

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/30206> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Rabe, Martin

Title: Coiled-coils on lipid membranes : a new perspective on membrane fusion

Issue Date: 2014-12-18

SAMENVATTING

Al tientallen jaren wordt er onderzoek verricht aan peptide-peptide interacties en de interactie van membranen met peptiden en eiwitten. Dit wordt gedaan om het mechanisme te doorgronden van essentiële biologische processen zoals bijvoorbeeld de uitstulping en splitsing van vesikels, membraanfusie en de werking van antimicrobiele peptiden. De recente vooruitgang in de celbiologie heeft chemici geïnspireerd om deze biologische processen na te bootsen met simpele modelsystemen. Het is duidelijk geworden dat deze modelsystemen complexer zijn dan aanvankelijk werd aangenomen en dat de lessen die we hebben geleerd van biologische systemen ook hier toepasbaar zijn.

Dit proefschrift beschrijft de toepassing en uitbreiding van de klassieke methodes in het onderzoek aan peptide-peptide interacties en peptide-membraan-interacties met als doel de eigenschappen van fusogene coiled-coil-vormende lipopeptiden in oplossing en in diverse modelsystemen van membranen te bestuderen. Deze lipopeptiden bevatten coiled-coil peptiden, de zogenaamde peptiden E en K, die via polyethyleenglycol (PEG₁₂) verbonden zijn met een anker in het membraan. De DOPE-verankerde LPE en LPK werden gebruikt, alsmede de cholesterol verankerde CPE en CPK, de peptiden E en K zonder fosfolipide anker, alsmede variaties hierop door middel van gewijzigde aminozuursequenties. De gebruikte modelsystemen waren monolagen en vesikels met de samenstelling DOPC : DOPE : cholesterol (2 : 1 : 1). Hypotheses werden opgesteld en getest op basis van hedendaagse biochemische en biofysische modellen van natuurlijke membraanfusie.

In *Hoofdstuk I* wordt een algemene introductie van de concepten en modellen gegeven die van belang zijn voor de opvolgende hoofdstukken. Peptide-peptide interacties in de vorm van temperatuur-geïnduceerde ontvouwing van coiled-coil-complexen zijn het onderwerp van *Hoofdstuk II*. Een algemene techniek, die gebruik maakt van ontvouwingscurves die door circulair dichroïsmespectroscopie gemeten worden, is verbeterd om het aantal ketens in oligomere peptidecomplexen te bepalen. Ook wordt de ontwikkeling van het gebruikersvriendelijke programma '*FitDis!*' beschreven waarmee deze methode kan worden toegepast. De methode en het programma zullen de informatie, die wordt verkregen uit de smeltovergangen van oligomere peptide verbeteren en zullen het gemakkelijker maken om deze techniek ook toe te passen op supramoleculaire systemen zoals fusogene lipopeptiden die aan membranen gebonden zijn.

De volgende hoofdstukken beschrijven een gedetailleerde studie van de fusogene lipopeptiden. In *Hoofdstuk III* wordt de interactie van lipide monolagen

met de vrije peptiden E en K bestudeerd en met de lipopeptiden LPE en LPK. Er wordt voorgesteld dat wanneer peptiden E en K gevouwen zijn als amfipatische helixen zij interacties aangaan met de monolaag. Vergeleken met LPE wordt een sterkere interactie gevonden tussen de monolaag en LPK. Er wordt verwacht dat die interacties een rol spelen in systemen van dubbellaagige lipide membranen. Deze voorspelling wordt getest in *Hoofdstuk IV* waarbij gebruik wordt gemaakt van de peptiden E_{GW} , K_{GW} en de lipopeptiden LPE_{GW} , LPK_{GW} die ontworpen zijn op basis van de originele aminozuur sequenties van E en K. Het blijkt, dat peptide K_{GW} relatief ondiep in het membraan bindt, waarbij de α -helix die dichtbij de glycerol en de fosfaatgroepen van de lipiden gecentreerd is. Een close-up-weergave van de secundaire structuren van CPE, CPK en de direct aan het membraan gebonden peptide K wordt verkregen in *Hoofdstuk V* met behulp van temperatuurafhankelijke infrarood- en circulair dichroïsmespectroscopie.

In *Hoofdstukken III t/m V* wordt duidelijk dat de membraangebonden lipopeptiden asynchroon gedrag vertonen. Peptide K is als een helix geïncorporeerd met een parallele oriëntatie aan de membranen, terwijl een significant deel van peptide E homocoils vormt op het membraanoppervlak. Beide toestanden zijn zeer waarschijnlijk ook na de fusie aanwezig in de membranen. Een asymmetrisch mechanisme wordt voorgesteld waarin de peptide K membraanfusie bevordert door de oppervlaktekromming van het membraan te verstoren.

Om deze hypothese in *Hoofdstuk VI* te testen worden variaties op peptide K met kortere lysine-zijketens ontworpen met als doel de interactie met het membraan te onderdrukken. Hoewel een sluitend bewijs voor de hypothese nog ontbreekt, wordt wel aangetoond dat de lysine-zijgroepen significant bijdragen aan de membraanbinding van peptide K door middel van een zogenaamd snorkelmechanisme.

Het complete werk dat in dit proefschrift beschreven is heeft geleid tot een nieuw perspectief op de door lipopeptiden gefaciliteerde membraanfusie. Het heeft tot een belangrijk algemeen inzicht geleid: een gemakkelijk modelsysteem zoals dat van de fusogene lipopeptiden kan in close-up-weergave de complexe en onderling afhankelijke interacties en evenwichten aan het licht brengen. Bovendien is ondervonden dat het opsporen van het juiste vergrootglas een uitdagende en tijdrovende taak is.