

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