



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The advantages and disadvantages of bioorthogonal proteins

Groenewold, G.J.M.

Citation

Groenewold, G. J. M. (2021, February 17). *The advantages and disadvantages of bioorthogonal proteins*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3142384>

Version: 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/1887/3142384>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3142384> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Groenewold, G.J.M.

Title: The advantages and disadvantages of bioorthogonal proteins

Issue Date: 2021-02-17

A large, light-colored watermark of the letter 'S' is centered on the page. It has a soft, painterly texture with a color gradient from light pink at the top to light blue at the bottom.

Nederlandse samenvatting

Het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven richt zich op het gebruik van bioorthogonaal gelabelde eiwitten in immunologische analyses. In deze thesis wordt vooral gefocust op MHC-II antigenen.

In **hoofdstuk 1** wordt een algemene omschrijving van eiwitexpressie gegeven. Hierna wordt besproken hoe belangrijk posttranslationele modificaties zijn en hoe eiwitten posttranslationeel gemodificeerd kunnen worden door gebruik te maken van bioorthogonale eiwitten. Vervolgens worden verschillende methodes beschreven waarmee eiwitten bioorthogonaal gemodificeerd kunnen worden. Allereerst wordt er aandacht besteed aan het modificeren van de N- en C-terminus en de zijketens van de aminozuren waaruit eiwitten zijn opgebouwd. Dan volgt een introductie in verschillende eiwitexpressie systemen en de stammen waarin recombinante eiwitten tot expressie kunnen worden gebracht. Achtereenvolgens worden twee methoden besproken waarbij onnatuurlijke aminozuren, die een orthogonale groep bevatten, ingebouwd kunnen worden. Als eerste wordt het gebruik van onder andere amber codon suppressie besproken om vervolgens metabole labeling te benoemen. Tot slot wordt in het eerste hoofdstuk een aantal toepassingen van bioorthogonale eiwitten besproken.

In **hoofdstuk 2** wordt de expressie en zuivering beschreven van ovalbumine (Ova) met de inbouw van L-Aha en L-Hpg. Allereerst wordt het N. Del Cid construct gebruikt om 6His-TEV-Ova tot expressie te brengen. Het bleek mogelijk om dit eiwit met de inbouw van deze onnatuurlijke aminozuren te produceren en te zuiveren, maar dit gaf een lage opbrengst. Om deze opbrengst te verhogen wordt het gen aan een 10His-tag gekloneerd. De expressie van 10His-TEV-Ova resulteert in de productie van zogenaamde inclusion bodies. Met het toevoegen van solubiliserende tags kon dit niet veranderd worden en het bleek ook niet mogelijk om het eiwit te zuiveren uit de inclusion bodies wanneer L-Hpg in het eiwit was ingebouwd. Een laatste eiwit expressie wordt geprobeerd waarbij het eiwit zonder tags tot expressie wordt gebracht. Dit resulteerde in de expressie van het eiwit in LB medium en met de inbouw van L-Aha, maar dit laatste alleen in BL21::MetA en niet in de veelgebruikte B834(DE3).

Na de in **hoofdstuk 2** besproken moeilijkheden met de expressie en zuivering van bioorthogonaal Ova wordt in **hoofdstuk 3** tetanus toxin C fragment (TTCF) gebruikt om antigeen presentatie te bestuderen. Hiervoor worden de voorspelde negen aminozuren, – de onderstreepte aminozuren in de volgende sequentie: SGFNSSVITYPDAQLVP – die binden tussen het MHC klasse II epitoom en de T-cel receptor van de 2F2 T-cel hybridoma, gemuteerd naar methionine. Dit resulteert in 9 mutant genen, die vervolgens gekloneerd worden in het expressieplasmide pET16b. Na transformatie van deze plasmiden in B834(DE3) is het mogelijk om deze tot expressie te brengen in LB medium of SelenoMet medium waaraan L-Aha is toegevoegd. Dit resulteert in 20 (mutant) eiwitten die, na zuivering, gebruikt kunnen worden voor diverse antigeen experimenten. Als eerste wordt bekeken of de bioorthogonaal gelabelde aminozuren afgebroken worden in BMDCs, waarna, na bevestiging van de afbraak, wordt gekeken of het eiwit in staat is om de corresponderende T-cel hybridoma te activeren. Dit bleek het geval voor zowel de azide-gelabelde eiwitten als voor de methionine bevattende eiwitten, alleen voor beiden bleek de IL-2 productie te laag om verschil te kunnen ontdekken tussen eventueel geblokkeerde antigeen presentatie en wild-type niveaus. Om deze reden werden verschillende MHC-II peptide varianten gesynthetiseerd gebaseerd op residuen 323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) van het model eiwit Ova. Hierbij bevatte elk peptide een andere aminozuur vervanging naar L-Aha. Een antigeen presentatie assay via A20s naar DO11.10 liet zien dat verschillende mutant peptiden nog in staat waren om de T-cellen te activeren. Het veelbelovendste peptide, ISQAVHAAHAEINaHaAGR, werd vervolgens gebruikt voor een immunoprecipitatie tegen MHC-II, waarvan de eerste resultaten veelbelovend lijken.

In **hoofdstuk 4** wordt een nieuwe methode geïntroduceerd voor het visualiseren van antigenen in immunocytochemie en immunohistochemie. Voor deze methode wordt gebruik gemaakt van het bekende horseradish peroxidase (HRP). Als eerste wordt gekeken of de diazotransfer zoals beschreven bij van Dongen *et al.* verbeterd kan worden. Het bleek dat de modificatie van HRP tot HRP-N₃ via de methode van van Dongen bijna optimaal is. Vervolgens wordt gekeken of HRP-N₃ geligeerd kan worden aan gealkyleerd TTCF en specificiteit van de reactie wordt gecontroleerd door dit eiwit

in cellysaat te verdunnen. Na bevestiging van deze specificiteit wordt de ligatiereactie ook uitgevoerd met verschillende concentraties gealkyleerde bacteriën. Dit liet een duidelijk verschil zien tussen niet gemodificeerde en volledig gealkynyleerde bacteriën. Als laatste wordt in dit hoofdstuk HRP-N₃ gebruikt om gealkyleerde probes te visualiseren na inhibitie van het bijbehorende eiwit. Dit resulteerde niet in een verschil tussen signaal en achtergrondsignaal.

