



Universiteit
Leiden
The Netherlands

A bioorthogonal chemistry approach to the study of biomolecules in their ultrastructural cellular context

Elsland, D.M. van

Citation

Elsland, D. M. van. (2018, January 11). *A bioorthogonal chemistry approach to the study of biomolecules in their ultrastructural cellular context*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/61131>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/61131>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:

<http://hdl.handle.net/1887/61131>

Author: Elsland, D.M. van

Title: A bioorthogonal chemistry approach to the study of biomolecules in their ultrastructural cellular context

Issue Date: 2018-01-11

Nederlandse Samenvatting

Om inzicht te krijgen in hoe biomoleculen cellulaire processen coördineren zijn er verschillende methoden ontwikkeld die het mogelijk maken om biomoleculen te bestuderen. Eén van deze strategieën is bioorthogonale chemie, een chemische markeringstechniek waarbij met behulp van een kleine chemische aanpassing biomoleculen ontvankelijk gemaakt voor detecteerbare labels. Bioorthogonale chemie kan worden toegepast bij onderzoek naar een veelvoud aan biomoleculen waaronder DNA, RNA, eiwitten, lipiden en suikers en heeft veel informatie opgeleverd over de eigenschappen en interacties van deze biomoleculen. Echter is het tot dus ver niet mogelijk geweest om bioorthogonaal gelabelde biomoleculen te bestuderen in de context van de complete cellulaire omgeving. In dit proefschrift wordt de ontwikkeling en de toepassing van een methode beschreven waarbij, door het combineren van bioorthogonale chemie en elektronen microscopie, biomoleculen bestudeerd kunnen worden in de ultrastructurele context van hun cellulaire omgeving.

In **hoofdstuk 1** worden de algemene principes beschreven van elektronen microscopie voor biochemisch onderzoek. Allereerst worden twee verschillende elektronen microscopen beschreven; de 'Scanning Electron Microscope' (SEM) en de 'Transmission Electron Microscope' (TEM). Vervolgens worden verschillende preparatie technieken besproken die nodig zijn om biologische monsters te bekijken met de TEM. Tot slot wordt er beschreven met welke reeds ontwikkelde strategieën biomoleculen gelokaliseerd kunnen worden in deze biologische TEM-monsters. Eén van deze strategieën correlatieve licht en elektronen microscopie (CLEM) wordt verder uitgelegd aan de hand van twee strategieën; CLEM op levende cellen en CLEM op dunne coupes van cellen.

In **hoofdstuk 2** wordt het belang en de potentie benadrukt van bioorthogonale labellingsstrategieën voor CLEM. In dit review wordt een overzicht gegeven van veel gebruikte bioorthogonale labellingsstrategieën, onder andere; de koper gekatalyseerde Huisgen cycloadditie reactie, de 'strain-promoted' cycloadditie, de 'inverse electron-demand' Diels-Alder cycloadditie en de 'photoclick' reactie. **Hoofdstuk 2** bediscussieert tevens welk onderzoek reeds is uitgevoerd op het gebied van bioorthogonale labellingsstrategieën en CLEM. Hieronder vallen onder andere strategieën zoals azide-gemodificeerde goud partikels, bioorthogonaal gefunctionaliseerde seleen/zink sulphine 'core-shell quantum dots' en

bioorthogonaal gefunctionaliseerde fluorophoren die in staat zijn om diaminobenzidine te foto oxideren.

In **hoofdstuk 3** worden twee methoden beschreven die zijn ontwikkeld om bioorthogonaal gelabelde biomoleculen te detecteren met de elektronen microscoop. In de eerste methode worden bioorthogonaal gelabelde biomoleculen direct in de elektronen microscoop gedetecteerd met behulp van colloïdale goud partikels. In het geval van de tweede strategie wordt er gebruik gemaakt van een CLEM methode waarbij allereerst bioorthogonale groepen fluorescent gelabeld worden en geïdentificeerd worden met een lichtmicroscoop. Vervolgens wordt er elektronen microscopie toegepast op dezelfde locaties waarna de informatie uit beiden microscopie strategieën aan elkaar wordt gekoppeld. Beide strategieën zijn toegepast om bioorthogonaal gelabelde bacteriën te identificeren in een mengsel van ongelabelde bacteriën.

In **hoofdstuk 4** wordt een grondige analyse beschreven van goud en fluorescentie labelling voor EM. Door het vergelijken van beide strategieën wordt aangetoond dat -indien epitopen aanwezig zijn in verschillende cellulaire structuren- er verschillen bestaan tussen de fluorescentiesignalen en de verdeling van goud partikels. Dit is aangetoond en gekarakteriseerd met behulp van de technieken die zijn beschreven in **hoofdstuk 3**; de labelling van bioorthogonale groepen met zowel goud als fluorescentie.

In **hoofdstuk 5** wordt de CLEM detectie van bioorthogonale labels toegepast om bacteriële afbraak in het fagolysosomale stelsel van fagocytische cellen te bestuderen. Onderzoek naar de afbraak van bacteriën in fagocytische cellen is problematisch aangezien de genetische modificatie van pathogenen gecompliceerd is en –indien succesvol- alleen gebruikt kan worden tot het punt waarop de genetisch geïntroduceerde markerings-eiwitten worden afgebroken. In **hoofdstuk 5** wordt aangetoond dat de CLEM-detectie van bioorthogonale groepen het mogelijk maakt om met zeer hoge resolutie de sub-cellulaire locatie van gedegradeerde bacteriën te bestuderen, zelfs nadat het signaal van de genetische reporter constructen verloren zijn gegaan.

In **hoofdstuk 6** wordt geïllustreerd hoe implementatie van ‘stochastic optical reconstruction microscopy’ microscopie -in de gerapporteerde strategie van de **hoofdstuk 5**- kan worden toegepast om de sub-cellulaire locatie van *Salmonella*-virulentiefactoren te bekijken. Deze strategie biedt de mogelijkheid om

virulentiefactoren die afkomstig zijn van pathogenen te bestuderen in de context van de gastheercel. Met behulp van deze strategie is het mogelijk om te bestuderen op welke manier de injectie van virulentiefactoren gastheercellen beïnvloed en hoe deze interacties veranderingen veroorzaken in de gastheercel.

In **hoofdstuk 7** word beschreven hoe actieve enzym populaties kunnen worden bestudeerd met behulp van 'activity based probes' (ABPs) en CLEM. In dit hoofdstuk wordt beschreven dat zowel met twee-staps als directe ABPs actieve cysteïneproteasen populaties kunnen worden bestudeerd in de context van cellulaire ultrastructuren. Bij het gebruik van zowel twee-staps als directe ABPs kunnen actieve populaties van cysteïneproteasen gedetecteerd worden met hoge selectiviteit en efficiëntie. Bovendien laat **hoofdstuk 7** zien dat met behulp van directe ABP labelling meerdere enzym populaties kunnen worden bestudeerd met CLEM.

In het concluderende **hoofdstuk 8** worden alle bevindingen samengevat en worden er suggesties gegeven voor alternatieve technieken en toekomstige toepassingen, onder andere; labelling met behulp van diaminobenzidine precipitatie; het inbouwen van bioorthogonale aminozuren in *Salmonella* mutanten; 3D-CLEM van bioorthogonaal gelabelde bacteriën in fagocytische cellen en suggesties voor verbetering van de CLEM-ABP strategie.

