

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138677> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Egorova, E.A.

Title: Gold nanoparticle-peptide conjugates for biomedical applications

Issue Date: 2020-12-15

CHAPTER 7

Nederlandse Samenvatting en Perspectieven

Goud nanodeeltjes (GNPs) zijn metallische nanodeeltjes die eenvoudig zijn te synthetiseren met controle over vorm en grootte. GNPs kunnen gemakkelijk worden gefunctionaliseerd en beschikken over bijzondere optische eigenschappen. Vanwege deze kenmerken zijn GNPs aantrekkelijk voor gebruik in een groot aantal toepassingen variërend van nanofotonica en sensoren, tot aan de behandeling van ziektes. Desondanks wordt het daadwerkelijke gebruik gehinderd door de inherente instabiliteit in fysiologische condities. Eerder werd aangetoond dat het modifieren van het oppervlak met biocompatibele moleculen resulteert in een significante vermindering van aggregatie en cytotoxiciteit. Het modifieren van GNPs met bijvoorbeeld silica of polymeren, is echter niet eenvoudig. Bovendien zijn deze coatings relatief dik, wat nadelig is voor bepaalde toepassingen. Een oplossing hiervoor is het stabiliseren van GNPs met peptiden. In dit proefschrift is een reeks cysteïne-bevattende oligopeptiden ontwikkeld waarin de thiol groep van cysteïne bindt aan het goud oppervlak via een Au-S binding. Dit resulteert in β -sheet-achtige secundaire peptide structuren op het goudoppervlak. Deze oligopeptiden beschikken over een netto negatieve lading die elektrostatische repulsie tussen individuele GNPs veroorzaakt resulterend in colloïdale stabiliteit. Tot dusver zijn peptiden alleen gebruikt voor het stabiliseren van kleine (≤ 30 nm), sferische GNPs en niet voor het stabiliseren van grotere GNPs of met een andere vorm. In dit proefschrift zijn nieuwe amfifiele peptiden ontwikkeld voor het stabiliseren van een breed scala aan GNPs met verschillende vorm en grootte. Deze moleculen beschikken over eigenschappen die zorgen voor een effectieve stabilisatie van GNPs: β -gestructureerd zelf-organiserend gedrag en een hoge netto lading. Bovendien bleek dat hydrofobe interacties tussen alkylketens kunnen bijdragen aan het stabiliserende effect van deze peptide-amfifielen. Wij hebben een reeks peptide-amfifielen ontworpen en hun zelf-organiserende eigenschappen gekarakteriseerd. De geschiktheid als coatings voor GNP's

van verschillende vormen en maten werd onderzocht. Ten slotte werd aangetoond dat functionalisatie van de peptide-amfifielen met specifieke epitopen de cellulaire immunresponse kan beïnvloeden.

Om de peptide-amfifielen te binden aan een goudoppervlak, werd een thiol groep geïntroduceerd. Een gedetailleerde structuur-assemblage studie is beschreven in **Hoofdstuk 2** van dit proefschrift. Om de effecten van de thiol groep te evalueren, zijn vijf peptide sequenties (V_3A_3 , A_3V_3 , A_6 , $(VA)_3$, en $(AV)_3$) en twee alkyl keten lengte (C16 en C11) bestudeerd. Bovendien is er een vergelijking gemaakt tussen monomeren en dimeren die gevormd worden door thiol-oxidatie. De zelf-organiserende eigenschappen zijn vergeleken met conventionele gepalmitoyleerde peptide-amfifielen. De introductie van een thiol groep leidde in het algemeen tot een vermindering van de hoeveelheid β -structuur en zelforganisatie, met uitzondering van één peptide segment, $(AV)_3$. Bovendien waren de gevormde assemblages korter. Dimerisatie van de C16-alkylketen had een duidelijk effect op de morfologie van de vezels in vergelijking met hun monomere tegenhangers, maar niet op de hoeveelheid aan β -structuur. Bij het gebruik van een kortere gethioleerde alkylketen (C11) konden er geen duidelijke trends worden ontdekt voor de vijf peptide-amfifielen assemblages, behalve dat het gehalte aan α -structuur in alle gevallen toenam. Dimerisatie van de C11-alkylketen had een positief effect op zowel de morfologie van de assemblages en de hoeveelheid aan β -structuur. Interessant genoeg vertoonden de A_6 -peptide-amfifielen het hoogste α -gehalte, wat tot uiting kwam in de morfologie van de gevormde vezels. De gecombineerde analyse van gegevens verkregen met behulp van circulaire dichroïsme (CD) spectroscopie, Fourier-transformatie infrarood (FT-IR) spectroscopie en transmissie-elektronenmicroscopie (TEM) maakte het mogelijk dat de vijf peptidesequenties in twee groepen werden verdeeld: die met een peptide-gedreven modus van zelforganisatie (V_3A_3 en A_3V_3) of die waarbij zelforganisatie afhankelijk is van de alkylketensamenstelling (A_6 ,

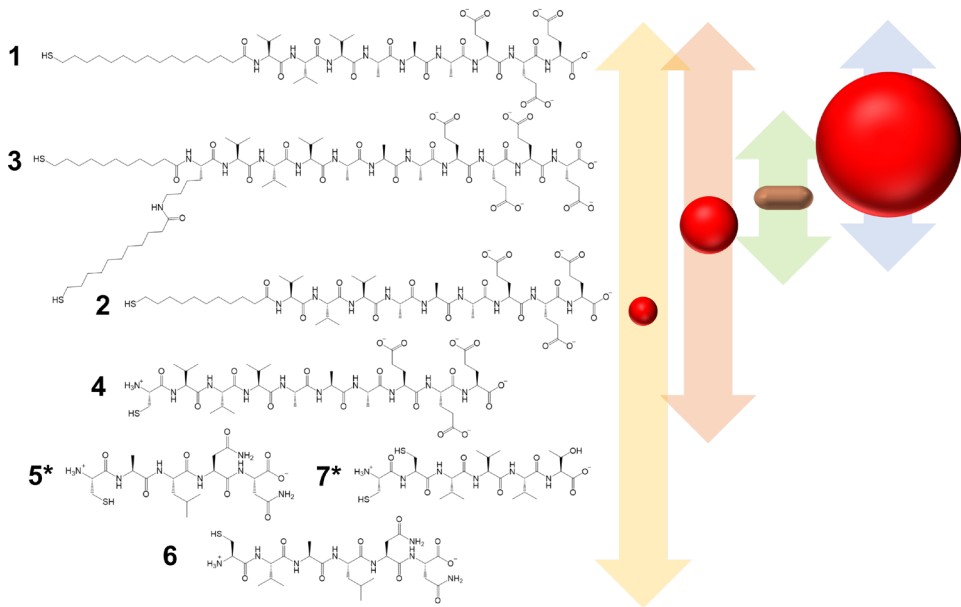
(VA)₃ en **(AV)₃**). Het **V₃A₃**-peptidedomein vertoonde minimale veranderingen in zelf-organiserend gedrag als reactie op veranderingen in de alkylketen en werd daarom verondersteld de meest geschikte kandidaat te zijn voor het stabiliseren van GNPs. Dit peptide-amfifiel werd vervolgens gebruikt in **Hoofdstuk 3**.

In **Hoofdstuk 3** van dit proefschrift werd het gebruik van negatief geladen, gethioleerde peptide-amfifielen als stabilisator voor sferische GNPs met een diameter van 20, 40 en 100 nm onderzocht. De kromming van het GNP oppervlak heeft een grote invloed op het stabiliserend vermogen van de peptidestabilisatoren: hogere netto lading en meer hydrofoob volume waren vereist voor lagere oppervlaktekrommingen. Peptiden met een lagere netto lading konden alleen kleinere GNPs (20 nm in diameter) stabiliseren. Een verhoogde oppervlaktelading (CV₃A₃E₃-peptide) was voldoende voor effectieve stabilisatie van 40 nm GNPs, maar niet voor grotere deeltjes (100 nm in diameter). Gethioleerde peptide-amfifielen waren in staat om GNP-groottes te stabiliseren resulterend in een hoge colloïdale stabiliteit door de vorming van zelf-geassembleerde monolagen (SAMs) op het goudoppervlak. Het oppervlakkrommingseffect werd weerspiegeld in de SAM-dichtheid: deze nam af van 3,72 tot 2,17 peptide / nm², terwijl de GNP-grootte toenam van 20 tot 100 nm in diameter. Dezelfde trend werd waargenomen voor het β-gehalte: deze nam af van 73,8% naar 41,8%. Deze SAMs bleken ondoordringbaar te zijn voor thiolen in oplossing van wege de hoge alkylketen-dichtheid. Eén variant ((mercaptoundecanoyl)₂-KV₃A₃E₄) was in staat om de colloïdale stabiliteit van alle GNPs bij hoge NaCl-concentraties te behouden. De verkregen resultaten tonen aan dat peptide-amfifiel gecoate GNPs stabiel zijn onder fysiologisch relevante omstandigheden en geschikt zijn voor biologische en biomedische toepassingen.

Hoofdstuk 4 van dit proefschrift beschrijft dezelfde gethioleerde peptide-amfifielen als stabilisatoren voor goud nanostaafjes (GNRs). GNRs worden meestal gesynthetiseerd met behulp van een andere procedure resulterend in een oppervlaktechemie die verschilt van sferische GNPs. GNRs worden doorgaans gestabiliseerd door een oppervlakreactieve dubbellaag van cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB). In dit hoofdstuk werd aangetoond dat deze dubbellaag een beperkte permeabiliteit heeft voor peptiden, terwijl de drie gethioleerde peptide-amfifielen in staat waren tot een SAM-vorming op het GNR-oppervlak. De standaard coatingprocedure voor GNPs leidde tot significante vezelvorming. Dit werd toegeschreven aan de lading van de oorspronkelijke stabilisator: negatief geladen citraat versus positief geladen CTAB. Deze lading bepaalde de elektrostatische interacties optraden met de negatief geladen gethioleerde peptide-amfifielen. Daarom werd de coatingprocedure voor GNRs geoptimaliseerd. Net als in het geval van peptide-amfifiel gecoate GNPs, waren de SAM-dekkingsdichtheden en het β -gehalte voor GNRs hoog (respectievelijk 2,62-3,87 peptide/nm² en 51-58%). Alle geteste coatings waren resistent tegen concurrerende thiolen, maar alleen (mercaptoundecanoyl)₂-KV₃A₃E₄ was in staat om de colloïdale stabiliteit te behouden bij zeer hoge NaCl-concentraties. Vanwege de bidentate binding van (mercaptoundecanoyl)₂-KV₃A₃E₄ is de dekkingsdichtheid lager in vergelijking met de andere peptide-amfifielen. Desondanks bevatte deze SAM een hoog β -gehalte.

Het gebruik van langere alkylketens (mercaptohexadecanoyl-V₃A₃E₃) zorgde echter voor een nog hogere dekkingsdichtheid en minder pakkingsgebreken. Een hoge negatieve lading en de aanwezigheid van een hydrofoob segment maken gethioleerde peptide-amfifielen superieure GNR-stabilisatoren in vergelijking met veelgebruikte PEG-coatings. SAMs gevormd door peptide-amfifielen vertonen vergelijkbare stabiliserende capaciteiten als PEG, maar de peptide-amfifiele SAMs zijn tot 8 keer korter. Deze functie is vooral

aantrekkelijk voor toepassingen van GNRs in biosensing en nanofotonica, waarbij de laagdikte de meetnauwkeurigheid beïnvloedt.



Schema 7.1. Samenvatting van peptiden en peptide-amfielen die in dit proefschrift zijn getest als stabilisatoren voor GNPs en GNRs van verschillende grootte. Pijlen geven het stabiliserend vermogen van verschillende moleculen aan met betrekking tot de grootte en vorm van het GNP. GNPs en GNRs worden op schaal weergegeven (van links naar rechts: 20 en 40 nm in diameter, 45 bij 15 nm GNR, 100 nm in diameter).

Omdat modificatie van een peptidesequentie met verschillende liganden mogelijk is, kunnen peptide-amfiel gecoate GNPs en GNRs gebruikt worden voor diverse toepassingen.

Als voorbeeld werden peptide-amfiel gecoate GNPs van verschillende groottes en GNRs uitgerust met model-epitopen (OVA₂₅₇₋₂₆₄ en OVA₃₂₃₋₃₃₉). Vervolgens werden de opgewekte immunresponsen *in vitro* en *ex vivo* bestudeerd met OT-I en OT-II muislijnen, zoals beschreven in **Hoofdstuk 5** van dit proefschrift. De gebruikte epitopen stimuleren óf cytotoxische óf helper-T-epitopen en in deze studie werd het mogelijk om de

immuunrespons op te splitsen in twee componenten en conclusies te trekken met betrekking tot de impact van de vorm en grootte van het epitooportragerdeeltje. Aangetoond werd dat peptide-amfifiel gecoate GNPs en GNRs geen cytotoxiciteit of ontstekingen veroorzaken via de IL-1 β -route. GNPs met een diameter van 15 nm induceerde geen activatie van beenmerg-afgeleide dendritische cellen (BMDCs) en wekten daardoor ook geen significante cytotoxische of helper-T-celreacties op. Hoewel bij verhoogde concentraties 15 nm GNPs een toename in helper T-celrespons vertoonden, was hun effect minimaal in vergelijking met grotere deeltjes (GNPs met een diameter van 40 nm en GNRs van 45 bij 15 nm). Verrassend genoeg vertaalde de sterke BMDC-activering door IL-12-secretie zich -voor GNP's met een diameter van 40 nm- niet in superieure cytotoxische en helper-T-celresponsen. Bovendien induceren GNRs meer antigeenproductie dan 40 nm GNPs. Dit is belangrijk omdat MHC-II is geladen met antigenen in lysosomen, waardoor GNRs een sterkere helper-T-celrespons opwekken. Er werd echter een andere trend waargenomen wanneer GNPs en GNRs werden gebruikt om een cytotoxische T-celrespons op te wekken. 40 nm GNPs wekten een aanzienlijk sterkere cytotoxische T-celrespons op dan GNRs, wat aangeeft dat de massa (of het volume) van het nanodeeltje de MHC-I-antigeenpresentatie bepaalt. Dit kan worden verklaard door het feit dat MHC-I en MHC-II verschillende routes gebruiken voor de presentatie van de verwerkte antigenen: MHC-I is geladen met epitopen die aanwezig zijn in het cytosol. Onze bevindingen wijzen uit, dat vorm en grootte van een antigeenafgiftedragers de immuunrespons beïnvloeden. Er zijn twee belangrijke conclusies: (i) er is een afmetingsdrempel waaronder de afgifte-efficiëntie daalt (~15 nm in diameter); (ii) er is een massa (of volume) drempel waaronder geen effectieve MHC-I-antigeenpresentatie mogelijk is (~40 nm in diameter). Deze bevindingen zullen naar verwachting een grote impact hebben voor de ontwikkeling van betere vaccins en zullen helpen om een

beter begrip te krijgen van de cellulaire opname, en antigentransport van lysosomen naar cytosol.

Er zijn verschillende toepassingen van peptide-amfifiel gecoate GNP/GNRs denkbaar. De dunne, maar zeer stabiele coatings zijn bijvoorbeeld geschikt voor biosensor toepassingen op het niveau van een enkel molecuul en voor doel-specifieke beeldvorming of biomarkerdetectie-assays. Bovendien kunnen deze nanodeeltjes gebruikt worden als modelsysteem om de fundamentele principes achter het gedrag en de functie van biomacromoleculen en cellen te ontrafelen.