



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthesis of chemical tools to study the immune system

Graaff, M.J. van de

Citation

Graaff, M. J. van de. (2023, January 19). *Synthesis of chemical tools to study the immune system*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3512649>

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/1887/3512649>

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

Nederlandse Samenvatting

Het immuunsysteem beschikt over de mogelijkheid om onderscheid te kunnen maken tussen cellen van het lichaam zelf en die van indringende pathogene microben. Dat realiseert deze met receptoren die een sterke affiniteit hebben voor moleculaire patronen die zich altijd voordoen op microben. Die patronen liggen ten grondslag van de vitaliteit van de microbe, waardoor mutaties in deze patronen niet vaak voorkomen en de receptor dus altijd functioneel blijft. Een familie van deze receptoren is de Toll-Like Receptor (TLR) familie. Deze TLRs bevinden zich voornamelijk op cellen van het immuunsysteem die door het lichaam patrouilleren, en kunnen de aanwezigheid van bacteriën en virussen waarnemen zowel binnen als buiten hun cel.

Als een TLR geactiveerd wordt, resulteert dit uiteindelijk in twee soorten responsen. De eerste respons is een direct antwoord op de indringer en gebruikt een niet-specifieke aanval die over het algemeen goed werkt tegen pathogenen. Dit wordt het aangeboren immuunsysteem genoemd. Het tweede respons werkt op een langere termijn, en zet het immuunsysteem aan het werk om specifieke antilichamen te maken tegen de indringende microbe. Dit wordt het adaptieve immuunsysteem genoemd, en de kracht van de respons treedt pas na enkele dagen in werking. Wat voor soort respons er gegenereerd wordt, hoe sterk deze is en de robuustheid van de immuniteit die verworven wordt erdoor hangt allemaal af van welke TLRs er op welk moment en in welke locatie van de cel geactiveerd worden. Absolute kennis van hoe deze families van receptoren signalen doorvoeren is daarom van groot belang bij het ontwerpen van moderne vaccins.

Dit proefschrift beschrijft de synthese van moleculen die gebruikt kunnen worden om te onderzoeken hoe TLRs hun signalen doorgeven. Deze moleculen beschikken over de mogelijkheid om te binden aan een TLR zonder een signaal te initiëren. Dit wordt bewerkstelligd door een groep te introduceren op het molecuul die juist dat gedeelte afschermt die cruciaal is voor de receptor om een signaal door te geven. Deze groep wordt ook wel de ‘cage’ genoemd. Pas als er een reagens wordt toegevoegd die de cage eraf haalt, wordt het signaal doorgegeven. Dit geeft de chemisch bioloog controle over waar en wanneer zij bepaalde TLRs wil activeren in de cel, ook wel ‘spatiotemporal control’ genoemd.

Hoofdstuk 1 beschrijft kort hoe het immuunsysteem werkt, welke receptoren daar betrokken bij zijn en de plaats van TLRs daarin. Hierna wordt de focus gelegd op de liganden voor de TLRs, ofwel moleculen die de receptoren kunnen activeren, en welke cages gebruikt kunnen worden om hun activiteit te beheersen. De eigenschappen alsmede de mechanismes waarmee deze cages kunnen worden ontschermd is beschreven in dit hoofdstuk.

Hoofdstuk 2 beschrijft de ontwikkeling van een TLR2/6 ligand waarvan zijn activiteit beheerst kan worden met het gebruik van een *trans*-cyclooctene (TCO) cage. De totstandkoming van dat molecuul is een proces geweest met continue aanpassingen gebaseerd op resultaten uit een nauwe samenwerking met een immunoloog werkend in het LUMC, Timo Oosenbrug. Deze biologische resultaten zijn ook in dit hoofdstuk verwerkt om het proces beter te kunnen beschrijven en illustreren. Uit deze samenwerking is een molecuul verworven die sterk bindt aan TLR2 zonder dat deze een signaal induceert. Pas als een tetrazine reagens wordt toegevoegd, valt de signaalinductie instantaan te volgen door de tijd. Het tetrazine reagens zou aangepast kunnen worden waardoor slechts de intra- of extracellulaire populatie van TLRs wordt geactiveerd.

Hoofdstuk 3 rapporteert de synthese en biologische analyse van conditioneel controleerbare liganden voor de intracellulaire TLRs 4, 7/8 en 9. Voor de TLRs 4 en 7/8 worden twee kleine, synthetische liganden gebruikt om een TCO op een cruciale plek in te bouwen en zo een conditionele controleerbaarheid te bewerkstelligen. Naast het gebruik van een enkel-gefunctionaliseerde TCO als cage, wordt hier ook een dubbel-gefunctionaliseerde TCO gebruikt als cage. Deze beschikt over een tweede positie waar een amine-bevattend molecuul op geïnstalleerd kan worden. In de context van TLR4 wordt deze functionaliteit gebruikt om het oplosbaarheidsvermogen van het product in water te verhogen. In de context van TLR 7/8 wordt deze functionaliteit gebruikt een anti-tumor antilichaam te decoreren met het beschermd ligand. Resultaten hieruit zijn gebruikt in een patentaanvraag voor selectieve levering van TLR-liganden in tumoren: het ligand activeert pas het immuunsysteem nadat de meerderheid zich in de tumor bevindt en het niet-toxische tetrazine wordt toegediend om het ligand te bevrijden. TLR 9 wordt geactiveerd door DNA die 'CpG' motieven bevatten. Omdat er nog geen kleine synthetische liganden bestaan voor TLR 9, is er getracht om een TCO te installeren op een cytosine (de 'C' in CpG) in een enkelstrengs DNA. Hiervoor is een cytosine bouwsteen gemodificeerd met een TCO zodat deze gebruikt kan worden in vaste-dragers DNA-synthese om zo een TCO-beschermde CpG-bevattende enkelstrengs DNA fragment te bekomen.

Hoofdstuk 4 examineert het gebruik van licht-gevoelige cages in de context van TLR-liganden. Waar tetrazine de 'trigger' is voor TCO-cages, is UV-licht de 'trigger' voor deze cages. TLR-liganden die beschermd zijn met de laatstgenoemde bleken over het algemeen compleet onoplosbaar in water. Dit hoofdstuk tracht daarom een extra functionaliteit in deze cages in te brengen, analoog tot de dubbel-gefunctionaliseerde TCO gebruikt in hoofdstuk 3. Deze functionaliteit is gebruikt om moleculaire motieven in te brengen die de oplosbaarheid in water zouden veelvoudigen. Deze strategie is toegepast op klassieke licht-gevoelige cages, maar ook op zeer recent-ontwikkelde cages. Het effect van deze modificatie op de photo-chemische eigenschappen is onderzocht met een in-huis ontwikkelde opstelling en bleek de extinctiecoëfficiënt met 30% te verhogen. De toepasbaarheid van deze nieuwe, dubbel-gefunctionaliseerde cage buiten de context van TLRs is onderzocht in het opvolgend hoofdstuk.

Hoofdstuk 5 geeft een samenvatting van elk hoofdstuk en projecteert potentiële toekomstige experimenten die hun waarde vinden binnen elk onderzoeksgebied. Hiernaast zijn enkele resultaten beschreven die behaald zijn met de dubbel-gefunctionaliseerde licht-gevoelige cage beschreven in hoofdstuk 4. Zo is deze gebruikt om een construct te verwerven die sterk en selectief sub-units van het immunoproteasoom inhibeert waar, na het kort bestralen met laag energetisch UV-licht, het zeer toxische doxorubicin bevrijd wordt. Deze 'one-two-punch' strategie is succesvol in het doden van multiple myeloma cellen die immuniteit hebben ontworpen voor enkel het immunoproteasoom inhibitor. Ook is de cage gebruikt als brug tussen een sortase-tag en fluorophore. Dit construct is geconjugeerd aan een nanolichaam specifiek voor CD8, en is gebruikt om een twee-dimensionale scheiding op de FACS te verkrijgen van laagenergetisch UV-bestraalde CD8+ cellen binnen een tumor block. Met deze techniek kunnen individuele cellen binnen specifieke tumorale regio's gesequenced worden, om zo de specifieke immuuncelpopulaties binnen een tumor op te helderen.