

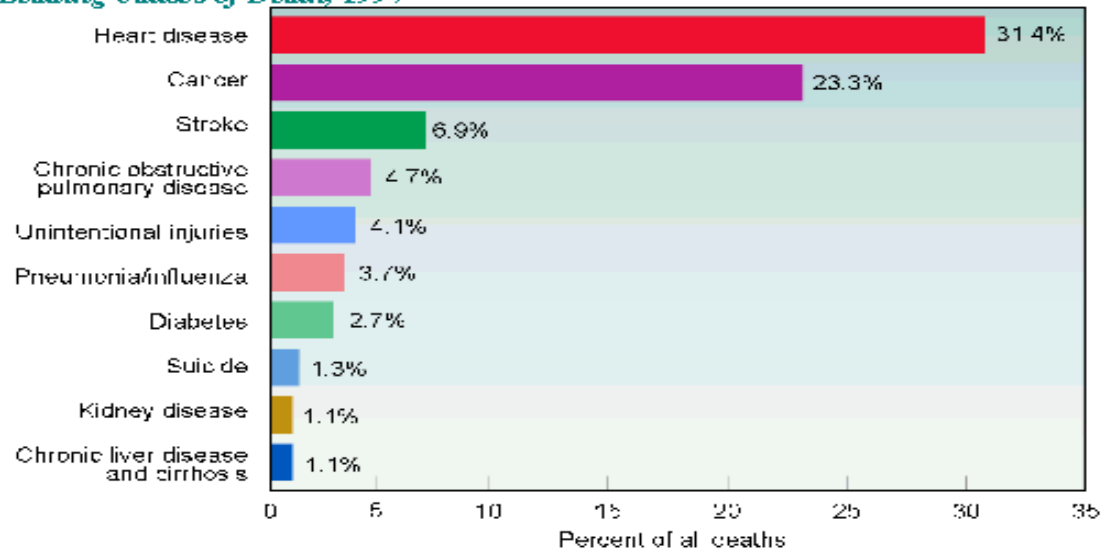
***Biologiczne zastosowania nanocząsteczek
fluorescencyjnych***

Od kropek kwantowych do choroby Alzheimera

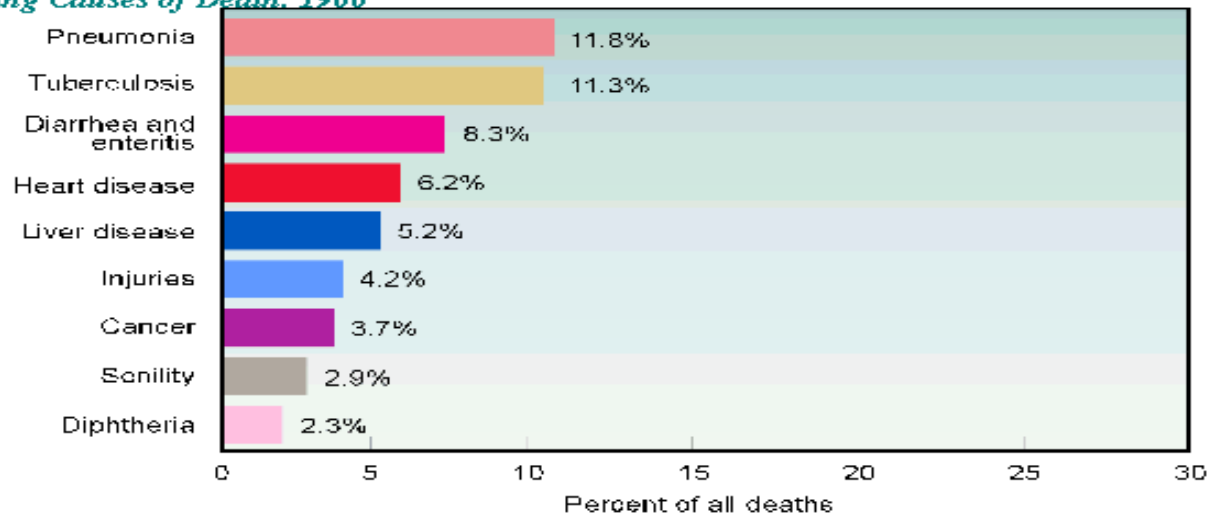
Danek Elbaum,
IFPAN

The leading causes of death as a percentage of all deaths in the United States, 1900 and 1997

Leading Causes of Death, 1997



*Leading Causes of Death, 1900**



*Not all States are represented.

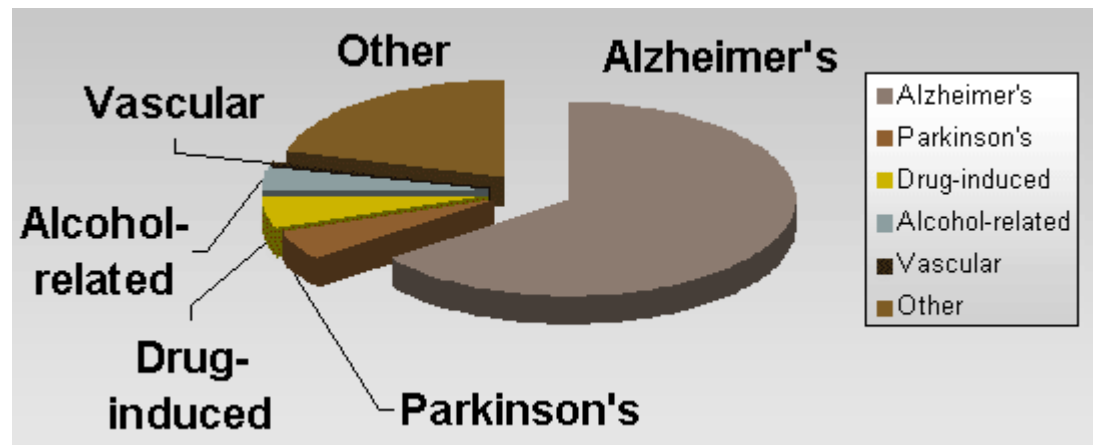
Source: Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics. National Vital Statistics System and unpublished data. 1997.

Medical statistics for AD

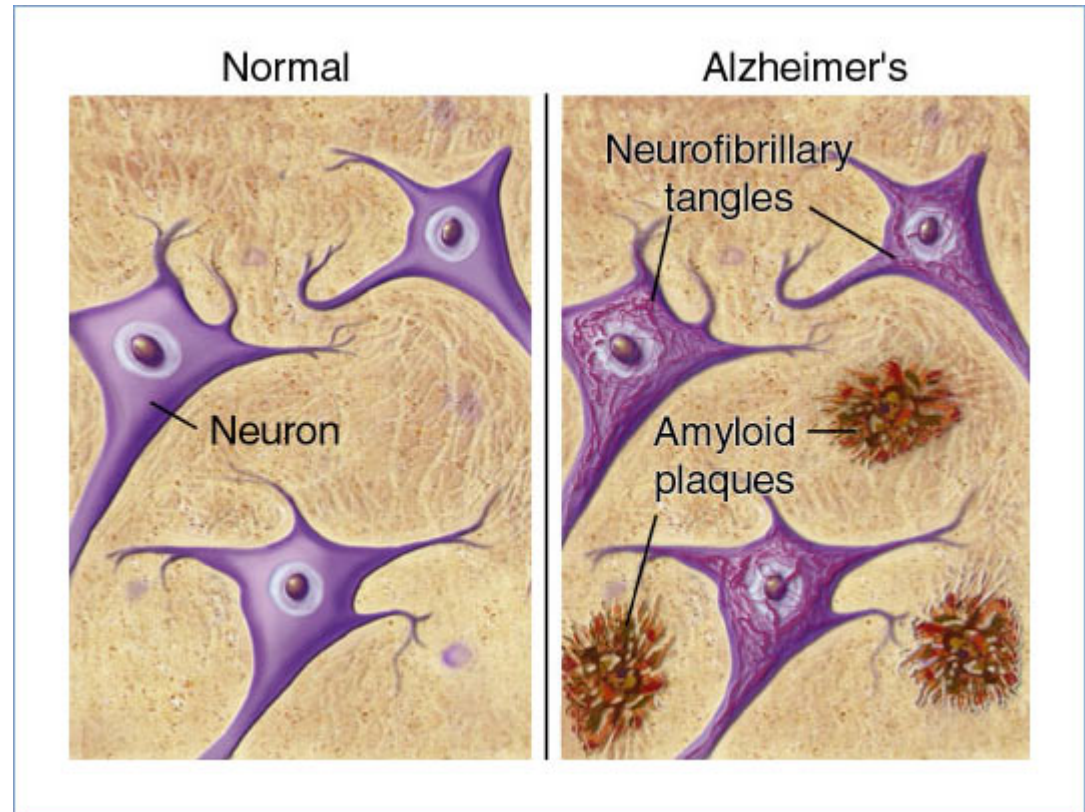
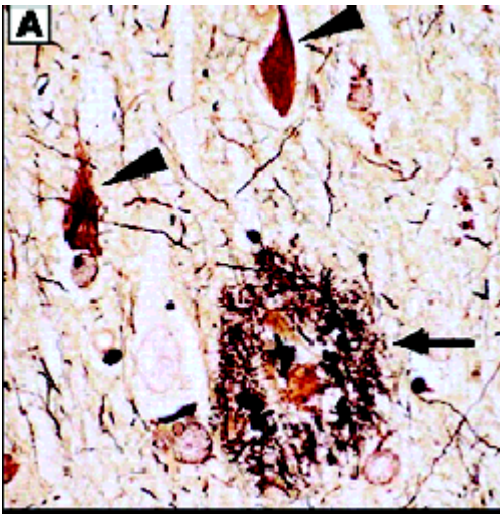
based on US population in 2001 of 280 millions

- Age 65 3%
- Age 70 6%
- Age 75 12%
- Age 80 24%
- Age 85 50%

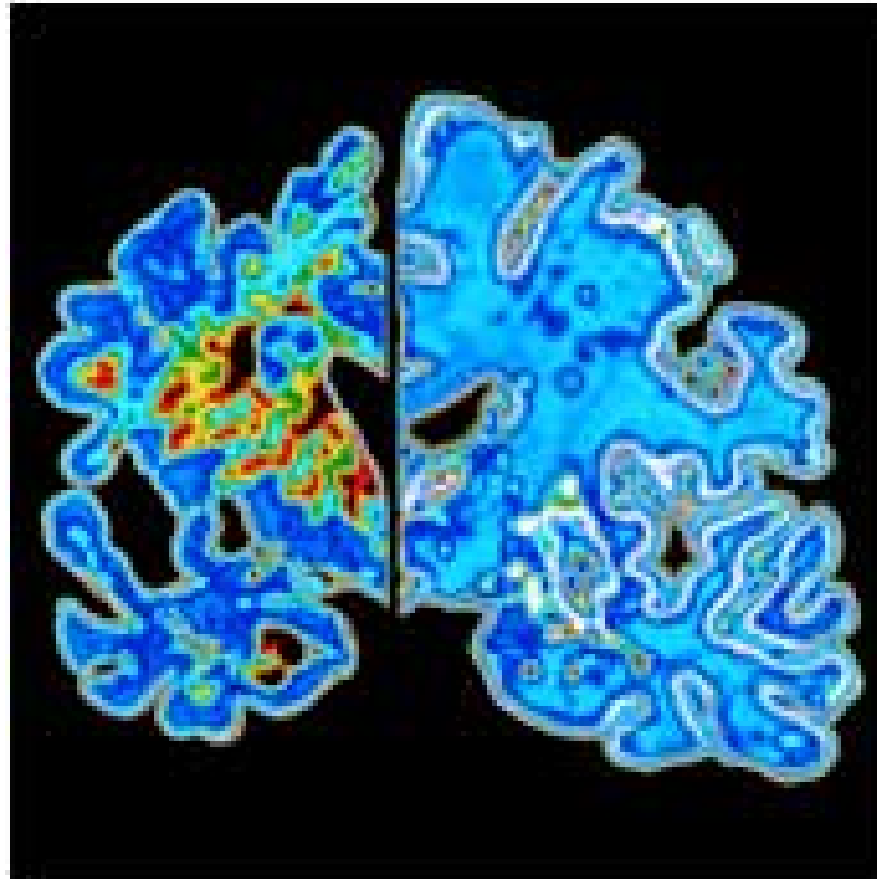
Primary Illnesses Causing Dementia
n=200 (age>60)



Diagnostic Gold Standard- amyloid plaques since Dr. Alzheimer work in 1904

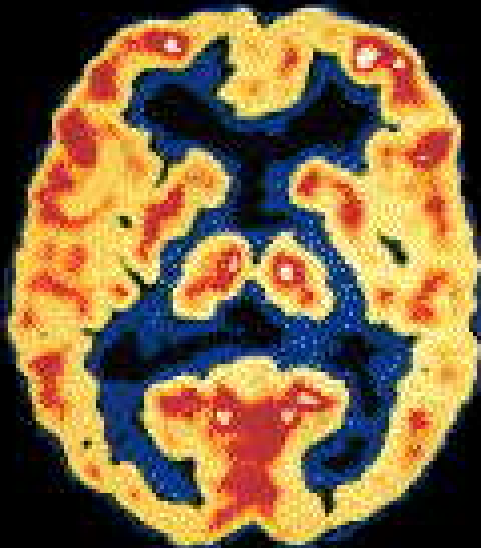


AD Normal

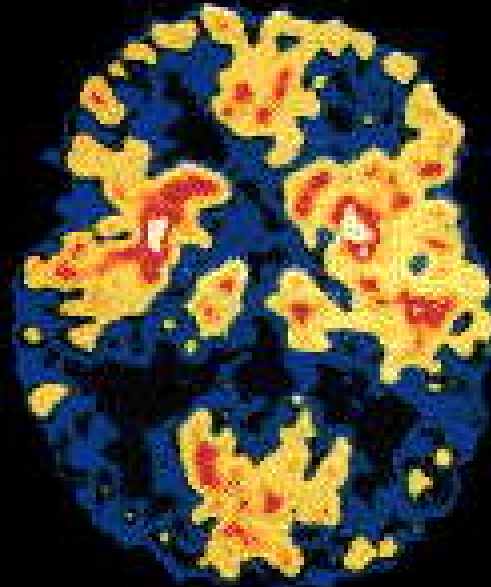


PET

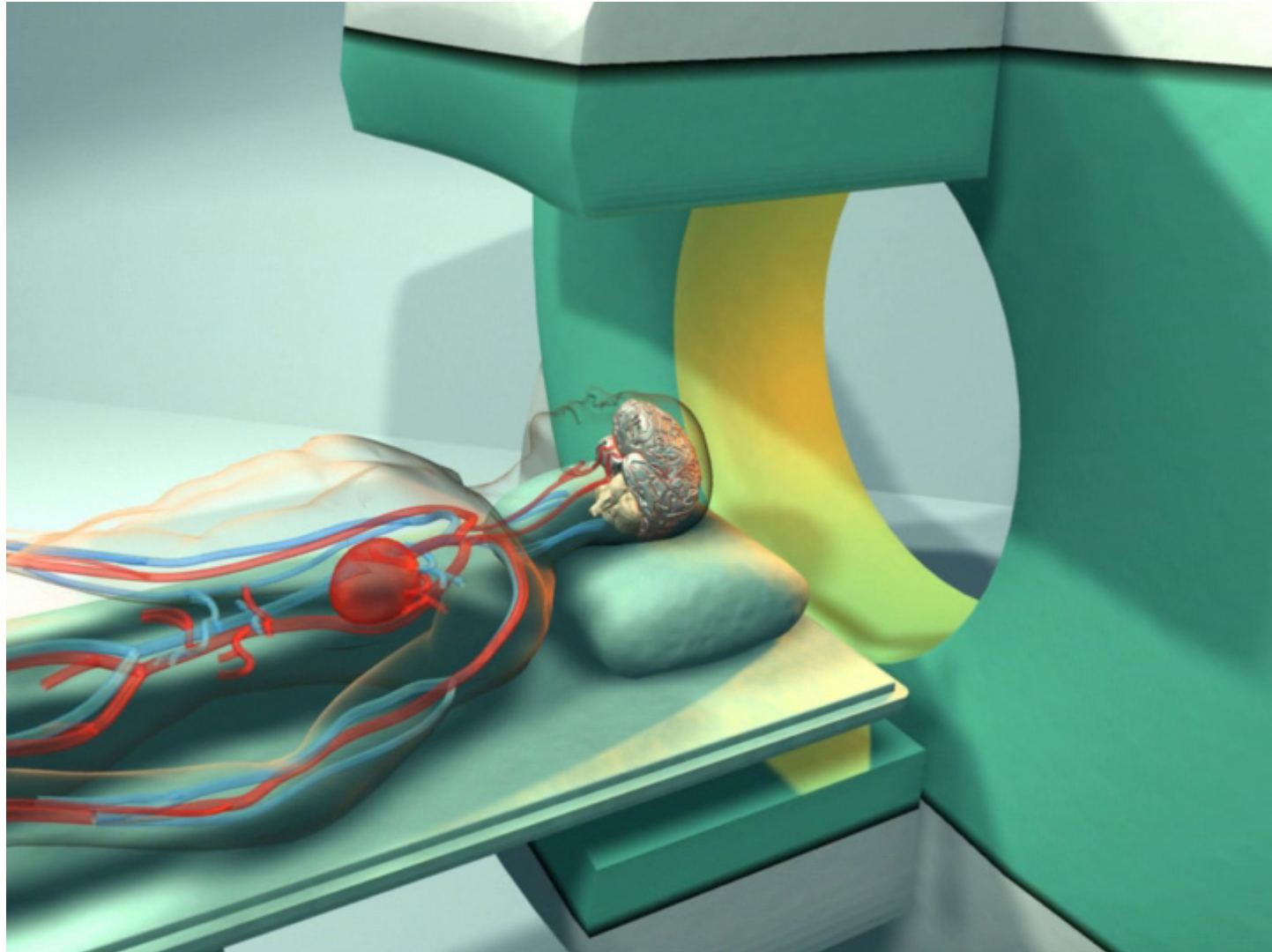
**Normal
Brain**



**Alzheimer's
Disease**



Single Photon Emission Computed Tomography- SPECT
Resolution: 5-10 mm, Time resolution: 15 min.
Sensitivity: 70-80%



Problems:

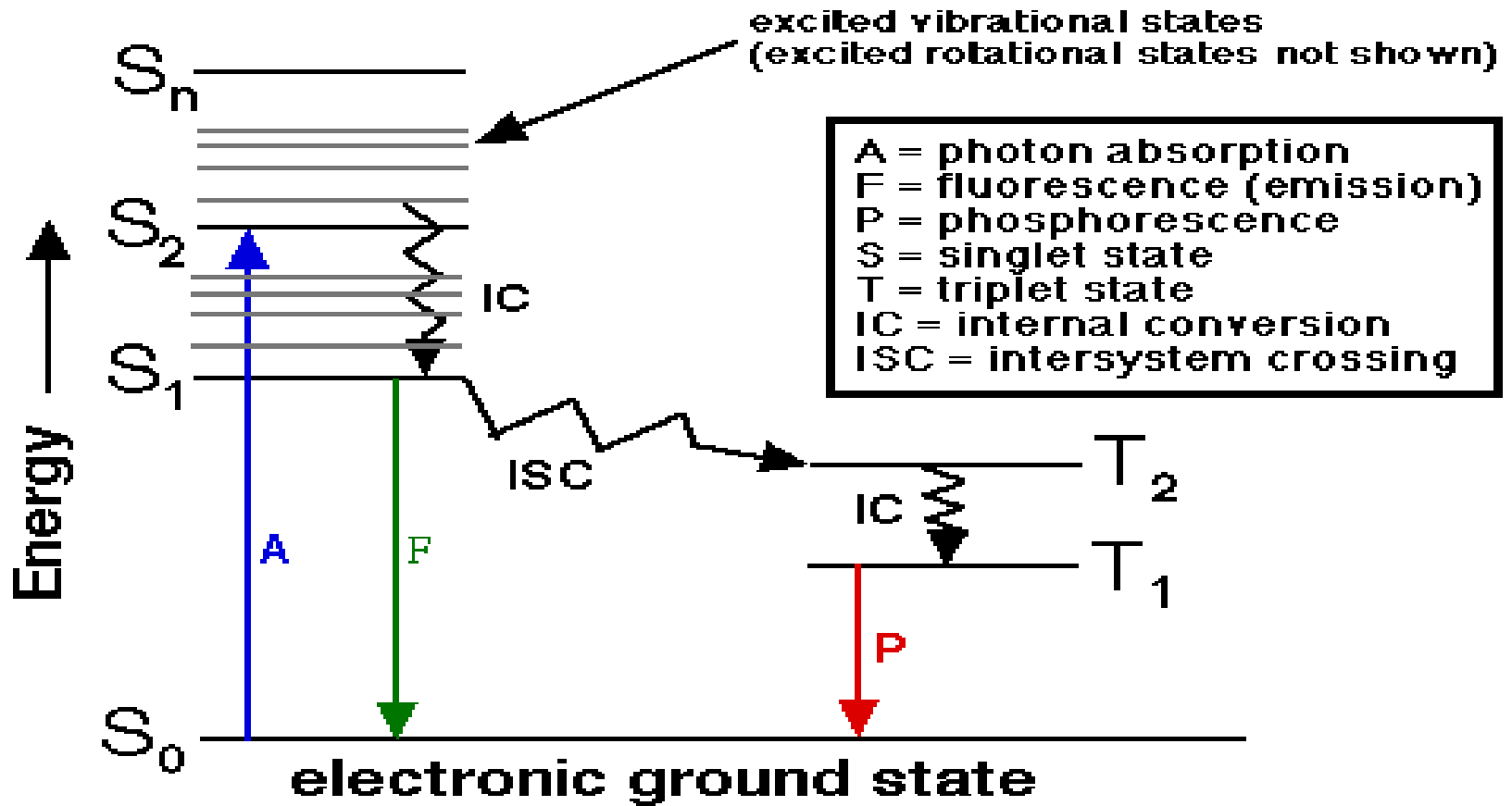
- No **early** diagnostic test is available
- All available, up to now, tests detect symptoms when irreversible damages to neurons occurred

Plan:

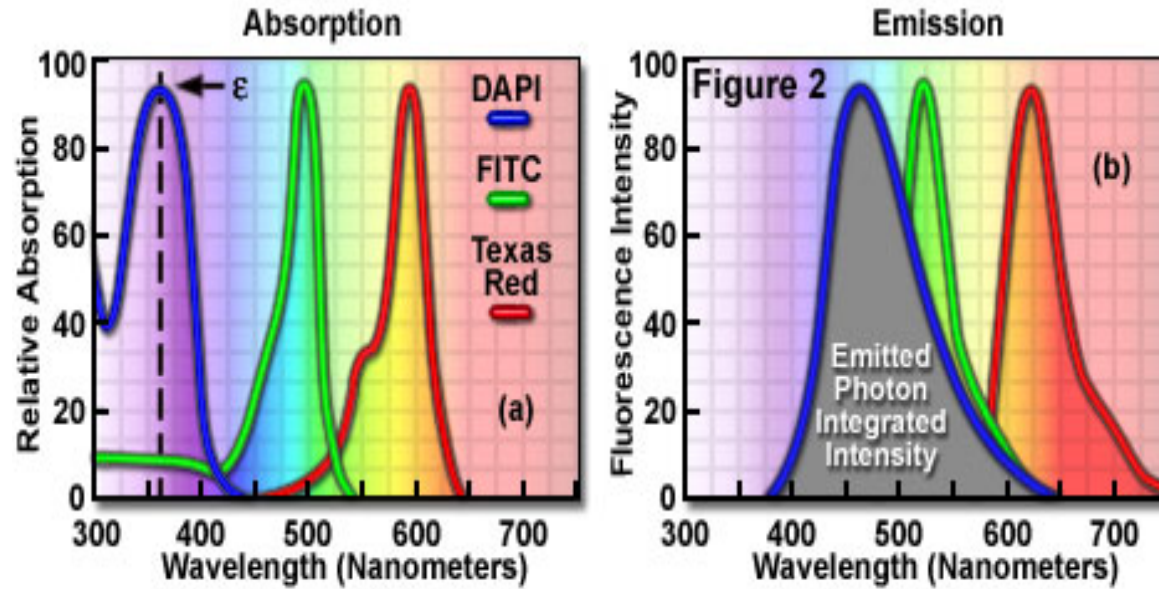
- 1. Fluorescencyjne sondy aromatyczne-Fura,
 - FRET-FLIM: rozdzielczosc przestrzenna, czasowa.
- 2. Fluorescencyjne sondy kwantowe (QD).
 - Przykład: CdSe@ZnS.
 - a. Właściwości.
 - b. Biofunkcjonalizacja.
- 3. Porównanie sond aromatycznych z kwantowymi.
- 4. Przykładowe zastosowania w biologii.
- 5. Nasze zainteresowania:
 - a. Transportery komórkowe w membranach erytrocytów- endocytoza.
 - b. Białka jako rusztowania- amyloid udekorowany Cu(II), Zn(II)
 - c. Elektroprzewodzenie włókien białkowych (IPPT)
 - d. Fluorescencyjne włókna białkowe jako donory/ receptory energii (IPPT).
 - e. 2D matryce czułe na FRET (IPPT).
 - f. Testowanie potencjalnych zastosowań w diagnostyce choroby Alzheimerera.

Właściwości fluorescencyjnych sond aromatycznych

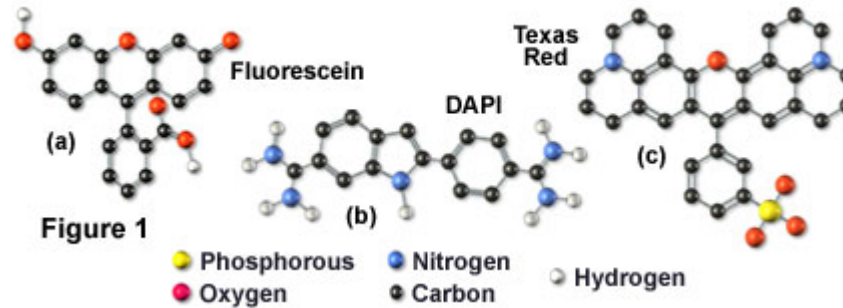
Diagram Jablonskiego



Spectral Profiles of Popular Traditional Fluorophores

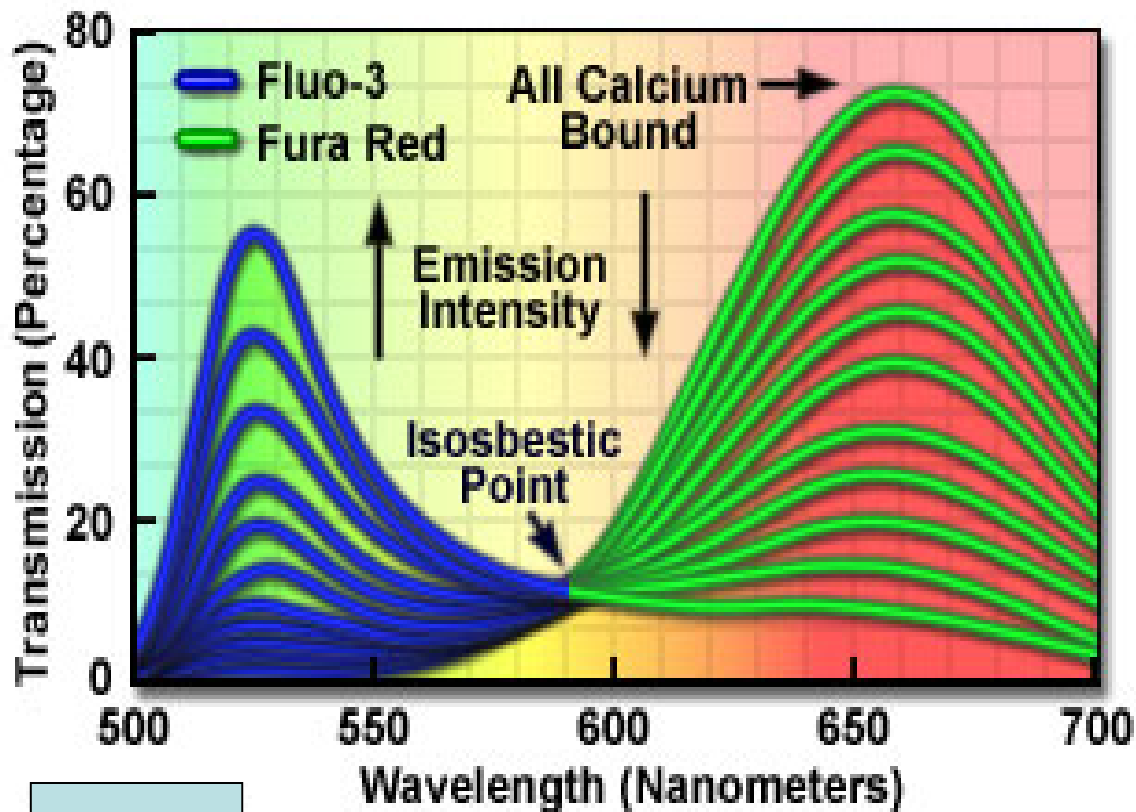
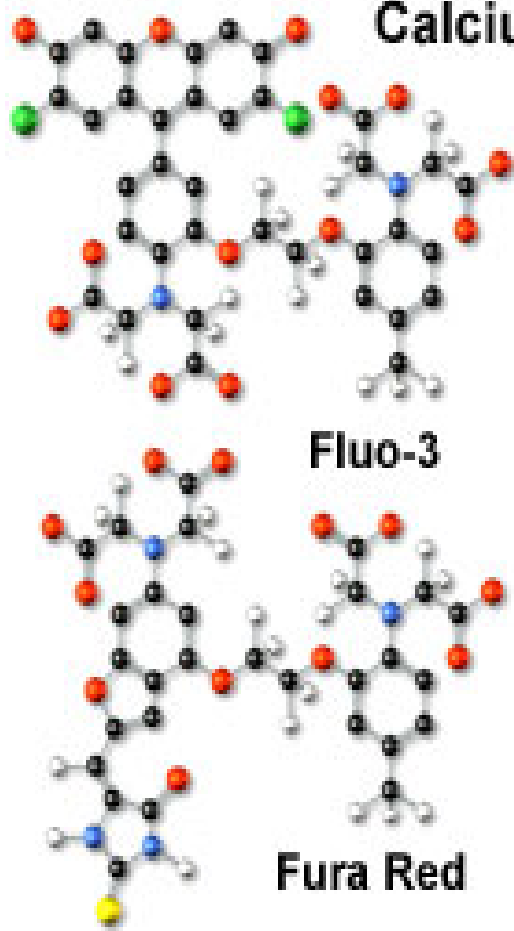


Common Fluorophores in Widefield and Confocal Microscopy



Aromatyczne sondy

Calcium Ratiometric Titration with Fluo-3 and Fura Red

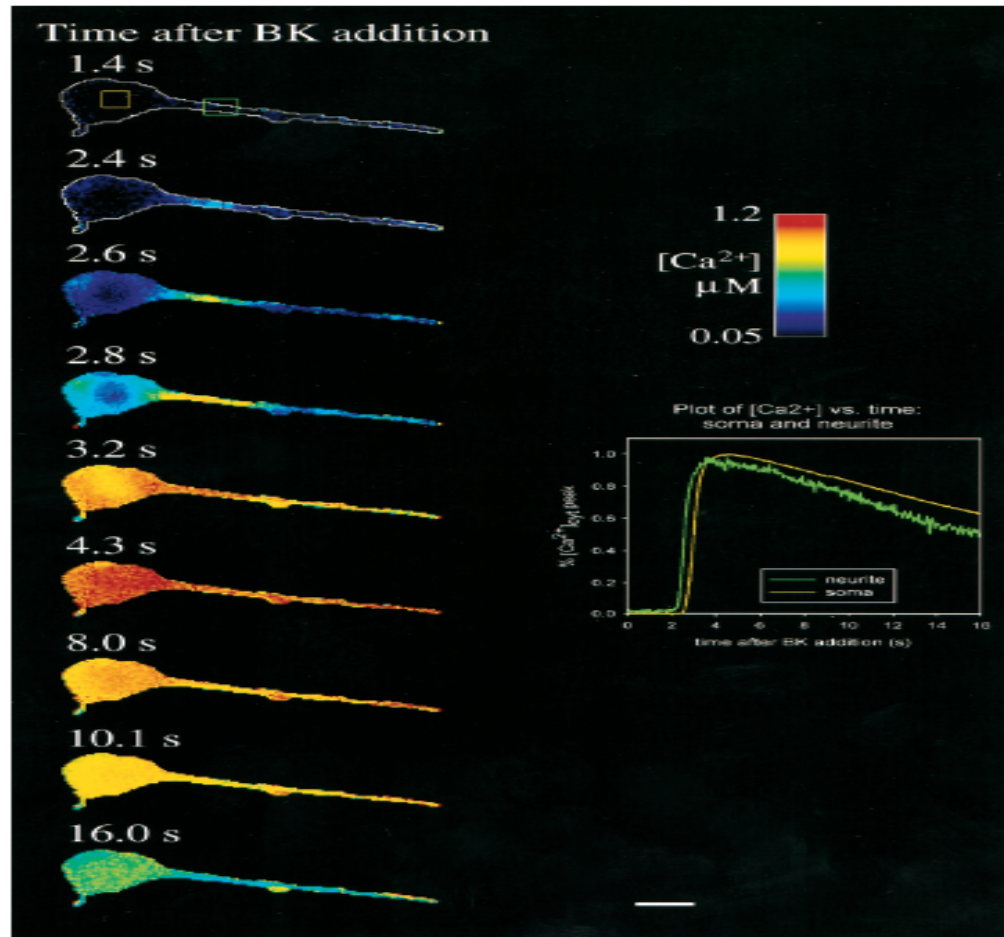


Przykład fali Ca(II) po dodaniu bradykininy do neuroblastomów, Fink, et.al.

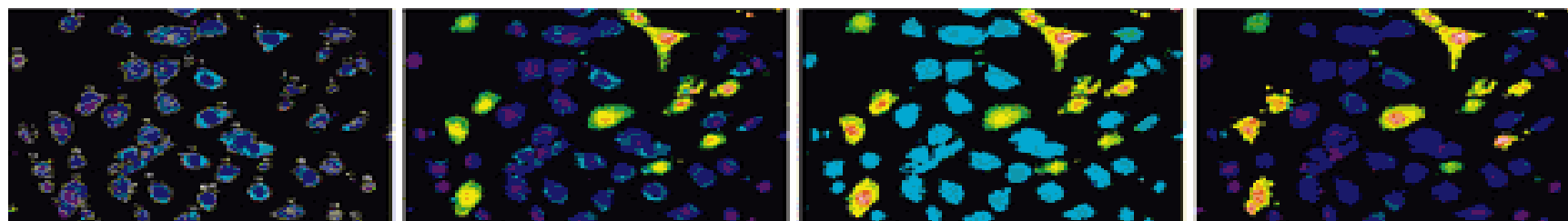
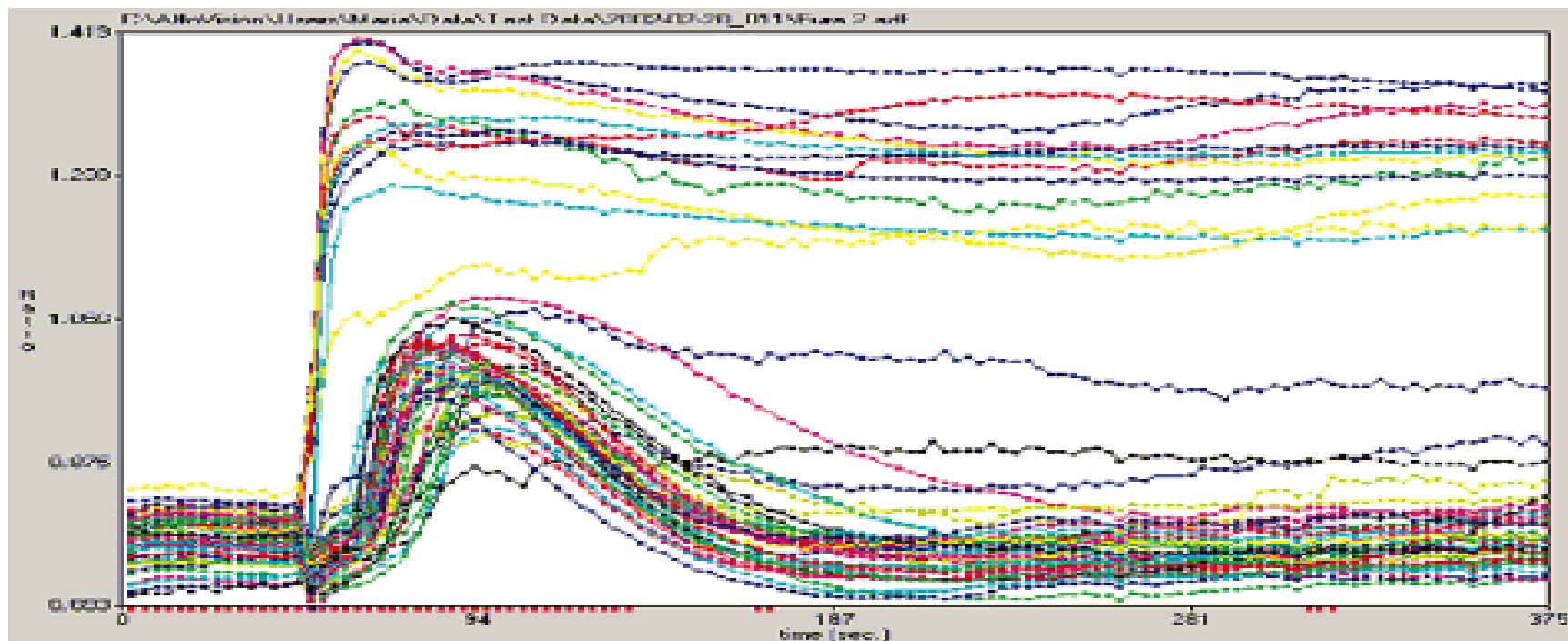
166

Fink et al.

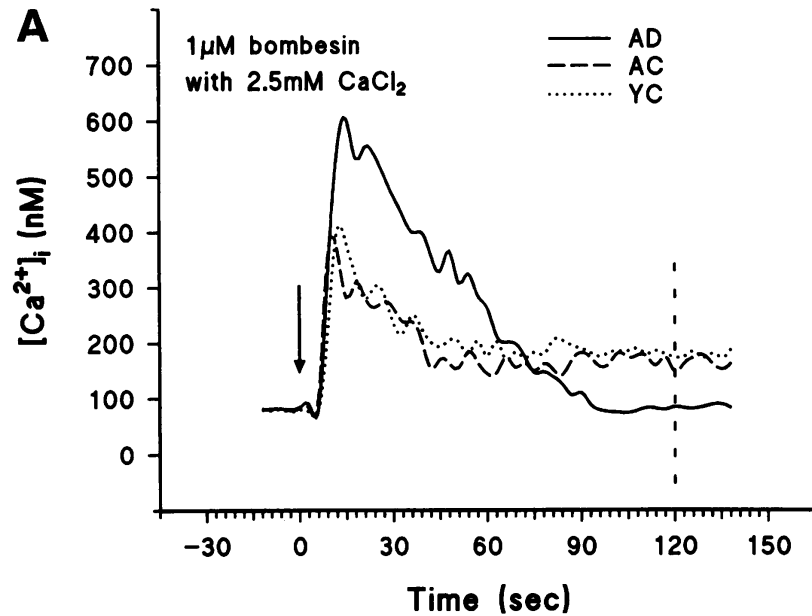
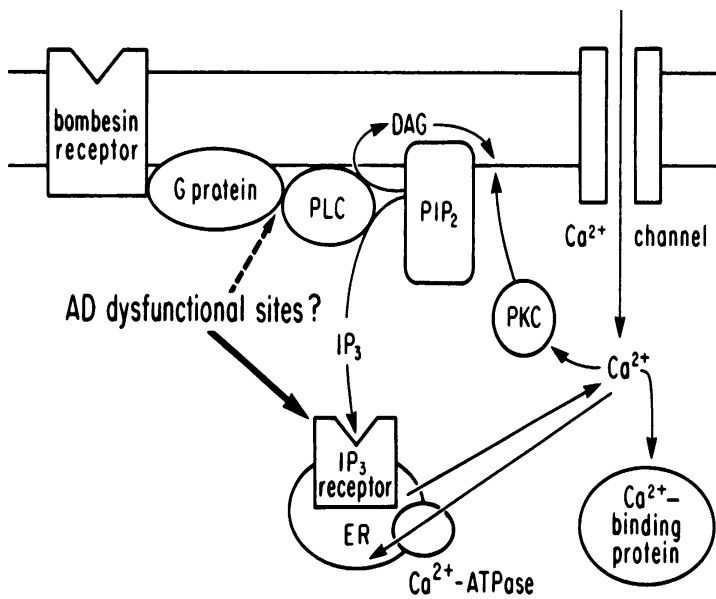
Komórki naładowane
Fura Red



Heterogenność fali Ca(II) w komórkach NIH 3T3 (fibroblasty mysich embrionów)



Efekt bombesyny na falę $\text{Ca}(\text{II})$ w fibroblastach pobranych od zdrowych donorów oraz chorych na AD.



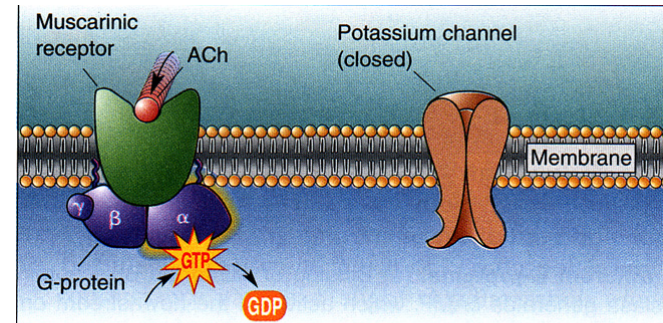
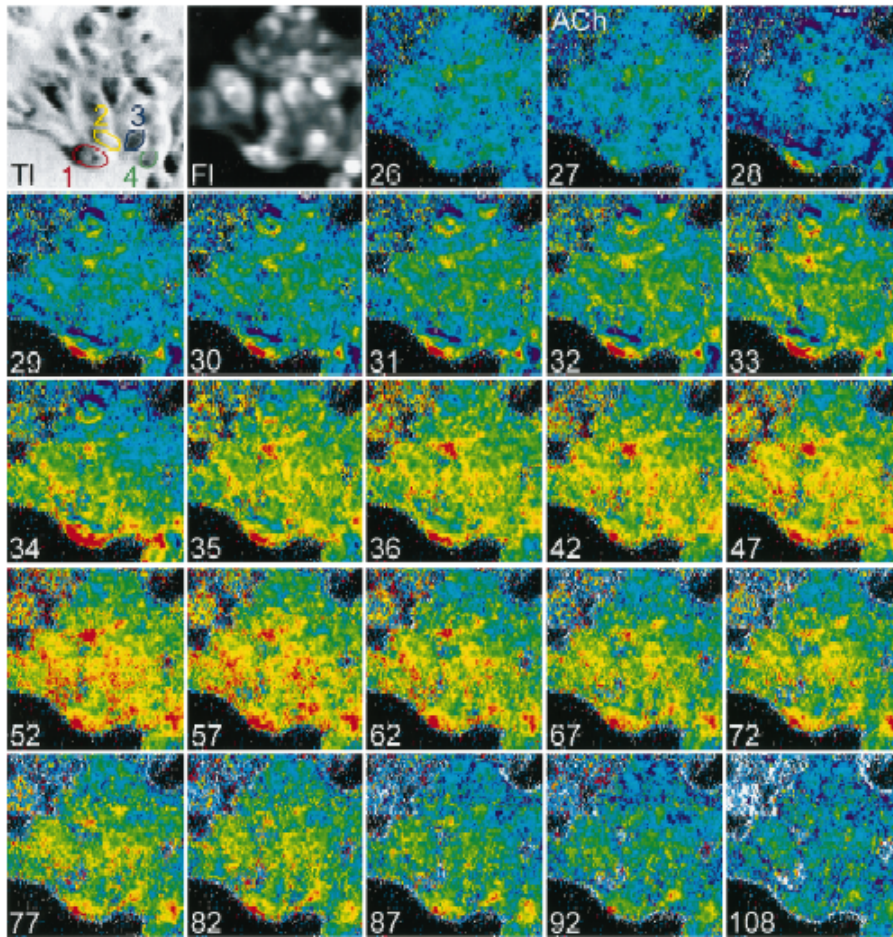
Termogeneza komórek jajowych chńskiego chomika (CHO) w wyniku dodania acetylocholiny w obecności termoczułej sondy fluorescencyjnej (Europium (III)thenoyl trifluoro-acetonate).

Biophysical Journal, 1999

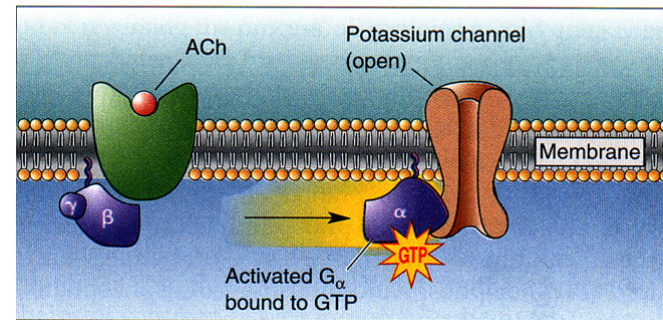
96

Biophysical Journal

Volume 74 January 1999

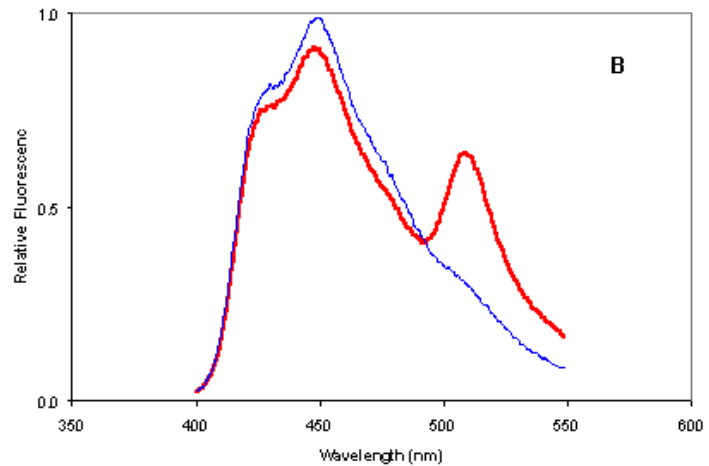
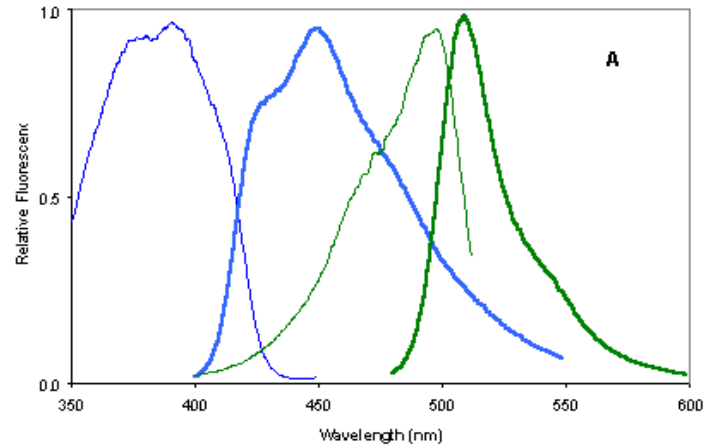
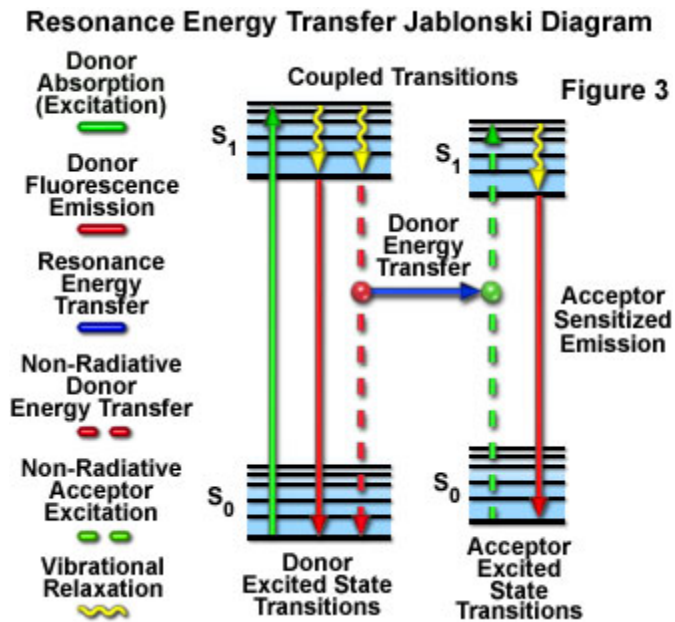


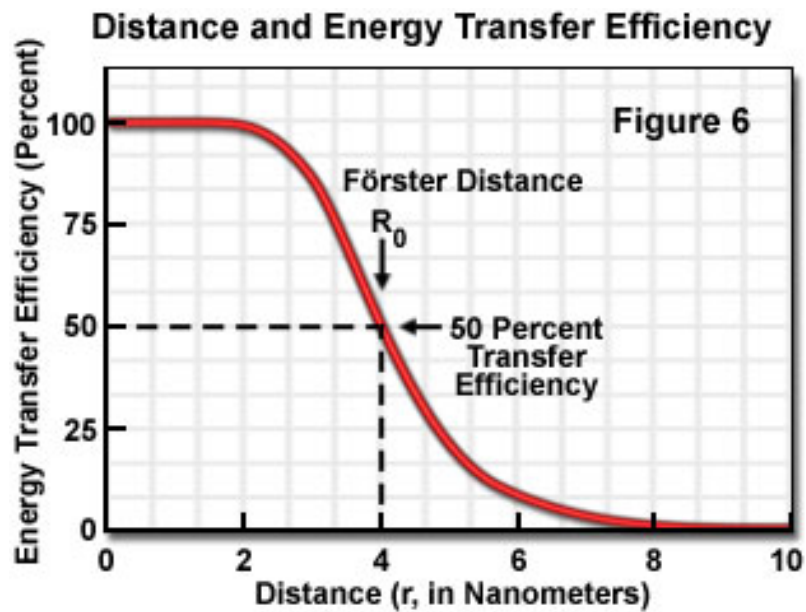
(a)



(b)

FRET- obniżenie emisji donora, wzrost emisji akceptora



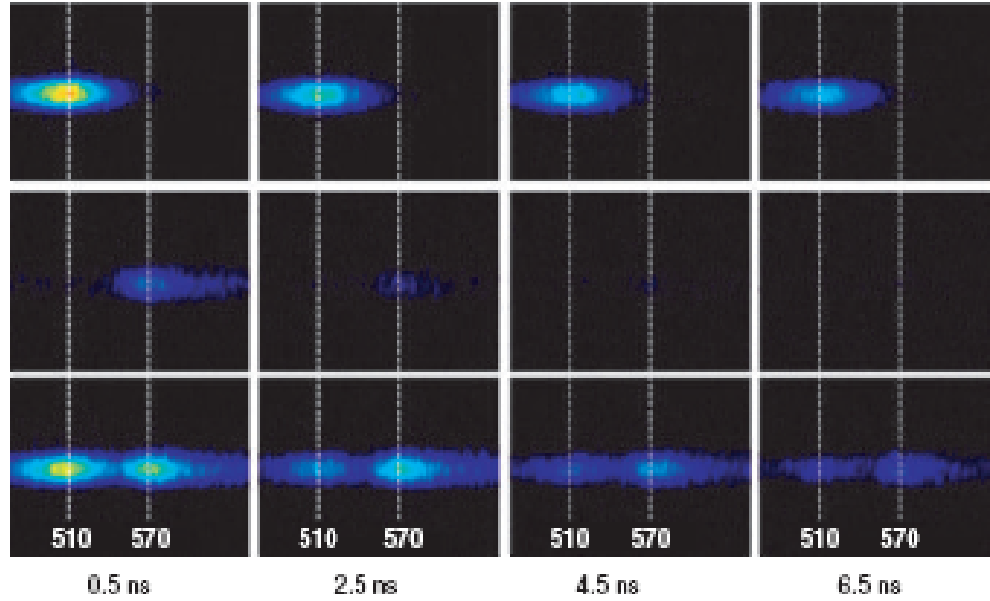


$$E = 1 - \tau'_D / \tau_D$$

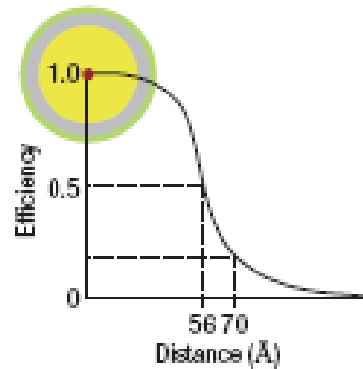
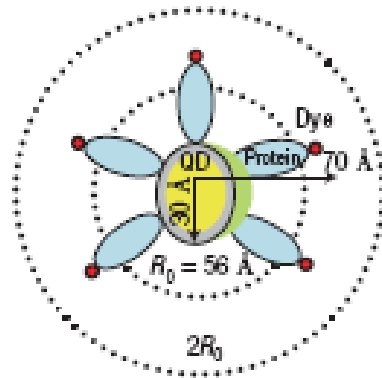
$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}$$

FRET (QD510 donor and MBP acceptor)

a



b

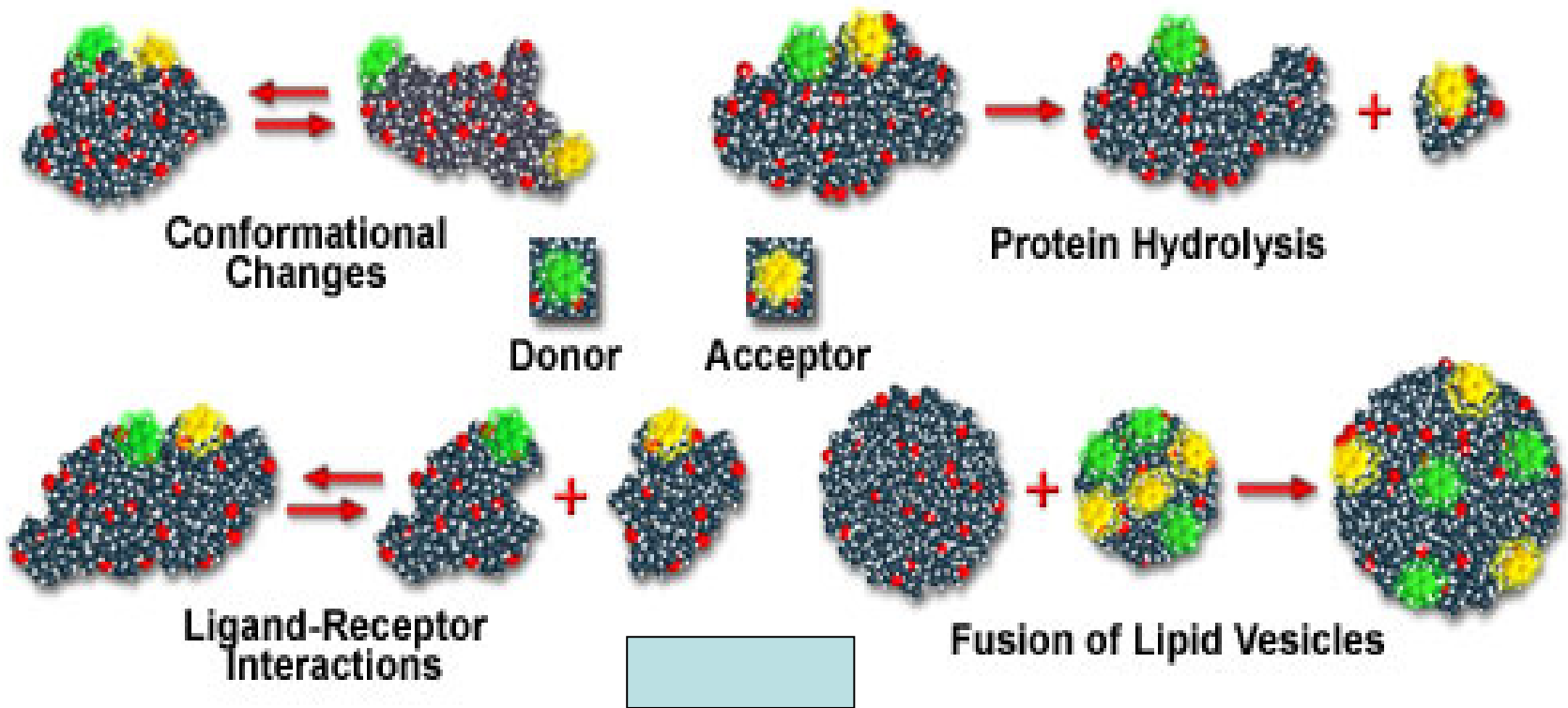


$$Eff = \frac{nR_0^6}{nR_0^6 + r^6}$$

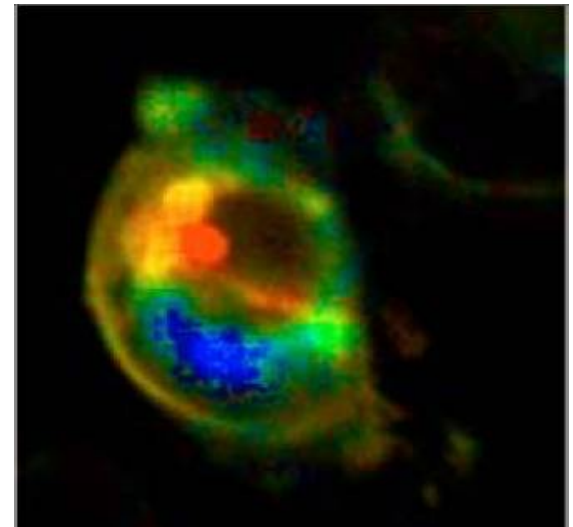
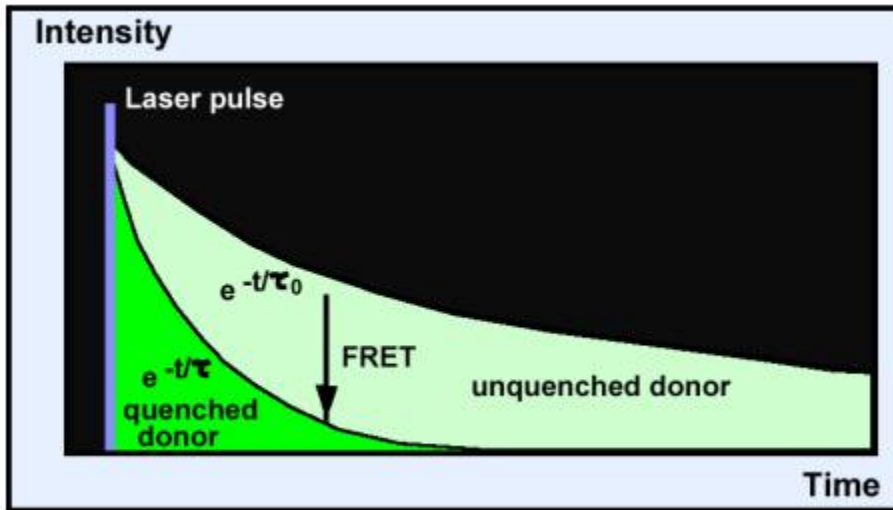
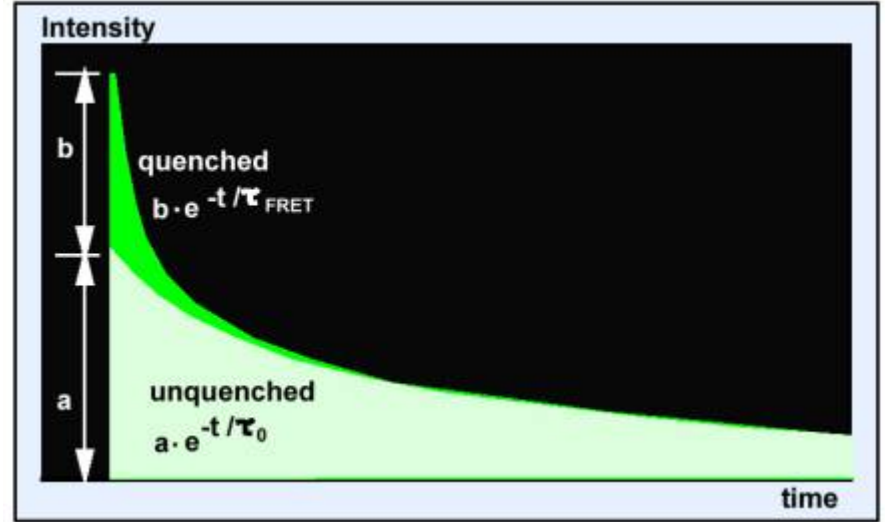
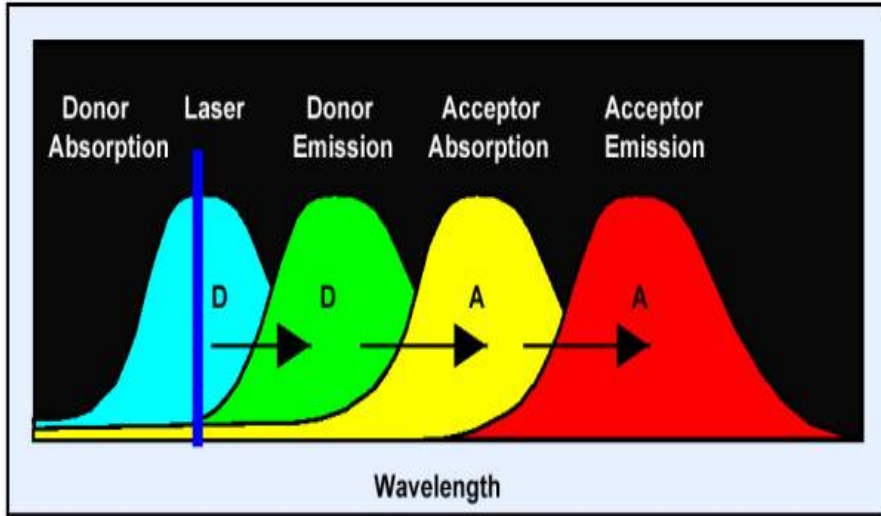
$$R_0 = 56 \text{ \AA}$$

$r(\text{\AA})$	n	Eff (%)
70	1	21.8
70	5	58.0

Biomolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer Applications

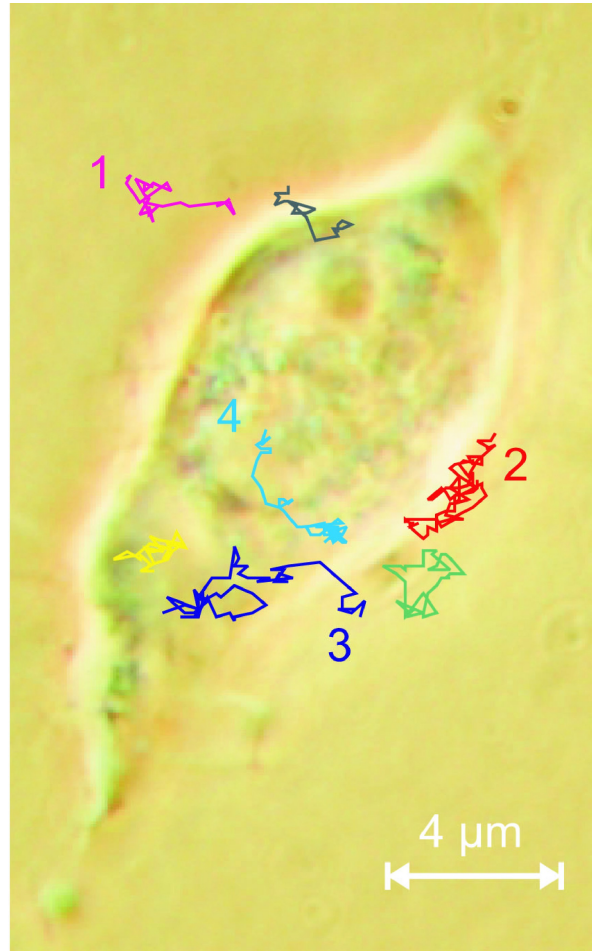


FRET- FLIM, kinetyka



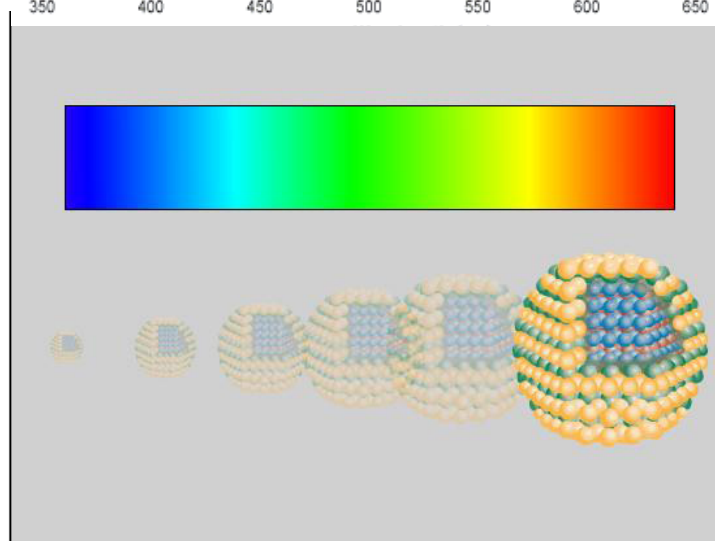
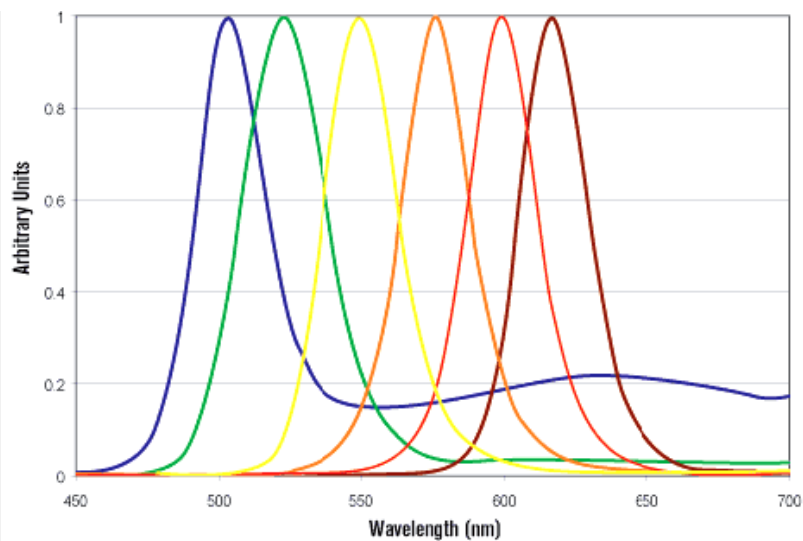
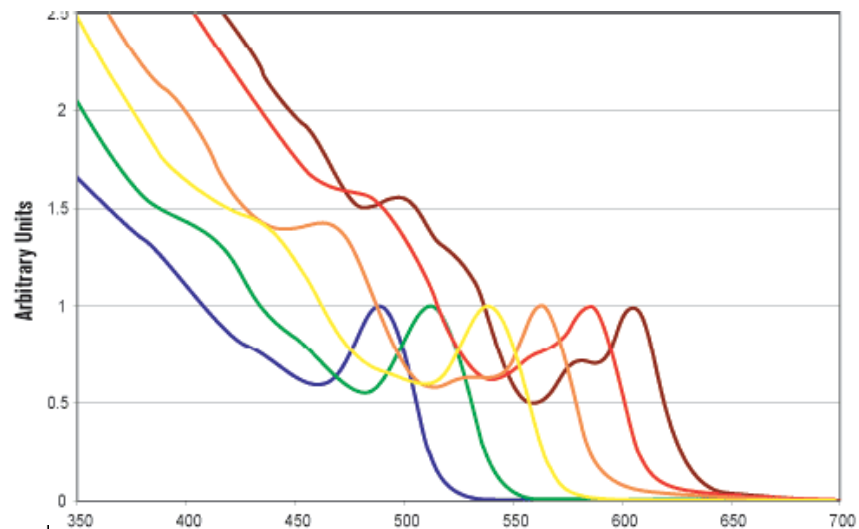
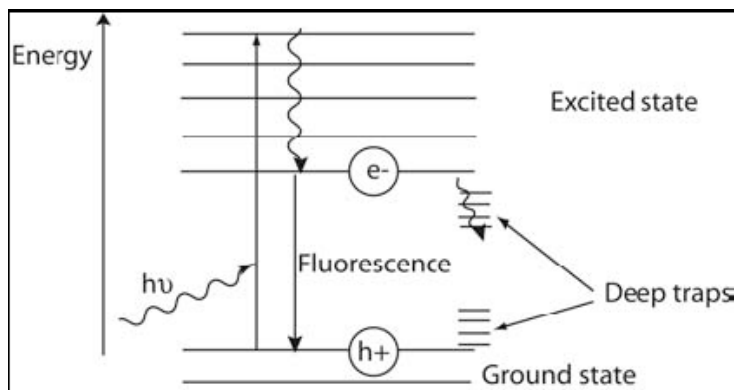
Trajektorie adeno-wirusa infekującego żywą komórkę HeLa

Sonda: GFP, Brauchle, et, al. Science

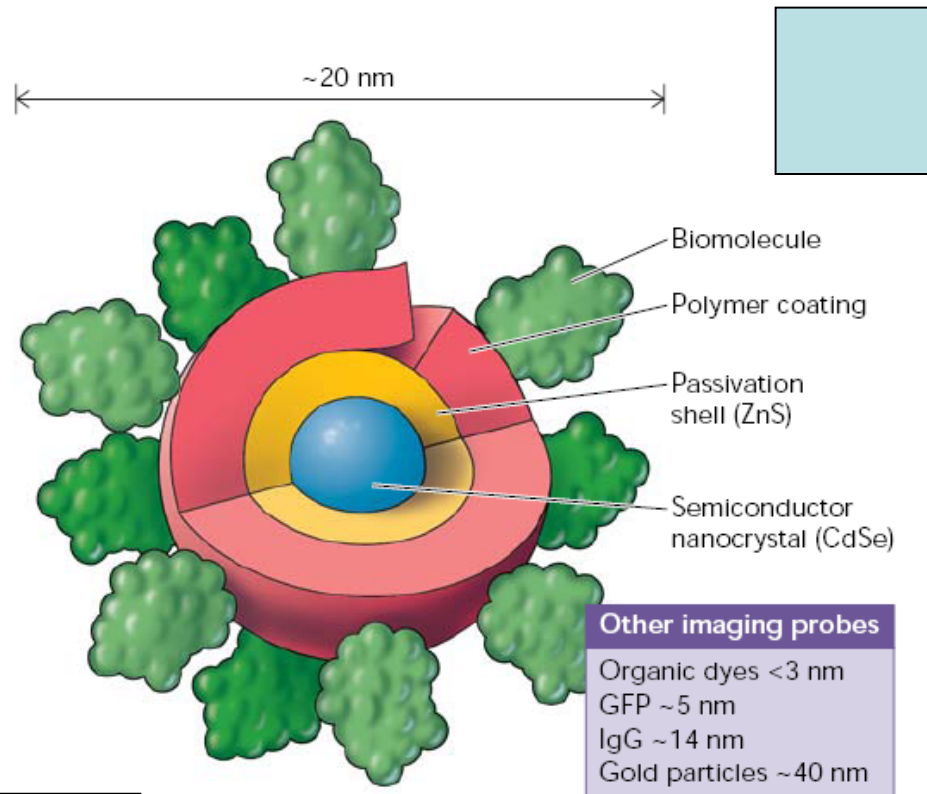


Właściwości fluorescencyjnych nanokryształów-
nowa generacja sond fluorescencyjnych

Absorption and emission spectra of CdSe@ZnS NCs having different size, in organic solvent.



Struktura QD stosowana w biologii



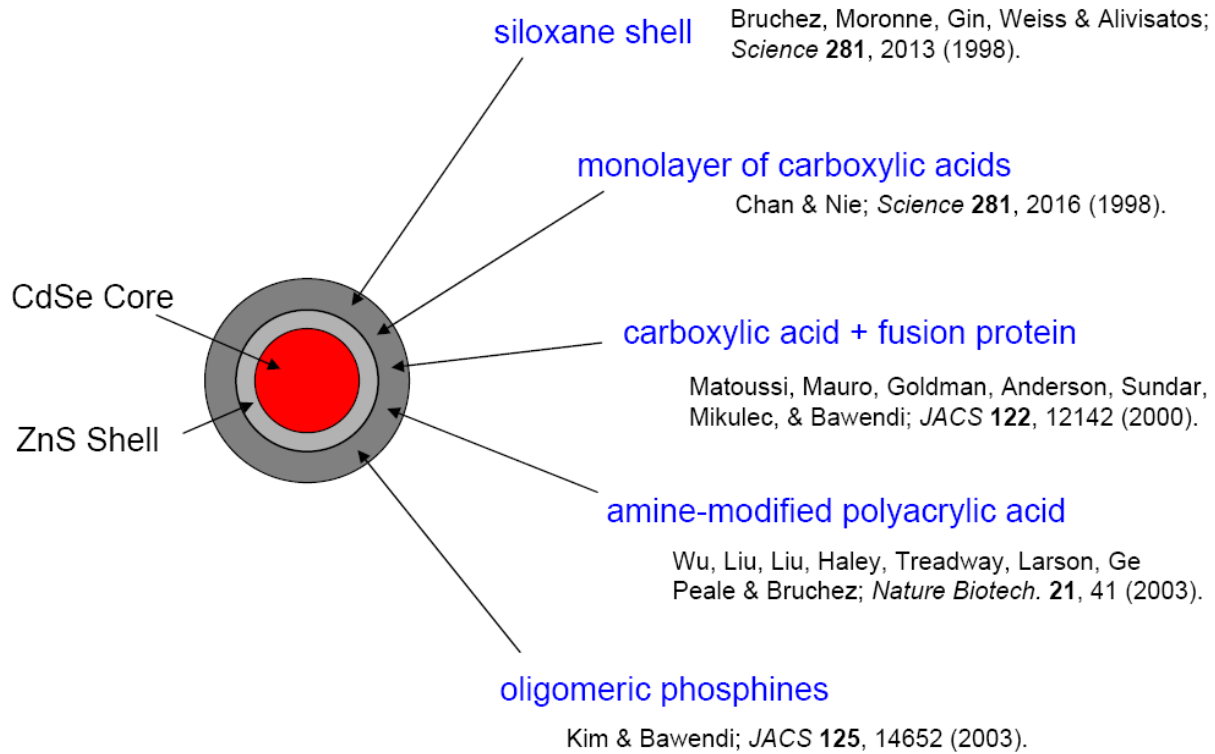
Structure of a quantum dot

Quantum dots (QDs) consist of a CdSe nanocrystal surrounded by a ZnS passivation shell. The surface is coated with a polymer that protects the QD from water and allows for chemical coupling to biomolecules. The sizes of other common imaging probes are listed for comparison.

Metody biofunkcjonalizowania kropek kwantowych

Jak uczynic QD hydrofilowe?

Different Strategies

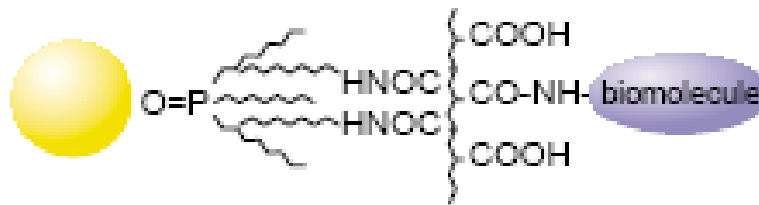


Bioconjugation of QD: a. mercaptoacetic acid, b. TOPO capped QD bound to acrylic acid polymer, c. mercaptosilane method, d. electrostatic method, e. microbeads, nanobeads.

(a) Bifunctional linkage



(b) Hydrophobic attraction



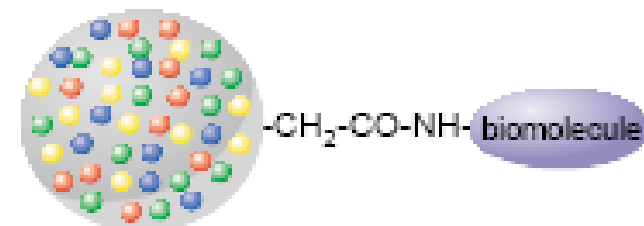
(c) Silanization



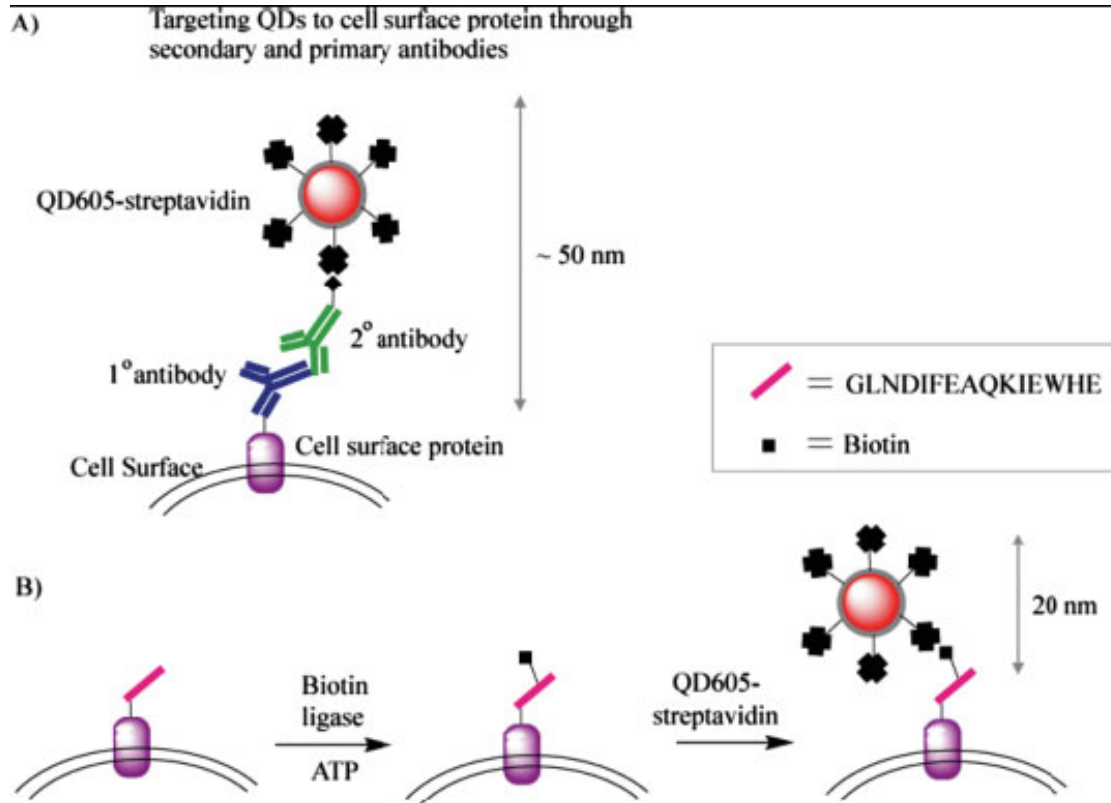
(d) Electrostatic attraction



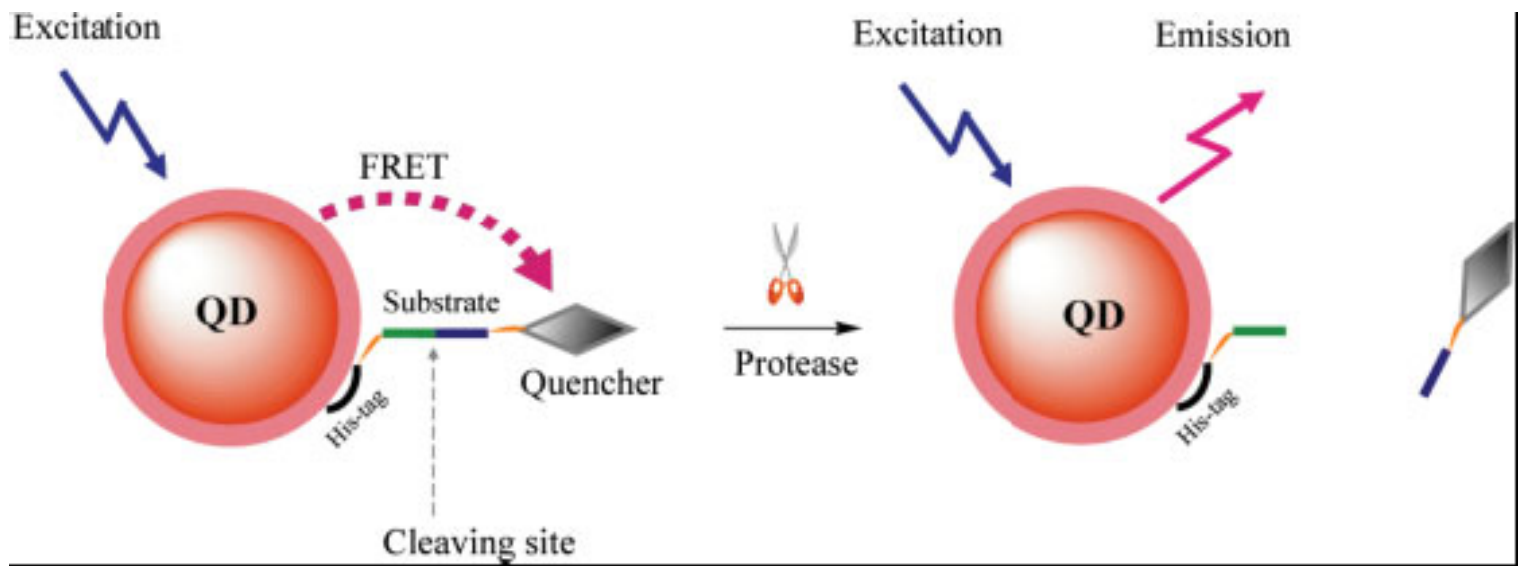
(e) Nanobeads



Strategie „opłaszczania” QD: a. dwa przeciwciała, b. biotyna-streptoawidyna

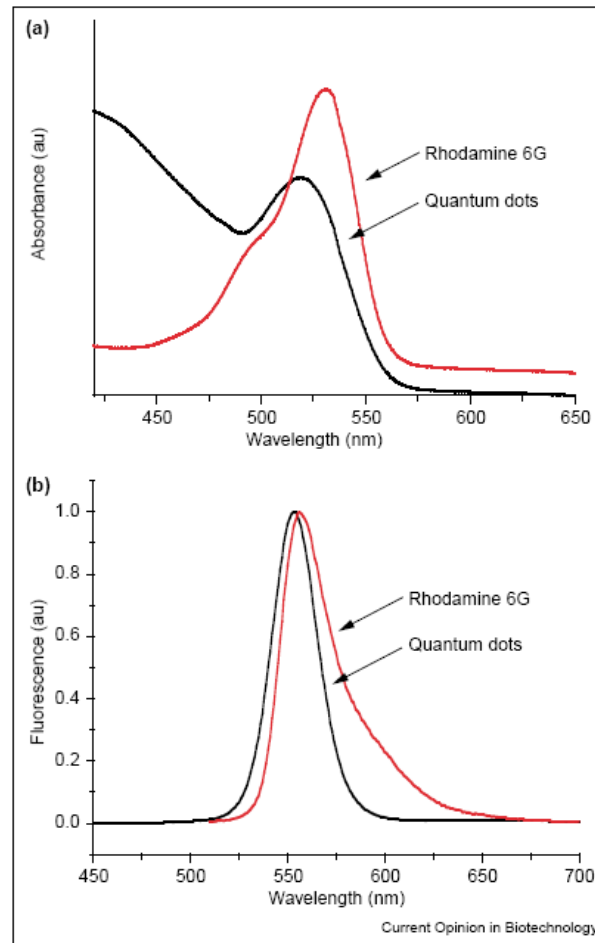


QD jako detektor proteolizy

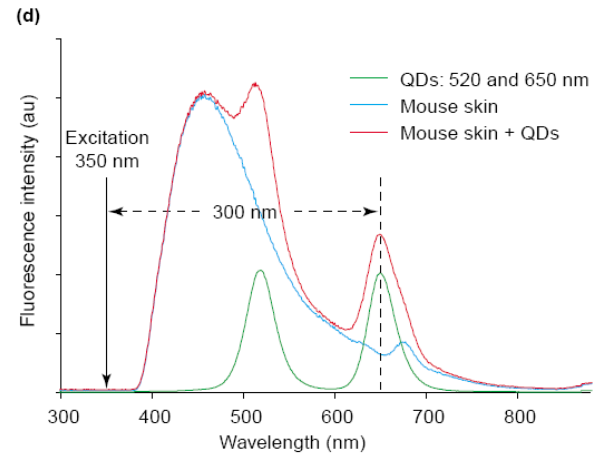
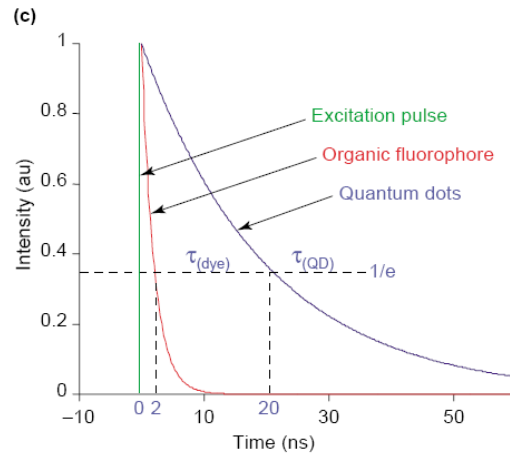
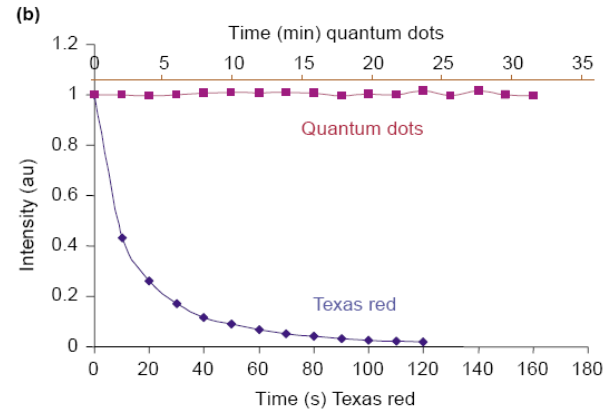


Bezpośrednie porównanie sond aromatycznych z QD:

Porównanie aromatycznej sondy z QD540



Porównanie aromatycznych sond fluorescencyjnych z QD



Porównanie QD z sondami aromatycznymi:

- 1. Emisja może być „strojona” wielkością QD.
- 2. Wysoki współczynnik absorpcji QD.
- 3. Wysoki „extinction coefficient” $0.5-5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
 - sprawia, że QD świecą ok. 10x „jaśniej” od aromatów.
- 4. Wysoki współczynnik efektywności emisji (Q_{eff}).
- 5. Foto-stabilność QD (3 rzędy wielkości bardziej stabilne na „fotowysbielenie”).
- 6. Duży współczynnik Stokes.
- 7. Wielokolorowość- multipleks.
- 8. Długie czasy emisji (0.2 vs. 20 ns), kontrast (sygnał do tła)
 - dramatycznie wyższy.

Przykłady zastosowań kropek kwantowych w biologii komórek

Względna stabilność QD630 vs. aromatycznej sondy Alexa488

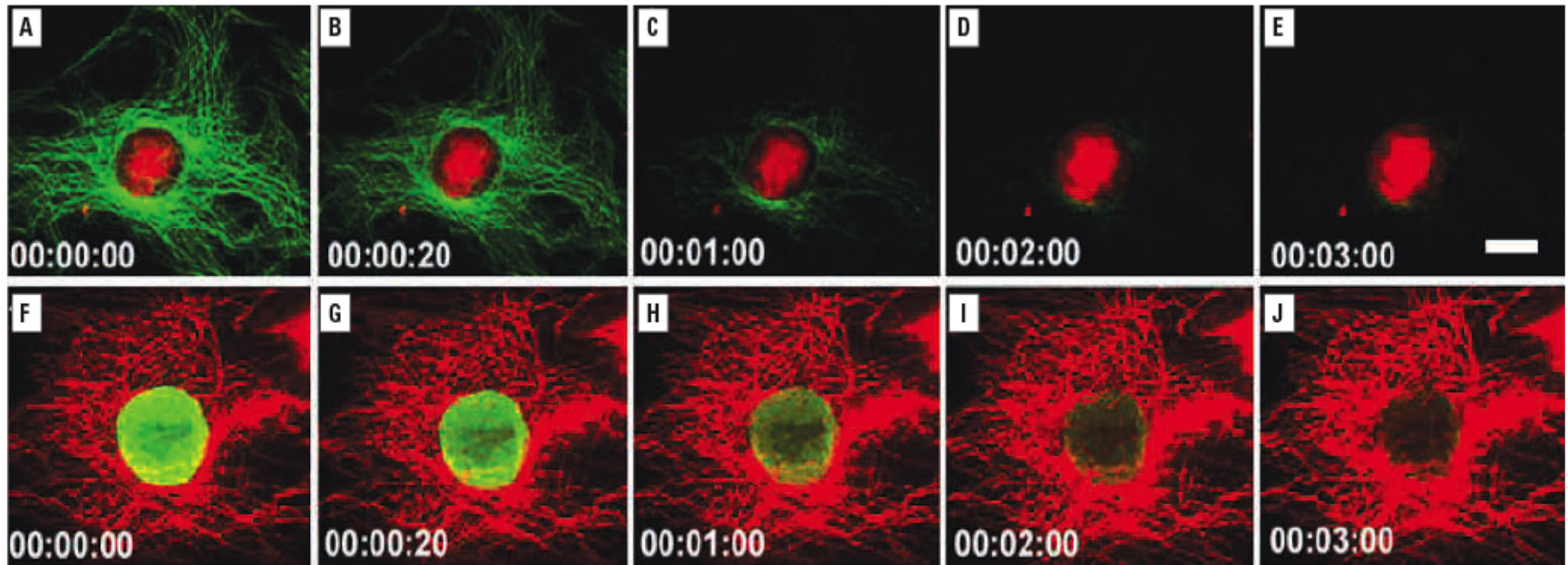
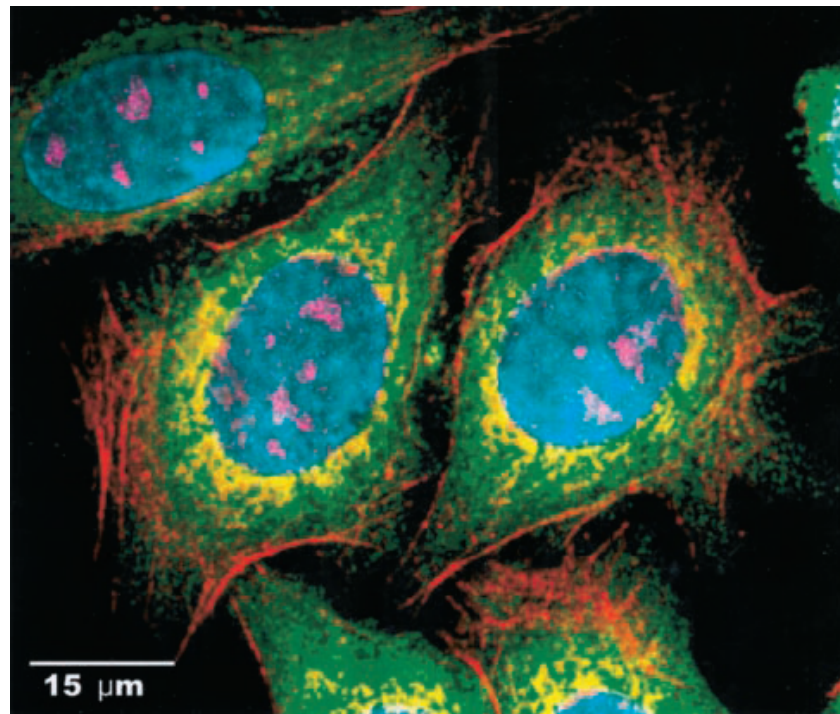
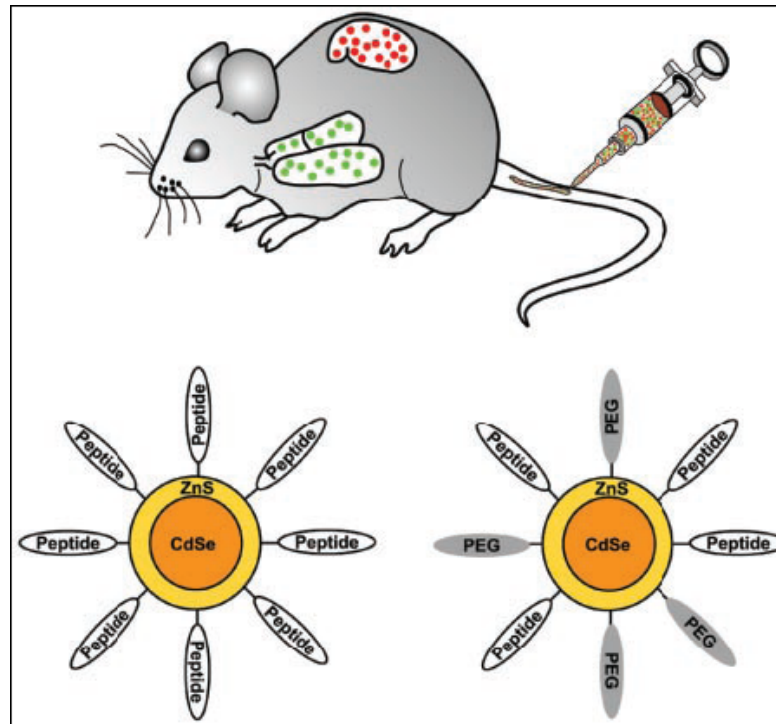


Figure 1. Fluorescent photostability and fluorescence intensity of quantum dots (QD 630) compared with organic dye Alexa 488. (A–E) Nuclei are labeled bright red with QD 630–streptavidin; actin fibers are stained green with Alexa 488. (F–J) Images of actin fibers are labeled red with QD 630–streptavidin; nuclei are labeled green with Alexa 488. Numbers in the bottom left corner indicate elapsed time. Scale bar, 10 μm . From Wu et al. (2003) and reproduced with permission from Quantum Dot Corp. (Hayward, CA).

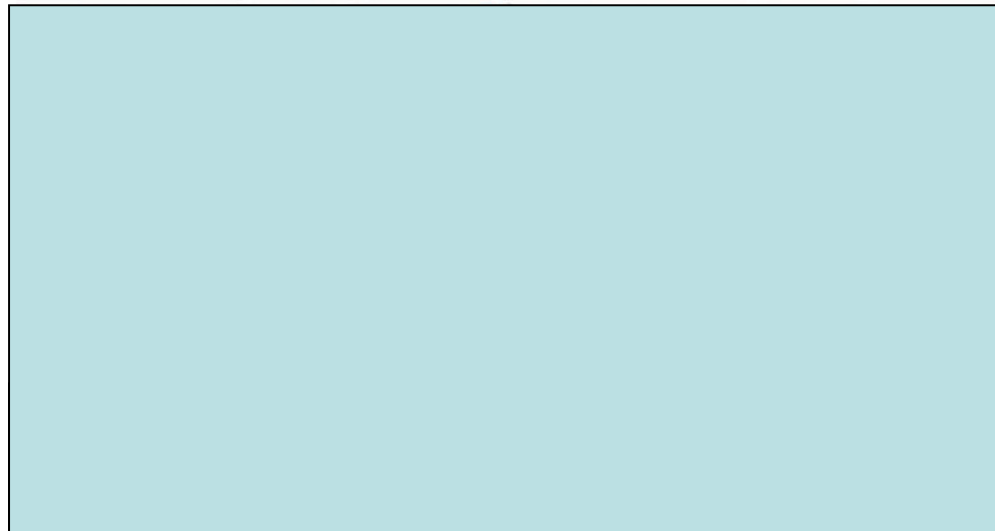
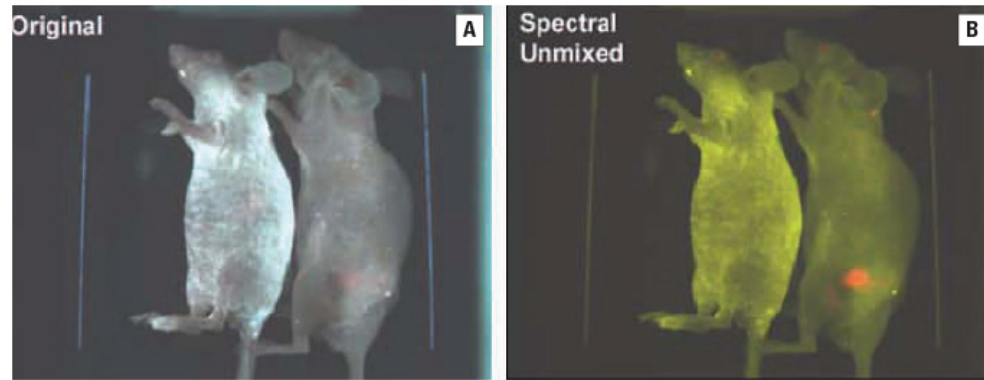
Simultaneous 5-color imaging in fixed human epithelial cells using QD conjugates. The colors allowed localization of cellular proteins and substructures: nuclei (cyan), cell proliferation protein Ki-67 (magenta), mitochondria (orange), microtubules (green), and actin filaments (red). Courtesy of Quantum Dot Corp. (Hayward, Calif).



QD opłaszczzone przeciwciałem akumuluje się w specyficznych organach



QD pokryty przeciwciałem do patologicznego „białka prostaty”



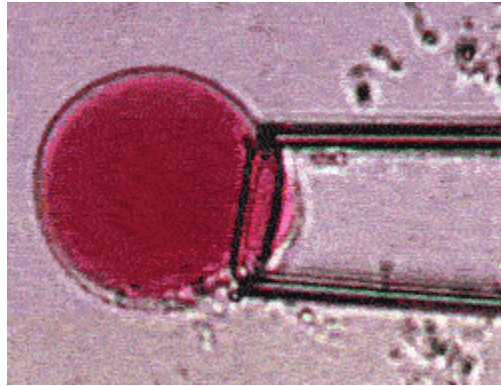
Nasze zainteresowania:

- Transport sond diagnostycznych oraz biologicznie aktywnych cząsteczek do żywej komórki.
- Białka jako rusztowania dla nanocząsteczek, komórek, lekarstw.
- Wielofunkcyjne sondy strukturalne.

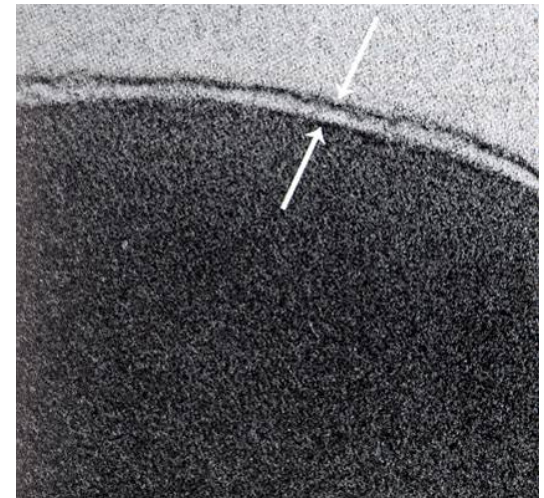
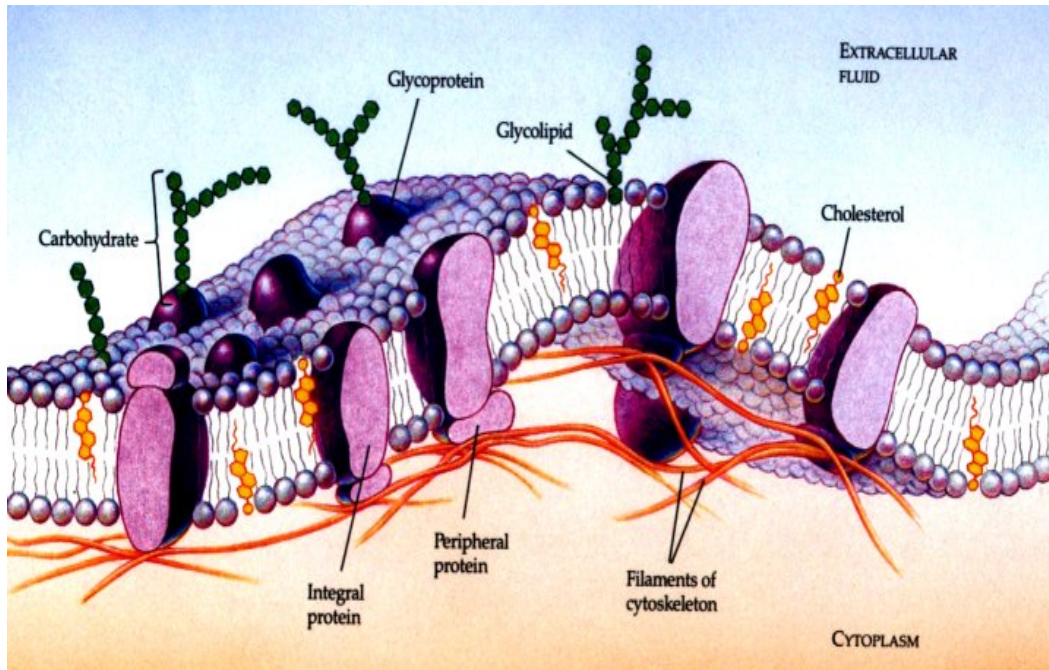
Jak to realizujemy?

- 1. Zamykamy sondy w duchach i pęcherzykach z membran erytrocytów.
- 2. Drogą endocytozy wprowadzamy sondy do cytosolu komórki gospodarza.

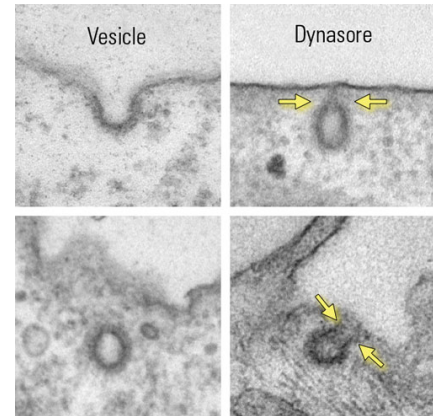
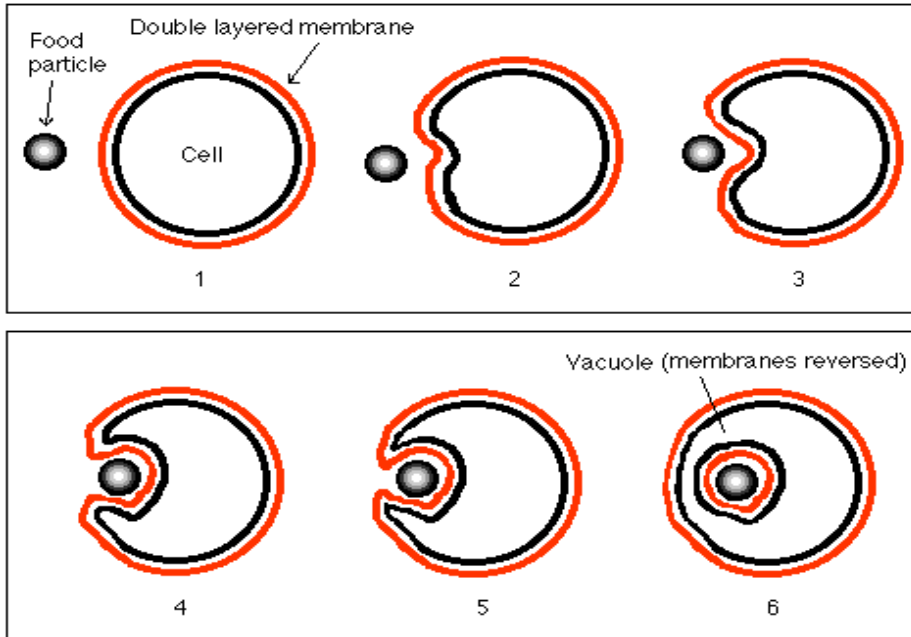
Dlaczego wybraliśmy membrany erytrocytów ?

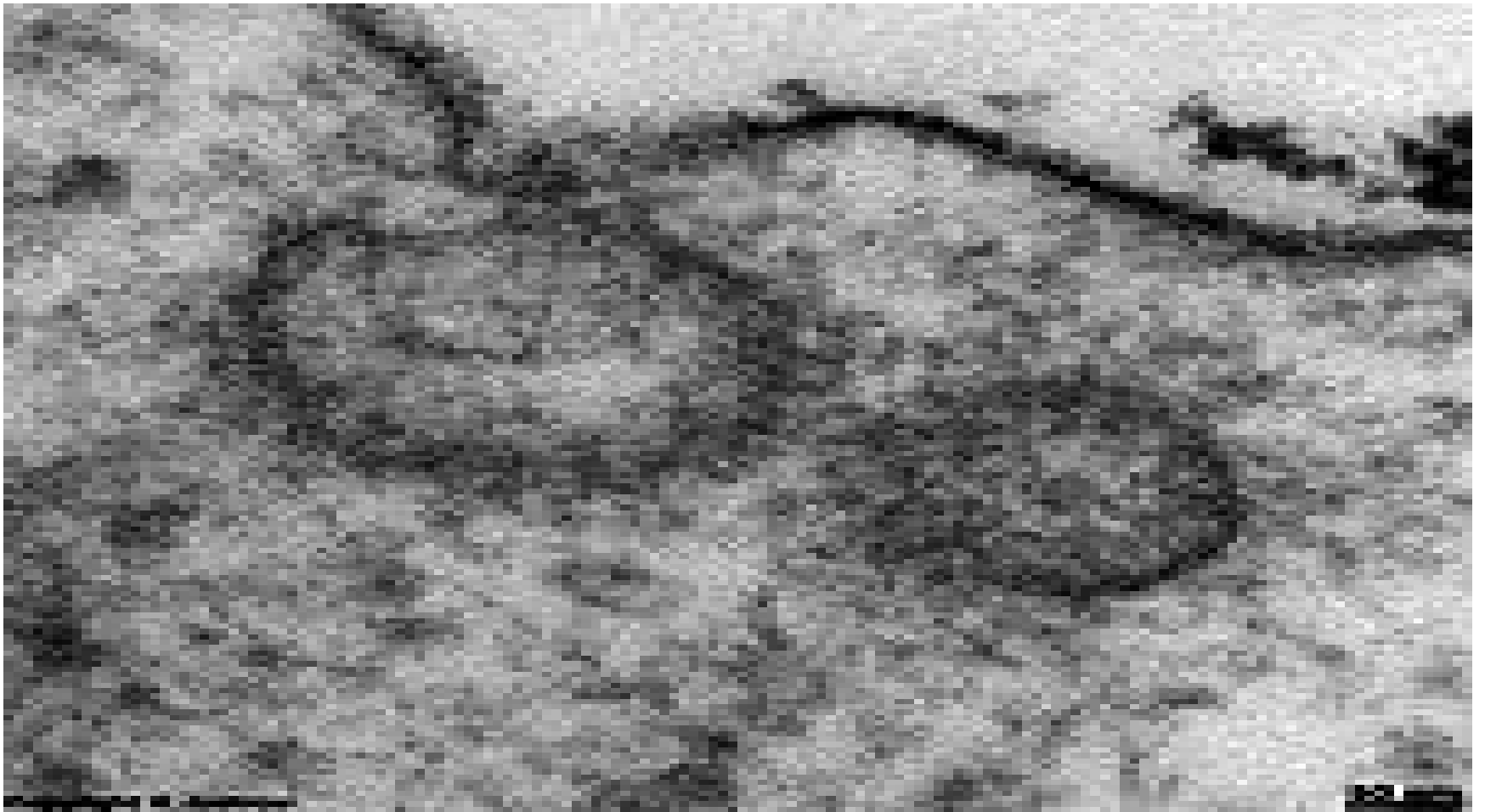


Struktura membrany komórkowej erytrocytu (grubość:około 10nm)

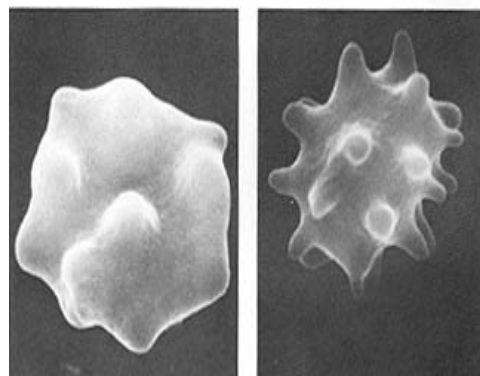
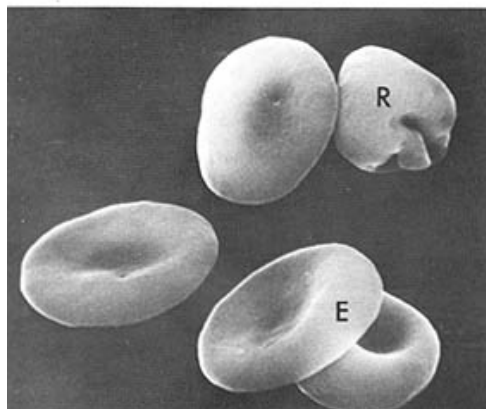
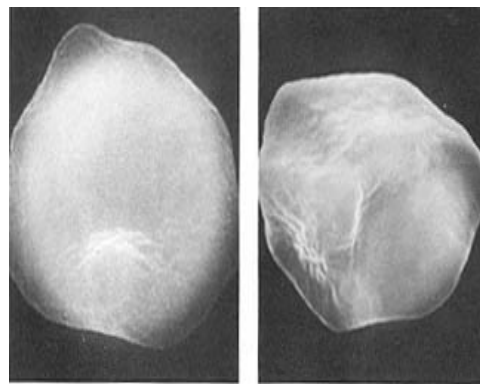
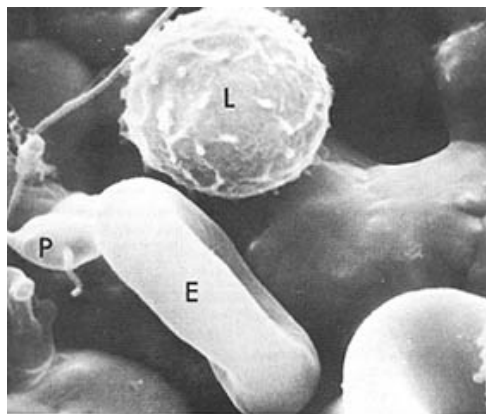


Endocytosis

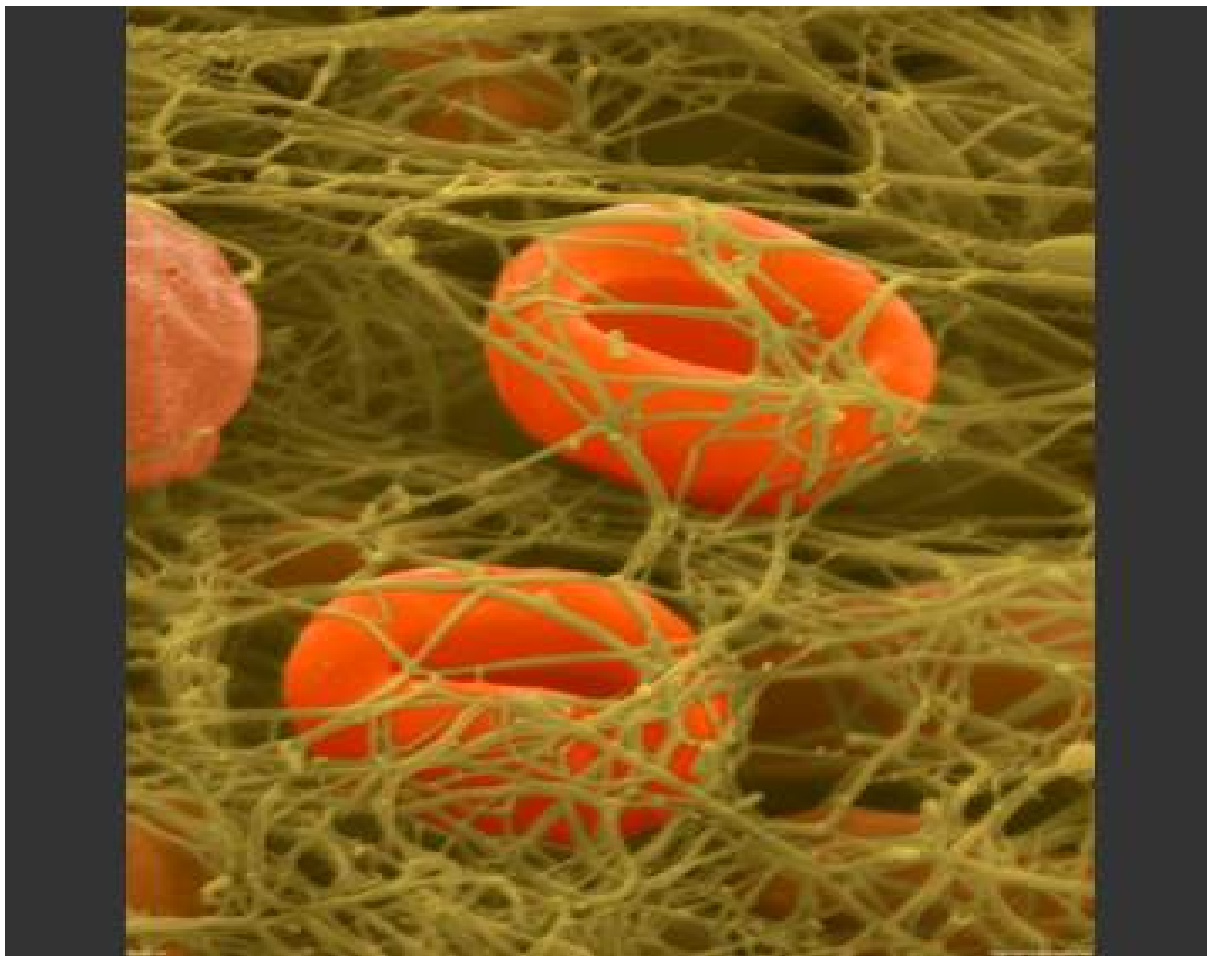




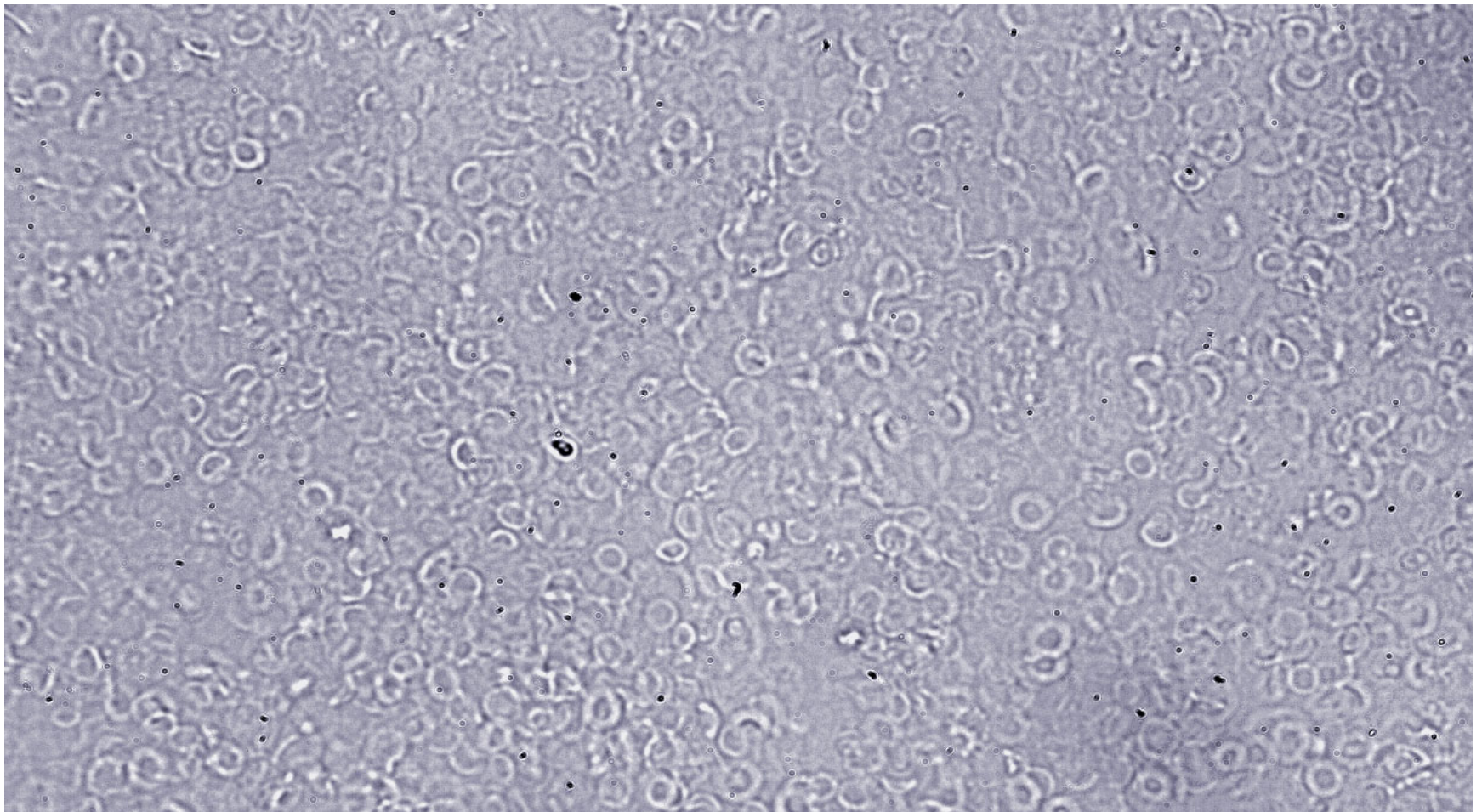
Morfologia erytrocytów



Erytrocyt z fibryną (tworzenie skrzepu)



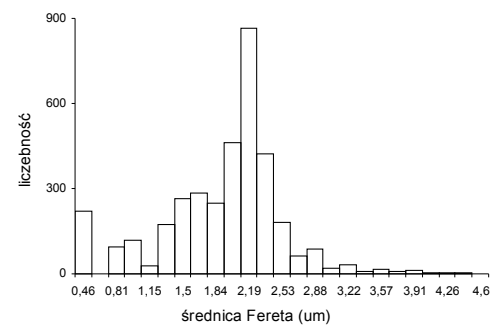
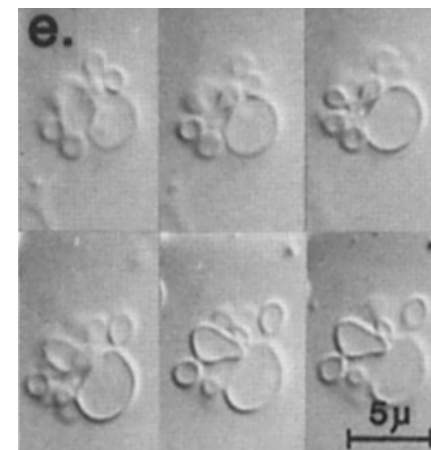
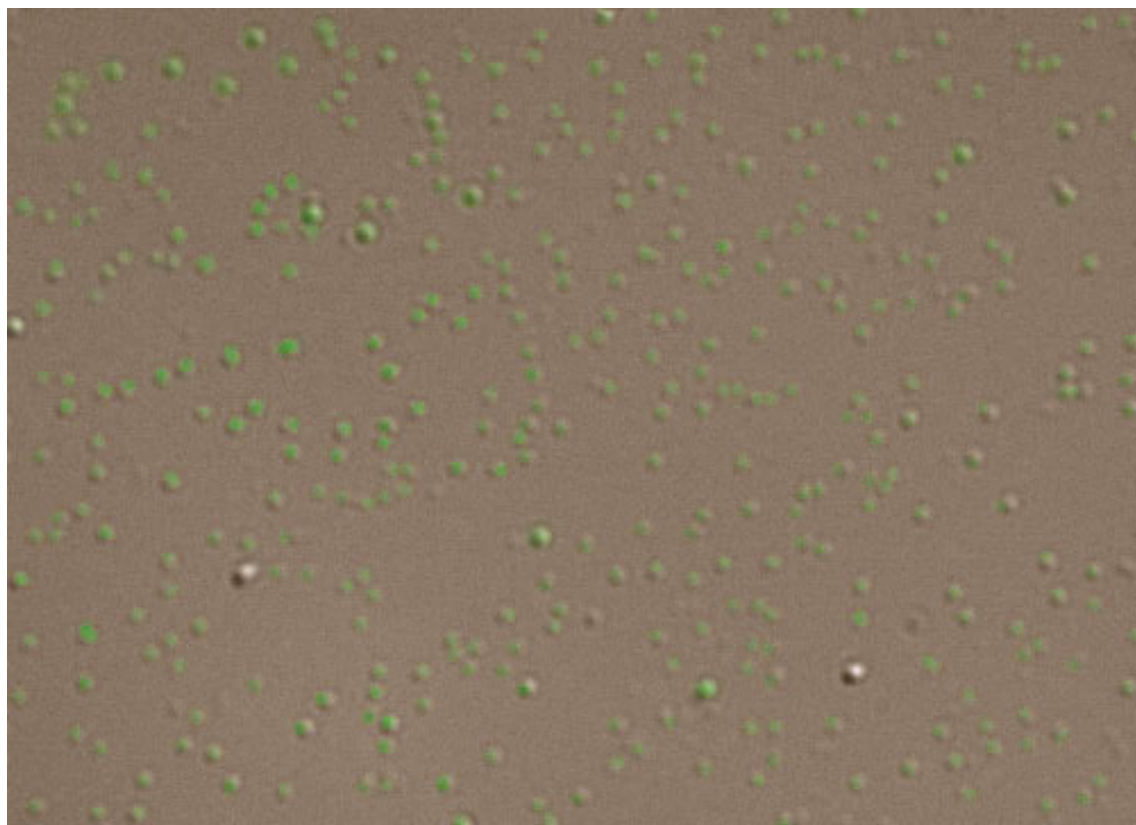
Duchy erytrocytów
Nowicka, 2007



Duchy otrzymane z erytrocytów



Obserwacje: mikroskop fluorescencyjny z kontrastem fazowym w świetle przechodzącym, Nowicka, 2007

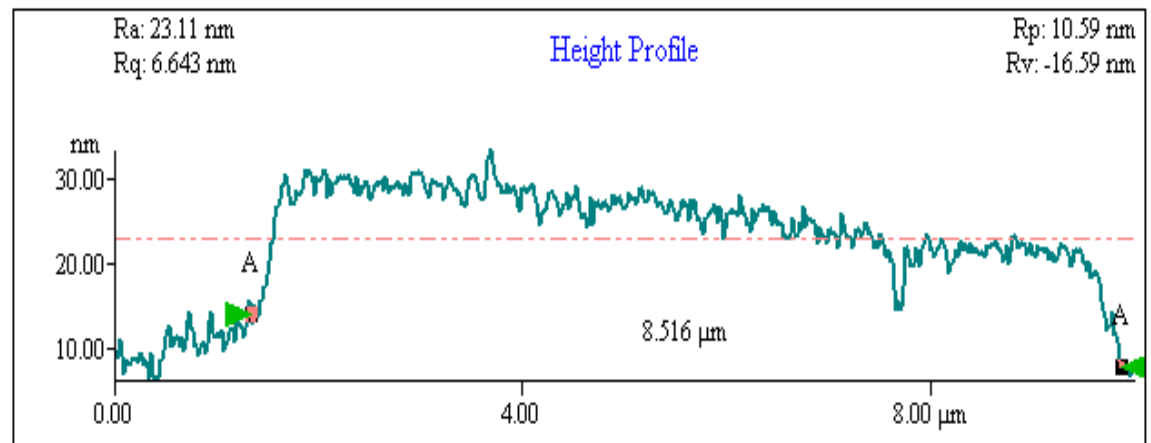
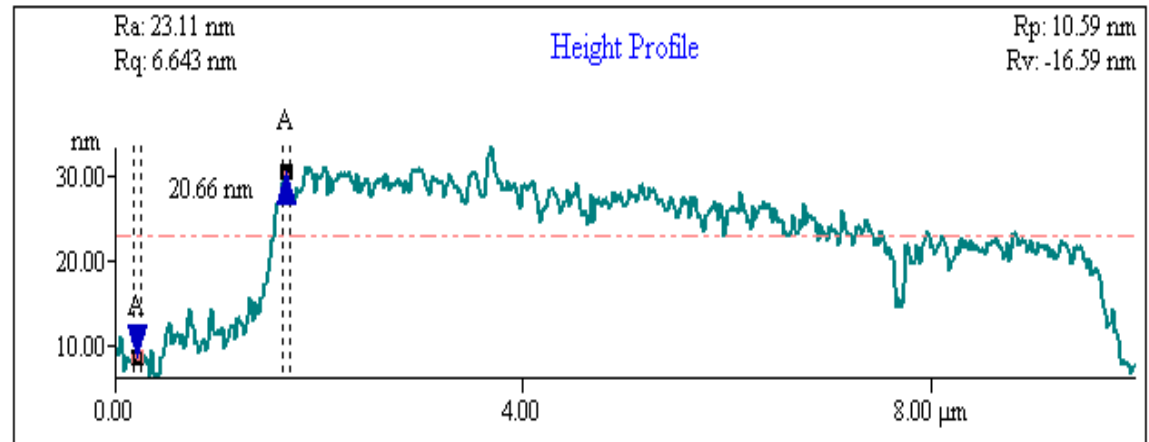
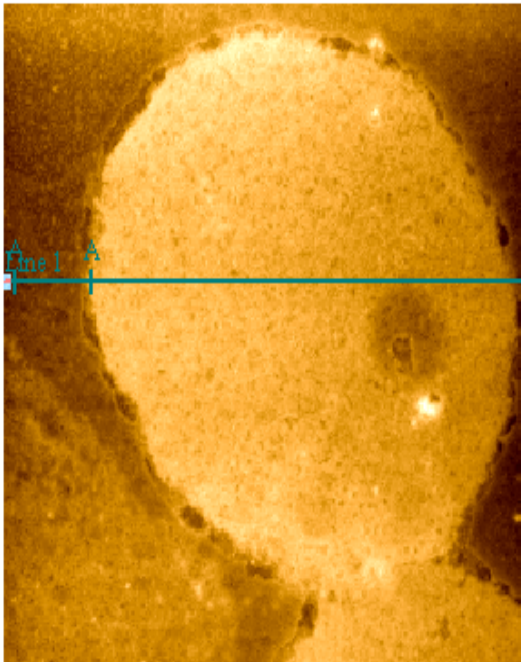


Duch otrzymany z erythrocytu

AFM, noncontact

Nowicka, Szczepankiewicz, 2007

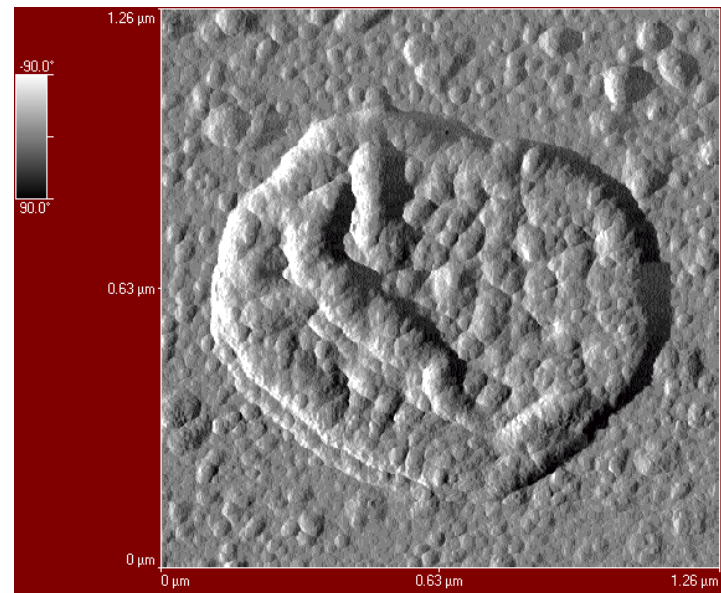
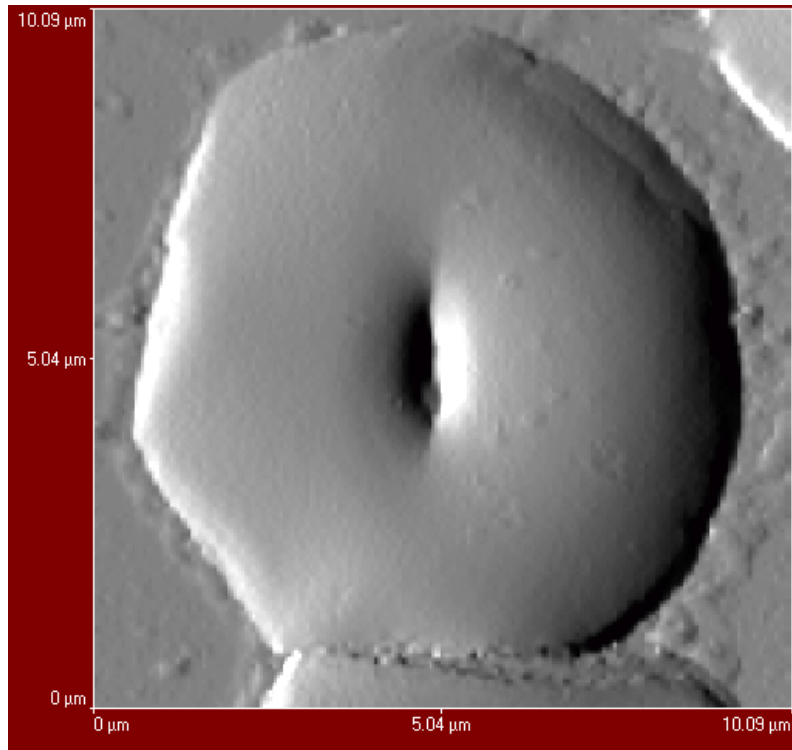
(300,504) x: 5.86 μm y: 9.844 μm z: 0.02573 μm



Erytrocyt vs pęcherzyk

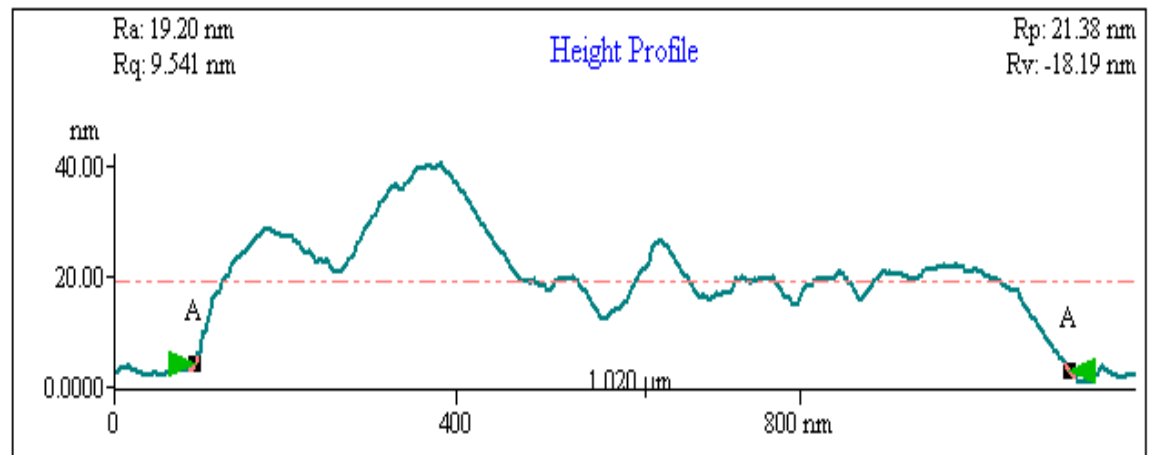
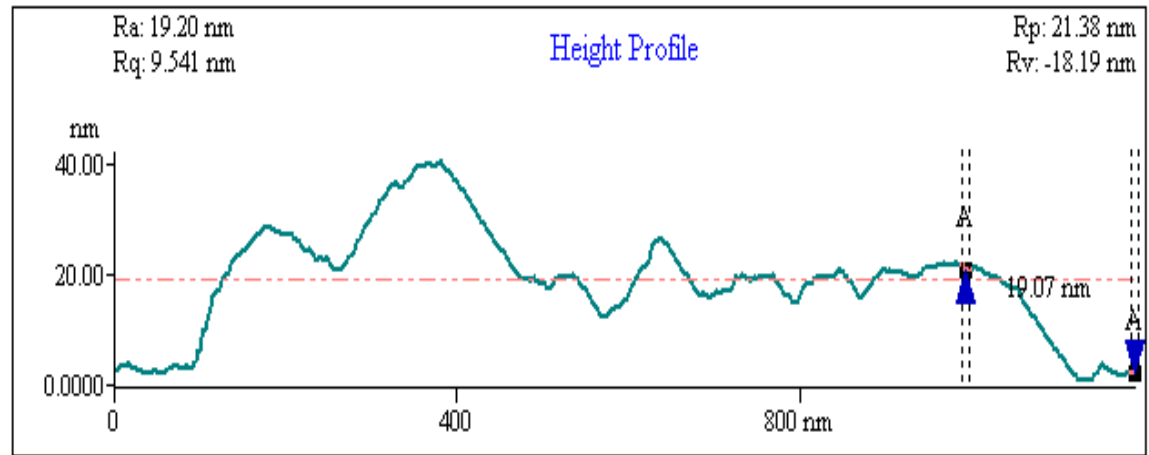
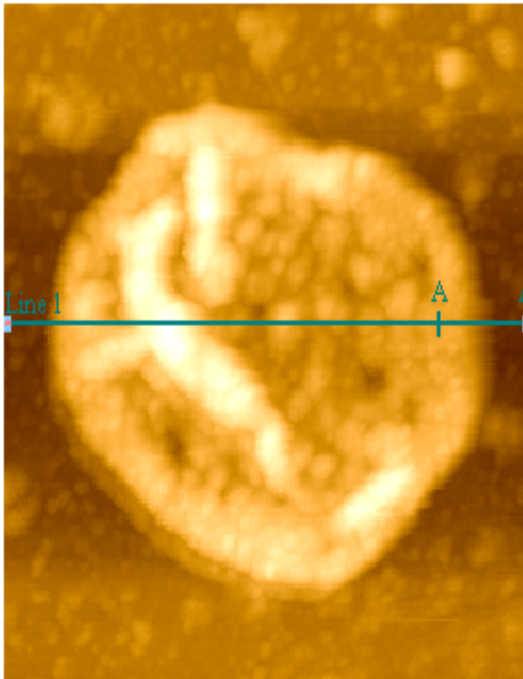
AFM, noncontact

Nowicka, Szczepankiewicz, 2007

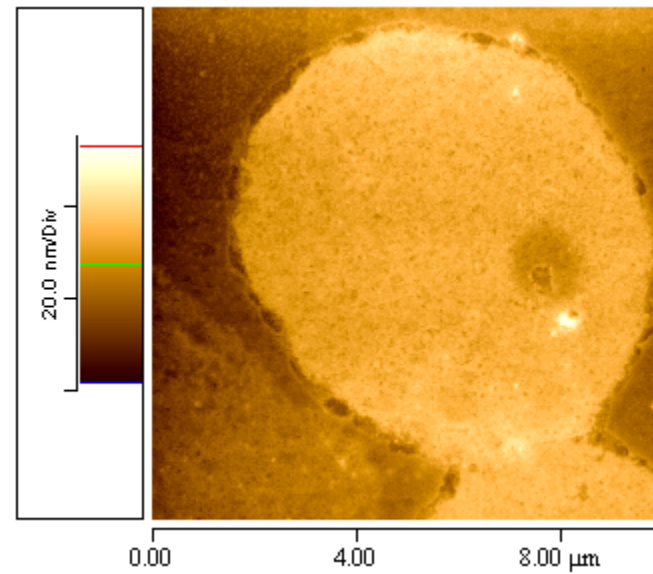
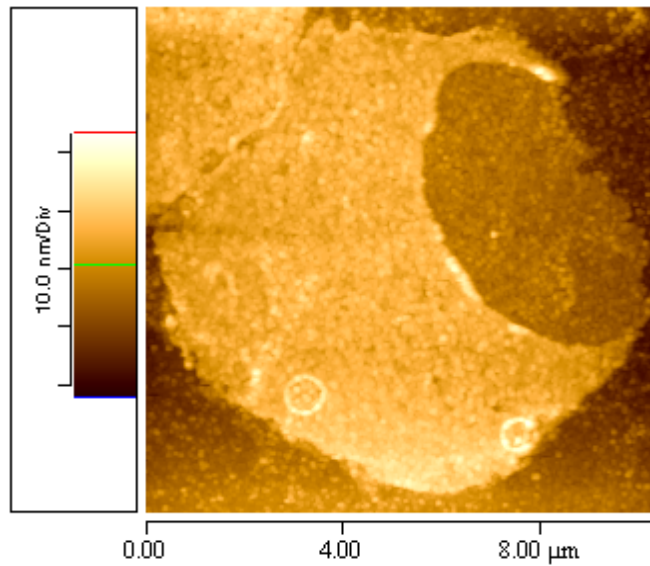


Pecherzyk otrzymany z erythrocytu

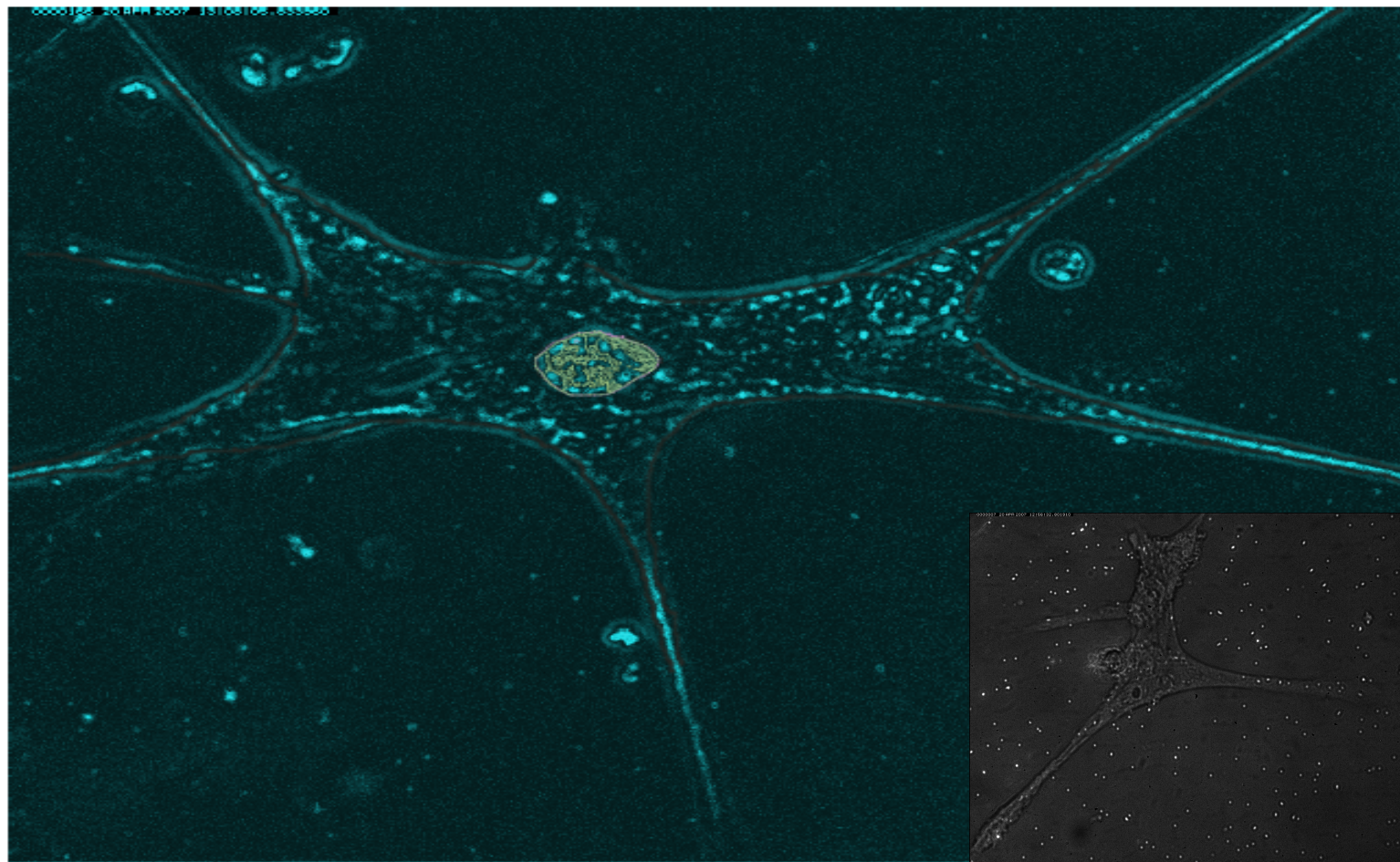
(427,469) x: 0.995 μm y: 1.092 μm z: 0.02198 μm



Dziurawe duchy

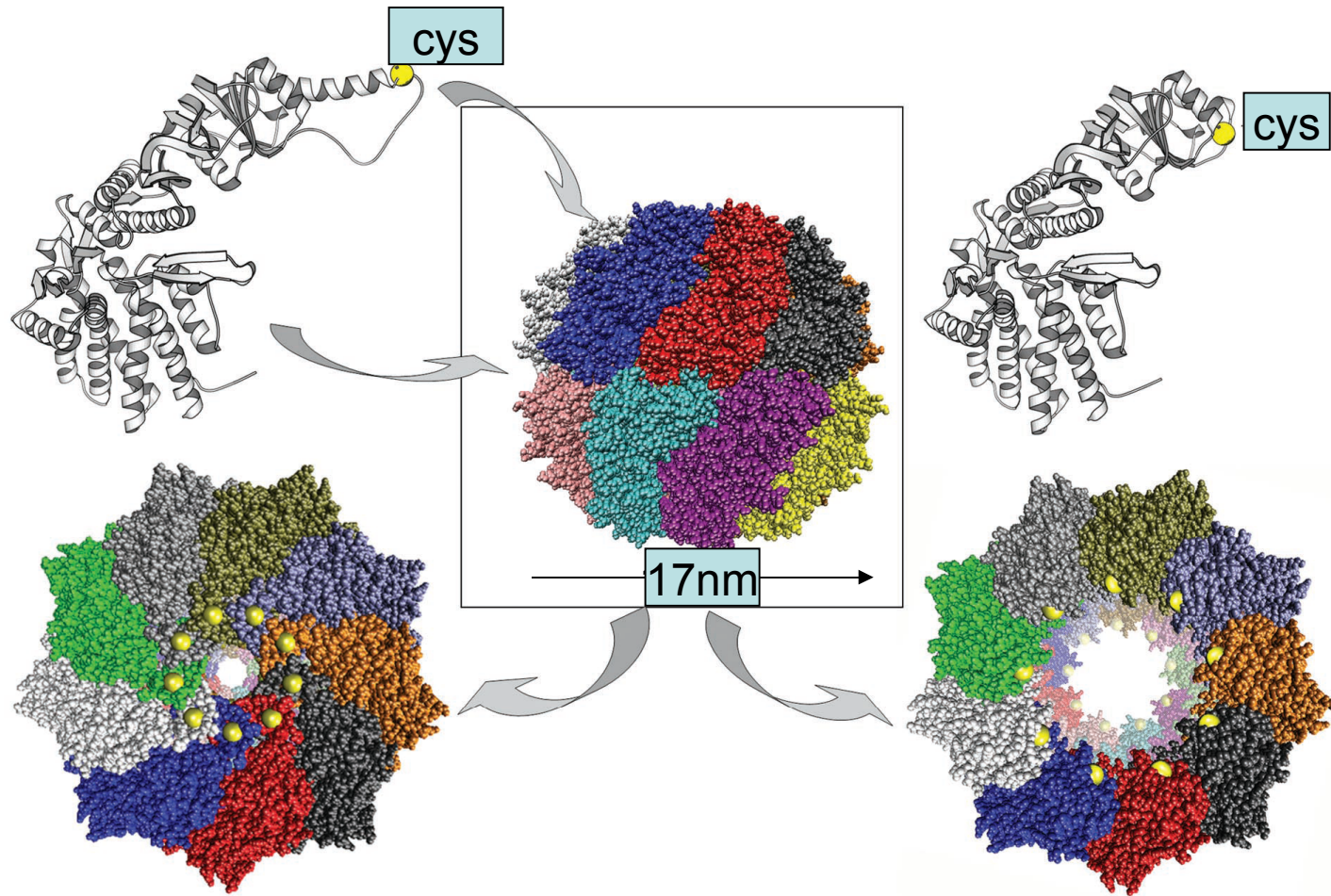


Astrocyt z mikrosferami (polistyrenowe cząsteczki z zamkniętym wewnątrz barwnikiem fluorescencyjnym) Nowicka, Błoński, Kowalewski 2007

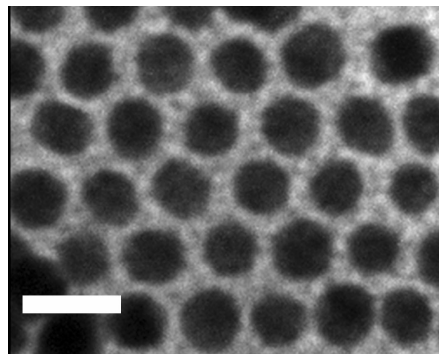
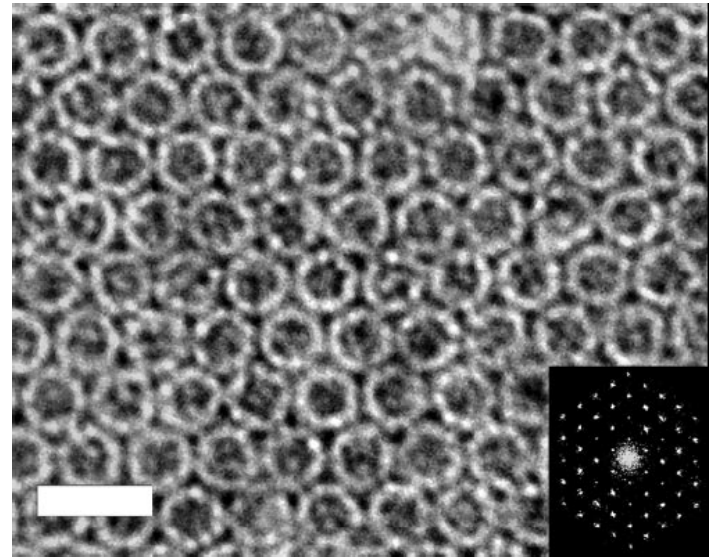
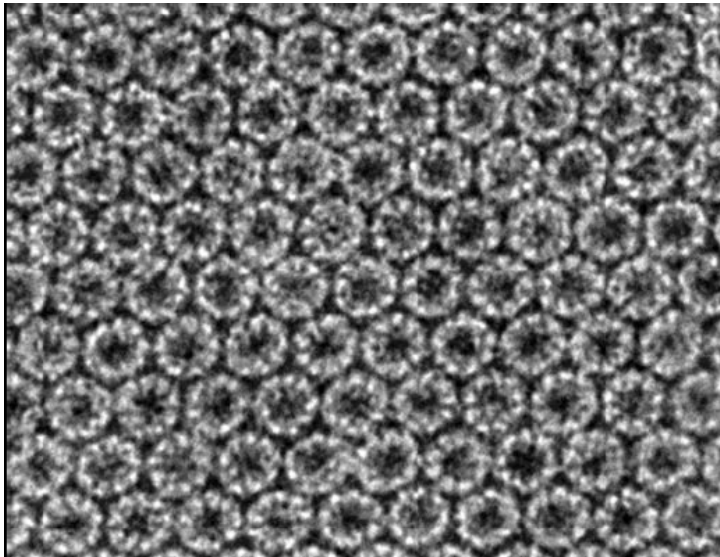


Białka jako rusztowania

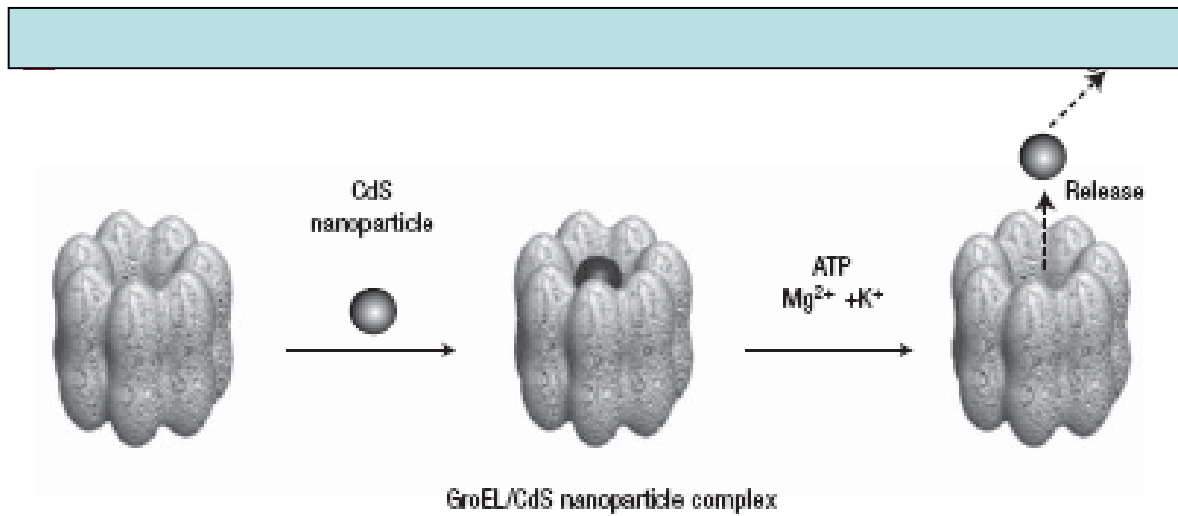
Dwie formy białka czaperonowego (HSP60 beta), 9 łańcuchów peptydowych.
Mutant ma odcięty fragment 28 AA. Agregaty białkowy różnią się średnicą otworu.
McMillan, et.al., 2002



TEM negatywnie barwionych 2D kryształów beta-czaperonów,
dwie formy białka, 10 nm gold związany z matrycą
McMillan, 2002, bar=30nm, 20nm



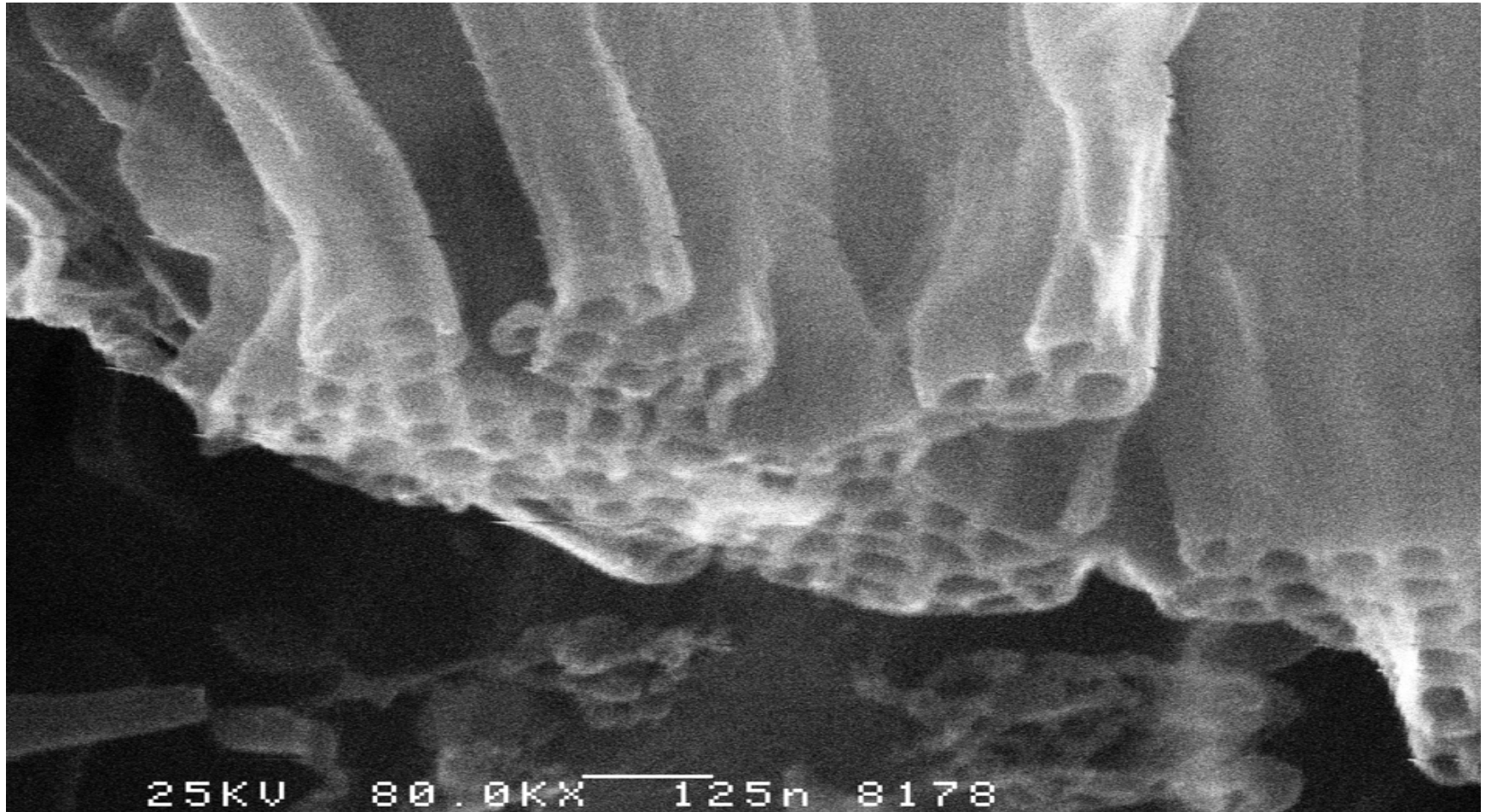
Chaperonin protein complex
Medintz, et.al, Nature, 2005



Włókna amyloidowe jako potencjalne rusztowania dla sond biologicznych:

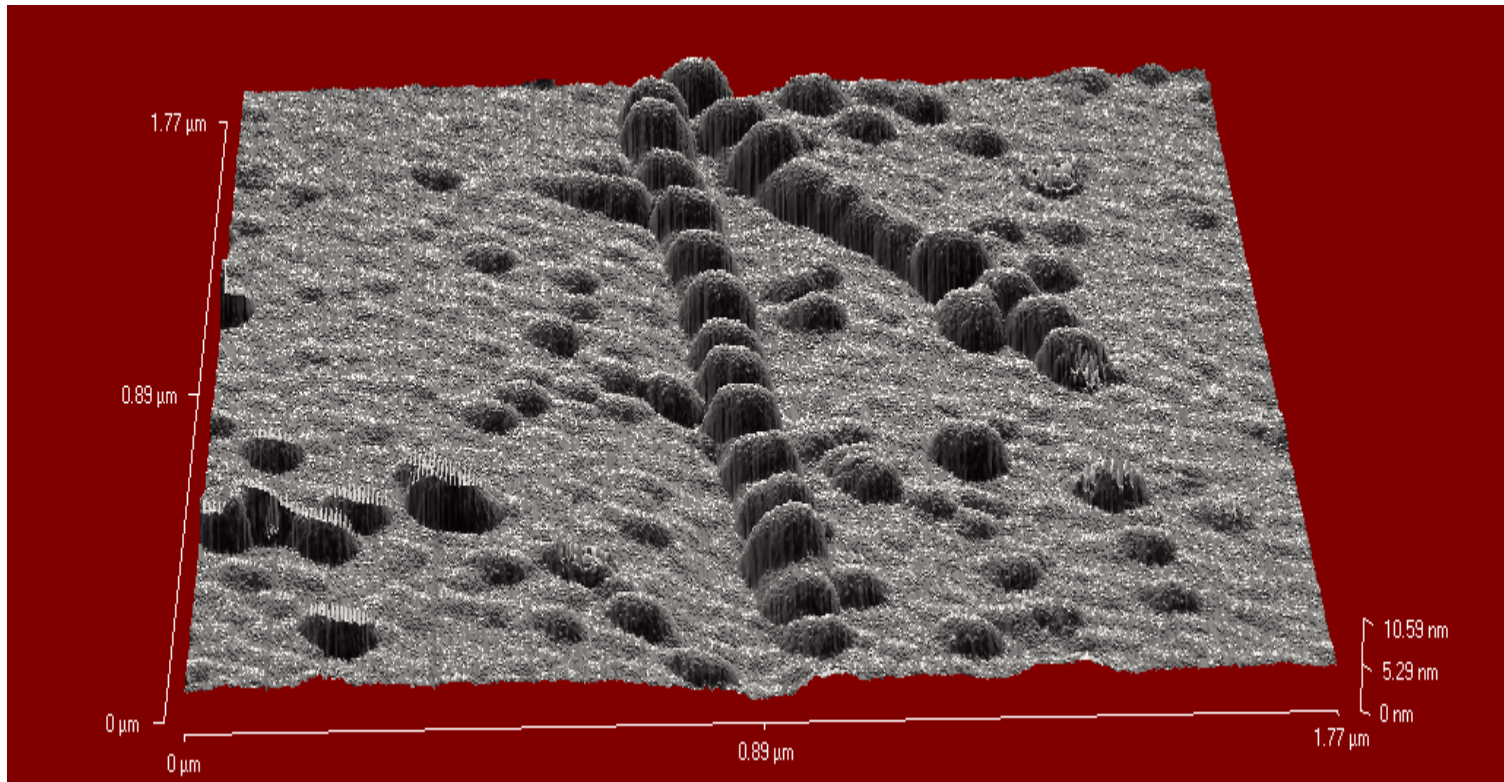
4. Fluorescencyjnych QD.
5. Magnetycznych, paramagnetycznych.
6. Hybrydy optyczno-magnetyczne.

Prof. DG Lynn Lab
Seth Childers, Dr. Kun Lu, Emory University
Amyloid AB (16-22) nanotube bundles



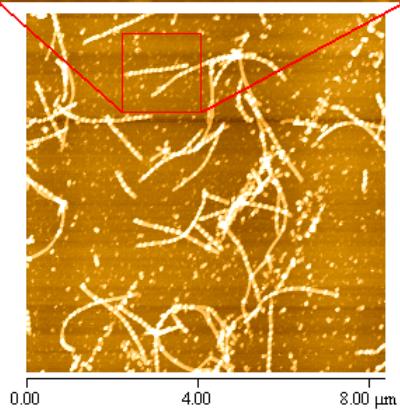
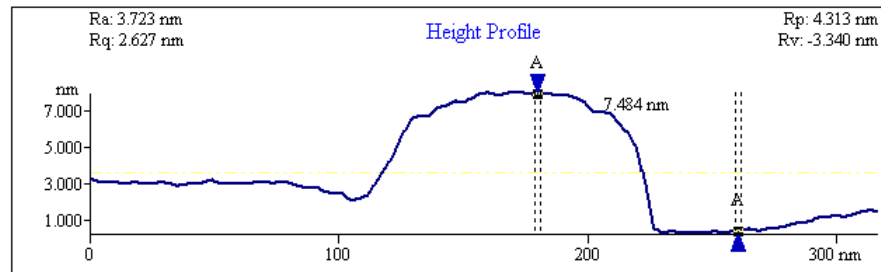
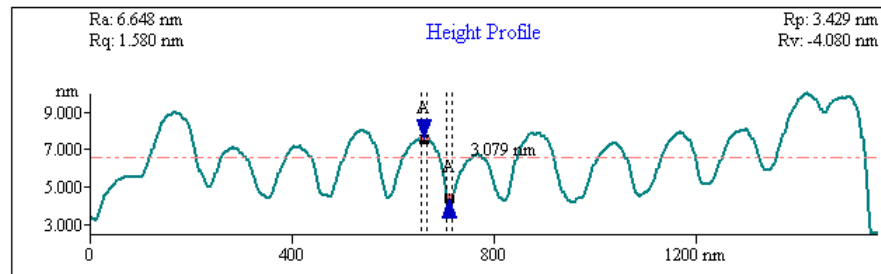
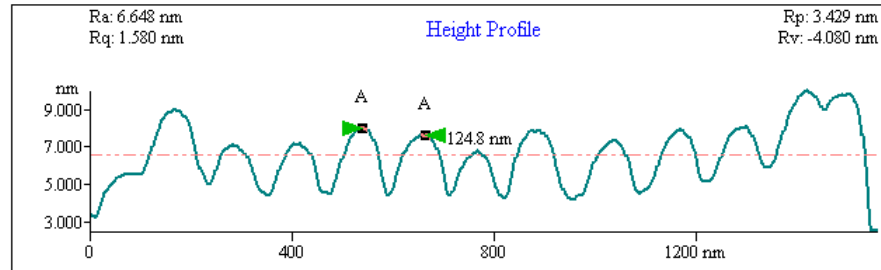
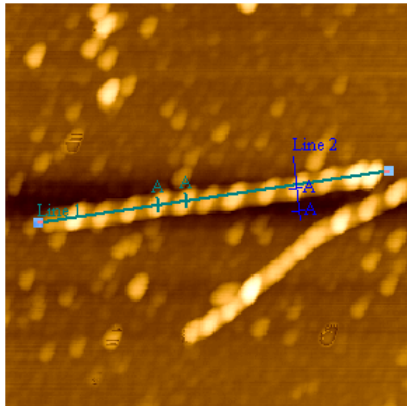
Włókna beta-amyloidu(1-40), AFM

Szczepankiewicz, Elbaum,2007



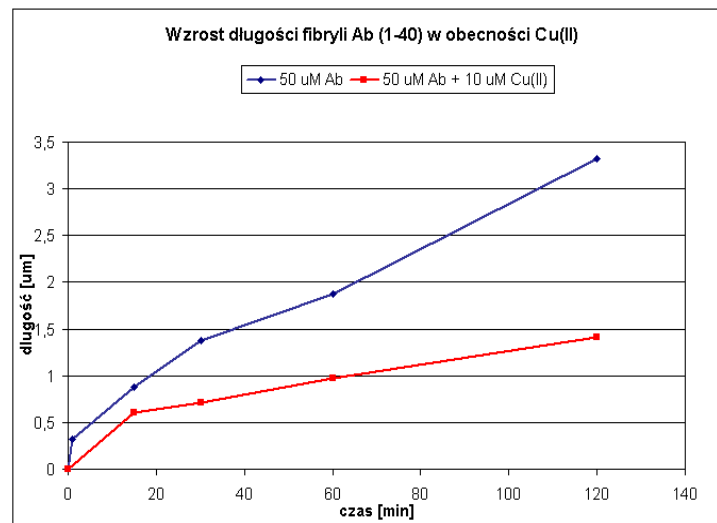
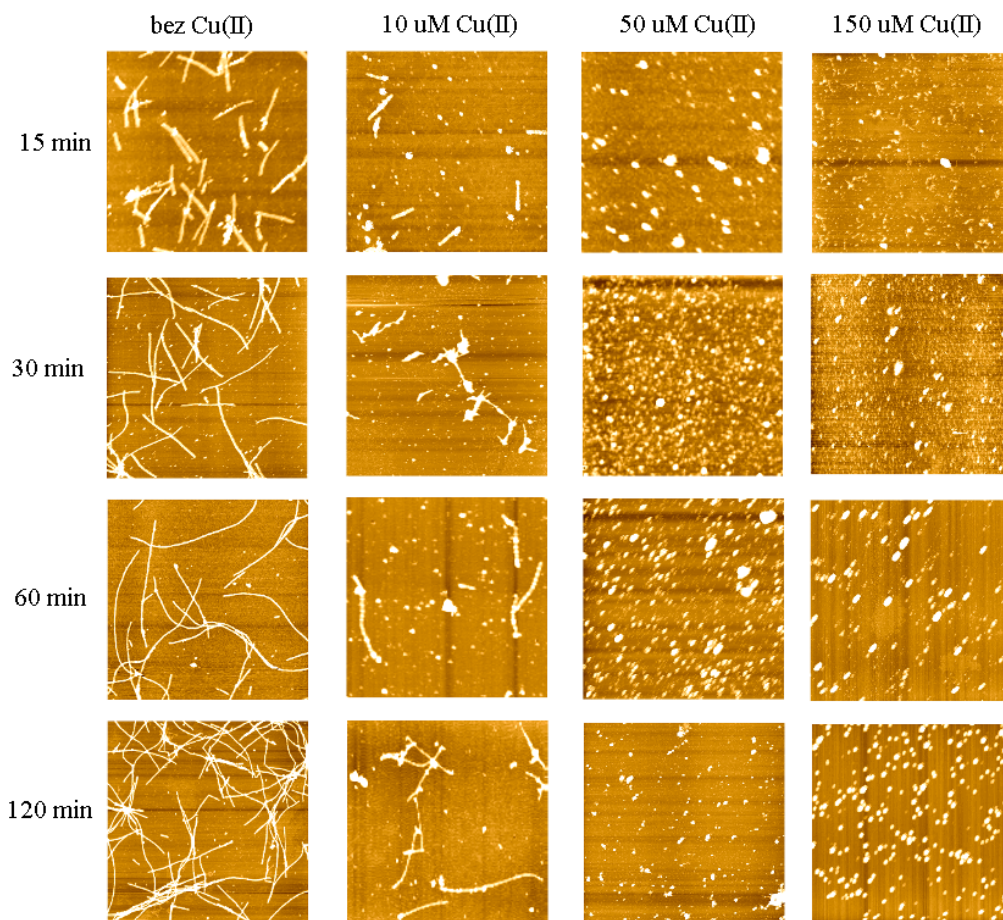
Super- struktura Beta-amyloidu (1-40). Szczepankiewicz, Elbaum, 2006

(503,332) x: 1.74 μm y: 1.150 μm z: 0.004209 μm

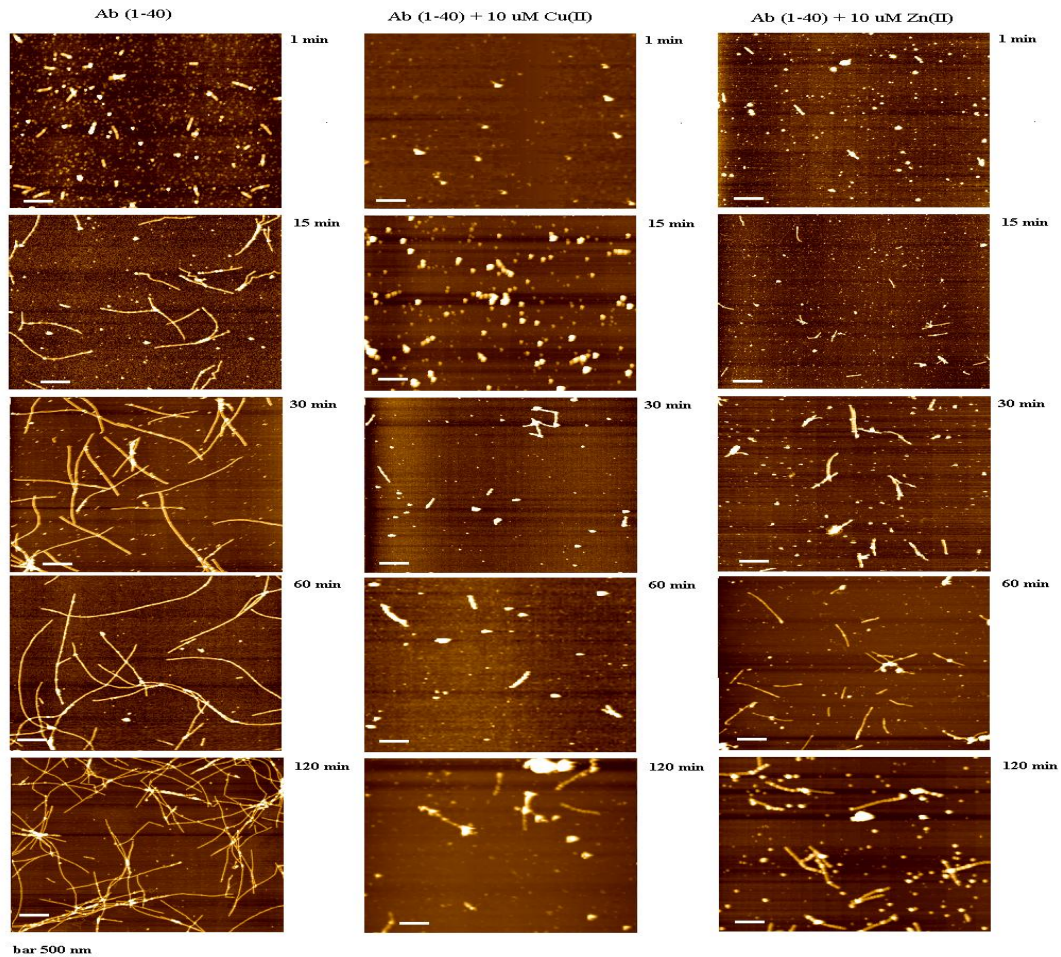


Efekt miedzi na kinetykę wzrostu długości fibryla beta-amyloidowego(1-40)

Szczepankiewicz, Elbaum, 2007



Efekt Zn(II) i Cu(II) na kinetykę fibrylizacji AFM, Szczepankiewicz, 2007

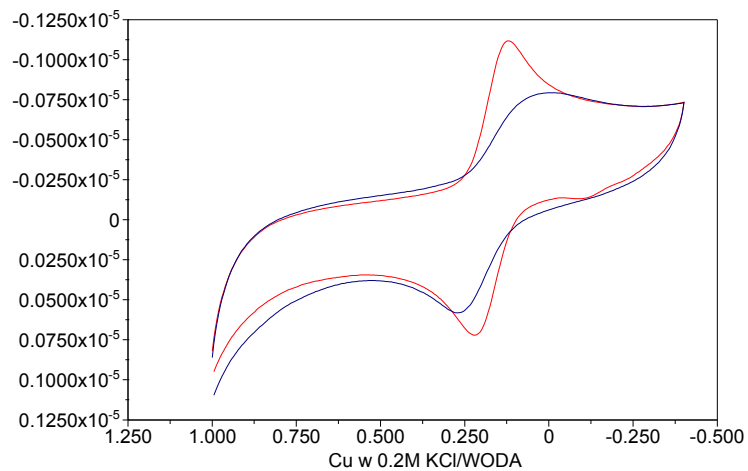


CV and DPV for beta-amyloid in the presence of Cu(II)

Trzesniewska, Wieckowska, 2007

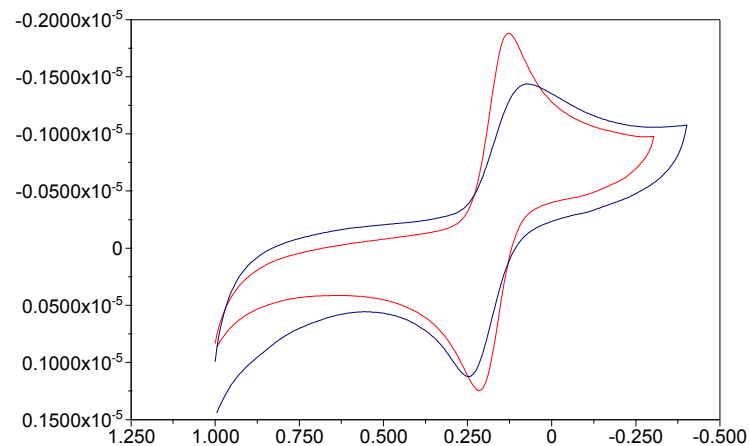
Cu w 0.2M KCl/WODA

50uM

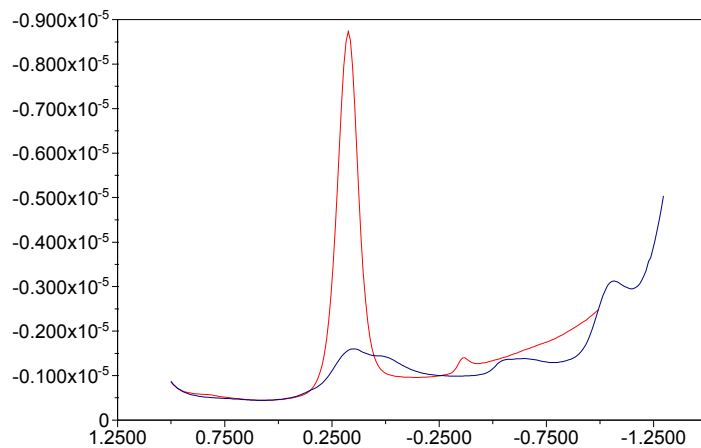
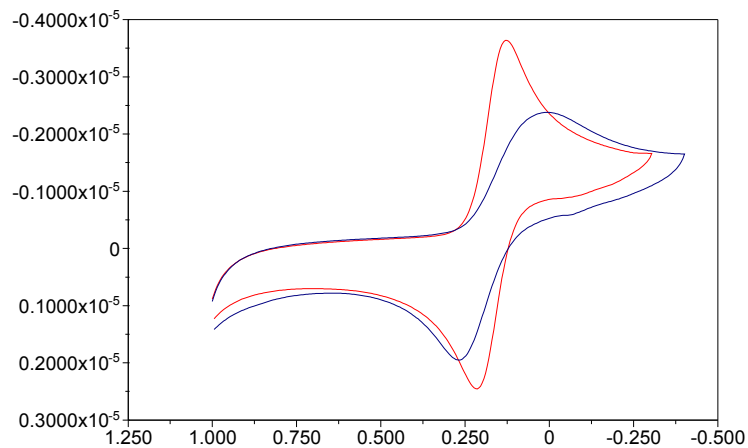


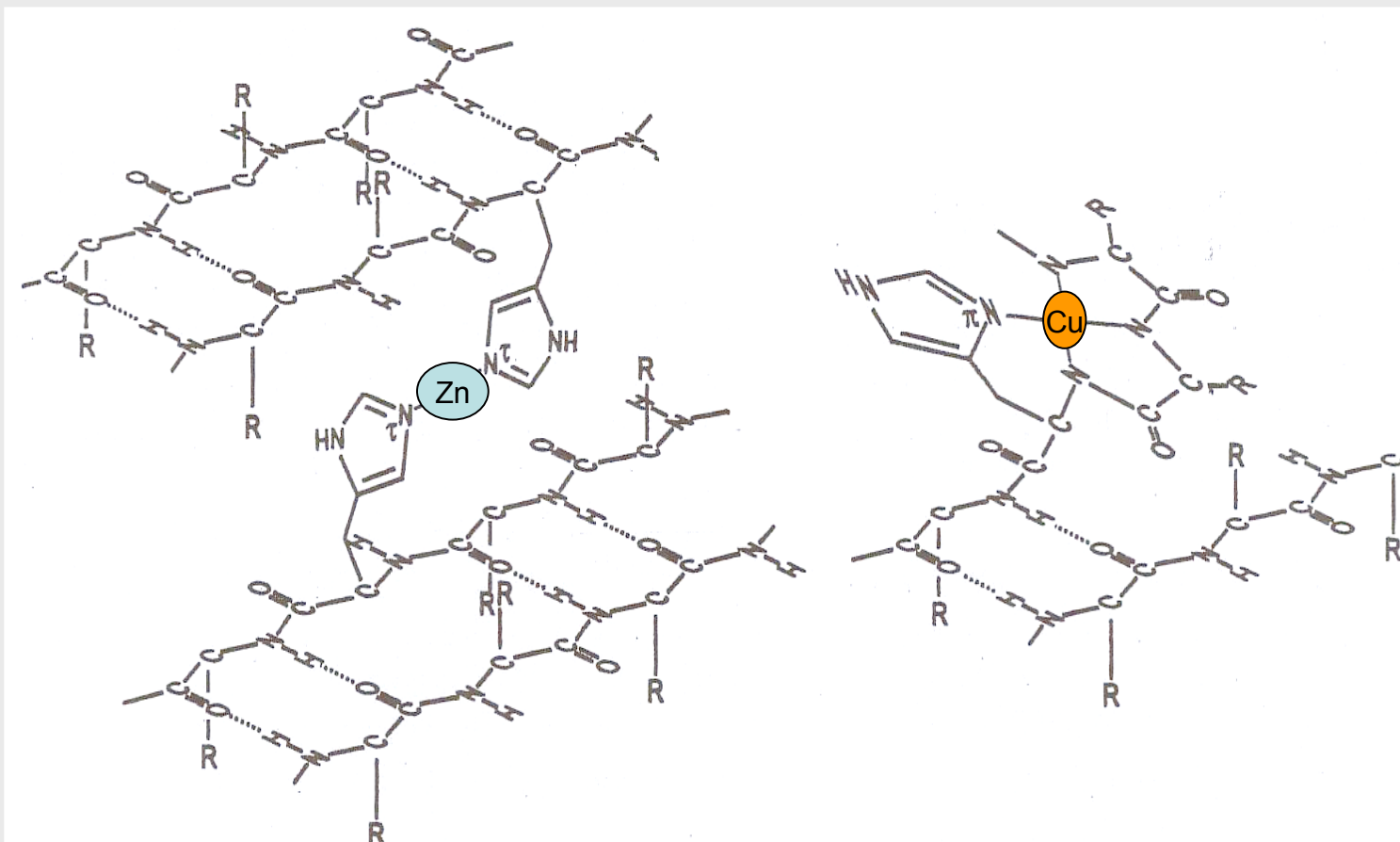
Cu w 0.2M KCl/WODA

100uM



200uM



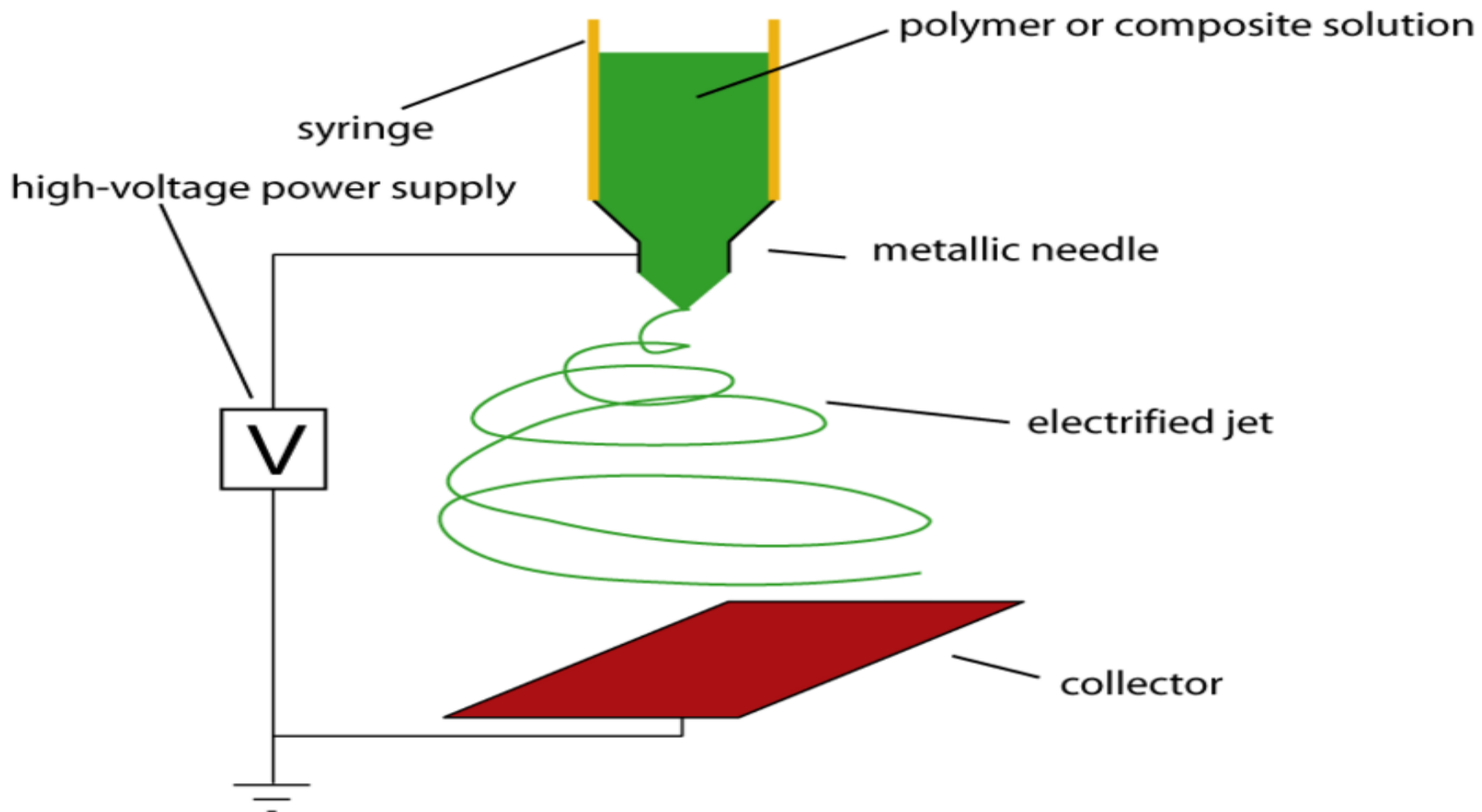


**Cross linking of β -amyloid by Zn(II)
and Cu(II) complex formation**

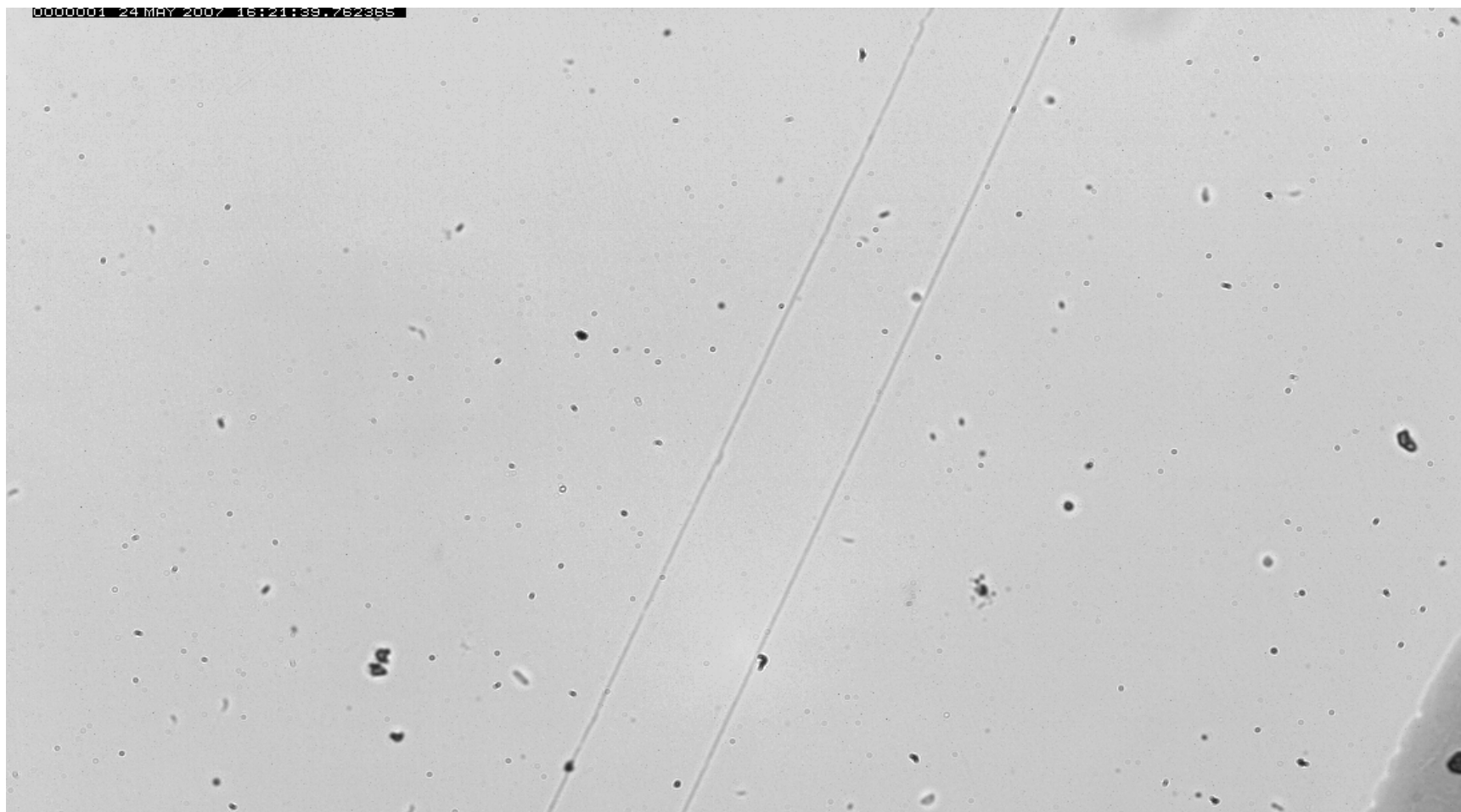
Jak budować włókna z białek?

Elektroprzędzenie białek

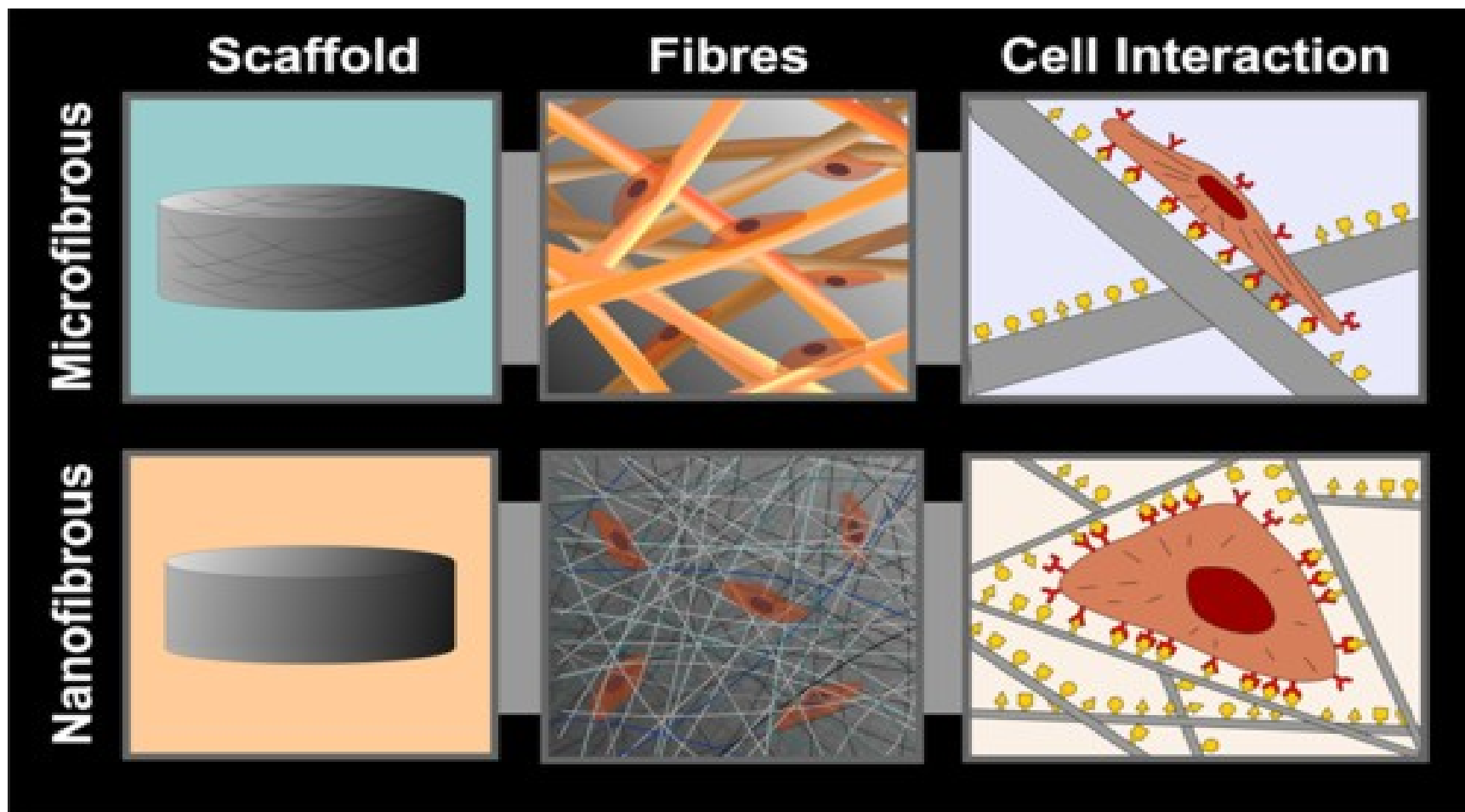
IPPT, Kowalczyk, et.al ,2007



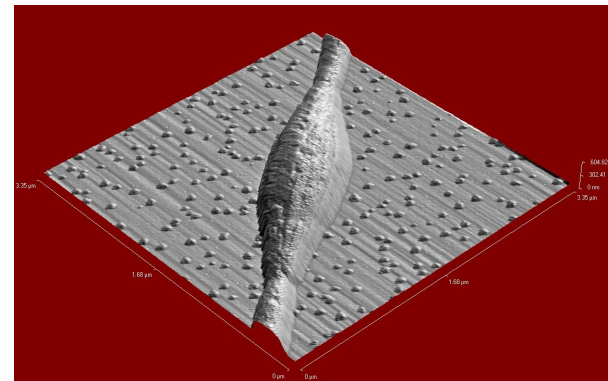
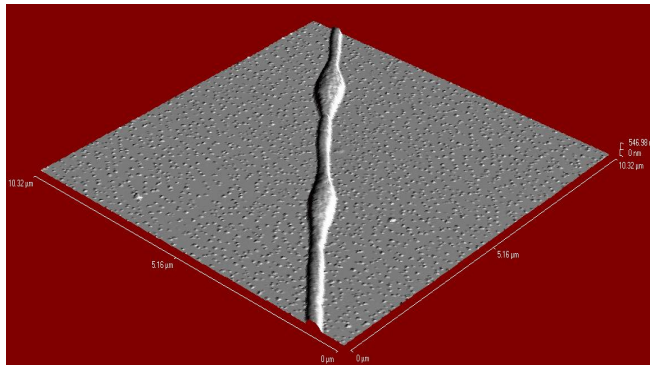
Włókna utworzone z białka (BSA),
85% BSA, 15% POEX, 91h w wodzie, 29 deg C
średnica ok. 150 nm, Kowalczyk, et.al. 2007



Adhezja komórek do biodegradowalnych włókien

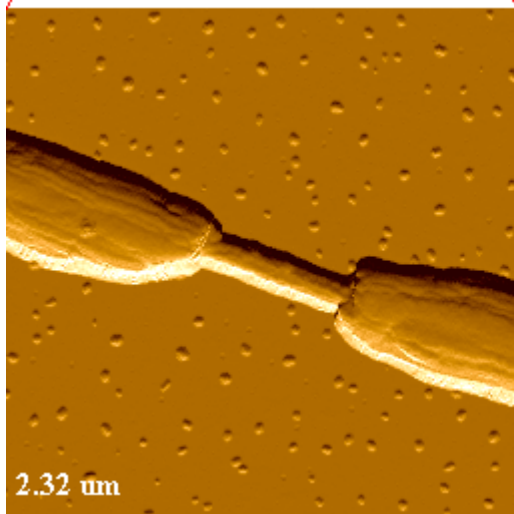
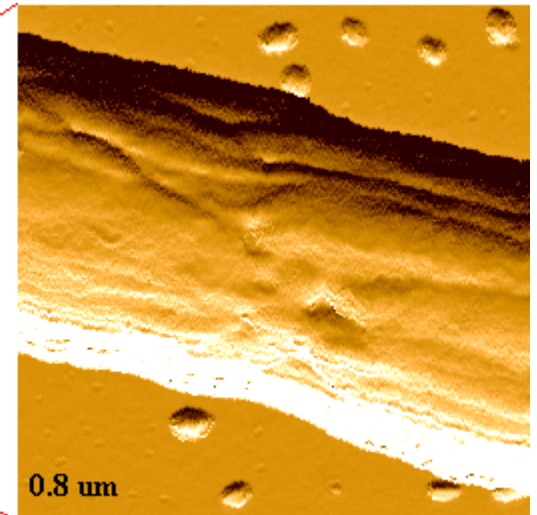
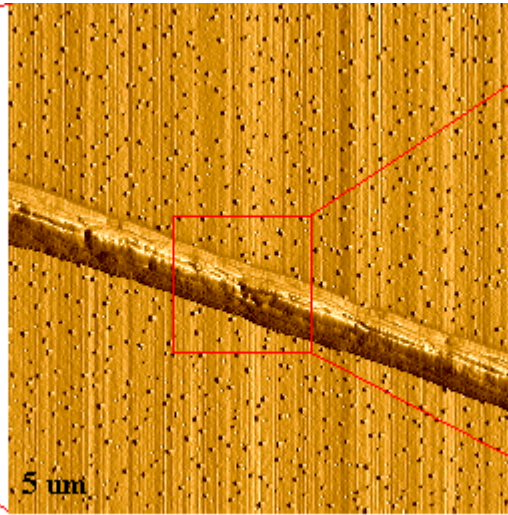
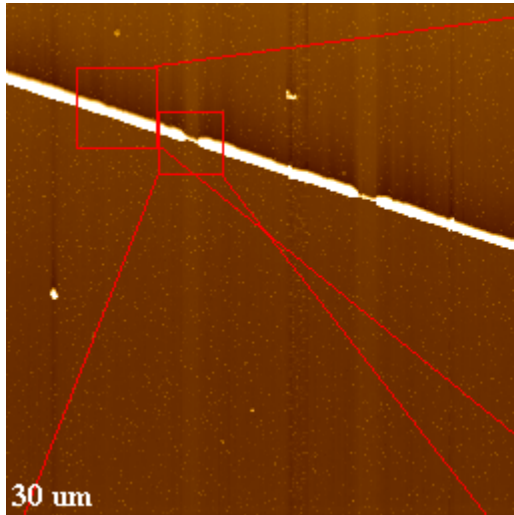


Włókna BSA, Kowalczyk, Szczepankiewicz, 2007



AFM włókien białkowych (BSA) (85% białko)

Kowalczyk, Szczepankiewicz, 2007

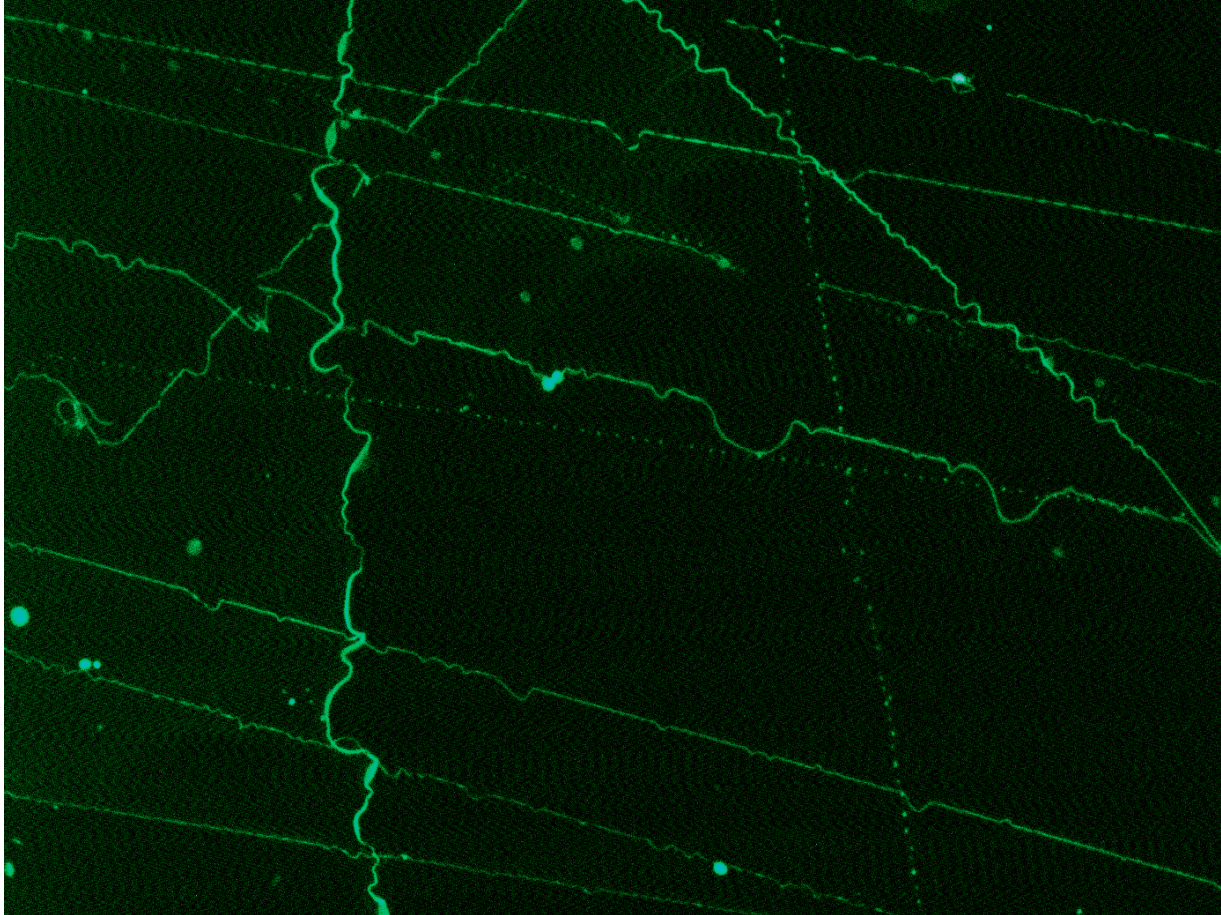


Włókna BSA-Fluoresceina

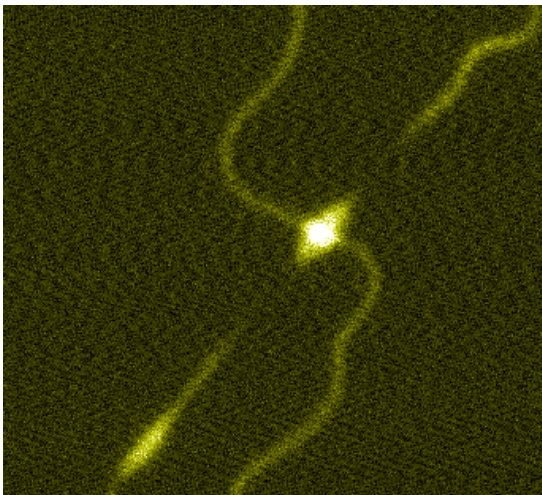
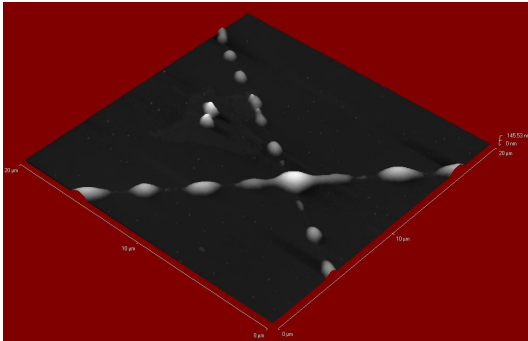
D=15cm, U=15kV, i=40 mA

Ext=465-490, Em= 505

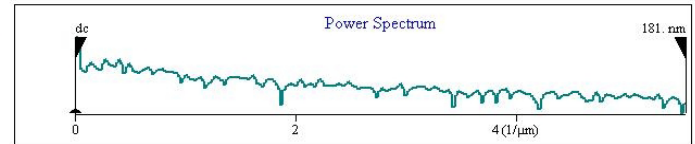
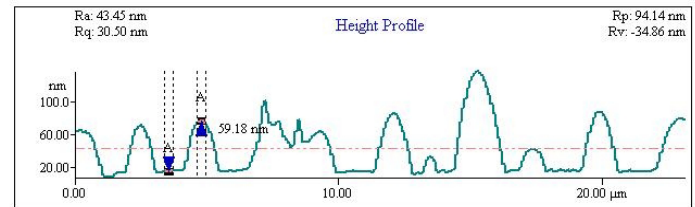
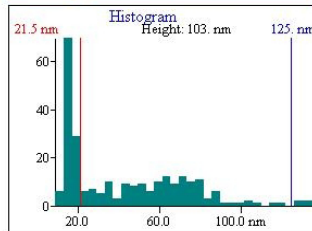
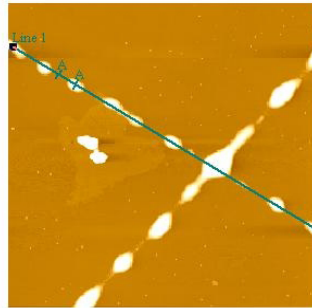
Kowalczyk,2007



2D- Homo-FRET ? (Włókna BSA, AFM, fluorescencja),

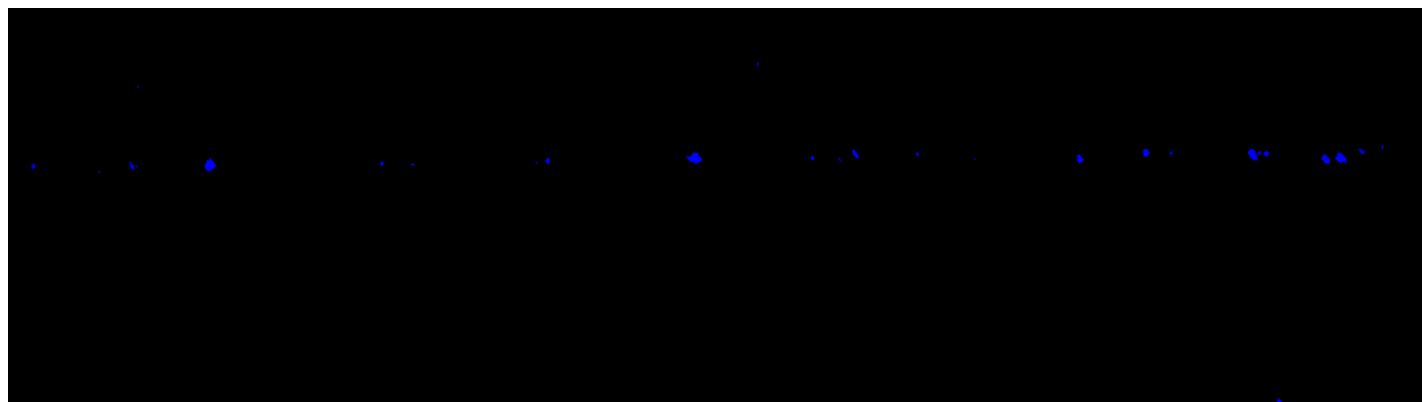
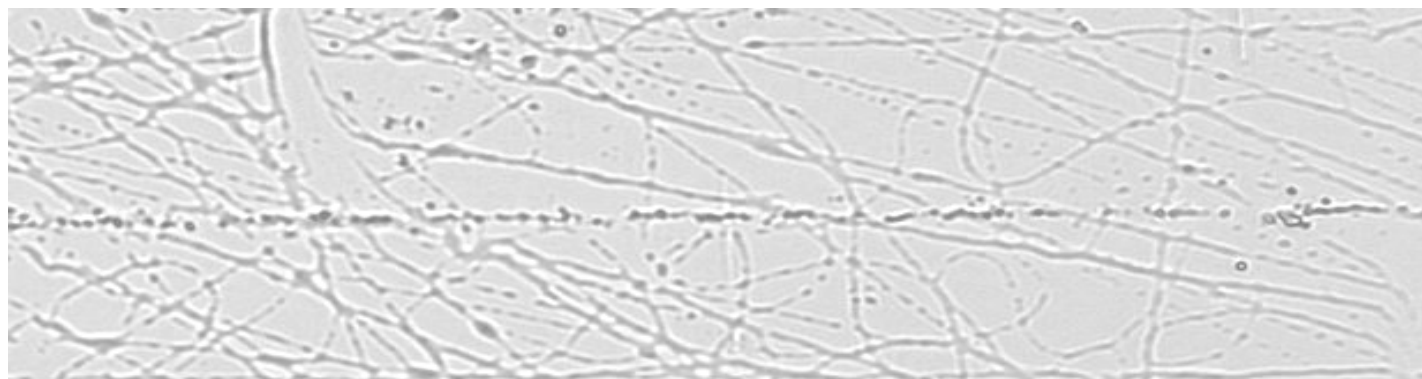


(255,64) x: 19.9 μm y: 5.000 μm z: 0.07684 μm



	Arc length	Bearing Ratio	Bearing Ratio	Peak (Rp)	Valley (Rv)	Cursor
Line 1	23.43 μm	@30.0% 61.34 nm	@80.0% 15.98 nm	94.14 nm	-34.86 nm	A h: 0.05918 μm
Delta []						

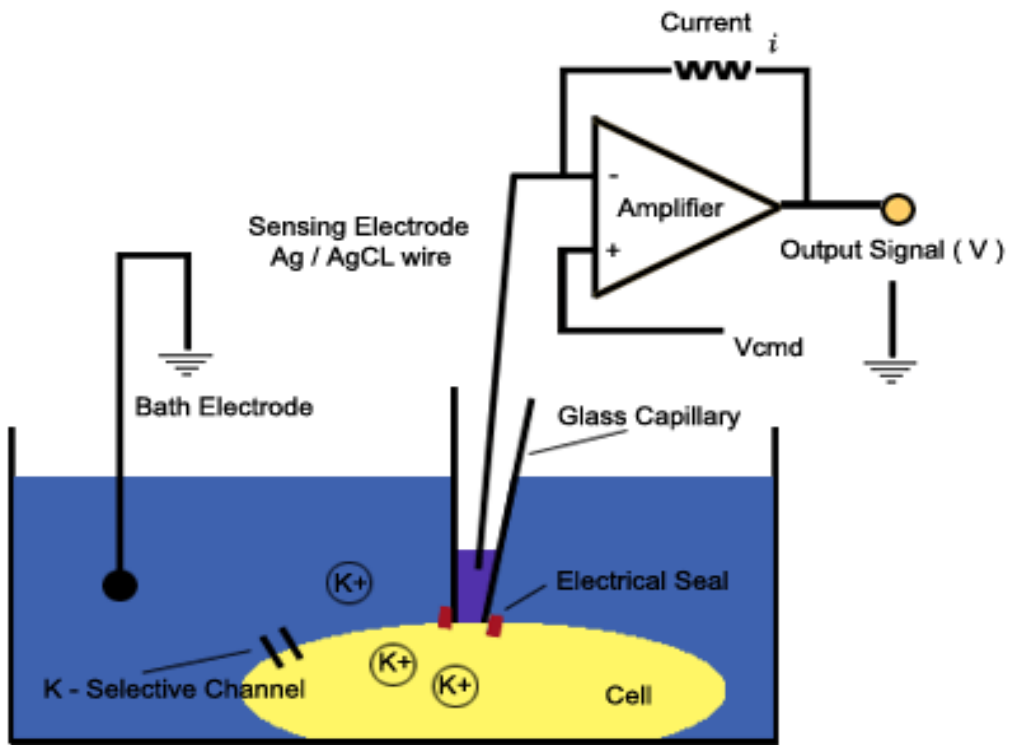
Włókno ZnO-PEOX



Hipoteza:

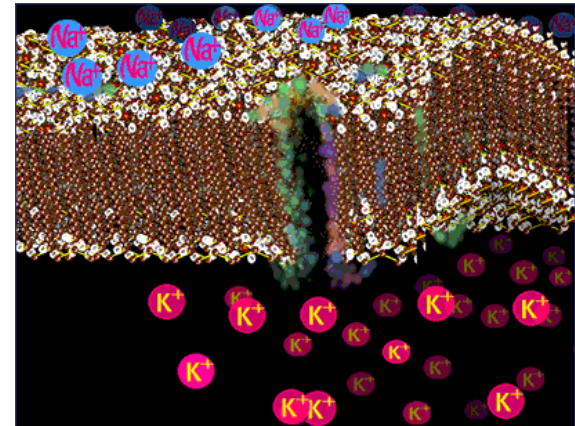
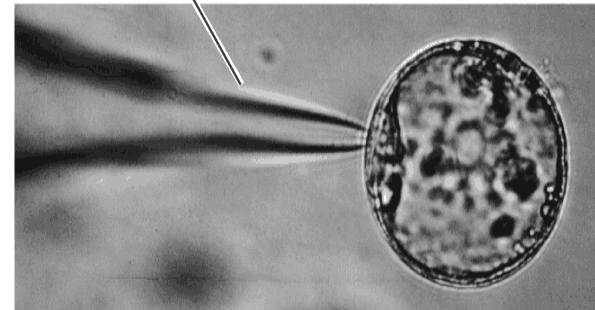
Etiologia choroby Alzheimera ma swoje źródło w defektach membranowych.

Elektrofizjologia komórek biologicznych



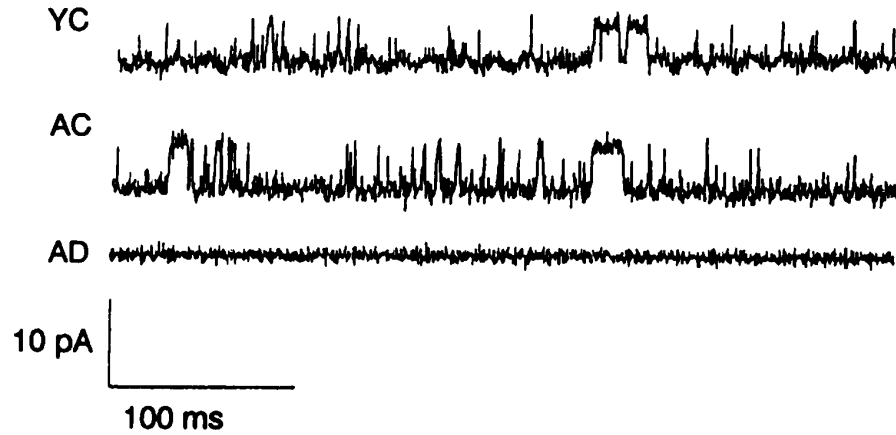
Functional depiction of classical patch-clamp electrophysiology

Patch pipette

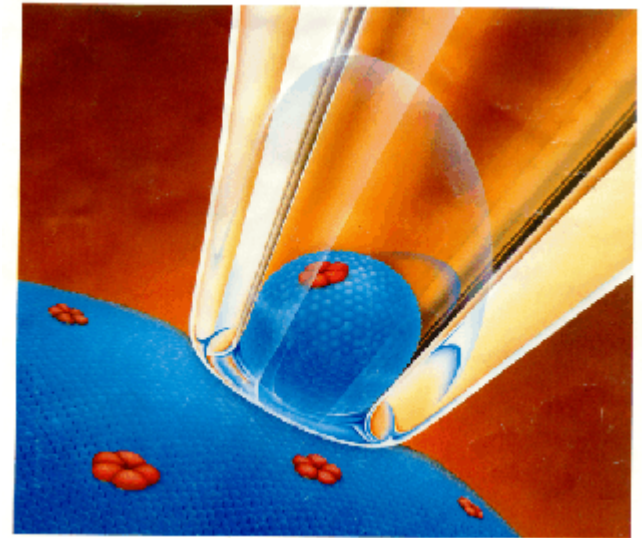
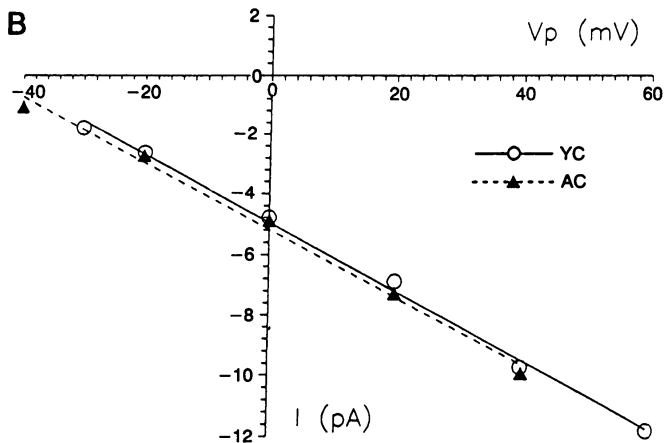


„Patch-clamp” pojedynczej komórki 113 pS kanał K(+) obecny w ludzkich fibroblastach

A



B



Podsumowanie:

- Otrzymaliśmy duchy oraz pęcherzyki z ludzkich erytrocytów.
- Zaobserwowaliśmy endocytozę fluorescencyjnych kulek polysterynowych do wnętrza astrocytu.
- Uprzedliśmy włókna z białka (albumina).
- Przyłączyliśmy kowalencyjnie sondę fluorescencyjną do włókien białkowych.
- Uprzedliśmy włókno z fluorescencyjnych QD.

- Jak planujemy wykorzystać otrzymany materiał?
 - Zamknąć w duchach oraz pęcherzykach membranowych QD.
 - Endocytować QD do wnętrza komórek otrzymanych od zdrowych i chorych pacjentów.
 - Przetestować hipotezę, że obserwowane różnice w fali Ca(II) są indeksem diagnostycznym patologii spowodowanym defektem membranowym.
 - Przetestować możliwość, że membranowe pęcherzyki są transporterami potencjalnych sond diagnostycznych.

Czy sondy fluorescencyjne mogą mieć znaczenie diagnostyczne w chorobie Alzheimera (AD) ?

- **Obserwacje:**

- 1. Różnice w fali Ca(II) sugerują defekty w funkcjonowaniu membranowych kanałów.
- 2. Zostało to potwierdzone przez pomiary potencjałów membranowych.

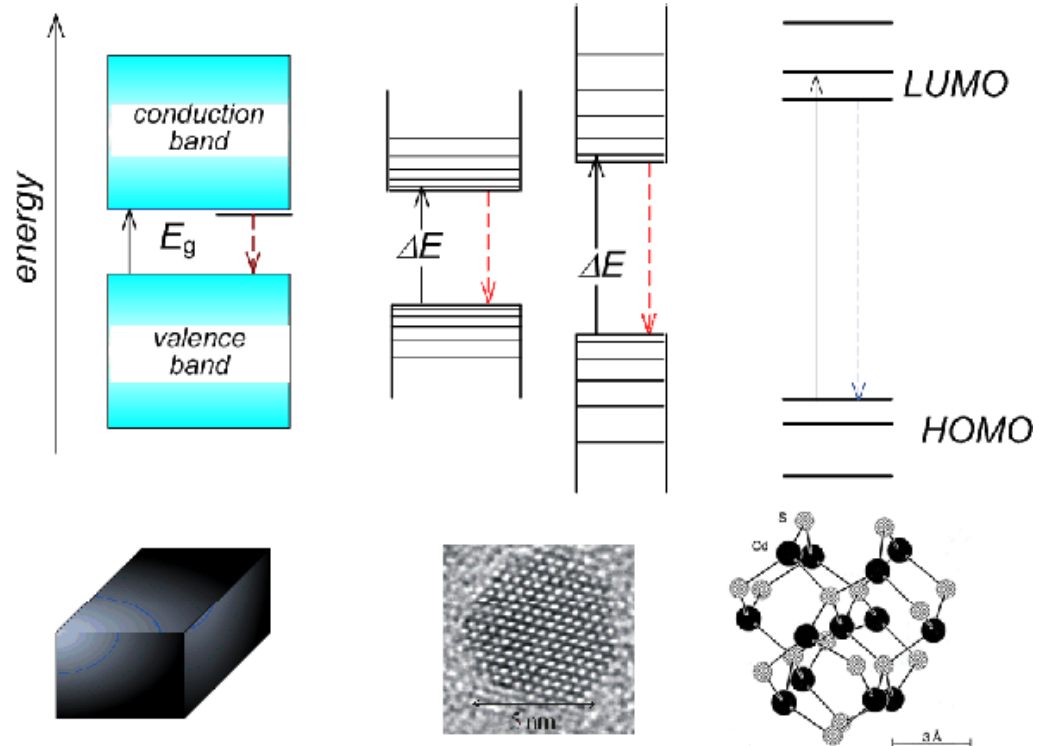
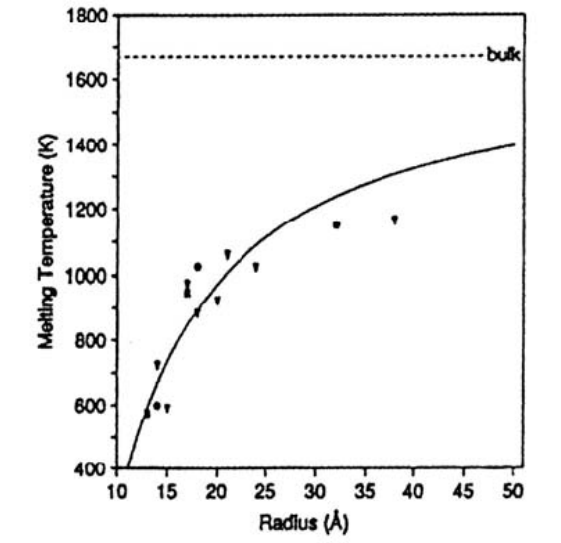
- **Plan:**

1. Zbudować, matrycę czułą na FRET.
2. Porównać zmiany polaryzacji membran fibroblastów kontrolnych z fibroblastami od pacjentów z AD stosując FRET.
3. Przetestować możliwość zastosowania membranowych duchów i pęcherzyków jako potencjalnych transporterów sond fluorescencyjnych oraz ligandów.

Dziękuję:

- Aleksandrze Nowickiej, IF-PAN
- Tomaszowi Kowalczykowi, IPPT
- Tomaszowi Kowalewskiemu, IPPT
- Andrzejowi Szczepankiewiczowi, IBD im. Nenckiego
- Katarzynie Trzesniewskiej

dE vs. Size for CdS



Wzrost długości fibryli Ab(1-40) w obecności miedzi(II) i cynku(II)

