-koncovou His kotvu, která byla po purifikaci rmPrP afinitní chromatografií odštěpena thrombinem. Štěpení probíhalo v 50 mM acetátu amonném pH 8,3 různými množstvími thrombinu (0,5; 1; 2,5 a 5 U/ml) po dobu 1 hod. (pozice 1 – 4, resp.) a 2 hod. (pozice 5 – 8, resp.) při 37°C. Koncentrace štěpeného rmPrP byla 0,1 mg/ml, převážná většina His kotvy byla odštěpena již po 1 hod. za použití 0,5 U/ml thrombinu. Na pozici 9 je neštěpený rmPrP s His kotvou. Western blot byl obarven protilátkou 6H4 (0,125 µg/ml).

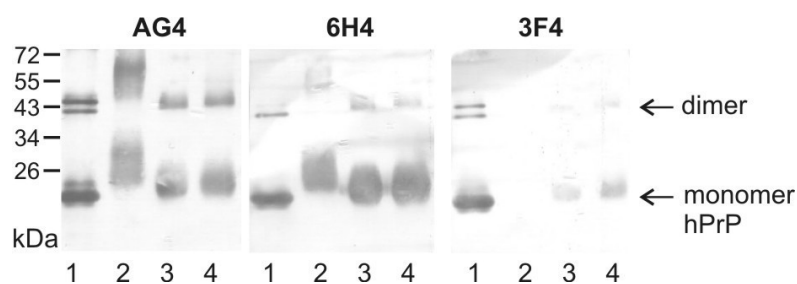
Výtěžek po odštěpení His-tagu z oxidovaného rmPrP a následné purifikaci na HPLC byl

5,6 mg / 0,8 l média (7 mg/l), tj. 37% oproti oxidovanému rhPrP s His-tagem (19 mg/l).

4.2. Příprava a využití protilátek proti glykovanému prionovému proteinu

4.2.1. Příprava protilátek

Pro přípravu protilátek proti glykovanému prionovému proteinu byl jako antigen vybrán rekombinantní lidský PrP modifikovaný na postranních řetězcích lysinu na karboxymethyl-lysín (CML). Během modifikace pravděpodobně dochází i k modifikaci argininu. CML představuje koncový produkt glykace proteinů a je nejčastěji zastoupeným antigenem AGE *in vivo* [117]. Naším cílem bylo připravit protilátku proti CML, která by byla zároveň specifická i pro lidský prionový protein. Rekombinantní hPrP byl připraven dle 3.2.4. a modifikován kyselinou glyoxalovou v redukčním prostředí. Kontrola vzniku rhPrP-CML byla monitorována western blotem pomocí N- i C- koncových anti-prionových protilátek necitlivých ke glykaci (AG4 a 6H4, resp.) a pomocí protilátky 3F4, jejíž afinita vlivem glykace klesá. 3F4 je namířena proti centrální části molekuly hPrP (106-112) a obsahuje ve svém epitopu 2 molekuly lysinu. Vlivem modifikace jsou lysiny karboxymethylovány, což způsobí inaktivaci epitopu pro 3F4 (Obr. 23). Vlivem glykace dochází ke zvýšení molekulové hmotnosti hPrP, což se projeví posunem bandu rhPrP směrem k vyšším molekulovým hmotnostem nebo vymizením signálu u membrány obarvené protilátkou 3F4 (viz Obr. 23). Zároveň dochází ke tvorbě celé řady meziproductů CML, což se projeví rozšířením bandu pro rhPrP-CML (Obr. 23). Tvorba většího množství meziproductů rhPrP-CML není na škodu, naopak zvyšuje množství přítomných antigenů (což lépe odpovídá i fyziologickým podmínkám) a zvyšuje se tudíž i pravděpodobnost získání většího spektra protilátek ke screeningu.



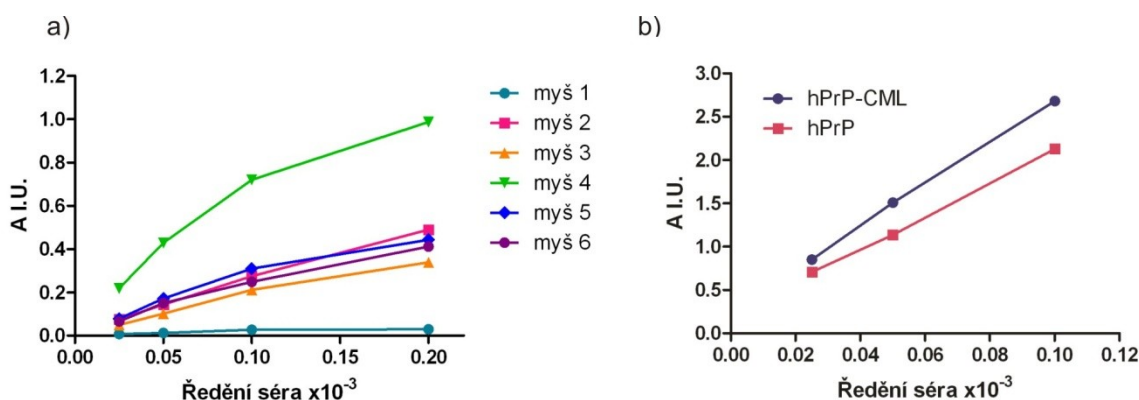
Obr. 23: Příprava rhPrP-CML pro imunizaci myší. rhPrP₂₃₋₂₃₁ byl modifikován kyselinou glyoxalovou ve 4°C 16 hod. (pozice 3 a 4) nebo 24 hod. (pozice 2). Nemodifikovaný rhPrP je na pozici 1. Pro kontrolu glykace byla použita anti-prionová protilátka 3F4 (0,25 µg/ml), která se váže na neglykovaný hPrP, ale neváže se na hPrP-CML (pozice 2-4). Slabá reaktivita na pozicích 3 a 4 je dána neúplnou glykací rhPrP. Anti-prionové protilátky AG4 (0,2 µg/ml) a 6H4 (0,125 µg/ml) jsou ke glykaci necitlivé a byly použity jako kontrola přítomnosti PrP.

K imunizaci byly použity geneticky modifikované myši bez genu pro prionový protein (*Prnp*^{0/0}), imunizace byla provedena rhPrP-CML. Rozpis imunizací i odběry krve pro kontrolu tvorby protilátek jsou uvedeny v tabulce 5.

Den	0	1	14	21	28	36	9. týden
Operace	odběr krve	1. imunizace	2. imunizace	odběr krve	3. imunizace	odběr krve	boost
Vzorek	negativní sérum	s.c, 30µg antigenu	s.c, 30µg antigenu	sérum po 2. imun.	s.c, 30µg antigenu	sérum po 3. imun.	i.v, 5µg antigenu

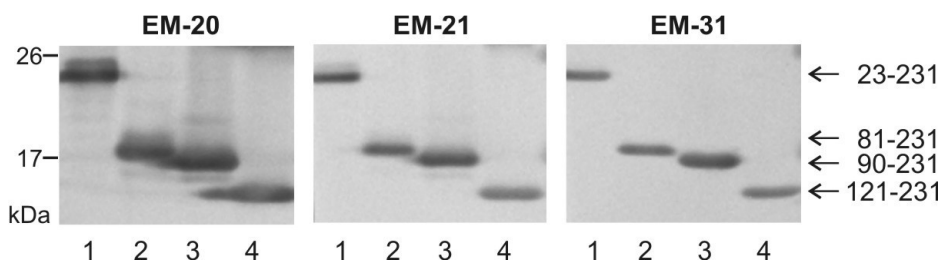
Tab. 5: Schéma imunizací a odběrů krve pokusných myší

Jedna ze šesti imunizovaných myší měla vysokou, čtyři střední a jedna nízkou odpověď na imunizaci (Obr. 24 a). Reaktivita protilátek proti rhPrP-CML v sérech obou myší s nejvyšší imunitní odpovědí (myš č. 4 a 2) byla mírně vyšší než reaktivita k nemodifikovanému rhPrP (tj. $A_{405} = 1,5$ oproti $A_{405} = 1,1$ při ředění séra 5×10^{-5} u myši č. 4, Obr. 24 b).



Obr. 24: Šest *Prnp*^{0/0} myši bylo imunizováno s.c. 30 µg rhPrP-CML v PBS s Freundovým adjuvans ve dnech 0, 14 a 28. **a)** Titry protilátek proti rhPrP-CML v myším séru byly měřeny 7 dní po 3. imunizaci. Do jamek mikrotitrační destičky byl ukotven rhPrP-CML a jednotlivá myší séra byla přidávána v rostoucí koncentraci. Myš č. 4 (—▼) vykazovala zvýšenou imunitní odpověď oproti ostatním, myš č. 1 (—●) zůstala téměř bez odpovědi. **b)** 6 týdnů po 3. imunizaci byl myši č. 4 i.v. podán finální booster 5 µg antigenu v PBS a za 4 dny byly v séru stanoveny titry protilátek proti PrP. Do jamek mikrotitrační destičky byly ukotveny rhPrP a rhPrP-CML a myší sérum bylo přidáváno v rostoucí koncentraci. Odpověď proti rhPrP-CML (—●) byla vyšší než proti rhPrP (—■).

Po primárním screeningu 960 hybridomů metodou ELISA bylo vybráno 53 klonů produkujících monoklonální protilátky (MAb) s různými afinitami pro CML modifikovaný i nemodifikovaný rhPrP. Během sekundárního screeningu western blotem bylo vybráno 12 klonů s nejvyšší afinitou k rhPrP-CML a 7 klonů s nejvyšší afinitou k rhPrP. Těchto 19 klonů bylo postupně testováno western blotem a dotblotem na biologickém materiálu (normální lidský mozkový homogenát (MH), normální i scrapie myší MH, lidské krevní destičky, membrány po hemolýze červených krvinek, BSA a BSA-CML) a k produkci MAb byly vybrány 3 klony s nejvyšší specificitou a afinitou. Purifikované MAb produkované v EXBIO Praha a.s. nesou komerční názvy EM-31 (MAb specifická pro rhPrP-CML) a EM-20 a EM-21 (MAb specifické pro nemodifikovaný rhPrP). Epitopy všech tří protilátek se nacházejí v C-koncové části molekuly PrP (Obr. 25).



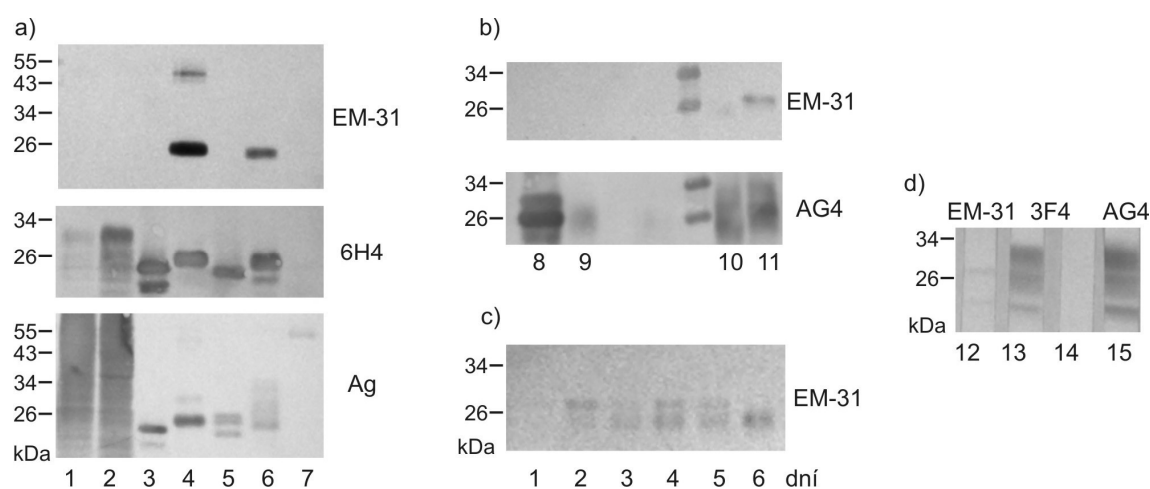
Obr. 25: Epitopové mapování EM-20, EM-21 a EM-31. Western blot fragmentů rhPrP byl rozstříhán na třetiny a membrána pro reakci s EM-31 byla glykovaná kyselinou

glyoxalovou, zatímco ostatní dvě membrány zůstaly nemodifikovány. Všechny tři protilátky vykazují afinitu pro C-koncové fragmenty rhPrP₂₃₋₂₃₁, rhPrP₈₁₋₂₃₁, rhPrP₉₀₋₂₃₁ a rhPrP₁₂₁₋₂₃₁. EM-20, EM-21 a EM-31 byly použity v ředění 0,5 µg/ml.

4.2.2. Protilátky proti glykovanému PrP

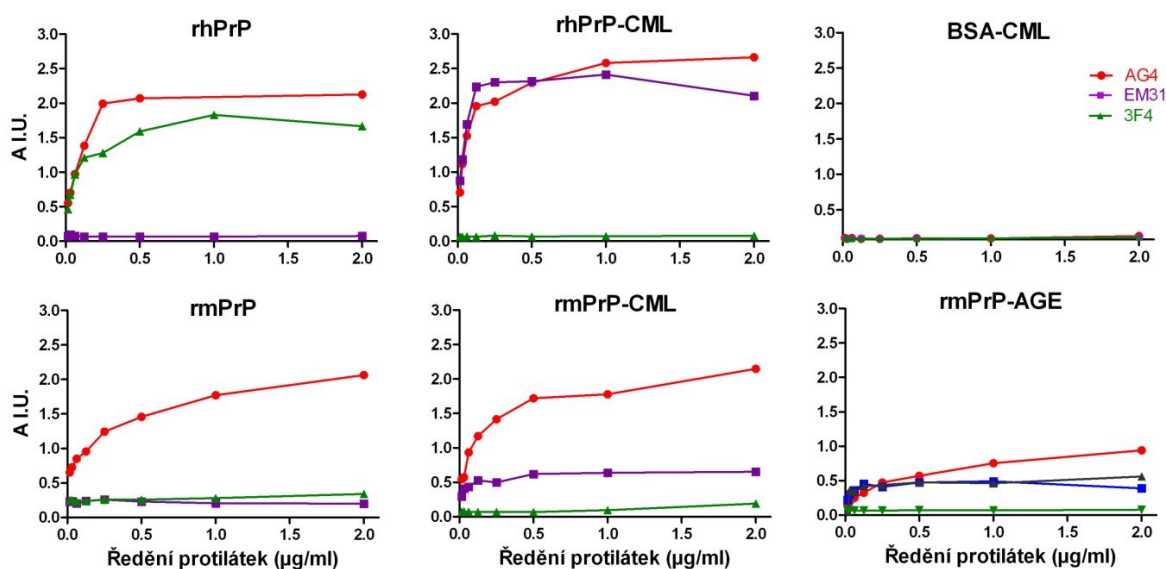
Během sekundárního screeningu western blotem bylo vybráno 12 klonů s nejvyšší afinitou k rhPrP-CML, mezi nimiž 4 klony (7A8, 1C3, 1C12 a 1F3) vykazovaly vysokou afinitu k rhPrP-CML.

Nejprve jsme se zaměřili na charakterizaci MAb EM-31 produkovanou klonem 7A8 s nejvyšší reaktivitou proti rhPrP-CML. MAb EM-31 vykazovala silnou vazbu na rhPrP-CML, zatímco její vazba na nemodifikovaný rhPrP byla zanedbatelná (Obr. 26 a a Obr. 27). EM-31 se nevázála na BSA-CML na WB (Obr. 26 a) ani na ELISA (Obr. 27). Protilátka smíšeně reagovala i s rmPrP-CML (Obr. 26 a a Obr. 27) a s rmPrP-AGE připraveným glykací proteinu D-ribózou (Obr. 26 b, c a Obr. 27). To potvrzuje schopnost protilátky rozeznat i rPrP glykovaný v mírnějších a fyziologičtějších podmínkách. EM-31 se nevázála na redukovaný rhPrP-CML ani na redukovaný rmPrP-CML nebo rmPrP-AGE (Obr. 26 b). Na western blotu nevykazovala EM-31 reaktivitu k proteinům normálního lidského nebo myšního MH (Obr. 26 a) a pouze slabou afinitu k PrP v glykovaném lidském MH (Obr. 26 d).



Obr. 26: Charakterizace vazby monoklonální protilátky EM-31 na glykované prionové proteiny western blotem. **a)** Tři identické bloty byly obarveny protilátkou EM-31,

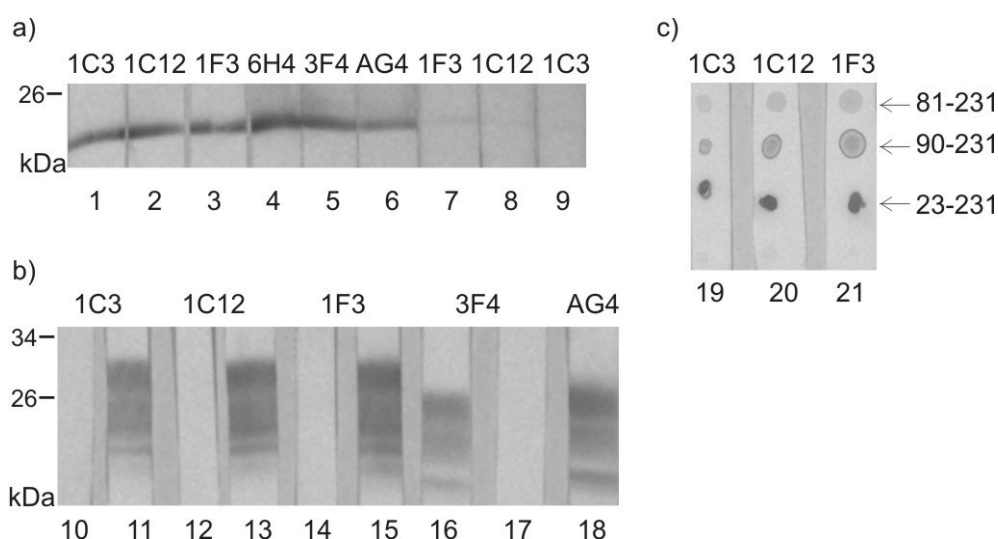
kontrolní anti-prionovou protilátkou 6H4 a celkový protein byl obarven koloidním stříbrem (Ag). Zleva nanesené vzorky: normální myší MH (1); normální lidský MH (2); rekombinantní myší PrP (rmPrP, 3); glykovaný rmPrP (rmPrP-CML, 4); rekombinantní lidský PrP (rhPrP, 5); glykovaný rhPrP (rhPrP-CML, 6); glykovaný BSA (BSA-CML, 7). EM-31 reaguje pouze s glykovanými rPrP. **b)** Dva identické bloty byly obarveny protilátkou EM-31 a kontrolní anti-prionovou protilátkou AG4. Zleva nanesené vzorky: redukovaný rmPrP-CML (8); redukovaný rmPrP-AGE (glykovaný inkubací s ribózou, 9); neredukovaný rmPrP po inkubaci s ribózou v Tris-HCl pufru (glykace byla inhibována, 10); glykovaný neredukovaný rmPrP po inkubaci s ribózou ve fosfátovém pufru (11). Reaktivita EM-31 s rmPrP-CML a rmPrP-AGE byla zrušena po redukcii vzorků dithiothreitem. **c)** Časový průběh modifikace rmPrP inkubací s 1 M D-ribózou detekován pomocí EM-31. **d)** EM-31 vykazuje pouze slabou afinitu k PrP v glykovaném lidském MH (12). Pro kontrolu glykace byla použita anti-prionová protilátka 3F4, která se váže na neglykovaný lidský MH (13), ale neváže se na glykovaný lidský MH (14). Anti-prionová protilátka AG4 je ke glykaci necitlivá a byla použita jako kontrola detekující PrP v glykovaném lidském MH (15).



Obr. 27: Specificita EM-31 ke glykovanému prionovému proteinu měřená metodou ELISA. Do jamek mikrotitrační destičky byly ukotveny rhPrP, rmPrP, rhPrP-CML, rmPrP-CML, rmPrP-AGE nebo BSA-CML a jednotlivé protilátky byly přidávány

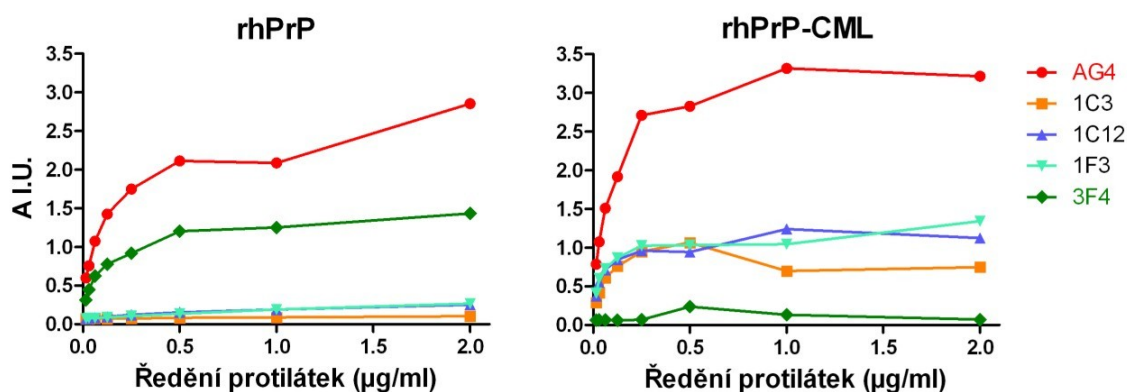
v rostoucí koncentraci: EM-31 (—■), na glykaci citlivá 3F4 (—▲) a ke glykaci necitlivá AG4 (—●). Označení grafu s rhPrP-AGE je: AG4 (—●), 3F4 (—▼) a EM-31 (—■ a—▲). EM-31 se neváže na nemodifikované proteiny a reaktivita 3F4 k rhPrP se po glykaci vytratí. Žádná z protilátek se neváže na glykovaný BSA.

Vzhledem k tomu, že EM-31 má pouze slabou afinitu k PrP v glykovaném lidském MH (Obr. 26 d), zaměřili jsme se na analýzu vlastností MAb produkovaných klony 1C3, 1C12 a 1F3, i když jejich afinita vůči rhPrP-CML nebyla tak vysoká jako u EM-31. Protilátky obecně vykazují stejné vlastnosti jako EM-31, se dvěma důležitými rozdíly: dokážou rozeznat nejen rhPrP-CML (Obr. 28 a), ale i glykosylovaný PrP^C-CML na western blotech *in vitro* modifikovaných lidských MH (Obr. 28 b) a myších MH. Jejich vazba navíc není citlivá k redukci proteinů dithiothreitem (data neuvedena). Specificita MAb ke glykovanému rhPrP byla potvrzena i metodou ELISA (Obr. 29).



Obr. 28: Tři supernatanty hybridomů vykazují afinitu k PrP v *in vitro* glykovaném mozковém homogenátu. **a)** Western blot rhPrP byl nastříhán na proužky a proužky 1-3 byly glykované kyselinou glyoxalovou, zatímco proužky 4-9 zůstaly nemodifikovány. Supernatanty 1C3, 1C12 a 1F3 vykazují silnou reaktivitu k PrP na glykovaných membránách (1 – 3), ale jen velmi slabou nebo žádnou reaktivitu k nemodifikovanému rhPrP (7 – 9). Přítomnost rhPrP byla ověřena protilátkami 6H4, 3F4 a AG4 (4 – 6). **b)** Klony 1C3, 1C12 a 1F3 rozeznávají PrP v *in vitro* glykovaném lidském mozковém homogenátu (lidský MH-CML, 11, 13, 15), ale ne v lidském MH (10, 12, 14). Protilátka 3F4 byla použita jako kontrola glykace, váže se na PrP v neglykovaném lidském MH

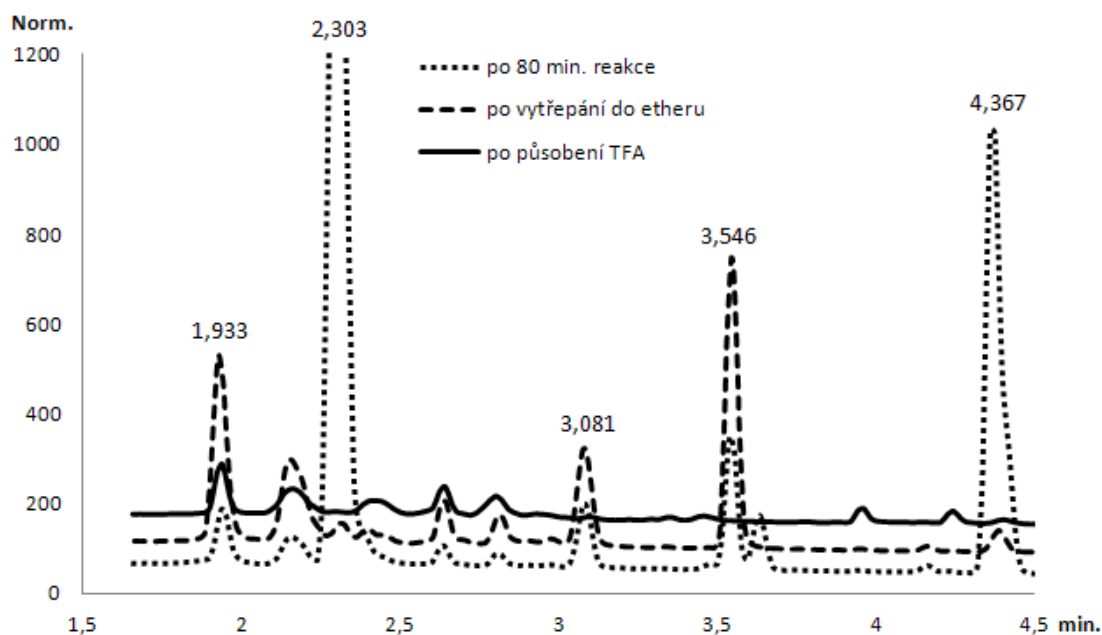
(16), ale ne v lidském MH-CML (17). Protilátka AG4 je pozitivní kontrola pro PrP v lidském MH-CML (18). **c)** Reaktivita všech tří klonů ke glykovaným C-koncovým fragmentům rhPrP₈₁₋₂₃₁ a rhPrP₉₀₋₂₃₁ na dot blotech je slabší, než k rhPrP₂₃₋₂₃₁-CML.



Obr. 29: Ukázka reaktivity 1C3, 1C12 a 1F3 k rhPrP-CML metodou ELISA. Do jamek mikrotitrační destičky byly ukotveny rhPrP nebo rhPrP-CML a jednotlivé protilátky byly přidávány v rostoucí koncentraci: AG4 – necitlivá ke glykaci (—●), 3F4 – citlivá ke glykaci (—◆), 1C3 (—■), 1C12 (—▲) a 1F3 (—▼). Reaktivita 3F4 se po glykaci vytrácí, zatímco reaktivita protilátek produkovaných klony se zvyšuje.

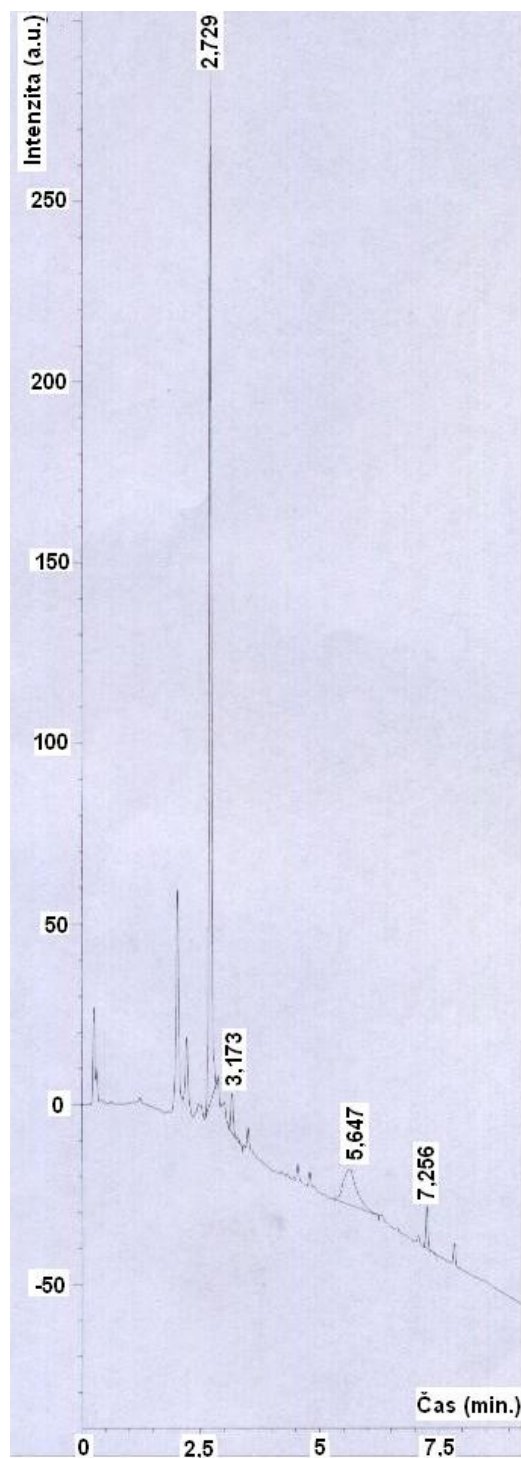
4.2.3. Příprava antigenu hPrP₁₀₀₋₁₁₃-CML

Ve spolupráci s UOCHB byl syntetizován peptid hPrP₁₀₀₋₁₁₃ s C-koncovým cysteinem (hPrP₁₀₀₋₁₁₃Cys, aminokyselinová sekvence NKPSKPKTNMKHMAC). Koncový cystein byl k sekvenci přidán z důvodu umožnění vazby peptidu na imunogenní nosič (KLH), ke které dochází prostřednictvím thiolové skupiny postranního řetězce cysteinu a aminoskupin nosiče. Peptid byl nejprve glykovaný, během karboxymethylace však došlo k modifikaci nejen postranních amino skupin lysinů, ale i thiolových skupin koncového cysteinu a dvou methioninů v molekule hPrP. Proto bylo třeba -SH skupinu cysteinu před vlastní glykací lysinů ochránit. K tomu byl využit trimethoxybenzyl chlorid (Tmob) v acetonitrilu v 50 násobném molárním přebytku oproti hPrP₁₀₀₋₁₁₃Cys (Obr. 30). Ke zpětnému odštěpení chránících skupin byla použita kyselina trifluor octová (TFA) s přídatkem scavengerů (thioanisol, ethandithiol, TIS) (Obr. 30).



Obr 30. Monitorování průběhu vazby Tmob na peptid. a) Reakce peptidu s Tmob byla ukončena vytřepáním peptidu do etheru a byly identifikovány 2 hlavní produkty s retenčními časy 3,081 a 3,546 (čárkovaně). Po působení TFA v přítomnosti scavengerů píky vymizí v důsledku odštěpení chránících skupin (plná čára). Pík s RT = 1,933 odpovídá původnímu peptidu, RT = 2,303 odpovídá nečistotám v Tmob a RT = 4,367 představuje Tmob. Píky nelze kvantitativně hodnotit z důvodu zakoncentrování, popř. naředění produktů v jednotlivých fázích reakce.

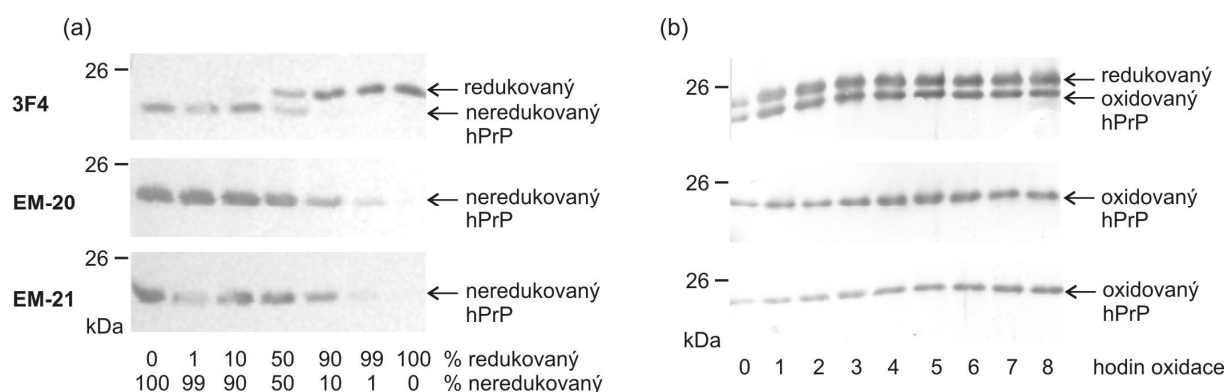
Chráněný peptid byl karboxymethylován 45 mM kyselinou glyoxalovou v redukčním prostředí 25 mM kyanoborohydridu sodného (pH 7,0). Z glykovaného peptidu byly odstraněny chránící skupiny Tmob a Dmob působením TFA v přítomnosti scavengerů, výsledný produkt byl lyofylizován a analyzován na HPLC (Obr. 31). Výtěžek reakce byl 54%, k imunizaci bylo připraveno 4,3 mg peptidu.



Obr 31: HPLC glykovaného peptidu. Po odstranění chránící skupiny Tmob a Dmob působením TFA v přítomnosti scavengerů byl peptid v gradientu acetonitrilu (5 – 100% gradient ACN, 10 min., 40°C) preparován na koloně Poroshell120 SB-C18. Pík o retenčním čase 2,729 odpovídá glykovanému peptidu.

4.2.4. Charakteristika a využití monoklonálních protilátek EM-20 a EM-21

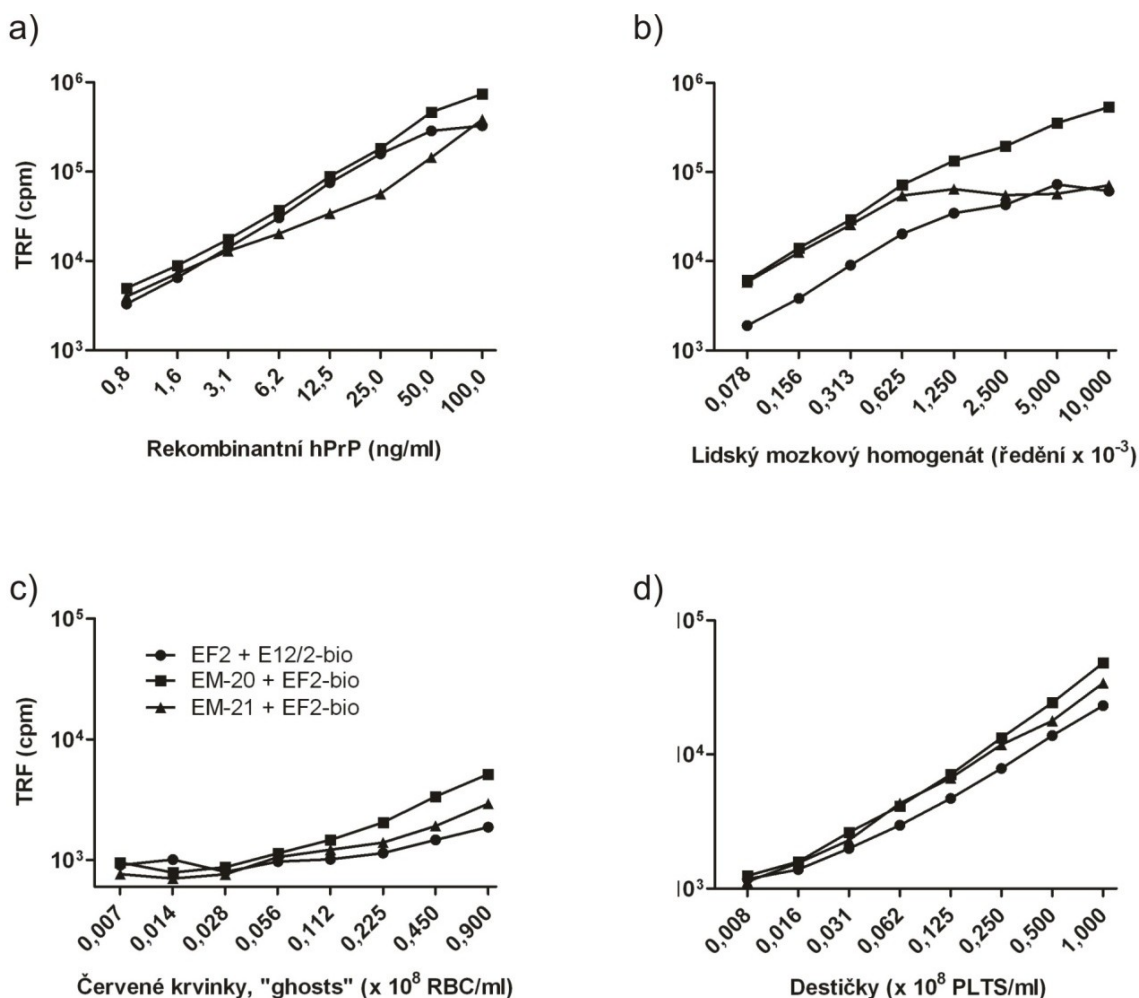
EM-20 a EM-21, stejně jako EM-31, nereagují s redukováným PrP. Reaktivita obou MAb k rhPrP byla zrušena po redukcí vzorků dithiothreitem (Obr. 32 a) nebo 2-merkaptoethanolem (Obr. 32 b). Epitop EM-20 a EM-21 tedy pravděpodobně není lineární a může zahrnovat disulfidický můstek mezi Cys₁₇₉ a Cys₂₁₄, obdobně jako je tomu u EM-31. To je v souladu s předchozím zjištěním (viz výše), že epitopy protilátek se nacházejí v C-koncové polovině molekuly rhPrP.



Obr. 32: Selektivní vazba EM-20 a EM-21 na neredukovaný hPrP₂₃₋₂₃₁. **a)** rhPrP byl redukován dithiothreitem a volné –SH skupiny byly acetylovány pro zabránění zpětné tvorby disulfidových můstků. Do každé jamky byla nanášena směs redukováného a neredukovaného rhPrP, jednotlivé formy od sebe byly odděleny SDS-PAGE a přebílotovány. EM-20 a EM-21 se selektivně váží pouze na neredukovaný rhPrP, zatímco protilátka 3F4 necitlivá k redukcí se váže na obě redox formy. **b)** Po redukcí 2-merkaptoethanolem byl rhPrP částečně oxidován 1 mM glutathionem v 8 M močovíně a nanášen do jamek, jednotlivé formy rhPrP od sebe byly odděleny SDS-PAGE a přebílotovány. EM-20 a EM-21 se selektivně váží na oxidovanou formu rhPrP, zatímco protilátka 3F4 necitlivá k redukcí se váže na obě redox formy.

EM-20 má vysokou afinitu k prionovému proteinu v lidském biologickém materiálu. Rozeznává di-, mono- a neglykosylovanou formu hPrP. EM-20 a EM-21 byly použity k detekci hPrP v normálním a CJN pozitivním lidském mozgovém homogenátu (Obr. 33 b), na membránách červených krvinek (RBC ghosts, Obr 33 c), krevních destiček (PLTS, Obr. 33 d) a v mozkomíšním moku (MMM) metodou DELFIA. Detekční limit

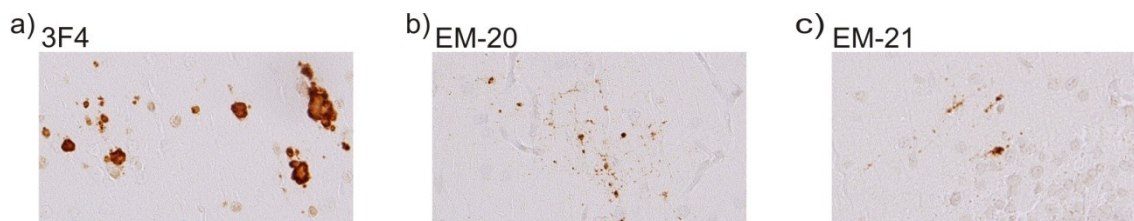
pro dvojici protilátek EM-20 a biotinylovaná EF2 (N-koncová protilátka proti hPrP) je $5,6 \times 10^6$ RBC/ml, $6,25 \times 10^6$ PLTS/ml, 4×10^{-5} ředění mozkového homogenátu, 0,6% MMM a 0,4 ng/ml rekombinantního hPrP (Obr. 33 a). Použití EM-21 vede k slabšímu signálu, tato protilátka má přibližně 30x nižší afinitu k rhPrP než EM-20 (stanoveno western blotem, data neuvedena).



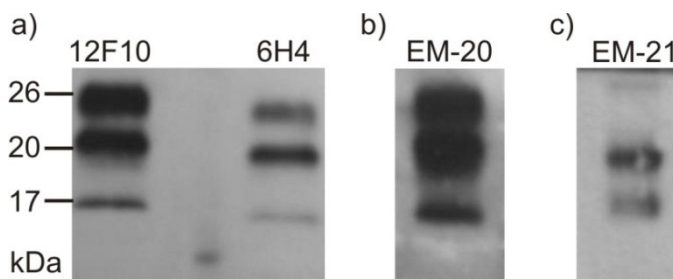
Obr. 33: Detekce hPrP metodou DELFIA za použití EM-20 a EM-21. ■ Dvojice protilátek EM-20 a biotinylovaná EF2 vykazuje nejvyšší afinitu k hPrP. ● Protilátky EF2 a biotinylovaná E12/2 byly použity jako kontrolní protilátky, E12/2 je namířena proti středové části hPrP, podobně jako EM-20 a EM-21. ▲ Dvojice protilátek EM-21 a biotinylovaná EF2 vykazuje nejnižší afinitu k rhPrP.

Protilátky jsou v současnosti testovány za účelem validace v národní referenční laboratoři TSE-CJN na oddělení patologie ve FTN s cílem nahradit komerčně obtížně

dostupnou protilátku 3F4. Protilátky byly testovány na imunohistologických preparátech zhotovených Dr. Matějem (Obr. 34) a na western blotech zhotovených Ing. Novákovou (Obr. 35).



Obr. 34: Imunohistologická detekce hPrPres na řezu mozečkem pacienta s Gerstmann-Sträussler-Scheinkerovým syndromem. Fixované preparáty byly štěpeny proteinázou K (10 $\mu\text{g/ml}$, 25°C, 10 min.) a denaturovány guanidin thiokyanátem (2 M, 25°C, 30 min.). K detekci plaků byly použity protilátky 3F4 v ředění 1 $\mu\text{g/ml}$ (a), EM-20 10 $\mu\text{g/ml}$ (b) a EM-21 10 $\mu\text{g/ml}$ (c). Zvětšení preparátů: 400x.

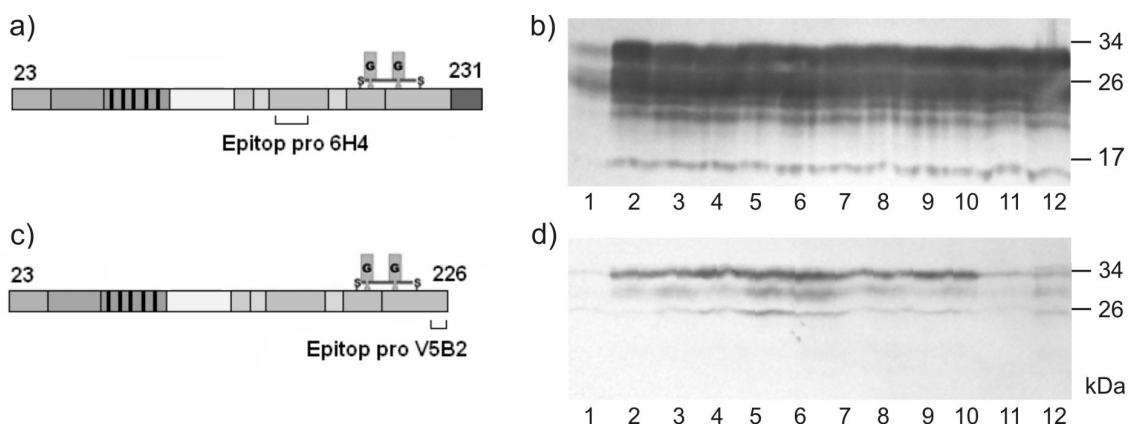


Obr. 35: WB mozkových homogenátů pacienta s CJN. Vzorčky byly štěpeny proteinázou K a následně detekovány kontrolními protilátkami 12F10 v ředění 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a 6H4 v ředění 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (a), EM-20 byla použita v ředění 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (b) a EM-21 v ředění 1,5 $\mu\text{g/ml}$ (c). Sekundární protilátka GAM-HRP (Dako, Agilent) byla nanášena v ředění 0,1 $\mu\text{g/ml}$, doba expozice preparátů byla 2 min.

4.3. Detekce fragmentu prionového proteinu PrP226* v lidském mozku

4.3.1. Stabilita fragmentu PrP226* v mozkových homogenátech

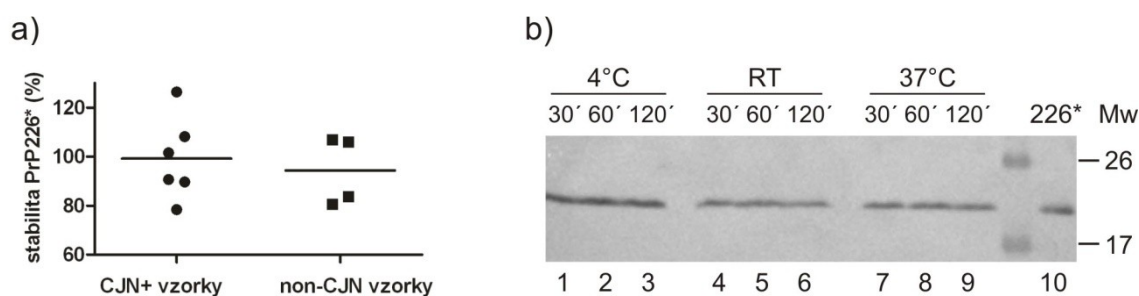
Přítomnost prionového proteinu bez GPI kotvy, tj. PrP(Δ GPI), v mozkových homogenátech jedinců s TSE byla v minulosti opakovaně prokázána [97, 118-120]. Abychom jej prokázali i u non-CJN případů, použili jsme protilátku V5B2 namířenou proti fragmentu PrP226*, který je zakončen Tyr₂₂₆ a neobsahuje tedy GPI kotvu. Vzhledem k tomu, že podíl PrP226* je v rámci celkového PrP minimální, použili jsme k jeho detekci western blotem neředěné 10% mozkové homogenáty 36 non-CJN případů. V tomto uspořádání jsme prokázali přítomnost PrP226* u 30 vzorků, z nichž 12 je uvedeno na Obr. 36 d. Množství PrP226* představovalo pouze malou část celkového PrP detekovaného anti-prionovou protilátkou 6H4 (Obr. 36 b). Množství PrP226* u zbývajících 6 vzorků se zřejmě pohybovalo pod detekčním limitem WB ve výše zmíněném uspořádání.



Obr. 36: a, c) Vazebná místa monoklonálních protilátek 6H4 (a) a V5B2 (c) na molekule lidského prionového proteinu a western bloty non-CJN mozkových homogenátů (b, d). Do jamek bylo nanášeno 5 μ l (b) a 10 μ l (d) 10% mozkových homogenátů ze 13 non-CJN pacientů (1 – 12). Membrány byly vyvolány monoklonálními protilátkami 6H4 (b), která detekuje celkové množství PrP a V5B2 (c), která specificky rozeznává PrP fragment 226*.

Otázkou zůstalo, zda se fragment PrP226* ve vzorcích neobjevuje až *post mortem* aktivací mozkových proteáz, nebo zda je přítomen fyziologicky již během života. 10% mozkové homogenáty 6 CJN a 6 non-CJN případů byly rozděleny do dvou alikvotů a

první alikvot každého vzorku byl ponechán bez přídavku inhibitorů přes noc (16 hod.) při laboratorní teplotě, druhé alikvoty vzorků byly okamžitě zamrazeny a skladovány v -80°C. Abychom zvýšili detekční limit stanovení PrP226* v non-CJN vzorkách metodou ELISA, kotvili jsme jamky mikrotitračních destiček 5 µg/ml V5B2 namísto běžně používané koncentrace 1 µg/ml. Absorbance 2 non-CJN vzorků nedosahovaly 3x hodnoty pozadí (tj. $A < 0,03$ I.U.), hodnoty tedy nebyly uvažovány do dalšího výpočtu. Stabilita fragmentu PrP226* v MH ponechaných přes noc při laboratorní teplotě byla stanovena na 94,3% (\pm SD 14,1) u non-CJN případů a na 99,2% (\pm SD 16,9) u CJN případů (Obr. 37 a), vztaženo k absorbanci zamražených alikvotů. Abychom podpořili tyto výsledky, naředili jsme rekombinantní PrP226* v koncentraci 1,5 µg/ml do 10% non-CJN MH bez přítomnosti inhibitorů a ponechali 3 alikvoty při 4°C, laboratorní teplotě a 37°C. Části alikvotů byly odebírány v různých časech, okamžitě zamrazeny a uchovávány při -80°C až do nanesení na SDS-PAGE gel (Obr. 37 b). Vzorky rPrP226* v MH uchovávaných při 4°C (1 – 3, Obr. 37 b) nebyly vzhledem ke kontrolnímu rPrP226* (10, obr. b) degradovány, zatímco vzorky uchovávané při laboratorní teplotě a při 37°C vykazovaly slabou degradaci rPrP226* po 30 min. bez další degradace v čase (4 – 9, obr. b). Podle výše uvedených výsledků je tedy fragment PrP226* fyziologickou součástí mozku *ante mortem* a neobjevuje se v signifikantních množstvích posmrtně dodatečným naštěpením PrP mozkovými proteázami. PrP226* je relativně stabilní i 2 hod. při 37°C nebo při pokojové teplotě minimálně po dobu 16 hod.

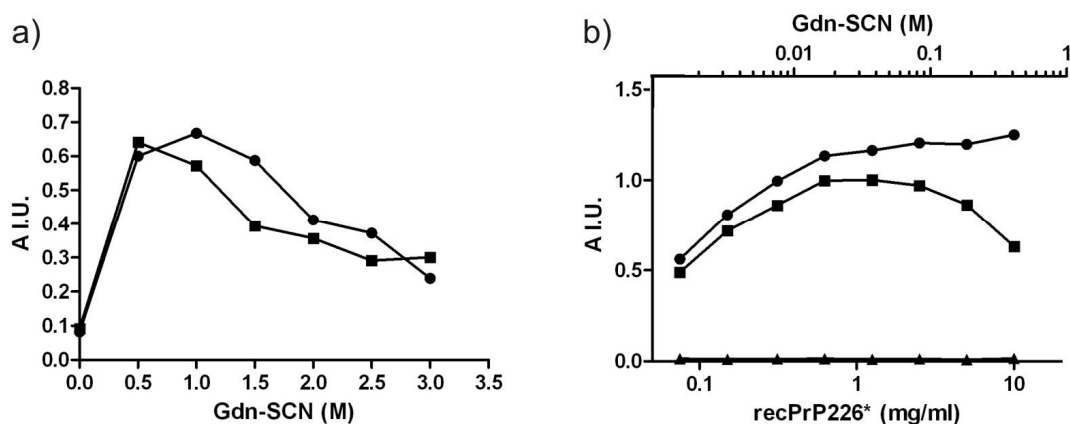


Obr. 37: **a)** 10% MH ze 4 non-CJN a 6 sCJN pacientů byly rozděleny do 2 alikvotů. První alikvot z každého vzorku byl ponechán přes noc při laboratorní teplotě a druhý alikvot byl ihned zamražen. Vzorky byly měřeny následující den metodou ELISA, s použitím protilátek V5B2 (5 µg/ml) jako kotvící a biotinylované EM-20 (0,5 µg/ml) jako detekční protilátky. Procento stability PrP226* je dáno poměrem signálu PrP226* měřeného při laboratorní teplotě vůči signálu PrP226* zamražených vzorků. **b)**

Rekombinantní lidský PrP226* byl naředěn do zdravého lidského MH a ponechán po dobu 30 min., 1 hod. a 2 hod. při 4°C (1 – 3, resp.), při laboratorní teplotě (4 – 6, resp.) a při 37°C (7 – 9, resp.). Rekombinantní PrP226* byl přidán jako kontrola (10), výsledné množství rPrP226* naneseného do jamek bylo 5 ng v každé jamce. Membrány byly vyvolány protilátkou V5B2 (5 µg/ml).

4.3.2. Denaturace vzorků

Nejprve jsme optimalizovali denaturaci vzorků guanidin thiokyanátem (Gdn-SCN). Dva CJN mozkové homogenáty byly inkubovány se vzrůstající koncentrací Gdn-SCN při 60°C po dobu 15 min. (Obr. 38 a). Množství PrP226* se významně zvýšilo již při použití 0,5 M Gdn-SCN, vybrali jsme tedy finální koncentraci 1,5 M běžně používanou k denaturaci PrP^{TSE} v mozkových homogenátech [121]. Ke stanovení efektu Gdn-SCN na vazebnou kapacitu ukotvených protilátek jsme naředili dvojkovou řadou 50 µg/ml rekombinantního PrP226*, rozpuštěného v 1,5 M Gdn-SCN. Až po zředění 20x (tj. 2,5 µg/ml PrP226* v 75 mM Gdn-SCN) docházelo ke snižování signálu detekce PrP226* vlivem denaturace ukotvené protilátky V5B2. Nad zředění 80x (tj. 0,625 µg/ml PrP226* v 18,75 mM Gdn-SCN) docházelo ke snižování signálu detekce v důsledku dosažení lineárních hodnot koncentrace PrP226* (Obr. 38 b). V dalších experimentech byly tedy 5% MH denaturovány 1,5 M Gdn-SCN (hodnoty finální koncentrace) 15 min. při 60°C, poté 20x naředěny vodným pufrům na 0,25% MH v 75 mM Gdn-SCN a nanášeny do jamek.



Obr. 38: **a)** Dva 10% sCJN mozkové homogenáty byly denaturovány Gdn-SCN o

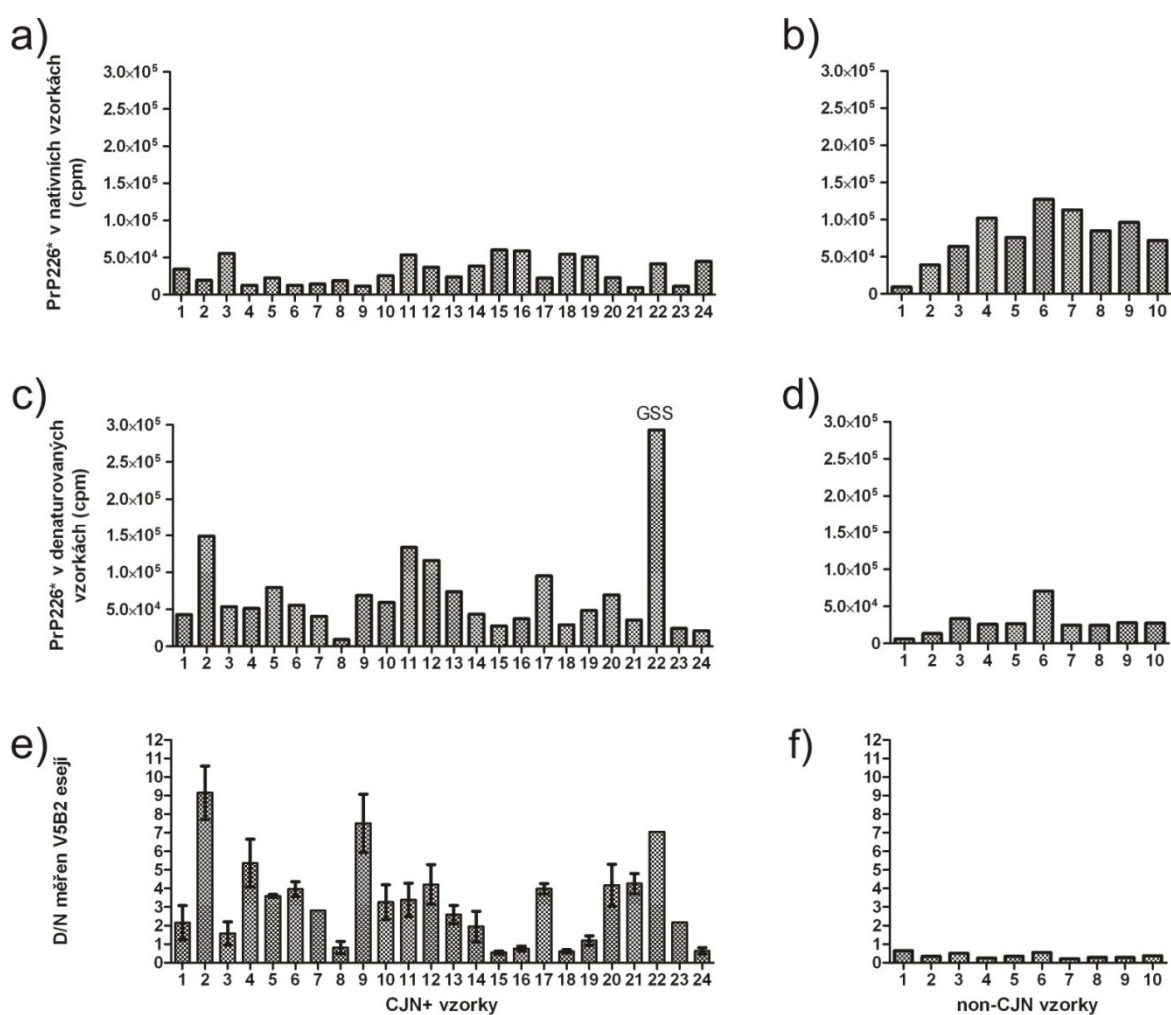
zvyšující se koncentraci při 60°C po dobu 15 min. Vzorky byly poté 10x naředěny v 50 mM Tris-HCl pH 8,0 a byl měřen fragment PrP226* metodou ELISA za použití V5B2 (5 µg/ml) jako kotvící protilátky a biotinylované EM-20 (0,5 µg/ml) jako detekční protilátky. Pro další denaturaci byl vybrán 1,5 M (finální koncentrace) Gdn-SCN. **b)** Efekt denaturace na kotvící protilátku V5B2 byl stanoven pomocí rekombinantního fragmentu PrP226*, který byl připraven smícháním v poměru 1:1 (v/v) zásobního roztoku rhPrP226* o koncentraci 100 µg/ml se 3 M Gdn-SCN v PBS. Roztok byl dále zředěn nejprve 5x a poté dvojkovou řadou v PBS (■). Biotinylovaná EM-20 (0,5 µg/ml) byla použita jako detekční protilátka a byly změřeny i hodnoty pro nativní rhPrP226* v PBS (●) a samotný PBS (▲).

4.3.3. Optimalizace V5B2 eseje

Výše uvedené podmínky denaturace jsme použili k měření signálu celkového PrP226* u 10 non-CJN, 23 CJN a 1 GSS mozkových homogenátů pomocí “Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay” (DELFI). CJN/GSS vzorky jsou blíže charakterizovány v Tab. 6. Hodnoty časově rozlišené fluorescence (Time Resolved Fluorescence, TRF) byly průměrně vyšší u CJN/GSS případů než u non-CJN, 7 CJN/GSS vzorků (č. 1, 5, 11, 12, 13, 17, 22, Obr. 39 e) vykazovalo vyšší signál pro PrP226* než non-CJN vzorek č. 6 (70 684 cpm, Obr. 39 f). Tyto výsledky však neudávají informaci o stavu GPI-PrP v jednotlivých vzorkách. Abychom zjistili, zda se fragment PrP226* vyskytuje v mozcích v monomerní “rozpuštěné” formě, nebo zda se podílí na tvorbě agregátů, změřili jsme poměr signálů PrP226* v denaturovaném MH ku nativnímu MH (D/N poměr) pro každý CJN/GSS a non-CJN vzorek. Hodnoty D/N všech 10 non-CJN vzorků byly $\leq 0,65$ (Obr. 39 f) a hodnoty D/N 24 CJN/GSS vzorků se pohybovaly ve dvou rozmezích. První skupina s $D/N < 1,6$ (vzorky č. 3, 8, 15, 16, 18, 19, 24) obsahovala podobné hodnoty PrP226* v MH před i po denaturaci (Obr. 39 a, c, resp.), zatímco druhá skupina s poměrem $D/N \geq 2,0$ (zbývající CJN/GSS vzorky) obsahovala významné množství PrP226* dostupného pouze po denaturaci (Obr. 39 a, c, resp.). Data byla ověřena ve dvou nezávislých experimentech za použití protilátek V5B2 a biotinylované EM-20 v sendvičovém uspořádání. Podobná data byla naměřena i při použití protilátek V5B2 a biotinylované E12/2 (data neuvedena). Abychom zjistili, zda nízké hodnoty D/N u vzorků č. 1, 3, 8, 15, 16, 18, 19, 24 nebyly zapříčiněny nedostatečnou homogenizací či nedostatečnou denaturací, opakovali jsme měření po

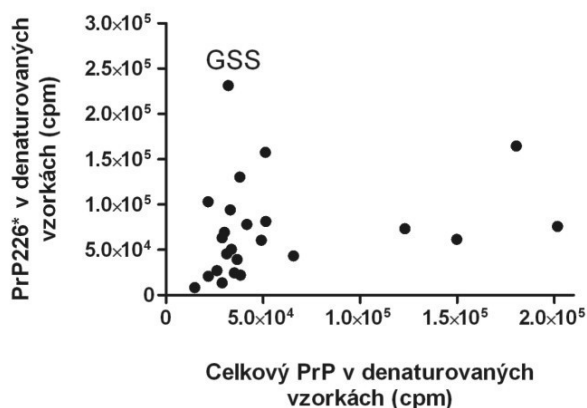
dodatečné homogenizaci vzorků opakovaným protažením inzulinovou jehlou i po denaturaci vzorků 1,5 M Gdn-SCN po dobu 10 min. při 90°C. Žádné změny v distribuci hodnot D/N jsme nepozorovali.

Zároveň jsme změřili signály celkového PrP v CJN/GSS i non-CJN vzorků metodou DELFIA za použití protilátek EM-20 a biotinylované EF2. Množství PrP226* v denaturovaných vzorkách nekoreluje s množstvím celkového PrP (Obr. 40), hladina PrP226* tedy není pouze úměrná celkovému PrP, ale je individuální v každém vzorku.



Obr. 39: 23 CJN a 1 GSS mozkových homogenátů (a, c, e) a 10 non-CJN mozkových homogenátů (b, d, f) bylo analyzováno metodou DELFIA ve V5B2/EM-20-bio uspořádání u nedenaturovaných vzorků (a, b) a u vzorků denaturovaných 3M Gdn-SCN (15 min., 60°C) (c, d). Absolutní hodnoty jsou vyneseny jako počet za minutu („counts per minute“, cpm), měřeno časově rozlišenou fluorescencí (TRF). Hodnoty poměrů D/N jsou znázorněny v (e) a (f). Vymezení chyby je udáno jako průměrná hodnota ze 2

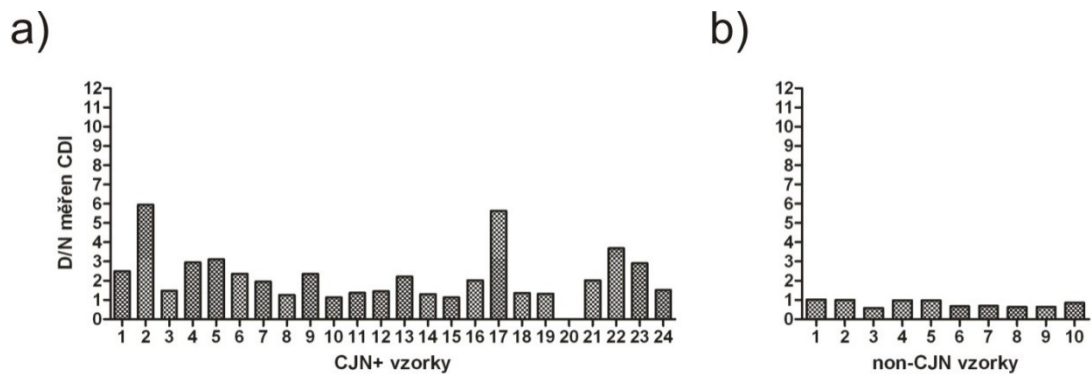
nezávislých pokusů.



Obr. 40: Korelační diagram mezi množstvím PrP226* a množstvím celkového PrP v denaturovaných vzorcích. Vzorky 24 CJN/GSS mozkových homogenátů byly denaturovány 3M Gdn-SCN (15 min., 60°C), naředěny na 0,5% a měřeny metodou DELFIA ve V5B2/EM-20-bio uspořádání (PrP226*) a EM-20/EF2-bio uspořádání (celkový PrP).

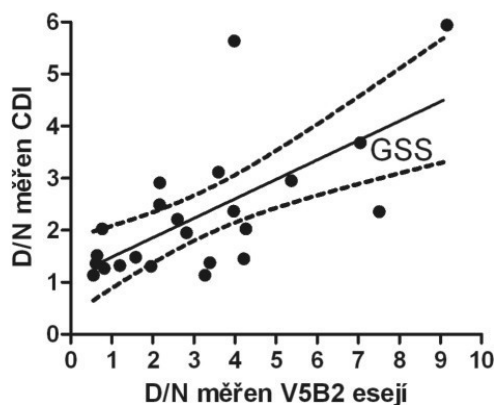
4.3.4. Korelace PrP226* s výsledky CDI

Následně jsme porovnali výsledky V5B2 eseje s konformačně-dependentní imunoesejí (Conformation-Dependent Immunoassay, CDI), prvně popsanou Šafářem a kol. [56]. CDI esej je založena na schopnosti denaturačního činidla (běžně používaného guanidin hydrochloridu, Gdn-HCl) odhalit epitopy v molekule PrP, které se v průběhu strukturálních změn při tvorbě PrP^{TSE} staly nedostupnými. V našem uspořádání byly vzorky MH detekovány sendvičovou metodou za použití monoklonální protilátky FH11 ukotvené k povrchu jamek mikrotitračních destiček a biotinylované protilátky 3F4 s následným použitím streptavidinu značeného europiem jako detekujícího systému. FH11 reaguje s lidským, bovinním, ovčím a křeččím prionovým proteinem a v minulosti byla v sendvičové CDI eseji použita k detekci scrapie, BSE i CJN [114, 122, 123]. 10% MH byly připraveny dle [56] (viz 3.4.6.), zředěny na finální koncentraci 0,25% a naneseny do jamek. Byly proměřeny denaturované i nedenaturované CJN/GSS a non-CJN vzorky v CDI uspořádání a vypočteny jejich D/N hodnoty (Obr. 41 a, b, resp.). Hraniční hodnota D/N mezi pozitivními a negativními vzorky byla stanovena jako 1,0, tj. $D/N > 1,0$ u CJN/GSS a $D/N < 1,0$ u non-CJN.



Obr 41: 23 z 24 CJN/GSS a 10 non-CJN vzorků mozkových homogenátů (pozn.: vzorek č. 20 nebyl k dispozici) bylo analyzováno metodou CDI. Vzorky byly denaturovány 8 M Gdn-HCl (5 min., 80°C) a analyzovány metodou DELFIA v FH11/3F4-bio uspořádání. Hodnoty D/N CJN/GSS vzorků jsou znázorněny v (a) a non-CJN vzorků v (b).

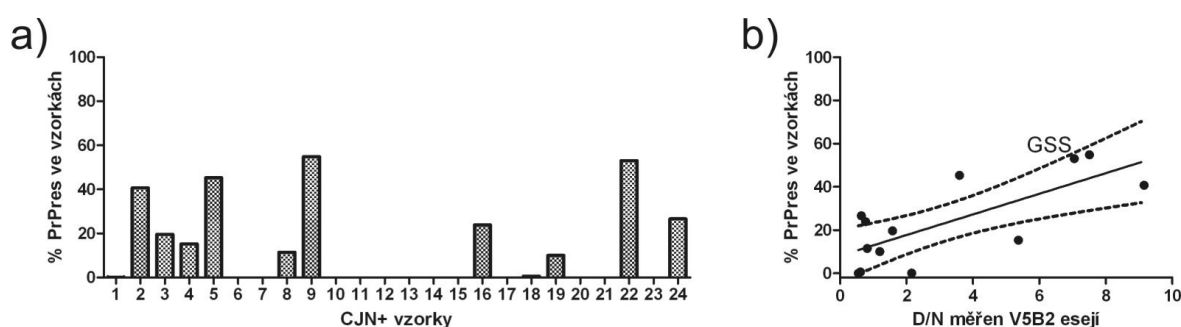
Statistická korelace mezi D/N hodnotami CJD/GSS vzorků měřenými V5B2 esejí a D/N hodnotami měřenými CDI (Obr. 42) byla vyhodnocena jako vysoce signifikantní v 95% intervalu spolehlivosti s P-hodnotou testu 0,0005 a Pearsonovým korelačním faktorem $r = 0,6673$ pro všech 23 vzorků. Po odstranění vzdálených bodů 9 a 17 (sCJD) byla hodnota $r = 0,8105$. Výsledky analýzy naznačují, že množství fragmentu PrP226* obsažené v prionových depozitech je proporcionální množství celkového PrP v depozitech.



Obr 42: Korelační diagram mezi hodnotami D/N měřenými V5B2 esejí a metodou CDI u 23 CJN/GSS vzorků mozkových homogenátů.

4.3.5. Korelace PrP226* s PrPres

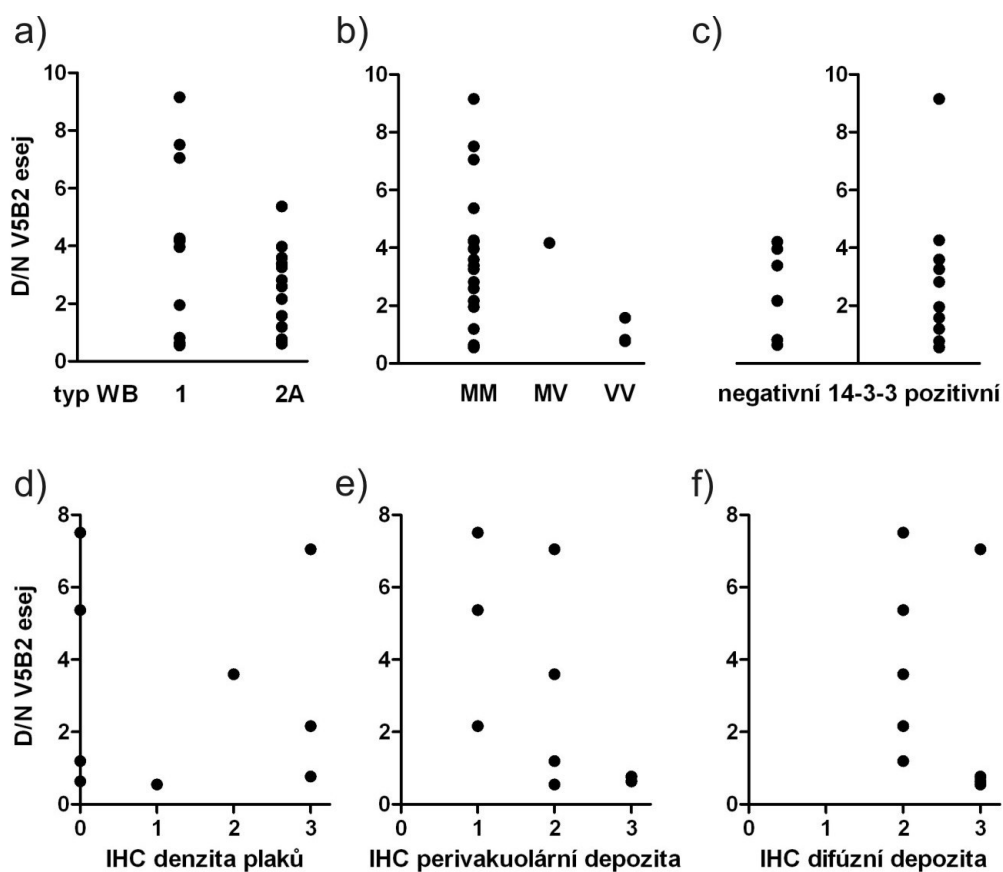
Pro lepší pochopení rozdílů hodnot D/N naměřených v 4.3.3. jsme stanovili podíl PrP rezistentního ke štěpení proteinázou K (PrPres) u vzorků s hodnotami nejvzdálenějšími od průměru. Vybrali jsme 12 z 24 CJN/GSS vzorků s nejvyššími (vz. č. 2, 4, 5, 9 a 22) a nejnižšími (vz. č. 1, 3, 8, 16, 18, 19 a 24) hodnotami PrP226* D/N. Vzorky byly za standardních podmínek štěpeny proteinázou K (PK, 50 µg/ml, 37 °C, 30 min.) a přeblotovány. Bloty byly vyvolány protilátkou 3F4 (0,25 µg/ml) a denzitometricky vyhodnoceny. Přestože působení proteinázy K vedlo k podstatnému naštěpení většiny vzorků, množství PrPres detekované v jednotlivých vzorcích bylo značně rozdílné. Hodnoty PK rezistence vyjádřené jako procento signálu PrPres vztaženého k signálu PrP v neštěpených vzorcích se pohybovalo v rozmezí 0 – 60% (Obr. 43 a). Statistická korelace mezi hodnotami D/N měřeními V5B2 esejí a PK rezistencí (Obr. 43 b) byla vyhodnocena jako signifikantní v 95% intervalu spolehlivosti s P-hodnotou testu 0,0036 a Pearsonovým korelačním faktorem $r = 0,7438$ pro všech 12 vzorků. Lze tedy usuzovat, že vzorky s vyššími PrP226* D/N poměry jsou zároveň i více odolné ke štěpení proteinázou K. Pozn.: všechny CJN/GSS vzorky byly původně western bloty potvrzeny jako pozitivní na CJN/GSS v Národní referenční laboratoři pro TSE/CJD za použití monoklonálních protilátek 12F10, 3F4 a EM-20 (viz typizace WB v Tab. 6).



Obr. 43: 12 z 24 CJN/GSS mozkových homogenátů bylo štěpeno proteinázou K o koncentraci 50 µg/ml 30 min. při 37°C, okamžitě nanášeno na SDS-PAGE 12% gel a přeblotováno. Membrány byly vyvolány protilátkou 3F4 (0,25 µg/ml). Western bloty byly denzitometricky vyhodnoceny a PK rezistence vyjádřena jako procento množství rezistentního PrP vztaženého k množství neštěpeného PrP (a). Korelační diagram mezi hodnotami poměru D/N měřeními V5B2 esejí a PK rezistencí je znázorněn v (b).

4.3.6. Korelace PrP226* se standardní klasifikací CJN

Abychom zjistili, zda poměr nerozpustného PrP226* (tj. poměr D/N) koreluje s klasickou typizací CJN vzorků, porovnali jsme hodnoty D/N naměřené V5B2 esejí s typizací vzorků western blotem, s Met/Val polymorfismem na kodonu 129, s výskytem nebo absencí proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku a s imunohistochemickými (IHC) preparáty frontální mozkové kůry CJN/GSS vzorků. Hodnoty D/N nekorelovaly s typizací 1 nebo 2A western blotem ani s Met/Val polymorfismem na kodonu 129 (Obr. 44 a, b, resp.). Nenalezli jsme ani korelaci mezi hodnotami D/N a přítomností proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku (Obr. 44 c). Nakonec jsme zhotovili čerstvé IHC preparáty z řezů frontální mozkové kůry náhodně vybraných vzorků (1, 4, 5, 8, 15, 16, 19, 22 a 24, zhotoveno Dr. Matějem z FTN), u kterých jsme hodnotili intenzitu prionových plaků, perivakuolárních depozit a difuzních (synaptických) depozit (Tab. 6), a to na stupnici 0 (bez přítomnosti) až 3 (četná přítomnost). Ani zde jsme korelaci mezi intenzitou jednotlivých typů depozit a hodnotami D/N nenalezli (Obr. 44 d, e, f). Poz.: všechny CJN/GSS vzorky byly původně imunohistochemicky potvrzeny jako pozitivní na prionová depozita v Národní referenční laboratoři pro TSE/CJD za použití monoklonálních protilátek 12F10 a 3F4 na preparátech z různých mozkových oblastí. Korelaci jsme nenašli ani při porovnání hladiny PrP226* v denaturovaných vzorkách (absolutní hodnota D, viz Obr. 39 c) se všemi výše zmíněnými parametry klasické typizace (data neuvedena).



Obr. 44: Poměr D/N naměřený u 24 CJN/GSS vzorků V5B2 testem byl porovnán s 1 nebo 2A typizací western blotem (a), s methionin (M) – valin (V) polymorfismem na kodonu 129 (b), s výskytem nebo absencí proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku (c) a s IHC zhodnocením 9 vybraných CJN/GSS řezů frontální kůrou (e, f, g). IHC preparáty byly zhotoveny standardním protokolem fixací vzorku formaldehydem a po působení proteinázou K (10 $\mu\text{g/ml}$, 25°C, 10 min.) byly vizualizovány protilátkou 6H4 v ředění 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Intenzita prionových plaků (e), perivakuolárních depozit (f) a difúzních (synaptických) depozit (g) byla zhodnocena na stupnici 0 – 3 (tj. žádná až četná přítomnost).

vzorek číslo	protein 14-3-3	kodon 129	typ WB	imunohistochemie pomocí 6H4		
				plaky	difúzní depozita	perivakuolár- ní depozita
SPORADICKÁ CJN						
1	-	MM	2A	xxx	xx	x
2	+	MM	1			
3	+	VV	2A			
4	0	MM	2A	0	xx	x
5	+	MM	2A	xx	xx	xx
6	-	MM	1			
7	+	MM	2A			
8	-	VV	1			
9	0	MM	1	0	xx	x
10	+	MM	2A			
11	-	MM	2A			
12	-	MM	1			
13	0	MM	2A			
14	+	MM	1			
15	+	MM	1	1	xxx	xx
16	+	VV	2A	xxx	xxx	xxx
17	0	MM	2A			
18	0	MM	2A			
19	+	MM	2A	0	xx	xx
20	0	MV	1			
FAMILIÁLNÍ CJN						
21	+	MM	1			
22 GSS	0	MM	1	xxx	xxx	xx
23	-	MM	2A			
24	-	MM	1	0	xxx	xxx

Tab. 6: Klasická charakterizace CJN/GSS vzorků použitých ve studii. Protein 14-3-3 stanoven metodou ELISA v mozkomíšním moku (nestanoven: 0, nepřítomen: -, přítomen: +), M/V polymorfismus na kodonu 129 genu *Prnp*, typ western blotu

v klasifikaci dle Parchi a kol. [60]. Hodnocení imunohistochemických preparátů za použití protilátky 6H4 (0,5 µg/ml; nevyskytuje se: 0, slabý výskyt: +, střední: ++ a četný: +++ výskyt).

5. Diskuze

5.1. Diskuze k přípravě rekombinantního prionového proteinu

Podarilo se nám úspěšně zaklonovat gen *mPrnpa* do expresního vektoru pET-15b, exprimovat jej v *E. coli* BL21(DE3) a izolovat větší množství rekombinantního myšího prionového proteinu. V procesu purifikace a správného sbalení rmPrP bylo třeba přistoupit k několika optimalizačním krokům. K eluci rekombinantního PrP z Ni-NTA pryskyřice se v laboratořích běžně využívá gradient imidazolu [113, 124], nebo snížení pH [125]. V našem uspořádání jsme dali přednost eluci snížením pH, výtěžky rmPrP byly nadstandardní (35 mg/l média) a metoda dobře reprodukovatelná, nebylo tedy třeba při každé purifikaci monitorovat průběh eluce.

Kritickým krokem při přípravě nativního, tedy na α -helix bohatého PrP, je oxidace cysteinů. Oxidaci je třeba provést ve správném ředění proteinu, aby docházelo přednostně ke tvorbě intramolekulárních, nikoli intermolekulárních disulfidických můstků. Při tvorbě dimerů a oligomerů PrP dochází k masivní agregaci proteinu ve vodných pufrch [126]. Proto jsme zvolili koncentraci rmPrP v roztoku 0,1 mg/ml, což je v souladu s postupem jiných laboratoří [115, 126].

Samotné sbalení rPrP do nativní konformace lze ovlivnit několika faktory, nejčastěji pH vodného pufru a přítomností chaotropních činidel, popř. koncentrací solí nebo teplotou [39, 124, 126, 127]. Obecně platí, že při pH nižším než 4,0 dochází přednostně ke tvorbě náhodných struktur, které časem spontánně přecházejí v β -strukturu [39, 124]. Reakci lze urychlit přidávkem nižších koncentrací chaotropních činidel, např. 4 M močoviny nebo Gdn-HCl. Při pH 5,0 – 8,5 přítomnost denaturačních činidel nevadí, správně oxidovaný protein po jejich odstranění z roztoku opět zaujme konformaci α -šroubovice [127]. My jsme pro renaturaci rmPrP použili v souladu s jinými laboratořemi pufr o pH 8,0 [124, 126] a vyhnuli jsme se současné oxidaci s renaturací, která byla – z výše zmíněných důvodů – problematická. Lepších výsledků jsme dosáhli při oxidaci v denaturujících podmínkách a teprve poté následné dialýze do vodného pufru o pH 8,0.

Téměř při každé renaturaci rPrP dochází k částečné agregaci proteinů. Jedná se pravděpodobně o proteiny redukované či špatně oxidované (dimery nebo oligomery),

kteře preferují sbalení do β -struktury a následnou agregaci. Sbalení do rozpustné nativní konformace můžou bránit i nečistoty navázané na molekulu PrP, například zbytky DNA či afinitních ligandů z původního bakteriálního lyzátu. Tomu odpovídá i skutečnost, že po opětovné denaturaci, reoxidaci a refoldingu je výtěžek rozpustného rmPrP minimální. Tento jev popsal i Jackson a kol., kteřý uvádí více než 80% agregaci reoxidované a opětovně sbalené redukované frakce, oproti cca 3% agregaci v původně oxidované frakci [124]. Výtěžek oxidovaného rmPrP v nativní struktuře je po následné purifikaci na HPLC koloně 19 mg/l média, což je hodnota srovnatelná s výsledky jiných laboratořích používajících vysokoexpresních systémů (21 mg/l média, [124]).

K vysokým ztrátám dochází po štěpení His-Tagu thrombinem z N-koncové části molekuly rmPrP (64% ztráty oproti His-rmPrP). Ke ztrátám dochází pravděpodobně při nedostatečné eluci z kolony C18 při HPLC na reverzních fázích, kdy se rmPrP bez His-TAGu nadměrně adsorbuje na povrch kolony. Řešením by byla optimalizace elučních podmínek, nebo příprava nového plasmidu bez sekvence pro His-TAG. Molekula PrP obsahuje na svém N-konci tzv. „octarepeat region“ se sekvencí bohatou na histidin, kteřou lze využít k vazbě na Ni-NTA matriční namísto His-TAGu [128].

5.2. Diskuze k přípravě a využití protilátek proti glykovanému prionovému proteinu

Příprava protilátek proti prionovému proteinu byla často ztížena slabou imunogenicitou PrP, jež je dána vysoce mezidruhově konzervovanou primární strukturou prionového proteinu. Tento problém často neumožňuje obejít ani xenogenní imunizace. Abychom se tomuto potenciálnímu problému vyhnuli, použili jsme *Prnp*^{0/0} myši, kteřé jsme imunizovali karboxymethylovaným rekombinantním hPrP (rhPrP-CML). Karboxymethyl lysin představuje koncový produkt glykace proteinů a je nejrozšířenějším AGE antigenem *in vivo* [117]. Z šesti imunizovaných myši jedna produkovala vysoký, čtyři střední a jedna nízký titr protilátek jako odpověď na imunizaci. Reaktivita protilátek proti rhPrP-CML v sérech obou nejvíce respondujících myši byla mírně vyšší než reaktivita k nemodifikovanému rhPrP (tj. $A_{405} = 1,5$ oproti $A_{405} = 1,1$ při ředění 5×10^{-5} , Obr. 24 b), což potvrzuje prioritní tvorbu protilátek namířených proti CML.

Primárním screeningem metodou ELISA a sekundárním screeningem western blotem byly vybrány 4 klony (7A8, 1C3, 1C12 a 1F3) s vysokou specificitou k rhPrP-CML a 2 klony s vysokou specificitou vůči rhPrP. Klon 7A8 a oba klony proti rhPrP byly využity ke tvorbě purifikovaných monoklonálních protilátek EM-31, EM-20 a EM-21 (resp.). Původně jsme se zaměřili na charakterizaci monoklonální protilátky EM-31, která vykazovala nejvyšší reaktivitu k rhPrP-CML, její vazba na nemodifikovaný rhPrP byla zanedbatelná (Obr. 26 a a Obr. 27) a vazba na BSA-CML nulová (Obr. 26 a), což svědčí o specificitě vazby k CML modifikovanému prionovému proteinu. EM-31 se váže na glykované fragmenty rhPrP 23-231, 81-231, 90-231 a 121-231 (Obr. 25), což naznačuje umístění jejího epitopu v C-koncové části molekuly hPrP mezi AK 121 a 231. Protilátka se neváže na glykované peptidy hPrP 89-106, 102-114, 106-126, 127-147 a 142-154 (data neuvedena). EM-31 nereagovala s redukováným rhPrP-CML ani s redukováným rmPrP-CML nebo rmPrP-AGE (Obr. 26 b), z čehož vyplývá, že epitop EM-31 není lineární a může zahrnovat disulfidický můstek mezi Cys₁₇₉ a Cys₂₁₄. To je v souladu s předchozím zjištěním, že epitop EM-31 se nachází v C-koncové polovině molekuly hPrP (viz výše).

Purifikovaná EM-31 i supernatanty klonů 1C3, 1C12 a 1F3 byly opakovaně testovány na 12 mozkových homogenátech pacientů s CJN, avšak ani jedna z protilátek nebyla schopna zachytit hPrP-CML na žádném ze vzorků homogenátů, i když byly naneseny v desetinásobném množství než obvykle, tj. 10% MH místo 1% MH. Protilátky nereagovaly specificky ani na imunohistochemických preparátech zhotovených Dr. Matějem ve FTN. Během přípravy antigenu došlo ke tvorbě celého spektra hPrP-CML a antigen pravděpodobně obsahoval hPrP modifikovaný na všech lysinech molekuly. Během imunizace *Prnp*^{0/0} myši tak mohlo dojít preferenčně ke tvorbě protilátek namířených proti jinému epitopu glykovaného PrP, než jaký/jaké se vyskuteje/í v *in vivo* systémech. *In vivo* může docházet majoritně ke glykaci určité (např. na povrchu exponované) části prionového proteinu a jen minoritně nebo vůbec na jiných částech. Maturovaný lidský PrP obsahuje 10 lysinů a 10 argininů, v jejichž postranním řetězci může teoreticky docházet ke glykaci. Předchozí studie prokázaly přítomnost glykace na jednom nebo více lysinech N-koncové části PrP^{TSE} [103]. Dochází-li v průběhu onemocnění k modifikaci dalších možných glykačních míst zatím není známo.

Roli může hrát i použití rekombinantního PrP jako antigenu při imunizaci. Na rozdíl od PrP^C není rPrP posttranslačně modifikován a není tudíž glykosylován. Tím je možno vysvětlit i velmi nízkou afinitu EM-31 k *in vitro* CML modifikovanému lidskému MH (Obr. 26 d), oproti vysoké afinitě k rhPrP-CML (Obr. 26 a). Slabá reakce nevznikla v důsledku nedostatečné modifikace PrP v MH, neboť protilátka 3F4 ztratila reaktivitu [104], zatímco ke glykaci necitlivá kontrolní protilátka AG4 stále s PrP reagovala (Obr. 26 – 29). Tento jev lze vysvětlit například sterickým bráněním glykosylačních míst na asparaginech N₁₈₁ a N₁₉₇ v molekule PrP^C, které není přítomno u rekombinantního proteinu. Tato skutečnost může limitovat použitelnost EM-31 pro detekci *in vivo* glykovaných glykosylovaných isoform PrP^C/PrP^{TSE}, zároveň však lze protilátku použít pro studium glykace neglykosylované isoformy proteinu.

Po provedení studií na protilátce EM-31 jsme se zaměřili na vlastnosti monoklonálních protilátek produkovaných hybridomovými klony 1C3, 1C12 a 1F3. Obecně lze říci, že jsou podobné vlastnostem EM-31, avšak se dvěma důležitými rozdíly. Protilátky byly schopny rozeznat nejen rhPrP-CML (Obr. 28 a), ale i glykosylovaný PrP^C-CML na blotech *in vitro* modifikovaných lidských MH (Obr. 28 b) a myších MH (data neuvedena). Jejich vazba navíc nebyla citlivá k redukci proteinu dithiothreitem (data neuvedena). Specificita jejich vazby ke glykovanému rhPrP byla potvrzena i metodou ELISA (Obr. 29). Vzhledem k tomu, že všechny klony reagovaly silněji s rhPrP-CML než s rhPrP₉₀₋₂₃₁-CML a rhPrP₈₁₋₂₃₁-CML (Obr. 28 c), mohou se jejich epitopy vyskytovat v N-koncové části molekuly PrP. To by však bylo třeba ještě potvrdit nezávislým pokusem.

Abychom se v příští imunizaci vyhnuli výše nastíněnému problému, pokusili jsme se v sekvenci hPrP vytipovat epitop, který je v *in vivo* systémech skutečně modifikován. V nedávné studii provedené Panigajem a kol. bylo prokázáno, že epitop protilátky 3F4 (PrP₁₀₆₋₁₁₂) v molekule PrP^C na membránách lidských červených krvinek je kovalentně modifikován, pravděpodobně glykací [104]. Červené krvinky jsou dlouho žijící buňky (120 dní) a vzhledem k absenci proteosyntézy neobnovují své proteiny, které tak jsou na povrchu membrány exponovány k případné glykaci. S ohledem na tuto informaci jsme se zaměřili na přípravu CML modifikovaného peptidu rhPrP, obsahujícího sekvenci epitopu protilátky 3F4, ve kterém jsou přítomny 4 lysiny. Jako optimální byl vybrán peptid hPrP₁₀₀₋₁₁₃ s C-koncovým cysteinem (hPrP₁₀₀₋₁₁₃Cys, aminokyselinová sekvence

NKPSKPKTNMKHMAC). Koncový cystein byl k sekvenci přidán z důvodu umožnění vazby peptidu na imunogenní nosič (KLH), ke které dochází prostřednictvím thiolové skupiny postranního řetězce cysteinu a aminoskupin nosiče.

Kromě přípravy imunogenu umožňujícího přípravu vhodnějších protilátek bude třeba i vhodně zvolit primární a sekundární screening. Vedle rhPrP-CML, rhPrP, BSA-CML a *in vitro* glykovaných biologických vzorků by bylo vhodné zařadit i patientské vzorky mozkových homogenátů spolu s kontrolními zdravými mozkovými homogenáty, popř. vhodně zvolené spektrum infikovaných myších tkání (mozek, slezina, krev).

Závěrem lze říci, že příprava monoklonální protilátky specifické pro glykovaný prionový protein je proveditelná. V současnosti pokračuje charakterizace protilátek produkovanými klony 1C3, 1C12 a 1F3, zatímco protilátka EM-31 je komerčně dostupná (EXBIO Praha a.s., Vestec). Protilátky by bylo možné využít například ve studiích vedoucích k objasnění role glykace prionového proteinu v patogenezi TSE. Miranda *et al.* v nedávné době prokázali, že glykace se podílí na stabilizaci proteinových depozit u různých typů neurodegenerativních onemocnění, včetně TSE [109]. Na druhou stranu ke glykaci PrP^C velmi pravděpodobně dochází na červených krvinkách [104, 108], což může vést ke změně PrP^C, tj. jeho afinity k PrP^{TSE}. Vzhledem k tomu, že červené krvinky obsahují většinu na membrány vázaného PrP^C v krvi, a to nejen u lidí [104], ale i u laboratorních myši a některých primátů [19], může taková změna vlastností hrát významnou roli v přenosu TSE krevní transfuzí.

EM-20 a EM-21 se vážou na fragmenty rhPrP 23-231, 81-231, 90-231 a 121-231 (Obr. 25), což naznačuje umístění jejich epitopů v C-koncové polovině molekuly hPrP mezi AK 121 a 231. Protilátky se nevážou na peptidy hPrP 89-106, 102-114, 106-126, 127-147 a 142-154. EM-20 nereagovala s redukovaným rhPrP ani s redukovaným rmPrP (Obr. 32), z čehož vyplývá, že epitop EM-20 není lineární a může zahrnovat disulfidický můstek mezi Cys₁₇₉ a Cys₂₁₄. To je v souladu s předchozím zjištěním, že epitop EM-20 se nachází v C-koncové polovině molekuly hPrP (viz výše).

Detekční limity protilátky EM-20 (ve dvojici s biotinylovanou N-koncovou protilátkou EF2) v sendvičovém uspořádání ELISA/DELFIJA jsou srovnatelné se standardně používanými protilátkami v diagnostických testech. Detekční limit rekombinantního

mPrP (Obr. 33 a) je řádově stejný, jaký naměřili MacGregor a kol. při použití dvojice FH11 a 3F4-bio v DELFIA uspořádání [129] a řádově 10x nižší než v tomtéž uspořádání měřeném Dabaghian a kol. [123]. Detekční limit pro měření PrP^C v červených krvinkách (Obr. 33 c) a krevních destičkách (Obr. 33 d) je řádově stejný jako ve [129] a v mozковém homogenátu (Obr. 33 b) 5x nižší než ve [130], kde byl před vlastní ELISou (protilátky ICSM 10 a ICSM 35-bio) navíc použit koncentrační imunoprecipitační krok pomocí protilátky ICSM 33.

Vzhledem ke snadné komerční dostupnosti byly protilátky EM-20 a EM-21 testovány v národní referenční laboratoři TSE-CJN na oddělení patologie ve FTN s cílem nahradit komerčně nedostupnou, ale standardně používanou protilátku 3F4. Z imunohistochemických preparátů na řezu mozečkem pacienta s GSS je patrné, že protilátky EM-20 ani EM-21 nedosahují kvality protilátky 3F4, navíc pravděpodobně zachycují především difuzní depozita (Obr. 34). Naopak, využití protilátky EM-20 u western blotů by bylo možné, reaktivita protilátky ve srovnání s používanou protilátkou 12F10 je srovnatelná, ne-li vyšší při stejném ředění (viz Obr. 25 a, b). Protilátka EM-21 reaguje velmi slabě a i při nižším ředění nezaručuje zachycení všech pozitivních vzorků (Obr. 25 c).

5.3. Diskuze k detekci fragmentu prionového proteinu PrP226* v lidském mozku

Přestože význam GPI kotvy při replikaci PrP^{TSE} a propagaci prionových onemocnění zůstává nejasný [131-133], prionový protein bez GPI kotvy, tj. PrP(Δ GPI), působí ve smyslu urychlení propagace a tvorby prionových depozit. Heterozygotní transgenní myši, jimž byla odejmuta sekvence pro GPI kotvu na jedné z alel pro PrP, vykazovaly rychlejší nástup klinických příznaků a zemřely rychleji než divoké myši při infekci TSE. V mozcích transgenních myši byl prokázán PrPres tvořený oběma formami, tj. GPI-kotveným PrP i PrP(Δ GPI) [134]. Stöhr a kol. nedávno zveřejnili studii, kdy u myši s nadměrnou tvorbou PrP Δ GPI došlo ke spontánní tvorbě neurologického onemocnění [135]. Podobná situace byla popsána i u lidských pacientů se stop mutacemi na kodonech 226 a 227, které vedly ke tvorbě C-koncově zkrácených molekul PrP končících tyrosinem 225, nebo tyrosinem 226. Oba pacienti byli heterozygoti s druhou alelou kódující normální PrP a došlo u nich k rozvoji atypických prionových amyloidóz

[136]. Prionový protein bez GPI kotvy byl také nalezen v krevních buňkách pacientů s paroxysmální noční hemoglobinurií trpících klonálním defektem při syntéze GPI [71, 137]. Postižené buňky nicméně exprimovaly PrP(Δ GPI) spíše intracelulárně než transmembránově [71] a u pacientů se nevyvinuly neurologické symptomy.

V předkládané studii je popsán vývoj sendvičové imunoeseje k detekci fragmentu prionového proteinu bez glykosylphosphatidylinositolového (GPI) ukotvení, končícího aminokyselinou Y226, tj. PrP226* [97]. Metoda je založena na použití monoklonální protilátky V5B2 [96] a umožňuje identifikovat fragment PrP226*, který je různě přístupný v mozkové tkáni pacientů s CJN a bez CJN (např. Obr. 37 d a Obr. 39 c, d).

V5B2 esej umožňuje měřit poměr D/N u PrP226* přítomného v mozkovém homogenátu, tj. signál měřený v denaturovaném vzorku dělený signálem měřeným ve vzorku za nativních podmínek. Denaturace prionových agregátů pomocí Gdn-SCN uvolňuje dříve nedostupný PrP226* a s ním i nové epitopy protilátky V5B2. Princip V5B2 esej je založen na podobných principech jako konformačně-dependentní imunoesej [56] a využívá chaotropních solí k odkrytí epitopů sbalených v prionových agregátech. Chaotropní činidla jako Gdn-SCN, Gdn-HCl nebo močovina rozruší vodíkové vazby zodpovědné za sekundární strukturu (α -šroubovice a β -skládané listy) proteinů. Protože vodíkové vazby napomáhají i k udržení terciárních a kvartérních struktur proteinů, denaturace lidských mozkových homogenátů pomocí Gdn-SCN (nebo Gdn-HCl) vede k disociaci prionových agregátů, stejně jako k rozbalení polypeptidových řetězců PrP.

Různé vzorky mozkové tkáně mohou k dosažení optimální disociace prionových agregátů vyžadovat různé denaturační podmínky (Obr. 38 a). Pro V5B2 esej jsme vybrali 1,5 M Gdn-SCN jako kompromis pro zajištění efektivní denaturace většiny vzorků. Dále jsme optimalizovali ředění denaturovaných vzorků tak, aby výsledná koncentrace Gdn-SCN přítomná v mikrotitrační destičce ovlivňovala jen minimálně vazebnou kapacitu V5B2 (Obr. 38 b). Při použití rekombinantního PrP226* namísto mozkových homogenátů jsme zaznamenali 20% snížení signálu při ředění Gdn-SCN na koncentraci 0,075 M. Signál dále při použití denaturantu o finální koncentraci vyšší než 0,1 M rychle klesal, i když bylo zároveň zvýšeno množství rekombinantního PrP226*.

Důvodem snižování signálu jsou patrně strukturální změny části paratopů protilátky V5B2 a jejích epitopů v důsledku působení denaturantu.

V5B2 esej využívá vlastnosti monoklonální protilátky V5B2, namířené proti C-koncové části lidského prionového proteinu končícího AK zbytkem Y226. V5B2 je vysoce specifická pro všechny prionové fragmenty končící motivem AYY. Nepřítomnost jediného z tyrosinů, stejně jako připojení jediné aminokyseliny za tyrosin 226, způsobí přerušení vazby protilátky V5B2. V tom případě se může jednat o molekulu s C-koncovou částí končící Y225, nebo o fragment PrP227 a výše, nebo o celou molekulu PrP [97]. Důležitost motivu AYY PrP226* dobře koresponduje s výsledky prací Jansena a kol. na dvou pacientech se stop mutacemi na kodonech 226 a 227 na jedné z alel genu *Prnp*, vedoucí ke koexpresi PrP225 nebo PrP226 (tj. PrP226*) spolu s normálním, GPI-vázaným PrP. Oba pacienti překvapivě vykazovali různé fenotypy onemocnění, což dokazuje, že rozdíl v přítomnosti jediné molekuly tyrosinu 226 může významně ovlivnit preferenční umístění amyloidových depozit a celkový fenotyp prionového onemocnění [136].

V5B2 esej byla vyhodnocena za použití lidských mozkových homogenátů 23 CJN, 1 GSS a 10 non-CJN vzorků. Závěrem lze říci, že hodnoty D/N pro PrP226* jsou nižší než 0,7 v non-CJN vzorkách mozků a vyšší než 1,0 v 80% případech CJN/GSS patientských vzorků mozků (Obr. 39). Navíc jsme prokázali, že PrP226* je relativně stabilní; *post-mortem* nebo post-homogenizační procesy degradace PrP uvolněnými mozkovými proteázami ovlivňují hladinu PrP226* jen minimálně (Obr. 37 a, b). Většina fragmentu PrP226* je tedy v mozku přítomna již v čase úmrtí. Naše studie tak ukazuje, že PrP226* se akumuluje v depozitech prionového proteinu již v průběhu onemocnění a může tedy být použit jako biomarker pro lidské TSE.

V rámci studie jsme měli možnost mezi vzorky zahrnout i jeden atypický případ GSS. Jednalo se o případ GSS způsobený klasickou mutací P102L, ale průběh onemocnění se podobal spíše CJN [138]. Výsledky V5B2 eseje ukazovaly pětikrát vyšší hodnoty denaturovaného vzorku GSS než byla průměrná hodnota signálu ostatních testovaných mozkových homogenátů CJN vzorků. (Obr. 39 c, vz. č. 22), což poukazuje na vyšší množství fragmentu PrP226* v mozku pacienta s GSS. V porovnání s ostatními

studiemi je zajímavé, že Jansen a kol. u pacienta s expresí fragmentu PrP226* popsal také fenotyp onemocnění podobný GSS [136].

Abychom lépe porozuměli výkyvům v hodnotách D/N mezi jednotlivými vzorky zahrnutými ve studii, změřili jsme obsah frakce PrP rezistentního ke štěpení proteinázou K (PrPres) ve vzorcích s velmi vysokými nebo velmi nízkými hodnotami D/N (Obr. 43 a) a našli jsme obecnou korelaci mezi proporcí PrP226* a PrPres v prionových agregátech jednotlivých měřených vzorků. Přesto nás ale znepokojilo, že jsme byli schopni jasně stanovit jako pozitivní jeden ze dvou vzorků CJN, které byly zcela rozštěpeny proteinázou K o koncentraci 50 µg/ml (vz. č. 1: Obr. 43 a, v porovnání s Obr. 39 e, D/N = 2,16). Hodnoty D/N naměřené V5B2 esejí korelovaly s hodnotami D/N naměřenými CDI esejí, což naznačuje, že množství PrP226* v agregátech je přímo úměrné množství celkového misfoldovaného PrP v nich přítomného (Obr. 41 a, b).

Fragmenty, které by mohly mít souvislost s PrP226*, již byly popsány ve zvířecích i lidských mozcích infikovaných TSE. Stahl a kol. prokázali, že 15% PrP^{Sc} izolovaného z křeččího mozku končilo glycinem 228 [120]. Přestože štěpné místo tohoto fragmentu je jiné než u PrP226*, oba fragmenty mohou vznikat stejným mechanismem, ale lišit se pouze z důvodu různé AK sekvence křeččího (myšního) a lidského PrP v oblasti štěpného místa proteáz. Jako méně pravděpodobný se zdá být původ PrP226* v následném exoproteázovém štěpení fragmentu PrP228, jelikož PrP226* nikdy nebyl u myši detekován (data nepublikována).

Notari a kol. v lidském mozku s CJN identifikovali dva fragmenty PrP bez GPI kotvy, které se v elektroforetickém poli pohybovaly o 2–3 kDa rychleji než PrPres (nebo PrP27–30) [118]. Fragmenty, kterým chybělo několik AK spolu s GPI kotvou na úplném C-konci molekuly, mají zřetelnou molekulovou váhu kolem 18,5 kDa, pokud jsou asociovány s PrP27–30 typem 1, a 17 kDa, pokud jsou asociovány s typem 2. Notari a kol. též identifikoval významné rozdíly v množství těchto fragmentů mezi testovanými CJN subtypy [118]. Když jsme porovnali hodnoty D/N pro PrP226*, měřené u 24 vzorků CJD/GSS, s profily western blotů, s polymorfismem Met/Val na kodonu 129, s přítomností proteinu 14-3-3 v MMM nebo s typem depozit PrP^{TSE}, nenalezli jsme korelaci s žádným z výše zmíněných parametrů (Tab. 6).

V této studii jsme též prokázali, že PrP226* lze detekovat i v mozcích některých pacientů bez neurologických poruch (Obr. 39 b). Je známo, že i když většina PrP^C je vázána k buněčným membránám prostřednictvím GPI kotvy, existuje i rozpustná forma PrP^C produkovaná různými buňkami v rámci normálních metabolických procesů, a to např. neurony, splenocyty a destičkami [[139-141](#)]. PrP(Δ GPI) byl rovněž identifikován v médiu jiných tkáňových kultur [[142](#), [143](#)], v lidském mozkomíšním moku a v séru [[139](#), [143](#)]. Přesné štěpné místo na molekule PrP v těchto studiích nebylo identifikováno. Parkin a kol. ukázali, že kromě odštěpení GPI kotvy fosfolipázou C za serinem 231 je významné množství PrP^C z buněk vylučováno proteolytickým působením na zinku závislých metaloproteáz, které štěpí PrP^C velmi blízko C-konce [[119](#)]. Jestli však PrP226*(Δ GPI) vzniká působením na zinku závislých metaloproteáz a jaký může být jeho biologický význam ve zdravých či nemocných mozcích, je třeba teprve objasnit.

6. Závěr

Tato práce byla zaměřena na přípravu a detailní studii vlastností monoklonálních protilátek proti novým potencionálním biomarkerům prionových chorob než je běžně používaný PrP^{TSE}. Naše výsledky lze využít k vývoji nových typů diagnostických testů a v širším pojetí k hledání nových biomarkerů a zjednodušení diagnostiky TSE.

Shrnutí výsledků:

1. Připravili jsme rekombinantní prionový protein ve velkém množství, vysoké čistotě a stabilitě.
2. Připravili jsme 4 monoklonální protilátky (EM-31, 1C3, 1C12 a 1F3) proti glykovanému prionovému proteinu (rhPrP-CML).
3. EM-31 vykazuje nejvyšší reaktivitu k rhPrP-CML, její vazba na nemodifikovaný rhPrP je zanedbatelná a vazba na BSA-CML nulová. Epitop EM-31 se nachází v C-koncové části molekuly hPrP mezi AK 121 a 231 a je citlivý k redukci hPrP dithiothreitem.
4. 1C3, 1C12 a 1F3 jsou schopny rozeznat nejenom rhPrP-CML, ale i glykosylovaný PrP^C-CML na blotech *in vitro* modifikovaných lidských a myších mozkových homogenátů.
5. Připravili jsme antigen pro cílenou imunizaci a přípravu monoklonální protilátky reagující s *in vivo* glykovaným PrP.
6. Prionový fragment bez GPI ukotvení (PrP226*) je v mozkových homogenátech stabilní.
7. Vyvinuli jsme sendvičovou imunoesej (DELFIJA), která umožňuje měřit poměr D/N u PrP226* v mozkovém homogenátu, tj. signál měřený v denaturovaném vzorku dělený signálem měřeným ve vzorku za nativních podmínek.
8. Fragment PrP226* je součástí prionových agregátů v mozcích CJN/GSS pacientů a jeho množství je proporcionální k celkovému PrP^{TSE}.
9. Vzorky s vysokým poměrem D/N obecně obsahují více PrP rezistentního ke štěpení proteinázou K.
10. Nenalezli jsme korelaci mezi množstvím PrP226* a parametry standardní klasifikace CJN.

7. Citace

1. Prusiner, S.B., *Prions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13363-83.
2. Creutzfeldt, H.G., *Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. Vorläufige Mitteilung*. . Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie, 1920. **57**: p. 1-18.
3. Jakob, A., *Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). Vorläufige Mitteilung*. . Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkund, 1921. **70**: p. 132–146.
4. Gajdusek, D.C. and V. Zigas, *Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population*. N Engl J Med, 1957. **257**(20): p. 974-8.
5. Budka, H., *Neuropathology of prion diseases*. Br Med Bull, 2003. **66**: p. 121-30.
6. Will, R.G., et al., *A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK*. Lancet, 1996. **347**(9006): p. 921-5.
7. Hewitt, P.E., et al., *Three reported cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission following transfusion of labile blood components*. Vox Sang, 2006. **91**(4): p. 348.
8. Duffy, P., et al., *Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease*. N Engl J Med, 1974. **290**(12): p. 692-3.
9. Bernoulli, C., et al., *Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery*. Lancet, 1977. **1**(8009): p. 478-9.
10. Davanipour, Z., et al., *Possible modes of transmission of Creutzfeldt-Jakob disease*. N Engl J Med, 1984. **311**(24): p. 1582-3.
11. Buchanan, C.R., M.A. Preece, and R.D. Milner, *Mortality, neoplasia, and Creutzfeldt-Jakob disease in patients treated with human pituitary growth hormone in the United Kingdom*. BMJ, 1991. **302**(6780): p. 824-8.
12. Healy, D.L. and J. Evans, *Creutzfeldt-Jakob disease after pituitary gonadotrophins*. BMJ, 1993. **307**(6903): p. 517-8.
13. Brown, P., et al., *Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: an example of the interplay between ancient genes and modern medicine*. Neurology, 1994. **44**(2): p. 291-3.
14. Palmer, M.S., et al., *Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. Nature, 1991. **352**(6333): p. 340-2.
15. Mead, S., *Prion disease genetics*. Eur J Hum Genet, 2006. **14**(3): p. 273-81.
16. Collins, S., C.A. McLean, and C.L. Masters, *Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies*. J Clin Neurosci, 2001. **8**(5): p. 387-97.
17. Medori, R., et al., *Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene*. N Engl J Med, 1992. **326**(7): p. 444-9.
18. Aguzzi, A. and A.M. Calella, *Prions: protein aggregation and infectious diseases*. Physiol Rev, 2009. **89**(4): p. 1105-52.
19. Holada, K., et al., *Divergent expression of cellular prion protein on blood cells of human and nonhuman primates*. Transfusion, 2007. **47**(12): p. 2223-32.
20. Aguzzi, A., F. Baumann, and J. Bremer, *The prion's elusive reason for being*. Annu Rev Neurosci, 2008. **31**: p. 439-77.
21. Gunther, E.C. and S.M. Strittmatter, *Beta-amyloid oligomers and cellular prion*

- protein in Alzheimer's disease.* J Mol Med (Berl), 2010. **88**(4): p. 331-8.
22. Borchelt, D.R., et al., *Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells.* J Cell Biol, 1990. **110**(3): p. 743-52.
 23. Caughey, B., et al., *Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells.* J Virol, 1989. **63**(1): p. 175-81.
 24. Riek, R., et al., *NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231).* Nature, 1996. **382**(6587): p. 180-2.
 25. Zahn, R., et al., *NMR solution structure of the human prion protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 145-50.
 26. Shmerling, D., et al., *Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions.* Cell, 1998. **93**(2): p. 203-14.
 27. Shyng, S.L., J.E. Heuser, and D.A. Harris, *A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits.* J Cell Biol, 1994. **125**(6): p. 1239-50.
 28. Marella, M., et al., *Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release.* J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25457-64.
 29. Pan, K.M., et al., *Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 10962-6.
 30. Safar, J., et al., *Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein.* J Biol Chem, 1993. **268**(27): p. 20276-84.
 31. Wille, H., et al., *Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3563-8.
 32. DeMarco, M.L. and V. Daggett, *From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2293-8.
 33. Prusiner, S.B., *Molecular biology of prion diseases.* Science, 1991. **252**(5012): p. 1515-22.
 34. Silveira, J.R., et al., *The most infectious prion protein particles.* Nature, 2005. **437**(7056): p. 257-61.
 35. Jarrett, J.T. and P.T. Lansbury, Jr., *Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?* Cell, 1993. **73**(6): p. 1055-8.
 36. Saborio, G.P., B. Permanne, and C. Soto, *Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding.* Nature, 2001. **411**(6839): p. 810-3.
 37. Deleault, N.R., et al., *Formation of native prions from minimal components in vitro.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(23): p. 9741-6.
 38. Hornemann, S., C. Schorn, and K. Wuthrich, *NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains.* EMBO Rep, 2004. **5**(12): p. 1159-64.
 39. Swietnicki, W., et al., *Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231.* Biochemistry, 2000. **39**(2): p. 424-31.
 40. Lee, S. and D. Eisenberg, *Seeded conversion of recombinant prion protein to a disulfide-bonded oligomer by a reduction-oxidation process.* Nat Struct Biol, 2003. **10**(9): p. 725-30.
 41. Baskakov, I.V., *Autocatalytic conversion of recombinant prion proteins displays a species barrier.* J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7671-7.
 42. Stohr, J., et al., *Mechanisms of prion protein assembly into amyloid.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(7): p. 2409-14.

43. Wang, F., et al., *Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein*. Science, 2010. **327**(5969): p. 1132-5.
44. Cobb, N.J., A.C. Apetri, and W.K. Surewicz, *Prion protein amyloid formation under native-like conditions involves refolding of the C-terminal alpha-helical domain*. J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 34704-11.
45. Kim, J.I., et al., *Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors*. J Biol Chem, 2010. **285**(19): p. 14083-7.
46. Chiti, F. and C.M. Dobson, *Protein misfolding, functional amyloid, and human disease*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 333-66.
47. Kimberlin, R.H. and C.A. Walker, *Pathogenesis of scrapie: agent multiplication in brain at the first and second passage of hamster scrapie in mice*. J Gen Virol, 1979. **42**(1): p. 107-17.
48. Scott, M., et al., *Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques*. Cell, 1989. **59**(5): p. 847-57.
49. Prusiner, S.B., et al., *Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication*. Cell, 1990. **63**(4): p. 673-86.
50. Kocisko, D.A., et al., *Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3923-7.
51. Caughey, B., *Interactions between prion protein isoforms: the kiss of death?* Trends Biochem Sci, 2001. **26**(4): p. 235-42.
52. Priola, S.A. and B. Chesebro, *A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7754-8.
53. Collinge, J., *Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 519-50.
54. Weissmann, C., *The state of the prion*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(11): p. 861-71.
55. Bessen, R.A. and R.F. Marsh, *Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy*. J Virol, 1994. **68**(12): p. 7859-68.
56. Safar, J., et al., *Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations*. Nat Med, 1998. **4**(10): p. 1157-65.
57. Peretz, D., et al., *A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain*. Neuron, 2002. **34**(6): p. 921-32.
58. Nishina, K.A., et al., *The stoichiometry of host PrP^C glycoforms modulates the efficiency of PrP^{Sc} formation in vitro*. Biochemistry, 2006. **45**(47): p. 14129-39.
59. Gambetti, P., et al., *Sporadic and familial CJD: classification and characterisation*. Br Med Bull, 2003. **66**: p. 213-39.
60. Parchi, P., et al., *Different patterns of truncated prion protein fragments correlate with distinct phenotypes in P102L Gerstmann-Straussler-Scheinker disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8322-7.
61. Collinge, J. and A.R. Clarke, *A general model of prion strains and their pathogenicity*. Science, 2007. **318**(5852): p. 930-6.
62. Hill, A.F., et al., *The same prion strain causes vCJD and BSE*. Nature, 1997. **389**(6650): p. 448-50, 526.
63. Collinge, J., et al., *Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing*

- human prion protein*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 779-83.
64. Zerr, I., et al., *Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. Brain, 2009. **132**(Pt 10): p. 2659-68.
 65. Sassa, Y., et al., *Anti-PrP antibodies detected at terminal stage of prion-affected mouse*. Cell Immunol, 2010. **263**(2): p. 212-8.
 66. Safar, J.G., et al., *Diagnosis of human prion disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(9): p. 3501-6.
 67. Thackray, A.M., L. Hopkins, and R. Bujdoso, *Proteinase K-sensitive disease-associated ovine prion protein revealed by conformation-dependent immunoassay*. Biochem J, 2007. **401**(2): p. 475-83.
 68. Yakovleva, O., et al., *Effect of protease treatment on plasma infectivity in variant Creutzfeldt-Jakob disease mice*. Transfusion, 2004. **44**(12): p. 1700-5.
 69. Holada, K., et al., *Expression of cellular prion protein on platelets from patients with gray platelet or Hermansky-Pudlak syndrome and the protein's association with alpha-granules*. Haematologica, 2006. **91**(8): p. 1126-9.
 70. Holada, K., J. Simak, and J.G. Vostal, *Transmission of BSE by blood transfusion*. Lancet, 2000. **356**(9243): p. 1772.
 71. Holada, K., et al., *Activated platelets of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria express cellular prion protein*. Blood, 2002. **100**(1): p. 341-3.
 72. Daude, N., S. Lehmann, and D.A. Harris, *Identification of intermediate steps in the conversion of a mutant prion protein to a scrapie-like form in cultured cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(17): p. 11604-12.
 73. Horiuchi, M., et al., *Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5836-41.
 74. Pastrana, M.A., et al., *Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrPSc fraction*. Biochemistry, 2006. **45**(51): p. 15710-7.
 75. Gambetti, P., et al., *A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease*. Ann Neurol, 2008. **63**(6): p. 697-708.
 76. Jansen, C., et al., *The first case of fatal familial insomnia (FFI) in the Netherlands: a patient from Egyptian descent with concurrent four repeat tau deposits*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2011. **37**(5): p. 549-53.
 77. Rodriguez-Martinez, A.B., et al., *A novel form of human disease with a protease-sensitive prion protein and heterozygosity methionine/valine at codon 129: Case report*. BMC Neurol, 2010. **10**: p. 99.
 78. Head, M.W., et al., *A case of protease sensitive prionopathy in a patient in the UK*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2009. **35**(6): p. 628-32.
 79. Zou, W.Q., et al., *Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein*. Ann Neurol, 2010. **68**(2): p. 162-72.
 80. Korth, C., et al., *Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody*. Nature, 1997. **390**(6655): p. 74-7.
 81. Spinner, D.S., et al., *CpG oligodeoxynucleotide-enhanced humoral immune response and production of antibodies to prion protein PrPSc in mice immunized with I39A scrapie-associated fibrils*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(6): p. 1374-85.
 82. Bainbridge, J., N. Jones, and B. Walker, *Multiple antigenic peptides facilitate generation of anti-prion antibodies*. Clin Exp Immunol, 2004. **137**(2): p. 298-304.
 83. Bueler, H., et al., *Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 577-82.
 84. Paramithiotis, E., et al., *A prion protein epitope selective for the pathologically*

- misfolded conformation*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 893-9.
85. Hedlin, P.D., et al., *Design and delivery of a cryptic PrP(C) epitope for induction of PrP(Sc)-specific antibody responses*. Vaccine, 2010. **28**(4): p. 981-8.
 86. Thackray, A.M., et al., *Detection of bovine spongiform encephalopathy, ovine scrapie prion-related protein (PrPSc) and normal PrPc by monoclonal antibodies raised to copper-refolded prion protein*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 1): p. 81-90.
 87. Polymenidou, M., et al., *The POM monoclonals: a comprehensive set of antibodies to non-overlapping prion protein epitopes*. PLoS One, 2008. **3**(12): p. e3872.
 88. Jones, M., et al., *An antibody to the aggregated synthetic prion protein peptide (PrP106-126) selectively recognizes disease-associated prion protein (PrP) from human brain specimens*. Brain Pathol, 2009. **19**(2): p. 293-302.
 89. Horiuchi, M., et al., *Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrPSc from PrPC and neutralizes prion infectivity*. Virology, 2009. **394**(2): p. 200-7.
 90. Petsch, B., et al., *Biological effects and use of PrPSc- and PrP-specific antibodies generated by immunization with purified full-length native mouse prions*. J Virol, 2011. **85**(9): p. 4538-46.
 91. Biasini, E., et al., *Non-infectious aggregates of the prion protein react with several PrPSc-directed antibodies*. J Neurochem, 2008. **105**(6): p. 2190-204.
 92. Moroncini, G., et al., *Motif-grafted antibodies containing the replicative interface of cellular PrP are specific for PrPSc*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(28): p. 10404-9.
 93. Williamson, R.A., et al., *Mapping the prion protein using recombinant antibodies*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 9413-8.
 94. Burton, D.R., et al., *Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody*. Science, 1994. **266**(5187): p. 1024-7.
 95. Solforosi, L., et al., *Toward molecular dissection of PrPC-PrPSc interactions*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7465-71.
 96. Curin Serbec, V., et al., *Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob's disease-affected and normal brain tissue*. J Biol Chem, 2004. **279**(5): p. 3694-8.
 97. Kosmac, M., et al., *Epitope mapping of a PrP(Sc)-specific monoclonal antibody: identification of a novel C-terminally truncated prion fragment*. Mol Immunol, 2011. **48**(5): p. 746-50.
 98. Zou, W.Q., et al., *Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1380-5.
 99. Cordeiro, Y., et al., *DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 49400-9.
 100. Parchi, P., et al., *Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects*. Ann Neurol, 1999. **46**(2): p. 224-33.
 101. Tayebi, M., et al., *PrP(Sc)-specific antibodies with the ability to immunodetect prion oligomers*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19998.
 102. Kaye, R., et al., *Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis*. Science, 2003. **300**(5618): p. 486-9.
 103. Choi, Y.G., et al., *Nonenzymatic glycation at the N terminus of pathogenic prion*

- protein in transmissible spongiform encephalopathies*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30402-9.
104. Panigaj, M., et al., *Underestimation of the expression of cellular prion protein on human red blood cells*. Transfusion, 2011. **51**(5): p. 1012-21.
 105. Dvorakova, E., et al., *Development of monoclonal antibodies specific for glycated prion protein*. J Toxicol Environ Health A, 2011. **74**(22-24): p. 1469-75.
 106. Obšil, T. and Z. Pavliček, *Glykace proteinů a fosfolipidů: Maillardova reakce in vivo*. Chem. Listy 1997. **91**: p. 558-569.
 107. Brownlee, M., H. Vlassara, and A. Cerami, *Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications*. Ann Intern Med, 1984. **101**(4): p. 527-37.
 108. Ando, K., et al., *Membrane proteins of human erythrocytes are modified by advanced glycation end products during aging in the circulation*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **258**(1): p. 123-7.
 109. Miranda, H.V. and T.F. Outeiro, *The sour side of neurodegenerative disorders: The effects of protein glycation*. J. Pathol., 2010. **221**: p. 13–25.
 110. Wei, Y., et al., *Rapid glycation with D-ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SH-SY5Y cells*. BMC Cell Biol, 2009. **10**: p. 10.
 111. Sasaki, N., et al., *Advanced glycation end products (AGE) and their receptor (RAGE) in the brain of patients with Creutzfeldt-Jakob disease with prion plaques*. Neurosci Lett, 2002. **326**(2): p. 117-20.
 112. Zahn, R., et al., *Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15024-9.
 113. Zahn, R., C. von Schroetter, and K. Wuthrich, *Human prion proteins expressed in Escherichia coli and purified by high-affinity column refolding*. FEBS Lett, 1997. **417**(3): p. 400-4.
 114. McCutcheon, S., N. Hunter, and F. Houston, *Use of a new immunoassay to measure PrP Sc levels in scrapie-infected sheep brains reveals PrP genotype-specific differences*. J Immunol Methods, 2005. **298**(1-2): p. 119-28.
 115. Hornemann, S., et al., *Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization*. FEBS Lett, 1997. **413**(2): p. 277-81.
 116. Hochuli, E., H. Dobeli, and A. Schacher, *New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues*. J Chromatogr, 1987. **411**: p. 177-84.
 117. Reddy, S., et al., *N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins*. Biochemistry, 1995. **34**(34): p. 10872-8.
 118. Notari, S., et al., *Characterization of truncated forms of abnormal prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease*. J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 30557-65.
 119. Parkin, E.T., et al., *Dual mechanisms for shedding of the cellular prion protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11170-8.
 120. Stahl, N., et al., *Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing*. Biochemistry, 1993. **32**(8): p. 1991-2002.
 121. Legname, G., et al., *Continuum of prion protein structures enciphers a multitude of prion isolate-specified phenotypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(50): p. 19105-10.

122. Barnard, G., et al., *The measurement of prion protein in bovine brain tissue using differential extraction and DELFIA as a diagnostic test for BSE*. Luminescence, 2000. **15**(6): p. 357-62.
123. Dabaghian, R.H., et al., *An immunoassay for the pathological form of the prion protein based on denaturation and time resolved fluorometry*. J Virol Methods, 2006. **132**(1-2): p. 85-91.
124. Jackson, G.S., et al., *Multiple folding pathways for heterologously expressed human prion protein*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1431**(1): p. 1-13.
125. Baskakov, I.V., et al., *Folding of prion protein to its native alpha-helical conformation is under kinetic control*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 19687-90.
126. Alvarez-Martinez, M.T., et al., *Optimized overproduction, purification, characterization and high-pressure sensitivity of the prion protein in the native (PrP(C)-like) or amyloid (PrP(Sc)-like) conformation*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1645**(2): p. 228-40.
127. Baskakov, I.V., et al., *The peculiar nature of unfolding of the human prion protein*. Protein Sci, 2004. **13**(3): p. 586-95.
128. Yin, S.M., Y. Zheng, and P. Tien, *On-column purification and refolding of recombinant bovine prion protein: using its octarepeat sequences as a natural affinity tag*. Protein Expression and Purification, 2003. **32**(1): p. 104-109.
129. MacGregor, I., et al., *Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the analysis of normal prion protein in human blood and its components*. Vox Sang, 1999. **77**(2): p. 88-96.
130. Tattum, M.H., et al., *A highly sensitive immunoassay for the detection of prion-infected material in whole human blood without the use of proteinase K*. Transfusion, 2010. **50**(12): p. 2619-27.
131. Kim, J.I., et al., *The role of glycosylphosphatidylinositol anchor in the amplification of the scrapie isoform of prion protein in vitro*. FEBS Lett, 2009. **583**(22): p. 3671-5.
132. Bate, C., M. Tayebi, and A. Williams, *The glycosylphosphatidylinositol anchor is a major determinant of prion binding and replication*. Biochem J, 2010. **428**(1): p. 95-101.
133. McNally, K.L., A.E. Ward, and S.A. Priola, *Cells expressing anchorless prion protein are resistant to scrapie infection*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4469-75.
134. Chesebro, B., et al., *Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie*. Science, 2005. **308**(5727): p. 1435-9.
135. Stohr, J., et al., *Spontaneous generation of anchorless prions in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(52): p. 21223-8.
136. Jansen, C., et al., *Prion protein amyloidosis with divergent phenotype associated with two novel nonsense mutations in PRNP*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(2): p. 189-97.
137. Risitano, A.M., et al., *CD34+ cells from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients are deficient in surface expression of cellular prion protein (PrP_c)*. Exp Hematol, 2003. **31**(1): p. 65-72.
138. Rusina, R., et al., *Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome with the P102L pathogenic mutation presenting as familial Creutzfeldt-Jakob disease: a case report and review of the literature*. Neurocase, 2013. **19**(1): p. 41-53.
139. Parizek, P., et al., *Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44627-32.
140. Hay, B., S.B. Prusiner, and V.R. Lingappa, *Evidence for a secretory form of the cellular prion protein*. Biochemistry, 1987. **26**(25): p. 8110-5.

141. Vostal, J.G., K. Holada, and J. Simak, *Expression of cellular prion protein on blood cells: potential functions in cell physiology and pathophysiology of transmissible spongiform encephalopathy diseases*. *Transfus Med Rev*, 2001. **15**(4): p. 268-81.
142. Harris, D.A., et al., *Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites*. *Biochemistry*, 1993. **32**(4): p. 1009-16.
143. Tagliavini, F., et al., *A soluble form of prion protein in human cerebrospinal fluid: implications for prion-related encephalopathies*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **184**(3): p. 1398-404.

8. Přílohy

Příloha č. 1:

Zbigniew Zawada, Martin Šafařík, Eva Dvořáková, Olga Janoušková, Anna Březinová, Ivan Stibor, Karel Holada, Petr Bouř, Jan Hlaváček, and Jaroslav Šebestík. *Quinacrine reactivity with prion proteins and prion derived peptides*. *Amino Acids*, 2013. **44**(5): p. 1279–1292.

Příloha č. 2:

Panigaj M, Brouckova A, Glierova H, Dvorakova E, Simak J, Vostal JG, Holada K. *Underestimation of the expression of cellular prion protein on human red blood cells*. *Transfusion*, 2011. **51**(5): p. 1012-21.

Příloha č. 3:

Dvorakova E, Prouza M, Janouskova O, Panigaj M, Holada K. *Development of monoclonal antibodies specific for glycated prion protein*. *J Toxicol Environ Health A*, 2011. **74**(22-24): p. 1469-75.

Příloha č. 4:

Eva Dvorakova, Tanja Vranac, Olga Janouskova, Maja Černilec, Simon Koren, Anja Lukan, Jana Nováková, Radoslav Matej, Karel Holada and Vladka Čurin Šerbec. *Detection of the GPI-anchorless prion protein fragment PrP226* in human brain*. *BMC Neurology*, 2013. **13**(126): p. 1471-2377.