

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 redukcujících 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 mozkem.

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.

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.

Obsah

1. Úvod	4
2. Hypotézy a cíle práce.....	7
3. Materiál a metodika	8
4. Výsledky	9
5. Diskuze	18
6. Závěry	21
7. Použitá literatura.....	22
8. Seznam publikací.....	25

1. Úvod

Prionové choroby, neboli transmisivní spongiformní encefalopatie (TSE), jsou neurodegenerativní onemocnění spojené s úbytkem neuronů, spongiformními změnami, gliózou a ukládáním patologické formy prionového proteinu v mozku [1]. Onemocnění se projevuje například jako klusavka („scrapie“) ovcí a koz, bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) skotu nebo chronické chřadnutí (CWD) jelenovitých. První lidská prionová choroba byla popsána v roce 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. Onemocnění většinou vzniká bez známých příčin (85% případů), může ale být i dědičné (10 – 15% případů) nebo získané (2 – 3% případů). Vzácněji se vyskytuje dědičný Gerstmann-Sträussler-Scheinkerův syndrom (GSS) a fatální familiární insomnie (FFI) [5]. V současnosti velkou pozornost poutá variantní CJN (vCJN), která vznikla s největší pravděpodobností alimentárním přenosem BSE prionů na člověka. Na rozdíl od klasické CJN postihuje především mladé lidi, vCJN priony se akumulují i v orgánech imunitního systému a choroba je přenosná krevní transfuzí [6, 7].

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, na struktury β -skládaného listu bohatou konformaci [1]. PrP^{C} se vyskytuje na povrchu většiny buněk v těle [1, 8] 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 [9]. Molekula PrP^{C} obsahuje ve své sekundární struktuře vysoký podíl α -šroubovice, což ji činí dobře štěpitelnou proteázami. Poločas života molekuly PrP^{C} v buňce se odhaduje na 3 – 6 hodin [10, 11]. Oproti tomu 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}) [12, 13], která ji činí částečně odolnou vůči proteolýze. PrP^{TSE} navíc agreguje za tvorby amyloidových fibril a vytváří v mozku depozita, která se podílí na rozvoji onemocnění. V současnosti neexistují protilátky specifické pro PrP^{TSE} , které by byly klinicky využívány a diagnostické testy jsou založeny na

průkazu rezistentního jádra PrP^{TSE} po štěpení vzorku proteinázou K pomocí western blotu nebo imunohistochemie fixované mozkové tkáně. Tento krok je však pracný a časově náročný a obtížně standardizovatelný. Řešením problému by mohl být zcela nový typ diagnostických testů založených na jiném principu než je detekce PrP^{TSE}, kde by nutnost kroku štěpení proteinázou K odpadla. V prvním případě jsme se zaměřili na detekci glykovaného prionového proteinu monoklonální protilátkou, ve druhém případě jsme využili protilátky specifické pro prionový protein bez C-koncového ukotvení.

Glykovaný protein by mohl podle naší hypotézy představovat nový typ markeru pro TSE, který by bylo možné přímo prokázat specifickou monoklonální protilátkou bez potřeby štěpení proteinázou K. Působením glukózy a jiných redukujících cukrů v organismu vzniká spektrum produktů zvaných koncové produkty glykace (advanced glycation end products, AGEs). AGEs hrají klíčovou roli např. při patogenezi komplikací u chronického diabetu mellitus [14] 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 [15], včetně buněčného prionového proteinu [16]. 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 [17]. Ke glykaci v těchto případech dochází z důvodu dlouhodobého výskytu proteinových depozit v organismu a jejich vystavení účinkům glukózy. V mozcích CJN pacientů byly za pomoci nespecifické protilátky proti AGEs opakovaně prokázána depozita glykovaného PrP^{TSE} [18, 19], 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 studiiemi role glykace na iniciaci patologie v *in vitro* i *in vivo* systémech. V této části studie jsme se zaměřili na přípravu monoklonálních protilátek proti glykovanému prionovému proteinu a na charakterizaci jejich vlastností.

V dřívějších studiích byla popsána příprava a vlastnosti monoklonální protilátky V5B2, specifické proti lidskému peptidu PrP₂₁₄₋₂₂₆ [20]. V5B2 specificky rozeznává C-koncový fragment prionového proteinu zakončeného tyrosinem 226, který byl nazván PrP226* [21]. Monoklonální protilátka V5B2 tak představuje jedinečný nástroj pro studium lokalizace a chování tohoto C-koncově neukotveného fragmentu prionového proteinu v různých biologických vzorcích. V současných publikacích se objevují zprávy o různých zkrácených

formách anormálního prionového proteinu identifikovaných v prionových depozitech [22-26]. Jedním z identifikovaných fragmentů je PrP bez glykosylfosfatidylinositolové kotvy, tj. PrP(Δ GPI), zkrácený na úplném C konci [26-28]. Přestože úloha GPI kotvy v replikaci PrP^{TSE} a šíření onemocnění zůstává nejasná [29-31], PrP(Δ GPI) působí ve smyslu urychlení tvorby a šíření prionů [32-34]. V této části studie jsme se zaměřili na vývoj sendvičové DELFIA imunoeseje pro detekci fragmentu PrP226* v lidských mozkových homogenátech, s využitím monoklonální protilátky V5B2. Metoda je založená na porovnání množství PrP226* měřených v nativních a denaturovaných vzorcích. Princip metody je podobný konformačně-dependentní imunoeseji prvně popsané Šafářem a kol. [35]. Testovali jsme 20 sCJN, 3 fCJN, 1 GSS a 10 non-CJN mozkových homogenátů a zjistili jsme, že fragment PrP226* se hromadí v mozcích postižených TSE, v nejvyšší míře pak v případě GSS. Množství PrP226* bylo obecně úměrné množství PrP^{TSE} a PrPres přítomných v prionových agregátech.

2. Hypotézy a cíle práce

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 metodika

Expresa a purifikace rhPrP: rhPrP byl připraven v expresních *E. coli* BL21(DE3). Buňky byly stočeny a sonikovány, inkluzní tělíska byla následně rozpuštěna v 50 mM fosfátovém pufru pH 8,0 s 8 M ureou a 5 mM 2-merkapt ethanol. Redukovaný protein byl přečištěn chromatografií na afinitní Ni-NTA matici, oxidován glutathionem a přečištěn na RP-HPLC.

Modifikace rPrP kyselinou glyoxalovou: Přečištěný rhPrP byl modifikován 45 mM kyselinou glyoxalovou s 1 mM kyanoborohydridem sodným přes noc na kývačce při 4°C. Modifikovaný protein byl analyzován na western blotu a použit k imunizaci myší.

Imunizace myší: Šest *Prnp*^{0/0} (*Zürich I*) myší (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 ve dnech 21 a 35. V den 64 byl dvěma myším s nejvyšším titrem protilátek i.v. podán finální booster 5 µg antigenu v PBS a myši byly usmrceny 68. den. Bylo připraveno 960 hybridomových buněk (EXBIO, Praha), které byly primárně screenovány metodou ELISA, vybrané klony pak sekundárně western blotem a dot blotem.

DELFA lidských mozkových homogenátů: Vzorky pro měření V5B2 testem byly připraveny denaturací 10% lidských mozkových homogenátů (MH) s 3 M Gdn-SCN v poměru 1:1 (v/v) a následným zředěním TBS-T na 0,25% MH. Nedenaturované MH byly zředěny TBS-T na 0,25% MH. Vzorky byly detekovány v destičkách (NUNC U96 MaxiSorp) s ukotvenými protilátkami V5B2 nebo EM-20. K detekci byl použit streptavidinem konjugovaným s europiem (Eu-SA, PE), signál uvolněného Eu byl měřen „time-resolved“ fluorescencí při 613 nm po excitaci vzorku při 340 nm, časová prodleva mezi excitací a měřením emisní fluorescence byla 400 µs.

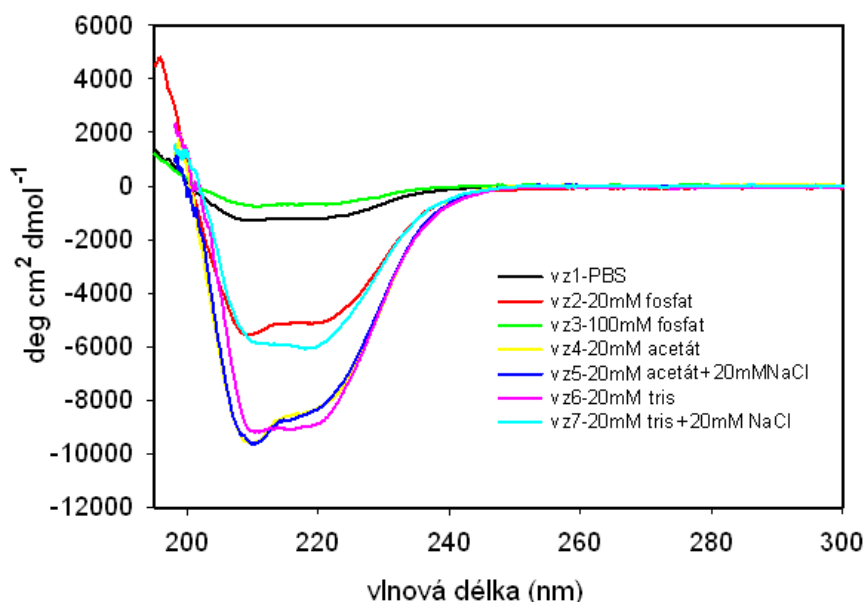
Konformačně-dependntní imunoesej (CDI): Vzorky byly připraveny dle Safar a kol. [35] a CDI byla provedena v sendvičovém uspořádání dle McCutcheon a kol. [36] s využitím Eu-SA (PE). DELFIA (viz výše) byla provedena s použitím monoklonální protilátky FH11 jako kotvící protilátky a biotinylované 3F4 jako sekundární protilátky.

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. Vzorky štěpeného prionového proteinu byly analyzovány western blotem, membrány a densitometricky vyhodnoceny.

4. Výsledky

Příprava rekombinantního prionového proteinu

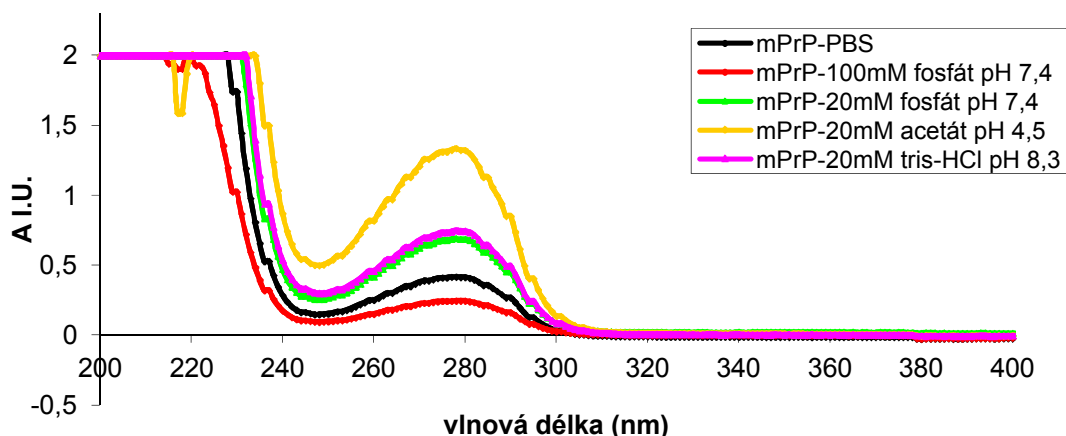
K přípravě rekombinantního myšního PrP (rmPrP) byl použit plazmid pET-15b (Novagen), který umožňuje expresi požadovaného proteinu v hostitelských *E. coli* obsahujících chromozomální kopii genu pro T7 RNA polymerázu (kmen *E. coli* BL21(DE3)), který je kontrolován bakteriálním laktózovým promotorem. Jako předloha byla použita cDNA pro myší prionový protein 23-230 varianta A (*mPrnpa*), tj. varianta genu pro mPrP s krátkou inkubační dobou. K přípravě rekombinantního lidského prionového proteinu byly použity plasmidy pRSET A s geneticky upraveným klonovacím místem pro odštěpení N-koncové His kotvy thrombinem [37], 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 [38]. Bakteriálně exprimované rPrP byly v redukovaném stavu přečištěny afinitní chromatografií na Ni-NTA pryskyřici, následně oxidovány glutathionem a sbaleny do nativní konformace. Jak je patrné z Obr. 1, ideálním pufrům pro renaturaci je 20 mM Tris-HCl pH 8,3, rPrP vykazují maximální α -helix (výskyt dvojitého minima elipticity při cca. 210 a 220 nm a nejsilnější intenzita spektra: $-9000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$, —).



Obr. 1: 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

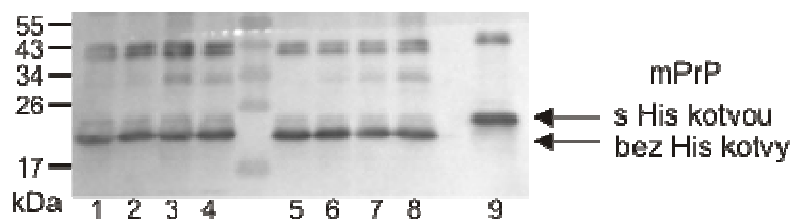
7,4; — 20 mM acetát, pH 4,5; — 20 mM acetát, 20 mM NaCl, pH 4,5; — 20 mM Tris-HCl, pH 8,3; — 20 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 8,3.

Čistota proteinu a jeho stabilita byla kontrolována pomocí spektrofotometrie proměřením UV spekter. Z Obr. 2 je patrné, že vzorky jsou stabilnější v pufrch s nízkou koncentrací solí (20 mM), než ve vzorcích s vyšší koncentrací solí (100 mM a vyšší).



Obr. 2: Absorbance mPrP v pufrch o různém pH. Vzorky mPrP (1 mg/ml) byly po rozpuštění v pufrch ponechány 4 týdny při 4°C. Případné agregáty byly z roztoku odstaněny centrifugací. Absorbční spektra byla proměřena v oblasti 200 – 400 nm.

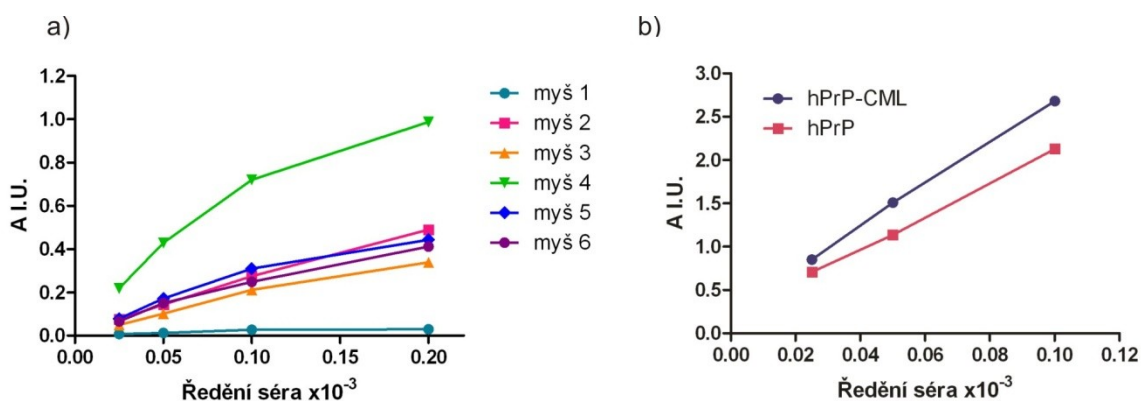
Oba rekombinantní PrP byly připraveny jako fúzní proteiny obsahující N-koncový His-tag se štěpným místem pro thrombin. Množství thrombinu i doba štěpení byly optimalizovány (Obr. 3). Štěpení probíhalo při pH 8,3, což je pH optimální k dosažení nejvyšší aktivity thrombinu i pro dosažení vysoké rozpustnosti mPrP ve vodném prostředí. 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. 3). Naopak dochází k přibývání nespecificky naštěpených fragmentů mPrP (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 mPrP po dobu 1 – 2 hod. při 37°C.



Obr. 3: Štěpení His-rmPrP o koncentraci 0,1 mg/ml probíhalo v 50 mM acetátu amonném pH 8,3 různým množstvím 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.) Na pozici 9 je neštěpený rmPrP s His kotvou. Western blot byl obarven protilátkou 6H4 (0,125 µg/ml).

Příprava a využití protilátek proti glykovanému prionovému proteinu

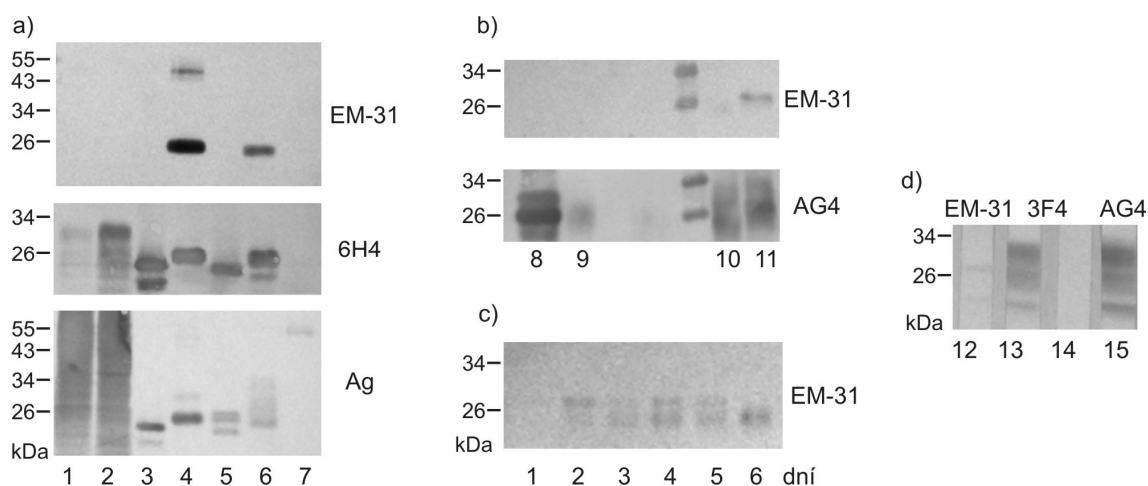
Pro přípravu protilátek proti glykovanému prionovému proteinu byl jako antigen vybrán rekombinantní lidský PrP modifikovaný na postranních řetězcích lysinu na karboxymethyl-lysín (CML). CML představuje koncový produkt glykace proteinů a je nejčastěji zastoupeným antigenem AGE *in vivo* [39]. K imunizaci byly použity geneticky modifikované myši bez genu pro prionový protein (*Prnp*^{0/0}), imunizace byla provedena rhPrP-CML. Jedna ze šesti imunizovaných myší měla vysokou, čtyři střední a jedna nízkou odpověď na imunizaci (Obr. 4a). 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. 4b).



Obr. 4: Šest *Prnp*^{0/0} myší 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. V mikrotitrační destičce byl ukotven rhPrP-CML, 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, za další 4 dny byly v séru stanoveny titry protilátek proti hPrP. V mikrotitrační destičce byly ukotveny rhPrP a rhPrP-CML, myší sérum bylo přidáváno v rostoucí koncentraci.

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.

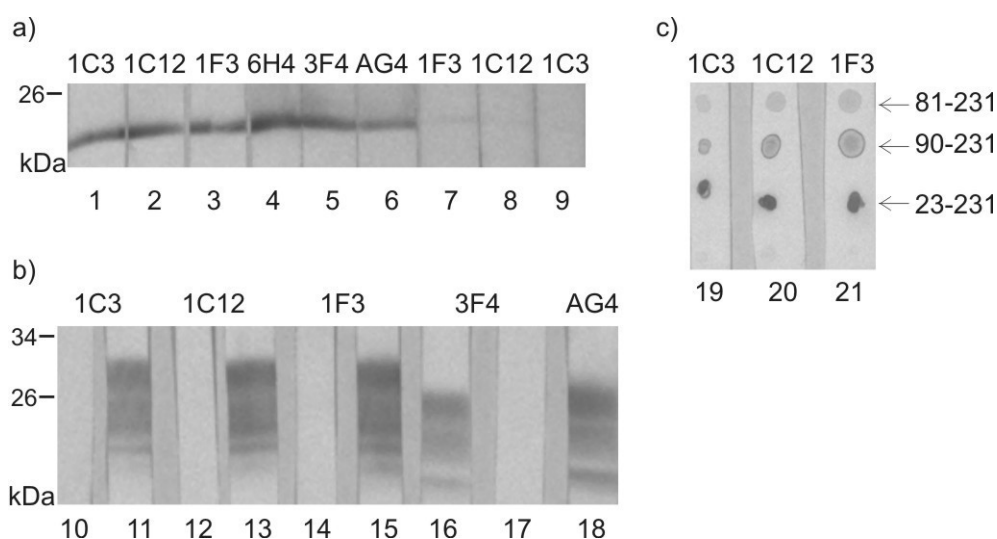
Nejprve jsme se zaměřili na charakterizaci MAb EM-31 produkovanou klonem 7A8 s nejvyšší reaktivitou proti rhPrP-CML. MAb EM-31 vykazovala silnou vazbu na rhPrP-CML, zatímco její vazba na nemodifikovaný rhPrP byla zanedbatelná (Obr. 5a). EM-31 se nevázála na BSA-CML na WB (Obr. 5a) ani na ELISA. Protilátka smíšeně reagovala i s rmPrP-CML (Obr. 5a) a s rmPrP-AGE připraveným glykací proteinu D-ribózou (Obr. 5b, c). 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. 5b). Na western blotu nevykazovala EM-31 reaktivitu k proteinům normálního lidského nebo myšího MH (Obr. 5a) a pouze slabou afinitu k PrP v glykovaném lidském MH (Obr. 5d).



Obr. 5: **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 redukci 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).

Vzhledem k tomu, že EM-31 má pouze slabou afinitu k PrP v glykovaném lidském MH (Obr.

5d), 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. 6a), ale i glykosylovaný PrP^C-CML na western blotech *in vitro* modifikovaných lidských MH (Obr. 6b) a myších MH. Jejich vazba navíc není citlivá k redukci proteinů dithiothreitem (data neuvedena). Specificita MAb ke glykovanému rhPrP byla potvrzena i metodou ELISA.



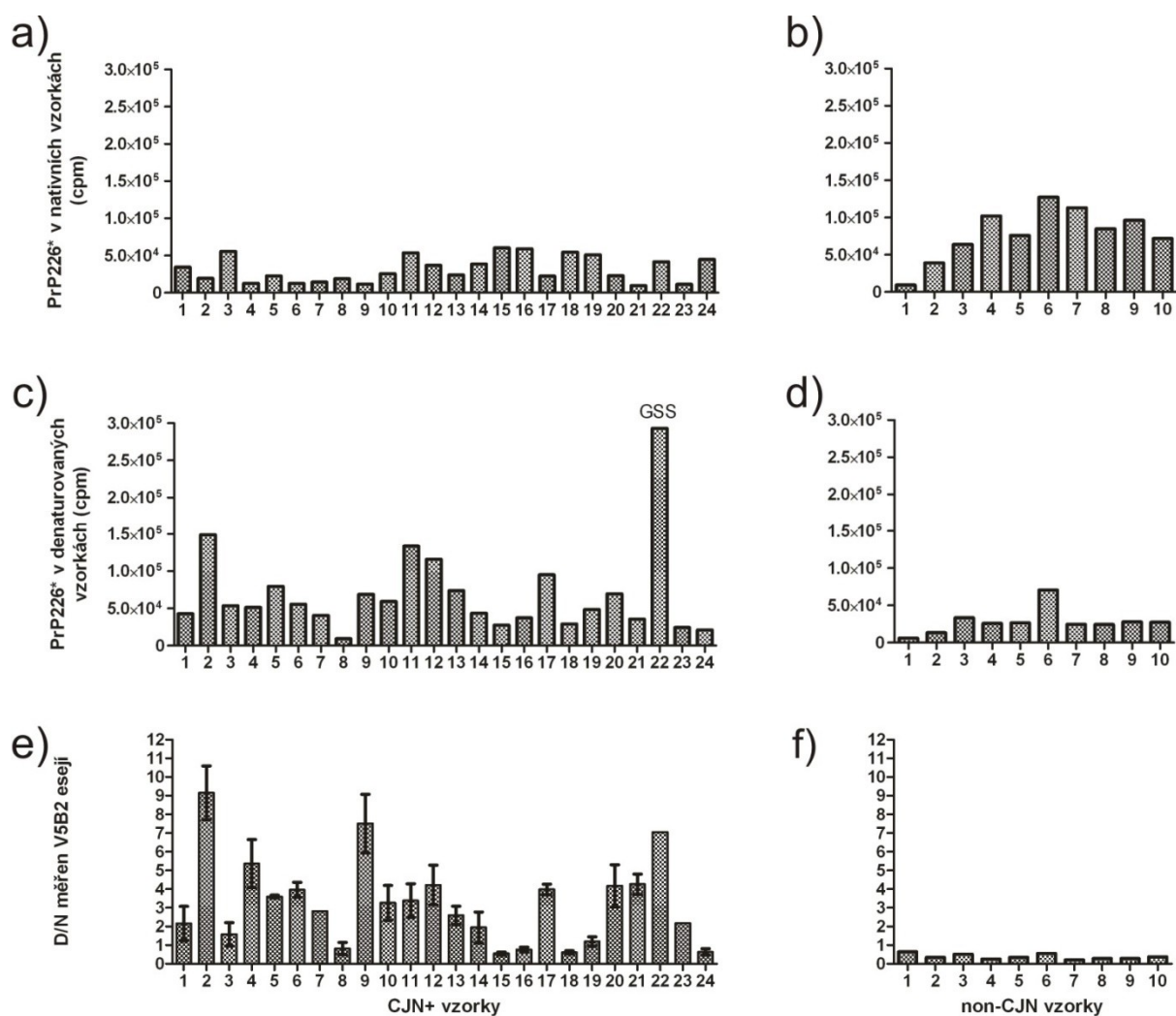
Obr. 6: **a)** Western blot rhPrP byl nastříhán na proužky a proužky 1-3 byly glykované kyselinou glyoxalovou, zatímco proužky 4-9 zůstaly nemodifikovány. Supernatanty 1C3, 1C12 a 1F3 vykazují silnou reaktivitu k PrP na glykovaných membránách (1 – 3), ale jen velmi slabou nebo žádnou reaktivitu k nemodifikovanému 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.

Detekce fragmentu prionového proteinu PrP226* v lidském mozku

Přítomnost prionového proteinu bez GPI kotvy, tj. PrP(Δ GPI), v mozkových homogenátech jedinců s TSE byla v minulosti opakovaně prokázána [21, 26-28]. V této studii jsme k detekci PrP(Δ GPI) použili protilátku V5B2 namířenou proti fragmentu PrP226*, který je zakončen Tyr₂₂₆ a neobsahuje tedy GPI kotvu. Změřili jsme signál celkového PrP226* v nativním i denaturovaném stavu u 10 non-CJN, 23 CJN a 1 GSS mozkových homogenátů pomocí “Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay” (DELFI).

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. 7e) vykazovalo vyšší signál pro PrP226* než non-CJN vzorek č. 6 (70 684 cpm, Obr. 7f). Tyto výsledky však neudávají informaci o stavu GPI-PrP v jednotlivých vzorcích. 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. 7f) 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 denuraci (Obr. 7a, c, resp.), zatímco druhá skupina s poměrem $D/N \geq 2,0$ (zbývající CJN/GSS vzorky) obsahovala významné množství PrP226* dostupného pouze po denuraci (Obr. 7a, 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 denurací, opakovali jsme měření po dodatečné homogenizaci vzorků inzulinovou jehlou i po denuraci vzorků 1,5 M Gdn-SCN po dobu 10 min. při 90°C. Žádné změny v distribuci hodnot D/N jsme nepozorovali.

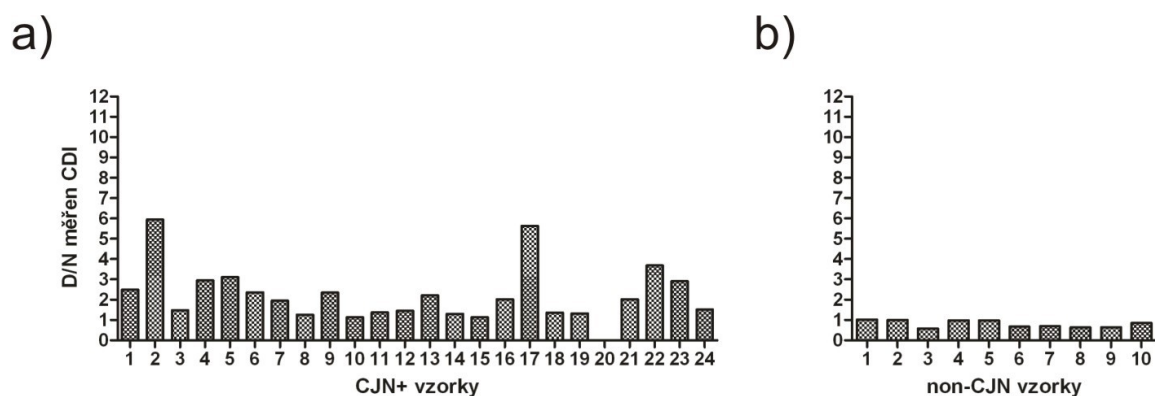
Zároveň jsme změřili signály celkového PrP v CJN/GSS i non-CJN vzorků metodou DELFIA za použití protilátek EM-20 a biotinylované EF2. Množství PrP226* v denaturovaných vzorcích nekoreluje s množstvím celkového PrP, hladina PrP226* tedy není pouze úměrná celkovému PrP, ale je individuální v každém vzorku.



Obr. 7: 23 CJD a 1 GSS mozkových homogenátů (a, c, e) a 10 non-CJD 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 z 2 nezávislých pokusů.

Následně jsme porovnali výsledky V5B2 eseje s konformačně-dependentní imunoesejí (Conformation-Dependent Immunoassay, CDI), prvně popsanou Šafářem a kol. [35]. 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 mozkových homogenátů 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. Byly proměřeny denaturované i nedenaturované CJD/GSS a non-CJD vzorky v CDI uspořádání a vypočteny jejich D/N

hodnoty (Obr. 8a, 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.

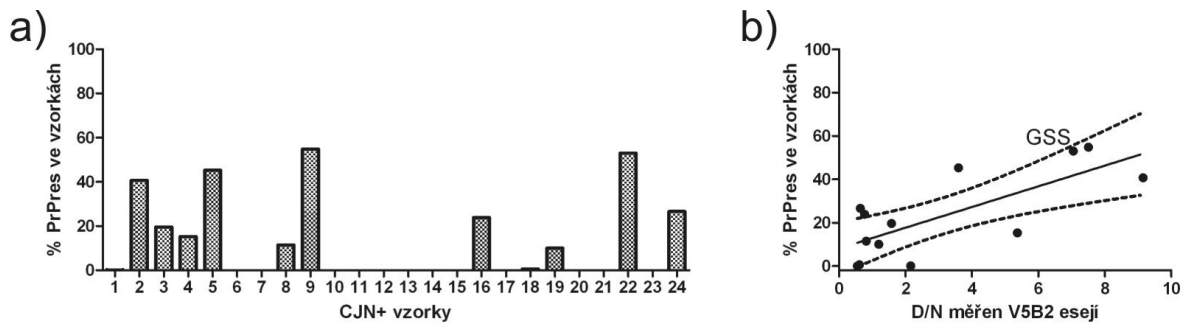


Obr 8: 23 z 24 CJN/GSS a 10 non-CJN vzorků mozkových homogenátů (pozn.: vzorek č. 20 nebyl k dispozici) bylo analyzováno metodou CDI. Vzorky byly denaturovány 8 M Gdn-HCl (5 min., 80°C) a analyzovány metodou DELFIA v FH11/3F4-bio uspořádání. Hodnoty D/N CJN/GSS vzorků jsou znázorněny v (a) a non-CJN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

Statistická korelace mezi D/N hodnotami CJD/GSS vzorků měřenými V5B2 esejí a D/N hodnotami měřenými CDI byla vyhodnocena jako vysoce signifikantní v 95% intervalu spolehlivosti. Výsledky analýzy naznačují, že množství fragmentu PrP226* obsažené v prionových depozitech je proporcionalní množství celkového PrP v depozitech.

Pro lepší pochopení rozdílů hodnot D/N naměřených pomocí V5B2 esejí 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. 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. 9a). Statistická korelace mezi hodnotami D/N měřenými V5B2 esejí a PK rezistencí (Obr. 9b) byla vyhodnocena jako signifikantní v 95% intervalu spolehlivosti. 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.

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 žádnou s uvedených hodnot.



Obr. 9: 12 z 24 CJN/GSS mozkových homogenátů bylo štěpeno proteinázou K o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ 30 min. při 37°C, okamžitě nanášeno na SDS-PAGE 12% gel a přeblokováno. Membrány byly vyvolány protilátkou 3F4 (0,25 $\mu\text{g/ml}$). Western bloty byly denzitometricky vyhodnoceny a PK rezistence vyjádřena jako procento množství rezistentního PrP vztáženého k množství neštěpeného PrP (a). Korelační diagram mezi hodnotami poměru D/N měřenými V5B2 esejí a PK rezistencí je znázorněn v (b).

5. Diskuze

Diskuze k přípravě rekombinantního prionového proteinu:

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 pufrech [40]. Proto jsme zvolili koncentraci rmPrP v roztoku 0,1 mg/ml, což je v souladu s postupem jiných laboratoří [40, 41].

Samotné sbalení rPrP do nativní konformace lze ovlivnit několika faktory, nejčastěji pH vodného pufru a přítomností chaotropních činidel, popř. koncentrací solí nebo teplotou [40, 42-44]. My jsme pro renaturaci rmPrP použili v souladu s jinými laboratořemi pufr o pH 8,0 [40, 44] a vyhnuli jsme se současné oxidaci s renaturací, která byla problematická. Lepších výsledků jsme dosáhli při oxidaci v denaturujících podmínkách a teprve poté následné dialýze do vodného pufru o pH 8,0.

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, které jsme imunizovali karboxymethylovaným rekombinantním hPrP (rhPrP-CML).

Screeningem vybrané monoklonální protilátky, tj. purifikovaná EM-31 i supernatanty klonů 1C3, 1C12 a 1F3, byly opakovaně testovány na 12 mozkových homogenátech pacientů s CJN. Ani jedna z protilátek nebyla schopna zachytit hPrP-CML na žádném ze vzorků homogenátů (MH), 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 zřejmě 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 vyskutekuje/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} [19]. 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. 5d), oproti vysoké afinitě k rhPrP-CML (Obr. 5a). Slabá reakce nevznikla v důsledku nedostatečné modifikace PrP v MH, neboť protilátka 3F4 ztratila reaktivitu [16], zatímco ke glykaci necitlivá kontrolní protilátka AG4 stále s PrP reagovala (Obr. 5 a 6). 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.

Diskuse k detekci fragmentu prionového proteinu PrP226* v lidském mozku:

Přestože význam GPI kotvy při replikaci PrP^{TSE} a propagaci prionových onemocnění zůstává nejasný [29-31], prionový protein bez GPI kotvy, tj. PrP(ΔGPI), působí ve smyslu urychlení propagace a tvorby prionových depozit [32-34].

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. 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 vzorcích mozků a vyšší než 1,0 v 80% případů CJN/GSS patientských vzorků mozků (Obr. 7). Navíc jsme prokázali, že PrP226* je relativně stabilní; *post-mortem* nebo post-homogenizační procesy degradace PrP uvolněnými mozkovými proteázami ovlivňují hladinu PrP226* jen minimálně. 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.

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. 9a) 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 $\mu\text{g/ml}$ (vz. č. 1: Obr. 9a, v porovnání s Obr. 7e, $D/N = 2,16$). 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. 8).

6. Závěry

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 mozковém 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. Použitá literatura

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. Matěj, R., R. Rusina, and F. Koukolik, *5 let činnosti Národní referenční laboratoře lidských prionových onemocnění při Oddělení patologie a molekulární medicíny FTNsP: naše zkušenosti a přehled literatury.* Cesk Slov Neurol N, 2007. **70/103**(6): p. 637–642.
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. 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.
9. Aguzzi, A., F. Baumann, and J. Bremer, *The prion's elusive reason for being.* Annu Rev Neurosci, 2008. **31**: p. 439-77.
10. 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.
11. Caughey, B., et al., *Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells.* J Virol, 1989. **63**(1): p. 175-81.
12. 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.
13. Safar, J., et al., *Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein.* J Biol Chem, 1993. **268**(27): p. 20276-84.
14. Brownlee, M., H. Vlassara, and A. Cerami, *Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications.* Ann Intern Med, 1984. **101**(4): p. 527-37.
15. 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.
16. Panigaj, M., et al., *Underestimation of the expression of cellular prion protein on human red blood cells.* Transfusion, 2011. **51**(5): p. 1012-21.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. 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.
21. 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.
22. Piccardo, P., et al., *Phenotypic variability of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity*. J Neuropathol Exp Neurol, 1998. **57**(10): p. 979-88.
23. Zou, W.Q., et al., *Identification of novel proteinase K-resistant C-terminal fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40429-36.
24. Zanusso, G., et al., *Identification of distinct N-terminal truncated forms of prion protein in different Creutzfeldt-Jakob disease subtypes*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38936-42.
25. Pan, T., et al., *Biochemical fingerprints of prion diseases: scrapie prion protein in human prion diseases that share prion genotype and type*. J Neurochem, 2005. **92**(1): p. 132-42.
26. 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.
27. 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.
28. Parkin, E.T., et al., *Dual mechanisms for shedding of the cellular prion protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11170-8.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Chesebro, B., et al., *Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie*. Science, 2005. **308**(5727): p. 1435-9.
33. 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.
34. 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.
35. Safar, J., et al., *Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations*. Nat Med, 1998. **4**(10): p. 1157-65.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
 42. Swietnicki, W., et al., *Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231.* Biochemistry, 2000. **39**(2): p. 424-31.
 43. Baskakov, I.V., et al., *The peculiar nature of unfolding of the human prion protein.* Protein Sci, 2004. **13**(3): p. 586-95.
 44. Jackson, G.S., et al., *Multiple folding pathways for heterologously expressed human prion protein.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1431**(1): p. 1-13.

8. Seznam publikací

Publikace, které jsou podkladem disertace:

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. *IF*: 3,91

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. *IF*: 3,52

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. *IF*: 1,73

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. *IF*: 2,56

E. Dvořáková, K. Holada. *Konformačně specifické protilátky a diagnostika prionových chorob*. Cesk Slov Neurol N, 2012. **75/108**(3): p. 283-290. *IF*: 0,37