



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Lipid bilayers decorated with photosensitive ruthenium complexes

Bahreman, A.

Citation

Bahreman, A. (2013, December 17). *Lipid bilayers decorated with photosensitive ruthenium complexes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22877>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/22877>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22877> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Bahreman, Azadeh

Title: Lipid bilayers decorated with photosensitive ruthenium complexes

Issue Date: 2013-12-17

Samenvatting (Summary in Dutch)

Algemene inleiding (H 1)

Polypyridyl-rutheniumcomplexen worden veel gebruikt in fotochemie.^[1-2] Hun fotofysische eigenschappen kunnen worden verfijnd om de gewenste reactie te krijgen als ze met licht worden beschenen met licht. Rutheniumcomplexen, in het bijzonder die met een verstoord-octaëdrische geometrie, kunnen een ligand vervangen voor een oplosmiddelmolecuul wanneer ze worden beschenen met zichtbaar licht (400-600 nm).^[3]

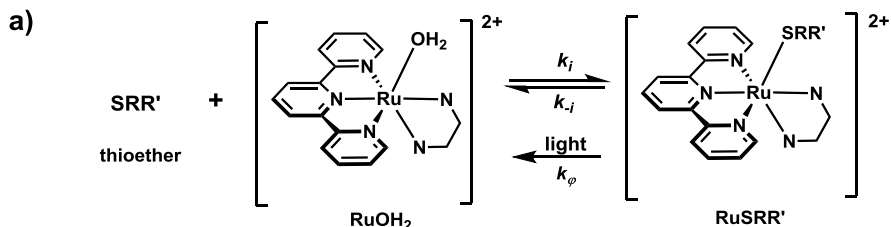
Twee mogelijke toepassingen van dit soort verbindingen worden besproken: allereerst als lichtgestuurde moleculaire machines en ten tweede als antikankermedicijn dat door licht geactiveerd kan worden. In dit proefschrift wordt er verbinding gelegd tussen deze twee toepassingen door gebruik te maken van een membraan van een dubbele laag van vetten. In het eerste deel van het in dit proefschrift beschreven werk zijn fotosubstitutiereacties van rutheniumverbindingen bestudeerd op het oppervlak van membranen, om natuurlijke moleculaire machines na te bootsen. Door monodentaatliganden in het membraan te binden kan het rutheniumcomplex thermisch aan het membraan binden terwijl het weer worden losgemaakt door bestraling met licht; op deze manier kan een model van een lichtbestuurde moleculaire transporteur worden gerealiseerd. In het tweede deel van het beschreven werk worden dezelfde membranen met daarop verankerde, lichtgevoelige rutheniumcomplexen beschouwd als mogelijke fotochemotherapeutica, omdat het ruthenium-watercomplex dat vrijkomt bij de bestraling met licht mogelijk cytotoxisch is. De membranen met daarop de rutheniumverbinding, die als prodrug fungeren, zouden naar kankercellen gebracht kunnen worden. Eenmaal opgenomen kunnen ze worden geactiveerd met licht, wat resulteert in een fotosubstitutiereactie waarbij het actieve ruthenium-watercomplex vrijkomt in de cel. Door de fotochemie van rutheniumverbindingen en de biologische eigenschappen van liposomen te combineren, zijn we van een fundamenteel biomimetisch onderwerp, moleculaire beweging, naar het tweede onderwerp gekomen, het meer praktisch gerichte medicijntransport.

Ruthenium-polypyridylcomplexen die springen op het oppervlak van anionische dubbellen van vetten door middel van een lichtgevoelige supramoleculaire verbinding (H 2)

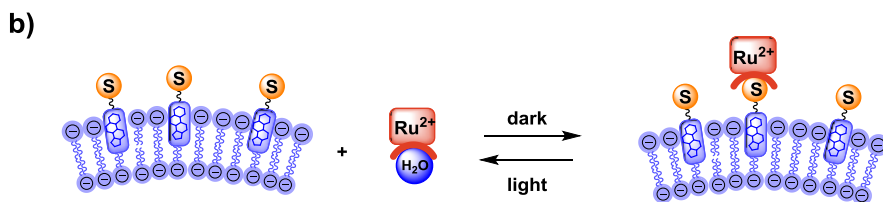
In hoofdstuk 2 is de nieuwe rutheniumverbinding $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{dcbpy})(\text{Hmte})]^{2+}$ (RuHmte) geïntroduceerd (terpy = 2,2';6',2''-terpyridine, dcbpy = 6,6'-dichloro-2,2'-bipyridine, Hmte = 2-methylthioethan-1-ol). Met behulp van kinetiekmetingen en thermodynamische gegevens is aangetoond dat de sterische hindering van de methylgroepen in dcbpy destabilisatie veroorzaakt van zowel het ruthenium-thioethercomplex (afgekort als RuHmte) als ook de waterbevattende verbinding $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{dcbpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (afgekort als RuOH_2). Bij kamertemperatuur en in het donker zijn deze twee verbindingen in thermisch evenwicht. Echter, bestraling van de oplossing met blauw licht resulteert in selectieve substitutie van het thioetherligand door een waterligand, wat het evenwicht verschuift richting de vorming van RuOH_2 (zie schema 7.1a). Het is aangetoond dat deze evenwichtsverschuiving veroorzaakt door licht ten minste vier keer herhaald kan worden in een homogene, waterige oplossing.

Thermisch binden en lichtgeïnduceerde dissociatie van een thioetherligand aan het rutheniumcentrum is ook uitgevoerd op het oppervlak van negatief geladen liposomen (zie schema 7.1b). UV-vis metingen laten zien dat het ruthenium-watercomplex efficiënt coördineert aan een membraangebonden thioetherligand in het donker, en dat tijdens beschijnen met zichtbaar licht de Ru-S-binding selectief wordt verbroken zodat het ruthenium-watercomplex wordt losgelaten. Het is aangetoond dat deze reacties vier keer herhaald kunnen worden door de lichtbron aan en weer uit te schakelen. Hiermee is dus lichtgeïnduceerd 'springen' van een rutheniumcomplex op een membraan van vetten bereikt.

Efficiënt, lichtgestuurde springen van een rutheniumcomplex op het membraan heeft twee vereisten. Allereerst moet de sterische hindering van het rutheniumcomplex hoog genoeg zijn om snelle thermische coördinatie en lichtgeïnduceerde dissociatie mogelijk te maken. Ten tweede moeten de liposomen negatief geladen zijn zodat de rutheniumcomplexen in de buurt van het membraan blijven en weer kunnen binden aan de membraangebonden zwavelliganden. Deze twee zaken worden verder besproken in respectievelijk hoofdstuk 3 en 4.



N—N : a sterically hindered diimine ligand



Schema 7.1. a) Thermisch evenwicht tussen $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{N-N})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ en $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{N-N})(\text{SRR}')]^{2+}$ en de fotosubstitutie van SRR' door H_2O . SRR' is een thioetherligand zoals 2-methylthioethan-1-ol en N-N is een diimineligand zoals dcbpy. b) Lichtgeïnduceerde rutheniumbinding en dissociatie op een negatief geladen membraan.

Spontane vorming in het donker en lichtgeïnduceerde verbreking van een Ru-S-binding in water: een thermodynamische en kinetische studie (H 3)

In hoofdstuk 3 wordt de thermische en fotochemische reactiviteit in water beschreven van vier verwante ruthenium-polypyridylcomplexen met de algemene formule $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{N-N})(\text{Hmte})]^{2+}$ ($\text{N-N} = \text{bpy}, \text{biq}, \text{dcbpy}, \text{of dmbpy}$, zie schema 3.1a). Bij elk van deze complexen wordt de Ru-S-binding verbroken door bestraling met licht, wat resulteert in de vorming van het ruthenium-watercomplex $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{N-N})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (RuOH_2). In dit hoofdstuk is beschreven hoe de sterische hindering van het N-N ligand de thermodynamische stabiliteit en kinetische labiliteit van de RuHmte- en RuOH_2 -complexen in het donker beïnvloedt. De kinetiek van de van fotosubstitutiereacties is ook gerapporteerd.

Met toenemende sterische hindering van het N-N ligand, wordt de snelheid van thermische binding aan en thermische dissociatie van het Hmte -ligand van het rutheniumcentrum vergroot. Een verschuiving is waargenomen langs de serie van bpy , biq , dcbpy , en dmbpy , van een zeer langzaam thermisch evenwicht tussen RuOH_2 en RuHmte met $\text{N-N}=\text{bpy}$, tot een zeer snel evenwicht met $\text{N-N}=\text{dmbpy}$.

De grotere labiliteit van de gehinderde complexen in water wordt niet veroorzaakt door een verandering van de activeringsenthalpie van de substitutiereactie ($\Delta H^\ddagger$), maar door een verandering van de activeringsentropie $\Delta S^\ddagger$, die negatief is voor bpy en biq en positief is voor dcbpy en dmbpy. Deze verandering in de activeringsentropie geeft aan dat er een verandering is in het mechanisme van de substitutiereactie, van een associatief mechanisme voor de verbindingen met bpy en biq ($\Delta S^\ddagger < 0$) naar een dissociatief mechanisme voor de complexen met dcbpy en dmbpy ($\Delta S^\ddagger > 0$).

De kwantumefficiëntie van de fotoverbreking van de Ru-S-binding neemt ook toe langs de serie van N-N = bpy, biq, dcbpy, en dmbpy. In het algemeen zijn er twee voorwaarden gevonden om het evenwicht tussen RuHmte en RuOH₂ in water met licht te verschuiven. Allereerst moet de thermodynamische stabiliteit van het RuHmte-complex in het donker in water groter zijn dan dat van RuOH₂ ($k_{-i} < k_i$) om te leiden tot de spontane vorming van de ruthenium-thioetherverbinding. Echter, RuHmte wordt niet gevormd als de instelling van het thermische evenwicht te langzaam is, zoals in het geval van het complex met het minst-gehinderde ligand bpy, omdat er niet genoeg thermische energie is om de activeringsbarrière van de coördinatiereactie te overwinnen. Ten tweede moet de snelheid van de fotosubstitutie van het Hmte-ligand voor een waterligand hoger zijn die van de analoge thermische substitutiereactie ($k_{-i} < k_\phi$, zie schema 7.1a). Voor het complex met het meest sterisch-gehinderde ligand dmbpy geldt dit niet; de thermische labiliteit van het RuHmte-complex is zo hoog dat licht geen significante verschuiving kan veroorzaken in het evenwicht tussen RuHmte en RuOH₂. De conclusie is dat alleen de complexen die niet al te zeer gehinderd zijn, namelijk die met N-N=biquinoline en dcbpy, geschikt zijn voor de verschuiving van het evenwicht tussen RuHmte en RuOH₂ met licht.

Het binden van een rutheniumcomplex aan een thioetherligand dat gebonden is aan een negatief geladen dubbellaag van vetten: een tweestapsmechanisme (H 4)

Negatief geladen membranen zijn nodig voor de binding van ruthenium-watercomplexen aan membraangebonden thioetherliganden, zoals besproken in hoofdstuk 2. In hoofdstuk 4 wordt de rol gerapporteerd van de negatieve lading van de membranen in de coördinatiereactie die plaatsvindt op het water-membraan grensvlak. De interactie van het complex $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{dcbpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ met fosfolipidemembranen die neutrale thioetherliganden of cholesterol bevatten, is bestudeerd door gebruik te maken van drie verschillende technieken: UV-visible spectroscopie, oppervlakedrukmetingen aan Langmuir-Blodgett monolagen en Isothermische Titratie-Calorimetrie (ITC).

De resultaten van de eerste techniek toonden aan dat de reactie van de rutheniumverbinding met de thioetherliganden langzamer wordt wanneer de elektrostatistische interactie tussen de rutheniumkationen en de negatief geladen liposomen wordt afgeschermd door een grotere ionsterkte van de oplossing. Adsorptie van het dikationische rutheniumcomplex op het oppervlak van de negatieve membranen speelt dus een prominente rol in de vorming van de Ru-S coördinatieverbinding.

Informatie over de tijdsschaal van dit adsorptiefenomeen en over de thermodynamica is verkregen uit de metingen van de oppervlaktedruk van een monolaag van vetten en uit ITC metingen. Het is aangetoond dat de adsorptie van het ruthenium-watercomplex aan het oppervlak van de negatief-geladen monolagen en dubbellaagen veel sneller is (minuten) dan coördinatie aan de thioetherverbinding (liganduitwisseling) (uren). Bovendien bleek het adsorptiefenomeen endotherm te zijn, oftewel gedreven door entropie. Gebaseerd op deze resultaten is een tweestapsmechanisme voorgesteld voor de binding van het dikationische metaalcomplex aan thioetherliganden die verankerd zijn in negatief-geladen liposomen. In de eerste stap adsorbeert de buitenste laag van een negatief geladen dubbellaag van vetten de positief geladen metaalcomplexen, en in de tweede stap wordt de Ru-S verbinding gevormd via tweedimensionale diffusie van beide reagentia op het membraan (zie Schema 4.2). Deze tweestapsreactie op negatief geladen membranen is sneller dan de corresponderende Ru-S vorming in een homogene oplossing.

Ruthenium-gefunctionaliseerde liposomen: naar een tumor-gerichte, licht-gecontroleerde antikanker geneesmiddel (H 5)

In hoofdstuk 5 is de potentiële toepassing beschreven van liposomen die gefunctionaliseerd zijn met lichtgevoelige polypyridyl-rutheniumcomplexen. Vier niet-labiele rutheniumcomplexen zijn gemaakt met de algemene formule $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{N}-\text{N})(\text{SRR}')^{2+}]$ (N-N = bpy of pyri (fenylpyridin-2-ylmethylene-imine), en SRR' = thioetherliganden met een cholesterolstaart). Deze verbindingen zijn allemaal geplaatst op neutrale en negatief geladen liposomen. Alle vier de ruthenium-gefunctionaliseerde liposomen zijn fotoreactief; als oplossingen met deze liposomen worden beschenen met blauw licht, wordt de ruthenium-zwavelbinding verbroken. De fotosubstitutiereacties bleken sneller te zijn bij menselijke lichaamstemperatuur (37 °C) dan bij kamertemperatuur (25 °C), en iets sneller op het oppervlak van neutrale liposomen dan op negatief geladen liposomen.

Celopname-experimenten op menselijke kankercellen lieten zien dat, in afwezigheid van PEG, het verhogen van de netto oppervlaktespanning van de liposomen resulteert in hogere celopname voor HepG2, A2780 en A2780R kankercellijnen. Rutheniumgefunctionaliseerde liposomen bestaande uit neutrale vetten worden beter opgenomen dan de analoge liposomen van negatief geladen lipiden. Echter, wanneer gePEGyleerde vetten geïntroduceerd worden in het membraan, wordt de netto oppervlaktespanning van de resulterende rutheniumgefunctionaliseerde “stealthliposomen” afgeschermd, wat resulteert in een verlaagde celopname vergeleken met PEG-vrije liposomen. In het algemeen heeft de exacte structuur van de rutheniumcomplexen geen significant effect op de celopnameresultaten.

De giftigheidstesten van de neutrale en negatief-geladen “stealthliposomen” gefunctionaliseerd met een van de vier rutheniumcomplexen onder uitsluiting van licht, lieten zien dat deze liposomen in lage mate toxisch zijn voor A2780 en A2780R cellijnen, zonder significante verschillen tussen de vier rutheniumcomplexen. De cytotoxiciteit op HepG2 cellen is ook bepaald na bestraling met licht van één van de rutheniumcomplexen gebonden aan niet-gePEGyleerde liposomen. Het resultaat is dat bestraling met licht leidt tot een minimaal 40% hogere cytotoxiciteit ten opzichte van de cytotoxiciteit in het donker. Bij neutrale liposomen is dit effect het sterkst en is de cytotoxiciteit na bestraling met licht zelfs 80% hoger. Op basis van deze resultaten kan geconcludeerd worden dat het gebruik van ruthenium-gefunctionaliseerde liposomen veelbelovend is voor gecontroleerde afgifte van antikankermedicijnen.

Sensitizatie met geel licht van een ligand-fotosubstitutiereactie in een ruthenium-polypyridylcomplex dat covalent gebonden is aan een rhodaminekleurstof (H 6)

In hoofdstuk 6 wordt de mogelijkheid besproken om de fotoactivering van polypyridyl-rutheniumcomplexen uit te bereiken met langere golflengtes. Zoals vermeld in hoofdstuk 1 zijn verscheidene polypyridyl-rutheniumcomplexen voorgesteld als lichtactiveerbare medicijnen voor fototherapie. Echter, hun potentiële toepassing *in vivo* is gelimiteerd, omdat ze voornamelijk blauw licht (450 nm) absorberen, waarvan bekend is dat het zeer slecht doordringt in menselijk weefsel.

De fotosubstitutie van een thioetherligand op een rutheniumcomplex door een watermolecuul is bestudeerd met geel licht (570 nm). Een rhodamine-B kleurstof met een hoge molaire absorptie voor geel licht is covalent gebonden via een korte verzadigde linker aan het terpyridineligand Rtepy in het complex $[\text{Ru}(\text{Rtepy})(\text{bpy})(\text{Hmte})]^{2+}$. Het uitstekende antenn-effect van de rhodamine-B kleurstof, gekoppeld aan efficiënte energieoverdracht naar het rutheniumcentrum via

het omgekeerde Förstermechanisme, resulteerde onverwacht in snellere fotosubstitutie van het thioetherligand door bestraling met geel licht dan met blauw licht.

In hoofdstuk 6 is de snelheid van fotosubstitutiereacties besproken wanneer fotonen met onvoldoende energie, vergeleken met dat van de ¹MLCT toestand, zijn gebruikt. Voor zowel het rhodamine-B-gefunctionaliseerde rutheniumcomplex en voor zijn antenneloze equivalent [Ru(terpy)(bpy)(Hmte)]²⁺ zijn de kwantumopbrengsten vergelijkbaar voor blauw of geel licht. Sterker nog, bij een constante fotonflux is het de extinctiecoëfficiënt die de snelheidsconstante van fotosubstitutie het meest beïnvloedt voor deze complexen, terwijl de kwantumopbrengst van fotosubstitutie nauwelijks afhangt van de gebruikte golflengte.

References

- [1] V. Balzani, A. Juris, *Coord. Chem. Rev.* **2001**, 211, 97-115.
- [2] K. Kalyanasundaram, *Coord. Chem. Rev.* **1982**, 46, 159-244.
- [3] S. Bonnet, J.-P. Collin, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1207-1217.
- [4] P. Zhang, W. Steelant, M. Kumar, M. Scholfield, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 4526-4527.
- [5] R. Weissleder, V. Ntziachristos, *Nat. Med.* **2003**, 9, 123-128.
- [6] M. von Delius, E. M. Geertsema, D. A. Leigh, *Nature Chem.* **2010**, 2, 96-101.
- [7] D. A. Leigh, J. K. Y. Wong, F. Dehez, F. Zerbetto, *Nature* **2003**, 424, 174-179.
- [8] L. Simeone, G. Mangiapia, G. Vitiello, C. Irace, A. Colonna, O. Ortona, D. Montesarchio, L. Paduano, *Bioconjug. Chem.* **2012**, 23, 758-770.
- [9] G. Mangiapia, G. D'Errico, L. Simeone, C. Irace, A. Radulescu, A. Di Pascale, A. Colonna, D. Montesarchio, L. Paduano, *Biomaterials* **2012**, 33, 3770-3782.

List of Publications

Efficient Synthesis of Pyrrolo[2,1-a]isoquinoline and Pyrrolo[1,2-a]quinoline Derivatives in Aqueous Media

Kianmehr, E.; Estiri, H.; Bahreman, A.; *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, *46*, 1203

Ruthenium polypyridyl complexes hopping at anionic lipid bilayers via a supramolecular bond sensitive to visible light

Bahreman, A.; Limburg, B.; Siegler, M.A.; Koning, R.; Koster, A.J.; Bonnet, S.; *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10271.

Spontaneous formation in the dark, and visible light-induced cleavage, of a Ru-S bond in water: a thermodynamic and kinetic study

Bahreman, A.; Limburg, B.; Siegler, M.A.; Bouwman E.; Bonnet, S.; *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 9456.

Activation of a photodissociative ruthenium complex by triplet-triplet annihilation upconversion at liposomes

Askes S.H.C; Bahreman A.; Bonnet S.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, in press.

Yellow-light sensitization of a ligand photosubstitution reaction in a ruthenium polypyridyl complex covalently bound to a rhodamine dye

Bahreman, A.; Cuello-Garibo J. A.; Bonnet S.; *submitted for publication.*

Binding of a ruthenium complex to a thioether ligand embedded in a negatively charged lipid bilayer: a two-step mechanism

Bahreman, A.; Rabe M.; Kros A.; Bruylants G.; Bonnet S.; *submitted for publication.*

Light-induced releasing of a cytotoxic ruthenium complex supported at the surface of a liposome drug carrier

Bahreman A.; Van Geest E.; Heger M.; Balemans C.; Lupica-Spagnolo L.; Bonnet S.; *manuscript in preparation.*

Curriculum Vitae

Azadeh Bahreman was born in Babol, Iran and grew up in Tehran, Iran. In the last year of high school she became interested in Chemistry while preparing for the national undergraduate entrance examination (Concours). After successfully passing the Concours in 2000, she chose to study pure chemistry in Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. After obtaining her bachelor degree she worked in the Tehran International High School as a chemistry laboratory assistant until 2006. She then decided to continue studying chemistry and passed the national graduate entrance exam, to start a MSc's degree in organic chemistry at the University of Tehran. She performed her Master project under the supervision of Dr. E. Kinamehr and worked on the one-pot synthesis of new pyrrolo [1, 2- α] quinoline derivatives and on synthetic methodology for the ipso-substitution of aryl boronic acids. In parallel, she was cooperating as a part-time research assistant with the Chemical Processes Investigation Center of the Chemical Engineering College of the University of Tehran on the production of industrial amines. After obtaining her Master degree in 2008, she was employed in the Barzegar Zonouz research institute, Tehran, Iran as a research expert to work on a hydroformylation project.

In November 2009 she got a position at the Leiden Institute of Chemistry to pursue her PhD under the supervision of Dr. S. Bonnet and Prof. Dr. E. Bouwman on a multi-disciplinary project in the field of bioinorganic photochemistry. During her PhD she collaborated with several research groups such as the Department of Experimental Surgery of the Academic Medical Center in Amsterdam, and the Molecular and Biomolecular Engineering group at the Free University in Brussels. She attended several postgraduate courses and schools organized by the Holland Research School of Molecular Chemistry (HRSMC). In addition, she participated in general training courses such as Effective communication, Time management, and Scientific Integrity organized by the Leiden University graduate school. As a part of the PhD program, she also contributed in assisting several general and organic practical courses and also supervised several MSc students (Lucia Lupica Spagnolo, Jordi-Amat Cuello-Garibo, Rehana Sukhrie, Erik van Geest), and BSc students (Matthew Everhart, Collin Balemans, Michiel Langerman).

She presented her PhD work at several national and international conferences including the HRSMC annual symposia (2010 and 2013 Leiden, 2011 Amsterdam), the Leiden Institute of Chemistry annual Reedijk symposium (2010, Leiden), the NWO-CW Organic Chemistry and Synthesis Study Group Meetings (2010 and 2012 Lunteren), the CHAINS conference (2011, Utrecht), the COST meeting “Supramolecular chemistry in water” (2012, Riccione, Italy), the KNCV Wageningen meeting (2012, Wageningen), and the Gordon Research Photochemistry Conference (Boston, MA, USA). She was awarded two poster prizes in two consecutive HRSMC symposia.

Nawoord

(Acknowledgements)

The COST action 1005 “Supramolecular chemistry in water” (European Cooperation in Science and Technology) is acknowledged for providing a grant to attend a COST meeting in Italy, and a grant for a short-term scientific mission in Belgium. Dr. Gilles Bruylants (Université Libre de Bruxelles, Belgium) is kindly acknowledged for his hospitality and supervising in Brussels. Dr. Alexander Kros and Martin Rabe are acknowledged for the scientific discussion and their help with Langmuir-Blodgett monolayer surface pressure measurements. Dr. Michal Heger (Academic Medical Center, University of Amsterdam) is acknowledged for his scientific help with in vitro tests and performing experiments on HepG2 cells. Dr. Maxime Siegler (Johns Hopkins University, USA) determined the crystal structures of the compounds described in Chapter 2 and 3, Jos van Brussel carried out elemental analyses and ICP-OES measurements, John van Dijk performed ESI-Mass analysis, and Hans van den Elst performed HR-Mass spectrometry analysis; they are all kindly acknowledged for their help. Prof. Abraham Koster, Dr. Roman Koning, and Christoph Diebolder (Electron Microscopy group, Leiden University Medical Center) performed Cryo-transmission electron microscopy of liposome samples are kindly acknowledged. Bart Limburg contributed to Chapters 2 and 3, Erik van Geest contributed to Chapter 5 and Dutch Summary, Collin Balemans and Lucia Lupica Spagnolo contributed to Chapter 5, and Jordi-Amat Cuello-Garibo contributed to Chapter 6; are kindly acknowledged. Dr. Pablo Contreras-Carballada for the scientific discussion about Chapter 6, Hans den Dulk, Dr. Bianka Siewert, Dr. Samantha Higgins, and Steven Hiemstra for their help to perform cell experiments in Leiden, and finally Geert Daudey for synthesizing a WALP peptide used for part of my research; they are all kindly acknowledged.

