

Název: **Detekce prionových proteinů a jejich interakce s kovy a metalothioneinem**

Školitel: Alžběta Cardová, Vojtěch Adam

Datum: 21. 3. 2014

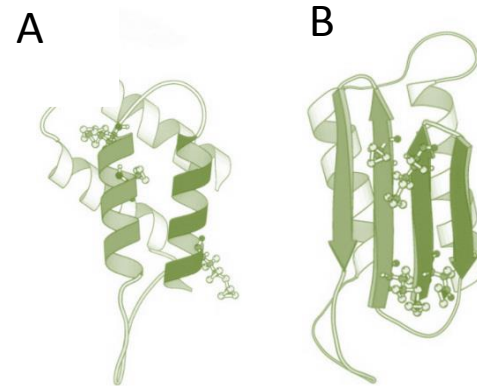
Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik



# Priony

- **Buněčný prionový protein (PrP<sup>C</sup>)** - protein přirozeně přítomný v mozku, konformace  $\alpha$ -šroubovice
- **Patologická forma prionu (PrP<sup>Sc</sup>)** - odolnost ke štěpení enzymy, konformace  $\beta$ -skládaného listu
- Hromadění PrP<sup>Sc</sup> - **transmisivní spongiformní encefalopatie**



Obr. 1: A) PrP<sup>C</sup>, B) PrP<sup>Sc</sup>.

Převzato a upraveno dle: Huang Z., Prusiner S. B., Cohen F. E.:  
*Current topics in microbiology and immunology*, 207, 49 (1996).

# Prionový protein, kovy a metalothionein

- **Cu(II) a Zn(II) ionty** - jsou vázány PrP<sup>C</sup>, který je může transportovat a udržovat jejich rovnováhu, zapojují se do procesu neurodegenerace
- **Cu(II)** mohou usnadnit konverzi PrP<sup>C</sup> na PrP<sup>Sc</sup>
- **Metalothionein (MT)** - udržování rovnovážné koncentrace zinku a mědi, ochrana proti toxicitě těžkých kovů
- **MT-III** - mozkově specifická izoforma MT, snížení exprese MT-III může vést k formaci neurofibrilárních shluků

# Cíle práce

Cílem této práce byla charakterizace prionových proteinů za pomoci moderních analytických metod:

1. Izolace a purifikace rekombinantního lidského prionového proteinu
2. Optimalizace elektrochemických metod pro výzkum PrP<sup>C</sup>
3. Elektrochemická detekce PrP<sup>C</sup> a jeho interakcí s esenciálními kovy Cu(II), Zn(II) a MT
4. Sledování hladiny MT-III ve zdravých a prion-infikovaných myších mozkových tkáních různých genotypů.

# Metodika

- Klonování lidského prionového proteinu v *E. coli* - pRSET B cloning kit (Invitrogen).
- Elektrochemická měření - diferenční pulzní voltametrie (DPV) v klasickém zapojení tří elektrod.
- Sledování exprese MT-III – metody SDS-PAGE a western blot s anti-MT-III protilátkou.

# Diferenční pulzní voltametrie

**Měření prionových proteinů a metalothioneinu** - adsorptivní přenosová technika (AdTS), 5  $\mu\text{l}$  vzorku, 5 ml elektrolytu, doba adsorpce 120 s.

**Měření kovů** - klasické měření v nádobce, 1980  $\mu\text{l}$  elektrolytu, 20  $\mu\text{l}$  vzorku.

Analyzované vzorky byly zbaveny kyslíku pomocí probublávání argonem po dobu 120 s.

Vzorky:

**Prionový protein** = lidský rekombinantní prionový protein izolovaný z *E. coli*

**Standard mědi** =  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ; FW = 241,60 (Sigma Aldrich)

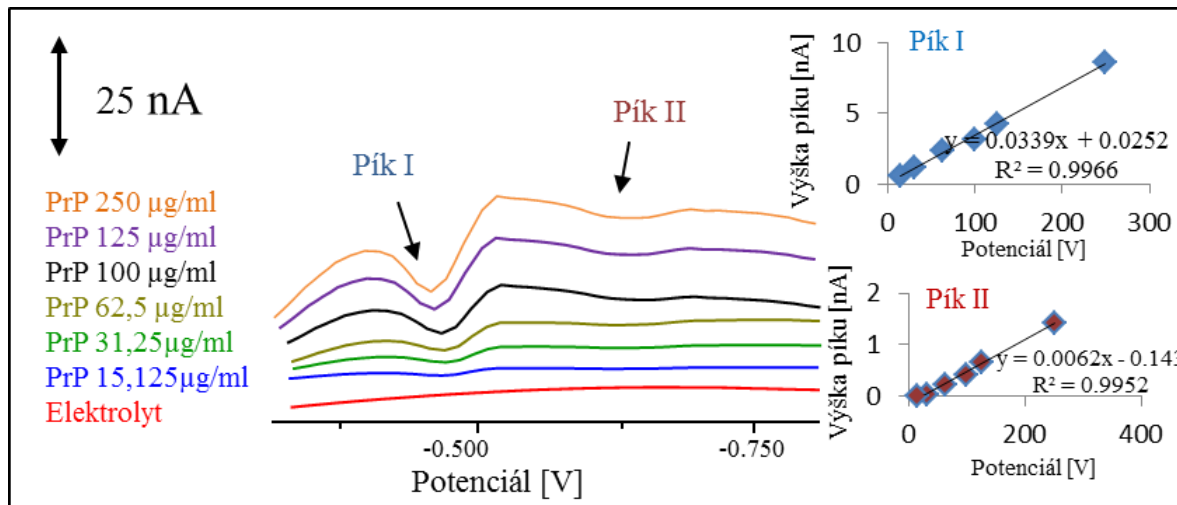
**Standard zinku** =  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ; FW = 297,49 (Sigma Aldrich)

**Metalothionein** = Zinc Metallothionein; Zn-MT65 (Ikzus Proteomics)

# Výsledky

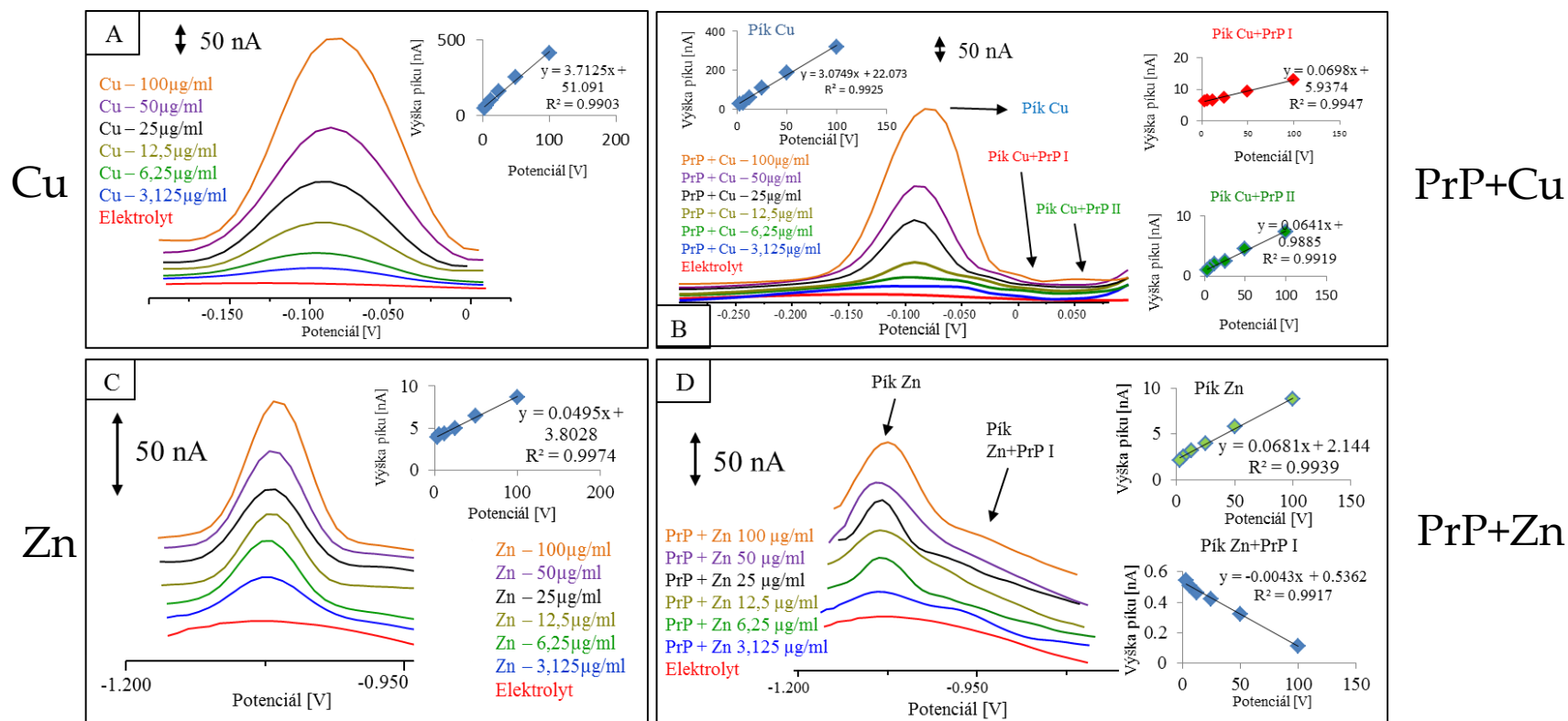
Elektrochemická detekce lidského buněčného prionového proteinu (PrP<sup>C</sup>) pomocí diferenční pulzní voltametrie.

PrP



- Měřeno v acetátovém pufru pH 5
- Elektrochemický signál koresponduje s koncentrací.
- Závislost obou píků je lineární ( $R^2$  vyšší než 0.9)

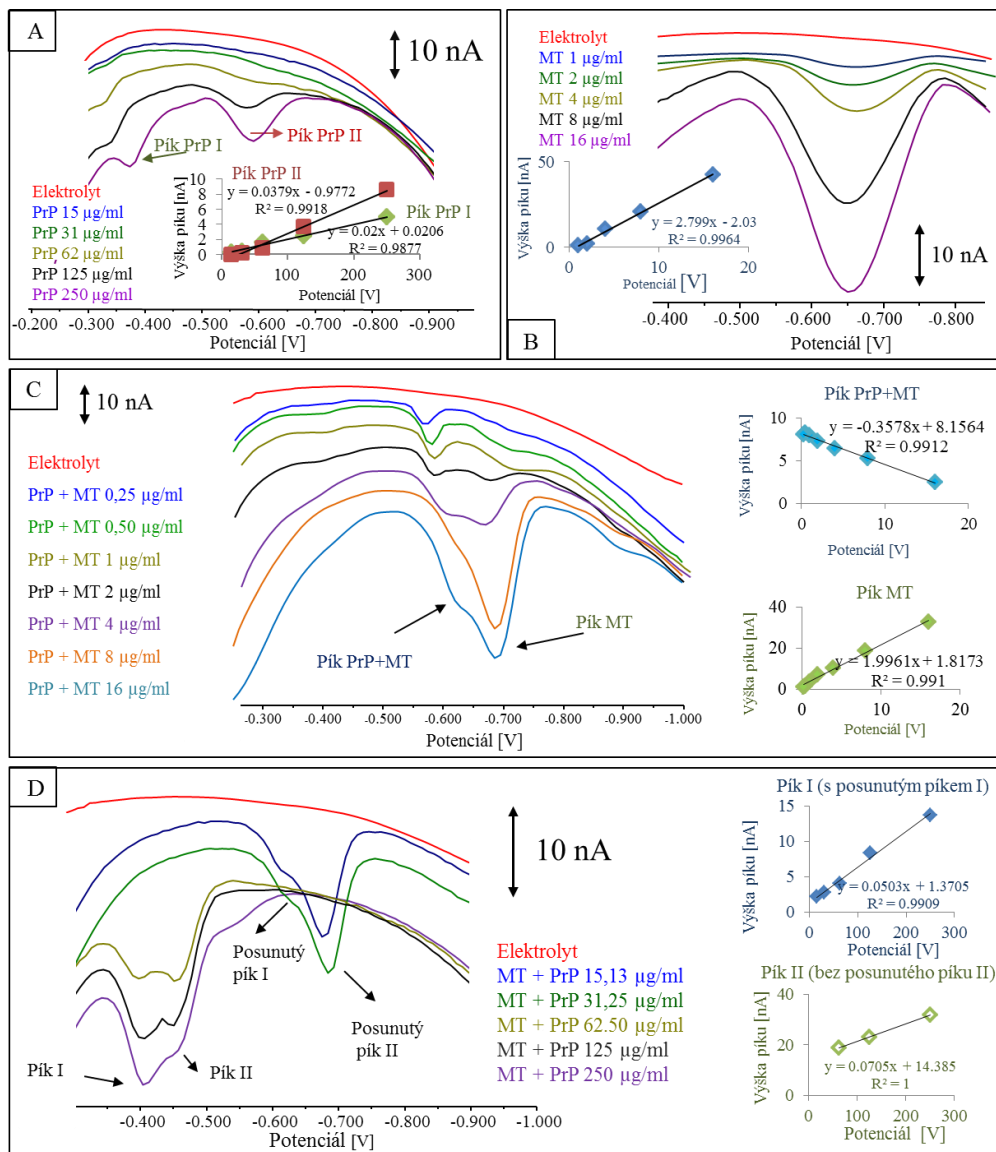
Elektrochemická detekce a kalibrační křivky buněčného prionového proteinu (PrP<sup>C</sup>), mědi, zinku a jejich interakcí pomocí diferenční pulzní voltametrie (DPV): A) měď; B) interakce PrP<sup>C</sup> a mědi; C) zinek; D) interakce PrP<sup>C</sup> a zinku



- Měřeno v acetátovém pufru pH 5
- Elektrochemický signál koresponduje s koncentrací.
- Závislost obou píků je lineární ( $R^2$  vyšší než 0.9)



# Elektrochemická detekce a kalibrační křivky buněčného prionového proteinu (PrP<sup>C</sup>), metalothioneinu (MT) a jejich interakcí pomocí diferenční pulzní voltametrie: A) PrP<sup>C</sup>; B) MT; C) interakce PrP<sup>C</sup> a MT; D) interakce MT a PrP<sup>C</sup>

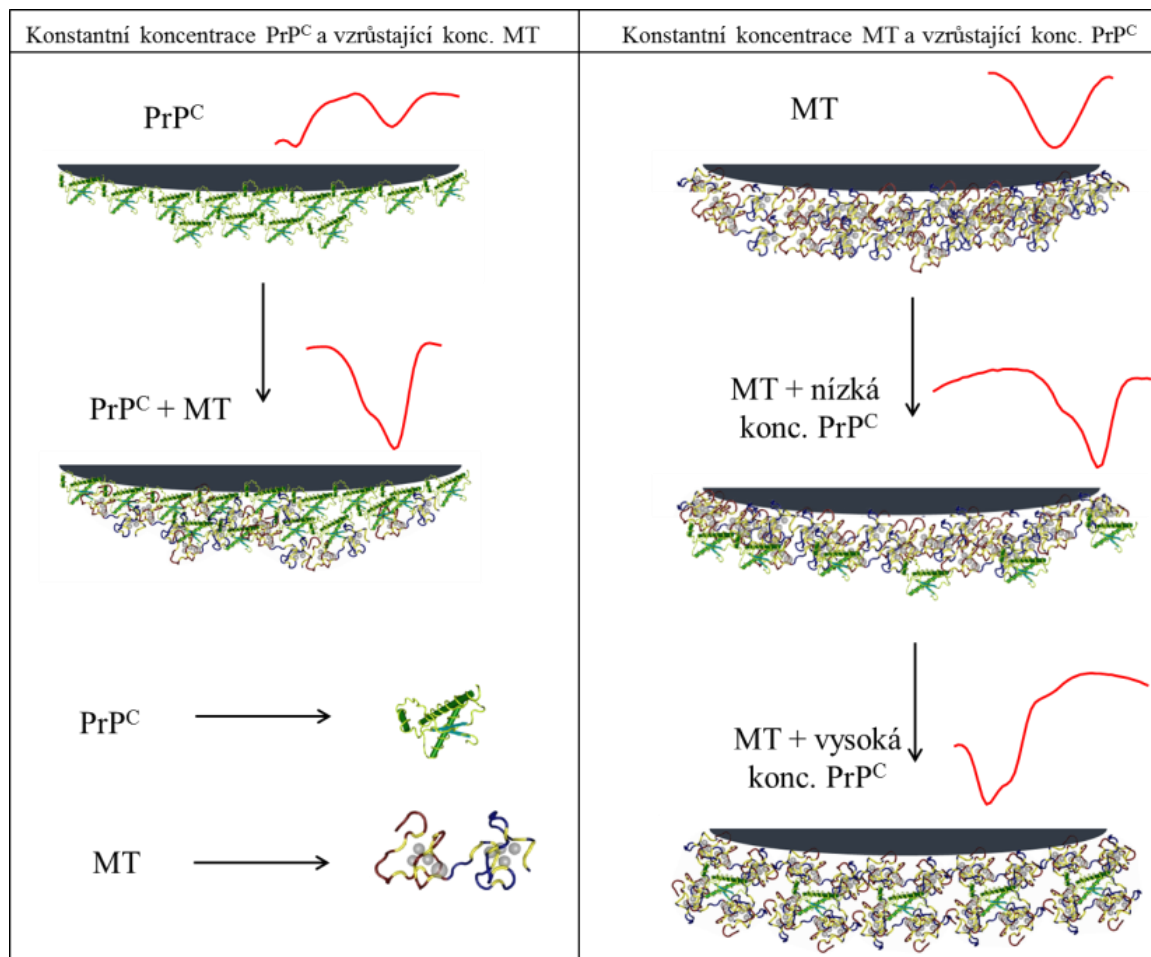


- Fosfátový pufr pH 7
- Elektrochemický signál koresponduje s koncentrací
- Závislost píků je lineární ( $R^2$  vyšší než 0.9)

- V případě měření PrP<sup>C</sup> a MT interakce dochází ke splynutí 2 píků

- V případě měření MT a PrP<sup>C</sup> interakce dochází se zvyšováním koncentrace k posunu píku do nové pozice.

# Nákres předpokládaných interakcí mezi buněčným prionovým proteinem ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) a metalothioneinem (MT) na povrchu rtuťové elektrody



Na levé straně obrázku můžeme vidět schéma interakce konstantní koncentrace  $\text{PrP}^{\text{C}}$  se vzrůstající koncentrací MT na povrchu rtuťové kapkové elektrody.

Na pravé straně obrázku je pak možné pozorovat schéma interakce MT o konstantní koncentraci se vzrůstající koncentrací  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . Při vysoké koncentraci  $\text{PrP}^{\text{C}}$  tvoří MT tetramery, které do sebe molekulu  $\text{PrP}^{\text{C}}$  uzavírají a charakter elektrochemického signálu se výrazně mění.

# Sledování hladiny MT-III pomocí western blotu

Použité protilátky:

- Protilátka proti PrP<sup>C</sup>: **Sha31** (Cambridge Bioscience)
- Protilátka proti MT-III: **anti-MT-III** (Dr. Scott Garret)

## Vzorky neinfekčních myších mozkových tkání

Myš divokého typu  
(genotypy  
C57BL/6, CD1, C57)



Myš se zvýšenou expresí PrP<sup>C</sup>  
(genotyp TGA 20)

Myš bez PrP<sup>C</sup> (knock-out)  
(genotyp PrP<sup>-/-</sup>)

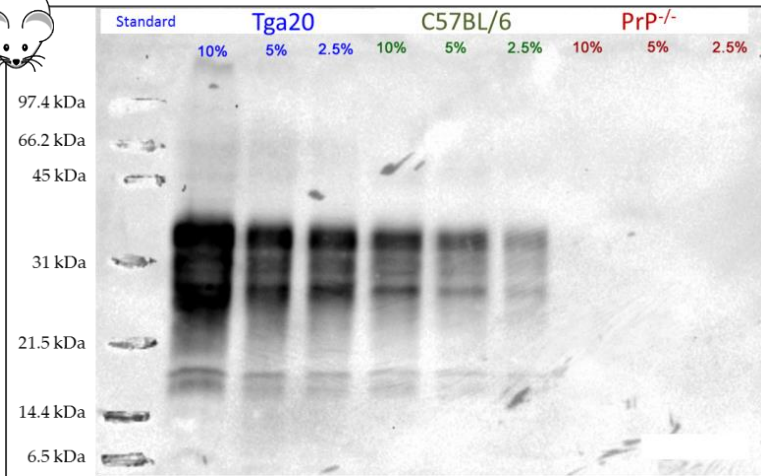
## Vzorky prion-infekčních myších mozkových tkání

Prion-infekční myš  
(genotypy RML, ME7,  
470-87A, 28-ME7, 37-221C,  
46-ME7, 475-87A, 65-221C,  
634-221C-variant)



## Ověření identity vzorků pomocí western blotu s anti-PrP protilátkou

## Sledování hladiny MT-III v neinfekčních mozkových tkáních

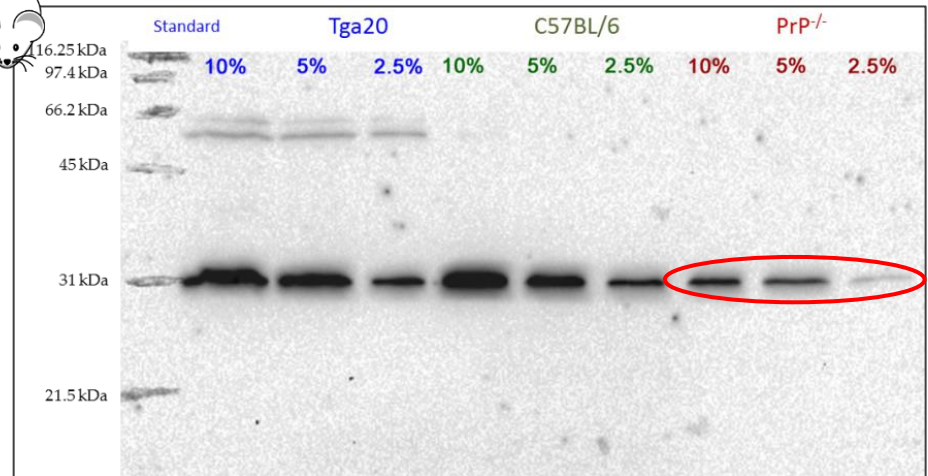


*Dráha č. 1 – hmotnostní standard*

*Dráha č. 2, 3, 4 – vzorky genotypu Tga20 (myš exprimující PrP v nadbytku)*

*Dráha č. 5, 6, 7 – vzorky genotypu C57BL/6 (myš divokého typu, normální exprese PrP)*

*Dráha č. 8, 9, 10 – vzorky genotypu PrP<sup>-/-</sup> (myš postrádající prionový protein).*



*Dráha č. 1 – hmotnostní standard*

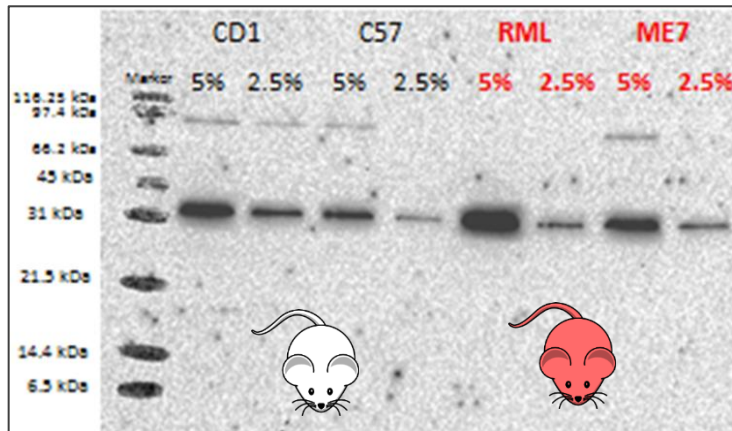
*Dráha č. 2, 3, 4 – vzorky genotypu Tga20 (myš exprimující PrP v nadbytku)*

*Dráha č. 5, 6, 7 – vzorky genotypu C57BL/6 (myš divokého typu, normální exprese PrP)*

*Dráha č. 8, 9, 10 – vzorky genotypu PrP<sup>-/-</sup> (myš postrádající prionový protein)*

**Hladina MT-III je výrazně snížena v případě neinfekční mozkové tkáně PrP<sup>-/-</sup>**

# Sledování hladiny metalothioneinu-III (MT-III) v prion-infikovaných myších mozkových tkáních



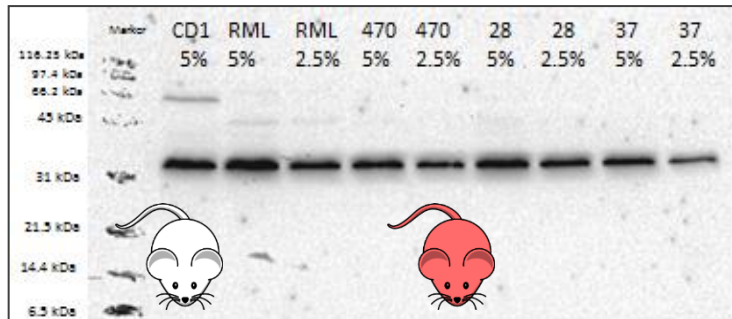
**Dráha č. 1** – hmotnostní standard

**Dráha č. 2, 3** – vzorky genotypu CD1 (myš divokého typu, normální exprese PrP)

**Dráha č. 4, 5** – vzorky genotypu C57 (myš divokého typu, normální exprese PrP)

**Dráha 6, 7** – vzorky genotypu RML (prion-infekční genotyp myši)

**Dráha č. 8, 9** – vzorky genotypu ME7 (prion-infekční genotyp myši).

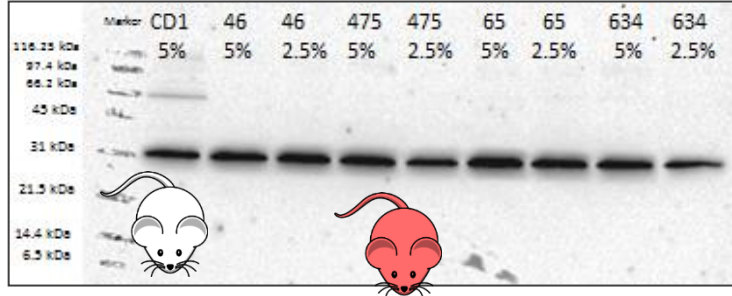


**Dráha č. 1** – hmotnostní standard, **dráha č. 2** – vzorek

genotypu CD1 (myš divokého typu, normální exprese PrP),

**dráha č. 3, 4** – vzorky genotypu RML (prion-infekční genotyp myši), **dráha č. 5, 6** – vzorky genotypu 470-87A (prion-infekční genotyp myši), **dráha č. 7, 8** – vzorky genotypu 28-ME7 (prion-infekční genotyp myši),

**dráha č. 9, 10** – vzorky genotypu 37-221C (prion-infekční genotyp myši).



**Dráha č. 1** – hmotnostní standard, **dráha č. 2** – vzorek genotypu

CD1 (myš divokého typu, normální exprese PrP), **dráha č. 3, 4** –

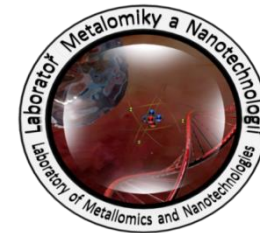
vzorky genotypu 46-ME7 (prion-infekční genotyp myši), **dráha č. 5, 6** – vzorky genotypu 475-87A (prion-infekční genotyp myši),

**dráha č. 7, 8** – vzorky genotypu 65-221C (prion-infekční genotyp myši), **dráha č. 9, 10** – vzorky genotypu 634-221C-variant (prion-infekční genotyp myši).

# Závěr

- Byl vytvořen rekombinantní lidský prionový protein (PrP<sup>C</sup>) v transformované E. coli.
- Byly detekovány interakce PrP<sup>C</sup> s kovy a metalothioneinem pomocí metody diferenční pulzní voltametrie (DPV)
- Byla sledována hladina MT-III v neinfekčních a prion-infikovaných myších mozkových tkáních různých genotypů a bylo zjištěno, že hladina MT-III je výrazně snížena v případě myší PrP<sup>-/-</sup>
- V budoucnu by bylo vhodné provést dodatečné experimenty zaměřené na stanovení hladiny mRNA MT-III u PrP<sup>-/-</sup> tkání a u prion-infikovaných tkání pro potvrzení a rozšíření našich výsledků

# Poděkování



- Ing. Pavlína Šobrová, Ph.D.
- Doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.
- Ráda bych poděkovala i celému kolektivu Laboratoře metalomiky a nanotechnologií



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Děkuji Vám za pozornost

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik

