Universiteit
Leiden
The Netherlands

Bioorthogonal antigens as tool for investigation of antigen processing and presentation

Pieper Pournara, L.

Citation

Pieper Pournara, L. (2021, November 16). *Bioorthogonal antigens as tool for investigation of antigen processing and presentation*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3239301

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/1887/3239301

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

Zusammenfassung
(German Summary)

Diese Dissertation beschreibt die Forschung zur Verwendung von bioorthogonalen Proteinen als Antigene - molekulare Strukturen, die das Immunsystem aktivieren - in immunologischen Studien. Bioorthogonale Proteine sind definiert als Proteine, bei denen eine der kanonischen Aminosäuren durch eine nicht-kanonische ersetzt ist, deren Seitenkette eine bioorthogonale Funktionalität trägt - eine Funktionalität, die in physiologischen Proben (bei Zimmertemperatur, normalem Druck, neutralem pH-Wert und wässriger Umgebung) inert, also stabil und unreaktiv ist und die dazu gebracht werden können, effektiv und selektiv zu reagieren, um zu einem gewünschten Zeitpunkt im Verlauf eines biologischen Experiments zusätzliche Funktionalität zu bringen.

Im Rahmen der in dieser Dissertation beschriebenen Forschung werden bioorthogonale Proteine hergestellt und verwendet, bei denen die kanonische Aminosäure Methionin im Proteinrückgrat durch Azidohomoalanin oder Homopropargylglycin ersetzt werden - biologische Methioninisostere, die wenig anders sind (also die Proteinfunktionalität wahrscheinlich nicht sehr stören), sind physiologisch weitgehend inert, aber reaktiv in der Kupfer-katalysierten Huisgen-Reaktion oder - im Falle von Azidohomoalanin - auch in der Staudinger- und der spannungsbegünstigten Azid-Alkin-Cycloadditions Reaktion und lassen sich leicht durch Methionin-auxotrophe bakterielle Expressionsstämme in rekombinante Proteine integrieren. Das Hauptaugenmerk dieser Dissertation lag auf der Etablierung von Verfahren, die bioorthogonale Proteine nutzen, um die Proteolyse - den enzymatischen Abbau - von Proteinen zu untersuchen, die in dendritischen Zellen während der Antigenpräsentation stattfindet. Faktoren, die an der Antigenverarbeitung beteiligt sind, wie Dynamik, Hierarchie proteolytischer Ereignisse (welche Proteasen sind in welcher Reihenfolge beteiligt) und in welchen subzellulären Kompartimenten dies stattfindet, sind derzeit sehr schwer zu untersuchen. Die einfache Inkubation von antigenpräsentierenden Zellen mit immunogenen Peptiden, die mit Reportermolekülen wie Fluorophoren ausgestattet sind, gibt kein gutes Bild davon, was bei der natürlichen Antigenverarbeitung passiert, da intrazellulärer Antigentransport und -proteolyse untrennbar miteinander verbunden sind. Die Proteolysegeschwindigkeit hängt stark von der genauen Aminosäresequenz und Struktur des Proteins ab, was die Verwendung von konstruierten/modifizierten immunogenen Proteinen mit (großen, oft hydrophoben) Fluorophoren als Reportereinheiten erschwert oder sogar überflüssig macht (diese Arbeit Kapitel 2).

Eine letzte Komplikation umfasst die extremen chemischen Bedingungen, die innerhalb des Antigenpräsentations-Zyklus der dendritischen Zelle herrschen. Die Abbauproducte der Proteine - die Peptide - werden auf ihrem Weg von der Zelloberfläche über die Lysosomen zu speziellen intrazellulären Kompartimenten transportiert, wo sie zur Bestückung von spezialisierten Proteinkomplexen, sogenannten Hauptgewebeverträglichkeitskomplexen (MHC), verwendet werden, um das Immunsystem gegebenenfalls

über bestimmte Immunzellen zu aktivieren. Neben der sehr sauren Umgebung, wie sie in Lysosomen vorkommt, werden die Peptide zusätzlich sowohl oxidativen als auch reduzierenden Bedingungen ausgesetzt - Bedingungen, denen angeheftete Fluorophore möglicherweise nicht standhalten (was auch die Verwendung alternativer bioorthogonaler Markierungen wie zum Beispiel trans-Cyclooctene ausschließt). Auf ihrem Weg von der Zelloberfläche zur Bestüung von sogenannten Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (MHC) mit den Abbauprodukten der Proteine - den Peptiden - werden diese neben der sauren Umgebung, wie sie in Lysosomen vorkommt, sowohl oxidativen als auch reduzierenden Bedingungen ausgesetzt - Bedingungen, denen Fluorophore möglicherweise nicht standhalten (und übrigens auch die Verwendung alternativer bioorthogonaler Markierungen wie zum Beispiel trans-Cyclooctene ausschließt).

Aus diesen Gründen werden hier immunogene Proteine, die entweder Azidohomoalanin oder Homopropargylglycin als bioorthogonale Aminosäuren enthalten, für eine Vielzahl von Studien im Rahmen der Antigenverarbeitung und -präsentation vorgestellt. Die in den aufeinander folgenden Kapiteln dieser Dissertation beschriebene Forschungsarbeit umfasst sowohl die Erzeugung solcher bioorthogonalen Antigene als auch die Untersuchung ihres Verbleibs in einer Reihe von Proteolysestudien innerhalb und außerhalb der Zelle.

Kapitel 2 stellt die Antigenverarbeitung und -präsentation als einen zentralen Weg der adaptiven Immunität bei Wirbeltieren vor. Weiter werden einerseits die Techniken vorgestellt, die zur Untersuchung der an diesen Prozessen beteiligten Faktoren zur Verfügung stehen, und andererseits die bioorthogonale Chemie, deren Umfang, Grenzen und Potenzial das Studium der Antigenverarbeitung und -präsentation unterstützen.

Kapitel 3 beschreibt die Expression bioorthogonaler Varianten des Modellantigens Ovalbumin in einem Methionin-auxotrophen *E. coli* Stamm. Das Ersetzen von Methionin durch Azidohomoalanin oder Homopropargylglycin während der Expression ergab das Antigen mit 17 reaktiven Gruppen pro Protein. Diese Proteine wurden dann auf ihre Fähigkeit untersucht, relevante T-Zellen - Zellen des adaptiven Immunsystems - nach der Verarbeitung durch dendritische Zellen - Zellen des angeborenen Immunsystems - zu aktivieren, wobei sich herausstellte, dass sie in ihren immunogenen Eigenschaften nahezu identisch mit dem Wildtyp des Antigens waren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Abbau des Antigens durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese verfolgt und der Verbleib des Antigens und seiner Abbauprodukte durch konfokale Mikroskopie verfolgt werden konnte. Diese Daten kombiniert legen nahe, dass bioorthogonale Antigene geeignete Werkzeuge zum Studium der Antigenverarbeitung sind.

Kapitel 4 beschreibt die detaillierte Untersuchung der Proteolyse der bioorthogonalen immunogenen Proteine, die wie in Kapitel 3 beschrieben hergestellt wurden. Durch die Bewertung der Abbaurate durch verschiedene rekombinante Proteasen außerhalb der Zelle können die Auswirkungen der bioorthogonalen Modifikation auf diesen Abbau detailliert untersucht werden. Diese Experimente zeigen, dass sich diese Feinspezifität bei Einführung der reaktiven Gruppen um <20 % ändert. Es wurde auch analysiert, ob die posttranslationalen Proteinmodifikationen - Carbamylierung und Citrullinierung - zu einer veränderten Proteinverarbeitung führen. Dies wurde in der Tat beobachtet: Insbesondere die Carbamylierung führte bei verschiedenen endolysosomalen Proteasen zur signifikanten Reduktion der Proteolyserate. Interessanterweise galt dies auch für das Autoantigen Vinculin, dessen post-translationale Carbamylierung und Citrullinierung mit der Entstehung von rheumatoider Arthritis in Verbindung gebracht wurde.

Dies führte zu den in **Kapitel 5** beschriebenen Untersuchungen, in denen die veränderte Immunogenität dieser Proteine beschrieben wird, was bestätigt, dass bioorthogonale Antigene nützliche Werkzeuge für die Untersuchung der Verarbeitung dieser modifizierten Proteine sind.

Kapitel 6 fasst die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen und zeigt mögliche Perspektiven auf, die bei Weiterführung dieser Forschungsarbeit aufgegriffen werden können.