

Bachelorproef

Onderzoek naar het gebruik van een
zuurgevoelig eiwit voor (nucleaire)
beeldvorming van solide tumoren

Molecular Imaging and Therapy Research Group

Laarbeeklaan 103 - 1090 Brussel

Promotor: Prof. dr. Nick Devoogdt

Copromotor: dr. Thomas Ertveldt

Noura Lazaar

EhB School of Health & Environment

Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie

Farmaceutische en Biologische
Laboratoriumtechnologie

2025-2026

1 VOORWOORD

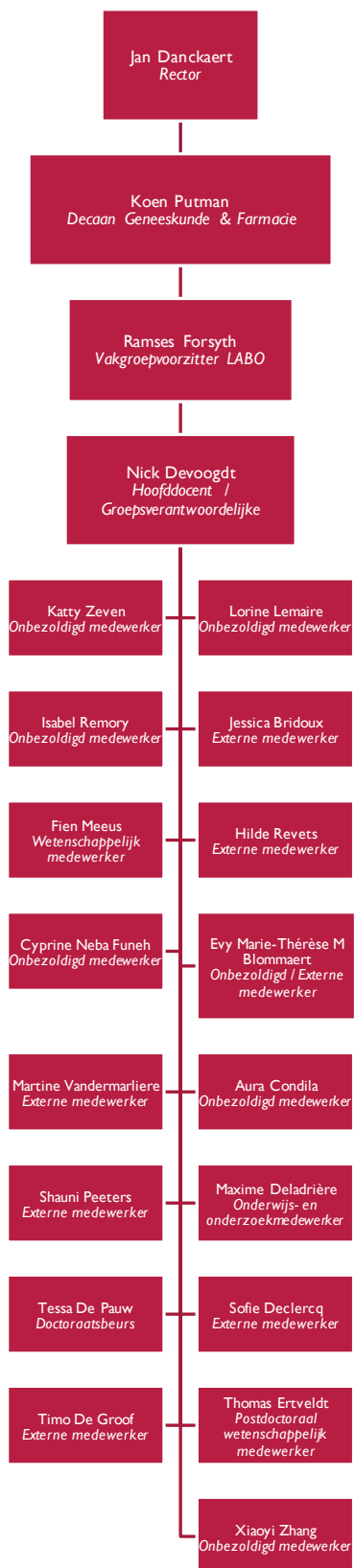
Het realiseren van deze bachelorproef was niet mogelijk geweest zonder de steun, begeleiding en expertise van verschillende personen, die ik graag zou willen bedanken.

Allereerst wil ik mijn promotor Prof. dr. Nick Devoogdt en co-promotor dr. Thomas Ertveldt bedanken voor hun voortdurende ondersteuning, kritische feedback en begeleiding gedurende dit onderzoeksproject. Dankzij hun begeleiding heb ik tijdens dit onderzoek ervaring opgedaan met verschillende nieuwe technieken en geleerd om resultaten kritisch en wetenschappelijk te interpreteren. Ook zou ik graag mijn begeleider Sarah Vanwijnsberghe willen bedanken voor de feedback en ondersteuning tijdens het schrijven van deze bachelorproef.

Daarnaast ben ik heel dankbaar dat ik mijn stage heb mogen uitvoeren binnen de Molecular Imaging and Therapy Research Group (MITH) aan de Vrije Universiteit Brussel (VUB). Binnen deze stage heb ik aan de hand van een onderzoek naar pH-gevoelige constructen en hun binding aan tumorcellen, mijn kennis kunnen verbreden rond dit onderzoek. Ook wil ik het hele laboteam bedanken. Ik kon altijd bij hen terecht met vragen en zij hebben mij vaak geholpen wanneer iets niet duidelijk was. De fijne werksfeer heeft mijn stage ook veel aangenamer gemaakt.

Ten slotte wil ik graag mijn familie en vrienden bedanken voor hun steun en aanmoediging tijdens deze periode.

2 ORGANIGRAM



3 INHOUDSOPGAVE

1	Voorwoord	2
2	Organigram	3
4	Lijst van afkortingen	6
5	Abstract (NI)	7
6	Abstract (Eng)	9
7	Inleiding	11
8	Literatuuronderzoek	13
8.1	<i>Solide tumoren en hun micro-omgeving</i>	13
8.1.1	<i>De MC38 murine colon adenocarcinoomcellijn (MC38)</i>	13
8.1.2	<i>Het Warburg-effect of de aërobe glycolyse</i>	13
8.2	<i>Invloed van pH op eiwitstructuur en -functie</i>	14
8.3	<i>Zuurtegraad als selectiviteitsmechanisme voor beeldvorming</i>	15
8.4	<i>T-SorTag: een pH-gevoelig eiwitconstruct afgeleid van het difterietoxine</i>	16
8.5	<i>Nucleaire beeldvorming voor tumordetectie</i>	17
8.6	<i>chelator koppeling en Radiolabeling van ph-gevoelige moleculen voor nucleaire beeldvorming</i>	17
9	Experimenten	19
9.1	<i>Bufferwissel van T-SorTag via ultrafiltratie (Vivaspin 5000)</i>	19
9.1.1	<i>Materialen en methoden</i>	19
9.2	<i>CD-meting van zuurgevoelig eiwit T-SorTag onder veranderende pH</i>	19
9.2.1	<i>Materialen en methoden</i>	19
9.3	<i>Vorbereiding en kweek van MC38-celijn</i>	20
9.3.1	<i>Materialen en methoden</i>	20
9.4	<i>Flowcytometrische analyse van de pH-afhankelijke binding van T-SorTag aan MC38-cellen</i>	21
9.4.1	<i>Materialen en methoden</i>	21
9.5	<i>Conjugatie van T-SorTag met NCS-THP</i>	22
9.5.1	<i>Materialen en methoden</i>	22
9.6	<i>SDS-PAGE van opgezuiverde eiwit-fracties</i>	24
9.6.1	<i>Materialen en methoden</i>	24
9.7	<i>Testlabeling van THP-T-SorTag met ⁶⁸Ga</i>	24
9.7.1	<i>Materialen en methoden</i>	25
9.8	<i>CELBINDINGSSTUDIE VAN ⁶⁸Ga-THP-T-SORTAG OP MC38-CELLEN</i>	25
9.8.1	<i>Materialen en methoden</i>	25

10	Resultaten.....	28
10.1	<i>CD-meting van zuurgevoelig eiwit T-SorTag onder veranderende pH.....</i>	28
10.2	<i>Flowcytometrische analyse van de pH-afhankelijke binding van T-SorTag aan MC38-cellen.....</i>	28
10.2.1	Fluorescentiegebaseerde beoordeling van pH-afhankelijke T-SorTag-binding	28
10.2.2	Kwantificatie van pH-afhankelijke binding op basis van MFI-waarden.....	29
10.2.3	Relatieve toename van T-SorTag-binding via fold change-analyse	30
10.3	<i>Conjugatie van T-SorTag met NCS-THP.....</i>	31
10.4	<i>SDS-PAGE van opgezuiverde eiwit-fracties</i>	32
10.5	<i>Testlabeling van THP-T-SorTag met ⁶⁸Ga.....</i>	33
10.6	<i>celbindingsstudie van ⁶⁸Ga-THP-T-SorTag aan MC38-cellen via gamma-counting</i>	34
10.6.1	Radiolabelingsstap	34
10.6.2	Celbindingsstudie	35
11	Discussie	37
11.1	<i>CD-meting van zuurgevoelig eiwit T-SorTag onder veranderende pH.....</i>	37
11.2	<i>Flowcytometrische analyse van de pH-afhankelijke binding van T-SorTag aan MC38-cellen.....</i>	37
11.2.1	Interpretatie van histogramverschuivingen	37
11.2.2	Interpretatie van MFI-analyse en vergelijking met isotypecontrole	37
11.2.3	Interpretatie van fold change-analyse	38
11.3	<i>Conjugatie van T-SorTag met NCS-THP.....</i>	39
11.4	<i>SDS-PAGE van opgezuiverde eiwit-fracties</i>	39
11.5	<i>Testlabeling van THP-T-SorTag met ⁶⁸Ga.....</i>	40
11.6	<i>celbindingsstudie van ⁶⁸Ga-THP-T-SorTag aan MC38-cellen via gamma-counting</i>	40
11.6.1	Radiolabelingsstap	40
11.6.2	Celbindingsstudie	41
12	Besluit	42
13	Referenties.....	42
14	Bijlagen.....	48

4 LIJST VAN AFKORTINGEN

- AL: antilichaam
- BeStSel: Beta Structure Selection
- CEST-MRI: Chemical Exchange Saturation Transfer magnetische resonantiebeeldvorming
- CD: circulair dichroïsme
- CT: computertomografie
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO: dimethylsulfoxide
- 18F-FDG: 18F-fluorodeoxyglucose
- FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting
- FBS: foetaal bovien serum
- iTLC: instant dunnelaagchromatografie
- KPCY: KrasG12D/Pdx1-Cre/p53/RosaYFP, genetisch gemodificeerd muismodel voor pancreaskanker
- LLC: Lewis Lung Carcinoma, murine longkankercellijn
- MC38: MC38 murine colon adenocarcinoomcellijn
- MRI: magnetische resonantiebeeldvorming
- MWCO: moleculaire gewichtscut-off
- NOTA: 1,4,7-triazacyclononaan-1,4,7-triacetaat
- NO2A: 1,4,7-triazacyclononaan-1,4-diacetaat
- PDAC: pancreas ductaal adenocarcinoom
- PenStrep: penicilline/streptomycine
- pHLP: pH Low Insertion Peptide
- PET: positronemissietomografie
- SDS-PAGE: natriumdodecylsulfaat-polyacrylamidegelelektroforese
- SEC: gelfiltratie (size-exclusion chromatography)
- SPECT: single-fotonemissietomografie
- THP-NCS: tris(hydroxypyridinon)-isothiocyanaat
- 4T1-Luc: murine borstkankercellijn met expressie van luciferase



Abstract van

***Onderzoek naar het gebruik van een zuurgevoelig eiwit voor
(nucleaire) beeldvorming van solide tumoren***

Noura Lazaar

Promotor: Prof. dr. Nick Devoogdt

Copromotor: dr. Thomas Ertveldt

Contactpersoon hogeschool: Sarah Vanwijnsberghe

Achtergrond

Solide tumoren worden vaak gekenmerkt door een zure extracellulaire micro-omgeving. Aangezien gezond weefsel een meer neutrale pH heeft, kan tumoraciditeit gebruikt worden als herkenningsmechanisme voor meer gerichte beeldvorming.

Doel

Het doel van dit onderzoek was om na te gaan of het zuurgevoelig eiwit T-SorTag, potentieel kan dienen voor nucleaire beeldvorming van solide tumoren.

Methode

T-SorTag werd eerst onderzocht met circulair dichroïsme (CD) om structurele veranderingen bij neutrale en zure pH na te gaan. Vervolgens werd de pH-afhankelijke binding aan MC38-cellen geëvalueerd met flowcytometrie, waarbij diverse pH-condities werden getest. Daarnaast werd T-SorTag gekoppeld aan de chelator THP-NCS, en het verkregen THP-T-SorTag-conjugaat werd nadien gelabeld met gallium-68. De kwaliteit van de labeling werd beoordeeld met size exclusion chromatografie (SEC) en instant dunnelaagchromatografie (iTLC). Tot slot werd een celbindingsstudie uitgevoerd met ⁶⁸Ga-THP-T-SorTag op MC38-cellen, waarbij de celgebonden radioactiviteit werd gemeten met een gamma-counter.

Resultaten

De CD-analyse toonde aan dat T-SorTag bij zure pH een verandering in structuur vertoonde. De flowcytometrische analyse liet een duidelijke pH-afhankelijke toename in binding zien, met het hoogste fluorescentiesignaal bij de laagste pH-waarde (pH 5,5). Ook de celbindingsstudie met ⁶⁸Ga-THP-T-SorTag liet zien dat de celgebonden activiteit toenam naarmate de pH daalde. De conjugatie en radiolabeling verliepen echter niet naar verwachting en vereisten verdere optimalisatie. De meerdere chromatografische pieken

kunnen wijzen op een heterogeen product, mogelijks door: o.a. onvolledige conjugatie, aggregatie of gedeeltelijke degradatie van T-SorTag.

Conclusie

De resultaten tonen aan dat T-SorTag pH-afhankelijke kenmerken bezit en sterker bindt aan MC38-cellen onder zure omstandigheden. Toch kon op basis van deze bachelorproef nog niet worden aangetoond dat T-SorTag effectief bruikbaar is voor nucleaire beeldvorming van solide tumoren *in vivo*. Verdere optimalisatie van de conjugatie, eiwitstabiliteit en radiochemische zuiverheid is noodzakelijk voordat het construct verder kan worden getest in preklinische beeldvormingsstudies.



Abstract of

Investigation of the use of a pH-sensitive protein for (nuclear) imaging of solid tumors

Noura Lazaar

Supervisor: Prof. dr. Nick Devoogdt

Co(supervisor): dr. Thomas Ertveldt

Institutional contact person: Sarah Vanwijnsberghe

Background

Solid tumors are often characterized by an acidic extracellular microenvironment. Since healthy tissue usually has a more neutral pH, tumor acidity can be used as a recognition mechanism for more targeted imaging.

Objective

The aim of this study was to investigate whether the pH-sensitive protein T-SorTag could potentially be used for nuclear imaging of solid tumors.

Methods

T-SorTag was first analyzed by circular dichroism (CD) to evaluate structural changes at neutral and acidic pH. Its pH-dependent binding to MC38 cells was then determined using flow cytometry under different pH conditions. In addition, T-SorTag was conjugated to the chelator THP-NCS, and the resulting THP-T-SorTag conjugate was subsequently radiolabeled with gallium-68. The quality of the radiolabeling was evaluated using size exclusion chromatography (SEC) and instant thin-layer chromatography (iTLC). Finally, a cell binding study was performed with ⁶⁸Ga-THP-T-SorTag on MC38 cells, and the cell-bound radioactivity was measured using a gamma counter.

Results

CD analysis showed that T-SorTag underwent a structural change under acidic conditions. Flow cytometry demonstrated a clear pH-dependent increase in binding, with the highest fluorescence signal observed at the lowest pH value, pH 5,5. The cell binding study with ⁶⁸Ga-THP-T-SorTag also showed that the cell-bound activity increased as the pH decreased. However, the conjugation and radiolabeling did not proceed fully as expected and required further optimization. The multiple chromatographic peaks may indicate a heterogeneous

product, caused by factors such as incomplete conjugation, aggregation or partial degradation of T-SorTag.

Conclusion

The results show that T-SorTag has pH-dependent behavior and binds more strongly to MC38 cells under acidic conditions. However, based on this bachelor thesis, it cannot yet be concluded that T-SorTag is effectively suitable for nuclear imaging of solid tumors *in vivo*. Further optimization of the conjugation procedure, protein stability and radiochemical purity is required before the construct can be evaluated further in preclinical imaging studies.

7 INLEIDING

Kanker is een verzamelnaam voor aandoeningen die gekenmerkt worden door een ongecontroleerde proliferatie en verspreiding van abnormale cellen (Brown et al., 2023). Het is een ziekte die een grote impact heeft op de samenleving en waarmee vrijwel iedereen, rechtstreeks of onrechtstreeks, in aanraking komt.

De prevalentie van kanker vormt een groeiend gezondheidsprobleem in België. In 2022 werden ongeveer 72.680 nieuwe kankergevallen geregistreerd, wat hoger ligt dan het Europese gemiddelde. Bovendien wordt verwacht dat het aantal kankergevallen tussen 2022 en 2040 met ongeveer 21% zal toenemen, wat wijst op een verdere stijging in de komende jaren. Factoren zoals onder andere bevolkingsgroei, vergrijzing, maar ook veranderingen in levensstijl en omgevingsfactoren kunnen hiermee te maken hebben (Gorasso et al., 2024). Een tijdige en nauwkeurige diagnose speelt daarom een cruciale rol in het bepalen van de prognose en het verdere behandeltraject (*Kanker - Naar Een Gezond België*, n.d.; OECD & Commission, 2025).

Een belangrijk kenmerk van solide tumoren is hun zure extracellulaire omgeving. Door verhoogde glycolyse en lactaatproductie, ontstaat een lage extracellulaire pH die duidelijk verschilt van die van gezond weefsel. Deze tumoraciditeit blijkt geen toevallig bijproduct te zijn, maar draagt actief bij aan tumorprogressie, invasie, immuunontwijking en therapieresistentie. Hierdoor is de pH van de tumormicro-omgeving uitgegroeid tot een biologisch relevant kenmerk (Gillies et al., 2002; M. A. Rahman et al., 2024a).

In de klinische praktijk wordt voor de opsporing en opvolging van kanker gebruikgemaakt van verschillende diagnostische technieken, waaronder computertomografie (CT), magnetische resonantiebeeldvorming (MRI) en nucleaire beeldvormingstechnieken, zoals: positronemissietomografie (PET) en single-fotonemissietomografie (SPECT) (Saeed et al., 2025). Deze methoden maken het mogelijk om tumoren in het lichaam zichtbaar te maken.

In het oncologisch onderzoek speelt nucleaire beeldvorming een belangrijke rol, omdat deze technieken het mogelijk maken om biologische processen *in vivo* en op een niet-invasieve manier te visualiseren a.d.h.v. radioactief gelabelde tracers. Ze worden onder meer gebruikt om tumoren op te sporen, hun metabole activiteit te bestuderen en de respons op therapie op te volgen. Daarnaast worden biopsieën en aanvullende laboratoriumonderzoeken ingezet om de aard van het tumorweefsel verder te karakteriseren (Juweid et al., 2025).

Ondanks de beschikbaarheid van deze beeldvormingstechnieken, blijft een belangrijke uitdaging bestaan. Veel van deze tracers vertonen ook opname in gezond weefsel, waardoor de specificiteit voor tumoren beperkt kan zijn. Dit benadrukt de nood aan meer gevoelige en tumorselectieve beeldvormende strategieën die tumoren gericht kunnen detecteren.

Binnen dit kader komt de vraag naar voren of biologische moleculen kunnen worden ingezet die functioneel reageren op een zure omgeving. Eiwitten zijn hierbij geschikt, aangezien ze gevoelig zijn voor veranderingen in pH en hierop kunnen inspelen. In de literatuur zijn reeds voorbeelden beschreven van zuurgevoelige eiwitten en peptiden die

bij lage pH een andere conformatie aannemen en daardoor selectief interageren met tumorweefsel (Bauer et al., 2022; Demoin et al., 2016; Reshetnyak et al., 2024).

In combinatie met radiochemische technieken opent dit de mogelijkheid om eiwitten te gebruiken als pH-afhankelijke probes voor nucleaire beeldvorming. Hierbij fungeert het eiwit als biologisch herkenningselement, terwijl een radioactief label zorgt voor detectie met PET of SPECT.

Daarnaast blijkt uit de literatuur (Anemone et al., 2019) dat er momenteel nog geen gestandaardiseerde klinische methode beschikbaar is om tumor-pH betrouwbaar *in vivo* te meten, wat wijst op een nood aan nieuwe pH-gevoelige beeldvormingstechnieken. In dit onderzoeksproject wordt deze vraag verder onderzocht: kan een zuurgevoelig eiwit dienen voor (nucleaire) beeldvorming van solide tumoren?

Deze bachelorproef richt zich op het bestuderen van tumoraciditeit, pH-afhankelijke eiwitstructuur, nucleaire beeldvorming en radiogelabelde eiwitten, met als doel het potentieel van zuurgevoelige eiwitten als beeldvormingsprobes voor solide tumoren te evalueren.

8 LITERATUURONDERZOEK

8.1 SOLIDE TUMOREN EN HUN MICRO-OMGEVING

In het lichaam delen cellen zich voortdurend om groei en herstel mogelijk te maken. Dit proces verloopt meestal op een gecontroleerde en gereguleerde manier, maar soms kunnen er fouten optreden, waardoor cellen zich ongecontroleerd blijven vermenigvuldigen. Hierdoor kan er een ophoping van cellen ontstaan. Dit hoopje cellen wordt een tumor, gezwel of neoplasma genoemd. Wanneer dit klompje cellen zich verder verspreid in omliggende weefsels en uitzaait, word het een kwaadaardige tumor of kanker genoemd (*Goedaardige of Kwaadaardige Tumor?* - UMCG Protonentherapiecentrum, n.d.).

Als er zo een kwaadaardige tumor in een bepaald orgaan of weefsel ontstaat, behoort dit tot de solide tumoren. Het woord 'solide' betekent dat de cellen vast bij elkaar zitten. Kanker kan ook ontstaan in het bloed of in de lymfe. In dat geval gaat het meestal om losse kankercellen die de gezonde cellen verdringen, zonder dat er een vaste tumor gevormd wordt (niet-solide kanker) (Kanker.nl, n.d.).

8.1.1 DE MC38 MURINE COLON ADENOCARCINOOMCELLIJN (MC38)

In dit onderzoek wordt er gebruik gemaakt van een MC38-cel lijn. Een colon adenocarcinoom is een vorm van darmkanker die ontstaat uit het klierweefsel (produceert o.a. slijm) van de darm. Dit is afkomstig van muizen en wordt frequent gebruikt als muismodel voor colorectale kanker, onder andere omdat deze cellen klinisch relevante mutaties vertonen en geschikt zijn voor preklinisch onderzoek. In syngene muismodellen, zoals C57BL/6-muizen, groeien MC38-cellen in aanwezigheid van een intact immuunsysteem, wat het mogelijk maakt om tumorontwikkeling en therapierespons *in vivo* te bestuderen (Greenlee & King, 2022; Taniura et al., 2020).

De micro-omgeving van tumoren is de lokale omgeving rond tumorcellen, bestaande uit immuuncellen, de extracellulaire matrix, bloedvaten en andere cellen. (Kelley Murfin, n.d.) Samen beïnvloeden ze de groei, overleving en verspreiding van de tumor. Deze micro-omgeving verschilt sterk van die van gezond weefsel.

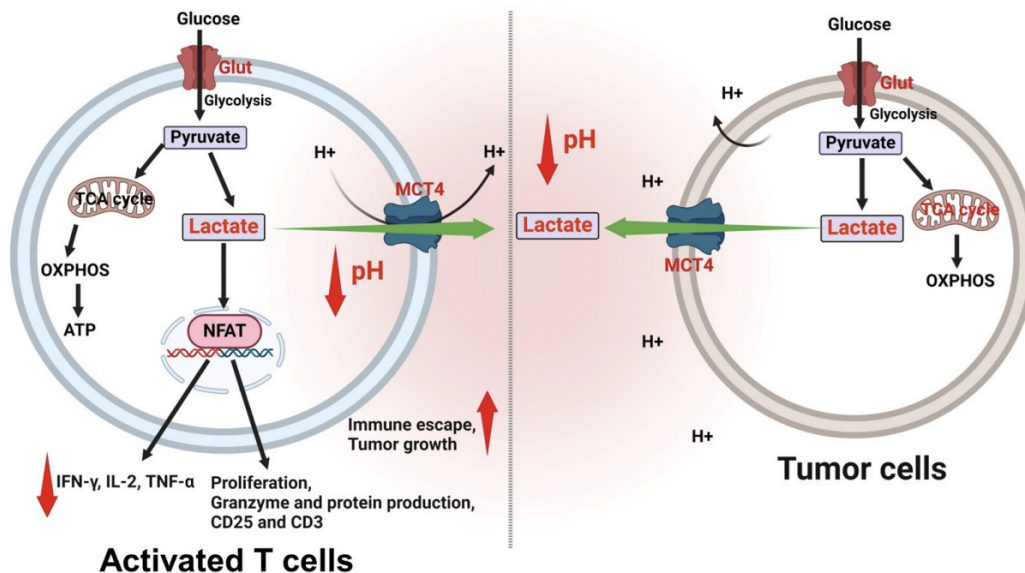
Een belangrijk kenmerk van solide tumoren is hun slecht georganiseerde bloedvoorziening. Hierdoor is de bloedtoevoer ongelijk verdeeld, waardoor sommige delen van de tumor tijdelijk of langdurig te weinig zuurstof krijgen, dit fenomeen wordt hypoxie genoemd (drs. T.W.H. Meijer et al., n.d.; Gillies et al., 2002; Zhang et al., 2010).

8.1.2 HET WARBURG-EFFECT OF DE AËROBE GLYCOLYSE

Naast hypoxie vertonen tumorcellen een veranderd metabolisme om energie te kunnen produceren, waarbij voornamelijk gebruik wordt gemaakt van de glycolyse. Dit is een proces waarbij glucose wordt omgezet in pyruvaat met productie van een beperkte hoeveelheid ATP. In normale, gedifferentieerde cellen wordt dit pyruvaat, in aanwezigheid van zuurstof, verder afgebroken via oxidatieve fosforylering. Dit leidt tot een efficiënte energieproductie met weinig vorming van lactaat. In tegenstelling tot tumorcellen, die glucose voornamelijk omzetten in lactaat, desondanks er voldoende zuurstof aanwezig is. Dit fenomeen staat bekend als anaërobe glycolyse of het Warburg-effect. Hoewel deze

manier van energie maken minder efficiënt is, helpt ze tumorcellen om snel te groeien (door de vorming van bouwstoffen) (Heiden et al., 2009).

Onderstaande figuur (M. A. Rahman et al., 2024b) toont aan hoe tumorcellen via verhoogde glycolyse (veel) lactaat en protonen produceren, wat leidt tot een zure micro-omgeving. Door de lage pH gaan T-cellen minder goed werken en zal de activatie en functie van T-cellen worden geremd, waardoor de tumor het immuunsysteem kan ontwijken.



Figuur 1. Effect van een lage pH op de interacties tussen geactiveerde T-cellen en tumorcellen. Verhoogde lactaatsniveaus afkomstig van tumorcellen remmen de activatie, proliferatiecapaciteit en cytotoxische werking van T-cellen, waardoor hun vermogen om tumorcellen specifiek te herkennen en te elimineren afneemt. Een zure omgeving inhibeert de activiteit van T-cellen, wat leidt tot een onderdrukking van de anti-tumorrespons en tumorcellen in staat stelt te ontsnappen aan immuuncontrole en zich verder te vermenigvuldigen. Dit wijst erop dat acidose tumoroverleving, proliferatie en resistentie tegen immunotherapie bevordert (M. A. Rahman et al., 2024b). De figuur werd gemaakt met BioRender.com.

De combinatie van hypoxie, verhoogde glycolyse en lactaataccumulatie resulteert in een verlaagde pH, een kenmerk dat solide tumoren duidelijk onderscheidt van gezond weefsel. Zo kan de pH gebruikt worden om tumoren selectief te benaderen (Hashim et al., 2011; Martins Pinto et al., 2023).

8.2 INVLOED VAN PH OP EIWITSTRUCTUUR EN -FUNCTIE

Eiwitten zijn essentiële biomoleculen die onmisbaar zijn voor de structuur, werking en regeling van cellen. Elk eiwit bestaat uit een keten van aminozuren. Eén of meerdere van zo'n polypeptideketens vouwen zich tot een specifieke driedimensionale structuur, die noodzakelijk is voor een biologisch actief eiwit. Deze structuur wordt in stand gehouden door relatief zwakke interacties die makkelijk verstoord kunnen worden, zoals onder andere waterstofbruggen (Lauren Rodriguez & Larry Joe, n.d.). Specifieke omgevingsfactoren, zoals: de temperatuur, chemische (denaturerende) stoffen of de pH kunnen een invloed hebben op die structuur (O'Brien et al., 2011).

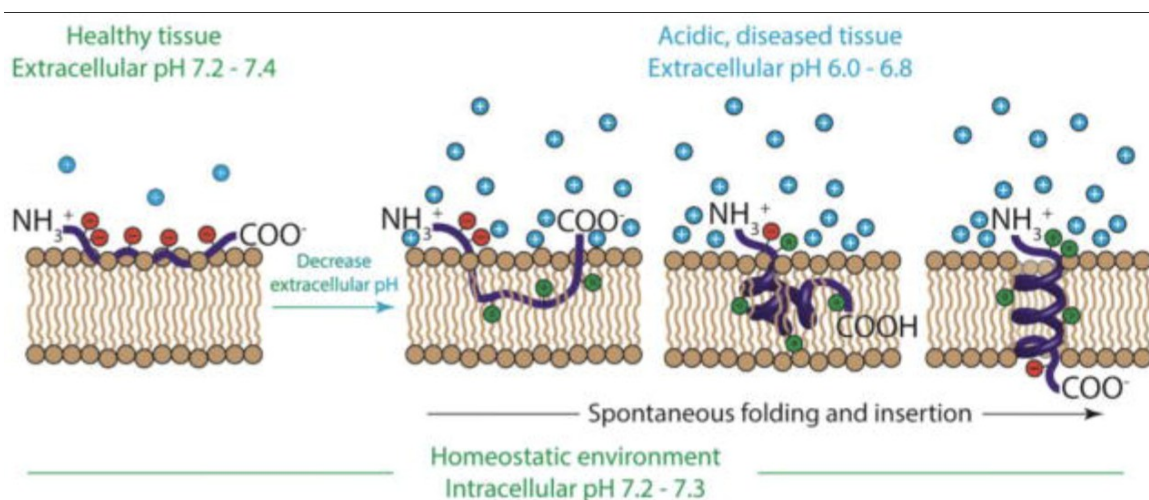
Veranderingen in pH beïnvloeden de protonatietoestand (aantal gebonden protonen) van zure en basische aminozuurresiduen in eiwitten. Door protonatie (protonopname) of deprotonatie (proton afgeven) veranderen de ladingsverdeling en de elektrostatistische interacties binnen het eiwit. Bij extreme pH-waarden kan het eiwit gedeeltelijk of volledig ontvouwen. Dit proces kan resulteren in structurele veranderingen, verlies van stabiliteit en uiteindelijk denaturatie (Melanie M. Cooper & Michael W. Klymkowsky, n.d.).

De studie van (Guckeisen et al., 2021) toont aan dat pH-wijzigingen meetbare veranderingen in de secundaire structuur van eiwitten veroorzaken, onder andere aangetoond met CD (circulair dichroïsme). De mate waarin eiwitten structureel veranderen bij pH-veranderingen is eiwitspecifiek: sommige eiwitten behouden grotendeels hun structuur onder zure of basische omstandigheden, terwijl andere duidelijke structurele herorganisaties of ontvouwing vertonen. Dit benadrukt dat pH-gevoeligheid afhangt van de samenstelling en structuur van het eiwit.

Structurele veranderingen van eiwitten hebben directe gevolgen voor hun biologische activiteit. Veranderingen in conformatie kunnen de interactie van eiwitten met andere moleculen beïnvloeden of volledig functieverlies veroorzaken. Daarom wordt voor elk eiwit een optimale pH-waarde onderscheiden waarbij de 3D-structuur en functie behouden blijven (Melanie M. Cooper & Michael W. Klymkowsky, n.d.).

8.3 ZUURTEGRAAD ALS SELECTIVITEITSMECHANISME VOOR BEELDVORMING

pH kan naast een destabiliserende factor, ook beschouwd worden als een selectiviteitsmechanisme. Op basis van dit concept werden zuurgevoelige moleculen ontwikkeld die specifiek reageren op een zure omgeving en daardoor selectief geactiveerd worden of accumuleren in tumorweefsel (Visca et al., 2022). Een voorbeeld hiervan is het pHLIP (pH Low Insertion Peptide). Het pHLIP werd ontwikkeld als een zuurgevoelig eiwit dat selectief reageert op een lage extracellulaire pH. Het blijft bij neutrale pH oplosbaar in water of gebonden aan het membraanoppervlak. Echter krijgt het eiwit onder zure omstandigheden een verandering in zijn structuur en penetreert het in de lipidelaag (Reshetnyak et al., 2007).



Figuur 2. Mechanisme van pHLIP-insertie in het celmembraan.

Wanneer het pHLIP in contact komt met gezond weefsel bij een neutrale pH, blijft het peptide grotendeels in oplossing of slechts zwak gebonden aan het celmembraan. In een zuur tumormilieu daarentegen ondergaat het pHLIP een conformatieverandering waardoor het zich sterker aan het membraan bindt en erin kan insereren. Hierdoor kan het zich selectief opstapelen in tumorweefsel. De *in vivo* studie van (Andreev et al., 2007) geeft aan dat dit leidt tot een stabiel signaal van meer dan vier dagen en een vijf keer hoger signaal in tumoren t.o.v. gezond weefsel (Andreev et al., 2010; Wyatt et al., 2017).

Een ander voorbeeld naast deze peptiden, zijn pH-gevoelige contrastmiddelen, zoals iopamidol. Dit kan gebruikt worden in combinatie met Chemical Exchange Saturation Transfer magnetische resonantiebeeldvorming (CEST-MRI) om de extracellulaire pH van tumoren *in vivo* te meten. Deze techniek maakt het mogelijk om pH-veranderingen in het tumormicro-omgeving niet-invasief en met hoge ruimtelijke resolutie in kaart te brengen (Anemone et al., 2019b). Bovendien kan iopamidol (de 'sensor') met CEST-MRI (de 'meettechniek') gebruikt worden om de tumor-pH longitudinaal te volgen en veranderingen in het tumormetabolisme te detecteren, bijvoorbeeld na therapeutische ingrepen (Jardim-Perassi et al., 2023; Longo et al., 2016).

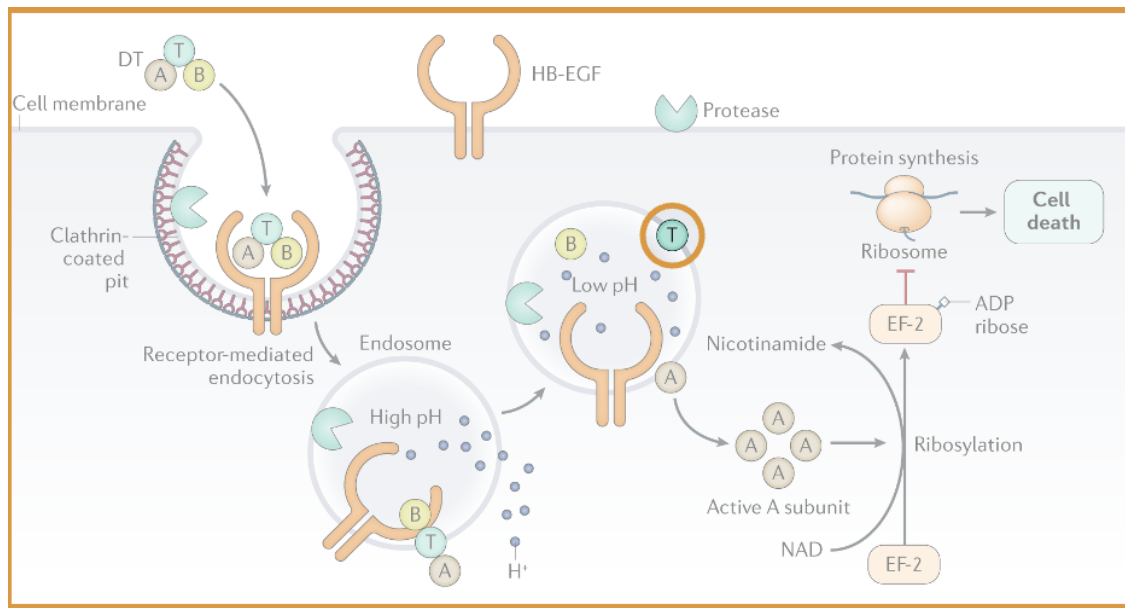
In dit onderzoek wordt verder gebouwd op deze pH-gevoelige mechanismen door gebruik te maken van een specifiek eiwitconstruct, T-SorTag, afgeleid van het difterietoxine.

8.4 T-SORTAG: EEN PH-GEVOELIG EIWITCONSTRUCT AFGELEID VAN HET DIFTERIETOXINE

T-SorTag is een gemodificeerd eiwitconstruct dat werd geproduceerd met een His-Tag als recombinant eiwit in stabiel getransduceerde ExpiCHO-cellen en geleverd in PBS door VIB's Protein Service Facility via dienstverlening. Dit pH-gevoelig construct is afgeleid van het difterietoxine, bestaande uit drie afzonderlijke structurele domeinen met elk een specifieke functie. Deze structuur bestaat uit fragment A (katalytisch domein) en fragment B, dat zelf bestaat uit twee domeinen: het transmembrane (translocatie-) domein en het receptorbindend domein (Choe et al., 1992).

Het translocatiedomein bestaat uit negen alfa-helices die een belangrijke rol speelt bij het binnendringen van het toxine in de cel. Wanneer de pH in het endosoom daalt, ondergaat het T-domein een conformatieverandering, waardoor het katalytische domein over het membraan naar het cytosol kan verplaatsen. De verzuring van het endosoom is dus een essentiële stap in dit translocatiemechanisme (Falnes & Sandvig, 2000).

De verschillende functies van het toxine worden uitgevoerd door aparte structurele domeinen, wat het mogelijk maakt om deze domeinen afzonderlijk te gebruiken bij het ontwerpen van chimere eiwitten (Choe et al., 1992). T-SorTag is gebaseerd op dit mechanisme en ondergaat bij lage pH, zoals in de tumormicro-omgeving, een conformatieverandering, waardoor het met het celmembraan kan interageren. Hierdoor kan het beter binden aan het celmembraan van tumorcellen, wat het dus mogelijk maakt om deze cellen gericht op te sporen en zichtbaar te maken via beeldvorming.



Figuur 3. Werkingsmechanisme van difterietoxine (Sharma, N.C., Efstratiou, A., Mokrousov, I. et al. Diphtheria. Nat Rev Dis Primers 5, 81 (2019)) ('Sharma et al., 2019)

8.5 NUCLEAIRE BEELDVORMING VOOR TUMORDETECTIE

Beeldvorming speelt een belangrijke rol in oncologisch onderzoek, omdat het toelaat om tumoren en biologische processen in levende organismen niet-invasief te bekijken en op te volgen m.b.v. radioactief gelabelde tracers. In tegenstelling tot klassieke histologische technieken, die enkel momentopnames bieden en destructief zijn, maakt beeldvorming het mogelijk om tumorontwikkeling, tumorgroei en de respons op therapie dynamisch te bestuderen (Rowe & Pomper, 2021). Nucleaire beeldvorming is een specifieke vorm van medische beeldvorming, waarbij gebruik wordt gemaakt van radioactief gelabelde tracers. Deze tracers zenden straling uit die buiten het lichaam kan worden gedetecteerd. Hierdoor kunnen in vivo processen zichtbaar worden gemaakt (M E Phelps, 2000; Rowe & Pomper, 2021) .

Voorbeelden van nucleaire beeldvormingstechnieken die hiervoor worden gebruikt zijn PET en SPECT. Beide technieken maken gebruik van radioactief gelabelde tracers die na injectie via de bloedbaan verspreid worden en zich ophopen in specifieke weefsels, waardoor functionele processen in het lichaam in beeld kunnen worden gebracht. De uitgezonden straling wordt vervolgens gedetecteerd en omgezet in 3D-beelden (Harsha., 2024). Tumoren vertonen vaak een verhoogde glucose-opname, waardoor tracers zoals bijvoorbeeld ^{18}F -FDG (^{18}F -fluorodeoxyglucose), zich opstapelen in tumorweefsel en zo detectie mogelijk maken (Low et al., 2023). Hoewel deze technieken een hoge sensitiviteit hebben, is hun ruimtelijke resolutie beperkter, waardoor ze vaak gecombineerd worden met CT (Harsha., 2024). Deze technieken vormen o.a. de basis voor het gebruik van radioactief gelabelde probes.

8.6 CHELATORKOPPELING EN RADIOLABELING VAN PH-GEVOELIGE MOLECULEN VOOR NUCLEAIRE BEELDVORMING

Radiometalen zoals Gallium-68 (^{68}Ga) worden frequent gebruikt in PET voor de visualisatie van tumoren. Aangezien deze metaalionen niet rechtstreeks aan biomoleculen kunnen binden, is een chelator noodzakelijk. Een chelator is een ligand dat het radiometalaan stabiel kan coördineren, waardoor het veilig naar een biologisch doelwit kan worden getransporteerd, in dit geval de micro-omgeving van de tumor (Price & Orvig, 2013).

In veel gevallen wordt gebruik gemaakt van een bifunctionele chelator, die enerzijds het radiometaal bindt en anderzijds covalent gekoppeld wordt aan een molecule, zoals een peptide of eiwit. Deze strategie maakt het mogelijk om eerst een stabiele conjugatie met het doelmolecuul te vormen en vervolgens het radio-isotoop toe te voegen tijdens de radiolabelingstap. Studies tonen ook aan dat variaties in chelatorstructuur en koppelingstechniek een belangrijke impact hebben op de tumoropname en distributie van de radiotracer (Gourni et al., 2017).

In dit onderzoek wordt er gelijkaardig gewerkt, waarbij het eiwitconstruct T-SorTag eerst wordt geconjugeerd met de chelator tris(hydroxypyridinon)-isothiocyanaat (THP-NCS). Vervolgens wordt dit complex gelabeld met ^{68}Ga , waardoor een radiogelabelde probe ontstaat die gebruikt kan worden voor nucleaire beeldvorming van tumoren.

In de studie van (Demoin et al., 2016) werden pHLIP-varianten ook gekoppeld met chelatoren zoals 1,4,7-triazacyclononaan-1,4,7-triacetaat (NOTA) en 1,4,7-triazacyclononaan-1,4-diacetaat (NO₂A). Deze chelatoren maken het mogelijk om positron-emitterende radio-isotopen stabiel te binden zonder het pH-afhankelijke gedrag van de peptide te verstoren.

9 EXPERIMENTEN

9.1 BUFFERWISSEL VAN T-SORTAG VIA ULTRAFILTRATIE (VIVASPIN 5000)

9.1.1 MATERIALEN EN METHODEN

9.1.1.1 BEREIDING NATRIUMFOSFAATBUFFER

Voor de bufferwissel werd een natriumfosfaatbuffer bereid. Hiervoor werd 179,07 mg natriumfosfaat afgewogen en opgelost in 50 mL Milli-Q water. De pH werd aangepast tot ongeveer 7,4 met 1M SO_4^{2-} -buffer.

9.1.1.2 BUFFERWISSEL

De bufferwissel werd uitgevoerd om T-SorTag over te brengen naar een geschikte bufferomgeving voor verdere experimenten, zoals conjugatie en radiolabeling.

Aangezien T-SorTag een moleculair gewicht heeft van 22,70 kDa, werd er gekozen voor ultrafiltratie met een Vivaspin 5000. Dit semipermeabel membraan laat moleculen kleiner dan 5 kDa door, terwijl het eiwit achterblijft in de bovenkamer van de Vivaspin.

Eerst werd het membraan bevochtigd met natriumfosfaatbuffer. Vervolgens werd het T-SorTag-staal in de bovenkamer van de Vivaspin gepipetteerd en dit werd gecentrifugeerd bij 7197 rcf gedurende 5 minuten bij 4 °C. Na centrifugatie werd het filtraat (flow-through) verwijderd.

In de filter werd het eiwit gepipetteerd en gedurende 3 minuten gecentrifugeerd bij 7197 rcf bij 4 °C. De flow-through werd verwijderd. Vervolgens is er natriumfosfaatbuffer toegevoegd aan het retentaat en werd er opnieuw gecentrifugeerd. Deze stappen werden meerdere keren herhaald om de oorspronkelijke buffer (PBS) geleidelijk aan te vervangen door de nieuwe buffer (natriumfosfaatbuffer). Op het einde werd een eindvolume van ongeveer 370 uL bekomen en de concentratie werd gemeten.

9.2 CD-METING VAN ZUURGEVOELIG EIWIJ T-SORTAG ONDER VERANDERENDE PH

9.2.1 MATERIALEN EN METHODEN

Met behulp van CD-spectroscopie werd nagegaan of T-SorTag structurele veranderingen ondergaat bij dalende pH.

9.2.1.1 STAALVOORBEREIDING

Voor de CD-analyse werden drie stalen voorbereid:

1. Een blanco-oplossing (natriumfosfaatbuffer)
2. T-SorTag (in oorspronkelijke PBS-buffer)

3. Geacidificeerd T-SorTag

Acidificatie (staal 3) werd uitgevoerd door toevoeging van verdund zwavelzuur (1M), waarbij de pH werd verlaagd tot 5,5.

9.2.1.2 CD-METING

De meting werden uitgevoerd met een Jasco J-810 spectropolarimeter. Er werd gebruik gemaakt van een kwartscuvet met een padlengte van 0,1 cm.

CD-spectra werden opgenomen in het UV-bereik (190 – 250 nm). Voor elk staal werden vijf opeenvolgende scans uitgevoerd, waarna het gemiddelde spectrum werd berekend. Het blanco-spectrum werd telkens afgetrokken van het eiwitspectrum om achtergrondinterferentie te corrigeren. Het CD-signaal werd uitgezet in functie van de golflengte.

De bekomen CD-spectra werden geanalyseerd met de software BeStSel (Beta Structure Selection), een programma dat de secundaire structuur van eiwitten bepaald.

9.3 VOORBEREIDING EN KWEK VAN MC38-CELLIJN

9.3.1 MATERIALEN EN METHODEN

9.3.1.1 BEREIDING KWEKMEDIUM

Het kweekmedium bestond uit 500 mL DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific), aangevuld met 10% (50 mL) foetaal bovien serum (FBS) en 1% (5mL) PenStrep (penicilline/streptomycine). Het medium werd steriel bereid en bewaard bij 4 °C.

9.3.1.2 ONTDOOIEN VAN CELLEN

De MC38-cellen werden bewaard in vloeibare stikstof. Hiervan werd 1 mL overgebracht in een falcontube en verdund met 9 mL kweekmedium. Vervolgens werd deze oplossing gedurende 5 minuten gecentrifugeerd bij 400 rcf. Het supernatans werd verwijderd en de celpellet werd geresuspendeerd in 10 mL kweekmedium.

De cellen werden vervolgens overgebracht in een cultuurfles met 40 mL kweekmedium. Gedurende vier dagen werden de cellen geïncubeerd bij 37 °C in een incubator met 5% CO₂.

9.3.1.3 SPLITSSEN VAN CELLEN

De cellen werden dagelijks geobserveerd onder de microscoop op morfologie en confluentie. MC38-cellen hebben een geschatte verdubbelingstijd van ongeveer 24 uur onder optimale omstandigheden.

Wanneer een confluentie van 70–80% werd bereikt, werden de cellen gesplitst om overgroei te vermijden en een gezonde proliferatie te behouden. Het splitsen gebeurde

volgens de standaardprocedure (trypsinisatie), waarna de cellen opnieuw werden uitgezaaid in vers kweekmedium.

9.4 FLOWCYTOMETRISCHE ANALYSE VAN DE PH-AFHANKELIJKE BINDING VAN T-SORTAG AAN MC38-CELLEN

9.4.1 MATERIALEN EN METHODEN

Aangezien solide tumoren gekenmerkt worden door een zure micro-omgeving, werd onderzocht of T-SorTag een verhoogde binding vertoont bij lagere pH-waarden in vergelijking met een fysiologische pH.

9.4.1.1 BEREIDING BUFFERS

Ter voorbereiding van dit experiment, werden er vijf pH-buffers bereid van 250 mL met respectievelijk vijf verschillende pH-condities: pH 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 en 7,5. Deze buffers werden in vijf aparte maatkolven gemaakt: 3,35 g lyofiliseerd DMEM-poeder werd afgewogen en in oplossing gebracht met water for injection. Hierna werd er 12,5 mL van de buffersystemen toegevoegd (eindconcentratie: 25 mM). Afhankelijk van de gewenste pH, werd MES-buffer gebruikt voor zure condities (pH 5,5; pH 6,0 en pH 6,5) en HEPES-buffer voor neutrale tot licht basische condities (pH 7,0 en pH 7,5). Nadat de pH van elk medium nauwkeurig werd afgesteld met de pH-meter, werd er verder aangelengd tot 250 mL met water voor injectie. Gebruikmakend van een vacuümfiltersysteem (*corning filters*) werden de buffers gefilterd en bewaard bij 4–8 °C in het donker tot gebruik.

9.4.1.2 CELTELLING

Voorafgaand aan het experiment werden de cellen gekleurd en geteld m.b.v. trypaanblauw. Hiervoor werd de celsuspensie verdund door 10 µL celsuspensie te mengen met 90 µL trypaanblauw. Een kleine hoeveelheid werd op een Neubauer-telkamer gepipetteerd en de cellen werden geteld onder de microscoop. Er werden gemiddeld 22 cellen geteld in één groot telvak. Rekeninghoudend met de telkamer (verdunningsfactor = 10.000) komt dit overeen met 220.000 cellen/mL. Aangezien de celsuspensie werd verdund (1/10), bedraagt de uiteindelijke celconcentratie $2,2 \times 10^6$ cellen/mL.

Volgens het protocol was een eindconcentratie van 1×10^6 cellen/mL voorzien met een volume van 1 mL per conditie. Aangezien de bekomen celsuspensie een concentratie van $2,2 \times 10^6$ cellen/mL had, werd per conditie de helft (500 µL) van de celsuspensie overgebracht in afzonderlijke FACS(Fluorescence-Activated Cell Sorting)-tubes. Op deze manier werd per buis een vergelijkbaar totaal aantal cellen verkregen.

Hierna werden de buisjes gedurende vijf minuten gecentrifugeerd bij 300–400 rcf. Het supernatans werd verwijderd en de celpellet werd geresuspendeerd in 200 µL van de gewenste pH-buffers.

9.4.1.3 INCUBATIE MET T-SORTAG

Drie μL van het eiwit (eindconcentratie: $0,34 \text{ mg/mL}$) werd toegevoegd aan elke FACS-tube met celsuspensie en gemengd. De cellen werden daarna gedurende één uur geïncubeerd bij kamertemperatuur in het donker.

Na incubatie werd 1 mL FACS-buffer toegevoegd aan elke tube. De cellen werden gecentrifugeerd gedurende 5 minuten bij $300\text{--}400 \text{ rcf}$ en opnieuw werd het supernatans verwijderd.

9.4.1.4 FLUORESCENTE KLEURING

De cellen werden gekleurd met een oplossing van een anti-His monoklonaal antilichaam ($100\times$). Als isotype controle werd een mouse IgG1-antilichaam gebruikt (Miltenyi Biotec). Eerst werd deze oplossing verdund door 792 uL FACS-buffer toe te voegen aan 8 uL antilichaam (AL). Hiervan werd in elke FACS-tube 150 uL toegevoegd. De tubes werden gedurende 30 minuten geïncubeerd bij 4°C in het donker.

Na incubatie werd opnieuw 1 mL FACS-buffer toegevoegd, gevolgd door centrifugatie (5 minuten, $300\text{--}400 \text{ rcf}$). Het supernatans werd verwijderd en tenslotte werd de pellet geresuspendeerd in 300 uL FACS-buffer. In een 96-well plaat werd de oplossing verdeeld in triplicaten van $100 \text{ }\mu\text{L}$ per well.

De gekleurde cellen werden geanalyseerd met een BD FACSCelesta flowcytometer. Het volledige staal werd telkens geanalyseerd.

9.5 CONJUGATIE VAN T-SORTAG MET NCS-THP

9.5.1 MATERIALEN EN METHODEN

Deze conjugatie werd uitgevoerd met als doel een stabiel eiwit-chelatorconjugaat te bekomen. Dit geconjugeerde eiwit wordt later gebruikt bij radiochemische labeling.

9.5.1.1 BEREIDING VAN STOCKOPLOSSINGEN

Als conjugatiebuffer werd een $10\times$ natriumcarbonaatbuffer ($0,5 \text{ M NaHCO}_3$, pH $8,5$) gebruikt. Hiervoor werd $2,65 \text{ g}$ watervrij natriumcarbonaat afgewogen, opgelost in water voor injectie (Fluka) en aangevuld in een 50 mL falcontube. Deze buffer werd verdund tot een $1\times$ werkoplossing door 1 mL van de $10\times$ buffer te mengen met 9 mL Fluka water (eindconcentratie: $0,05\text{M}$).

Daarnaast werd een stockoplossing van de chelator NCS-THP bereid in dimethylsulfoxide (DMSO). Hiervoor werd $3,0 \text{ mg}$ NCS-THP afgewogen in een donker eppendorf en opgelost in DMSO tot een eindconcentratie van $10 \text{ nmol}/\mu\text{L}$. De oplossing werd gedurende 30 minuten geschud bij 37°C .

9.5.1.2 BUFFERWISSEL

De bufferwissel van T-SorTag naar $1\times$ natriumcarbonaatbuffer werd uitgevoerd via dezelfde procedure als beschreven in sectie 9.1. Hierbij werd het staal geconcentreerd tot $30 \text{ }\mu\text{M}$ in een eindvolume van $1000 \text{ }\mu\text{L}$.

9.5.1.3 INITIËLE CONJUGATIEREACTIE EN PURIFICATIE

Voor de conjugatiereactie werd 15 µL van de NCS-THP-stockoplossing toegevoegd aan 1000 µL T-SorTag-oplossing, overeenkomend met een vijfvoudige molaire overmaat van chelator ten opzichte van het eiwit. Het totale reactiemengsel werd overnacht geïncubeerd bij 50 °C onder continu schudden aan 650 rpm.

Na incubatie werd het conjugatiemengsel gezuiverd via size-exclusion chromatografie (SEC) met behulp van een ÄKTA HPLC-systeem, uitgerust met een Superdex 75 Increase 10/300 GL SEC-kolom. Als mobiele fase werd metaalvrije 2X PBS gebruikt onder isocratische condities.

Voorafgaand aan injectie werd de injectieloop gereinigd door spoeling met NaOH, gevolgd door neutralisatie met Tris-buffer, spoeling met water en uiteindelijk spoeling met mobiele fase. Vervolgens werd 900 µL van het reactiemengsel geïnjecteerd. Tijdens de run van ongeveer 50 minuten werden vijf opeenvolgende fracties verzameld.

9.5.1.4 OPTIMALISATIE VAN DE CONJUGATIECONDITIES

Evaluatie van verschillende reactiecondities

Aangezien de eerste conjugatie- en purificatieresultaten niet voldeden aan de verwachtingen, werden verschillende optimalisatiestappen uitgevoerd.

Eerst werd een niet-radioactief simulatie-experiment uitgevoerd waarbij 0,1 M HCl werd gebruikt ter simulatie van de elutieomgeving van ⁶⁸Ga. Hierbij werden verschillende pH-condities getest (pH 7,5; 8,0 en 8,5). Na analyse op zowel het ÄKTA-systeem als een gevoeliger Hitachi HPLC-systeem werden meerdere pieken waargenomen in plaats van één duidelijke eiwitpiek.

Vervolgens werd een bijkomend simulatie-experiment uitgevoerd waarbij DMSO werd gebruikt, in plaats van NCS-THP, om het effect van de reactieomgeving op het eiwit te evalueren. Hierbij werden opnieuw verschillende pH-waarden getest. Ook onder deze omstandigheden werden meerdere pieken waargenomen.

Toevoeging van Tween-20

Omdat het eiwit mogelijk "sticky" gedrag vertoonde, werd de mobiele fase aangepast door toevoeging van 0,1% Tween-20 aan de metaalvrije 2X PBS-buffer om aggregatie en niet-specifieke binding te verminderen.

Daarnaast werd de Vivaspin voorgewassen met 0,05 M Na₂CO₃-buffer (pH 8,0) aangevuld met 0,1% Tween-20. Het eiwit werd opnieuw via een bufferwissel overgebracht naar deze aangepaste buffer. Vervolgens werd THP-NCS opgelost in DMSO, toegevoegd aan het eiwitstaal en overnacht geïncubeerd bij 37 °C. Na een bijkomende bufferwissel, via ultrafiltratie, werd het staal opnieuw geanalyseerd op het ÄKTA-systeem.

Verhoging van eiwitconcentratie

De conjugatiecondities werden verder geoptimaliseerd door de concentratie van T-SorTag te verhogen. Hiervoor werd een nieuwe THP-stockoplossing bereid door 3,24 mg THP op te lossen in 160 µL DMSO. Deze oplossing werd gedurende 30 minuten geschud bij 37 °C aan 900 rpm.

Daarnaast werd de conjugatiebuffer verder aangepast door toevoeging van 0,1% Tween-20 aan de bestaande 0,05 M natriumcarbonaatbuffer. De pH van deze aangepaste buffer bedroeg hier 8,9.

Voor de bufferwissel en concentratieverhoging werd in meerdere stappen in totaal 5 mL T-SorTag-oplossing (15 μ M) toegevoegd aan een Vivaspin 5000. Na herhaald centrifugeren en aanvullen met buffer werd het eiwit geconcentreerd tot ongeveer 83 μ M, met een eindvolume van ongeveer 900 μ L. Vervolgens werd 18,75 μ L van de THP-stockoplossing toegevoegd aan het geconcentreerde T-SorTag-staal. De conjugatiemix werd overnacht geïncubeerd bij 37 °C onder continu schudden aan 650 rpm.

De dag nadien werd het conjugatiemengsel gezuiverd via SEC met behulp van het ÄKTA Avant-systeem. Er werd 700 μ L van het conjugatiestaal geïnjecteerd. Tijdens de run van ongeveer 40 minuten werden in totaal 14 fracties verzameld.

Deze laatste geoptimaliseerde conjugatieprocedure werd verder gebruikt voor de daaropvolgende SDS-PAGE-analyse en testlabeling met ^{68}Ga .

9.6 SDS-PAGE VAN OPGEZUIVERDE EIWIT-FRACTIES

9.6.1 MATERIALEN EN METHODEN

Na optimalisatie van de conjugatiereactie werden negen van de 14 fracties, verkregen na purificatie via SEC, geanalyseerd met behulp van SDS-PAGE om de moleculaire grootte en zuiverheid te controleren.

Per fractie werd 20 μ L staal, overeenkomend met ongeveer 5 μ g eiwit, gemengd met 20 μ L 2 $\times$ Laemmli sample buffer. De stalen werden gedurende 5 minuten verhit bij 95 °C en vervolgens onmiddellijk gekoeld op ijs. Daarna werden de stalen kort gecentrifugeerd.

De SDS-PAGE werd uitgevoerd met een commerciële, voorgegoten gel (Novex™ 16% Tris-Glycine mini-gel) in een XCell SureLock™ Mini-Cell systeem. Als loopbuffer werd een 1X SDS-PAGE Tris/Glycine/SDS running buffer gebruikt.

Na installatie van de gel, werd de elektroforesekamer gevuld met loopbuffer totdat alle welletjes volledig bedekt waren. Vervolgens werd 10 μ L PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) geladen als referentie. Van elke fractie werd 40 μ L op de gel geladen.

De elektroforese werd uitgevoerd in twee stappen:

- 10 minuten bij 80 V
- gevolgd door 1,5 uur bij 150 V

Na de run werd de gel gekleurd met InstantBlue Coomassie bij kamertemperatuur en vervolgens overnacht ontkleurd met Milli-Q water.

De gel werd nadien geanalyseerd met de Amersham Imager 680 via colorimetrische transilluminatie.

9.7 TESTLABELING VAN THP-T-SORTAG MET ^{68}Ga

9.7.1 MATERIALEN EN METHODEN

9.7.1.1 BEREIDING BUFFERS

De 0,5 M natriumcarbonaatbuffer (pH 8,5) werd reeds bereid voor het conjugatie-experiment. Daarnaast werd een 2X PBS injectiebuffer bereid met Fluka water. Hiervoor werd één PBS-tablet opgelost in 500 mL Fluka water.

9.7.1.2 TESTLABELING MET ^{68}Ga

Na SDS-PAGE-analyse werden geselecteerde fracties samengevoegd tot twee afzonderlijke T-SorTag-THP pools. De testlabeling werd vervolgens afzonderlijk uitgevoerd voor beide pools.

Voor elke testlabeling werd 10 μL van de gepoolde fractie gemengd met 40 μL 0,05 M natriumcarbonaatbuffer (pH 8,5, met Tween-20). Vervolgens werd 50 μL geëluëerd ^{68}Ga uit de Ge/Ga-generator (Galli Eo, IRE ELIT) toegevoegd, steeds in deze volgorde. Het totale reactiemengsel bedroeg 100 μL . Het reactiemengsel werd gedurende ongeveer 10 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur.

SEC-analyse

Door middel van SEC werd nagegaan of ^{68}Ga succesvol gebonden was aan het THP-T-SorTag-conjugaat of nog vrij aanwezig was in oplossing.

Aangezien de activiteit van het reactiemengsel te hoog was voor directe injectie op het SEC-systeem, werd een verdunning uitgevoerd door 10 μL reactiemengsel te mengen met 90 μL injectiebuffer. Van dit verdunde staal werd vervolgens 100 μL geïnjecteerd op het Shimadzu HPLC-systeem uitgerust met een Superdex™ 75 Increase 5/150 GL kolom.

Daarnaast werd voor pool 1 een bijkomend “cold” referentiestaal voorbereid door een sterk verdunde oplossing van ongelabeld T-SorTag-THP te analyseren via SEC. Dit diende als referentie om de elutietijd van het natieve eiwit te vergelijken met de radioactieve fracties.

iTLC-analyse

Parallel werd voor beide pools een kwaliteitscontrole uitgevoerd via iTLC (instant dunnelaagchromatografie). Hiervoor werd ongeveer 2 μL van het reactiemengsel aangebracht op een iTLC-strip. De analyse werd uitgevoerd met 0,1 M natriumcitraatbuffer (pH 4,7) als mobiele fase.

Op basis van de chromatografische analyses werd nagegaan in welke mate ^{68}Ga succesvol gebonden was aan het THP-T-SorTag-conjugaat en of vrij ^{68}Ga of aggregatie nog aanwezig waren.

9.8 CELBINDINGSSTUDIE VAN ^{68}Ga -THP-T-SORTAG OP MC38-CELLEN

9.8.1 MATERIALEN EN METHODEN

9.8.1.1 VOORBEREIDING VAN MC38-CELLEN

Eén dag voor de celbindingsstudie werden MC38-cellen uitgezaaid in 6-well platen. De cellen werden eerst losgemaakt, verdund met trypaanblauw en vervolgens geteld met behulp van een Neubauer telkamer. Op basis van deze telling werd de celsuspensie verdund tot een eindconcentratie van 200.000 cellen per well.

Per well werd 200.000 cellen van de celsuspensie toegevoegd, samen met 2 mL medium. In totaal werden drie afzonderlijke 6-well platen voorbereid zodat alle pH-condities (pH 7,5; 7,0; 6,5; 6,0 en 5,5), telkens in triplicaat, samen met een blanco zonder probe konden worden onderzocht. De platen werden vervolgens overnacht geïncubeerd.

9.8.1.2 RADIOLABELING VAN THP-T-SORTAG MET ^{68}Ga

Voorafgaand aan de celbindingsstudie werd het THP-T-SorTag-conjugaat radiogelabeld met ^{68}Ga . Hiervoor werd een PD-10 kolom vooraf geëquilibreerd met 2X PBS-buffer aangevuld met 0,1% Tween-20.

Vervolgens werd ^{68}Ga geëluëerd uit de Ge/Ga-generator met behulp van een metaalvrije spuit. Het eluens bevatte een activiteit van 772 MBq.

Voor de radiolabelingsreactie werd 90,2 μL THP-T-SorTag gemengd met 360,8 μL 0,5 M natriumcarbonaatbuffer (pH 8,5), gevolgd door toevoeging van 451 μL ^{68}Ga -eluens. Het reactiemengsel werd gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd.

Na incubatie werd het volledige reactiemengsel gezuiverd via de PD-10 kolom. Tijdens deze zuiveringsstap werden acht fracties van telkens ongeveer 500 μL verzameld.

De radioactiviteit van elke fractie werd afzonderlijk gemeten (Tabel 1) om de fractie met de hoogste hoeveelheid radiogelabeld eiwit te selecteren. Op basis van deze analyse werd fractie 4 gekozen voor verdere experimenten, aangezien deze de hoogste activiteit bevatte.

Tabel 1. Activiteit van opgevangen fracties met PD-10

Fractie	Activiteit (MBq)
Flow-through	0,012
1	0,012
2	0,029
3	22,8
4	134
5	59,6
6	5,53
7	3,41
8	1,33

Voor kwaliteitscontrole werd fractie 4 verdund door 7,5 μL van de fractie aan te vullen met buffer tot een totaalvolume van 100 μL . Van deze verdunning werd een deel gebruikt voor radio-SEC-analyse op de Shimadzu HPLC en een kleine hoeveelheid werd aangebracht op een iTLC-strip. Daarnaast werd ook een staal van het natieve, ongelabelde eiwit geïnjecteerd als referentie om de normale elutietijd van het eiwit te bepalen.

9.8.1.3 UITVOERING VAN CELBINDINGSSTUDIE

Na de radiolabeling werden de eerder uitgezaaide MC38-cellen voorbereid voor de bindingsstudie. Het oorspronkelijke medium werd verwijderd en de cellen werden

gewassen met PBS. Vervolgens werd per pH-conditie 750 μ L van de overeenkomstige buffer toegevoegd aan de drie bijhorende wells.

Daarna werd aan elke well ongeveer 50 μ L van fractie 4 (onverdund) toegevoegd. De blanco wells ontvingen geen radiogelabeld construct. De platen werden vervolgens gedurende één uur bij kamertemperatuur geïncubeerd om binding van het construct aan de cellen mogelijk te maken.

Na incubatie werd het supernatans zorgvuldig verwijderd en afzonderlijk verzameld in FACS-tubes voor latere analyse met de gamma-counter. De cellen werden vervolgens gelyseerd door toevoeging van 1 M NaOH. Na enkele minuten werd elke well bijkomend gespoeld met PBS, waarna ook deze oplossing met gelyseerde cellen werd overgebracht naar afzonderlijke FACS-tubes.

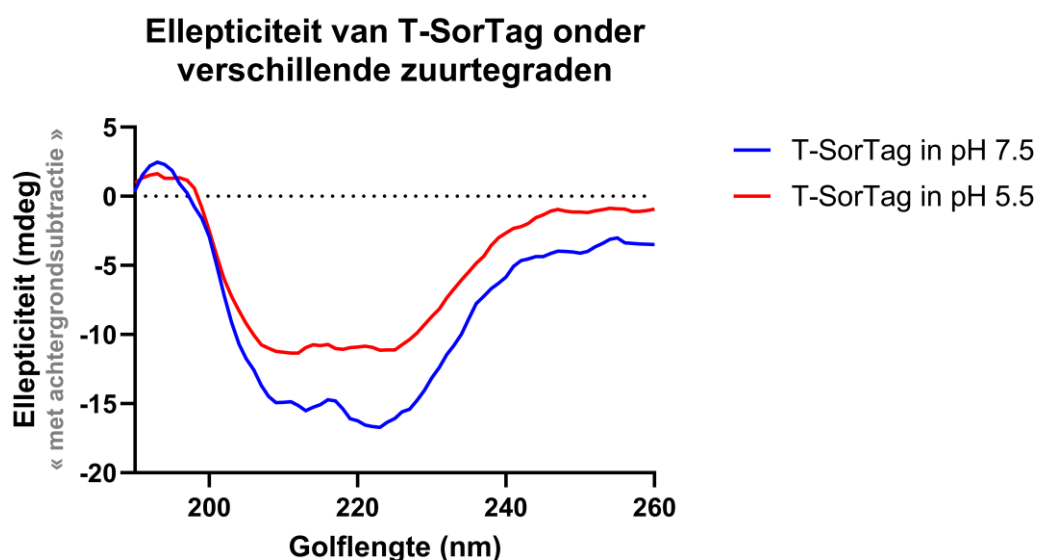
Zowel de FACS-tubes met supernatans als de tubes met cellysaten werden afzonderlijk geanalyseerd m.b.v. een gamma-counter. Daarnaast werden blanco's, achtergrondcontroles en standaarden (10 μ L van fractie 4) opgenomen om de meetresultaten correct te kunnen interpreteren.

10 RESULTATEN

10.1 CD-METING VAN ZUURGEVOELIG EIWIT T-SORTAG ONDER VERANDERENDE PH

Om de invloed van de pH op T-SorTag te onderzoeken, werd een circulair dichroïsmespectrum opgenomen bij pH 7,5 en pH 5,5 (Figuur 4). Beide spectra vertonen een gelijkaardig verloop, met negatieve ellipticiteit tussen ongeveer 200 en 260 nm. De ellipticiteit is een maat voor het verschil in absorptie van links- en rechts-circulair gepolariseerd licht door een eiwit.

Bij pH 7,5 is de negatieve ellipticiteit duidelijk sterker, met een minimum rond 220 nm. Bij pH 5,5 is dit minimum minder uitgesproken.



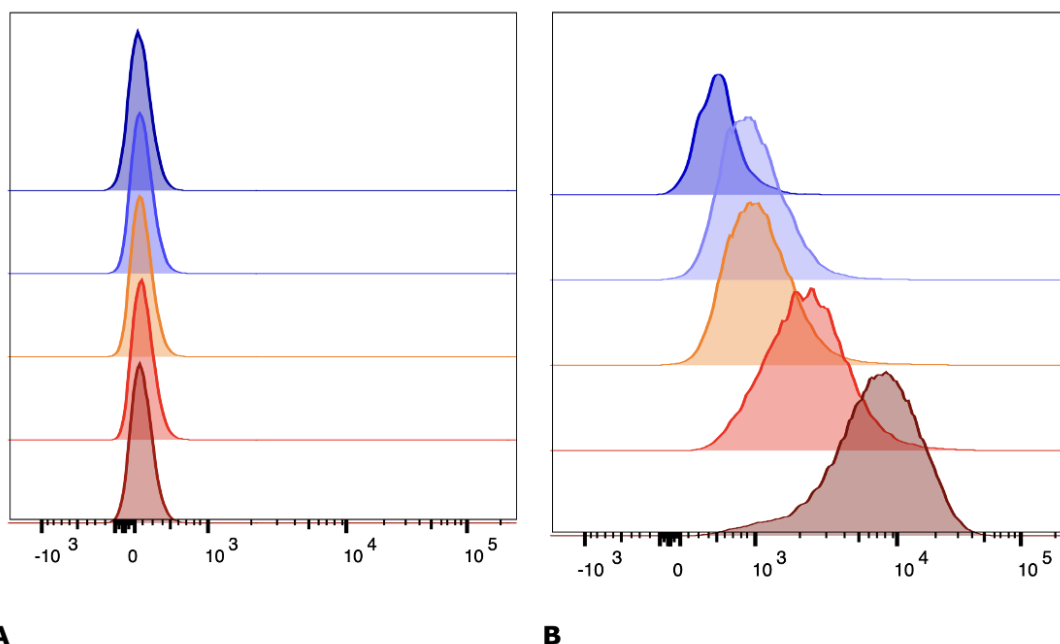
Figuur 4. Circular dichroïsmespectra van T-SorTag bij neutrale (pH 7,5) en zure (pH 5,5) omstandigheden

10.2 FLOWCYTOMETRISCHE ANALYSE VAN DE PH-AFHANKELIJKE BINDING VAN T-SORTAG AAN MC38-CELLEN

10.2.1 FLUORESCENTIEGEBASSEERDE BEOORDELING VAN PH-AFHANKELIJKE T-SORTAG-BINDING

Om na te gaan of T-SorTag sterker bindt aan MC38-cellen bij een lagere pH, werd een flowcytometrische analyse uitgevoerd (Figuur 5). Het fluorescentiesignaal op de x-as geeft weer hoeveel antilichaamsignaal per cel wordt gemeten.

De isotypecontrole werd gebruikt om het achtergrondsignaal en de niet-specifieke binding te controleren. In de isotypecontrole bleven de fluorescentiepieken bij alle pH-waarden laag en dicht bij elkaar (Figuur 5A). Bij detectie met anti-HisTag werd een duidelijke verschuiving naar rechts waargenomen, naarmate de pH daalde (Figuur 5B). Deze verschuiving was het sterkst zichtbaar bij pH 5,5.



Figuur 5. Histogrammen van binding van T-SorTag aan MC38-cellen bij verschillende pH-condities, verkregen na flowcytometrische analyse met (A) IC en (B) anti-His-tag

A		B	
	Sample Name		Sample Name
■	T-SorTag pH7p5 IC_G1_G01_018.fcs	■	T-SorTag pH7p5 anti-His_C1_C01_003.fcs
■	T-SorTag pH7p0 IC_G2_G02_021.fcs	■	T-SorTag pH7p0 anti-His_C2_C02_006.fcs
■	T-SorTag pH6p5 IC_G3_G03_024.fcs	■	T-SorTag pH6p5 anti-His_C3_C03_009.fcs
■	T-SorTag pH6p0 IC_E4_E04_025.fcs	■	T-SorTag pH6p0 anti-His_A4_A04_010.fcs
■	T-SorTag pH5p5 IC_F5_F05_029.fcs	■	T-SorTag pH5p5 anti-His_B5_B05_014.fcs

10.2.2 KWANTIFICATIE VAN PH-AFHANKELIJKE BINDING OP BASIS VAN MFI-WAARDEN

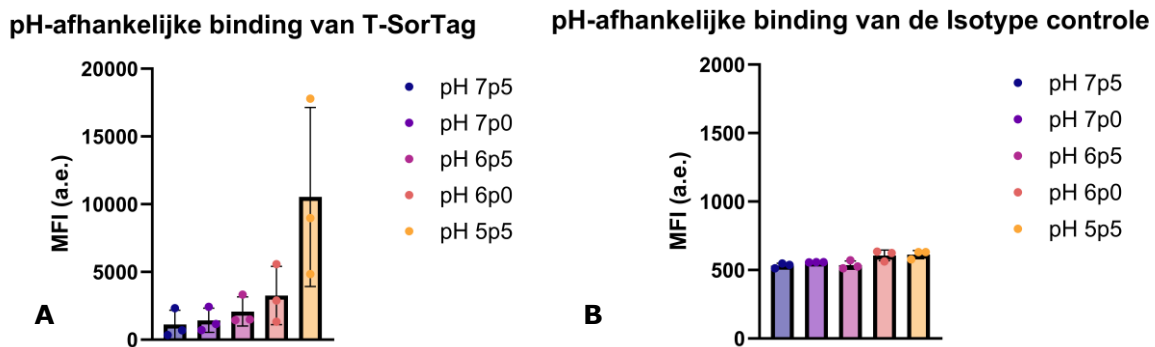
Om de pH-afhankelijke binding van T-SorTag aan MC38-cellen verder te vergelijken werden de MFI-waarden, voor zowel T-SorTag als de IC onder verschillende pH-condities, bepaald (Figuur 6). De MFI geeft het gemiddelde fluorescentiesignaal per cel weer en wordt gebruikt om de mate van detectie tussen de verschillende pH-condities te vergelijken.

Voor T-SorTag (Figuur 6A) bleef de MFI van pH 7,5 tot pH 6,0 relatief beperkt stijgen. Bij pH 5,5 werd echter een duidelijke sterke toename waargenomen, met veel hogere waarden dan bij de andere pH-condities. Binnen deze laagste pH-conditie was ook een grote spreiding zichtbaar tussen de drie metingen.

Voor de IC (Figuur 6B) werd eveneens een lichte stijging van de MFI waargenomen naarmate de pH daalde, maar deze toename verliep beperkter dan bij T-SorTa. Ook bij de IC werd de hoogste waarde gemeten bij pH 5,5, maar de absolute MFI-waarden bleven

over alle pH-condities duidelijk lager dan die van T-SorTag. Terwijl T-SorTag bij pH 5,5 waarden rond 10000 bereikte, bleef de IC beperkt tot ongeveer 1500.

Voor de IC (Figuur 6B) bleven de MFI-waarden bij de verschillende pH-condities vrij constant. Er was geen duidelijke pH-afhankelijke stijging zichtbaar, aangezien alle waarden ongeveer tussen 500 en 600 a.e. lagen. Ook bij de laagste pH-waarde bleef het IC-signaal beperkt.



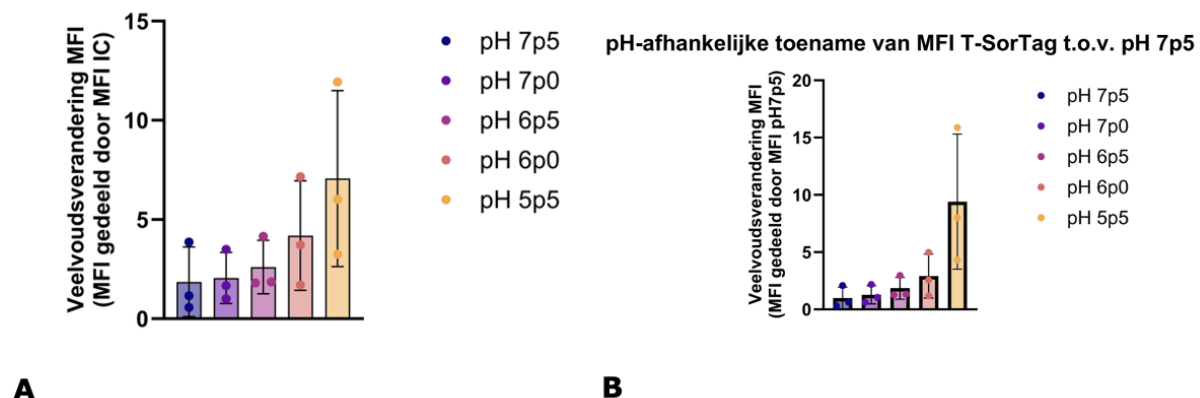
Figuur 6. Vergelijking van de gemiddelde fluorescentie-intensiteit (MFI) - waarden van de pH-afhankelijke binding van T-SorTag (A) en de IC (B) aan MC38-cellen bij verschillende pH-condities

10.2.3 RELATIEVE TOENAME VAN T-SORTAG-BINDING VIA FOLD CHANGE-ANALYSE

De fold change of veelvoudsverandering van de MFI werd berekend ten opzichte van zowel de IC als pH 7,5 (Figuur 7). De veelvoudsverandering geeft weer hoeveel keer het fluorescentiesignaal verandert of toeneemt ten opzichte van een referentieconditie (pH 7,5).

Bij vergelijking met de IC (Figuur 7A) nam de veelvoudsverandering van T-SorTag geleidelijk toe naarmate de pH daalde. De hoogste veelvoudsverandering werd opnieuw waargenomen bij pH 5,5; hoewel hierbij ook een duidelijke spreiding zichtbaar was.

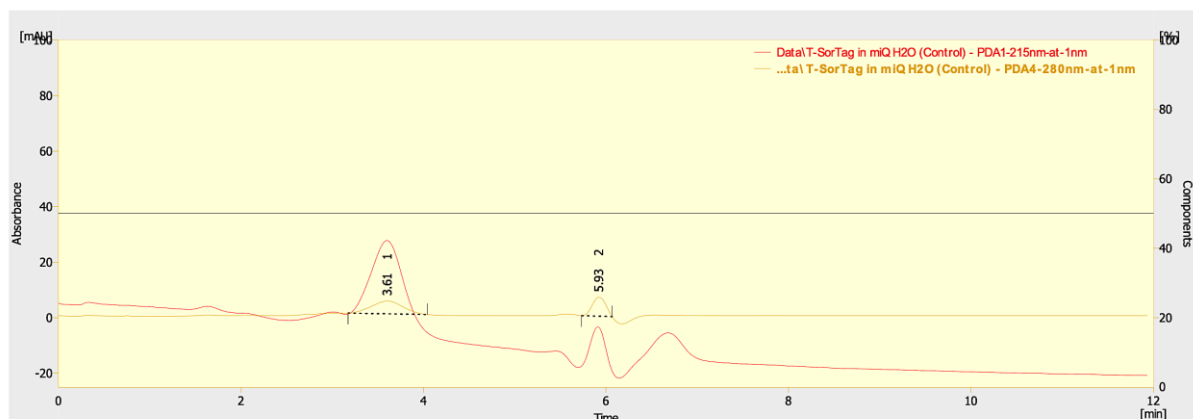
Wanneer pH 7,5 als referentieconditie werd gebruikt (Figuur 7B), bleef de veelvoudsverandering beperkt bij pH 7,0 en pH 6,5, gevolgd door een langzame stijging bij pH 6,0 en vooral bij pH 5,5. Hoewel de grootste toename zichtbaar was bij pH 5,5, toonde de statistische analyse geen significant verschil ten opzichte van pH 7.5 (Bijlage 5).



Figuur 7. Veelvoudsverandering (fold change) van MFI van T-SorTag bij verschillende pH-condities ten opzichte van IC (A) en pH 7,5 (B) als referentieconditie

10.3 CONJUGATIE VAN T-SORTAG MET NCS-THP

Tijdens de eerste conjugatie-experimenten werd vastgesteld dat het chromatografisch profiel van het reactiemengsel meerdere elutiepieken bevatte. Ook het native T-SorTag-eiwit zelf vertoonde reeds meerdere signalen in het SEC-profiel.



Figuur 8. SEC-analyse van natief T-SorTag ter evaluatie van het initiële eiwitprofiel voor conjugatie

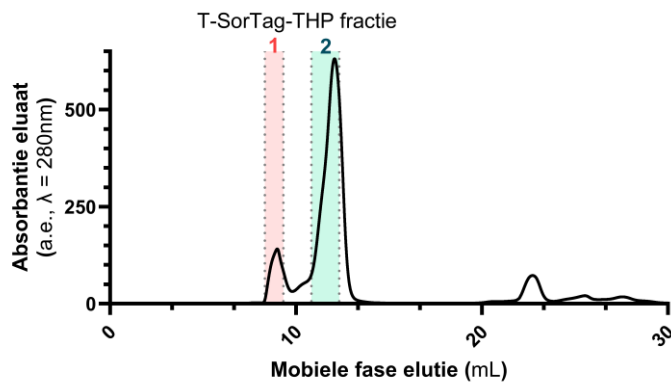
Om de conjugatie verder te optimaliseren werden verschillende niet-radioactieve simulatie-experimenten uitgevoerd waarbij de invloed van pH op het conjugatieprofiel werd geëvalueerd. Hiervoor werden conjugatiereacties uitgevoerd bij pH 7,5, pH 8,0 en pH 8,5. In alle condities bleven meerdere pieken zichtbaar in het chromatogram (Bijlage 1, 2 en 3)

Bij vergelijking van de verschillende pH-condities werd vastgesteld dat pH 8,0 een relatief stabiel en beter interpreteerbaar profiel opleverde, met een duidelijkere scheiding tussen de dominante pieken. Daarnaast werden bijkomende optimalisaties uitgevoerd, waaronder incubatie gedurende de nacht bij 37°C, toevoeging van Tween-20 aan de mobiele fase en verhoging van de eiwitconcentratie.

Na verdere optimalisatie werd een verbeterd SEC-opzuiveringsprofiel bekomen (Figuur 9). Hierbij werden twee dominante pieken waargenomen die duidelijker van elkaar gescheiden waren dan in de initiële experimenten. Op basis van SDS-PAGE-analyse werden specifieke fracties geselecteerd voor verdere testlabeling. Fracties 1 en 2 werden samengevoegd tot T-SorTag-THP pool 1 (rood gebied op Figuur 9), terwijl fracties 6, 7, 8 en 9 werden

samen gevoegd tot T-SorTag-THP pool 2 (groen gebied op Figuur 9). De latere kleinere pieken in het chromatogram werden niet verder geselecteerd.

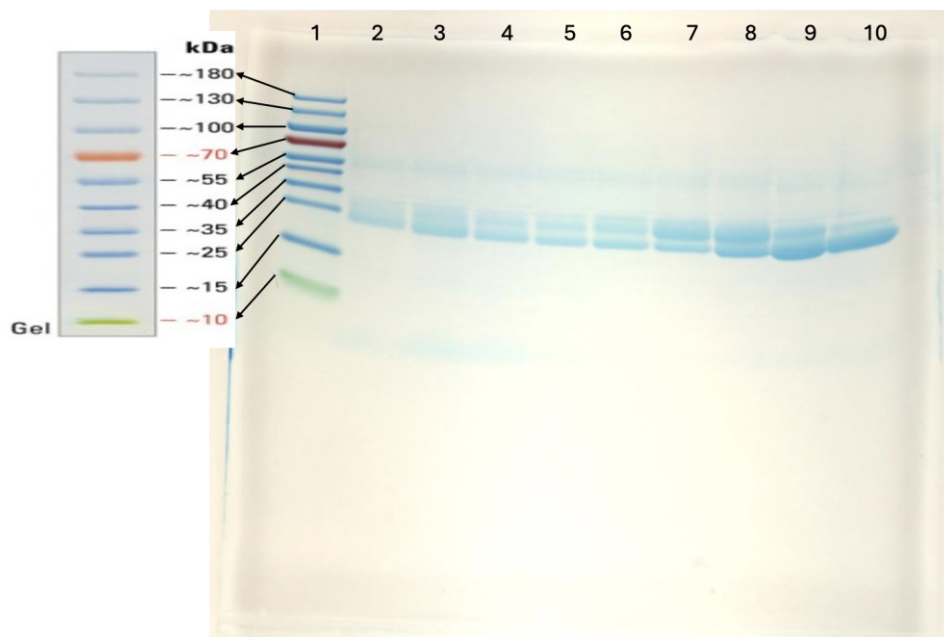
Opzuiveringsprofiel van conjugatiemengsel T-SorTag + NCS-THP



Figuur 9. Geoptimaliseerd SEC-opzuiveringsprofiel van het conjugatiemengsel T-SorTag-NCS-THP met aanduiding van de geselecteerde fracties voor pool 1 en pool 2

10.4 SDS-PAGE VAN OPGEZUIVERDE EIWIT-FRACTIES

Om te bepalen in welke van de geselecteerde fracties T-SorTag aanwezig was, werden de negen fracties geanalyseerd via SDS-PAGE om de grootte te controleren.



Figuur 10. SDS-PAGE-analyse van 9 SEC-fracties verkregen na geoptimaliseerde conjugatie van T-SorTag met NCS-THP. Laan 1 bevat de PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific), laan 2 is fractie 1, laan 3 is fractie 2, laan 4 is fractie 3, laan 5 is fractie 4, laan 6 is fractie 5, laan 7 is fractie 6, laan 8 is fractie 7, laan 9 is fractie 8 en laan 10 is fractie 9.

In alle fracties werd een duidelijke dominante band waargenomen met een vergelijkbare migratiehoogte, overeenkomend met een geschatte moleculaire massa van ongeveer 22,7 kDa.

Fracties 1 en 2 vertoonden voornamelijk één duidelijke, relatief zuivere band. Vanaf fractie 3 werd een tweede band zichtbaar.

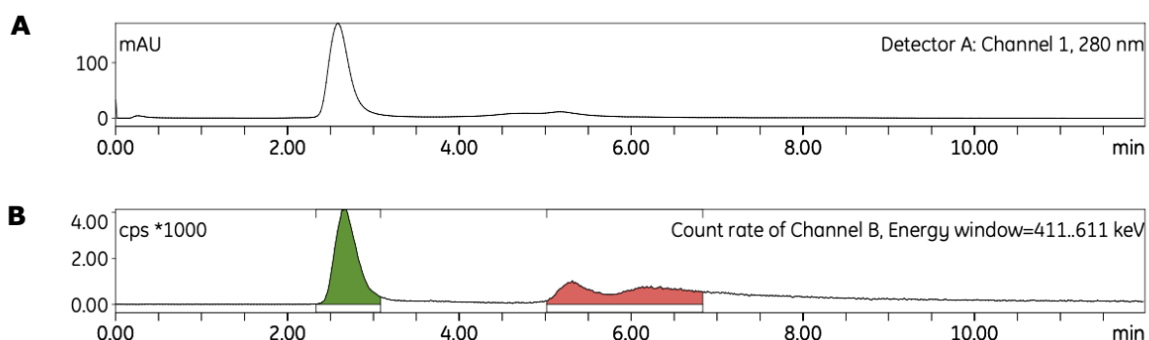
Daarnaast werd een licht "smiley-effect" waargenomen over de gel, waarbij de banden licht gebogen migreerden. Dit fenomeen beïnvloedde de interpretatie beperkt, maar veranderde de algemene bandpatronen niet veel.

10.5 TESTLABELING VAN THP-T-SORTAG MET ^{68}Ga

De testlabeling van het T-SorTag-THP-conjugaat met ^{68}Ga werd uitgevoerd en de resultaten werden geanalyseerd via SEC (en iTLC).

Figuur 11 toont de chromatogrammen van de testlabeling van pool 1 (fractie 1 en 2) van T-SorTag-THP. In het chromatogram van 280 nm (Figuur 11A) is een piek zichtbaar op ongeveer 2,5 minuten. Deze piek komt ook overeen met de elutietijd van het natief eiwit (Figuur 12). In het onderste chromatogram (Figuur 11B), die de radioactiviteit meet in het energievenster tussen 411-611 keV, is ook dezelfde piek (groen gebied) zichtbaar met een activiteit van ongeveer 53% van de totale gemeten radioactiviteit die binnen dit energievenster vallen.

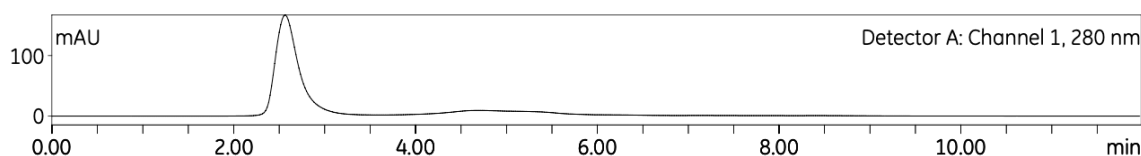
Een tweede piek wordt waargenomen vanaf ongeveer 5,5 minuten in zowel het 280 nm chromatogram als in het chromatogram die de radioactiviteit meet (rood gebied, Figuur 11B). De activiteit van deze piek is net iets lager (ongeveer 47%) dan de eerste piek, maar over het algemeen quasi verdeeld.



Figuur 11. SEC-chromatogrammen van pool 1 na radiolabeling van het T-SorTag-THP-conjugaat met ^{68}Ga (geen opzuivering uitgevoerd)

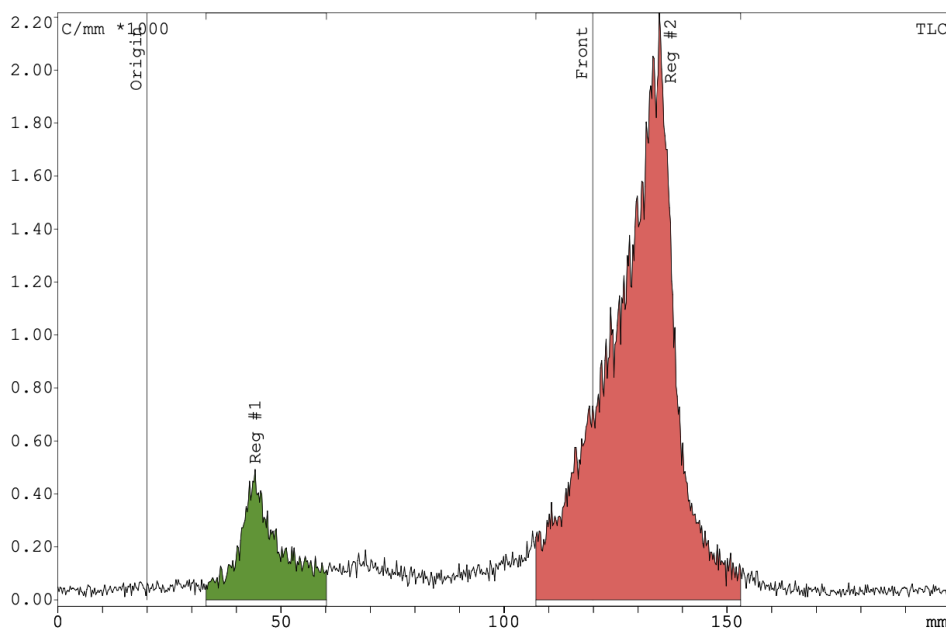
Tabel 2. Relatieve piekoppervlakten van de radioactieve fracties in pool 1

Integration Count rate of Channel B, Energy window=411..611 keV				
Substance	R/T min	Type	Area Counts	%Area %
Reg #1	2.67	DD(M)	76651.00	52.99
Reg #2	5.32	DD(M)	67996.00	47.01
Sum in ROI	-	-	144647.00	100.00
Area (total)	-	-	235476.00	-
Ext. BKG.	-	-	0.00 cps	-



Figuur 12. SEC-chromatogram van het natieve eiwit gebruikt als referentie voor pool 1

De iTLC-analyse (Figuur 13) toont vooral dat er veel vrij ^{68}Ga aanwezig was in het reactiemengsel, terwijl de SEC-analyse een bijna gelijke verdeling van radioactiviteit toonde over beide pieken.



Figuur 13. iTLC-analyse van pool 1 na radiolabeling met ^{68}Ga

10.6 CELBINDINGSSTUDIE VAN ^{68}Ga -THP-T-SORTAG AAN MC38-CELLEN VIA GAMMA-COUNTING

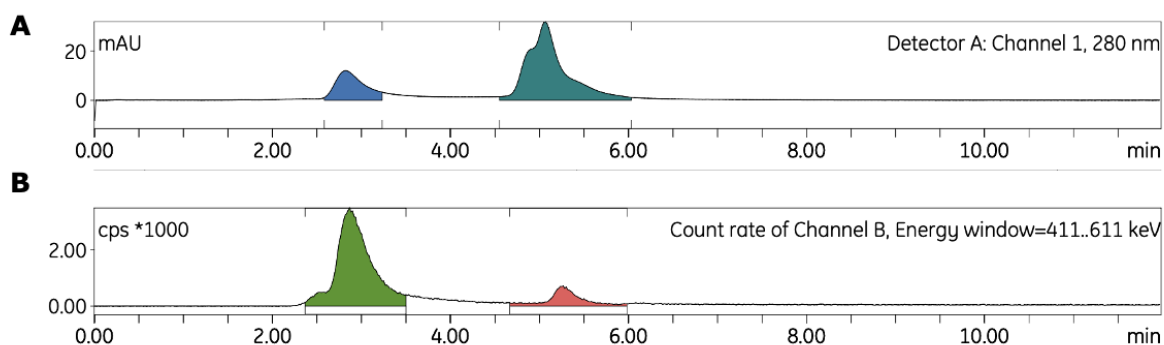
10.6.1 RADIOLABELINGSSTAP

Voorafgaand aan de celbindingsstudie werd het THP-T-SorTag-conjugaat radiogelabeld met ^{68}Ga en gezuiverd via PD-10 size-exclusion chromatografie. Fractie 4, die de hoogste radioactiviteit bevatte (134 MBq), werd geselecteerd voor verdere analyse met SEC en iTLC.

De SEC-analyse toonde twee afzonderlijke pieken in zowel het UV-sigitaal (Figuur 14A) als het radioactieve signaal (Figuur 14B). Bij detectie op 280 nm, wat voornamelijk overeenkomt met eiwitabsorptie, werd een kleinere piek waargenomen rond 2,8–3,0 minuten en een grotere piek rond 5,0–5,5 minuten. Volgens de integratiegegevens vertegenwoordigde de eerste piek 23,29% van het totale UV-sigitaal, terwijl de tweede piek 76,71% was.

Bij detectie van radioactiviteit binnen het energieraam van 411–611 keV (Figuur 14B) werd eveneens een vroege piek rond 2,87 minuten en een tweede piek rond 5,27 minuten

waargenomen. De eerste piek bevatte echter het grootste deel van de radioactiviteit, namelijk 84,32%, terwijl de tweede piek slechts 15,68% van de totale radioactiviteit bevatte.



Figuur 14. SEC-analyse van fractie 4 na PD-10 zuivering van ^{68}Ga -THP-T-SorTag

Tabel 3. Integratie van het UV-signaal bij 280 nm van fractie 4 na PD-10-zuivering

Integration Detector A: Channel 1, 280 nm				
Substance	R/T min	Type	Area mAU*min	%Area %
Reg #1	2.82	DD(M)	270.4020	23.29
Reg #2	5.07	DD(M)	890.7144	76.71
Sum in ROI	-	-	1161.1164	100.00
Area (total)	-	-	1379.0436	-

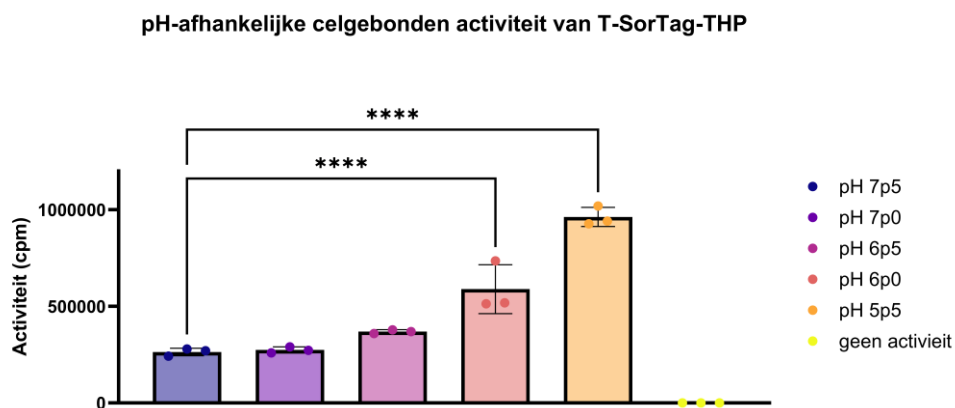
Tabel 4. Relatieve verdeling van de radioactiviteit in fractie 4 na PD-10-zuivering bepaald via SEC

Integration Count rate of Channel B, Energy window=411..611 keV				
Substance	R/T min	Type	Area Counts	%Area %
Reg #1	2.87	DD(M)	91252.00	84.32
Reg #2	5.27	DD(M)	16968.00	15.68
Sum in ROI	-	-	108220.00	100.00
Area (total)	-	-	143835.00	-
Ext. BKG.	-	-	0.00 cps	-

10.6.2 CELBINDINGSSTUDIE

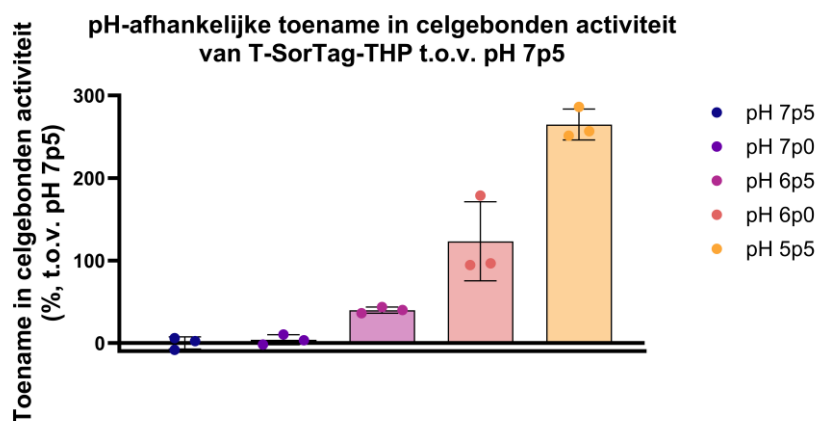
Tijdens de eerste gamma-countermeting van de supernatansfracties bleek de radioactiviteit aanvankelijk te hoog, wat leidde tot overgesatureerde signalen. Na ongeveer twee uur wachten was de radioactiviteit voldoende gedaald om de metingen uit te voeren.

De celbindingsstudie toonde een pH-afhankelijk verschil in celgebonden radioactiviteit van ^{68}Ga -THP-T-SorTag aan MC38-cellen. Bij pH 7,5 en pH 7,0 werd de laagste activiteit in het cellysaat gemeten (Figuur 15). Bij verdere daling van de pH nam de gemeten activiteit progressief toe. Vanaf pH 6,5 werd een eerste stijging zichtbaar, gevolgd door hogere waarden bij pH 6,0 en de hoogste activiteit bij pH 5,5.



Figuur 15. pH-afhankelijke celgebonden radioactiviteit van ^{68}Ga -THP-T-SorTag aan MC38-cellen

Daarnaast werd de celgebonden activiteit genormaliseerd (Figuur 16) ten opzichte van pH 7,5 om de relatieve stijging in binding duidelijker weer te geven. Hierbij werd aangetoond dat de binding bij pH 6,5 ongeveer 40% toenam, bij pH 6,0 ongeveer 120% steeg en bij pH 5,5 een toename van ongeveer 260% bereikte ten opzichte van pH 7,5.



Figuur 16. Relatieve pH-afhankelijke toename in celgebonden activiteit van ^{68}Ga -THP-T-SorTag ten opzichte van pH 7,5.

11 DISCUSSIE

11.1 CD-METING VAN ZUURGEVOELIG EIWIJ T-SORTAG ONDER VERANDERENDE PH

Het minder uitgesproken minimum rond 220 nm bij pH 5,5 wijst erop dat de structuur van T-SorTag verandert naarmate de omgeving zuurder wordt. Dit komt overeen met wat er werd verwacht, omdat het eiwit bedoeld is om te reageren op een zure omgeving (zoals in solide tumoren). Zo beschreven (Boyken et al., 2019) dat ontworpen pH-responsieve eiwitten bij lage pH grootschalige conformationele veranderingen kunnen ondergaan, en dat deze veranderingen met CD-metingen rond 222 nm kunnen worden opgevolgd.

Tegelijk blijft het algemeen verloop van het spectrum bij beide pH-waarden gelijkaardig. Dit toont aan dat T-SorTag niet volledig zijn structuur verliest bij zure pH, maar eerder een pH-afhankelijke structurele verandering ondergaat. Dat is belangrijk, omdat een bruikbaar eiwit voor beeldvorming voldoende stabiel moet blijven, maar tegelijk gevoelig moet kunnen reageren op de zuurtegraad.

Alleen op basis van CD kan nog niet besloten worden of deze structurele verandering ook leidt tot betere binding aan tumorcellen.

11.2 FLOWCYTOMETRISCHE ANALYSE VAN DE PH-AFHANKELIJKE BINDING VAN T-SORTAG AAN MC38-CELLEN

11.2.1 INTERPRETATIE VAN HISTOGRAMVERSCHUIVINGEN

Bij flowcytometrie betekent een verschuiving van de piek naar rechts dat er een hoger fluorescentiesignaal wordt gemeten (Nakhjavani et al., 2022). In dit experiment ontstaat dat signaal doordat het fluorescent gelabelde anti-His-tag antilichaam bindt aan de His-tag van celgebonden T-SorTag. Een hoger signaal wijst dus op meer detectie van T-SorTag op de MC38-cellen.

In Figuur 2B is te zien dat de pieken bij lagere pH-waarden duidelijk naar rechts verschuiven. Dit is het sterkst zichtbaar bij pH 5,5. Dit betekent dat er bij zure pH meer T-SorTag op de cellen wordt gedetecteerd dan bij een hogere pH. De isotypecontrole in Figuur 2A blijft bij alle pH-waarden laag en vertoont nauwelijks verschuiving. Dit toont aan dat het achtergrondsignaal beperkt is. Daardoor kan de duidelijke rechtsverschuiving in Figuur 2B gekoppeld worden aan T-SorTag-detectie.

Een beperking is dat deze figuur vooral een eerste (visuele) indruk geeft. Verdere analyse is nodig om het verschil tussen de verschillende pH-condities duidelijker te bepalen.

11.2.2 INTERPRETATIE VAN MFI-ANALYSE EN VERGELIJKING MET ISOTYPECONTROLE

De beperkte stijging van de MFI tussen pH 7,5 en pH 6,0 toont aan dat T-SorTag binnen dit pH-bereik slechts geleidelijk toeneemt op veranderingen in zuurtegraad. De sterke toename bij pH 5,5 daarentegen, geeft aan dat het eiwit vooral bij sterk zure

omstandigheden een meer uitgesproken structurele of bindingsverandering ondergaat. Dit sluit aan bij de eerdere CD-resultaten, waarin eveneens werd aangetoond dat de structuur van T-SorTag verandert na verzuring.

De IC vertoonde over de verschillende pH-condities geen duidelijke pH-afhankelijke stijging. De MFI-waarden bleven relatief constant en duidelijk lager (rond 500-600 a.e.) dan het signaal bij T-SorTag. Omdat de IC stabiel bleef (Nakhjavani et al., 2022), kan de sterke toename bij T-SorTag niet worden verklaard door achtergrondsignaal of niet-specifieke binding. Dit wijst eerder op een pH-afhankelijke detectie of binding van T-SorTag zelf.

De uitgesproken stijging van T-SorTag bij pH 5,5 ondersteunt dus het idee dat dit construct effectief pH-gevoelige eigenschappen bezit. Tegelijk moeten de resultaten kritisch bekeken worden, aangezien pH 5,5 relatief extreem zuur is en mogelijk minder representatief voor het gemiddelde extracellulaire tumormilieau. Bovendien wijst de grote spreiding van metingen binnen deze conditie op verhoogde variabiliteit, wat bijkomende bevestiging vraagt.

Samengevat ondersteunen deze resultaten dat T-SorTag sterker reageert onder zure omstandigheden, maar dat experimentele variatie mee in rekening moeten worden gebracht bij verdere interpretatie.

Tabel 5. Overzicht van de gemiddelde MFI-waarden van T-SorTag/anti-His-tag en IC bij verschillende pH-condities gebaseerd op drie onafhankelijke experimenten met telkens drie herhalingen per pH-conditie

pH	Gemiddelde MFI T-SorTag/anti-His-tag	Gemiddelde MFI IC
7,5	1356,23	444,67
7,0	1983,01	487,61
6,5	3316,30	512,76
6,0	8134,08	532,92
5,5	14761,83	770,47

In deze tabel (5) werd per pH-conditie het gemiddelde genomen van de drie herhalingen binnen elk experiment (bijlage 4). Daarna werd het gemiddelde berekend van de drie onafhankelijke experimenten die werden uitgevoerd. Deze finale gemiddelde MFI-waarden werden gebruikt als basis voor de veelvoudsverandering-analyse. De tabel toont vooral aan dat het T-SorTag/anti-His-tag signaal hoger ligt dan de IC en algemeen toeneemt bij lagere pH.

11.2.3 INTERPRETATIE VAN VEELVOUDSVERANDERING-ANALYSE

Dit bevestigt dat de binding van T-SorTag over het algemeen toeneemt naarmate de omgeving zuurder wordt. Door de resultaten te normaliseren ten opzichte van referentiecondities wordt duidelijker zichtbaar dat de stijging van T-SorTag sterker is dan enkel op basis van achtergrondsignaal verwacht zou worden. Dus hoewel de IC ook licht stijgt bij lagere pH, is de stijging bij T-SorTag duidelijk sterker. Daardoor lijkt de verhoogde binding niet alleen door achtergrondsignaal te komen, maar ook door pH-afhankelijke binding van T-SorTag zelf.

De vergelijking met pH 7,5 toont daarnaast aan dat vooral sterk zure omstandigheden, zoals pH 5,5, leiden tot een uitgesproken toename in binding. Dit suggereert dat T-SorTag vooral onder sterk verzuurde omstandigheden maximaal reageert.

Toch blijft voorzichtigheid nodig, aangezien ook in deze analyse bij pH 5,5 de grootste spreiding zichtbaar is. Dit wijst op verhoogde variabiliteit binnen deze extreme conditie.

11.3 CONJUGATIE VAN T-SORTAG MET NCS-THP

De conjugatie van T-SorTag met NCS-THP bleek moeilijker dan verwacht. Reeds voor conjugatie vertoonde het natieve T-SorTag-eiwit meerdere pieken in het SEC-profiel, wat kan duiden op het feit dat het eiwit zelf al heterogeen of gedeeltelijk instabiel was. Dit kan mogelijks verklaard worden door structurele veranderingen die ontstaan tijdens herhaald invriezen en ontdooien van het eiwit.

Na conjugatie bleven meerdere elutiepieken aanwezig. Dit kan verschillende oorzaken hebben, waaronder: minder gecontroleerde conjugatie (Pometti et al., 2024), aanwezigheid van vrije of ongebonden chelator, vorming van aggregaten of degradatie van het eiwit. Daarnaast kan ook niet-specifieke interactie van het eiwit met oppervlakken of componenten van het chromatografisch systeem hebben gezorgd voor dit complex chromatografisch profiel.

De uitgevoerde optimalisaties hadden als doel de homogeniteit van het conjugatiemengsel te verbeteren. Variatie van de pH had slechts een beperkt effect op het uiteindelijke profiel, hoewel pH 8,0 een relatief stabielere scheiding opleverde in vergelijking met pH 7,5 en pH 8,5. Dit suggereert dat kleine veranderingen in pH van reactieve groepen slechts gedeeltelijk invloed hadden op de efficiëntie van de conjugatiereactie.

Daarnaast werd Tween-20 toegevoegd aan de mobiele fase om mogelijks "sticky" gedrag van het eiwit en niet-specifieke interacties te verminderen. Volgens (Chou et al., 2005) kan het gebruik van Tween-20 zorgen voor het beperken van eiwitaggregatie, omdat het eiwitten beschermt tegen schade door roeren en oppervlakcontact. Hierdoor blijft het eiwit stabiel en zal het minder snel ontvouwen en samenklonteren.

Ook werd de eiwitconcentratie verhoogd om de kans op effectieve conjugatie te verbeteren. Ondanks deze optimalisaties bleef volledige homogeniteit moeilijk te bereiken, wat erop kan wijzen dat T-SorTag gevoelig is voor structurele veranderingen onder de gebruikte reactieomstandigheden.

Toch resulteerden de finale geoptimaliseerde omstandigheden in een duidelijker en beter interpreteerbaar chromatografisch profiel, waardoor bruikbare fracties konden worden geselecteerd voor verdere SDS-PAGE-analyse en testlabeling.

11.4 SDS-PAGE VAN OPGEZUIVERDE EIWIT-FRACTIES

Alle bandjes hebben ongeveer dezelfde grootte (22,7 kDa). Dit komt overeen met de verwachte grootte van T-SorTag(-THP) zelf. Hieruit kon afgeleid worden dat het eiwit aanwezig was in alle geselecteerde fracties.

Fractie 1 en 2 en in baan 2 en 3 wezen op relatief zuivere fracties, omdat er slechts één band te zien is. Vanaf fractie 3 zijn er meerdere bandjes waar te nemen en kan dit wijzen op de aanwezigheid van contaminanten of andere eiwitvormen.

Het smiley-effect is waarschijnlijk het gevolg van verschillen in temperatuurverdeling of zoutconcentratie tijdens elektroforese. Aangezien de bandpatronen interpreteerbaar bleven, had dit niet veel impact op de selectie van bruikbare fracties.

Globaal toont de SDS-PAGE aan dat de optimalisaties in conjugatiecondities resulteerden in een verbetering, hoewel verdere verfijning noodzakelijk zou blijven om een volledig homogeen bandje te verkrijgen.

11.5 TESTLABELING VAN THP-T-SORTAG MET ^{68}Ga

De piek die vroeg in het chromatogram verschijnt bij 2,5 minuten, komt overeen met het profiel van het natief eiwit. Dit betekent hoogstwaarschijnlijk dat deze piek het gebonden eiwit is met ^{68}Ga . De overige activiteit die in de tweede piek te zien is, is mogelijks vrij gallium in oplossing door hoogstwaarschijnlijk degradatie van het eiwit dat heeft opgetreden.

De iTLC- en -SEC-resultaten gaven geen volledig overeenstemmend beeld. Bij radio-SEC was de radioactiviteit bijna gelijk verdeeld over twee pieken, terwijl iTLC vooral activiteit in de tweede piek liet zien. Dit verschil kan verklaard worden doordat beide technieken op een andere manier scheiden: SEC scheidt voornamelijk op basis van grootte, terwijl iTLC scheidt op basis van migratie op de strip. De tweede piek kan daarom wijzen op vrij ^{68}Ga , een kleiner gelabeld fragment of een afbraakproduct van het construct.

11.6 CELBINDINGSSTUDIE VAN ^{68}Ga -THP-T-SORTAG AAN MC38-CELLEN VIA GAMMA-COUNTING

11.6.1 RADIOLABELINGSSTAP

De SEC-resultaten tonen dat fractie 4 geen volledig zuiver staal was. Na vergelijking met het chromatografisch profiel van het natieve eiwit werd aangenomen dat de vroeg eluerende piek hoogstwaarschijnlijk overeenkomt met intact radiogelabeld THP-T-SorTag. De later eluerende piek komt vermoedelijk overeen met kleinere eiwitfragmenten of degradatieproducten. Dit past bij het principe van SEC, waarbij grotere structuren sneller elueren dan kleinere componenten.

Slechts een klein deel van het totale eiwit was aanwezig als intact THP-T-SorTag. Deze resultaten wijzen mogelijks op gedeeltelijke degradatie van het eiwit tijdens of na de radiolabeling. Een waarschijnlijke verklaring hiervoor is radiolyse, veroorzaakt door de hoge initiële activiteit van ^{68}Ga in een klein reactievolume.

Bij radioactief verval van ^{68}Ga wordt ioniserende straling gevormd. Deze straling kan reactieve zuurstofsoorten vormen, die eiwitten kunnen beschadigen of denatureren. Hierdoor kunnen kleinere fragmenten ontstaan die later elueren tijdens SEC-analyse.

In de literatuur (Baudhuin et al., 2021) wordt beschreven dat bij ^{68}Ga -labeling met hoge activiteit, radiolyse kan optreden door de vorming van vrije radicalen. Deze vrije radicalen kunnen leiden tot degradatie van de tracer, vooral bij eiwitachtige constructen. Antioxidanten of radicalenvangers, zoals ascorbinezuur of ethanol, kunnen deze vrije radicalen neutraliseren en zo de mate van radiolyse verminderen. Hierdoor kan de stabiliteit van radiogelabelde biomoleculen beter behouden blijven.

Ondanks de vermoedelijke gedeeltelijke degradatie werd fractie 4 verder gebruikt voor de celbindingsstudie. De reden hiervoor is dat het grootste deel van de radioactiviteit geassocieerd bleef met de vroeg eluerende piek, die vermoedelijk overeenkomt met het intacte radiogelabelde construct.

11.6.2 CELBINDINGSSTUDIE

De resultaten van de celbindingsstudie wijzen erop dat ^{68}Ga -THP-T-SorTag een verhoogde binding vertoont aan MC38-cellen bij lagere pH-waarden. Dit komt overeen met eerdere flowcytometrische resultaten, waarbij eveneens een hogere binding onder zure omstandigheden werd waargenomen.

Aangezien verzuring van de tumormicro-omgeving niet uitsluitend voorkomt bij colonkanker, zou T-SorTag in de toekomst ook geëvalueerd kunnen worden in andere tumorcellijnen die frequent gebruikt worden in de literatuur, zoals; 4T1-Luc (een murine borstkankercellijn met luciferase-expressie), LLC (Lewis Lung Carcinoma) bij longkanker en KPCY (een genetisch gemodificeerd muismodel voor pancreaskanker)/PDAC (pancreas ductaal adenocarcinoom)-modellen bij pancreaskanker (McDonald et al., 2019; A. Rahman et al., 2023; Suzuki et al., 2014).

De duidelijke stijging in celgebonden activiteit bij pH 6,0 en vooral pH 5,5 toont aan dat het pH-afhankelijke bindingsgedrag van T-SorTag grotendeels behouden bleef na conjugatie met THP en radiolabeling met ^{68}Ga .

De minder gunstige SEC-resultaten die eerder werden waargenomen, kunnen mogelijks verklaard worden door structurele instabiliteit van het eiwit. Frequent invriezen en ontdooien kan leiden tot gedeeltelijke denaturatie, aggregatievorming of afbraak van het eiwit. Dit kan mogelijks verklaren waarom tijdens eerdere conjugatie- en testlabelingexperimenten meerdere chromatografische pieken zichtbaar waren in plaats van één homogeen product.

Ondanks deze mogelijke instabiliteit, bleef een duidelijk pH-afhankelijk bindingsprofiel zichtbaar. Verdere optimalisatie van de eiwitstabiliteit en radiolabeling is aangeraden.

12 BESLUIT

In dit onderzoek werd nagegaan of het pH-afhankelijk eiwit T-SorTag potentieel kan dienen voor nucleaire beeldvorming van solide tumoren.

De resultaten tonen aan dat T-SorTag pH-afhankelijke eigenschappen bezit. Uit de CD-analyse bleek dat het eiwit bij zure pH een structurele verandering ondergaat. Daarnaast toonde de flowcytometrische analyse aan dat T-SorTag sterker werd gedetecteerd op MC38-cellen naarmate de pH daalde. Ook na conjugatie met THP-NCS en radiolabeling met ^{68}Ga bleef een pH-afhankelijk bindingsprofiel zichtbaar. In de celbindingsstudie werd namelijk een duidelijke toename van celgebonden activiteit waargenomen bij lagere pH-waarden, vooral bij pH 6,0 en pH 5,5.

Tegelijkertijd verliep de ontwikkeling van een stabiel en homogeen T-SorTag-THP-conjugaat moeilijker dan verwacht. Tijdens de conjugatie-, zuiverings- en radiolabelingsexperimenten werden meerdere chromatografische pieken waargenomen. Dit kan wijzen op aggregatie, gedeeltelijke degradatie, ongecontroleerde conjugatie of beperkte homogeniteit van het product zelf. Hierdoor waren verschillende optimalisatiestappen nodig en kon het oorspronkelijk geplande *in vivo* luik niet worden uitgevoerd. Hoewel het initiële onderzoeksplan beeldvormingsexperimenten in tumordragende muizen voorzag, was er binnen de beschikbare tijd geen voldoende stabiel en radiochemisch zuiver construct beschikbaar voor dierexperimenten.

Op basis van deze bachelorproef kan daarom nog niet besloten worden dat T-SorTag effectief inzetbaar is voor nucleaire beeldvorming van solide tumoren *in vivo*. De bekomen *in vitro* resultaten vormen wel een eerste aanwijzing dat T-SorTag, ook na radiolabeling, zijn pH-afhankelijke eigenschappen behoudt. Verder onderzoek is dus zinvol, maar verdere optimalisatie van de conjugatie, eiwitstabiliteit, radiolabeling en zuiverheid blijft noodzakelijk.

13 REFERENTIES

- Andreev, O. A., Dupuy, A. D., Segala, M., Sandugu, S., Serra, D. A., Chichester, C. O., Engelman, D. M., & Reshetnyak, Y. K. (2007). Mechanism and uses of a membrane peptide that targets tumors and other acidic tissues in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), 7893–7898. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702439104>
- Andreev, O. A., Engelman, D. M., & Reshetnyak, Y. K. (2010). pH-sensitive membrane peptides (pHLIPs) as a novel class of delivery agents. *Molecular Membrane Biology*, 27(7), 341. <https://doi.org/10.3109/09687688.2010.509285>
- Anemone, A., Consolino, L., Arena, F., Capozza, M., & Longo, D. L. (2019a). Imaging tumor acidosis: a survey of the available techniques for mapping in vivo tumor pH. *Cancer Metastasis Reviews*, 38(1–2), 25–49. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09782-9>
- Anemone, A., Consolino, L., Arena, F., Capozza, M., & Longo, D. L. (2019b). Imaging tumor acidosis: a survey of the available techniques for mapping in vivo tumor pH. *Cancer Metastasis Reviews*, 38(1–2), 25–49. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09782-9>
- Baudhuin, H., Cousaert, J., Vanwolleghem, P., Raes, G., Caveliers, V., Keyaerts, M., Lahoutte, T., & Xavier, C. (2021). 68Ga-labeling: Laying the foundation for an anti-radiolytic formulation for nota-sdab pet tracers. *Pharmaceuticals*, 14(5), 448. <https://doi.org/10.3390/PH14050448/S1>
- Bauer, D., Visca, H., Weerakkody, A., Carter, L. M., Samuels, Z., Kaminsky, S., Andreev, O. A., Reshetnyak, Y. K., & Lewis, J. S. (2022). PET Imaging of Acidic Tumor Environment With 89Zr-labeled pHLIP Probes. *Frontiers in Oncology*, 12, 882541. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.882541>
- Boyken, S. E., Benhaim, M. A., Busch, F., Jia, M., Bick, M. J., Choi, H., Klima, J. C., Chen, Z., Walkey, C., Mileant, A., Sahasrabudde, A., Wei, K. Y., Hodge, E. A., Byron, S., Quijano-Rubio, A., Sankaran, B., King, N. P., Lippincott-Schwartz, J., Wysocki, V. H., ... Baker, D. (2019). De novo design of tunable, pH-driven conformational changes. *Science*, 364(6442), 658–664. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAV7897;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
- Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. (2023). Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research*, 21(11), 1142–1147. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411/727658/AM/UPDATING-THE-DEFINITION-OF-CANCERUPDATING-THE>
- Choe, S., Bennett, M. J., Fujii, G., Curmi, P. M. G., Kantardjieff, K. A., Collier, R. J., & Eisenberg, D. (1992). The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature*, 357(6375), 216–222. <https://doi.org/10.1038/357216a0>
- Chou, D. K., Krishnamurthy, R., Randolph, T. W., Carpenter, J. F., & Manning, M. C. (2005). Effects of Tween 20® and Tween 80® on the stability of Albutropin

- during agitation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(6), 1368–1381.
<https://doi.org/10.1002/jps.20365>
- Demoin, D. W., Wyatt, L. C., Edwards, K. J., Abdel-Atti, D., Sarparanta, M., Pourat, J., Longo, V. A., Carlin, S. D., Engelman, D. M., Andreev, O. A., Reshetnyak, Y. K., Viola-Villegas, N., & Lewis, J. S. (2016). PET Imaging of Extracellular pH in Tumors with (64)Cu- and (18)F-Labeled pHLP Peptides: A Structure-Activity Optimization Study. *Bioconjugate Chemistry*, 27(9), 2014–2023.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00306>
- drs. T.W.H. Meijer, dr. P.N. Span, prof. dr. L-F de Geus-Oei, & prof. dr. J.H.A.M. Kaanders. (n.d.). *Tumormetabolisme en het Warburg-effect: translatie naar de klinische praktijk* - NTVO. Retrieved March 1, 2026, from
<https://www.ntvo.nl/journal-article/tumormetabolisme-en-het-warburg-effect-translatie-naar-de-klinische-praktijk/>
- Falnes, P., & Sandvig, K. (2000). Penetration of protein toxins into cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(4), 407–413. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00109-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00109-5)
- Gillies, R. J., Raghunand, N., Karczmar, G. S., & Bhujwalla, Z. M. (2002). MRI of the tumor microenvironment. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, 16(4), 430–450. <https://doi.org/10.1002/jmri.10181>
- Goedaardige of kwaadaardige tumor? - UMCG Protonentherapiecentrum. (n.d.). Retrieved March 1, 2026, from
<https://umcgprotonentherapiecentrum.nl/goedaardige-of-kwaadaardige-tumor/>
- Gorasso, V., Vandevijvere, S., Van der Heyden, J., Pelgrims, I., Hilderink, H., Nusselder, W., Demoury, C., Schmidt, M., Vansteelandt, S., De Smedt, D., & Devleeschauwer, B. (2024). The incremental healthcare cost associated with cancer in Belgium: A registry-based data analysis. *Cancer Medicine*, 13(3), e6659. <https://doi.org/10.1002/CAM4.6659;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- Gourni, E., Del Pozzo, L., Bartholomä, M., Kiefer, Y., T. Meyer, P., Maecke, H. R., & Holland, J. P. (2017). Radiochemistry and Preclinical PET Imaging of 68Ga-Desferrioxamine Radiotracers Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen. *Molecular Imaging*, 16. <https://doi.org/10.1177/1536012117737010>
- Greenlee, J. D., & King, M. R. (2022). A syngeneic MC38 orthotopic mouse model of colorectal cancer metastasis. *Biology Methods and Protocols*, 7(1).
<https://doi.org/10.1093/biomethods/bpac024>
- Guckeisen, T., Hosseinpour, S., & Peukert, W. (2021). Effect of pH and urea on the proteins secondary structure at the water/air interface and in solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 590, 38–49.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.01.015>
- Harsha. (2024, March). *De verschillen begrijpen: SPECT-scan versus PET-scan*.
<https://kiranpetct.com/understanding-the-differences-spect-scan-vs-pet-scan/>

- Hashim, A. I., Zhang, X., Wojtkowiak, J. W., Martinez, G. V., & Gillies, R. J. (2011). Imaging pH and Metastasis. *NMR in Biomedicine*, 24(6), 582. <https://doi.org/10.1002/nbm.1644>
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Jardim-Perassi, B. V., Irrera, P., Lau, J. Y. C., Budzevich, M., Whelan, C. J., Abrahams, D., Ruiz, E., Ibrahim-Hashim, A., Damgaci Erturk, S., Longo, D. L., Pilon-Thomas, S. A., & Gillies, R. J. (2023). Intraperitoneal Delivery of Iopamidol to Assess Extracellular pH of Orthotopic Pancreatic Tumor Model by CEST-MRI. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2023, 1944970. <https://doi.org/10.1155/2023/1944970>
- Juweid, M. E., Al-Qasem, S. F., Khuri, F. R., Gallamini, A., Lohmann, P., Ziellenbach, H., & Mottaghy, F. M. (2025). Beyond fluorodeoxyglucose: Molecular imaging of cancer in precision medicine. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 75(3), 226–242. <https://doi.org/10.3322/CAAC.70007>;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:15424863;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Kanker - Naar een gezond België. (n.d.). Retrieved March 1, 2026, from <https://www.gezondbelgie.be/nl/gezondheidstoestand/niet-overdraagbare-aandoeningen/kanker>
- Kanker.nl. (n.d.). *Goedaardige en kwaadaardige tumoren*. Retrieved March 1, 2026, from <https://www.kanker.nl/algemene-onderwerpen/wat-is-kanker/algemeen/goedaardige-en-kwaadaardige-tumoren>
- Kelley Murfin. (n.d.). *What is the tumor microenvironment?* | MD Anderson Cancer Center. Retrieved March 1, 2026, from <https://www.mdanderson.org/cancerwise/what-is-the-tumor-microenvironment-3-things-to-know.h00-159460056.html>
- Lauren Rodriguez, & Larry Joe. (n.d.). *Protein structure and function (article)* | Khan Academy. Retrieved March 1, 2026, from <https://www.khanacademy.org/science/hs-bio/x230b3ff252126bb6:gene-expression-and-regulation/x230b3ff252126bb6:untitled-348/a/protein-structure-and-function>
- Longo, D. L., Bartoli, A., Consolino, L., Bardini, P., Arena, F., Schwaiger, M., & Aime, S. (2016). In Vivo Imaging of Tumor Metabolism and Acidosis by Combining PET and MRI-CEST pH Imaging. *Cancer Research*, 76(22), 6463–6470. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0825>
- Low, H. Y., Yang, C. T., Xia, B., He, T., Lam, W. W. C., & Ng, D. C. E. (2023). Radiolabeled Liposomes for Nuclear Imaging Probes. *Molecules* 2023, Vol. 28, 28(9). <https://doi.org/10.3390/molecules28093798>
- M E Phelps. (2000). PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging - PubMed. *Journal of Nuclear Medicine*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10768568/>

- Martins Pinto, M., Paumard, P., Bouchez, C., Ransac, S., Duvezin-Caubet, S., Mazat, J. P., Rigoulet, M., & Devin, A. (2023). The Warburg effect and mitochondrial oxidative phosphorylation: Friends or foes? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1864(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2022.148931>
- McDonald, P. C., Chafe, S. C., Brown, W. S., Saberi, S., Swayampakula, M., Venkateswaran, G., Nemirovsky, O., Gillespie, J. A., Karasinska, J. M., Kalloger, S. E., Supuran, C. T., Schaeffer, D. F., Bashashati, A., Shah, S. P., Topham, J. T., Yapp, D. T., Li, J., Renouf, D. J., Stanger, B. Z., & Dedhar, S. (2019). Regulation of pH by Carbonic Anhydrase 9 Mediates Survival of Pancreatic Cancer Cells With Activated KRAS in Response to Hypoxia. *Gastroenterology*, 157(3), 823–837. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.05.004>
- Melanie M. Cooper, & Michael W. Klymkowsky. (n.d.). 9.3: *Amino Acids, Proteins, and pH* - *Chemistry LibreTexts*. Retrieved May 24, 2026, from https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/CLUE%3A_Chemistry_Life_the_Universe_and_Everything/09%3A_Reaction_Systems/9.3%3A_Amino_Acids_Proteins_and_pH
- Nakhjavani, M., Giles, B., Strom, M., Vi, C., Attenborough, S., & Shigdar, S. (2022). A Flow Cytometry-Based Cell Surface Protein Binding Assay for Assessing Selectivity and Specificity of an Anticancer Aptamer. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 2022(187), e64304. <https://doi.org/10.3791/64304>
- O'Brien, E. P., Brooks, B. R., & Thirumalai, D. (2011). Effects of pH on proteins: Predictions for ensemble and single molecule pulling experiments. *Journal of the American Chemical Society*, 134(2), 979. <https://doi.org/10.1021/ja206557y>
- OECD, & Commission, E. (2025). Landenprofiel voor Kanker: België 2025. *EU Country Cancer Profiles, EU Country Cancer Profiles*. <https://doi.org/10.1787/5c4dfa17-nl>
- Pometti, M. A., Di Natale, G., Geremia, G., Gauswami, N., Garufi, G., Ricciardi, G., Sciortino, M., Scopelliti, F., Russo, G., & Ippolito, M. (2024). A Kinetically Controlled Bioconjugation Method for the Synthesis of Radioimmunoconjugates and the Development of a Domain Mapping MS-Workflow for Its Characterization. *Bioconjugate Chemistry*, 35(3), 324–332. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.3C00519>
- Price, E. W., & Orvig, C. (2013). Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews*, 43(1), 260–290. <https://doi.org/10.1039/c3cs60304k>
- Rahman, A., Janic, B., Rahman, T., Singh, H., Ali, H., Rattan, R., Kazi, M., & Ali, M. M. (2023). Immunotherapy Enhancement by Targeting Extracellular Tumor pH in Triple-Negative Breast Cancer Mouse Model. *Cancers*, 15(20), 4931. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15204931/S1>
- Rahman, M. A., Yadab, M. K., & Ali, M. M. (2024a). Emerging Role of Extracellular pH in Tumor Microenvironment as a Therapeutic Target for Cancer

- Immunotherapy. *Cells* 2024, Vol. 13, 13(22).
<https://doi.org/10.3390/cells13221924>
- Rahman, M. A., Yadab, M. K., & Ali, M. M. (2024b). Emerging Role of Extracellular pH in Tumor Microenvironment as a Therapeutic Target for Cancer Immunotherapy. *Cells* 2024, Vol. 13, 13(22).
<https://doi.org/10.3390/cells13221924>
- Reshetnyak, Y. K., Andreev, O. A., & Engelman, D. M. (2024). Aiming the magic bullet: targeted delivery of imaging and therapeutic agents to solid tumors by pHLP peptides. *Frontiers in Pharmacology*, 15.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1355893>
- Rowe, S. P., & Pomper, M. G. (2021). Molecular Imaging in Oncology: Current Impact and Future Directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(4), 333.
<https://doi.org/10.3322/caac.21713>
- Saeed, E., Bibi, K., Mushtaq, S., Bibi, I., & Park, J. A. (2025). Advancing Photodynamic Therapy: The Role of PET and SPECT in Imaging-Guided Theranostics. *Molecular Pharmaceutics*, 22(7), 3637–3653.
<https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.5C00551>
- 'Sharma, N. C., 'Efstratiou, A., 'Mokrousov, I., 'Mutreja, A., 'Das, B., & 'Ramamurthy, T. (2019). *Diphtheria*.
- Suzuki, A., Maeda, T., Baba, Y., Shimamura, K., & Kato, Y. (2014). Acidic extracellular pH promotes epithelial mesenchymal transition in Lewis lung carcinoma model. *Cancer Cell International* 2014 14:1, 14(1), 129-.
<https://doi.org/10.1186/S12935-014-0129-1>
- Taniura, T., Iida, Y., Kotani, H., Ishitobi, K., Tajima, Y., & Harada, M. (2020). Immunogenic chemotherapy in two mouse colon cancer models. *Cancer Science*, 111(10), 3527. <https://doi.org/10.1111/cas.14624>
- Visca, H., DuPont, M., Moshnikova, A., Crawford, T., Engelman, D. M., Andreev, O. A., & Reshetnyak, Y. K. (2022). pHLP Peptides Target Acidity in Activated Macrophages. *Molecular Imaging and Biology*, 24(6), 874–885.
<https://doi.org/10.1007/s11307-022-01737-x>
- Wyatt, L. C., Lewis, J. S., Andreev, O. A., Reshetnyak, Y. K., & Engelman, D. M. (2017). Applications of pHLP Technology for Cancer Imaging and Therapy. *Trends in Biotechnology*, 35(7), 653–664.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.03.014>
- Zhang, X., Lin, Y., & Gillies, R. J. (2010). Tumor pH and its measurement. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 51(8), 1167–1170. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.068981>

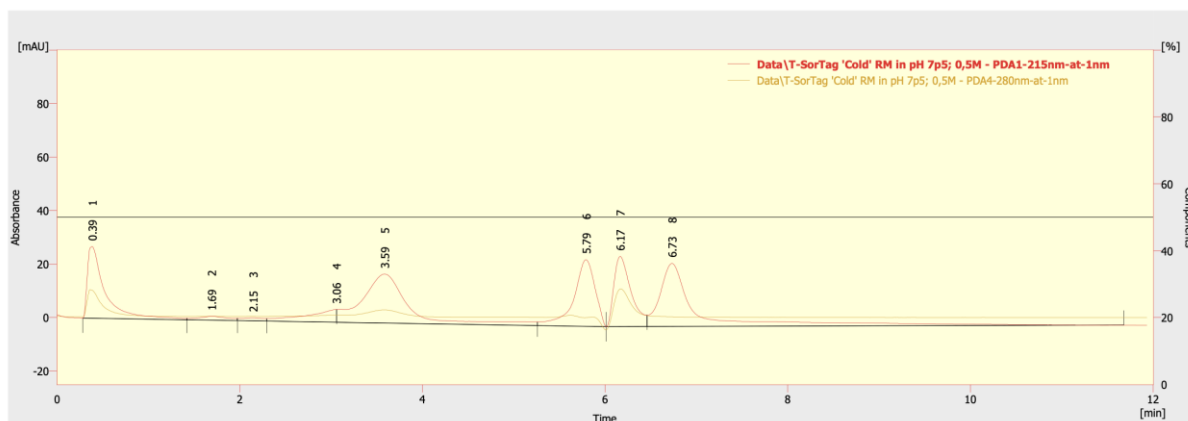
Ik heb ChatGPT (genAI-tool) gebruikt als ondersteunend hulpmiddel bij het schrijven van mijn tekst. Het werd gebruikt om voorstellen te krijgen voor de structuur en volgorde van resultaten, om moeilijke woorden en processen eenvoudiger uit te leggen en om spelling en grammatica te verbeteren. Alle inhoudelijke informatie, conclusies, data en analyses zijn afkomstig uit de vermelde bronnen en mijn eigen kennis en inzichten verworven gedurende de stage.

Omdat er geen optie beschikbaar is om de promptkoppelingen te delen, worden een aantal hieronder opgesomd:

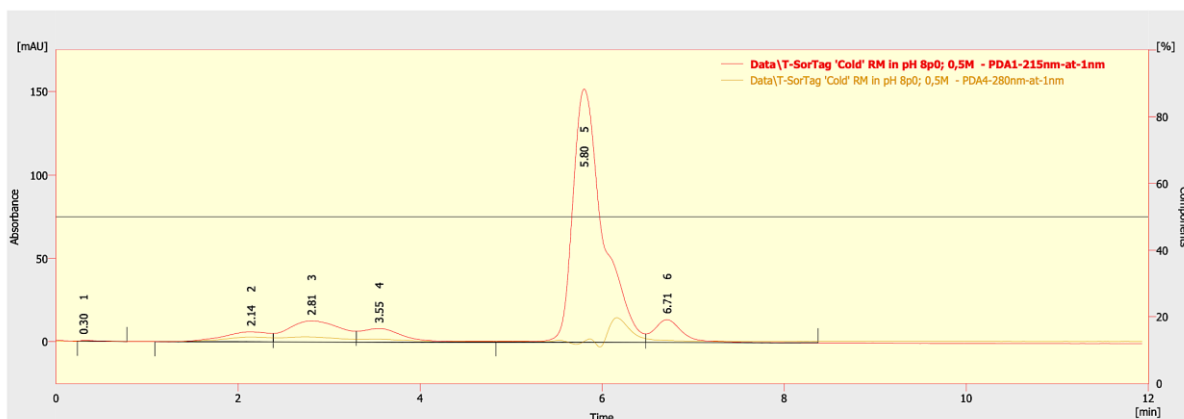
- Leg eenvoudig uit + de verschillen: glycolyse en Warburg-effect
- Herschrijf deze tekst in wetenschappelijke taal en verbeter schrijffouten, zonder inhoudelijk iets te veranderen
- Is dit een logische structuur om de resultaten te bespreken van het gedeelte 'flowcytometrie': eerst de histogrammen, dan MFI-analyse en dan fold-change; indien nee: geef andere suggesties a.u.b.
- Hoe kan ik op Word mijn afbeeldingen automatisch nummeren?
- Geef een synoniem voor: verzuring

14 BIJLAGEN

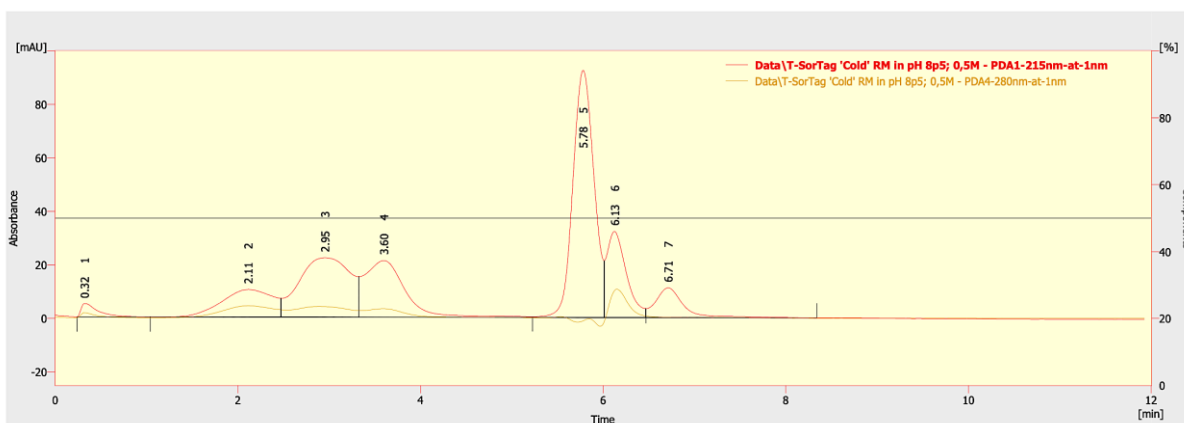
Bijlage 1 (cold experiment T-SorTag in pH 7,5)



Bijlage 2 (cold experiment T-SorTag in pH 8,0)



Bijlage 3 (cold experiment T-SorTag in pH 8,5)



Bijlage 4

Experiment 1: 27/01/2026

pH	Gemiddelde MFI T- SorTag/anti- His-tag	Gemiddelde MFI IC
7,5	696,06	199,44
7	1160,17	209,54
6,5	1436,64	204,16
6	2891,94	213,17
5,5	8973,8	206,79

Experiment 2: 04/03/2026

pH	Gemiddelde MFI T-SorTag / anti-His-tag	Gemiddelde MFI IC
7,5	2325,45	601,97
7	2427,94	696,46
6,5	3318,4	797,76
6	1321,83	778,82
5,5	17783,97	1491,33

Experiment 3: 24/03/2026

pH	Gemiddelde MFI T-SorTag / anti-His-tag	Gemiddelde MFI IC
7,5	1047,18	532,59
7	2360,93	556,82
6,5	5193,86	536,35
6	20188,48	606,78
5,5	17527,73	613,3

Bijlage 5 (one-way ANOVA test van de veelvoudsverandering van het MFI-sigitaal van T-SorTag ten opzichte van pH 7,5)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Fold change MFI HisTag over IC (in % fold change) (n=3)										
2											
3	One-way ANOVA (Veelvoudsverandering fluorescent signaal van pH 7p5 vergeleken met andere pH)										
4											
5	Number of families	1									
6	Number of comparisons per family	4									
7	Alpha	0,05									
8											
9	Dunnett's multiple comparisons test	Mean diff,	95,00% CI	Below threshold	Summary	Adjusted F	A-?				
10	pH 7p5 vs. pH 7p0	-81,09	-672,7 to 510,6	No	ns	0,9828	B	pH 7p0			
11	pH 7p5 vs. pH 6p5	-24,45	-616,1 to 567,2	No	ns	0,9998	C	pH 6p5			
12	pH 7p5 vs. pH 6p0	-44,74	-636,4 to 546,9	No	ns	0,9981	D	pH 6p0			
13	pH 7p5 vs. pH 5p5	-407	-998,6 to 194,6	No	ns	0,2092	E	pH 5p5			
14											
15	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF		
16	pH 7p5 vs. pH 7p0	287	368,1	-81,09	204,7	3	3	0,3962	10		
17	pH 7p5 vs. pH 6p5	287	311,5	-24,45	204,7	3	3	0,1195	10		
18	pH 7p5 vs. pH 6p0	287	331,8	-44,74	204,7	3	3	0,2186	10		
19	pH 7p5 vs. pH 5p5	287	694	-407	204,7	3	3	1,988	10		
20											
21											

Bijlage 6

LOGBOEK Bachelorproefstage 12 weken FBT

Naam student: Noura Lazaar

Naam en adres stageplaats: Molecular Imaging and Therapy Research Group

Laarbeeklaan 103 - 1090 Brussels

Naam promotor: Prof. dr. Nick Devoogdt

Naam copromotor: dr. Thomas Ertveldt

Week 1

Datum	Voormiddag (activiteiten)	Namiddag (activiteiten)
05/01/2026	Overleg met copromotor, zelfstandig werk	Buffer exchange d.m.v. size exclusion chromatography
06/01/2026	2de poging van buffer exchange via ultrafiltratie (Vivaspin 5000)	Vorbereiding CD-experiment volgende dag (verduunningen...)
07/01/2026	CD-meting van T-SorTag onder veranderende pH (Structural Biology lab - campus Etterbeek)	Zelfstandig werk
08/01/2026	Zelfstandig werk, analyse CD-resultaten	Zelfstandig werk, analyse CD-resultaten
09/01/2026	Zelfstandig werk	Zelfstandig werk, overleg met copromotor

Handtekening copromotor:

Week 2

Datum	Voormiddag (activiteiten)	Namiddag (activiteiten)
12/01/2026	Interpretatie CD-resultaten met programma BeStSel onder begeleiding van copromotor, observatie ander project (nanobodies)	Observatie ander project (nanobodies), overleg met copromotor
13/01/2026	Observatie ander project (nanobodies), zelfstandig werk	Observatie ander project (nanobodies), zelfstandig werk
14/01/2026	Literatuur opzoeken en bronnen verwerken	Literatuur opzoeken en bronnen verwerken
15/01/2026	Uitschrijven en structureren van labo-notities	Zelfstandig werk
16/01/2026	Labmeeting, Zelfstandig werk	Literatuur opzoeken

Handtekening copromotor:

Week 3

Datum	Voormiddag (activiteiten)	Namiddag (activiteiten)
19/01/2026	Bereiden van kweekmedium, zelfstandig werk	MC38-cellen ontgooien, zelfstandig werk
20/01/2026	Protocol doornemen van experiment volgende dag (pH-buffers bereiden) en werkschema maken	Literatuur opzoeken
21/01/2026	MC38-cellen observeren, pH-buffers bereiden	Observatie ander project (nanobodies), Zelfstandig werk

22/01/2026	MC38-cellen observeren, zelfstandig werk	Observatie ander project (nanobodies), Zelfstandig werk
23/01/2026	Zelfstandig werk	MC38-cellen splitsen

Handtekening copromotor: 

Week 4

Datum	Voormiddag (activiteiten)	Namiddag (activiteiten)
26/01/2026	Cellen splitsen	Vorbereiden flowcytometrie-experiment volgende dag (oplossingen bereiden, labelen recipiënten...) en protocol doornemen
27/01/2026	Cellen splitsen, uitvoeren flowcytometrie-experiment onder begeleiding van copromotor	Vervolg flowcytometrie-experiment en analyse met BD FACSCelesta
28/01/2026	Uitschrijven en structureren van labo-notities	Zelfstandig werk
29/01/2026	Cellen splitsen, analyse en interpretatie resultaten flowcytometrie	Verdere analyse resultaten flowcytometrie, zelfstandig werk
30/01/2026	Labmeeting, inzage examens op school	Cellen splitsen, Zelfstandig werk

Handtekening copromotor: 

Week 5

Datum	Voormiddag (activiteiten)	Namiddag (activiteiten)
02/02/2026	Volgen van cursus radioprotectie	Cellen splitsen, zelfstandig werk
03/02/2026	Cellen splitsen, zelfstandig uitvoeren van flowcytometrie-	Vervolg flowcytometrie-experiment, analyse met BD FACSCelesta

	experiment (herhalen)	
04/02/2026	Uitschrijven en structureren van labo-notities, protocol doornemen conjugatie-experiment namiddag	Uitvoeren conjugatie-experiment (eiwit koppelen aan chelator) ter voorbereiding van testlabeling (berekeningen)
05/02/2026	Purificatie eiwit-chelator conjugaat met ÄKTA avant	Purificatie eiwit-chelator conjugaat met ÄKTA avant
06/02/2026	Uitschrijven en structureren van labo-notities, zelfstandig werk	Cellen splitsen

Handtekening copromotor: 

Week 6

Datum	Voormiddag (activiteiten)	Namiddag (activiteiten)
09/02/2026	SDS-PAGE van opgezuiverde fracties, 2X PBS-buffer bereid	Observeren gel, testlabeling met ^{68}Ga op eiwit-chelator conjugaat (T-SorTag-THP-NCS)
10/02/2026	Analyse en interpretatie resultaten testlabeling	Uitschrijven en structureren van labo-notities
11/02/2026	Zelfstandig werk	kweekmedium bereiden, cellen observeren
12/02/2026	Zelfstandig werk	Cellen splitsen
13/02/2026	Labmeeting, overleg met copromotor	Cellen splitsen

Handtekening copromotor: 

Week 7

Datum	Voormiddag (activiteiten)	Namiddag (activiteiten)
16/02/2026	Cellen splitsen, buffers bereiden voor experimenten van de week	Uitschrijven en structureren van labo-notities
17/02/2026	Zelfstandig werk	Cellen observeren, zelfstandig werk
18/02/2026	MC38-cellen splitsen + 2 aparte cellijnen van ander project	Zelfstandig werk
19/02/2026	Optimalisatie reactiecondities van testlabeling-experiment (cold experiment) → SEC QC analyse met Äkta	Verdere optimalisatie reactiecondities met ander toestel (cold experiment) → Hitachi HPLC-systeem
20/02/2026	Cellen splitsen	Uitschrijven en structureren van labo-notities

Handtekening copromotor:



Week 8

Datum	Voormiddag (activiteiten)	Namiddag (activiteiten)
23/02/2026	Cellen splitsen	Optimalisatie van conjugatie-experiment (simulatie uitvoeren om juiste reactiecondities te vinden)
24/02/2026	Verderzetten van simulatie conjugatie-experiment, 2de poging van eigenlijke conjugatie-experiment, analyse met Hitachi HPLC-systeem, analyse resultaten flowcytometrie (<i>FlowJo</i>)	Vervolg 2de poging eigenlijke conjugatie-experiment
25/02/2026	Purificatie van conjugatie-mix met ÄKTA avant toestel, overleg met copromotor	Decontaminatie ÄKTA avant toestel, zelfstandig werk

26/02/2026	VISION day	VISION day
27/02/2026	Labmeeting, cellen splitsen	Uitschrijven en structureren van labo-notities

Handtekening copromotor: 

Week 9

Datum	Voormiddag (activiteiten)	Namiddag (activiteiten)
02/03/2026	Cellen splitsen	3de poging conjugatie-experiment, equilibratie kolom op ÄKTA avant toestel
03/03/2026	Purificatie conjugatie-mix + decontaminatie kolom, SDS-PAGE van opgezuiverde fracties	Gesprek met begeleidend docent, vervolg SDS-PAGE van opgezuiverde fracties
04/03/2026	Cellen splitsen, zelfstandig uitvoeren flowcytometrie-experiment (herhalen), bekijken gel SDS-PAGE en fracties poolen	Vervolg flowcytometrie-experiment, analyse met BD FACSCelesta
05/03/2026	Zelfstandig werk	Uitschrijven en structureren van labo-notities
06/03/2026	Cellen splitsen	Zelfstandig werk

Handtekening copromotor: 

Week 10

Datum	Voormiddag (activiteiten)	Namiddag (activiteiten)
09/03/2026	Cellen splitsen	Zelfstandig werk

10/03/2026	Zelfstandig werk	Twee afzonderlijke testlabelingen uitvoeren (2 afzonderlijke gepoolde fracties)
11/03/2026	Cellen splitsen	Uitschrijven en structureren van labo-notities
12/03/2026	Analyse resultaten van testlabelingen	Zelfstandig werk
13/03/2026	Labmeeting, cellen splitsen	Zelfstandig werk

Handtekening copromotor: 

Week 11

Datum	Voormiddag (activiteiten)	Namiddag (activiteiten)
16/03/2026	Cellen splitsen	Zelfstandig werk
17/03/2026	Doornemen protocol celbindingsstudie, werkschema maken	Zelfstandig werk
18/03/2026	Analyse resultaten flowcytometrie met FlowJo en Graphpad prism, overleg met copromotor	Vorbereiding experiment celbindingsstudie: cellen splitsen, cellen tellen (kleuren), uitzaaien cellen
19/03/2026	Celbindingsstudie uitvoeren	Vervolg celbindingsstudie, cellen splitsen
20/03/2026	Cellen splitsen	Uitschrijven en structureren van labo-notities

Handtekening copromotor:



Week 12

Datum	Voormiddag (activiteiten)	Namiddag (activiteiten)
23/03/2026	Cellen splitsen, overleg met copromotor	Data-analyse celbindingsstudie
24/03/2026	Cellen splitsen, 4de keer zelfstandig uitvoeren flowcytometrie-experiment (herhalen)	Analyse met BD FACSCelesta
25/03/2026	Resultaten verwerken met FlowJo en Graphpad prism	Zelfstandig werk
26/03/2026	Uitschrijven en structureren van labo-notities	Zelfstandig werk
27/03/2026	Labmeeting, overleg met copromotor	Feedback en verbeterpunten BP bespreken met copromotor

Handtekening copromotor:

