

# VU Research Portal

## Controlling the conformational constraint of peptides to modulate their target affinity

Müller, C.

2019

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Müller, C. (2019). *Controlling the conformational constraint of peptides to modulate their target affinity*.

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **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.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# Nederlandse Samenvatting

Cellen bevatten een groot aantal verschillende proteïnen en peptiden, die fungeren als moleculaire hulpmiddelen voor de meest uiteenlopende processen en procedures, en die verschillende taken vervullen. Omdat het mogelijk is om peptiden chemisch op te bouwen en daarmee (de grenzen van) eenvoudige peptidevertaling te overschrijden, is een assortiment van mogelijkheden binnen bereik voor het ontwerp en gebruik van peptiden voor diverse toepassingen. Dit proefschrift beschrijft enkele van deze toepassingen.

**Hoofdstuk 1** vat de rol van peptiden in hedendaags onderzoek samen en beschrijft hun toepassing als proteïne-proteïne remmers. Het eerste deel behandelt verschillende mogelijkheden voor de stabilisatie van peptiden die leiden tot verbeterde bindingsaffiniteit, cel permeabiliteit en proteasestabiliteit. Naast hun gebruik als inhibitoren van moleculen, worden peptiden ook ingezet als moleculaire sonde, zoals besproken in het tweede deel van de inleiding.

**Hoofdstuk 2** (*Peptidomimetics as synthetic ligands of the protein FtsQ - Inhibition of the protein-protein interaction between FtsB and FtsQ in bacterial cell division*) toont de evolutie van een dergelijke proteïne-proteïne interactie (PPI) remmer. Eerder werd aangetoond dat een belangrijk proteïnen complex (divisoom) in het bacterieel organisme cruciaal was voor de bacteriële celdeling. Onder meer bleken twee proteïnen hoofdzakelijk betrokken te zijn bij het delingsproces (FtsB / FtsQ). Daarom is dit project gericht op het vinden van een remmer die de bacteriële celdeling op basis van deze PPI onderdrukt. Na de structuurbepaling van de belangrijke interactiegebieden van zowel FtsB als FtsQ via kristallisatie, werd een 24-mer van FtsB geïdentificeerd, die sterk betrokken is bij deze PPI.

Om deze reden werd dit peptide gesynthetiseerd en gebruikt in een ander kristallisatie-experiment. Daarin werd de bindwijze van deze 24-meer peptide in detail geanalyseerd met behulp van de peptide/proteïne kristalstructuur en de affiniteit van dit peptide (FtsB-p) werd gemeten via verschillende methoden, bijv. Fluorescentiepolarisatie. Op basis hiervan werden verschillende stabilisatietechnieken, zoals geïntroduceerd in Hoofdstuk 1, binnen FtsB-p gescreend om peptiden met een hogere affiniteit te vinden. Verschillende crosslink posities ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  en  $\epsilon$ ); verschillende technieken zoals alkeen-crosslinks, guanidine-bruggen en op cysteïne gebaseerde crosslinks; en verschillende linker lengtes ( $n = 6 - 12$ ) werden getest. Na het identificeren van verschillende effectieve crosslink mogelijkheden die leidden tot hogere affiniteitskandidaten, werden combinaties van deze technieken geïmplementeerd. Succesvolle reductie van de grootte van de peptiden, door middel van truncatie-onderzoeken, gaf een peptidomimeticum dat nog verdere verfijningen, biofysische evaluatie en *in vivo* testen moet ondergaan.

Naast het nabootsen van een bekende interactiepartner om een remmer voor PPI's te ontwikkelen, kunnen peptiden worden gebruikt om een sonde voor proteïne detectie te ontwerpen en proteïne-proteïne interacties uit te lezen. Deze nieuwe benadering wordt gepresenteerd in **Hoofdstuk 3** (*Coiled-coil Peptide Beacon: A Tuneable Conformational Switch for Protein Detection*). Het welbekende gevestigde concept van nucleïnezuur-gebaseerde moleculaire beacons werd overgebracht naar een volledig peptidic systeem. Hierin werden twee parallelle coiled-coil peptiden, bedoeld om een intermoleculaire superhelix te vormen, gesynthetiseerd in variërende lengten om dimeren van verschillende affiniteiten te verkrijgen. Om een intra moleculair coiled-coil peptide beacon te bouwen, werd vervolgens een receptor-bindende ligandsequentie geïntroduceerd om de spiraalvormige onderdelen via chemische ligatie te verbinden. Met behulp van een fluorofoor en een quenching molecuul aan de C-terminale uiteindes van beide tegenhangers, konden de open en de gesloten toestand van het beacon worden onderscheiden aan de hand van de fluorescentie-intensiteit, resulterend in verschillende affiniteiten voor de verschillende coiled-coil peptide beacons (fxx-L-q21). Karakterisering van de nieuw ontworpen sondes werd uitgevoerd met verschillende assays, zoals massaspectrometrie, size exclusion chromatografie, dynamische lichtverstrooiing en circulair dichroïsme. Vervolgens bewees een competitiebepaling daarnaast de bindingslocatie specificiteit van de nieuwe coiled-coil peptide beacons.

De eerste drie hoofdstukken gingen over uitdagende peptidomodificaties en constructies. Echter, het is ook mogelijk om veeleisende biologische vragen te beantwoorden met vrij eenvoudige peptiden. Deze strategie is ook cruciaal in de huidige chemische biologie. Het gebruik van korte synthetische peptiden in plaats van heteroloog tot expressie gebrachte proteïnen vereenvoudigt het onderzoek naar bepaalde moleculaire problemen. In **Hoofdstuk 4** (*Plant cysteine oxidases are dioxygenases that directly enable arginyl transferase-catalysed arginylation of N-end rule targets*) werden natuurlijke peptiden

gebruikt als substraten voor arginyl overdracht-RNA-transferase, wat antwoorden gaf op vragen over de regulering routes in planten.

**Hoofdstuk 5** (*The Therapeutical Potential of PTEN Modulation Targeting strategies from Gene to Protein*) vat de ontwikkeling van PTEN-modulatie als therapeutisch doel samen. Hierin worden benaderingen erkend die gebaseerd zijn op alle niveaus van het biologische dogma, die leidt tot een diepgaande basis voor algemene targetingstrategieën.