



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Coiled-coil biomaterials for biological applications

Shen, M.

Citation

Shen, M. (2021, November 24). *Coiled-coil biomaterials for biological applications*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3243305>

Version: 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/1887/3243305>

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



Chapter 7

**Nederlandse
Perspectieven**

Samenvatting

en

Coiled coils zijn een belangrijk structuurmotief in eiwitten, en zijn essentieel voor het verloop van diverse biologische processen. De mogelijkheid om coiled-coil structuren te ontwerpen met geprogrammeerde oligomerisatie en oriëntatie maakt ze een ideaal motief voor de ontwikkeling van responsieve en bioactieve materialen. In dit proefschrift wordt de heterodimerische coiled coil “E/K” gebruikt voor de ontwikkeling van een nieuwe protocollen om cellen te scheiden en om membraanfusie tussen liposomen en biologische membranen te stimuleren.

In **hoofdstuk 2** is een nieuwe methode voor de scheiding van cellen deeltjes met behulp van magnetische (magnetic-activated cell sorting, MACS) ontwikkeld, gebaseerd op de coiled coil interactie tussen de peptiden K_3 en E_3 . Divynylsulfon gemodificeerd dexraan (Dextran-DVS) is gesynthetiseerd en toegepast als coating voor magnetische ijzeroxide deeltjes (IOPs). Deze coating strategie maakt het niet alleen mogelijk om IOPs te functionaliseren, maar geeft ook de mogelijkheid om de hoeveelheid functionele groepen op de IOPs te controleren door de substitutiegraad (DS) van Dextran-DVS aan te passen. Introductie van cysteïne in peptide E_3 en K_3 resulteert in de synthese preparatie van magnetische deeltjes gemodificeerd met coiled-coil peptiden; IOPs- E_3 en IOPs- K_3 . Succesvolle functionalisatie van de magnetische deeltjes wordt aangetoond door tryptofaan-fluorescentie van de peptiden, alsmede door de binding van de complementaire coiled-coil peptide voorzien van een fluorescent label. Een MACS experiment was uitgevoerd met zowel IOPs- E_3 als IOPs- K_3 en cellen gefunctionaliseerd met de complementaire lipopeptiden (respectievelijk CPK $_3$ of CPE $_3$). Het gebruik van IOPs- E_3 resulteerde in een efficiënte scheiding van cellen met CPK $_3$ op het oppervlakte en cellen zonder deze peptide na toepassing van een extern magnetisch veld. Dit nieuwe MACS protocol is getest op drie verschillende cellijnen (Hela, CHO en NIH3T3), met een hoge selectiviteit voor gelabelde cellen in alle gevallen. Een extra voordeel van dit systeem is de eenvoudige dissociatie van cellen gebonden aan IOPs door gebruik van trypsine, wat resulteerde in een hoge levensvatbaarheid van de gescheiden cellen. Uitvoering van het MACS protocol met IOPs- K_3 resulteerde in slechte scheiding tussen cellen, waarschijnlijk door elektrostatische interacties tussen de positief geladen K_3 peptiden en het negatief geladen celmembraan. Deze elektrostatische interacties beïnvloeden de dissociatie van cellen van de IOPs negatief. Als laatste stap zijn de drie cellijnen gemodificeerd zodat K_3 gepresenteerd wordt op het celmembraan, en IOPs- E_3 is gebruikt voor hun scheiding. Met behulp van MACS kon de concentratie van K_3 -producerende cellen verrijkt worden. Deze studie laat de voordelen zien van coiled

coils als een nieuwe, niet-covalente conjugatiemethode voor het scheiden van cellen. Het beschreven MACS protocol kan worden gebruikt in verschillende biomedische toepassingen, zoals celscheiding na genetische modificatie.

In **hoofdstuk 3** is de fusogeniciteit van coiled-coil peptiden als functie van de peptidelengte onderzocht. Voor dit onderzoek zijn varianten van peptiden K en E gesynthetiseerd met een sequentie die bestond uit drie-, vier- of vijf- keer dezelfde 'heptad repeat'. De secundaire structuur van de vier en vijf heptad-peptiden induceert homodimerisatie, waarbij peptide K meer homodimerisatie vertoont dan peptide E. K_n -peptiden demonstreerden ook een hogere thermische stabiliteit in vergelijking met E_n -peptiden van dezelfde lengte, waarbij langere peptiden in het algemeen een hogere thermische stabiliteit vertoonden. De stabiliteit van E_n/K_n coiled coils vertoonde dezelfde trends als voor de peptiden op zichzelf. Denaturatie experimenten met guanidine hydrochloride (GdnHCl) suggereerden zelfassemblage voor peptiden K_5 en E_5 . Gelipideerde varianten van peptiden met verschillende lengtes (CPK_n en CPE_n) werden gesynthetiseerd en de fusogeniciteit van deze peptiden is getest in experimenten die de menging van lipiden-membranen en de inhoud van liposomen kan aantonen. De K_5 - E_4 coiled coil vertoonde de hoogste fusogeniciteit in deze fusie-experimenten. Vervolgens zijn de peptiden ook getest in cel-labeling experimenten, met als resultaat dat alle CPK_n varianten in staat zijn om aan de buitenkant van cellen te binden en coiled coils te vormen met complementaire E_n peptiden. Bindingsstudies tussen liposomen met CPE_n en celmembranen gemodificeerd met CPK_n laten zien dat de grootste hoeveelheid liposoom binding verkregen wordt door de peptiden met 4 of 5 heptad repeats. Geselecteerde coiled coils zijn verder onderzocht voor hun capaciteit om membraanfusie te faciliteren. CPK_4/CPE_4 leverde de beste resultaten op in cell-liposoom fusie, terwijl de CPK_5/CPE_4 de hoogste efficiëntie vertoonde in fusiestudies met liposomen. Deze resultaten laten zien dat liposoom-binding door coiled-coils met K_5 niet direct translateert in efficiënte aflevering van de inhoud van liposomen in cellen. Dit is waarschijnlijk omdat peptide K_5 een homodimeer kan vormen wat de interactie met het membraan verzwakt, mogelijk resulterend in minder efficiënte formatie van fusieporiën. In deze studie hebben we nieuwe informatie verkregen over de structuur, zelfassemblage, thermische stabiliteit en fusogeniciteit van coiled-coil peptiden met verschillende lengtes. Deze resultaten laten zien dat fusogeniciteit niet alleen afhankelijk is van de stabiliteit van de coiled coil, maar ook beïnvloed wordt door competitieve interacties tussen peptiden

ondercing en met lipidenmembranen. Deze studie helpt de ontwikkeling van nieuwe fusogene moleculen met potentiële applicaties in medicijn afgifte doormiddel van liposoom fusie met complexe biologische membranen.

In het E/K membraanfusiesysteem wordt er een coiled-coil gevormd tussen peptide E en K om twee lipidenmembranen samen te brengen, maar van peptide K is ook bekend dat deze interacties heeft met het lipidenmembraan zelf, wat efficiëntere fusie van membranen faciliteert. In **hoofdstuk 4** zijn drie verschillende dimeren van peptide K ontworpen, geprepareerd en gekarakteriseerd, gebaseerd op de aanname dat dimeren van peptide K tegelijkertijd coiled coil en membraaninteracties kunnen vormen en daardoor de efficiëntie van membraanfusie verhoogd wordt. De parallelle K_4 dimeer (PK_4) vormde peptiden-aggregaten in oplossing, welke verdwenen na toevoeging van zijn coiled coil bindingspartner E_4 , resulterend in de vorming van heterodimerische coiled coils. De lineaire dimeren van K_4 (NLK_4 of CLK_4) zelf-assembleerden als ‘tetrameer-achtige’ homodimeren. Deze zeer stabiele structuren waren niet in staat om een heterodimerische coiled coil te vormen met peptide E_4 , wat waarschijnlijk efficiënte membraan fusie inhibeert. De hoogste affiniteit voor lipidenmembranen is gemeten voor PK_4 in vergelijking met K_4 en de twee lineaire K_4 -dimeren. De fusogeniciteit van alle K_4 varianten werd bepaald door middel van lipide en inhouds-menging experimenten. Zoals verwacht resulteerde het coiled-coil paar PK_4/CPE_4 in de meest efficiënte fusie in beide experimenten, waarbij de lineaire dimeren van K_4 alleen lage levels van membraanfusie induceerde. Dit is consistent met de hypothese dat de membraanaffiniteit van peptide K gerelateerd is aan de fusogeniciteit van de heterodimerische coiled-coil. Fusie van liposomen met celmembranen was succesvol met PK_4/CPE_4 en resulteerde in efficiënte aflevering van propidium iodide (PI) in de cellen. Deze studie help ons met het begrijpen van de zelfassemblage van peptiden, de membraanaffiniteit en de fusogeniciteit van coiled coils, wat kan helpen in de ontwikkeling van systemen voor de aflevering van medicijnen gebaseerd op membraanfusie.

Omdat PK_4/CPE_4 een hogere efficiëntie van membraanfusie vertoonde in vergelijking met CPK_4/CPE_4 , is deze in **hoofdstuk 5** gebruikt om fusie tussen bacteriën zonder celwand (L-Forms) te induceren. Twee verschillende soorten L-forms zijn hiervoor gebruikt, beide met twee unieke eigenschappen voor identificatie. Voor deze experimenten produceerde één van de L-forms het eiwit eGFP met resistentie voor het antibioticum hygromycin, en de andere soort bevat

het eiwit mCherry produceerde resistentie voor het antibioticum apramycin. Experimenten met het fluorescente labelen van de membranen lieten zien dat CPE₄ gebruikt kan worden voor het modificeren van L-form membranen met coiled-coil peptiden. Een fusiëstudie tussen de twee L-form soorten is uitgevoerd met het coiled-coil paar PK₄/CPE₄. Gefuseerde L-forms werden verkregen, en verrijkt in medium dat beide eerder genoemde antibiotica bevat. Na meerdere generaties van selectie was de zuiverheid van de dubbel gelabelde fluorescente cellen >97%. Het proces van celdeling werd gevolgd door time-lapse microscopie waarbij de gezondheid van de gefuseerde cellen is aangetoond. We hebben ook geobserveerd dat de gefuseerde L-forms stabiele genexpressie vertoonden van beide originele cellijnen, en dat scheiding van de chromosomen een langzaam proces is. Het werk in dit hoofdstuk presenteert een nieuwe methode, gebaseerd op membraanfusie tussen cellen, voor het genereren van hybride organismen waarbij meerdere genomen gecombineerd zijn. Dit is een belangrijke stap in het begrijpen van de evolutie van protocellen en het ontwerp van synthetische cellen.

De onderzoeken beschreven in deze thesis laten ook enkele vragen onbeantwoord. Een nieuwe fusogene peptide, PK₄ is ontdekt en er is aangetoond dat de combinatie PK₄/CPE₄ één van de meest fusogene coiled coil combinaties tot op heden. De introductie van deze nieuwe variant maakt het achterliggende fusiemechanisme wel complexer, omdat het daarmee 3 componenten bevat. In toekomstige onderzoeken zou het interessant zijn om cholesterol te conjugeren aan PK₄, ter simplificatie van het modelsysteem en om medicijn aflevering makkelijker te maken. Een ander probleem in het onderzoek naar gefuseerde L-forms is de lastige scheiding van chromosomen na verrijking van gefuseerde cellen door antibiotica-selectie. Het karakteriseren van de genomsequentie van gefuseerde L-forms is een belangrijke stap in het voortzetten van dit onderzoek.

In deze thesis hebben we meerdere biomaterialen met verschillende applicaties ontwikkeld, gebaseerd op coiled-coil peptiden. Het verder ontwikkelen en aanpassen van dit coiled-coil membraanfusie systeem, met de hier vergaarde kennis over de werking van dit systeem, brengt *in vivo* toepassing van membraanfusie voor het afleveren van medicijnen dichterbij. Ten slotte, hybride L-forms verkregen door de coiled-coil fusie van verschillende soorten L-forms zijn een ideaal platform voor onderzoek naar de oorsprong van het leven en de ontwikkeling van nieuwe soorten antibiotica.