

Matching grant 09I01-03-V04-00039 Monitorovacia správa – priebežná

Popis činností uskutočnených v rámci projektu počas monitorovacieho obdobia

V prvej etape sme sa zamerali na zavedenie metódy izolácie neuronálnych extracelulárnych vezikúl (NEV) z biologických tekutín. Pôvodne plánovaný prístup mal pozostávať z izolácie celkových vezikúl pomocou precipitácie a centrifugácie, a následnej selekcie neuronálnych vezikúl pomocou špecifickej protilátky proti povrchovým proteínom L1CAM (L1 cell adhesion molecule) alebo NCAM (neural cell adhesion molecule). Vzhľadom na najnovšie poznatky, a detegovanie L1CAM, ako aj NCAM vo forme voľných proteínov v plazme aj CSF¹ však v komunite existujú pochybnosti o vhodnosti týchto proteínov ako biomarkerov na izoláciu NEV takýmto spôsobom. Aj vzhľadom na nedávnu publikáciu Gilboa et al., 2024, sme sa rozhodli okrem vyššie uvedeného prístupu preto zaradiť aj alternatívny prístup na izoláciu NEV a to konkrétne chromatograficky pomocou gélovej filtrácie, pri ktorej dochádza k izolácii vezikúl na základe ich veľkosti². Veľkosť extracelulárnych vezikúl je približne 50-100 nm^{3,4} a práve na základe tejto ich vlastnosti bol opísaný prístup, pri ktorom je možné izolovať extracelulárne vezikuly z krvnej plazmy. Testovali sme dva typy kolón, qEV20 a qEV35 (Izon Sciences). Výrobca uvádza, že by malo byť možné izolovať častice o veľkosti 20-100 nm v prípade qEV20 a 35-400 nm v prípade qEV35. V pilotných experimentoch sme použili oba izolačné prístupy, teda precipitáciu a selekciu pomocou protilátok, aj gélovú filtráciu, a metódy sme porovnávali. Nakoľko ešte prebieha výber pacientov a ich diagnostika Parkinsonovej choroby na zber vzoriek, využili sme zatiaľ len kontrolné vzorky krvnej plazmy dostupné v našom laboratóriu. Pomocou gélovej filtrácie sme boli schopní izolovať častice, rozdelené v rôznych frakciách na základe ich veľkostí. Vzorky sme analyzovali pomocou metódy DLS (dynamic light scattering) a ich veľkosť sa pohybovala v rozmedzí 17-170 nm (Príloha k monitorovacej správe, **Obr. 1**). Frakcie 9-12 pri kolónkach qEV20 a 8-12 pri qEV35 obsahovali častice, ktoré by mali veľkosťou zodpovedať očakávanej veľkosti extracelulárnych vezikúl, 50-100 nm. Vzorky z gélovej filtrácie, aj vzorky po precipitácii a selekcii pomocou protilátky sme ďalej analyzovali Western blottingom na prítomnosť α -synukleínu a L1CAM. Bohužiaľ, koncentrácia oboch molekúl vo vzorkách bola mimo detekčného limitu a okrem vzorky pozitívnej kontroly (rekombinantného α -synukleínu) sme ich prítomnosť nedetegovali (Príloha k monitorovacej správe, **Obr. 2**). Pracujeme preto tiež na testovaní metódy, ktorá by v sebe kombinovala oba prístupy. Vďaka gélovej filtrácii dochádza k prečisteniu vzorky od sérových proteínov (teda aj plazmatických NCAM a L1CAM) a pri použití selekcie pomocou protilátky až v ďalšom kroku by tento prístup mohol viesť k zakonzentrovaniu NEV a tým získaniu vezikúl s väčším obsahom patologického α -synukleínu.

Súbežne s izoláciou NEV sme sa sústredili na zavedenie metódy RT-QuIC a hoci bola táto metóda na detekciu α -synukleínu opísaná vo viacerých publikáciách, nie je ešte rutinne používanou metódou v praxi a jej použitie sa u jednotlivých pracovísk značne líši. Kľúčovými aspektami tejto metódy sú jednak optimalizácia podmienok, ako je teplota, spôsob trepania, zloženie reakčnej zmesi, ale najmä kvalita substrátu, t.j. monomérneho rekombinantného α -synukleínu. Tieto aspekty vo veľkej miere ovplyvňujú reprodukovateľnosť, senzitivitu a špecificitu metódy. V našej práci sme začali s testovaním najskôr na vzorkách s rekombinantným α -synukleínom, kde ako substrát slúžil His-tagovaný α -synukleín. Rekombinantný α -synukleín sme pripravovali expresiou v bunkách *Escherichia coli* a následnou trojkrokovou kvapalinovou chromatografiou (afinitná, ionomeničová a gélová chromatografia) (Príloha k monitorovacej správe, **Obr. 3**). Čistota proteínu bola overená pomocou SDS-PAGE. Prístroj Octet R2, ktorý bol určený na štrukturálnu charakterizáciu a štandardizáciu rekombinantných proteínov bol dodaný až v decembri 2024 a jeho inštalácia a zaškolenie k nemu prebehlo až vo februári 2025. Tým nastal sklz pri validácii naprodukovaných šarží rekombinantného monomérneho α -synukleínu, na ktorý prístroj potrebujeme. Keďže ako pozitívna kontrola-iniciátor agregácie („seed“) má slúžiť nami predpripravený agregovaný rekombinantný His-tagovaný α -synukleín, po purifikácii sme časť proteínu použili na jeho seedu, a to inkubáciou a miešaním pri teplote 37°C po dobu 1 týždňa. Takýmto spôsobom sa nám podarilo pomocou sedimentačného testu identifikovať až 70% celkového α -synukleínu v sedimentovanej frakcii, čo svedčí o jeho zmene z rozpustnej na agregovanú formu. V ďalšom postupe, keď dosiahne test požadovanú robustnosť, bude ako iniciátor agregácie slúžiť vzorka NEV izolovaných z mozgovomiešneho moku alebo z plazmy pacientov s diagnostikovanou Parkinsonovou chorobou. Následne sme sa zamerali na testovanie variability agregačnej reakcie medzi jednotlivými šaržami rekombinantného α -synukleínu, ako aj porovnaniu

variability a špecificity pri použití rôznych reakčných podmienok (teplota, spôsob trepania, prítomnosť detergentov) (Príloha k monitorovacej správe, **Obr. 4**). Práve substrát, vnáša do testu najvýraznejšiu úroveň variability závisiacu od jednotlivých šarží α -synukleínu. Pristúpili sme preto aj k porovnaní natívneho verzus His-tagovaného α -synukleínu, aby sme vylúčili vplyv His-tagu na túto variabilitu. Natívny proteín bol purifikovaný pomocou postupu zahŕňajúcom kvapalinovú chromatografiu (ionomeničová a gélová chromatografia), ale tiež inkubáciu vzoriek pri teplote 100 °C po dobu 15 minút s následnou centrifugáciou. Nakoľko α -synukleín sa vyznačuje značnou tepelnou odolnosťou, tento krok odstránenie mnohých termosenzitívnejších kontaminantov a bol zaradený pred gélovou filtráciou. Napriek tomu sme nezískali natívny α -synukleín v čistote, akú sme dosiahli pri His-tagovanom α -synukleíne (Príloha k monitorovacej správe, **Obr. 5**). Keďže prímеси ovplyvňujú schopnosť synukleínu agregovať v prítomnosti seedu a tým môžu znižovať citlivosť metódy alebo naopak viesť k falošne pozitívnej reakcii, pokračujeme ešte s optimalizáciou purifikácie natívneho α -synukleínu.

Referencie:

1. Rocha, D. A. S., Santos, L. E., Da Fonseca, P. B. & De Felice, F. G. Prospects and challenges in using neuronal extracellular vesicles in biomarker research. *Alzheimer's Dement.* 6632–6638 (2024) doi:10.1002/alz.13918.
2. Gilboa, T. *et al.* Toward the quantification of α -synuclein aggregates with digital seed amplification assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **121**, (2024).
3. Lai, C. P. K. & Breakefield, X. O. Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. *Front. Physiol.* **3 JUN**, (2012).
4. Zitvogel, L. *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* **4**, (1998).

Míľniky

Míľník 1 Reprodukateľnosť izolácie neuronálnych extracelulárnych vezikúl z krvi

Priebežná monitorovacia správa č. 1

Počas tohto monitorovacieho obdobia prebehli pilotné experimenty zamerané na optimalizáciu izolácie neuronálnych extracelulárnych vezikúl (NEV) z kontrolných plazmatických vzoriek. Otestované boli dve metodiky: tradičná precipitácia a selekcia pomocou protilátky L1CAM/NCAM, ako aj alternatívna gélová chromatografia (qEV20 a qEV35). Výsledky ukázali izoláciu vezikúl vo veľkostnom rozsahu 50–170 nm, čo bolo potvrdené DLS. Vzhľadom na nové poznatky o výskyte voľných foriem L1CAM/NCAM proteínov v plazme, vyvíjame tiež metódu kombinujúcu oba prístupy – najskôr chromatografickú separáciu nasledovanú selekciou protilátkami. Validácia metódy na 50 pacientoch zatiaľ nebola ukončená z dôvodu optimalizácie metódy a neukončeného výberu vhodných vzoriek na testovanie.

Dokument: Príloha k monitorovacej správe.

Míľník 2 Validácia α -syn RT-QuIC test z krvných extracelulárnych vezikúl

Priebežná monitorovacia správa č. 1

Zaviedli sme metodiku RT-QuIC na detekciu agregovaného α -synukleínu. Testovanie bolo zahájené na rekombinantných proteínoch, ktoré sme pripravili expresiou v *E. coli* a purifikovali chromatograficky. Prebieha validácia variability substrátu (His-tagovaný vs. natívny α -synukleín) a optimalizácia reakčných podmienok (teplota, rýchlosť a čas miešania, prítomnosť a koncentrácia detergentov). Overenie bolo realizované na vzorkách pozitívnej kontroly vytvorenej s použitím rekombinantných foriem α -synukleínu. V tomto stave testu, keď je jeho variabilita ešte vysoká by bolo použitie vzoriek od PD pacientov neetickým plytvaním vzácnym klinickým materiálom. Vzorky pacientov s potvrdenou PD sú zozbierané a budeme ich analyzovať v najbližších týždňoch.

Výstupy projektu

Výstup 1 Metóda izolácie neuronálnych extracelulárnych vezikúl

Priebežná monitorovacia správa č. 1
Pracovný balík NV1 – Izolácia neuro-ECV

Počas tohto monitorovacieho obdobia sme zaviedli a optimalizujeme dve metodiky izolácie neuronálnych extracelulárnych vezikúl (NEV) – kombináciu precipitácie a imunoselekcie pomocou protilátok (L1CAM/NCAM) a gélovej chromatografie (qEV20 a qEV35). Prebiehalo porovnanie oboch prístupov na kontrolných vzorkách, izolované častice mali veľkosť v rozmedzí 50–170 nm podľa DLS analýzy. Prebieha finálne testovanie kombinovanej metódy s cieľom zvýšiť výťažok a špecifitu izolácie NEV.

Dokument: Príloha k monitorovacej správe.

Výstup 2 α -syn RT-QulC test z krvných extracelulárnych vezikúl

Priebežná monitorovacia správa č. 1
NV2 – α -syn RT-QulC test

V rámci aktuálneho monitorovacieho obdobia prebieha optimalizácia metódy RT-QulC. Otestovaná bola jej funkčnosť pomocou pozitívnej kontroly na báze rekombinantného His-tagovaného α -synukleínu, pripraveného v našom laboratóriu. Experimentálne sa testoval vplyv rôznych podmienok (teplota, miešanie, prítomnosť detergentov) na rozsah agregácie α -synukleínu a aktuálne prebieha porovnanie natívneho a His-tagovaného substrátu. Metóda zatiaľ nebola aplikovaná na patientskych vzorkách – prebieha ich zber a prípravné testovanie.

Na základe predbežných zistení prebieha príprava odborného prehľadového článku s názvom „When proteins go MAD – Misfolded, Amplified, Detected: Advances in α -Synuclein pathophysiology and RT-QulC detection“. Doteraz dosiahnuté výsledky boli zároveň prezentované formou prednášky na odbornom podujatí AD-WORKSHOP No. 5. Relevantná dokumentácia: AD-workshop5_program a Príloha k monitorovacej správe.

Identifikácia problémov a rizík

Počas aktuálneho monitorovacieho obdobia došlo k miernemu oneskoreniu v napĺňaní míľnikov č. 1 a 2, ktoré boli plánované na prvý rok riešenia projektu. Hlavné dôvody sú nasledovné:

1. Sporná špecifita povrchových markerov (L1CAM, NCAM): Na základe aktuálne publikovaných dát ¹ sme prehodnotili pôvodne plánovaný spôsob selekcie NEV pomocou protilátok. Ich výskyt vo forme voľných proteínov v plazme a CSF spochybňuje ich využiteľnosť ako selektívnych markerov. To viedlo k nutnosti zavedenia alternatívneho prístupu cez gélovú chromatografiu, čo si vyžiadalo dodatočné optimalizačné experimenty.
2. Nízka detekovateľnosť cieľových proteínov po izolácii NEV: Pomocou Western blottingu nebolo možné detegovať α -synukleín ani L1CAM v izolovaných vezikulách, pravdepodobne pre nízku koncentráciu. To oddialilo validáciu izolácie a vynútilo potrebu kombinovaného izolačného prístupu.
3. Variabilita medzi šaržami rekombinantného monomérneho α -synukleínu: Rôzne šarže rekombinantného substrátu vykazovali odlišnú schopnosť agregovať, čo ovplyvňovalo konzistentnosť RT-QulC signálu a znemožňuje štandardizáciu testov. Porovnanie natívneho a His-tagovaného proteínu si vyžiadalo dodatočný čas na purifikáciu a testovanie.

Prijaté opatrenia:

1. Zavedenie gélovej chromatografie ako štandardného kroku pred imunoselekciou pri izolácii NEV, čím sa znižuje prítomnosť plazmatických kontaminantov a umožňuje efektívne využitie L1CAM, NCAM protilátok pri imunopurifikácii.
2. Optimalizácia kombinovaného izolačného postupu a zvýšenie vstupného objemu plazmy na zvýšenie výťažku NEV.
3. Paralelná príprava a testovanie natívneho aj His-modifikovaného α -synukleínu pre výber najvhodnejšieho substrátu a jeho štandardnej prípravy z hľadiska čistoty a funkčnosti do RT-QulC testu a ich dodatočná validácia pomocou metódy interferencie na biovrstve (prístroj Octet R2).

4. Zaznamenanie výsledkov a metodík do interných protokolov a ich prezentácia na odbornom workshope (AD-WORKSHOP No.5) za účelom získania spätnej väzby od odbornej komunity.

Riziká pre nasledujúce monitorovacie obdobie a plánované opatrenia:

1. Variabilita medzi šaržami substrátu pre RT-QulC

Riziko: Znížená reprodukovateľnosť výsledkov.

Opatrenie: Zavedenie štandardizovaného purifikačného a validačného postupu pomocou Octet R2 pre každú šaržu rekombinantného α -synukleínu pred jej použitím v RT-QulC.

2. Technická náročnosť vývoja obdobného RT-QulC testu pre tau agregáty

Riziko: Potenciálne oneskorenie pri zavádzaní testu na tau agregáty.

Opatrenie: Skoré spustenie testovania tau fragmentov paralelne s prebiehajúcimi úlohami RT-QulC pre α -synukleín; využitie skúseností z predchádzajúcich experimentov.

Popis plánovaných činností v nasledujúcom monitorovacom období

V nasledujúcom monitorovacom období sa plánujeme zamerať na ukončenie rozpracovaných úloh spojených s dosiahnutím míľnikov 1 a 2 a pokročiť k míľniku 3, ktorý zahŕňa analýzu klinických vzoriek. Hlavné aktivity budú nasledovné:

1. Dokončenie validácie izolačnej metódy pre NEV
 - Optimalizácia kombinovanej stratégie gélovej chromatografie a imunoselektie.
 - Aplikácia optimalizovanej metódy na väčší súbor kontrolných vzoriek a následne na prvé dostupné vzorky od pacientov s Parkinsonovou a Alzheimerovou chorobou.
 - Kvantifikácia výťažku a testovanie špecificity izolovaných NEV (markerové proteíny, veľkosť).
2. Zabezpečenie kvality rekombinantného α -synukleínu ako substrátu pre RT-QulC
 - Zavedenie štandardizovanej validácie každej pripravenej šarže pomocou Octet R2.
 - Výber medzi natívnym a His-modifikovaným variantom podľa čistoty, stability a schopnosti agregácie.
3. Zavedenie RT-QulC testovania na biologických vzorkách pacientov
 - Po dodaní prvých klinických vzoriek z projektu ADDIT-CE zahájenie RT-QulC testovania v režime troch nezávislých meraní.
 - Stanovenie základných parametrov ako limity detekcie a kvantifikácie, dynamický rozsah linearity a reprodukovateľnosť.
 - Porovnanie signálov medzi klinickými a kontrolnými vzorkami.
4. Príprava podmienok pre vývoj tau RT-QulC testu
 - Expresia a purifikácia rekombinantných fragmentov tau proteínu.
 - Testovanie ich schopnosti spontánnej agregácie a interakcie s agregovaným tau proteínom z mozgového tkaniva.
 - Výber najvhodnejších fragmentov pre ďalší vývoj testu.

Opatrenia na elimináciu identifikovaného omeškania:

Vzhľadom na oneskorenie spôsobené potrebou zmeny stratégie izolácie NEV a optimalizácie substrátu RT-QuIC, budú uvedené činnosti realizované súbežne a s vyššou frekvenciou testovaní. Zároveň sa zintenzívni spolupráca so zbernými centrami a koordinátormi ADDIT-CE na zabezpečenie skorého prístupu k patientskym vzorkám. Na zabezpečenie splnenia míľnikov a výstupov projektu sa pristúpilo tiež k navýšeniu personálnej kapacity a do projektu bola zapojená ďalšia pracovníčka, plánuje sa tiež prijať doktorand/ka.