

FEMTOGRAM ELECTROCHEMICAL SENSING OF PRION PROTEINS USING QUANTUM DOTS

FEMTOGRAMOVÉ ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ PRIONOVÝCH PROTEINŮ POMOCÍ KVANTOVÝCH TEČEK

Šobrová P.¹, Zítka O.^{1,2}, Ryvolová M.^{1,2}, Janů L.¹, Adam V.^{1,2}, Kizek R.^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: pavlina.sobrova@seznam.cz

ABSTRACT

The prion protein (PrP) is involved in neurodegeneration via its conversion from the normal cellular form, PrP^C, to the infectious form, PrP^{Sc}, which is the causative agent of the transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) including Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). In spite of great effort in this field, diagnostics of prion protein caused diseases represents a sort of challenge. In this study, we aimed our attention on studying of prion protein interaction with CdTe quantum dots (QDs) by voltammetry as a new and extremely sensitive tool for sensing of these proteins. Primarily, we characterized fluorescent and electrochemical properties of QDs. Further, electrochemical study of their interactions was carried out to find the most suitable conditions for sensitive detection of prion proteins. Detection limit (3 S/N) was estimated as 1 fg in 5 μ l. This makes labelling of proteins with QDs of great importance due to easy applicability and possibility to use in miniaturized devices, which can be used *in situ*. In addition, we also tested stability of the dots *in vitro* and *in vivo* using our ultrasensitive and optimized electrochemical method.

Key words: Quantum Dot; Prion; Electrochemistry; Differential Pulse Voltammetry

Acknowledgments: The financial support from the following project IGA FA MENDELU IP 5/2012 is highly acknowledged.

ÚVOD

Infekční prionový označovaný jako PrP^{Sc} je pozměněnou formou přirozeně se vyskytujícího prionu (PrP^C), který se vyskytuje v savčích buňkách. Infekčnost tohoto proteinu je dána konformační změnou jeho struktury z α -helixu u PrP^C na konformaci β -skládaného listu PrP^{Sc}. Výsledkem této změny je mimořádná odolnost vůči různým fyzikálním vlivům, vysoká odolnost proti enzymům štěpícím protein a schopnost navazovat se na zdravé formy prionových proteinů a konvertovat je infekční formu. Patofyziologické funkce PrP^{Sc} a jejich role v procesech vedoucích k degeneraci mozku u pacientů trpících přenosnými spongiformními encefalopatiemi dosud nebyly dostatečně objasněny (Damberger, a kol., 2011, Schreuder, a kol., 1996). Mezi nejvýznamnější prionové onemocnění patří Creutzfeldt–Jacobova nemoc (CJD), Gerstmann–Straussler–Scheinker syndrom a kuru u lidí stejně jako scrapie u ovcí a bovinní spongiformní encefalopatie u krav (nemoc šílených krav). Všechny tyto nevy léčitelné nemoci jsou způsobeny nevratnými změnami v mozkové tkáni s následnou tvorbou amyloidních plaků (Prusiner, 2012).

Obtížnost diagnostiky těchto onemocnění vyplývá v první řadě z dlouhé inkubační doby, tedy období, kdy nejsou patrné žádné příznaky, která může trvat od několika měsíců až po celá desetiletí. Ke klinickým příznakům TSE, které se ovšem objevují v pokročilých stádiích onemocnění, patří demence a ztráta pohybu a koordinace. Neuropatologické vyšetření obvykle odhalí hluboké astrocytické gliosy a spongiformní změny, které bývají někdy doprovázené vznikem amyloidních plaků. Na rozdíl od jiných infekčních onemocnění způsobených viry nebo bakteriemi je obtížné prionové onemocnění diagnostikovat pomocí konvenčních metod, jako jsou PCR, sérologie nebo testy buněčných kultur. Laboratorní diagnostika TSE je dále komplikována nerovnoměrným rozdělením původců TSE v tělních tkáních, kdy nejvyšší koncentrace se nachází v tkáních nervového systému a velmi nízké koncentrace ve snadno přístupných tělních tekutinách, jako jsou krev nebo moč (Bannach, a kol., 2012, Dagdanova, a kol., 2010). Prionové onemocnění jsou obvykle diagnostikovány klinicky a následně potvrzeny histopatologickým vyšetřením mozkové tkáně prováděným post-mortem. Jediný spolehlivý molekulární marker pro prionové onemocnění je přítomnost abnormální formy PrP^{Sc}, patologicky konformačně pozměněné, která se hromadí v centrálním nervovém systému a v menší míře i v lymforetikulární tkáni. V případech BSE je k dispozici několik komerčních diagnostických souprav, které jsou založeny na imunochemické detekci přítomnosti PrP^{Sc} v mozkové tkáni post-mortem. V současné době neexistuje žádný diagnostický test pro rychlou a spolehlivou detekci prionových chorob u zvířat nebo lidí z tělních tekutin. Nové diagnostické techniky zaměřené na zvýšení citlivosti a specifčnosti PrP^{Sc} detekce a na identifikaci nových náhradních ukazatelů jsou nyní intenzivněji vyvíjeny (Kubler, a kol., 2003, Sobrova, a kol., 2012, Sobrova, a kol., 2012). Jedním ze směrů

současného výzkumu je další zvyšování citlivosti dosud dostupných testů natolik, abychom byli schopni stanovit i nepatrná množství prionu, která se vyskytují v tělních tekutinách. Další cestou je nalézt způsob, jak vyhledat a identifikovat molekuly, které se objeví v krvi ve chvíli, kdy dojde k infekci. Nejedná se tedy jen o detekci samotných prionů, ale i fyziologických známek jejich přítomnosti v organizmu (Foster, 2000). Z pohledu toho, že koncentrace pozměněných prionových proteinů v tělních tekutinách je velmi nízká, je třeba hledat způsoby, jak zvýšit citlivost jejich stanovení. V posledních letech se ukazuje, že různé způsoby značení biomolekul pomocí fluorescenčních či jiných značek, je velmi výhodné pro detekci biomolekul s možností snížit detekční limity o několik řádů. Kvantové tečky, polovodičové materiály o velikosti jednotek až desítek nanometrů, představují jednu skupinu těchto značek. Proto jsme se v naší práci zaměřili na možnosti značení prionových proteinů pomocí kvantových teček a následnou detekci tohoto komplexu nejen fluorescenčními metodami, ale především elektrochemickými, protože kvantové tečky obsahují těžké kovy, které je možné velmi citlivě detekovat pomocí elektrochemických metod.

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).

Příprava kvantových teček

Pro syntézu kvantových teček bylo použito: 2 ml CdCl_2 ($0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a naředěno do 42 ml. Dále byl přidán trisodium citrát dihydrát (100 mg), Na_2TeO_3 (0.01 M, 4 ml), MPA (119 mg) a NaBH_4 (50 mg). Molární poměr $\text{Cd}^{2+}/\text{MPA}/\text{Te}$ byl 1:7:0.25. Roztok byl v uzavřené skleněné reakční nádobce umístěn do mikrovlnného reaktoru. Parametry syntézy byly: 180 °C, 800 W a 20 minut. Po dokončení byly vzorky ochlazeny na 50 °C a odstředěny při 25000 RCF po dobu pěti minut.

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^2 ; referenční elektrodou byla $\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$ 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 tříelektrodovém zapojení (Adam, a kol., 2005). Díky této technice je umožněna elektrochemická analýza z velmi malého objemu vzorku (3 až 10 μl).

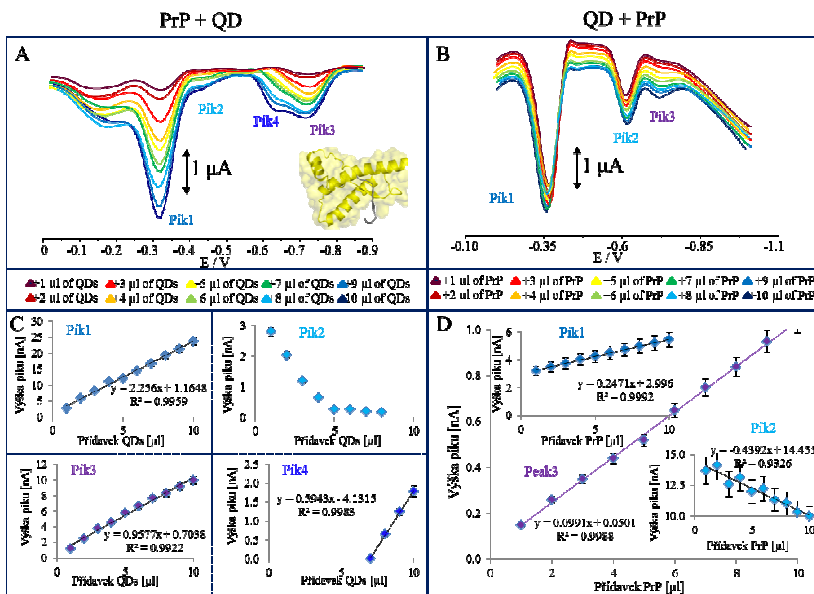
Diferenční pulzní voltmetrie (DPV)

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 $-0,2\text{ V}$, konečný potenciál $-0,8\text{ V}$, modulovací čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, krok potenciálu 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, $E_{\text{ads}} = 0\text{ V}$. Veškeré experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě (22–24 °C). Standardy prionů byly před vlastním měřením probublávány argonem (99,999%) po dobu 120 s.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci jsme se zaměřili na studování proteinů, což jsou biomolekuly přirozeně se vyskytující v živočišných buňkách. Pro tyto účely jsme využili QD, které mají díky merkaptopropionové kyselině na svém povrchu vysokou afinitu vůči proteinům. Smíchali jsme prionové proteiny v poměru 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:7, 1:8, 1:9 a 1:10 a nechali interagovat 24 hodin ve tmě při 35 °C. Tato směs byla následně analyzována za pomoci adsorptivní přenosové techniky (AdTs) ve spojení s diferenční pulzní voltmetrií. Při konstantní koncentraci prionových proteinů a zvyšující se koncentrací kvantových teček nám voltamogram poskytoval 3 píky (obr. 1A). Při zvyšování koncentrace QD docházelo k nárůstu všech píků a začátku tvorby píku 4. Z výsledků je zřejmé, že píky 1, 3, 4 jsou přímo úměrné koncentraci, což je důležitá charakteristika pro posuzování koncentrace prionových proteinů (obr. 1B). Při posuzování komplexu QD-prion z pohledu konstantní koncentrace QD a zvyšující se koncentrace prionového proteinu je zřejmé, že u všech koncentrací jsou znatelné pouze 3 píky (Pík 1, 2, 3). Pík 4 se již nevyskytuje (obr. 1B). Pík 1 a 3 rostou lineárně s rostoucí koncentrací prionu, což dokazuje závislost na koncentraci prionového proteinu (obr. 1D). Pík 2 se snižuje s rostoucí koncentrací prionu. Z výšky píků jasně vyplývá, že Pík 1 je nejcitlivější pro posuzování koncentrace komplexu QD-prion. Proto jsme se zaměřili svou pozornost najít detekční limit. Detekční limit byl dle kalibrační závislosti, která byla měřena v rozpětí od $1 \cdot 10^{-5}$ do 4 $\mu\text{g/ml}$ (75 fg/5 μl do 20 $\mu\text{g/ml}$). Získaná závislost byla logaritmická, což může být způsobeno přítomností dalších elektroaktivních částic. Striktně lineární části byla nalezena v intervalu od 0,05 ng/ml do 4 ng/ml. Mez detekce (3 S/N) byla stanovena 1 fg v 5 ul. Značení proteinů za pomoci QD má velký význam z hlediska snadné použitelnosti a možnost využití v miniaturních zařízeních.

Obr. 1 Závislost signálu na koncentraci komplexu QD-prion. A) při konstantní koncentraci prionu a vzrůstající koncentraci QD B) při konstantní koncentraci QD a zvyšující se koncentrace prionového proteinu. C, D) závislosti jednotlivých píků na výšce signálu.



ZÁVĚR

QD, miniaturní, světlo emitující krystalky se jeví jako slibná fluorescenční značka pro buněčné a biomolekulární značení. Ve srovnání s organickými barvivy a fluorescenčními proteiny, mají QD unikátní optické a elektronické. V této práci jsme zjistili, že kvantové tečky mají rovněž výborné elektrochemické vlastnosti, díky nimž mohou být použity jako excelentní elektroaktivní značka pro stanovení prionových proteinů. Komplex QD-protein je vysoce stabilní a může být kvantifikován ve velmi malých objemech. Tento objev může otevřít nové možnosti stanovení těchto proteinů a to nejen u živočišných tkání, ale i rezidua na chirurgických nástrojích a dalších typech takto potenciálně kontaminovaných materiálů.

LITERATURA

Adam V., Petrlova J., Potesil D., Zehnalek J., Sures B., Trnkova L., Jelen F., Kizek R. (2005): Study of metallothionein modified electrode surface behaviour in the presence of heavy metal ions - biosensor. *Electroanalysis*, 17(18): 1649-1657.

Bannach O., Birkmann E., Reinartz E., Jaeger K. E., Langeveld J. P. M., Rohwer R. G., Gregori L., Terry L. A., Willbold D., Riesner D. (2012): Detection of Prion Protein Particles in Blood Plasma of Scrapie Infected Sheep. *Plos One*, 7(5).

Dagdanova A., Ilchenko S., Notari S., Yang Q. W., Obrenovich M. E., Hatcher K., Mcanulty P., Huang L. Q., Zou W. Q., Kong Q. Z., Gambetti P., Chen S. G. (2010): Characterization of the Prion Protein in Human Urine. *Journal of Biological Chemistry*, 285(40): 30489-30495.

Damberger F. F., Christen B., Perez D. R., Hornemann S., Wuthrich K. (2011): Cellular prion protein conformation and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(42): 17308-17313.

Foster P. R. (2000): Prions and blood products. *Annals of Medicine*, 32(7): 501-513.

Kubler E., Oesch B., Alex J. R. (2003): Diagnosis of prion diseases. *British Medical Bulletin*, 66(267-279).

Prusiner S. B. (2012): A Unifying Role for Prions in Neurodegenerative Diseases. *Science*, 336(6088): 1511-1513.

Schreuder B. E. C., Vankeulen L. J. M., Vromans M. E. W., Langeveld J. P. M., Smits M. A. (1996): Preclinical test for prion diseases. *Nature*, 381(6583): 563-563.

Sobrova P., Ryvolova M., Adam V., Kizek R. (2012): Capillary electromigration based techniques in diagnostics of prion protein caused diseases. *Electrophoresis*, in press(

Sobrova P., Ryvolova M., Hynek D., Adam V., Hubalek J., Kizek R. (2012): Electrochemical behaviour of native and denatured β -sheet breaker prion protein. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7(2): 928-942.