



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Bioorthogonal tools to study fatty acid uptake in immune cells

Bertheussen, K.

Citation

Bertheussen, K. (2026, January 13). *Bioorthogonal tools to study fatty acid uptake in immune cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4286403>

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/1887/4286403>

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

A

Appendices

Nederlandse Samenvatting

Bio-orthogonale technieken voor het bestuderen van de vetzuuropname in immuuncellen

Het cellulaire metabolisme van immuuncellen vormt een belangrijk onderdeel van hun functie en activatie. Aan de hand van T-cellen wordt dit fenomeen geïllustreerd door de metabole herprogrammering die optreedt bij activatie van deze cellen. Het metabolisme van rustende T-cellen bestaat voornamelijk uit katabole routes, waarbij glucose (voor naïeve T-cellen) of vetzuren (voor T-geheugencellen) worden afgebroken om de tricarbonsuurcyclus en oxidatieve fosforylering te voeden, waarmee energie wordt gegenereerd via mitochondriale respiratie. Na activatie en differentiatie schakelen effector-T-cellen hun metabolisme om van mitochondriale respiratie naar aerobe glycolyse. Glycolyse is een belangrijke route voor de aanmaak van bouwstenen die nodig zijn voor de synthese van complexe biomoleculen. Deze metabole herprogrammering gaat daarom gepaard met een verschuiving naar anabole routes, die de noodzakelijke biomaterialen produceren voor verhoogde groei en proliferatie. De metabole herprogrammering wordt verder ondersteund door een verhoogde opname van exogene nutriënten, zoals glucose, aminozuren en vetzuren. De beschikbaarheid van deze nutriënten in de extracellulaire omgeving is essentieel voor de correcte activatie en differentiatie van effector-T-cellen. Het ontrafelen van dit complexe samenspel tussen het immuunsysteem en het cellulaire metabolisme vereist de ontwikkeling van de juiste chemische hulpmiddelen. Het doel van dit proefschrift was om sterculinezuur te ontwikkelen als een bio-orthogonaal analoog van het immunomodulerende vetzuur oliezuur, en dit te gebruiken als hulpmiddel om de opname van sterculinezuur in verschillende immuuncellen te bestuderen.

Hoofdstuk 1 geeft een gedetailleerde beschrijving van de huidige kennis over het metabolisme van T-cellen en de relatie met hun immunologische functies. Hierbij werd speciale aandacht besteed aan vetzuur- en lipidenmetabolisme, met uitleg over hoe processen als vetzuur bèta-oxidatie, vetzuursynthese en vetzuuropname worden gereguleerd in verschillende T-cel-subtypen. Vervolgens wordt ingegaan op de rol van het enkelvoudig onverzadigde oliezuur (C18:1, ω -9) als immunomodulerend molecuul, dat invloed heeft op immuunfuncties bij ziekten zoals astma, sepsis en kanker. Voor T-cellen specifiek is aangetoond dat oliezuur hun proliferatie, metabolisme en differentiatie beïnvloedt. Daarnaast worden moleculaire hulpmiddelen beschreven die gebruikt worden om de opname van exogene vetzuren te onderzoeken. Traditioneel werd dit gedaan met radioactief of fluorescent gelabelde vetzuren, maar hier wordt voorgesteld dat bio-orthogonale chemie geschikter is voor dit doel. Door een kleine chemische modificatie met een unieke bio-orthogonale functionele groep in het vetzuur aan te brengen, cellen met dit analoog te behandelen en vervolgens een rapporteermolecuul (bijv. een fluorofoor) toe te voegen met de complementaire functionaliteit, kan het vetzuuranaloog covalent worden gelabeld in de cel. Hoofdstuk 1 stelt het plantaardige metaboliet sterculinezuur voor als een nieuw, 'live-cell'-compatibel bio-orthogonaal analoog van oliezuur, en veronderstelt dat de cyclopropeenring van sterculinezuur een 'inverse electron-demand Diels-Alder' (IEDDA)-reactie mogelijk maakt met een tetrazine-gemodificeerd rapporteermolecuul.

Hoofdstuk 2 beschrijft de eerste verkenning van sterculinezuur als bio-orthogonaal

oliezuur-analoog. Een bibliotheek van acht 'quenched' tetrazine-geconjugeerde fluoroforen werd getest op hun vermogen om via een IEDDA-reactie met sterculinezuur te reageren. Hun stabiliteit, 'turn-on'-ratio en reactiesnelheid werden geëvalueerd. Deze testen toonden aan dat de IEDDA-reactie tussen sterculinezuur en de fluoroforen met verschillende efficiëntie kon plaatsvinden in oplossing. Vervolgens werd met confocale microscopie aangetoond dat sterculinezuur door levende cellen kan worden opgenomen en dat de IEDDA-reactie succesvol kon worden uitgevoerd op zowel levende als gefixeerde cellen. Fluorofoor **6** (een op BODIPY FL gebaseerd conjugaat met H-substitutie op de tetrazine) bleek het meest geschikt voor gefixeerde cellen, terwijl fluorofoor **7** (een op BODIPY gebaseerd conjugaat met methylsubstitutie op de tetrazine) het meest geschikt was voor levende cellen. De 'turn-on'-ratio van fluorofoor **7** was zelfs hoog genoeg om 'live-cell' confocale microscopie uit te voeren zonder niet-gereageerde fluorofoor uit te wassen, wat een groot voordeel is om verlies van cellen tijdens wasstappen te voorkomen. Tot slot werd aangetoond dat het labelen van sterculinezuur in cellen kon worden gecombineerd met twee andere bio-orthogonale reacties om meerdere biomoleculen gelijktijdig te labelen, waarmee de veelzijdigheid van dit nieuwe oliezuur-analoog werd benadrukt.

Hoofdstuk 3 gaat dieper in op de diversiteit van sterculinezuur als bio-orthogonaal oliezuur-analoog door te onderzoeken of het kan worden ingebouwd in eiwitten als posttranslationale modificatie (PTM). Eiwitlipidatie als PTM is belangrijk voor een correcte eiwitfunctie, signaaloverdracht, transport en regulatie, en kan ook immunomodulerende eigenschappen hebben. Met fluorescente gelelektroforese werd aangetoond dat sterculinezuur in eiwitten kan worden ingebouwd, en dat deze lipidatie kan worden gevisualiseerd via een IEDDA-reactie met tetrazine-geconjugeerde fluoroforen. De gedetecteerde eiwitten verschilden echter afhankelijk van de gebruikte fluorofoor en of de reactie werd uitgevoerd in levende cellen of in cellysaten. Om deze verschillen verder te onderzoeken, werd een 'pull-down' chemoproteomicsbenadering toegepast. Een bibliotheek van cel-permeabele tetrazine-gemodificeerde biotine-moleculen met verschillende spacerlengtes en substituties op de tetrazine werd gesynthetiseerd en vergeleken met de commercieel beschikbare, cel-impermeabele biotine-PEG₄-tetrazine. Met fluorescentie-microscopie werd aangetoond dat biotines **17** (met een korte spacer en een methylsubstitutie op de tetrazine) en **19** (met een langere spacer en een H-substitutie op de tetrazine) cel-permeabel waren en reageerden met sterculinezuur. Vergelijking van de gelipideerde eiwitten die met **17**, **19** of biotine-PEG₄-tetrazine werden geïsoleerd, toonde weinig overlap tussen de gedetecteerde eiwitten. Dit bevestigde dat het moment van de IEDDA-reactie van invloed is, maar suggereerde ook dat de chemische eigenschappen van de biotine (zoals de spacerlengte) de detectie van verschillende eiwitten beïnvloeden. Met deze methode werden verschillende eiwitten met bekende immunologische functies gedetecteerd die niet eerder als gelipideerd bekend stonden, waaronder SLC15A3, een transmembraan aminozuurtransporter met immunomodulerende eigenschappen. Dit kan wijzen op een nieuw regulatiemechanisme voor dit eiwit via oliezuur-modificatie.

Hoofdstuk 4 beschrijft het gebruik van sterculinezuur als bio-orthogonaal oliezuur-analoog om de opname van exogene vetzuren te bestuderen in een heterogene, primaire T-celpopulatie. Na opname van sterculinezuur en IEDDA-reactie met fluorofoor **7** werden cellen op basis van lage of hoge sterculinezuur-opname

gescheiden met 'fluorescence-activated cell sorting' (FACS). Vergelijking van de populaties met lage en hoge opname onthulde opvallende fenotypische, proteomische en transcriptomische verschillen. De cellen met hoge opname vertoonden een meer effectorachtig fenotype, met grotere en meer gegranuleerde cellen, verhoogde expressie van CD44 en verlaagde expressie van CD62L. Deze verschillen werden waargenomen in zowel naïeve als *in vitro* geactiveerde T-cellen. Bovendien bleken de cellen met hoge opname een hogere metabolisch activiteit te hebben, overeenkomstig met bestaande literatuur over effector-T-celmetabolisme. De metabole verschillen kwamen ook tot uiting op proteomisch en transcriptomisch niveau, waarbij belangrijke eiwitten en genen betrokken bij glycolyse, vetzuursynthese en de mevalonaatroute significant waren opgereguleerd in de cellen met hoge opname. Deze opregulatie sluit nauw aan bij de metabole herprogrammering die optreedt tijdens effector-T-celdifferentiatie (zoals beschreven in Hoofdstuk 1), en ondersteunt de observatie nog verder dat T-cellen met hoge sterculinezuur-opname een meer effectorachtige toestand vertonen. Het kon echter niet worden geconcludeerd of deze cellen van nature voorbestemd zijn tot een effectorachtig profiel, of dat dit wordt geïnduceerd door een verhoogde beschikbaarheid van vetzuren in het medium.

Concluderend rapporteert dit proefschrift het eerste gebruik van sterculinezuur als bio-orthogonaal analoog van oliezuur. Sterculinezuur werd *in vitro* gemakkelijk opgenomen door diverse immuunceltypen en kon reageren met tetrazine-gemodificeerde rapporteermoleculen (zoals fluoroforen) via een IEDDA-reactie, waarmee een niet-toxisch, 'live-cell'-compatibel alternatief wordt geboden voor andere bio-orthogonale reacties. De veelzijdigheid van deze aanpak maakte 'multiplexing' met andere bio-orthogonale reacties mogelijk, waardoor gelijktijdige studie van meerdere biomoleculen kon plaatsvinden. De workflow kon bovendien worden aangepast om eiwitlipidatie als PTM te onderzoeken, evenals de fenotypische en multi-omische verschillen tussen T-cellen met verschillende sterculinezuur-opname te bestuderen. De flexibiliteit van deze methode benadrukt haar kracht en bruikbaarheid als chemisch hulpmiddel voor de studie van vetzuuropname.