

Biosensores específicos basados en quantum dots en la detección de proteínas patológicas en ELA.

Carlota Tosat Bitrián^{1, 2, a}, Ana Martínez², Valle Palomo²

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Grupo de Química Médica y Biología Traslacional, Centro de Investigaciones Biológicas- CSIC, Madrid, España.

a. carlotatbitri@gmail.com

Palabras clave: ELA; quantum dot; patología molecular; célula única; TDP-43

Resumen

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte de las motoneuronas (MN) lo cual produce una parálisis progresiva. El mecanismo subyacente a dicha muerte selectiva de las motoneuronas todavía no se ha caracterizado, convirtiéndose en una diana crucial para el desarrollo de fármacos innovadores y efectivos. Con el objetivo de caracterizar la patología molecular, se propone realizar un análisis de perfil molecular a nivel de célula única. Como herramienta para analizar diferentes dianas moleculares, se han utilizado quantum dots (QDs) conjugados con anticuerpos monoclonales. Los QD son nanopartículas formadas por un núcleo de CdSe y una cubierta de ZnS que ofrecen propiedades fotoluminiscentes únicas. Presentan una alta fotoestabilidad, altos coeficientes de extinción, amplios espectros de absorción pero estrechos de emisión lo cual permite una detección más sensible así como ensayos multiplex. Conjugando los QD con distintos anticuerpos monoclonales se propone implementar un inmunoensayo basado en QD que permita estudiar a nivel de célula única distintas proteínas diana implicadas en la patología molecular del ELA como la proteína nuclear TDP-43. Se ha visto que las MN afectadas presentan agregados de p-TDP-43 en el citosol que inducen por distintos mecanismos la apoptosis de las MN. Es por ello que resulta crucial determinar la etiología de estas inclusiones y caracterizarlas molecularmente. En este trabajo se muestran los primeros resultados de la implementación del inmunoensayo basado en QD en células SH-SY5Y. Posteriormente, el objetivo final es aplicar este inmunoensayo en modelos de MN humanos para determinar cambios en las proteínas clave tras el tratamiento con candidatos terapéuticos ayudando a su selección.

Cita: Tosat Bitrián, Carlota; Martínez, Ana; Palomo, Valle (2018) Biosensores específicos basados en quantum dots en la detección de proteínas patológicas en ELA. *dianas* 7 (2): . ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.. URI http://hdl.handle.net/10017/15181](http://hdl.handle.net/10017/15181)

Copyright: © Tosat-Bitrián C, Martínez A, Palomo V. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida de función, selectiva y progresiva, de las motoneuronas (MN) tanto del córtex motor (neuronas motoras superiores) como del tronco cerebral y de la médula espinal (neuronas motoras inferiores) [1]. La neurodegeneración de las MN produce atrofia de los músculos diana provocando parálisis gradual. La progresión de la enfermedad varía mucho entre los individuos pero generalmente la muerte del enfermo se produce de 3-5 años después de su diagnóstico, debido a una insuficiencia respiratoria causada por la debilidad muscular característica de la enfermedad. Cada año se diagnostican 1-2 individuos por cada 100.000, sin embargo la prevalencia anual actual es de 2-3 casos por cada 100.000 personas, lo que pone de manifiesto la letalidad de la enfermedad [2].

La mayoría de los casos de ELA son esporádicos, con una etiología que todavía no se conoce con precisión, pero en torno a un 5-10% de los casos se pueden clasificar como ELA familiar. En estos casos, la enfermedad se desarrolla debido a la herencia con carácter autosómico dominante de mutaciones específicas en genes determinados. Estas mutaciones también se han observado en algunos casos de ELA esporádico pero sin transmisión hereditaria. La primera mutación genética que se reportó fue en el gen *SOD-1* que codifica la enzima antioxidante cobre-zinc superóxido dismutasa, que se ha descrito en el 12% de los pacientes con ELA familiar y el 1% de los pacientes con ELA esporádico. Se ha descrito que esta mutación provoca actividades tóxicas de la enzima más que una disminución de su actividad [3]. Otros genes relacionados con ELA en los que se han descrito mutaciones son *TARDBP* que codifica la proteína TDP-43 (*TAR DNA-binding protein 43*) y *FUS* representando ambas en total, un 8% de los casos de ELA familiar. Ambas proteínas regulan el metabolismo del RNA. Recientemente, se ha descrito la mutación más común tanto en ELA familiar, 40-50% de los casos, como en ELA esporádico, 7% de los casos, una expansión del hexanucleótido GGGGCC en la región intrónica en el gen *C9orf72* [1,3].

Aunque esta enfermedad fue descrita a finales del s. XIX por Jean-Martin Charcot, todavía se desconoce el mecanismo que subyace la muerte selectiva de las MN. Varios estudios han confirmado procesos patológicos que se producen también en otros desórdenes crónicos neurológicos como estrés oxidativo, excitotoxicidad, alteraciones en la glía, desregulación del procesamiento y transcripción del RNA, fallos en el tráfico endosomal y fallos en la homeostasis proteica que conlleva consecuentemente a la formación de inclusiones citoplasmáticas. Estos depósitos de proteínas tienden a ubiquitinarse y están compuestos principalmente por TDP-43 [1,4].

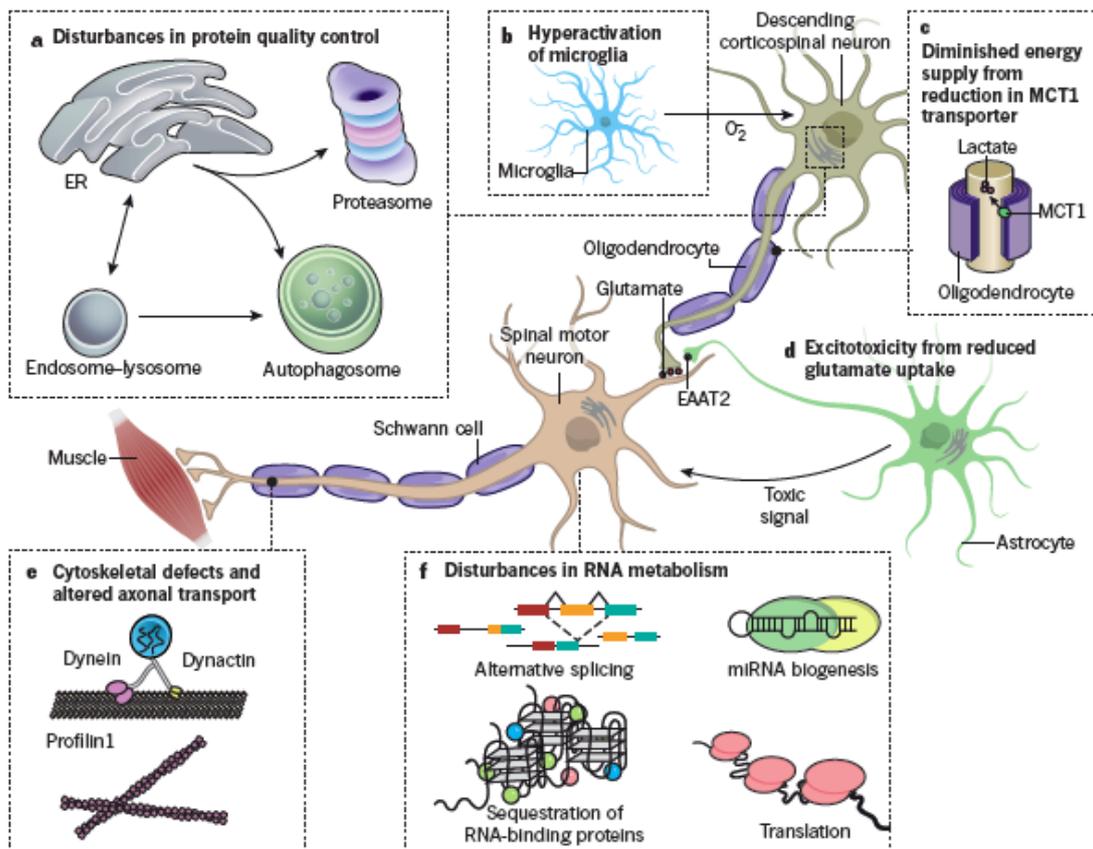


Figura 1.- Mecanismos patológicos implicados en la enfermedad del ELA [1].

TDP-43 es una proteína de la familia de hnRNP (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins*) expresada ubicuamente. Estructuralmente contiene dos motivos de reconocimiento del RNA (RRMs), y una región rica en glicina en el extremo C-terminal. Además contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) y una secuencia de salida del núcleo (NES), por lo que se localiza principalmente en el núcleo aunque se propone que está continuamente translocándose entre núcleo y citoplasma ya que regula procesos celulares en ambos compartimentos como la transcripción de genes, la estabilidad del mRNA, la biogénesis de los microRNA etc [5].

TDP-43 está estrechamente asociada con la mayoría de los casos tanto de ELA como de demencia frontotemporal (DFT) pero también se ha relacionado con la enfermedad de Alzheimer. En las neuronas afectadas, se produce una disminución de los niveles de TDP-43 en núcleo y una acumulación en forma de agregados en el citoplasma. Estos agregados contienen principalmente TDP-43 fosforilado en los residuos de serina 409/410. Se ha descrito que los agregados de TDP-43 pueden inducir apoptosis dependiente de p53 en modelos de progenitores murinos neuronales *in vivo* así como en neuronas corticales humanas *in vitro*. Se ha probado que existe una activación de genes apoptóticos como Bbc3 y Bax, sin embargo la causa de estos agregados todavía se desconoce [5].

Actualmente, existen dos medicamentos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento del ELA, el riluzol y la edaravona. El riluzol es un antagonista de los receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) que actúa reduciendo la excitotoxicidad. Sin embargo, éste tratamiento no es curativo y además no ha demostrado mejorar la función motora [6]. La edaravona tiene un mecanismo de acción protector del estrés oxidativo ya que neutraliza los radicales libres, pero tampoco ha mostrado tener una alta eficacia [7]. La falta de un tratamiento eficaz para la ELA se debe principalmente a la complejidad de los mecanismos moleculares de la enfermedad, el desconocimiento de la etiología y la falta de modelos experimentales que reproduzcan la enfermedad esporádica humana. Es por ello que es de gran importancia comprender la patología a nivel molecular para poder así seleccionar fármacos eficaces.

El análisis de perfil molecular es una técnica innovadora para el estudio de las redes moleculares que subyacen tanto procesos fisiológicos como patológicos. Los quantum dots (QDs) son una herramienta

muy poderosa a utilizar en esta técnica, ya que pueden conjugarse con anticuerpos sirviendo como sondas para determinar la expresión de distintas dianas [8].

Los QDs son nanopartículas formadas por un núcleo de CdSe y un recubrimiento de ZnS que presentan propiedades fotoluminiscentes únicas. Tienen una alta fotoestabilidad, altos coeficientes de extinción molar, longitud de onda (λ) de emisión dependiente del tamaño del núcleo, espectros de absorción amplios y de emisión estrechos [9]. Con el objetivo de que los QD sean solubles en agua, y por tanto adecuados para aplicaciones biológicas, su superficie se modifica con un recubrimiento de ligandos hidrofílicos como PEG (*poly (ethyleneglycol)*) o se encapsulan en polímeros anfifílicos [10]. La amplia superficie de los QD ofrece la posibilidad de unir distintas biomoléculas de interés como anticuerpos o enzimas. En concreto, la unión de anticuerpos que reconocen dianas biológicas específicas permite que los QD puedan ser utilizados como sondas en inmunofluorescencia [9-11].

Debido a sus propiedades fotoluminiscentes, los QD son una alternativa muy prometedora frente a las moléculas orgánicas fluorescentes tradicionales ya que son mucho más brillantes y permiten una detección más sensible de las moléculas. Además, debido a su característico espectro de absorción y de emisión, tienen la capacidad de analizar dianas moleculares simultáneamente excitando a una única longitud de onda (λ) lo que permite realizar perfiles moleculares a nivel de célula única [11].

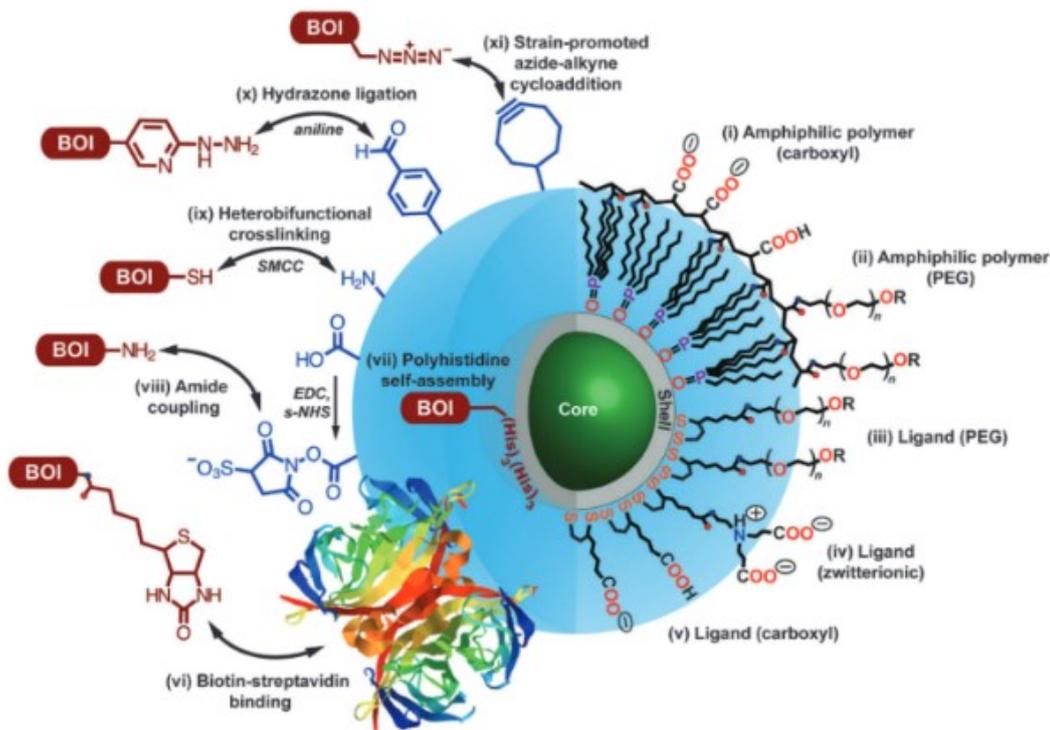


Figura 2. Estructura de los QD y distintas estrategias de conjugación de biomoléculas de interés (BOI). [9]

Recientemente, se ha desarrollado una tecnología de síntesis de sondas QD-anticuerpo (QD-Ab) para detectar entre 5-10 dianas moleculares por experimento [11,12]. La tecnología denominada *Multicolor Multicycle Molecular Profiling* (M3P) permite realizar ciclos de marcaje/desmarcaje, incrementando el número de dianas a analizar en célula única. Para ello, se utilizan QD recubiertos con PEG funcionalizados con amina, disponibles comercialmente, a los que se les acopla mediante una reacción de conjugación con un conector la Proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA) de manera covalente. Los QD funcionalizados en amina se hacen reaccionar con un conector BS3 (3-sulfo-*N*-hidroxisuccinimida del ácido subérico) formando un enlace amida y que posteriormente se acopla con la proteína SpA mediante otro enlace amida.

La SpA se une a los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas de tipo IgG estando implicada en la evasión de la respuesta inmune impidiendo la fagocitosis y la activación del complemento por la vía clásica. Esta estrategia de conjugación garantiza que los anticuerpos se unan al QD en la orientación adecuada para unirse a sus proteínas dianas [13]. Se ha descrito que la SpA presenta hasta 5 dominios de unión de IgG, dos de los cuales son accesibles simultáneamente, mientras que la IgG presenta dos sitios de unión a SpA [14]. Sin embargo, aunque podrían formarse polímeros de complejos SpA-IgG, se ha demostrado que no existe agregación entre ellos utilizando la técnica aquí descrita [12].

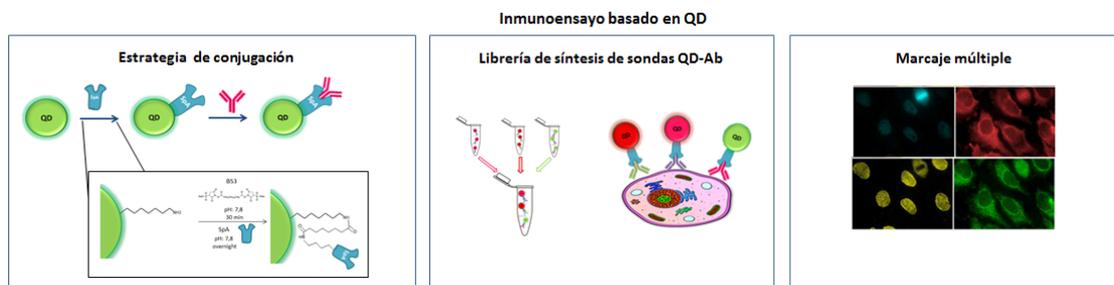


Figura 3.- Esquema general de la tecnología M3P. a) Estrategia de bioconjugación de las sondas QD-Ab utilizando SpA. b) Las sondas QD-Ab sintetizadas se utilizan para realizar ensayos multiplex. c) Imagen de fluorescencia de 5 sondas QD-Ab marcando diferentes dianas [11].

El objetivo de este trabajo es implementar un inmunoensayo basado en QD en células SH-SY5Y para analizar en célula única la expresión de proteínas clave implicadas en ELA como TDP-43 y p-TDP-43 (phospho-TDP-43). La puesta a punto del inmunoensayo permitirá determinar cambios moleculares tras un tratamiento farmacológico ayudando a seleccionar candidatos terapéuticos.

Materiales y métodos

Equipos y Servicios

Para la realización de los experimentos de este trabajo, se utilizaron equipos de distintos servicios del Centro de Investigaciones Biológicas. Las imágenes de fluorescencia se recogieron en un microscopio confocal láser (CLSM) LEICA TCS SP5 en el servicio de microscopía láser confocal y multidimensional *in vivo*; el tamaño de los QD, QD-SpA y QD-SpA-Ab se determinó utilizando el equipo de dispersión de luz dinámica, DynaPro MS/X, Wyatt Inc. del servicio de ultracentrifugación analítica y dispersión de luz dinámica y mediante el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2130 del servicio de microscopía electrónica.

Síntesis de bioconjugados de QD-SpA

Para la síntesis de los bioconjugados QD-SpA, se utilizaron QDs comerciales recubiertos con PEG y funcionalizados en amina (Sigma-Aldrich, n° cat 900229, Invitrogen, n° cat Q21521MP) con picos de emisión centrados a 520, y 655nm (QD520, QD655). Se centrifugó el stock de QDs a 2000 rpm 1 min a temperatura ambiente (TA) con el objetivo de eliminar los posibles agregados de QDs que se hubieran formado. A continuación, los QDs se activaron con un conector bifuncional, BS3 (3-sulfo-*N*-hidroxisuccinimida del ácido subérico), n° cat S5799 Sigma-Aldrich). Se incubaron durante 30 min a TA, 25 μ L del stock QD a 8 μ M, 61 μ L agua, 10 μ L PBS 10X (pH 7,8) y 4 μ L de BS3 50 mM, obteniendo 100 μ L de QDs en PBS 2 μ M con exceso 1000x de BS3. Los QDs activados se purificaron utilizando una columna NAP-5 (n° cat 17085301, GE Healthcare) pre-equilibrada con PBS 1X (pH 7,5). Para seguir el avance de los QD en la columna, se utilizó una lámpara portátil UV. Se recogieron en torno a 500 μ L de QDs que se concentraron hasta 40-50 μ L utilizando filtros Amicon Ultra 100 kDa MWCO (n° cat UFC510024, Millipore) por centrifugación a TA, 7 min 7990 rpm. Los QD activados se conjugaron covalentemente con 100 μ L a 100 μ M de proteína SpA (Proteína A de *Staphylococcus aureus*, n° cat P6031, Sigma-Aldrich). La reacción se incubó 12 h a temperatura ambiente y se purificó por columna NAP-5.

Una vez sintetizados los bioconjugados QD-SpA se calculó su concentración midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro (*Ultrospec 2100, Amersham Bioscience*) en referencia con una muestra 1 μ M.

Código	λ emisión	Casa comercial	Concentración μ M
CTB1.06	655	Invitrogen, Q21521MP	0,7
CTB1.10	655	Invitrogen, Q21521MP	0,8
CTB1.14a	520	Sigma-Aldrich, 900229	0,8
CTB1.24a	520	Sigma-Aldrich, 900229	0,7
CTB1.24b	655	Invitrogen, Q21521MP	1

Tabla 1.- Especificaciones de los bioconjugados QD-SpA sintetizados

Código	λ emisión	Casa comercial	Bioconjugado SpA	Anticuerpo conjugado
CTB1.07	655	Invitrogen, Q21521MP	CTB1.06	p-TDP-43 (66318-1-Ig)
CTB1.13	655	Invitrogen, Q21521MP	CTB1.10	TDP-43 (60019-2-Ig)
CTB1.16a	520	Sigma-Aldrich, 900229	CTB1.14a	Anticuerpo secundario anti-ratón (1706516)
CTB1.24e	520	Sigma-Aldrich, 900229	CTB1.24a	Tubulina (SC-23948)
CTB1.24f	655	Invitrogen, Q21521MP	CTB1.24b	Tubulina (SC-23948)
CTB1.26a	520	Sigma-Aldrich, 900229	CTB1.24a	TDP-43 (60019-2-Ig)
CTB1.26b	655	Invitrogen, Q21521MP	CTB1.24b	TDP-43 (60019-2-Ig)
CTB1.26c	520	Sigma-Aldrich, 900229	CTB1.24a	p-TDP-43 (66318-1-Ig)

Tabla 2.- Especificaciones de las sondas QD-SpA-Ab sintetizadas

Caracterización de los bioconjugados QD-SpA

Movilidad electroforética. Los bioconjugados QD-SpA se caracterizaron en gel de agarosa al 1%, utilizando una corriente de 110V durante 40 min. 5 μ L de las soluciones de QD, QD-SpA y la sonda QD-Ab a 0,1 μ M se mezclaron con 1 μ L tampón de carga (n° cat G2526, Sigma-Aldrich) y se cargaron en el gel. Las imágenes se tomaron en el equipo de quimioluminiscencia (*Chemidoc Imaging System*, Bio-rad).

Dispersión de luz dinámica (DLS). Las muestras para analizar por DLS se diluyeron en PBS 1X, se filtraron y centrifugaron, y se utilizaron a una concentración de 0,1 μ M de QD libre, QD-SpA y QD-SpA-Ab. En total, se recogieron 40 medidas de datos por muestra, con un tiempo de recogida de medida de 10 seg.

Microscopia de transmisión electrónica (TEM). Una disolución de 4 μ L a una concentración de 0,2-0,5 μ M de QD o QD-SpA se depositó sobre una gradilla y se tiñeron con acetato de uranilo 0,5% previamente a su observación.

Intensidad de fluorescencia. Los bioconjugados QD-SpA se caracterizaron espectralmente. Este proceso se repitió para cada nueva preparación de QD-SpA. Los QD-SpA presentan un espectro de emisión muy estrecho por lo que es necesario establecer el espectro de cada bioconjugado preparado. Para ello, se marcó tubulina con las distintas sondas QD-SpA en células SH-SY5Y y se determinó el espectro de emisión realizando un barrido de fluorescencia de 415-750 nm. Además, puesto que existe una variación en la intensidad de fluorescencia bajo las mismas condiciones de imagen de los QD (debido principalmente a la variación que existe en el coeficiente de extinción [9]), se midió la intensidad de fluorescencia de cada QD-SpA sobre las mismas muestras con el objetivo de establecer un factor de corrección en una futura cuantificación de las mismas.

Cultivo celular y procesamiento

Para los ensayos llevados a cabo, se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Las células SH-SY5Y se crecieron en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y penicilina/estreptomina al 1%.

Se sembraron 30.000 células en pocillos de placas de 24 pocillos con medio DMEM y 10% de FBS, sobre un cubreobjetos de cristal esterilizado previamente. 24 h después, la mitad de los pocillos se trataron con ácido etacrínico (n° cat 1083, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 20 μ M. El ácido etacrínico (EA) provoca una depleción del glutatión, incrementando el estrés oxidativo e induciendo la fosforilación del carbono terminal de la serina 403/404 y 409/410 de la proteína TDP-43 [15]. Por ello, en líneas celulares de neuronas se utiliza el EA para inducir la fosforilación de TDP-43 asemejando así uno de los procesos implicados en la patogénesis de la esclerosis lateral amiotrófica. Las células se fijaron al día siguiente con paraformaldehído (PFA) tras alcanzar una confluencia del 80-90% en monocapa. Se añadieron 500 μ L de tampón de fijación (3 mL PFA 16% n° cat 30525-89-4, VWR, 9 mL PBS 10X y 60 μ L de Tritón X-100 10% n° cat 93443, Sigma-Aldrich) por pocillo durante 15-20 min a 37°C.

Inmunofluorescencia

Todos los tampones utilizados en el experimento fueron preparados justo antes de su uso para tratar un total de 24 pocillos.

Tampón de permeabilización. Se prepararon 15 mL de Tritón-X-100 0,25% tras mezclar 10,5 mL de agua, 0,3 mL Triton-X-100 10% y 1,2 mL PBS 10X.

Tampón de bloqueo. El tampón de bloqueo se preparó con 13,2 mL agua, 1,5 mL PBS 1X, 300 mg BSA (*Bovine Serum Albumin*, n° cat 10735078001, Sigma-Aldrich) y 300 µL caseína 5% (n° cat C4765, Sigma-Aldrich) para obtener una solución de BSA 2%.

Tampón de marcaje. Se mezclaron 2,7 mL de agua, 0,3 mL de PBS 10X y 180 mg de BSA para obtener una solución de BSA al 6%.

Tampón de lavado. Se prepararon 20 mL de tampón de lavado, tras mezclar 17,6 mL de agua, 2 mL de PBS 10X, 200 mg BSA y 400 µL de caseína 5%.

Las células fijadas se permeabilizaron con 500 µL de tampón de permeabilización durante 20 min a TA. Una vez permeabilizadas, se lavaron las células 3 veces con PBS 1X y las células se bloquearon con 500 µL de tampón de bloqueo por 5 min a TA dos veces y se dejó incubar una tercera vez durante 30 min a TA.

La sonda QD-Ab se preparó en un tubo de 1,5 mL combinando 2,5 µL PBS 1X, 1,5 µL de anticuerpo primario a una concentración de 0,2 mg/mL y 6 µL del bioconjugado QD-SpA a una concentración de 1µM. Tras 1 h de incubación, las sondas QD-Ab se diluyeron en 300 µL de tampón de marcaje. Se aspiró el tampón de bloqueo y se añadieron 300 µL de la sonda QD-Ab diluida en BSA 6%. Las células se incubaron durante tres horas a TA. Tras 2 h y 50 min, se añadió DAPI (n° cat D9542, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 µg/mL y se incubó todo en conjunto durante 10 min.

A continuación, se aspiró la mezcla de QD-Ab y se lavaron las células con 1 mL de tampón de lavado durante 10 min. Tras 3 lavados de 5 min cada uno con 1 mL de PBS 1X por pocillo, los cristales se montaron en los portaobjetos con medio Fluoromount (n° cat F4680, Sigma-Aldrich) y se guardaron a TA (24-48 h max) o a 4°C.

Como control positivo, se realizó una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 488 (0,75 mg/mL, n° cat 115-546-062, Jackson Immuno Research). Se siguió el mismo protocolo de permeabilización y bloqueo. El anticuerpo primario se utilizó a la concentración indicada (Tabla 3) en 300 µL de BSA 6% y se incubó durante 1 h a TA. Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y posteriormente se añadió el anticuerpo secundario diluido 1:800-1:1000 en 300 µL de BSA 6% y se incubó 1 h a TA. Como controles negativos, se siguió el mismo protocolo incubando las células con 6µL a 1µM de QD libres sin unir a anticuerpo y con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (diluido 1:1000).

Las imágenes se obtuvieron en el microscopio confocal Leica TCS SP5 con un objetivo de aumento 63. Los láseres de excitación utilizados fueron 405 y 488. Se recogió fluorescencia en los rangos establecidos previamente para cada sonda QD-SpA.

Anticuerpo primario	Casa Comercial	N° cat	Concentración Ab en inmunoensayo basado en QD	Concentración inmunofluorescencia
TDP-43	ProteinTech	60019-2-Ig	6,66·10 ⁻³ nM	2,36·10 ⁻³ nM
Phospho (409/410)-TDP-43	ProteinTech	66318-Ig	6,66·10 ⁻³ nM	0,046 nM
α-tubulina	Santa Cruz	SC-23948	6,66·10 ⁻³ nM	8,88·10 ⁻³ nM

Tabla 3.- Especificaciones de los anticuerpos utilizados en este estudio.

Resultados

Caracterización de los bioconjugados QD-SpA

La bioconjugación de los QD con la proteína SpA se confirmó por tres técnicas distintas. En primer lugar se determinó la migración electroforética de los QD libres y bioconjugados en un gel de agarosa partiendo de la premisa que los QD bioconjugados, al tener un mayor tamaño, migrarían menos en el gel. Sin embargo, los resultados que obtuvimos muestran lo contrario. Todos los QD libres migran menos en el gel que sus respectivos bioconjugados QD (Fig 4a,d). Esto es debido a que en la electroforesis, las moléculas migran en función de su tamaño pero también en función de su carga. Los QDs libres no tienen carga puesto que las aminas libres no están protonadas al pH del tampón TAE utilizado (pH: 8,8). Por el contrario, la proteína SpA tiene en su estructura un elevado porcentaje de aminoácidos ácidos (Glu y Asp) que sí están cargados negativamente haciendo que los bioconjugados migren más en el gel. Esta diferencia de migración confirma que los QD sí se han unido a la proteína SpA, así como la unión del anticuerpo a la SpA, pues se observa una menor migración debido al tamaño del anticuerpo.

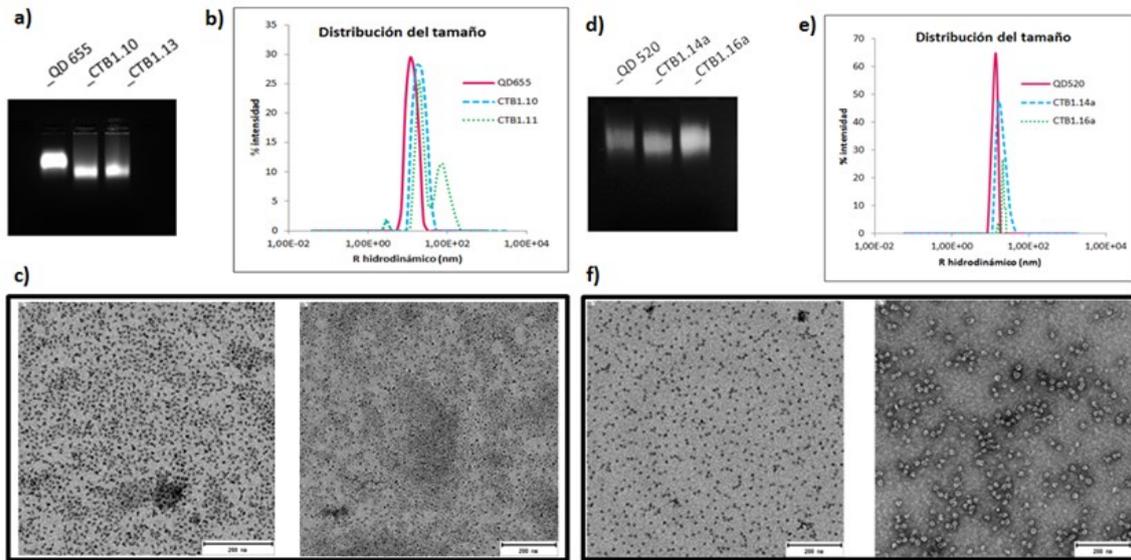


Figura 4.- Caracterización de los bioconjugados QD-SpA con picos de emisión centrados a 655 (izqda) y a 520 nm (dcha). a,d) Análisis de la migración de los distintos bioconjugados, (a) QD655, CTB1.10 y CTB1.13 y (d) QD520, CTB1.14a y CTB1.16a en gel de agarosa 1%,110V 40 min. b,e) Distribución del tamaño hidrodinámico de (b) QD655, CTB1.10, CTB1.11 y (e) QD520, CTB1.14a, CTB1.16a. c,e) Imágenes de microscopía electrónica de (c) QD655 recubiertos de PEG con un tamaño medio de 10-12 nm (izqda.) y bioconjugados CTB1.24b (dcha) con un diámetro de 15-18 nm y (e) QD520 recubiertos de PEG con un tamaño de 9-10 nm (izqda.) y bioconjugados CTB1.14a con un diámetro medio de 12-15 nm (dcha.). La escala es de 200 nm.

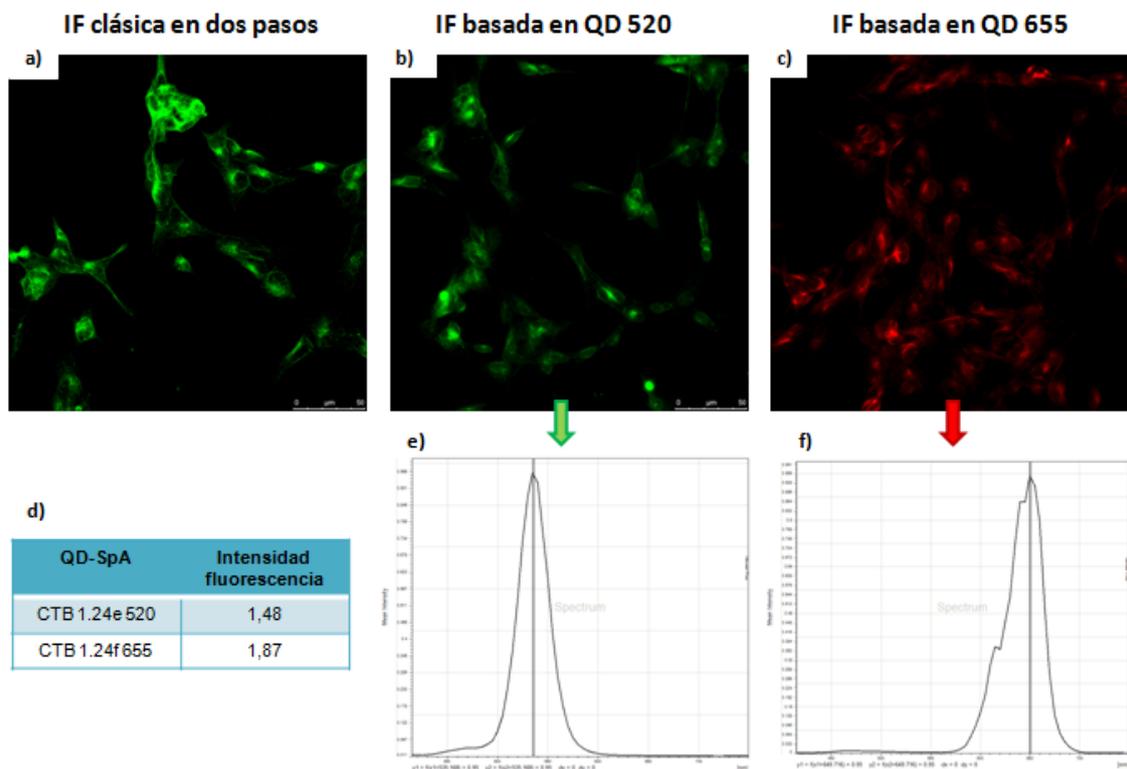


Figura 5.- Caracterización espectral de los bioconjugados QD-SpA. a) Inmunofluorescencia clásica en dos pasos. Marcaje específico de tubulina en células SH-SY5Y con anticuerpo secundario Alexa-488. b) Inmunofluorescencia basada en QD. Marcaje de las células SH-SY5Y con la sonda CTB1.24e. c) Inmunofluorescencia basada en QD. Marcaje de las células SH-SY5Y con la sonda CTB1.24f. La escala es 50 μ m. d) Factores normalizados en función del área de la imagen de la intensidad de fluorescencia de ambas sondas QD-Ab. e) Espectro de emisión de la sonda CTB1.24e con la longitud de onda máxima centrada a 535. f) Espectro de emisión de la sonda CTB1.24f con la longitud de onda máxima centrada a 649 nm.

La técnica de DLS también confirmó estos resultados (Fig 4b,e). Se determinó un radio hidrodinámico de 13,2-13 nm en el caso de los QD655/QD520 (línea continua) que incrementó a 21,2-20,8 nm en el caso de los bioconjugados QD-SpA (línea rayas) y hasta 82,8-69,4 nm las sondas QD-Ab (línea puntos).

Por último, se confirmó la bioconjugación de los QD con la proteína SpA por microscopía electrónica (Fig 4c,f). Los QD libres tienen un tamaño medio de 9-12 nm y debido a su densidad electrónica se observan negros al teñirlos con acetato de uranilo. Los bioconjugados presentan un diámetro ligeramente

superior, de entre 12-18 nm y se observan blancos al estar recubiertos por la proteína SpA, a excepción del núcleo del QD donde se refleja la mayor densidad electrónica que hay.

La disparidad de tamaños obtenida por DLS y por TEM se debe a que en el primer caso, se está midiendo el tamaño hidrodinámico que se calcula en función de la difusión de las partículas en un fluido mientras que por TEM se determina el radio. Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía que recoge que las medidas por DLS estiman alrededor de un 20% más de tamaño que el TEM [16].

Espectralmente, los bioconjugados se caracterizaron marcando las células SH-SY5Y con tubulina, determinando su espectro de emisión (Fig 5e,f) y la intensidad de fluorescencia (Fig 5d). Como control positivo del inmunoensayo, la tubulina se marcó simultáneamente con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 y con las sondas CTB1.24e (QD520-Ab) y CTB1.24f (QD655-Ab) (Fig 4a,b,c). Tras obtener los espectros de emisión de ambos bioconjugados QD-SpA, se corrigieron las longitudes de onda máximas estimadas por las casas comerciales siendo de 535 nm para el QD520 y de 649 nm para el QD655. En función de estos valores, se decidió recoger fluorescencia para el resto de muestras analizadas con estos bioconjugados entre 515-535 nm y 645-665 nm respectivamente. Por otro lado, se observa una diferencia de intensidad de fluorescencia entre ambos QDs siendo más fluorescentes los QD655 que los QD520. Se determinaron los valores de intensidad dividiendo la intensidad media de fluorescencia por la superficie. Estos valores serán utilizados posteriormente para calcular los factores de corrección a aplicar en una futura cuantificación.

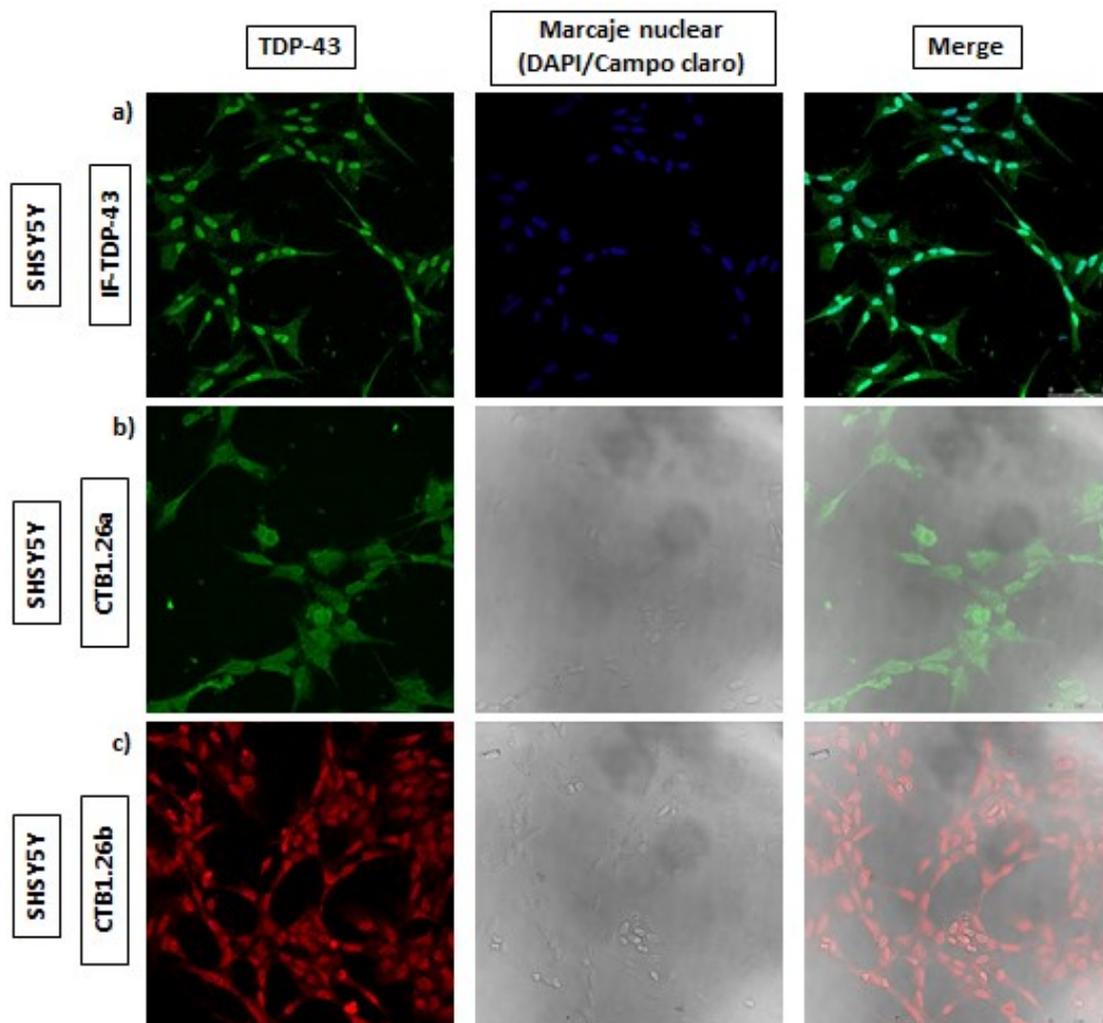


Figura 6.- Marcaje específico de TDP-43 en la línea celular SH-SY5Y. a) Inmunofluorescencia clásica en dos pasos. Marcaje específico de TDP-43 en células SH-SY5Y con anticuerpo secundario Alexa-488. b) Inmunofluorescencia basada en QD. Marcaje de TDP-43 en las células SH-SY5Y con la sonda CTB1.26a. c) Inmunofluorescencia basada en QD. Marcaje de TDP-43 en las células SH-SY5Y con la sonda CTB1.26b. La escala es 50 μ m.

Inmunofluorescencia TDP-43

La expresión de TDP-43 en las células SH-SY5Y, se analizó tanto por inmunofluorescencia (IF) clásica con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 como por inmunoensayo basado en QD de distintas longitudes de onda de emisión (CTB1.26a y CTB1.26b). Los resultados obtenidos con el inmunoensayo basado en QD (Fig 6b,c) muestran la localización principalmente nuclear de TDP-43 ya que es una proteína nuclear que regula entre otros procesos la transcripción de genes. Además TDP-43 también

regula procesos que tienen lugar en el citosol como la estabilidad del mRNA y es por ello que también se observa marcaje citosólico de TDP-43. Estos mismos resultados, se obtienen con la IF clásica (Fig 6a) confirmando la localización principalmente nuclear, y citosólica de TDP-43 en las células SH-SY5Y.

Inmunofluorescencia p-TDP-43

La expresión de p-TDP-43 se estudió en células SH-SY5Y control y en células tratadas con ácido etacrínico. Tanto en el control positivo de la IF clásica como en el inmunoensayo basado en QD, se observa un incremento de los niveles de p-TDP-43 en las células tratadas con EA respecto de las células sin tratar (Fig 7).

Estos resultados validan la utilización de las sondas QD-Ab para analizar por inmunofluorescencia tanto TDP-43 como p-TDP-43 permitiendo realizar de ahora en adelante ensayos múltiples en los que se marcará más de una proteína.

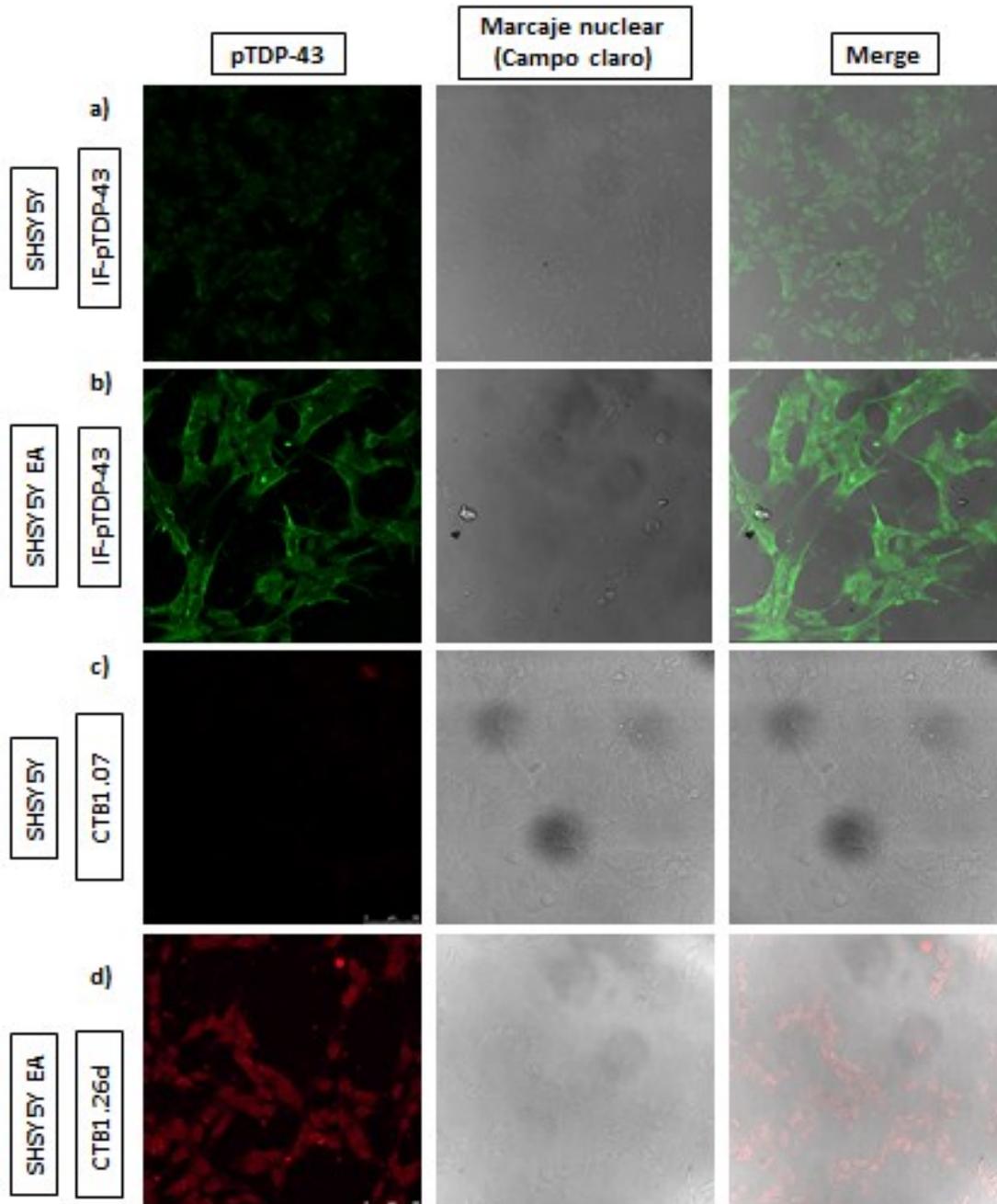


Figura 7.- Marcaje específico de p-TDP-43 en la línea celular SH-SY5Y. a) Inmunofluorescencia clásica en dos pasos. Marcaje específico de p-TDP-43 en células SH-SY5Y con anticuerpo secundario Alexa 488. b) Inmunofluorescencia clásica en dos pasos. Marcaje específico de p-TDP-43 en células SH-SY5Y tratadas con EA con anticuerpo secundario Alexa 488. c) Inmunofluorescencia basada en QD. Marcaje de p-TDP-43 en las células SH-SY5Y con la sonda CTB1.07. d) Inmunofluorescencia basada en QD. Marcaje de p-TDP-43 en las células SH-SY5Y tratadas con EA con la sonda CTB1.26d. La escala es 50 μm .

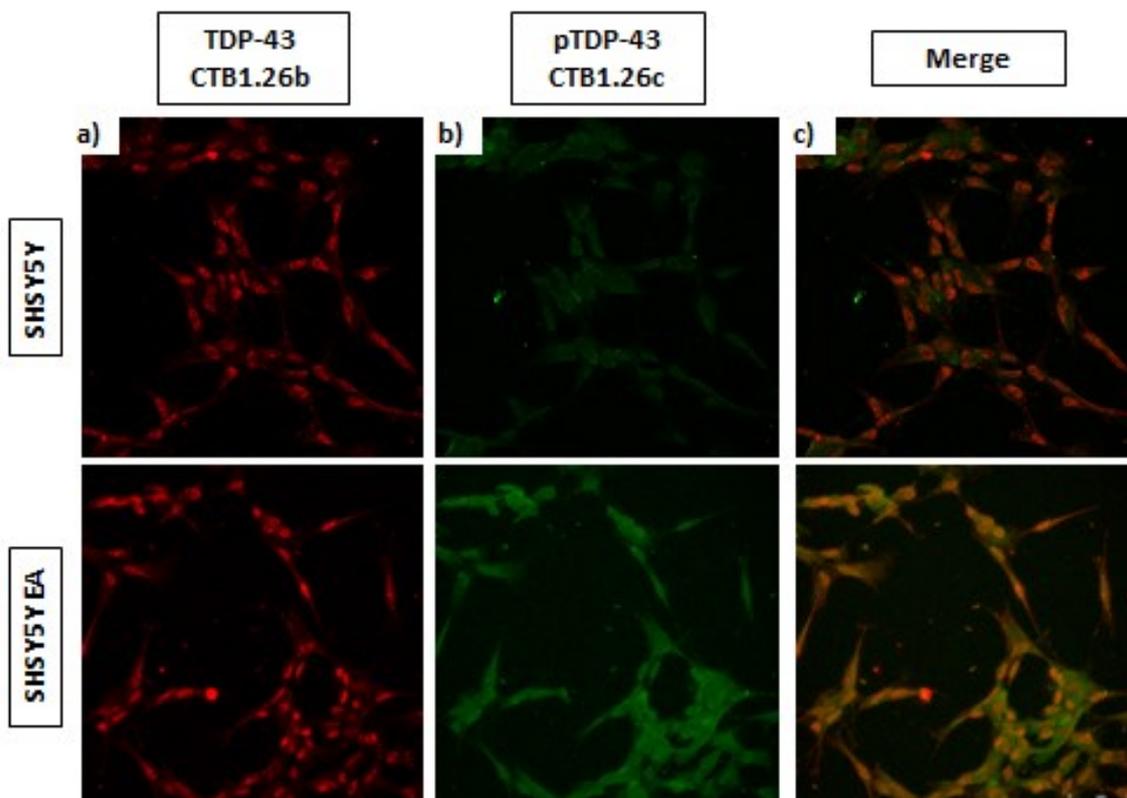


Figura 8.- Marcaje específico de TDP-43 y p-TDP-43 en la línea celular SH-SY5Y. a) Inmunofluorescencia basada en QD. Marcaje de TDP-43 con la sonda CTB1.26ben células SH-SY5Y control y en células SH-SY5Y tratadas con EA. b) Inmunofluorescencia basada en QD. Marcaje de p-TDP-43 con la sonda CTB1.26c en células SH-SY5Y control y en células SH-SY5Y tratadas con EA. c) Merge de a y b.

Inmunofluorescencia TDP-43 y p-TDP-43

Una vez puesto a punto el inmunoensayo basado en QD tanto para TDP-43 como para p-TDP-43, se marcaron ambas proteínas con QD de distintas longitudes de onda de emisión en las células SH-SY5Y control y tratadas con EA. Los niveles de TDP-43 se mantienen en las células tratadas y sin tratar, mientras que los niveles de p-TDP-43, al igual que ensayos previos aumentan en las células tratadas con EA (Fig 8a,b). Ambas proteínas colocalizan siendo mayores los niveles de TDP-43 en núcleo y de p-TDP-43 en citosol puesto que los agregados de p-TDP-43 se forman en citoplasma.

Conclusiones

Las sondas QD-Ab se están convirtiendo en una herramienta de gran utilidad en estudios de análisis de perfil molecular en célula única y en una alternativa a la inmunofluorescencia ya que cada vez hay más ensayos en la literatura que destacan la ventaja de esta técnica [8,10]. No obstante, al tratarse de una técnica todavía novedosa, es necesario poner a punto el inmunoensayo para las proteínas que se desea estudiar.

Por el momento, hemos conseguido marcar tanto tubulina, como TDP-43 y p-TDP-43 en células SH-SY5Y validando estos datos con la inmunofluorescencia clásica. Nuestro siguiente propósito es poner a punto el inmunoensayo para otras proteínas implicadas en la enfermedad como GSK-3, Tau y phospho-Tau. Esto nos va a permitir estudiar y caracterizar la patología molecular del ELA, ya que vamos a ser capaces de cuantificar cambios en los niveles de dichas proteínas, superando una de las limitaciones de la inmunofluorescencia basada en moléculas orgánicas fluorescentes.

Además, también queremos validar estos resultados en modelos humanos de MN de células pluripotenciales humanas inducidas y en linfoblastos derivados de pacientes.

Referencias

1. Taylor, J.P., Brown Jr R.H. and Cleveland, D.W. 2016. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature*. 539(7628):197-206
2. Marin, B., Boumédiène, F., Logroscino, G., Couratier, P., Babron, M.C., Leutenegger A.L., Copetti, M., Preux, P.M. and Beghi, E. 2017. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 46(1):57-74

3. De Lago, E., Moreno-Maret, M., Espejo-Porras, F. and Fernández-Ruiz J. 2015. Endocannabinoids and amyotrophic lateral sclerosis. In: editors. Cannabinoids in Neurologic and Mental Disease. Cagliari: Elsevier. 99-123
4. Mathis, S., Couratier, P., Julian, A., Corcia, P. and Le Masson, G. 2017. Current view and perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regen Res.* 12(2):181-184
5. Voqt, M.A., Ehsaei, Z., Knuckles, P. *et al.* 2018. TDP-43 induces p53-mediated cell death of cortical progenitor and immature neurons. *Sci Rep.* 8(1):8097
6. Zapata-Zapata, C.H., Franco-Dager, E., Solano-Atehortúa, J.M. and Ahunca-Velásquez, L.F. 2016. Esclerosis lateral amiotrófica: actualización. *Latreia.* 29(2): 194-205
7. Takei, K., Watanabe, K., Yuki, S., Akimoto, M., Sakata, T. and Palumbo, J. 2017. Edaravone and its clinical development for amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration.* 18(1):5-10
8. True, L.D. and Gao, X. 2007. Quantum dots for molecular pathology: their time has arrived. *J MolDiagn.* 9(1):7-11
9. Wegner, K.D. and Hildebrandt N. 2015. Quantum dots: bright and versatile *in vitro* and *in vivo* fluorescence imaging biosensors. *ChemSoc Rev.* 44:4792-4834
10. Francis, J.E., Mason, D. and Lévy, R. 2017. Evaluation of quantum dot conjugated antibodies for immunofluorescent labelling of cellular targets. *Beilstein. J. Nanotechnol.* 8:1238-1249
11. Zrazhevskiy, P. and Gao, X. 2013. Quantum dot platform for single-cell molecular profiling. *Nat Commun.* 4:1619
12. Zrazhevskiy, P., True, L.D. and Gao, X. 2013. Multicolor multicycle molecular profiling with quantum dots for single-cell analysis. *NatProtoc.* 8(10):1852-1869
13. Atkins, K.L., Burman, J.D., Chamberlain, E.S., Cooper, J.E., Poutrel, B., Bagby, S., Jenkins, A.T., Feli, E.J. and van den Elsen, J.M. 2008. *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanism of immunocomplex formation. *MolImmunol.* 45(6):1600-11
14. Moks, T., Abrahmsén, L., Nilsson, B., Hellman, U., Sjöquist, J. and Uhlén M. 1986 Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem.* 156(3):637-43
15. Iguchi, Y., Katsuno, M., Takagi, S., Ishigaki, S., Niwa, J.I., Hasegawa, M., Tanaka, F. and Sobue, G. 2012. Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiology of Disease* 45:62–870.
16. Souza, T.G.F., Ciminelli, V.S.T. and Mohallem, N.D.S. 2016. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *J Phys.: Conf. Ser.* 733 012039