

# HEK293 GlycoDelete: optimalisatie door vergelijking van verschillende endoglycosidasen

**Andries DE KOKER**

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van  
Master in de Biochemie en de Biotechnologie  
Major Biochemie en Structurele Biologie  
Academiejaar 2012-2013

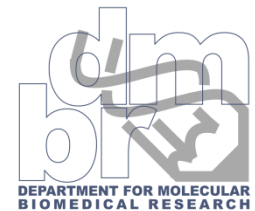
Promotor: prof. dr. Nico Callewaert

Wetenschappelijk begeleider: drs. Francis Santens

UGent – Vakgroep: Biomedische Moleculaire Biologie

VIB – Departement voor Moleculair Biomedisch Onderzoek

Eenheid voor Medische Biotechnologie



UGent – Vakgroep: Biochemie en Microbiologie

Laboratorium voor Eiwitbiochemie en Eiwitengineering

Eenheid voor Moleculaire Glycobiologie



## **Confidentialiteitsclausule**

Scriptie 'HEK293 GlycoDelete: optimalisatie door vergelijking van verschillende endoglycosidasen'

opgemaakt door Andries De Koker

onder verantwoordelijkheid van promotor prof. dr. Nico Callewaert

Dit document en de informatie die het omvat, worden voorgesteld in confidentialiteit, met als enig doel de evaluatie van de Masterproef van Andries De Koker, en mogen niet onthuld worden aan een derde partij of voor andere doeleinden gebruikt worden zonder uitdrukkelijke geschreven toestemming van Nico Callewaert.

---

---

## DANKWOORD

---

---

Stroperig, plakkerig, melig, ronduit zeemzoet, zo'n dankwoord, bah! Doch een mooie gelegenheid om woorden neer te pennen die veel te weinig worden gezegd, zoals 'doch', 'zeemzoet' maar vooral 'bedankt'.

Bedankt **Nico** om mij dit jaar toe te laten in de onderzoeksgroep voor mijn thesis en mij de kans te geven vanaf volgend academiejaar een doctoraat te starten.

**Francis**, ik kon me geen betere begeleider voorstellen, je vertrouwde me meteen en deelde al je labomateriaal met mij. "What is mine, is yours", toch wel een sprong in het duister met een onervaren thesisstudentje. Ik heb veel van je geleerd en niet alleen op wetenschappelijk gebied. Ik hoop dat we in de volgende jaren nog vele verhalen gaan beleven.

**Leander** en **Wim**, ik heb me de voorbije maanden kostelijk geamuseerd te luisteren naar jullie soms wel filosofische vertelsels. **Morgane**, jij hipster, alles wat op dit moment een rage is, heb jij al maanden geleden ontdekt. **Charlot**, de nieuwe lichting van het labo. Party hard de volgende 4 jaar, deal? **Katrien**, als ik een productje nodig had, kon ik het altijd van jou lenen. Meestal kwam je het dan wel maar achteraf te weten, oeps! **Kristof VDW**, de rust zelve, altijd chille gesprekken met jou. **Bram**, een bodemloze put aan verhalen, wanneer heb je die toch allemaal beleefd? **Charlotte**, er was wel altijd een grappig babbeltje met jou te slaan. **Hendrik** en **Annelies**, een onbesliste strijd wie de beste "baksels" maakt, ik ga toch nog eens moeten proeven om het zeker te zijn. **Erica**, **Evelyn** en **Dieter**, jullie gesprekken daar aan de andere kant van het labo zorgden steeds voor een superleuke sfeer! En natuurlijk ook **Petra**, **Paul**, **Kristof DS** en **Nele**, veel wijsheid samen, daar in dat kleine kamertje.

Alle **vriendjes**, 2<sup>de</sup> masters en niet 2<sup>de</sup> masters, alvast bedankt voor het plezier door de jaren heen en dat er nog veel van hetzelfde mag volgen!

**Mama** en **papa**, bedankt voor de onvoorwaardelijke steun. En nog eens bedankt, gewoon omdat ik het veel te weinig zeg. Zonder jullie zou ik niet de persoon zijn die ik nu ben.

**Oma** en **peter**, ook jullie wil ik bedanken eerst voor het babysitten als ik jong was en daarna voor het jarenlang gezelschap houden in eenzame examenperiodes.

Grote **broer**, ik wil zelfs niet eens beginnen aan dingen op te noemen die jij mij geleerd hebt want die lijst is eindeloos. Je stond altijd klaar om mij te helpen. Je hebt voor mij gezorgd en mij beschermd. We verschilden in sommige opzichten, maar we waren zeker en vast broers. Uren hebben we afgelachen, want we hadden dezelfde humor. Je bent er nu niet meer, maar toch wil ik je bedanken voor alles. Het ga je goed.

Andries

# INHOUDSTAFEL

<b>Dankwoord</b>	<b>I</b>
<b>Inhoudstafel</b>	<b>II</b>
<b>Lijst met afkortingen</b>	<b>IV</b>
<b>Nederlandstalige samenvatting</b>	<b>VI</b>
<b>English summary</b>	<b>VII</b>
<b>Inleiding</b>	<b>- 1 -</b>
<b>I  Glycobiologie 101</b>	<b>- 2 -</b>
1  Monosacchariden	- 2 -
2  N-glycaanbiosynthese	- 3 -
A  In het Endoplasmatisch Reticulum	- 3 -
B  In het Golgi-apparaat	- 5 -
<b>II  Glyco-engineering</b>	<b>- 7 -</b>
1  De HEK293S GnTI <sup>-/-</sup> -cellijn	- 7 -
2  De GlycoDelete-technologie	- 7 -
A  Rationale	- 7 -
B  Strategie	- 8 -
<b>III  Endo-N-acetyl-β-(D)-glucosaminidasen</b>	<b>- 10 -</b>
1  EndoT (GH18)	- 12 -
2  EndoF2 (GH18)	- 12 -
3  EndoF3 (GH18)	- 12 -
4  EndoH (GH18)	- 12 -
5  EndoBI-1 (GH18)	- 14 -
6  EndoM (GH85)	- 15 -
7  EndoS (GH18)	- 15 -
<b>IV  Test-glycoproteïnen</b>	<b>- 16 -</b>
1  Humaan Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (hGM-CSF)	- 16 -
2  Humaan Interleukine 22 (hIL-22)	- 16 -
3  Anti-Cluster of Differentiation 20 humaan Immunoglobuline G (αCD20-hIgG)	- 16 -
<b>Doelstelling</b>	<b>- 18 -</b>
<b>Resultaten</b>	<b>- 21 -</b>
<b>I  Constructie expressieplasmiden</b>	<b>- 22 -</b>
1  Endoglycosidasen	- 22 -
A  <i>In silico</i> gendesign	- 22 -
B  Expressievector	- 22 -
2  Test-glycoproteïnen	- 23 -
A  <i>In silico</i> gendesign	- 23 -
B  Expressievector	- 24 -

<b>II </b>	<b>Analyse activiteit van de endoglycosidasen via transiënte cotransfectie</b>	<b>- 25 -</b>
1	Optimalisering	- 25 -
2	αCD20-hIgG	- 27 -
3	hGM-CSF	- 29 -
4	hIL-22	- 30 -
A	In vitro endoH-digest	- 31 -
<b>III </b>	<b>Genereren stabiel endoH-celijn</b>	<b>- 33 -</b>
1	Selectiestrategie	- 33 -
2	Analyse van stabiele HEK293S klonen op genomische integratie van pCAXL:endoH	- 35 -
3	Analyse van stabiele HEK293S-eH klonen op endoH gemedieerde 'glyco-engineering' efficiëntie	- 35 -
A	In vitro PNGaseF-digest	- 36 -
<b>IV </b>	<b>Bijkomende resultaten</b>	<b>- 38 -</b>
1	Klonering endoS	- 38 -
A	Kloneringsstrategie 1	- 38 -
B	Kloneringsstrategie 2	- 38 -
C	Kloneringsstrategie 3	- 39 -
D	Kloneringsstrategie 4	- 40 -
E	Kloneringsstrategie 5	- 42 -
2	Genereren stabiele substraatproducerende celijn	- 43 -
A	Optimaliseren minimale lethale dosis geniticine	- 43 -
3	Zuivering van de test-glycoproteïnen	- 44 -
A	His-getagd eiwit (vb. hGM-CSF)	- 44 -
B	Immunoglobulines (vb. αCD20-hIgG)	- 44 -
	<b>Discussie</b>	<b>- 46 -</b>
	<b>Materiaal &amp; Methodes</b>	<b>- 51 -</b>
	<b>Referenties</b>	<b>- 61 -</b>
	<b>Bijlagen</b>	<b>- 65 -</b>
I	<b>Bijlagen bij RESULTATEN</b>	<b>- 65 -</b>
II	<b>Bijlagen bij MATERIAAL &amp; METHODE</b>	<b>- 68 -</b>

---



---

## LIJST MET AFKORTINGEN

---



---

(g)DNA	(genomisch) DeoxyriboNucleic Acid
(h)GM-CSF	(humaan) Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
(h)IL-22	(humaan) InterLeukine 22
ST/(h)SialT	(humaan) SialylTransferase
(k)b(p)	(kilo)base(paren)
(m)RNA	(messenger) RiboNucleic Acid
3FR	3' Flanking Regio
4-MEP	4-Mercapto-Ethyl-Pyridine
APTS	8-Amino-1,3,6-PyreneTriSulfonic acid
Amp(R)	Ampicilline(Resistentiegen)
ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
$\alpha$ CD20-hIgG	Anti-Cluster of Differentiation 20-humaan Immunoglobuline G
Asn	Asparagine
Alg	Asparagine-linked glycosylation
BCR	B-cel receptor
bGH	bovine Growth Hormone
BSA	Bovine Serum Albumine
BS/HEPES buffer	Buffered Saline/4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid buffer
CHO	Chinese Hamster Ovary
CLL	Chronische Lymfatische Leukemie
CDC	Complement-Dependent Cytotoxicity
ConA	Concanavaline A
CMP	Cytidine MonoPhosphate
dNTP	deoxyriboNucleotide TriPhosphate
DMSO	DiMethyl SulfOxide
Dol	Dolichol
DTT	DiThioThreitol
DSA-FACE	DNA Sequencer-Assisted Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EndoX/eX	Endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidase X (X=BI-1, F2, F3, H, M, S, T)
ER	Endoplasmatisch Reticulum
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
Fuc	Fucose
FucT	Fucosyl Transferase
Gal	Galactose
GalT	Galactosyl Transferase
G418	Geniticine
GnT	GlcNAc Transferase
Glc	Glucose
GLS	GLucosidaSe
GH	Glycoside Hydrolase

---

GDP	Guanosine DiPhosphate
HC	Heavy Chain
HA	Hemagglutinine A
hCMV(-IE)	humaan CytoMegalovirus (-Immediate Early)
HEK	Human Embryo Kidney
HCIC	Hydrophobic Charge Induction Chromatography
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
Kan(R)	Kanamycine(Resistentiegen)
Kif	Kifunensine
kDa	kiloDalton
LC	Light Chain
Loc	Localisation signal
LB/NB	Luria Broth/Nutriënt Broth
Man	Mannose of Mannosidase
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight
mAb	monoclonal AntiBody
mST2s	mouse ST2-protein soluble
GalNAc	N-AcetylGalactosamine
GlcNAc	N-AcetylGlucosamine
NeuNAc/Sia	N-AcetylNeuraminezuur/Siaalzuur
Neo(R)	Neomycine(Resistentiegen)
NP-40	Nonidet-P40
NS1	NonStructural protein 1
OST	OligoSaccharylTransferase
PNGaseF	Peptide-N-Glycosidase F
PBS	Phosphate Bufferd Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTM	Post-Translatie Modificatie
PCD	Programmed Cell Death
RIPA buffer	RadiolImmunoPrecipitation Assay buffer
Rpm	Rotations per minute
SS	Salmon Sperm
Ser	Serine
SV40	Simian Virus 40
Tm	melting Temperature
SDS-PAGE	SodiumDodecylSulfaat PolyAcrylamide GelElektroforese
TB	Terrific Broth
TEMED	TetraMethylEthyleenDiamine
Thr	Threonine
TAE buffer	Tris-Acetaat-EDTA buffer
TE buffer	Tris-EDTA buffer
UDP	Uridine DiPhosphate
YPD	Yeast extract-Peptone-Dextrose
β-ME	β-MercaptoEthanol

---

---

## NEDERLANDSTALIGE SAMENVATTING

---

---

Therapeutische eiwitten hebben in de voorbije jaren aan belang gewonnen in de biofarmaceutische industrie. Voor complexe eiwitten kiest de biofarmaceutische industrie veelal voor zoogdiercellijnen, zoals HEK293 en CHO, als productiesysteem omdat deze in staat zijn post-translationele modificaties, zoals N-glycosylatie, uit te voeren. N-glycanen spelen enerzijds een noodzakelijke, assisterende rol in de eiwitopvouwing maar anderzijds zorgt de inherente complexiteit van de N-glycosylatiepathway voor laag efficiënte downstream processing en bemoeilijkt deze variatie in N-glycaanstructuur de reproduceerbare productie en validatie van het uiteindelijke biofarmaceutische eiwit. De huidige consensus is dat het glycaanprofiel van het biofarmaceuticum moet behouden blijven tussen de verschillende batches, maar zelfs dat is niet eenvoudig. Meerdere pogingen werden reeds ondernomen om N-glycosylatie op eiwitten in te perken. In ons lab werd recent een oplossing ontwikkeld om dit probleem te omzeilen, de GlycoDelete-technologie. De GlycoDelete-technologie maakt gebruik van de stabiele overexpressie van het fungale endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidase T uit *Trichoderma reesei* in HEK293S GnT<sup>-/-</sup>-cellen. In de technologie werd het glycaanprofiel van de wild-type HEK293S-cel eerst aangepast aan de substraatspecificiteit van endoT, nl. hoog-mannose type N-glycanen. Echter is deze GnTI-inactivering niet eenvoudig, het is tijdrovend en zeker niet optimaal om deze uit te voeren in elke biofarmaceutische productie-cel lijn. Het doel van deze thesis is het exploreren welke endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidasen de versatiliteit en universele inzetbaarheid van de GlycoDelete-technologie kunnen verbeteren. Verschillende endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidasen werden transiënt getransfecteerd samen met een test-glycoproteïne om hun de-N-glycosylatie activiteit na te gaan. De endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidasen waren endoH uit *Streptomyces plicatus*, endoS uit *Streptococcus pyogenes*, endoF2 en endoF3 uit *Flavobacterium meningosepticum*, endoBI-1 uit *Bifidobacterium infantis* en endoM uit *Mucor hiemalis*. Deze endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidasen hebben een gelijkaardig enzymatisch werkingsmechanisme, maar verschillende substraatspecificiteit en verschillende enzymkinetische parameters dan endoT. De test-glycoproteïnen waren hGM-CSF, een biofarmaceutisch interessant glycoproteïne, hIL-22, een endoT-recalcitrante N-glycosylatiesite bevattend eiwit en  $\alpha$ CD20-hIgG, omdat antilichamen veruit de meest geproduceerde therapeutische eiwitten zijn van dit moment. Uit deze eerste experimenten bleek dat alle endoglycosidasen, behalve endoM, een activiteit vertoonden in wild-type HEK293S-cellen. Onverwacht was dat endoH alle N-glycaanstructuren bleek te verwijderen. Een selectiestrategie werd uitgedacht om endoH stabiel te integreren in het genoom. De selectiestrategie bestond eruit een inhibitor voor ER en cisGolgi mannosidase I, kifunensine, toe te voegen opdat alle N-glycanen van het type hoog-mannose waren. Daarna werd concanavale A, een cytostatisch lectine met hoog-mannose glycanen als substraat, toegevoegd. Enkel wanneer het endoH-gen stabiel werd geïntegreerd in het genoom en daar actief was, werd de cel terug insensitief voor conA. Enkele stabiele klonen werden verkregen en de aanwezigheid van endoH werd bevestigd op DNA-niveau. Door visualisatie van het effect op getransfecteerd hGM-CSF werd ook de enzymatische activiteit van endoH bevestigd. Bij deze stabiele klonen waren er meerdere die naast een goede de-N-glycosylatie ook gunstige celparameters, zoals celgroei en celmorfologie, vertoonden. Deze kandidaatcellijnen moeten in de toekomst echter nog verder gekarakteriseerd worden.



---

---

## ENGLISH SUMMARY

---

---

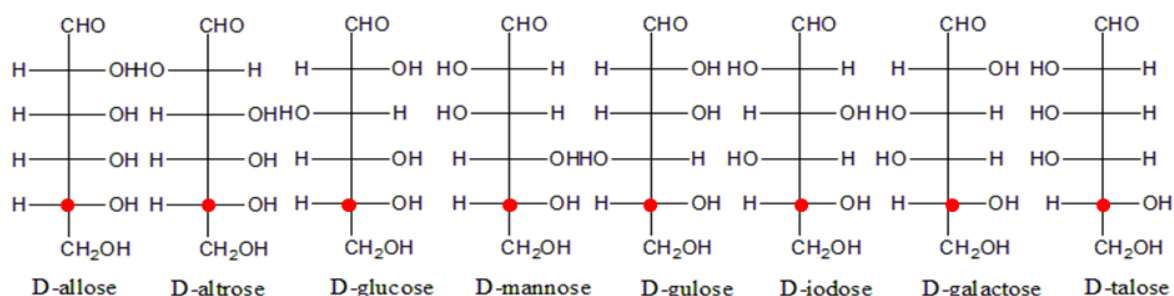
In the last few years therapeutic proteins have become of great importance for the biopharmaceutical industry. For complex proteins the biopharmaceutical industry often chooses mammalian cell-lines, like HEK293 and CHO, as a production system because these are capable of adding post-translational modifications, like N-glycosylation. On the one hand N-glycans play an important, assisting role in protein folding, but on the other hand the inherent complexity of the N-glycosylation pathway accounts for a low efficiency of downstream processing and the variation in N-glycan structure makes the reproducible production and validation of the biopharmaceutical protein more difficult. Nowadays the consensus is that the glycan profile of the biopharmaceuticum has to be preserved between the different batches, but even this is not evident. Already lots of attempts were made to limit N-glycosylation on proteins. In our lab a solution was recently found to circumvent this problem, the GlycoDelete-technology. The GlycoDelete-technology makes use of the stable overexpression of a fungal endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidase T from *Trichoderma reesei* in HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cells. In this technology the glycan profile of wild-type HEK293S-cells had to be adapted to the substrate specificity of endoT, high-mannose type N-glycans. In practice, the inactivation of the GnTI-gene is not straightforward; it is time-consuming and certainly not optimal to perform in every biopharmaceutical production cell-line. The purpose of this thesis is to explore which endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidases could improve the versatility and universal availability of the GlycoDelete-technology. Different endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidases were transiently transfected together with a test-glycoprotein to investigate their de-N-glycosylation activity. The endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidases were endoH from *Streptomyces plicatus*, endoS from *Streptococcus pyogenes*, endoF2 and endoF3 from *Flavobacterium meningosepticum*, endoBI-1 from *Bifidobacterium infantis* and endoM from *Mucor hiemalis*. These endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidases all have a similar enzymatic mechanism, but have different substrate specificity and different enzymatic parameters compared with endoT. The test-glycoproteins were hGM-CSF, a biopharmaceutical interesting glycoprotein, hIL-22, a protein which contains a difficult to access N-glycan site and  $\alpha$ CD20-hIgG, because antibodies are the most widely produced therapeutic proteins of the moment. These first experiments showed that all endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidases, except endoM, showed activity in wild-type HEK293S-cells. Unexpected was that endoH removed all N-glycans. A selection strategy was devised to stably integrate endoH in the genome. The selection strategy consisted of two steps, adding an inhibitor for ER and cisGolgi mannosidase I, kifunensine, so all N-glycans became of the high-mannose type. Afterwards concanavalin A, a cytostatic lectin with high-mannose glycans as a substrate, was added. Only when the endoH-gene was stably integrated in the genome and was active, the cell again became insensitive to conA. Several stable clones were obtained and the presence of endoH was confirmed on the DNA-level. By visualization of its effect on transfected hGM-CSF, the enzymatic activity of endoH was assayed. There were multiple clones which showed, besides a decent de-N-glycosylation, optimal cell parameters, such as rapid cell growth and normal cell morphology. In the future these candidate cell-lines have to be characterized further.

INLEIDING

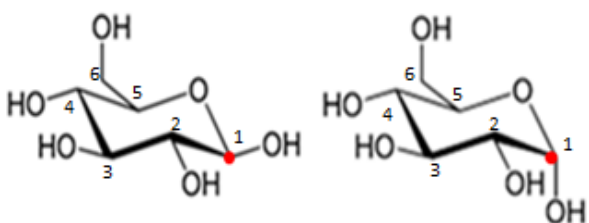
# I| Glycobiologie 101

## 1| Monosacchariden

De bouwstenen van N-glycanen zijn voor het grootste gedeelte hexosen, die zes koolstofatomen bevatten. Ze bevatten een aldehydegroep op positie 1 en worden daarom aldosen of aldohexosen genoemd. Aldosen hebben 4 chirale centra of stereocentra, koolstofatomen die verbonden zijn met vier chemisch verschillende substituenten. Er zijn dus  $4^2 (= 16)$  verschillende stereoisomeren mogelijk. Stereoisomeren die een verschillende configuratie hebben in één stereocentrum worden epimeren genoemd en diegene die in twee of meer stereocentra verschillen, diastereomeren. Stereoisomeren die een verschillende configuratie hebben in alle stereocentra zijn complete spiegelbeelden van elkaar en worden enantiomeren genoemd. Enantiomeren krijgen eenzelfde naam, andere stereoisomeren krijgen een verschillende naam. De aanduiding van configuratie, D of L, wordt bepaald door de configuratie rondom het chirale koolstofatoom het verst verwijderd van de aldehyde-groep. In de natuur komen naast enkel D-suikers (**Figuur 1** - Website: Wikimedia, 2009) ook zeker niet alle stereoisomeren voor (**Tabel 1**).



**Figuur 1: Fischer projectie van 8 D-stereoisomere aldohexosen.** Aldehydegroep (CHO) op positie 1. Het chirale koolstofatoom dat bepaalt of een configuratie D of L is, werd aangeduid in rood. Een voorbeeld van epimeren zijn glucose en mannose. Een voorbeeld van diastereomeren zijn glucose en talose. Figuur overgenomen en aangepast van Wikimedia, 2009.

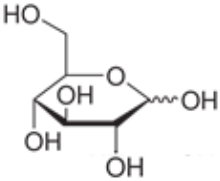
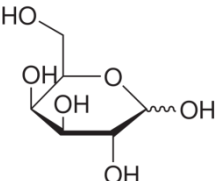
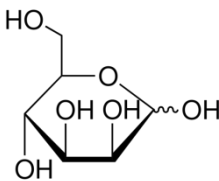
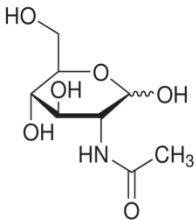
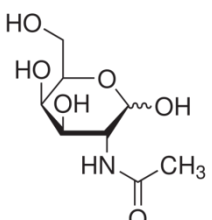
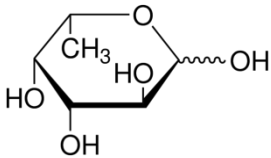
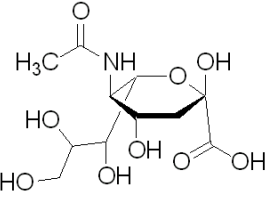


**Figuur 2: Haworth projectie van (links)  $\beta$ -D-glucose en (rechts)  $\alpha$ -D-glucose in de stoelconfiguratie.** Het anomere centrum werd aangeduid in rood. Figuren overgenomen en aangepast van Wikimedia, 2009.

In de natuur komen cyclische en lineaire vormen voor in evenwicht, maar de cyclische vorm of Haworth projectie (**Figuur 2** - Website: Wikimedia, 2009 & Website: Wikimedia, 2009) is veel stabiel. De Haworth projectie komt niet voor in planaire vorm maar vooral in stoelconfiguratie (ook bootconfiguratie is mogelijk). Bij cyclisatie reageert de aldehydegroep met een distale hydroxy-

groep met vorming van een zesring, d.i. de pyranose-vorm. Het koolstofatoom betrokken in de cyclisatiereactie, d.i. het koolstofatoom van de aldehydegroep wordt het anomere

koolstofatoom genoemd, omdat een vijfde, nieuw asymmetrisch centrum wordt gevormd. De hydroxygroep van het anomere centrum kan gepositioneerd zijn aan de  $\alpha$ - of  $\beta$ -zijde. De  $\beta$ -zijde is deze zijde waar het C6-atoom uitsteekt. Via mutarotatie over de lineaire vorm kan gewisseld worden tussen deze zijden. Dit is enkel mogelijk wanneer het suiker zijn reducerend uiteinde behoudt, met andere woorden wanneer de hydroxygroep van het C1-atoom niet deelneemt aan een verbinding (Taylor & Drickamer, 2011).

<b>Tabel 1</b> <b>Meest voorkomende monosaccharidestructuren in N-glycanen</b> (symboolnomenclatuur volgens Consortium for Functional Glycomics) Figuren overgenomen en aangepast van (Website: Sigma-Aldrich, 2013) en (Website: Consortium for Functional Glycomics, 2013)		
		
D-Glucose (Glc) ●	D-Galactose (Gal) ●	D-Mannose (Man) ●
		
N-Acetyl-D-Glucosamine (GlcNAc) ■	N-Acetyl-D-Galactosamine (GalNAc) ■	
		
L-Fucose (Fuc) ▲	N-Acetylneuraminic acid of sialic acid (NeuNAc) ◆	

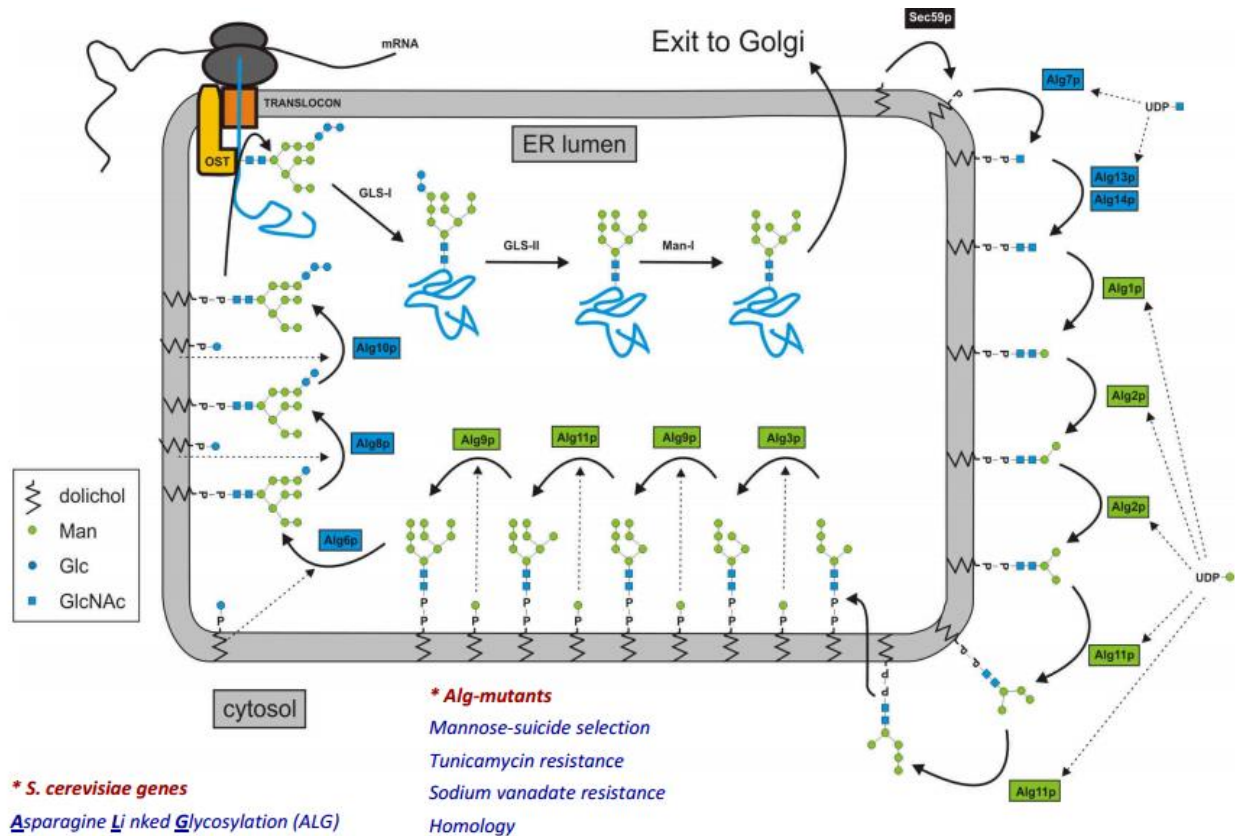
## 2| N-glycaanbiosynthese

### A| In het Endoplasmatisch Reticulum

In het endoplasmatisch reticulum wordt een tetrasaccharide precursor,  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$ , opgebouwd op een dolichol-dragermolecule (Dol). De eerste stappen van deze pathway worden uitgevoerd aan cytosolaire zijde. De vorming van een glycosideverbinding is een energie-ongunstig proces. Daarom moeten de monosacchariden vooreerst geactiveerd worden door conjugatie tot nucleotide-suikers; UDP-GlcNAc en GDP-Man.



bepaald mechanisme zorgt ervoor dat terminaal misvouwen eiwitten toch afgebroken kunnen worden. Dit mechanisme omvat een laag-actief mannosidase dat een terminaal  $\alpha$ -1,6-mannoseresidu genereert (**Figuur 4**), dat een ligand is voor een welbepaald lectine, Yos9p (gist), dat een complex vormt met een retrotranslocon en ubiquitin-proteïne ligasen. Ubiquitinatie leidt uiteindelijk tot proteasomale afbraak



**Figuur 5: Endoplasmatisch reticulum gedeelte van de N-glycaanbiosynthese in gist, maar geconserveerd tot in mens.** Merk op dat de initiële stappen van de N-glycosylatiebiosynthese, t.e.m. glycosyltransferase Alg11p, gebeuren aan cytoplasmatische zijde. Daarna vindt een 'flip'-proces plaats. (OST) Oligoaccharyl transferase complex, (GLS) Glucosidase, (Man) Mannosidase. Figuur overgenomen uit Jacobs, 2008.

## B| In het Golgi-apparaat

Correct opgevouwen eiwitten bereiken het Golgi-apparaat en worden species- en celspecifiek gemodificeerd door een reeks van glycosidases en glycosyltransferases (**Figuur 6** - Jacobs, 2008). Golgi-glycosyltransferases zijn membraaneiwitten met een typische type-2 transmembraantopologie, d.i. één transmembranaire regio, de N-terminus aan cytoplasmatische zijde en de C-terminus is het katalytische domein. Deze enzymen gebruiken nucleotide-suikers (UDP-Gal, UDP-GlcNAc, GDP-Fuc en CMP-Sia) als geactiveerde suikermoleculen. Deze moeten getransporteerd worden binnenin het organel. Transport wordt verzorgd door antiporters die bijproducten van de glycosylatiereactie, de nucleosidemonofosfaten, als tweede substraat gebruiken.



---

## II| Glyco-engineering

---

‘Glyco-engineering’ is de gerichte manipulatie van glycoconjugaten en de synthese daarvan. De preliminaire kennis voor de opheldering van de glycaanbiosynthese kwam uit experimenten uitgevoerd door Stanley en collega’s. In deze experimenten werden grote hoeveelheden aan mutante CHO-cellijnen gegenereerd door selectie voor resistentie aan cytotoxische lectines. Een overzicht van al deze cellijnen zou ons veel te ver leiden, daarom wordt verwezen naar hun review (Patnaik & Stanley, 2006). Wel wordt een voor deze thesis interessante cellijn hier beschreven, nl. de HEK293 GnT<sup>-/-</sup>-cellijn en een voor deze thesis interessante technologie, nl. de GlycoDelete-technologie.

### 1| De HEK293S GnT<sup>-/-</sup>-cellijn

Rhodopsine, geproduceerd in een HEK293S-cel lijn, was zwaar en niet-uniform geglycosyleerd, waardoor kristallisatie van het eiwit niet mogelijk was. Er was op dat ogenblik nood aan een cel lijn die het eiwit van interesse zou produceren met kleinere en uniforme N-glycanen. Uit de N-glycosylatiepathway bleek N-acetylglucosaminyltransferase I (GnT1) het enzyme te zijn dat de diversiteit van N-glycanen kon initiëren. Door deze enzymactiviteit uit te schakelen zou men dus quasi exclusief N-glycanen krijgen van het type Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, met andere woorden zeer uniform en voldoende klein. Het genereren van een homozygote genknock-out in aneuploïde zoogdiercellen, zoals HEK293, was toen niet eenvoudig. Door middel van ethylmethaansulfonaat werden random mutanten gegenereerd en deze werden geselecteerd met het toxische lectine ricine. Ricine heeft een hoge affiniteit voor complex en hybride type glycanen met terminale β-Gal residu’s, maar bindt niet aan hoog mannose glycaanvormen. Een inactivatie van GnT1 leidt dus tot resistentie voor ricine, zoals eerder was aangetoond in CHO-cellen (Reeves *et al*, 2002).

### 2| De GlycoDelete-technologie

#### A| Rationale

Één aspect van ‘glyco-engineering’ is het genereren van nieuwe biologische systemen die eiwitten produceren met een gedefinieerd glycosylatiepatroon, door rationeel gebruik te maken van recombinante gentechnologie. Het produceren van eiwitten met gedefinieerd glycosylatiepatroon heeft vele toepassingen in verscheidene sectoren, met de biofarmaceutische industrie als voornaamste sector. Voor verschillende doeleinden is een verschillend glycosylatiepatroon nodig. Zo zorgt terminale sialylatie voor verhoogde bloedcirculatie tijd van glycoproteïnen (Byrne *et al*, 2007), terwijl hoog-mannosestructuren dan weer zorgen voor snelle klaring uit het lichaam (Goetze *et al*, 2011). Eiwitten met gefosforyleerde N-glycanen worden efficiënt getarget naar de lysosomen van cellen die de mannose-6-fosfaatreceptor expresseren (Tiels *et al*, 2012). Wanneer glycosylatie kan en mag vermeden worden, zal men het farmaceutische eiwit trachten te produceren in *E. coli*. *E. coli* blijft een zeer belangrijk productieorganisme omwille van de lange lijst aan voordelen (vb. snelgroeiend, best gekarakteriseerd modelorganisme, ...) tegenover de andere productiesystemen. Maar in dit bacteriële organisme kunnen veel biofarmaceutisch interessante eiwitten van eukaryote oorsprong (vb. antilichamen, ...) tot nu toe niet correct gevouwen worden (Baneyx & Mujacic, 2004). N-glycanen spelen namelijk een noodzakelijke,

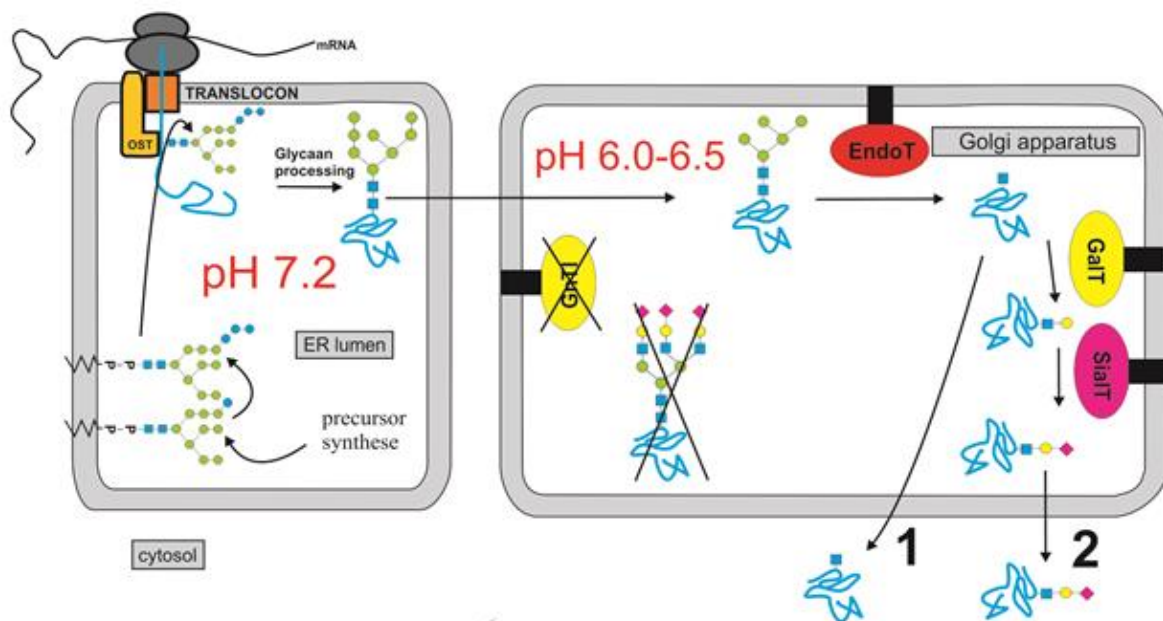


assisterende rol in de eiwitopvouwing. Hierdoor moet de biotechnoloog in meer dan de helft van de gevallen teruggrijpen naar de moeilijker hanteerbare zoogdiercellijnen die de biofarmaceutische eiwitten wel correct opvouwen door deze te modificeren op een manier vergelijkbaar met het menselijk post-translationele modificatie (PTM)-patroon. Het meest gebruikte zoogdierexpressiesysteem is Chinese Hamster Ovary (CHO)-cellen, maar ook Human Embryo Kidney (HEK293)-cellen worden vaak gebruikt (Chu & Robinson, 2001) & (Wurm, 2004). Een valabel alternatief zijn gistcellen waarvan het glycaanprofiel werd gehumaniseerd (Jacobs *et al*, 2009). De N-glycosylatiepathway is een aaneengeschakelde reeks van enzymen, elk met een bepaalde enzymatische efficiëntie (85-90%). Dit resulteert in een waaier aan intermediaire glycaanvormen (vaak isovormen) naast het verwachte eindproduct (glycaan microheterogeniteit). De meeste glycoproteïnen bevatten daarenboven meerdere N-glycosylatieplaatsen die niet altijd bezet worden, wat resulteert in zogenaamde 'glycaan macroheterogeniteit'. Deze inherente complexiteit verlaagt de efficiëntie van downstream processing, bemoeilijkt de reproduceerbare productie en validatie van het uiteindelijke biofarmaceutische eiwit en introduceert heterogeniteit, alsook vaak verminderde werking van het therapeuticum. Een concreet voorbeeld van verminderde therapeutische werking door glycosylatie zijn vaccins, bijvoorbeeld het influenza-vaccin. De nu beschikbare vaccins wekken een immuunrespons op tegen minder geconserveerde, snel evoluerende epitopen van het virus. Sterk geconserveerde epitopen zijn meestal afgeschermd van het immuunsysteem door lange, complexe glycaanstructuren. Er zijn sterke indicaties dat door verwijdering van deze glycaanstructuren hogere titers en mogelijk breder neutraliserende antilichamen kunnen opgewekt worden (Wang *et al*, 2009). Met andere woorden worden in vele toepassingen N-glycaanstructuren eerder gezien als een 'noodzakelijk kwaad' om proteïnen correct te laten opvouwen. De ontwikkeling van een eukaryoot productiesysteem dat geen of korte uniforme N-glycanen synthetiseert, maar toch proteïnen correct laat opvouwen, zou een zeer welgekomen 'tool' zijn voor de biofarmaceutische industrie. Ook voor zowat alle academische onderzoekslaboratoria opent deze technologie nieuwe perspectieven, bijvoorbeeld voor labo's die structureel biologisch onderzoek van eukaryote eiwitten verrichten.

## B| Strategie

Meerdere pogingen werden reeds ondernomen om N-glycosylatie op eiwitten te verhinderen of in te perken: toevoeging van chemische inhibitoren van de N-glycosylatie (vb. tunicamycin), mutagenese van de N-glycosylatiesites binnen de glycoproteïnesequentie of *in vitro/in vivo* behandeling met PNGaseF. De meeste van deze pogingen zijn gefaald omwille van te bruusk of te toxisch. N-glycosylatie heeft namelijk in het endoplasmatisch reticulum een noodzakelijke functie bij de eiwitopvouwing. Ook is gebleken dat N-glycanen bijdragen tot stabiliteit van het eiwit, meer bepaald het meest proximale GlcNAc-residu blijkt de minimale N-glycaanstructuur te zijn (Hanson *et al*, 2009). In ons lab ontwikkelden we recent een oplossing voor dit probleem, nl. de GlycoDelete-technologie. De GlycoDelete-technologie maakt gebruik van de stabiele overexpressie van het fungale endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidase T uit *Trichoderma reesei* (zie verder) in eukaryote celtypes die van nature of na engineering enkel hoog-mannose type N-glycanen kunnen produceren. Deze type glycanen zijn een substraat voor endoT. Voor zoogdiercellen werd deze technologie geïmplementeerd in de HEK293S GnT<sup>-/-</sup>-cellijn. Bijkomende redenen om voor endoT te kiezen waren zijn eukaryote oorsprong en een studie die aangetoond had dat in de gist

*Pichia pastoris* het enzyme in grote hoeveelheden stabiel kon worden geëxprimeerd (onpubliceerde resultaten). EndoT werd door middel van een signaalsequentie, afkomstig van humaan sialyltransferase I (hSialTI = CD75), naar het transGolgi-apparaat gelokaliseerd. Hierbij trachtte men te interfereren met de N-glycosylatie in het Golgi-apparaat, terwijl de N-glycosylatie in het endoplasmatisch reticulum grotendeels ongemoeid werd gelaten, zoals bleek uit een afwezigheid van inductie van de Unfolded Protein Response in de GlycoDelete-cellen. De HEK293SGlycoDelete-cel (verder ook HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT genoemd) bleek naast het GlcNAc monosaccharide ook nog GalGlcNAc di- en hoofdzakelijk het NeuNAcGalGlcNAc trisaccharide te genereren door enzymatische activiteit van galactosyltransferases en sialyltransferases (**Figuur 8**) (onpubliceerde resultaten).

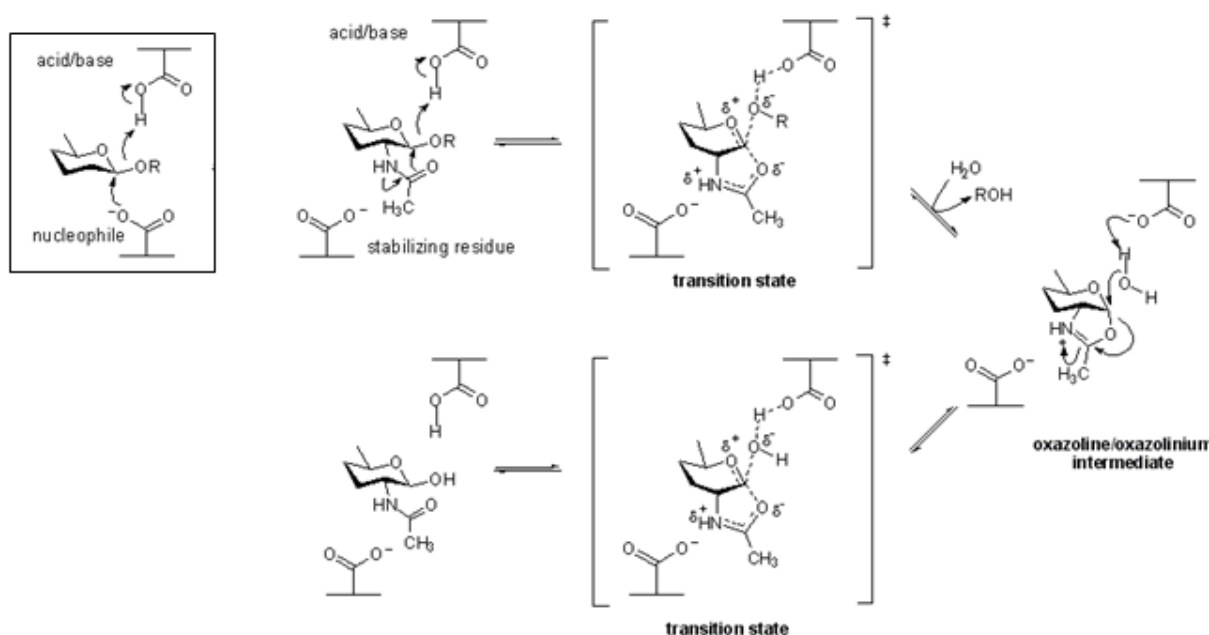


**Figuur 8: Schematische voorstelling van de de-N-glycosylatie activiteit van endoT in een HEK293 GnTI<sup>-/-</sup>-cel.** Pathway 1 resulteert in een GlcNAc monosaccharide, pathway 2 in een NeuNAcGalGlcNAc trisaccharide per N-glycosylatieplaats. Beperkte hoeveelheid GlcNAc monosaccharide en een GalGlcNAc disaccharide worden waargenomen door incomplete enzymatische conversies door de betrokken GalT- en SialT-glycosyltransferases (onpubliceerde resultaten)(Santens, 2010).

Recent werd door Henrik Clausen en collega's een zogenaamde SimpleCell-cel lijn ontworpen die zeer vereenvoudigde en verkorte mucine (GalNAc)-type-O-glycosylatie vertoonde (Steentoft *et al*, 2011). Combinatie van deze technologie met de bestaande GlycoDelete-technologie kan het mogelijk maken een GlycoDoubleDelete-cel lijn te genereren, die zowel deficiënt is in N-glycosylatie als O-glycosylatie.

### III| Endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidasen

Onder de enzyme-klasse van de hydrolasen (EC 3) vindt men de subklasse van de glycosylasen (EC 3.2). Hieronder vindt men de sub-subklasse van de glycoside hydrolasen (GH) of glycosidasen (EC 3.2.1). Deze laatste klasse is op basis van sequentiesimilariteit verder onderverdeeld in meerdere families. Endo-N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidasen (EC 3.2.1.96) (vanaf hier endoglycosidasen genoemd) behoren allemaal tot de families GH18 en GH85. Families kunnen op hun beurt gegroepeerd worden op basis van vergelijkbare 'enzyme-fold'. GH18 en GH85 behoren tot de GH-K clan, getypeerd door een  $(\alpha/\beta)_8$ -barrelstructuur. Endoglycosidasen zijn hydrolytische enzymen die de glycosideverbinding tussen de twee meest eiwit-proximale GlcNAc-residuen verknippen. De families GH18 en GH85 gebruiken een retaining-mechanisme waarbij de stereoconfiguratie ter hoogte van het anomere centrum wordt behouden. Meer bepaald gebruiken ze het mechanisme van 'Neighboring Group Participation' (**Figuur 9** - Website: Carbohydrate Active Enzymes, 2013). In dit mechanisme voorziet het enzyme een algemene zuurfunctie om de 'leaving group' te protoneren. In GH18 en GH85 is deze zuurfunctie een glutamaatresidu. Bij GH18 is dit glutamaatresidu echter aanwezig in een sterk geconserveerd domein, nl. D-X-X-D-X-D-X-E. Door gebrek aan een katalytisch nucleofiel wordt de 2-acetamidogroep (d.i. N-acetyl) gebruikt als intramoleculair nucleofiel. Dit leidt tot een oxazoline (of meer strikt oxazolinium ion) intermediair (Website: Carbohydrate Active Enzymes, 2013).



**Figuur 9: Het enzymatisch mechanisme van de glycoside hydrolasen, retaining neighbor group participation.**

De zuurfunctie hier getoond is een glutamaatresidu eigen aan GH18 en GH85. Het asparaatresidu (GH18) of asparagine-residu (GH85) heeft een stabiliserende functie en treedt niet op als nucleofiel, zoals bij het klassieke mechanisme (zie kader linksboven). Door gebrek aan een katalytisch nucleofiel wordt de 2-acetamidogroep (N-acetyl) gebruikt als intramoleculair nucleofiel. Figuur overgenomen en aangepast van Cazypedia, 2013.

Opmerkelijk is dat vele organismen, maar niet alle, waarin deze verschillende endoglycosidasen werden ontdekt, pathogenen zijn. Pathogenen staan steeds onder evolutionaire selectiedruk die adaptaties selecteert om hun gastheer te infecteren en er zo

lang mogelijk te resideren (door bijvoorbeeld te ontsnappen aan het immuunsysteem). Één van deze adaptaties blijkt de mogelijkheid voor verwijdering van N-glycanen op glycoproteïnen te zijn, door het secreteren van endoglycosidasen. Dit is niet abnormaal aangezien dat N-glycanen een modulerende functie kunnen hebben, denk maar aan een geconserveerd N-glycaan op humaan immunoglobuline G dat cruciaal is voor complementactivering en binding met de Fc-receptor (Collin & Olsén, 2001).

Een zo volledig mogelijk beeld van de substraatspecificiteit van enkele interessante endoglycosidasen wordt getoond in **Tabel 2**. Substraatspecificiteit blijkt primair gedetermineerd door het oligosaccharide, maar er is ook evidentie dat de structuur van het geglycosyleerde eiwit een rol kan spelen in de substraatherkenning (Website: Carbohydrate Active Enzymes, 2013). Herkenning van het substraat door de endoglycosidasen gebeurt ter hoogte van ‘loop’-structuren die de  $\alpha$ -helices en  $\beta$ -strands verbinden met elkaar. Deze loops zijn minder geconserveerd tussen de verschillende endoglycosidasen, maar zij vormen een groeve ter hoogte van het oppervlak van het enzyme (Rao *et al*, 1995).

De volgende endoglycosidasen worden besproken: endoH uit *Streptomyces plicatus* (Rao *et al*, 1995) & (Tarentino *et al*, 1974), endoS uit *Streptococcus pyogenes* (Collin & Olsén, 2001) & (Goodfellow *et al*, 2012), endoF2 en endoF3 uit *Flavobacterium meningosepticum* (Trimble & Tarentino, 1991) & (Tarentino *et al*, 1993) & (Waddling *et al*, 2000), endoBI-1 uit *Bifidobacterium infantis* (Garrido *et al*, 2012), endoT uit *Trichoderma reesei* (Stals *et al*, 2010) & (Stals *et al*, 2012) en endoM uit *Mucor hiemalis* (Fujita *et al*, 2004).

**Tabel 2: Substraatspecificiteit van enkele interessante endoglycosidasen.** (1) EndoH wordt niet gehinderd door core-fucosylatie. (2) EndoF2 wordt niet gehinderd door core-fucosylatie op biantennaire complex type N-glycanen. (3) EndoF3 heeft een hogere specifieke activiteit voor core-fucosylatie op biantennaire complex type N-glycanen. (4) EndoM wordt niet gehinderd door een bisecting GlcNAc-residu op hybride type N-glycanen (Website: GlycoPOD, 2012). (5) EndoBI-1 wordt niet gehinderd door core-fucosylatie op complex en hybride type N-glycanen (Garrido *et al*, 2012). (6) in onze onderzoeksgroep werd in ongepubliceerde experimenten recent aangetoond dat endoT hybride type N-glycanen hydrolyseert. (7) EndoS wordt niet gehinderd door core-fucosylatie (Goodfellow *et al*, 2012). Wel substraat (X), geen substraat (O). Illustraties van representatieve structuren voor de drie algemene types N-glycanen worden getoond.

N-glycaansubstraat →	Complex type			
	Hoog Mannose	Biantennair	Triantennair	Hybride type
◆ Sialic acid ● galactose ■ GlcNAc ● Mannose				
Endo↓				
EndoH (1)	X	O	O	X
EndoF2 (2)	X	X	O	O
EndoF3 (3)	O	X	X	O
EndoM (4)	X	X	O	X
EndoBI-1 (5)	X	X	X	X
EndoT (6)	X	O	O	X
EndoS (7)	O	X (enkel op IgG)	O	O

## 1| EndoT (GH18)

Endoglycosidase T is matuur  $\pm 32$  kDa groot en werd ontdekt in het species *Trichoderma reesei* (**Figuur 11 – 1**). *T. reesei* is een fungus die voorkomt in de bodem en groeit bij 20-30°C. Deze fungus wordt in de industrie gebruikt voor productie van cellulasen en hemicellulasen (Lynd *et al*, 2002). EndoT was het eerst ontdekte endoglycosidase van fungale oorsprong in familie 18 van de glycoside hydrolasen. N-glycanen die als substraat dienen voor het eiwit zijn oligogemannosyleerde, gefosforyleerde en hypergemannosyleerde glycoproteïnen. Complex type N-glycanen zijn geen substraat. De de-N-glycosylatie activiteit van endoT werd getest bij pH 5 en 25 °C (Stals *et al*, 2010).

## 2| EndoF2 (GH18)

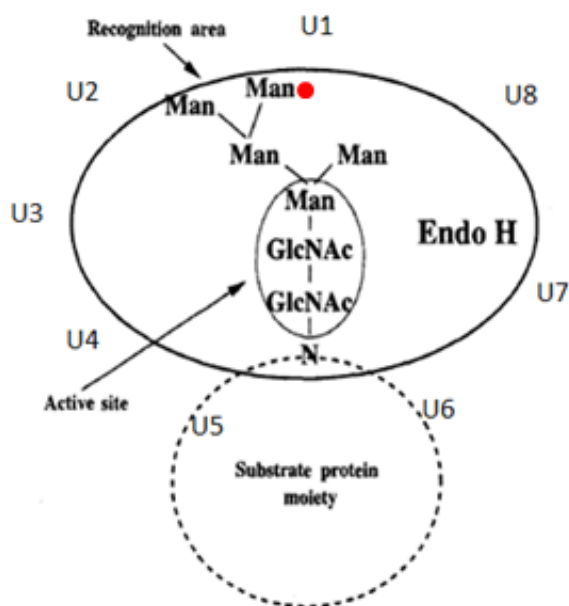
Endoglycosidase F2 is matuur  $\pm 32$  kDa groot en werd ontdekt in het species *Flavobacterium meningosepticum*. Dit is een Gram-negatieve bacterie geassocieerd met meningitis en sepsis. De bacterie bevat meerdere endoglycosidasen, nl. endoF1, endoF2 en endoF3. Deze vertonen echter een lage sequentiesimilariteit, endoF2 vertoont 20% met endoF3 en slechts 15% met endoF1, behalve ter hoogte van een bepaalde korte regio, specifiek voor de familie 18 van de glycoside hydrolasen (Waddling *et al*, 2000). Ook het amidase PNGaseF is afkomstig uit *F. meningosepticum*. Het amidase PNGaseF knipt tussen het meest eiwitproximale GlcNAc-residu en het asparagine, wat geen glycosideverbinding is (Trimble & Tarentino, 1991). EndoF2 heeft hoog-mannose en complex, biantennaire N-glycanen als substraat (Tarentino *et al*, 1993). Het enzyme vertoont een maximale activiteit bij pH 4,5 en bij een temperatuur van 37°C.

## 3| EndoF3 (GH18)

Endoglycosidase F3 is matuur  $\pm 31$  kDa groot en werd ontdekt in het species *Flavobacterium meningosepticum*. EndoF3 heeft complex bi- en triantennaire N-glycanen als substraat (Tarentino *et al*, 1993). Het enzyme vertoont een maximale activiteit bij pH 4,5 en bij een temperatuur van 37°C. De eiwitstructuur van endoF3, zeer gelijkend op endoT, werd opgehelderd en bestudeerd. **Figuur 11 - 3** geeft een vergelijking tussen endoF3, endoT en endoH. Een verschillende 'fold' en aminozuurcompositie werd gezien ter hoogte van de oligosaccharide-herkenningsplaats. Hierdoor kan gespeculeerd worden waarom de substraatspecificiteit van deze drie enzymen verschilt. Verrassend is dat geen carbohydraat-eiwit contacten nodig zijn na de trimannosylcore, wat de substraatspecificiteit zou kunnen verklaard hebben. De specificiteit van endoF3 blijkt niet gedetermineerd te worden door carbohydraat-eiwit interacties uniek voor bi- en triantennaire complex type glycanen maar eerder door sterische exclusie van de andere types glycanen (Waddling *et al*, 2000).

## 4| EndoH (GH18)

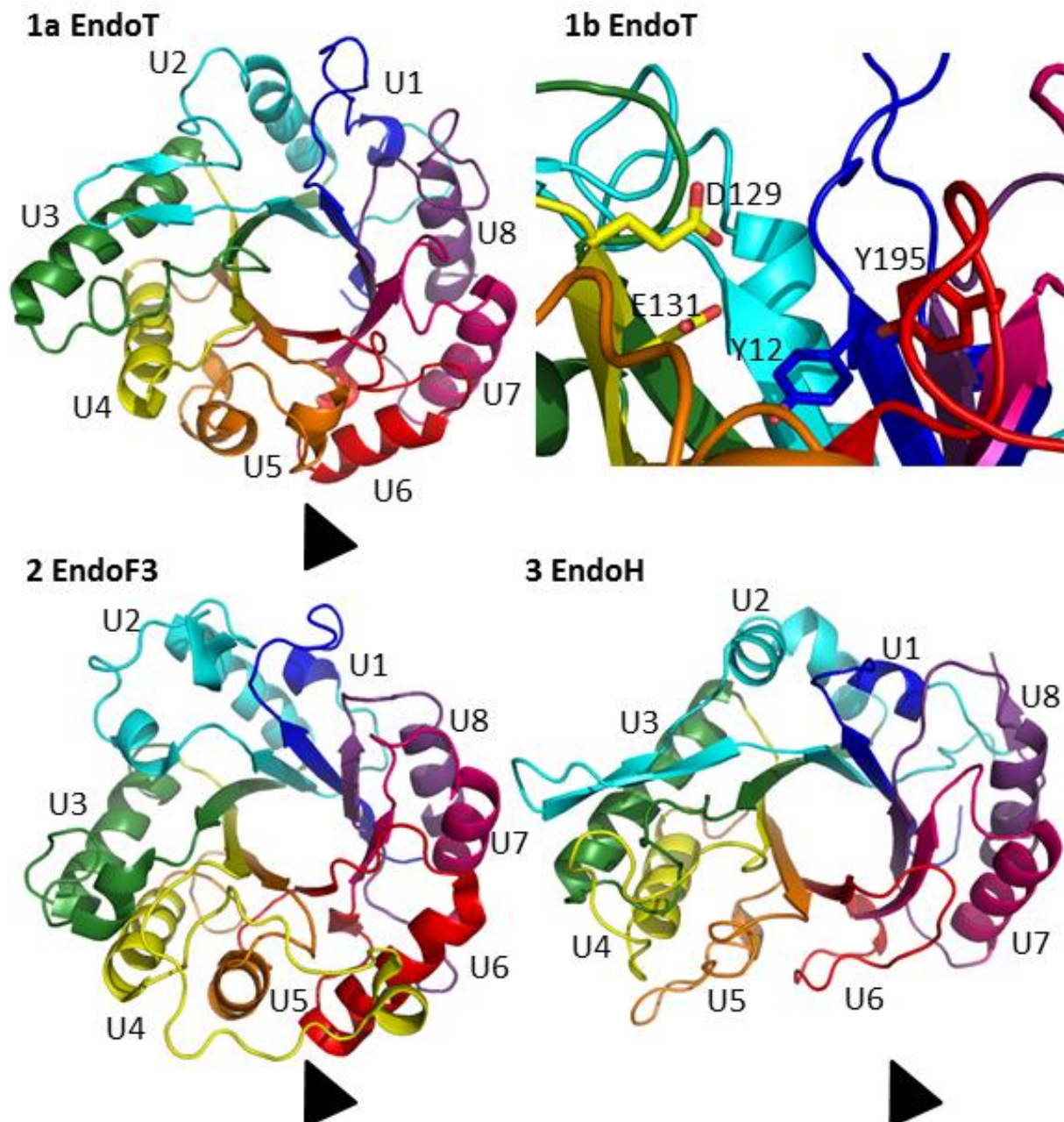
Endoglycosidase H is matuur  $\pm 29$  kDa groot en werd ontdekt in het species *Streptomyces plicatus*. EndoH is het best bestudeerde endoglycosidase en wordt vaak gebruikt als reagens in glycoproteïne-onderzoek. Het enzyme heeft hoog-mannose type en hybride type N-glycanen als substraat. Het minimale substraat voor hydrolytische activiteit is  $-Man\alpha(1-3)/[Man\alpha(1-6)]Man\beta(1-4)GlcNAc\beta(1-4)GlcNAc-Asn$ .



**Figuur 10:** Schematische voorstelling carbohydratebinding met endoH. Het glycoproteïnesubstraat bindt in een groeve startend van unit 5 en 6 en eindigend bij unit 1 en 2. Een unit bestaat uit N-terminale loop,  $\beta$ -strand, C-terminale loop en  $\alpha$ -helix. De voor endoH essentiële  $\alpha(1-3)$ -mannose werd aangeduid met een rode stip. Figuur overgenomen en aangepast uit Rao *et al*, 1995.

Het  $\alpha(1-3)$ -gebonden mannose (gedrukt in cursief in de tekst en aangeduid met een rode stip in **Figuur 10** (Rao *et al*, 1995) is niet aanwezig in complex type N-glycanen en is absoluut nodig voor de-N-glycosylatie activiteit. EndoH vertoont een maximale activiteit bij pH 5,5 en bij een temperatuur van 37°C. EndoH is zeer gelijkaardig aan endoF1 (niet besproken), niet alleen in substraatspecificiteit en enzymkinetische parameters, maar ook in eiwit-‘fold’, met een maximum rms-displacement van 1,07Å tussen de  $\alpha$ -koolstofatomen uit de  $\beta$ -barrel. Zoals bij endoH (**Figuur 11 - 2**) bevat loop 2 van endoF1 een  $\beta$ -hairpinstructuur en zijn loop 5 en 6 zeer kort omdat  $\alpha 5$  en  $\alpha 6$  afwezig zijn. Hierdoor ontstaat een depressie ter hoogte van de rand van de  $\beta$ -barrel, m.a.w. een groeve beginnend bij loop 5 en 6 en eindigend bij loop 1 en 2. Het enige grote verschil tussen endoH en endoF1 is de lengte van loop 7, deze is namelijk langer bij endoF1 en zorgt voor sterische hinder bij het afklieven van N-glycaanstructuren met een  $\alpha(1-6)$ -gebonden fucose-residu. EndoH ondervindt geen probleem van een  $\alpha(1-6)$ -gebonden fucose-residu, terwijl de activiteit van endoF1 op  $\alpha(1-6)$ -gefucosyleerde glycanen 50 maal lager is dan de activiteit van endoH op deze glycanen (Rao *et al*, 1995).

**Figuur 11:** (volgende pagina) (1a) cartoon-presentatie van endoT (PDB ID 4AC1), (1b) close-up actieve site van endoT, (2) cartoon-presentatie van endoF3 (PDB ID 1EOK), (3) cartoon-presentatie van endoH (PDB ID 1EDT). (1a, 2, 3) Bovenaanzicht op de C-terminale zijde van het enzyme. Endoglycosidasen bezitten een  $(\alpha/\beta)_8$ -barrelstructuur met aan N-terminale zijde korte loops en aan C-terminale zijde langere loops. Aan C-terminale zijde bevindt zich de substraatbindingsplaats, vandaar de langere loops aan deze zijde. Units werden aangeduid in dezelfde kleur: U1 (donkerblauw), U2 (cyaanblauw), U3 (groen), U4 (geel), U5 (oranje), U6 (rood), U7 (roos) en U8 (paars). Elke unit bestaat uit een N-terminale loop, een  $\beta$ -strand, een C-terminale loop en een  $\alpha$ -helix. Ter hoogte van unit 2 wordt een verschil opgemerkt tussen enerzijds endoT en endoH en anderzijds endoF3. De C-terminale loop van unit 2 van endoF3 bestaat uit twee  $\alpha$ -turns en niet uit de meer geconserveerde  $\beta$ -hairpinstructuur, die gezien wordt bij zowel endoT als endoH. Unit 2 speelt een belangrijke rol in oligosaccharidebinding en structuurverschillen hier kunnen wijzen op verschillen in substraatspecificiteit. Ter hoogte van unit 5 en 6 wordt een tweede verschil opgemerkt nu tussen enerzijds endoT en endoF3 en anderzijds endoH (aangeduid met een pijlpunt). Bij endoH zijn de  $\alpha$ -helices afwezig waardoor de structuur hier minder dicht is dan bij endoT en endoF3. Gespeculeerd wordt dat endoH hierdoor enerzijds grotere glycoproteïnesubstraten kan binden en anderzijds sneller N-glycanen kan verwijderen omwille van minder sterische hinder. (1b) De actieve site van het endoT-enzyme ligt in een groeve met zowel links als rechts de ‘wanden’ van deze groeve. De katalytische residuen, E131 en D129 en enkele stabiliserende residuen, Y12 en Y195 worden getoond. Kristalstructuren werden gevisualiseerd in Pymol en secundaire structuren werden handmatig toegekend aan de hand van Stals *et al*, 2012.



## 5| EndoBI-1 (GH18)

Endoglycosidase BI-1 is matuur ±56 kDa groot en werd ontdekt in het species *Bifidobacterium longum subsp. infantis*. Deze bacteriën komen voor in het spijsverteringsstelsel van neonaten. *B. infantis* verwijdert door middel van zijn endoBI-1 N-glycanen aanwezig op eiwitten uit moedermelk en gebruikt deze suikers als koolstofbron. N-glycanen die als substraat dienen zijn zeer variabel. Het enzyme is actief tegen alle grote types N-glycanen en wordt niet gehinderd door core/vertakkings-fucosylatie, sialylatie of aantal vertakkingen. Het enzyme vertoont een maximale activiteit bij pH 5 en bij een temperatuur tussen 30-45°C, maar is resistent aan temperaturen tot 95°C (Garrido *et al*, 2012).

## 6| EndoM (GH85)

Endoglycosidase M is 85 kDa groot en werd ontdekt in *Mucor hiemalis*. *M. hiemalis* is een fungus die planten infecteert en groeit bij 25-30°C. EndoM is een vertegenwoordiger van familie 85 van de glycoside hydrolasen. Het is waarschijnlijk een cytosolisch enzyme en voert eerder een transglycosylatiereactie uit dan een endoglycosidasereactie. Transglycosylatie is het verplaatsen van suikerresiduen van het ene glycoside naar een ander glycoside. Een glycoside is opgebouwd uit een suiker (het glycon) en een niet-suiker (het aglycon). N-glycanen die als substraat dienen zijn van het hoog-mannose, biantennair complex en hybride type. Een bisecting GlcNAc-residu op hybride type glycanen hindert de de-N-glycosylatie activiteit van endoM niet (Fujita *et al*, 2004). Het enzyme vertoont een maximale activiteit bij pH 6 en bij een temperatuur van 30°C.

## 7| EndoS (GH18)

Endoglycosidase S is matuur ±108 kDa groot en werd ontdekt in het species *Streptococcus pyogenes*. Deze is een belangrijke pathogeen van de mens en omzeilt het immuunsysteem van de gastheer door middel van virulentiefactoren. EndoS is één van die factoren en verwijdert specifiek de N-glycanen aanwezig op immunoglobuline G die van het biantennair complex type zijn, al dan niet met core-fucosylatie. Afwezigheid van deze glycanen verhindert activatie van het complementsysteem, binding aan de Fc-receptoren op macrofagen en inductie van antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Het enzyme vertoont een maximale activiteit bij pH 7,4 en bij een temperatuur van 37°C, omstandigheden in humaan serum (Collin & Olsén, 2001).



---

## IV| Test-glycoproteïnen

---

Bij de keuze van de eerste test-eiwitten voor de ontwikkeling van een 'glyco-engineering' technologie stellen we enkele voorwaarden. Vanzelfsprekend moeten substraatglycanen aanwezig zijn, maar liefst slechts een paar op een dragereiwit (<50 kDa). Bij verwijdering van het glycaan wensen we immers een daling in moleculair gewicht te kunnen detecteren op SDS-PAGE. Het eiwit moet zich makkelijk laten manipuleren (vb. gesecreteerd of makkelijk te extraheren, makkelijk te overexpresseren, ...). Er mag ook geen interferentie optreden met inherent geproduceerde eiwitten. Een farmaceutische waarde is een pluspunt.

### 1| Humaan Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (hGM-CSF)

Humaan granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is een cytokine. Het stimuleert groei en differentiatie van de hematopoëtische progenitorcellen van granulocyt-, macrofaag-, eosinofiel- en erythrocyt-cellijnen (Metcalf, 1986). Natuur hGM-CSF is 127 aminozuren lang en heeft een moleculaire massa van 14,5 kDa. Het eiwit wordt gesynthetiseerd als een 144 aminozuren lange precursor met een N-terminaal secretiesignaal. hGM-CSF bevat twee N-glycosylatiesites en twee of drie O-glycosylatiesites (Forno *et al*, 2004). hGM-CSF wordt in de klinische sector gebruikt bij myelodysplastische syndromen, verworven immunodeficiëntie syndromen, chemotherapie-geïnduceerde myelosuppressie en beenmerg transplantatie (Walter *et al*, 1992). Het eiwit is ook een effectief adjuvans in proteïne- en peptide-gebaseerde vaccins (Disis *et al*, 1996).

### 2| Humaan Interleukine 22 (hIL-22)

Humaan interleukine 22 is eveneens een cytokine en wordt geproduceerd door dendritische cellen en geactiveerde T-cellen. Het is een essentiële mediator van mucosale immuniteit tegen extracellulaire bacteriën in de longen en het spijsverteringsstelsel (Laurence *et al*, 2008). Natuur hIL-22 is 145 aminozuren lang en heeft een moleculaire massa van 17 kDa. Het eiwit wordt gesynthetiseerd als een 179 aminozuren lange precursor met een N-terminaal secretiesignaal. Het bevat 3 mogelijke N-glycosylatiesites. Tot op heden zijn geen potentiële O-glycosylatiesites gevonden, echter werd wel evidentie gevonden in ons lab dat muis IL-22 geproduceerd in *Pichia pastoris* ge-O-mannosyleerd wordt (ongepubliceerde resultaten). hIL-22 heeft mogelijk klinische waarde als een nieuwe behandeling voor hepatitis (Zenewicz *et al*, 2007), gastroenteritis (Sugimoto *et al*, 2008) en bacteriële pneumonia (Aujla *et al*, 2008). Chronisch gebruik van hIL-22 is mogelijks niet zonder gevaar. hIL-22 induceert anti-apoptotische signalisatie in epitheliale cellen via activatie van STAT3 (Pickert *et al*, 2009). Deze signalisatie is ongewenst bij auto-immuunziektes, zoals psoriasis (Boniface *et al*, 2007) en zou in chronische inflammatoire context pro-oncogen kunnen zijn.

### 3| Anti-Cluster of Differentiation 20 humaan Immunoglobuline G ( $\alpha$ CD20-hIgG)

$\alpha$ CD20-hIgG, meer bepaald Obinutuzumab (GA101) van Genentech, is een monoklonaal antilichaam (mAb) gericht tegen CD20. CD20 werd eerst ontdekt als een celmerker voor B-cellen, maar is vooral interessant gebleken als een target voor mAb-immunotherapie van B-

cel lymfoma. Tot recent was de functie van CD20 heel obscuur, maar vele studies wijzen op een biologische rol als versterker van calcium-signalisatie die geïnitieerd werd door de B-celreceptor (BCR) tijdens antigenherkenning door immature en mature B-cellen (Alduaij *et al*, 2011).  $\alpha$ CD20-hlgG is een antilichaam, bestaande uit twee lichte en twee zware ketens. Elke lichte keten heeft een moleculaire massa van 25 kDa en elke zware keten een moleculaire massa van 50 kDa. De zware keten bevat één N-glycosylatiesite, op het C<sub>H</sub>2-domein, die geconserveerd is in alle antilichamen, namelijk Asn297. Glycosylatie van dat asparagineresidu speelt een grote rol bij de IgG-functionaliteit. Bijvoorbeeld, het ontbreken van een core-fucose verhoogt de antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC)-activiteit 10- tot 100-voudig *in vitro* (Kanda *et al*, 2007).

Obinutuzumab is reeds gevorderd tot fase 3 van de klinische studie als behandeling voor chronische lymfatische leukemie (CLL). Het is een type II mAb, anders dan de huidige en eerste behandeling met Rituximab, dat een type I mAb is. Het verschil zit in de manier waarop het antilichaam celdood veroorzaakt. Type I zorgt voor complement-dependent cytotoxicity (CDC), terwijl type II efficiënt programmed cell death (PCD) uitlokt. Beide types induceren ook ADCC-activiteit (Glennie *et al*, 2007).

# DOELSTELLING

De GlycoDelete-technologie die recent ontwikkeld werd in de 'medische biotechnologie'-eenheid van het lab biedt de mogelijkheid om recombinante eiwitten te produceren met kleinere, uniforme N-glycanen zonder te interfereren met de correcte opvouwing van deze eiwitten. Bezetting van recombinante eiwitten met kleinere, uniforme N-glycanen heeft vele toepassingen. In de biofarmaceutische sector zou dit de efficiëntie van downstream processing verhogen en de reproduceerbare productie en validatie van het uiteindelijke biofarmaceutische eiwit vergemakkelijken. Bovendien biedt een kleine, uniforme N-glycaanstructuur een bouwplatform om de functionaliteit van biofarmaceutica verder te moduleren. Ook in vele academische onderzoekslaboratoria opent deze technologie nieuwe perspectieven, bijvoorbeeld in labo's die structureel biologisch onderzoek van eukaryote eiwitten verrichten.

De GlycoDelete-technologie behoudt de opbouwings-katalyserende functie van N-glycanen, inherent aan het endoplasmatisch reticulum. Maar er wordt een endoglycosidase gebruikt om in het Golgi-apparaat de N-glycanen drastisch in te korten. Deze technologie is afhankelijk van het gebruikte endoglycosidase, waarbij het glycaanprofiel van de te engineeren cel eerst moet aangepast worden aan de substraatspecificiteit van het gebruikte endoglycosidase. De technologie gebruikt tot nog toe het endoT uit *T. reesei* in een GnTI knock-out achtergrond, waardoor alle suikerstructuren van het oligomannose type zijn en daardoor substraat zijn voor endoT. Momenteel beperken deze vereisten nog de versatiliteit van de technologie. Concreet, deze GnTI-inactivering is niet eenvoudig en het is tijdrovend en zeker niet optimaal om deze uit te voeren in elke biofarmaceutische productie-cel lijn. Een bijkomend probleem is dat endoT in sommige gevallen niet alle oligomannose glycanen, hoewel toch een geschikt substraat, verwijdert (vb. hIL-22 bevat zo een endoT-recalcitrante N-glycosylatieplaats, wellicht ten gevolge van sterische hinder ter hoogte van dergelijke glycosylatiesites).

Het doel van deze thesis is het exploreren welke endoglycosidasen de versatiliteit en universele inzetbaarheid van de GlycoDelete-technologie kunnen verbeteren. Deze kennis en de daarbij ontwikkelde toolbox aan expressievectoren moet het mogelijk maken de ontwikkelde technologie gebruiksvriendelijker en performanter te maken. De toolbox zal een reeks genetische constructen bevatten waaruit kan gekozen worden om de gewenste cel lijn mee te transfecteren opdat deze het gewenste eiwit produceert met kleine, uniforme N-glycanen.

Concreet zal de de-N-glycosylatie activiteit van verschillende endoglycosidasen getest worden op verschillende glycoproteïnesubstraten. Deze endoglycosidasen zijn afkomstig uit verschillende organismes, nl. endoH uit *Streptomyces plicatus*, endoS uit *Streptococcus pyogenes*, endoF2 en endoF3 uit *Flavobacterium meningosepticum*, endoBI-1 uit *Bifidobacterium infantis* en endoM uit *Mucor hiemalis*. Deze endoglycosidasen hebben een gelijkaardig enzymatisch werkingsmechanisme, maar verschillende substraatspecificiteit en verschillende enzymkinetische parameters dan endoT. De substraten die zullen gebruikt worden zijn hGM-CSF, een biofarmaceutisch interessant glycoproteïne, hIL-22, een endoT-recalcitrante N-glycosylatiesite bevattend eiwit en een antilichaam gericht tegen CD20 ( $\alpha$ CD20-hIgG), omdat antilichamen veruit de meest geproduceerde therapeutische eiwitten zijn van dit moment.

Verwacht wordt een antwoord te bekomen op de vragen:

- Kunnen de in deze thesis gekozen endoglycosidasen, vooral van bacteriële oorsprong, functioneel geëxprimeerd worden in een eukaryote achtergrond, nl. HEK293?
- Met welke andere endoglycosidasen is de GlycoDelete-technologie nog compatibel? En zijn er endoglycosidasen die een meer complete de-N-glycosylatie uitvoeren dan endoT?
- Kan het gebruik van één of meerdere van deze endoglycosidasen ertoe leiden dat de GlycoDelete-technologie rechtstreeks toegepast kan worden op zoogdiercellijnen met natuurlijke complex type glycosylatie?

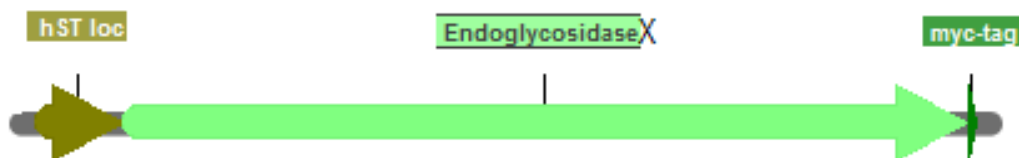
# RESULTATEN

# I| Constructie expressieplasmiden

## 1| Endoglycosidasen

### A| *In silico* gendesign

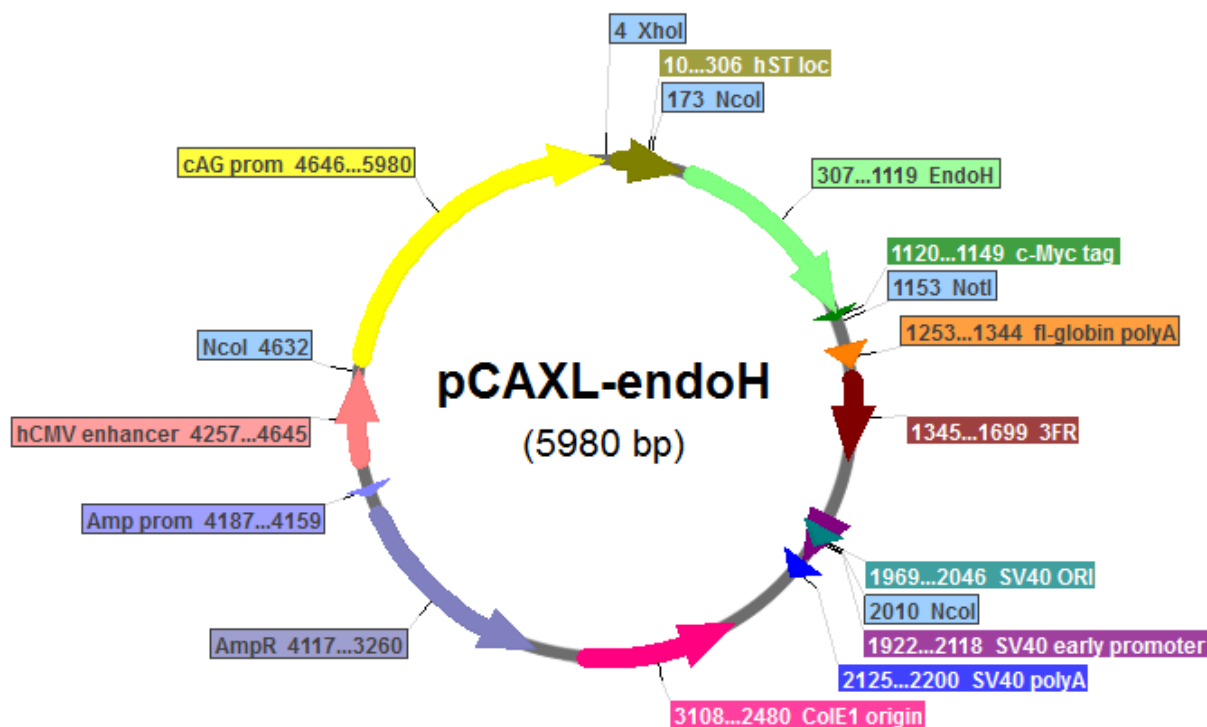
Voor de constructie van de genexpressieconstructen kon een strategie analoog aan deze gebruikt in de ontwikkeling van de GlycoDelete-technologie gevolgd worden. In de GlycoDelete-technologie werd namelijk, zoals eerder vermeld, endoT gebruikt. Eerst werden de wild-type endoglycosidase-sequenties geëxtraheerd uit de UniProtKB-database. Verschillende annotaties, zoals signaalsequentie-informatie, werden reeds aangebracht in de UniProtKB-database. Deze informatie leerde ons dat alle endoglycosidasen, behalve endoM, een N-terminale signaalsequentie bezitten. Extra werd diezelfde N-terminale signaalsequentie voorspeld door gebruik van SignalP, maar deze informatie bleek minder accuraat. Hoe verder downstream in de signaalsequentie en dus hoe dichterbij de coderende sequentie aan, hoe moeilijker deze ‘tools’ het namelijk hebben een statistisch significant resultaat te genereren. Deze signaalsequentie is een signaal voor secretie en moet vervangen worden door een signaal voor lokalisatie naar het Golgi-apparaat. N-terminaal werd het transmembranair signaalanker van het humaan sialyltransferase I (hSialTI = CD75), een transGolgi-apparaat enzyme, toegevoegd. Om detectie van eiwitexpressie van het endoglycosidase te vergemakkelijken werd C-terminaal een myc-tag toegevoegd (**Figuur 12**). De complete sequenties zijn te vinden in de sectie ‘Bijlagen bij RESULTATEN’.



**Figuur 12: Gendesign van endoglycosidasen.** EndoglycosidaseX is een verzamelnaam voor de bestudeerde endoglycosidasen, dus endoBI-1, endoF2, endoF3, endoH, endoM, endoS en endoT. Een lokalisatiesignaal naar het transGolgi-apparaat afkomstig van humaan sialyltransferase I (hST loc) werd N-terminaal toegevoegd. C-terminaal werd een myc-tag toegevoegd voor het makkelijker detecteren van endoglycosidase-expressie.

### B| Expressievector

EndoT werd vroeger, tijdens de ontwikkeling van de GlycoDelete-technologie, gekloneerd in het pCAGGS-plasmide. EndoBI-1, endoF2, endoF3, endoH en endoM werden na gensynthese (Genscript) gekloneerd in de pCAXL-vector, een afgeleide van de pCAGGS-vector (verkregen van het labo van prof. dr. Xavier Saelens) (**Figuur 13**). Het enige verschil tussen beide vectoren is de aanwezigheid van een NotI-restrictiesite in plaats van een Bsu36I-restrictiesite. Een synthetisch gen voor endoS was beschikbaar in ons labo, maar was gekloneerd in een pUC57-vector, wat geen expressievector is. EndoS was dus het enige endoglycosidase dat nog overgekloneerd moest worden naar een geschikte expressievector, bijvoorbeeld de pCAGGS- of pCAXL-vector (zie sectie ‘Bijkomende resultaten – klonering endoS’).



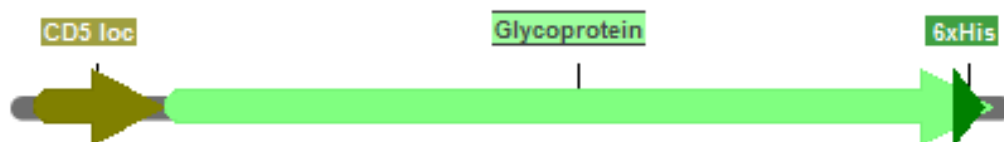
**Figuur 13: Plasmidemap pCAXL-vector met endoglycosidase, hier endoH.** (hST loc) humaan sialyltransferase I transGolgi lokalisatiesignaal, (endoH) gen van interesse: endoglycosidase H, (c-Myc tag) tag afkomstig van het myc-eiwit voor detectie van endoglycosidase-expressie, (fl globin polyA) polyA-terminatiesequentie van het konijn  $\beta$ -globine gen, (3FR) 3' flanking regio van het  $\beta$ -globine gen, (SV40 ori/SV40 early promoter) ori en overlappende promotor van het SV40-virus, wordt gebruikt voor plasmideamplificatie in zoogdiercellen door middel van toevoeging van het SV40 large T-antigen, (SV40 polyA) polyA-terminatiesequentie van het SV40-virus, (colE1 origin) ori voor amplificatie in *E. coli*, (Amp prom) promotor van het ampicillineresistentiegen, (AmpR) ampicillineresistentiegen, (hCMV enhancer) enhancersequentie afkomstig van het humaan cytomegalovirus dat zorgt voor betere transcriptie, (cAG prom) chicken  $\beta$ -actine promotor. Het gen van interesse werd gekloneerd met de restrictiesites XhoI en NotI. Controle restrictiedigest werd uitgevoerd met NcoI.

## 2| Test-glycoproteïnen

### A| *In silico* gendesign

Voor de ontwikkeling van een 'glyco-engineering' technologie moet een test-glycoproteïne vanzelfsprekend N-glycaansubstraten bevatten, maar moet het ook makkelijk te detecteren zijn. Daarom werd bij de hIL-22-sequentie, zonder eigen signaalsequentie (verkregen van drs. Bram Laukens), N-terminaal het secretiesignaal van het humaan CD5-gen toegevoegd zodat het geproduceerde eiwit in het medium gesecreteerd werd. C-terminaal werd een 6xHis-tag toegevoegd om detectie van het test-glycoproteïne na transfectie te vergemakkelijken (**Figuur 14**). Het hGM-CSF-gen werd geëxprimeerd met de native signaalsequentie en voorzien van een C-terminale 6xHis-tag. De DNA-sequentie van  $\alpha$ CD20-hlgG is intellectuele eigendom van NovImmune en dus confidencieel.

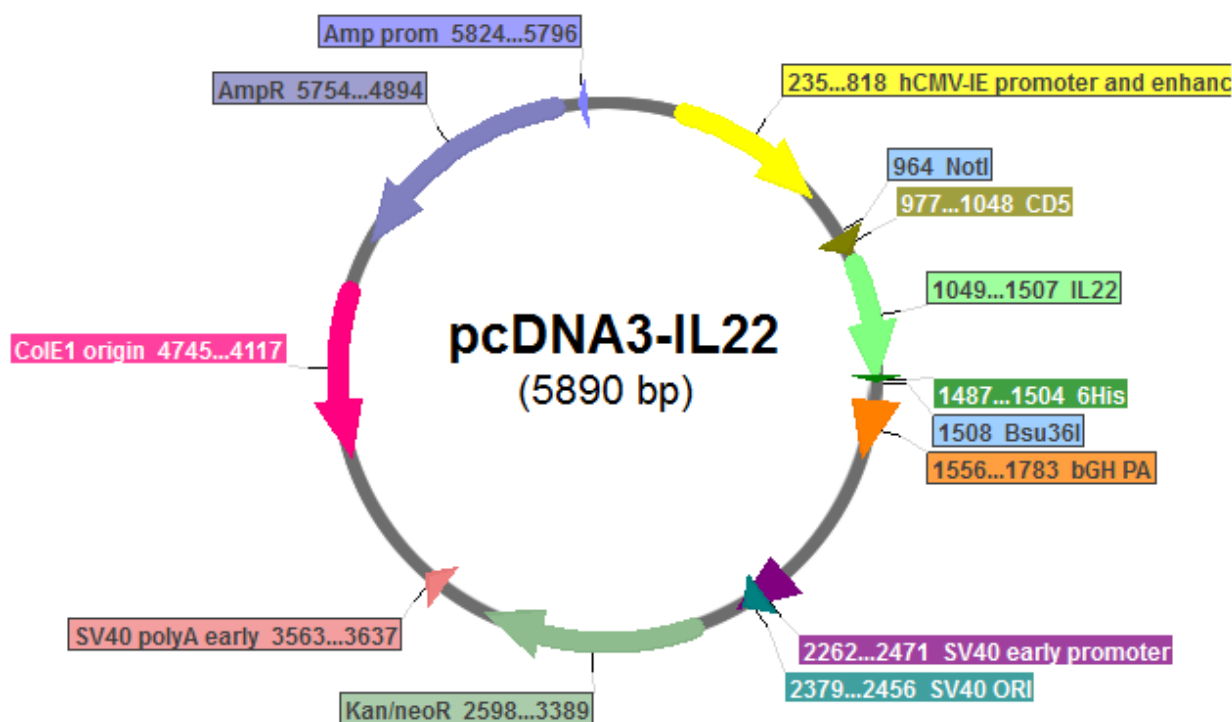




**Figuur 14: Gendesign van test-glycoproteïnen.** Glycoproteïne staat voor hGM-CSF, hIL-22 of  $\alpha$ CD20-hIgG. Een secretiesignaal afkomstig van CD5 (CD5 loc) werd N-terminaal toegevoegd aan de gensequentie van hIL-22 zonder signaalsequentie. C-terminaal werd een 6xHis-tag toegevoegd aan zowel hGM-CSF en hIL-22 voor het makkelijker maken van detectie van glycoproteïne-expressie. De sequentie van  $\alpha$ CD20-hIgG is intellectuele eigendom van NovImmune en dus confidentieel.

## B| Expressievector

De hGM-CSF-sequentie werd vroeger, tijdens de ontwikkeling van de GlycoDelete-technologie, gekloneerd in de pcDNA3-vector. hIL-22 werd na gensynthese (Genscript) gekloneerd in de pcDNA3-vector (**Figuur 15**). De expressievector, waarin  $\alpha$ CD20-hIgG is gekloneerd, is intellectuele eigendom van NovImmune en dus confidentieel.



**Figuur 15: Plasmidemap pcDNA3-vector met test-glycoproteïne, hier hIL-22.** (CD5) secretiesignaal van het hCD5-gen, (IL-22) gen van interesse: humaan interleukine 22 zonder eigen signaalsequentie, (6His) tag voor detectie van glycoproteïne-expressie bestaande uit zes codons voor het aminozuur histidine, (bGH PA) polyA-terminatiesequentie van het rund groeihormoon gen, (Kan/neoR) resistentiegen tegen de antibiotica kanamycine en neomycine, (hCMV-IE promoter and enhanc) promoter en enhancersequentie afkomstig van humaan cytomegalovirus (van de immediate early genen). Het gen van interesse werd gekloneerd met de restrictiesites XhoI en Bsu36I.

## II| Analyse activiteit van de endoglycosidasen via transiënte cotransfectie

### 1| Optimalisering

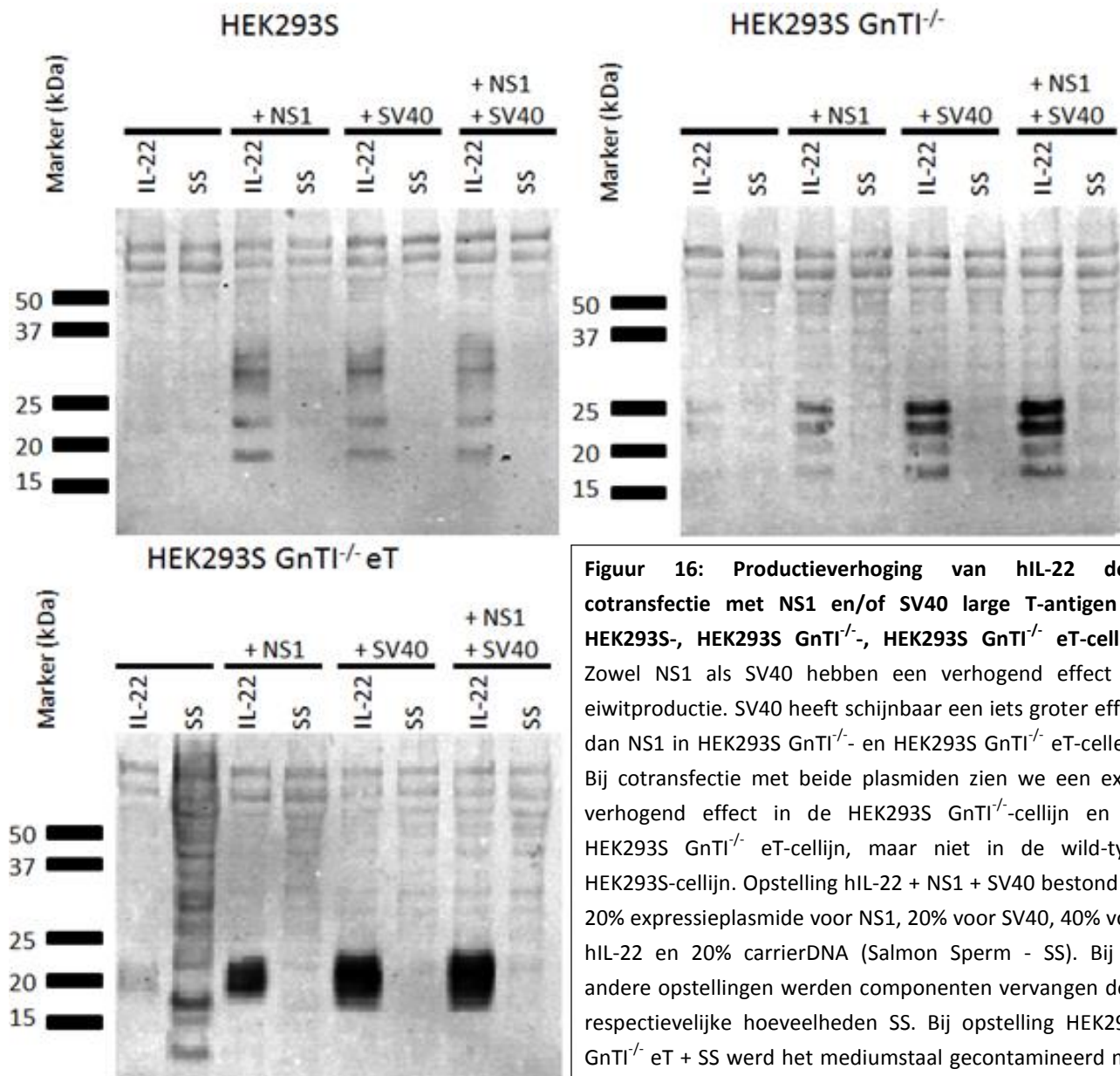
De de-N-glycosylatie activiteit van de verschillende endoglycosidasen werd geanalyseerd door deze transiënt te transfecteren samen met een test-glycoproteïne. Elk van deze transiënte cotransfectie-experimenten (zie secties 'αCD20-hIgG', 'hGM-CSF', 'hIL-22') werd minimaal tweemaal succesvol uitgevoerd. Ook werden tijdens de uitvoering van deze experimenten enkele experimentele tussenstappen in het protocol geoptimaliseerd. Sommige optimalisaties werden meteen geïmplementeerd in de cotransfectie-experimenten, maar andere kunnen handig zijn in de toekomst:

- 1) Meerdere problemen werden opgemerkt bij de calciumfosfaattransfectiemethode: batch-afhankelijke transfectie-efficiëntie (veelal een lage efficiëntie) en achterblijven van precipitaat met celdood tot gevolg. In de toekomst kan overgeschakeld worden naar lipofectie met FuGENE® HD reagent.
- 2) Eiwitproductie in serumbevattend medium zorgde voor interferentie met het signaal op western blot voor de test-eiwitten, waardoor geen interpretatie van de resultaten mogelijk was. Deze interferentie werd gezien als een vervorming van het eiwit signaal, dit door aanwezigheid van een grote hoeveelheid aan serumeiwitten. Daarom werd in deze experimenten het test-glycoproteïne meteen geproduceerd in serumvrij medium.
- 3) Het 6-wellformaat waarin de experimenten werden uitgevoerd, leverde niet-detecteerbare niveaus aan eiwit op. Na het oogsten van het medium werd in deze experimenten eiwit opgeconcentreerd door acetoneprecipitatie, maar ook vroeger in het protocol kon eiwitproductie verhoogd worden. Namelijk tijdens transfectie kunnen plasmiden die NS1- of SV40-eiwit produceerden, toegevoegd worden voor hogere eiwitopbrengst. In deze experimenten werd enkel gebruik gemaakt van het NS1-plasmide, maar in de toekomst kan beter een combinatie van beide plasmiden gebruikt worden.

NS1 is een niet-structureel eiwit van influenza A en heeft vele functies, waaronder het limiteren van interferon-productie, het verhogen van viraal mRNA- en eiwitproductie (Hale *et al*, 2008). Het treedt ook op als een RNA-silencing suppressor en kan eiwitexpressie verhogen in cellijnen waarvan het stabiel geïntegreerde transgen over tijd is gesilenced (Noll, 2010). Het concrete werkingsmechanisme van NS1 bij transiënte transfectie is onbekend, maar het blijkt eiwitproductie te verhogen (**Figuur 16** en ongepubliceerde resultaten van het labo van prof. dr. Xavier Saelens).

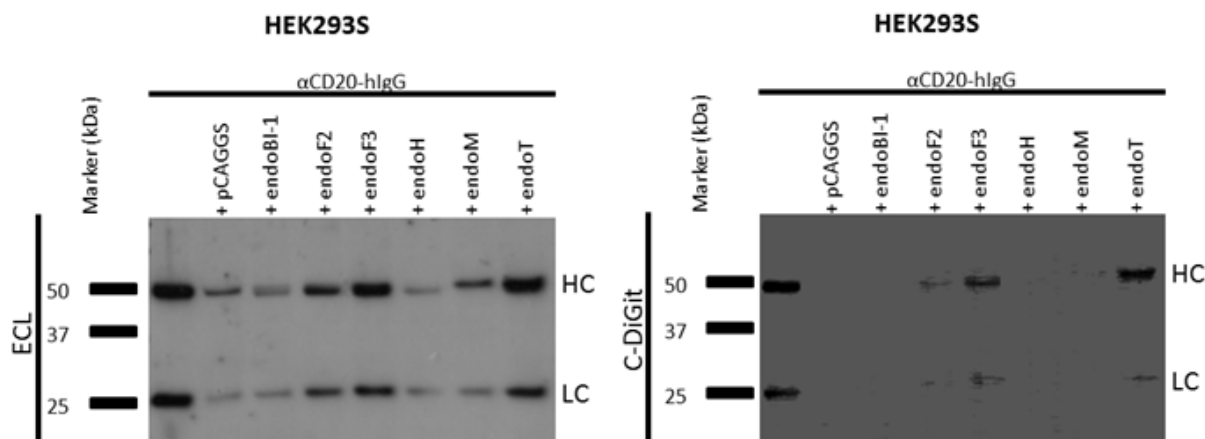
Het SV40 large T-antigen komt vroeg tot expressie bij infectie met SV40-virus en zorgt voor replicatie van het virale genoom door binding aan de SV40-ori (Dean *et al*, 1987). De SV40-ori is ook aanwezig op vele expressievectoren, zoals de pCAGGS-vector en de pcDNA3-vector. Door cotransfectie van een plasmide dat het SV40 large T-antigen bevat, kan amplificatie van de expressievectoren verkregen worden. Een hoger kopij-aantal leidt veelal tot verhoging van het recombinant te produceren eiwit (**Figuur 16**).

Bij cotransfectie met beide plasmiden, zowel NS1 als SV40, zien we een extra verhogend effect in de HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellijn en de HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT-cellijn, maar niet in de wild-type HEK293S-cellijn (**Figuur 16**).



**Figuur 16: Productieverhoging van hIL-22 door cotransfectie met NS1 en/of SV40 large T-antigen in HEK293S-, HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-, HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT-cellen.** Zowel NS1 als SV40 hebben een verhogend effect op eiwitproductie. SV40 heeft schijnbaar een iets groter effect dan NS1 in HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>- en HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT-cellen. Bij cotransfectie met beide plasmiden zien we een extra verhogend effect in de HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellijn en de HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT-cellijn, maar niet in de wild-type HEK293S-cellijn. Opstelling hIL-22 + NS1 + SV40 bestond uit 20% expressieplasmide voor NS1, 20% voor SV40, 40% voor hIL-22 en 20% carrierDNA (Salmon Sperm - SS). Bij de andere opstellingen werden componenten vervangen door respectievelijke hoeveelheden SS. Bij opstelling HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT + SS werd het mediumstaal gecontamineerd met celdebris, vandaar het hogere achtergrondsignaal.

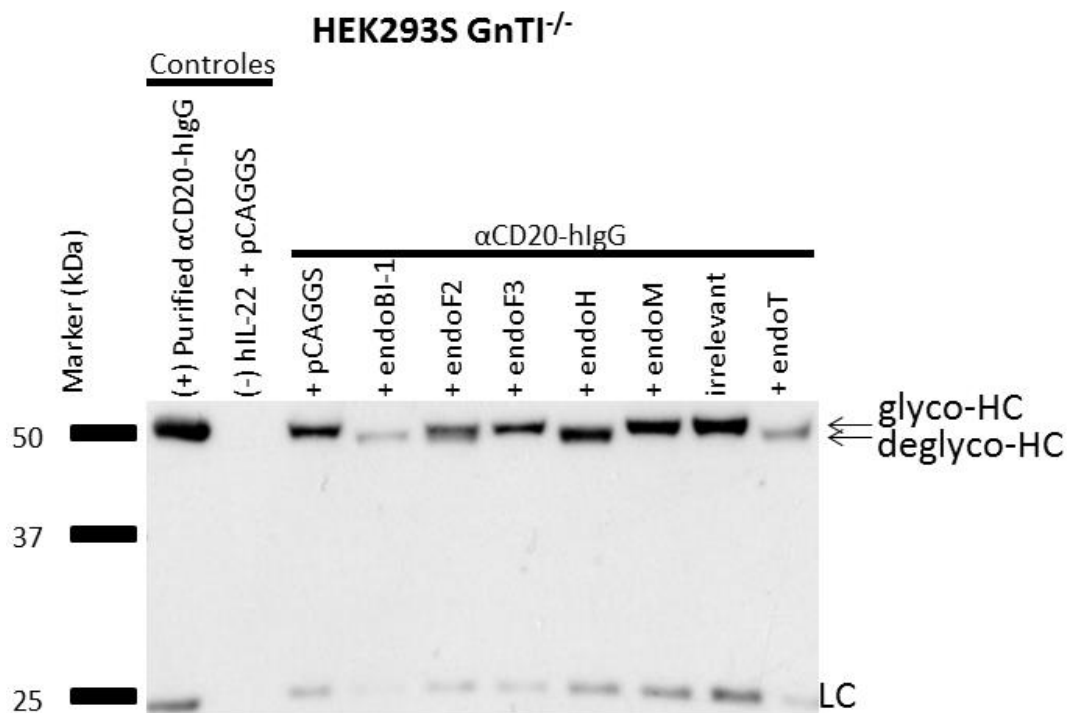
- 4) Een hoge resolutie moest verkregen worden om geglycosyleerde en niet-geglycosyleerde substraten te scheiden. In deze experimenten werden SDS-PAGE gels gelopen aan een lage spanning (80-100V). Ook op ijs lopen van de gels had een positief effect op de resolutie. SDS-PAGE gels van voldoende hoge concentratie (12%) werden gebruikt.
- 5) Recent is een apparaat ontwikkeld voor digitale detectie van chemiluminescentie, C-DiGit. Dit zou eenvoudiger, milieuvriendelijker en goedkoper zijn dan het ontwikkelen van fotografische films. De C-DiGit heeft echter een veel lagere sensitiviteit (**Figuur 17**).



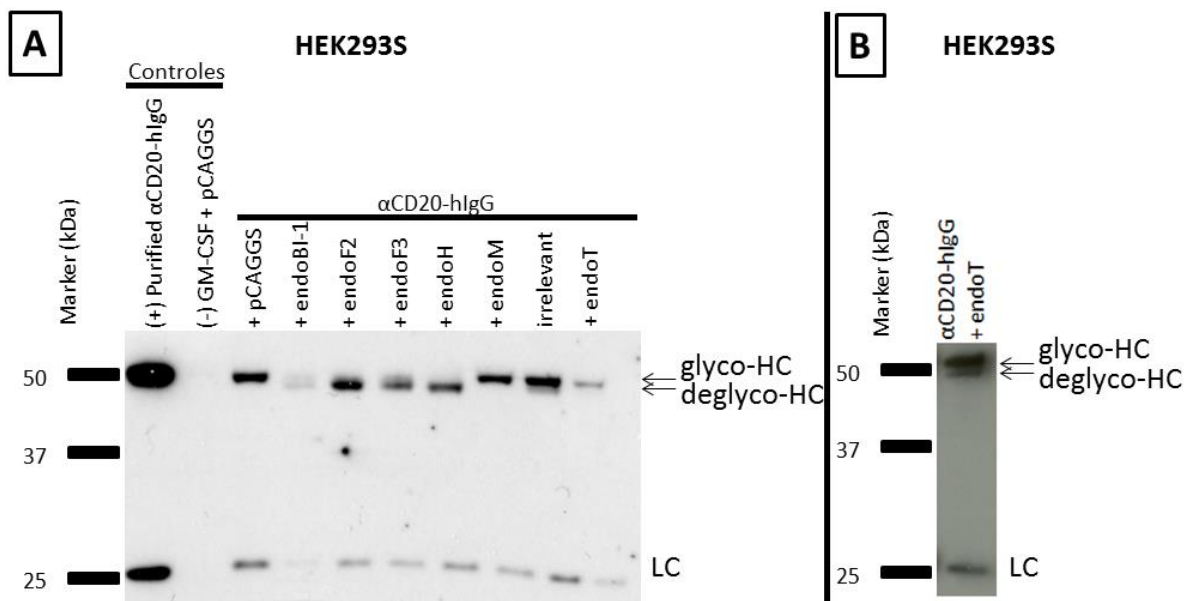
**Figuur 17: Vergelijking sensitiviteit fotografische film (ECL) en C-DiGit.** (Links) een belichtingstijd van drie minuten op fotografische film. (Rechts) een belichtingstijd van zes minuten op C-DiGit. Enkel hogere concentraties aan eiwit worden opgepikt door de C-DiGit, met andere woorden lagere sensitiviteit. Naast een lagere sensitiviteit blijkt de C-DiGit ook een slechtere resolutie te hebben.

## 2| $\alpha$ CD20-hIgG

Zowel HEK293S- als HEK293S  $GnT1^{-/-}$ -cellen werden gecotransfecteerd met de expressievector voor  $\alpha$ CD20-hIgG en telkens één van de te testen endoglycosidasen. Het  $\alpha$ CD20-hIgG werd op western blot gedetecteerd met horseradisch peroxidase-gelabeld antilichaam gericht tegen zowel de zware (HC) als de lichte (LC) keten van het  $\alpha$ CD20-hIgG. De zware keten loopt ter hoogte van  $\pm 50$  kDa en bevat één N-glycosylatieplaats. In HEK293S  $GnT1^{-/-}$ -cellen wordt een, volgens de *in vitro* substraatspecificiteit, verwacht patroon gedetecteerd, nl. enkel endoglycosidasen met hoog-mannose type glycanen als substraat vertonen een activiteit: endoBI-1, endoF2, endoH en endoT (**Figuur 18**). In wild-type HEK293S-cellen vertoont bijna elk endoglycosidase, behalve endoM, activiteit. Opvallend is dus de activiteit van endoT, gebruikt in de recente GlycoDelete-technologie, en van endoH. Zowel endoT als endoH blijken in wild-type HEK293S-cellen eveneens te leiden tot  $\alpha$ CD20-hIgG-HC de-N-glycosylatie (**Figuur 19**). Gezien de gekende substraatspecificiteit van beide endoglycosidasen, nl. hoog-mannose type glycanen, speculeren we dat de-N-glycosylatie door deze enzymen hier heeft plaatsgevonden alvorens biosynthetische conversie van de  $\alpha$ CD20-hIgG N-glycanen van hoog-mannose en/of hybride type naar complex type. Met andere woorden wordt door overexpressie van het endoT- en endoH-enzyme dit niet alleen gelokaliseerd in het transGolgi-apparaat, maar ook in meer upstream organellen (vb. cisGolgi en endoplasmatisch reticulum). Dat het endoT-enzyme ook gelokaliseerd werd in meer upstream organellen werd reeds aangetoond door lokalisatie-experimenten aan de hand van microscopie (Meuris, 2012). Het verschil in de mate van de-N-glycosylatie is waarschijnlijk te verklaren door de hogere specifieke activiteit van endoH. EndoH heeft in vergelijking met endoT een meer dan 20 maal hogere specifieke activiteit. (Stals *et al*, 2010).



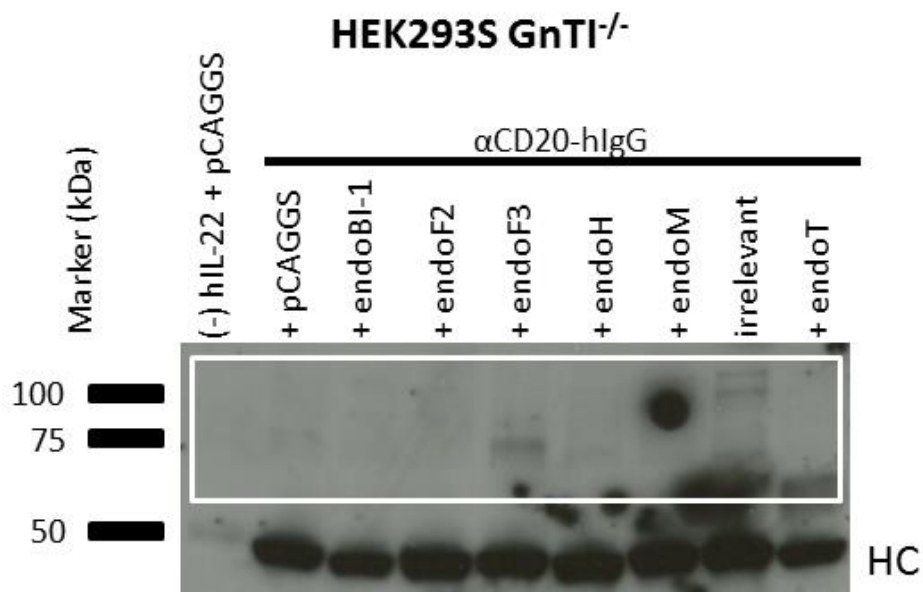
**Figuur 18: Transiënte cotransfectie  $\alpha$ CD20-hlgG en verschillende endoglycosidasen in HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen.** Enkel endoglycosidasen met hoog-mannose type glycanen als substraat vertonen activiteit, nl. endoBI-1, endoF2, endoH en endoT. (HC) heavy chain, (LC) light chain.



**Figuur 19: Transiënte cotransfectie  $\alpha$ CD20-hlgG en verschillende endoglycosidasen in HEK293S-cellen. (A)** Alle endoglycosidasen, behalve endoM en endoT, lijken een activiteit te vertonen. **(B)** Een gedeelte van de western blot van de herhaling van het identieke experiment wordt getoond. EndoT lijkt weldegelijk ook een activiteit te vertonen. (HC) heavy chain, (LC) light chain.

Bij dit experiment werden laag-intense, hooggewicht ( $\pm 75$ - $150$  kDa) banden opgemerkt bij de opstelling met endoH (resultaten niet getoond). Dit zou kunnen wijzen op enige aggregatie van het antilichaam. Wanneer endoH reeds tot expressie zou komen in het endoplasmatisch reticulum zou dit inderdaad kunnen interfereren met de eiwitopbouw.

van het geproduceerde glycoproteïne. Daarom werd bij een herhaling van het experiment de fotografische film langer geëxposeerd aan de western blot. We detecteerden dat deze banden ook bij opstellingen met andere endoglycosidasen voorkwamen, inclusief deze die het glycoproteïne niet deglycosyleren. De detectie van deze banden is dus niet gecorreleerd met de de-N-glycosylatie van het antilichaam. Het feit dat deze banden een moleculaire massa hadden van 75, 100 en 150 kDa laat ons zelf vermoeden dat dit geen aggregatie is maar zware keten-lichte keten oligomeren door incomplete reductie van de intermoleculaire zwavelbruggen (**Figuur 20**).

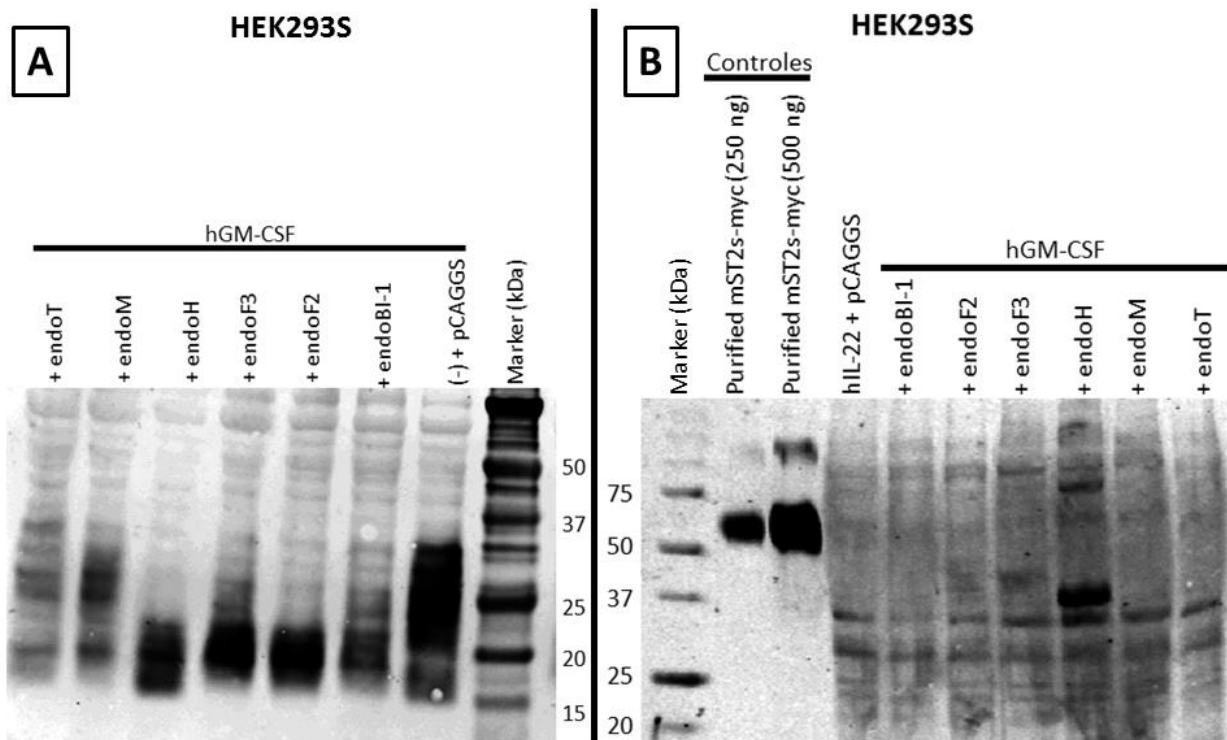


**Figuur 20:** Nagaan aanwezigheid aggregatie bij transiënte cotransfectie αCD20-hIgG en verschillende endoglycosidasen in HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen. De fotografische film werd voor 20 minuten blootgesteld aan de western blot. Laag-intense, hooggewicht (±75-150 kDa) banden werden zichtbaar in verschillende endoglycosidase-opstellingen.

### 3| hGM-CSF

Om te bevestigen dat de co-expressie van endoH/endoT kan leiden tot de-N-glycosylatie van eiwitten die geproduceerd worden in complex type glycosylerende zoogdiercellen werd in HEK293S-cellen hGM-CSF gecotransfecteerd met de verschillende endoglycosidasen. Het hGM-CSF werd op western blot gedetecteerd met fluorescent-gelabeld (DyeLight 800) antilichaam gericht tegen de 6xHis-tag. Door de hevige N- en O-glycosylatie van het eiwit is het effect van de verschillende endoglycosidasen moeilijker te kwantificeren. hGM-CSF heeft namelijk twee mogelijke N-glycosylatiesites maar ook minimum twee O-glycosylatiesites, vandaar dat dit eiwit als een smeer wordt gezien op western blot. Ook hier blijkt endoH, maar niet endoT, de onverwachte *in vivo* de-N-glycosylatie activiteit te vertonen. Daarnaast werd heterogeniteit opgemerkt lager dan waar het volledig gede-N-glycosyleerde hGM-CSF zou lopen, wat een aanwijzing zou kunnen zijn voor eiwitafbraak (**Figuur 21 - A**). In de identieke herhaling van dit experiment (resultaten niet getoond) was dit patroon ook aanwezig, hoewel minder duidelijk. Om na te gaan of de verschillende endoglycosidasen

daadwerkelijk tot expressie kwamen in dit experiment, werden tevens cellysaten bereid en geanalyseerd op western blot met een antilichaam gericht tegen de myc-tag, aangezien alle endoglycosidaseconstructen C-terminaal voorzien zijn van deze tag. Dit wordt getoond in **panel B** van **Figuur 21**. Enkel endoH kon gedetecteerd worden. Ofwel duidt dit op een hoger expressieniveau van endoH, ofwel op de afwezigheid van C-terminale processing bij endoH en aanwezigheid van dergelijke processing bij de andere endoglycosidasen, wat reeds is aangetoond voor endoT (Stals *et al*, 2010). C-terminale processing leidt vanzelfsprekend tot verlies van de myc-tag.

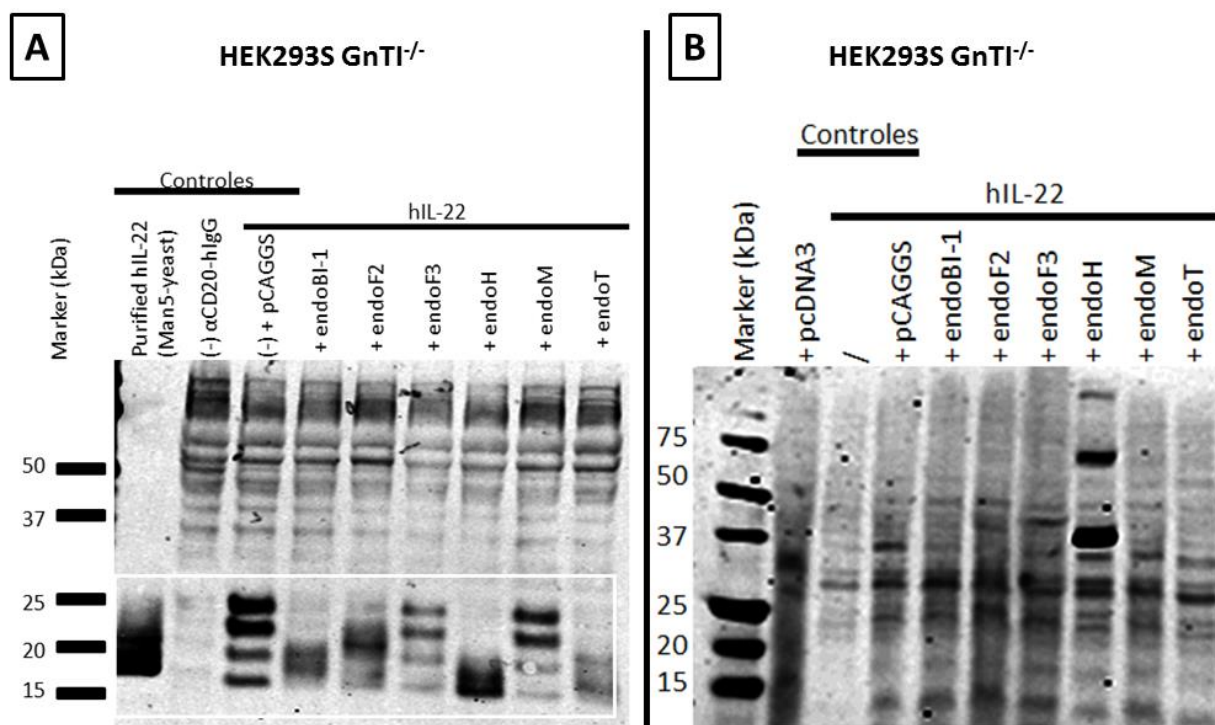


**Figuur 21: Transiënte cotransfectie hGM-CSF en verschillende endoglycosidasen in HEK293S-cellen. (A) Mediumstaal:** hGM-CSF wordt gezien als een smeer op western blot door hevige N- en O-glycosylatie, nl. twee N-glycosylatiesites en minimum twee O-glycosylatiesites. Bij endoBI-1, endoF2, endoF3 en endoH wordt een reductie in 'smearing' waargenomen en loopt de bovenste grens van de eiwitband bij een lager moleculair gewicht dan bij de negatieve controle. Bij endoH wordt echter een heterogeniteit opgemerkt lager dan de onderste grens van de negatieve controle hGM-CSF-eiwitband. EndoM en endoT vertonen een patroon gelijkend op dat van de negatieve controle. **(B) Cellysaatstaal:** Enkel endoH kon waargenomen worden ter hoogte van  $\pm 37$  kDa en een dimeer ter hoogte van  $\pm 75$  kDa. Positieve controles zijn 250 ng en 500 ng myc-getagd muis soluble ST2, een IL-1 receptor (verkregen van Harald Braun) en de negatieve controle is transfectie met de lege pCAGGS-vector.

## 4| hIL-22

hIL-22 werd in HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen gecotransfecteerd met verschillende endoglycosidasen omdat beoogd werd een endoglycosidase te identificeren die een endoT-recalcitrante glycosylatiesite kon de-N-glycosyleren. Daarnaast bevat hIL-22 nog twee andere N-glycosylatiesites. Tot op heden werden geen potentiële O-glycosylatiesites aangetoond,

echter werd wel evidentie gevonden in ons lab dat muis IL-22 geproduceerd in *Pichia pastoris* ge-O-mannosyleerd wordt (onpubliceerde resultaten). Daarom wordt hIL-22 gedetecteerd als vier afzonderlijke eiwitbanden, overeenkomend met geen, één, twee of drie bezette N-glycosylatiesites. Het enige enzyme dat een vergelijkbare deglycosylatie als endoT bewerkstelligt was hier endoH. EndoH lijkt zelfs een nog compacter hIL-22-sigitaal te genereren. Dit zou kunnen wijzen op de verwijdering van het endoT-recalcitrante N-glycaan (**Figuur 22**). Of de overblijvende heterogeniteit nog te wijten is aan N-glycosylatie, moet nog aan de hand van een PNGaseF-digest op deze stalen worden geverifieerd. Nog in **Figuur 22**, **panel B**, wordt een western blot getoond waar het cellysaat, dus de intracellulaire eiwitten, werd gescheiden (analoog als in bovenstaande sectie 'hGM-CSF'). Ook hier kon enkel endoH gedetecteerd worden, wat opnieuw ofwel duidt op een hoger expressieniveau van endoH, ofwel op de afwezigheid van C-terminale processing bij endoH en aanwezigheid van dergelijke processing bij de andere endoglycosidasen.



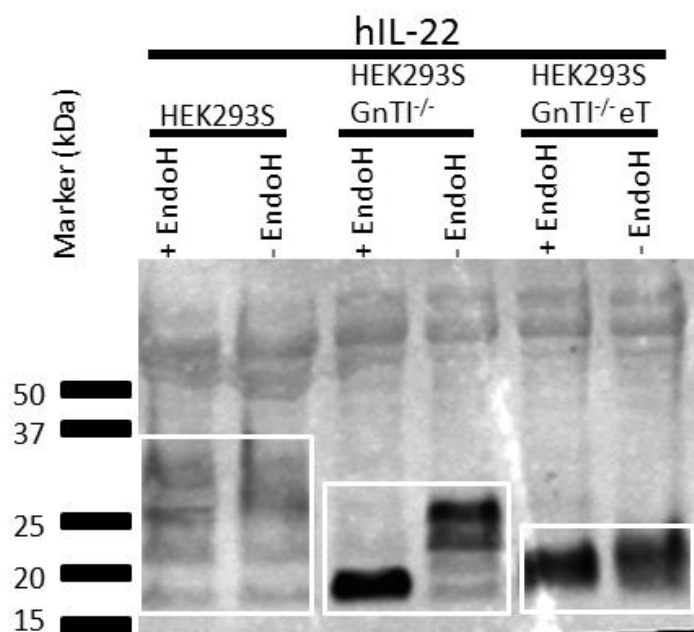
**Figuur 22: Transiënte cotransfectie hIL-22 en verschillende endoglycosidasen in HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen. (A) Mediumstaal:** Gist IL-22-Man5 werd gedetecteerd met een antilichaam gericht tegen bepaalde eiptopen van hIL-22, maar het HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-geproduceerd hIL-22 werd gedetecteerd met antilichaam gericht tegen de 6xHis-tag. hIL-22 kan gezien worden als vier eiwitbanden, overeenkomend met geen, één, twee of drie bezette N-glycosylatiesites. Enkel de hoog-mannose de-N-glycosylerende endoglycosidasen: endoBI-1, endoF2, endoH en endoT vertonen activiteit tegenover dit hoog-mannose substraat. EndoH lijkt echter een nog compacter signaal te genereren dan endoT. **(B) Cellysaatstaal:** Enkel endoH kon waargenomen worden ter hoogte van ±37 kDa, een dimeer ter hoogte van ±75 kDa en zelfs een tetrameer ter hoogte van ±150 kDa. Negatieve controles zijn transfectie met het pcDNA3:hIL-22-plasmide, de lege pcDNA3- en lege pCAGGS-vector.

### A| In vitro endoH-digest

Om na te gaan wat de maximaal te verwachten homogenisering van hIL-22 N-glycosylatie is door endoH-behandeling werd een *in vitro* endoH-digest uitgevoerd (**Figuur 23**). EndoH



verwijderde enkel N-glycanen van hIL-22 geproduceerd in HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen, dus hoog-mannose type glycanen, en niet van hIL-22 geproduceerd in wild-type HEK293S-cellen. Bij hIL-22 geproduceerd in de HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT-cel lijn lijkt het hIL-22 dat in contact gekomen is met het endoH-enzyme een compacter signaal te genereren dan wanneer het hIL-22 niet in contact is gekomen met het endoH-enzyme. Dit kan wijzen op het feit dat endoH ook het endoT-recalcitrante N-glycaan kan verwijderen, maar een resultaat met hogere resolutie moet meer uitsluitel brengen. De conclusie hier is wellicht dat endoH beter presteert dan endoT qua processing-efficiëntie, ook in een GnTI<sup>-/-</sup>-achtergrond.



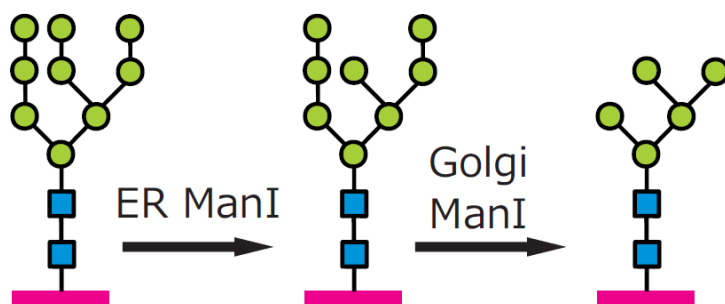
**Figuur 23:** *In vitro* endoH-digest van hIL-22 geproduceerd in HEK293S, HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>- en HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT-cellen. Complex type glycanen aanwezig op hIL-22 geproduceerd in HEK293S-cellen worden niet verwijderd door endoH, terwijl hoog-mannose type glycanen aanwezig op hIL-22 geproduceerd in HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen wel worden verwijderd. Bij hIL-22 geproduceerd in de HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT-cel lijn lijkt endoH het endoT-recalcitrante N-glycaan te verwijderen wat leidt tot een compacter hIL-22-sigitaal. Een resultaat met hogere resolutie zal meer uitsluitel brengen.

### III| Genereren stabiel endoH-celijn

Door de onverwachte *in vivo* de-N-glycosylatie activiteit van endoH in wild-type glycosylerende HEK293S-cellen werd voorrang gegeven aan het genereren van een wild-type HEK293S-celijn die stabiel dit endoglycosidase expresseert, verder HEK293S eH-celijn genoemd. Als het mogelijk zou blijken door een enkele overexpressie van een endoglycosidase hetzelfde resultaat te verkrijgen als bij de recente GlycoDelete-technologie, zou dit een grote vooruitgang zijn. Bij de huidige technologie is het immers noodzakelijk het glycaanprofiel van het celsysteem eerst aan te passen aan de hoog-mannose substraatspecificiteit van endoT (bijvoorbeeld via een GnTI knock-out). Dergelijke knock-outs in zoogdiercellen zijn weliswaar recent meer haalbaar (bijvoorbeeld TALEN™, CRISPR-Cas), maar vergen toch nog heel wat manipulaties en screeningwerk.

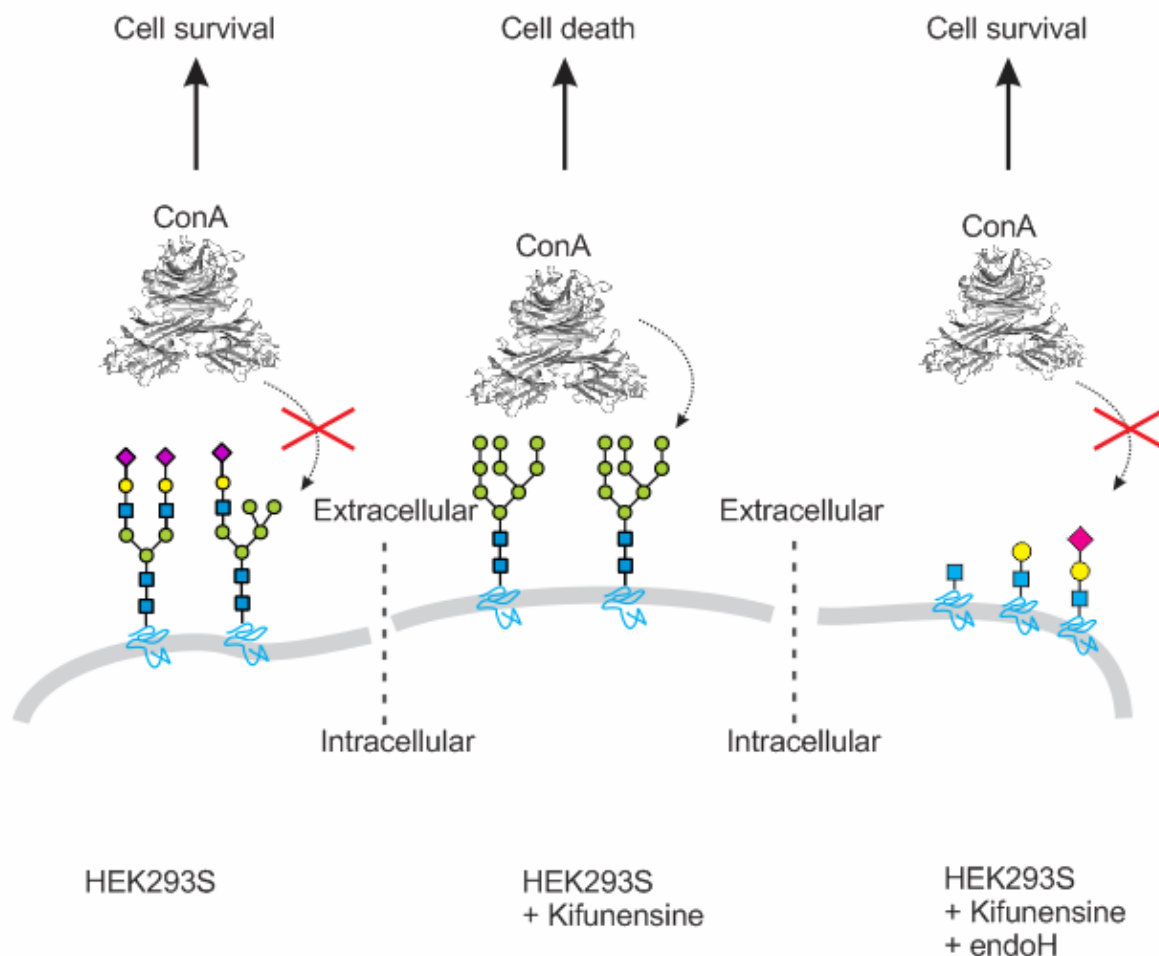
#### 1| Selectiestrategie

Bij het genereren van de GlycoDelete-celijn werd geobserveerd dat wanneer men interfereert met het glycosylatiepatroon van de celijn, deze veel gevoeliger wordt aan antibiotica. Een strategie gebaseerd op antibioticaselectie is dus moeilijker bruikbaar. Bij het ontwikkelen van de GlycoDelete-technologie vertrok men van een HEK293S-celijn met GnTI knock-out. Het glycosylatiepatroon van deze celijn was beperkt tot hoog-mannose type structuren. Deze structuren zijn liganden voor concanavale A (conA), een plantlectine. Dit lectine is cytostatisch voor de HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-celijn, al is de manier van actie hierbij niet gekend. ConA bevat geen toxische subunit dus er wordt voorgesteld dat door blokkeren van receptor- of transport-functies een cytostatisch/celdood signaal wordt geïnduceerd (Cummings & Etzler, 2009). Door selectie met conA kan geselecteerd worden voor HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-klones die endoT efficiënt expresseren zodat de cellen volledig conA-resistent worden. Het voordeel is dat direct geselecteerd wordt voor het gewilde fenotype (d.i. verwijdering van alle N-glycanen). Maar conA vertoont geen affiniteit voor complex type glycaanstructuren, zoals die geproduceerd worden in wild-type HEK293S-cellen. Daarom werd een extra stap toegevoegd aan de selectiestrategie, nl. toevoeging van kifunensine (kif) (**Figuur 25**). Kifunensine is een inhibitor van klasse 1  $\alpha$ -mannosidasen, zoals mannosidase I uit het endoplasmatisch reticulum en het cisGolgi-apparaat, waardoor een hoog-mannose glycosylatiepatroon wordt verkregen (**Figuur 24**). Deze selectiestrategie werd dus gebruikt om endoH stabiel te integreren in het genoom van wild-type HEK293S-cellen. Ook werd getracht met dezelfde selectiestrategie de andere endoglycosidasen, behalve endoT, stabiel te integreren, maar dit was niet succesvol. Dit was enigszins te verwachten omdat de selectiestrategie geoptimaliseerd werd voor de substraatspecificiteit van endoH.



**Figuur 24: De klasse I  $\alpha$ -mannosidasen die door kifunensine geïnhibeerd worden.** Het mannosidase I in het endoplasmatisch reticulum katalyseert de reactie van  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9$  naar  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$ . Het mannosidase I in het cisGolgi-apparaat katalyseert de reactie van  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$  naar  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$ .

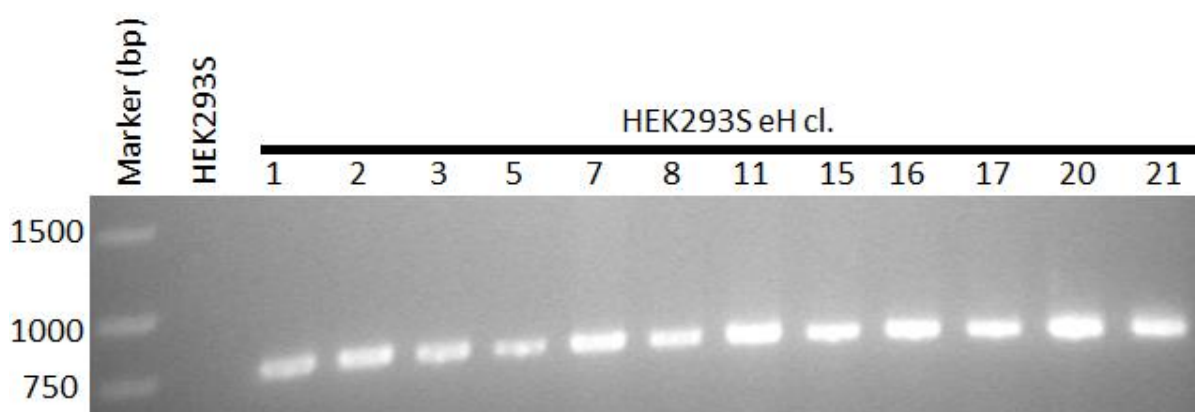
Eerst werden de cellen getransfecteerd met het pCAXL:endoX-plasmide in aanwezigheid van kifunensine. Één dag na transfectie werd ook conA toegevoegd. Vanaf dan werd voor een zestal weken tweemaal per week het groeimedium en de selectiecomponenten ververscht. De cellen werden elke keer volledig losgemaakt van elkaar zodat de selectiecomponenten het celoppervlak goed konden bereiken. Stervende cellen kunnen namelijk een soort 'schild' vormen rondom andere cellen waardoor voor deze beschermde cellen de selectie suboptimaal is. Voor endoH werd deze selectiestrategie succesvol uitgevoerd want meerdere klonen bleven leven onder de selectiedruk. Tijdens het oppikken van deze overlevende klonen en de opschaling ervan werd geen selectiedruk meer aangehouden.



**Figuur 25: Selectiestrategie voor het genereren stabiel endoH-producerende HEK293S-cellen.** Concanavaleine A vertoont weinig tot geen affiniteit voor hybride en complexe type N-glycanen en is dus weinig toxisch voor wild-type HEK293S-cellen. Daarom werd een inhibitor van ER en cisGolgi mannosidase I, kifunensine, toegevoegd. Hierdoor werden alle eiwitten geglycosyleerd met hoog-mannose type structuren, die wel een hoog-affien substraat zijn voor conA. Toevoeging van conA werd opnieuw toxisch voor de HEK293S-cellen, behalve als deze cellen stabiel het endoH-gen hadden geïntegreerd in hun genoom. EndoH heeft, zoals vroeger aangetoond, hoog-mannose type en hybride type N-glycanen als substraat. EndoH trimt de N-glycanen zodat deze geen substraat meer zijn voor conA. Ten gevolge daarvan kan conA zijn toxische activiteit niet meer uitvoeren. Figuur overgenomen en aangepast uit Meuris, 2012.

## 2| Analyse van stabiele HEK293S klonen op genomische integratie van pCAXL:endoH

Na het oppikken en opschalen van 21 resistente klonen werd de aanwezigheid van het endoH-gen in deze verschillende HEK293S eH-klones bevestigd door middel van PCR op genomisch DNA. Alle kif/conA-overlevende HEK293S eH-klones zijn positief voor de coderende sequentie van endoH, wat duidt op een zeer efficiënte selectiestrategie (**Figuur 26**). Van de 21 geselecteerde klonen werden kloon 4, 9, 10 en 14 tijdens het oppikken reeds verloren, dus alvorens experimenten op DNA- en eiwitniveau konden uitgevoerd worden. Kloon 6, 12, 13, 18 en 19 vertoonden tijdens de opschaling een trage groei en veel celdood waardoor tot op heden geen genomisch DNA kon geëxtraheerd worden.

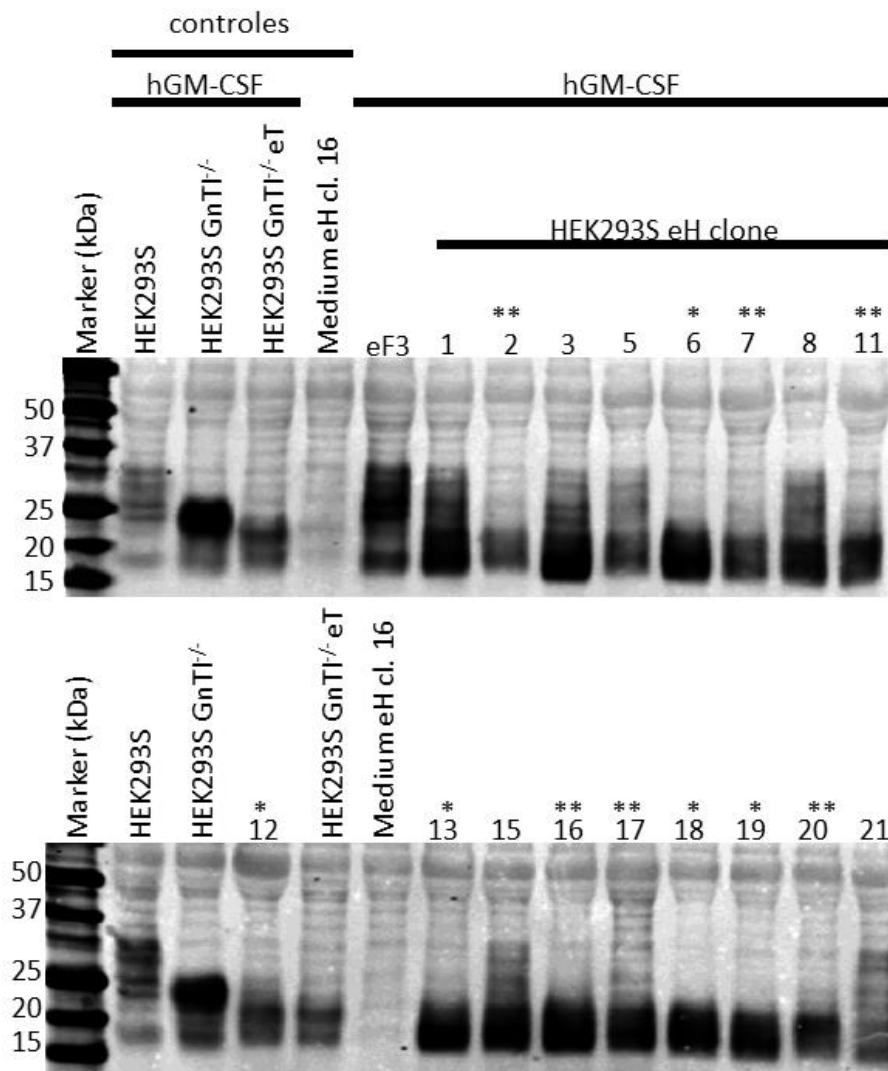


**Figuur 26: Bevestiging aanwezigheid van het endoH-gen in de verschillende HEK293S eH-klones.** Een PCR-reactie werd uitgevoerd met primers gericht tegen de endoH-sequentie, een fragment van 720 bp werd verwacht. Alle overlevende HEK293S eH-klones blijken positief te zijn voor dit fragment. De negatieve controle is genomisch DNA van wild-type HEK293S-cellen.

## 3| Analyse van stabiele HEK293S-eH klonen op endoH gemedieerde 'glyco-engineering' efficiëntie

Het glycoproteïnesubstraat hGM-CSF werd geproduceerd in de verschillende HEK293S eH-klones om na te gaan hoe actief het endoH-enzyme is, want naargelang plaats van insertie in het genoom kan het meer of minder tot expressie komen. Doordat de selectiestrategie direct selecteerde voor het gewilde fenotype bleken alle eH-klones N-glycanen te verwijderen. Toch presteerden enkele klonen merkbaar beter dan andere. Zo bleken de klonen aangeduid met een asterisk (\*) in **Figuur 27** meer N-glycanen te verwijderen dan de andere klonen. De klonen die zowel goed groeiden in adherente cultuur en die efficiënte de-N-glycosylatie van hGM-CSF vertoonden, zijn aangegeven met een dubbele asterisk (\*\*). Het verschil in hGM-CSF-expressieniveaus tussen de verschillende klonen is waarschijnlijk te wijten aan suboptimale condities bij transfectie (bijvoorbeeld ongelijke hoeveelheden aan celmateriaal). Een herhaling van het experiment met gelijke hoeveelheden aan celmateriaal zal aantonen of ook een klonaal effect hier een rol speelt. Dit werd voor de meeste klonen bevestigd door middel van een *in vitro* PNGaseF-digest (zie sectie '*in vitro* PNGaseF-digest'). Voor kloon 6, 12, 13, 18 en 19 werd dit alweer niet bevestigd omdat deze tijdens de opschaling een trage groei en veel celdood vertoonden. Deze laatstgenoemde klonen zijn

stuk voor stuk wel goed presterende klonen, wat zou kunnen wijzen op een toxisch effect van de sterke overexpressie van het endoH-gen.

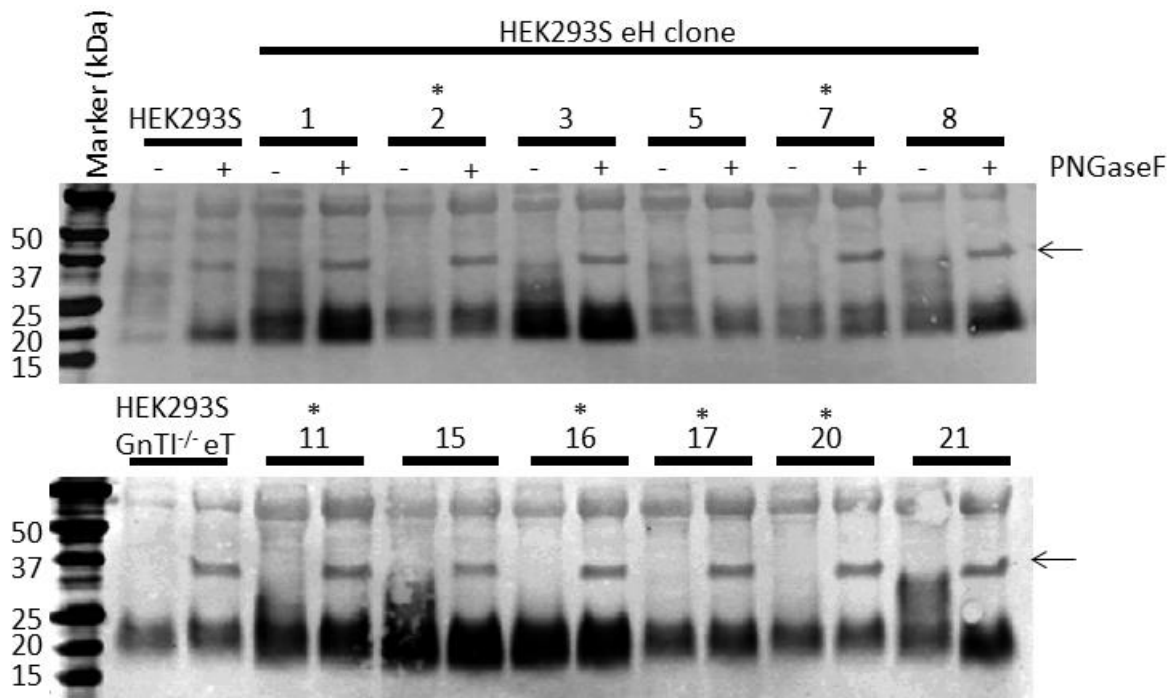


**Figuur 27: Bevestiging de-N-glycosylatie activiteit van het endoH-enzyme in de verschillende HEK293S eH-klones.** hGM-CSF werd getransfecteerd in de verschillende HEK293S eH-klones en gedetecteerd op western blot met een antilichaam gericht tegen een 6xHis-tag. Klones die efficiënte de-N-glycosylatie vertoonden zijn aangeduid met een asterisk (\*), de klones die daarenboven een goede groei in adherente cultuur vertoonden, zijn aangegeven met dubbele asterisk (\*\*). Negatieve controles zijn hGM-CSF in HEK293S en HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen. Nog een negatieve controle was een mediumstaal van eH-kloon 16 dat werd meegenomen om het achtergrondsignaal te bepalen. De positieve controle was hGM-CSF in HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT-cellen. eF3 was een met endoF3 getransfecteerde HEK293S-cel die zeer lang onder de kif/conA selectiestrategie overleefde, maar waarschijnlijk gewoon een wild-type HEK293S-celijn is. Er werd namelijk geen insertiefragment opgepikt met PCR.

### A| In vitro PNGaseF-digest

hGM-CSF geproduceerd in de verschillende HEK293S eH-klones werd behandeld met PNGaseF om na te gaan of hier nog resterende N-glycanen aanwezig waren. Bij de klones zonder asterisk in **Figuur 28** blijken inderdaad nog N-glycanen aanwezig te zijn op het recombinant hGM-CSF. Dit is duidelijk te zien aan het terugvallen van het eiwitssignaal naar

een compacter signaal bij lager moleculair gewicht. Klonen aangeduid met een asterisk (\*) hebben een meer complete N-glycaanprocessing door endoH en lijken op dit moment de meest geschikte kandidaten. Vooral kloon 16, want buiten het efficiënt verwijderen van N-glycanen vertoont deze kloon een even snelle groei als wild-type HEK293S-cellen.



**Figuur 28: *In vitro* PNGaseF-digest van hGM-CSF geproduceerd in HEK293S eH-cellen.** Controles zijn hGM-CSF geproduceerd in HEK293S of HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT-cellen wel (+) of niet (-) behandeld met PNGaseF. Er werd opgemerkt dat de klonen aangeduid met een asterisk (\*) een meer complete N-glycaanprocessing door endoH hebben dan de klonen zonder asterisk. Dit is te zien aan het terugvallen van het gesmeerd eiwitssignaal naar een compacter signaal bij lager moleculair gewicht. PNGaseF, aangeduid met een pijl, bezit een 6xHis-tag en wordt gedetecteerd bij 37 kDa.

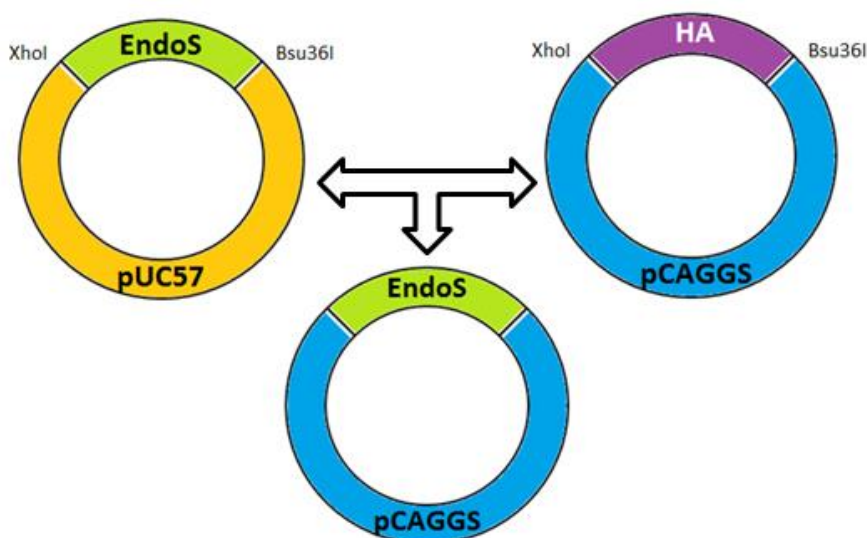
## IV| Bijkomende resultaten

### 1| Klonering endoS

Een synthetisch gen voor endoS was beschikbaar in ons labo, maar was gekloneerd in een pUC57-vector, wat geen expressievector is. EndoS was dus het enige endoglycosidase dat nog overgekloneerd moest worden naar een geschikte expressievector. Hierna volgen meerdere pogingen om endoS over te kloneren in verschillende expressievectoren, maar deze bleven tot nu zonder succes. Daarom is de de-N-glycosylatie activiteit van endoS niet getest kunnen worden.

#### A| Kloneringsstrategie 1

EndoS werd uit de pUC57-vector geknipt met de restrictie-enzymen XhoI en Bsu36I en geligeerd in een pCAGGS-vector waaruit met dezelfde restrictie-enzymen het hemagglutinine A stufferfragment werd verwijderd (**Figuur 29**). Na transformatie van het ligatiemengsel werden geen *E. coli*-kolonies verkregen. Deze strategie werd tweemaal herhaald.

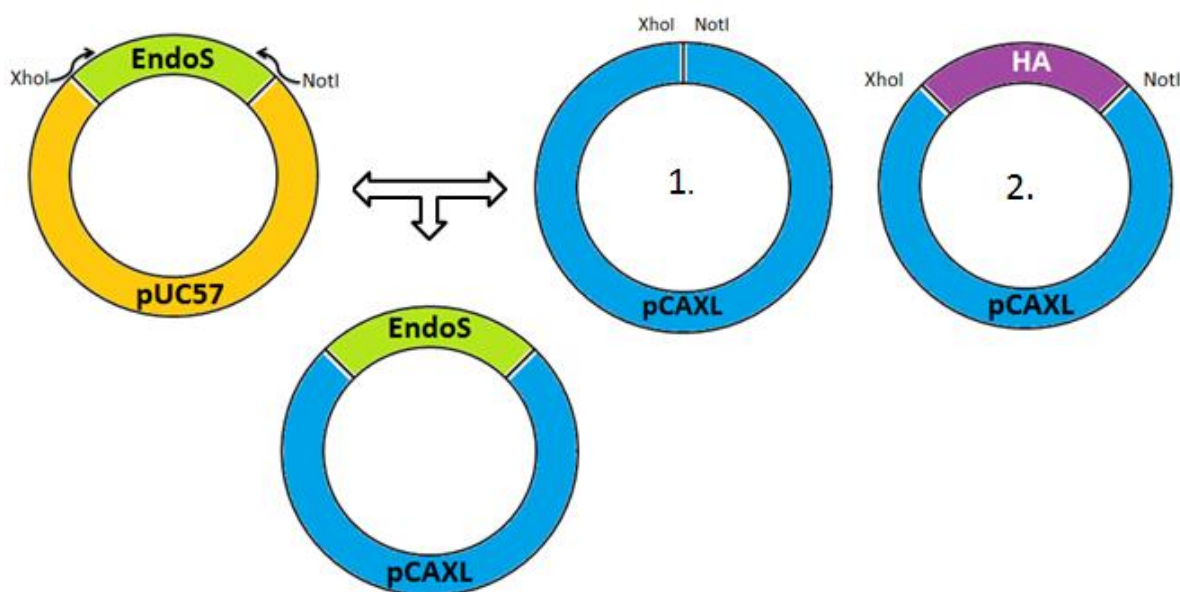


**Figuur 29: Voorstelling kloneringsstrategie 1.** XhoI en Bsu36I werden gebruikt om endoS uit de pUC57-vector te knippen en dezelfde enzymen werden gebruikt om het HA stufferfragment uit de pCAGGS-vector te knippen. Zuiver endoS en zuiver pCAGGS-vector werden met elkaar geligeerd.

#### B| Kloneringsstrategie 2

Omdat in het verleden gebleken is dat de Bsu36I-restrictieplaats problematisch kan zijn, werd geprobeerd endoS te ligeren in de pCAXL-vector. Het pCAXL-plasmide is een afgeleide van de pCAGGS-vector met een extra restrictiesite, nl. NotI. De pUC57-vector bevat geen NotI-restrictieplaats, dus werd endoS uit deze pUC57-vector PCR-geamplificeerd met een voorwaartse primer die de XhoI-restrictiesequentie bevatte en een terugkerende primer die de NotI-restrictiesequentie bevatte. Op dit PCR-product werd dan een restrictiedigest met

XhoI en NotI uitgevoerd. Allereerst werd een lege pCAXL-vector (1.) verknipt met XhoI en NotI. Omdat op agarosegel onmogelijk na te gaan was of beide restrictie-enzymen correct geknipt hadden, werd daarna de pCAXL:HA-vector (2.) gebruikt (**Figuur 30**). Enkel wanneer de opstelling met de pCAXL:HA-vector werd getransformeerd, werden endoS-positieve *E. coli*-kolonies opgepikt via kolonie-PCR. Deze werden opgepikt met dezelfde primers als hierboven gebruikt, nl. de voorwaartse primer met XhoI-site en de terugkerende primer met NotI-site. Door een controle restrictiedigest en sequentiebepaling bleken deze gegenereerde plasmiden toch niet correct. De HA-sequentie bleek aanwezig te blijven in het pCAXL-plasmide. Deze strategie werd eenmaal herhaald.

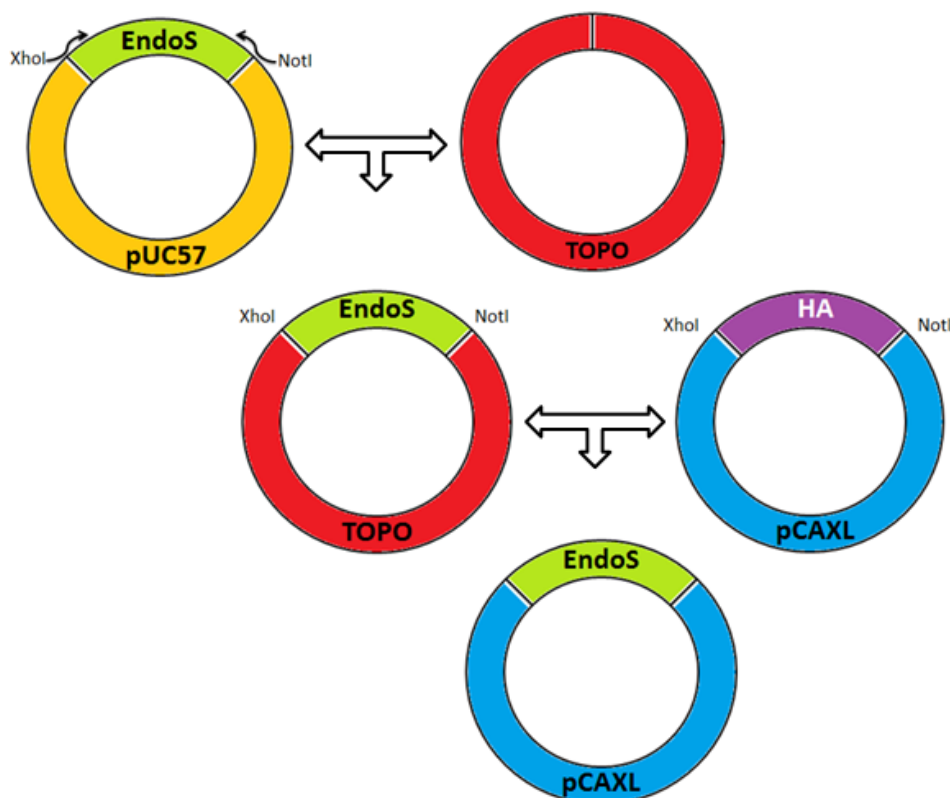


**Figuur 30: Voorstelling kloneringsstrategie 2.** EndoS werd PCR-geamplificeerd uit de pUC57-vector met een voorwaartse primer die de XhoI-restrictiesequentie bevatte en een terugkerende primer die de NotI-restrictiesequentie bevatte. Op dit PCR-product werd een restrictiedigest met XhoI en NotI uitgevoerd en geligeerd ofwel in een lege pCAXL-vector (1.) geknipt met dezelfde restrictie-enzymen, ofwel in de pCAXL:HA-vector (2.) ook geknipt met dezelfde restrictie-enzymen.

### C| Kloneringsstrategie 3

Een restrictiedigest uitvoeren op een PCR-product is soms ook problematisch en daarom werd het PCR-product van endoS eerst geligeerd in de pCR-Blunt II-TOPO-vector. Vanuit deze vector kon makkelijk nagegaan worden of endoS op een correcte manier was geknipt. Dit werd ook bevestigd door een restrictiedigest met XhoI, NotI en DraI. Het DraI-enzyme moest toegevoegd worden omdat de endoS-sequentie en de pCR-Blunt II-TOPO-vector ongeveer dezelfde lengte hadden. DraI knipt centraal in de pCR-Blunt II-TOPO-vector. Vanaf hier werd opnieuw 'strategie 2' gevolgd (**Figuur 31**). Er werden endoS-positieve *E. coli*-kolonies geïdentificeerd via kolonie-PCR. Maar deze bleken zoals in 'strategie 2' ook steeds HA-positief te zijn. Dit werd gedetecteerd in een kolonie-PCR met primers die homoloog waren aan flankerende regio's van de insertieplaats op de pCAGGS-vector. Deze kolonie-PCR genereerde een fragment van  $\pm 2000$  bp, identiek aan de lengte van de HA-sequentie. Deze strategie werd tweemaal herhaald.

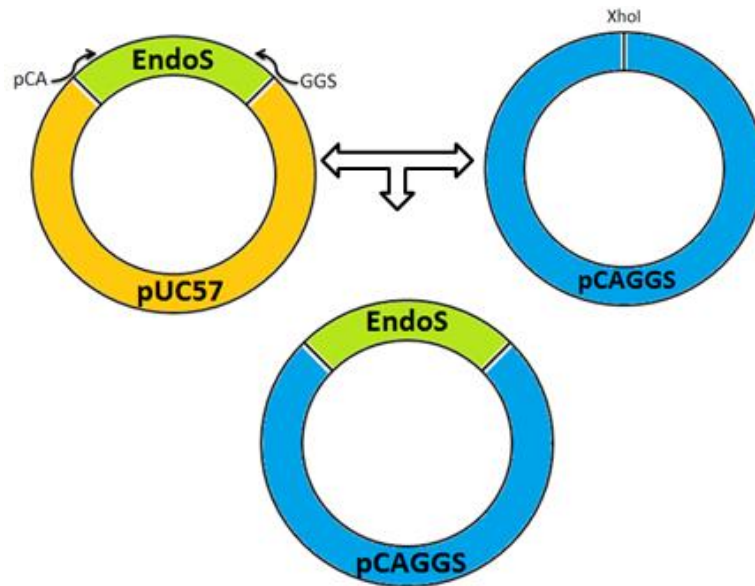




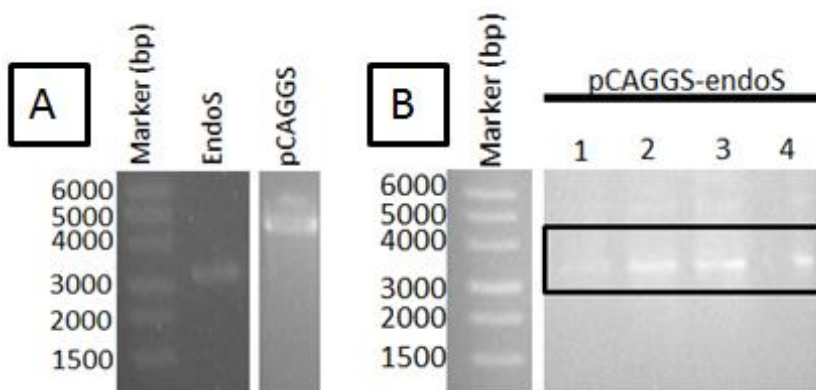
**Figuur 31: Voorstelling kloneringsstrategie 3.** EndoS werd eerst PCR-geamplificeerd uit de pUC57-vector met een voorwaartse primer die de XhoI-restrictiesequentie bevatte en een terugkerende primer die de NotI-restrictiesequentie bevatte. Dit blunt PCR-product werd geligeerd in de pCR-Blunt II-TOPO-vector, waaruit het makkelijker kon geknipt worden. Dit restrictiefragment werd geligeerd in de verknipte pCAXL-vector (zoals in 'strategie 2').

#### D| Kloneringsstrategie 4

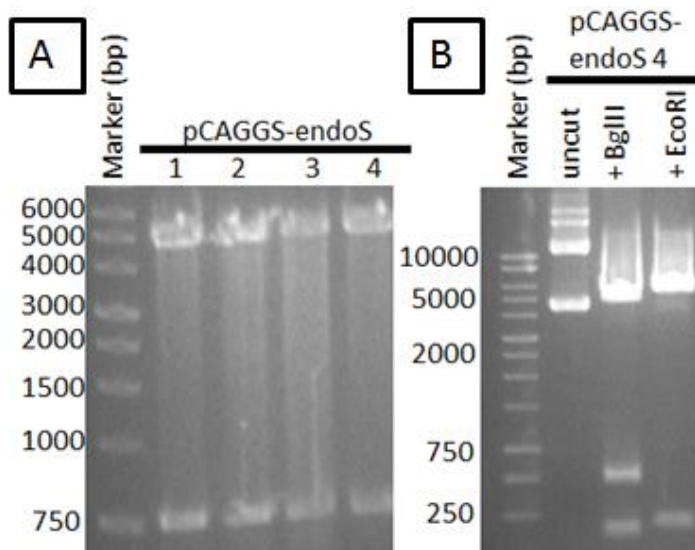
EndoS werd uit de pUC57-vector PCR-geamplificeerd met primers die adapters bevatten homolog aan de pCAGGS-vector (**Figuur 33 - A**). In plaats van ligatie berust CloneEZ (Genscript) namelijk op recombinatie (**Figuur 32**). Minimaal 15 baseparen zijn nodig voor efficiënte recombinatie. EndoS-positieve *E. coli*-kolonies werden opgepikt via kolonie-PCR met de primers gebruikt in 'strategie 2', nl. de voorwaartse primer met XhoI-site en de terugkerende primer met NotI-site (**Figuur 33 - B**). Met een controle restrictiedigest en sequentiebepaling werd aangetoond dat deze gegenereerde plasmiden toch niet correct bleken (**Figuur 34**). We vermoeden dat de endoS-sequentie op een verkeerde plaats in het plasmide is geïntegreerd. Deze strategie werd tweemaal herhaald. De tweede maal werd correcte integratie van endoS niet meer bekeken door middel van sequentiebepaling, maar door middel van een kolonie-PCR met primers die homolog waren aan flankerende regio's van de insertieplaats op de pCAGGS-vector, gebruikt in 'strategie 3'.



**Figuur 32: Voorstelling kloneringsstrategie 4.** EndoS werd eerst PCR-geamplificeerd uit de pUC57-vector met een voorwaartse en een terugkerende primer die homoloog waren aan de pCAGGS-vector, voorgesteld als 'pCA' en 'GGS'. Dit PCR-product werd gerecombineerd in de XhoI-geknipte pCAGGS-vector.



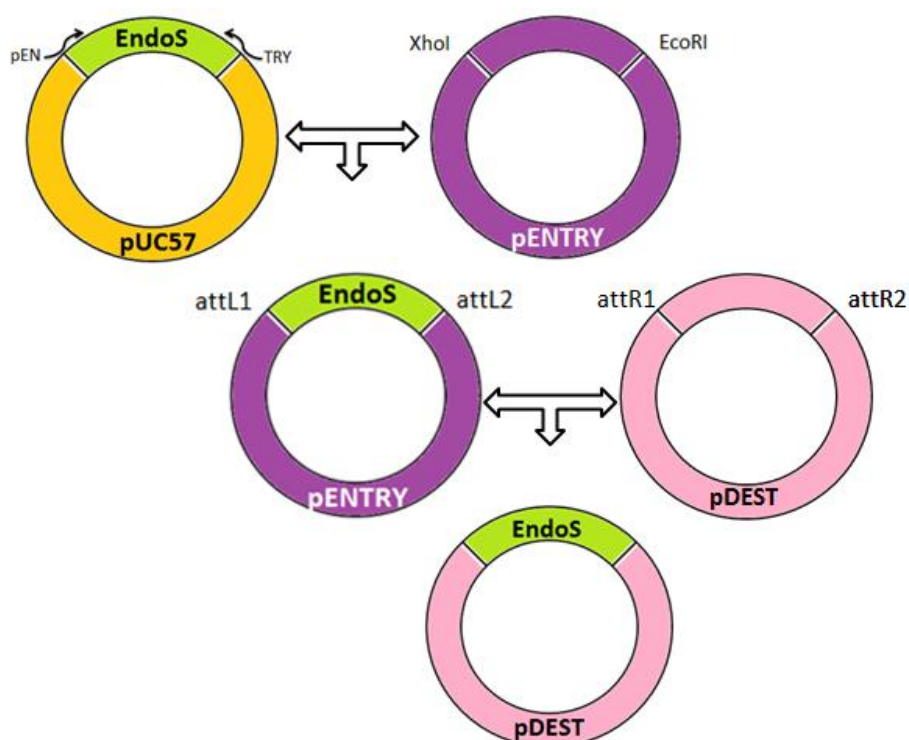
**Figuur 33: (A) PCR-fragment endoS ( $\pm 3200$  bp) en XhoI-restrictiefragment pCAGGS-vector ( $\pm 4800$  bp).** Primers bevatten 15 basenpaar lange adapters homoloog aan de pCAGGS-vector. CloneEZ berust op recombinatie. **(B) Kolonie-PCR van succesvol getransformeerde *E. coli*-kolonies.** Primers gericht tegen endoS werden gebruikt (zie 'strategie 2'). Alle kolonies zijn endoS-positief



**Figuur 34: (A) HindIII-restrictiedigest van vier pCAGGS:EndoS-plasmiden.** Verwachte fragmenten waren  $\pm 1500$  bp en  $\pm 6500$  bp. **(B) restrictiedigest van pCAGGS:EndoS-plasmide uit kolonie 4 met BglIII en EcoRI.** Verwachte fragmenten bij BglIII waren 202, 376, 712 en 6734 bp en bij EcoRI 373, 2854 en 4793 bp.

## E| Kloneringsstrategie 5

Door communicatie binnen het departement (dr. Philippe De Grootte) werd een kloneringsstrategie die gebruik maakte van CloneEZ- en Gateway®-cloning, uitgeprobeerd. EndoS werd uit de pUC57-vector PCR-geamplificeerd met primers die adapters bevatten homolog aan de pENTRY-vector. De klonering in de pENTRY-vector berustte op CloneEZ. Na transfectie van het recombinatiemengsel werden geen *E. coli*-kolonies bekomen. Deze strategie werd tweemaal herhaald. Wanneer wel een correct pENTRY:endoS-construct zou bekomen zijn, volgt Gateway®-cloning in de pDEST-vector. Er bestaat een grote collectie aan pDEST-vectoren, compatibel met transiënte en stabiele transfectie (**Figuur 35**).



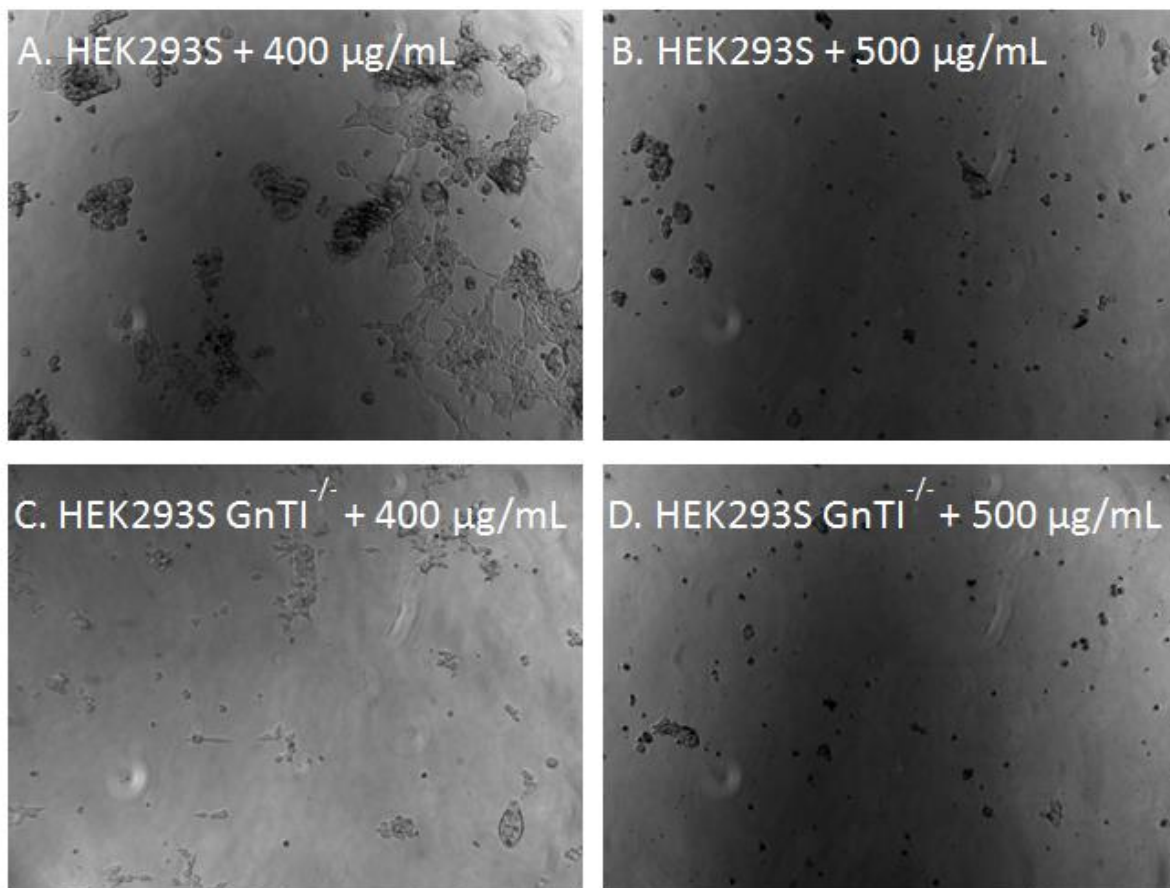
**Figuur 35: Voorstelling kloneringsstrategie 5.** EndoS werd eerst PCR-geamplificeerd uit de pUC57-vector met een voorwaartse en een terugkerende primer die homolog waren aan de pENTRY-vector, voorgesteld als 'pEN' en 'TRY'. Dit PCR-product werd gerecombineerd in de 'XhoI en EcoRI'-geknipte pENTRY-vector. Een geschikte pDEST-vector werd gekozen en gemengd met het correcte pENTRY:endoS-construct. Dit mengsel werd geïncubeerd met LR clonase waardoor via recombinatie het correcte pDEST:endoS-construct werd verkregen.

## 2| Genereren stabiele substraatproducerende cellijn

Om de verschillende endoglycosidasen te kunnen vergelijken in een uniforme cellulaire achtergrond werd geopteerd om stabiele substraatproducerende cellijnen te genereren. Dit was enkele mogelijk voor hGM-CSF en hIL-22 (en niet  $\alpha$ CD20-hlgG), omdat deze in de pcDNA3-vector waren gekloneerd, die een geniticine (G418)-resistentiegen bevat. Omwille van noodzakelijke optimalisatie van het protocol konden deze cellijnen door tijdsgebrek niet meer gegenereerd worden.

### A| Optimaliseren minimale lethale dosis geniticine

Om een idee te krijgen van de minimale lethale dosis G418 werd een 'kill-curve' opgesteld. De cellijnen van interesse, HEK293S en HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> werden onderworpen aan een stijgende concentratie aan G418. In totaal werden 12 concentraties getest: 0  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 75  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 200  $\mu$ g/mL, 300  $\mu$ g/mL, 400  $\mu$ g/mL, 500  $\mu$ g/mL, 600  $\mu$ g/mL, 800  $\mu$ g/mL en 1000  $\mu$ g/mL. Geniticine werd driemaal per week ververs tot geen geïnduceerde celdood meer optrad bij de relevante G418-concentraties. Beide cellijnen overleefden niet meer vanaf een antibioticumconcentratie van 500  $\mu$ g/mL (**Figuur 36**).



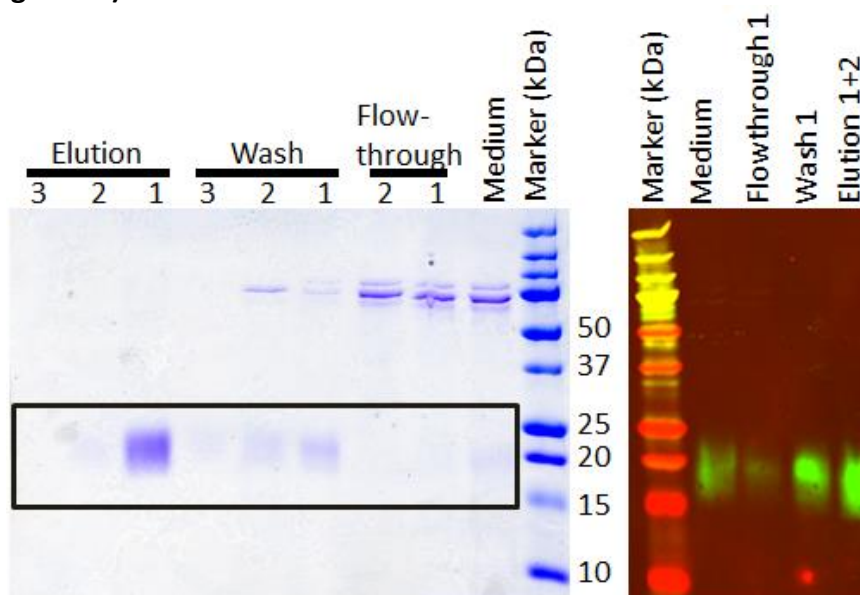
**Figuur 36:** Foto's HEK293S (A en B) en HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> (C en D) bij relevante geniticine-concentraties. HEK293S- en HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen blootgesteld aan 400  $\mu$ g G418 per milliliter kunnen nog overleven, maar HEK293S- en HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen blootgesteld aan 500  $\mu$ g G418 per milliliter overleven niet.

### 3| Zuivering van de test-glycoproteïnen

Om in toekomstige experimenten vlotter via directe structurele analyse te identificeren welke glycaanstructuren nog aanwezig zijn op de test-glycoproteïnen na productie in aanwezigheid van de verschillende endoglycosidasen wordt een beroep gedaan op MALDI-TOF/TOF technologie. Om robuust te kunnen werken moet hiervoor toch een paar  $\mu\text{g}$  aan gezuiverd staal voorhanden zijn. Er werd een snelle en eenvoudige manier geoptimaliseerd om deze hoeveelheden te bekomen. De zuiveringsprotocollen maken gebruik van reguliere injectiespuiten en geen infrastructuur, zoals een ÄKTA-purifier, is nodig, hetgeen toelaat meer stalen te verwerken (bijvoorbeeld bij kloon-screening).

#### A| His-getagd eiwit (vb. hGM-CSF)

De zuivering is hier gebaseerd op het feit dat de elektronendonorgroep van de imidazoolring van histidine een coördinatieverbinding kan vormen met geïmmobiliseerde metaalionen, bijvoorbeeld  $\text{Ni}^{2+}$ . Immobilisatie van de nikkelionen gebeurde op chelerende sepharose beads (GE Healthcare). Elutie is eenvoudig met imidazool dat in competitie treedt met het gebonden eiwit voor de gebonden nikkelionen. Bij het gebruikte protocol zien we dat een fractie van het eiwit verloren gaat tijdens de wasstappen, maar voldoende eiwit blijft over in het eluaat (**Figuur 37**).

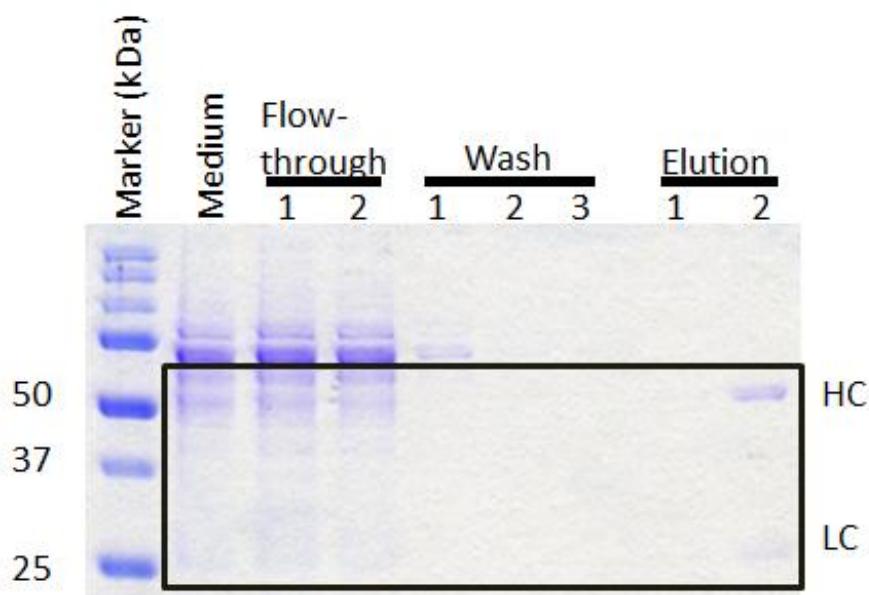


**Figuur 37: Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) purificatie van een his-getagd eiwit, hGM-CSF, geproduceerd in de HEK293S  $\text{GnTI}^{-/-}$  eT-cel lijn.** Alle geïmmobiliseerde fracties werden geanalyseerd op SDS-PAGE met Coomassie-staining. Een gedeelte van de fracties (medium, flowthrough 1, wash 1 en een 1:1 mengsel van elutie 1 en elutie 2) werden bekeken op western blot ter validatie dat het gezuiverde eiwit weldegelijk hGM-CSF is. Wasstappen werden uitgevoerd met 20 mM imidazool. Eerste elutie met een buffer die 0,260 M imidazool bevatte, tweede en derde elutie met een buffer die 0,500 M imidazool bevatte.

#### B| Immunoglobulines (vb. $\alpha\text{CD20}$ -hIgG)

Zuivering is gebaseerd op een milde hydrofobische interactie van het antilichaam met een antilichaam-selectief ligand, nl. 4-Mercapto-Ethyl-Pyridine (4-MEP). Het MEP HyperCel chromatography resin bestaat uit een cellulosematrix met het 4-MEP ligand eraan gelinkt.

Dit ligand vertoont een pH-afhankelijk gedrag. Bij fysiologische pH is de aromatische pyridine-ring ongeladen en dus vrij hydrofoob. Bijkomende hydrofobe interacties zijn afkomstig van de alifatische linker-arm. Elutie is gebaseerd op elektrostatische repulsie en gebeurt door te elueren met een zure oplossing (pH 4). Onder zure omstandigheden wordt de pyridine-ring positief geladen, evenals de antilichamen. De zuivering van  $\alpha$ CD20-hIgG was succesvol, maar bij het gebruikte protocol werd wel medium over de kolom gebracht dat waarschijnlijk een te lage pH had voor optimale binding (**Figuur 38**). Een meer optimale binding zou dus kunnen verkregen worden door het verhogen van de pH van het ruwe medium en het verlengen van de contacttijd tussen het resin en het medium. Dit zal in de toekomst worden uitgetest.



**Figuur 38: Hydrophobic Charge Induction Chromatography (HCIC) purificatie van antilichaam,  $\alpha$ CD20-hIgG, geproduceerd in de HEK293S-cel lijn.** Alle gecollecteerde fracties werden bekeken op SDS-PAGE met Coomassie-staining. Wasstappen werden uitgevoerd met 1X PBS. Er werd geëlueerd met 50 mM glycine (pH 4) en het eluaat werd meteen geneutraliseerd met 6  $\mu$ L tris (pH 8) per milliliter eluaat.

DISCUSSIE

Therapeutische eiwitten (biofarmaceutica) hebben in de voorbije jaren aan belang gewonnen in de farmaceutische industrie maar toch blijven er significante uitdagingen bij de productie van deze therapeutica. De biofarmaceutische industrie kiest in veel gevallen voor zoogdiercellijnen, zoals HEK293 en CHO, als productiesysteem omdat deze in staat zijn glycosylatie uit te voeren (Li & d' Anjou, 2009). Glycanen spelen een cruciale rol in eiwitopvouwing, maar de glycaanstructuur kan variëren naargelang de productieparameters. Parameters zoals nutriëntconcentratie, fase in de celcyclus, pH, temperatuur en zuurstofconcentratie hebben een significant effect op het glycosylatiepatroon. Het eindproduct is dus een mengsel van verschillende glycovormen van het therapeutisch eiwit. De huidige consensus is dat het glycaanprofiel van het biofarmaceuticum moet behouden blijven tussen de verschillende batches, maar zelfs dat is niet eenvoudig (Butler, 2005). N-glycaanstructuren worden hier dus eerder gezien als een 'noodzakelijk kwaad' om proteïnen correct te laten opvouwen.

Vanuit een ander perspectief vormen glycanen modificaties die kunnen gemanipuleerd worden om de eigenschappen van biofarmaceutica te sturen. Beide aspecten hebben aanleiding gegeven tot het veld van biotechnologische 'glyco-engineering' om controle te krijgen over het glycaanprofiel van het therapeuticum. Een nieuwe manier om dit aan te pakken is de quasi volledige verwijdering van N-glycanen voor secretie van de eiwitten, hetgeen leidt tot productie van sterk vereenvoudigde glycaanmodificaties. Deze technologie, de GlycoDelete-technologie, werd uitgevonden in ons lab en wordt momenteel ten volle ontwikkeld. Concreet, deze GlycoDelete-technologie behoudt de eiwitopbouwende functie van N-glycanen toegeschreven aan het endoplasmatisch reticulum en interfereert pas met het glycosylatiepatroon vanaf het Golgi-apparaat. Ook wordt de eiwitstabiliserende functie van het meest proximale GlcNAc-residu behouden. Zoals vermeld in de introductie, wordt dit gedaan door endoT te lokaliseren in het transGolgi-apparaat van HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen. In deze cellen is een knock-out gebeurd van het N-acetylglucosaminyltransferase I waardoor enkel hoog-mannose type N-glycanen worden gesynthetiseerd, het optimale substraat voor endoT. Het belangrijkste probleem met de huidige GlycoDelete-technologie is dat het glycaanprofiel van de te engineeren cel eerst moet aangepast worden aan de substraatspecificiteit van het gebruikte endoglycosidase. Er zou dus een GnTI knock-out gegenereerd moeten worden van elke biofarmaceutische productie-cel lijn wat een zeer arbeidsintensieve aanpak is. Dit beperkt de versatiliteit van de technologie. Wij waren geïnteresseerd of het gebruik van andere of combinaties van endoglycosidasen deze technologie gebruiksvriendelijker en universeel inzetbaar kon maken.

In deze thesis waren we in staat alle endoglycosidasen samen met de drie test-glycoproteïnen transiënt te transfecteren naar de relevante cellijnen HEK293S en HEK293S GntI<sup>-/-</sup>. In HEK293S GntI<sup>-/-</sup>-cellen vertoonden alle endoglycosidasen, behalve endoM, een de-N-glycosylatie activiteit te verwachten gezien hun substraatspecificiteit. Enkel endoBI-1, endoF2, endoH en endoT hebben hoog-mannose type glycanen als substraat en vertoonden dus activiteit tegenover glycoproteïnesubstraten geproduceerd in de HEK293S GntI<sup>-/-</sup>-cel lijn. EndoH lijkt in staat te zijn om endoT-recalcitrante N-glycanen te hydrolyseren, zowel *in vitro* als *in vivo*. Verdere analyse zal uitwijzen of dit enkel te wijten is aan de hogere specifieke activiteit van endoH tegenover endoT, dan wel of endoH intrinsiek in staat is sterisch meer geocludeerde N-glycanen te verwijderen dan endoT. De conclusie hier is wellicht dat endoH beter presteert dan endoT qua processing-efficiëntie in een GnTI<sup>-/-</sup>-achtergrond.



In wild-type HEK293S-cellen bleken alle endoglycosidasen, behalve endoM, een de-N-glycosylatie activiteit te vertonen. Dit was gezien hun substraatspecificiteit te verwachten voor endoBI-1, endoF2 en endoF3 maar was onverwacht voor endoT en endoH. We speculeren dat de-N-glycosylatie door endoT en endoH hier heeft plaatsgevonden alvorens biosynthetische conversie van de test-glycoproteïne N-glycanen van hoog-mannose en/of hybride type naar complex type. Met andere woorden wordt door overexpressie van het endoT- en endoH-enzyme dit niet alleen gelokaliseerd in het transGolgi-apparaat, maar ook in meer upstream organellen (vb. cisGolgi en endoplasmatisch reticulum). Dat het endoT-enzyme ook gelokaliseerd werd in meer upstream organellen werd reeds aangetoond door lokalisatie-experimenten aan de hand van microscopie (Meuris, 2012). Het verschil in de mate van de-N-glycosylatie tussen beide is waarschijnlijk te verklaren door de hogere specifieke activiteit van endoH. EndoH heeft in vergelijking met endoT een meer dan 20 maal hogere specifieke activiteit.

Omwille van veelbelovend resultaat met endoH in de voorgenoemde transiënte expressie-experimenten, werd geopteerd een stabiele cellijn te genereren die dit transGolgi-getarget endoglycosidase expresseert. We hebben een selectiestrategie ontwikkeld waarmee meteen geselecteerd werd voor het gewilde fenotype (d.i. afwezigheid van intacte N-glycanen) en deze werd succesvol uitgevoerd. De selectiestrategie bestond erin een inhibitor voor ER en cisGolgi mannosidase I, kifunensine, toe te voegen opdat alle N-glycanen van het type hoog-mannose zouden zijn. Tegelijkertijd werd het endoH-expressieconstruct getransfecteerd in deze cellen. Één dag later werd concanavale A, een cytotoxisch lectine, toegevoegd. ConA bindt namelijk hoog-mannose type N-glycanen. Deze selectie werd aangehouden voor een zestal weken. Aangezien deze nieuwe selectiestrategie onafhankelijk is van de genetische achtergrond van de te selecteren cel, zou ze naar verwachting bruikbaar moeten zijn voor elke zoogdiercellijn. Mogelijks is deze selectiestrategie ook bruikbaar voor (meestal) polyploïde insecten- en plantencellijnen aangezien deze met kifunensine eveneens hoog-mannose glycanen zullen produceren die binden op conA. Polyploïdie bemoeilijkt het genereren van genknock-outs enorm en deze kunnen met de voorgestelde selectiestrategie vermeden worden.

De efficiëntie van N-glycaan verwijdering in de stabiele endoH-klonen werd getest door transiënt een glycoproteïnesubstraat, hGM-CSF, te transfecteren. In sommige klonen was de hGM-CSF de-N-glycosylatie even efficiënt als in de geoptimaliseerde GlycoDelete HEK293S-cellijn (d.i. met endoT), maar of deze HEK293S eH-klonen werkelijk beter presteren dan de huidige GlycoDelete-technologie was niet te concluderen uit deze experimentele set-up wegens het gebruik van ongelijke concentraties aan eiwit.

Finaal werd een *in vitro* PNGaseF-digest uitgevoerd op hGM-CSF geproduceerd in deze HEK293S eH-klonen. Hier werd bevestigd dat in sommige cellijnen de verwijdering van N-glycanen niet compleet was, maar andere cellijnen deden het veel beter. Op basis van deze eerste experimenten kunnen we reeds enkele potentiële HEK293S eH-cellijnen selecteren. Op dit moment lijkt de HEK293S eH16-kloon de meest geschikte kandidaat, want buiten het efficiënt verwijderen van N-glycanen vertoont deze kloon een even snelle groei als wild-type HEK293S-cellen.

We kunnen nu ook een antwoord trachten te formuleren op de vragen gesteld in 'doelstelling':

- Kunnen de in deze thesis gekozen endoglycosidasen, vooral van bacteriële oorsprong, functioneel geëxprimeerd worden in een eukaryote achtergrond, nl. HEK293?

*De meeste endoglycosidasen kwamen tot expressie en hadden een de-N-glycosylatie activiteit in HEK293S- en HEK293S GnT<sup>-/-</sup>-cellen. Enkel voor endoM kon niet bepaald worden of dit enzyme functioneel geëxprimeerd werd. De aanwezigheid van endoM kon niet aangetoond worden in cellysaat, maar ook voor de meeste andere endoglycosidasen kon dit niet worden aangetoond. Echter kon voor endoM ook geen de-N-glycosylatie activiteit aangetoond worden, terwijl dit dan weer wel kon voor de andere endoglycosidasen. EndoM bevat eerder een transglycosylatie-activiteit en we speculeren dat dit de oorzaak is.*

- Met welke andere endoglycosidasen is de GlycoDelete-technologie nog compatibel? En zijn er endoglycosidasen die een meer complete de-N-glycosylatie uitvoeren dan endoT?

*In de HEK293S GnT<sup>-/-</sup>-achtergrond blijken endoBI-1 en endoF2 het even goed te doen als endoT. EndoH lijkt het zelf beter te doen dan endoT in diezelfde achtergrond, dit volgt uit het transiënte cotransfectie-experiment met hIL-22 en daaropvolgende in vitro endoH-digest.*

- Kan het gebruik van één of meerdere van deze endoglycosidasen ertoe leiden dat de GlycoDelete-technologie rechtstreeks toegepast kan worden op zoogdiercellijnen met natuurlijke complex type glycosylatie?

*Het antwoord hierop is dat we enkele grote stappen in de goede richting hebben gezet, vooral endoH is zeer efficiënt in het verwijderen van N-glycanen. Vooreerst moeten de gegenereerde HEK293S eH-klonen verder gekarakteriseerd worden om een idee te krijgen waar en hoe geoptimaliseerd moet worden. Ook endoF3 mag niet uit het oog verloren worden, dit enzyme vertoont een significante de-N-glycosylatie activiteit in een wild-type HEK293S-achtergrond.*

## Toekomstperspectieven

- Het experiment waar transiënt hGM-CSF werd getransfecteerd in de nieuw gegenereerde HEK293S eH-klonen moet herhaald worden. Er moet gecontroleerd worden of van elke opstelling evenveel eiwit wordt gevisualiseerd op western blot. Daarna kan verder de uiteindelijke HEK293S eH-cel lijn geselecteerd worden die naast de meest complete verwijdering van N-glycanen ook goede celparameters, zoals een snelle groei en eenvoudige manipulatie, vertoont.
- Bij deze celparameters behoort ook de 'Unfolded Protein Response'. Het is gewild dat deze niet opgereguleerd is en dit moet ge-assayd worden. Opregulatie zou kunnen wijzen op interferentie met eiwitopvouwing door overexpressie van endoH.

- Extra experimenten om de hoeveelheid resterende N-glycanen na te gaan moeten uitgevoerd worden. Zo kan de toevoeging van kifunensine aan de HEK293S eH-cel lijn ons leren of er nog resterende N-glycanen aanwezig zijn. De toevoeging van O-glycaaninhibitoren, zoals benzyl 2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranoside (Delannoy *et al*, 1996), kan ons leren of de resterende smeer nog steeds te zien bij recombinant geproduceerd hGM-CSF enkel O-glycanen zijn of ook N-glycanen.
- Om te bekijken welke N-glycanen nog aanwezig zijn op het hGM-CSF geproduceerd in HEK293S eH-cellen moeten de suikerprofielen geanalyseerd worden door middel van DSA-FACE, alsook bevestigd worden met de MALDI-TOF/TOF massaspectrometer. Alsook kan met massaspectrometrie bepaald worden wat de fractie is aan deze resterende N-glycanen relatief ten opzichte van hGM-CSF geproduceerd in wild-type HEK293S-cellen.
- EndoH moet zeer snel de N-glycanen verwijderen want eenmaal het glycoproteïne mediaalGolgi is gepasseerd, en meer bepaald mannosidase II, is het  $\alpha(1,3)$ -gebonden mannoseresidu verwijderd. Dit mannose is cruciaal voor de enzymatische activiteit van endoH. Er moet uitgezocht worden of de contacttijd van endoH kan verlengd worden door bijvoorbeeld een hele lage hoeveelheid kifunensine aan het medium toe te voegen of de nutriëntsamenstelling zo te optimaliseren dat de cel vooral hoog-mannose type glycanen synthetiseert (Butler, 2005).
- Door tijdsgebrek werd in deze thesis vooral gefocust op endoH, maar misschien kan door cotransfectie van een tweede endoglycosidase een complete de-N-glycosylatie bekomen worden. Zeker endoF3 is een goede kandidaat, want de substraatspecificiteit van endoF3 is volledig complementair aan deze van endoH. We speculeren dat endoF3 meest actief is in het transGolgi, waar endoH geen de-N-glycosylatie activiteit meer vertoont. In het transGolgi-apparaat zijn de glycosylatiesites van de proteïnen reeds voor een groot gedeelte bezet met complex type glycanen, het geschikte substraat voor endoF3. De enkele N-glycanen die ontsnappen aan endoH kunnen dan verwijderd worden door endoF3.
- Ook de klonering van endoS in een expressievector mag niet opgegeven worden. EndoS zou het endoglycosidase kunnen zijn dat zeer efficiënt alle N-glycanen van antilichamen kan verwijderen. Antilichamen zijn veruit de meest geproduceerde therapeutische eiwitten van het moment (Walsh, 2010). Er is zeker vraag naar een versie van de GlycoDelete-technologie specifiek aangepast voor de productie van antilichamen. Er wordt ook verwacht dat de de-N-glycosylatie activiteit van endoS veel minder invloed zal hebben op de celmorfologie omdat de N-glycanen aanwezig op de eigen eiwitten van de cel geen substraat zijn voor endoS.
- Doorheen deze gehele thesis bleek dat de opbrengst van de meeste recombinant geproduceerde eiwitten in HEK293S-cellen en afgeleiden zeer laag ligt. Het optimaliseren van een protocol waarmee werkbare hoeveelheden aan eiwit worden bekomen, zou een grote hulp zijn in het labo.

# MATERIAAL & METHODEN

---

### Buffers, oplossingen, media & antibiotica

---

De samenstelling van verschillende buffers, oplossingen, media en antibiotica wordt getoond in bijlage

---

### *E. coli* transformatie ('heat shock'-methode)

---

Ingevroren chemisch competente *E. coli*-cellen (MC1061) werden ontdooid op ijs (10'). Hieraan werd een bepaalde hoeveelheid plasmide toegevoegd. Bij plasmideamplificatie werd een beperkte hoeveelheid plasmideDNA (0,1 µg) toegevoegd, maar een ligatiemengsel werd compleet toegevoegd. De *E. coli*-cellen werden na een half uur op ijs één minuut bij 42°C geplaatst en daarna meteen terug op ijs (5'). Luria Broth (LB) medium of Terrific Broth (TB) medium (zonder antibioticumselectie) (900 µL) werd toegevoegd en voor één uur al schuddend (226 rpm) geïncubeerd bij 37°C. Laatst werd een hoeveelheid (exacte waarden, zie sectie 'klonering') uitgeplaat op selectief medium door middel van glazen beads. Het antibioticum in de LB-agar was afhankelijk van de antibioticum resistentiemerker op het plasmide.

---

### Plasmide en DNA zuivering

---

PCR- en restrictiedigest-fragmenten werden na toevoeging van 10X DNA loading dye gescheiden op een agarosegel (1,2%), gevisualiseerd met ethidiumbromide, uitgesneden en opgezuiverd door middel van NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel).

Plasmiden werden opgezuiverd door middel van GenCatch™ Plasmid DNA Miniprep Kit (Epoch Life Sciences) of NucleoBond®Xtra Midi plasmid purification (Macherey-Nagel), naargelang het volume van de *E. coli*-cultuur. DNA-concentratie van deze plasmiden werden gemeten via Nanodrop® (Thermo Scientific).

Genomisch DNA werd opgezuiverd via de Gentra® Puregene® Cell kit (Qiagen). DNA-concentratie van het gDNA werden gemeten via Nanodrop® (Thermo Scientific).

---

### Polymerase chain reaction (PCR)

---

Een PCR-reactie werd uitgevoerd op een DNA-template (500 ng) met het Phusion®-polymerase (New England Biolabs®) (0,2 µL). De PCR-mix bevatte daarnaast 5X Phusion HF buffer (4 µL), 100 µM forward en reverse primers (0,5 µL), 10 mM dNTP's (0,4 µL) en milliQ (totaalvolume: 20 µl). Het PCR-programma omvatte een initiële denaturatie-stap (30" bij 98°C), 25 cycli denaturatie (5" bij 98°C), annealing (10" bij T<sub>m</sub>) en extensie (15" tot 30"/kb bij 72°C) en een finale extensie (5' bij 72°C).

### Kolonie-PCR

Een PCR-reactie werd uitgevoerd op een kleine hoeveelheid celmateriaal met het Taq-polymerase (Invitrogen) (1 u). De PCR-mix bevatte daarnaast 10X PCR Rxn buffer (2 µL), 100 µM forward en reverse primers (0,5 µL), 10 mM dNTP's (0,4 µL), 50 mM MgCl<sub>2</sub> en milliQ (totaalvolume: 20 µl). Het PCR-programma omvatte een initiële denaturatie-stap (5' bij

96°C), 25 cycli denaturatie (45" bij 96°C), annealing (30" bij T<sub>m</sub>) en extensie (1'/kb bij 72°C) en een finale extensie (10' bij 72°C).

### gDNA-PCR

Een PCR-reactie werd uitgevoerd op ± 200 ng gDNA met het Taq-polymerase in 2X GoTaq® Green Mastermix (Promega) (10 µL). Daarnaast werd 100 µM forward en reverse primers (0,1 µL) en milliQ (totaalvolume: 20 µL) toegevoegd. Het PCR-programma omvatte een initiële denaturatie-stap (5' bij 96°C), 28 cycli denaturatie (45" bij 96°C), annealing (30" bij T<sub>m</sub>) en extensie (1'/kb bij 72°C) en een finale extensie (10' bij 72°C).

DNA-template	Strategie	Fw/Rev	Sequentie (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
EndoH in gDNA	Detectie	Fw	TTCTGTCGCCTCCATCCA	56,0
		Rev	ACCCACATCAGTCGCCTA	55,7

De primers werden ontwikkeld met behulp van CLC workbench, de smelttemperatuur (T<sub>m</sub>) werd bepaald met Primer 3.

### Restrictiedigesten en ligatie

Een restrictiedigest van 1 µg plasmideDNA werd verkregen door toevoeging van restrictie-enzymen (1 µL/restrictiesite), 10X reactiebuffer (2 µL), eventueel 10 mg/ml Bovine Serum Albumine (BSA) (0,2 µL) en milliQ (totaalvolume: 20 µL). Voor andere reactiefactoren werd teruggerepen naar aanduidingen van de leveranciers van de enzymen (Promega, Fermentas, NEB). Het restrictiedigest werd één uur geïncubeerd bij 37°C en opgezuiverd volgens het protocol beschreven in sectie 'Plasmide en DNA zuivering'.

Ligatie van restrictiedigest-fragmenten en eventueel PCR-fragmenten (gegenereerd volgens het protocol beschreven in sectie 'Polymerase Chain Reaction (PCR)') werd verkregen door toevoeging van 10X ligatiebuffer (2 µL), T4 DNA-ligase (Fermentas) (1 µL) en milliQ (totaalvolume: 20 µL).

### Klonering van endoglycosidase- en glycoproteïne-sequenties

#### Overzicht genexpressieconstructen

EndoBI-1, endoF2, endoF3, endoH en endoM werden chemisch gesynthetiseerd en reeds door Genscript in de pCAXL-vector gekloneerd. EndoT werd reeds gekloneerd in de pCAGGS-vector en enkel endoS moest overgekloneerd worden vanuit een pUC57-vector naar een andere, geschikte expressievector.

hIL-22 werd chemisch gesynthetiseerd en reeds door Genscript in de pcDNA3-vector gekloneerd. hGM-CSF werd reeds gekloneerd in de pcDNA3-vector en αCD20-hlgG kwam in een niet gekende vector van NovImmune.

#### Kloneringsstrategieën

Strategie 1 (klassiek): EndoS werd door middel van XhoI en Bsu36I (Promega) uit de pUC57-vector geknipt en HA werd door middel van XhoI en Bsu36I (Promega) uit de pCAGGS-vector

geknijpt. Restrictiedigest, DNA-zuivering, ligatie en *E. coli*-transformatie werden uitgevoerd volgens de protocols beschreven in respectievelijke secties. *E. coli* werd uitgeplaat (100-300 µL) op LB-agar met carbenicilline en overnacht gegroeid bij 37°C. Kolonies werden geanalyseerd door middel van kolonie-PCR, zoals voorheen beschreven.

DNA-template	Strategie	Fw/Rev	Sequentie (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
pCAGGS-vector	1-5	Fw	ACGTGCTGGTTATTGTGCTG	56,0
		Rev	CTTCTGATAGGCAGCCTGCAC	58,1
EndoS	1-5	Fw	gcactcgacATGATTCATAACC	53,0
		Rev	gcggccgcTTACAGGTCTTCTTCGCTAATC	65,3
EndoS	1-5	Fw	ttaggagtggaattccATGATTCATACCAACCTGAAG	61,7
		Rev	tgaggagtgaattccTTACAGGTCTTCTTCGCTAATC	62,5

De primers werden ontwikkeld met behulp van CLC workbench, de smelttemperatuur (T<sub>m</sub>) werd bepaald met Primer 3.

**Strategie 2 (klassiek):** EndoS werd vooreerst gePCRT uit de pUC57-vector volgens het protocol beschreven in sectie 'Polymerase Chain Reaction (PCR)', gecheckt op agarosegel en gezuiverd door middel van NucleoSpin® PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). Daarna werd een restrictiedigest uitgevoerd op dit PCR-product met de enzymen XhoI en NotI (Fermentas). De lege pCAXL-vector of de pCAXL:HA-vector werden ook geknijpt met deze enzymen. Restrictiedigest, DNA-zuivering, ligatie en *E. coli*-transformatie werden uitgevoerd volgens de protocols beschreven in respectievelijke secties. *E. coli* werd uitgeplaat (100-300 µL) op LB-agar met carbenicilline en overnacht gegroeid bij 37°C. Kolonies werden geanalyseerd door middel van kolonie-PCR, zoals voorheen beschreven, met dezelfde primers getoond bij 'strategie 1'.

DNA-template	Strategie	Fw/Rev	Sequentie (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
EndoS	1 & 2	Fw	gcactcgacATGATTCATAACC	62,4
		Rev	gcggccgcTTACAGGTCTTCTTCGCTAATC	59,5

De primers werden ontwikkeld met behulp van CLC workbench, de smelttemperatuur (T<sub>m</sub>) werd bepaald met T<sub>m</sub> Calculator (Thermo Scientific).

**Strategie 3 (klassiek):** EndoS werd vooreerst gePCRT uit de pUC57-vector volgens het protocol beschreven in sectie 'Polymerase Chain Reaction (PCR)' met de primers getoond in 'strategie 2', gecheckt op agarosegel en gezuiverd door middel van NucleoSpin® PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). Daarna werd dit PCR-product geligeerd in de pCR-Blunt-II-TOPO-vector (Invitrogen) volgens het protocol beschreven in de Zero Blunt TOPO PCR cloning kit. Het PCR-product (4 µL) werd gemengd met 1 µL Salt Solution en 1 µL pCR-Blunt-II-TOPO-vector en werd geïncubeerd (5') op kamertemperatuur. Daarna werd het volledige mengsel getransformeerd naar *E. coli*-cellen volgens sectie 'E. coli transformatie'. De getransformeerde bacteriën werden uitgeplaat (20-100 µL) op LB-agar met kanamycine en overnacht gegroeid bij 37°C. Kolonies werden opgegroeid voor plasmideamplificatie. Gezuiverd plasmideDNA werd geanalyseerd door een restrictiedigest met XhoI, NotI en DraI.

EndoS werd door middel van XhoI en NotI (Fermentas) uit de pCR-Blunt-II-TOPO-vector geknijpt en HA werd door middel van XhoI en NotI (Fermentas) uit de pCAXL-vector geknijpt. Restrictiedigest, DNA-zuivering, ligatie en *E. coli*-transformatie werden uitgevoerd volgens de

protocols beschreven in respectievelijke secties. *E. coli* werd uitgeplaat (100-300  $\mu$ L) op LB-agar met carbenicilline en overnacht gegroeid bij 37°C. Kolonies werden geanalyseerd door middel van kolonie-PCR, zoals voorheen beschreven, met primers getoond in 'strategie 1'.

**Strategie 4 (CloneEZ):** EndoS werd vooreerst gePCRt uit de pUC57-vector volgens het protocol beschreven in sectie 'Polymerase Chain Reaction (PCR)', gecheckt op agarosegel en gezuiverd door middel van NucleoSpin® PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). De lege pCAXL-vector werd geknipt met het enzyme XhoI. DNA-zuivering en *E. coli*-transformatie werden uitgevoerd volgens de protocols beschreven in respectievelijke secties. In plaats van ligatie berust CloneEZ (Genscript) op recombinatie. Een reactie wordt opgezet door 6  $\mu$ L gelineariseerde vector, n  $\mu$ L PCR DNA (n = 4, 6, 8 en 10 bij lengte = 1 kb, 2 kb, 3 kb en >3 kb, respectievelijk), 2  $\mu$ L 10X CloneEZ® buffer, 2  $\mu$ L CloneEZ® Enzyme en milliQ (totaalvolume: 20  $\mu$ L) samen te voegen. Dit mengsel werd gedurende 30 minuten geïncubeerd bij 22°C. *E. coli* werd uitgeplaat (100-300  $\mu$ L) op LB-agar met carbenicilline en overnacht gegroeid bij 37°C. Kolonies werden geanalyseerd door middel van kolonie-PCR, zoals voorheen beschreven, met dezelfde primers getoond bij 'strategie 1'.

DNA-template	Strategie	Fw/Rev	Sequentie (5' → 3')	Tm (°C)
EndoS	4	Fw	ttggcaaagaattccATGATTCATACCAACCTGAAG	58,5
		Rev	tgaggagtgaattccTTACAGGTCTTCTTCGCTAATC	59,5

De primers werden ontwikkeld met behulp van CLC workbench, de smelttemperatuur (Tm) werd bepaald met Tm Calculator (Thermo Scientific).

**Strategie 5 (CloneEZ + Gateway®):** EndoS werd vooreerst gePCRt uit de pUC57-vector volgens het protocol beschreven in sectie 'Polymerase Chain Reaction (PCR)', gecheckt op agarosegel en gezuiverd door middel van NucleoSpin® PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). De pENTRY-vector werd geknipt met de enzymen XhoI en EcoRI. DNA-zuivering en *E. coli*-transformatie werden uitgevoerd volgens de protocols beschreven in respectievelijke secties. Een reactie werd opgezet door 6  $\mu$ L gelineariseerde vector, n  $\mu$ L PCR DNA (n = 4, 6, 8 en 10 bij lengte = 1 kb, 2 kb, 3 kb en >3 kb, respectievelijk), 2  $\mu$ L 10X CloneEZ® buffer, 2  $\mu$ L CloneEZ® Enzyme en milliQ (totaalvolume: 20  $\mu$ L) samen te voegen. Dit mengsel werd gedurende 30 minuten geïncubeerd bij 22°C. *E. coli* werd uitgeplaat (900  $\mu$ L) op LB-agar met kanamycine en overnacht gegroeid bij 37°C. Geen kolonies werden verkregen.

DNA-template	Strategie	Fw/Rev	Sequentie (5' → 3')	Tm (°C)
EndoS	5	Fw	atccggtaccgaattcaccATGATTCATACCAACCTGAAGA	60,4
		Rev	gtctagatatctcgagtTACAGGTCTTCTTCGCTAATC	59,5

De primers werden ontwikkeld met behulp van CLC workbench, de smelttemperatuur (Tm) werd bepaald met Tm Calculator (Thermo Scientific).

## Cultivatie HEK293S-celijn en afgeleiden

### Opstarten HEK293S-celijn en afgeleiden

Één 'freezing' per celijn (HEK293S WT, HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> en HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT) werden ontdooid en verdund in complete DMEM F12-medium (Invitrogen) (5 mL). Gedurende 10 minuten werden de cellen gecentrifugeerd aan 1000 x g. Het supernatans werd verwijderd



en de pellet werd opgelost in 10 mL complete DMEM F12, het correcte volume van een T25-flacon. De cellen werden gegroeid in de warme kamer bij 37°C.

#### **Doorzetten HEK293S-celijn en afgeleiden**

Bij confluente werden de cellen losgeschud en 1 mL werd overgezet naar een nieuwe T25-flacon met 9 mL complete DMEM F12-medium, d.i. 1 op 10 verdund. Dit regime werd aangehouden tweemaal per week. De cellen werden gegroeid in de warme kamer bij 37°C.

#### **Uitzaaien HEK293S-celijn en afgeleiden**

Twee dagen voor transfectie werden cellen 1 op 12 verdund in een cultuurplaat of falcon (vb. 300 µL losgeschudde cellen uit een T25 bij confluente werden overgezet in één well van een 6-wellplaat samen met 1,7 mL vers compleet DMEM F2-medium). Na twee dagen zijn de cellen subconfluent, ideaal voor transfectie. De cellen werden gegroeid in de incubator bij 37°C, 80% H<sub>2</sub>O en 5% CO<sub>2</sub>.

#### **Genereren 'freezing' van HEK293S-celijn en afgeleiden**

De cellen werden losgemaakt en overgebracht naar een centrifugeertube. De cellen werden gecentrifugeerd voor vijf minuten aan 1000 x g en het supernatans werd verwijderd. De pellet werd heropgelost in 800 µL complete DMEM F12 medium en overgebracht naar een capsule. Hieraan werd 100 µL DMSO toegevoegd, daarna meteen op ijs gebracht en uiteindelijk ingevroren bij -80°C.

#### **Transfectie HEK293S-celijn en afgeleiden**

---

##### **Calciumfosfaatprecipitatie (6-well formaat)**

Twee uur voor transfectie werd het medium ververs (800 µL). Hieraan werd een mengsel van 20 µL CaCl<sub>2</sub>, totaal 2 µg DNA (zie secties transiënte en stabiele transfecties voor concrete samenstellingen), 100 µL TE-buffer en 200 µL BS/HEPES-buffer toegevoegd. BS/HEPES-buffer werd als laatste druppelgewijs toegevoegd en geïncubeerd voor twee minuten bij kamertemperatuur. Daarna werd het geheel toegevoegd aan de cellen en voor vier uur geïncubeerd in de incubator. Laatst werd het medium ververs bij transiënte transfectie met serum-vrij DMEM F12 en bij stabiele transfectie met complete DMEM F12 of geconditioneerd complete DMEM F12.

##### **FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega) (12-wellformaat):**

Transfectie werd uitgevoerd volgens de FuGENE® HD Protocol Database. Twee uur voor transfectie werd het medium ververs (1 mL). Hieraan werd een mengsel (50 µL) van 1,1 µg DNA, 3,3 µL FuGENE® HD reagent en milliQ (totaalvolume: 55,3 µL) toegevoegd. Het mengsel werd voordien eerst gemixt en vijf minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur. Het medium moet daarna niet meer ververs worden.

## Transiënte transfecties

Eiwitproductie his-getagd eiwit (hGM-CSF) en  $\alpha$ CD20-hIgG: HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT- en HEK293S-cellen werden uitgezaaid in een T175 volgens het protocol onder sectie 'Uitzaaien HEK293S-cel lijn en afgeleiden' en werden getransfecteerd met hGM-CSF en  $\alpha$ CD20-hIgG, respectievelijk, door middel van de calciumfosfaatmethode. De DNA-mix bestond uit 20  $\mu$ g hGM-CSF in de pcDNA3-vector of  $\alpha$ CD20-hIgG in niet gekende vector, 10  $\mu$ g NS1 en 10  $\mu$ g salmon sperm (SS) DNA. Het medium werd na drie dagen afgenomen en gecentrifugeerd. Het supernatans werd extra gezuiverd doorheen een syringe filter (0,2  $\mu$ m) (vwr).

### De-N-glycosylatie activiteit experimenten:

\*HEK293S- en HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen werden uitgezaaid in 6-wellplaten. HEK293S-cellen werden gecotransfecteerd met hGM-CSF en  $\alpha$ CD20-hIgG enerzijds en de endoglycosidaseconstructen anderzijds door middel van de calciumfosfaatmethode. De DNA-opstellingen waren als volgt: 800 ng hGM-CSF/ $\alpha$ CD20-hIgG, 400 ng NS1, 800 ng SS; 800 ng hGM-CSF/ $\alpha$ CD20-hIgG, 400 ng NS1, 800 ng lege pCAGGS-vector; 800 ng hGM-CSF/ $\alpha$ CD20-hIgG, 400 ng NS1, 800 ng endoX (met X = BI-1, F2, F3, H, M, S, T). HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen werden gecotransfecteerd met hIL-22 en  $\alpha$ CD20-hIgG enerzijds en de endoglycosidaseconstructen anderzijds door middel van de calciumfosfaatmethode. De DNA-opstellingen waren als volgt: 800 ng hIL-22/ $\alpha$ CD20-hIgG, 400 ng NS1, 800 ng SS; 800 ng hIL-22/ $\alpha$ CD20-hIgG, 400 ng NS1, 800 ng lege pCAGGS-vector; 800 ng hIL-22/ $\alpha$ CD20-hIgG, 400 ng NS1, 800 ng endoX.

\*HEK293S eH-klones (gegenereerd in sectie 'stabiele transfectie - endoX') werden uitgezaaid in 6-wellplaten. Deze werden getransfecteerd met hGM-CSF gebruik makend van FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent. De DNA-opstelling was als volgt: 400 ng NS1, 1200 ng hGM-CSF en 400 ng SS.

NS1/SV40-experimenten: HEK293S-, HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>- en HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT-cellen werden uitgezaaid in 6-wellplaten. Deze cellijnen werden getransfecteerd met hIL-22 door middel van de calciumfosfaatmethode. De DNA-opstellingen bij de drie cellijnen waren als volgt: 2  $\mu$ g SS; 800 ng hIL-22 en 1200 ng SS; 400 ng NS1 en 1600 ng SS; 400 ng NS1, 800 ng hIL-22 en 800 ng SS; 400 ng SV40 en 1600 ng SS; 400 ng SV40, 800 ng hIL-22 en 800 ng SS; 400 ng NS1, 400 ng SV40 en 1200 ng SS; 400 ng NS1, 400 ng SV40, 800 ng hIL-22 en 400 ng SS. Het medium werd na 3 dagen afgenomen.

## Stabiele transfectie

hGM-CSF/hIL-22: HEK293S-, HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>- en HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT-cellen werden uitgezaaid in 12-wellplaten. Deze cellijnen werden getransfecteerd met pcDNA3:hGM-CSF-, pcDNA3:hIL-22- of lege pCAGGS-vector gebruik makend van FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent. Om een idee te hebben over de te gebruiken concentratie aan geniticine (G418) werd eerst een 'killcurve' opgesteld, maar om efficiënt te werken werden de meest relevante G418-concentraties meegenomen bij het genereren van de stabiele cellijnen. De uiteindelijke opstellingen waren bij HEK293S- en HEK293S GnTI<sup>-/-</sup>-cellen: 200  $\mu$ g, 300  $\mu$ g, 400  $\mu$ g en 500  $\mu$ g. Bij HEK293S GnTI<sup>-/-</sup> eT-cellen waren dit: 100  $\mu$ g, 150  $\mu$ g, 200  $\mu$ g en 300  $\mu$ g.

Deze concentraties aan geniticine werden één dag na transfectie toegevoegd aan de losgeschudde cellen en tweemaal per week ververst.

**EndoX:** HEK293S-cellen werden uitgezaaid in 6-wellplaten. Deze cellijnen werden getransfecteerd met de verschillende endoglycosidaseconstructen en de lege pCAGGS-vector door middel van de calciumfosfaatmethode. Een dubbele selectiemethode werd gebruikt om stabiele endoX-cellijnen te bekomen, maar vooral een stabiele endoH-celijn. Kifunensine (1 µl 10mM solutie) en concanavale A (20 µg) werden toegevoegd aan cellen in 2 mL medium en tweemaal per week ververst. ConA werd één dag na transfectie toegevoegd aan losgeschudde cellen. Na vier tot zes weken ontstonden aparte kolonies van resistente cellen, die werden getransfereerd naar 96-wellplaten in geconditioneerd complete DMEM F12-medium (zonder selectie). Deze kolonies werden geleidelijk opgeschaald tot T25-flacons waaruit enerzijds 'freezings' werden ontwikkeld (zie sectie 'Genereren 'freezing' van HEK293S-celijn en afgeleiden') en anderzijds de stabiele aanwezigheid van het gen van interesse werd bevestigd op genomisch DNA-niveau door middel van PCR en op eiwitniveau via western blot.

### **Endoglycosidase expressie analyse**

---

#### **Eiwitprecipitatie**

Voor het opconcentreren van eiwit uit mediumstalen werden twee volumes ijskoude aceton toegevoegd en een half uur geïncubeerd bij 4°C. Daarna werden de stalen gecentrifugeerd voor vijf minuten aan 14000 rpm. Het supernatans werd verwijderd en de pellet gedroogd bij 37°C. Laatst werd de pellet opnieuw opgelost in 48 µL milliQ en 12 µL 5X Laemmli loading dye.

#### **Maken van cellysaat**

Aan  $1,2 \times 10^6$  cellen (= confluente 6-well) werd 500 µL RIPA-buffer toegevoegd en gedurende 10 seconden gevortext. Dit mengsel werd gedurende een half uur geïncubeerd in de koude kamer op een 'rocking platform' en daarna gecentrifugeerd voor 10 minuten aan 14000 rpm. Het supernatans werd overgebracht naar een nieuwe eppendorf-tube.

#### **SDS-PAGE en Western blotting immunodetectie**

Eiwitstaal werd elektroforetisch gescheiden (100V) op ijs op standaard 12% SDS-PAGE gels (zie bijlage). De gels werden geblot op nitrocellulose membranen met transferbuffer via de 'semi-dry'-methode (25V, 80 mA/gel). De blots werden voor minimum één uur (kamertemperatuur) of maximum overnacht (4°C) geblokkeerd met blocking buffer. Daarna werden de blots voor één uur met het primaire antilichaam van interesse geïncubeerd en na drie wasstappen eventueel voor één uur geïncubeerd met het secundaire antilichaam van interesse. Na nog eens drie wasstappen werd het eiwit gevisualiseerd ofwel met de PerkinElmer ECL kit ofwel met de odyssey (LI-COR Biosciences).

---

## ***In vitro* verwijderen van N-glycanen**

---

### ***In vitro* endoH-digest**

Aan 1  $\mu\text{L}$  10X Glycoprotein Denaturing Buffer (NEB) werd 9  $\mu\text{L}$  opgeconcentreerd eiwit uit mediumstaal toegevoegd en voor 10 minuten geïncubeerd bij 100°C. Aan dit mengsel werd 2  $\mu\text{L}$  10X G5 Reaction Buffer (NEB), 1  $\mu\text{L}$  endoH (NEB) en 7  $\mu\text{L}$  milliQ toegevoegd en voor één uur geïncubeerd bij 37°C.

### ***In vitro* PNGaseF-digest**

Aan 1  $\mu\text{L}$  10X Glycoprotein Denaturing Buffer (NEB) werd 9  $\mu\text{L}$  opgeconcentreerd eiwit uit mediumstaal toegevoegd en voor 10 minuten geïncubeerd bij 100°C. Aan dit mengsel werd 2  $\mu\text{L}$  10X G7 Reaction Buffer (NEB), 2  $\mu\text{L}$  10% NP-40 (NEB), 2  $\mu\text{L}$  PNGaseF (NEB) en 4  $\mu\text{L}$  milliQ toegevoegd en voor één uur geïncubeerd bij 37°C.

---

## **Proteïne purificatie**

---

### **Affiniteitschromatografie**

His-getagde eiwitten (hGM-CSF): Een kolom werd gevuld met 500  $\mu\text{L}$  chelating sepharose 'slurry' beads (GE Healthcare). De kolom was compatibel met een reguliere spuit, waardoor alle oplossingen op een eenvoudige manier over de kolom konden gebracht worden. De ethanol waar de beads in bewaard werden, werd verwijderd door te wassen met een vijftal kolomvolumes milliQ. De kolom werd gefunctionaliseerd met een vijftal kolomvolumes chelating buffer en gewassen met eerst een vijftal kolomvolumes 20mM HEPES en daarna een vijftal kolomvolumes milliQ. Gefilterd celmedium werd tweemaal over de kolom gebracht en een fractie van elke flowthrough werd verzameld. De kolom werd driemaal gewassen met buffer A, fracties werden verzameld. Daarna werd het his-getagde eiwit geëluëerd eerst met een 50:50 mengsel van buffer A:B en laatst met 100% buffer B. alle verzamelde fracties werden geanalyseerd op SDS-PAGE met Coomassie-detectie. De kolom werd bewaard op 20% ethanol, maar kon ook geregenereerd worden door sequentieel een vijftal kolomvolumes regeneratiebuffer, milliQ, 1M NaOH, 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7) en 20% ethanol over de kolom te brengen.

$\alpha\text{CD}20\text{-hIgG}$ : Een kolom werd gevuld met 500  $\mu\text{L}$  MEP HyperCel™ 'slurry' resin (Pall Life Sciences). De kolom was compatibel met een reguliere spuit, waardoor alle oplossingen op een eenvoudige manier over de kolom konden gebracht worden. De 0,02% sodium azide storage buffer waar het resin in bewaard werd, werd verwijderd door te wassen met een vijftal kolomvolumes 1X PBS. Het resin werd verder gewassen met 0,5M NaOH (contacttijd: 30-60 minuten) en 10 kolomvolumes 1X PBS. Gefilterd celmedium werd tweemaal over de kolom gebracht en een fractie van elke flowthrough werd verzameld. De kolom werd driemaal gewassen met 1X PBS, fracties werden verzameld. Het gebonden antilichaam werd geëluëerd met vier kolomvolumes 50 mM glycine (pH 4) en het eluaat (1 mL) werd meteen geneutraliseerd met 6  $\mu\text{L}$  tris (pH 8). De kolom werd geregenereerd door opnieuw toevoegen van 0,5M NaOH (contacttijd: 30-60 minuten) en 10 kolomvolumes 1X PBS. De kolom werd bewaard op 1M NaCl in 20% ethanol.

### **SDS-PAGE en Coomassie-detectie**

Eiwitstaal werd elektroforetisch gescheiden (100V) op ijs op standaard 12% SDS-PAGE gels (zie bijlage). De gel werd gekleurd (30') in Coomassie Brilliant blue-oplossing en daarna ontkleurd in Destain-oplossing. Gels konden bewaard worden in 70% ethanol en werden ingescand en gedroogd.

---

---

## REFERENTIES

---

---

- Alduaij W, Ivanov A, Honeychurch J, Cheadle EJ, Potluri S, Lim SH, Shimada K, Chan CHT, Tutt A, Beers SA, Glennie MJ, Cragg MS & Illidge TM (2011) Novel type II anti-CD20 monoclonal antibody (GA101) evokes homotypic adhesion and actin-dependent, lysosome-mediated cell death in B-cell malignancies. *Blood* **117**: 4519–4529
- Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K, Husain S, Kreindler JL, Dubin PJ, Pilewski JM, Myerburg MM, Mason CA, Iwakura Y & Kolls JK (2008) IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.* **14**: 275–281
- Baneyx F & Mujacic M (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**: 1399–1408
- Boniface K, Guignouard E, Pedretti N, Garcia M, Delwail A, Bernard F-X, Nau F, Guillet G, Dagregorio G, Yssel H, Lecron J-C & Morel F (2007) A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **150**: 407–415
- Butler M (2005) Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**: 283–291
- Byrne B, Donohoe GG & O’Kennedy R (2007) Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discov. Today* **12**: 319–326
- Chu L & Robinson DK (2001) Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 180–187
- Collin M & Olsén A (2001) EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *Embo J.* **20**: 3046–3055
- Cummings RD & Etzler ME (2009) Boek: Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. In *Essentials of Glycobiology*, Varki A Cummings RD Esko JD Freeze HH Stanley P Bertozzi CR Hart GW & Etzler ME (eds) Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Dean FB, Bullock P, Murakami Y, Wobbe CR, Weissbach L & Hurwitz J (1987) Simian virus 40 (SV40) DNA replication: SV40 large T antigen unwinds DNA containing the SV40 origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 16–20
- Delannoy P, Kim I, Emery N, De Bolos C, Verbert A, Degand P & Huet G (1996) Benzyl-N-acetyl-alpha-D-galactosaminide inhibits the sialylation and the secretion of mucins by a mucin secreting HT-29 cell subpopulation. *Glycoconj. J.* **13**: 717–726
- Disis ML, Bernhard H, Shiota FM, Hand SL, Gralow JR, Huseby ES, Gillis S & Cheever MA (1996) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. *Blood* **88**: 202–210
- Forno G, Bollati Fogolin M, Oggero M, Kratje R, Etcheverrigaray M, Conradt HS & Nimitz M (2004) N- and O-linked carbohydrates and glycosylation site occupancy in recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secreted by a Chinese hamster ovary cell line. *Eur. J. Biochem.* **271**: 907–919
- Fujita K, Kobayashi K, Iwamatsu A, Takeuchi M, Kumagai H & Yamamoto K (2004) Molecular cloning of *Mucor hiemalis* endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and some properties of the recombinant enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **432**: 41–49

- Garrido D, Nwosu C, Ruiz-Moyano S, Aldredge D, German JB, Lebrilla CB & Mills DA (2012) Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidases from Infant Gut-associated Bifidobacteria Release Complex N-glycans from Human Milk Glycoproteins. *Mol. Cell. Proteomics* **11**: 775–785
- Glennie MJ, French RR, Cragg MS & Taylor RP (2007) Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* **44**: 3823–3837
- Goetze AM, Liu YD, Zhang Z, Shah B, Lee E, Bondarenko PV & Flynn GC (2011) High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology* **21**: 949–959
- Goodfellow JJ, Baruah K, Yamamoto K, Bonomelli C, Krishna B, Harvey DJ, Crispin M, Scanlan CN & Davis BG (2012) An Endoglycosidase with Alternative Glycan Specificity Allows Broadened Glycoprotein Remodelling. *J. Am. Chem. Soc.* **134**: 8030–8033
- Hale BG, Randall RE, Ortín J & Jackson D (2008) The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* **89**: 2359–2376
- Hanson SR, Culyba EK, Hsu T-L, Wong C-H, Kelly JW & Powers ET (2009) The core trisaccharide of an N-linked glycoprotein intrinsically accelerates folding and enhances stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 3131–3136
- Helenius A & Aebi M (2001) Intracellular Functions of N-Linked Glycans. *Science* **291**: 2364–2369
- Jacobs PP (2008) Doctoraat: Glycosylation and cell surface engineering in *Pichia Pastoris*.
- Jacobs PP, Geysens S, Vervecken W, Contreras R & Callewaert N (2009) Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat. Protoc.* **4**: 58–70
- Kanda Y, Yamada T, Mori K, Okazaki A, Inoue M, Kitajima-Miyama K, Kuni-Kamochi R, Nakano R, Yano K, Kakita S, Shitara K & Satoh M (2007) Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology* **17**: 104–118
- Laurence A, O’Shea JJ & Watford WT (2008) Interleukin-22: a sheep in wolf’s clothing. *Nat. Med.* **14**: 247–249
- Li H & d’ Anjou M (2009) Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**: 678–684
- Lynd LR, Weimer PJ, Zyl WH van & Pretorius IS (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 506–577
- Metcalf D (1986) The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* **67**: 257–267
- Meuris L (2012) Doctoraat: GlycoDelete: a new glycoengineering concept for protein production in mammalian cells.
- Noll T (2010) Cells and Culture: Proceedings of the 20th ESACT Meeting, Dresden, Germany, June 17-20, 2007 Springer
- Patnaik SK & Stanley P (2006) Lectin-Resistant CHO Glycosylation Mutants. In *Methods in Enzymology*, Minoru Fukuda (ed) pp 159–182. Academic Press
- Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Lehr H-A, Hirth S, Weigmann B, Wirtz S, Ouyang W, Neurath MF & Becker C (2009) STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* **206**: 1465–1472

- Rao V, Guan C & Roey PV (1995) Crystal structure of endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H at 1.9 Å resolution: active-site geometry and substrate recognition. *Structure* **3**: 449–457
- Reeves PJ, Callewaert N, Contreras R & Khorana HG (2002) Structure and function in rhodopsin: High-level expression of rhodopsin with restricted and homogeneous N-glycosylation by a tetracycline-inducible N-acetylglucosaminyltransferase I-negative HEK293S stable mammalian cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 13419–13424
- Santens F (2010) IWT-project: Biofarmaceutische eiwitten: glyco-engineeringtechnologie voor de productie van verbeterde, homogene glycovormen.
- Stals I, Karkehabadi S, Kim S, Ward M, Van Landschoot A, Devreese B & Sandgren M (2012) High Resolution Crystal Structure of the Endo-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase Responsible for the Deglycosylation of *Hypocrea jecorina* Cellulases. *Plos One* **7**:
- Stals I, Samyn B, Sergeant K, White T, Hoorelbeke K, Coorevits A, Devreese B, Claeysens M & Piens K (2010) Identification of a gene coding for a deglycosylating enzyme in *Hypocrea jecorina*. *Fems Microbiol. Lett.* **303**: 9–17
- Steenftoft C, Vakhrushev SY, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT-BG, Kong Y, Bennett EP, Mandel U, Wandall H, Lavery SB & Clausen H (2011) Mining the O-glycoproteome using zinc-finger nuclease-glycoengineered SimpleCell lines. *Nat. Methods* **8**: 977–982
- Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, Blumberg RS, Xavier RJ & Mizoguchi A (2008) IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* **118**: 534–544
- Tarentino AL, Plummer TH & Maley F (1974) The Release of Intact Oligosaccharides from Specific Glycoproteins by Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.* **249**: 818–824
- Tarentino AL, Quinones G, Changchien LM & Plummer TH (1993) Multiple endoglycosidase F activities expressed by *Flavobacterium meningosepticum* endoglycosidases F2 and F3. Molecular cloning, primary sequence, and enzyme expression. *J. Biol. Chem.* **268**: 9702–9708
- Taylor ME & Drickamer K (2011) Boek: Introduction to glycobiology Oxford; New York: Oxford University Press
- Tiels P, Baranova E, Piens K, De Visscher C, Pynaert G, Nerinckx W, Stout J, Fudalej F, Hulpiau P, Tännler S, Geysens S, Van Hecke A, Valevska A, Vervecken W, Remaut H & Callewaert N (2012) A bacterial glycosidase enables mannose-6-phosphate modification and improved cellular uptake of yeast-produced recombinant human lysosomal enzymes. *Nat. Biotechnol.* **30**: 1225–1231
- Trimble RB & Tarentino AL (1991) Identification of distinct endoglycosidase (endo) activities in *Flavobacterium meningosepticum*: endo F1, endo F2, and endo F3. Endo F1 and endo H hydrolyze only high mannose and hybrid glycans. *J. Biol. Chem.* **266**: 1646–1651
- Waddling CA, Plummer TH Jr, Tarentino AL & Van Roey P (2000) Structural basis for the substrate specificity of endo-beta-N-acetylglucosaminidase F(3). *Biochemistry (Mosc.)* **39**: 7878–7885
- Walsh G (2010) Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat. Biotechnol.* **28**: 917–924
- Walter MR, Cook WJ, Ealick SE, Nagabhushan TL, Trotta PP & Bugg CE (1992) Three-dimensional structure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Mol. Biol.* **224**: 1075–1085
- Wang C-C, Chen J-R, Tseng Y-C, Hsu C-H, Hung Y-F, Chen S-W, Chen C-M, Khoo K-H, Cheng T-J, Cheng Y-SE, Jan J-T, Wu C-Y, Ma C & Wong C-H (2009) Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Website: Carbohydrate Active Enzymes, 2013 Available at: [Http://www.cazy.org](http://www.cazy.org) [Accessed April 21, 2013]



- 
- Website: Consortium for Functional Glycomics, 2013 Available at: <http://www.functionalglycomics.org/> [Accessed April 21, 2013]
- Website: Sigma-Aldrich, 2013 *Sigma-Aldrich* Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/belgium-nederlands.html> [Accessed April 21, 2013]
- Website: Wikimedia, 2009 Available at: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fischer\\_projection\\_of\\_D-aldoses1.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fischer_projection_of_D-aldoses1.png) [Accessed April 21, 2013a]
- Website: Wikimedia, 2009 Available at: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Beta-D-Glucose.svg> [Accessed April 21, 2013b]
- Website: Wikimedia, 2009 Available at: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alpha-D-Glucose.svg> [Accessed April 21, 2013c]
- Website: GlycoPOD, 2012 Available at: <http://jcggdb.jp/GlycoPOD/protocolListShow> [Accessed April 21, 2013]
- Wurm FM (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **22**: 1393–1398
- Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M & Flavell RA (2007) IL-22 but not IL-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* **27**: 647–659

---



---

## BIJLAGEN

---



---

### I| Bijlagen bij RESULTATEN

- Lokalisatiesignaal van humaan sialyltransferase I naar het transGolgi-apparaat (bij de endoglycosidase-sequenties) of secretiesignaal van humaan CD5 (bij hIL-22-sequentie) werd aangeduid in **vet**
- Tag voor detectie van eiwitexpressie werd onderlijnd

EndoBI-1  
1851 bp

ATGATCCACACTAACCTGAAGAAAAAGTTAGCTGCTGTGTGCTGGTCTTCCTGCTGTTTGCCGTATTGCGGTG  
TGGAAGGAGAAAAAGAAAGGATCCTACTATGACTCTTTCAAGCTGCAGACAAAAGAATTTAGGTGCTGAAGTC  
CCTGGGAAAACCTGGCCATGGGCTCAGACAGCCAGTCCGTGAGCTCCTCTAGTACACAGGATCCTCACAGGGCCG  
CCAGACTCTGGGATCACTGCGAGGGCTGGCTAAGGCAAAACCAGAGGCTAGCTTCCAGGTCTGGAACAAGGACGC  
AGTGAGTCCCACACAGGAACTATCCAGTCAACCGCCGACATTTTATGGTGTACTATCGAGCCTGGCGGACGTCACC  
ATGAAAAGGGTGAACACAGATCTGCCCGACGATAATTGGATCAGCATGTATGACATTCCTTACGGGGTCGATGTGGTC  
AATATTTTTCAGTTATGTGCCTTCAGGACAGGAGGAACAGGCTCAGCCATTTTACGACAAGCTGAAAAGCGATTACGCA  
CCATATCTGCATTCCCGAGGATCAAGCTGGTGGCGGGGATTGACTACACCGGAGTGGCCGTCACCGCTTTCAGGACCT  
TCATGAAGGAGCAGAACAAAGCTGAGAGCGAAGCCACCGAAGCTGACTACGATGCCTATGCTAAGCAGGTCAATCGACA  
AATACATGATTTCCGTGGCCCTGGATGGCTGGACATCGATATGGAGGCCACCCCAACGACGCTGATGTCAAGATCT  
CTGACAATGTGATTCGCGCCCTGTCAAACATATTGGACCCAAGAGCGCTAAACCTGACACCACAATGTTCTGTATGA  
TACCAACGGCAGCTACCTGAACCTTTCAAGAATGTGCGAGAGTGTGTTGATTACGTGGCCTATCAGCAGTACGGCTCA  
AGCTCCGACAGAACAGCCAGGCGCCGTGCAGATTATCAGCCTTACATCGGGAACGAGTTCGTGCCAGGACTGACTTTTC  
CCGAGGAAGGGGACATGAACAATAGATGGTATGATGCTACCGAGCCATACGAGGAATCCCACTTCTATCAGGTCCGCT  
CTTACGTGAGGGAAACATAATCTGGGCGGGATGTTTGTGTATGCCCTGGACCCGCGATGGCGGAACTACGACAGGATC  
TGCGGAGAATCGTGCCATCCAATCTGCTGTGGACTAAGACCGCAATTGCGGAGTCTGAAGGAATGGCACTGGACACCG  
CCAAAACAGCCGCTAACCCTATCTGGATAGGATGTCTCTGCGCCAGGTCATCGACGATAATGCAGCCAGTGCAGACA  
AGGCCCGGGATATGGTCGGGAAAGCTGCAAACCTGTACGAGACCAATAAGGCTGTGCTGGGAGGCGACTATGGGAGG  
GCTTCAGCAACTTACGATCCCACCCTGGAAGCCGGACTGCTGGCCTCGACATTAGCGTGTGCTGAGCAGCAGATCGA  
TAAGTCTAGTGAGATCATTGGCGCTGACACTGCAGAATCTGATGCCAAAACCGCTTGCAGGATGGCTAGAGACGCCG  
TATCGATGGGCTGACAGGAAAGATCTACACTGCCACCAGGTGTCAGCTTGGAGCCAGGCACTGAAAGCAGCCCTGGA  
TGCCACAGTGCCCGTCCCTACACCAGACAGCACTGATCAGAACCGCAATCGGACAAAGTCACTAATCATAAAGTGCA  
GGGACAGCCTAAGCAGCTGAGCGCAACCGGCATCTCCACAGATATCATTGTGGCCGTGCGCGTGACCCTGGCTATTGCA  
GGGTGGCCCTGTCTCTGAGTAGAAAGCTGTCTGAGCAGAACTGATCAGTGAGGAAGACCTG

EndoF2  
1197 bp

ATGATTCACACAACTGAAGAAAAAGTTAGCTGCTGTGTGCTGGTCTTCCTGCTGTTTGCCGTGATCTGCGTC  
TGGAAGGAGAAAAAGAAAGGCTTACTATGACTCATTCAAGCTGCAGACAAAAGAATTTAGGTGCTGAAGAG  
CCTGGGAAAACCTGGCCATGGGAGCGACTCCAGTCTGTGAGCTCCTCTAGTACCCAGGATCCCACCGGGGCGA  
CAGACTGGGGAGTCTGAGGGGACTGGCAAAAGCCAAACCTGAGGCCCTCCTTCCAAGTGTGGAACAAGGACCGT  
GTCAACCTGTCTAATCTGATTCATACAAAATTTCTGACCATCAGATCAGTGTGGTACTATAGGACTTGGCGGAT  
AGCGCTACCGCATCCGAAATCTGCCATCAATGCGGTGGCTGCCCGACAGCCTGGATATGGTCAATGTTTCCAGATT  
ACACCCCTCTGAGAAGCCTATTGGAATACCCCTGAAGACAAAACCTACGTGCCCTATCTGCATAAGAGAGGCACAAAAG  
TCATCTACTTGGGCGACTGAACAGCCTACCACAACCTGGCGGCGAGGATTCTATTGGTACTCAAGCTGGGCA  
AGGGAATCTACGACAAATGGGTGGGAGAGTATAACCTGGATGGCATCGACATTGATATCGAATCCTCTCTAGCGGG  
CAACTGACTAAATTTGTGGCGCTACAAAGCCCTGTCCAATACTTCGGGCCAAAGTCTGGGACTGAAAAACCT  
TTGTGTATGATACCAACCAGAACTCTACAACTTCTTTATTAGACTGCCCCAGCTACAATATGTGTTCTGACGGC  
TTACGGAGCAAGTACCACAAATCTGACTACCGTCTCAGGCCCTGACGCCCTATATCAGCATGAAGCAGTTCCTGCCT  
GGCTTACGCTTTTACGAGGAAAACGGATACCAGGCAACTATTGGAATGACGTGAGGTATCCCAGAAATGGCACTGG  
AGAGCCTACGATTATGCTAGGTGGCAGCCGCAACCGGCAAGAAAGGAGCGGTCTCTCTATGCAATTTAGCGCGAC  
GGCCCTCTGACAAGTTCAAACGATAATACTCTGCGAGCTCCAACCTTTCGGGTGACCAAGGACCTGATCAAGATCATG  
AATCCTGAACAGAAGCTGATCTCTGAGGAAGATCTG

EndoF3  
1197 bp

ATGATCCACACTAACCTGAAGAAAAAGTTAGCTGCTGTGTGCTGGTCTTCCTGCTGTTTGCCGTGATTTGCGTC  
TGGAAGGAGAAAAAGAAAGGCTTACTATGATAGTTTCAAGCTGCAGACAAAAGAATTTAGGTGCTGAAGA  
GCCTGGGAAAACCTGGCCATGGGATCCGATTCTCAGAGTGTGAGCTCCTCTAGTACCCAGGACCCATCGGGGGA  
GACAGACTGGGAAGCCTGAGAGGCTGGCTAAGGCAAAACCCGAGGCATCCTTTCAAGTGTGGAACAAGAT  
GCCACCGCTCTGGCAGGATCCAATGGCGTCTGTATCGCTTACTATATTACTGACGAGCAGCAACCCACCTTCAAGCTGA  
AAGATATCCCTGACAAGGTGGATATGGTCAATTTCTGTTGGCCTGAAGTACTGGTCTCTGACGATACCCAAAACCTGC  
CAGGCGGACAGGGATGATGGGATCCTTCAAGTCTTATAAAGATCTGGACACTCAGATCAGGAGTCTGAGTCAAGCG  
GGATCAAGGTGCTGCAGAAATTTGACGATGACGTGAGTGGCAGTCAAGCAAACCCGAGGCTTTGCAAGTGGCGCTG  
CATACGAGAGACCCATCAAGTCAATCTGATTGACAAGTGGAAACTGGATGGCATCTCACTGATTAAGACACAGCG  
GGGCCAAGCCCAACCTATTCCAACATTCCTGGATATGGCGCTACTGGTACAATGGGTGGTATTCAGGACGATGGC  
AGCCACTCCTGCCTTCTGAATGTGATCTCTGAGTGCACCAAGTACTTTGGCACTACCGCTCAAACAACAAGCAGCTG  
CAGATCGCCAGTGGGATGATGTGTATGCTTGGAAACAAGATCATGAAAAACTTCGAAAACAACCTCAACTACATCCAG

EndoH  
1140 bp

CTGCAGTCTATGGCGCCAATGTGTCTCGGACCCAGCTGATGATGAACTACGCTACAGGGACTAATAAGATCCCCGCAT  
CCAAAATGGTGTGGAGCCTATGCTGAGGGGGGAACCAACCAGGCTAATGACGTGGAAGTCCGCAAAGTGGACCCCTA  
CACAGGGCGCCAAAGGCGGGATGATGATCTACACATATAACAGCAATGTGTCTACGCAAACGCCGTGAGGGATGCTG  
TCAAGAATGAGCAGAACTGATTTCTGAGGAAGACCTG

ATGATCCACACCAATCTGAAGAAAAAGTTACAGCTGCTGTGTGCTGGTCTTCTGCTGTTTGCCGTGATTTGCGTCTGGAAGGA  
GAAAAAGAAAGGGAGTTACTATGATTCATTCAAGCTGCAGACAAAAGAATTTACAGGTGCTGAAGAGCCTGGGAAAACTGGC  
CATGGGCTCCGATTCTCAGAGTGTGAGCTCCTCTAGTACACAGGACCCCATAGGGGACGCCAGACTCTGGGCTCCCTGAGA  
GGGCTGGCAAAGGCCAAACCTGAGGCTCTTTCAAGTGTGGAATAAGGACGCTCCCGCACCTGTGAAACAGGGACCCACAT  
CAGTCGCCTACGTGGAAGTCAACAATAACAGCATGCTGAATGTGGGCAAGTATACTCTGGCTGATGGCGGGGAAACGCTTTC  
GACGTGGCAGTCATCTTTGCCGCTAATATTAATGATACCGGCACAAAACTGCCTACCTGCACCTTAAATGAGAACGTGCAGC  
GAGTCTGGACAACGCTGTGACACAGATCAGGCCTCTGCAGCAGCAGGGCATTAAAGTGTGCTGTCCGCTCTGGGGAATCA  
CAGGGGCTGGATTTCGAAACTTTCCAAGCCAGCAGGCCTCCGCTCGCTAAGCAGCTGTCTGATGATGATGATGATGATGAT  
CGGACTGGACGGCGTCGATTTTGACGATGAGTACGCTGAATATGGGAATAACGGAACCTGCACAGCCCAATGATTCAAGCTTCG  
TGCACCTGGTACCAGCTGCAGCTAATATGCCTGACAAAATCATTAGTCTGTATAACATCGGCCAGCTGCATCCCGGCTGTCT  
TTACGGCGGGTGGACGTGACGATAAGTTTGACTATGCTGGAACCCATACTATGGGACTTGGCAGGTGCCAGGAATCGCAC  
TGCCAAAAGCTCAGCTGTCCCGAGCAGCTGTGGAGATTGGACGAACCTCACGGAGCACAGTGGCAGATCTGGCCGGGAAACC  
GTGGACGAAGGCTACGGGGTCTATCTGACATAAACCTGGATGGAGGCGACAGAAGCTGCAGATGTGTCTGCTTTACCAGGGA  
GCTGTACGGGAGTGAAGCCGTGCGCACCCCTGAGCAGAAGCTGATTTCTGAGGAAGACCTG

EndoM  
2556 bp

ATGATCCACACAAACCTGAAGAAAAAGTTACAGCTGCTGTGTGCTGGTCTTCTGCTGTTTGCCGTGATTTGCGTCT  
TGGAAAGGAGAAGAAGAGGGCTCCTACTATGACTCTTTCAAACCTGCAGACCAAGGAGTTTACAGTCTCTGAAATC  
CTGAGGGAAAGCTGGCTATGGGAAGCAGCTCCAGCTCTGTGAGCTCCTCTAGTACACAGGATCCACATAGGGCCCG  
CCAGACTCTGGGATCTCTGCGAGGACTGGCAAAGGCTAAACCCAGAGGCTCTTTTACAGTCTGGAATAAGGATCC  
AAGTCTGCAGCTGCAGCCGACGATAAACTGGCTCCTGTGAGTTTCGCACTGAAGTCAATGAACGAAGTCCGGGACTG  
GACTCCCGATGAGAAGTCAAGTTCAACGCTGTCAAGCGTCCGCTCTGCAGCCTAGAGTGAAAAACGCCTGAAAGCCACA  
TCTGTGCTGACCCACGACATGGCAGGAGGTATAAGGAGGATAAAAAATATCCAGGGCAAACAATCAAGGACATCTA  
TAACATCCAGTACTGGCACCTGGCTGATACATTCGTGTACTTTAGCCATGAAAGAGTCTCCATCCCCCTGTGAAGTGG  
ACAAATGCATGCCATAGGAACGGCGTCAAGTGTCTGGGGACTTTCTGGTGGAGGGCAAACAATCAGATGCACGAGATG  
GAAGCCCTGTGCATGGGCCACCCCTGCTGAACAATACCGAGGATCCAATGAGGCTGTGGAGCCCTACTATGCTGACC  
AGCTGGTGGCAATCGCCAAACACTACGGATTTCGATGGCTGGCTGTTAATATTGAGTGTGAGTTCTTCCCTTCCCTAC  
AAACCTAAGTTAAAGCCGAGGAACCTGGTAAAGTCTGCACACTTCAAGGAAAAGTGCATAACGAGATCCGAG  
ATCACAGCTGATTTGGTACGACAGCATGACTAACAGGCGGAAATCCATTGGCAGAACCCAGCTGAGTGGAAAAATGA  
GCTGTCTTTAAGAACACAGATGGCATTTTCTGAAATATTGGTGGAAAGAAAGAAATACCCAGAGATGGCAGGAGAGT  
GGCAGAAAGGAATCGGACGATCCGGACTGGAGGTCTATTTTCGAACTGACGCTGTGGGAGCAGACACACTACGGAGGAGG  
AGGCTCAAGTCAATAAAAGGGTGAAGACTGCTTACAGCGCAATGACCTCCTTGCCTGTTCCGAATGGCTTTGGAC  
CTACGAACATTTTCGAGAAGAGTGAAGTTGAAAAGATGGACAGGCTGTTTTGGTGGCGGGGGAAGTACTCTGATATTC  
TCCACCCCTCCAAAAAACCCGACGATGAGAAGGAGTGGAGAGTACGATTCAGAAGACGAGCTGATGTACGGACA  
CAAGAAAGGCATCGCCGATACCGTTCGAGAGCATTCCAGTCCCGGGACCGACTGGTTCGTGACAAAATTTTATCGGG  
CTTCGGGAACAGATTTACTATCGAGGAAAGGACTGCTGAGCCAGCCATGGAGCCACTGTCCCATCAGGCTATCTCTG  
CCTAACAAAAGCTATCGCAATCCGAAATCTACCTACAGACCAGAATATCAAGATTACTAGTTCACTGGACTGTGAT  
CACGGGGCATTCTCGGAGGCAACAGCCTGATCAATTAAGGGACAGCGGTTCAACACAGGGAGAGCCATGACGTGGAA  
ACAGAGATCTCCATTTCCCTGTACAACTGAGTCTGGATGCATCAAAGGGCTGCAGCCTGCCTACATCTATCGAACCC  
TGCTGATGAAAGACGTCAAGCTGACAGTGGCCTGTCAATTTCTCTGAAAACTAACGACAGTGTCAATTTCTTTAAAG  
TGTGGCAGCCTGATGAAAATTTACAGTCTTGTAGTACGACGATGGCATGGCGGGCCACCTGACCACAGAAAACCTACAG  
AGAGTAGTGTCTTCTGCTGCGCACTACCGAGGAAGACCCGGCAGAAATGATTTGGTACAAAAGACTTAAACGTGC  
CTGCTGTCCAGAAGGGTCCAGCTGTATATCACTAGACTGGAGGTGTCTGTGGTCTGGACACCCGAGGCTGGTGGG  
ACTGGTCAATCAGGTCACTCGCTGTCTGGCTACATTTCCATCATTCCTACTATCAACTCTGGGATTAAGACCGATAGC  
TCCAGGATCATTCAGGACCTGTCTGGAAAGATCAGAAGTATACAAAATCGGAAAGGAATCCCTGGAGCATATTGCC  
CAGGAGGAAGTGCACCGCTACTATGGCACACTGAAGTGGGAGAACTGCAAACGTGGTCAATGCCTGGGAGGAAATC  
GACTACTATAATGTGTCTACAAAGAGTGCAGACGATAGCGCCACCCGAATTTTCTGGGAACAGCTTCTGCAACCC  
TTTCGGGTGAGTGGCTGGATATCATTTCTGTCAAACCTGCCAAGATCGTCAATGAAGCCGTGAACAAGGAGGGGTAT  
ATCTCTAGTTACAGGATCCATTGACCTGTCTCTGAACGAGCAGAAGCTGATCTCTGAGGAAGATCTG

EndoS  
3204 bp

ATGATTCATACCAACCTGAAGAAGAAGTTAGCTGCTGCGTCTGGTGTTCCTGCTGTTTGCCGTGATTTGCGTCT  
TGGAAAGAGAAGAAGAAGGATCCTACTATGACTCTTTCAAGCTGCAGACCAAAGAGTTTACAGGTGCTGAAGAG  
CCTGGGCAAACCTGGCCATGGGGTCCGATTCTCAGAGTGTGAGCTCCTCTAGTACTCAGGACCCACAGAGGCAG  
ACAGACCTGGGATCACTGAGAGGCTGGCAAAGGCCAAACCCGAGGCCAGCTTCCAAGTGTGGAACAAGGATGA  
GGAAAAACAGTGCAGGTCCAGAAGGGCTGCCCTCCATTGACTCTCTGCATTACCTGAGTGAAGTCAAGAAAGA  
GTTCAAGGAGGAAGTCTTAAAGCCGGGAGGAGAGTCAAGAGTGAAGAAATCTGGCTAAGGCACAGCAGGACAGA  
CAAACAGGCCAGGAGCTGGCTAAGATGAAAATCCAGAAAAGATTCTATGAAACCACTGCACGGACCCCTGTATGG  
CGGATACTTCCGGACCTGGCATGACAAGACCAGTATCTACAGAGAAGGATAAAGTGAAGTCAATGGCGGAGCTGCC  
AAAGGAAGTGCAGCTGGCATTATCTTACGACTGGACTAAAGATTATAGCCTGTTCTGGAAGGAGCTGGCCACCAA  
ACATGTGCCCCAAGCTGAACAAAACAGGGGACTAGGGTCACTCCGACCATTCCTTGGAGATTCTGGTGGAGGCGCAAA  
TTCCGGCATTTGACAGGATACCTCTAAGTACCCCAACACCTGAAAGGGAATAAGGCACTTGGCTAAAGCAATTCGTGGA  
CGAGTACGTCTATAAGTACAACCTGGATGGCTGGACGTGGATGTGGAACACGACTCTATCCCAAGGTGGACAAGAA  
AGAGGATACCGCGGAGTGGAAAGGAGTATTACAGGCTTCGAGGAAATCGGCAAGCTGATTGGCCCAAAGGGCGTGGAA  
CAAAAGTCCCTGTTTATCATGGACTCAACATACATGGCCGATAAGAATCCCTGATCGAGCGAGGGCTCCTTATATT  
AACCTGCTGCTGGTGCAGGTCTATGGATCTCAGGGAGAGAAGGGCGGCTGGGAACCCCTGAGCAACAGACAGAGAAG  
ACCATGGAGGAACGGTGGCAGGGGTATTTCAAATACATCCGGCCAGAACAGTATATGATTGGCTTCTTTTTTACGAG  
GAAAACGCTCAGGAGGGGAATCTGTGGTATGATATCAATAGCAGAAAGGACGAAGATAAAGCCAACGGGATCAATAC  
TGACATTACAGGACCCGGGCGGAGCGGTACGCAAGATGGCAGCCTAAGACCGGGGGTGAAGGAGGCATCTTCAG  
CTATGCTATTGACAGGATGGCGTGGCACACCAGCCAAAGAAATACGCCAAGCAGAAAGAGTTCAAGGACGCCACCGA

	<p>TAACATCTTCCATAGCGATTACTCAGTGAGCAAGGCTCTGAAAACAGTCATGCTGAAGGACAAAAGCTACGACCTGATCGATGAGAAGGACTTTCCAGATAAAGCCCTGCGCGAAGCTGTGATGGCACAGGTCGGGACAAGGAAGGGCGACCTGGA GCGGTTCAACGGAACCTGCGACTGGACAACCCGCAATCCAGTCCCTGGAAGGCCTGAATAAGTTAAGAAAAGCTGGCC CAGCTGGACTGATCGGGCTGTCACGGATTACCAAGCTGGACAGAAGCGTGTGCCCCGCTAACATGAAGCCCTGGCAAA GATACTGAGACTGTGCTGGAAACCTACAAGAAAGACAATAAGGAGGAACCTGCCACAATCCCCCTGTGAGTCTG AAGGTCTCAGGGCTGACAGGACTGAAAGAGCTGGACCTGTCCGGATTGATAGGAAAACCTGGCTGGCTGGATGCC GCTACCCTGACAAGCCTGGAGAAGGTGGACATCTCCGGGAACAAGCTGGATCTGGCCCCGGAACCGAAAACCGCCAGA TCTTCGACACTATGCTGAGCACCATTTCCAACCAAGTGGGCTCTAATGAGCAGACAGTCAAGTTTGATAAGCAGAAA CAACTGGCCATTATCCCGACACATACGGGAAGACTAGTCTGCGACTGCTGTGGCCAACGAGAAAAGTCGACCTGCAGTC ACAGCTGCTGTTCGGAAGTGTGACCAATCAGGGCACACTGATCAACTCTGAAGCTGATTATAAGGCATACCAGAATCA CAAAATTGCCGGGAGAAGCTTCGTGGACTCCAATATCATTACAACAACCTCAAGGTGAGCTATGAGAATTACACAGT GAAAGTCACCGATAGTACACTGGGAACCACAACCTGACAAGACTCTGGCCACCGATAAGGAGGAAAACCTACAAAAGTGA CTTCCTTTCCCTGCTGATAAGACAAAAGCCGTGCACACTGCTAAAAGTGTCTGCGGGACGAGAAAACCATGATGGT GAACCTGGCCGAAGGAGCTACAGTCAATGGGGATCTGCAGATCCAGTGAATGAAGAAAGGCTTTTGTATGGACAGCT GGGGTACAGAGACCGACAATATCAGCCTGGGATGGGATTTAAGCAGAGTATCATCTTCAAGCTGAAGGAAGATGGCCT GATCAAGCATTGGAGGTTCTTTAACGACAGCGCCGCAATCTGAGACCACAAAAGCCTCCAGGAAGCATCCCT GCAGATCTCAATATCAAGGACTATAAAGCTGGATAAATCTGCTGGAGAACCCTAATAAGTTTCGACGATGAAAAGTACTG GATCACAGTGGATACATATAGCGCCAGGGAGAGAGAGCAACCGCTTTCTCCAACACACTGAACAATATCACTTCTAA GTATTGGAGAGTGGTCTTTGACACAAAGGGGATAGGTACTCAAGCCAGTGGTCCCGAGCTGCAGATCCTGGGATA CCCACTGCCAATGCAGACACCATTTAAGAGCAGTACTACCGCAAAAGAGCTGTCTCAGCAGAAGGACAAATTCAG TCAGAAGATGCTGGATGAACTGAAGATCAAAGAGATGGCTCTGAAAACCTCACTGAACAGCAAGATCTTTGATGTGAC CGCAATTAACGCAAAATGCCGGCTCCTGAAAAGACTGTATTGAAAAGGCACAGCTGCTGAAAAAAGAACAGAAAACCTGAT TAGCGAAGAAGACCTG</p>
<p>EndoT 1353 bp</p>	<p><u>ATGATTACACCAACCTGAAGAAAAAGTTAGCTGCTGCGTCTGGTCTTTCTTCTGTTTGCAGTCATCTGTGTG TGGAAGGAAAAAGAAGAAAGGGAGTTACTATGATTCCCTTTAAATTGCAAACCAAGGAATTCAGGTTGTTAAAGA GTCTGGGGAAATGGCCATGGGGTCTGATTCCAGTCTGTATCCTCAAGCAGCACCCAGGACCCACAGGGGCC GCCAGACCTCGGCAGTCTCAGAGGCTAGCCAAGGCCAAACCAGAGGCTCCTTCCAGTGTGGAACAAGGACG TACCCGTAAAGAACTGCAGTTGAGAGCTGAACCAACTGATTTGCCCTAGGCTTATCGTTACTTCCAGACTACTCACGA CTCTTCCAACAGACCAATCTCCATGTTGCCATTGATCACTGAGAAGGGTATCGCTTTGACTCACTTGATCGTTTGTTC TTCCACATTAACAGGGTGGTGTGTTCACTTGAACGACTTCCACCAGATGATCCACACTTCTACACTTTGTGGAACG AGACTATCACTATGAAGCAGGCTGGTGTAAAGGTTATGGGAATGGTTGGTGGTCTGCTCCTGGTCTTTCAACACTC AGACTTTGGACTCTCCAGACTCTGCTACTTTGAGGACTACTACGGTCAATTGAGAGATGCTATCGTTAACTTCCAGTT GGAGGGAATGGATTGGACGTTGAGCAACCAATGTCCAACAAGGTATCGACAGATTGATCGTAGATTGAGAGCTGA TTTCCGTTCCAGACTTCTTGATTACTTTGGCTCCAGTTGCTTCTGCTTTGGAGACTCTCTACTTGTCTTCTCTCT TACACTGCTTTGCAACAGACTCAGGGTAACGACATTGACTGGTACAACACTCAGTTCTACTCTGGTTCCGTTCTATGG CTGACACTTCCGACTACGACAGAATCGTTGCTAACGGTTTCGCTCCAGCTAAAGTTGTTGCTGGTCACTTACTACTCC TGAAGGTGCTGGATGGATTCCAATCTCTCTTGAACAACACTATCGTTTCCCTGGTTTCCGAGTACGGTCAAATCGGT GGTGTTATGGGATGGGAGTACTTCAATTCCTTGCAGGTGGTACTGCTGAACCATGGGAGTGGGCTCAAATCGTTACT GAGATCTTGAGACCAGGATTGGTTCCAGAGCTCAAAGATTACTGAGGATGACGCTGCTAGATTGACTGGTCTTACGAA GAATCCGTTAAGGCTGCTGCTGCTGATAACAAGTCTTCTGTTAAGAGGCCTTCCATCAACTACTACGCTATGGTTAAGC CTGAACAAAAGCTTATTTCTGAAGAAGATCTG</u></p>
<p>hGM-CSF 450 bp</p>	<p><u>ATGTGGTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGCATCTCTGCACCCGCCGCTCGCCAGCCAGCAC GCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCGGCTCTCTGAACCTGAGTAGAGACTGCTGCTGAGATG AATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCTGGAGCTGTAC AAGCAGGGCCTGCGGGCAGCCTCACCAGCTCAAGGGCCCTTGACCTGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCC CTCCAACCCGAAAACCTTCTGTGCAACCCAGACTATCACCTTTGAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTCTGCT GTGCATCCCCCTTACTGCTGGGAGCCAGTCCAGGAGCATCACCATCATCACCAT</u></p>
<p>hIL-22 528 bp</p>	<p><u>ATGCCTATGGGGTCACTGCAGCCTCTGGCCACTCTGTATCTGCTGGGGATGCTGGTTCGCAAGTTGCTGGGAGCG CCCATCAGCTCCACTGCAGGCTTGACAAGTCCAACCTCCAGCAGCCCTATATCACAACCCGACCTTCACTGCTGGCTA AGGAGGCTAGCTTGGCTGATAACAACACAGACGTTTCGCTCATTTGGGAGAAAAGTTTCCACGGAGTCAAGTATGAGTG AGCGCTGCTATCTGATGAAGCAGGTGCTGAACCTTACCCTTGAAGAAGTGTGTTCCCTCAATCTGATAGGTTCCAGCC TTATATGCAGGAGGTGGTGGCCCTTCTGGCCAGGCTCAGCAACAGGCTAAGCACATGTCATATTGAAGGTGATGACCT GCATATCCAGAGGAATGTGCAAAAAGCTGAAGGACACAGTGAAAAAGCTTGGAGAGAGTGGAGAGATCAAAGCAATTG GAGAACTGGATTGCTGTTTATGTCTCTGAGAAATGCCTGCATTCATCATCATCATCAT</u></p>
<p>αCD20-hIgG</p>	<p>Intellectual property NovImmune</p>

## II| Bijlagen bij MATERIAAL & METHODE

Buffers and solutions	
<b>5X Laemmli loading buffer (120 mL)</b>	Natriumdodecylsulfaat (SDS) (10 g) 1 M Tris (pH 6,8) (25 mL) Broomfenolblauw (0,1 g) Dithiothreitol (DTT) (7,8 g) 100% glycerol (50 mL) MilliQ (45 mL)
<b>10X DNA loading buffer (50 mL)</b>	1 M Tris (pH 8,0) (2,5 mL) Broomfenolblauw (125 mg) 100% glycerol (30 mL) MilliQ (17,5 mL)
<b>1,2 % Agarosegel (300 mL)</b>	UltraPure™ Agarose (Invitrogen) (3,6 g) 1X TAE-buffer tot 300 mL opkoken in microgolf
<b>50X TAE buffer (1 L)</b>	Tris (242 g) Acetaat (57,1 mL) Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O (37,2 g) MilliQ tot 1L sterilisatie door autoclaving
<b>TE-buffer (1 L)</b>	Tris-HCl (1,2 g) EDTA (0,37 g) MilliQ tot 1 L pH 8,0
<b>BS/HEPES (1 L)</b>	NaCl (8,8 g) HEPES (4,8 g) MilliQ tot 1 L pH 7,4
<b>3X Tricine SDS-PAGE gel buffer (1 L)</b>	Tris (121 g) SDS (3 g) MilliQ tot 1 L pH 8,45
<b>10X Tricine SDS-PAGE anode buffer (1 L)</b>	Tris (121 g) MilliQ tot 1 L pH 8,9
<b>10X Tricine SDS-PAGE cathode buffer (1 L)</b>	Tris (121 g) Tricine (179,2 g) SDS (10 g) MilliQ tot 1 L
<b>1X Western blot transfer buffer (1 L)</b>	10X Running buffer (100 mL) Methanol (200 mL) MilliQ tot 1 L

<b>10X Running buffer (1 L)</b>	Tris (30 g) Glycine (144 g) MilliQ tot 1 L
<b>Coomassie Stain (1 L)</b>	Methanol (450 mL) Acetaat (91,5 mL) Coomassie (0,6 g) MilliQ tot 1 L
<b>Coomassie Destain (1 L)</b>	Methanol (150 mL) Acetaat (70 mL) MilliQ tot 1 L
<b>Blocking Buffer (100 mL)</b>	1X PBS-Tween (100 mL) Melkpoeder (3 g)
<b>1X PBS-Tween (1 L)</b>	10X PBS-poeder (100 g) 0,05% Tween20 MilliQ tot 1 L
<b>RIPA-buffer (50 mL)</b>	5M NaCl (1,5 mL) 10% Igepal CA630 (5 mL) 10% Na deoxycholate (2,5 mL, protect from light) 10% SDS (0,5 mL) 1M Tris (pH 8,0) (2,5 mL) Complete protease inhibitor tablette 5M EDTA (0,5 mL) MilliQ (37,5 mL)
<b>Chelating Buffer (1 L)</b>	NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O (26,3 g) HEPES (4 g) pH 7,0
<b>Buffer A (1 L)</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2,4 g) NaCl (29,2 g) Imidazool (1,36 g) pH 7,5
<b>Buffer B (1 L)</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2,4 g) NaCl (1,17 g) Imidazool (34,1 g) pH 7,5

Media	
<b>Luria Broth (LB) (1 L)</b> <b>Nutriënt Broth (NB) (1 L)</b>	Bacto-tryptone (10 g) Bacto yeast extract (5 g) NaCl (10 g) MilliQ tot 1 L pH 7,0 sterilisatie door autoclaving
<b>LB agar (1 L)</b>	Bacto-tryptone (10 g) Bacto yeast extract (5 g) NaCl (10 g) agar (7,5 g) MilliQ tot 1 L pH 7,0 sterilisatie door autoclaving
<b>Terrific Broth (1 L)</b>	Terrific Borth poeder (47 g) 100% Glycerol (4 mL) MilliQ tot 1L sterilisatie door autoclaving
<b>YPD (1 L)</b>	yeast extract (10 g) peptone (20 g) MilliQ tot 900 mL sterilisatie door autoclaving 10X dextrose (100 mL)
<b>Complete DMEM/F12 (Invitrogen) (550 mL)</b>	DMEM/F12 (500 mL) 500X Penicillin/Streptomycin (1,1 mL) 100X Glutamax (5,5 mL) 10% foetaal kalfserum Geconditioneerd: + 550 mL medium van cellen
<b>Complete, serum vrij DMEM/F12 (Invitrogen) (550 mL)</b>	DMEM/F12 (500 mL) 500X Penicillin/Streptomycin (1,1 mL) 100X Glutamax (5,5 mL) 100X Insulin Transferrin Selenite (5,5 mL) Primatone (1,650 g)

Antibiotica	
<b>Carbenicilline (1000X)</b>	100 mg/mL
<b>Kanamycine (1000X)</b>	50 mg/mL
<b>Geniticine (G418)</b>	50 mg/mL
<b>Concanavalin A</b>	10 mg/mL
<b>Kifunensine</b>	10 mg/mL

Antilichamen	
<b>Mouse anti-6xHis (Rockland)</b>	DyLight 800, 1/25000
<b>Mouse anti-myc (Invitrogen)</b>	-, 1/3000
<b>Rabbit anti-actin (ICN Biomedicals)</b>	-, 1/20000
<b>Goat anti-human IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub> (Millipore)</b>	HRP, 1/5000
<b>Goat anti-mouse IgG (Thermo Scientific)</b>	DyLight 800, 1/15000
<b>Goat anti-rabbit IgG (Thermo Scientific)</b>	DyLight 800, 1/15000

**Bereiding één 12% Tricine SDS-PAGE gel (1 mm):**

Separating gel	Concentrating gel
MilliQ (1,48 mL)	MilliQ (1,6 mL)
3X buffer (1,67 mL)	3X buffer (625 µL)
40% Acrylamide (1,5 mL)	40% Acrylamide (312,5 µL)
100% Glycerol (300 µL)	100% Glycerol (0 µL)
10% APS (50 µL)	10% APS (30 µL)
TEMED (4,15 µL)	TEMED (4 µL)