

CHRONOPOTENCIOMETRICKÁ ROZPOUŠTĚCÍ ANALÝZA PROTEINŮ A JEJICH INTERAKCÍ

Věnováno profesorovi Jiřímu Barkovi u příležitosti jeho 75. narozenin.

TATIANA STAROŇOVÁ a VERONIKA OSTATNÁ

Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i., Královopolská 135, 612 00 Brno, Česká republika
staronova@ibp.cz

Došlo 27.6.24, přijato 28.8.24.

Chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza s konstantním proudem (CPS) je vysoce citlivá metoda analýzy proteinů, která nevyžaduje úpravu ve formě modifikace či značení. Během CPS analýzy poskytují proteiny tzv. pík H, který vzniká v důsledku katalytické reakce vylučování vodíku. Tento pík je citlivý na lokální i globální změny v proteinové struktuře a umožňuje zkoumání jak samostatných proteinů, tak i jejich komplexů. CPS analýza proteinů našla své uplatnění při studování biomedicínsky důležitých proteinů, které hrají roli například v průběhu neurodegenerativních onemocnění nebo rakoviny. V tomto článku popisujeme vývoj CPS analýzy proteinů a její pokrok za poslední desetiletí. Ukážeme také všestrannost metody a potenciál jejího využití.

Klíčová slova: chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza, interakce proteinů, pík H, elektrochemická analýza proteinů, rtuťová elektroda

Obsah

1. Úvod
2. Katalytické vylučování vodíku proteiny
3. Chronopotenciometrický pík H
4. Vliv struktury a aminokyselinového složení na pík H
5. Chronopotenciometrická analýza proteinových komplexů
6. Závěr

1. Úvod

První makrobiomolekuly analyzované elektrochemickými metodami byly právě proteiny¹. Krátce po objevu polarografie J. Heyrovským se ukázalo, že proteiny jsou schopny katalyzovat vylučování vodíku (CHER, z angl. Catalytic Hydrogen Evolution Reaction) na povrchu rtuťové kapkové elektrody^{1,2}. J. Heyrovský a J. Babička v roce 1930 představili a popsali tzv. polarografickou prenátriovou vlnu, kterou poskytovaly proteiny v přítomnosti amonných iontů. Kromě samotných proteinů byl vznik vlny pozorován i pro tělní tekutiny jako moč a krev¹. O pár let později pozoroval R. Brdička v roztocích obohacených o kobaltové ionty nejen prenátriovou vlnu, ale také vznik dvojvlny, později nazvané Brdičkova dvojvlna^{3,4}. Zatímco prenátriová vlna byla v praxi využívána jen zřídka, Brdič-

kova dvojvlna našla své uplatnění v biochemii jako základ analytické metody. V klinické medicíně a farmakologii byla používána jako diagnostická metoda, především v diagnostice rakoviny^{5,6}.

2. Katalytické vylučování vodíku proteiny

Prenátriová vlna i Brdičkova dvojvlna se zapojuje do CHER, což je elektrochemický proces, během kterého se z roztoku za účasti katalyzátoru uvolňuje plynný vodík na povrchu elektrody⁷. Mechanismus průběhu CHER na rtuťové elektrodě byl popsán J. Heyrovským a J. Kútou v roce 1965 (cit.⁸). Elektroaktivní zbytky aminokyselin peptidů a proteinů nacházející se v těsné blízkosti povrchu elektrody se redukují za vzniku aniontu. Ten se následně stabilizuje přijetím protonu z kyselé části pufru, což iniciuje proces katalýzy. K vylučování vodíku dochází přenosem zmíněného protonu na negativně nabitý povrch elektrody, kde vzniká molekulární vodík^{9,10}. Proces CHER lze zapsat reakčním schématem:

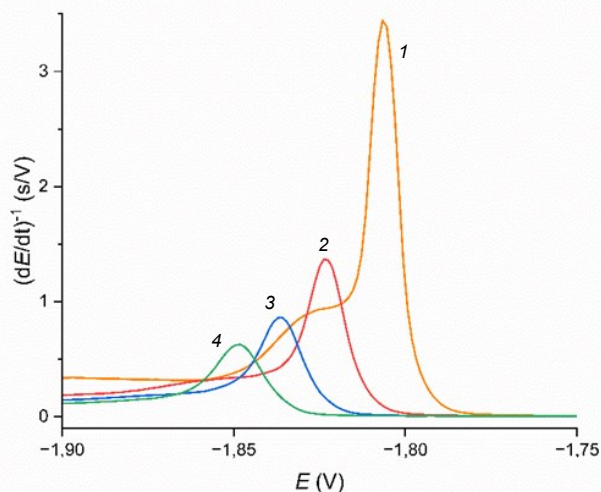


kde PH a P⁻ představují protonizovanou a neprotonizovanou formu aminokyselinových zbytků peptidů/proteinů, HA označuje kyselou složku pufru a A⁻ její konjugovanou

bázi^{8,11,12}. Do katalytické reakce se zapojují aminokyselinové zbytky peptidů a proteinů obsahující snadno poskytující proton, za daných experimentálních podmínek to mohou být cystein (Cys), lysin (Lys), arginin (Arg) a histidin (His)¹³.

3. Chronopotenciometrický pík H

V roce 1998 v laboratoři prof. Palečka byly poprvé studovány peptidy na rtuťové elektrodě s visící kapkou (HMDE, z angl. Hanging Mercury Drop Electrode) v kombinaci s chronopotenciometrickou analýzou konstantním proudem (CPS, z angl. Constant Current Chronopotentiometric Stripping)¹⁴. Na rozdíl od slabě vyvinutého signálu naměřeného pomocí DC polarografie poskytovala CPS dobře vyvinutý pík i při nanomolárních koncentracích analytu¹⁴. Pík byl nazván píkem H podle jeho původu, tj. procesu vylučování vodíku (z angl. Hydrogen Evolution), vysoké citlivosti (z angl. High Sensitivity) a na počest profesora J. Heyrovského, v jehož laboratoři byla schopnost proteinů katalyzovat CHER poprvé pozorována. Od té doby byla CPS analýza proteinů použita při monitorování jejich denaturace^{15,16}, oligomerizace¹⁷, agregace¹⁸, glykace¹⁹, oxidačního poškození²⁰ a při pozorování změn redoxního stavu²¹. Byly studovány peptidy a proteiny, které hrají důležitou roli v onemocnění rakovinou, včetně nádorového supresora p53 (cit.^{22,23}), gradientového onkoproteinu AGR2 (cit.²⁴), prostatického specifického antigenu PSA (cit.²⁵) a galektinu²⁶. Citlivé monitorování agregace bylo testováno pro α -synuklein¹⁹



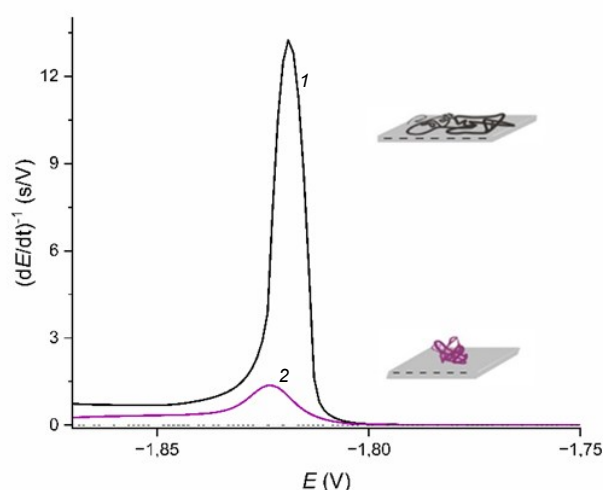
Obr. 1. CPS píky H pro 300nM hovězí sérový albumin (BSA) při různých hodnotách rozpouštěcího proudu (I_{STR}), a to $-35 \mu\text{A}$ (1, oranžová), $-40 \mu\text{A}$ (2, červená), $-45 \mu\text{A}$ (3, modrá) a $-50 \mu\text{A}$ (4, zelená) ve 50mM sodném fosfátovém pufru pH 7,0. BSA byl na elektrodu akumulován při potenciálu $-0,3 \text{ V}$ po dobu 60 s. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

a peptidy $\text{A}\beta$ -amyloidu²⁷, které jsou úzce spojeny s neurodegenerativními nemocemi.

Výhodou CPS metody ve spojení s CHER je možnost studovat prakticky všechny proteiny bez nutnosti značení, protože každý protein obsahuje alespoň jedno elektroaktivní reziduum. Rozdíl mezi CPS a voltametrickými metodami je ten, že změna rychlosti polarizace není u CPS konstantní²⁸. Během měření se elektrodový potenciál mění v průměru až o dva či tři řády rychleji než u voltametrických metod, a to až do momentu, kdy začne probíhat elektrochemická reakce. V průběhu této reakce se rychlost změny elektrodového potenciálu snižuje¹⁶. Parametr, který ovlivňuje rychlost polarizace v chronopotenciometrii, se nazývá rozpouštěcí proud, I_{STR} (obr. 1). U proteinů je chronopotenciometrie výhodná, protože rychlá změna polarizace k negativním potenciálům zamezuje poškození proteinů vlivem elektrického pole. V píku H dochází ke snížení rychlosti polarizace, což příznivě ovlivňuje katalýzu¹.

4. Vliv struktury a aminokyselinového složení na pík H

Několik desetiletí převládal názor, že po adsorpci proteinů na povrch kovových elektrod dochází k jejich denaturaci^{1,29,30}. Teprve pozdější výzkumy ukázaly, že proteiny adsorbované na povrch rtuťové elektrody v oblasti potenciálu nulového náboje (PZC, z angl. Potential of Zero Charge) nemusí být nutně denaturovány, ale k rozplétání jejich struktury může docházet při delším vystavení negativním potenciálům^{15,16,31}, jelikož ke CHER u proteinů dochází při potenciálech negativnějších než cca $-1,7 \text{ V}$. Hovězí sérový albumin (BSA, z angl. Bovine Serum Albumin) byl prvním proteinem, jehož nativní a denaturovaná forma byla sledována pomocí CPS na HMDE (cit.³²) (obr. 2). Močovinou denaturovaný BSA poskytoval vysoký, dobře vyvinutý pík H, který byl téměř 50krát vyšší než pík nativního BSA. Velký nárůst píku H u denaturované formy byl připisován lepší dostupnosti elektroaktivních zbytků aminokyselin, neboť po rozpletení terciární struktury jsou elektrodě dostupné i ty aminokyselinové zbytky, které jsou v nativním stavu umístěny uvnitř proteinu^{11,19,33,34}. Na výsledný tvar píku H má vliv nejen struktura proteinu, ale i jeho aminokyselinové složení. Přestože dostatečné množství a dostupnost elektroaktivních zbytků aminokyselin jsou pro vznik píku H potřebné, velmi důležitou roli hrají i neelektroaktivní aminokyseliny, které v polypeptidovém řetězci sousedí s elektroaktivními aminokyselinami. Skupina prof. Palečka to ukázala studiem CPS píku H čtyř angiotensinů³⁵, které měly stejnou část sekvence, lišily se pouze v délce na C- a N-konci. Ze čtyř peptidů poskytoval dobře vyvinutý CPS pík H pouze ten, který ve své sekvenci obsahoval arginin a zároveň postrádal na C-konci aspartát. Aspartát svým negativně nabitým nábojem odpuzoval C-konec, včetně argininu, od povrchu negativně nabitě elektrody, a tak se arginin



Obr. 2. Pík H 300nM denaturovaného (1, černá) a nativního (2, fialová) BSA. Oba píky byly naměřeny ve 50mM sodném fosfátovém pufru pH 7,0 (černá přerušovaná čára) při rozpouštěcím proudu (I_{STR}) $-35 \mu\text{A}$. BSA byl na povrch elektrody akumulován při potenciálu $-0,3 \text{ V}$ po dobu 60 s. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

jako jediné elektroaktivní reziduum zkoumaných peptidů nemohl zapojit do CHER.

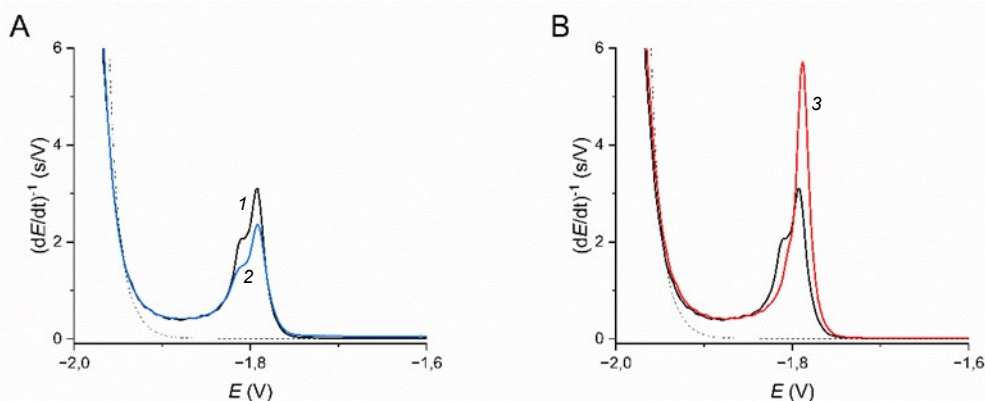
5. Chronopotenciometrická analýza proteinových komplexů

V roce 2004 publikovali L. Havran a spol. práci³⁶, ve které zkoumali interakci proteinu avidinu s jeho ligandem – biotinem. Komplex avidin-biotin představuje jednu

z nejsilnějších známých nekovalentních interakcí. Díky své vysoké afinitě a stabilitě je tvorba tohoto komplexu široce používána v mnoha biochemických a klinických technikách³⁷.

Samotný avidin poskytoval dobře vyvinutý pík H. Po vzniku komplexu avidin-biotin byl, ve srovnání se samotným avidinem, pozorován výrazný pokles výšky píku H. Podobný jev byl pozorován také o pět let později při sledování interakce riboflavinu a proteinu vázícího riboflavin (RBP, z angl. Riboflavin Binding Protein) M. Bartošíkem a spol.³⁸. Pík H naměřený pro komplex riboflavin-RBP byl při molárním poměru 1:1 nižší přibližně o 75 % ve srovnání s píkem samotného RBP. V obou případech se jedná o interakci proteinů s nízkomolekulární látkou a k poklesu píku H po vzájemné interakci dochází zejména zamezením dostupnosti elektroaktivních reziduí k elektrodě (resp. nedostupností aminokyselinových reziduí nacházejících se ve vazebném místě po navázání ligandu). Interakce s ligandem může také způsobit změnu orientace komplexu v porovnání se samotnými proteiny.

Stejné chování bylo pozorováno i v práci T. Galicové a spol.³⁹, kde byla studována interakce lektinu *Sambucus nigra* se dvěma sialovanými oligosacharidy, přičemž jeden oligosacharid se vázal na lektin silně a druhý několikanásobně slaběji. Píky H naměřené pro samotný lektin a pro komplex lektinu se slabě interagujícím oligosacharidem byly prakticky stejné. U komplexu lektinu se silně interagujícím oligosacharidem byl pozorován přibližně 20% pokles ve výšce píku H (obr. 3A). Pozorovaný pokles byl nižší než v předcházejících případech, což může být způsobeno výrazně slabší interakcí oligosacharidu s lektinem, než jak tomu bylo v případě interakce avidin-biotin nebo riboflavin-RBP. Odlišné chování bylo pozorováno při interakci lektinu s proteinem, konkrétně s prostatickým specifickým antigenem (PSA) (obr. 3B). V tomhle případě způsobila interakce s PSA výrazný ná-



Obr. 3. Pík H samotného $2 \mu\text{M}$ lektinu SNA-1 (1, černá) a jeho komplexu s (A) $40 \mu\text{M}$ oligosacharidem 6-sialyllaktosaminem (2, modrá) a (B) $2 \mu\text{M}$ prostatickým specifickým antigenem (3, červená). Měřeno ve 50mM sodném fosfátovém pufru pH 7,4 (černá přerušovaná čára) při rozpouštěcím proudu (I_{STR}) $-22,5 \mu\text{A}$. Při potenciálu 0 V byl na povrch elektrody nejdříve akumulován lektin SNA-1 (po dobu 5 minut), následně i 6-sialyllaktosamin/prostatický specifický antigen (po dobu 1 minuty). Podrobné podmínky měření jsou uveřejněny v práci³⁹. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy)

růst píku H, což je pravděpodobně způsobeno změnou struktury lektinu a tím i zlepšenou dostupností elektroaktivních reziduí k povrchu elektrody. Na rozdíl od interakce lektinu s malým oligosacharidem interaguje PSA s vazebným místem lektinu přes glykany (oligosacharidy) a zároveň se může nespecificky vázat přes svou proteinovou část a tím může částečně ovlivnit strukturu lektinu. Výsledek této práce byl podobný jako ten, jenž získala V. Vargová a spol.⁴⁰, která studovala interakce lektinu konkanavalinu A (ConA, lektin *Canavalia ensiformis*) s glykoproteinem ovalbuminem (Ova). Oba zmíněné proteiny byly analyzovány nejprve samostatně, později v komplexu. Zatímco pro Ova byl zaznamenán pík H s dvěma maximy, ConA při daných experimentálních podmínkách pík H neposkytoval. Důvodem pro absenci píku H může být nižší počet elektroaktivních aminokyselinových reziduí ConA. Pro komplex ConA-Ova byl naměřen pík H až 6krát vyšší, než byl pík H Ova. Zlepšená dostupnost katalyticky aktivních aminokyselinových reziduí k elektrodovému povrchu může být v důsledku konformačních změn ve struktuře Ova anebo ConA-Ova, ke kterým došlo po vytvoření komplexu ConA-Ova. Konformační změny v Ova anebo ConA-Ova mohou po kontaktu s nabitým povrchem elektrody způsobit i reorientaci komplexu.

Pomocí CPS byly sledovány i interakce proteinů s DNA, jak s jednořetězcovou, tak i s dvoušroubovicí. V. Ostatná a spol.⁴¹ se zabývali interakcí lysozymu s DNA aptamerem, t.j. jednořetězcovou DNA, která se specificky váže k dané látce, v tomto případě k lysozymu. Samotný protein poskytoval při daných experimentálních podmínkách dobře vyvinutý pík H se třemi maximy. Pro komplex lysozym-DNA byl také pozorován pík s třemi maximy, výrazně se ale lišila jejich výška. Pík H komplexu byl přibližně 8krát menší než pík samotného lysozymu. Podobný trend byl zaznamenán i H. Černockou a spol.⁴² při studování komplexu dvoušroubovice DNA a proteinu p53, který se jako nádorový supresor zapojuje do mnoha buněčných regulačních procesů. Pík H vzniklého komplexu byl 10krát menší než pík H samotného proteinu p53. V obou pracích byl pík H samotného proteinu několiknásobně vyšší než u komplexu protein-DNA. Snížení píku H komplexu proteinu s jednořetězcovou nebo dvouřetězcovou DNA může být způsobeno: 1) kompetitivní adsorpcí proteinu a DNA na hydrofobní povrch rtuťové elektrody, 2) větší konformační stabilitou vzniklého komplexu v elektrickém poli anebo odlišnou orientací na povrchu elektrody, 3) zhoršenou přístupností pozitivně nabitých elektroaktivních aminokyselinových reziduí (Arg, Lys) k elektrodě jako důsledek interakce těchto aminokyselinových zbytků s negativně nabitou DNA.

6. Závěr

Současný progres v genomice, proteomice a biomedicině vyžaduje citlivé analytické metody, které dokážou spolehlivě studovat nejen samotné proteiny, ale i jejich komplexy. Chronopotenciometrie konstantním proudem

umožňuje rychlou, vysoce citlivou analýzu proteinu bez nutnosti modifikace nebo značení. Díky svým vlastnostem byl chronopotenciometrický pík H již dříve uplatněn při sledování procesů, během kterých dochází ke změnám ve struktuře proteinu jako například denaturace, oligomerizace, agregace či oxidační poškození. Ke změnám struktury, a tím i k dostupnosti elektroaktivních aminokyselinových zbytků k elektrodě, dochází i při interakci s jinými biomolekulami, proto je pomocí chronopotenciometrie možné sledovat a porovnávat mezi sebou proteiny a jejich komplexy, což popisujeme i v tomto článku. V posledních letech se pík H používá také při studování proteinů důležitých v různých neurodegenerativních onemocněních či rakovině a spolu v kombinaci s jinými elektrochemickými metodami má potenciál napomoci k lepšímu porozumění chování proteinů a jejich komplexů na nabitém fázovém rozhraní.

LITERATURA

1. Paleček E., Tkáč J., Bartošík M., Bertók T., Ostatná V., Paleček J.: *Chem. Rev.* 115, 2045 (2015).
2. Vacek J., Zatloukalová M., Dorčák V., Cifra M., Futera Z., Ostatná V.: *Microchim. Acta* 190, 442 (2023).
3. Brdička R.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 5, 148 (1933).
4. Brdička R.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 5, 112 (1933).
5. Brezina M., Zuman P.: *Polarography in Medicine, Biochemistry, and Pharmacy*. Interscience Publishers, New York 1958.
6. Ruttkay-Nedecký G., Anderlová A.: *Nature* 213, 564 (1967).
7. Mairanovskii S. G., v knize: *Catalytic and Kinetic Waves in Polarography* (Mairanovskii S. G., ed.). Plenum Press, New York 1968.
8. Heyrovský J., Kůta J.: *Principles of Polarography*. Academic Press, New York 1965.
9. Heyrovsky M., v knize: *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics* (Paleček E., Scheller F., Wang J., ed.), 1. díl, str. 657. Elsevier, Amsterdam 2005.
10. Melníková E., Izadi N., Gál M., Ostatná V.: *Electroanalysis* 31, 1868 (2019).
11. Doneux T., Dorčák V., Paleček E.: *Langmuir* 26, 1347 (2010).
12. Doneux T., Ostatná V., Paleček E.: *Electrochim. Acta* 56, 9337 (2011).
13. Dorčák V., Vargová V., Ostatná V., Paleček E.: *Electroanalysis* 27, 910 (2015).
14. Tomschik M., Havran L., Fojta M., Paleček E.: *Electroanalysis* 10, 403 (1998).
15. Černocká H., Ostatná V., Paleček E.: *Electrochim. Acta* 174, 356 (2015).
16. Paleček E., Ostatná V.: *Analyst* 134, 2076 (2009).

17. Borsarelli C. D., Falomir-Lockhart L. J., Ostatná V., Fauerbach J. A., Hsiao H. H., Urlaub H., Paleček E., Jares-Erijman E. A., Jovin T. M.: *Free Radical Biol. Med.* 53, 1004 (2012).
18. Paleček E., Ostatná V., Masařík M., Bertoncini C. W., Jovin T. M.: *Analyst* 133, 76 (2008).
19. Havlikova M., Zatloukalova M., Ulrichova J., Dobes P., Vacek J.: *Anal. Chem.* 87, 1757 (2015).
20. Vargová V., Giménez R. E., Černocká H., Trujillo D. C., Tulli F., Zanini V. I. P., Paleček E., Borsarelli C. D., Ostatná V.: *Electrochim. Acta* 187, 662 (2016).
21. Dorčák V., Paleček E.: *Anal. Chem.* 81, 1543 (2009).
22. Ostatná V., Černocká H., Paleček E.: *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9408 (2010).
23. Paleček E., Černocká H., Ostatná V., Navrátilová L., Brázdová M.: *Anal. Chim. Acta* 828, 1 (2014).
24. Kasalová V., Hrstka R., Hernychová L., Coufalová D., Ostatná V.: *Electrochim. Acta* 240, 250 (2017).
25. Belický S., Černocká H., Bertok T., Holazova A., Réblová K., Paleček E., Tkac J., Ostatná V.: *Bioelectrochemistry* 117, 89 (2017).
26. Hamala V. a 18 spoluautorů: *Inorg. Chem. Front. Odeslané v červnu 2024* (2024).
27. Kurzątkowska K., Ostatná V., Hamley I. W., Doneux T., Paleček E.: *Electrochim. Acta* 106, 43 (2013).
28. Dorčák V., Bartošík M., Ostatná V., Paleček E., Heyrovský M.: *Electroanalysis* 21, 662 (2009).
29. Černocká H., Ostatná V., Paleček E.: *Electrochem. Commun.* 61, 114 (2015).
30. Scheller F., Janchen M., Prumke H. J.: *Biopolymers* 14, 1553 (1975).
31. Černocká H., Ostatná V., Paleček E.: *Anal. Chim. Acta* 789, 41 (2013).
32. Ostatná V., West R. M.: *J. Electroanal. Chem.* 860, 113884 (2020).
33. Vargová V., Živanović M., Dorčák V., Paleček E., Ostatná V.: *Electroanalysis* 25, 2130 (2013).
34. Živanović M., Aleksić M., Ostatná V., Doneux T., Paleček E.: *Electroanalysis* 22, 2064 (2010).
35. Dorčák V., Ostatná V., Paleček E.: *Electrochem. Commun.* 31, 80 (2013).
36. Havran L., Billová S., Paleček E.: *Electroanalysis* 16, 1139 (2004).
37. Izadi N., Černocká H., Trefulka M., Ostatná V.: *ChemPlusChem* 85, 1347 (2020).
38. Bartošík M., Ostatná V., Paleček E.: *Bioelectrochemistry* 76, 70 (2009).
39. Galicová T., Hasoň S., Ostatná V.: *Bioelectrochemistry* 152, 108457 (2023).
40. Vargová V., Helma R., Paleček E., Ostatná V.: *Anal. Chim. Acta* 935, 97 (2016).
41. Ostatná V., Kasalová-Vargová V., Kékedy-Nagy L., Černocká H., Ferapontova E. E.: *Bioelectrochemistry* 114, 42 (2017).
42. Černocká H., Fojt L., Adámik M., Brázdová M., Paleček E., Ostatná V.: *J. Electroanal. Chem.* 848, 113300 (2019).

T. Staroňová and V. Ostatná (*Institute of Biophysics, Czech Academy of Sciences, Brno, Czech Republic*): **Chronopotentiometric Stripping Analysis of Proteins and Their Interactions**

Chronopotentiometric constant current stripping analysis (CPS) is a highly sensitive method for protein analysis that does not require modification or labeling. During the CPS analysis, proteins yield the so-called peak H, resulting from the catalytic hydrogen evolution reaction. This peak is sensitive to both local and global changes in protein structure, allowing the study of individual proteins, as well as their complexes. CPS analysis has been utilized in studying biomedically important proteins involved in neurodegenerative diseases and cancer. In this article, we describe the development of CPS protein analysis and its progress over the past decade. We also demonstrate the versatility of the method and its potential applications.

Keywords: chronopotentiometric stripping analysis, protein interactions, peak H, electrochemical protein analysis, mercury electrode



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.