



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthetic modification of fusogenic coiled coil peptides

Crone, N.S.A.

Citation

Crone, N. S. A. (2021, December 16). *Synthetic modification of fusogenic coiled coil peptides*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3247291>

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/1887/3247291>

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

Nederlandse Samenvatting

Coiled coil peptiden hebben een sterke en selectieve binding die verenigbaar is met biologische systemen. Deze eigenschappen maken coiled coil peptiden de ideale bouwsteen in de synthetische biologie. In deze thesis wordt een synthetisch membraanfusie system onderzocht, gebaseerd op de peptiden 'E' en 'K', die in combinatie een dimerische coiled coil vormen. Verschillende structurele varianten van deze peptiden zijn geprepareerd en getest op hun eigenschappen in fusie-experimenten, met als doel het achterliggende mechanisme op te helderen. Om de functionaliteit van dit coiled-coil system te vergroten is de introductie van een licht-actieve azobenzeen groep onderzocht. Het koppelen van de licht-gedreven isomerisatie van de azobenzeen met de structuur van de coiled-coil introduceert een schakel-functie in de activiteit van deze peptiden. Deze schakel functie leidt tot controle over de activiteit van biomoleculen en nano-materialen gebaseerd op deze coiled coil peptiden.

Een vaak voorkomende modificatie van aminozuur zijketens in de natuur is het bevestigen van een palmitinezuur, of andere vetstaart. In **hoofdstuk 2** wordt onderzocht hoe de plaatsing van vetstaarten op de zijketens van aminozuren, in plaats van op de N-terminus, effect heeft op de efficiëntie van membraanfusie. Liposomen gemodificeerd met deze nieuwe peptiden (**fCPK** en **fCPE**) lieten een vergelijkbare of verminderde fusogeniciteit zien, waarbij in het geval van **fCPE** waren deze liposomen niet stabiel. Deze veranderingen zijn toegekend aan de homomerische interacties tussen liposomen gemodificeerd met deze peptide. In eerdere studies zijn de homomerische interacties van peptide E altijd als niet belangrijk beschouwd. De instabiliteit die in deze studie is geobserveerd laat zien dat de homomerische interacties toch een belangrijke rol spelen; ze stabiliseren de peptiden op het oppervlakte van liposomen, nog voordat fusie plaats kan vinden. Daarnaast kan de algemene conclusie getrokken worden dat peptide die terminaal verankert zijn aan het membraan een gelijke of hogere efficiëntie van fusie vertonen.

Eerdere studies naar de interacties van peptide K hebben aangetoond dat deze peptide een affiniteit heeft voor lipidenmembranen, wat is voorgesteld als één van de redenen voor de efficiëntie van het E/K fusiesysteem. In **hoofdstuk 3** wordt deze

theorie verder onderzocht via de preparatie van cyclisch varianten (ook wel bekend als ‘stapled peptides’) van peptide K. Deze cyclische varianten zijn structurele isomeren van elkaar, welke alleen verschillen in de locatie van de modificatie en de grootte van de ring. Dit is gerealiseerd door het verbinden van twee cysteïnes met verschillende dibromoxyleen linkers. Deze cyclisatie strategie resulteerde in meer gevouwen peptiden, sterkere binding en meer stabiliteit van de respectievelijke coiled-coils, wat verklaard wordt door een pre-organisatie mechanisme. Fusie-experimenten met cyclische peptide die een lipide anker bevatten resulteerden in een zeer efficiënte menging van de inhoud van liposomen, welke direct gerelateerd is aan de toename in bindingssterkte van de peptide. Deze resultaten leiden tot de verwerping van de vorige hypothese en stelt dat de bindingssterkte van de coiled coil peptiden de grootste drijfveer is achter de fusie van membranen. Een positief effect op fusie door de interacties van peptide K met lipiden membranen is hiermee niet uitgesloten, maar verdient niet de focus in de optimalisatie van dit systeem.

Omdat de fusie-activiteit sterk afhankelijk was van de bindingsterkte van de coiled-coil, zou het theoretisch mogelijk moeten zijn om deze fusie-activiteit aan of uit te zetten door een actieve component in te bouwen in de binding van de coiled coil peptiden. Deze hypothese wordt onderzocht in **hoofdstuk 4**, waar opnieuw stapled peptides worden gemaakt, maar in dit project is de xyleen linker vervangen door een licht-actieve azobenzeen. Deze azobenzeen heeft twee verschillende isomeren, ‘cis’ en ‘trans’, en isomerisatie tussen deze twee conformaties is mogelijk met behulp van licht. Deze strategie is toegepast op peptide K en resulteerde in controle over zijn structuur met behulp van licht. Coiled-coils met een lengte van 21 aminozuren konden ook tussen verschillende structuren wisselen met behulp van licht. Deze resultaten tonen aan dat deze strategie in principe toepasbaar is, maar synthese van deze varianten met een azobenzeen linker was erg inefficiënt. Voor praktische toepassingen is dus andere methode vereist.

In **hoofdstuk 5** wordt een nieuwe strategie onderzocht voor controle over de self-assemblage van coiled coil peptiden met behulp van licht. Deze strategie maakt gebruik van aminozuren die een azobenzeen groep bevatten, en plaatst deze azobenzeen in het hydrofobe domein van de coiled-coil. Drie verschillende aminozuren met een azobenzeen groep zijn getest; twee daarvan zijn gebaseerd op eerder onderzoek met de structuur van fenylalanine als basis. Het derde aminozuur is een nieuw ontwerp op basis van fenylglycine (genaamd **APgly**). De synthese van peptide K varianten met deze aminozuren was eenvoudig en de azobenzeen

groepen vertoonden na de synthese nog steeds goede isomerisatie eigenschappen. Van de drie varianten vertoonde peptide K met **APgly** het grootste verschil in binding tussen de twee isomeren van de azobenzeen, en de sterkste coiled coil binding in het algemeen. Dit verschil komt waarschijnlijk door de extra methyleen groep in de phenylalanine-derivaten, welke de azobenzeen buiten het hydrofobe domein van de coiled-coil plaatst. Moleculaire simulaties ondersteunen dit idee en lieten ook kleinere structuurveranderingen zien in de positie van de azobenzeen in **APgly** in vergelijking met dezelfde phenylalanine variant. Deze resultaten laten dit zien dat het nieuwe aminozuur **APgly** effectief de binding tussen coiled coil peptiden kan beïnvloeden, wat veroorzaakt wordt door verstoring van het centrale hydrofobe domein in de coiled-coil na foto-isomerisatie van de azobenzeen.

Ditzelfde mechanisme zou in principe toepasbaar moeten zijn op andere peptiden-structuren met een hydrofoob domein. In **hoofdstuk 6** wordt getest of azobenzeen-gemodificeerd phenylalanine (**APhe**) in staat is de structuur en zelf-assemblage van peptiden met een β -structuur te beïnvloeden. Hiervoor zijn peptiden gebruikt die bekend zijn om te assembleren als ' β -sheet' vezels, waarbij de binnenkant van de vezels bestaat uit hydrofobe aminozuren. Zowel de β -sheet structuur als de self-assemblage van deze peptiden kon met licht beïnvloed worden wanneer één van de aminozuren was veranderd tot **APhe**, met de positie in de sequentie van invloed op de oligomerisatie van peptiden vezels. Om te onderzoeken of de structurele veranderingen veroorzaakt door **APhe** isomerisatie leidt tot verschillen in de activiteit van de peptiden, is er een katalytische histidine in de sequentie geïntroduceerd. De hydrolyse van esters, gekatalyseerd door deze peptiden, kon beïnvloed worden door isomerisatie van de azobenzeen, hoewel hier nog geen duidelijk verband tussen de β -structuur en de hydrolyse snelheid geobserveerd is. Dit hoofdstuk bevestigt de hypothese; dat de foto-isomerisatie van azobenzeen bevattende aminozuren ook gebruikt kan worden voor het verstoren van hydrofobe domeinen in β -sheet peptiden.

In deze thesis worden verschillende onderzoeken gepresenteerd met als doel het ontwikkelen van een ideaal synthetisch membraanfusie-systeem. Het aanbrengen van peptiden staples resulteerde in een hogere coiled coil binding, wat direct gerelateerd kan worden met de fusie-efficiëntie van het systeem. Dit onderzoek heeft ook tot de nieuwe hypothese geleid; dat membraanfusie gecontroleerd plaats kan vinden door actieve controle over de bindingsterkte van de coiled-coil. De tweede helft van deze thesis introduceert een nieuwe strategie om zowel coiled

coil peptiden met een α -helix structuur, als die van β -sheet vormende peptide te beïnvloeden met licht. Deze strategie berust op aminozuren met een licht-actieve azobenzeen groep, die de hydrofobe domeinen van deze geassembleerde peptiden verstoort. De α -helix en β -structuur zijn de twee meest voorkomende structuren in eiwitten, en suggereren daarmee dat deze strategie algemeen toepasbaar is in andere peptiden en eiwitten. Deze nieuwe methode gaat hopelijk een brede applicatie vinden in de synthetische biologie, en daarmee een licht schijnen op de complexe eiwit-interacties die voorkomen in de natuur.