

Abschlussbericht Max-Buchner-Forschungsstipendium (MBFSt 3497)

Bio/anorganische Nanostäbchen als Komponenten für Funktionsmaterialien: Peptid-vermittelte Mineralisation von Tabakmosaikviren

Dr. Fania Geiger¹

Dr. Dirk Rothenstein²

Elke Evgrafov B.Sc.^{1,2}

¹ Max-Planck-Institut für Intelligente Systeme, Neue Materialien und Biosysteme, Heisenbergstraße 3, 70569 Stuttgart

² Universität Stuttgart, Institut für Materialwissenschaft, Heisenbergstraße 3, 70569 Stuttgart

Zusammenfassung

Ziel des Projekts war die Herstellung von organisch-anorganischen Nanohybridmaterialien mit Hilfe von funktionalisierten Mineralisationstemplaten, die aus spezifischen Mineralisationspeptiden und Tabakmosaikviren (TMV) aufgebaut waren. Zunächst wurde der Einfluss der Mineralisationspeptide auf die CaCO_3 Mineralisation untersucht. Peptide, die die Abscheidungsreaktion beeinflussten wurden ausgewählt und zur Funktionalisierung des Templates kovalent an TMV gebunden. Diese funktionalisierten Biotemplate wurden dann durch Biomineralisation mit CaCO_3 beschichtet um organisch-anorganische Hybridnanostäbchen zu erhalten. Das Pflanzenvirus TMV diente hierbei als multivalentes 3D Templat, das eine strukturierte Präsentation der Mineralisationspeptide ermöglichte. Dieses Projekt war Teil des NanoBioMater Projekthauses der Universität Stuttgart, dessen Ziel die Erzeugung neuer Hybridmaterialien für die Analytik, Sensorik und Medizintechnik ist.

Einleitung

In der Natur synthetisieren verschiedene Organismen Hybridmaterialien mit organischen und anorganischen Phasen. Dieser Prozess wird als Biomineralisation bezeichnet. Ein prominentes Beispiel hierfür ist das Perlmutter mariner Schnecken und Muscheln. Perlmutter ist ähnlich einer Backsteinmauer aus Aragonit-Plättchen aufgebaut, die über dünne Proteinschichten miteinander verbunden sind. Durch diesen Aufbau erzielt Perlmutter eine außergewöhnlich hohe Bruchzähigkeit, die die mechanischen Eigenschaften der Einzelkomponenten bei weitem überträgt.¹ Durch Biomineralisation erzeugte Hybridmaterialien zeigen häufig verbesserten Eigenschaften gegenüber rein anorganischen Materialien und zudem oft Multifunktionalität wie z.B. die mechanische Stabilisierung und Lichtleitung von Tiefseeschwammnadeln.² Zudem werden Biomineralien unter Umgebungsbedingungen erzeugt (z.B. Druck, Temperatur, Lösungsmittel), mit einer Übertragung dieser „Grünen Synthese“ auf technische Materialien könnten harsche Reaktionsbedingungen vermieden werden und eine umweltschonendere Materialerzeugung erreicht werden. Die Übertragung eines Biomineralisationsprozesses auf die Synthese von technischen Materialien ist deshalb erstrebenswert.

Selektion von CaCO_3 -bindenden Peptiden.

Peptide, die spezifisch mit Calciumcarbonat interagieren wurden mittels der Phagen Display Methode aus einer randomisierten Peptidbibliothek isoliert (Abb. 1). Dabei wurden Phagen, die eine Peptidbibliothek am p3 Hüllprotein exprimieren an Aragonit bzw. Calcit gebunden. Nicht bindende Klone wurden eliminiert und interagierende Klone anschließend isoliert und die

Peptidsequenz mittels DNA Sequenzierung bestimmt. Insgesamt wurden 44 Aragonit- und 39 Calcit-bindende Peptide selektiert. Die Verteilung der berechneten isoelektrischen Punkte (pI) der Peptidpools zeigte Unterschiede (Abb. 2). Aragonit-bindende Peptide hatten in ihrer Mehrzahl einen höheren pI im Vergleich zu Calcit bindenden Peptiden. Die verschiedenen pI der Peptidpools spiegelten sich in einer unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung der Peptide wider. Interessant war, dass saure Aminosäuren (Asparagin- und Glutaminsäure) im Vergleich zu natürlichen Biomineralisationsproteinen unterrepräsentiert waren. Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung und des pI wurden fünf Aragonit-bindende und vier Calcit-bindende Peptide (Tabellen 1 und 2) ausgewählt und ihr Einfluss auf die Mineralisation von CaCO_3 untersucht.

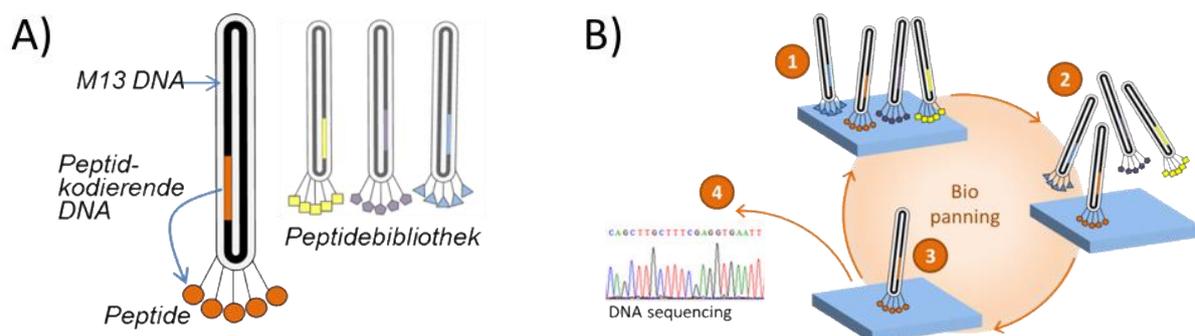


Abbildung 1: Die Phagen Display Methode zur Selektion von Peptiden, die mit anorganischen Materialien interagieren. A) Genetisch modifizierte M13 Bakteriophagen die in Fusion mit dem p3 Hüllprotein ein zusätzliches Peptid der Peptidbibliothek exprimieren. Die Peptidbibliothek umfasst $2.7 \cdot 10^9$ unterschiedliche Peptidsequenzen. B) schematische Darstellung des Phagen Displays. 1) Inkubation der Phagen/Peptidbibliothek mit dem Zielsubstrat. Dabei Bindung von interagierenden Peptiden. 2) Nicht oder schwach bindende Peptide werden durch waschschritte eliminiert. 3) Peptide mit einer starken Bindung zum Zielsubstrat werden eluiert. Um die Spezifität der Peptide zu erhöhen werden die Schritte 1-3 mehrfach wiederholt. 4) Peptidsequenzen der Bindungspeptide werden über eine DNA Sequenzierung identifiziert.

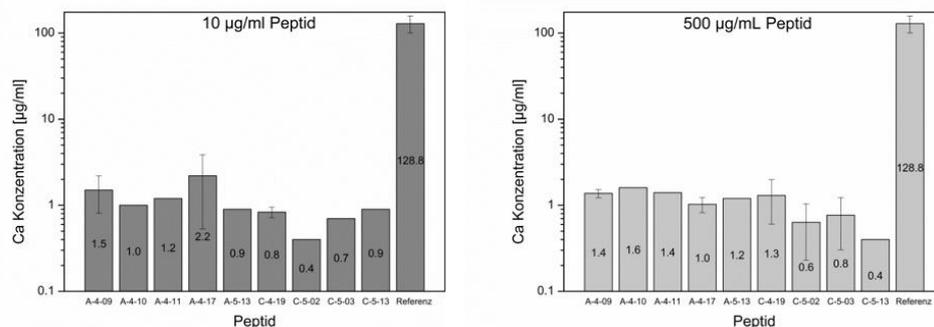


Abbildung 2: Berechnete isoelektrische Punkte (pI) der Aragonit- und Calcit-bindenden Peptide. Der prozentuale Anteil der Peptide wurde gegen den berechneten pI aufgetragen. A) Aragonit-bindende Peptide waren in ihrer Mehrheit positiv geladen unter den Selektionsbedingungen. B) Die Calcite-bindenden Peptide zeigten einen niedrigeren pI im Vergleich zu den Aragonit-bindenden Peptiden. Folglich hatten die Calcite-bindenden Peptide keine Ladung oder hatten eine negative Ladung.

Tabelle 1: Ausgewählte Calcit-bindende Peptide zur Mineralisation.

Peptid	Isoelektrischer Punkt (pI)	Ladung, pH 7.5	Einfluss auf Mineralisation
C-4-19	7.19	-0.1	+
C-5-02	9.06	0.8	-
C-5-03	11.12	1.8	-
C-5-13	3.81	-1.2	-

Tabelle 2: Ausgewählte Aragonit-bindende Peptide zur Mineralisation.

Peptid	Isoelektrischer Punkt (pI)	Ladung, pH 7.5	Einfluss auf Mineralisation
A-4-09	5.69	-1.2	++
A-4-10	9.06	0.8	+
A-4-11	10.00	1.8	-
A-4-17	12.02	3.9	++
A-5-13	7.19	-0.2	+

Einfluss der ausgewählten Peptide auf die Mineralisation von CaCO_3

CaCO_3 wurde aus einer 10 mM CaCl_2 Mineralisationslösung in Anwesenheit von $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ in 72 Stunden bei 4°C mineralisiert. Die Peptide wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zu der Mineralisationslösung gegeben. Nach erfolgter CaCO_3 Bildung wurde der Überstand abgenommen und die CaCO_3 Partikel hinsichtlich ihrer Morphologie im Elektronenmikroskop untersucht. Die Peptide A-4-09, A-4-17 und C-4-19 zeigten den größten Einfluss auf die Morphologie, exemplarisch wird hier das Peptid A-04-17 gezeigt. Das Peptid A-04-17 beeinflusste über einen großen Konzentrationsbereich die Partikelmorphologie (Abb. 3). Während sich ohne Peptidadditiv würfelförmige CaCO_3 Partikel bildeten, wurden die Strukturen mit steigender Peptidkonzentration komplexer. Bei der höchsten Peptidkonzentration von 2000 $\mu\text{g/ml}$ konnte eine Morphologie erzeugt werden, die der Morphologie von CaCO_3 Partikel, die in Anwesenheit von natürlichen Mineralisationsproteinen aus dem Seeigel *Arbacia lixula* synthetisiert wurden³, gleicht.

Die Ausfällung von Calciumionen aus der Mineralisationslösung wurde durch Peptide erhöht (Abb.4). Durch den Zusatz von Peptiden verblieben ca. 0,5% der Calciumionen im Überstand der Mineralisationslösung (ca. 99,5 % Ausfällung) während in der Referenzprobe ohne Peptid ca. 36 % der Calciumionen im Überstand verblieben (ca. 64% Ausfällung).

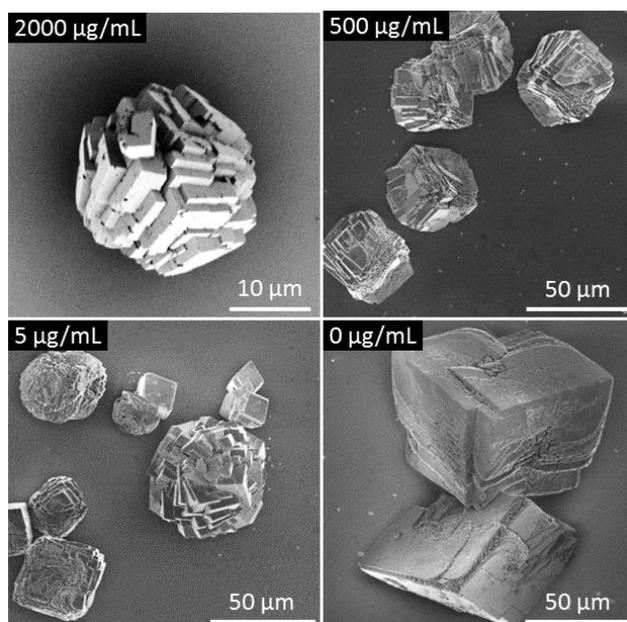


Abbildung 3: REM Aufnahmen des konzentrationsabhängigen Einflusses des Peptids A-04-17 auf die Mineralisation von CaCO_3 . Das Peptid zeigt einen großen Einfluss auf die Morphologie der gebildeten CaCO_3 Partikel in einem Konzentrationsbereich von 2000 bis 5 $\mu\text{g/ml}$. Bei hohen Konzentrationen (2000 $\mu\text{g/ml}$) wird eine Partikelmorphologie gebildet, die der mit natürlichen Biominalisationsproteinen aus dem Seeigel ähnelt. Ohne Peptid Addition (0 $\mu\text{g/ml}$) werden würfelförmige CaCO_3 Kristalle gebildet.

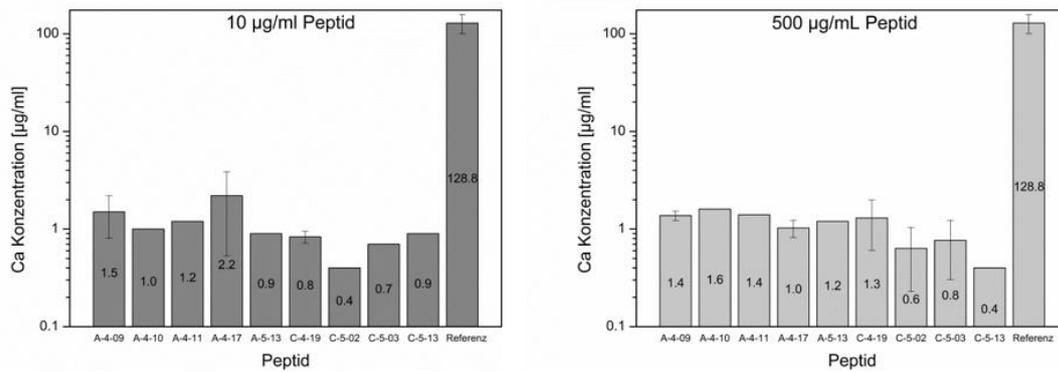


Abbildung 4: Im Überstand vorhandene Calciumionenkonzentration nach der Mineralisation von CaCO_3 . Die Calciumionenkonzentration im Überstand wurde mittels Optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) für $10\mu\text{g/ml}$ und $500\mu\text{g/ml}$ Peptidkonzentrationen im Mineralisationsansatz bestimmt. Bei Anwesenheit von Peptiden im Mineralisationsansatz wurde deutlich mehr CaCO_3 Präzipitiert als in Ansätzen ohne Peptid (Referenz). Dabei war die Peptidsequenz nicht entscheidend für die Menge an abgeschiedenem CaCO_3 .

Kopplung der Peptide an TMV

Die Peptide A-4-09, A-4-17 und C-4-19, die die größten morphologischen Änderungen bei der Mineralisation von CaCO_3 hervorgerufen haben, wurden an Tabakmosaikviren gekoppelt. Hierzu wurde eine TMV Hüllproteinmutante, die Lysin auf der Oberfläche exprimiert (TMV_{Lys})⁴, sowie Peptide mit einem zusätzlichen Cystein am C-Terminus verwendet. Als bifunktionaler Linker, um die Aminogruppen der Lysine mit der Thiolgruppe der Cysteine an den Peptiden zu verbinden, wurde NHS-PEG₁₂-Maleimid verwendet. Der Linker wurde zunächst über NHS an die NH_2 -Gruppe des gentechnisch eingebrachten Lysins an TMV gekoppelt und überschüssiger Linker durch Ultrazentrifugation entfernt. Anschließend wurden die Peptide über deren SH-Gruppe an die Maleimid-Gruppe des Linkers gekoppelt. Die einzelnen Schritte wurden mittels SDS-PAGE überprüft. Es konnten ca. 50 % der Hüllproteine mit Peptid funktionalisiert werden (Abb. 5), so dass die 300 nm langen TMV-Stäbchen mit ca. 1000 Peptiden belegt waren.

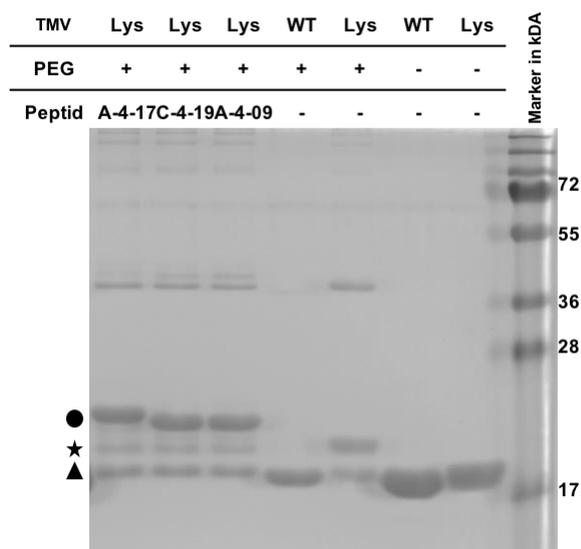


Abbildung 5: Coomassie gefärbtes, denaturierendes 15 % SDS-Gel, das die einzelnen Schritte der Peptidkopplung an TMV_{Lys} (Lys) bzw. als Kontrolle an wildtyp TMV (WT) zeigt. Die Peptide (ca. 3 kDa) wurden mit einem NHS-PEG₁₂-Maleimide (PEG; 866 Da) Linker über ihr C-terminales Cystein kovalent an das Lysin der TMV_{Lys} Hüllproteine (17 kDa) gekoppelt. Dreieck: TMV-Hüllprotein; Stern: TMV-Hüllprotein+PEG-Linker; Kreis: TMV-Hüllprotein+Linker+Peptid

CaCO₃ Mineralisation mit Peptid-funktionalisiertem TMV

TMV_{Lys} mit A-4-17 gekoppeltem Peptid, sowie nicht funktionalisiertes TMV_{Lys} wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zum oben beschriebenen Mineralisationsansatz dazugegeben und sowohl die Überstände mit den darin enthaltenen TMV-Partikeln als auch die entstandenen CaCO₃ Kristalle im Rasterelektronenmikroskop (REM) analysiert. Die gebildeten CaCO₃ Kristalle mit TMV zeigten wie beim Zusatz von Peptid deutlich komplexere Morphologien mit steigender Konzentration (Abb. 6 A-D). Zusätzlich bildete sich eine CaCO₃ Schicht um die Kristalle, die mineralisierte TMV-Stäbchen enthielt (Abb. 6 E). In den Kontrollen ohne TMV oder freiem Peptid konnten solche Schichten nicht gefunden werden (Abb. 6 F). Der Einfluss der gekoppelten Peptide im Vergleich zu nicht funktionalisiertem TMV und die Schichtdicken auf den TMV konnten im REM nicht bestimmt werden. Hierzu sind TEM-Untersuchungen nötig, in denen die Schichtdicken im zeitlichen Verlauf bestimmt werden können.

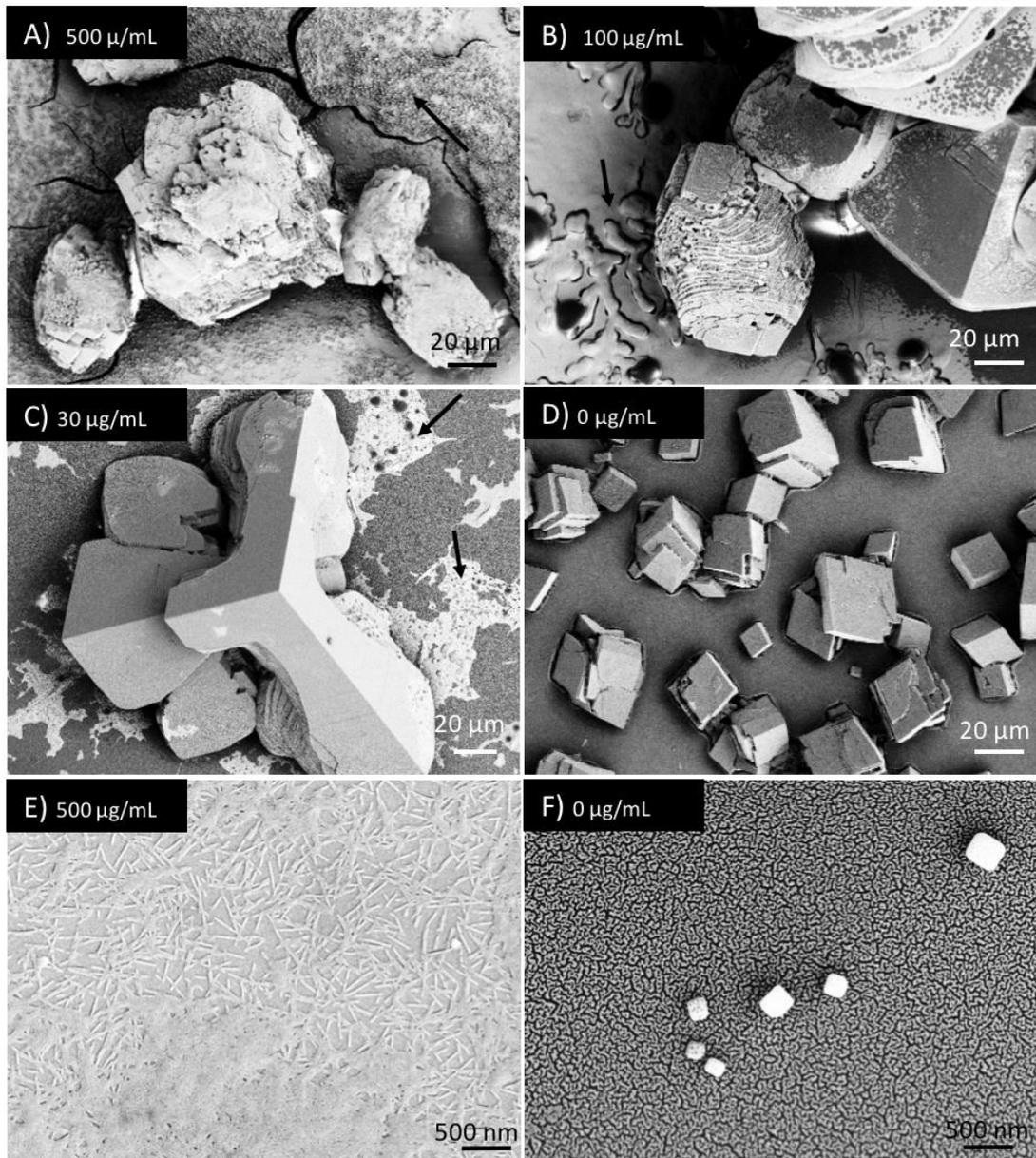


Abbildung 6: REM Aufnahmen der CaCO₃ Kristalle (A-D), sowie der umliegenden Flächen (E+F), die bei der Biom mineralisation mit TMV-A-4-17 entstanden sind. Mit zunehmender Proteinkonzentration nimmt die Komplexität der Morphologie zu. Zusätzlich sind Strukturen auf den Kristallen zu finden, die vermutlich TMV enthalten. In den entstehenden CaCO₃ Flächen (Pfeile) um die Kristalle sind mineralisierte TMV zu finden (A-C; E). In Kontrollen ohne TMV oder mit freiem Peptid sind die Kristalloberflächen glatt und keine zusätzlichen Flächen zu finden (D+F).

Ausblick

Im vorliegenden Projekt konnte gezeigt werden, dass Peptide die mittels Phagen-Display selektiert wurden, einen Einfluss auf die Mineralisation von CaCO_3 haben. Dies zeigte sich vor allem in der Morphologie der CaCO_3 Kristalle. Den Einfluss der Peptide auf das gebildete Polymorph ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Erste Ergebnisse zeigen, dass mit verschiedenen Peptidsequenzen und -konzentrationen die Bildung von Calcit oder Aragonit bevorzugt wird. Dies wird in Zukunft eine kontrollierte Mineralisation eines bestimmten Polymorphs durch die Wahl des Peptids und der Peptidkonzentration ermöglichen. Die ausgewählten Peptide konnten erfolgreich an Tabakmosaikviren gekoppelt werden und damit Strukturen mit einer sehr hohen Peptiddichte (1000 Peptide auf 300 nm Stäbchen) hergestellt werden. Diese zeigten ebenfalls einen Einfluss auf die Morphologie der entstehenden CaCO_3 Kristalle. Der Mineralisationsprozess direkt an den funktionalisierten TMV-Stäbchen muss im Detail noch untersucht werden. Hierzu werden die Schichtdicken nach unterschiedlich langer Mineralisationszeit im TEM untersucht, sowie die Polymorphe mittels XRD bestimmt. Der Mineralisationsprozess an TMV Stäbchen, die unterschiedlich funktionalisierte Hüllproteine enthalten und damit eine räumliche Anordnung der Peptide auf der Nanometerskala erlauben, ist ebenfalls Gegenstand der derzeitigen Untersuchung und muss noch mittels TEM ausgewertet werden.

Literatur

1. M. A. Meyers, P. Y. Chen, A. Y. M. Lin and Y. Seki, *Prog. Mater Sci.*, 2008, **53**, 1-206.
2. W. E. G. Müller, M. Kasueske, X. Wang, H. C. Schroder, Y. Wang, D. Pisignano and M. Wiens, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, **66**, 537-552.
3. J. M. Kanold, N. Guichard, F. Immel, L. Plasseraud, M. Corneillat, G. Alcaraz, F. Brümmer and F. Marin, *Febs J*, 2015, **282**, 1891-1905.
4. F. C. Geiger, F. J. Eber, S. Eiben, A. Mueller, H. Jeske, J. P. Spatz and C. Wege, *Nanoscale*, 2013, **5**, 3808-3816.