



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Peptide Amphiphiles and their use in Supramolecular Chemistry

Versluis, F.

Citation

Versluis, F. (2013, December 9). *Peptide Amphiphiles and their use in Supramolecular Chemistry*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22801>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/22801>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22801> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Versluis, Frank

Title: Peptide amphiphiles and their use in supramolecular chemistry

Issue Date: 2013-12-09

B. Samenvatting en Perspectieven

Dit proefschrift beschrijft onderzoek dat binnen de grenzen valt van de supramoleculaire chemie. In dit vakgebied wordt onderzoek gedaan dat vaak geïnspireerd is door biologische moleculen. Voorbeelden van natuurlijke moleculen die interessant zijn voor de supramoleculaire chemie zijn eiwitten, lipiden en DNA. Model systemen die eigenschappen van deze natuurlijke producten kunnen nabootsen leiden tot ‘slimme’ materialen die gebruikt kunnen worden voor toepassingen in bijvoorbeeld ‘drug delivery’ en materiaal wetenschappen. Voor dit proefschrift heb ik de zelfassemblage eigenschappen bestudeerd van peptiden die zich op het oppervlak van liposomen, cyclodextrine vesikels, cellen en zebrafish embryo’s bevinden.

In **hoofdstuk 2** werd een peptide ((leu-glu)₄) bestudeerd dat de neiging heeft om β -sheets te vormen. Dit peptide werd gefunctionaliseerd met een adamantaan, waardoor we in staat waren om deze amfifiele peptiden op het oppervlak van cyclodextrine vesikels te binden. Bij pH 7.3 zijn de glutaminezuur residuen voornamelijk gedeprotoneerd, dit voorkomt de vorming van β -sheets en we namen dan ook een ongeordende peptide structuur waar. Wanneer de pH verlaagd werd naar 5.0 werd een deel van de glutaminezuur residuen geprotoneerd, waardoor de electrostatische repulsie tussen de peptiden verminderd werd en β -sheets gevormd konden worden. Deze overgang was niet alleen reversibel, maar zorgde er ook voor dat de vorm van het hele aggregaat veranderde van bolvormig naar draadvormig. Deze overgang bleek ook reversibel, na het verhogen van de pH naar 7.4 namen we de bolvormige structuur van de aggregaten opnieuw waar. Bovendien bleek dat tijdens de overgang van bolvormige naar draadvormige aggregaten de inhoud van de vesikels buiten die vesikels trad. Concluderend is er op basis van peptide interacties een schakelbaar nanoaggregaat ontwikkeld die zijn inhoud kan afstaan als functie van de pH.

Hoofdstuk 3 beschrijft het resultaat van een literatuurstudie van de zelf assemblage van amfifiele peptiden. Deze literatuur studie beperkt zich tot amfifiele peptiden die bestaan uit twee verschillende blokken, een peptide blok en een hydrofoob blok. Het hydrofobe blok is vaak een lipide-of alkylstaart en zorgt ervoor dat de peptiden aggregeren in een waterig oplosmiddel. Nu is het zo dat het hydrofobe blok verschillende effecten kan hebben op de vorm van de aggregaten die gevormd worden

door de amfifiele peptiden alswel de structuur van de peptide blokken in die aggregaten. Via voorbeelden wordt gedemonstreerd dat het hydrofobe blok kan zorgen voor: 1) een beter gedefinieerde secundaire structuur van de peptiden; 2) moderatie van peptide-peptide interacties zodat alle interacties tussen de amfifiele peptiden gebalanceerd zijn; 3) het verhinderen van peptide-peptide interacties, dit gebeurt wanneer de hydrofobe interacties zo sterk zijn dat ze de peptide interacties compleet overheersen. Vervolgens worden de interacties tussen de peptide blokken onderzocht op hun invloed op de vorm van de gehele aggregaten. Het laatste deel van dit hoofdstuk beschrijft voorbeelden van toepassingen van amfifiele peptiden die onder de materiaal wetenschappen en 'drug delivery' vallen.

In **hoofdstuk 4** wordt membraan fusie voor het eerst besproken. Dit natuurlijke proces, dat wordt veroorzaakt door de vorming van een SNARE complex, is gedefinieerd als twee membranen die met elkaar versmelten. In dit hoofdstuk werd gebruik gemaakt van een model systeem dat in staat is om membraan fusie tussen liposomen te veroorzaken. Dit model systeem is gebaseerd op een set van amfifiele peptiden die de functie van SNARE eiwitten nabootsen en zij hebben de volgende structuur: anker-spacer-peptide. Het hydrofobe anker zorgt ervoor dat de peptiden in het membraan van het liposoom blijven zitten. De peptiden die gebruikt zijn worden afgekort met E en K. Deze peptiden vormen coiled coils wanneer ze bij elkaar gevoegd worden, net zoals de SNARE eiwitten dat doen. De spacer is geïncorporeerd in het model systeem omdat die ervoor zorgt dat peptiden E en K zich kunnen heroriënteren zodat ze efficiënt coiled coils kunnen vormen wanneer ze zich op het oppervlak van liposomen bevinden. In dit hoofdstuk werd de invloed van het hydrofobe anker op de snelheid waarmee coiled coil vorming tussen E en K op het oppervlak van liposomen membraan fusie induceert onderzocht. De aanpak was als volgt, een kleine bibliotheek van gelipideerde peptiden werd gesynthetiseerd waarin het anker varieerde. Met deze gelipideerde peptiden werden fusie experimenten gedaan die als volgt gingen: twee liposoom oplossingen werden gemaakt, een waarbij de liposomen het E peptide op het oppervlak hadden en een waarbij de liposomen het K peptide op het oppervlak hadden. Wanneer deze liposoom oplossingen werden gecombineerd vormde peptiden E en K coiled coils, waarna membraan fusie plaats vond. Onze bevindingen waren dat peptiden met DOPE en cholesterol ankers efficiënte fusie veroorzaakten, terwijl de minder hydrofobe ankers dat niet deden.

Experimenten waarin gekeken werd naar het mengen van de inhoud van de liposomen lieten zien dat de cholesterol peptiden nog efficiënter waren dan de DOPE peptiden. Bovendien hebben de cholesterol peptiden een ander belangrijk voordeel ten opzichte van de DOPE peptiden. Het bleek dat de cholesterol peptiden gebruikt konden worden om ‘kale’ liposomen te decoreren met E en K peptiden. Normaal gesproken worden fusogene liposomen bereid door de lipiden en peptiden eerst te mengen in organisch oplosmiddel, vervolgens het oplosmiddel te verdampen, daarna de lipide laag te hydrateren door een buffer oplossing toe te voegen waarna liposomen gevormd kunnen worden na soniceren. Waterige oplossingen van de cholesterol peptiden konden simpelweg toegevoegd worden aan al gevormde liposomen, waarna spontane insertie van de cholesterol peptiden in de membranen van de liposomen plaats vond. Experimenten lieten zien dat deze liposomen efficiënt fuseerden. Deze bevinding is zeer interessant omdat dit erop wijst dat deze peptiden aan al gevormde membranen toegevoegd kunnen worden. Dit breidt de bruikbaarheid van ons model systeem voor membraan fusie uit, omdat nu ook biologische membranen geactiveerd kunnen worden met peptiden E en K. Bijvoorbeeld, cholesterol peptide K kan toegevoegd worden aan levende cellen en nestelen zich spontaan in het membraan van deze cellen. Wanneer vervolgens peptide E toegevoegd wordt, kunnen coiled coils gevormd worden op het oppervlak van deze cellen. Dit kan leiden tot toepassingen in het bestuderen van membraan gerelateerde processen of zelfs de fusie van liposomen met cellen wat een doorbraak op het terrein van ‘drug delivery’ zou betekenen.

In **hoofdstuk 5** werd verder gebouwd op het model systeem voor membraan fusie zoals geïntroduceerd in **hoofdstuk 4**. Het idee van dit onderzoek is gebaseerd op de observatie dat in levende systemen membraan fusie alleen plaats vindt wanneer de coiled coil die gevormd wordt tussen SNARE eiwitten een bepaalde oriëntatie heeft ten opzichte van het membraan die ik ‘zipper-like’ zal noemen. Deze oriëntatie is het directe gevolg van 2 eigenschappen die vast liggen in de structuur van de SNARE eiwitten: 1) de coiled coils die gevormd worden zijn parallel en 2) de eiwitten zijn aan dezelfde kant verankerd in het membraan. Hier werd de invloed van de oriëntatie van de coiled coil die gevormd werd door peptiden E en K op membraan fusie gemeten. Er werd voor gekozen om de peptiden zo te synthetiseren dat ze aan tegenovergestelde zijden in het membraan verankerd waren. De oriëntatie die dan ontstaat noem ik ‘non-zipper-like.’ De bevindingen waren dat zowel de ‘zipper-like’

en de 'non-zipper-like' coiled coil oriëntatie leidden tot efficiënte fusie. Dit laat zien dat in ons model systeem de oriëntatie van de coiled coil geen belangrijke rol speelt. Het is mogelijk dat het verschil tussen de SNARE eiwitten en de gelipideerde peptiden die wij gebruiken komt door het verschil in grootte tussen de twee entiteiten. De SNARE eiwitten zijn veel groter dan de peptiden in ons model systeem, wat zou kunnen verklaren dat de oriëntatie voor de SNARE eiwitten wel belangrijk is maar niet voor de gelipideerde peptiden.

In **hoofdstuk 6** werd het model systeem voor membraan fusie, dat we al tegenkwamen in **hoofdstukken 4 en 5**, opnieuw gebruikt en combineerden dat met de cyclodextrine vesikels die geïntroduceerd werden in **hoofdstuk 2**. Hier werden eerst liposomen gemaakt die gedecoreerd werden met het cholesterol E peptide. Vervolgens werden daar cyclodextrine vesikels aan toegevoegd. Experimenten toonden aan dat dit mengsel stabiel was, oftewel, er vond geen fusie plaats tussen beide populaties vesikels. Om fusie te bewerkstelligen werd er vervolgens een K peptide aan toegevoegd dat gemodificeerd was met adamantaan. Na toevoeging van deze peptiden aan het mengsel bonden de K peptiden zich aan de cyclodextrine vesikels, waarna coiled coil vorming tussen peptiden E en K fusie veroorzaakten tussen de liposomen en cyclodextrine vesikels. Door middel van verschillende fluorescentie experimenten werd duidelijk dat de interactie tussen deze twee verschillende liposomen gekarakteriseerd kan worden als hemifusie. Dit betekent dat de buitenste lipide lagen van de vesikels wel mengde, maar dat er geen menging van de inhoud van de vesikels plaats vond. Een gedetailleerde studie naar de vorm van de resulterende aggregaten en de structuur van de resulterende membranen werd ondernomen met behulp van cryo-electronenmicroscopie. Uit deze studie bleek dat aggregaten met meerdere bilagen gevormd waren. Bovendien werd geobserveerd dat er contactpunten waren tussen de membranen. Verassend was dat de structuur van de cyclodextrine vesicles erg leek op die van de gemengde vesicles. Toekomstige studies zullen uitwijzen of het mengen van de buitenste lagen van de vesikels aangetoond kan worden via cryo-electronenmicroscopie. Hiervoor zal de ruwheid van de membranen van de gemengde vesikels vergeleken worden met die van de cyclodextrine vesikels en liposomen. Dit zal de eerste keer zijn dat het mengen van lipiden direct kan worden aangetoond.

Het laatste hoofdstuk, **hoofdstuk 7**, bouwt verder op **hoofdstuk 4** waarin ontdekt werd dat de cholesterol E en K peptiden spontaan opgenomen werden in membranen van liposomen. In dit hoofdstuk werd gebruik gemaakt van die eigenschap door de peptiden toe te voegen aan biologische membranen, zowel onder *in vitro* (CHO cellen) als onder *in vivo* (zebravis embryo's) omstandigheden. Het idee was dat als een van de peptiden in het membraan verankerend kan worden, dat daarna, door het complementaire peptide toe te voegen, coiled coils gevormen konden worden op het oppervlak van deze cellen en zebravis embryo's. Door een fluorescent cholesterol E peptide te gebruiken kon aangetoond worden dat dit peptide daadwerkelijk spontaan en snel (~5 min) in cel membranen verankerd. De toevoeging van het fluorescente geacetylerde complementaire peptide resulteerde in fluorescente membranen, wat een zeer sterke indicatie is dat coiled coil vorming plaats vond. Aangezien coiled coil vorming leidt tot het aan elkaar koppelen van datgene wat aan de peptides vast zit, betekend deze ontdekking dat we allerlei moleculaire constructen aan het oppervlak van cellen en zebravis embryo's kunnen binden. Dit werd gedemonstreerd door het complementaire peptide te verankeren in liposomen. Hier werd waargenomen dat de liposomen bonden aan de oppervlakken van de cellen en zebravis embryo's. Deze bevindingen kunnen leiden tot toepassingen die helpen bij het onderzoeken van membraan gerelateerde processen en drug delivery.

De vraag die overblijft na deze samenvatting is: wat zijn de vervolgstappen die nu genomen kunnen worden in dit onderzoek? In dit proefschrift heb ik een set complementaire coiled coil peptiden gebruikt om 1) liposomen met elkaar te fuseren 2) hybride vesikels te vormen en 3) liposomen te binden op het oppervlak van biologische membranen. Met betrekking tot elk van deze bevindingen zijn er belangrijke stappen die gezet kunnen worden ten einde een beter begrip van de materie te krijgen en deze system toe te kunnen passen. Ten eerste zijn er nog onduidelijkheden over het mechanisme waardoor membraan fusie tussen liposomen plaats vindt. De cruciale vraag hier is wat er nou precies gebeurt tussen het vormen van coiled coils en het mengen van de inhoud van de twee liposomen. De interacties tussen de peptiden en lipiden speelt hierin een centrale rol en deze moeten in detail bestudeerd worden om dit mysterie te ontrafelen. Bovendien zijn er tot nu toe alleen nog maar kleine, simpele moleculen in de liposomen geencapsuleerd. Fusie tussen liposomen kan ook gebruikt worden om twee ingrediënten met elkaar te

mengen in een afgesloten omgeving, een zogenaamde micro reactor. Hier liggen nog heel veel mogelijkheden om te komen tot elegante systemen die op basis van coiled coil vorming een bepaalde reactie laten verlopen.

De coiled coil vorming en het binden van liposomen aan biologische membranen, die werd gepresenteerd in hoofdstuk 7, stelt ons in staat om membraan gerelateerde processen in de cel te bestuderen. Bovendien is er ook een 'drug delivery' toepassing die potentieel zeer krachtig is. Een logische vervolgstap van het onderzoek gepresenteerd in dit proefschrift is de fusie van liposomen met cellen. Wanneer dit doel gerealiseerd wordt kunnen medicijnen direct in het cytoplasma van de cel gebracht worden. Deze aanpak heeft een zeer belangrijk voordeel op traditionele manieren van het toedienen van medicijnen, namelijk, het natuurlijke metabolische proces waarin een groot deel van de toegediende medicijnen al inactief gemaakt worden kan zo worden voorkomen. Om dit te bewerkstelligen zullen de variabelen in ons systeem, zoals peptiden, lipiden en buffer, geoptimaliseerd moeten worden. Het is mogelijk dat dit een tijdrovende en arbeidsintensieve opdracht is, maar de vruchten zullen zeer zoet smaken wanneer het lukt. Bovendien moet het mogelijk zijn om het systeem specifiek te maken voor specifieke cel types. Hiervoor zou er gebruik gemaakt kunnen worden van gemengde micellen die bestaan uit de gelipideerde peptiden en gelipideerde aptameren. Aptameren kunnen zo geconstrueerd worden zodat ze binden aan een specifiek cel type. In de toekomst zou het volgende verhaal de waarheid kunnen worden. De gemengde micellen worden geïnjecteerd in zebrafish embryo's via micro injectie. De micellen vinden hun weg naar een specifiek cel type door de aptameren en de gelipideerde peptiden incorporeren in de cel membranen. Vervolgens kunnen de liposomen met de complementaire peptiden geïnjecteerd worden. De liposomen binden alleen aan de cellen die de peptiden al op het oppervlak hebben en fuseren vervolgens met de cellen. Ik hoop dat deze visie waarheid wordt in de nabije toekomst.