

# Oximation optimization and applications in cardiovascular research

## Citation for published version (APA):

Agten, S. M. (2016). *Oximation optimization and applications in cardiovascular research*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20161215sa>

## Document status and date:

Published: 01/01/2016

## DOI:

[10.26481/dis.20161215sa](https://doi.org/10.26481/dis.20161215sa)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## 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.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Samenvatting

Het werk in dit proefschrift presenteert nieuwe methodes voor de plaats specifieke bioconjugatie van (semi-) gesynthetiseerde eiwitten. Hiermee kunnen hun werkingsmechanismes ontcijferd worden en therapieën gebruikt voor de behandeling van hart- en vaat ziekten geoptimaliseerd worden. In **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift worden chemische eiwit synthese en bioconjugatie met behulp van oxime chemie geïntroduceerd en de doelstellingen van het onderzoek bekend gemaakt.

In **Hoofdstuk 2** worden methodes besproken die gebruikt kunnen worden voor de introductie van een keton of aldehyde in peptiden en eiwitten. Modificaties in eiwitten kunnen namelijk plaats specifiek gemaakt worden met behulp van oxime chemie, maar de benodigde ketonen en aldehyden komen van nature niet voor in eiwitten. Meerdere methodes worden besproken, waar een onderscheid tussen 5 hoofd groepen wordt gemaakt. Deze omvatten chemische behandeling, enzymatische modificatie, genetische methodes, sacharide modificatie en chemische synthese. Verder wordt de nucleofiele katalyse van aniline en de meer recent ontwikkelde derivaten besproken.

**Hoofdstuk 3** behandelt de optimalisatie van oxime chemie in peptiden en eiwitten. Levulinezuur werd frequent gebruikt voor de introductie van een keton in biologische moleculen. Het ketozuur werd gereageerd met een vrije amine zoals die voorkomen op de zijketens van lysine of de N-terminus van een eiwit. Het gebruik hiervan leidde echter vaak tot lage opbrengsten en langzame reacties. Wij ontdekten dat dit verklaard kan worden door de formatie van een intramoleculair gevormde cyclische variant van levulinezuur, die niet meer in staat is te reageren met een aminoxy om een oxime te vormen. Naast het ontrafelen van dit reactiemechanisme, hebben we ook alternatieven onderzocht die deze cyclische variant niet vormen en dus gebruikt kunnen worden om stabiele ketonen in eiwitten en peptiden te introduceren.

In **Hoofdstuk 4** rapporteren we een onverwachte methode van katalyse van de oxime reactie. Langzaam bevriezen van het reactiemengsel bleek te zorgen voor een grote toename in reactiesnelheid. Vervolgens werd een model systeem gebruikt om meer inzicht te krijgen in het mechanisme van deze toename. Het reactiemengsel werd bevroren bij 3 verschillende temperaturen (-20 °C, -80 °C en -196 °C), waarbij bleek dat langzaam vriezen bij -20 °C een absoluut vereiste was. In vergelijking met aniline gekatalyseerde reacties, werd de grootste toename in reactiesnelheid gevonden bij neutrale pH en lage concentraties. Uiteindelijk werd de methode gebruikt voor het fluorescent labelen van een groter eiwit.

In **Hoofdstuk 5** werd de optimalisatie van het keton en de vernieuwde oxime katalyse toegepast voor de synthese van een covalente heterodimeer van de chemokines RANTES (CCL5) en PF4 (CXCL4). Een combinatie van natieve chemische ligatie (NCL) en oxime ligatie werd gebruikt om de volledig gevouwen eitwitten met elkaar te

verbinden. De structuur van de nieuw gevormde heterodimeer werd geëvalueerd met behulp van NMR en de biologische activiteit werd gemonitord met een monocytarrest assay. Verder konden wij aantonen dat de affiniteit tussen de twee chemokines aanwezig is doordat de chemische ligatie versneld werd door eiwit-eiwit interacties. Uiteindelijk konden we aantonen dat de functieversteking van het chemokine paar wordt veroorzaakt door de fysieke formatie van een heterodimeer.

In **Hoofdstuk 6** wordt het “Chemokine Interactoom” geïntroduceerd, een functionele interactie tussen verschillende chemokines om hun functie te moduleren of modificeren. Het interactoom werd onderzocht met immuno-ligand blotting en surface plasmon resonance. Twee covalent gelinkte chemokine paren werden gesynthetiseerd met behulp van vaste fase peptide chemie, native chemische ligatie en oxime ligatie. Deze heterodimeren werden functioneel en structureel gekarakteriseerd. Functionele interacties die van belang zijn in atherosclerose werden verder opgevolgd *in vitro* met chemotactische en arrest assays en *in vivo* in verschillende muizen modellen. Verder werden peptide inhibitoren voor chemokine heterodimerisatie ontwikkeld en getest. Met deze uitgebreide studie is inzicht verkregen in de formatie van chemokine heterodimeren die gebruikt kan worden voor therapeutische toepassingen.

In **Hoofdstuk 7** wordt de oxime gebruikt voor de modificatie van recombinant tissue plasminogeen activator (rtPA), dat gebruikt wordt voor de trombolytische behandeling van hersenbloedingen, met een fibrine crosslinking sequentie (A14) afgeleid van  $\alpha 2$ -antiplasmin, gericht op een verbeterd, meer efficiënt trombolyticum. Het huidige gebruik van rtPA leidt vaak tot bloedingsneigingen als gevolg van de hoge gebruikte dosis. De modificatie van rtPA wordt bereikt door de oxidatie van de N-terminale serine gevolgd door oxime ligatie met A14. Verschillende A14-tPA constructen werden getest in plasma clot lysis assays in zowel statische als flow condities. We konden aantonen de modificatie van rtPA plaats specifiek gedaan kon worden, een verbetering in functie werd echter niet waargenomen. In dit lopende project worden geoptimaliseerde constructen ontwikkeld die uiteindelijk moeten leiden tot een efficiënter trombolyticum.