

SYNTHETIC PEPTIDE MEDIATED IMMUNOCONJUGATION OF QUANTUM DOTS

PŘÍPRAVA KVANTOVÝCH TEČEK MODIFIKOVANÝCH PROTLÁTKAMI POMOCÍ SYNTETICKÉHO PEPTIDU

Janů L.¹, Stanisavljevic M.¹, Ryvolová M.^{1,2}, Hubálek J.², Adam V.^{1,2}, Kizek R.^{1,2}

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

ABSTRACT

Quantum dots (QDs) are nanoparticles with the dimensions in the range of 2–10 nm. They are used as a fluorescent label in a variety of biological investigations. QDs have a broad absorption with narrow photoluminescence spectra, high resistance to photobleaching and high resistance to photo- and chemical degradation. Nowadays, they are usually made of semiconductor core capped with any organic derivative making the quantum dot water soluble. This organic compound covering the metal core also serves as a linker for further conjugation.

Up to now, many efforts have been made to utilize quantum dots as immunochemical sensor. One of the possible ways is to conjugate the quantum dot with antibody. There are several methods of immuno-quantum dot preparation. The conjugation of antibodies or proteins to quantum dots using standard linking chemistry can be related to potential difficulties of working with nanoparticles. We have investigated an alternative approach of self-assembled immuno-quantum dot preparation using a peptide as a linker.

Key words: quantum dots, immuno-quantum dots, human IgG.

Acknowledgments: The financial support from the following project IGA AF Mendelu IP 10/2012 is highly acknowledged.

ÚVOD

Imunochemické metody využívají vazbu mezi protilátkou a antigenem. Pomocí specifické vazby na značenou protilátku lze tímto způsobem stanovit celou řadu analytů. S rozvojem nanotechnologie se ke značení protilátek začaly využívat také kvantové tečky. Kvantové tečky (quantum dots, QD) jsou nejčastěji polovodičové částice o rozměrech 2-10 nm. Struktura kvantových teček se zpravidla skládá z anorganického jádra (CdTe, CdSe, CdS, ZnS a mnohé další) a svrchní, nejčastěji organické vrstvy, tvořené merkaptopropionovou kyselinou (MPA), glutathionem (GSH), polyetylen glykolem (PEG) a podobně (Drbohlavova, a kol., 2012, Duan, a kol., 2009, Jin, a kol., 2005, Molaei, a kol., 2011). Takto upravené vykazují vynikající fluorescenční vlastnosti. V porovnání s klasickými organickými barvivy mají kvantové tečky delší životnost, úzké emisní spektrum a široké absorpční spektrum (Baumle, a kol., 2004, Duan, a kol., 2009). Několik posledních studií se ale také zabývá jejich nevýhodami a omezeními, které jsou spjaty především s konjugací s proteiny, protilátkami a dalšími organickými molekulami. Ukázalo se, že jejich stabilita a fluorescenční vlastnosti mohou být negativně ovlivněny pH, teplotou nebo koncentrací solí v roztoku (Drbohlavova, a kol., 2009). CdTe kvantové tečky pokryté MPA, které jsou hojně používány pro své výborné spektroskopické vlastnosti a snadnou přípravu, jsou v kyselém prostředí (při pH nižším jak 3) velmi nestálé a během krátké doby ztrácejí svoji luminiscenci. Tento efekt není úplně vysvětlen, ale má se za to, že vlivem vysoké koncentrace vodíkových iontů, ztrácí povrch kvantových teček záporný náboj, dochází k následnému pronikání vodíkových kationtů hlouběji k anorganickému jádru nanočástice, kde reagují s thiolovou skupinou MPA. Následně dochází k desorpci molekuly MPA od povrchu částice, ta ztrácí svoji rozpustnost, dochází k aglomeraci a kompletní ztrátě fotoluminiscence. Pravděpodobně velmi podobným nebo shodným mechanismem působí také vysoká koncentrace iontů, např. Na⁺ (Kulvietis, a kol., 2011). Při standardním použití konjugačních činidel (sulfo-SMCC, sulfo-MBS, EDC) jsou hodnoty pH důležité z hlediska účinnosti a specifity reakce. Tudíž v dosavadních protokolech konjugace kvantových teček s proteiny je nezbytné použít tlumivých roztoků (PBS atd.), které obsahují poměrně vysokou koncentraci iontů. Druhým faktem je, že klasická konjugační činidla spojují například karboxylové skupiny (EDC) nebo thiolové skupiny proteinu (sulfo-SMCC, sulfo-MBS) a amino-skupiny kvantových teček. Na proteinu (protilátce) tedy může dojít k této reakci na kterékoliv dostupné skupině. Během reakcí může také docházet ke vzniku polymerů, které se následně mohou vysrážet z roztoku (Clapp, a kol., 2006).

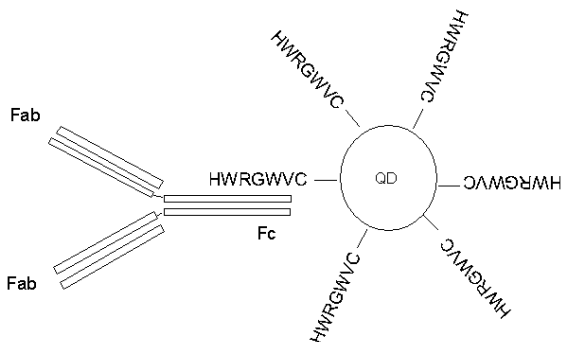
Výše uvedené důvody vedly k vývoji metodik založených na více či méně odlišných postupech konjugace. Kvantové tečky, jejichž povrch je modifikovaný MPA, TGA (thioglycolic acid) nebo DHLA (dihydrolipoic acid) na svém povrchu nesou karboxylové skupiny. Záporný náboj karboxylových skupin zajišťuje vzájemnou repulzi (Kulvietis, a kol., 2011). Bylo prokázáno, že

jsou-li kvantové tečky v roztoku o pH nižším než je pI proteinu (protilátky), potom může docházet k samovolnému navázání kvantových teček na povrch proteinu pomocí elektrostatických sil. Záporně nabitě tečky se vážou na povrch proteinu, který má při daném pH celkový kladný náboj (Na, a kol., 2010). Jiný přístup spočívá ve využití afinity polyhistidinového řetězce ke kovovému povrchu – tedy povrchu kvantových teček. Na C-nebo N-konec proteinu je navázána sekvence obvykle minimálně pěti histidinů, která zajišťuje rychlou a snadnou konjugaci proteinu na kvantové tečky.

Byly také provedeny zajímavé práce, které se snaží napodobit přirozenou biologickou syntézu nanočástic. Tvorba anorganické hmoty v tělech živých organismů je řízena proteiny. Příkladem mohou být kosti, zuby, ulity, ostny nebo superparamagnetické částice v magnetotaktických bakteriích (Tamerler a Sarikaya, 2009). Pomocí technik jako je phage display, byla zjištěna celá řada peptidových sekvencí, které mají vysokou afinitu k různým druhům kovů nebo jejich sloučeninám a jsou schopny regulovat růst nanočástic. Stejně tak některé proteiny jsou schopny se specificky vázat na jiné proteiny nebo organické molekuly (avidin-biotin, *Staphylococcus aureus*, Protein A – lidský imunoglobulin (HIgG) a jiné). Výhodou těchto procesů je, že probíhají ve vodném prostředí, nevyžadují zvýšenou teplotu reakce ani žádné další chemikálie. Tyto poznatky byly nedávno využity k syntéze kvantových teček, kdy do proteinu A byl zakomponován peptid s vysokou afinitou k ZnS. Jednoduchým smícháním teček modifikovaných proteinem A s HIgG vznikl komplex kvantová tečka-HIgG. Jak bylo uvedeno, proces nepotřebuje žádnou další chemickou ani teplotní aktivaci, avšak vyžaduje modifikaci proteinu a navíc, výsledný produkt je poměrně velký (spojení proteinu A a HIgG) (Zhou, a kol., 2010).

V naší práci jsme využili poznatku, že hexamer HWRGWV, jehož selektivní vazba je srovnatelná s proteinem A, se specificky váže na Fc fragment HIgG (Yang, a kol., 2005). Provedli jsme syntézu CdTe kvantových teček modifikovaných tímto peptidem a po následném jednoduchém smíchání s lidským imunoglobulinem (HIgG) se podařilo identifikovat komplex kvantová tečka – HIgG (Obr.1).

Obr. 1: idealizované schéma vazby lidského imunoglobulinu na kvantovou tečku modifikovanou peptidem HWRGWVC.



MATERIÁL A METODIKA

Resiny pro přípravu syntetických peptidů byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (USA), aminokyseliny pro syntézu na pevné fázi byly zakoupeny od firmy Merck (USA) a Sigma Aldrich (USA). Rozpouštědla pro syntézu peptidů byla zakoupena od firmy Biosolve (Holandsko) a Sigma Aldrich (USA). Chemikálie potřebné na přípravu kvantových teček byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (USA). Lidský imunoglobulin byl zakoupen od firmy Sigma Aldrich (USA).

K syntéze peptidů na pevné fázi byl použit automatický syntetizátor peptidů Prelude (Protein technologies, USA). Analýza čistoty peptidů byla provedena na HPLC od firmy Shimadzu (USA). K analýze byly použity následující mobilní fáze: A = 0,1% TFA, B = 80% acetonitril, 20% voda a 0,08% TFA. Gradient byl od 2%B do 100% B, 15 minut. Analýzy MS byly provedeny na přístroji Ultraflex III instrument (Bruker Daltonik, Germany). 0,6 µl vzorku bylo smícháno s 2,4 µl roztoku matrix (nasyčený roztok alfa-kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny směsí voda/acetonitril 1:1, v/v). Elektroforéza byla provedena na přístroji CE (Beckman Coulter, PACE 5500).

Syntéza kvantových teček modifikovaných peptidem byla provedena na mikrovlnném systému Anton Paar (Rakousko).

Měření kapilární elektroforézou bylo provedeno na systému Beckman P/ACE™ MDQ s absorbančním detektorem (214 nm) a křemennou kapilárou (délka 47 cm, efektivní délka 40 cm, vnitřní průměr 75 µm. 20 mM borátový pufr byl použit jako separační elektrolyt. Separace byla provedena při 20kV a vzorek byl injektován 20 s při 3,4 kPa.

Fluorescenční spektra byla měřena na přístroji Tecan Infinite 200 PRO (TECAN, Switzerland). K analýze bylo použito 50 µl vzorku.

Syntéza peptidu HWRGWVC

Hexamer HWRGWV vykazuje vysokou afinitu k proteinu A (Yang, a kol., 2005). K jeho napojení na CdTe kvantové tečky jsme zvolili vazbu přes SH skupinu cysteinu. Cystein jsme umístili na C-konec peptidu, který se zdá být vhodný, protože podle dostupných informací je pro vazbu na HgG klíčový histidin na N-konci peptidu, který by z tohoto důvodu měl zůstat volný. Peptid byl připraven pomocí syntézy na pevné fázi, klasickým postupným napojování aminokyselin od C-konce peptidu po jeho N-konec.

Úvodní krok syntézy byl proveden s Rink amide resinem. Další tvorba peptidových vazeb probíhala následovně: Fmoc skupina byla odstraněna 20% roztokem piperidinu v dimethylformamidu (DMF) po dobu 2 x 2,5 minuty. Aktivace příchodí aminokyseliny probíhala pomocí 0,05 M roztoku N,N-diisopropylethylaminu (DIPEA) v DMF; 0,15 g O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-fosfát (HBTU) a 0,03 g Hydroxybenzotriazol (HOBt). Molární poměr aminokyseliny (AK) a aktivátorů byl:

AK : HBTU : HOBt : DIPEA = 1 : 1 : 0,5 : 2.

Reakční doba byla 30 minut. Byl použit čtyřnásobný molární přebytek aminokyselin vzhledem k navázce resinu. Měřítka reakce bylo 0,1 mmol.

Závěrečná úprava peptidu zahrnovala štěpení sekvence od resinu, štěpení chránících skupin postranních řetězců aminokyselin, precipitaci peptidu dietyléterem a lyofilizaci. Štěpení peptidu probíhalo v koncentrované TFA. K potlačení vedlejších reakcí během štěpení byly zvoleny následující přísady: voda (HPLC grade), fenol, triisopropylsilan a 3,6-dioxa-1,8-oktandithiol (89:2:5:2:2). Tyto chemikálie mají za úkol eliminovat uvolněné zbytky chránících skupin, které mohou být velmi reaktivní a modifikovat vedlejší řetězce aminokyselin a tím způsobovat tvorbu nežádoucích vedlejších produktů. Doba štěpení byla vzhledem k přítomnosti cysteinu 2 hodiny. Poté byl peptid vysrážen dietyléterem přímo z roztoku TFA. Identifikace peptidu a vedlejších produktů byla provedena na MALDI-TOF MS. Kvantifikace byla provedena na HPLC.

Syntéza kvantových teček

Pro syntézu kvantových teček modifikovaných peptidem bylo zavedeno menší měřítka syntézy (0,5 ml roztoku). To nám umožňovalo větší počet opakování pokusů s nižšími navážkami peptidu a tím pádem menšími ekonomickými náklady. Příprava kvantových teček probíhala následovně:

2 ml CdCl_2 ($0,04 \text{ mol.l}^{-1}$) bylo naředěno do 21 ml. Za stálého míchání bylo postupně přidáno 50 mg citrátu sodného 2 ml Na_2TeO_3 ($0,01 \text{ mol.l}^{-1}$). Z tohoto roztoku bylo následně odebráno 0,5 ml. Do těchto 0,5 ml byly přidány 2 mg peptidu v DMF a přebytek NaBH_4 (2,0 mg). Roztok v uzavřené skleněné reakční nádobce byl umístěn do mikrovlnného reaktoru. Parametry syntézy byly: 180°C , 800W a 20 minut. Po dokončení byly vzorky ochlazeny na 50°C a odstředěny při 25000 RCF po dobu pěti minut. Supernatant byl podroben analýzám.

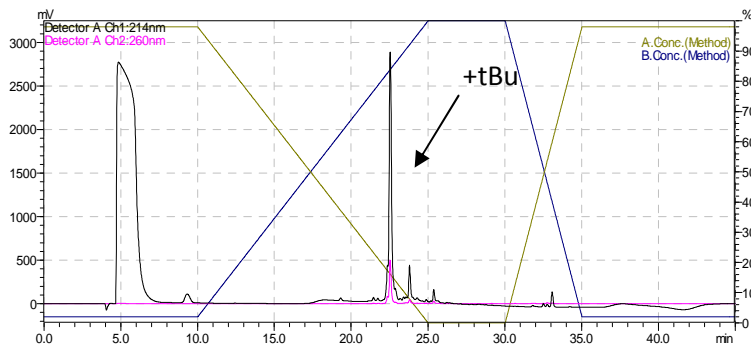
Příprava kvantových teček modifikovaných lidským imunoglobulinem

Navázání na HIgG proběhlo jednoduchým přidáním 13 μ l HIgG do 100 μ l kvantových teček a následným třepáním po dobu dvou hodin.

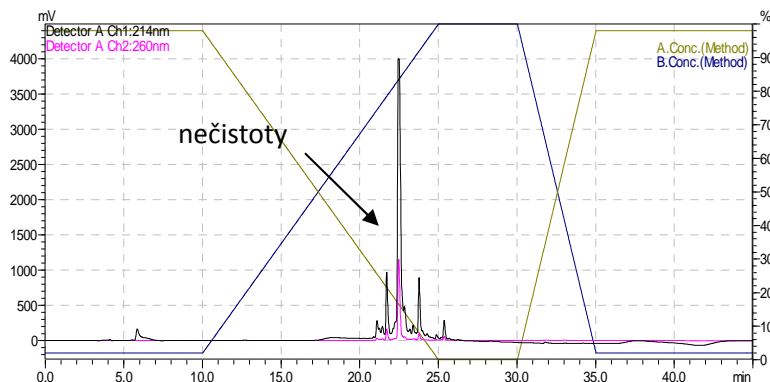
VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledná čistota surového peptidu byla 70% (obr. 2). Vedlejší produkt byl identifikován jako peptid s neodstraněnou chránící skupinou tBu. K odstranění této skupiny bylo zapotřebí prodloužené doby štípání v TFA. Tento krok se ale ukázal jako kontraproduktivní, protože při delším kontaktu s TFA byla už atakována samotná sekvence peptidu a docházelo k vedlejším reakcím, pravděpodobně na cysteinu (obr. 3). Z těchto důvodů bylo přistoupeno k pokusům s původním peptidem. Struktura peptidu (hmotnostní spektrum na obr. 4) byla navržena následovně: sekvence HWRGWV má podle dostupných údajů vykazovat vysokou afinitu k Fc fragmentu HIgG. Důležitý z tohoto hlediska je N-konec sekvence s histidinem. Proto byl cystein přidán na C-konec peptidu. Cystein, stejně jako u MPA, TGA nebo DHLA, zajišťuje vazbu peptidu na kvantovou tečku. Jako organická molekula-modifikátor také určuje růst (velikost) kvantových teček.

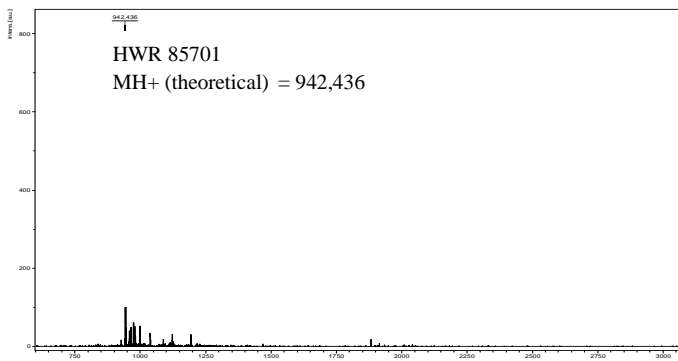
Obr. 2: HPLC chromatogram surového peptidu HWRGWVC. V retenčním čase 4-8 minut je pík DMF.



Obr. 3: HPLC chromatogram peptidu HWRGWVC po prodlouženém štěpení chránících skupin. Před samotným peptidem jsou vidět nečistoty vzniklé prodlouženou dobou štípaní chránících skupin

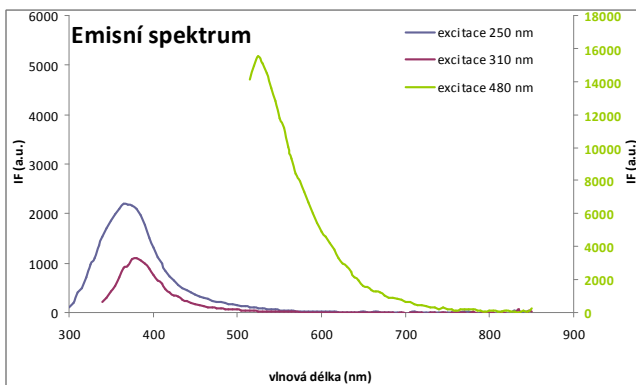


Obr. 4: MALDI TOF-MS surového peptidu HWRGWVC.



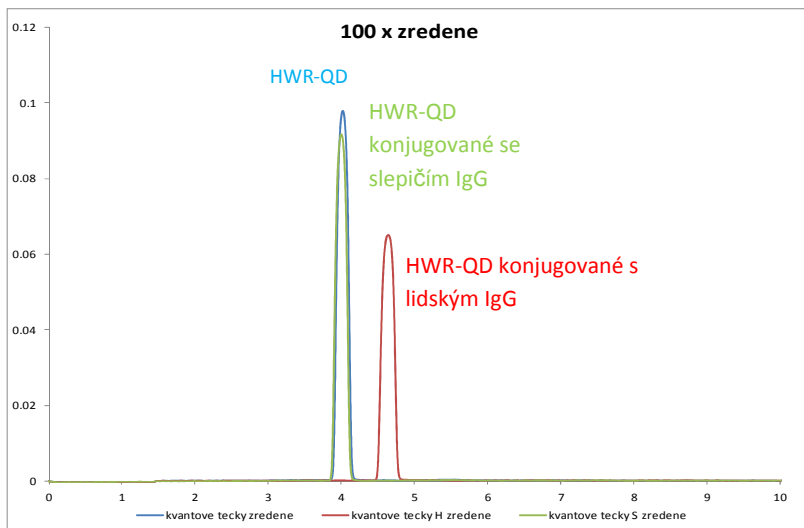
Navržený peptid je dobře rozpustný v čisté vodě (HPLC grade) nebo dimethylformamidu (DMF), ovšem v roztoku reaktantů kvantových teček je jeho rozpustnost omezená. Proto byl nejprve rozpuštěn ve 100 μ l DMF a poté přidán do reakční směsi. I tak ale došlo k jeho částečnému zpětnému vysrážení, což zřejmě omezilo konečné rozměry a luminiscenční vlastnosti teček. Při excitaci 480 nm bylo emisní maximum 525 nm (obr. 5). Následné pokusy posunout vlnovou délku emise k vyšším hodnotám pomocí vyšších návážek peptidu, prodloužení doby nebo zvýšením teploty reakce byly jen málo úspěšné. Omezená rozpustnost peptidu v reakční směsi zřejmě neumožňuje větší růst kvantových teček, přičemž část z nich se spolu s peptidem vysrážela z roztoku. Tyto přebytky byly odstraněny centrifugací (25000 rcf, 5 minut). Omezená rozpustnost peptidu může být zapříčiněna vysokou koncentrací iontů v roztoku nebo izoelektrickým bodem peptidu (8,26), který je velmi blízký pH reakční směsi (8-9).

Obr. 5: Emise kvantových teček modifikovaných peptidem HWRGWVC v závislosti na vlnové délce excitace.



Naším cílem bylo vytvořit metodiku pro syntézu imuno-kvantových teček, která by spočívala v maximální jednoduchosti a maximální specifitě reakce. V prvním kroku jsme provedli syntézu kvantových teček, jejichž povrch byl modifikovaný peptidem HWRGWVC. Peptid se na povrch kvantových teček váže thiolovou skupinou cysteinu. Samotná syntéza kvantových teček probíhala pomocí mikrovlnného záření. Tato aktivace je oproti klasickému ohřevu v baňce rychlejší a zajišťuje rovnoměrný ohřev vzorku. Tím je omezena tvorba povrchových defektů během reakce. Výsledkem jsou kvantové tečky nesoucí na svém povrchu peptid, který je schopen vázat se na Fc fragment lidského imunoglobulinu. Výhodou je, že Fab fragment, který je zodpovědný za vazbu na antigen, by měl zůstat volný, tedy aktivní. Při konjugaci byl jako negativní kontrola použit slepičí IgG (obr.6).

Obr. 6: Elektroforeogram surového produktu QD-HWR-IgG



ZÁVĚR

Podařilo se připravit protilátkou modifikované kvantové tečky. Příprava spočívala v jednoduchém smíchání lidského imunoglobulinu s kvantovými tečkami. Princip reakce je založen na využití peptidu HWRGWVC, který má afinitu k Fc fragmentu HIgG. V prvním kroku byly připraveny kvantové tečky modifikované tímto peptidem. Peptid byl na jejich povrch napojen přes thiolovou skupinu cysteinu umístěného na C-konci peptidu. V druhém kroku bylo smícháno 13 μ l HIgG a 100 μ l kvantových teček. Výhodou této metodiky je snadná finální příprava imuno-kvantových teček, specifická vazba teček na Fc fragment HIgG a relativně malá velikost výsledného komplexu. Nevýhodou, která by měla být předmětem dalšího výzkumu, je omezená rozpustnost peptidu, která pravděpodobně limituje velikost a vlastnosti kvantových teček.

LITERATURA

Baumle M., Stamou D., Segura J. M., Hovius R., Vogel H. (2004): Highly fluorescent streptavidin-coated CdSe nanoparticles: Preparation in water, characterization, and micropatterning. *Langmuir*, 20(10): 3828-3831.

Clapp A. R., Goldman E. R., Mattoussi H. (2006): Capping of CdSe-ZnS quantum dots with DHLA and subsequent conjugation with proteins. *Nature Protocols*, 1(3): 1258-1266.

Drbohlovova J., Adam V., Kizek R., Hubalek J. (2009): Quantum Dots - Characterization, Preparation and Usage in Biological Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(2): 656-673.

Drbohlovova J., Chomoucka J., Hrdy R., Prasek J., Janu L., Ryvolova M., Adam V., Kizek R., Halasova T., Hubalek J. (2012): Effect of Nucleic Acid and Albumin on Luminescence Properties of Deposited TiO₂ Quantum Dots. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(2): 1424-1432.

Duan J. L., Song L. X., Zhan J. H. (2009): One-Pot Synthesis of Highly Luminescent CdTe Quantum Dots by Microwave Irradiation Reduction and Their Hg²⁺-Sensitive Properties. *Nano Research*, 2(1): 61-68.

Jin W. J., Fernandez-Arguelles M. T., Costa-Fernandez J. M., Pereiro R., Sanz-Medel A. (2005): Photoactivated luminescent CdSe quantum dots as sensitive cyanide probes in aqueous solutions. *Chemical Communications*, 7): 883-885.

Kulvietis V., Streckytė G., Rotomskis R. (2011): Spectroscopic investigations of CdTe quantum dot stability in different aqueous media. *Lithuanian Journal of Physics*, 51(2): 163-171.

Molaei M., Iranizad E. S., Marandi M., Taghavinia N., Amrollahi R. (2011): Synthesis of CdS nanocrystals by a microwave activated method and investigation of the photoluminescence and electroluminescence properties. *Applied Surface Science*, 257(23): 9796-9801.

Na N., Liu L., Taes Y. E. C., Zhang C. L., Huang B. R., Liu Y. L., Ma L., Ouyang J. (2010): Direct CdTe Quantum-Dot-Based Fluorescence Imaging of Human Serum Proteins. *Small*, 6(15): 1589-1592.

Tamerler C., Sarikaya M. (2009): Molecular biomimetics: nanotechnology and bionanotechnology using genetically engineered peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society A - Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 367(1894): 1705-1726.

Yang H., Gurgel P. V., Carbonell R. G. (2005): Hexamer peptide affinity resins that bind the Fc region of human immunoglobulin G. *Journal of Peptide Research*, 66(120-137).

Zhou W., Schwartz D. T., Baneyx F. (2010): Single-Pot Biofabrication of Zinc Sulfide Immuno-Quantum Dots. *Journal of the American Chemical Society*, 132(13): 4731-4738.