



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).

Samenvatting

(Dutch Summary)

Dit proefschrift beschrijft het onderzoek naar het gebruik van bioorthogonale eiwitten als antigenen - moleculaire structuren die het immuunsysteem activeren - in immunologische studies. Bioorthogonale eiwitten worden gedefinieerd als eiwitten waarin een van de canonieke aminozuren is vervangen door een niet-canonieke waarvan de zijketen een bioorthogonale functionaliteit draagt - een functionaliteit die wordt aangetroffen in inerte fysiologische monsters (bij kamertemperatuur, normale druk, neutrale pH en een waterige omgeving), dat wil zeggen stabiel en niet-reactief. Deze kan worden gemaakt om effectief en selectief te reageren zodat er extra functionaliteit op een gewenst tijdstip in de loop van een biologisch experiment kan worden ingebracht.

In de context van het beschreven onderzoek in dit proefschrift worden bioorthogonale eiwitten geproduceerd en gebruikt waarbij het canonieke aminozuur methionine in de eiwit wordt vervangen door azidohomoalanine of homopropargylglycine - biologische methionine-isosteren die weinig verschillen (dus de eiwitfunctie wordt waarschijnlijk niet geïnterfereerd) zijn grotendeels fysiologisch inert maar reactief in de door kopergekatalyseerde Huisgen reactie of - in het geval van azidohomoalanine - ook in de Staudinger- en de strain-promoted azide-alkyn cycloadditie reactie en kunnen gemakkelijk worden geïntegreerd in recombinante eiwitten door methionine-auxotrofe bacteriële expressiestammen. De belangrijkste focus van dit proefschrift was het opzetten van procedures te onderzoeken die bioorthogonale eiwitten gebruiken om de proteolyse - de enzymatische afbraak - van eiwitten die plaatsvindt in dendritische cellen tijdens antigeenpresentatie. Factoren die betrokken zijn bij antigeenverwerking, zoals dynamiek, hiërarchie van proteolytische gebeurtenissen (welke proteasen zijn betrokken in welke volgorde) en in welke subcellulaire compartimenten dit plaatsvindt, zijn momenteel erg moeilijk te onderzoeken. De eenvoudige incubatie van antigeen presenterende cellen met immunogene peptiden uitgerust met reportermoleculen zoals fluoroforen geeft geen goed beeld van wat er gebeurt tijdens natuurlijke antigeenverwerking, aangezien intracellulair antigeentransport en proteolyse onlosmakelijk met elkaar verbonden zijn. De snelheid van proteolyse hangt sterk af van de exacte aminozuursequentie en structuur van het eiwit, wat het gebruik van geconstrueerde/gemodificeerde immunogene eiwitten met (grote, vaak hydrofobe) fluoroforen als reportereenheden moeilijk of zelfs overbodig maakt (dit werk, Hoofdstuk 2) .

Een laatste complicatie betreft de extreme chemische omstandigheden die bestaan binnen de antigeenpresentatiecyclus van de dendritische cel. De afbraakproducten van de eiwitten - de peptiden - worden op hun weg van het celoppervlak via de lysosomen naar speciale subcellulaire compartimenten getransporteerd, waar ze worden gebruikt om gespecialiseerde eiwitcomplexen samen te stellen, de zogenaamde hoofdweefselcompatibiliteitscomplexen (MHC), om zo nodig via bepaalde afweercellen het immuunsysteem te activeren. Naast de zeer zure omgeving die in lysosomen wordt aangetroffen,

worden de peptiden ook blootgesteld aan zowel oxidatieve als reducerende omstandigheden - omstandigheden die gehechte fluoroforen niet kunnen weerstaan (wat ook het gebruik van alternatieve bioorthogonale labels zoals trans-cyclooctenen uitsluit). Om deze redenen worden immunogene eiwitten die ofwel azidohomoalanine ofwel homopropargylglycine als bioorthogonale aminozuren bevatten, hier gepresenteerd voor een groot aantal studies in de context van antigeenverwerking en presentatie. Het onderzoek beschreven in de opeenvolgende hoofdstukken van dit proefschrift omvat zowel het genereren van dergelijke bioorthogonale antigenen als het onderzoek naar hun lot in een reeks proteolysestudies binnen en buiten de cel.

Hoofdstuk 2 introduceert antigeenverwerking en -presentatie als een centrale route van adaptieve immuniteit bij gewervelde dieren. Verder worden aan de ene kant de technieken gepresenteerd die beschikbaar zijn voor het onderzoek van de factoren die betrokken zijn bij deze processen, en aan de andere kant de bioorthogonale chemie, de reikwijdte, limieten en potentieel om de studie van antigeenverwerking en presentatie te ondersteunen.

Hoofdstuk 3 beschrijft de expressie van bioorthogonale varianten van het model antigeen ovalbumine in een methionine-auxotrofe *E. coli* stam. Het vervangen van methionine door azidohomoalanine of homopropargylglycine tijdens expressie gaf het antigeen met 17 reactieve groepen per eiwit. Deze eiwitten werden vervolgens onderzocht op hun vermogen om relevante immuuncellen te activeren - cellen van het adaptieve immuunsysteem - na verwerking door dendritische cellen - cellen van het aangeboren immuunsysteem - en er werd vastgesteld dat hun immunogene eigenschappen bijna identiek waren aan die van het wildtype. Verder kon worden aangetoond dat de afbraak van het antigeen kan worden gevolgd door natriumdodecylsulfaat-polyacrylamidegelelektroforese en het lot van het antigeen en zijn afbraakproducten kan worden gevolgd door confocale microscopie. Gecombineerd suggereren deze gegevens dat bioorthogonale antigenen geschikte hulpmiddelen zijn voor het bestuderen van antigeenverwerking.

Hoofdstuk 4 beschrijft de gedetailleerde studie van de proteolyse van de bioorthogonale immunogene eiwitten geproduceerd zoals beschreven in Hoofdstuk 3. Door de snelheid van afbraak door verschillende recombinante proteasen buiten de cel te evalueren, kunnen de effecten van de bioorthogonale modificatie op deze afbraak in detail worden onderzocht. Deze experimenten tonen aan dat deze fijne specificiteit met <20% verandert wanneer de reactieve groepen worden geïntroduceerd. Ook werd geanalyseerd of de post-translationele eiwitmodificaties - carbamylering en citrullinatie - leiden tot veranderde eiwitverwerking. Dit is inderdaad waargenomen: met name carbamylering leidde tot een significante verlaging van de snelheid van proteolyse in verschillende endolysosomale proteasen. Interessant genoeg gold dit ook voor het auto-antigeen vinculine, waarvan de post-translationele carbamylering en citrullinatie in verband is gebracht met de ontwikkeling van reumatoïde artritis.

Dit leidde tot de studies beschreven in Hoofdstuk 5, die de veranderde immunogeniciteit van deze eiwitten beschrijven, wat bevestigt dat bioorthogonale antigenen nuttige hulpmiddelen zijn voor het bestuderen van de verwerking van deze gemodificeerde eiwitten.

Hoofdstuk 6 vat de resultaten van dit werk samen en laat mogelijke perspectieven zien die kunnen worden meegenomen in het vervolg van dit onderzoekswerk.