

다이타이로신 공유결합으로 자기조립된 펩타이드 나노입자의 합성

허윤미 · 민경익[†]

경북대학교 의생명융합공학과
41566 대구광역시 북구 대학로80
(2020년 10월 13일 접수, 2020년 11월 6일 수정본 접수, 2020년 11월 11일 채택)

Synthesis of Self-Assembled Peptide Nanoparticles Based on Dityrosine Covalent Bonds

Yun-Mi Hur and Kyoung-Ik Min[†]

Biomedical Convergence Science and Technology, Kyungpook National University,
80 Daehakro, Bukgu, Daegu, 41566, Korea

(Received 13 October 2020; Received in revised form 6 November 2020; Accepted 11 November 2020)

요 약

본 연구에서는 생물학적 공유결합인 다이타이로신 결합을 모방하여 비가역적 공유결합을 기반으로 한 펩타이드의 자기조립 방법을 연구하였다. 고밀도의 다이타이로신 결합을 달성하기 위해 Tyr-Tyr-Leu-Tyr-Tyr (YYLYY)의 서열을 갖는 펩타이드 단량체를 선택하였다. 다이타이로신 결합으로 자기조립된 펩타이드 나노입자는 가시광선 하에서 Ru(BPY)₃Cl₂ 촉매를 사용하여 단일공정 광교로를 통해 합성되었다. 펩타이드 나노입자의 크기에 대한 각 성분의 농도 효과는 동적 광산란, UV-Vis 분광법 및 투과 전자 현미경을 사용하여 확인하였다. 이를 통해 130 nm~350 nm범위의 펩타이드 나노입자의 크기별 최적의 합성 조건을 제시하였다.

Abstract – In this study, a method of self-assembly of peptides based on irreversible covalent bonds was studied by mimicking a biological covalent bond, dityrosine bond. A tyrosine-rich short peptide monomer having the sequence of Tyr-Tyr-Leu-Tyr-Tyr (YYLYY) was selected to achieve a high-density of dityrosine bond. The peptide nanoparticles covalently self-assembled with dityrosine bonds were synthesized by one-step photo-crosslinking of a peptide using a ruthenium catalyst under visible light. The effect of the concentration of each component for the size of the peptide nanoparticle was studied using dynamic light scattering, UV-Vis spectroscopy, and transmission electron microscopy. As a result, the synthesis conditions for size of the peptide nanoparticles ranging from 130 nm to 350 nm were optimized.

Key words: Peptide, Assembly, Tyrosine, Dityrosine, Photo crosslink

1. 서 론

펩타이드 자기조립(Peptide self-assembly)은 아미노산 서열과 주변 환경을 제어함으로써 다양한 특성 및 구조를 가진 바이오 나노 소재를 합성할 수 있는 기술로서, 펩타이드 고유의 생체 적합성과 생분해성, 손쉬운 합성 방법으로 인해 나노기술 및 생명공학기술 등의 다양한 분야에 적용될 수 있다는 점에서 큰 주목을 받고 있다 [1-3]. 일반적으로 펩타이드 자기조립은 펩타이드 단량체들 사이의 수소 결합, 정전기 상호작용, 소수성 상호작용, 반데르발스 힘, π - π 상호작용 등 비교적 약한 가역적 비공유 인력들의 집합적 상호작용과

자체 오류 수정(self-correction of errors) 과정을 거쳐 자기조립 나노 구조체를 만든다[1,3,4]. 그러나, 개별 비공유 결합은 공유 결합에 비해 약하며, pH, 온도, 용매 등 주변 환경 변화에 본래의 구조가 변형되기 쉽다[5,6]. 이와 반대로, 비가역적 공유 결합에 의한 자기조립은 펩타이드 사이의 강한 결합으로 구성되어 단백질 가수분해 효소 등에 내성을 가지며, 폭 넓은 작동조건에서의 적용이 가능하다[5,7]. 하지만, 자체 오류 수정 과정을 거칠 수 없고, 나노스케일에서의 크기 및 모양이 재현성있게 잘 정의된 구조를 제어하기 위해서는 다단계 합성 과정 또는 템플릿이 필요하기 때문에 많은 연구가 진행되지 못하고 있는 실정이다[5,7]. 또한, 나노 의학, 바이오 이미징, 나노 모터 같은 다양한 응용 분야에서 활용되기 위해서는 수십에서 수백 나노미터 크기를 가지는 균일한 나노구조체의 합성 기술이 필요하다.

따라서, 본 연구에서는 펩타이드 자기조립의 한계를 극복하기 위해 생물학적 공유결합인 다이타이로신(dityrosine) 결합을 모방하여 비

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kimin@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

가역적 공유결합 기반 펩타이드 자기조립법을 연구하였다. 다이타이로신 결합은 생체 내 구조 단백질을 안정화하는 대표적인 생물학적 공유 결합 시스템으로, 두 개의 타이로신이 결합 구조를 형성하여 단백질의 물리적, 화학적 저항성을 증가시킨다[8-10]. 본 연구에서는 고밀도의 다이타이로신 결합을 이룰 수 있도록 Tyr-Tyr-Leu-Tyr-Tyr (YYLYY)의 서열을 가지는 펩타이드 단량체를 선정하여, 합성에 사용되는 광촉매와 펩타이드의 농도에 따른 나노구조체의 모양, 크기, 균일도 영향을 비교하였고, 시간에 따른 펩타이드 평가 과정을 분석하였다. 최적화된 광촉매 단일 공정으로 펩타이드를 고분자화함으로써, 수분 안에 공유결합 기반 펩타이드 자기조립 나노입자를 합성하였다.

2. 실험

2-1. 시약 및 재료

시약으로서 YYLYY 서열 펩타이드(순도 98%)는 GL Biochem (China)에서, 트리스 2,2'-바이피리딜디클로로루테늄(II) 헥사하이드레이트(Tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II) hexahydrate, Ru(BPY)₃Cl₂)와 과황산암모늄(ammonium persulfate, APS)는 Sigma Aldrich사에서, pH 10 완충 용액은 Samchun chemical사에서, 투과전자현미경 분석에 사용된 그리드(FC-200 mesh Cu)는 Ted Pella사에서 각각 구입하여 사용하였다.

2-2. 펩타이드 나노입자의 합성

펩타이드 나노입자의 합성을 위해 200 μ L의 Ru(BPY)₃Cl₂ (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 및 5 mM), 600 μ L의 10 mM APS 수용액, 200 μ L의 pH 10 완충 용액에 녹인 YYLYY 서열 펩타이드 용액(0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL)을 혼합하여 총 1 mL의 펩타이드 나노입자 합성 용액을 제조하여 실험을 진행하였다. 각 구성성분의 최종 농도는 Table 1에 나타내었다. 상기 혼합 용액을 직경이 1 cm인 석영 관에 담고, 상온에서 10 cm 거리의 백색광 램프(OSRAM, DULUX L LED, 18 W, 2개) 빛에 시간에 따라 노출 시켰다. 평가교 반응이 끝난 펩타이드 혼합액은 생성된 펩타이드 나노입자를 분리하기 위하여 13,500 rpm에서 2분간 원심 분리하고, 침전된 샘플을 회수하여 증류수로 세척하는 과정을 3번 반복한 후 다시 증류수에 분산시켰다. 모든 실험은 3번 반복으로 진행하였으며, 평균값으로 표시하였다.

2-3. 분석

펩타이드 나노입자의 특성 파악을 위하여, 평가교 반응 시간에

따른 자외선 및 가시광선 분광분석법(UV-Vis spectrophotometer, Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific), 동적광산란광도계(Dynamic light scattering, DLS, ELSE-2000, Otsuka electronics, Japan), 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM, Hitachi, HT 7700) 및 전계방사형 주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscop, FE-SEM, Hitachi SU8220)을 사용하였다. 펩타이드 혼합 용액이 담긴 석영 관을 백색광 램프에 노출시킨 시간에 따라 반응을 중지시키고 곧바로 UV-Vis 스펙트럼을 측정하였고, 다이타이로신 결합 형성은 펩타이드 용액의 시간에 따른 330 nm 흡광도 측정을 통해 확인하였다. 펩타이드 나노입자의 크기와 분포는 세척 전의 펩타이드 광 반응액 100 μ L과 증류수 800 μ L을 큐벳에서 혼합하여 희석액을 제조해 DLS를 사용하여 측정하였다. 펩타이드 나노입자의 크기와 모양 분석을 위해 세척 후의 펩타이드 나노입자 용액 10 μ L를 200-mesh 탄소 코팅 구리 그리드와 실리콘 웨이퍼 조각에 각각 떨어뜨리고, 1~5 분간 보존한 후에 건조시켰다. 준비된 시료는 70 °C 오븐에서 72 시간 동안 완벽히 건조된 후 TEM 및 FE-SEM을 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 펩타이드 나노입자의 합성과 특성 분석

펩타이드 자기조립 나노구조체는 단분자 펩타이드가 다양한 비공유결합을 통해 서로 응집되어 생성된다[1,3,4]. 구성성분이 아미노산으로 이루어져 있기 때문에, 물리적, 화학적 및 생물학적 특성을 자유자재로 조절할 수 있어, 새로운 기능을 수행할 수 있는 다양한 기능성 나노바이오소재를 만드는데 유용한 물질이다[1-3]. 기존의 펩타이드 자기조립 구조체는 분자간의 비공유결합을 유도하기 위하여 복잡한 다단계 합성 과정을 통해 특정한 분자(예: 양친매성, 이온성, 파이 결합 유도기)를 설계하여 진행되어 왔다[1,11]. 본 실험에서는 일반적인 비공유결합 방식이 아닌, 생물학적 공유 결합 중의 하나인 다이타이로신 결합을 모방하여 복잡한 화학적 설계 과정 없이 펩타이드 내에 있는 타이로신 잔기들 사이의 비가역적 공유결합을 통해서 나노입자를 합성하는 방법을 연구하였다. Fig. 1에 고밀도의 다이타이로신 결합을 형성하기 위한 Tyr-Tyr-Leu-Tyr-Tyr (YYLYY) 서열의 펩타이드 단량체 구조와 합성 방법을 나타내었다. 다이타이로신 결합으로 자기조립된 펩타이드 나노입자는 잘 알려진 Ru(BPY)₃Cl₂ 촉매와 APS를 사용하여 가시광선 하에서 평가교를 통해 합성하였다[12-14]. Ru(BPY)₃Cl₂ 촉매와 APS는 가시광선의 빛 에너지를 받아 산화환원 반응을 통해 라디칼을 형성하고, 이

Table 1. Results of peptide nanoparticles synthesized from various compositions

Entry No.	Peptide	Ru(BPY) ₃ Cl ₂	Ammonium persulfate	Size
1	0.5 mg/mL	0.025 mM	6 mM	aggregates
2	0.5 mg/mL	0.05 mM	6 mM	141.8 \pm 37.1 nm
3	0.5 mg/mL	0.1 mM	6 mM	183.2 \pm 55.1 nm
4	0.5 mg/mL	0.2 mM	6 mM	229.1 \pm 52.7 nm
5	0.5 mg/mL	0.4 mM	6 mM	277.9 \pm 36.1 nm
6	0.5 mg/mL	1 mM	6 mM	aggregates
7	0.125 mg/mL	0.1 mM	6 mM	aggregates
8	0.25 mg/mL	0.1 mM	6 mM	135.3 \pm 55.5 nm
9	1 mg/mL	0.1 mM	6 mM	254.6 \pm 32.9 nm
10	2 mg/mL	0.1 mM	6 mM	344.9 \pm 85.2 nm
11	0.5 mg/mL	0 mM	0 mM	N/A

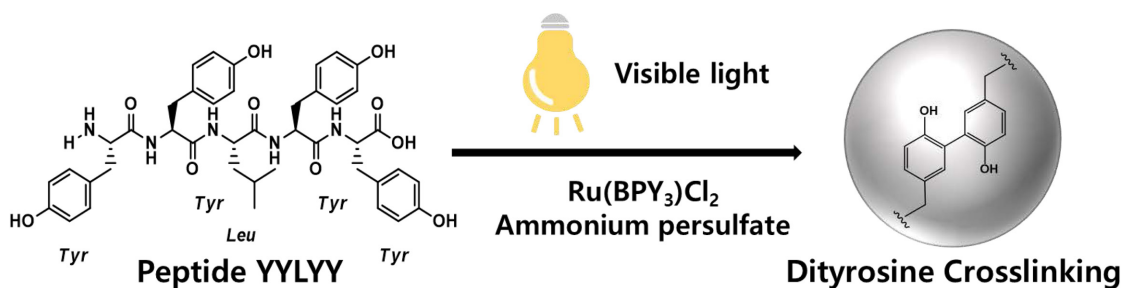


Fig. 1. Chemical structure of tyrosine-rich short peptide (YYLYY) and scheme for the synthesis of peptide nanoparticle through the formation of dityrosine bonds between peptides using Ru(BPY)₃Cl₂ photo-catalyst under visible light.

때 타이로신 잔기인 페놀(phenol)의 산화 및 라디칼을 형성하면서, 두 분자의 타이로신이 결합하게 한다[12-14]. 기존의 보고에서는 Tyr-Tyr-Ala-Tyr-Tyr (YYAYY) 서열의 펩타이드 단량체로 131 ~ 315 nm 크기의 펩타이드 나노입자를 만든 연구가 보고되었다[15]. 본 연구에서는 가운데 알라닌 아미노산이 아이소뷰틸 작용기를 가지는 류신으로 치환된 펩타이드를 사용함으로써 보다 더 소수성을 띠게 하였다.

먼저, 펩타이드 단량체의 공유적 상호작용에 의한 자기조립 펩타이드 나노입자의 형성 유무를 확인하기 위하여, 펩타이드, Ru(BPY)₃Cl₂, APS의 농도를 각각 0.5 mg/mL, 0.1 mM, and 6 mM (entry no. 3)

로 설정하여 광가교반응을 진행하였고, DLS, TEM, UV-Vis 분광법으로 분석하였다. Fig. 2a에서 보여주는 TEM 결과에 의하면, 가시광선 광가교 반응을 통해 펩타이드 용액에서 비교적 균일한 구형의 펩타이드 나노입자가 합성된 것을 확인할 수 있었다. 특이한 점은 Fig. 2b의 고배율 TEM image 에서 보여지는 것처럼, 합성된 나노입자의 표면이 일반적인 비공유결합으로 만들어진 나노입자나 마이셀(micelle) 처럼 매끄러운 표면을 가지지 않고, 거친 표면을 가졌다. 이는 광가교에 의한 합성 과정에서 비가역적으로 타이로신들이 결합되어 펩타이드 분자가 자체 오류 수정을 거치지 않고 펩타이드 나노입자로 성장되었기 때문이다[15]. 한편, 비교 반응으로서

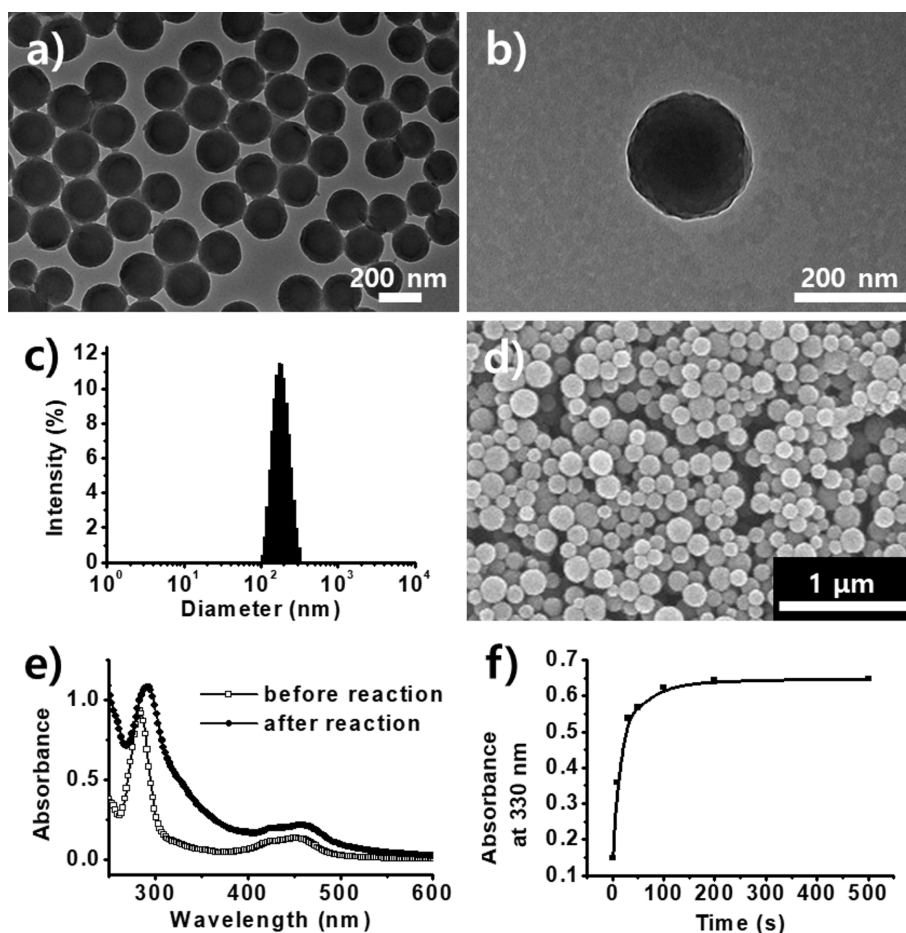


Fig. 2. Morphology and characteristics of peptide nanoparticles synthesized from 0.5 mg/mL of peptide YYLYY monomer, 0.1 mM of Ru(BPY)₃Cl₂, and 6 mM of APS under visible light for 500 sec. a, b) TEM images, c) size distribution, and d) SEM image of the peptide nanoparticles. e) UV-Vis spectra of peptide monomer (gray) and covalently cross-linked peptide nanoparticle (Black). f) Time-dependent UV absorption profile at 330 nm.

pH 10 완충 용액에 녹인 펩타이드 용액(entry no. 11)을 광조사 하였을 때는 어떠한 나노구조체도 형성되지 않았음을 확인하였다. 이를 통해, pH 10 완충 용액에 녹아 있는 펩타이드는 어떠한 자기조립 나노구조체가 형성되지 않았으므로, Ru(BPY)₃Cl₂의 광가교 개시에 의해 펩타이드 나노입자가 형성되었다는 것을 알 수 있었다. Fig. 2c의 DLS 결과에 따르면, 펩타이드 나노입자의 크기 분포는 183.2 ± 55.1 nm이며, 이는 Fig. 2의 TEM 결과 및 SEM 결과에서 관찰된 펩타이드 나노입자의 크기와 일치하였다. Fig. 2e의 펩타이드 나노입자 형성 전후의 UV-Vis 결과를 살펴보면, 일반적으로 알려진 다이하티로신 결합에 따른 330 nm 파장에서의 흡광도 증가가 관찰되었고, 이는 광가교 반응 동안에 펩타이드 사이의 다이하티로신 결합이 형성되었다는 것을 의미한다[12-16]. 또한 타이로신의 274 nm 흡수 피크가 펩타이드 나노입자의 형성 후에 적색 편이(red shift) 되는 것은 다이하티로신의 형성이 방향족 고리의 전자를 더욱 비편재화(electron delocalization)하여 UV 흡광도의 적색 편이를 유발하기 때문이며, 이러한 관찰은 기존의 문헌에서 타이로신 함유 단백질 및 펩타이드의 이량체화에 대해 보고 된 것과 일치하였다[17-19]. Fig. 2f의 광반응 시간에 따른 330 nm 파장에서의 흡광도를 살펴보면, 반응 시작 후 1분 이내에 흡광도가 급격하게 증가하였고, 이후에 소폭 증가되었다가, 100초 이후부터는 흡광도의 변화가 미미하였다. 이러한 흡광도 모니터링을 통해, 펩타이드 사이의 다이하티로신 결합이 광가교 반응초기에 매우 빠르게 형성되었음을 알 수 있었으며, 약 5분 내에 반응이 종결되는 것을 확인하였고, 이는 선행 연구 결과와 유사한 결과를 보였다[15].

3-2. Ru(BPY)₃Cl₂ 농도에 따른 펩타이드 나노입자의 크기 변화

Ru(BPY)₃Cl₂ 농도가 펩타이드 나노입자 형성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 펩타이드의 농도와 APS의 최종 농도를 각각 0.5 mg/mL, 6 mM로 고정하고, Ru(BPY)₃Cl₂ 용액의 농도(entry no. 1~6)를

변화하여 형성된 나노입자의 크기를 분석하였다. Fig. 3의 루테튬 농도 변화에 따른 펩타이드 나노 입자 크기의 변화를 살펴보면, 0.05 mM의 루테튬 농도에서는 141.8 ± 37.1 nm, 0.1 mM에서는 183.2 ± 55.1 nm, 0.2 mM에서는 229.1 ± 52.7 nm, 0.4 mM에서는 277.9 ± 36.1 nm 크기의 비교적 균일한 펩타이드 나노 입자가 형성되었음을 확인하였다. 전체적으로 Ru(BPY)₃Cl₂의 농도가 증가함에 따라 펩타이드 나노 입자의 크기가 소폭 증가하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 Ru(BPY)₃Cl₂ 농도가 증가할수록 라디칼이 많이 형성되어 펩타이드의 성장을 향상시키기 때문으로 보인다. 한편, Ru(BPY)₃Cl₂ 농도가 0.025 및 1 mM에서 합성된 결과물은 균일하지 않은 응집체를 형성하였다. 이를 통해 나노스케일에서 크기 및 모양이 재현성있게 잘 정의된 구조를 합성하기 위해서는 0.05 mM에서 0.4 mM 사이의 Ru(BPY)₃Cl₂ 농도를 사용해야 한다는 합성 조건을 확인하였다.

3-3. 펩타이드 단량체 농도에 따른 펩타이드 나노입자의 크기 변화

펩타이드의 농도가 펩타이드 나노입자 크기에 미치는 영향을 분석하기 위하여 APS와 Ru(BPY)₃Cl₂의 최종 농도를 각각 6 mM, 0.5 mM로 고정한 상태에서, 펩타이드의 농도(entry no. 7~10)를 변화하여 형성된 나노입자의 크기를 분석하였다. Fig. 4의 펩타이드 농도의 변화에 따른 펩타이드 나노 입자의 크기 분포를 살펴보면, 펩타이드 농도 0.25 mg/mL에서는 135.3 ± 55.5 nm, 1.0 mg/mL에서는 254.6 ± 32.9 nm, 2.0 mg/mL에서는 344.9 ± 85.2 nm 크기의 펩타이드 나노 입자가 형성되었다. 이를 통해, 펩타이드 농도가 증가함에 따라 나노 입자의 크기도 증가하는 것을 알 수 있었다. 한편, 0.125 mg/mL의 펩타이드 농도에서는 루테튬의 농도에 비해 펩타이드 농도가 현저하게 낮아 합성이 미완료된 나노구조(ill-defined nanostructure)가 관찰되었다.

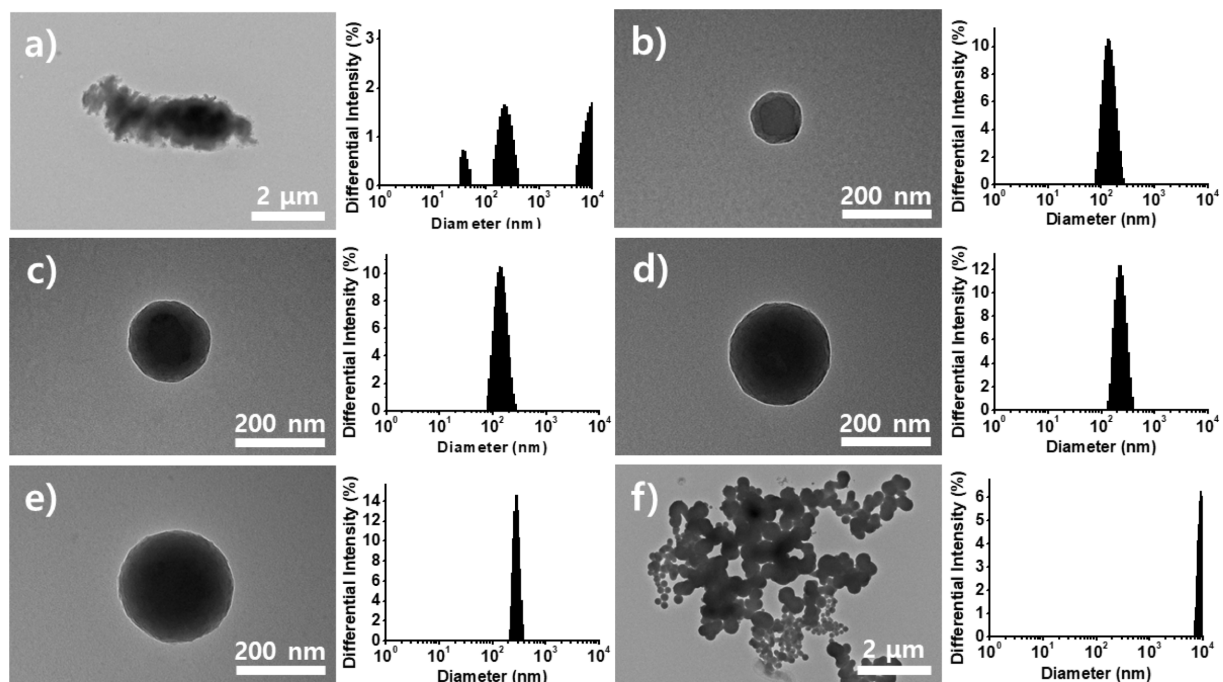


Fig. 3. TEM images and DLS results of peptide nanoparticles as a function of various concentrations of Ru(BPY)₃Cl₂ a) 0.025, b) 0.05, c) 0.1, d) 0.2, e) 0.4, f) 1 mM, while the concentration of peptide and APS were fixed at 0.5 mg/mL and 6 mM, respectively.

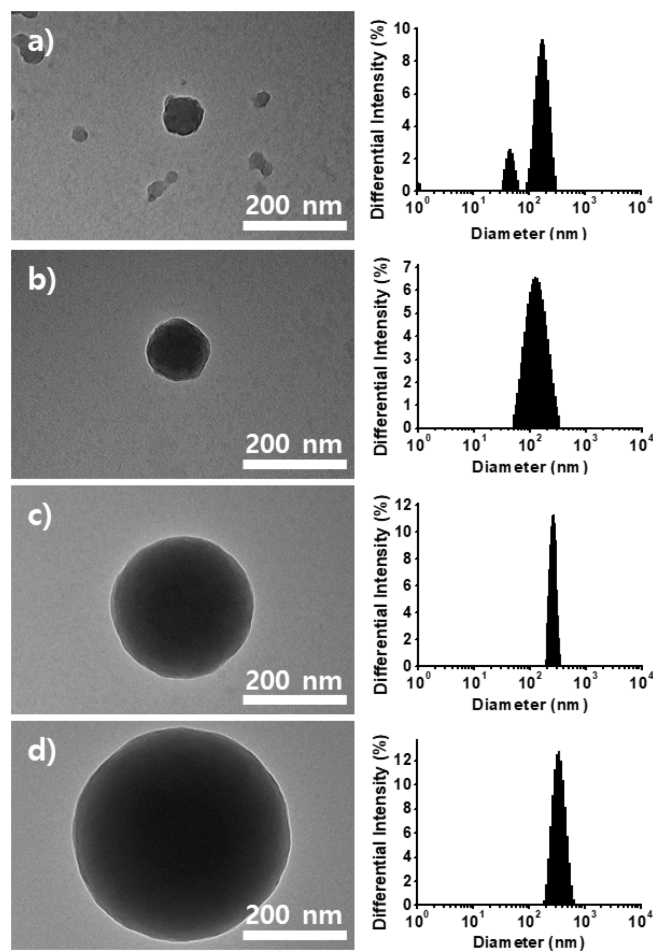


Fig. 4. TEM images and DLS results of peptide nanoparticles as a function of various concentrations of peptide a) 0.125, b) 0.25, c) 1, d) 2 mg/mL, while the concentration of Ru(BPY)₃Cl₂ and APS were fixed at 0.1 and 6 mM, respectively.

4. 결 론

본 연구에서는 타이로신이 많이 포함된 짧은 사슬 펩타이드인 YYLYY 서열 펩타이드 단량체의 광가교 반응을 통해 다이타이로신 결합으로 이루어진 공유결합성 펩타이드 나노입자를 합성하는 방법을 연구하였다. 또한 펩타이드 단량체와 Ru(BPY)₃Cl₂의 농도가 펩타이드 나노입자의 크기와 균일도에 미치는 영향을 평가하였고, 용액의 조성에 따라 합성된 나노입자의 크기를 제어할 수 있었다. 또한 광가교 반응의 시간에 따른 펩타이드 나노입자의 크기 및 형태의 변화를 확인하여 5분 이내에 나노입자가 빠르게 형성되는 것을 확인하였고, 이를 통해 130 nm ~ 350 nm 범위의 펩타이드 나노입자의 크기별 최적의 합성 조건을 제시하였다. 본 연구에서 다뤄진 방법은 짧은 펩타이드의 자기 조립에 대한 대안 중 하나로서 펩타이드 기반 기능성 나노 물질 합성으로의 활용 가능성을 시사하며, 생명공학, 의학 등의 다양한 분야에 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 2019년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2019R1C1C1005824).

References

1. Lim, Y., Moon, K.-S. and Lee, M., "Recent Advances in Functional Supramolecular Nanostructures Assembled from Bioactive Building Blocks," *Chem. Soc. Rev.*, **38**(4), 925-934(2009).
2. Santisa, E. D. and Ryadnov, M. G., "Peptide Self-assembly for Nanomaterials: the Old New Kid on the Block," *Chem. Soc. Rev.*, **44**(22), 8288-8300(2015).
3. Hu, X., Liao, M., Gong, H., Zhang, L., Cox, H., Waigh, T. A. and Lu, J. R., "Recent Advances in Short Peptide Self-assembly: from Rational Design to Novel Applications," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **45**, 1-13(2020).
4. Mann, S., "Self-assembly and Transformation of Hybrid Nano-objects and Nanostructures Under Equilibrium and Non-equilibrium Conditions," *Nat. Mater.*, **8**(10), 781-792(2009).
5. Baek, K., Hwang, I., Roy, I., Shetty, D., and Kim, K., "Self-assembly of Nanostructured Materials Through Irreversible Covalent Bond Formation," *Acc. Chem. Res.*, **48**(8), 2221-2229(2015).
6. Luo, T. and Kiick, K. L., "Noncovalent Modulation of the Inverse Temperature Transition and Self-assembly of Elastin-b-Collagen-like Peptide Bioconjugates," *J. Am. Chem. Soc.*, **137**(49), 15362-15365(2015).
7. Okesola, B. O. and Mata, A., "Multicomponent Self-assembly as a Tool to Harness New Properties from Peptides and Proteins in Material Design," *Chem. Soc. Rev.*, **47**(10), 3721-3736(2018).
8. Elvin, C. M., Carr, A. G., Huson, M. G., Maxwell, J. M., Pearson, R. D., Vuocolo, T., Liyou, N. E., Wong, D. C. C., Merritt, D. J. and Dixon, N. E., "Synthesis and Properties of Crosslinked Recombinant Pro-resilin," *Nature*, **437**(7061), 999-1002(2005).
9. Partlow, B. P., Applegate, M. B., Omenetto, F. G. and Kaplan, D. L., "Dityrosine Cross-linking in Designing Biomaterials," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2**(12), 2108-2121(2016).
10. Burrows, M., Shaw, S. R. and Sutton, G. P., "Resilin and Chitinous Cuticle form a Composite Structure for Energy Storage in Jumping by Frog Hopper Insects," *BMC Biol.*, **6**(1), 41(2008).
11. Cui, H., Webber, M. J., and Stupp, S. I., "Self-assembly of Peptide Amphiphiles: From Molecules to Nanostructures to Biomaterials," *Pept. Sci.*, **94**(1), 1-18(2010).
12. Fancy, D. A. and Kodadek, T., "Chemistry for the Analysis of Protein-protein Interactions: Rapid and Efficient Cross-linking Triggered by Long Wavelength Light," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**(11), 6020-6024(1999).
13. Ding, Y., Li, Y., Qin, M., Cao, Y. and Wang, W., "Photo-cross-Linking Approach to Engineering Small Tyrosine-containing Peptide Hydrogels with Enhanced Mechanical Stability," *Langmuir*, **29**(43), 13299-13306(2013).
14. Zhang, D., Peng, H., Sun, B. and Lyu, S., "High Water Content Silk Protein-based Hydrogels with Tunable Elasticity Fabricated via a Ru(II) Mediated Photochemical Cross-linking Method," *Fiber. Polym.*, **18**(10), 1831-1840(2017).
15. Min, K. I., Kim, D. H., Lee, H. J., Lin, L. and Kim, D. P., "Direct Synthesis of a Covalently Self-Assembled Peptide Nanogel from a Tyrosine-Rich Peptide Monomer and Its Biomineralized Hybrids," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **130**(20), 5732-5736(2018).
16. Min, K. I., Yun, G., Jang, Y., Kim, K. R., Ko, Y. H., Jang, H. S., Lee, Y. S., Kim, K. and Kim, D. P., "Covalent Self-assembly and One-step Photocrosslinking of Tyrosine-rich Oligopeptides to form

- Diverse Nanostructures,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**(24), 6925-6928(2016).
17. Malencik, D. A., Sprouse, J. F., Swanson, C. A. and Anderson, S. R., “Dityrosine: Preparation, Isolation, and Analysis,” *Anal. Biochem.*, **242**(2), 202-213(1996).
18. Lehrer, S. S. and Fasman, G. D., “Ultraviolet Irradiation Effects in Poly-L-tyrosine and Model Compounds. Identification of Bityrosine as a Photoproduct,” *Biochemistry*, **6**(3), 757-767(1967).
19. Correia, M., Neves-Petersen, M. T., Jeppesen, P. B., Gregersen, S. and Petersen, S. B., “UV-light Exposure of Insulin: Pharmaceutical Implications Upon Covalent Insulin Dityrosine Dimerization and Disulphide Bond Photolysis,” *PLoS One*, **7**(12), e50733(2012).