

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/30141> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Zheng, Tingting  
**Title:** Zipping into fusion  
**Issue Date:** 2014-12-17

---

---

# Samenvatting

---

---





---

---

Eén van de manieren waarop chemicaliën getransporteerd worden binnen de cel is door fusie van lipide bilagen. Membraanfusie wordt gereguleerd door een verzameling eiwitten, zodat er controle is over waar en wanneer er fusie plaatsvindt. In eukariotische cellen zijn het SNARE eiwitten die aan de basis staan van fusie. Echter, er is nog weinig bekend over het mechanisme waardoor fusie plaatsvindt op het moleculaire niveau. Onze groep heeft een modelsysteem voor membraanfusie ontwikkeld, dat geïnspireerd is door het natuurlijke SNARE eiwit complex. Dit modelsysteem bestaat uit twee complementaire, gelipideerde, coiled coil vormende peptiden die de gerichte fusie tussen liposomen mogelijk maken. In dit modelsysteem worden alle essentiële eigenschappen van SNARE-gedreven fusie nagebootst. Het tetramerische coiled coil complex wordt nagebootst door een complementair paar van coiled coil vormende peptiden, die elk bestaan uit 3 repeterende eenheden van 7 aminozuren (genaamd “coil-E” en “coil-K”). Aan de N-terminus van deze peptiden werd een flexibele poly(ethyleenglycol) keten gekoppeld, die ervoor zorgt dat de peptiden vrijelijk kunnen bewegen op het oppervlak van liposomen. Vervolgens werd er een lipide gekoppeld, zodat we zeker konden zijn dat het peptide zich zou verankeren in lipide membranen.

Om toepassingen te kunnen ontwikkelen voor dit modelsysteem, moet het mechanisme waardoor fusie plaatsvindt in meer detail bestudeerd worden. Dit is dan ook het doel van dit proefschrift. Het eerste deel van dit proefschrift (hoofdstuk 2 en 3) bestudeert de zelfassemblage van de peptiden terwijl het tweede deel (hoofdstuk 4, 5 en 6) zich richt op fusie tussen liposomen, waarin het effect van variaties in de structuur van de peptiden op de mate van membraanfusie wordt beschreven.

**Hoofdstuk 2** beschrijft een nieuwe methode om de oligomere toestand en oriëntatie van coiled coil peptiden te bepalen. Peptiden K en E zijn ontworpen om parallelle, heterodimerische coiled coils te vormen (CC-K/E) en deze peptiden werden gelabeld met de aromatische aminozuren tryptofaan en tyrosine aan hun C-termini. Vervolgens werd één van de peptiden gelabeld met een paramagnetische groep, MTSL genaamd. Proton NMR metingen werden vervolgens gebruikt om te bepalen in welke mate het signaal van de aromatische protonen onderdrukt werd door het nitroxyl radicaal. Hiermee kon de quaternaire structuur van de peptiden bepaald worden en werden de parallelle oriëntatie en de heterodimerische zelfassemblage van peptiden E en K bevestigd. Bovendien onderdrukken de MTSL labels ook de fluorescentie van de aromatische aminozuren en fluorescentie metingen bevestigde de NMR data. Dit alles laat zien dat het labelen van

## Samenvatting

---

peptiden met nitroxyl radicalen en aromatische, fluorescente groepen zeer waardevolle informatie kan geven over de quaternaire structuur van de peptiden. Deze handige methode kan bovendien toegepast worden op alle supramoleculaire systemen die een goed gedefinieerde structuur hebben.

In **hoofdstuk 3** werd de aminozuur sequentie van coil-E omgedraaid en de zelfassemblage met peptide K bestudeerd, gebruik makend van dezelfde methode als in **hoofdstuk 2**. Deze studies werden aangevuld met data uit computersimulaties en laten zien dat coil-E<sub>r</sub> en coil-K assembleren in een anti-parallel, tetramerisch coiled-coil motief (CC-K/E<sub>r</sub>). Verassend genoeg bleek de stabiliteit van dit complex vergelijkbaar met de originele heterodimerische coiled coil CC-K/E. Vervolgens werd de mate waarin CC-K/E<sub>r</sub> membraanfusie kon veroorzaken bepaald en vergeleken met CC-K/E. Beide coiled coils laten vergelijkbare fusie efficiënties en snelheden zien, wat demonstreert dat in ons modelsysteem voor membraanfusie zowel de oriëntatie en oligomere toestand van de coiled coil geen cruciale rol spelen.

In **hoofdstuk 4** wordt de invloed van de concentratie van lipiden en gelipideerde peptide op de fusie van liposomen besproken. Het mengen van de lipiden van liposomen was optimaal wanneer 0.75 mol% gelipideerde peptiden werden gebruikt. Dynamische lichtverstrooiing (DLS) en microscopie studies laten zien dat het variëren van de lipide en peptide concentraties toegang geven tot twee fusie regimes: in het eerste regime resulteren meerdere fusies van liposomen tot de vorming van zeer grote liposomen, terwijl in het tweede regime fusie beperkt blijft tot gemiddeld twee liposomen die met elkaar fuseren. Door fusie experimenten uit te voeren onder verschillende condities was het mogelijk om de potentie van ons model systeem voor membraan fusie gedetailleerd in kaart te brengen. De resultaten maken de weg vrij voor toekomstige toepassingen zoals bijvoorbeeld nanoreactoren en drug delivery.

In **hoofdstuk 5** werd de mate waarin fusie plaatsvond gecontroleerd door de bindingsenergie van de coiled coils te variëren. In het oorspronkelijke modelsysteem bestonden zowel coil-E als coil-K uit drie repeterende eenheden van 7 aminozuren. In dit hoofdstuk werd de lengte van de peptiden gevarieerd tussen respectievelijk twee (coil-E<sub>2</sub>, coil-K<sub>2</sub>) en vier (coil-E<sub>4</sub>, coil-K<sub>4</sub>) repeterende eenheden. Eerst werden de bindingsenergieën bepaald van de peptiden en zoals verwacht bleek de stabiliteit van de langste peptiden het hoogst. De mate waarin deze peptiden fusie konden induceren werd

---

---

vervolgens bepaald door DLS metingen en door de menging van de lipiden en inhoud van de liposomen te kwantificeren. Het langste coiled coil paar ( $K_4/E_4$ ) induceerde fusie op de meest efficiënte manier en bovendien bleek deze coiled coil resistent tegen hoge temperaturen en ongevoelig voor variaties in de pH. Dit onderzoek breidt de potentiële toepassingen van het modelsysteem verder uit.

In **hoofdstuk 6** werd de invloed van elektrostatistische interacties op de mate van fusie onderzocht. Om ervoor te zorgen dat de bindingsenergie van afgeleiden van CC-K/E niet verschillend waren van de oorspronkelijke coiled coil, werden er coil-K peptiden gesynthetiseerd die een andere lading hadden op de 'f' positie. De mate waarin de nieuwe coil-K derivaten (coil- $K_S$  (geen lading op 'f') en coil- $K_K$  (positieve lading op 'f') in staat waren om, in combinatie met coil-E, fusie te induceren werd onderzocht. Opmerkelijk was dat de invloed van de lading op de 'f' positie zeer groot was, wat bleek uit experimenten waarin het mengen van lipiden en inhoud van de liposomen werd gemeten. Door de oorspronkelijke negatieve lading (coil-K) te vervangen door geen lading (coil- $K_S$ ) en een positieve lading (coil- $K_K$ ) werd de fusie significant versterkt. Mogelijk komt dit doordat er minder KK coiled coils zijn voordat fusie plaatsvindt. Er is echter meer onderzoek nodig om deze hypothese te bevestigen.

Dit proefschrift richt zich op het ontwerpen van nieuwe coiled coil peptiden en het optimaliseren van coiled coil gedreven membraanfusie. Er is nog ruimte voor vervolgstudies, bijvoorbeeld in hoofdstuk 3, waarin de aminozuur sequentie van coil-E werd omgedraaid. Het zou bijvoorbeeld interessant kunnen zijn om de sequentie van coil-K om te draaien omdat recent onderzoek heeft laten zien dat coil-K interacteert met membranen. Deze interacties zorgen er wellicht voor dat de membranen verstoord worden waardoor de fusie zo efficiënt mogelijk verloopt. Door de sequentie van coil-K om te draaien zou deze hypothese bevestigd kunnen worden. Hoofdstukken 4, 5 en 6 laten zien dat het modelsysteem nog sneller en efficiënter fusie kan induceren, wat een belangrijke stap is voor het in-vivo gebruik van dit model systeem. Als dat gerealiseerd kan worden is het modelsysteem werkelijk in staat de natuurlijke, SNARE gedreven, membraanfusie na te bootsen.

