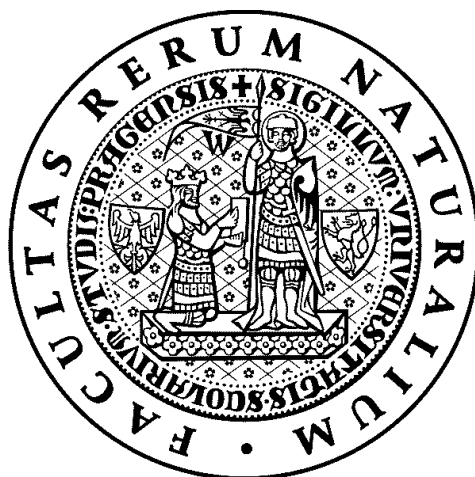


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Jitka Šlegerová

Konjugáty proteinů s nanodiamanty: příprava a charakterizace

Protein-nanodiamond conjugates: the preparation and characterization

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Jan Konvalinka CSc.

Konzultant: Petr Cígler, PhD.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.5.2011

Podpis:

Jitka Šlegerová

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi CSc. za vedení mé práce a konzultantovi Petru Cíglerovi, PhD. za všestrannou pomoc při vypracování této práce, mnoho rad a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře, především Monice Tvrdonové a Ivanu Řehořovi za vytvoření příjemné atmosféry v laboratoři, za jejich pomoc a dobré rady. Děkuji také své rodině za veškerou podporu a zázemí, které mi v průběhu studia poskytli.

Abstrakt:

Nanodiamanty patří k rozsáhlé skupině uhlíkových nanomateriálů. Mezi jejich nejvýznamnější vlastnosti patří chemická stabilita, biokompatibilita, nízká toxicita, možnost chemické modifikace povrchu a poté konjugace s různými biologickými molekulami, především proteiny. Podstatná vlastnost nanodiamantů je snadno detekovatelná stabilní fluorescence bez fotodestrukce, zvláště fluorescence z tzv. (N-V) center vzniklých vysokoenergetickým ozařováním nanodiamantů. Tyto vlastnosti umožňují uplatnění nanodiamantů jako fluorescenčních značek a sond, umožňují cílení buněk, internalizaci do buněk, přenos a kontrolované uvolňování léčiv a také imobilizaci enzymů. Biomolekuly mohou být připojeny na povrch různými způsoby – nekovalentními interakcemi nebo kovalentně. Jak již bylo dříve popsáno, nekovalentními interakcemi byly navázány na povrch nanodiamantů různé proteiny, jako lysozym, cytochrom c, neurotoxin nebo antigen. Kovalentní vazbou byly připojeny proteiny, glykoproteiny, oligonukleotidy, vitamín nebo růstový hormon. Při navázání biomolekuly je zásadní, aby si ponechala své vlastnosti, například enzym katalytickou aktivitu. Připojení biomolekul pomocí tzv. oximové ligace, tedy navázání jejich aldehydové skupiny na nanodiamant nesoucí aminoxy skupiny, představuje pro tyto účely výhodnou variantu z důvodu velké selektivity a stability vazby, efektivnosti připojení za mírných podmínek a známého způsobu připojení. V této bakalářské práci je popsána spektrofotometrická metoda kvantifikace aminoxy skupin na nanodiamantech, využívající pyridoxal 5'-fosfát. V praktické části je dále popsáno modelové navázání proteinu kovalentními i nekovalentními vazbami.

Abstract:

Nanodiamonds represent a member of vast group of carbon nanomaterials. They are characterized by chemical stability, biocompatibility, low toxicity and possibility of surface chemical modification that enables further conjugation of biomolecules, namely proteins. The most important property of nanodiamonds is easily detectable fluorescence resistant towards photobleaching. This luminescence is produced by so called (N-V) centers that can be formed by irradiation of nanodiamonds using high energy beams. Fluorescence of nanodiamonds is useful for construction of fluorescent labels and probes, cellular targeting and internalization, controlled drug delivery as well as enzyme immobilization. Two main connection modes are suitable for biomolecules' attachment: non-covalent and covalent. The first one has been utilized for decoration of nanodiamonds by various proteins, e.g. lysozyme, cytochrome c, neurotoxin or antigen. The second possibility has been demonstrated also on various proteins and, furthermore, on glycoproteins, oligonucleotides, vitamins or growth factor. During the immobilization of biomolecule on the nanoparticle surface it is crucial to keep its function, for example the catalytic activity in enzymes. For such purposes, the oxime ligation (connection of aldehyde presented on biomolecule and aminoxy group bound on nanodiamond surface) represent a convenient pathway, because of reasonable effectivity of reaction at mild conditions and well defined way of attachment. In this bachelor thesis, the spectrophotometric procedure for aminoxy group quantitation on nanodiamonds using pyridoxal-5'-phosphate was developed. The conjugation of model proteins by covalent and also by non-covalent bonds is further demonstrated.

(In czech)

OBSAH:

1. Seznam zkratek	1
2. Cíl práce	3
3. Teoretický úvod	4
3.1 Obecné vlastnosti nanodiamantů	4
3.1.1 Výroba, post-syntetické procesy a homogenizace povrchu	4
3.1.2 Biokompatibilita, cytotoxicita, vnik do buňky a lokalizace v buňce	6
3.1.2.1 Test cytotoxicity	6
3.1.2.2 Zkouška vyvolání apoptosy	6
3.1.2.3 Vnik do buňky a lokalizace nanodiamantů uvnitř	7
3.1.3. Označení pomocí nanodiamantů	8
3.1.3.1 Ramanova spektroskopie.....	9
3.1.3.2 Vlastní fluorescence nanodiamantu.....	10
3.1.3.3 Fluorescence z (N-V) center	11
3.2 Konjugace nanodiamantů s biomolekulami	12
3.2.1. Způsoby připojení molekul na povrch a jejich využití	12
3.2.2 Nekovalentní interakce mezi nanodiamantem a biomolekulou	13
3.2.2.1 Nеспецифické navázání proteinů na povrch nanodiamantu	14
3.2.2.2. Vazba lysozymu na nanodiamant.....	15
3.2.2.3 Vazba α -bungarotoxinu na nanodiamant	17
3.2.2.4 Antigen navázaný na nanodiamantu.....	19
3.2.2.5 Protilátka navázaná na nanodiamantu.....	20
3.2.2.6 Nanodiamant pokrytý poly-l-lysinem	20
3.2.3 Popsaná kovalentní připojení biomolekul na nanodiamant	21
3.2.3.1 Připojení oligonukleotidů přes vinylovou sloučeninu	22
3.2.3.2 Vazba biotinu na povrch nanodiamantu	24
3.2.3.3 Syntéza krátkého peptidu na povrchu nanodiamantu	24
3.2.3.4 Vazba cytochromu c na povrch nanodiamantu	25
3.2.3.5 Specifické vázání glykoproteinů na nanodiamanty	27
3.2.3.6 Imobilizace trypsinu na povrchu nanodiamantů.....	30
3.2.3.7 Cílení rakovinných buněk pomocí transferinu, folátu a růstového hormonu	32
3.2.4 Kovalentní připojení proteinů na nanodiamant pomocí aminoxy skupiny	33

4.	Materiál a metody	35
4.1	Chemikálie a přístroje	35
4.2	Stanovení aminoxy skupin na pevné fázi	36
4.3	Modifikace nanodiamantů a pryskyřice TentaGelu pro analytické stanovení aminoxy skupin.....	36
4.4	Odlišný způsob přípravy nanodiamantů modifikovaných aminoxy skupinami	38
4.5	Pokrývání nanodiamantů vrstvou silikagelu a následné zavedení aminoxy skupin na jejich povrch	39
4.6	Navázání proteinu holo-transferinu na nanodiamant pokrytý silikagelem a modifikovaný aminoxy skupinami	40
4.7	Navázání proteinu lidského sérového albuminu na nanodiamant pomocí elektrostatických interakcí.....	41
5.	Výsledky	42
6.	Diskuze	46
7.	Závěr	49
8.	Seznam použité literatury	50

1. SEZNAM ZKRATEK

α -BTX	α -bungarotoxin
α 7-nAChR	acetylcholinový receptor reagující na α 7-nikotinovou kyselinu
buňka A549	lidská plicní epitelální buňka
APBA	kyselina aminofenylboritá
APTS	(3-aminopropyl)trimethoxysilan
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonylová skupina
BOP	benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfát
BSA	hovězí sérový albumin
cND	karboxylované nanodiamanty
Cy3	fluorescenční barvivo Cy3
DCC	N,N'-dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DIPEA	N,N-diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	N,N-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EDC	1-ethyl-3[3-dimethylaminopropyl] karbodiimid
Fmoc	9-fluorenylmethoxykarbonylová skupina
FND	fluorescenční nanodiamanty
FND-Tf	fluorescenční nanodiamanty s navázaným proteinem transferinem
GABAFmoc	Fmoc- γ -aminobutanová kyselina
HBTU	O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium hexafluorofosfát
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethan sulfonová kyselina
HOBT	N-hydroxybenzotriazol

HRTEM	transmisní elektronový mikroskop s vysokým rozlišením
HSA	lidský sérový albumin
LAH	tetrahydridohlinitan lithný
MAP	adhezivní protein mušlí
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAHasa	N-acetyl- β -D-hexosaminidasa
ND	nanodiamanty
NH ₂ -PEG-NH ₂	diaminopolyethylenglykol
NH ₂ -TEG-NH ₂	diaminotriethylenglykol
NHS	N-hydroxysukcinimid
PBS	fosfátový pufr
PNGasa F	peptid-N4-(acetyl- β -glucosaminy)-asparagin amidasa
PNP-(GlcNAc) ₅	p-nitrofenyl penta-N-acetyl-beta-chitopentaglukosid
ROS	reaktivní molekuly obsahující kyslík
SSMCC	sulfosukcinimydyl-4-(N-maleinimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát
TFA	kyselina trifluoroctová
TfR	receptor pro transferin
THF	tetrahydrofuran
TMR	tetramethylrhodamin
TNT	2-methyl-1,3,5-trinitrobenzen

2. CÍL PRÁCE

Cílem teoretického úvodu předkládané bakalářské práce je charakterizovat nanodiamanty jako materiál a vyzdvihnout jejich vlastnosti, které jsou významné pro možné budoucí biologické aplikace. Dále má tato práce zmapovat již popsané způsoby připojení biomolekul na povrch nanodiamantů s důrazem na konjugáty proteinů s nanodiamanty. Cílem experimentální části je řešení různých způsobů modifikace povrchu nanodiamantů aminoxy skupinami, ověření jejich přítomnosti na povrchu pomocí nové metody využívající pyridoxal 5'-fosfát a navázání glykosylovaného proteinu holo-transferinu pomocí jeho aldehydové skupiny k aminoxy skupinám nanodiamantů. Dalším cílem je ověření možnosti navázání proteinu lidského sérového albuminu na povrch nanodiamantů adsorpcí pomocí nekovalentních vazeb.

3. TEORETICKÝ ÚVOD

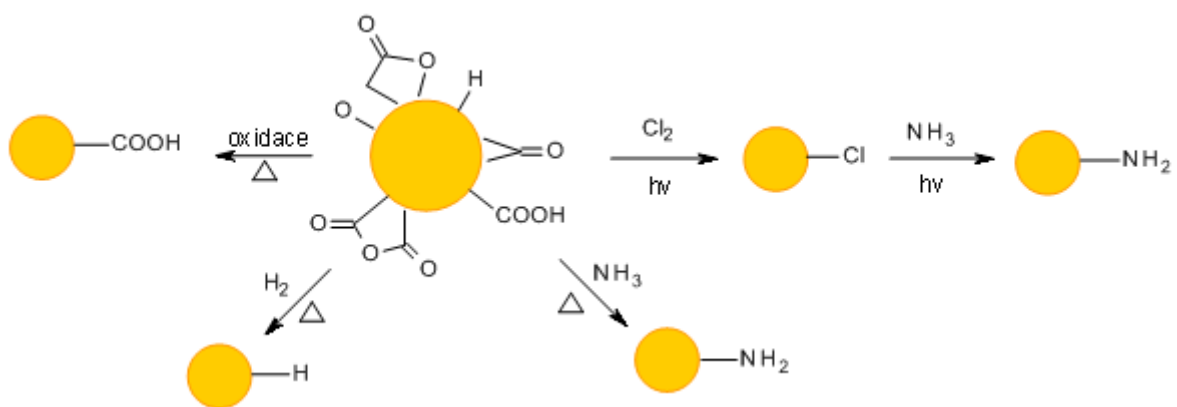
3.1 OBECNÉ VLASTNOSTI NANODIAMANTŮ

Nanodiamanty patří k rozsáhlé skupině uhlíkových nanomateriálů, ke kterým lze zařadit například grafen, uhlíkové nanotrubky, uhlíková nanovlákná, fullereny a diamantové nanofilmy. Tyto formy našly uplatnění v biotechnologiích. Nanodiamanty jsou ve skupině unikátní z důvodu svých výjimečných vlastností jako je tvrdost, elektrochemická inertnost, odolnost proti korozi, nízký koeficient tření nebo vysoká tepelná vodivost [1,2]. Další výhodou je poměrně levná syntéza ve velkém množství (1 gram za přibližně 1000 korun), která umožňuje výrobu různě velkých, řádově nanometrových částic, s úzkou distribucí [3]. K nejdůležitějším vlastnostem, kterým se tato práce bude věnovat podrobněji, patří jejich stabilita, biokompatibilita, nízká toxicita, možnost chemické modifikace povrchu a poté konjugace s různými biologickými molekulami, především proteiny. Podstatná je také dále popsána snadno detekovatelná fluorescence bez fotodestrukce pocházející buď z nečistot, tzv. vlastní fluorescence, nebo silnější fluorescence z (N-V) center (z anglického „nitrogen vacancy“) vzniklých vysokoenergetickým ozařováním nanodiamantů, které poté nazýváme fluorescenční nanodiamanty (FND) [4]. Tyto vlastnosti umožňují velmi slibné uplatnění nanodiamantů především jako fluorescenčních značek a sond, umožňují cílení buněk, internalizaci do buněk, přenos a kontrolované uvolňování léčiv a také imobilizaci enzymů.

3.1.1 VÝROBA, POST-SYNTETICKÉ PROCESY A HOMOGENIZACE POVRCHU

Vlastnosti a struktura nanodiamantů závisí na způsobu jejich přípravy. Mohou vznikat růstem za vysoké teploty a tlaku okolo zárodečného centra, rozkladem methanu v mikrovlnné plazmě nebo detonací směsi explosiv, především 2-methyl-1,3,5-trinitrobenzenu (TNT) a 1,3,5-cyklotrimethyltrinitraminu (hexogenu), v přítomnosti neoxidujícího chladícího média zabraňujícího převodu uhlíku na grafit [3]. Nanodiamanty nesou z důvodu extrémních podmínek při jejich vzniku různorodé povrchové skupiny, nejčastěji karboxylové a hydroxylové skupiny, ketoskupiny, anhydridy a laktony. Po syntéze je třeba odstranit zbytky grafitového a jiného nediamantového uhlíku a nehořlavých kovových nečistot. Aby toto bylo možné, je třeba nejprve mechanicky (rozemletím pomocí kuliček, ultrazvukem) dezintegrovat nanodiamantové agregáty [3].

Grafitický (sp^2) uhlík lze odstranit oxidací na vzduchu při vysokých teplotách 400°C , kdy nedochází k oxidaci nanodiamantového uhlíku (sp^3), a výrazně tedy stoupne poměr sp^3/sp^2 uhlíku. Zároveň dojde k oxidaci povrchových skupin [6]. Vystavení nanodiamantů silným kyselinám na druhé straně pomůže odstranit kovové nečistoty a na povrchu vytváří převážně karboxylové skupiny [7]. Nejčastěji se jako silná kyselina používá 9:1 (v:v) koncentrovaná H_2SO_4 : HNO_3 při 75°C po dobu 3 dnů, následuje reakce nanodiamantů s 0,1 M NaOH při 90°C po dobu 2 hodin a 0,1 M HCl při 90°C také po dobu 2 hodin [8]. Tyto post-syntetické modifikace jsou důležité také z hlediska toxicity materiálu, kterou každá nečistota zvyšuje. Už v průběhu úprav se na nanodiamantech pozmění povrchové skupiny. Pro další modifikace a konjugace je ovšem výhodné mít jako výchozí materiál homogenní povrch, který by obsahoval ideálně jeden druh skupin. Existuje mnoho způsobů dosažení teoreticky homogenního povrchu. Ke zlepšení čistoty a tvorby zvýšeného množství například následujících struktur: NH_2 , C-H a Cl v tomto pořadí na nanodiamantu vede reakce s různými plyny: s vodíkem a amoniakem za zvýšené teploty a chlorem při použití UV záření (obr. 1) [9].



Obr. 1 **Povrchové skupiny na nanodiamantu** - možnost jejich přeměny na jiné skupiny a snaha homogenizovat povrch.

Další možností homogenizace povrchu nanodiamantu je redukce povrchových karboxylových skupin pomocí boranu nebo tetrahydridohlinitanu lithného (LAHu) za vzniku hydroxylových skupin [10].

3.1.2 BIODROPATIBILITA, CYTOTOPICITA, VNİK DO BUŇKY A LOKALIZACE V BUŇCE

Důležitými vlastnostmi nanodiamantů pro budoucí použití například v biomedicínských aplikacích jsou biokompatibilita a nízká toxicita. Zvláště kvůli těmto vlastnostem vynikají nanodiamanty nad jinými nanočásticemi. Nanočástice jsou obecně považovány za toxické zvláště kvůli své malé velikosti, a tedy možnosti vnikat do buněk a lokalizovat se v kritických organelách. Nanočástice mohou z dýchacího ústrojí vniknout do nervů a dokonce mohou procházet hematoencefalickou bariérou [3]. Nanodiamanty po post-syntetických modifikacích (bez nečistot) nicméně na základě různých studií a zjištění za biokompatibilní a netoxické považovány jsou [1,11]. Nanodiamanty nevyvolávají zánětlivou nebo cytotoxickou odpověď, neprodukují znatelné množství reaktivních molekul obsahujících kyslík (ROS) nebo cytokinů a nepůsobí v buňkách morfologické změny. Otázkou je ovšem jejich dosud neobjasněný dlouhodobý efekt v organismu i buňkách, který by mohl být nepříznivý, a také jejich odolnost vůči degradaci [3].

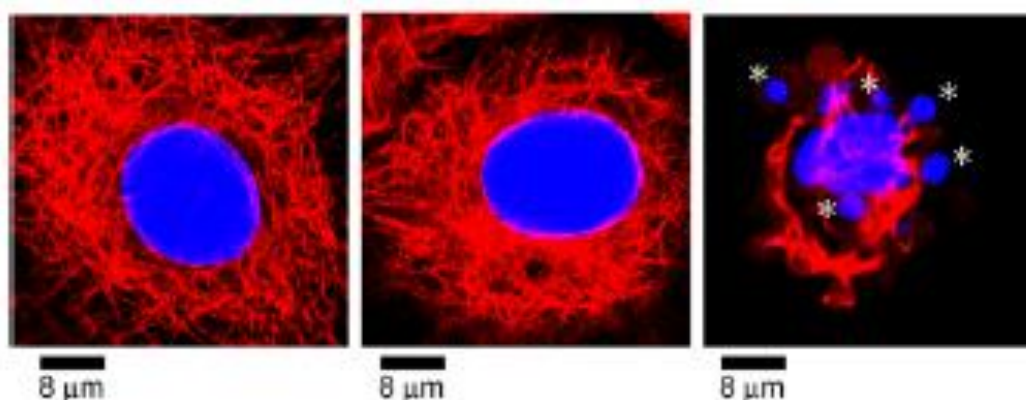
3.1.2.1 TEST CYTOTOPICITY

Jeden z testů pro potvrzení použitelnosti nanodiamantů jako sond v živých buňkách byl proveden s karboxylovanými nanodiamanty (s průměrem 5 a 100 nm) v lidských plicních epitelálních buňkách A549 [1]. Nanodiamanty vnikají do těchto buněk a akumulují se bez způsobení škod. Buňky byly po vystavení nanodiamantům inkubovány s roztokem tetrazoliové soli (MTT z anglického „3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid“), která se používá pro stanovení životnosti buněk. Živé buňky mají aktivní metabolismus, který redukuje MTT v přítomnosti dimethylsulfoxidu (DMSO) na formazan, nerozpustnou fialovou látku, kterou je možno indikovat spektrofotometricky. Po provedení experimentu bylo zjištěno, že karboxylované nanodiamanty (ani jedné velikosti) v rozsahu koncentrací 0,1-1000 µg/ml neindukovaly významně buněčnou smrt [1].

3.1.2.2 ZKOUŠKA VYVOLÁNÍ APOPTOSY

Ke zkoušce cytotoxicity byl přidán také test týkající se vyvolání apoptosy [11]. Buňky A549 byly v Petriho misce inkubovány 48 hodin se 100 nm karboxylovanými nanodiamanty o koncentraci 100 µg/ml. Jako pozitivní kontrola byly použity buňky inkubované

v přítomnosti 10 μM arsenitanu sodného, lidského karcinogenu vyvolávajícího apoptosu. Po promytí buněk fosfátovým pufrém PBS (z anglického „phosphate buffer saline“) a inkubaci po dobu 1 hodiny ve 4 % paraformaldehydu při 37°C byl cytoskelet (konkrétně mikrotubuly) obarven barvivem anti- β -tubulin-cyanin Cy3 a jádra barvivem Hoechst 33258. Zatímco arsenitan sodný, jak bylo vidět při pozorování buněk ve fluorescenčním mikroskopu (obr. 2), vyvolal v buňkách kondenzaci jader, porušení cytoskeletu a tvorbu apoptotických tělísek, buňky inkubované s nanodiamanty nebyly nijak ovlivněny [11].



Obr. 2 **Pozorování obarvených buněk (pomocí Cy3 a Hoechst 33258) fluorescenčním mikroskopem.** Vlevo je neinkubovaná buňka, uprostřed buňka inkubovaná karboxylovanými nanodiamanty, vpravo buňka inkubovaná v arsenitanu sodném. Hvězdičky označují apoptotická tělíska (převzato z [11]).

3.1.2.3 VNIK DO BUŇKY A LOKALIZACE NANODIAMANTŮ UVNITŘ

Způsob internalizace nanodiamantu do buňky byl sledován například pomocí fluorescenčního nanodiamantu s navázaným transferinem (FND-Tf) [12]. Bylo zjištěno, že takto modifikovaný nanodiamant vstupuje do buňky endocytosou pomocí receptoru (TfR). Toto důležité zjištění bylo potvrzeno pomocí přítomnosti volného transferinu. Pokud byla buňka nejprve vystavena volnému transferinu, transferinu imobilizovaného na nanodiamantu vniklo do buňky méně. Toto bylo vysvětleno právě tím, že volný i navázaný transferin vstupují do buňky stejnou cestou - pomocí receptoru. Pokud je nejprve buňka vystavena volnému transferinu, část receptorů je tím obsazena a neschopna přijmout transferin navázaný na nanodiamantu.

Experiment byl proveden s HeLa buňkami a bylo zjištěno, že mechanismus vstupu do buňky se uskutečňuje pomocí klathrinových váčků, vyžaduje energii a závisí na teplotě

[12]. Pokud je buňka inkubována při 4°C, v přítomnosti NaN₃ (který inhibuje činnost ATPsynthasy) nebo za přítomnosti sacharosy (známé tím, že narušuje tvorbu klathrinových váčků), schopnost buňky přijmout FND-Tf je výrazně omezená. Tato zjištění byla potvrzena i pro nanodiamanty bez konjugátů [13]. Endocytosa závislá na vstupu do buňky pomocí klathrinových váčků byla potvrzena i zjištěním, že po inkubaci buňky ve filipinu – látce, která znemožňuje internalizaci do buňky pomocí kalveol, se nezměnilo množství nanodiamantů buňkou přijatých [13.14].

Čím víc je k dispozici částic (transferinů navázaných na nanodiamantu), tím větší je jejich množství v buňce. Samotné fluorescenční nanodiamanty sice také podléhají tomuto trendu, jejich množství v buňce je ovšem mnohonásobně nižší. Příjem částice buňkou záleží na velikosti částice. Větší částice jsou buňkou integrovány výrazně pomaleji než menší částice. Při koncentraci částic 25 µg/ml jsou 140 nm nanodiamanty pokryté transferinem (vykazující velikost 221 nm) buňkou přijímány výrazně pomaleji (poločas je přibližně 1,26 hod) než zlaté nanočástice s velikostí 74 nm obalené transferinem (poločas vstupu do buňky je 0,75 hodin) [12]. Nanodiamanty, které nejsou konjugovány s biomolekulou reagující na specifické receptory na buňce, jsou buňkou přijímány ještě pomaleji (poločas vstupu do buňky pro 70 nm FND jsou 3 hodiny) [13]. V buňce je většina nanočástic zachycena v endosomu nebo lysosomu, kde tvoří agregáty, a nemůžou se volně pohybovat v cytoplazmě. Výjimkou jsou nejmenší částice (5-10 nm), které byly objeveny volně v cytoplazmě. Tyto malé částice buď unikly z endosomu, nebo byly do buňky internalizovány pomocí pasivního transportu přes vnější membránu. To, že malé nanodiamanty mohou předejít endosomálnímu opouzdření a vniknout do cytoplazmy, je nadějí pro transport léků k místu zásahu [14]. Důležité také je, že žádné nanodiamanty (ani ty nejmenší) nebyly pozorovány uvnitř jádra [13].

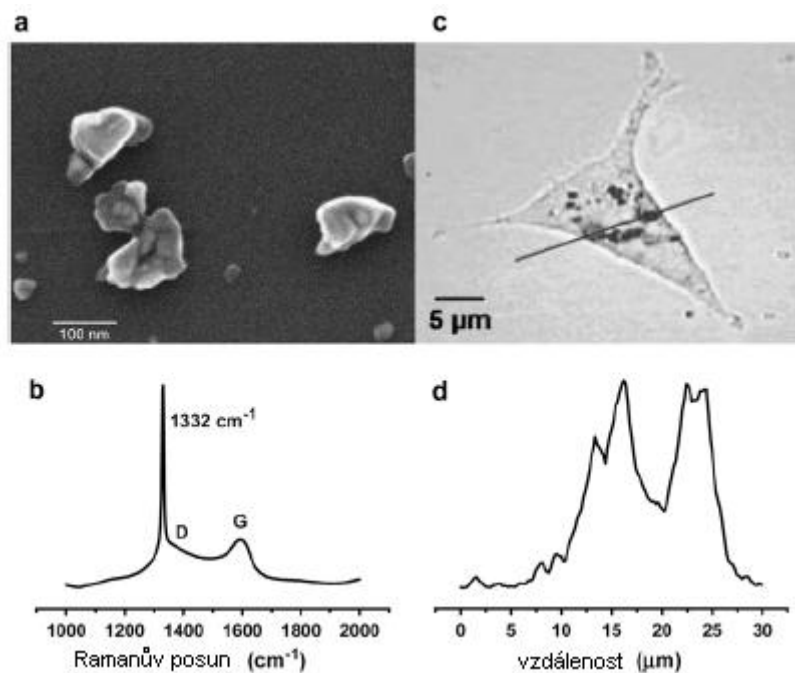
3.1.3 OZNAČENÍ POMOCÍ NANODIAMANTŮ

Nanodiamanty se mohou stát v zobrazování a sledování biomolekul nadějnými nástupci hojně využívaných nanočástic kvantových teček - polovodičů, které vykazují fluorescenční vlastnosti. Mezi výhody kvantových teček patří fluorescence bez fotodestrukce a její vysoká jasnost oproti tradičním organickým barvivům. Bohužel přítomnost těžkého kovu (většinou kadmia), který je toxický, znemožňuje použití kvantových teček pro medicínské

aplikace. Další nevýhodou je změna jejich vlastností v závislosti na modifikacích povrchu. Naproti tomu nanodiamanty jsou netoxické, biokompatibilní, jejich fluorescence nepodléhá fotodestrukci a dokonce na rozdíl od kvantových teček nedochází ani k jejímu blikání a změně po modifikacích povrchu [4]. Velikost nanodiamantů je přibližně stejná jako velikost velkých biomolekul a buněčných struktur, což také zdůvodňuje jejich používání jako sond. Vzniklý komplex nanodiamantu a biomolekuly může interagovat specificky nebo nespecificky s cílovou molekulou, čímž umožní sledování této interakce [15].

3.1.3.1 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE

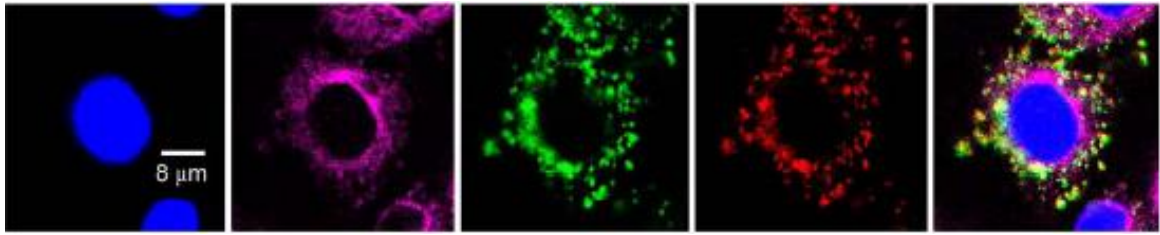
Nanodiamanty je možné označit jednotlivé buňky, které je poté možno vysledovat pomocí Ramanova rozptylu [1]. Nanodiamanty jsou v tomto případě ideální náhradou toxických kovů (například stříbra) pokrytých aktivními barvivy, které se běžně pro tyto účely používají. Nanodiamanty vykazují v Ramanově spektru snadno vystopovatelný, typicky velmi intenzivní a úzký pík při 1332 cm^{-1} , který odpovídá sp^3 uhlíkům ve struktuře. Tento pík může být také doprovázen dalšími slabými píky, které odpovídají sp^2 uhlíkům z ne zcela odstraněné grafitické vrstvy na povrchu (při 1355 cm^{-1} a 1575 cm^{-1}). Hlavní pík není ovlivněn povrchovými skupinami ani připojenými biomolekulami na nanodiamantu. Jeho intenzita je ovšem ovlivněna velikostí primární částice nanodiamantu. Čím menší částice, tím více převládá její povrch, na kterém se vyskytují grafitické uhlíky. Intenzita hlavního píku se tedy s rostoucí velikostí nanodiamantu zmenšuje. Pro nanodiamanty menší než 50 nm je srovnatelná s vedlejšími píky (pro menší nanodiamanty se tedy tato technika nepoužívá). Ramanova spektroskopie je jednou z možností sledování připojení například karboxylovaných nanodiamantů přímo na buňky A549 a také připojení karboxylovaných nanodiamantů přes napojený lysozym na bakterii *Escherichia coli*. Po oskenování vzorku laserem lze vynést intenzitu píku při 1332 cm^{-1} proti vzdálenosti na určité linii, a tedy určit, kde se na linii nalézá nanodiamant připojený na sledovaný cíl (obr. 3, str. 10). Toto sledování je neinvazivní, může být prováděno *in vivo* [1].



Obr. 3 **Sledování nanodiamantu (ND) pomocí Ramanovy spektroskopie.** (a) obrázek ze skenovacího mikroskopu 100 nm nanodiamantu, (b) Ramanovo spektrum 100 nm nanodiamantu, (c) buňka A549 s nanodiamanty, (d) vynesení distribuce intenzity proti vzdálenosti podél linie zakreslené v (c) (převzato z [1]).

3.1.3.2 VLASTNÍ FLUORESCENCE NANODIAMANTU

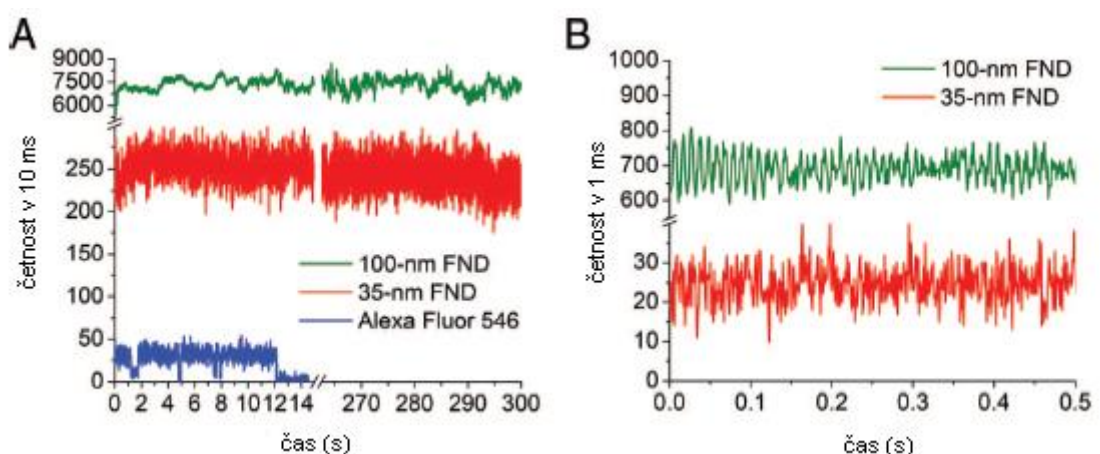
Pro sledování interakce nanodiamantů s buňkou A549 a interakce pomocí lysozymu k bakterii *Escherichia coli* byla využita také vlastní fluorescence nanodiamantu [1]. Tato fluorescence je sice oproti kvantovým tečkám řádově méně intenzivní, ale pro měření fluorescence konfokálním mikroskopem, pro průtokovou cytometrii a zjištění, kde přesně se nanodiamanty nachází, stačí. Vlastní fluorescence nanodiamantu vychází z přírodních defektů a nečistot (dusíku a kyslíku), které se ve struktuře nebo na povrchu nanodiamantu nachází. Vlastnosti fluorescence se liší v závislosti na velikosti nanodiamantových částic, a tedy počtu defektů u povrchu. K nejčastěji využívané fluorescenci karboxylovaných nanodiamantů při asi 525 nm dojde po excitaci 488 nm laserem. Konkrétní experiment (obr. 4, str. 11)) ukazuje, že je sledování pomocí barviva Cy3 možné nahradit sledováním pomocí karboxylovaných nanodiamantů, které se dostanou do cytoplazmy buňky a označí cytoskelet [1].



Obr. 4 **Buňka A549 označená různými značkami.** Zleva doprava: jádro buňky obarvené barvivem Hoechst 33258, cytoskelet buňky obarvený anti- β -tubulinem (fluorescenčně značeným Cy3), buňka interagující s karboxylovanými nanodiamanty při excitaci 488 nm laserem (fluorescence v rozsahu 500-530 nm), buňka interagující s karboxylovanými nanodiamanty při excitaci 633 nm laserem (fluorescence v rozsahu 640-720 nm), sloučení čtyř předchozích obrázků. (převzato z [1]).

3.1.3.3 FLUORESCENCE Z (N-V) CENTER

Pokud bychom chtěli zvýšit intenzitu fluorescence, bylo by třeba zvýšit počet zdrojů fluorescence – (N-V) center. Toto je možné vysokoenergetickým ozařováním nanodiamantů svazkem urychlených částic (například 40-keV He^+ paprskem) a následným žiháním ve vakuu [16]. Takto ošetřené nanodiamanty se nazývají fluorescenční nanodiamanty a obsahují mnoho (N-V) defektů uvnitř krystalové mřížky. Tyto defekty poskytují opět neblíkáající fluorescenci bez fotodestrukce (obr. 5) s velmi vysokým kvantovým výtěžkem (po osvětlení laserem skoro všechna (N-V) centra emitují záření), která umožňuje neinvazivní detekci uvnitř živé buňky jako například sledování endocytózy nebo diagnostiku rakoviny [17].



Obr. 5 **Stabilita fluorescence FND.** (A) Fluorescence 100-nm FND a 35-nm FND je stabilní, přetrvává až 300 s bez fotodestrukce. Zatímco barvivo Alexa Fluor 546 připojená k DNA podlehne fotodestrukci po pouhých 12 s. (B) Při rozlišení 1 ms nebylo zaznamenáno žádné blikání fluorescence FND. Je také vidět, že 35-nm FND vykazují asi 30 krát menší fluorescenci než větší 100-nm FND (převzato z [17]).

Vysokoenergetický paprsek vyrazí z krystalové mřížky atom uhlíku. Tak vznikne mnoho volných míst („vakancí“), které se při následném žíhání ve vakuu posouvají do blízkosti atomů dusíku (nečistot), které se v mřížce nalézají po výrobních procesech. Může vzniknout (N-V)⁰ centrum nebo nejčastěji využívané (N-V)⁻ centrum. Toto (N-V)⁻ centrum po ozáření laserem absorbuje kolem 560 nm a emituje fotony kolem 700 nm, což je oblast vlnových délek výrazně separovaná od vlastní fluorescence buněk (komponent jako jsou flaviny, nikotinamid adenin dinukleotidy, porfyriny a mnoho dalších vytvářejících signál v pozadí kolem 500 nm), tedy pro sledování výhodná. Intenzita fluorescence na rozdíl od fotostability závisí na počtu (N-V)⁻ center, tedy i velikosti nanočástice (100 nm nanodiamant může obsahovat kolem 10⁴ (N-V)⁻ center). Menší nanodiamanty budou vykazovat nižší intenzitu fluorescence (obr. 5, str. 11) [1,17].

3.2 KONJUGACE NANODIAMANTŮ S BIOMOLEKULAMI

3.2.1 ZPŮSOBY PŘIPOJENÍ MOLEKUL NA POVRCH A JEJICH VYUŽITÍ

Jak bylo řečeno, povrch nanodiamantů je stabilní a velmi výhodný pro chemické modifikace a biokonjugace. Látky se mohou připojovat na povrch různými způsoby – nekovalentními interakcemi (adsorpcí pomocí elektrostatických a jiných polárních vazeb či hydrofobních interakcí) nebo kovalentně. Navázání molekul nekovalentní vazbou je jednodušší případ než kovalentní vazbou, protože nevyžaduje přípravu speciálních spojek mezi enzymem a povrchem.

Existuje mnoho důvodů, proč je připojení molekuly na povrch žádoucí. Nejdůležitější příklady navázání biomolekul, především proteinů, na nanodiamanty jsou uvedeny na následujících stránkách. Některé příklady pouze ukazují možnost molekul se na nanodiamant navázat, ostatní příklady vyzdvihují velmi výhodná uplatnění konjugace biomolekul s nanodiamanty. Všechny příklady ale využívají možnosti navázané molekuly pomocí nanodiamantu sledovat.

Například enzymy, které jsou výhodnými specifickými biokatalyzátory za mírných podmínek, mají mnoho nevýhod jako nedostatečnou dlouhotrvající stabilitu za reagujících podmínek a náročnou obnovitelnost a znovupoužitelnost enzymu. Tyto problémy mohou být odstraněny imobilizací enzymů na nějakém povrchu, který zvyšuje jejich stabilitu, umožňuje opakované použití a snadné oddělení enzymů ze směsi a dokonce může zlepšit

jejich vlastnosti [18]. Vyjmenované výhody se uplatňují jak při nekovalentním navázání lysozymu [2,15] a neurotoxinu α -bungarotoxinu [4], tak při kovalentní vazbě trypsinu [28] na povrch nanodiamantu. Kromě enzymů se může na povrch nanodiamantu nekovalentně navázat také antigen [22]. Nanodiamant v tomto případě vystupuje jako velmi výhodné adjuvans udržující antigen (konkrétně adhezivní protein mušlí) ve stabilní konformaci, která zaručí silnou imunitní odpověď. Silná interakce mezi proteiny a nanodiamanty se uplatní v oddělování proteinů ze směsi pomocí nekovalentních vazeb [19] i glykoproteinů pomocí kovalentních vazeb [7]. Na nekovalentní interakci protilátky (navázané na nanodiamant) a bakterie je také založeno oddělování bakterií z prostředí [23]. A poslední velmi významnou možností uplatnění vazby nanodiamantu a biomolekul (transferinu [12], kyseliny listové [29] a růstového hormonu [30]) je cílení rakovinných buněk a vstup do těchto buněk pomocí receptorů. Toto uplatnění má velký význam pro následnou možnost využití nanodiamantů jako nosičů protirakovinných látek.

3.2.2 NEKOVALENTNÍ INTERAKCE MEZI NANODIAMANTEM A BIOMOLEKULOU

Pomocí adsorpce se může na velmi reaktivní povrch nanodiamantu připojit mnoho různých látek - malých (například voda) i velkých organických molekul. Záleží na povrchových modifikacích nanodiamantu, jak ochotně adsorbuje molekuly. Nanodiamanty bez povrchového náboje a hydrofilních skupin umožňujících polární interakce, například končící skupinou $-CH_3$, reagují mnohem méně ochotně než nanodiamanty s nabitými skupinami. Nanodiamanty, které mají na povrchu skupiny obsahující kyslík, mohou tvořit s molekulami vodíkové můstky [5]. V případě karboxylovaných nanodiamantů (nejčastěji využívaných modifikovaných nanodiamantů) dochází k elektrostatickým interakcím mezi záporně nabitou karboxylovou skupinou a kladně nabitou skupinou na připojované molekule. V případě nekarboxylovaných nanodiamantů se více uplatní při adsorpci povrchové defekty a nerovnosti. S nanodiamantem může interagovat také celá buňka (například buňka A549). Mechanismus interakce s buňkou není zcela zřejmý, pravděpodobně dochází k interakci záporně nabitých karboxylů na karboxylovaném nanodiamantu s pozitivně nabitými skupinami na vrchní straně buněčné membrány [1].

3.2.2.1 NESPECIFICKÉ NAVÁZÁNÍ PROTEINŮ NA POVRCH NANODIAMANTU

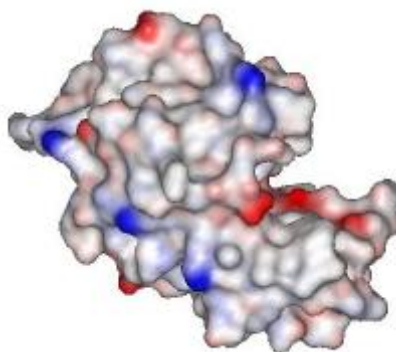
Při využití nekovalentních interakcí pro navázání molekul, především proteinů, na nanodiamanty je drobnou nevýhodou právě nespecifičnost interakce – schopnost více molekul se navázat pouze kvůli svému náboji na nanodiamant bez většího rozdílu. Tato nespecifičnost interakce se dá ovšem i využít, například v proteomice [19]. Karboxylovaný nanodiamant lze využít pro oddělení proteinů z roztoku kontaminovaného různými solemi, případně surfaktanty, které často znemožňují následné stanovení proteinů. Na záporně nabitý povrch nanodiamantu se mohou nespecificky vázat různé proteiny, které většinou bývají kladně nabitě. Tím lze docílit oddělení proteinů z roztoku a jejich prekoncentrování pro následné stanovení, například pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Toto prekoncentrování má za následek výrazné zvýšení citlivosti, navíc není nutná separace adsorbovaných proteinů z nanodiamantů, jak bylo ukázáno na roztoku cytochromu c, albuminu a myoglobinu [19]. Všechny tyto proteiny se navazují na povrch nanodiamantu nespecificky kvůli velmi silným elektrostatickým interakcím a následně oddělují z roztoku, nejlépe při pH odpovídajícím jejich izoelektrickému bodu pI. Po centrifugaci a odstranění supernatantu (tedy nenavázaných molekul) je možné nanodiamanty s navázanými proteiny rovnou bez jakékoli další úpravy smíchat s matricí pro MALDI. Z důvodu kyselého pH této matrice (obsahující například také kyselinu trifluoroctovou) vznikne repulze mezi stejnými náboji na proteinech a povrchem nanodiamantu a část proteinů se z povrchu odváže. Tyto proteiny potom mohou být s pomocí matrice ionizovány a detekovány s velkou citlivostí bez rušivých efektů [19].

Nanodiamantové částice byly použity i v případě separace rekombinantního apoobelinu (fotoproteinu) a rekombinantní luciferasy z roztoku [20]. Fotoproteiny, které emitují viditelné světlo po interakci s Ca^{2+} ionty, se vyskytují v mořských organismech láčkovcích. Tyto proteiny jsou stabilními komplexy enzymu (apoproteinu), substrátu (koelenterazinu) a molekuly kyslíku. Proteiny luciferasy, které tvoří heterodimery s flavinovým kofaktorem, se vyskytují v mořských světélkujících bakteriích. Pro tento experiment byly v bakterii *Escherichia coli* naklonovány a exprimovány geny těchto proteinů. Po rozrušení buněk (ultrazvukem v případě luciferasy a močovinou v případě apoobelinu) a centrifugaci byly k supernatantu přidány nanodiamanty, na které se luciferasa a apoobelin navázaly. Tento postup separace a purifikace je výrazně rychlejší než tradiční postupy a nevyžaduje

speciální chromatografické vybavení. Také dochází z důvodu možnosti použití pouze malého množství rozpouštědla při desorpci proteinů z nanodiamantu k výhodnému zakoncentrování proteinů. Navázání proteinů na nanodiamant je zde vysvětleno pomocí iontových a hydrofóbních interakcí [20].

3.2.2.2 VAZBA LYSOZYMU NA NANODIAMANT

Jedním z konkrétních příkladů připojení molekuly (proteinu) pomocí adsorpce je připojení lysozymu (obr. 6) na karboxylovaný 5 a 100 nm nanodiamant [15]. K 180-200 μM roztoku lysozymu ve vodě nebo PBS byl přidán roztok karboxylovaných nanodiamantů (4-10 mg/ml). Pro zajištění maximální adsorpce byl roztok 2 hodiny míchán a poté zcentrifugován. Množství naadsorbovaného lysozymu bylo zjištěno UV/VIS spektrometrií při 280 nm z rozdílu koncentrace před smícháním s nanodiamanty a po centrifugaci. Navázání lysozymu je umožněno elektrostatickými interakcemi. Karboxylové skupiny disociují a vytváří karboxylové ionty, které interagují s pozitivně nabitými NH_3^+ skupinami na lysozymu. Interakci zesilují i vodíkové můstky mezi NH_3^+ a libovolnými povrchovými skupinami obsahujícími karbonylovou skupinu. Na množství karboxylových skupin daném prostředí závisí schopnost adsorpce.



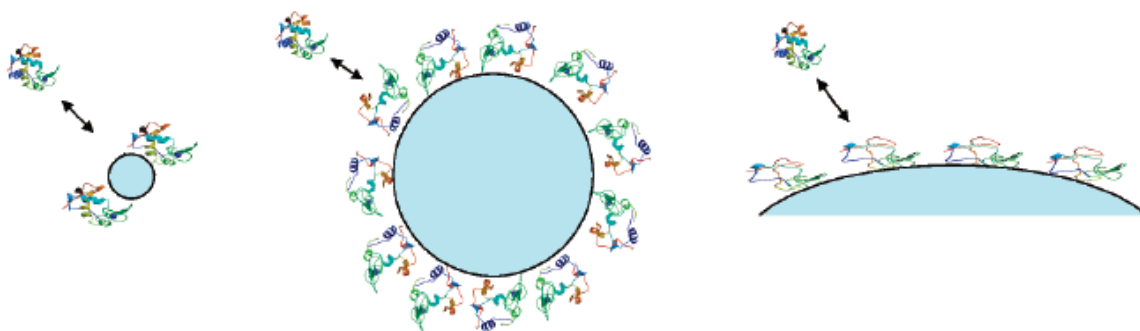
Obr. 6 **Znázornění lysozymu.** Lysozym je malá globulární bílkovina se 129 aminokyselinami, která tvoří pět helixů a tři antiparalelní β -listy. Ve struktuře má 4 disulfidické můstky. Na modelu je vidět elektrostatický potenciál povrchu, pozitivní je zobrazen modře, negativní červeně (převzato z <http://lysozyme.co.uk/>).

Lysozym se lépe absorbuje na nanodiamant v prostředí PBS o $\text{pH} = 6,5$, kde je více disociovaných karboxylových skupin, než v kyselějším prostředí deionizované vody ($\text{pH} \approx 4,5$). Na menší, 5 nm nanodiamant, se také adsorbuje lysozym lépe než na 100 nm nanodiamant, protože procento povrchových atomů klesá s rostoucí velikostí nanočástice.

Navázání lysozymu fyzikální adsorpcí bylo potvrzeno pomocí infračervené spektroskopie [15]. Také v další práci byla studována adsorpce lysozymu (konkrétně slepičího vaječného lysozymu HEWL) na nanodiamant a převážně jeho aktivita po navázání [2]. Stejně jako v předchozím experimentu zde bylo využito karboxylovaných nanodiamantů, tedy nanodiamantů vystavených silným oxidačním kyselinám. Karboxylované nanodiamanty totiž vykazují ve vodných roztocích výjimečně velkou afinitu k proteinům [19].

Jedním z důvodů pro připojení enzymu na nanodiamant je možnost následné biokatalýzy (s výhodou znovupoužitelnosti enzymu). Je ovšem důležité zjistit, jak se chová a jakou aktivitu má imobilizovaný enzym na nanodiamantu. Lysozym je enzym, který degraduje buněčné stěny mikrobiálních organismů tím, že hydrolyzuje jejich důležitou složku – cukerný peptidoglykan. Pro připojení bylo k 1 ml různých koncentrací lysozymu přidáno 10 mg nanodiamantů a směs byla 3 hodiny míchána při pokojové teplotě a poté zcentrifugována [2]. Množství navázaného lysozymu bylo opět zjištěno z rozdílu absorbancí roztoku lysozymu před navázáním a absorbancí supernatantu po centrifugaci. Obsah karboxylových skupin na povrchu nanodiamantu byl určen zpětnou konduktometrickou titrací jako 7 % z celkového počtu povrchových uhlíků. Vzhledem k tomu, že v rozmezí pH 3 až 11 je lysozym pozitivně nabitý ($pI = 11$) a povrch nanodiamantu kvůli hydrolyzovaným karboxylům záporně nabitý, bylo opět potvrzeno, že elektrostatická interakce je hlavní silou při adsorpci enzymu na nanodiamant. Kromě ní přispívají k navázání také vodíkové můstky, hydrofobní interakce a snížení entropie systému po navázání. Při $pH = pI = 11$ by pravděpodobně nanodiamant mohl být pokryt souvislou vrstvou lysozymů, které se navzájem neodpužují. Při klesajícím pH se lysozimy z důvodu stejného náboje odpuzují, a tedy adsorbují na povrch v menších množstvích. Množství proteinu, který může být naadsorbováno na povrch nanodiamantu závisí na prostoru pro tento protein, konformační změně, kterou při navázání může podstoupit, a orientaci přistupujícího proteinu k povrchu. Právě konformační změnou je možná způsobena silná interakce mezi lysozymem a nanodiamantem. Konformační změna ovšem zmenšuje hydrolytickou aktivitu enzymu po navázání. Aktivita lysozymu (ať už volného, či navázaného na ND) byla měřena kolorimetrickou metodou, která využívá jako substrát p-nitrofenyl penta-N-acetyl-beta-chitopentaglukosid (PNP-(GlcNAc)₅), který rozloží na fragmenty (PNP-GlcNAc) [2]. Tyto fragmenty jsou následně stanoveny spřaženou reakcí využívající N-acetyl- β -D-hexosaminidasu (NAHasu), která je rozštěpí na p-nitrofenolát

stanovitelný spektrofotometricky (při 405 nm). Tato reakce se provádí asi 4 hodiny ve 0,1 M fosfátovém pufru (pH = 5) a 37°C za prudkého míchání a je zastavena pomocí roztoku Na₂CO₃. Zajímavé je, že aktivita enzymu je nižší při nižším pokrytí nanodiamantu. To lze zdůvodnit tím, že lysozym má možnost využít větší prostor při navázání, dojde k rozvolnění enzymu za účelem pevnějšího navázání na povrch - k větší konformační změně, a tedy ztrátě aktivity. Tuto teorii změny sekundární struktury, především rozvolnění α -šroubovic, podporuje i experiment provedený dříve na nanočásticích silikagelu (obr. 7), na kterých lysozym vykazoval stejné zákonitosti jako na nanodiamantech v tomto experimentu. Změna proteinové struktury a s ní související změna aktivity je silně závislá na velikosti částice, na kterou je protein adsorbován [21].



Obr. 7 Schematické znázornění adsorpce lysozymu na povrch nanočástice. Adsorpce na malou částici probíhá bez změny konformace, adsorpce na největší částici probíhá s rozsáhlým rozvolněním α -šroubovic, a tedy změnou konformace (převzato z [21]).

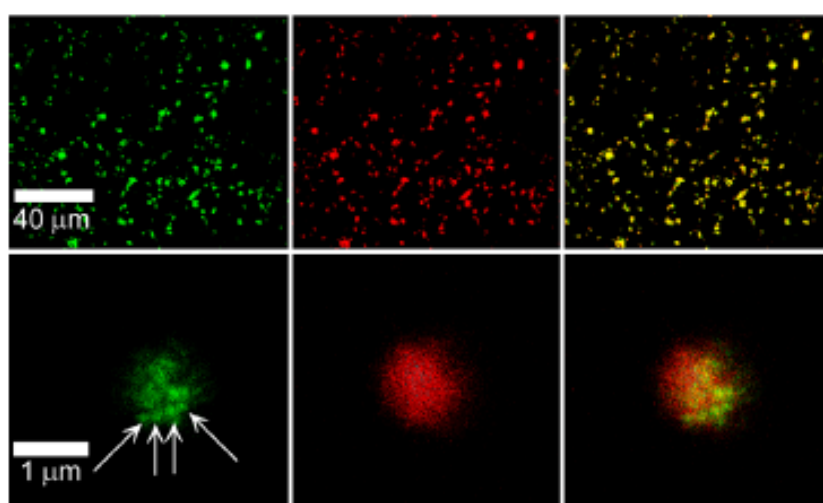
Maximální aktivity 60 % (100 % aktivity odpovídá volnému lysozymu) je dosaženo při 50 % pokrytí. Toto pokrytí je největší, kterého je možné dosáhnout při pH = 5.

Zajímavým řešením problému „rozložení se“ enzymu na povrchu je přidání jiného enzymu k povrchu nanodiamantu, konkrétně zde zvoleného cytochromu c. Cytochrom c je použit pro zablokování volných míst na povrchu nanodiamantu a způsobí zvýšení aktivity lysozymu při menším pokrytí nanodiamantu lysozymem [2].

3.2.2.3 VAZBA α -BUNGAROTOXINU NA NANODIAMANT

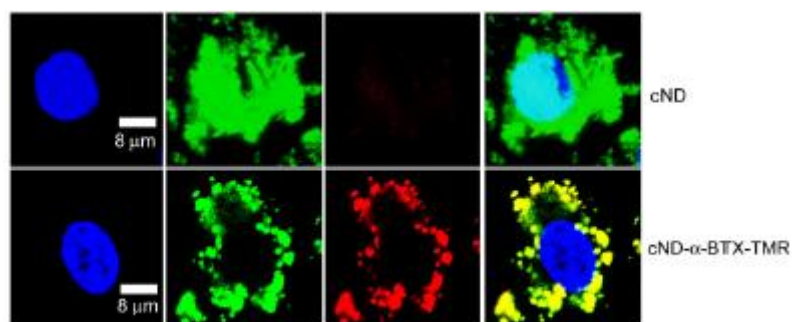
Na karboxylovaný nanodiamant se může velmi silnými nekovalentními elektrostatickými interakcemi vázat také pozitivně nabitý α -bungarotoxin (α -BTX) postupem podobným jako v předchozích případech (reakce karboxylovaných nanodiamantů cND o koncentraci

50 mg/ml s α -BTX o koncentraci 500 μ l/ml při 2 hodinovém míchání za pokojové teploty [4]. α -BTX je 74 aminokyselinový polypeptid, neurotoxin pocházející z jedovatého hada z Taiwanu druhu *Bungarus multicinctus* (česky bungar páskovaný), který specificky blokuje acetylcholinový receptor reagující také na α 7-nikotinovou kyselinu (α 7-nAChR). Receptor je exprimován i v jiných buňkách než nervových, kde reguluje mnoho fyziologických funkcí, jako například buněčné dělení. Navázání α -BTX na nanodiamant lze potvrdit konfokálním mikroskopem pomocí kombinace zelené fluorescence karboxylovaných nanodiamantů a červené fluorescence α -BTX s barvivem tetramethylrhodaminem (TMR), jejichž superpozice poskytne barvu žlutou (obr. 8).



Obr. 8 Obrázky ze skenovacího konfokálního mikroskopu komplexu cND- α -BTX-TMR. Popořadě zleva doprava je vidět zelená fluorescence při 520-530 nm pocházející z karboxylovaných nanodiamantů po excitaci 488 nm laserem; červená fluorescence barviva TMR excitovaného při 543 nm s emitovanou fluorescencí při 560-580 nm; na pravém obrázku je vidět superpozice předchozích dvou fluorescencí. Je vidět, že se cND a TMR vzhledem ke vzniku žluté barvy vyskytuje na stejných místech, tedy dochází ke konjugaci a vzniku cND- α -BTX-TMR (převzato z [4]).

To, že vazba není kovalentní lze potvrdit pomocí SDS-PAGE elektroforézy, při které komplex disociuje. Samotné karboxylované nanodiamanty vnikají do buněk. Komplex cND- α -BTX-TMR se ale váže specificky na α 7-nAChR lokalizovaný v tomto experimentu na oocytech z *Xenopus laevis* a rakovinových buňkách A549 (obr. 9, str. 19) a blokuje ho - zabraňuje toku vápenatých iontů. To dokazuje, že α -BTX navázaný na nanodiamant neztrácí svoji aktivitu [4].



Obr. 9 Detekce karboxylovaných nanodiamantů (cND) a komplexu cND- α -BTX-TMR v buňce A549 pomocí skenovací konfokální mikroskopie. Vlevo je jádro obarvené pomocí Hoechst 33258, zelená barva označuje výskyt cND a červená výskyt TMR (při stejných hodnotách vlnových délek jako na obr. 13), vpravo je ukázán překryv předchozích obrázků. Toto dokazuje, že cND vnikají do buněk, zatímco cND- α -BTX-TMR jsou lokalizovány na povrchu na α 7-nAChR (převzato z [4]).

3.2.2.4 ANTIGEN NAVÁZANÝ NA NANODIAMANTU

V dalším experimentu byl nanodiamant využit jako adjuvans pro antigen při vyvolání imunitní odpovědi u organismu [22]. Používané adjuvanty, tedy látky zvyšující imunitní odpověď, mají mnoho nevýhod - mění konformace navázaného antigenu nebo brání důležitý povrchový epitop, který je podstatný pro vyvolání imunitní odpovědi. Jako antigen byl v tomto experimentu použit adhezivní protein mušlí (MAP – z anglického „mussel adhesive protein“), který navázaný na běžně používané adjuvanty vyvolává pouze slabou imunitní odpověď. Z tohoto důvodu byl označen za bezpečný materiál pro využití v organismu, nebo například jako inhibitor koroze. Při použití modifikovaného nanodiamantu jako adjuvantu byla ale na adhezivní protein mušlí vyvolána silná imunitní odpověď. Na nanodiamant (1 mg/ml) byla v tomto případě navázána pouhým smícháním 250 mM roztok disacharidu cellobiosy. Navázání cellobiosy na nanodiamant bylo potvrzeno pomocí transmisního elektronového mikroskopu s vysokým rozlišením, kde je vidět, že vrstva cellobiosy není všude stejně široká. To je pravděpodobně způsobeno tím, že povrch nanodiamantového krystalu také není uniformní a jednotlivé části mají různou povrchovou energii (na různé plochy nanokrystalu se cellobiosa tedy adsorbuje různě).

Cellobiosa tvoří povrch, který umožňuje navázat pomocí vodíkových můstků antigen MAP, který je udržován v nenedenurovaném stavu. Takto modifikovaný nanodiamant udržuje antigen a jeho důležité povrchové skupiny přístupné. MAP je hydrofilní protein, který se skládá z opakovaných podjednotek a je atypický tím, že skoro všechny jeho aminokyseliny

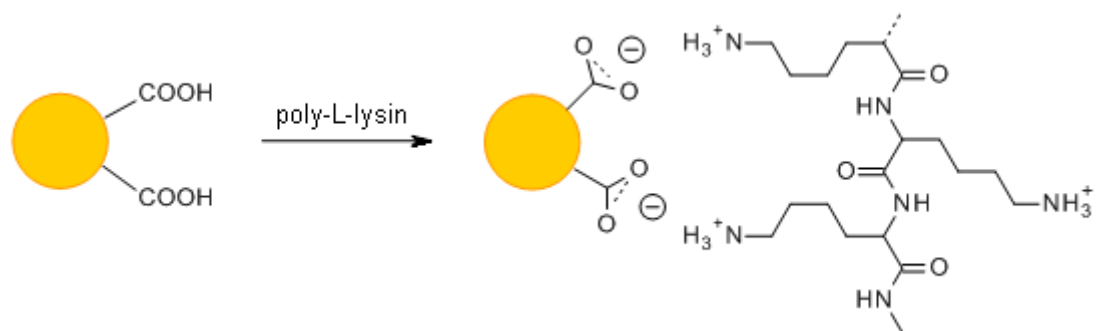
nesou hydroxylovou skupinu nebo aminoskupinu, obě jsou donory vodíkových můstků. MAP (1 mg v 2,5 ml 0,1 M octové kyseliny) byl zde navázán smícháním s 1 mg nanodiamantu modifikovaným cellobiosou v 1 ml při 4°C a za míchání. Směs byla následně dialyzována proti fosfátovému pufru. MAP na adjuvantu byl poté vpíchnut novozélandskému bílému králíkovi, který vyrobil protilátky analyzované pomocí ELISY. Ta ukázala vysokou schopnost imobilizovaného MAP vázat králičí protilátky, na rozdíl od imobilizovaného hovězího sérového albuminu, který protilátky váže nespecificky. Dle tohoto experimentu bylo možno vyvinout nový způsob purifikace MAP založený na protilátkách [22].

3.2.2.5 PROTILÁTKA NAVÁZANÁ NA NANODIAMANTU

Protilátkou pokrytý nanodiamant může sloužit jako efektivní sledovací zařízení pro přítomnost bakterií (patogenů) vyskytujících se například v jídle, které se na protilátku specificky váží [23]. Králičí protilátka byla na plasmou oxidovaný (při 400°C) nanodiamant navázána pomocí nespecifických interakcí zahrnujících nekovalentní vazby jako vodíkové můstky, hydrofobní interakce, van der Waalsovy síly nebo elektrostatické interakce. Tento komplex nanodiamantu s králičí protilátkou je dostatečně stabilní na to, aby se na něj vázaly bakterie *Salmonella typhimurium* a *Staphylococcus aureus*. Navázání protilátek bylo ověřeno pomocí ELISY a navázání bakterie pomocí skenovací elektronové mikroskopie [23].

3.2.2.6 NANODIAMANT POKRYTÝ POLY-L-LYSINEM

Často využívaný karboxylovaný nanodiamant lze modifikovat tak, aby jeho povrch byl kladně nabitý. Na záporně nabité karboxylové ionty se může elektrostatickými interakcemi a pomocí vodíkových můstků velmi silně adsorbovat poly-L-lysin (obr. 10, str. 21). Dojde tak k dekoraci povrchu nanodiamantu aminoskupinami. Naadsorbovaný poly-L-lysin zachovává svou reaktivitu a je možno na něj navázat další látky, použít tedy poly-L-lysin pouze jako spojení mezi nanodiamantem a další molekulou, která by se na nanodiamant sama nenavázala [5]. Vzhledem k tomu, že poly-L-lysinem modifikovaný povrch nanodiamantu má hodně pozitivně nabitých skupin, může se na něj opět nekovalentně elektrostatickými interakcemi vázat například molekula DNA [24].



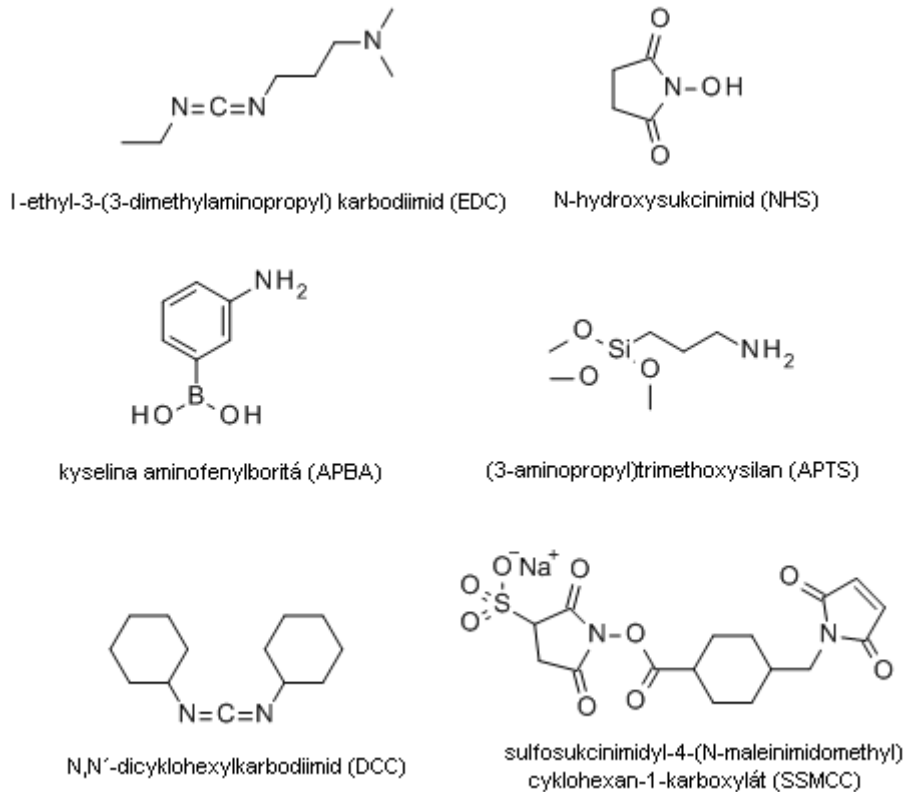
Obr. 10 Na karboxylovaný nanodiamant elektrostatickými interakcemi navázaný poly-L-lysin. Na poly-L-lysin je poté dále možno připojovat další molekuly, ať už nekovalentně nebo kovalentně.

Tvorba takovýchto stabilních komplexů může být využita k oddělování a prekoncentrování oligonukleotidů z roztoku kontaminovaného většinou kladně nabitými proteiny. Oligonukleotidy se na povrch nanodiamantu pokrytého poly-L-lysinem adsorbují lépe při nižším pH. Pro následnou charakterizaci oligonukleotidů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii je nutné oligonukleotidy od nanodiamantu oddělit, což bylo docíleno při zvýšených teplotách v roztoku hydroxidu amonného. Takováto metoda oddělování oligonukleotidů od proteinů a prekoncentrovávání oligonukleotidů pro hmotnostní spektrometrii je výhodnější než používaný systém biotin-streptavidin. Biotinylované DNA molekuly jsou odděleny z roztoku pomocí velké afinity k streptavidinu. Velkou nevýhodou této metody na rozdíl od metody využívající nanodiamanty ale je, že DNA molekuly, které nejsou biotinylované nebo jsou neznámé, z roztoku nelze oddělit [24].

3.2.3 POPSANÁ KOVALENTNÍ PŘIPOJENÍ BIOMOLEKUL NA NANODIAMANT

Kovalentní připojení znamená oproti nekovalentnímu větší specifickou, pevnost vazby i blízkost k povrchu. Je to ovšem časově náročnější proces, zahrnuje složitější přípravu spojek a připojení není vždy příliš efektivní [25]. Jako spojky (obr. 11, str. 22) jsou v dále popsaných v příkladech používány následující sloučeniny: sulfosukcinimydyl-4-(N-maleinimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát (SSMCC) použitý v případě vazby DNA a lysozymu; N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) pro připojení biotinu; (3-aminopropyl)trimethoxysilan (APTS) v případě navázání aminokyseliny a jako předstupeň pro vazbu glykoproteinů; kyselina aminofenylboritá (APBA) pro vazbu glykoproteinů. Nejčastěji používaná činidla pro aktivaci koncových skupin a následnou tvorbu amidové vazby jsou N-hydroxysukcinimid (NHS) a 1-ethyl-3[3-dimethylaminopropyl] karbodiimid

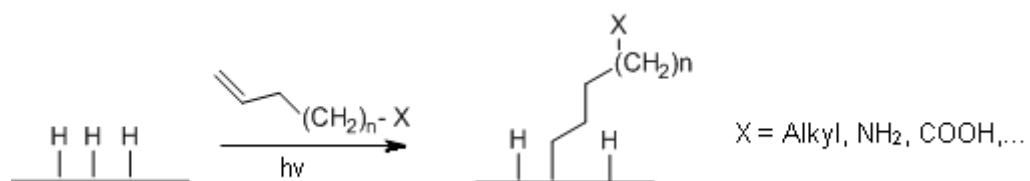
(EDC), která jsou použita ve všech zbývajících příkladech vazeb biomolekul na nanodiamanty ať v kombinaci s dříve zmíněnými spojkami (v případě lysozymu a glykoproteinů), či samotná (u transferinu, trypsinu, kyseliny listové, růstového hormonu).



Obr. 11 **Struktury spojek mezi biomolekulou a povrchem nanodiamantu využívaných pro kovalentní modifikace.**

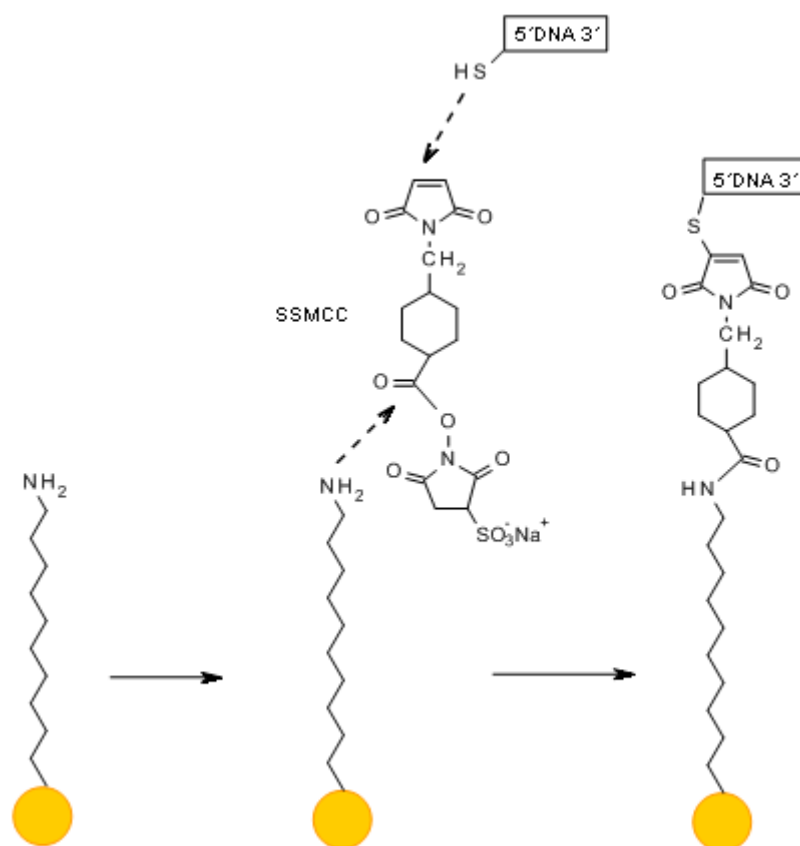
3.2.3.1 PŘIPOJENÍ OLIGONUKLEOTIDŮ PŘES VINILOVOU SLOUČENINU

Kovalentně se na povrch mohou připojit různé menší molekuly. Například nanodiamantový film mající na povrchu vodíky (-CH) za ozařování UV světlem může reagovat s vinylovými sloučeninami (obr. 12), na jejichž konci může být mnoho různých skupin (alkyly, -NH₂, COOH a další) [5].



Obr. 12 **Reakce na povrchu nanodiamantu.** Hydrogenovaný nanodiamantový film reaguje při fotochemické reakci s vinylovou sloučeninou, na jejímž konci může být mnoho různých funkčních skupin.

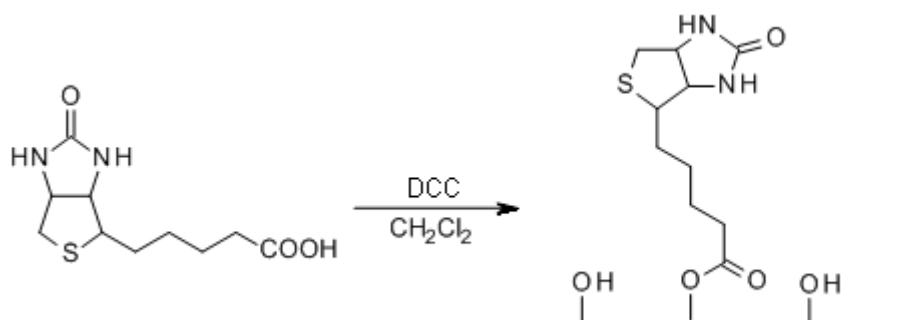
Tyto skupiny mohou být dále modifikovány. Pokud je konečnou skupinou aminoskupina, může se na ní navázat kovalentně pomocí další spojky SSMCC DNA (na 5'konci modifikovaná thiolem) (obr. 13). NHS-esterová skupina ve spojce reaguje specificky s aminoskupinou na povrchu nanodiamantu za tvorby amidové vazby. Maleinimid poté reaguje s thiolovou skupinou na oligonukleotidech DNA [26]. DNA-modifikované tenké nanodiamantové filmy vykazují oproti jiným v mikroelektronice používaným materiálům (křemík, zlato, sklo, sklovitý uhlík) výbornou chemickou stabilitu (i po několikanásobné hybridizaci a denaturaci) a především selektivitu. DNA navázaná na povrchu byla inkubována s fluorescenčně značenými komplementárními a nekomplementárními oligonukleotidy s 16 bázemi. Bylo zjištěno, že nedochází k navázání nekomplementárních úseků (obsahujících v sekvenci 4 nekomplementární báze) na DNA imobilizovanou na povrchu. Navázaný oligonukleotid tedy stále vykazuje selektivitu při párování bází [26].



Obr. 13 **Vazba DNA molekuly na povrch nanodiamantu.** Na aminoskupinu na nanodiamantu se pomocí heterobifunkční spojky (SSMCC) naváže thiolem modifikovaná DNA.

3.2.3.2 VAZBA BIOTINU NA POVRCH NANODIAMANTU

Na hydroxylovaném nanodiamantu může dojít ke kovalentnímu připojení biotinu na povrch nanodiamantu [27]. V tomto experimentu byla využita esterifikace mezi hydroxylovou skupinou na nanodiamantu a karboxylovou skupinou na biotinu (obr. 14).

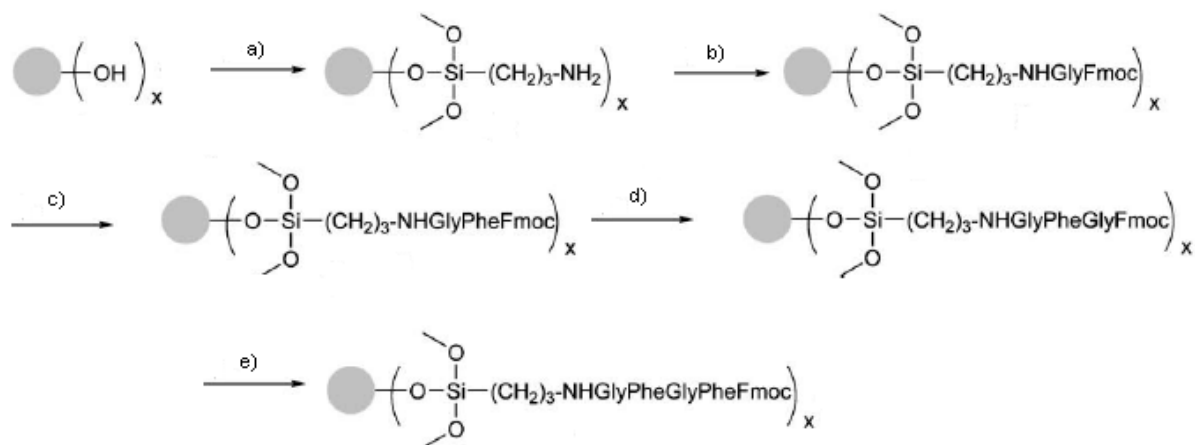


Obr. 14 Navázání biotinu esterifikací na hydroxylovaný povrch nanodiamantu.

Povrch nanodiamantu byl před vazbou s biotinem aktivován DCC. Připojení biotinu na povrch bylo ověřeno pomocí vysoce efektivního navázání fluorescenčně (fykoerythrinem) značeného streptavidinu na biotin. To bylo pozorováno pomocí fluorescenčního mikroskopu. Pro zajištění specifity interakce biotin-streptavidin byl biotinem pokrytý povrch nanodiamantu nejprve blokován hovězím sérovým albuminem (BSA) kvůli zamezení nespecifického navázání streptavidinu na povrch nanodiamantu [27].

3.2.3.3 SYNTÉZA KRÁTKÉHO PEPTIDU NA POVRCHU NANODIAMANTU

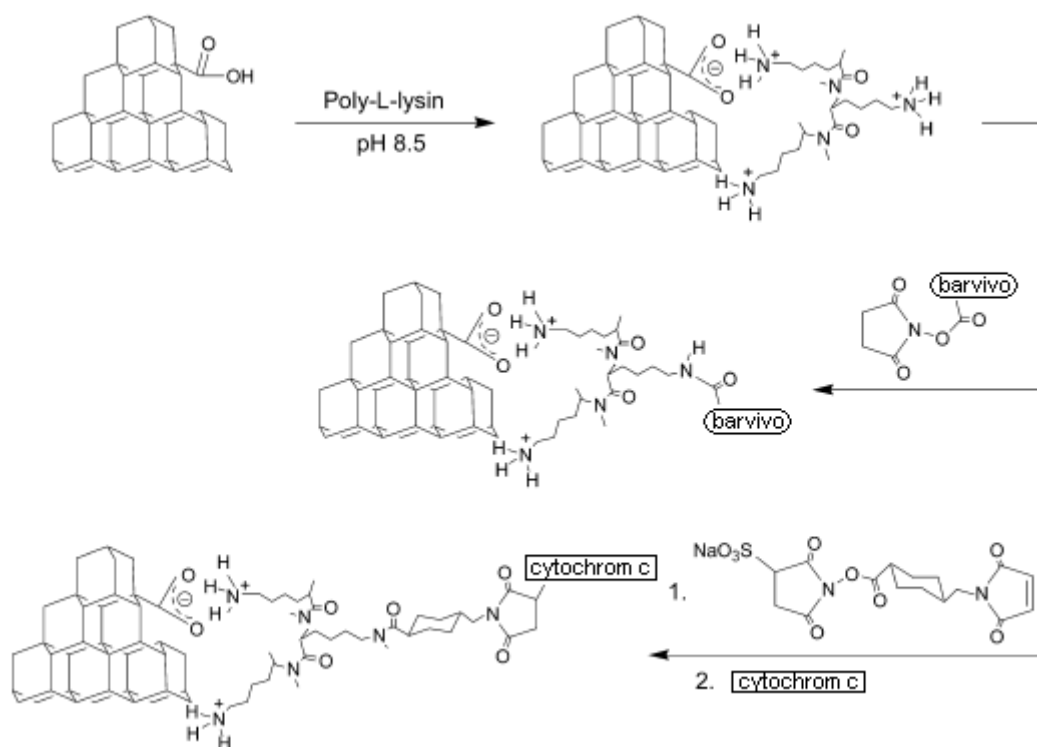
To, že na nanodiamantu lze přímo vystavět krátký peptid, bylo předvedeno v dalším experimentu [10]. Hydroxylovaný nanodiamant byl nejprve modifikován kondenzační reakcí s často používanou molekulou APTS. Na tuto molekulu se poté navázala první aminokyselina chráněná 9-fluorenylmethoxykarbonylovou (Fmoc) skupinou. Na tuto aminokyselinu ochráněnou následně pomocí piperidinu a N,N-dimethylformamid (DMF) se připojila další Fmoc-chráněná aminokyselina (obr. 15, str. 25). Reakce ovšem není stereospecifická. Aby nevznikla racemická směs, musely by se použít jiné podmínky. Důležitějším problémem je, že daným reakcím nepodléhají všechny skupiny na povrchu, dochází tedy postupně ke snižování pokrytí kýženými skupinami. Povrch nanodiamantu je ve výsledku pokryt směsí různých peptidových řetězců [10].



Obr. 15 **Výstavba krátkého peptidu na hydroxylovaném povrchu nanodiamantu modifikovaném siloxanových řetězcem.** Jednotlivé reakce zahrnují a) $(\text{MeO})_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ v acetonu, 43 hod za pokojové teploty, b) FmocGly-Cl v pyridinu a tetrahydrofuranu (THF), 19 hod za pokojové teploty, c) 1) 20% DMF-piperidin, 30 min za pokojové teploty, 2) FmocPhe-Cl v pyridinu a THF, 24 hod za pokojové teploty, d) 20% DMF-piperidin, 30 min za pokojové teploty, 2) FmocGly-Cl v pyridinu a THF, 18 hod za pokojové teploty, e) 20% DMF-piperidin, 30 min za pokojové teploty, 2) FmocPhe-Cl v pyridinu a THF, 17 hod za pokojové teploty (převzato z [10]).

3.2.3.4 VAZBA CYTOCHROMU C NA POVRCH NANODIAMANTU

Jednou z možností připojení (imobilizace) proteinu na nanodiamant je připojení cytochromu c. Připojení cytochromu c na povrch nanodiamantu bylo již jednou zmíněno v souvislosti s nescifickým oddělením různých proteinů z roztoku při využití v proteomice [19], kde je využito především elektrostatických interakcí mezi záporně nabitým povrchem nanodiamantu a kladně nabitými skupinami na cytochromu c (konkrétně 19 lysiny). Uplatní se zde také vodíkové můstky mezi NH_3^+ skupinami cytochromu c a skupinami na povrchu nanodiamantu obsahujícími CO skupinu. Cytochrom c lze ale také na nanodiamant opět modifikovaný poly-L-lysinem (obr. 10, str. 21) navázat pomocí heterobifunkční spojky, tedy kovalentně [25]. Bylo zjištěno, že ne všechny NH_3^+ skupiny poly-L-lysinu participují na interakci s nanodiamantem, což potvrdil i test. Při tomto testu se na volné aminoskupiny navázalo barvivo AlexaFluor 488, které obsahuje sukcinimidový (NHS) ester reagující pouze s primárními aminy (obr. 16, str. 26). To, že se barvivo navázalo, tedy že poly-L-lysin obsahuje volné aminoskupiny, je vidět pomocí konfokálního skenovacího fluorescenčního mikroskopu, v kterém lze pozorovat fluorescenci pocházející z barviva navázaného na částicích.



Obr. 16 Schematické znázornění povrchových kovalentních modifikací na nanodiamantu. V prvním kroku probíhá modifikace povrchu poly-L-lysinem navázaným především kvůli elektrostatickým interakcím. Volné NH_3^+ skupiny mohou reagovat se NHS esterem, který je součástí barviva. Volná aminoskupina může také reagovat s jednou částí heterobifunkční spojky, zatímco jeho druhá část reaguje s thiolovou skupinou volného cysteinu na cytochromu c (převzato z [25]).

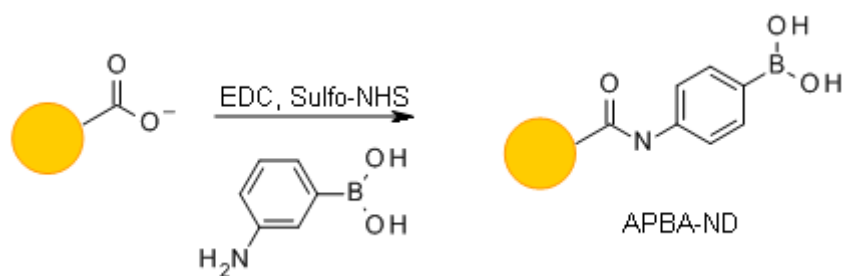
Volné NH_3^+ skupiny poly-L-lysinu tedy mohou reagovat s heterobifunkční spojkou SSCMM. Cytochrom c obsahuje volnou thiolovou skupinu na cysteinu 102, kterou je možné jej kovalentně navázat na maleinimid na heterobifunkční spojce (obr. 16). Toto spojení je pravděpodobně možné uplatnit i u jiných proteinů s thiolovou skupinou.

Nanodiamanty v tomto experimentu byly jako obvykle karboxylovány a oxidovány roztokem 9:1 (v:v) H_2SO_4 a HNO_3 při 75°C po 3 dny. 70 mg karboxylovaných nanodiamantů bylo na 30 minut smícháno s 30 mg poly-L-lysinu v 10 ml kyseliny borité při $\text{pH} = 8,5$ [25]. Nanodiamanty modifikované aminoskupinami (70 mg) reagovaly poté 1 hodinu v 10 ml PBS (při $\text{pH} = 8,5$) s 2,2 mg SSCMM. Nanodiamanty s touto spojkou po dobu 1 hodiny reagovaly s $26 \mu\text{M}$ roztokem cytochromu c pocházejícího ze *Saccharomyces cerevisiae* a poté promyty deionizovanou vodou. Takto připravené nanodiamanty s kovalentně navázaným cytochromem c byly porovnány s karboxylovanými nanodiamanty, na které byl cytochrom c navázán pouze adsorpcí. Míra navázání

cytochromu c adsorpci na povrch 100 nm nanodiamantu byla určena z rozdílu absorbancí roztoků cytochromu c před a po navázání na nanodiamant. Absorbance roztoku po nekovalentním navázání na nanodiamant byla skoro nulová, na nanodiamant se adsorboval skoro všechny cytochrom c, a to s velkou afinitou. Přesto, že metoda nekovalentní adsorpce se zdá být účinná, nanodiamanty modifikované kovalentně cytochromem c měly lepší vlastnosti. Hustota navázání cytochromu c na nanodiamant je výrazně vyšší v případě kovalentní vazby, což je vidět z hodnoty absorbance amidových pásů. Také stabilita absorbance, tedy navázaného cytochromu na povrchu, je v případě kovalentní vazby lepší. I po pěti měsících ponechání při snížené teplotě se absorbance nezměnila, což také ukazuje nanodiamant jako vhodnou částici pro imobilizaci. Pokud cytochrom c, který vykazuje absorpci při 409 nm (Soretův pás), změní svoji konformaci (denaturuje), hodnota vlnové délky absorpce se lehce posune. Například po denuraci proteinu kyselým prostředím (pH = 2) cytochrom c absorbuje při 395 nm. Po navázání na nanodiamant se ovšem vlnová délka, při které protein absorbuje, nezmění. Z toho lze usuzovat, že na povrchu nanodiamantu protein nezdenaturoval, a pokud změnil svoji konformaci, tak jen nepatrně [25].

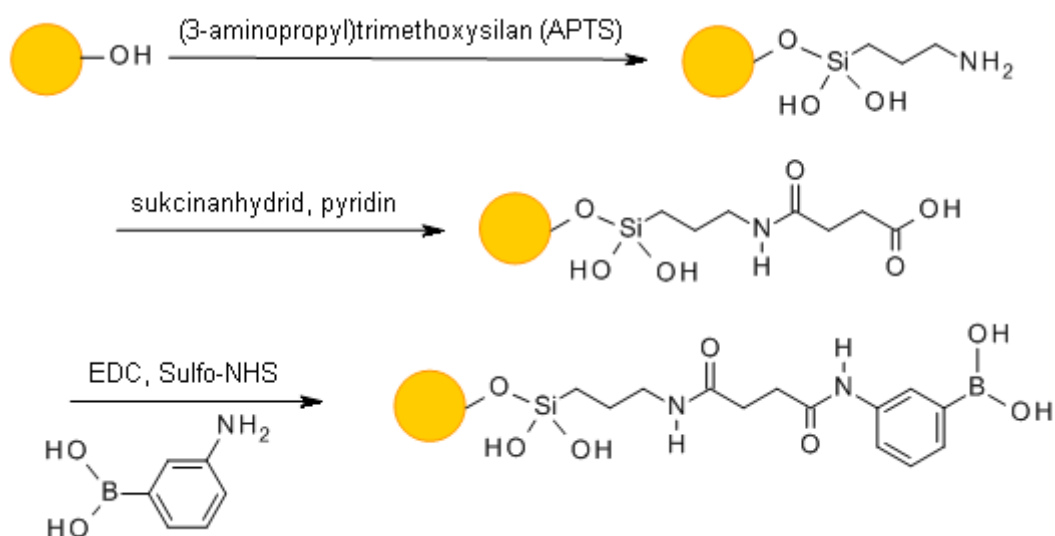
3.2.3.5 SPECIFICKÉ VÁZÁNÍ GLYKOPROTEINŮ NA NANODIAMANTY

Modifikací využití nespecifického vázání proteinů na nanodiamant je již specifitější navázání glykoproteinů na povrch nanodiamantu opět za účelem oddělení glykoproteinů ze směsi a možnosti jejich následné analýzy pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie [7]. S dioly sacharidů v bazickém prostředí reagují vysoce specificky deriváty kyseliny fenylborité za tvorby komplexů (v kyselém prostředí je možno reakci obrátit). V konkrétním experimentu byla na nanodiamant kovalentně navázána kyselina aminofenylboritá (APBA) pro specifické kovalentní zachycení glykoproteinů z roztoku tak, že 5 mg karboxylovaných nanodiamantů bylo v 1 ml dioxanu smícháno s 17 mg NHS a následně byly nanodiamanty aktivovány pomocí 30 mg EDC. Reakce probíhala za rychlého míchání 1 hodinu při pokojové teplotě. Až poté bylo přes noc a při 4°C k modifikovaným nanodiamantům přidáno 20 mg APBA (obr. 17, str. 28). Vylepšením tohoto postupu, pro ještě specifitější a účinnější zachycení glykoproteinů z roztoku, je vložení alkylového řetězce mezi nanodiamant a kyselinu boritou. Takovéto nanodiamanty byly připraveny v několika krocích.



Obr. 17 Znárodnění přípravy nanodiamantu modifikovaného kyselinou aminofenylboritou (APBA-ND) z karboxylovaných (oxidovaných) nanodiamantů.

Smícháním 0,5 g karboxylovaných nanodiamantů s 10 ml 5 % roztoku APTS v suchém toluenu za pomoci ultrazvuku, po centrifugaci a mnoha promytích acetonem vznikly nanodiamanty APTS-ND. 50 mg APTS-ND dále reagovalo s sukcinanhydridem. Na takto modifikované nanodiamanty byla navázána APBA postupem stejným jako je popsán výše (obr. 18). Na 1 g vzniklých nanodiamantů je možno z roztoku navázat až 350 mg glykoproteinů, na rozdíl od nespecifickými interakcemi navázaných 200 mg na 1 g nemodifikovaného nanodiamantu.

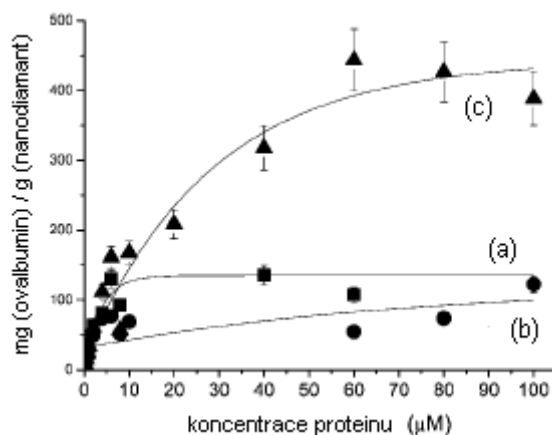


Obr. 18 Znárodnění přípravy nanodiamantu modifikovaného kyselinou aminofenylboritou na alkylovém (silanovém) řetězci z oxidovaných nanodiamantů.

Experiment byl proveden s roztokem ovalbuminu (glykoproteinu), fetuinu (glykoproteinu) a BSA (neglykosylovaného proteinu) o různých koncentracích ve fosfátovém pufru [7]. Nanodiamanty reagovaly s tímto roztokem tři hodiny za míchání následovaném centrifugací. Množství adsorbovaných proteinů bylo zjištěno z rozdílu absorbance roztoku proteinu před navázáním na nanodiamant a po centrifugaci následující po navázání

proteinů na nanodiamant. Získané nanodiamanty byly poté analyzovány také pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Míra adsorpce na různé typy nanodiamantů (karboxylovaný ND, ND-APBA, ND-alkylový řetězec-APBA) je vidět na obr. 19. Ve všech třech případech dochází při nízkých koncentracích roztoku ovalbuminu k rychlé adsorpci na povrch. Nejlépe se při pH = 9 adsorbuje ovalbumin na povrchu ND-alkylový řetězec-APBA. Nejhorší adsorpce je v případě ND-APBA. Lepší adsorpce je na karboxylovaný nanodiamant. I když při pH = 9 jsou nanodiamant i protein záporně nabitý, protein je na povrch nanodiamantu adsorbován. Na adsorpci se tedy musí podílet i jiné molekulární interakce jako vodíkové vazby a hydrofóbní interakce.



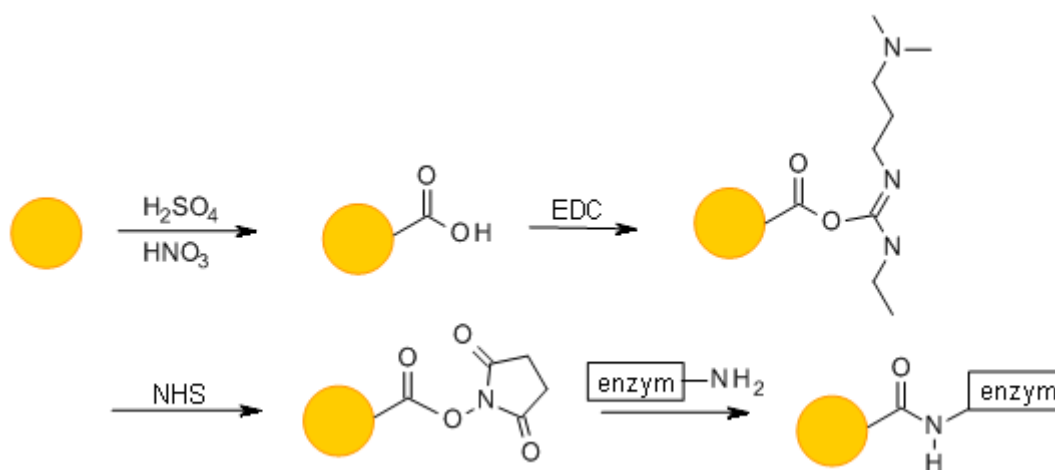
Obr. 19 **Množství ovalbuminu navázaného na nanodiamant** (a) oxidovaný, (b) s kyselinou aminofenylboritou, (c) modifikovaný kyselinou aminofenylboritou na alkylovém řetězci (převzato z [7]).

V případě adsorpce fetuinu na tyto tři typy nanodiamantů, vykazují karboxylované nanodiamanty nejnižší množství adsorpce. V každém případě je pro adsorpci glykoproteinů vždy nejúčinnější kyselina fenylboritá na alkylovém řetězci. Výsledky také potvrzují, že výrazně omezuje (ač ne úplně) nespecifickou interakci s neglykosylovanými proteiny – BSA se na takto modifikovaný nanodiamant adsorbuje výrazně méně než fetuin nebo ovalbumin. Podobné výsledky potvrzuje i hmotnostní spektrometrie, pro kterou je prekoncentrace proteinů výhodná kvůli zvýšení selektivity. Úloha alkylového řetězce je vytvořit kolem nanodiamantu obálku z příslušných funkčních skupin, poskytnout tedy navazujícím se glykoproteinům větší prostor. Takováto obálka navíc zabrání nespecifické interakci proteinů přímo na povrch (protože se zvýší vzdálenost mezi opačnými náboji na nanodiamantu a proteinech, elektrostatické interakce se proto nemohou uplatnit), a tedy

zvýší selektivitu procesu. Použití alkylového řetězce má ale také nevýhodu, snižuje kvůli své hydrofobicitě rozpustnost nanodiamantů v roztoku. Bylo by tedy vhodnější najít nějakou hydrofilní spojku, která by plnila stejnou funkci – omezovala by nespecifické interakce, ale rozpustnost nanodiamantů by nezhoršovala [7].

3.2.3.6 IMOBILIZACE TRYPSINU NA POVRCHU NANODIAMANTŮ

Jedním z příkladů kovalentní imobilizace enzymu na povrchu nanodiamantu je připojení trypsinu [28]. V mnoha pracích je popsána imobilizace enzymu na různých nosičích, jako jsou porézní kuličky, porézní silikonová matrice, různé membrány a polymery. Tyto nosiče ovšem nejsou vždy výhodné, zvláště kvůli své špatné biokompatibilitě. Navázat enzym na nanodiamant, který je biokompatibilní a netoxický a má malé částice, se ale jeví jako výhodná možnost. Enzym by mohl být na nanodiamant adsorbován nebo kovalentně navázán. Adsorpce je výhodná pro svoji jednoduchost, ale její velkou nevýhodou je možná desorpce enzymu z povrchu. Kovalentní vazba je naproti tomu výrazně stabilnější. Enzym byl kovalentně imobilizován tak, že 1 mg detonačních nanodiamantů (3-10 nm) a 7 mg NHS bylo rozpuštěno v 50 mM MES pufru (pH = 6,1) za pomoci ultrazvuku a pro aktivaci nanodiamantu bylo přidáno 8 mg EDC [28]. Směs byla inkubována za míchání a pokojové teploty po dobu 1 hodiny a poté zcentrifugována. K precipitátu byly přidány 2 mg enzymu a inkubovány při snížené teplotě 4°C za míchání 6 hodin (obr. 20).



Obr. 20 Naznačení vzniku karboxylového nanodiamantu, jeho aktivace EDC a reakce s NHS za vzniku aktivního esteru, se kterým následně reaguje enzym pomocí své aminoskupiny.

Množství imobilizovaného enzymu bylo opět zjištěno z rozdílu množství enzymu v roztoku před a po navázání a bylo vypočítáno jako navázání $223 \pm 30 \mu\text{g}$ enzymu/mg

nanodiamantu. Důležité je, že v tomto experimentu bylo ukázáno, že imobilizovaný trypsin výrazně nezměnil svoji katalytickou aktivitu, je tedy dále schopný štěpit proteiny, a to dokonce s lepší účinností než volný trypsin. Afinita enzymu k substrátu popsaná Michaelisovou konstantou (K_m) se pro imobilizovaný trypsin štěpící kasein lehce zvýšila (127,7 mg/ml oproti 67,9 mg/ml pro volný enzym). Toto může být zdůvodněno kombinací různých efektů jako je chemická modifikace imobilizovaného enzymu a blízkého okolí aktivního místa. Maximální rychlost reakce (V_{max}) se pro imobilizovaný enzym snížila (353,5 oproti 1303,8 $\mu\text{g}/\text{min}$). Obě hodnoty imobilizovaného enzymu jsou ovšem stejného řádu jako u volného enzymu. To naznačuje, že katalytická aktivita imobilizovaného enzymu nebyla navázáním výrazně zhoršena [28].

Při štěpení trypsinem v roztoku je nutné ponechávat nízké koncentrace enzymu, aby se předešlo autolýze enzymu. Z důvodu nízkých koncentrací enzymu je nutné štěpení provádět velmi dlouhou dobu, třeba i přes noc. Delší doba štěpení ale vede k nechtěným jevům jako nespecifickému štěpení, transpeptidaci, deaminaci a oxidaci. Imobilizovaný enzym však vykazuje lepší termální a chemickou stabilitu a jeho intermolekulární vazby jsou pomocí nanodiamantu stabilizovány. Kvůli těmto vlastnostem a také zjištění, že imobilizovaný enzym nepodléhá autolýze, je možno ho použít ve vyšších koncentracích a kratších inkubačních časech (například místo 12 hodin s volným enzymem inkubace pouze 5 minut s imobilizovaným enzymem). Další výhodou imobilizovaného enzymu je, že zůstává aktivním i při opakovaném použití a je snadné ho odstranit z roztoku.

Všechny výhody imobilizace enzymu na nanodiamantu je možno využít pro vysoce účinnou proteolýzu následovanou hmotnostní spektrometrií, jak bylo ukázáno na myoglobinu a hovězím sérovém albuminu použitým v experimentu [28]. Z porovnání spekter, které byly získány z hmotnostní spektrometrie po proteolýze, je možné vidět, že štěpení proteinů trypsinem imobilizovaným po dobu 5 minut je srovnatelná nebo dokonce účinnější než štěpení proteinů trypsinem v roztoku po dobu 12 hodin. Obě tyto inkubace proteinů s trypsinem jsou také výrazně účinnější než 5 minutová štěpení proteinů trypsinem imobilizovaným na porézních kuličkách. Na nanodiamanty byl také kovalentně navázán enzym peptid-N4-(acetyl- β -glucosaminy)-asparagin amidasa (PNGasa F), který odstraňuje N-glykany z glykoproteinů. PNGasa F navázaná na nanodiamant odštěpila za 10 min v podstatě veškeré glykosylace proteinu fetuinu, na

rozdíl od volné PNGasy F, která za 6 hodin inkubace protein jen částečně deglykosylovala. Imobilizovaný enzym tedy opět dosáhl lepších vlastností než enzym volný [28].

3.2.3.7 CÍLENÍ RAKOVINNÝCH BUNĚK POMOCÍ TRANSFERINU, FOLÁTU A RŮSTOVÉHO HORMONU

Li a Zhou, jejichž experiment byl již jednou zmíněn v souvislosti se zkoumáním internalizace modifikovaných nanodiamantů do buněk, rozpustili oxidované karboxylované fluorescenční nanodiamanty (3,5 mg) v 1 ml PBS (pH = 7,4) a přidali k nim 7 mg EDC pro aktivaci povrchových karboxylových skupin a poté 2 mg transferinu [12]. Množství navázaného transferinu určili z rozdílu koncentrace transferinu v roztoku před a po navázání. Transferin kovalentně navázaný na fluorescenční nanodiamant (140 nm) může cílit rakovinné buňky pomocí specifického receptoru (TfR), který je ve větší míře exprimován na povrchu různých rakovinných buněk. Toto cílení rakovinných buněk a vnik dovnitř může následně sloužit pro přenos léků a terapeutických genů [12].

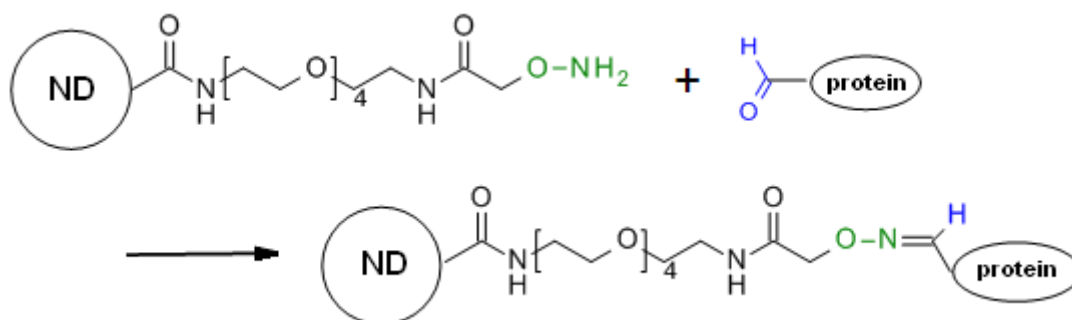
Ve větší míře je na rakovinových buňkách exprimován také receptor pro kyselinu listovou, proto další možnost v cílení rakovinových buněk je připojit na nanodiamant kyselinu listovou [29]. Kyselina listová má vysokou afinitu pro své receptory, kterými je i s nanodiamantem přijímána. Proto i zde platí obecné pravidlo, že pokud je buňka inkubována také v prostředí samotné kyseliny listové, nanodiamantů je do buňky přijato z důvodu obsazení některých receptorů méně. Na rozdíl od oxidovaných nanodiamantů bez další konjugace nebo nanodiamantů s navázaným transferinem, které vstupují do buňky pomocí klathrinových váčků, nanodiamanty konjugované s kyselinou listovou vstupují do buňky endocytosou pomocí kaveol. Před připojením kyseliny listové byl na oxidovaný nanodiamant aktivovaný pomocí NHS a EDC připojen diaminovaný polyethylenglykol (NH₂-PEG-NH₂). Na vzniklý FND-PEG-NH₂ byla poté přes terminální amin navázána kyselina listová (nejprve aktivována stejně jako předtím nanodiamant) [29].

Kovalentní připojení růstového hormonu na nanodiamant může pomoci v cílení, a tedy identifikaci a lokalizaci rakovinných buněk v brzkém stádiu, na kterých je ve zvýšené míře exprimován i receptor pro růstový hormon [30]. Po kovalentním připojení rekombinantního rybího růstového hormonu (obdobu lidského růstového hormonu) na karboxylovaný nanodiamant, byla pomocí Ramanova rozptylu studována interakce

modifikovaného nanodiamantu s buňkou A549. Kovalentní amidová vazba mezi nanodiamantem a růstovým hormonem je umožněna pomocí EDC a NHS. Samotné karboxylované nanodiamanty vnikly do buňky A549, zatímco komplex nanodiamantu s růstovým hormonem zůstal na povrchu buňky, kde reagoval s receptorem.

3.2.4 KOVALENTNÍ PŘIPOJENÍ PROTEINŮ NA NANODIAMANT POMOCÍ AMINOXY SKUPINY

Ve všech výše popsáných případech kovalentních připojení biomolekul na nanodiamant pomocí různých spojek si navázané biomolekuly ponechávají své vlastnosti. Například imobilizovaný trypsin na nanodiamantu výrazně nemění svoji katalytickou aktivitu a vyznačuje se navíc mnohými jinými vlastnostmi spojenými s imobilizací jako větší stabilitou a možností kratší doby štěpení proteinů [28]. Zamezení ztráty vlastností biomolekul, především u proteinů, je při připojení na nanodiamant zásadní. Připojení pomocí aminoxy skupiny na nanodiamantu a aldehydové skupiny na glykosylované biomolekule (obr. 21) by mohlo být dobrým řešením hned z několika důvodů.

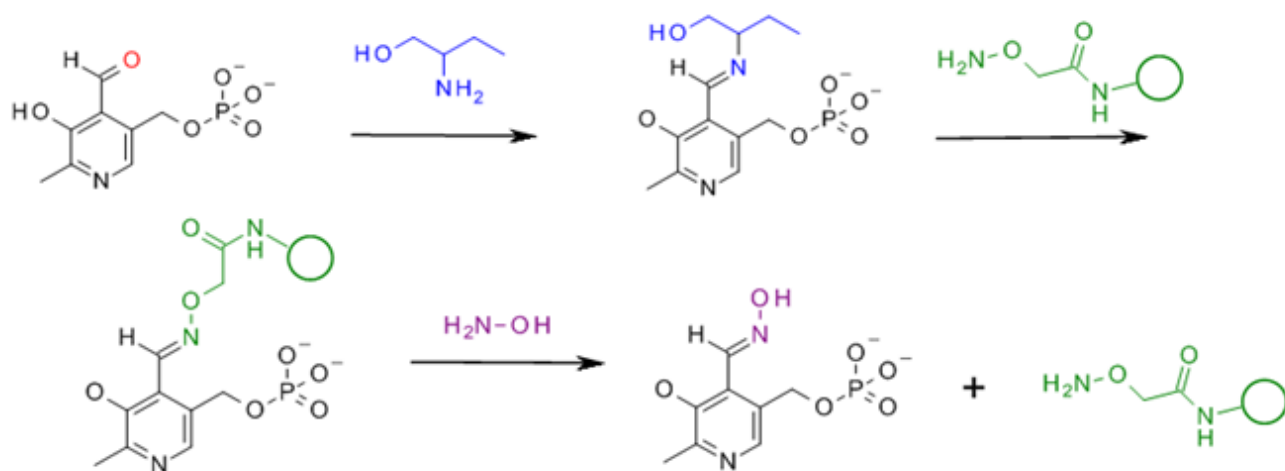


Obr. 21 Připojení proteinu aldehydovou skupinou na aminoxy skupinu nanodiamantu.

Nejčastěji používané činidlo k připojování NHS může reagovat se všemi stericky přístupnými aminoskupinami lysinu, které se na proteinu vyskytují. Protein se může navázat na nanodiamant i pomocí více aminoskupin zároveň, což je velká nevýhoda tohoto způsobu připojení. Vazba pomocí aminoxy skupiny je na druhou stranu velmi selektivní. Aldehydová skupina se buď vyskytuje ve struktuře glykosylovaného proteinu při otevírání koncového cyklického monosacharidu, nebo ji lze připravit štěpením 1,2-diolu v sacharidu (obr. 28, str. 40) [31]. Glykosylovaný protein holotransferin má po štěpení 1,2-diolu například pouze jednu aldehydovou skupinu, která zaručuje, že se protein na nanodiamant naváže jedním známým, přesně definovaným a výhodným

způsobem umožňující vystavení proteinu do prostoru. Známa efektivnost připojení, stabilita vazby a také velmi mírné podmínky vzniku vazby bez nutnosti použití činidel při fyziologickém pH jsou dalšími výhodami [32,33].

V případě připojování biomolekul na nanodiamanty pomocí aminoxy skupiny je vhodné znát množství aminoxy skupin na povrchu nanodiamantu. Metoda kvantifikace aminoxy skupiny na pevné fázi ovšem nebyla, na rozdíl od kvantifikace v roztoku, dosud popsána. Pokusili jsme se proto modifikovat metodu v roztoku využívající pyridoxal 5'-fosfát [34] pro použití na nanočásticích nebo pevné fázi (obr. 22).



Obr. 22 **Schéma reakce analytické kvantifikace pomocí pyridoxal 5'-fosfátu.** Pyridoxal 5'-fosfát reaguje s 2-aminobutan-1-olem za vzniku Schiffovy báze a poté s aminoxy skupinami modifikovaných nanodiamantů za vzniku aldoximu. Tento aldoxim je reakcí s hydroxylaminem uvolněn z nanočástic nebo pevné fáze a vzniklý produkt stanoven spektrofotometricky.

Pyridoxal 5'-fosfát nejprve tvoří se 2-aminobutan-1-olem Schiffovu bázi. Nadbytek 2-aminobutan-1-olu zajišťuje selektivitu reakce s aminoxy skupinami oproti aminoskupinám, které by mohly být přítomné na povrchu. Schiffova báze reaguje s aminoxy skupinou na nanočásticích nebo pevné fázi za tvorby aldoximu. Po separaci z roztoku je aldoxim rozštěpen hydroxylaminem a nově vzniklý aldoxim stanoven spektrofotometricky při 330 nm. Hydroxylamin, kterého je v reakci opět velký nadbytek, je v zásaditém pH kolem 12 velmi silný nukleofil [34]. Jeho reakce s pyridoxal 5'-fosfátem je o mnoho řádů rychlejší než reakce pyridoxal 5'-fosfátu s O-alkyl aminoxy sloučeninami vázanými navíc na povrch pevné fáze, která zhoršuje možnost přístupu reagujících skupin k sobě.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

Pyridoxal 5'-fosfát, 2-aminobutan-1-ol, kyselina citronová, hydroxylamin hydrochlorid, N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC), N-hydroxysukcinimid (NHS), Boc-aminooxy octová kyselina, pryskyřice TentaGel, O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium hexafluorofosfát (HBTU), N,N-diisopropylethylamin (DIPEA), 4-dimethylaminopyridin (DMAP), piperidin, L-askorbát sodný (+), hydrazin hydrát, Igepal CO 890, poly(vinylpyrrolidon) 10000, tetraethyl-orthosilikát, (3-aminopropyl)triethoxysilan, benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino) fosfonium hexafluorofosfát (BOP), threo-1,4-dimerkapto-2,3-butandiol, 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethan sulfonová kyselina (HEPES), poly(vinylalkohol) 13000-23000, N,N-dimethylformamid (DMF), jodistan sodný, lidský holo-transferin a lidský sérový albumin zbavený mastných kyselin (HSA) byly získány od Sigma Aldrich (Schneidorf, Německo). Fmoc-aminooxy octová kyselina od PolyPeptide Group (Štrasburk, Francie), N-hydroxybenzotriazol (HOBT) od Iris Biotech (Marktredwitz, Německo), vstupní nanodiamanty od MicroDiamant (Lengwil, Švýcarsko). 1Im2Py, diaminotriethylenglykol (NH₂-TEG-NH₂) a Fmoc-γ-aminobutanová kyselina byly k dispozici v laboratoři.

Jako rozpouštědla byly využity v HPLC kvalitě od Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) dimethylsulfoxid, dichlormethan (DCM), dioxan a methanol. Ethanol pro UV spektroskopii byl od firmy Penta (Praha, Česká republika). Dále byly použity v chemické laboratoři běžně dostupné chemikálie.

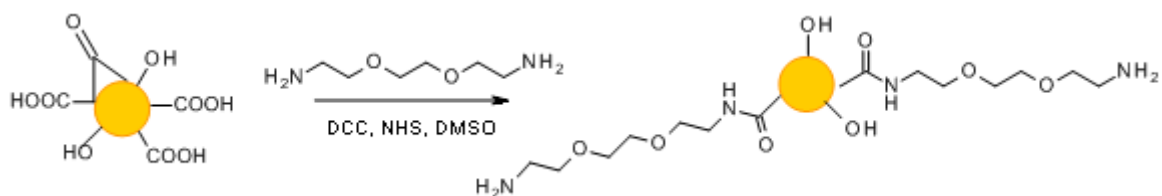
Použité přístroje: ultrazvukový homogenizátor UP200S od firmy Hielscher (Teltow, Německo), ultracentrifuga model Hermle Z36HK (Wehingen, Německo) a Eppendorf 5430 (Hamburg, Německo), sonikační lázeň Elmasonic P 60 H (Singen, Německo), pH metr Jenway 3505 (Stone, Velká Británie), přístroj na měření rozptylu ZetaSizer Nano ZS (Worcestershire, Velká Británie) a spektrofotometr Specord 210 analytic jena (Jena, Německo).

4.2 STANOVENÍ AMINOXY SKUPIN NA PEVNÉ FÁZI

Pyridoxal 5'-fosfát (finální koncentrace 4 mM) byl rozpuštěn v pufru A (80 mM 2-aminobutan-1-ol, 0,1 M kyselina citronová, pH = 5,5 upraveno pomocí NaOH) a vznikající Schiffova báze byla ponechána se 15 minut tvořit. 1 ml tohoto roztoku byl přidán vždy ke 2 mg pevné fáze (nanodiamantům nebo pryskyřici TentaGelu - zesíťovanému polyethylenglykolu). Vzorky obsahující nanodiamanty byly sonikovány na ultrazvukovém homogenizátoru po dobu 2 min, vzorky obsahující nanodiamanty modifikované silikagelem byly sonikovány v sonikační lázni po dobu 2 min. Směs byla 1 hodinu za laboratorní teploty míchána a poté byly vzorky třikrát promyty vodou. K promyté pevné fázi byl přidán pufr B (150 mM hydroxylamin, 1 M NaOH), aby s ní 15 minut reagoval (obr. 22, str. 34). Vzorky obsahující nanodiamanty byly před reakcí sonikovány. Po centrifugaci (5 min, 30 000 x g) byla změřena absorbance supernatantu od 260 do 420 nm.

4.3 MODIFIKACE NANODIAMANTŮ A PRYSKYŘICE TENTAGELU PRO ANALYTICKÉ STANOVENÍ AMINOXY SKUPIN

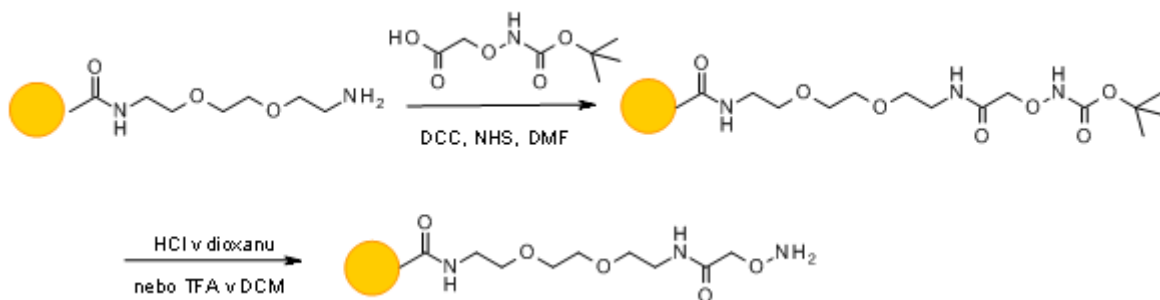
100 mg karboxylovaných nanodiamantů (upravených klasickou oxidační metodou - 3 denní reakce při 75°C se směsí H₂SO₄ : HNO₃ (9:1) následovaná reakcí s 0,1 M NaOH po dobu 2 hodin při 90°C a 0,1 M HCl opět po dobu 2 hodin při 90°C [8]) bylo rozpuštěno v 12 ml DMSO a smícháno s 200 mg DCC a 200 mg NHS. Po 30 minutách byl přidán diaminotriethylenglykol (NH₂-TEG-NH₂) a směs reagovala 1 den při laboratorní teplotě. Nanodiamanty byly následně promyty směsí DMSO : dichlormethan (DCM) (1:1) a sušeny na vzduchu. Touto procedurou vznikly nanodiamanty, které byly modifikovány aminoskupinami (obr. 23).



Obr. 23 **Reakce karboxylovaných nanodiamantů s diaminotriethylenglykolem** v přítomnosti DCC, NHS a DMSO za vzniku nanodiamantů modifikovaných aminoskupinami na koncích řetězců.

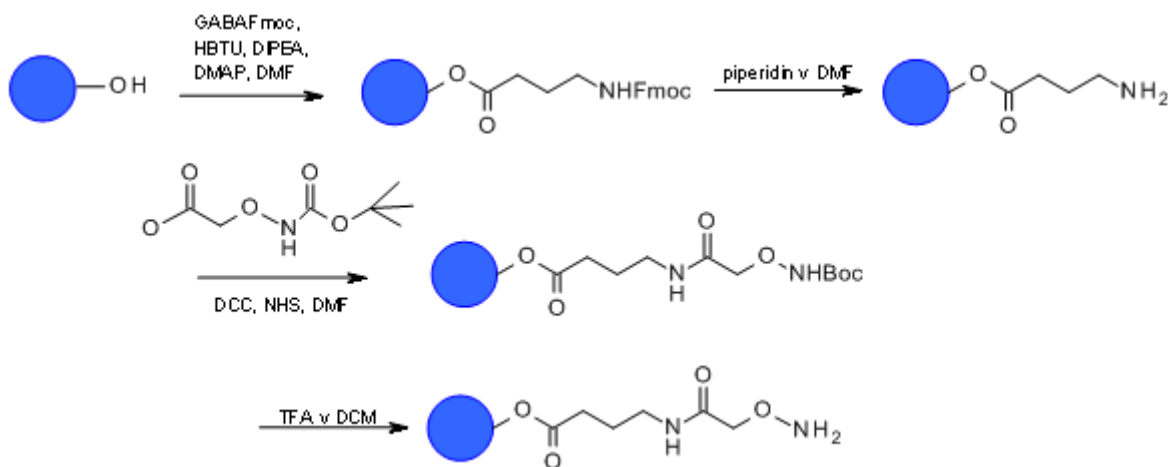
90 mg těchto nanodiamantů bylo dále modifikováno (obr. 24, str. 37) na aminoxy skupiny chráněné *tert*-butyloxykarbonylovou skupinou (Boc). 230 mg Boc-aminoxy

octové kyseliny, 560 mg NHS a 1 g DCC v 30 ml DMF reagovalo po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě a bylo přidáno k nanodiamantům ukončeným aminoskupinou, s kterými směs reagovala 2 hodiny za laboratorní teploty. Nanodiamanty byly následně třikrát promyty DMF, třikrát DCM a sušeny na vzduchu. Odchránění aminoxy skupiny bylo provedeno dvěma způsoby – dvouhodinovou reakcí za pokojové teploty s 10 ml 4 M HCl v dioxanu a 5 ml 20% kyseliny trifluoroctové (TFA) v DCM.



Obr. 24 Přeměna nanodiamantů terminovaných aminoskupinou na nanodiamanty ukončené aminoxy skupinou.

Pro povrchovou modifikaci 1 g pryskyřice TentaGelu (obr. 25), která má na svém povrchu hydroxylovou skupinu (s pokrytím přibližně 0,26 mmol/g), bylo použito 423 mg Fmoc- γ -aminobutanové kyseliny (GABAFmoc), 493 mg O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorofosfátu (HBTU), 0,45 ml N,N-diisopropylethylaminu (DIPEA), 3,2 mg 4-dimethylaminopyridinu (DMAP) v 10 ml DMF. Reakce probíhala po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Pryskyřice byla poté promyta v DMF, DCM, methanolu a opět DCM.

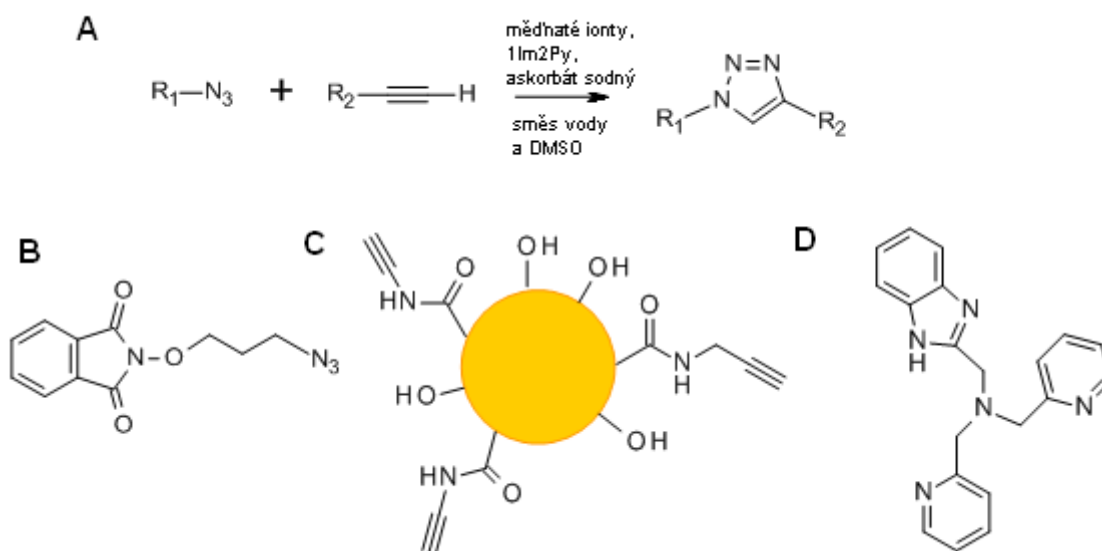


Obr. 25 Modifikace hydroxylových skupin TentaGelu přes aminoskupiny na aminoxy skupiny.

Odchránění aminoskupiny bylo uskutečněno pomocí 15 ml 20% piperidinu v suchém DMF během 30 minut za laboratorní teploty. Pryskyřice byla opět promyta v DMF, DCM, methanolu a DCM. K 1 g této pryskyřice byla přidána směs vzniklá během 1 hodiny za laboratorní teploty ze 497 mg Boc-aminooxy octové kyseliny, 1,197 g NHS a 2,683 g DCC v 15 ml DMF. Po reakci při laboratorní teplotě trvající 2 hodiny byla pryskyřice opět promyta DMF, DCM, methanolem a DCM. Odchránění aminooxy skupiny bylo provedeno pomocí 10 ml 20% TFA v DCM. Pryskyřice byla konečně promyta v DCM, methanolu a DCM. S takto vzniklými nanodiamanty a TentaGelem bylo provedeno stanovení aminooxy skupin na pevné fázi dle dříve popsaného postupu.

4.4 ODLIŠNÝ ZPŮSOB PŘÍPRAVY NANODIAMANTŮ MODIFIKOVANÝCH AMINOOXY SKUPINAMI

54 mg alkynylovaných nanodiamantů bylo sonikováno na ultrazvukovém homogenizátoru v 0,6 ml DMSO. Mezitím bylo smícháno 120 μ l vody, 3 μ l 100 mM CuSO_4 a 15 μ l 20 mM ligandu 1Im2Py [35]. K nanodiamantům v DMSO bylo přidáno 250 μ l 100 mM 2-(3-azidopropoxy) ftalimidu, 46 μ l předpřipravené směsi CuSO_4 a 1Im2Py a 50 μ l 100 mM askorbátu sodného (obr. 26).



Obr. 26 **Reakce alkynylovaných nanodiamantů s 2-(3-azidopropoxy) ftalidem.** A naznačuje průběh této reakce, B je vzorec 2-(3-azidopropoxy) ftalimidu, C znázorňuje alkynylované nanodiamanty a D ligand 1Im2Py (obsahující ve struktuře benzimidazol a 2 pyridiny).

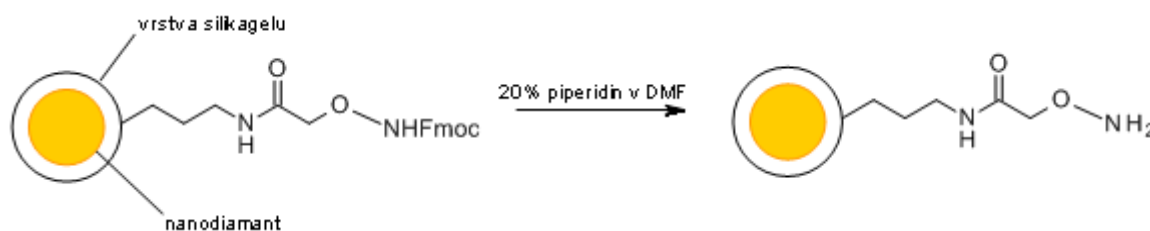
Směs byla protřepána, 12 hodin inkubována bez přístupu vzduchu a poté dvakrát promyta směsí DMSO:DCM (1:1) a třikrát vodou. Nanodiamanty byly poté sonikovány na ultrazvukovém homogenizátoru v 1 ml vody (koncentrace přibližně 50 mg/ml). Odchránění bylo provedeno dvěma způsoby. V prvním případě bylo k 100 µl směsi (ekvivalentu 5 mg nanodiamantů) přidáno 100 µl methanolu a 100 µl hydrazin hydrátu. V druhém případě bylo k 100 µl směsi přidáno 40 µl vody, 60 µl detergentu Igepalu CO 890 (s finální koncentrací 20 mM) a 100 µl hydrazin hydrátu. Směs byla v obou případech sonikována na ultrazvukovém homogenizátoru, inkubována 2 hodiny při 60 °C a promyta třikrát vodou. S takto vzniklými nanodiamanty bylo provedeno stanovení aminoxy skupin na pevné fázi dle dříve popsaného postupu.

4.5 POKRÝVÁNÍ NANODIAMANTŮ VRSTVOU SILIKAGELU A NÁSLEDNÉ ZAVEDENÍ AMINOXY SKUPINY NA JEJICH POVRCH

Směs karboxylovaných nanodiamantů ve vodě (2mg/ml) byla podrobena ultrazvukovému homogenizátoru. Mezitím byl připraven roztok poly(vinylpyrrolidonu) (25 mg/ml), který byl dvě hodiny při 80°C míchán a poté sonikován na ultrazvukovém homogenizátoru po dobu 20 minut. 34 ml vody bylo smícháno s 1 ml koloidu nanodiamantů a 650 µl roztokem poly(vinylpyrrolidonu) a 10 minut sonikováno na ultrazvukovém homogenizátoru [36]. Směs byla poté centrifugována (30 min, 40 000 x g, 15°C a následně v menším objemu 30 min, 30 000 x g) a peleta převedena do 2 ml ethanolu. Za míchání bylo k této směsi přidáno 84 µl amoniaku (4,2 % roztok amoniaku v ethanolu) a 20 µl směsi tetraethyl-orthosilikátu a (3-aminopropyl)triethoxysilanu (v objemovém poměru 3:1). Vzorek byl 12 hodin inkubován za laboratorní teploty při míchání.

Po navázání (3-aminopropyl)triethoxysilanu na nanodiamant byla na aminoskupinu amidovou vazbou navázána chráněná kyselina aminoxy octová. 2 mg nanodiamantů pokrytých silikou a promytých v DMF reagovaly v 1 ml DMF 24 hodin za míchání a při laboratorní teplotě s napřed smíchanými činidly potřebnými pro vznik amidické vazby: 1 mg Fmoc-aminoxy octové kyseliny, 2,42 mg DIPEA, 0,817 mg N-hydroxybenzotriazolu (HOBT) a 3,6 mg benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino) fosfonium hexafluorofosfátu (BOP) [37]. Po reakci byly nanodiamanty dvakrát promyty DMF. Fmoc-aminoxy skupina byla odchráněna tak (obr. 27, str. 40), že ke 2 mg modifikovaných nanodiamantů v 2 ml

DMF byl přidáno 400 μ l piperidinu (20 % piperidin v DMF) a 100 μ l threo-1,4-dimerkapto-2,3-butandiolu.

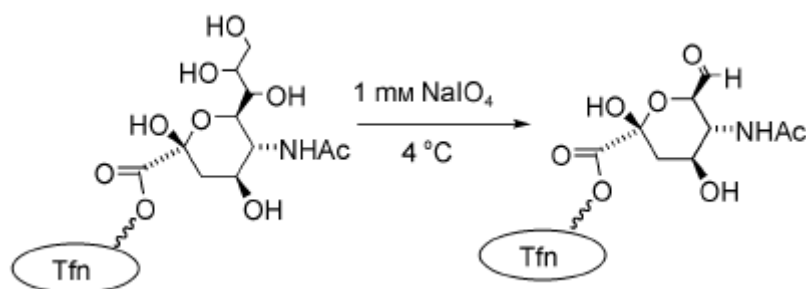


Obr. 27 **Odštěpení chránící skupiny Fmoc z aminoxy skupiny na silikou obaleném nanodiamantu.**

Směs reagovala 30 minut (prvních 10 minut v sonikační lázni), poté byla zcentrifugována (5 min, 10 000 x g) a v supernatantu proměřena absorbance od 260 nm do 400 nm. S takto modifikovanými nanodiamanty bylo také provedeno stanovení aminoxy skupin na pevné fázi dle dříve popsaného postupu.

4.6 NAVÁZÁNÍ PROTEINU HOLO-TRANSFERINU NA NANODIAMANT POKRYTÝ SILIKAGELEM A MODIFIKOVANÝ AMINOOXY SKUPINAMI

Holo-transferin byl rozpuštěn v 15 ml 0,1 M acetátovém pufru o pH = 5,5 (2 mg/ml). K vychlazenému roztoku byl po kapkách přidán vychlazený roztok jodistanu sodného (finální koncentrace 1 mM), směs byla inkubována 30 minut na ledu za tmy (obr. 28) [31].



Obr. 28 **Reakce glykosylovaného holo-transferinu (Tfn) s jodistanem sodným.** Štěpením diolových uskupení vzniká aldehydová skupina na holo-transferinu.

Roztok byl po reakci zakoncentrován na přibližně 0,5 ml pomocí centrifugační kyvety s 10 000 filtrem Amicon, Millipore (podle návodu při 3000 x g po dobu 40 min, 10 min a 5 min) kvůli zamezení další reakce jodistanu sodného s proteinem. Výsledný objem byl dialyzován (membrána 5000 Daltonů) proti 0,1 M pufru vytvořenému z 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethan sulfonové kyseliny (HEPES) o pH = 7,2 (dosaženo

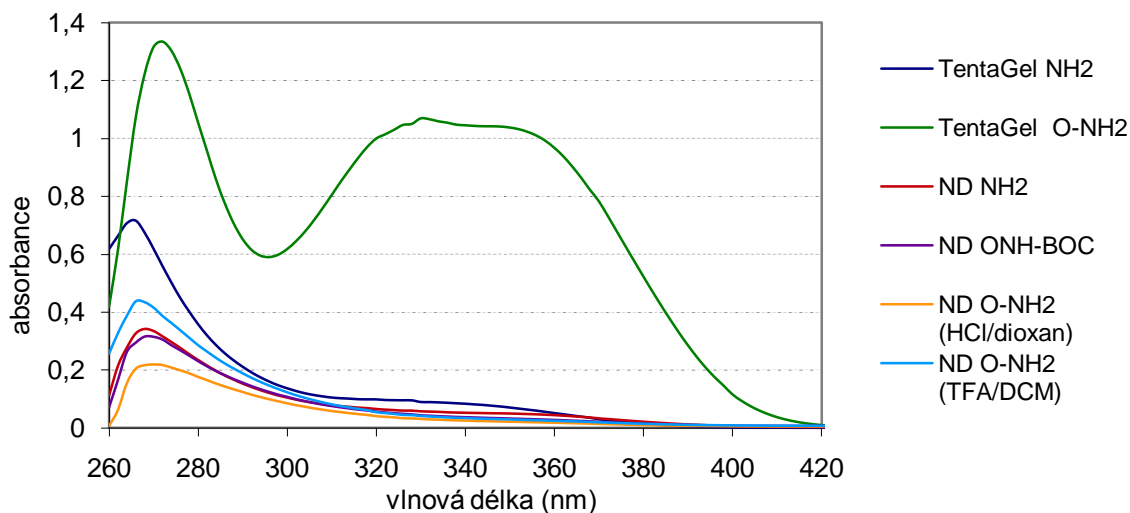
pomocí NaOH). Po 12 hodinách dialýzy bylo přidáno k 1 ml roztoku proteinu v HEPES pufru pomalu 1 ml nanodiamantů (1 mg/ml) ve vodě s rozpuštěným poly(vinylalkoholem) 13000 (24 mg/ml). Poly(vinylalkohol) byl rozpouštěn ve vodě dvě hodiny při 80°C za míchání a poté sonikován na ultrazvukovém homogenizátoru po dobu 20 minut. Nanodiamanty byly v roztoku poly(vinylalkoholu) před reakcí s proteinem inkubovány po dobu 2 hodin. Reakce proteinů s nanodiamanty probíhala přes víkend, během této doby se vysrážela z roztoku část nanodiamantů, které byly stočeny centrifugací (2 min, 800 x g). Supernatant byl dialyzován 24 hodin (membrána 300 000 Daltonů) proti vodě tak, aby se odstranil z roztoku volný nenávaný holo-transferin. V této době se opět část nanodiamantů srazila, ty byly odstraněny centrifugací (2 min, 800 x g) a v supernatantu proměřen rozptyl.

4.7 NAVÁZÁNÍ PROTEINU LIDSKÉHO SÉROVÉHO ALBUMINU (HSA) NA NANODIAMANT POMOCÍ ELEKTROSTATICKÝCH INTERAKCÍ

Ke karboxylovaným nanodiamantům ve vodě (1 mg/ml) předem sonikovaným na ultrazvukovém homogenizátoru (2 hod) byl přidán roztok HSA v hmotnostním poměru 1:1 [38]. pH vzniklé směsi bylo upraveno na 5,7 a roztok byl přes noc dialyzován (membrána 300 000 Daltonů) proti vodě. Navázání proteinu na nanodiamant bylo ověřeno pomocí aminokyselinové analýzy, proměřením rozptylu vzorku a infračerveného spektra vzorku. V paralelním pokusu byl ke karboxylovaným nanodiamantům ve vodě (1 mg/ml) předem sonikovaným na ultrazvukovém homogenizátoru (2 hod) přidán roztok HSA v hmotnostním poměru 1:1. pH roztoku nebylo upravováno. Roztok byl přes noc dialyzován (membrána 300 000 Daltonů) proti pufru PBS.

5. VÝSLEDKY

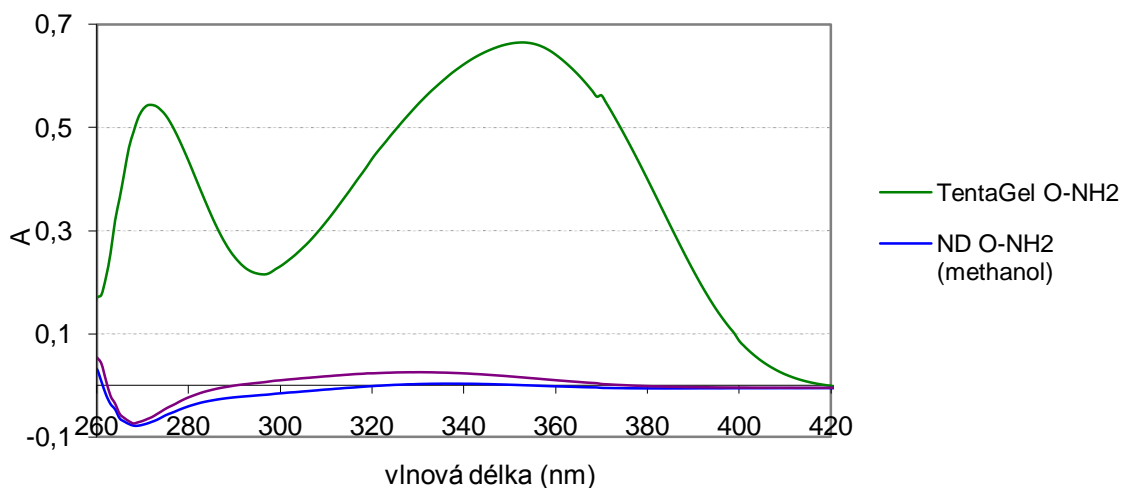
Stanovení aminoxy skupin pomocí pyridoxal 5'-fosfátu na pevné fázi bylo nejprve provedeno na nanodiamantech a TentaGelu modifikovaných aminoskupinami a aminoxy skupinami metodou popsanou v kapitole 4.3.



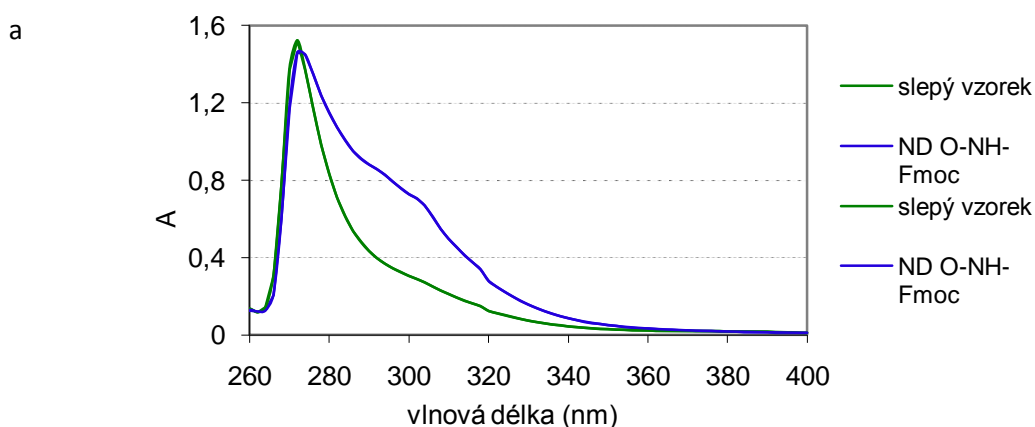
Obr. 29 Zobrazení absorpčního spektra při stanovení aminoxy skupin na nanodiamantech a TentaGelu metodou pomocí pyridoxal 5'-fosfátu popsanou v kapitole 4.2. TentaGel NH2 značí pryskyřici modifikovanou aminoskupinou, TentaGel O-NH2 označuje pryskyřici modifikovanou aminoxy skupinami. Obdobné značení platí i pro nanodiamanty (ND).

Jak je vidět na obr. 29, při 330 nm, kde absorbuje aldoxim, absorbuje jediný vzorek, a to aminoxy skupinami modifikovaný TentaGel. Lehce zvýšenou absorbancí má při 330 nm i TentaGel modifikovaný aminoskupinami. Žádný vzorek nanodiamantů v této oblasti výrazně neabsorbují.

Další stanovení aminoxy skupin pomocí pyridoxal 5'-fosfátu (obr. 30, str. 43) bylo provedeno na nově připravených nanodiamantech vzniklých z alkynylovaných nanodiamantů reagujících se 2-(3-azidopropoxy) ftalimidem (kapitola 4.4). Jako pozitivní kontrola byl opět zvolen TentaGel, který absorbuje ve zkoumané oblasti výrazně více než modifikované nanodiamanty. Maximum absorpce TentaGelu je ovšem posunuté oproti předpokladu a předchozímu pokusu doprava na přibližně 350 nm. Nově modifikované nanodiamanty opět nevykazují při 330 nm absorpci.



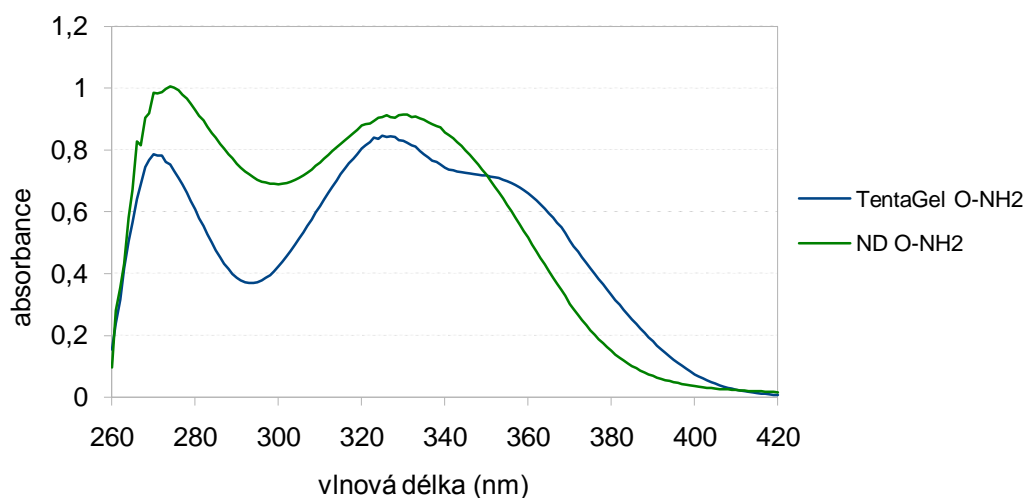
Obr. 30 Zobrazení absorpčního spektra při stanovení aminoxy skupin na nově modifikovaných nanodiamantech (vzniklých z alkynylovaných nanodiamantů a 2-(3-azidopropoxy) ftalimidu) a TentaGelu metodou pomocí pyridoxal 5'-fosfátu popsanou v kapitole 4.2. TentaGel O NH₂ označuje pryskyřici s navázanou aminoxy skupinou. ND ONH₂ označuje nanodiamant s navázanou aminoxy skupinou.



Obr. 31 Zobrazení absorpčního spektra při sledování odštěpení chránící skupiny Fmoc metodou popsanou v kapitole 4.5. Graf a zobrazuje absorbanci chránící skupiny Fmoc odštěpené z nanodiamantu ND O-NH-Fmoc i absorbanci slepého vzorku bez chránící skupiny Fmoc. Graf b zobrazuje absorpční křivku chránící skupiny Fmoc po odečtení slepého vzorku. Je vidět, že maximum absorpce se pohybuje při 290 nm.

Navázání kyseliny aminoroxy octové chráněné skupinou Fmoc na nanodiamant pokrytý vrstvou silikagelu bylo ověřeno proměřením absorbance při 290 nm, kde absorbuje odštěpená skupina Fmoc (obr. 31, str. 43). Po odštěpení skupiny Fmoc bylo na vzniklých aminoroxy skupinách provedeno opět stanovení pomocí pyridoxal 5'-fosfátu, které je zobrazeno na obr. 32. Jako pozitivní kontrola bylo opět využito TentaGelu. V tomto případě absorbují oba vzorky při 330 nm, jak vzorek pocházející z modifikované pryskyřice, tak vzorek pocházející z modifikovaných nanodiamantů. Jejich spektrum má ovšem lehce jiný průběh.

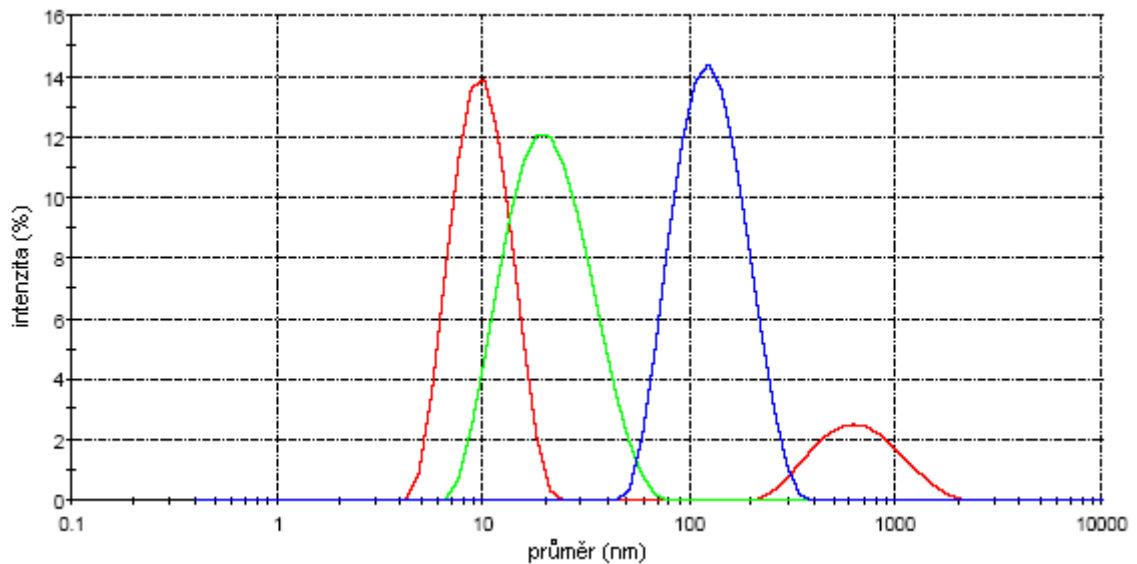
Navázání holo-transferinu aldehydovou skupinou na aminoroxy skupinu modifikovaného nanodiamantu nebylo prokázáno. Po odstranění nenavázaného proteinu, v roztoku nezbyly neagregované nanodiamantové částice, jak bylo zjištěno proměřením rozptylu.



Obr. 32 Zobrazení absorpčního spektra při stanovení aminoroxy skupin na nanodiamantech pokrytých silikou (ND O-NH2) a TentaGelu (TentaGel O-NH2) metodou pomocí pyridoxal 5'-fosfátu popsanou v kapitole 4.2.

Po navázání lidského sérového albuminu na nanodiamant byl změřen rozptyl světla, který naznačuje navázání proteinu na nanodiamant (obr. 33, str. 45). Na tomto obrázku je vidět červená křivka značící distribuci velikosti proteinu albuminu, zelená křivka odpovídající karboxylovaným nanodiamantům bez navázaného proteinu. Modrá křivka představuje na nanodiamantu navázaný albumin. Byla také provedena kvantitativní aminokyselinová analýza po kyselé hydrolýze, z které bylo vypočítáno, že se navázalo na 1 mg nanodiamantu 0,5 mg lidského sérového albuminu, což je 48% na počátku přidaného

množství lidského sérového albuminu. Proměření infračerveného spektra také naznačilo navázání lidského sérového albuminu. V případě navázání proteinu na nanodiamant a následné dialýzy do pufru PBS, vzorek zůstal koloidní.



Obr. 33 **Charakterizace nekovalentního navázání albuminu na nanodiamant pomocí rozptylu světla.** Červená křivka ukazuje distribuci velikosti proteinu albuminu, zelená křivka karboxylované nanodiamanty a modrá křivka albumin navázaný na nanodiamant.

6. DISKUZE

Možnost použití metody pro stanovení aminooxy skupin pomocí pyridoxal 5'-fosfátu (obr. 22, str. 34) byla ověřena na TentaGelu. Tato pevná fáze s navázanými aminooxy skupinami vykazovala silnou absorpci při 330 nm (obr. 29 – str. 42, obr. 30 – str. 43). Pro tuto metodu je podstatné, aby všechna Schiffova báze vytvořená z pyridoxal 5'-fosfátu a 2-aminobutan-1-olu, i všechen případně nezreagovaný pyridoxal 5'-fosfát a 2-aminobutan-1-ol byly odmyty a ve vzorku zůstal pouze pyridoxal 5'-fosfát navázaný na aminooxy skupinu na nanodiamantu. Lehce zvýšená absorbance pryskyřice modifikované aminoskupinami v porovnání s ostatními neabsorbujícími vzorky (obr. 29, str. 42) naznačuje, že reakce Schiffovy báze s aminooxy skupinami není zcela selektivní. Je ale vidět, že reakce s aminooxy skupinami je silně preferovaná. Pravděpodobnost vzniku Schiffovy báze na povrchu nanodiamantu s aminoskupinami je kvůli sterickým zábránám a velkému přebytku reaktivnějšího 2-aminobutan-1-olu téměř zanedbatelná. První stanovení aminooxy skupin na povrchu nanodiamantů dopadlo negativně (obr. 29, str. 42). Z tohoto stanovení (vzhledem k pozitivnímu výsledku stanovení aminooxy skupin na TentaGelu) by vyplývalo, že na takto modifikovaném nanodiamantu (obr. 23 – str. 36, obr. 44 – str. 37) se nevyskytují aminooxy skupiny. Bylo tedy žádoucí pokusit se zavést aminooxy skupiny na povrch jiným způsobem. Zvolena byla reakce alkynylovaných nanodiamantů (obr. 26, str. 38) s azidem obsahující chráněnou aminooxy skupinu a následné odchránění této skupiny hydrazin hydrátem. Stanovení aminooxy skupin na těchto nově připravených nanodiamantech ovšem opět neprokázalo jejich přítomnost na povrchu.

Na povrchu nanodiamantů, jak již bylo dříve řečeno, se vyskytují různé skupiny jako karboxylové a hydroxylové skupiny, ketoskupiny, anhydridy a laktony. I po oxidaci povrch nanodiamantů není zcela homogenní. Je proto možné, že vznikající aminooxy skupiny hned reagují s ketony taktéž přítomnými na povrchu nanodiamantů za vzniku ketoximů. Aminoxy skupiny na TentaGelu mohou být detekovány, protože na povrchu pryskyřice žádné ketoskupiny nejsou. Zcela monofunkcionalizovat povrch nanodiamantů a odstranit všechny ketoskupiny je téměř nemožné. Z toho důvodu je vhodné povrch nanodiamantů něčím obalit, aby se jeho povrchové skupiny nemohly účastnit následných reakcí. Všechny vlastnosti, které se týkají podstaty nanodiamantů, především fluorescence z (N-V) center,

by v takovém případě měly zůstat zachovány. Pokrývání různých nanočástic (například zlata) vrstvou silikagelu již bylo popsáno dříve [36], nanodiamanty pokryté vrstvou silikagelu byly připraveny nově. Přítomnost 3-(2-aminopropyl) triethoxysilanu ve směsi pro pokrytí nanodiamantů silikagelem umožňuje následně pomocí amidové vazby navázat sloučeninu obsahující chráněnou aminoskupinu. Navázání této sloučeniny bylo ověřeno spektrofotometricky při přibližně 290 nm po odštěpení chránící skupiny Fmoc (obr. 31, str. 43). Stanovení aminoskupin na takto modifikovaných nanodiamantech již bylo úspěšné (obr. 32, str. 44), nanodiamanty tedy obsahují aminoskupiny. Maximum absorbance při 330 nm je pro stanovení podstatné a z neznámého důvodu odlišný průběh křivky absorbance nanodiamantů a TentaGelu není pro tuto chvíli důležitý. Ověření přítomnosti a kompatibility aminoskupin na povrchu nanodiamantu pokrytého vrstvou silikagelu utvrzuje v hypotéze, že aminoskupiny nejsou chemicky kompatibilní s oxidovaným povrchem nanodiamantu.

Navázání holo-transferinu na nanodiamant může umožnit jeho sledování k cílové buňce. Holo-transferin, který váže dva železité kationty a slouží jako jejich přenašeč, je rozpoznáván specifickými receptory a je jejich prostřednictvím efektivně přijímán do buněk. Protože se receptory vyskytují na rakovinových buňkách ve zvýšené míře, je možno vysledovat výskyt takových buněk [12,31]. Výhodou proteinu holo-transferinu je jeho absorbance ve viditelné oblasti, na které se nanodiamant nepodílí. Případné navázání proteinu by tedy bylo možné snadno sledovat. Nanodiamanty obalené vrstvou silikagelu jsou udržovány stále v suchém DMF, protože vrstva silikagelu ve vodě hydrolyzuje. Reakce nanodiamantů s proteinem ovšem musí probíhat ve vodném prostředí. Z toho důvodu byl k nanodiamantům přidán vodný roztok poly(vinylalkoholu), který měl udržet stabilní koloid a zabránit nanodiamantům agregovat, což se nepodařilo. Postupem času se všechny nanodiamanty vysrážely ve viditelné částice. Proteiny obalující nanodiamant by také měly přispět k udržení stabilního koloidu. K navázání proteinů ale zřejmě nedojde dříve než ke vzájemnému spojení částic a hydrolýze jejich povrchu.

Jako další možnost zabránění precipitace bude na silikagel v nevodném prostředí připojena vrstva polyethylenglykolu, která by mohla mechanicky zabránit kontaktu reaktivních fází částic kvůli jejich větší vzdálenosti. Případně kyselina hyaluronová, stálá

v DMF, může sloužit k ochranění silikou obaleného nanodiamantu ve vodném prostředí. Zároveň i kyselina hyaluronová se dá využít k cílení rakovinových buněk.

Ověřit navázání lidského sérového albuminu na nanodiamant pomocí měření rozptylu světla je komplikované, neboť k intenzitě rozptylu světla přispívají kromě vlastních částic také jejich interakce. Změřený posun velikosti částice (obr. 33, str. 45) nemusí být tedy ovlivněn pouze skutečnou změnou velikosti částice, nicméně změna z takového důvodu je pravděpodobná. Posun velikosti částic nanodiamantu po smíchání s proteinem k vyšším hodnotám průměru naznačuje vazbu proteinu. Průměr nově modifikované částice je ovšem větší než dle očekávání, v čemž hrají pravděpodobně roli nově vzniklé interakce mezi částicemi. Navázání proteinu na nanodiamant ověřuje spíše aminokyselinová analýza, která je ovšem založena na předpokladu, že všechny volný nenavázaný albumin byl z roztoku odstraněn dialýzou přes noc. Aminokyselinová analýza ukázala, že 48 % albuminu smíchaného s nanodiamanty se navázalo (0,5 mg albuminu na 1 mg nanodiamantů). Nejdůležitějším výsledkem navázání proteinu na nanodiamant je ovšem stálost nanodiamantu v pufru PBS. Roztok nanodiamantů obalených albuminem je v PBS stálý i po několik dní. Nanodiamant bez navázaného proteinu netvoří v PBS ani v jiném prostředí s iontovou silou stabilní čirý koloid a okamžitě se z roztoku vysráží. Protein však dokáže precipitaci zabránit, což je nutné pro budoucí aplikace nanodiamantů.

7. ZÁVĚR

V praktické části jsem se pokusila demonstrovat dvě možnosti navázání proteinů na nanodiamanty. První variantou byla kovalentní vazba mezi aldehydovou skupinou na glykosylované molekule proteinu a aminosy skupinou na nanodiamantu. Tato vazba byla zvolena kvůli velké selektivitě, stabilitě, možným mírným podmínkám při vzniku a zachování vlastnosti biomolekuly. V rámci tohoto postupu jsem ověřila možnost použití metody využívající pyridoxal 5'-fosfát pro stanovení aminosy skupin na povrchu nanočástic a jiné pevné fáze. Aminosy skupiny nejsou zřejmě kompatibilní s povrchem oxidovaného nanodiamantu. Z toho důvodu bylo nutné připravit nové nanodiamanty, jejichž povrch by s žádoucími aminosy skupinami neinteragoval. Tyto nové nanodiamanty, pokryté vrstvou silikagelu, umožnily díky kompatibilitě aminosy skupin na svém povrchu pokus o navázání proteinu holo-transferinu aldehydovou skupinou. Problémem nanodiamantů obalených silikagelem je jejich nestálost ve vodném prostředí, nezbytném pro navazovaný protein. Nanodiamanty se v dosud provedených experimentech ve vodném prostředí vysrážely, a tedy nejsou využitelné pro další aplikace. Před zkoumáním možnosti připojení proteinů na nanodiamant je potřeba zabránit jejich precipitaci z roztoku.

Druhou variantou bylo navázání proteinu lidského sérového albuminu na nanodiamant nescifickými interakcemi. Metody, kterými navázání proteinu bylo ověřováno, konjugaci proteinu na nanodiamant potvrdily. Významným úspěchem byla v tomto případě stálost konjugátu nanodiamantů s proteinem v prostředí s iontovou silou, konkrétně v pufru PBS.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Chao, J-I., Perevedentseva, E., Chung, P-H., Liu, K-K., Cheng, Ch-Y., Chang, Ch-Ch., Cheng, Ch-L.: *Biophys. J.* 93, 2199-2208 (2007)
- [2] Nguyen, T-T-B., Chang, H-Ch., Wu, V.W-K.: *Diamond Relat. Mater* 16, 872-876 (2007)
- [3] Schrand, A.M., Ciftan Hens, S.A., Shenderova, O.A.: *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* 34, 18-71 (2009)
- [4] Liu, K-K., Chen, M-F., Chen, P-Y., Lee, T.J-F., Cheng, Ch-L., Chang, Ch-Ch., Ho, Y-P., Chao J-I.: *Nanotechnology* 19, 205102-205112 (2008)
- [5] Krüger, A.: *Chem. Eur. J.* 14, 1382-1390 (2008)
- [6] Osswald, S., Yushin, G., Mochalin, V., Kucheyev, S.O., Gogotsi, Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 128, 11635-11642 (2006)
- [7] Yeap, W.S., Tan, Y.Y., Loh, K.P.: *Anal. Chem.* 80, 4659-4665 (2008)
- [8] Ushizawa, K., Sato, Z., Mitsumori, T., Machinami, T., Ueda, T., Ando, T.: *Chem. Phys. Lett.* 351, 105-108 (2002)
- [9] Spitsyn, B.V., Davidson, J.L., Gradoboev, M.N., Galushko, T.B., Serebryakova, N.V., Karpukhina, T.A., Kulakova, I.I., Melnik, N.N.: *Diamond Relat. Mater.* 15, 296-299 (2006)
- [10] Krüger, A., Liang, Y., Jarre, G., Stegk, J.: *J. Mater. Chem.* 16, 2322-2328 (2006)
- [11] Liu, K-K., Cheng, Ch-L., Chang, Ch-Ch, Chao, J-I.: *Nanotechnology* 18, 35102-35112 (2007)
- [12] Li Y-Q., Zhou, Y-P.: *Diamond Relat. Mater.* 19, 1163-1167 (2010)
- [13] Faklaris, O., Joshi, v., Irinopoulou, T., Tauc, P., Girard, H., Gesset, C., Senour, M., Thorel, a., Arnault, J-Ch., Boudou, J-P., Curmi, P.A., Treussart, F.: *ACS Nano* 3, 3955-3962 (2009)
- [14] Ho, D.: *ACS Nano* 3, 3825-3829 (2009)

- [15] Chung, P.H., Perevedentseva, E., Tu, J-S., Chang, C.C., Cheng, C-L.: *Diamond Relat. Mater.* 15, 622-625 (2006)
- [16] Chang, Y-R., Lee, H-Y., Chen, K., Chang, Ch-Ch., Tsai, D-S., Fu, Ch-Ch., Lim, T-S., Tzeng, Y.K., Fang, Ch-Y., Han, Ch-Ch, Chang, H-Ch., Fann, W.: *Nat. Nanotechnol.* 3, 284-288 (2008)
- [17] Fu, Ch-Ch., Lee, H-Y., Chen, K., Lim, T-S., Wu H-Y., Lin, P-K., Wei, P-K., Tsao, P-H., Chang, H-Ch., Fann, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 727-732 (2007)
- [18] Bornscheuer, U.T.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3336-3337 (2003)
- [19] Kong, X.L., Huang, L.C.L., Hsu, C-M., Chen, W-H., Han, C-C., Chang, H-C.: *Anal. Chem.* 77, 259-265 (2005)
- [20] Bondar', V.S., Pozdnyakova, I.O., Puzyr', A.P.: *Phys. Solid State* 46, 758-760 (2004)
- [21] Vertegel, A.A., Siegel, R.W., Dordick, J.S.: *Langmuir* 20, 6800-6807 (2004)
- [22] Kossovsky, N., Gelman, A., Hnatyszyn, H.J., Rajguru, S., Garrell, R.L., Torbati, S., Freitas, S.S.F, Chow, G-M.: *Bioconjugate Chem.* 6, 507-511 (1995)
- [23] Huang, T.S., Tzeng, Y., Liu, Y.K., Chen, Y.C., Walker, K.R., Guntupalli, R., Liu, C.: *Diamond Relat. Mater.* 13, 1098-1102 (2004)
- [24] Kong, Y., Huang, L.C.L., Liau, S-C.V., Han, Ch-Ch., Chang, H-Ch.: *Anal. Chem.* 77, 4273-4277 (2005)
- [25] Huang, L-C.L., Chang, H-Ch.: *Langmuir* 20, 5879-5884 (2004)
- [26] Yang, W., Auciello, O., Butler, J.E., Cai, W., Carlishe, J.A., Gerbi, J.E., Gruen, D.M., Knickerbocker, T., Lassetter, T.L., Russell, J.N.jr, Smith, L.M., Hamers, R.J.: *Nature Mater.* 1, 253-257 (2002)
- [27] Delabouglise, D., Marcus, B., Mermoux, M., Bouvier, P., Chane-Tune, J., Petit, J-P., Mailley, P., Livache, T.: *Chem. Commun* 21, 2698-2699 (2003)
- [28] Wei, L., Zhang, W. Lu, H., Yang, P.: *Talanta* 80, 1298-1304 (2010)

- [29] Zhang, B., Li, Y., Fang, Ch-Y., Chang, Ch-Ch., Chen, Ch-S., Chen, Y-Y., Chang, H-Ch.: *Small* 5, 2716-2721 (2009)
- [30] Cheng, C-Y., Perevedentseva, E., Tu, J-S., Chung, P-H., Cheng, C-L., Liu, K-K., Chao, J-I., Chen, P-H., Chang, C-C.: *Appl. Phys. Lett* 90, 163903-163906 (2007)
- [31] Banerjee, D., Liu, A.P., Voss, N.R., Schmid, S.L., Finn, M.G.: *ChemBioChem* 11, 1273-1279 (2010)
- [32] Yi, L., Sun, H., Wu, Y-W., Triola, G., Waldmann, H., Goody, R.S.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 9417-9421 (2010)
- [33] Rose, K.: *J. Am. Chem. Soc.* 116, 30-33 (1994)
- [34] Korpela, T.K., Mäkelä, M.J.: *Anal. Biochem.* 110, 251-257 (1981)
- [35] Presolski, S.I., Hong, V., Cho, S-H., Finn, M.G.: *J. Am. Chem. Soc.* 132, 14570-14576 (2010)
- [36] Graf, Ch., Vossen, D.L.J., Imhof, A., Blaaderen, A.v.: *Langmuir* 19, 6693-6700 (2003)
- [37] Liu; H-Z., Tang, J-J., Ma, X-X., Guo, L., Xie, J-W., Wang, Y-X.: *Anal. Sci* 27, 19-24 (2011)
- [38] Tzeng, Y-K., Faklaris, O., Chang, B-M., Kuo, Y., Hsu, J-H., Chang, H-Ch. : *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 2262-2265 (2011)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka