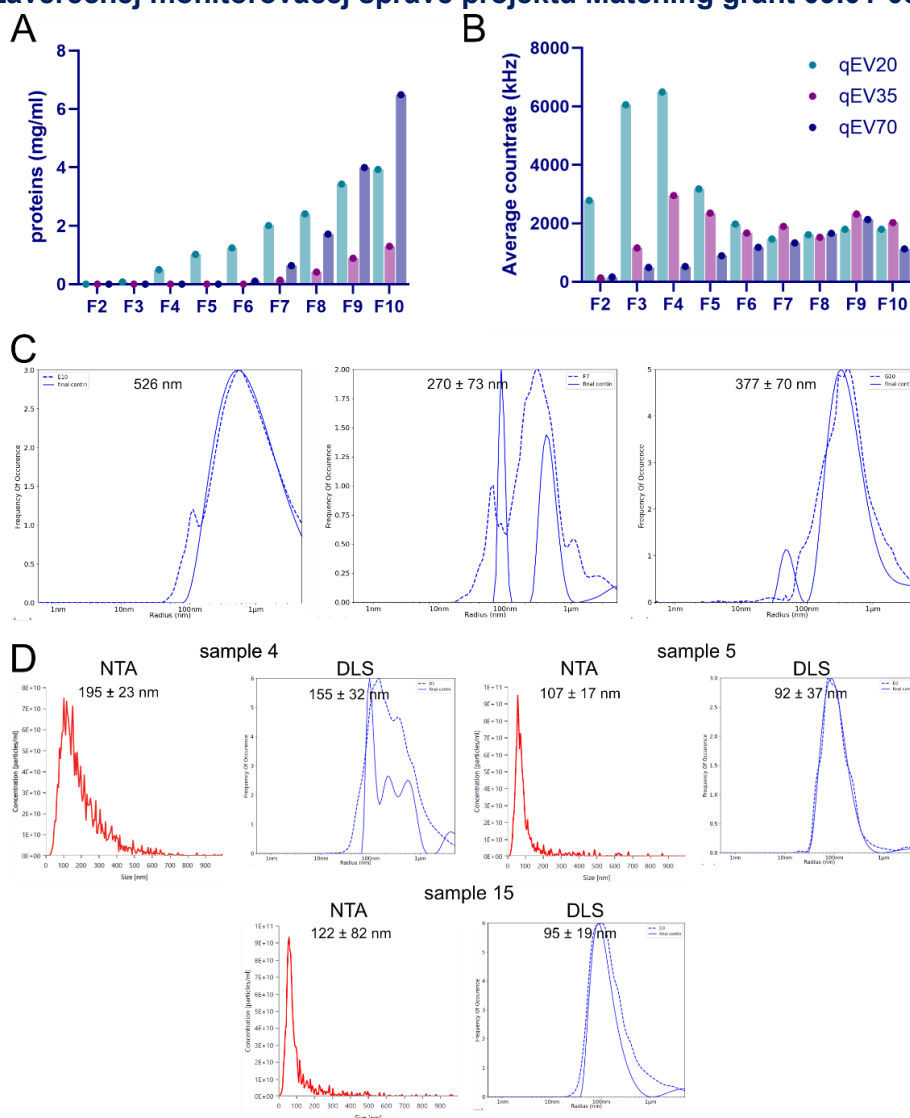
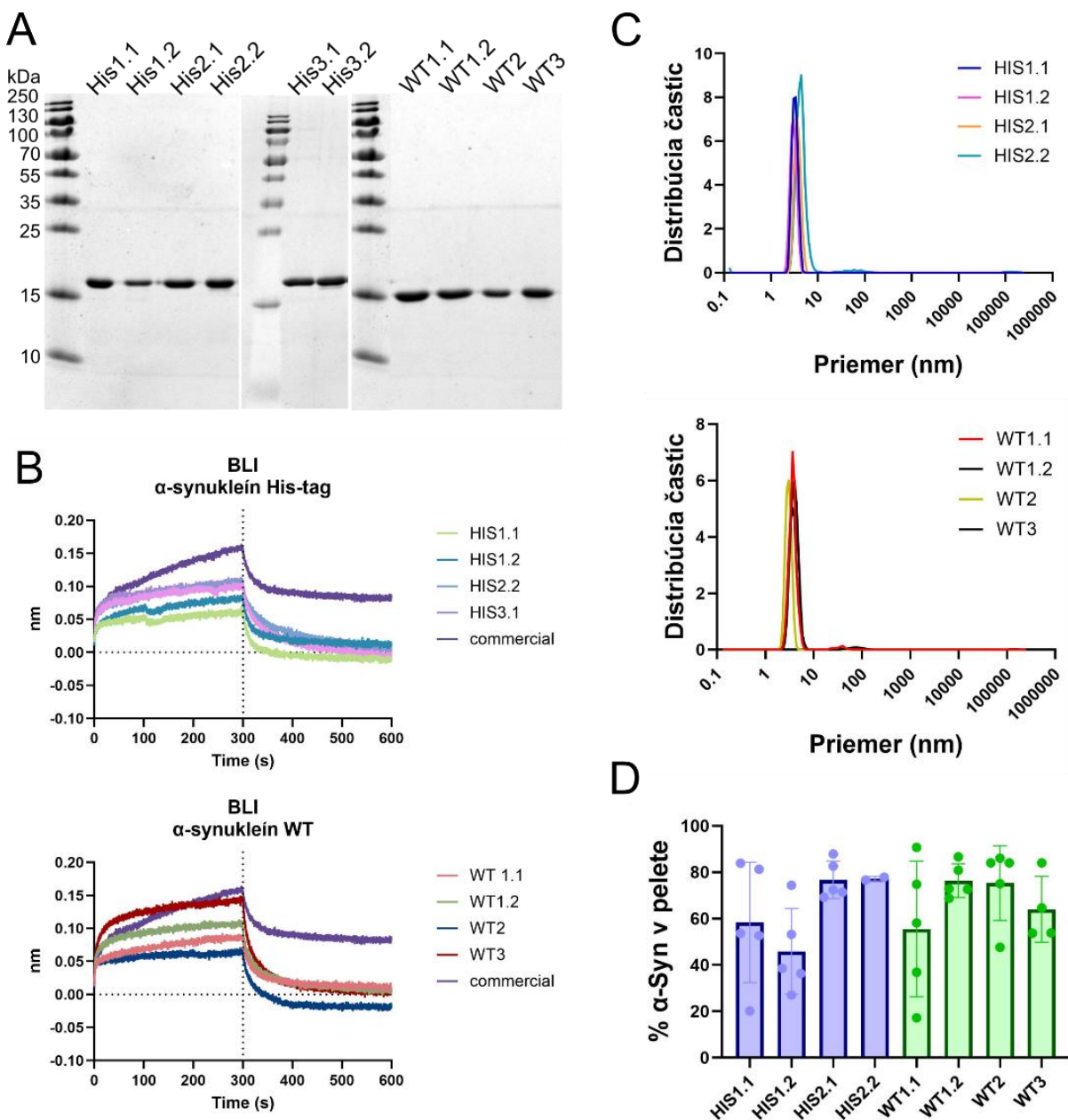


Príloha k záverečnej monitorovacej správe projektu Matching grant 09I01-03-V04-00039



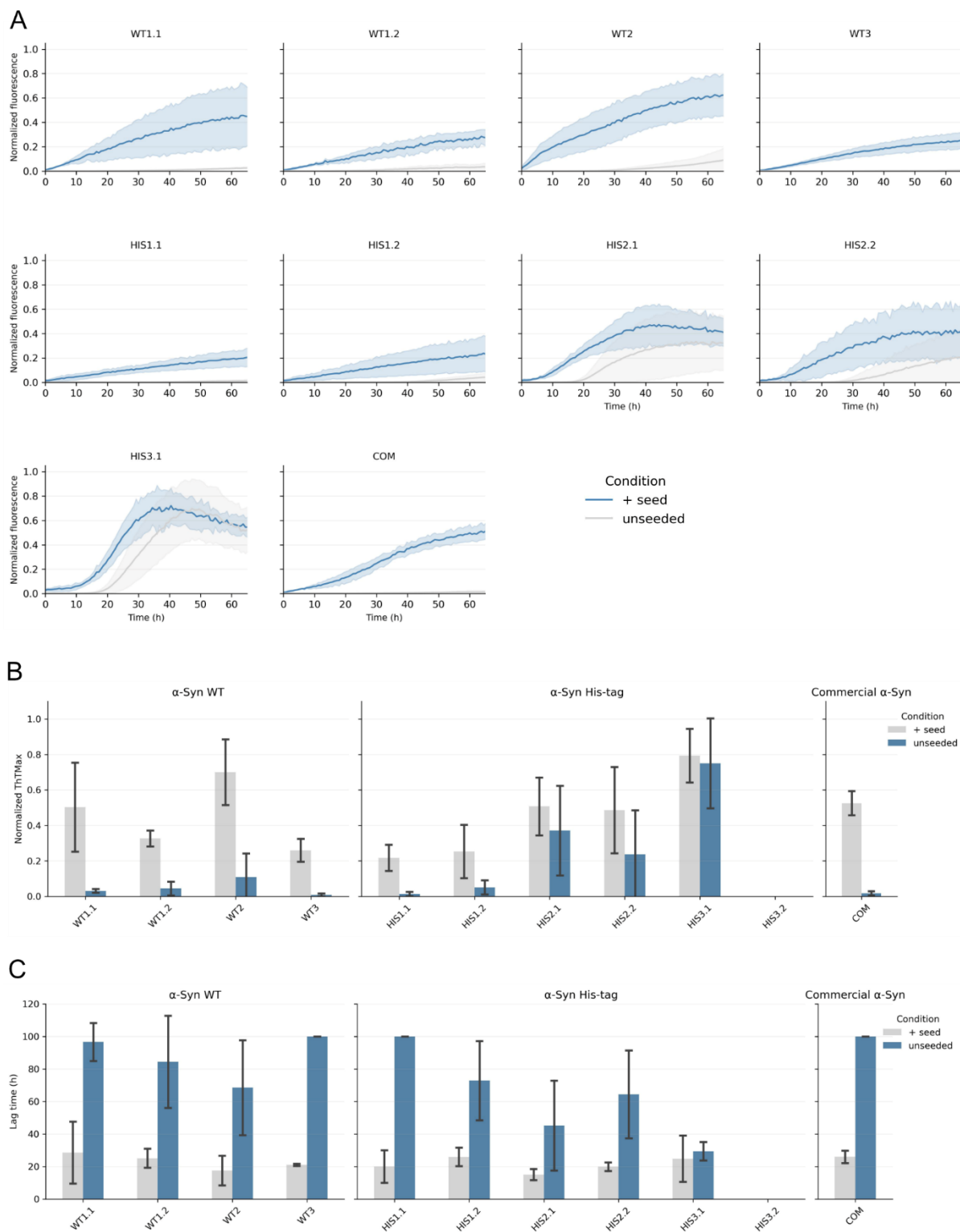
Obrázok 1: Optimalizácia izolácie extracelulárnych vezikúl

Na izoláciu extracelulárnych vezikúl sme porovnali tri typy kolónok SEC (size exclusion chromatography): qEV20, qEV35 a qEVOriginal-70. Jednotlivé eluované frakcie (F2–F10) boli analyzované z hľadiska obsahu proteínov a koncentrácie častíc. **(A)** Distribúcia proteínov v jednotlivých frakciách izolovaných pomocou testovaných kolóniek. **(B, C)** Charakterizácia veľkostnej distribúcie častíc vo vybraných frakciách pomocou Dynamic Light Scattering (DLS) pre jednotlivé typy kolóniek. Kolónka qEV35 poskytovala najnižšiu proteínovú kontamináciu vo frakciách obsahujúcich EV (F2–F7) pri súčasnom zachovaní populácie častíc v očakávanom veľkostnom rozsahu extracelulárnych vezikúl. Na základe týchto výsledkov bola qEV35 zvolená na izoláciu všetkých nasledujúcich vzoriek. **(D)** Reprezentatívne porovnanie veľkostnej distribúcie EV izolovaných pomocou qEV35 analyzovaných metódami DLS a Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). DLS sa ukázala ako rýchla, jednoduchá a nákladovo efektívna metóda na rutinnú kontrolu kvality EV izolátov, pričom poskytovala výsledky porovnateľné s NTA.



Obrázok 2: Purifikácia a analýza rekombinantného His-tagovaného a natívneho α-synukleínu

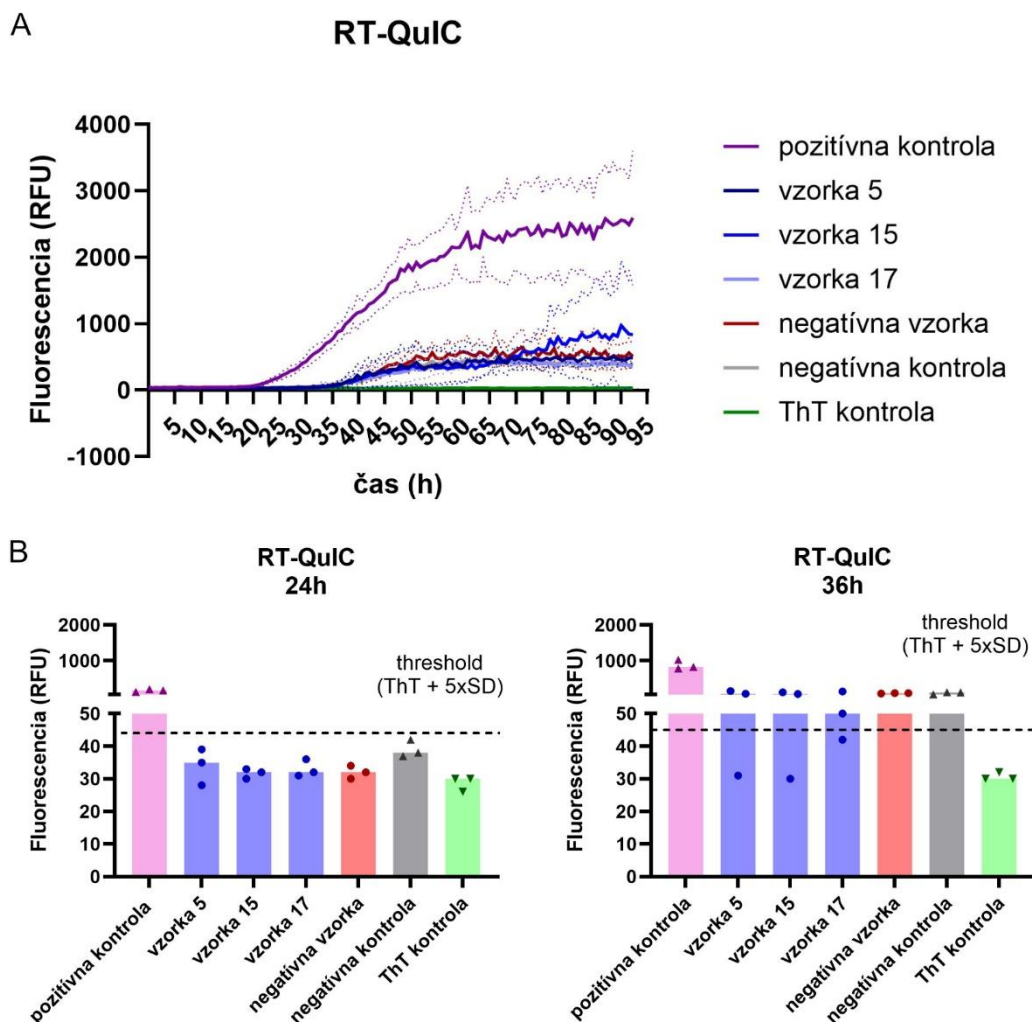
(A) Na obrázku sú jednotlivé šarže 15,3 kDa His-tagovaného (His) a 14,5 kDa natívneho (WT) α-synukleínu po analýze pomocou SDS-PAGE. Získali sme proteínové šarže porovnateľnej čistoty. **(B)** Analýza na prístroji Octer R2 preukázala, že schopnosť väzby na protilátku vykazuje medzi jednotlivými šaržami len malé rozdiely v porovnaní s komerčne zakúpeným proteínom. Priemerné K_D pre WT boli $2,6 \times 10^{-10}$, pre His-tag $2,5 \times 10^{-10}$, čo sú hodnoty porovnateľné s K_D komerčného substrátu ($1,9 \times 10^{-10}$). **(C)** Jednotlivé šarže sme analyzovali aj pomocou DLS. **(D)** Sedimentačný test odhalil výraznejšiu variabilitu medzi jednotlivými šaržami.



Obrázok 3: Charakterizácia jednotlivých šarží rekombinantného α -synukleínu pomocou RT-QuIC.

(A) Kinetické krivky RT-QuIC reakcie pre jednotlivé šarže natívneho (WT1.1–WT3), His-tagovaného (HIS1.1–HIS3.1) a komerčného α -synukleínu (COM) v prítomnosti (+ seed, modrá) alebo bez prítomnosti (unseeded, sivá) pozitívnej

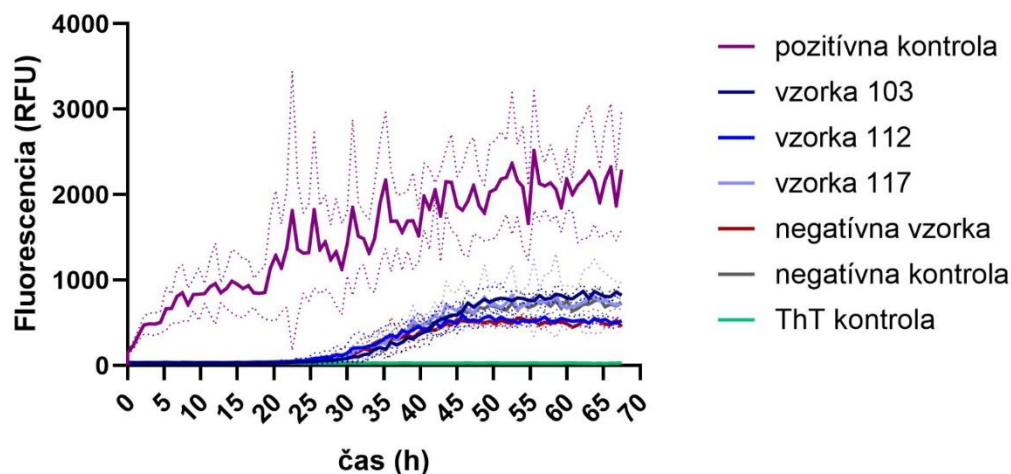
kontroly. Zobrazené sú priemerné hodnoty normalizovanej fluorescence $\pm$ SD. Výsledky poukazujú na rozdielnú schopnosť jednotlivých šarží amplifikovať agregovaný α -synukleín a na zvýšenú spontánnu agregáciu niektorých His-tagovaných substrátov. **(B)** Maximálna hodnota fluorescenčného signálu (ThTmax) dosiahnutá počas RT-QuIC reakcie. Parameter odráža rozsah tvorby amyloidných agregátov v reakcii. Šarža WT2 vykazovala vysoký signál v prítomnosti seedu pri súčasne nízkej úrovni spontánnej agregácie, zatiaľ čo niektoré His-tagované šarže dosahovali vysoké hodnoty aj bez pridania seedu, napríklad šarža 3.1. **(C)** Lag čas (h) definovaný ako čas potrebný na dosiahnutie prahovej hodnoty fluorescenčného signálu. Kratší lag čas zodpovedá rýchlejšej amplifikácii agregátov. Najkratšie lag časy v prítomnosti seedu boli pozorované pri šarži WT2, zatiaľ čo viaceré His-tagované substráty vykazovali skrátený lag čas aj bez pridania pozitívnej kontroly, čo naznačuje zvýšenú tendenciu k spontánnej agregácii. Na základe kombinácie parametrov ThTmax, lag času a úrovne spontánnej agregácie bola šarža WT2 vyhodnotená ako najvhodnejší substrát pre ďalšie RT-QuIC experimenty.



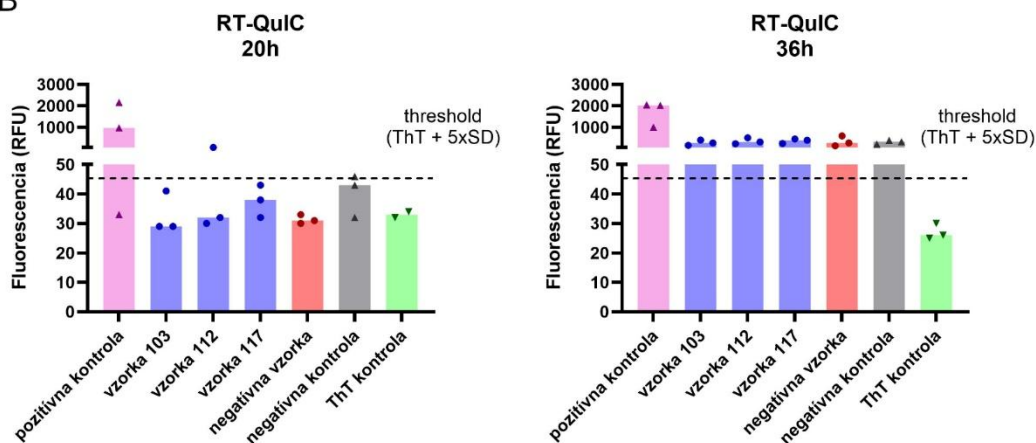
Obrázok 4: Výsledky α -Syn RT-QuIC analýzy EV/NEV izolátov z kontrolných a patientských vzoriek.

Pozitivita 53 vzoriek bola hodnotená na základe počtu pozitívnych replikátov v jednotlivých časových bodoch merania. Vzorka bola považovaná za pozitívnu, ak fluorescenčný signál prekročil stanovený prah priemeru fluorescencie ThT kontroly plus 5-násobok štandardnej odchýlky v najmenej dvoch z troch technických replikátov ($\geq 2/3$ pozitívnych replikátov). **(A)** Zobrazené sú reprezentatívne výsledky 3 patientských vzoriek (vzorky 5, 15, 17), negatívnej vzorky, pozitívnej vzorky (s 10 ng seedu) a negatívnej kontroly bez seedu. **(B)** Zobrazené sú dva časové body, ktoré dokumentujú vývoj positivity vzoriek počas RT-QuIC reakcie. Dochádza k nárastu počtu pozitívnych reakcií s predlžujúcim sa časom inkubácie, vrátane výskytu pozitívnych signálov aj v negatívnych kontrolách už po 36 h. Tento jav naznačuje potrebu ďalšej optimalizácie podmienok testu s cieľom zvýšiť jeho špecifickosť pri analýze klinických vzoriek.

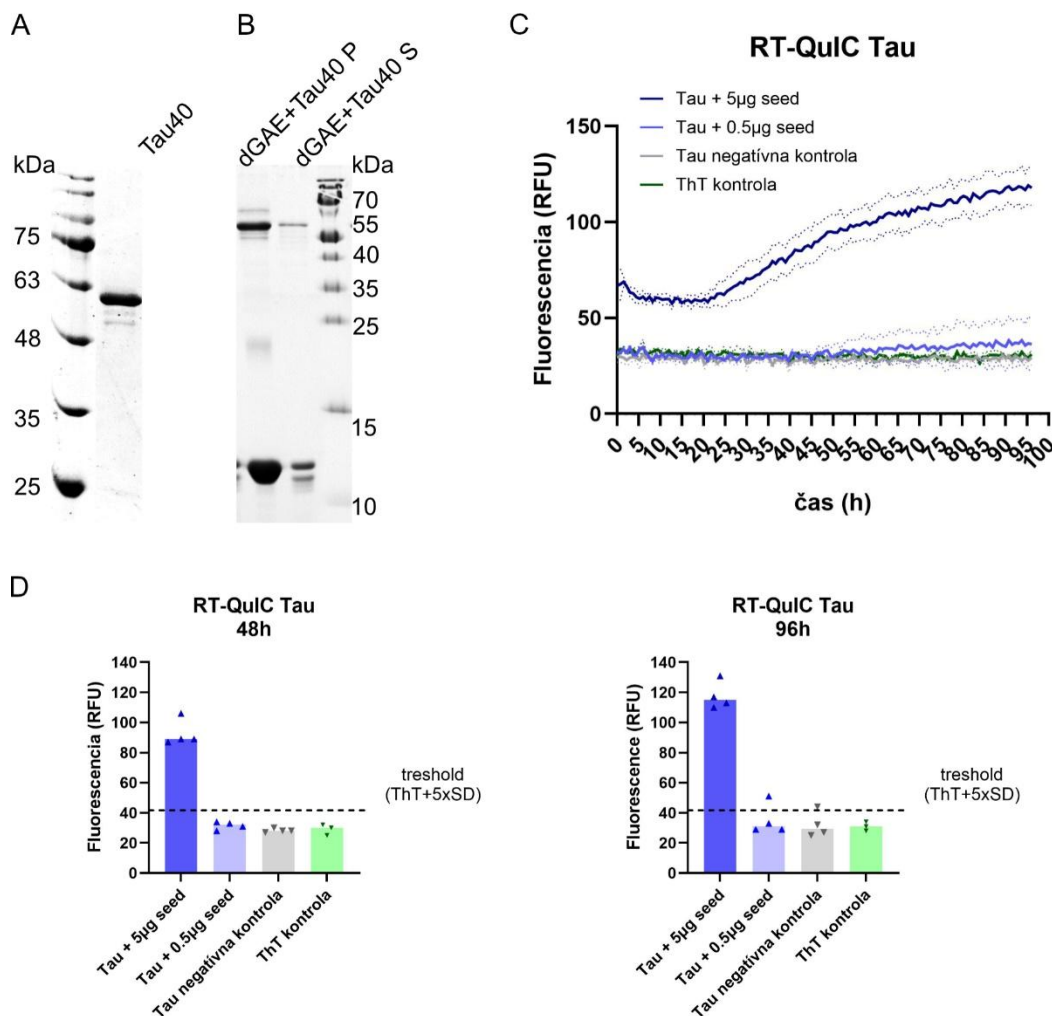
A

RT-QuIC α -Syn štúdia

B

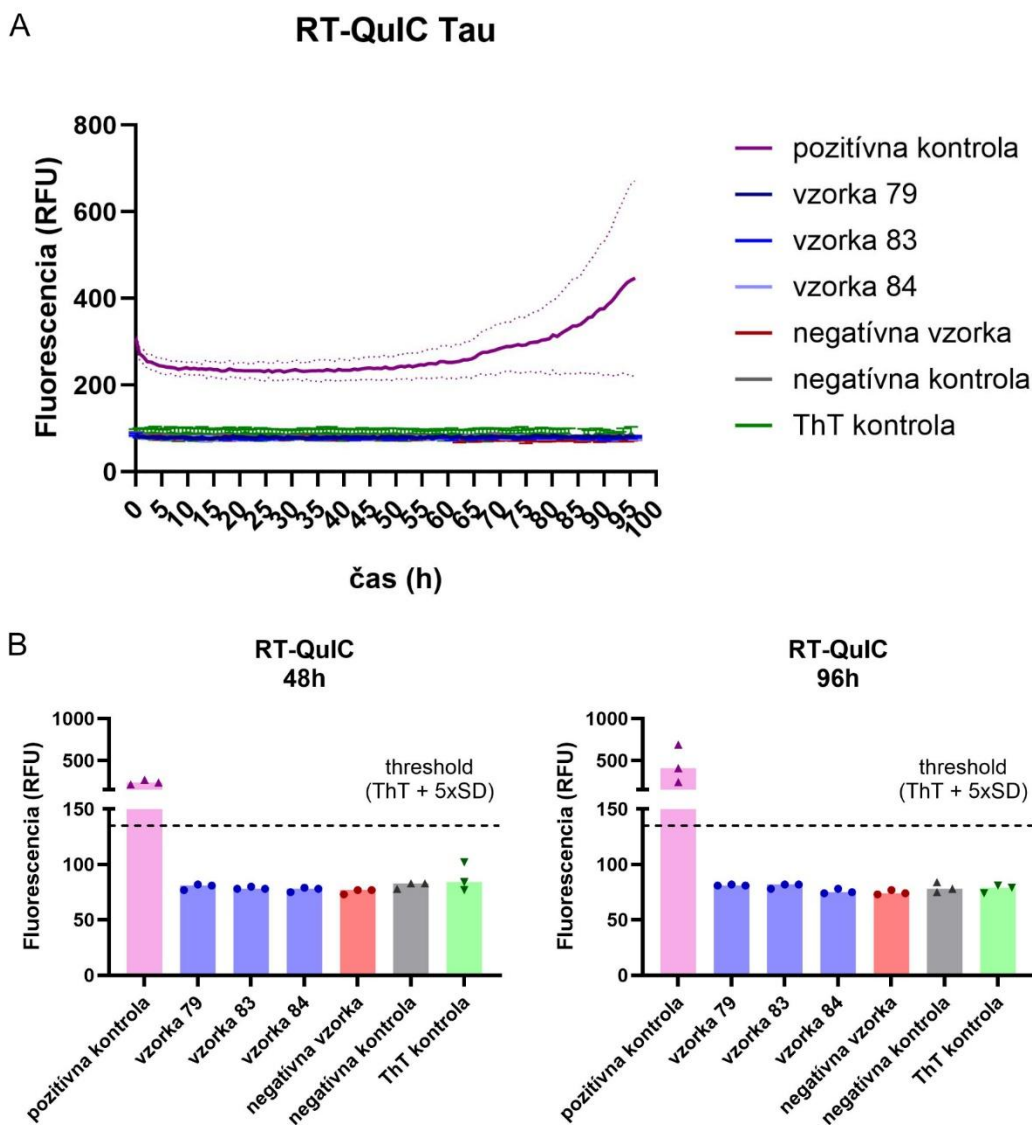
Obrázok 5: Výsledky α -Syn RT-QuIC analýzy EV/NEV z klinickej štúdie.

(A) Reprezentatívne kinetické krivky RT-QuIC reakcie pri analýze EV/NEV izolátov z patientskych a kontrolných vzoriek. Pozitívna kontrola pripravená z *in vitro* agregovaného α -synukleínu vykazovala nárast fluorescenčného signálu už počas prvých 20 hodín reakcie. Fluorescenčný signál patientskych aj kontrolných vzoriek začal narastať približne po 25–30 hodinách inkubácie, pričom podobná kinetika bola pozorovaná aj v negatívnej vzorke a negatívnej kontrole bez seedu. Výsledky naznačujú spontánnu agregáciu substrátu pri dlhšej inkubácii, čo obmedzuje schopnosť spoľahlivo odlíšiť pozitívne a negatívne klinické vzorky. **(B)** Porovnanie fluorescenčného signálu po 20 a 36 hodinách RT-QuIC reakcie. Prerušovaná čiara označuje prah positivity definovaný ako priemerná hodnota fluorescence ThT kontroly zvýšená o päťnásobok štandardnej odchýlky ($\text{ThT} + 5 \times \text{SD}$). Po 20 hodinách prekročila prah positivity iba pozitívna kontrola, zatiaľ čo všetky analyzované EV/NEV izoláty zostali negatívne. Po 48 hodinách však prah prekročili nielen patientske vzorky, ale aj negatívna vzorka a negatívna kontrola, čo poukazuje na nedostatočnú špecifitu testu pri dlhšej inkubácii. Výsledky naznačujú, že za použitých experimentálnych podmienok je koncentrácia patologických α -synukleínových agregátov v EV/NEV pravdepodobne na hranici detekcie metodiky a na zvýšenie diagnostickej výkonnosti bude potrebná ďalšia optimalizácia izolácie vezikúl aj podmienok RT-QuIC reakcie.



Obrázok 6: Purifikácia Tau40 proteínu, príprava seedu a RT-QuIC test

(A) SDS-PAGE analýza purifikovaného rekombinantného proteínu Tau40 pripraveného expresiou v *Escherichia coli*. Purifikovaný proteín vykazoval očakávanú mobilitu približne 55 kDa a vysoký stupeň čistoty. (B) SDS-PAGE analýza agregovaných Tau seedov pripravených inkubáciou Tau40 s induktorom agregácie dGAE. Vzorka pripravená v prítomnosti dGAE vykazovala vznik oligomérnych a vysokomolekulových agregovaných foriem Tau proteínu. (C) Pilotné testovanie metodiky Tau RT-QuIC s použitím *in vitro* pripravených Tau seedov. (D) Koncové body v 48. a 96. hodine RT-QuIC Tau testu. Pridanie 5 µg tau seedu viedlo k nárastu fluorešcenčného signálu v priebehu reakcie, čo potvrdilo schopnosť metodiky amplifikovať agregované formy Tau proteínu. Pri nižšom množstve seedu (0,5 µg) však nebola pozorovaná významná amplifikácia a fluorešcenčný signál zostal na úrovni neseedovanej negatívnej kontroly a ThT kontroly.



Obrázok 7: Pilotné testovanie metodiky Tau RT-QulC na EV/NEV izolátoch z kontrolných a patientskych vzoriek. (A) Reprezentatívne kinetické krivky fluorescenčného signálu pri analýze EV/NEV izolátov pomocou Tau RT-QulC. Pozitívna kontrola pripravená z *in vitro* agregovaného Tau vykazovala nárast fluorescence približne po 60 hodinách inkubácie, zatiaľ čo patientské vzorky, negatívna vzorka, negatívna kontrola a kontrola obsahujúca iba pufor a tioflavín T (ThT) zostali počas celej reakcie na úrovni bazálneho signálu. V porovnaní s optimalizáciou metodiky bez prítomnosti detergentu Triton X-100, kde pozitívna kontrola vykazovala amplifikáciu už približne po 24 hodinách (Obr. 6C), došlo v prítomnosti Tritonu k výraznému predĺženiu lag fázy. Výsledky naznačujú, že Triton X-100 používaný na uvoľnenie obsahu EV/NEV pravdepodobne inhibuje proces amplifikácie Tau agregátov. **(B)** Porovnanie fluorescenčného signálu po 48 a 96 hodinách inkubácie. Prerušovaná čiara označuje prah pozitivity definovaný ako priemerná hodnota fluorescence ThT kontroly zvýšená o päťnásobok štandardnej odchýlky ($\text{ThT} + 5 \times \text{SD}$). Pozitívna kontrola prekročila stanovený prah až po predĺženej inkubácii, zatiaľ čo všetky analyzované EV/NEV izoláty z pacientov, negatívna vzorka aj negatívne kontroly zostali pod hranicou pozitivity. Výsledky poukazujú na potrebu ďalšej optimalizácie podmienok uvoľnenia obsahu extracelulárnych vezikúl, najmä výberu detergentu kompatibilného s RT-QulC reakciou.