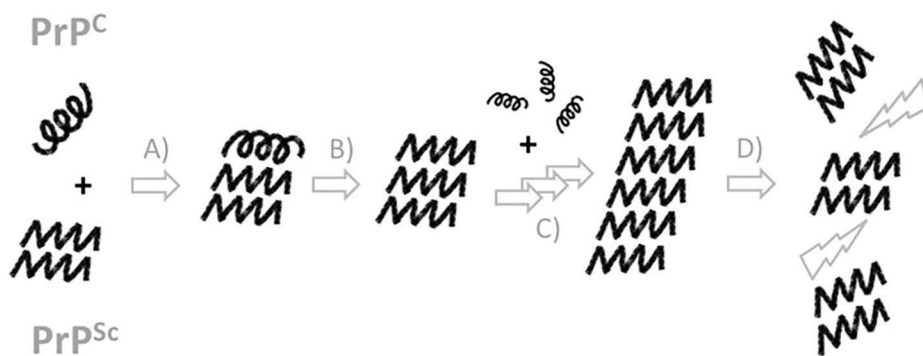


padů), opět různorodými, co se příznaků týká. Prionová onemocnění lze navíc přenést v rámci invazivních lékařských zákroků (Watson, 2021) a mohou se pak projevit u pacientů netypického stáří. Na přelomu století vzbudila velké obavy nová varianta CJN způsobená konzumací potravin kontaminovaných priony bovinní spongiformní encefalopatie, která postihovala především mladé a měla opět odlišné příznaky (Watson, 2021). Diagnostika prionových nemocí je tak díky relativní vzácnosti a vysoké heterogenitě jejich klinického obrazu obtížná a zejména na počátku klinických příznaků může docházet k záměně s jinými neurodegenerativními onemocněními. Proto se pro zpřesnění klinické diagnózy CJN využívají pomocná vyšetření, která zahrnují nález vysokých hladin proteinu 14-3-3 a nově i tau v mozkomíšním moku, typický elektroencefalografický záznam periodických trifázických vln a zvýšení intenzity signálu některých oblastí mozku při magnetické rezonanci (Jankovská, 2021). Zvýšené hladiny 14-3-3 a tau lze však nalézt i u jiných stavů spojených s rychlým rozpadem neuronů. Typický elektroencefalogram bývá přítomen jen u části pacientů a navíc až v pozdní fázi onemocnění. Hodnocení obrazu magnetické rezonance vyžaduje zkušenost a nález zvýšené intenzity signálu nebývá u všech pacientů vyjádřen stejně. Žádná z těchto metod tak není dostatečně citlivá a specifická, aby umožnila definitivní potvrzení diagnózy prionového onemocnění za života pacienta, a ta je potvrzena až pitevním neuropatologickým vyšetřením mozkové tkáně.

### Detekce prion konvertující aktivity v patientských vzorcích

Desítky let trvající výzkum věnovaný hledání více specifického biomarkeru prionových onemocnění velký pokrok nepřinesl a metody zaměřené na přímou detekci patologického prionového proteinu (PrP<sup>Sc</sup> či PrP<sup>TSE</sup>) v patientských vzorcích selhávaly kvůli jeho nízkým hladinám a neschopnosti těchto metod ho odlišit od vysokých hladin univerzálně přítomného normálního buněčného prionového proteinu (PrP<sup>C</sup>). Zásadního pokroku v diagnostice bylo dosaženo až po objasnění mechanismu replikace prionů

Obr. 1. Mechanismus propagace prionů



Prionová infekční částice tvořená oligomerem patologického prionového proteinu PrP<sup>Sc</sup> se naváže na normální buněčný prionový protein PrP<sup>C</sup> (A). Fyzickým kontaktem dochází ke změně alfa helikální konformace PrP<sup>C</sup> na patologickou, bohatou na strukturu beta skládaného listu (B). Opakování procesu vede k růstu agregátu PrP<sup>Sc</sup> za vzniku amyloidové fibrily (C). Rozštěpení fibrily uvolňuje další prionové infekční částice schopné měnit konformaci PrP<sup>C</sup> (D). Hromadění patologického PrP<sup>Sc</sup> v mozkové tkáni následně spouští rychle postupující neurodegenerativní změny.

a zopakování tohoto procesu v laboratorních podmínkách (Soto, 2011). Priony jsou infekční proteinové částice, které na rozdíl od virů a bakterií postrádají specifickou nukleovou kyselinu (DNA či RNA). Priony jsou přítomné ve tkáních pacientů nezávisle na tom, zda má prionové onemocnění sporadickou, genetickou či infekční etiologii. Informace potřebná pro množení prionů je nesena tvarem molekuly patologického prionového proteinu tvořícího infekční částici. Prionovou infekční částicí si můžeme představit jako organizovaný agregát (oligomer) molekul patologického prionového proteinu, který se od buněčného prionového proteinu liší sekundární strukturou obsahující vysoký podíl struktur beta skládaného listu. Tento oligomer PrP<sup>Sc</sup> má schopnost při kontaktu s PrP<sup>C</sup> měnit jeho nativní alfa helikální strukturu na patologickou a připojit takto pozměněnou molekulu ke stávajícímu agregátu. Dochází tak k postupnému růstu agregátů PrP<sup>Sc</sup> za vzniku amyloidových fibril. Rozlomení amyloidových fibril pak umožní vznik nových infekčních částic (Obr. 1).

Zásadní pokrok v diagnostice přinesly až metody zaměřené na detekci schopnosti prionů měnit konformaci a agregovat normální prionový protein. K průlomům došlo na konci minulého století, kdy se skupině Claudia Sota pomocí techniky zvané „Protein Misfolding Cyclic Amplification“ (PMCA) podařilo mnohonásobně zvýšit množství infekčního PrP<sup>Sc</sup> ve studovaném vzorku (Soto, 2011). Metoda byla založena na

inokulaci normálního mozкового homogennátu malým množstvím vzorku obsahujícím priony a následným střídáním fází inkubace a sonikace. Inkubace vedla k růstu agregátu PrP<sup>Sc</sup> a sonikace k jejich rozštěpení a tvorbě nových infekčních částic. Proces se cyklicky opakoval až několik týdnů. Vznikající PrP<sup>Sc</sup> byl infekční a jeho přítomnost se detekovala pomocí western blotu po ukončení amplifikace. Metoda PMCA byla sice velmi citlivá, ale díky použití sonikace obtížně standardizovatelná a pro použití v diagnostice pomalá. Změnu této situace přinesl „Real-Time Quaking-Induced Conversion assay“ (RT-QuIC) vyvinutý skupinou Byrona Caughey (Orrú, 2015). Metoda RT-QuIC využívá jako substrát pro detekci prion konvertující aktivity v patientských vzorcích v bakteriích připravený nativní prionový protein. Opět dochází ke střídání fází inkubace a fragmentace. V průběhu inkubace rekombinantní prionový protein po kontaktu s PrP<sup>Sc</sup> a změně struktury agreguje a tvorba agregátů je sledována pomocí fluorescenční sondy Thioflavinu T. Vznikající fibrily jsou následně fragmentovány intenzivním třepáním a jejich fragmenty iniciují změnu konformace a agregaci dalšího nativního substrátu (Obr. 2). Dochází tak k velké amplifikaci fluorescenčního signálu, který je sledován v reálném čase, podobně jako u kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). Metoda RT-QuIC je extrémně citlivá, schopná detekovat femtogramová (10<sup>-15</sup> g) množství patologického prionového proteinu ve vzorku. Vysoká