

## Abstrakt

Priony (PrP) jsou hlavní příčinou neurodegenerativních onemocnění jako je ovčí klusavka, bovinní spongiformní encefalopatie, chronické strádání jelenovité zvěře a lidská Creutzfeldt-Jacobova choroba. Přestože se buněčný PrP (PrP<sup>C</sup>) účastní mnoha buněčných procesů, jeho přesná funkce není dosud známá. Onemocnění vzniká akumulací patologické formy PrP (PrP<sup>TSE</sup>), která vzniká přímým kontaktem PrP<sup>TSE</sup> a PrP<sup>C</sup>. PrP je ukotvený v membráně pomocní GPI a může být přenášen mezi buňkami kontaktem, tzv. „tunnelling nanotubes“ nebo extracelulárními vezikuly (EV). Frakce EV se dělí na exosomy, mikrovezikuly a apoptotická tělíška rozdílnou biogenezí. PrP<sup>TSE</sup> se nachází v exosomech a mikrovezikulech, ale tyto frakce EV nikdy nebyly mezi sebou porovnány. Prvním cílem dizertační práce je porovnat obsah PrP, prion konvertující aktivitu a infektivitu v těchto frakcích EV na CAD5 a N2a-PK1 buněčných modelech infekce. Centrifugací jsme izolovali frakci velkých EV (20 000× g) a malých EV (110 000× g) z kondiciovaného média. EV jsme charakterizovali pomocí kryo-elektronové mikroskopie a western blotem s markery Alix, TSG-101, CD63, CD9 a HSP70. Kontaminace z jiných buněčných kompartmentů byla ověřena kalnexinem. Frakce EV se mezi sebou lišily obsahem β-1 integrinu. Malé EV mají sníženou a velké EV mají zvýšenou hladinu β-1 integrinu. Frakce malých EV obsahuje vezikuly o průměrné velikosti 79 nm a velikost velkých EV začíná na 100 nm. Infekčnost frakcí EV byla studována dvěma přístupy – standardizací na původní objem kondiciovaného média (OVS) a standardizací na celkové množství proteinu (TPS). Účinnost infekce jsme sledovali pomocí buněčného blotu, western blotu a standardního scrapie testu buněk. Z výsledků vyplývá, že infekce velkými EV vede k 4× vyšším prionovým signálům než infekce malými EV u OVS a více než 20× u infekce TPS, která je v souladu s 20× vyšší prion konvertující aktivitou ve velkých EV. Výsledky jsme ověřili na buněčném N2a-PK1-RML modelu infekce. Naše data ukazují, že velké EV hrají v přenosu PrP<sup>TSE</sup> důležitější roli než rozsáhle studované malé EV a obsahují více prion konvertující aktivity.

EV se v současnosti testují pro využití v diagnostice různých onemocnění, včetně prionových. Druhá část dizertační práce se zaměřuje na optimalizaci detekce EV z krve pomocí průtokové cytometrie a jejich diagnostický potenciál, který jsme hodnotili u pacientů s roztroušenou sklerózou (RS) a u předčasně narozených dětí. EV jsme izolovali ze žilní krve pacientů s RS a značili pomocí protilátek proti endotelu, krevním destičkám, leukocytům a červeným krvinkám. U předčasně narozených dětí jsme EV izolovali z pupečnickové krve a značili je protilátkami proti endotelu a krevním destičkám. Standardní průtoková cytometrie s neprokázala rozdíly mezi pacienty s RS a zdravými dárci krve a ani mezi předčasně narozenými a donošenými dětmi. Vylepšením cytometru o boční rozptyl světla na fialovém laseru jsme zlepšili citlivost cytometru. Po tomto vylepšení jsme znovu analyzovali vzorky pupečnickové krve. Analýzu standardním bočním rozptylem pro modrý laser jsme srovnali s analýzou na fialový boční rozptyl a došli jsme k významně korelujícím výsledkům. Spolehlivá analýza EV z krve vyžaduje důkladnou optimalizaci izolačního protokolu, značení a detekce. Přesto se nejeví zlepšení citlivosti cytometru zvláště kritické ve studiích porovnávající různé skupiny.

**Klíčová slova:** Prion, Extracelulární vezikuly, Exosomy, Mikrovezikuly, PrP, Buněčná kultura, Průtoková cytometrie, Krevní plazma