



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Synthetic peptides as tools in chemical immunology

Doelman, W.

### Citation

Doelman, W. (2023, February 9). *Synthetic peptides as tools in chemical immunology*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3563057>

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/1887/3563057>

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

## Nederlandse samenvatting

Dit proefschrift beschrijft nieuwe synthetische methodologie voor het produceren van verscheidende (glyco)peptiden en de toepassing van deze peptiden in het bestuderen van verscheidende immunologische processen. Het eerste deel van het proefschrift gaat over nieuwe inzichten in het ontstaan van de ziekte multiple sclerose, door onderzoek te doen naar lectine gestuurde immunotolerantie en een biochemische studie naar verschillen tussen een belangrijk menselijk antigeen en de dierlijke vorm van dit molecule. Het tweede deel omschrijft nieuwe multivalent geglycosyleerde peptides, welke gebruikt kunnen worden om lectine interacties en lectine-gestuurde antigeen opname te bestuderen. Het laatste stuk van deze thesis omschrijft een nieuwe manier om peptides met een *trans*-cyclooctene beschermde lysine te produceren, welke een interessante nieuwe categorie van moleculair gereedschap binnen de chemische biology.

**Hoofdstuk 2** beschrijft de synthese van een serie *N*-geglycosyleerde Fmoc-asparagine bouwstenen voor de vastedragersynthese. Vier verschillende sacharide structuren werden gesynthetiseerd: GlcNAc, LacNAc (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc), Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc en Lewis X (Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc, Le<sup>X</sup>). De bouwstenen werden gemaakt vanuit de beschermde glycosyl azides welke gekoppeld werden met asparagine door gebruikt te maken van een éénpots, tweestappen transformatie, gebruikmakend van een Staudinger reductie van de azide, gevolgd door regioselectieve opening van het cyclisch anhydride van Fmoc-asparaginezuur. Door gebruik te maken van standaard vastedragers peptide synthese zijn deze bouwstenen verwerkt in de immunologisch dominante peptide van het eiwit myeline oligodendrocyt glycoproteïne (MOG), MOG<sub>31-55</sub>. Deze peptide bevat het residu dat onder natuurlijke omstandigheden *N*-geglycosyleerd wordt, Asn<sub>31</sub>, welke hier vervangen werd met de *N*-geglycosyleerde asparagines. Door gebruikt te maken van een immunoabsorbtie methode (ELISA) kon bewezen worden dat de Le<sup>X</sup> bevattende peptide kan binden aan de DC-SIGN receptor. Verder werd aangetoond dat er een Le<sup>X</sup> gedreven effect van de peptiden is op de cytokine uitscheiding; moDCs behandeld met de peptide met of zonder Le<sup>X</sup> glycaan lieten een vermindering van IL12p70 zien voor de Le<sup>X</sup> bevattende peptide, als de peptides samen met LPS gegeven werden. Het effect van glycosylatie op de eerder beschreven citrulline gestuurde aggregatie van MOG<sub>31-55</sub> was ook onderzocht. Er bleek een suikerafhankelijk verlaging in de mate van aggregatie te zijn.

In **hoofdstuk 3** wordt een serie gecitrullineerde peptides afgeleid van myeline oligodendrocyt glycoproteïne (MOG) onderzocht op hun biofysische en immunologische eigenschappen. Eerder werk vond dat de immunologisch dominante peptide MOG<sub>35-55</sub>, afgeleid van de muis variant van MOG, amyloïde aggregatie vertoont, als één of meer van de arginine residuen gecitrullineerd zijn. Het eiwit MOG, en in het bijzonder de immunologisch dominante regio, hebben een zeer hoge mate van gelijkheid tussen verschillende diersoorten. Tussen de menselijke en muizenpeptide is slechts een enkel aminozuur verschil, in de vorm van een serine-naar-proline variatie op positie 42. In het hoofdstuk worden experimenten beschreven

die laten zien dat deze enkele substitutie de aggregatie volledig laat verdwijnen. Verdere analyse, waarbij peptides met verscheidende, op serine lijkende, aminozuren op positie 42 gemaakt werden, lieten zien dat de aggregatie sterk van dit serineresidue afhankelijk lijkt te zijn. Een verdere verrassende vondst op immunologisch gebied was dat de onderzochte gecitrullineerde peptides zich anders gedroegen in een antigeen kruispresentatie experiment. Hiervoor werden B- en T-cellen van penseelaapjes, eerder geïmmuniseerd met humaan MOG<sub>35-55</sub>, gebruikt. De niet-aggregerende humane peptide hMOG<sub>35-55</sub>-Cit<sub>46,52</sub>, liet een sterke respons, in de vorm van hoge mate van T-cel proliferatie, zien bij dit experiment. De gelijk gecitrullineerde muizenpeptide, mMOG<sub>35-55</sub>Cit<sub>46,52</sub>, een zeer effectief aggregerende peptide, liet geen enkele vorm van T-cell activatie zien.

In **hoofdstuk 4** wordt de synthese van een stel antigene peptiden met N-terminale glycoclusters en een C-terminale fluorofoor beschreven. Het gekozen antigeen is het welbekende peptide OVA<sub>247-264</sub>, afgeleid van kippenovalbumine (OVA). Deze peptide bevat het CD8<sup>+</sup> T-cel specifieke epitoom OVA<sub>257-264</sub>. De fluorofoor maakt het mogelijk om de binding van de glycopeptide aan een lectine, bijvoorbeeld de mannosereceptor (MR), te visualiseren. Hiervoor werd gebruikt gemaakt van de recent ontwikkelde glycoPAINT techniek. Door de fluorofoor covalent te koppelen aan het antigene glycoconjugaat, kan zowel de lectinebinding als de opname van het molecuul gemeten worden. Door de combinatie van glycocluster, antigeen en fluorofoor in een enkel construct word het mogelijk om met directe metingen de relatie tussen MR binding en T-cel activatie te bepalen. Dit zou kunnen bijdragen aan een beter begrip van het effect dat glycosylering van antigenen heeft op antigeen kruispresentatie, een onderwerp waar nog veel onderzoek naar nodig is.

De synthese van de conjugaten verliep niet vlekkeloos. De introductie van de oligosacharides verliep door middel van koper gekatalyseerde 'click' chemie (CuAAC), gebruikmakend van propargylgroep bevattende oligosacharides. Deze suikers werden doormiddel van deze click reactie gekoppeld aan een serie azidolysineresiduen aan de N-terminale kant van peptiden. Deze reactie verliep niet zonder problemen; peptiden met meerdere azidolysineresiduen bleken zeer slecht oplosbaar, wat de koper gekatalyseerde conjugatiereactie verhinderde. Om dit te verhelpen werd een flexibele triethyleneglycol spacer tussen de antigene peptide en het glycocluster geïntroduceerd. Deze verandering verhoogde de oplosbaarheid van de peptides voldoende om succesvol verschillende glycoconjugaten te produceren. Verder geeft dit een mogelijkheid om het effect van deze PEG spacer op de MR bindingskinetiek te bepalen, wat waardevolle inzichten zal kunnen opleveren voor de verdere ontwikkelingen van antigeen-glycocluster conjugaten.

**Hoofdstuk 5** beschrijft de synthese van een cyclisch, pentavalente peptide die als platform dient voor de conjugatie van suikers via CuAAC chemie. De cyclische peptide bestaat uit 6 lysineresiduen, waarvan vijf dienen als conjugatieposities voor de suikergroepen. De zesde lysine werd gebruikt om een fluorofoor te koppelen, wat resulteerde in een traceerbaar multivalent glycoconjugaat. Om dit doel te bereiken werd een combinatie van vastedragende chemie, waarop de cyclische peptide gebouwd werd, en oplossingschemie, om de suiker- en

fluorofloorconjugaties mogelijk te maken, gebruikt. Om de cyclische kern van het molecule te maken werd gebruik gemaakt van een welbekende kop-staart cyclisatiemethode op de vaste drager. Hierbij werd een probleem ondervonden, in de vorm van onbedoelde dimerisatie op de drager, een vaker voorkomend probleem volgens de chemische literatuur. De lengte van de lineaire startpeptide, welke significant groter was dan die gezien wordt bij de meeste gerapporteerde cyclisatiereacties, bleek het obstakel. Door het ontwerp minimaal aan te passen door de afstand tussen de lysineresiduen te verkleinen van zes koolstofatomen naar vier, kon de cyclisatie toch succesvol uitgevoerd worden. Op deze cyclische peptide werden, op de vijf lysines bedoelt voor suikerconjugatie, lange polyethylenederivaten gekoppeld, om voldoende afstand tussen de suikers en de cyclische kern te waarborgen. Om dit voor elkaar te krijgen moesten deze vijf lysineresiduen volledig ontschermd worden, zonder hierbij ook de peptide per abuis van de drager af te splitsen. Door gebruik te maken van de zeer zuurlabile monomethoxytrityl beschermgroep op deze vijf lysineresiduen, in combinatie met een zeer mild zure ontschermcocktail, kon een zeer hoge mate van volledige ontmaskering bereikt worden, zonder de gevoelige verbinding met de drager te beschadigen. Dit molecule was daarna, gebruikmakend van de chemie ontwikkeld in hoofdstuk 4, gekoppeld met oligosaccharides. Deze conjugatie werd gevolgd door labeling met een fluorofloor, wat de gewenste eindproducten opleverde.

In **hoofdstuk 6** wordt de ontwikkeling van een nieuwe methode voor de synthese van peptides die een allylische *trans*-cyclooctene (TCO) beschermd lysineresidue bevatten beschreven. Omdat de TCO functionaliteit zeer zuurgevoelig is, is de direct synthese van dit soort peptides door middel van Fmoc-SPPS erg moeilijk, omdat deze vorm van vastedragers synthese altijd gebruik maakt van een globale ontschemstap met trifluorazijnzuur (TFA). De nieuwe aanpak beschreven in dit hoofdstuk omvat het gebruik van azides als aminebeschermgroep voor de overige amines in de peptide, dat wil zeggen de N-terminus en alle andere lysineresiduen. Na de globale ontscherming met TFA wordt de TCO in oplossing geïntroduceerd als een geactiveerd carbonaat. Na de succesvolle introductie van de TCO functionaliteit, kunnen de overige amines onthult worden door gebruik te maken van een Staudinger reductie met trimethylfosfine. Deze aanpak maakt het mogelijk om langere TCO bevattende peptiden te produceren dan tot nu toe haalbaar was. Omdat deze methode, anders dan eerder beschreven synthetische strategieën, ook geen gebruik maakt van nucleofiele bases tijdens de ontschermstap, kunnen functionaliteiten gevoelig voor dit soort condities ook geïntroduceerd worden. Om dit te demonstreren werd een TCO-beschermede peptide gemaakt die ook een vetzuurester bevat.

