PRIONY: PATOGENEZE, INAKTIVACE, DIAGNOSTIKA

Doc. Ing. Karel Holada, Ph.D., Ústav lékařské mikrobiologie 1. LF UK a VFN Praha

Výzkum v prionové laboratoři je zaměřen především na studium patogeneze prionových infekcí a vývoj nových inaktivačních a diagnostických technik pro infekční prionové částice. Neobvyklá stavba a mechanismus replikace odlišují priony od ostatních infekčních agens. Odolnost prionů vůči řadě standardních sterilizačních a dezinfekčních postupů ztěžuje prevenci jejich přenosu. Imunitní systém nerozeznává priony jako cizí, netvoří se protilátky. To spolu s absencí specifického genomu komplikuje jejich diagnostiku. Patogeneze prionových infekcí byla tradičně studována na zvířecích modelech. Tyto experimenty jsou však extrémně časově náročné, drahé a eticky sporné.

V naší laboratoři jsme se pokusili zvýšit relevanci současných modelů prionové infekce v proliferujících buněčných kulturách vytvořením modelu v nedělících se diferencovaných buňkách. Popsali jsme změny exprese, postranslačních úprav a lokalizace buněčného prionového proteinu v průběhu diferenciace neuronální linie CAD5[1]. Zjistili jsme, že v buněčné kultuře přenáší velké extracelulární vezikuly prionovou infekci efektivněji než široce studované exosomy. Vytvořili jsme nový model prionové infekce v 3D diferencované kultuře CAD5 sferoidů (Obr. 1), který jsme opublikovali v minulém roce. Model by měl sloužit pro studium průběhu infekce v nedělících se diferencovaných buňkách a pro testování účinnosti vyvíjených anti-prionových farmak.

V oblasti dekontaminačních technik jsme již dříve popsali a patentovali originální metodu fotodynamické inaktivace prionů pomocí derivátů ftalocyaninu. V navazující studii[2] jsme prokázali účinnost fotodynamické inaktivace řadou experimentů využívajících nejen infikované buněčné kultury, ale i myší model prionové infekce. Podařilo se nám zjistit, že mechanisticky nejdůležitější molekulou při inaktivaci prionů je ftalocyaniny generovaný singletový kyslík. Inaktivace je rychlá, probíhá za pokojové teploty, využívá levné chemikálie a neprodukuje toxický odpad (Obr. 2). Předpokládáme, že by mohla najít uplatnění jako standardní součást sterilizačních postupů neurochirurgických nástrojů pro snížení nebezpečí přenosu proteinových infekčních částic v rámci operačních výkonů.

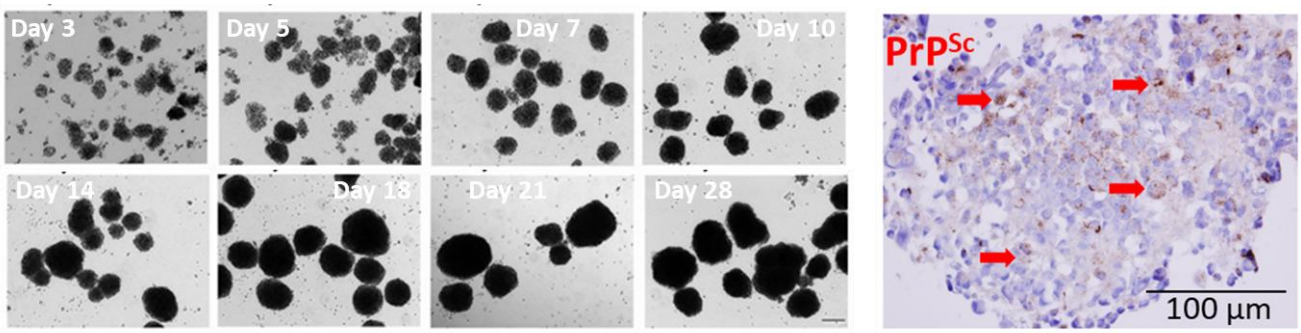
V předchozí studii jsme popsali úspěšné zavedení ultrasenzitivní metody detekce prionů „Real Time Quacking Induced Conversion (RT-QuIC) assay“ do naší laboratoře. V současné studii[3] demonstrujeme schopnost metody RT-QuIC citlivě a specificky detekovat priony nejen v mozkomíšním moku, ale i v homogenizovaném vzorku kůže (Obr. 3). Hladiny prion konvertující aktivity v kůži zemřelých pacientů jsou o jeden až dva řády vyšší než v korespondujícím mozkomíšním moku. Malá průbojníková biopsie kůže by tak mohla představovat méně invazivní cestu pro získání validních vzorků pro RT-QuIC vyšetření. S analýzou vzorků kůže počítáme i v připravovaném protokolu na testování těl darovaných pro anatomické pitvy. Zároveň ve spolupráci s klinickými pracovišti ověřujeme spolehlivost prionového RT-QuIC na vzorcích mozkomíšního moku žijících pacientů. Ukazuje se, že metoda je schopna potvrdit diagnózu prionového onemocnění ještě za života pacienta. Naším cílem je prosadit RT-QuIC mezi pojišťovnou hrazená vyšetření. Navíc chceme v souladu s publikovanými poznatky využít jejího principu k vývoji a zavedení RT-QuIC testů pro další, mnohem početnější „prion-like“ neurodegenerativní onemocnění, jako je Alzheimerova a Parkinsonova nemoc.

Reference

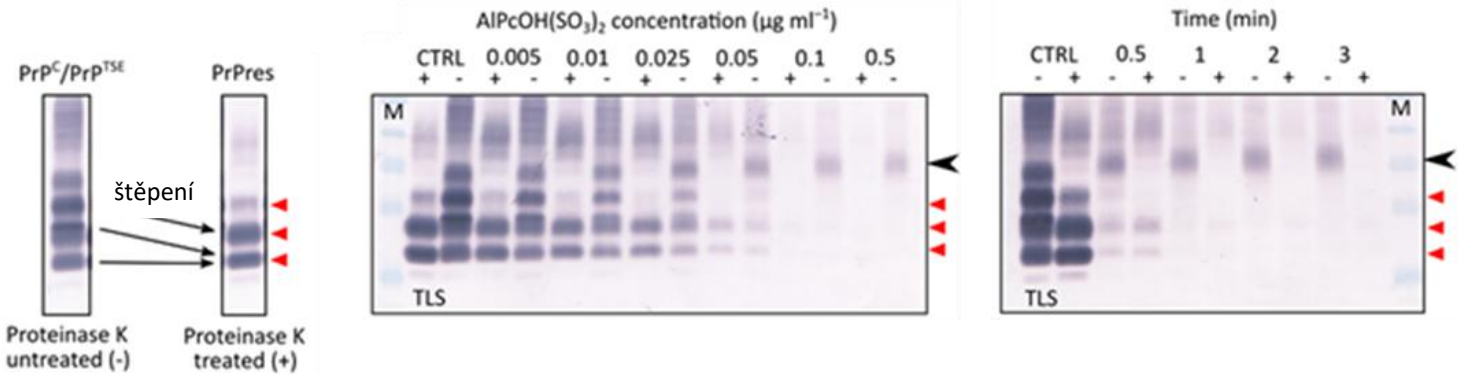
1) Fremuntova Z, Mosko T, Soukup J, Kucerova J, Kostelanska M, Hanusova ZB, Filipova M, Cervenakova L, **Holada K**. Changes in cellular prion protein expression, processing and localisation during differentiation of the neuronal cell line CAD 5. Biol Cell. 2020 Jan;112(1):1-21.

2) Kostelanska M, Freisleben J, Backovska Hanusova Z, Mosko T, Vik R, Moravcova D, Hamacek A, Mosinger J, **Holada K**. Optimization of the photodynamic inactivation of prions by a phthalocyanine photosensitizer: The crucial involvement of singlet oxygen. J Biophotonics. 2019:e201800340.

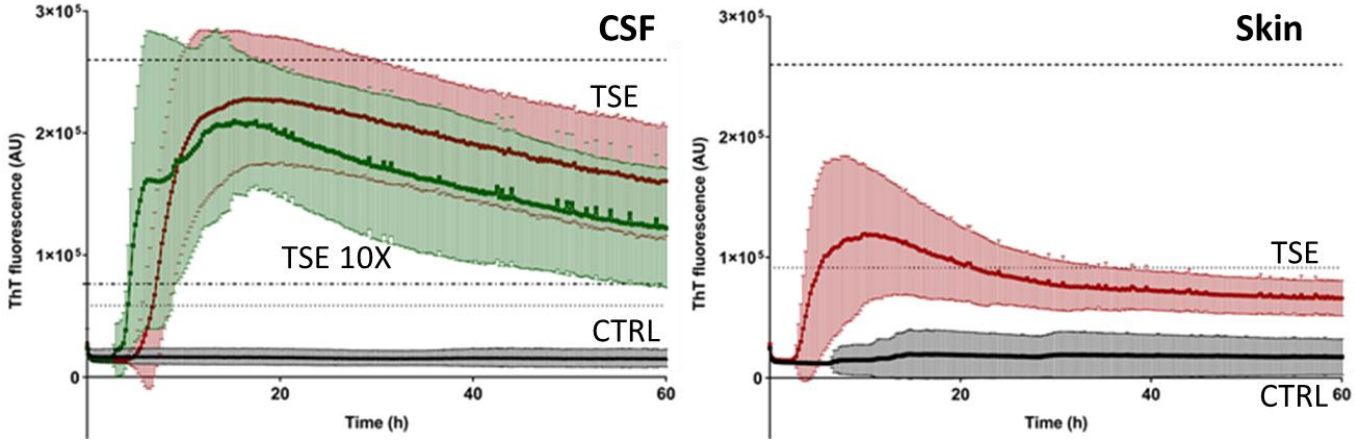
3) Baranová S, Moško T, Brůžová M, Haldiman T, Kim C, Safar JG, Matěj R, **Holada K**. Detection of prions in matching post-mortem skin and cerebrospinal fluid samples using second-generation real-time quaking-induced conversion assay. Sci Rep. 2024;14(1):6294.



Obrázek 1) **Nový model prionové infekce v 3D sferoidech diferencovaných buněk imortalizované neuronální linie CAD5.** Buňky jsou kultivovány na kývačce a postupnou výměnou média s odebráním séra dochází současně k růstu sferoidů a diferenciaci buněk. Sferoidy dosahují maximální velikosti za 3 týdny (obrázky vlevo) a lze je kultivovat po dobu až 9 týdnů. Obrázek vpravo představuje řez fixovaným a parafínem impregnovaným sferoidem obarveným protilátkou 6H4 proti prionovému proteinu (hnědá barva) a přebarvený hematoxylinem s eosinem. Červené šipky ukazují na depozita patologického prionového proteinu PrP^{Sc}.



Obrázek 2) **Demonstrace účinnosti fotodynamické inaktivace prionů pomocí disulfovaného ftalocyaninu hydroxyhlinitého ($AlPcOH(SO_3)_2$).** Homogenát mozku myši infikované RML kmenem prionů obsahuje jak normální (PrP^C), tak patologický prionový protein (PrP^{TSE}), který lze detekovat jako k proteolytickému štěpení rezistentní fragmenty PrPres (červené hroty) pomocí protilátky na Western blotu (obrázek vlevo). Uprostřed je demonstrována koncentrační závislost vymizení signálu PrPres při expozici vzorku světelnému zdroji 5 min. v přítomnosti $AlPcOH(SO_3)_2$. Vpravo je časová závislost vymizení signálu PrPres na délce osvitu vzorku při koncentraci $AlPcOH(SO_3)_2$ 0,1 µg ml^{-1}. Vymizení signálu je spojeno se signifikantním poklesem infektivity pro buněčné kultury a laboratorní myši.



Obrázek 3) **Analýza přítomnosti prion konvertující aktivity v post-mortem párových vzorcích mozkomíšního moku (CSF) a kůže pomocí metody RT-QuIC**. Vzorky pacientů s definitivní diagnózou prionového onemocnění (TSE, n=30, červená) a kontrol (CTRL, n=30, šedá). TSE 10X – desetkrát naředěné TSE vzorky (zelená). Zobrazen je aritmetický průměr fluorescence a standardní odchylka. Oba typy vzorků poskytují dobrou separaci signálu.