



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Coiled-coil mediated liposomal fusion: Asymmetric behaving peptide fusogens

Daudey, G.A.

Citation

Daudey, G. A. (2018, December 5). *Coiled-coil mediated liposomal fusion: Asymmetric behaving peptide fusogens*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/67109>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/67109>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/67109> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Daudey, G.A.

Title: Coiled-coil mediated liposomal fusion: Asymmetric behaving peptide fusogens

Issue Date: 2018-12-05

SAMENVATTING

Voor een ordelijke gang van zaken in onze samenleving is een accurate logistiek voor voedingsmiddelen zeer belangrijk. Met de woorden “De grens tussen menswaardigheid en wetteloosheid is maar 9 maaltijden” beschreef de Amerikaanse schrijver Alfred H. Lewis 100 jaar geleden al deze relatie tussen de beschikbaarheid van voedsel en een waardige samenleving. In ons lichaam, en zelfs in iedere cel gaat dit principe ook op. Wanneer essentiële voedingsmiddelen ontbreken, of zintuiglijke signalen op een verkeerde plaats worden afgeleverd, zullen cellen en organen afsterven en is het hele lichaam in gevaar. Biologisch leven heeft daarom uitgebreide en uitermate snelle bezorgdiensten voor zowel voedingsmiddelen als zintuiglijke informatie met zeer specifieke adressering: speciale eiwitten aangeduid als SNARE-eiwitten. Deze eiwitten zorgen ervoor dat de pakketjes met voedingsmiddelen / afvalstoffen / chemische zintuiglijke informatie bij de juiste cellen herkend en opgenomen worden via zogenoemde fusie mechanismen. De studie van deze fusie mechanismen, en de kunst van het begrijpen en namaken van de moleculaire herkenning van SNARE eiwitten, is van onschatbare waarde voor verschillende academische onderzoeksrichtingen; van biologen die lichamelijke ziekten willen begrijpen en genezen, en biochemici die medicijnen gericht willen afleveren bij ziekteverwekkers, tot materiaalkundigen die nieuwe materialen met bijvoorbeeld zelfhelende eigenschappen willen ontwerpen.

Dit proefschrift beschrijft de studie naar moleculaire herkenning tussen kleine deeltjes met gebruikmaking van 5 verschillende coiled-coil peptide paren. De gebruikte deeltjes zijn stevige ‘zeepbelletjes’, liposomen, met een diameter van 0.1 micrometer. De peptiden zelf hebben een lengte van ongeveer 0.004 micrometer (4 nanometer), en zijn door middel van een flexibele polymeerketen en een cholesterol molecuul verankerd in het liposoommembraan. Interactie tussen verschillende peptiden leidt bij liposomen tot fusie van de liposomen. De efficiëntie van de fusieprocessen geeft inzicht in de onderliggende moleculaire herkenning van de gebruikte peptiden.

In **Hoofdstuk I** wordt de werking uitgelegd van de SNARE-eiwitten in het proces van membraanfusie, en wordt het gebruik beschreven van het coiled-coil peptidepaar E en K als modelsysteem voor het gericht afleveren van medicijnen in cellen.

Hoofdstuk II focust op de invloed van de lengte van de poly(ethylene glycol) (PEG)-keten en het anker waarmee de peptiden E en K aan het liposoom zijn gebonden, op het fusiemechanisme. De invloed van de PEG-keten op de rol van beide peptiden in het mechanisme werd onderzocht. Liposoom fusie wordt efficiënter met langere PEG ketens voor peptide E, terwijl peptide K een PEG₈ / PEG₁₂ keten prefereert. Gecombineerd met de kennis dat peptide K interactie vertoont met het membraan, kan de dynamiek verklaart worden van de peptiden in de voorstadia van het fusieproces, en het volgende mechanisme wordt voorgesteld: Peptide K is volledig geïncorporeerd in het liposoommembraan, terwijl peptide E zich in de waterige omgeving in de nabijheid van het membraan bevindt. Als twee liposomen elkaar naderen kan peptide E een tijdelijke coiled-coil formatie vormen met peptide K, maar omdat de membraan geïncorporeerde toestand van K energetisch iets gunstiger is dan coiled-coil vorming met peptide E, is er een dynamisch evenwicht tussen de verschillende toestanden. Omdat door de coiled-coil formatie beide membranen dicht tegen elkaar aan worden geforceerd, kan peptide K na initiële coiled-coil vorming een interactie aangaan met beide membranen. Incorporatie van peptide K in het tegenoverliggende membraan brengt beide liposomen nog dichter bij elkaar, destabiliseert beide membranen en verdringt de aanwezige watermoleculen tussen beide membranen, welke de noodzakelijke voorwaarden zijn voor het fuseren van de membranen met elkaar.

In **Hoofdstuk III** wordt de structuur bestudeerd van membraan gebonden peptiden met infrarood spectroscopie, en een onverwachte en significante invloed van lengte van de PEG-keten op de peptidestructuur van peptide E werd waargenomen. Dit peptide heeft weinig interactie met het membraan waarin het verankerd is, maar de invloed van de ketenlengte op de peptide oriëntatie en op de membraandruk waarbij het peptide geen interactie meer heeft met het membraan wijzen op een extra stabilisatie van peptide-interacties bij langere ketenlengte. Bij peptide K werd een sterke interactie met het membraan gemeten die niet afhankelijk is van lengte van de PEG-keten. Wanneer beide peptiden in hetzelfde membraan zijn verankerd, vormt zich een evenwicht tussen E – K coiled-coil interacties en de membraan geïncorporeerde toestand van K. Omdat de laatstgenoemde interactie energetisch iets gunstiger is dan de coiled-coil vorming, is het dynamische evenwicht zichtbaar tussen beide conformaties, welke tot nu toe nooit direct was waargenomen.

Omdat peptide K ook met zichzelf kan associëren resulterend in een zogenaamde homocoil zijn er covalent gebonden peptide dimeren gesynthetiseerd om dit gedrag beter te bestuderen in **Hoofdstuk IV**. De positie en de chemische structuur van deze covalente verbinding tussen twee K peptiden heeft een grote invloed op de homocoil bindingsenergie. Ook het evenwicht tussen inter- en intramoleculaire interacties wordt beïnvloed, d.w.z. interacties van peptiden binnen een dimeer of tussen peptiden behorend tot verschillende dimeren. Deze K – K dimeren zijn ook in staat om fusie te initiëren tussen liposomen die gefunctionaliseerd zijn met peptide E, wat laat zien dat het mogelijk is om een herkenningssysteem te ontwikkelen voor liposoomfusie met zowel verankerde peptiden als niet-verankerde peptiden.

In **Hoofdstuk V** wordt een orthogonale set van coiled-coil peptiden geïntroduceerd. Deze set bevat 8 peptiden, die 4 onafhankelijke coiled-coil peptide paren vormen. Dit geeft de mogelijkheid om het mechanisme van liposoomfusie verder te onderzoeken aan de hand van de verschillen tussen de 4 peptideparen. Deze studie laat een grote invloed zien van de peptidestructuur, de peptide – membraan interactie en de coiled-coil bindingssterkte op de efficiëntie van het fusieproces. Zodra één van de peptiden een interactie vertoont met het membraan, wordt de fusie-efficiëntie drastisch verhoogd. Ook werd er een verband gevonden tussen de heliceit van de peptiden en fusie-efficiëntie; peptiden met een hogere heliceit zorgen voor een hogere fusie-efficiëntie. Opvallend is dat de coiled-coil bindingssterkte voor zover dat kon worden nagegaan geen enkele zichtbare invloed heeft op de fusie-efficiëntie. Een onverwachte en relatief zwakke interactie werd gemeten tussen het positief geladen peptide 1K en het negatief geladen peptide E. Fusie tussen liposomen gefunctionaliseerd met deze peptiden is zelfs efficiënter dan de fusie tussen liposomen gedecoreerd met het originele coiled-coil paar E en K. Deze resultaten laten zien dat liposoomfusie gemedieerd door coiled-coil peptiden sterk afhangt van de karakteristieke eigenschappen van de peptiden, en geeft nieuwe inzichten in het mechanisme van membraanfusie.