

University of Groningen

Peptides in motion

Poloni, Claudia

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Poloni, C. (2016). *Peptides in motion*. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

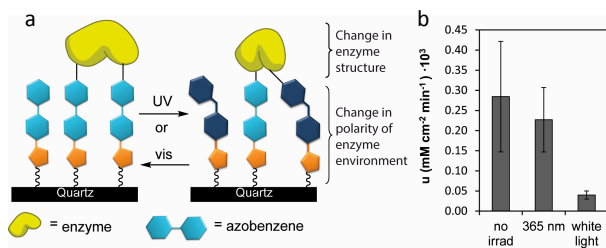
Het beïnvloeden en controleren van biologische processen is sinds mensenheugenis een grote uitdaging voor scheikundigen en biochemici. De mogelijkheid om een specifieke biologische functie te beïnvloeden helpt wetenschappers beter begrip te krijgen van deze functies en processen. Wanneer deze processen zijn gerelateerd aan pathologie biedt het zelfs mogelijkheden om nieuwe inzichten in de ontwikkeling van ziektes te vergaren met als uiteindelijke doel het ontdekken van nieuwe behandelmethoden. Om dit doel te bewerkstelligen kan men gebruik maken van licht als stimulus om desbetreffende biologische processen te beïnvloeden. Licht is niet invasief en meestal bio-orthogonaal: Het verhindert de werking van biologische processen doorgaans niet. Verder leidt het gebruik van licht meestal niet tot contaminatie, behalve wanneer er fotodegradatie of foto-oxidatie optreedt. Tenslotte kan het met grote precisie worden toegepast waarbij functies in tijd en ruimte gecontroleerd worden.

Fotoschakelaars zijn moleculen die een verandering in structuur/geometrie ondergaan na bestraling met licht. De meest gebruikte fotoschakelaars voor de controle van peptiden en eiwitten zijn azobenzenen, stilbenen en diarylethenen. In het eerste hoofdstuk zijn de structuren van deze schakelbare moleculen, en de strategieën om deze te incorporeren in peptiden beschreven. Illustratieve voorbeelden van fotoschakelbare peptiden zijn belicht, met extra focus op de verschillende eiwitdomeinen, zoals foto-gevoelige b-haarspeld en zink-vinger domeinen.

Het eerste gedeelte van dit proefschrift (hoofdstuk 2, 3, 4) beschrijft de ontwikkeling van methodologische manieren om fotoschakelaars in te bouwen in biomacromoleculen. Het tweede gedeelte van dit proefschrift beschrijft twee nieuwe voorbeelden van foto-responsieve peptiden.

In het tweede hoofdstuk is een foto-schakelbaar molecuul, een azobenzeen, gebruikt als verbindingsstuk tussen het lipase enzym van *Candida rugosa* en een kwarts oppervlak (Figuur 1a). De dubbele functionaliteit van dit verbindingsstuk maakt het mogelijk het geïmmobiliseerde enzym te deactiveren door beschijning met zichtbaar licht (Figure 1b). Ondanks de onomkeerbaarheid van het proces is dit systeem het eerste voorbeeld van covalente immobilisatie van een enzym doormiddel van een foto-schakelbaar als verbindingsstuk. Het ontwerp van dit verbindingsstuk doormiddel van twee groepen met orthogonale reactiviteit, maakt het mogelijk om enzymen aan

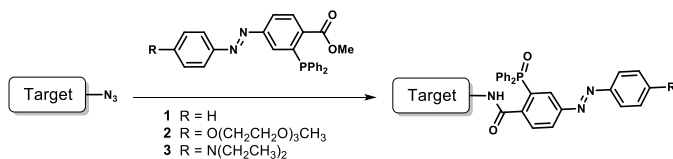
oppervlakken te immobiliseren op een modulaire manier. De gepresenteerde resultaten maken het wellicht mogelijk biosensoren te construeren op een vernieuwende manier. Deze zijn met name geschikt voor analytische toepassingen waar de duur van de enzymatische reactie cruciaal is en gestopt moet worden op een milde manier welke orthogonaal is jegens andere elementen in het systeem.



Figuur 1: a) Ontwerp van een geïmmobiliseerde lipase uit *Candida rugosa* op een kwarts oppervlak doormiddel van een fotoschakelbaar verbindingsstuk. B) specifieke activiteit van het geïmmobiliseerde enzym na beschijning met respectievelijk, $\lambda=365$ nm en wit licht.

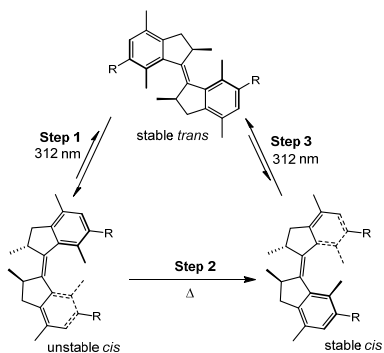
In het derde hoofdstuk is de ontwikkeling van een nieuwe groep azobenzenen fotoschakelaars beschreven. Deze azobenzenen kunnen worden geïntroduceerd in azide-houdende doelmoleculen door middel van een Staudinger-Bertozzi ligatie in zowel waterige als organische media zonder gebruik van additionele reagentia of katalysatoren (Figuur 2). De moleculaire fotoschakelaars die zijn gevormd in deze ligatie vertonen grote stabiliteit voor reversibel schakelen in water, fotostationaire toestand met 95% voorkeur voor de *cis* isomeer, en thermische stabiliteit aangaande de *cis* isomeer van milliseconden tot dagen. In dit hoofdstuk worden verder de mogelijke toepassingen van deze azobenzenen Staudinger tags bestudeerd.

Model studies zijn uitgevoerd aangaande het gebruik van deze moleculen voor de introductie van azobenzenen fotoschakelaars aan kwarts oppervlakken. Om te bevestigen dat deze moleculen gebruikt kunnen worden voor de modificatie van biomoleculen is een selectieve inbouw van het fotochromische residue in de structuur van een azide-gemodificeerde zink vinger uitgevoerd. Pogingen om de foto-schakelaar direct in vaste-fase eiwitsynthese te gebruik zijn niet gelukt door de sterische hinder welke mogelijk veroorzaakt wordt door de nabijheid van de azide functionaliteit tot de drager.



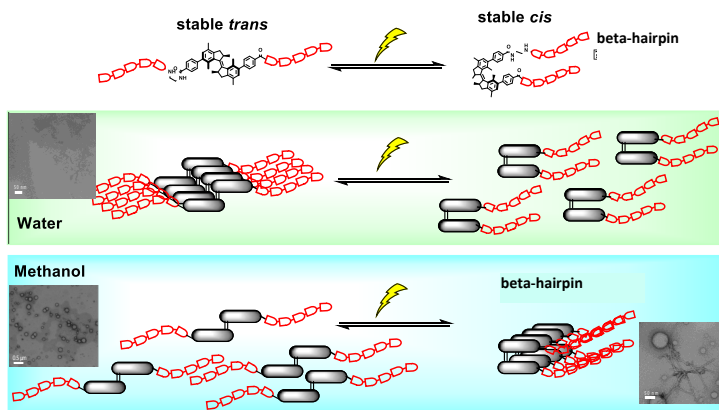
Figuur 2: Staudinger-Bertozzi ligatie van moleculaire fotoschakelaars aan een azide-bevattend doelmolecuul.

Manieren om de functie van peptiden te controleren met licht zouden voordeel kunnen halen uit het groeiende aantal mogelijk bruikbare schakelaars. Het onderzoeksveld aangaande foto-responsieve peptiden is momenteel nog gelimiteerd tot schakelaars welke een geometrische verandering tussen twee stereo-isomeren ondergaan waarbij de thermische instabiliteit van één van de foto-isomeren wordt gebruikt. Het onderzoek beschreven in het vierde hoofdstuk van dit proefschrift laat de zoektocht naar een synthetische strategie om, voor de eerste keer, een sterisch gehinderde alkeen schakelaar in het eiwit skelet te incorporeren zien. Om dit te bewerkstelligen is een strategie van vaste-fase eiwitsynthese beschreven welke gefocust is op de keuzes van zowel drager als beschermgroepen.



Figuur 3: Sterisch gehinderde alkeen fotoschakelaars.

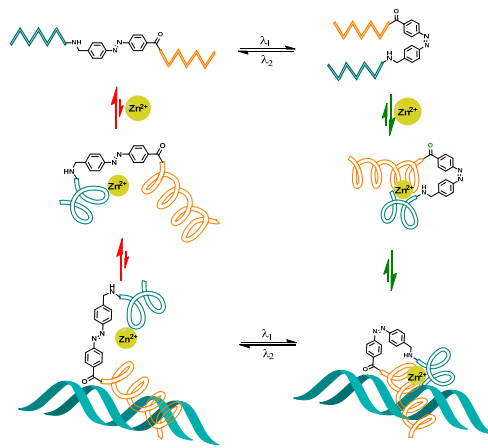
In het vijfde hoofdstuk is de ontwikkelde methode gebruikt om een sterisch gehinderde alkeen fotoschakelaar te incorporeren om een model β -haarspeld peptide te controleren (Figuur 4). Deze foto-responsieve eenheid ondergaat een grote verandering van conformatie en heeft twee thermisch stabiele isomeren, welke een grote invloed hebben op de secundaire structuur en de aggregatie van het peptide. Dit maakt het mogelijk om foto-geïnitieerde vorming van amyloïde-achtige vezels te initiëren. Verder is het verschil in aggregatiegedrag bestudeerd (Figuur 4).



Figuur 4: Model β -haarspeld peptide met als nieuwe functionaliteit een sterisch gehinderde alkeen en een voorstelling van de verschillen in aggregatiegedrag in zowel methanol als water.

Het laatste hoofdstuk, hoofdstuk 6, beschrijft de inlijving van een azobenzeen eenheid in een zink-vinger domein (Figuur 5). Het bestuderen van de fotochemische isomerisatie van dit systeem laat zien dat de azobenzeen een foto-stabiele staat heeft van minstens 45% *cis*-isomeer en reversibel kan schakelen. Daarnaast is laten zien dat de half-waarde tijd van de *cis* isomeer afhankelijk is van de aanwezigheid van zink ionen. Zowel de *trans* als de *cis* isomeer bind aan het zink ion en vormt hiermee de secundaire structuur van de zink vinger. Daardoor kunnen zowel de *trans* als *cis* isomeer binden aan DNA. Interessant is dat *cis*-AMPB-Sp1-f3 een sterkere zink-binder is maar een zwakkere DNA-binder dan *trans*-AMPB-Sp1-f3. Dit zou verklaart kunnen worden door de betere stabilisatie van een α -helix door de *trans* isomeer. De beschreven, alternatieve aanpak om controle te bemachtigen over de secundaire structuur van een zink vinger, en hiermee controle over de DNA binding van het zink vinger domein, is algemeen toepasbaar om zink vinger domeinen te controleren doordat het specifieke α -helix DNA interacties niet belemmert.

De resultaten gepresenteerd in dit proefschrift zijn gericht op het vaststellen van nieuwe methodes voor de modificatie van peptiden, enzymen en eiwitten doormiddel van fotoschakelaars. In het bijzonder was dit de eerste keer dat sterisch gehinderde alkenen zijn ingelijfd in eiwitten. Uiteindelijk zou dit werk de methodes voor de modificatie van foto-sensitieve oppervlakten met biomoleculen kunnen leveren welke nodig zijn voor de constructie van nieuwe foto-responsieve bio-systemen.



Figuur 5: Fotoschakelbare zink vinger waarbij een azobenzeen de vorming van een secundaire structuur, en hierdoor DNA-binding, verhindert.

