

---

## VARIOUS ELECTROCHEMICAL TECHNIQUES FOR PRION PROTEIN DETERMINATION

Šobrová P., Adam V., Kizek R.

Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: [pavlina.sobrova@seznam.cz](mailto:pavlina.sobrova@seznam.cz), [kizek@sci.muni.cz](mailto:kizek@sci.muni.cz)

---

### ABSTRACT

Prion diseases are fatal neurodegenerative and infectious disorders of humans and animals, characterized by structural transition of the host-encoded cellular prion protein (PrPC) into the aberrantly folded pathologic isoform PrPSc. Prion protein is a biomolecule naturally occurring in the animal cells. This protein is present in all mammal cells and occurs primarily in neural cells and immune system cells. The main aim of this study was to optimize electrochemical methods for the detection of natural (PrPC) and changed (PrPSc) prion protein. To carry out the main objective a complex study of the electrochemical behaviour of both proteins was required. For this purpose fundamental electrochemical techniques were used. Both of the prions were characterized using different techniques, their limits of detection were found at pM levels and possible ability to change the structure of  $\alpha$ -helix of natural prion (PrPC) to  $\beta$ -sheet of the infectious prion (PrPSc) were monitored.

**Key words:** prion protein; electrochemistry, adsorptive stripping technique, differential pulse voltametry, cyclic voltametry, chronopotentiometric stripping voltametry

**Acknowledgement:** The financial support from the following project NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068, NANOSEMED GA AV KAN208130801 is highly acknowledged. The author (PS) is „Holder of Brno PhD Talent Financial Aid“.

## ÚVOD

Prionový protein je přirozený protein ze zvířecích buněk. Tento protein je přítomen ve všech savcích buňkách a je exprimován zvláště v nervových buňkách a buňkách imunitního systému. Jeho fyziologická funkce je nejasná, zřejmě se podílí na synaptickém přenosu a diferenciaci buněk. Tento protein se může stát infekční. Přirozená a infekční forma proteinu se od sebe liší pouze prostorovým uspořádáním (Legname a kol., 2004). Konformační změna z alfa struktury u proteinu přirozeného (PrP<sup>c</sup>) na strukturu beta skládaného listu u proteinu pozměněného (PrP<sup>Sc</sup>) významně ovlivňuje činnost proteinu. Tato mutovaná forma je vysoce odolná vůči degradačním procesům uvnitř buňky, může se vázat na další PrP<sup>c</sup> proteiny a vyvolávat i u nich konformační změnu na PrP<sup>Sc</sup>. Nedostatek fyziologického PrP<sup>c</sup> a toxické působení špatně odbouratelného PrP<sup>Sc</sup> se pak spolupodílejí na vzniku prionových onemocnění (transitivní spongiformní encefalopatie, TSE) s klinickým obrazem progresivní neurodegenerativní choroby (Ji a Zhang, 2010). Je známo 9 hlavních onemocnění způsobených priony, z toho 4 nalézáme u člověka a 5 u zvířat. Nejčastějším lidským prionovým onemocněním (85 %) je Creutzfeldt-Jakobova nemoc (CJN). Z nemocí zvířat je nejznámější Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) tzv. nemoc šlenu krávy. Po pozření potravin kontaminovaných priony nemocné krávy se u člověka může vyvinout nová varianta lidské Creutzfeldt-Jakobovy nemoci (Ironsíde) (Coste, 2011). Existují i hypotézy, že priony mohou mít vztah k dalším neurodegenerativním onemocněním, jako je Alzheimerova nebo Huntingtonova choroba (Yokoyama a Mohri, 2008).

S vypuknutím epidemie a případu odhalení BSE téměř všude v Evropě vyvstává otázka, jak zdokonalit screeningové metody a možnosti detekce prionů. Nezbytnost koordinace vědeckých projektů podpořila už v roce 1996 Evropská komise, která stanovila akční plán zaměřený na podporu výzkumu prionů, ale i všech souvisejících oblastí, organizovaných na evropské úrovni. I přesto, že se v současné době výskyt prionových onemocnění u zvířat díky dostatečné kontrole a dodržování zásad správné hygienické praxe klesl, a tudíž nepředstavuje velké riziko přenosu na člověka, je toto téma stále aktuální. O stále aktuálnosti tohoto tématu svědčí i fakt, že je od roku 2007 vydáván ISI indexovaný časopis zabývající se pouze problematikou prionů se stejnojmenným názvem „Prion.“ Obtížnost sledování a detekce vyplývá v první řadě z dlouhé inkubační doby, tedy období, kdy nejsou patrné žádné příznaky. Nemoc je známá poměrně krátkou dobu a odborníci tedy ještě nejsou schopni minimální inkubační dobu stanovit. Proto nelze říct, že zvíře, které nevykazuje žádné příznaky, je skutečně zdravé. Dalším problémem je metoda detekce. Jedním ze směrů současného výzkumu je další zvyšování citlivosti těchto testů natolik, abychom byli schopni stanovit i nepatrná množství prionu. Další cestou je nalézt způsob, jak vyhledat a identifikovat molekuly, které se zřejmě objeví v krvi ve chvíli, kdy dojde k infekci. Nejedná se tedy jenom

o detekci samotných prionů, ale i fyziologických známek jejich přítomnosti v organismu (Foster, 2000).

## MATERIÁL A METODIKA

### Chemikálie

Prionový protein a další použité chemikálie byly zakoupeny od Sigma Aldrich (St. Louis, USA). K přípravě pufrů a standardních roztoků prionů byla použita voda ACS čistoty od Sigma Aldrich. Při přípravě pufrů byly pH hodnoty měřeny pomocí přístroje WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Německo), řízeného počítačem se softwarem (MultiLab Pilot, Weilheim, Německo).

### Elektrochemické měření

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodevém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0.4 mm<sup>2</sup>; referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda.

### *Adsorptivní přenosová technika (AdTS)*

Adsorptivní přenosová technika je metoda, při níž je stanovovaná látka na pracovní visící rtuťovou kapkovou elektrodu danou dobu akumulována z kapky vzorku, poté je přebytek vzorku omyt a zahájeno měření pomocí vybrané elektrochemické techniky v klasickém tříelektrodevém zapojení (Adam a kol., 2005), viz Obr. 1A. Díky této technice je umožněna elektrochemická analýza z velmi malého objemu vzorku (3 až 10 μl).

### *Cyklická voltametrie (CV)*

Prionový protein byl studován pomocí cyklické voltametrie. množství adsorbovaného vzorku byla 5 μl. Doba akumulace 100 s. Základní elektrolyt použitý pro měření byl fosfátový pufr o pH 7.38 o obsahu 5 ml v elektrochemické měřící nádobce. Parametry CV jsou následující: počáteční potenciál 0 V, konečný potenciál -1.9 V, krok potenciálu 2.44 mV, rychlost skenu 20 mV/s. Veškeré experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě (22-24 °C).

### *Diferenční pulzní voltametrie (DPV)*

Množství prionových proteinů jsme zjišťovali pomocí DPV. Základní elektrolyt byl: 0.5 M fosfátový pufr o pH škále od 5.59 do 8.04, borátový pufr v pH rozpětí od 7.09 do 9.11 a acetátový pufr o pH škále od 3.8 do 5.6. AdTS DPV parametry jsou následující: počáteční potenciál -0.2 V, konečný potenciál -0.8 V, modulovací čas 0.057 s, časový interval 0.2 s, krok potenciálu 1.05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, Eads = 0 V. Veškeré experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě (22-24 °C). Standardy prionů byly před vlastním měřením probublávány argonem (99.999%) po dobu 120 s.

### *Diferenční pulzní voltametrie ve spojení s Brdičkovou reakcí*

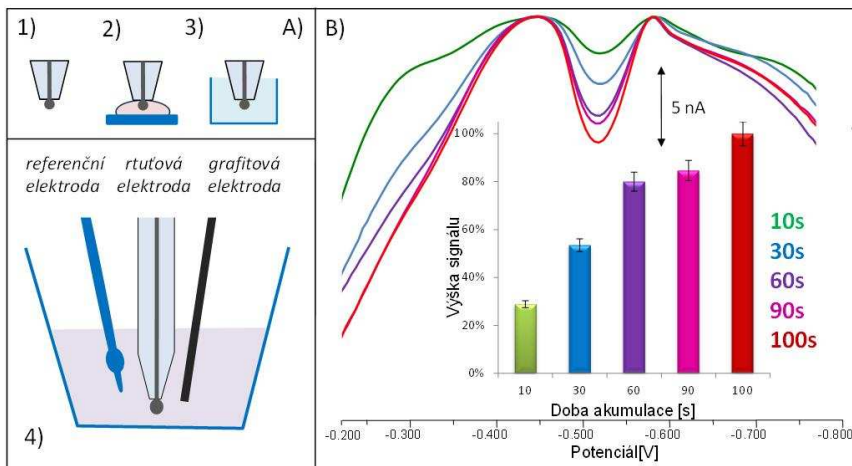
Základní elektrolyt (1 mmol.dm<sup>-3</sup> Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub> a 1 mol.dm<sup>-3</sup> amonný pufr; NH<sub>3</sub>(aq) + NH<sub>4</sub>Cl (Sigma Aldrich, ACS), pH = 9.6) byl po každých 3 analýzách vyměněn. AdTS DPV parametry byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál -0.6 V, konečný potenciál -1.6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0.2 s, potenciálový krok 1.05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, Eads = 0 V, teplota 20 °C.

#### *Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza - H pík*

Adsorptivní přenosová technika ve spojení s chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou (CPSA) byla použita pro stanovení prionových proteinů pomocí detekce derivace potenciálu za jednotku času. (dE/dt)-1 jako funkce potenciálu E (Kizek a kol., 2001). CPSA parametry byly: Istr -1 μA, teplota 20 °C, základní elektrolyt 0.1 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> + 0.05 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (pH 8.0).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

V naší práci jsme nejprve věnovali pozornost charakterizaci prionových proteinů PrPC and PrP<sup>Sc</sup> (prion protein fragment 118 – 135; FW = 1232.3 a β – sheet breaker peptide, FW = 1597.9) pomocí elektrochemických technik. Zaměřili jsme se na hledání optimálních podmínek jejich stanovení, jako je způsob dávkování jednotlivých vzorků, pH a druh elektrolytu, doba akumulace a teplota základního elektrolytu u jednotlivých testovaných elektrochemických metod. Zjistili jsme, že z hlediska dávkování vzorku je nejlepší způsob použití adsorptivní přenosové techniky (AdTS), která umožňuje analýzu velmi nízkých koncentrací z velmi malého množství vzorku (5 μl) ve srovnání s dávkováním vzorku přímo do elektrolytu v elektrochemické nádobce. AdTS nám umožní adsorbovat velmi malé množství vzorku přímo na rtuťovou kapku (Obr. 1A) a tak nedochází k naředění vzorku jako při nadávkování do elektrolytu. Dále jsme zkoumali vliv pH v závislosti na elektrochemické odezvě a zjistili jsme, že ze škály pH od 5.59 do 9.11 nám dává největší elektrochemickou odezvu právě pH 7.38 a to jednak při použití fosfátového, tak i borátového pufru. Při porovnání doby akumulace vzorku na rtuťovou elektrodu byla nejvyšší odezva pozorována při době akumulace 100 s (Obr. 1B). Při delší době akumulace již nedocházelo k dalšímu nárůstu elektrochemické odpovědi. Námi zoptimalizované parametry jsme nadále aplikovali na metody cyklické voltametrie a diferenční pulsní voltametrie. Další metodou byla Brdičkova reakce ve spojení s diferenční pulsní voltametří. Tato metoda byla s úspěchem použita pro detekci proteinů jako metalothionein (Petrova a kol., 2006), kde za použití adsorptivní přenosové techniky je možno dosáhnout až atomolární koncentrace. V naší práci jsme aplikovali stejné podmínky a dosáhli jsme detekčního limitu 50 pmol v 5 μl. Pro stanovení proteinů pomocí metody CPSA byly využity podmínky autorů Kizek a kol. (Kizek a kol., 2001), kde se pomocí této metody podařilo detekovat až femtomolární množství proteinů. Za použití stejných podmínek se nám podařilo dosáhnout detekčního limitu 100 fmol v 5 μl.



Obr. 1. A. Schéma použití adsorptivní přenosové techniky použité pro studium prionů. (1) obnovitelná rtuťová elektroda, (2) vazba prionu na elektrodu, (3) omytí ostatních nízkomolekulárních látek. B. Závislost výšky signálu na době akumulace. Výška signálu se zvyšuje se zvyšující se dobou akumulace. Nejvyšší signál byl pozorován při době akumulace 100 s.

## ZÁVĚR

V této práci se nám podařilo definovat prionový protein pomocí elektrochemických technik, jako je cyklická voltametrie, diferenční pulzní voltametrie, Brdičkova reakce ve spojení s diferenční pulzní voltametří a chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza. Díky použití adsorptivní přenosové techniky se nám podařilo dosáhnout velmi nízkých limitů detekce z minimálního množství vzorku, což může hrát klíčovou roli pro detekci prionů z biologických materiálů.

## LITERATURA

- Adam V., Petrlova J., Potesil D., Zehnalek J., Sures B., et al. (2005): Study of metallothionein modified electrode surface behaviour in the presence of heavy metal ions - biosensor. *Electroanalysis* 17(18):1649-1657.
- Coste J. (2011): Biological diagnosis of the the prion agent in the variant of Creutzfeldt-Jakob disease: development of a screening test on blood. *Virologie* 15(2):133-135.
- Foster P.R. (2000): Prions and blood products. *Annals of Medicine* 32(7):501-513.
- Ironside J.W. (2010): Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Haemophilia* 16(175-180).
- Ji H.F., Zhang H.Y. (2010): beta-sheet constitution of prion proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 35(3):129-134.
- Kizek R., Trnkova L., Palecek E. (2001): Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. *Analytical Chemistry* 73(20):4801-4807.

**MENDELNET 2011**

Legname G., Baskakov I.V., Nguyen H.O.B., Riesner D., Cohen F.E., et al. (2004): Synthetic mammalian prions. *Science* 305(5684):673-676.

Petrova J., Potesil D., Mikelova R., Blastik O., Adam V., et al. (2006): Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochimica Acta* 51(24):5112-5119.

Yokoyama T., Mohri S. (2008): Prion diseases and emerging prion diseases. *Current Medicinal Chemistry* 15(9):912-916.