



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Extending the self-assembly of coiled-coil hybrids

Robson, M.H.

Citation

Robson, M. H. (2009, December 9). *Extending the self-assembly of coiled-coil hybrids*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14498>

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/1887/14498>

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

SAMENVATTING

Een coiled-coil motief is opgebouwd uit meerdere peptiden die een helix structuur bezitten. De binding van deze peptiden is zeer specifiek en is gebaseerd op de interactie tussen repeterende complementaire aminozuur sequenties. Van de vele biomoleculaire bouwstenen die gebruikt worden in de natuur horen coiled-coil vormende peptiden bij diegenen met de meeste potentie als bouwstenen voor de synthetische zelf-assemblage van nanostructuren (bottom-up approach). Coiled-coil peptiden hebben een goed gedefinieerde grootte en oppervlakte functionaliteit, de aminozuur volgorde kan worden ontworpen voor specifieke intra- en intermoleculaire interacties, de bindingsenergie is verenigbaar met andere zelf-assemblage processen en ze kunnen eenvoudig gecombineerd worden met andere synthetische bouwstenen. Het gemak van het werken met en het vergaren van informatie over coiled-coil structuren heeft ertoe geleid dat ze een van de meest bestudeerde eiwitstructuren zijn. Zowel geïsoleerde coiled-coils, die discrete complexen vormen, als coiled-coils die assembleren in grotere aggregaten zijn bestudeerd. Tevens zijn coiled-coil structuren gekoppeld aan hydrofiele blokken die het mogelijk maakten aggregaten te vormen met behulp van coiled-coil formatie. Echter, één van de gebieden met de meeste potentie is nog nauwelijks bestudeerd: natuurlijk voorkomende coiled-coil complexen als radertjes in een grote machine die de mogelijkheid hebben te functioneren in complexe systemen opgebouwd uit meerdere bouwstenen en die deze systemen zelfs kunnen beïnvloeden. Het ware potentieel van coiled-coil bouwstenen wordt voor synthetisch chemici pas duidelijk wanneer ze gekoppeld worden aan andere componenten, waarbij iedere component zijn eigen functie heeft. Idealiter wordt er een balans gevonden tussen de afzonderlijke componenten, waardoor nieuwe functies verkregen worden uit de interacties tussen de componenten. Dit proefschrift beschrijft verschillende manieren om coiled-coil structuren te combineren met één of meerdere (niet)-peptide componenten.

In hoofdstuk 2 wordt de coiled coil eenheid, die later wordt gebruikt in de volgende hoofdstukken voor het vormen van hybride moleculen onderzocht. Het peptiden paar genaamd E en K, bestaan elk uit drie repeterende sequenties van zeven aminozuren die ontworpen zijn om een parallelle heterodimeer te vormen in waterig milieu. De bindingseigenschappen worden bepaald door gebruik te maken van experimentele en theoretische technieken, waarbij de resultaten van deze twee strategieën elkaar ondersteunen. De bindingsenergie van een E/K coiled-coil dimeer werd experimenteel bepaald ($\sim 11 \text{ kcal mol}^{-1}$). Uit computersimulaties bleek dat de belangrijkste bijdrage aan de bindingsenergie geleverd werd door het samenvakken van de zijketens van de hydrofobe aminozuren in de coiled-coil kern. In de controversiële kwestie of zoutbruggen ook bijdragen aan de binding, suggereren de simulaties dat deze niet veel voorkomen en

dat geladen zijketens de bindingsenergie zelfs verlagen maar nodig zijn om de vereiste specificiteit voor de E/K peptidenbinding te verkrijgen.

In hoofdstuk 3 is een polymeer-peptide hybride beschreven. De conjugatie van peptide E met polystyreen resulteert in een polymeer amfifiel (PS₉-E). De zelf-assemblage van PS₉-E is onderzocht evenals PS₉-E/K en PS₉-E/K-PEG₇₇ mengsels. Omdat peptide E oplosbaar is in water fungeert het als de corona in het PS₉-E block copolymeer, terwijl het hydrofobe PS de zelf-assemblage induceert waarbij sferische micellen ontstaan. De coiled-coil complexatie tussen de peptiden E en K vindt nog steeds plaats wanneer de peptides geconjugeerd zijn met PS en/of PEG, wat resulteert in lineaire, niet covalente di- en triblock copolymeren. PS-E/K vormt ook sferische micellen, terwijl PS-E/K-PEG mengsels leidde tot de vorming van cilindrische micellen. De coiled-coil binding in PS-E/K-PEG kan worden verbroken door de temperatuur te verhogen. Deze reductie in de grootte van de corona veroorzaakt een verandering in de morfologie van het systeem van cilindrische naar sferische micellen met een rigide kern van polystyreen zodat ook na het opnieuw vormen van de coiled-coil binding sferische micellen waar te nemen zijn. Samenvattend, het coiled-coil vormende E/K motief wordt op drie manieren gebruikt: ten eerste zorgt het hydrofiele karakter ervoor dat de corona van de micellen uit coiled coils bestaan en zo wordt de aggregatie van de micellen gecontroleerd; ten tweede worden door het vormen van het coiled coil complex de eigenschappen van het oppervlak gemodificeerd. Ten derde, het reversibele karakter van de coiled-coil binding zorgt ervoor dat de nanostructuren kunnen reageren op externe omgevingsfactoren.

Terwijl hoofdstuk 3 is gericht op het onderzoek naar het effect van het coiled-coil motief op de zelf-assemblage van amfifielen, wordt in hoofdstuk 4 de zelf-assemblage van coiled-coil hybrides uitgebreid door variatie aan te brengen in het hydrofobe blok. Een reeks van poly(γ -benzyl L-glutamaat)-E blokkopolymeren (PBLG-E) met verschillende molecuulgewichten voor het PBLG blok werden gesynthetiseerd en de zelf-assemblage in waterige milieu onderzocht, met als doel het vormen van grotere geordende structuren. Peptide E werd gesynthetiseerd op een vaste drager gevolgd door de PBLG synthese, waarbij de polymerisatiegraad gevarieerd werd tussen 36 en 250 monomeren BLG. Deze aanpak is geschikt voor modulaire zelf-assemblage, doordat zowel het hydrofobe blok als het hydrofiele blok gevarieerd kunnen worden. PBLG_n-E met $n < 80$ bleken goede amfifielen te zijn en in staat om goed gedefinieerde aggregaten te vormen. Wanneer een langer PBLG blok werd gebruikt was complexatie met K (PBLG-E/K) of K-PEG (PBLG-E/K-PEG) nodig voor de vorming van geordende aggregaten. Door gebruikmaking van slechts 4 moleculen uit deze klasse van verbindingen- PBLG₃₆-E, PBLG₁₀₀-E, K en K-PEG-K konden polymeersomen (vesicles die bestaan uit polymeren) met verscheidene groottes, membraandiktes en oppervlakte eigenschappen gesynthetiseerd worden, evenals schijfvormige micellen.

De PBLG_n-E moleculen vormen een nieuwe klasse van peptides: polypeptide-*blok*-peptiden, waarin de flexibiliteit van de lengte van de keten van de polypeptiden is verenigd met de flexibiliteit van de functionaliteit van ontworpen peptiden. Peptide E werd gesynthetiseerd op een vaste drager, waarna PBLG werd gevormd door middel van

een ring-opening polymerisatie vanuit de N-terminus van peptide E, terwijl deze nog verbonden was aan de vaste drager. Deze techniek heeft als voordeel dat de zuivering erg eenvoudig is, omdat nevenproducten (bv. PBLG) gemakkelijk van de resin gescheiden worden.

In de literatuur zijn veel verschillende methoden beschreven om vesicles te maken van polymeren, omdat in veel gevallen de methoden niet geschikt zijn voor alle amfifiele polymeren of vanwege praktische bezwaren zoals de tijd benodigde, de benodigde instrumenten en de vereisten die gesteld worden aan de intrinsieke eigenschappen van het blokcopolymeer of het materiaal wat geïncorporeerd moet worden in de vesicles. In de hoofdstukken 5 en 6 worden twee nieuwe methoden beschreven voor het maken van vesicles uit blokcopolymeren gebaseerd op methoden die al tientallen jaren gebruikt worden om liposomen te maken. In de eerste methode wordt een detergent gebruikt om de blokcopolymeer moleculen op homogene wijze op te lossen in waterige oplossingen, iets waar normaal gesproken organische oplosmiddelen voor gebruikt worden. Vervolgens werd het detergent langzaam verwijderd door middel van verdunning gevolgd door dialyse waarna vesicles verkregen werden. Deze methode heeft als voordeel dat er geen organische oplosmiddelen worden gebruikt en tevens dat er geen hoge energie-input bronnen (bv. sonicatie) vereist zijn, waardoor deze methode toegepast kan worden om gevoelige biomoleculen (bv. eiwitten) te encapsuleren in deze polymeersomen. Het blokcopolymeer dat werd gebruikt om deze techniek te demonstreren bestond uit PBLG₃₆-E moleculen. Dit molecuul heeft een veel hogere zelf-assemblage energie dan lipiden en de methode wordt uitgelegd met de nadruk op de aanpassingen die nodig zijn vanwege de specifieke eigenschappen van blokcopolymeren. In de tweede methode werd het blokcopolymeer opgelost in THF, waarna de waterige fase snel werd toegevoegd en de THF verwijderd werd. De parameters die het aggregatiegedrag bepalen zijn eenvoudig en snel te controleren: de kwaliteit van het oplosmiddel voor het hydrofobe PBLG-blok kan worden gereduceerd tot het gewenste niveau in twee seconden, wat leidt tot microfase scheiding en de vorming van de structuur; het controleren van de interacties binnen de corona, wat ervoor zorgt dat de grootte van de polymeersomen nauwkeurig bepaald kan worden, is ook erg eenvoudig. Deze hangt af van de zoutconcentratie en de temperatuur waarbij het organische oplosmiddel verdampt wordt. Op deze wijze kunnen binnen een paar minuten polymeersomen gevormd worden, waarbij de diameter nauwkeurig gestuurd kan worden. Bovendien zijn de verkregen polymeersomen zeer stabiel en blijft de structurele integriteit tenminste enkele maanden behouden. Met PBLG₅₀-E werden polymeersomen gemaakt met een goed gedefinieerde diameter die gevarieerd kon worden tussen 200 en 2000 nm. De algemene toepasbaarheid van deze techniek werd verder gedemonstreerd met geladen, peptide bevattende blokcopolymeren, niet-covalente blokcopolymeren en traditionele coiled-coil blokcopolymeren. Deze techniek blijkt erg praktisch en snel te zijn waarbij geen speciale apparatuur nodig is, en toepasbaar is voor veel verschillende blokcopolymeren.

In hoofdstuk 7 werden de peptiden E en K geconjugeerd aan een fosfolipide, waardoor deze hybride moleculen (LPE en LPK) verankerd konden worden in lipide bilagen zoals

synthetische liposomen of celmembranen. Deze moleculen werden ontwikkeld om een minimaal model te maken voor membraanfusie geïnspireerd op het natuurlijke SNARE eiwit complex. Experimenteel werd aangetoond dat dit modelsysteem dezelfde karakteristieken heeft als de SNARE eiwit complexen. LPE en LPK bootsen niet alleen de structurele eigenschappen van de SNARE eiwitten na maar ook de eigenschappen die fusie drijven. Wanneer twee populaties liposomen, gedecoreerd met LPE of LPK, gemengd werden, werd een snelle fusie waargenomen, waarbij de lipiden van de liposomen zich vermengen, evenals de inhoud zonder dat lekken plaatsvindt. De fusie wordt niet gedreven door membraan spanning en lipiden met een negatieve kromming hinderen het fusieproces. Dit is het eerste model voor membraanfusie met behulp van SNARE eiwitten die alle belangrijke eigenschappen in zich heeft zoals ze ook voorkomen in de cel en is daarom geschikt voor onderzoek aan de fusie van liposomen in vivo.

Zoals dit proefschrift al impliciet aangaf, zijn de mogelijke componenten, architecturen en eigenschappen van peptide-polymer blokcopolymeren zeer divers. De conjugatie van zulke zeer verschillende blokken is echter niet triviaal. In hoofdstuk 8 wordt een overzicht gegeven van de meest recente synthetische methoden die gebruikt worden voor de synthese van deze hybride moleculen.

PERSPECTIEVEN

De zelf-assemblage van de peptiden E en K en de coiled-coil vorming zijn in detail bestudeerd. De experimentele bevindingen werden ondersteund en uitgebreid door moleculaire dynamische (MD) simulaties. De volgende stap die genomen zou moeten worden is het gebruik van computer simulaties die bijdragen aan het ontwerp van een coiled-coil eenheid die een bepaald synthetisch biologisch doel dient. Met drie repeterende heptameren is het bestudeerde E/K complex één van de kortste heterodimerische coiled-coil vormende eenheden die gesynthetiseerd zijn. Uiteraard heeft de lengte van de coiled-coil invloed op de systemen waarop ze toegepast wordt. Het ontwerp van peptiden met drie of meer repeterende heptameren is goed beschreven in de literatuur, maar coiled-coil complexen gebaseerd op peptiden met slechts twee repeterende heptameren leidt alleen tot de vorming van stabiele homodimeren, Omdat computer simulaties toegang bieden tot de bepaling van de bijdrage aan de bindingsenergie van elk aminozuur, zou het mogelijk moeten zijn om met deze simulaties peptiden te ontwerpen die in staat zijn om heterodimerische coiled-coils te vormen. Uit de simulaties bleek dat sommige aminozuren een zeer destabiliserende rol spelen bij de vorming van het E/K coiled-coil complex, met name het negatief geladen glutaminezuur (Glu). Deze werden vervangen door neutraal polaire aminozuren. Op deze manier werd er een peptide gesynthetiseerd met twee repeterende heptameren dat een homodimeer coiled-coil complex vormt, maar tot dusver is het niet mogelijk gebleken een stabiel heterodimeer complex te vormen. Er is dus op dit gebied meer onderzoek noodzakelijk.

In dit proefschrift werd de eenvoudige vraag gesteld of het mogelijk is om een coiled-coil complex te functionaliseren met hydrofobe eenheden waardoor nieuwe functies verkregen konden worden. Kunnen de coiled-coil peptiden nog steeds functioneren wanneer ze verankerd worden in een supramoleculair aggregaat? Voor het beantwoorden van deze fundamentele vragen werden coiled-coil hybride moleculen gesynthetiseerd en hun zelf-assemblage gedrag onderzocht. Zoals vaak het geval is wanneer een nieuw en onbekend terrein verkend wordt bleken er onverwachte consequenties te zijn en delen van het beschreven werk uit dit proefschrift wordt op dit moment verder ontwikkeld voor mogelijke toepassingen. PBLG-E en PBLG-K vesicles hebben veel potentie als drug delivery systemen waarbij moleculen geëncapsuleerd kunnen worden in het water bevattende interieur van de vesicles of in het hydrofobe membraan. Tevens zijn de nanocapsules eenvoudig te modificeren, met een grote variatie in de dikte van het membraan en oppervlakte chemie waaruit gekozen kan worden. De vesicles worden ontwikkeld om te kunnen dienen als leverancier van het influenza vaccin. Gebaseerd op het minimale model voor fusie wordt momenteel een generieke methode ontwikkeld om medicijnen in de cel te brengen. Verder zijn er nog meer toepassingen mogelijk voor het membraanfusie model: het leveren van fluorescente DNA markers aan cellen, het overbrengen van calcium carbonaat aan monolagen, het testen van *in situ* atomic force microscopie en het toevoegen van nog een orthogonale dimensie door het fuseren van liposomen die fiber vormende coiled coils bevatten.

In dit proefschrift werd een coiled-coil motief gebruikt in combinatie met andere bouwstenen waarmee de zelfassemblage van de coiled-coil eenheden gecontroleerd kon worden en waarbij er bijna ongelimiteerde mogelijkheden zijn voor het ontwerpen van functionele systemen die gebruik maken van een coiled coil motief.