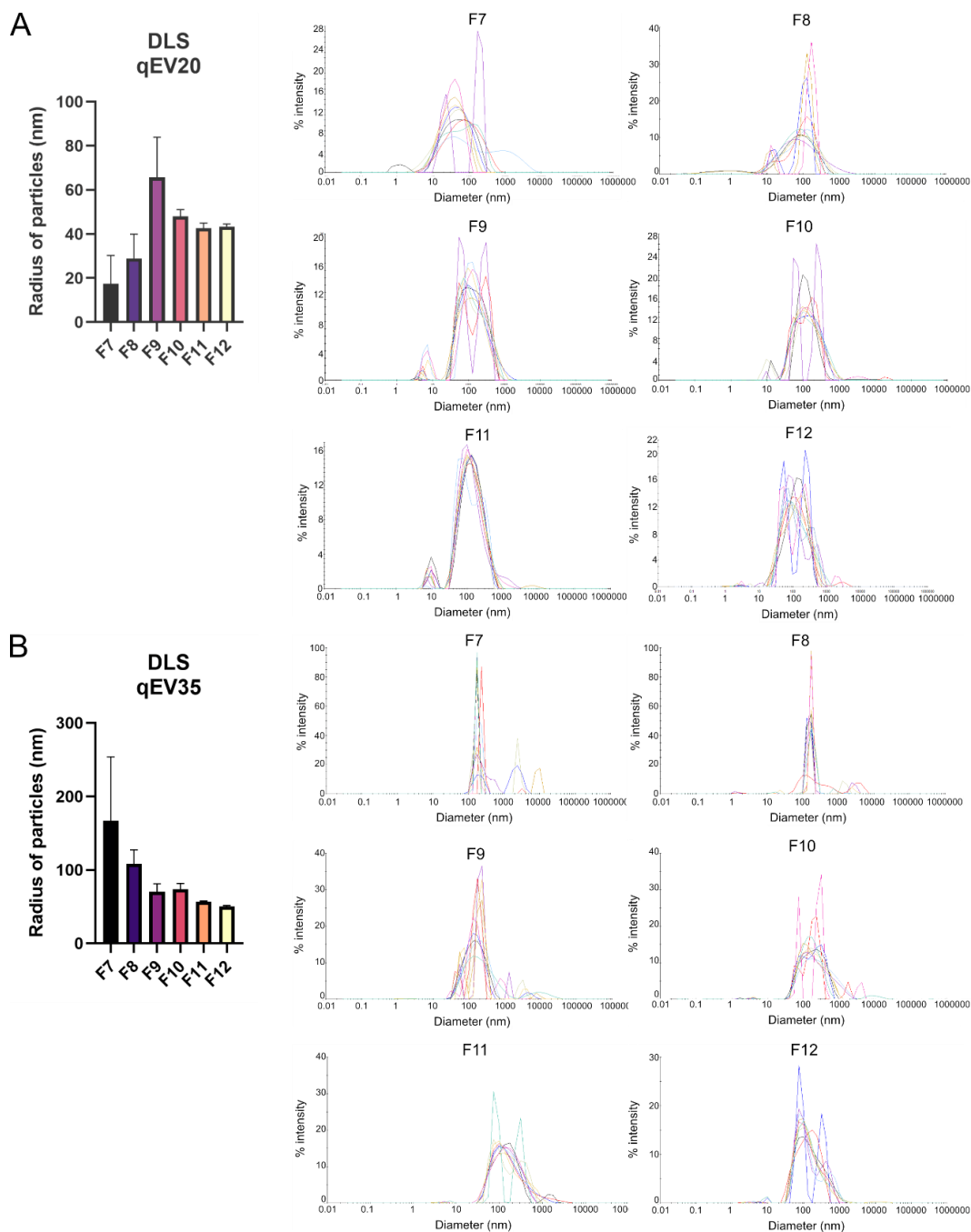
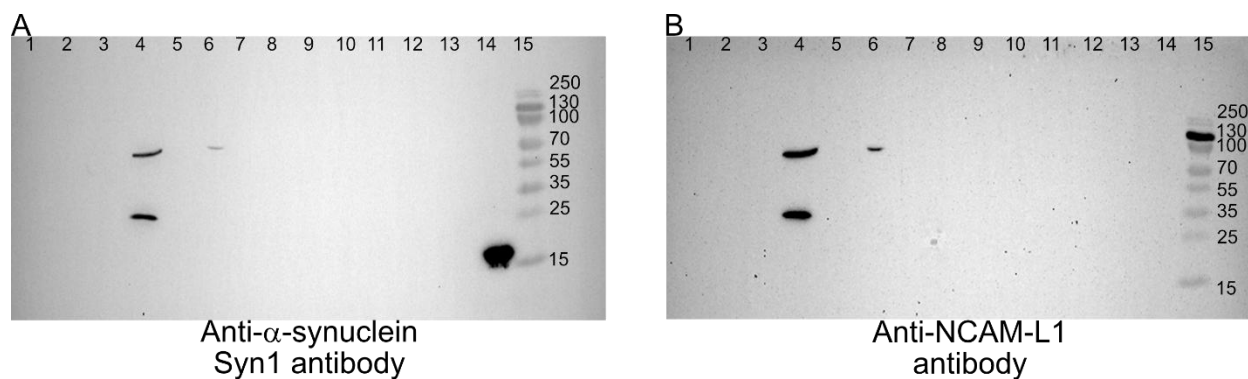


Príloha k priebežnej monitorovacej správe projektu Matching grant 09I01-03-V04-00039



Obrázok 1: DLS analýza extracelulárnych vezikul

Na izoláciu extracelulárnych vezikul sme testovali gélovú filtráciu pomocou kolóniek qEV20 (A) and qEV35 (B). Izovali sme častice, rozdelené v rôznych frakciách a vzorky sme analyzovali pomocou metódy DLS (dynamic light scattering). Ich veľkosť sa pohybovala v rozmedzí 17-170 nm. Frakcie (F) 9-12 pri kolónkach qEV20 a 8-12 pri qEV35 obsahovali častice, ktoré by mali veľkosťou zodpovedať očakávanej veľkosti extracelulárnych vezikul, 50-100 nm.



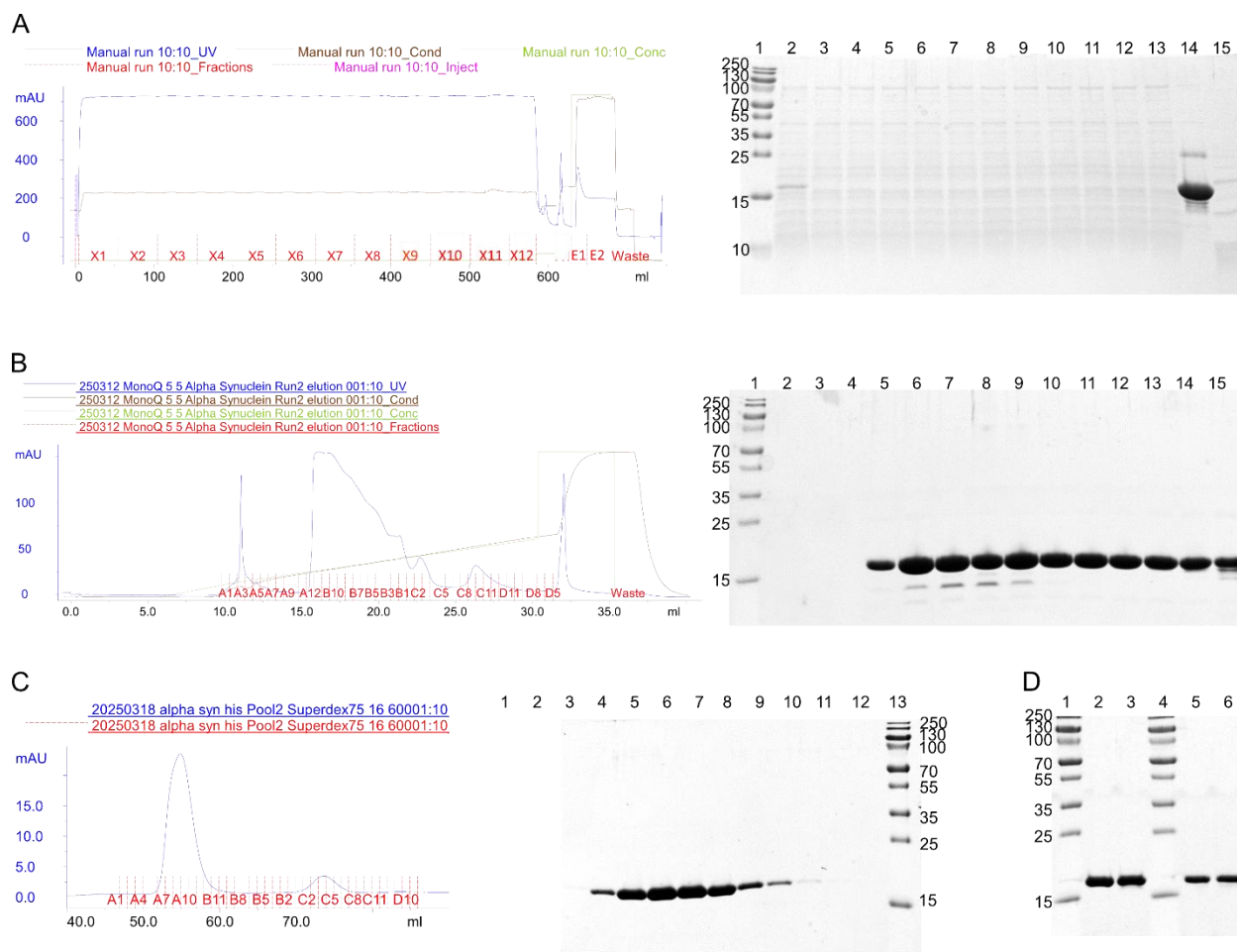
Obrázok 2: Western blot analýza extracelulárnych vezikúl

Vzorky extracelulárnych vezikúl izolovaných precipitáciou, ako aj vybrané frakcie po gélovej filtrácii, sme analyzovali pomocou Western blotu. Použili sme dva typy monoklonálnych protilátok: (A) anti- α -synuclein Syn1 (BD Biosciences) a (B) anti-NCAM-L1 (Santa Cruz).

V dráhach 1–14 boli nanesené nasledovné vzorky:

1. celková plazma pred izoláciou,
2. mikrovezikulárna frakcia,
3. frakcia celkových vezikúl,
4. prietok po imunoselekcii neurónových extracelulárnych vezikúl (NEV),
5. premytie,
6. frakcia vezikúl uvoľnená z imunokomplexu denaturáciou,
7. frakcia vezikúl eluovaná glycínom,
8. Tritónom ošetrované vzorky,
9. frakcia 8 po purifikácii gélovou filtráciou (qEV20),
10. frakcia 9 (qEV20),
11. frakcia 10 (qEV20),
12. frakcia 9 po purifikácii (qEV35),
13. frakcia 10 (qEV35),
14. 0,25 μ g rekombinantného α -synukleínu,
15. proteínový štandard PageRuler Plus.

Okrem kontrolnej vzorky s rekombinantným α -synukleínom sme pomocou protilátky Syn1 detegovali signál len v prietoku po imunoselekcii a slabý signál vo frakcii po denaturácii. Vzhľadom na to, že podobný signál sa objavil aj pri protilátke proti NCAM-L1, predpokladáme, že ide o nešpecifickú väzbu sekundárnej protilátky. Pri špecifickej detekcii sme očakávali signály zodpovedajúce veľkosti α -synukleínu (~15,3 kDa) a jednej alebo viacerým izoformám NCAM (~120, 140 alebo 180 kDa).

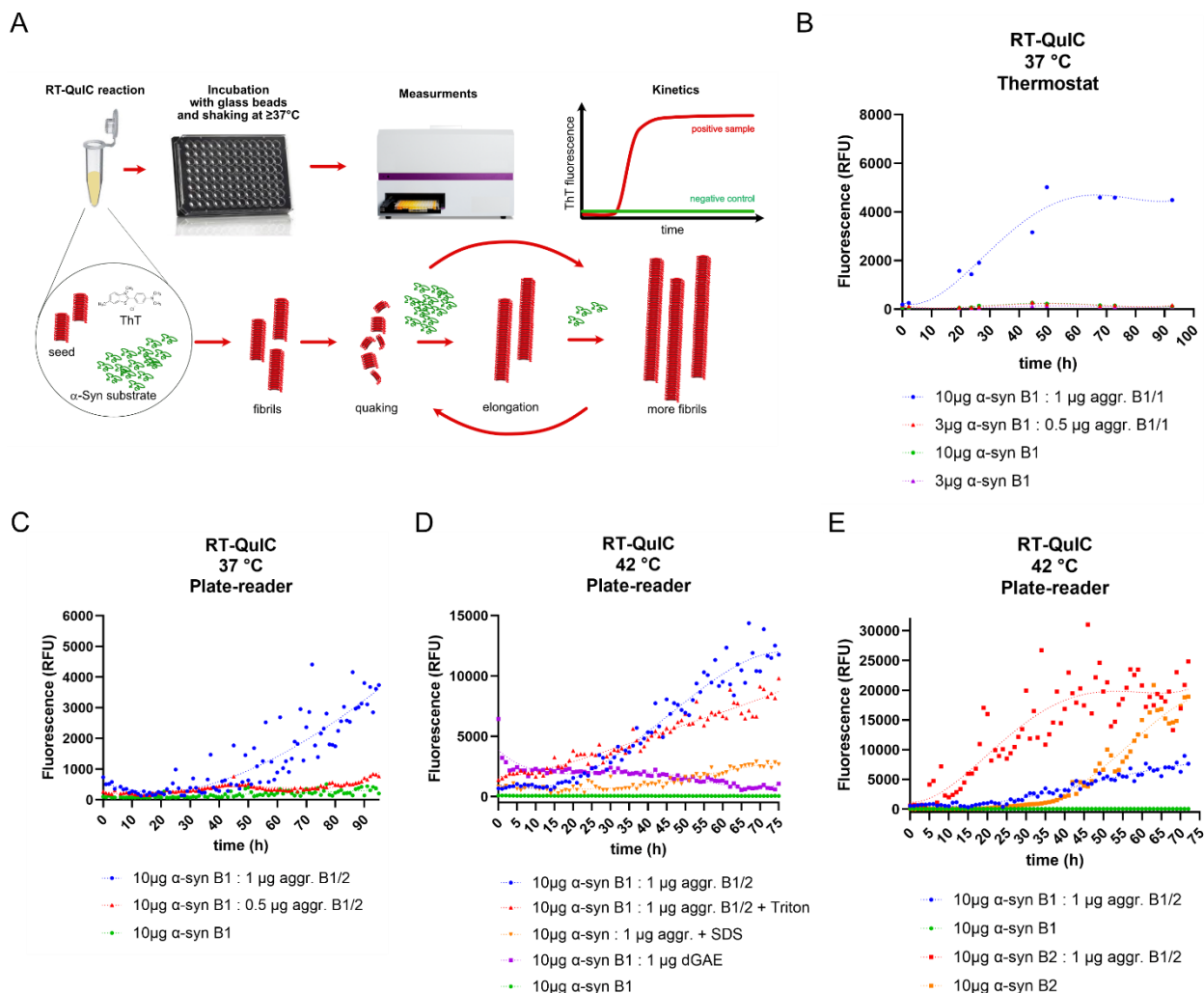


Obrázok 3: Purifikácia rekombinantného His-tagovaného α -synukleínu

Na obrázku je znázornený príklad purifikácie 15,3 kDa His-tagovaného α -synukleínu (α -Syn-His). Po expresii v bunkách *Escherichia coli*, ich lýze a centrifugácii bol α -Syn-His izolovaný pomocou chromatografických techník – najskôr afinitnou chromatografiou (A), následne iónomeničovou (B) a napokon gélovou filtráciou (C). Obrázok zobrazuje príslušné chromatogramy a analýzu čistoty pomocou SDS-PAGE. Na SDS-PAGE géloch sú znázornené tieto dráhy:

- (A) 1. proteínový štandard PageRuler Plus, 2. nanášaná vzorka, 3–13. prietokové frakcie, 14–15. eluované frakcie;
- (B) 1. proteínový štandard PageRuler Plus, 2–15. frakcie A9–B2;
- (C) 1–12. frakcie A5–B9, 13. proteínový štandard PageRuler Plus.

Na obrázku (D) je zobrazený finálny purifikovaný produkt, pričom v dráhach 2 a 3 bolo nanesené 1 μ g α -Syn-His a v dráhach 5 a 6 0,5 μ g α -Syn-His. Časť purifikovaného proteínu bola použitá na prípravu agregovanej formy α -Syn-His. Neagregovaný aj agregovaný α -Syn-His boli následne testované pomocou RT-QuIC.



Obrázok 4: Optimalizácia RT-QuIC testu

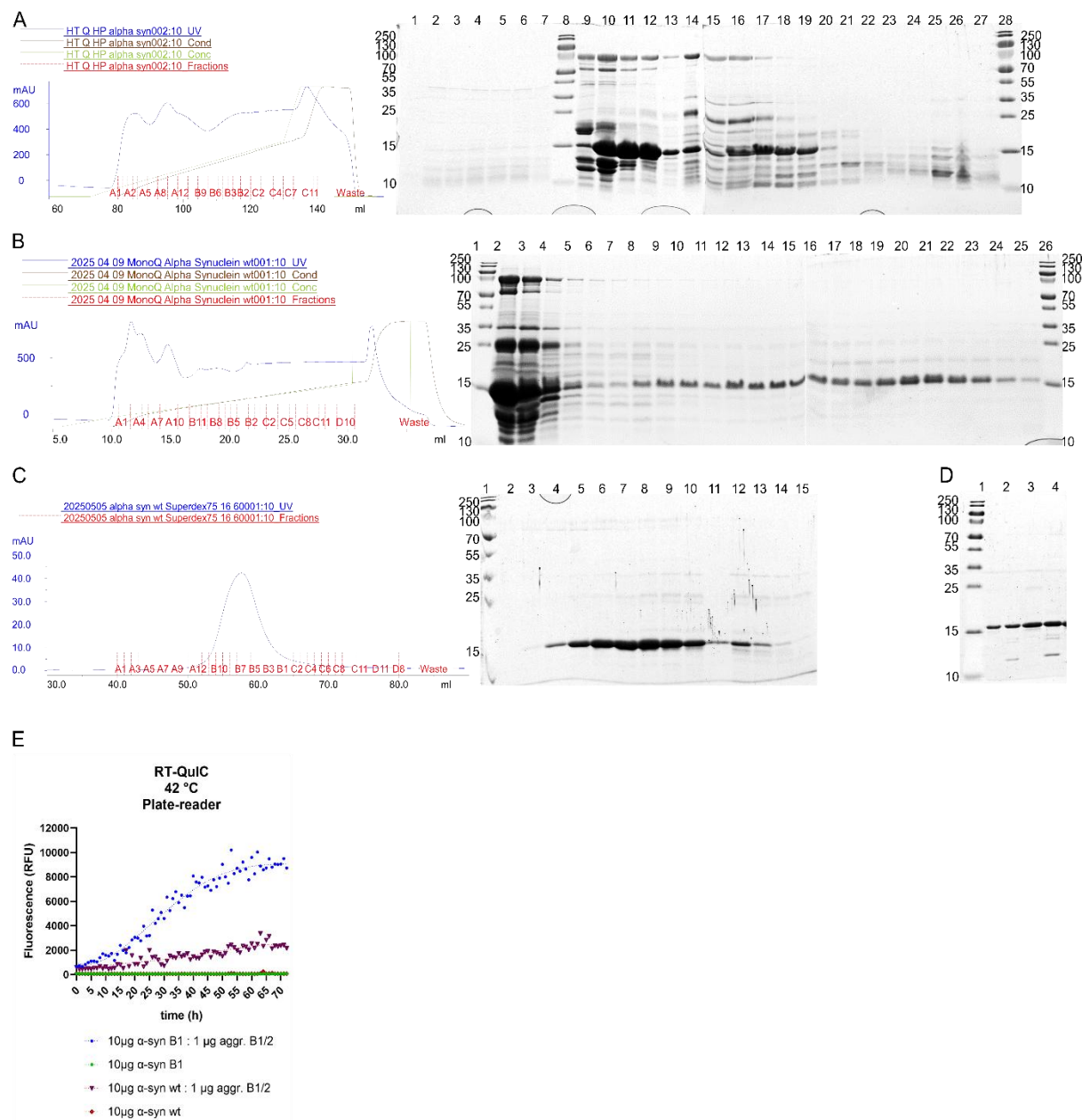
(A) Schéma princípu testu RT-QuIC (Real-Time Quaking-Induced Conversion). Táto technika využíva seeding aktivitu patologického α -Syn (seed), ktorý indukuje konverziu monomérneho α -Syn (substrát) na fibrily in vitro. Agregácia sa pri tom monitoruje pomocou fluorescencie Thioflavínu T (ThT). Amplifikácia v RT-QuIC sa vyznačuje sigmoidálnou kinetikou s tromi fázami: lag fáza, v ktorej je rekombinantný α -Syn ešte monomérny; exponenciálna fáza, kde patologické seedy urýchľujú fibrilizáciu; a plató fáza, keď sa všetok dostupný α -Syn konvertuje na fibrily. RT-QuIC teda umožňuje amplifikáciu a detekciu patologických foriem α -Syn, pričom kinetický profil je možné ovplyvniť výberom substrátu a reakčných podmienok (napr. pufor, teplota, miešanie).

(B) Testovali sme nami pripravené proteíny α -Syn-His. Miešanie prebiehalo kontinuálne v termostate v 96-jamkovej platničke pri rýchlosti 1000 rpm a teplote 37 °C. Testovali sa tiež dve rôzne koncentrácie substrátu a seedu. Nižšie koncentrácie substrátu (3 μ g) a seedu (0,5 μ g) neboli postačujúce a fluorescenčný signál bol na úrovni negatívnych kontrol.

(C) Pri miešaní a inkubácii priamo v čítačke platničiek bola platnička bola inkubovaná pri teplote 37 °C, miešanie prebiehalo po dobu 1 minúty v móde „double orbital“ pri rýchlosti 425 cpm, po ktorom nasledovalo odčítanie a 14 minútová prestávka. Otestovali sme aj zníženie koncentrácie seedu pri konštatnej koncentrácii substrátu. Už zníženie koncentrácie na polovicu (0,5 μ g) malo za následok fluorescenčný signál na úrovni negatívnej kontroly.

(D) Testovali sme tiež senzitivitu pri teplote 42 °C a za podmienok miešania ako v prípade (C), vplyv prítomnosti detergentov (Triton a SDS) a agregovaného peptidu Tau dGAE. Zvýšenie teploty inkubácie malo za následok nárast fluorescenčného signálu, detergenty však signál nezlepšovali. Prítomnosť dGAE peptidu neviedla k indukcii agregácie α -Syn-His proteínu. To je dôležité z hľadiska patientských vzoriek, ktoré potenciálne môžu obsahovať aj iné agregované proteíny, ako je Tau.

(E) Následne sme porovnali dve rôzne šarže subtrátu, B1 a B2, a hoci šarža B2 preukazuje zvýšenú schopnosť agregácie, dochádza aj k neželanej agregácii bez prítomnosti seedu. Pristúpili sme preto aj k purifikácii a testovaniu natívneho α -Syn. Všetky testy boli uskutočnené v triplikátoch a do grafov B-E boli vynesené hodnoty z meraní s odstupmi po jednej hodine.



Obrázok 5: Purifikácia natívneho α -synukleínu a jeho RT-QuIC test

Na obrázku je znázornený príklad purifikácie 14,5 kDa natívneho α -synukleínu (α -Syn wt) bez tagu. Po expresii v bunkách *Escherichia coli*, ich lýze a centrifugácii bol α -Syn wt izolovaný pomocou chromatografických techník – najskôr dvomi iónomeničovými chromatografiami na kolóne HiTrap Q HP 5ml (A), následne na MonoQ kolóne Capto HiRes Q 5/50 (B) a napokon gélovou filtráciou (C), pred ktorou boli vzorky inkubované pri teplote 100 °C po dobu 15 minút a následne centrifugované. Krok zahriatia na vysokú teplotu mal za následok odstránenie nečistôt. Obrázok zobrazuje príslušné chromatogramy a analýzu čistoty pomocou SDS-PAGE. Na SDS-PAGE géloch sú znázornené tieto dráhy:

(A) 1.-7. prietokové frakcie, 8. proteínový štandard PageRuler Plus, 9–27. každá druhá eluovaná frakcia A1-C12, 28. proteínový štandard PageRuler Plus;

(B) 1. proteínový štandard PageRuler Plus, 2–25. frakcie A1–B1, 26. proteínový štandard PageRuler Plus;

(C) 1–12. frakcie A5–B9, 13. proteínový štandard PageRuler Plus.

Na obrázku (D) je zobrazený finálny purifikovaný produkt, pričom v dráhach 2 a 3 bolo nanesené 0,5 μ g α -Syn wt a v dráhach 4 a 5 1 μ g α -Syn wt. Hoci sme nezískali α -Syn wt v čistote, akú sme dosiahli pri α -Syn-His, aj α -Syn wt bol testovaný ako substrát pomocou RT-QuIC (E). α -Syn wt vykazoval v teste zníženú schopnosť agregovať v prítomnosti seedu. Keďže prímesi môžu ovplyvniť jeho schopnosť agregovať a tým znižovať citlivosť metódy, pokračujeme ešte s optimalizáciou purifikácie natívneho α -synukleínu.