

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/55262> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Pawlak, J.B.

Title: Bioorthogonal Antigens

Issue Date: 2017-11-14

Bioortogonalne Antygeny

Badania opisane w tej pracy wykorzystują bioortogonalną chemię jako narzędzie do badania krzyżowej prezentacji antygeny. Dalsze zrozumienie tego procesu ma zasadnicze znaczenie, ponieważ jest to główny mechanizm wywołujący specyficzną cytotoksyczną odpowiedź komórek zwanych limfocyty T, niezbędną do usunięcia raka i patogennych infekcji, jak również w szczepionkach z antygenami białka, gdyż głównym celem jest zastosowanie tej wiedzy do opracowywania nowych peptydów do szczepionek przeciwrakowych. Proces prezentacji krzyżowej antygeny jest głównym tematem opisanym w niniejszej pracy. Powyższy proces ma miejsce gdy wirusy, bakterie lub komórki rakowe są pochłonięte, następnie przetworzone i ich fragmenty (peptydy) są prezentowane przez komórki prezentujące antygen (APC), głównie dendrytyczne, na cząsteczkach głównego układu zgodności tkankowej (MHC-I). Taki kompleks MHC klasy I z peptydem może być rozpoznany przez limfocyt T zwany $CD8^+$. Gdy taki kompleks zostanie rozpoznany jako obcy dla organizmu, $CD8^+$ T limfocyty są zdolne do wyeliminowania komórek posiadających taki kompleks. W **rozdziale 1** opisano ogólne zasady przetwarzania i prezentacji antygeny na cząsteczkach głównego układu zgodności tkankowej (MHC-I, -II i prezentacji krzyżowej). **Rozdział 2** przedstawia przegląd różnych molekularnych metod do badania pochłaniania, przetwarzania i prezentacji antygeny przez komórki prezentujące antygen na cząsteczkach MHC-I. Kilka przykładów obecnych metod zostało opisanych szczegółowo wraz z ich ograniczeniami i potencjalnym zastosowaniem antygenów bioortogonalnych jako nowych narzędzi do badania procesu prezentacji krzyżowej.

Wstępny rozwój nowej strategii do ilościowego oznaczania specyficznych kompleksów peptydowo-MHC-I (pMHC-I) na powierzchni komórkowej przy użyciu bioortogonalnej chemii został opisany w **rozdziale 3**. Biblioteka peptydów zawierających różne uchwytów bioortogonalne (azydki i alkyny) w obrębie epitopu (fragment antygeny łączący się bezpośrednio z receptorem limfocyty T) została zsyntetyzowana. Stabilność tych zmodyfikowanych peptydów jak i wiązanie się ich z MHC-I kompleksami została zoptymalizowana używając linii komórkowej RMA-S. W celu uzyskania najskuteczniejszej reakcji bioortogonalnej ligacji, testowano i oceniono różne typy reakcji "kliknięcia" (ang. "click"). Ustalono najbardziej optymalny rodzaj fluoroforu i

warunki ligacji bioortogonalnej. Wymóg dotyczący najbardziej efektywnego oznaczania ilościowego epitopu polega na modyfikacji alkinu w pozycjach dostępnych dla rozpuszczalnika w obrębie epitopów, stosując sondę CalFluor-488 w połączeniu z reakcją cykloaddycji Huisgena katalizowaną przez Cu (I) (ang. ccHc reaction). Głównym ograniczeniem tego podejścia jest wymóg miedzi w reakcji ccHc. Alternatywą dla tego podejścia może być zastosowanie reakcji kliknięcia nie wymagających katalizy. Na przykład, retro reakcja Dielsa-Aldera (IEDDA) pomiędzy cyklopropenem i tetrazyną nie wymaga stosowania miedzi i może zasadniczo umożliwić oznaczanie pMHC-I *in vivo*. Jednak reaktywność tej reakcji pod względem stosunku sygnału do szumu nie została w pełni zbadana w systemie tak rygorystycznym, jak krzyżowa prezentacja antygeny. Przy badaniu procesu przetwarzania i prezentacji antygeny, techniki, które mogą selektywnie oznaczać antygeny na powierzchni komórki byłyby bardzo cenne. Stąd taka metoda została opracowana na podstawie trzyetapowej procedury znakowania. Aby obejść przepuszczalność komórkową małych cząsteczek (spowodowanej obecnością miedzi), w drugiej części **rozdziału 3** opracowano trzyetapowe podejście do selektywnego znakowania antygenów na powierzchni komórki. To trzyetapowe oznakowanie składa się z trzech etapów: pierwszy krok można osiągnąć modyfikując wszystkie znajdujące się w antygenie grupy bioortogonalne z Alexa Fluor 488 w reakcji ccHc, drugi etap przeprowadza się stosując przeciwciało anti-Alexa Fluor 488 i końcowy trzeci etap, stosując białko A skoniugowane z Alexa Fluor 647. Steryczna objętość przeciwciała minimalizuje wewnątrzkomórkowe oznakowanie i pozwala umożliwić oznakowanie puli epitopu bioortogonalnego na powierzchni komórki. Ten trzyetapowy protokół znakowania został użyty do wykonania wysokorozdzielczych obrazów peptydów w kompleksach MHC na powierzchni komórki przy użyciu mikroskopii stochastycznej rekonstrukcji optycznej (ang. STORM). Wstępne wyniki obrazowania epitopów bioortogonalnych metodą STORM przy użyciu trzyetapowej procedury ujawniły potencjał do zlokalizowania i późniejszego oznaczenia ilościowego tych epitopów na powierzchni komórki. W przyszłości takie podejście można zastosować do oznaczenia ilości epitopów przypadających na komórkę, a kiedy tylko limfocyty T przeciwko grupom bioortogonalnym staną się dostępne - do ilościowego określania korelacji ilościowej peptydu powierzchniowego do siły odpowiedzi limfocytów T.

Rozdział 4 opisuje zastosowanie bioortogonalnej chemii w badaniach dłuższych antygenów, które w przeciwieństwie do minimalnych epitopów z rozdziału 3 wymagają przetwarzania wewnątrzkomórkowego przed ich prezentacją. Stąd zaprojektowano serię bioortogonalnych syntetycznych długich peptydów (ang. SLPs) i wykorzystano chemię typu "click" w celu zbadania ich pochłaniania, przetwarzania i prezentacji na powierzchni komórki. Oznaczanie i obrazowanie kandydata na

szczepionkę przeciwko wirusowi opryszczki, peptydu HSV-Gp₄₈₈₋₅₀₅-Pg-7 z azydkiem Alexa Fluor-488 wykazało niejednorodny wzór sygnału fluorescencyjnego na błonie komórkowej wskazujący, że peptyd agreguje się i że te agregaty są albo powoli albo wcale nie internalizowane przez komórki. Potwierdzono to stosując korelacyjną mikroskopię świetlną-elektronową (ang. CLEM) na bioortogonalnie wprowadzonych fluoroforach. Z tego względu aby selektywnie oznaczyć epitopy na powierzchni komórek, postanowiono zastosować bardziej rozpuszczalny SLP, który wymaga przetwarzania zależnego od proteasomu zarówno na końcu jak i początku peptydu (HSV-Gp₄₈₈₋₅₀₅A5K-Pg-7).

Szybkość prezentacji tego HSV-Gp₄₈₈₋₅₀₅A5K-Pg-7 została oceniona za pomocą chemii "kliknięcia" i stosując trzyetapowe oznakowanie opisane w rozdziale 3 w celu ilościowego określenia przetworzonego epitopu na powierzchni komórki. Kwantyfikacja jednak okazała się kłopotliwa. Słaby sygnał na powierzchni komórki (spowodowany niewielką częścią SLP docierającą do powierzchni w celu załadunku na MHC, a zamiast tego głównie pozostającą w częściach wewnątrzkomórkowych) zapobiegł silnemu oznakowaniu. Nawet użycie podejścia opartego na trzech etapach nie dało wystarczającego sygnału do szumu.

Podsumowując, zastosowanie trzyetapowego znakowania w połączeniu z reakcją cycloaddycji Huisgena katalizowanej przez Cu (I) na bioortogonalnych długich peptydach pozwoliło na obrazowanie wewnątrzkomórkowe, ale oznakowanie peptydów na powierzchni komórek nadal wymaga dalszych badań.

Rozdział 5 dotyczył różnych zastosowań antygenów bioortogonalnych. Podczas prac prowadzących do rozdziałów 3 i 4, odkryto, że zmiany 2-3 atomów epitopu zacierają rozpoznawanie przez specyficzne limfocyty T. Doprowadziło to do opracowania nowej metody pozwalającej na chemiczną kontrolę nad aktywacją limfocytów T. Strategię odbezpieczenia chemicznego zastosowano do badania aktywacji cytotoksycznych limfocytów T przez komórki prezentujące antygen: przez zastąpienie kluczowej lizyny w epitopie SIINFEKL na azydo-norleucynę, cytotoksyczna reakcja rozpoznania peptydu na powierzchni komórek dendrytycznych przez komórki T została zahamowana. Następnie przeprowadzając redukcję Staudingera (z azydo-norleucyny z powrotem do lizyny) na powierzchni komórki, odzyskano ponad 80% pierwotnej reaktywności limfocytów T.

Ostatni **rozdział 6** przedstawia podsumowanie tej tezy oraz przyszłe zastosowania, strategie i wskazówki dotyczące obrazowania (wizualizacji) całego procesu prezentacji krzyżowej antygeny.