



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Chemical tools for the study of proteolytic activities associated with antigen presentation

Swieten, Paul Franciscus van

Citation

Swieten, P. F. van. (2007, January 18). *Chemical tools for the study of proteolytic activities associated with antigen presentation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/9143>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/9143>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Het bestuderen van functionele eiwitten in de context van de levende cel is een belangrijk veld van onderzoek. Dit proefschrift richt zich op het ontwerp en de synthese van probes waarmee de enzymactiviteiten van het proteasoom en van cysteineproteases van de cathepsine klasse kunnen worden gedetecteerd en gekwantificeerd. In **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift wordt een overzicht gegeven van de manieren waarop biomoleculen in levende cellen van een label kunnen worden voorzien. In natieve eiwitten kan een reactieve groep ingebouwd worden, die vervolgens wordt gebruikt om het eiwit selectief van een label te voorzien. Een andere strategie omvat de biosynthese van fusie-eiwitten die bestaan uit het te bestuderen eiwit en een speciaal peptide of actief enzym. Het toegevoegde deel van het fusie-eiwit maakt het aanbrenge van een label mogelijk. De derde strategie maakt gebruik van speciaal ontworpen synthetische probes, die celpermeabel zijn. Deze probes binden covalent aan het te onderzoeken eiwit en zijn bovendien voorzien van een bio-orthogonale groep die inert is in de cellulaire omgeving, maar na cellysis wordt gebruikt voor het aanbrenge van een label.

In **Hoofdstuk 2** worden de synthese en toepassing van een nieuw type probe beschreven. Een bekende cel permeabele en irreversibele remmer van het proteasoom werd uitgerust met een azide als bio-orthogonale groep. Na incubatie van cellen met deze probe

en cellysis, kon het proteasoom middels de Staudinger-Bertozzi ligatie selectief worden gebiotinylerd. Met deze tweestapsprocedure konden voor het eerst alle proteolytische activiteiten van het proteasoom in de levende cel zichtbaar worden gemaakt en werden mogelijke artefacten, die kunnen optreden bij het lyseren van cellen en het meten van enzymactiviteiten in cellysaten, voorkomen.

Het proteasoom vertoont verschillende soorten enzymatische activiteit, die gelokaliseerd zijn in afzonderlijke subunits. In **Hoofdstuk 3** worden twee remmers gepresenteerd voor één van deze activiteiten van het proteasoom, namelijk degene die wat substraatherkenning betreft op caspases lijkt. Een van deze nieuwe remmers bevat een azidegroep, en de specificiteit van deze remmer voor de caspase-achtige activiteit van het proteasoom werd aangetoond middels de tweetrapsprocedure uit Hoofdstuk 2. Bij een lagere concentratie van de remmer werd bovendien selectiviteit voor het immunoproteasoom waargenomen.

Hoofdstuk 4 beschrijft de vaste drager synthese van twee paar probes voor cysteine proteases uit de cathepsineklasse. Kenmerkend voor deze probes zijn de speciale linkers, namelijk één in een lichte vorm, en de ander in een zware vorm, waarin een aantal waterstofatomen is vervangen door deuterium. Het inbouwen van de nieuwe linker in een bekende cathepsineremmer had geen invloed op het remmingsprofiel. Met behulp van een lichte en een zware probe zou de relatieve cysteine proteaseactiviteit tussen twee samples middels massaspectrometrie kunnen worden vastgesteld. Voorwaarde voor succes van deze methode is de massaspectrometrische detectie van het door de remmer gealkyleerde active site fragment van het enzym.

Hoofdstuk 5 behandelt de synthese van een nieuwe cysteine protease probe. Deze probe omvat een bekende remmer voor cysteine proteases die via een fotolabiele linker werd uitgebreid met een geactiveerde ester. De actieve ester werd gebruikt om een covalente binding tot stand te brengen tussen de probe en de aminogroepen van een modelantigeen. Door dit gemodificeerde antigeen aan te bieden aan een professionele antigeen presenterende cel zouden de cysteineproteases, die een rol spelen bij de verwerking van dit antigeen voor presentatie, in kaart gebracht kunnen worden. De identificatie van deze proteases zou vereenvoudigd kunnen worden door het verwijderen van het modelantigeen door de invloed van ultraviolet licht op de fotolabiele linker. De eerste

labelingsexperimenten verliepen echter niet eenduidig, wat mogelijk een gevolg is van een inhomogeniteit van het gemodificeerde antigen.

Sommige peptidesequenties zijn bekend om hun eigenschap andere moleculen door celmembranen heen te transporteren. Het mechanisme van dit transport is nog niet volledig opgehelderd. In **Hoofdstuk 6** wordt een benadering gepresenteerd die het inzicht in het opnamemechanisme kan vergroten. Een cysteine protease probe werd geconjugeerd aan een celpenetrerende peptidesequentie, opdat dit construct actief cellen in wordt getransporteerd. Tijdens het transport bindt de probe aan de actieve cysteine proteases die het onderweg tegenkomt. In een reeks experimenten werd aangetoond dat het opnamepad minimaal een energieonafhankelijke component kent. In toekomstig onderzoek zouden verschillende celpenetrerende peptiden aan een cysteine protease probe kunnen worden geconjugeerd om te zien of alle peptide hetzelfde opnamepad volgen.