

Elektrochemiczne bioczuJNIKI do oznaczania potencjalnych markerów choroby Alzheimera

W drugiej połowie XIX wieku w publikacji Clark'a i Lyons'a opisano pierwszy bioczuJNIK, którym była elektroda enzymatyczna przeznaczona do oznaczania glukozy. Od tego czasu nastąpił okres intensywnych badań skutkujący opracowaniem zupełnie nowych, bardziej zaawansowanych, czulszych i niezawodnych narzędzi analitycznych, jakimi są obecnie bioczuJNIKI elektrochemiczne. Cieszą się one dużym zainteresowaniem i w dalszym ciągu są udoskonalane przez dobór odpowiednich rodzajów materiałów biologicznych w warstwie analitycznie aktywnej, różnorodnych modyfikacji powierzchni elektrod oraz zmian w procedurach pomiarowych. Przez te udoskonalenia dąży się do uzyskania tanich, skutecznych i łatwych w obsłudze narzędzi w przyszłości dostępnych komercyjnie, które mogłyby być obsługiwane przez niewykwalifikowany personel w oznaczeniach medycznych, farmakologicznych czy środowiskowych. Na szczególną uwagę zasługują bioczuJNIKI wykorzystujące reakcje typu „ligand-receptor”, które umożliwiają oznaczenie w próbkach analitów (biomarkerów) o istotnym znaczeniu z medycznego punktu widzenia.

Celem niniejszej rozprawy było opracowanie elektrochemicznych bioczuJNIKÓW przeznaczonych do oznaczania stężenia wybranych markerów choroby Alzheimera umożliwiających wczesną diagnozę tej choroby. Zachorowalność na AD podwaja się co 5 lat u osób po 60 roku życia i dotyka obecnie ponad 35 milionów osób na całym świecie. Proces chorobowy może rozpocząć się nawet 20 lat przed pierwszymi oznakami utraty funkcji poznawczych umysłu. Według powszechnie przyjętych kryteriów warunkiem rozpoznania choroby Alzheimera jest wystąpienie otępienia. Jest ono niezwykle trudne do wychwycenia w początkowej fazie, choroba rozwija się bardzo wolno, a powstałe zmiany mają nieodwracalny charakter. W związku z powyższym w ostatnim czasie obserwuje się ogromny postęp w badaniach mających na celu określenie biomarkerów świadczących o wczesnych etapach rozwoju choroby Alzheimera. Możliwość ich oznaczania daje szansę na wczesną diagnozę, jeszcze przed występowaniem zaburzeń funkcji poznawczych. A to oznacza zwiększenie skuteczności terapii.

Podstawę elektrochemicznych czujników opracowywanych w ramach mojej rozprawy doktorskiej stanowiły elektrody złote zmodyfikowane warstwą elektro-aktywną. W roli analitycznie aktywnego czynnika odpowiedzialnego za wykrywanie wybranych markerów choroby Alzheimera zastosowałam poszczególne domeny receptora RAGE (receptor końcowych produktów zaawansowanych glikacji).

Przeprowadziłam eksperymenty mające na celu utworzenie elektroaktywnej warstwy czujnika, poprzez immobilizację na powierzchni elektrody złotej cząsteczek pochodnej tiolowej kwasu pentetynowego (DPTA) poprzez wytworzenie wiązań kowalencyjnych Au-S. Kolejny etap obejmował kompleksowanie jonów Cu^{2+} poprzez cząsteczki DPTA. Wykonałam charakterystykę parametrów elektrochemicznych uzyskanej warstwy. Uzyskaną powierzchnię elektrod złotych zmodyfikowaną warstwą NAC/DPTA-Cu(II) zastosowałam do zorientowanego i stabilnego unieruchomienia histagowanych domen receptora RAGE, wykorzystując powinowactwo Cu(II) do atomów azotu obecnych w cząsteczkach histydyny. Zastosowałam techniki elektrochemiczne oraz mikroskop sił atomowych do potwierdzenia każdego etapu modyfikacji oraz przyłączenia domen receptora. Otrzymane wyniki wykazały, iż cząsteczki pochodnej tiolowej kwasu pentetynowego odznaczają się powinowactwem do jonów Cu(II) i są odpowiednie do tworzenia elektroaktywnej warstwy na powierzchni elektrod złotych. Wykazałam, że kompleks DPTA-Cu(II) jest odpowiedni do zorientowanego i stabilnego unieruchomienia histagowanych domen receptora RAGE.

Opracowane bioczujniki zastosowałam do obserwacji procesu rozpoznania molekularnego pomiędzy wybranymi potencjalnymi markerami choroby Alzheimera tj. $\text{A}\beta_{16-23}$, $\text{A}\beta_{1-40}$, białko S100B, glikowana albumina, a domenami V oraz VC1 receptora RAGE. Oddziaływania te obserwowałam za pomocą woltamperometrii fali prostokątnej Osteryounga (OSWV). Sygnał analityczny stanowiła zmiana procesu utleniania i redukcji kompleksu DPM-Cu(II) unieruchomionego na powierzchni elektrody wygenerowana procesem rozpoznania międzymolekularnego. Podstawą mechanizmu generowania sygnału analitycznego przez proponowane bioczujniki jest zmiana konformacji domen receptora RAGE, która następuje po związaniu odpowiednich ligandów. Konsekwencją tego zjawiska jest zmiana dostępności jonów obecnych w elektrolicie podstawowym do centrów redoks aktywnych w celu zrównoważenia ładunku powstałego w wyniku procesu utleniania i redukcji. Konsekwencją tych zjawisk było obniżenie natężenia prądu utleniania i redukcji Cu(II)/Cu(I) występującego zarówno po przyłączeniu domen receptora RAGE jak i cząsteczek analizowanych. Zaobserwowałam liniową zależność sygnału analitycznego od stężenia oznaczanych peptydów $\text{A}\beta_{16-23}$ i $\text{A}\beta_{1-40}$ w zakresie stężeń pomiędzy 0.001–1 μM .

Natomiast w przypadku białka S100B oraz glikowanej albuminy linowy zakres obserwowano od 1 do 20 pM.

Zwieńczenie badań stanowiło zbadanie wpływu składników ludzkiego osocza na czułość oznaczania wyżej wymienionych markerów przez opracowane bioczujniki. Uzyskane wyniki dowiodły, iż obecność osocza ludzkiego nie wpływa na oznaczanie $A\beta_{1-40}$, a tylko w nieznacznym stopniu na oznaczenie białka S100B oraz glikowanej albuminy. Biorąc pod uwagę dobre parametry analityczne takie jak czułość, selektywność, limit detekcji w zakresie pM oraz brak reakcji na składniki osocza ludzkiego, prezentowane bioczujniki mogą zostać włączone do urządzeń pomiarowych odpowiednich do kosztowo efektywnej teranostyki. Bioczujniki zmodyfikowane domeną VC1 zmutowaną generują kilkukrotnie mniejszą odpowiedź w obecności oznaczanych markerów choroby Alzheimera w porównaniu do bioczujników zmodyfikowanych domeną VC1 naturalną receptora RAGE. Świadczy to o dobrej selektywności opracowanych bioczujników.

Biorąc pod uwagę czułość, selektywność, brak reakcji na składniki matrycowe obecne w próbkach fizjologicznych, bardzo małe objętości analizowanych prób (rzędu μL) oraz niskie koszty pomiaru, można zarekomendować opracowane bioczujniki, jako narzędzia analityczne odpowiednie do analizy próbek medycznych.

Edyta Nikuła

Electrochemical biosensors for determination the potential biomarkers of Alzheimer's disease

In the second half of the nineteenth century in Clark and Lyons publication the first biosensor was described, which was enzymatic electrodes for determination of glucose concentration. Since that time, there was a period of intensive research resulting in the development of entirely new, more advanced, more sensitive and reliable analytical tools, which are currently electrochemical biosensors. At present they enjoy great interest and continues to be improved by selecting appropriate types of biological materials in the analytically active layer, a variety of surface modification of electrodes and changes in measurement procedures. The aim of these enhancements was to obtain a cheap, effective and easy-to-use tools, commercially available in the future, which could be operated by unskilled personnel in a medical, pharmacological or environmental setting.

For special attention deserve the biosensors utilizing the reactions of „ligand-receptor” type that allow the determination of analytes (biomarkers) in samples relevant from a medical point of view. The purpose of this dissertation was the development of electrochemical biosensor for determining selected markers of Alzheimer's disease. This will make the early diagnosis of the disease possible.

The prevalence of Alzheimer's disease doubles every 5 years after the age of 60 and currently affects more than 35 million patients worldwide. The process of this disease can begin 20 years before the mind shows any signs of cognitive loss. According to widely accepted criteria for diagnosis of Alzheimer's disease is the occurrence of dementia. It is extremely difficult to detect in its early stages. The disease progresses very slowly, and the resulting changes are irreversible in nature. Therefore recently seen great progress in studies aimed at identifying biomarkers indicative of early stages of Alzheimer's disease. The possibility of their determination gives a chance for early diagnosis, before the occurrence of cognitive impairment. This means increasing the effectiveness of therapy.

The basis of electrochemical sensors developed in the framework of my doctoral dissertation were gold electrodes modified with electro-active layer. In the role of analytically active molecule used to detect markers of Alzheimer's disease I applied specific domains of RAGE receptor (receptor of advanced glycation end products).

I performed the experiment in order to create the electroactive layer of sensor by immobilization the thiol derivative of pentetic acid (DPTA) on the gold electrode surface by forming of covalent bonds Au-S. The next stage involved the complexation of Cu^{2+} ions by the DPTA molecule.

I made the characteristics of electrochemical parameters of created layer. The gold electrode surface modified with NAC/DTPA-Cu(II) layer I applied to the oriented and stable immobilization the his-tagged RAGE receptor domains using the affinity of Cu (II) to the nitrogen atoms present in the histidine molecules. I used electrochemical techniques and atomic force microscope to confirm each modification step and connection of the receptor RAGE domains to the redox active DPTA-Cu(II) layer. The obtained results indicates that the thiol derivative of pentetic acid exhibits the affinity for Cu(II) and could be used for the formation of electroactive layer on the surface of the electrodes. I revealed that the DTPA-Cu(II) complex is suitable for oriented and stable immobilization of his-tagged domain of RAGE receptor.

The developed biosensors were used to observe the molecular recognition processes between the selected potential markers of Alzheimer's disease, ie. $\text{A}\beta_{16-23}$, $\text{A}\beta_{1-40}$, S100B protein, glycated albumin, and V and VC1 domains of RAGE receptor. These interactions were analyzed by Osteryoung square wave voltammetry (OSWV). The obtained analytical signal comes from the changes of oxidation and reduction process of the DPM-Cu(II) complex immobilized on the electrode surface occurred upon molecular recognition process. The analytical signal of proposed biosensors was generating on the basis of the conformational change of domain of RAGE receptor, which occurs upon binding to the respective ligands. The consequence of this phenomenon is the changing of the availability of ions present in the base electrolyte to redox active centers in order to balance the charge subsequent from oxidation and reduction process. I observed a linear relationship between the analytical signal and concentration the assayed peptide $\text{A}\beta_{16-23}$ and $\text{A}\beta_{1-40}$ in the concentration range between 0.001-1 μM . However, in the case of S100B protein and glycated albumin the linear relationship was observed in the range of 1 to 20 pM .

The final study was the examination of the impact the components of human plasma to the sensitivity of the determination of the above markers by the developed biosensors. The

results showed that the presence of human plasma did not affect the labeled $A\beta_{1-40}$, and only to a small extent on the assay of S100B protein and glycated albumin. Taking into account the good analytical parameters such as sensitivity, selectivity, detection limit in the pM range, and no response to components of human plasma, the biosensors presented could be proposed as measuring devices suitable for cost-effective theranostics. The biosensors modified by VC1 mutated domain generate several times less response in the presence of selected Alzheimer disease markers compared to the biosensors modified by VC1 natural domain of RAGE receptor. This indicates the good selectivity of the developed biosensors.

Considering the sensitivity, selectivity, lack of response to the matrix components present in physiological samples, very small volume (in μL range) of the analyzed samples and low cost of measurement, the developed biosensors can be recommend as analytical tools suitable for the analysis of medical samples.

Edyta Nikuła