



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Bioorthogonal labeling tools to study pathogenic intracellular bacteria

Bakkum, T.

Citation

Bakkum, T. (2021, November 17). *Bioorthogonal labeling tools to study pathogenic intracellular bacteria*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3240088>

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/1887/3240088>

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

Nederlandse Samenvatting

Bioorthogonale chemie wordt gedefinieerd als scheikundige reacties die selectief uitgevoerd kunnen worden in een levende cel, zonder de van nature voorkomende biochemische reacties te verstoren en *vice versa*. Bioorthogonale chemie wordt voornamelijk gebruikt voor het selectief koppelen van twee moleculen ten midden van het complexe mengsel aan biochemische reacties die in een cel plaatsvinden. Deze specifieke koppeling van twee moleculen wordt ook wel een klik reactie genoemd en is uitermate geschikt om een fluorescente groep aan een biomolecuul vast te maken. Om deze koppeling mogelijk te maken, moet eerst in het biomolecuul van interesse een moleculair haakje aangebracht worden, ook wel een klik handvat genoemd. Door de fluorescente groep te voorzien van een bijpassend klik handvat, kunnen de twee moleculen eenvoudig aan elkaar geklikt worden. Hierdoor wordt het mogelijk om het biomolecuul te detecteren met behulp van microscopie of andere fluorescentie technieken, waardoor de functie van biomolecuul bestudeerd kan worden. In dit proefschrift wordt bioorthogonale chemie gecombineerd met verschillende analysemethoden zoals flowcytometrie, confocale fluorescentie microscopie, super-resolutie fluorescentie microscopie en bovenal correlatieve licht en elektronenmicroscopie (CLEM), om pathogene intracellulaire bacteriën te bestuderen in hun natuurlijke omgeving, wat wil zeggen binnenin de gastheercel.

In **hoofdstuk 1** wordt beschreven hoe bioorthogonale chemie en klik reacties toegepast kunnen worden voor biologisch onderzoek. Allereerst worden de algemene principes en geschiedenis van bioorthogonale chemie en klik reacties besproken. Vervolgens wordt beschreven hoe met behulp van metabole labeling biologische bouwstenen met een klik handvat eenvoudig ingebouwd kunnen worden in grotere biomoleculen zoals eiwitten en complexe koolhydraten. Vervolgens wordt uitgelegd hoe bioorthogonale metabole labeling toegepast kan worden om intracellulaire bacteriën te bestuderen, door middel van het aanbrengen van klik handvatten in de bacteriële eiwitten of celwand, en welke analysemethoden hiervoor geschikt zijn.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht geschetst van de nieuwste ontwikkelingen op het gebied van metabole labeling om de interacties tussen een pathogene bacterie en zijn gastheer te kunnen bestuderen, met behulp van geavanceerde microscopie technieken zoals CLEM. Hierbij wordt vooral gefocust op het labelen van enerzijds de bacteriële eiwitten en anderzijds de bacteriële celwand via het peptidoglycaan

of het mycomembraan, in het geval van corynebacteriën. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen directe labeling met een fluorofoor en twee-staps-labeling via een klik reactie. Speciale aandacht wordt gegeven aan het labelen van *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), vanwege de complexe samenstelling van het mycomembraan van deze gevaarlijke pathogeen. Ten slotte wordt een aanvullende techniek uitgelicht, genaamd 'Activity-Based Protein Profiling' (ABPP), waarmee actieve enzym populaties specifiek gelabeld kunnen worden.

Hoofdstuk 3 beschrijft de ontwikkeling van een techniek om de stabiliteit van klik handvatten te bestuderen in immuuncellen, ter bevestiging van de bruikbaarheid van deze chemische groepen voor het bestuderen van intracellulaire bacteriën. In dit hoofdstuk wordt met behulp van flow cytometrie bevestigd dat de terminale alkyn en azide groep langdurig stabiel blijven, terwijl de ringvormige alkyn groepen dibenzocylcooctyn (DBCO) en bicyclononyn (BCN) in grote mate afgebroken worden in de lysosomale compartimenten van immuuncellen.

Hoofdstuk 4 beschrijft de ontwikkeling van een techniek om intracellulaire (pathogene) bacteriën te bestuderen in immuuncellen, door de hoge resolutie van 'Stochastic Optical Reconstruction Microscopy' (STORM) te combineren met de ultrastructurele informatie van transmissie elektronenmicroscopie (TEM). De resulterende techniek, genaamd STORM-CLEM, werd geoptimaliseerd met behulp van een bioorthogonaal gelabelde *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Stm*). Om dit doel te bereiken, werd de labeling van *Stm* met homopropargylglycine (Hpg), azidohomoalanine (Aha) en alkyn-D-alanine (alkDala) geoptimaliseerd en gevalideerd. Ten slotte wordt een overzicht gegeven van de STORM-CLEM techniek voor het bestuderen van *Stm* in dendritische cellen.

Hoofdstuk 5 beschrijft de ontwikkeling van drievoudig gelabelde *Mtb* bacteriën en de toepassing van bioorthogonale CLEM voor het bestuderen van de intracellulaire verdeling van *Mtb* in macrofagen, onder normale omstandigheden en onder invloed van verschillende antibiotica. Voor de drievoudige labeling van *Mtb* werd een fluorescent eiwit (DsRed) gecombineerd met bioorthogonale eiwitlabeling (Aha) en celwandlabeling (alkDala). Met behulp van deze techniek konden verschillende observaties gemaakt worden met betrekking tot de pathogeen-gastheer interacties, waarvan sommigen kwantificeerbaar en anderen zeldzaam. Door de intracellulaire verdeling van *Mtb* in de macrofaag gastheercel te kwantificeren, werd een significant verschil gedetecteerd tussen onbehandelde bacteriën, dode bacteriën en bacteriën die intracellulair behandeld werden met verschillende antibiotica. Dit patroon zou mogelijk een verband kunnen houden

met de mate van *Mtb*-doding. Kwantificatie van de vorm van de bacteriële doorsnede liet een vergelijkbaar patroon zien en zou mogelijk een verband kunnen houden met de mate van *Mtb*-afbraak. Ten slotte kon het behoud van bioorthogonale labels door *Mtb* over tijd gebruikt worden als een maat voor remming van *Mtb*-celdeling. Hiervoor werd een aparte techniek opgezet, gebaseerd op flow cytometrie, om het totale labelbehoud per bacterie accuraat te kwantificeren, na herwinnen van de intracellulaire bacteriën door selectief de gastheercel open te breken.

In **hoofdstuk 6** worden de bevindingen samengevat en worden verschillende suggesties gegeven voor het verder ontwikkelen en toepassen van de beschreven technieken, waaronder; de toepassing van bioorthogonale CLEM op het bestuderen van een cathepsin S-selectieve 'Activity-Based Probe' (ABP) en het bestuderen van de rol van cathepsins in het afbraakproces van (non-)pathogene bacteriën. Daarnaast wordt de mogelijkheid van multi-orthogonale bioorthogonale reacties beschreven, waarbij drie verschillende klik reacties op een drievoudig-bioorthogonaal gelabelde cel uitgevoerd kunnen worden. Ten slotte worden verschillende suggesties gegeven om CLEM techniek verder te verbeteren, waardoor bijvoorbeeld 3-dimensionale informatie verkregen kan worden.

Alles tezamen biedt de hier beschreven bioorthogonale CLEM techniek vele mogelijkheden voor het bestuderen van de interacties tussen pathogene bacteriën en de gastheercel, op ultrastructureel niveau. Flow cytometrie en andere op fluorescentie gebaseerde analyse methoden kunnen hierbij aanvullende informatie verschaffen, om een vollediger beeld te krijgen van de label opname en behoud over tijd, onder invloed van bijvoorbeeld antibiotica. Mogelijk kunnen deze technieken in de toekomst bijdragen aan het bestuderen van het werkingsmechanisme van nieuwe antibiotica en het ontwikkelen van nieuwe antibiotica of gastheer-gerichte therapieën.

