



Doctoral Thesis

Tailored biomimicking structures via self-assembly in vitro

Author(s):

Baumann, Martina Katharina

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006242589> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 19212

TAILORED BIOMIMICKING STRUCTURES VIA
SELF-ASSEMBLY IN VITRO

A dissertation submitted to

ETH ZÜRICH

for the degree of

Doctor of Sciences

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

MARTINA KATHARINA BAUMANN

Dipl. Natw. ETH

born on June 14, 1978

citizen of Zollikon (ZH)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Marcus Textor, examiner

Prof. Dr. Wolfgang Meier, co-examiner

Prof. Dr. Peter Walde, co-examiner

Dr. Erik Reimhult, co-examiner

August, 2010

Abstract

Eukaryotic cells have a diameter of 10-50 μm and their functional units are typically a few nanometers to tens of nanometers in size. Materials that are designed for interaction with cells and subcellular structures, e.g. tissue culture hydrogels or drug delivery vehicles, therefore need nano- and micrometer range features. Likewise, in order to elucidate interactions on the molecular length scale of biological systems we need material interfaces that mimic their structure and can present interaction partners on the same length scales in a biomimetic way. Kinetics and specificity of binding between biological interaction partners are very difficult to assess in the complex setting of a native cell. Biological molecules of interest can be extracted from cells and inserted in a reduced and controlled *in vitro* biomimetic environment for detailed investigations if a sufficiently native like environment is provided. Molecular self-assembly is a route to fabricate biomimetic and biocompatible structures and materials at the nano- and micrometer range, for *in vitro* and *in vivo* applications, with potential to greatly advance science and the above mentioned applications.

In this thesis two research projects exploiting self-assembly as a construction tool for nano-scaled biomimetic materials and interfaces from peptides and lipid amphiphiles, respectively, were realized. The focus was set on careful characterization of the investigated assembly and final structures of the systems with the goal to elucidate design principles to control the assembled structures and methods to probe their interactions.

In the first project the self-assembly behavior of cationic lipid-like peptides with systematically varied tail and head regions was investigated. Peptide supramolecular materials fulfill the requirements of biocompatibility and *in vivo* degradation if the peptide monomers are built from only the natural occurring amino acids. The aim was set on investigating the influence of variation in one parameter (secondary structure preference of the hydrophobic amino acid in the peptide sequence) in three different peptide molecules

namely I6K2, V6K2 and L6K2. The supramolecular structures were characterized by transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM) while circular dichroism spectroscopy (CD) was used to determine the adopted secondary structure of the peptides in the aggregates. With this simple approach we identified preference for rod and ribbon structures in the self-assembled supramolecular aggregates at low peptide concentrations in aqueous solutions and were able to correlate the secondary structure adopted in the supramolecular assemblies with primary structure variations in the peptide monomers. It was found that the sequence forming β -sheet type hydrogen bonds (I6K2) favored ribbon-like structures, whereas rod structures were observed for sequences adopting random coil secondary structures (V6K2 and L6K2). The originally chosen design parameter, i.e. helix propensity, was found to be less relevant for shaping the adopted supramolecular structures than whether or not a β -sheet hydrogen bonding pattern between the monomers could be adopted upon aggregation.

In the second project of this thesis a supported phospholipid bilayer (SLB) platform was established on SiO₂ substrates to investigate specific peptide-lipid interactions. Lipids have fundamental roles in numerous signalling cascades and mediate a plethora of signal transductions at or across cell membranes. A native cell membrane contains various lipids and its lipid composition is also continuously adjusted by enzymes according to internal and external cell stimuli. For signal transduction or protein association with the membrane, protein domains can bind specifically to lipid head groups. To monitor the binding kinetics of these specific interactions reductionist *in vitro* systems are needed where the lipid composition as well as the constituents of the protein containing solution are precisely known.

To this end, two phosphoinositides, PIP2 and PIP3, were incorporated at physiologically relevant concentrations into POPC SLBs and characterized by quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D), fluorescence recovery after photo bleaching (FRAP) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). PIP2 was successfully incorporated into SLBs with up to 10 weight-% concentration whereas SLBs containing PIP3 could only be formed up to 1 weight-% PIP3 concentration, in line with the lower abundance of PIP3 found in natural occurring membranes. Protein-lipid interaction was tested on the PIP2 SLBs with the well characterized Pleckstrin homology domain (PH) of the PIP2 binding protein phospholipase C (PLC δ 1). The interaction was monitored with dual polarization interferometry (DPI). This dynamic sensing technique enabled us to select an optimal time point for affinity analysis corresponding to the bound PH-PLC δ 1 mass at equilibrium ($K_a=1-3.5 \cdot 10^5 \times M^{-1}$).

The possibility to monitor the detailed time evolution of the adsorption led to important information on the lipid-peptide interaction. It was observed that after initial adsorption, previously associated peptide desorbed from the membrane upon specific binding of the PH-PLC δ 1 to the PIP2 lipid head group in the SLB. Besides identifying this three-phase binding process the location of the peptide relative to the membrane and a clear kinetic and affinity discrimination of PIP2 binding vs. non-specific electrostatic association to a similarly charged membrane could additionally be clearly demonstrated through the use of an SLB functionalized DPI chip. *In vitro* platforms to measure label free interaction kinetics, as the presented phosphoinositide SLBs on QCM-D and DPI chips, are valuable research tools for investigation of specific protein-lipid interaction by presenting reaction partners that have a high turn-over *in vivo* in a stable and reproducible *in vitro* environment.

Zusammenfassung

Eukaryotische Zellen haben einen Durchmesser von 10-50 μm und ihre funktionellen Komponenten messen nur wenige Nanometer. Materialien, die dafür geschaffen wurden, mit Zellen und Zellbestandteilen zu interagieren, wie zum Beispiel Zellkulturhydrogele oder Medikamentenabgabesysteme, müssen daher auch funktionelle Eigenschaften im Nano- und Mikrometerbereich aufweisen. Um Interaktionen von biologischen Systemen auf molekularer Ebene zu untersuchen, werden Materialien mit Oberflächenstrukturen benötigt, die biologische Strukturen imitieren und die interagierenden Komponenten in der gleichen Größenordnung präsentieren. Im komplexen Aufbau einer Zelle sind Kinetik und Spezifität von biologischen Interaktionspartnern sehr schwierig zu erfassen. Biologische Moleküle können aber aus der Zelle extrahiert und *in vitro* analysiert werden, sofern ein adäquates System, das das biologische Umfeld imitiert, vorhanden ist. Materialien mit Strukturen, die diesen Anforderungen entsprechen, können mittels Molekülen realisiert werden, die sich spontan selbst anordnen. Diese Materialien können für Anwendungen *in vivo* und *in vitro* benutzt werden und bergen das Potential, Forschung in den zuvor erwähnten Gebieten voranzutreiben.

In dieser Arbeit wurden zwei Projekte realisiert, in denen die Selbstanordnung von Peptid- und Lipidmolekülen ausgenutzt wurde, um Materialien und Oberflächen mit Nanometerdimensionen zu konstruieren. Speziell beachtet wurde dabei die Charakterisierung des Selbstorganisationsprozesses und der geformten Strukturen, um Designprinzipien zur Kontrolle der supramolekularen Strukturen zu untersuchen, und um geeignete Methoden zu finden, diese Interaktionen quantitativ nachzuweisen.

Im ersten Projekt wurde die Selbstorganisation von kationischen, lipid-ähnlichen Peptiden mit systematischen Variationen im hydrophoben Teil untersucht. Wenn nur natürlich vorkommende Aminosäuren als Bausteine verwendet werden, erfüllen supramolekulare Peptidmaterialien die Anforderungen für Biokompatibilität und *in vivo* Degrada-

tion. Das Ziel bei diesem Projekt war es, den Einfluss eines einzelnen Parameters, nämlich die Sekundärstrukturpräferenz der hydrophoben Aminosäuren im Peptidamphiphil) in drei Peptidamphiphilen, I6K2, V6K2 und L6K2 zu untersuchen. Die supramolekularen Strukturen wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht und die Sekundärstruktur der Peptide in den Aggregaten wurde mittels Zirkulardichroismus Spektroskopie (CD) analysiert. Mit diesem vereinfachten Modell konnten Präferenzen für spezifische supramolekulare Strukturen bei niedriger Peptidkonzentration in wässriger Lösung nachgewiesen und der gemessenen Sekundärstruktur zugeordnet werden, die aufgrund der Variationen in der Aminosäuresequenz in den Peptidamphiphilen geformt wurde. Die β -Faltblatt bildende Sequenz (I6K2) begünstigte bandartige Strukturen, während diejenigen Sequenzen, die unregelmäßige Sekundärstrukturen annahmen (V6K2 und L6K2), stäbchenartigen Strukturen bildeten. Es wurde festgestellt, dass der ursprünglich verwendete Designparameter (α -helix Präferenz) weniger relevant war für die Aggregatstrukturen als die Fähigkeit während der Aggregation β -Faltblatt Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidamphiphilmolekülen zu bilden.

Im zweiten Projekt wurde ein Substrat-unterstütztes Lipid-Membranmodell (SLB) auf SiO₂ Oberflächen etabliert, um spezifische Peptid-Lipid Interaktionen zu untersuchen. Lipide haben eine fundamentale Rolle in vielen zellulären Signalkaskaden und vermitteln die Signalübertragung an und durch die Zellmembranen. In einer natürlichen Zellmembran finden sich daher viele verschiedene Lipide, deren Komposition fortwährend aufgrund von externen und internen Anreizen mittels Enzymen reguliert wird und so stetigem Wandel unterworfen ist. Für die Anlagerung von Proteinen und für die Signalübertragung an der Zellmembran können Proteindomänen spezifisch an Lipidkopfgruppen binden. Um die Bindungskinetik dieser spezifischen Interaktionen quantitativ zu beobachten, werden *in vitro* Systeme mit reduzierter Komplexität benötigt, in denen sowohl die Lipidzusammensetzung wie auch die Zusammensetzung der Proteinlösung genau bekannt sind.

Zwei verschiedene Phosphoinositide wurden einzeln in physiologisch relevanten Konzentrationen in POPC-basierten, Substrat-gestützten lipidischen Doppelschichten (SLBs) eingebaut und mittels Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationaufzeichnung (QCM-D), Fluoreszenzwiederherstellung nach Photoentfärbung (FRAP) und Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS) charakterisiert. PIP₂ konnte in Konzentrationen bis zu 10 Gewichts-% erfolgreich in SLB eingebaut werden. Hingegen konnten SLBs mit nur maximal 1 Gewichts-% PIP₃ hergestellt werden, was das viel geringere Vorkommen von PIP₃ in natürlichen Membranen im Vergleich zu PIP₂ reflektiert. Protein-Lipid In-

teraktionen wurden mittels der gut charakterisierten PIP₂-bindenden Pleckstrin Domäne der Phospholipase C1 (PH-PLC δ 1) auf PIP₂ SLB getestet. Die Interaktion wurde mittels Zweifachpolarisationsinterferenz (DPI) analysiert. Diese Technik ermöglichte die Selektion eines optimalen Zeitpunktes für die Bestimmung der Affinitätskonstante ($K_a=1-3.5 \cdot 10^5 \times M^{-1}$), entsprechend der im Gleichgewicht adsorbierten Masse der gebundenen Proteindomäne. Da die zeitliche Auflösung der Adsorption detailliert analysiert werden konnte, wurden wichtige Informationen über die Protein-Lipid Interaktion gewonnen. Es wurde beobachtet, dass sich zuvor gebundene Peptide von der Membran ablösten, als Folge der Ausbildung spezifischer Bindungen zwischen (PH-PLC δ 1) und PIP₂. Zusätzlich zu diesem dreistufigen Bindungsprozess konnten mittels SLBs auf funktionalisierten DPI Chips auch die Lage der Proteindomäne relativ zur Membran sowie klare Unterschiede in Kinetik und Spezifität für PIP₂ gegenüber nicht spezifischer elektrostatischer Adsorption auf einer Membran, mit vergleichbarer Ladung, gemessen werden. *In vitro* Modelle, die es erlauben, Marker-frei Interaktionskinetik zu messen, wie z.B. das beschriebene SLB Modell in Kombination mit den quantitativen, Marker-freien Sensortechniken QCM-D und DPI, sind wichtige Forschungshilfen für die Untersuchung von spezifischen Protein-Lipid Interaktionen, da die Reaktionspartner, die *in vivo* rapidem Wechsel unterworfen sind, in einem reproduzierbaren, stabilen Umfeld *in vitro* erforscht werden können.