



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Towards peptide based therapeutics-applications in celiac disease and infectious diseases

Kapoerchan, V.V.

Citation

Kapoerchan, V. V. (2009, December 22). *Towards peptide based therapeutics-applications in celiac disease and infectious diseases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14542>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/14542>

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

Nederlandse Samenvatting

HLA-DQ2 blockers

Het eerste deel van het onderzoek beschreven in dit Proefschrift behandelt het ontwerp, de synthese en de evaluatie van peptides die mogelijk kunnen dienen als 'blokkers' voor het HLA-DQ2 eiwit. Dit eiwit is betrokken bij de pathogenese van coeliakie, ook wel bekend als 'glutenallergie' of 'glutenintolerantie'. Coeliakie is de meest voorkomende voedsel-gerelateerde aandoening in de westerse wereld. Symptomen, zoals chronische diarree, vermoeidheid en gewichtsverlies worden veroorzaakt door ernstige beschadiging van de dunne darm en daardoor inefficiënte opname van voedingsstoffen. Dit is weer het gevolg van een ongewenste immuunrespons tegen gluten, eiwitten uit tarwe, die alomtegenwoordig zijn in allerlei voedingsproducten. De functie van HLA-DQ2 is het presenteren van glutenpeptides, gevormd door onvolledige afbraak van gluteneiwitten, aan gluten-specifieke T-cellen. Dit leidt tot een ongewenste en nadelige immuunrespons. In **Hoofdstuk 1** worden de drie belangrijkste factoren in de pathogenese van coeliakie beschreven, te weten de gluteneiwitten, HLA-DQ2 en het enzym tissue transglutaminase (tTG). De enige beschikbare therapie op dit moment is een glutenvrij dieet. Het volgen van dit dieet doet de schade aan de dunne darm herstellen en de symptomen verdwijnen. Echter, het glutenvrij dieet is een zware opgave en heeft een grote invloed op de kwaliteit van leven. Daarom wordt er intensief onderzoek gedaan naar alternatieve behandelingsmethoden en deze worden eveneens besproken in Hoofdstuk 1. De gevolgde strategieën kunnen ingedeeld worden in drie categorieën: ten eerste, het compleet afbreken van gluten met behulp van enzymen. Ten tweede, het remmen van het TG2 enzym door competitieve, reversibele of irreversibele inhibitie en ten derde, het blokkeren van het HLA-DQ2 eiwit. De laatste mogelijkheid wordt verder behandeld in **Hoofdstuk 2**. De ongewenste immuunrespons kan voorkomen worden door gebruik te maken van DQ2-'blokkers' ofwel peptides, die beter binden aan HLA-DQ2 dan de glutenpeptides, en niet worden herkend door T-cellen specifiek voor gluten. Het voorkomen van T-cel herkenning kan op papier worden bewerkstelligd door het introduceren van sterische en/of elektronische factoren. In het onderzoek van Hoofdstuk 2 werd het bekende glutenpeptide α -9 gekozen als uitgangspunt (QLQPFPPQPELPY, vetgedrukt is het epitoom dat aan HLA-DQ2 bindt). Dit peptide heeft een glutamine op de N-terminus en dit residu kan na peptide synthese onder zure condities cycliseren tot het pyroglutamaat, met een mengsel van peptides als gevolg. Om dit te voorkomen werd het pyroglutamaat al ingevoerd tijdens de peptide synthese, waarbij inderdaad maar één product werd geïsoleerd. Verder bleek deze modificatie de binding aan HLA-DQ2 niet nadelig te beïnvloeden. Vervolgens werd

een serie van 12 peptides gesynthetiseerd waarin het proline aminozuur op posities 3 en 5 van het epitoom werd vervangen door een azido-proline. De azidogroep werd gebruikt om via de Cu(I) gekatalyseerde Huisgen cycloadditie tussen een azide en een alkyne verschillende zijketens aan het peptide vast te maken. De peptides werden getest op bindingsaffiniteit voor HLA-DQ2 en de inductie van een immuunrespons ten gevolge van herkenning door een T-cel. Het peptide met een azido-proline op positie 3 en een zijketen afgeleid van het aminozuur phenylalanine toonde de hoogste bindingsaffiniteit en werd tevens niet herkend door de T-cel. Een competitie-experiment uitgevoerd in de aanwezigheid van het natuurlijke α -9 peptide toonde aan dat dit gemodificeerde peptide in staat is om T-cel respons te blokkeren, echter bij hoge concentraties van het peptide (200-400 μ M). **Hoofdstuk 3** behandelt het ontwerp en de synthese van peptides die een hogere affiniteit voor DQ2 hebben dan de natuurlijke peptides. Er werd een peptide met een hoge affiniteit voor HLA-DQ2 geïdentificeerd dat alleen natuurlijke aminozuren bevatte. Uit een kristalstructuur van het HLA-DQ2/ α -9 complex blijkt dat er in de bindingsplaats van het peptide in het eiwit op positie 1 ruimte is voor een aminozuur groter dan de proline die in α -9 op die positie zit. Om de bindingsaffiniteit verder te verhogen, werd dit peptide gemodificeerd met onnatuurlijke aminozuren op positie 1 van het epitoom. Het bleek dat het inbouwen van een lysine-analoon of een fluorescent aminozuur het meest positieve effect had op de bindingsaffiniteit. De veelbelovende aanpak uit Hoofdstuk 2, waarbij er grote zijketens worden bevestigd aan een peptide wat aan HLA-DQ2 bindt, wordt verder geëvalueerd in **Hoofdstuk 4**. Dit hoofdstuk beschrijft hoe drie peptides met een hoge bindingsaffiniteit voor HLA-DQ2 voorzien worden van a-gefunctionaliseerde aminozuren op positie 3 van het epitoom. Dit maakte het aanbrengen van grote zijketens mogelijk waardoor een serie van 12 peptides verkregen werd, welke werden getest op affiniteit voor HLA-DQ2. Het grootste verschil tussen de peptides met hoge affiniteit en de gluten peptides is de aanwezigheid van meerdere proline residuen in de natuurlijke peptides. Door de vele prolines zijn deze peptides bestand tegen afbraak door verschillende enzymen die normaal gesproken alle eiwitten en peptides uit voedsel afbreken tot de losse aminozuren. De resistentie tegen proteolyse is erg belangrijk in de pathogenese van coeliakie. Verder onderzoek moet uitwijzen of de constructen kans maken in een klinische setting of dat modificatie gericht op het verkrijgen van proteolytische stabiliteit noodzakelijk is.

GS analoga

Het tweede deel van dit Proefschrift heeft betrekking op het cyclisch peptide Gramacidine S (GS). Dit peptide, geïsoleerd uit de bodembacterie *Bacillus brevis*, bestaat uit tien aminozuren en heeft de sequentie (³Phe-Pro-Val-Orn-Leu)₂. De ruimtelijke

structuur bestaat uit twee antiparallelle β -strands die verbonden zijn door twee β -turns, gevormd door het $^{\text{D}}$ Phe-Pro dipeptide. Verder is het molecuul amfifiel, waarbij de positief geladen ornithines naar één kant wijzen, en de hydrofobe valines en leucines naar de andere kant. GS is een effectief antibioticum tegen zowel Gram-positieve als Gram-negatieve bacteriën. Nadelig is dat menselijke rode bloedcellen eveneens gevoelig zijn voor GS. Door deze zogeheten hemolytische activiteit wordt GS slechts gebruikt voor uitwendige toepassingen zoals in crèmes. Het modificeren van GS kan leiden tot verbindingen die wel nog steeds antibacterieel actief zijn maar niet meer schadelijk zijn voor rode bloedcellen en daardoor breder toepasbaar zijn. In **Hoofdstuk 5** wordt een serie GS analoga beschreven waarbij enkele residuen vervangen zijn door een adamantaan-aminozuur. Deze verbindingen werden getest op hun activiteit tegen bacteriën en menselijke rode bloedcellen. Twee van deze verbindingen, gebaseerd op een geïnverteerd GS molecuul, vertoonden een lagere hemolytische activiteit, maar bleven even actief tegen bacteriën als GS. Verder werd aangetoond dat de biologische activiteit kwalitatief correleert met de HPLC retentietijd van het peptide. Dit gegeven duidt erop dat er een GS analogon kan worden geconstrueerd met een optimale retentietijd gekoppeld aan een lage hemolytische activiteit en een hoge antibacteriële activiteit. Tot slot lijkt de aanwezigheid van vier geladen aminozuren, in plaats van twee in GS, belangrijk te zijn. In **Hoofdstuk 6** wordt een serie GS analoga beschreven waarbij vier verschillende morpholine aminozuren (MAA) het $^{\text{D}}$ Phe-Pro motief in de β -turn van GS vervangen. Het bleek dat subtiele veranderingen in de ruimtelijke structuur grote gevolgen hebben voor de antibacteriële en hemolytische activiteit. Het molecuul wat de ruimtelijke structuur betreft het meest op GS leek, toonde ook de meeste biologische overeenkomsten. De kristalstructuur van dit molecuul onthulde een supramoleculaire structuur in de vorm van een kanaal. De andere drie peptides waren zowel minder antibacterieel actief als minder hemolytisch actief. De kristalstructuur van één van de analoga liet een ‘amide flip’ zien, waarbij in plaats van de gebruikelijke vier waterstofbruggen er slechts drie aanwezig waren. Dit werd veroorzaakt door het wegdraaien van de amide band, die het MAA verbindt met de naastliggende leucine. Er kan worden geconcludeerd dat door subtiele veranderingen aan te brengen in de β -turn architectuur, mogelijk nieuwe GS analoga gesynthetiseerd kunnen worden die minder hemolytisch zijn dan GS, maar nog wel net zo actief zijn tegen bacteriën.