



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthesis of well-defined ADP-Ribosylated biomolecules

Kistemaker, H.A.V.

Citation

Kistemaker, H. A. V. (2017, May 11). *Synthesis of well-defined ADP-Ribosylated biomolecules*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/49075>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/49075>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/49075> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Kistemaker, H.A.V

Title: Synthesis of well-defined ADP-Ribosylated biomolecules

Issue Date: 2017-05-11

Samenvatting

ADP-ribosylering is een post-translationele modificatie (PTM) die betrokken is bij veel essentiële cellulaire processen, zoals transcriptie, genoom onderhoud en DNA-reparatie. De modificatie komt tot stand door de enzymatische transfer van het coënzym Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺) naar een doeleiwit waarbij nicotinamide wordt afgesplitst en een *mono*-ADP-geribosyleerd eiwit wordt gevormd. Door de overdracht van meerdere ADPr moleculen worden ook *poly*-ADP-geribosyleerde eiwitten gevormd waarbij het geïntroduceerde ADPr polymeer zowel lineair als vertakt kan zijn. Het is van groot belang om meer inzicht te krijgen in de vorming en de functie van de verschillende ADP-geribosyleerde eiwitten. De reversibiliteit, labiliteit en het heterogene karakter van ADP-geribosyleerde eiwitten zorgt dat het bestuderen van deze PTM op moleculair niveau een grote uitdaging is. Tot nog toe maakte de belangrijkste benadering veelal gebruik van een enzymatische aanpak. Bijvoorbeeld, het gebruik van gelabeld NAD⁺ (zoals radio-, affiniteits-, en fluorescentie-labels) als ADPr donor in de enzymatische ADP-ribosylering heeft gedetailleerde kennis van deze PTM opgeleverd. Deze aanpak resulteert echter in een mengsel van *poly*-ADPr structuren die onder meer verschillen in formaat en sluit bovendien de mogelijkheid uit om één specifiek aminozuur in het doeleiwit te ADP-ribosyleren. Een mogelijke oplossing voor deze beperkingen biedt de organische synthese wat tegelijkertijd ook voldoende hoeveelheden van gedefinieerde *mono*- en *poly*-ADPr moleculen kan opleveren.

In hoofdstuk 1 worden de synthetische uitdagingen alsmede de beschikbare strategieën voor het synthetiseren van *mono*- and *poly*-ADPr verbindingen besproken. De eerste hindernis in de synthese van ADP-geribosyleerde peptiden is de stereoselectieve introductie van een α -glycosidische (*cis*) binding tussen het anomere koolstof van ribose en de zijketen van een aminozuur naar keuze.

Een nieuwe synthetische procedure voor de α -selectieve ribosylering van aminozuren is beschreven in hoofdstuk 2. De aminozuren werden geselecteerd op basis van literatuurgegevens dat de zijketens van deze aminozuren mogelijk worden ADP-geribosyleerd. De ontwikkelde procedure maakt gebruik van een glycosylerings methode waarbij een zogenoemde ribosyl imidaat donor reageert met de nucleofiele zijketen van verschillende aminozuren. Systematisch optimalisatie van de reactie condities en aanpassing van de beschermgroepen in de ribosyl donor resulteerde in een zeer α -selectieve uitkomst voor zowel *N*-ribosides (asparagine, glutamine en een redelijke selectiviteit voor citrulline) als *O*-ribosides (serine, glutaminezuur, asparaginezuur). Ook werd de α -amino beschermgroep in de beschermde aminozuur bouwstenen veranderd van Cbz naar Fmoc. Deze aanpassing vermindert het aantal beschermgroep manipulaties, die nodig zijn om tot bouwstenen te komen die geschikt zijn voor vaste drager peptide synthese.

In hoofdstuk 3 wordt een nieuwe vaste drager synthese van *mono*-ADP-geribosyleerde oligopeptiden behandeld. Er is gekozen voor een op Fmoc gebaseerde vaste drager peptide synthese in combinatie met een base labiele beschermgroep strategie. Daartoe werd het patroon van beschermgroepen in de geribosyleerde aminozuren, zoals beschreven in hoofdstuk 2, aangepast. In het eerste deel van hoofdstuk 3 wordt een nieuwe methode beschreven voor de verwijdering van de *p*-methoxybenzyl beschermgroepen waarbij gebruik gemaakt wordt van een

katalytische hoeveelheid HCl in hexafluoroisopropanol. Met deze afsplitsingsmethode bleven de α -glycosidische bindingen in geribosyleerde asparagine en glutamine bouwstenen intact terwijl andere methodes anomerisatie veroorzaakten. Om de fosforyleringsreactie op vaste drager te vermijden werd op de 5'-positie van de geribosyleerde aminozuur bouwstenen een *tert*-butyl beschermde fosfaat triester geïnstalleerd. Met deze adequaat beschermde gefosforyleerde en geribosyleerde aminozuur bouwstenen werd een aantal geribosyleerde oligopeptiden efficiënt verkregen door middel van een vaste drager peptide synthese. De laatste en cruciale stap in deze synthese op weg naar de doel *mono*-ADPr oligopeptiden was de introductie van de pyrofosfaat functie. Daartoe werden eerst de zuur labiele fosfaat beschermgroepen verwijderd en de verkregen geïmmobiliseerde fosfaat monoester werd gecondenseerd met een beschermd adenosine fosforamidiet. Na oxidatie werd het geïmmobiliseerde, gedeeltelijk beschermde, doel *mono*-ADPr oligopeptide verkregen. Na verwijdering van de beschermende groepen en afsplitsing van de vaste drager werden de *mono*-ADPr oligopeptiden in goede opbrengsten (milligram hoeveelheden) verkregen. De bindingsaffiniteit van de verkregen *mono*-ADPr oligopeptiden voor verschillende zogenaamde macrodomein eiwitten werd onderzocht met behulp van isothermale calorimetrie (ITC). Hieruit bleek dat de lokale peptide sequentie rondom het ADP-geribosyleerde aminozuur invloed had op de affiniteit van bepaalde macrodomein eiwitten voor de desbetreffende peptide substraten. Verder onderzoek is nodig om hier meer inzicht in te krijgen aangezien in het huidige werk zowel de aangrenzende peptide sequentie alsmede het gemodificeerde aminozuur veranderd werd.

Hoofdstuk 4 heeft de synthese van *poly*-ADPr oligomeren als onderwerp. Een geschikte beschermde bouwsteen werd verkregen door de synthese van 2'-*O*- α -geribosyleerd adenosine, gevolgd door een aantal beschermgroep manipulaties. De synthese van de ADPr oligomeren werd uitgevoerd met behulp van een vaste drager strategie waarin de pyrofosfaat functie met dezelfde methode werd geïntroduceerd zoals beschreven in hoofdstuk 3. Dit leidde tot de eerste succesvolle synthese van een ADPr-dimeer en -trimeer en beide verbindingen werden in milligram hoeveelheden verkregen.

Het onderzoek beschreven in hoofdstuk 5 is gericht op het verkrijgen van een beschermde bouwsteen, die geschikt is voor de bereiding van vertakte *poly*-ADPr verbindingen. Allereerst werd een ribosyl trisacharide met uitsluitend α -glycosidische verbindingen gesynthetiseerd. Een Vorbrüggen condensatie van dit trisacharide met de adenine base gaf na verwijdering van de beschermende groepen voor de eerste keer 2'-*O*-(2''-*O*-(α -*D*-ribofuranosyl)- α -*D*-ribofuranosyl)adenosine, het kernmotief van vertakt ADPr. Met behulp van de methodologie uit hoofdstuk 4 kan de verkregen bouwsteen gebruikt worden voor de toekomstige synthese van vertakte ADPr oligomeren. De orthogonaliteit van de beschermgroepen in deze bouwsteen maakt het mogelijk om volledige controle te houden over de lengte van het lineaire en vertakte deel tijdens de synthese van de oligomeren.

Hoofdstuk 6 laat de brede toepasbaarheid zien van de methodologie voor *poly*-pyrofosfaat vorming, zoals die is beschreven in hoofdstuk 4. Thymidine oligonucleotiden met pyrofosfaat verbindingen tussen de afzonderlijke nucleosiden werden gekozen als doelmoleculen. Een andere synthese methode voor deze artificiële oligonucleotiden was in het verleden al gerapporteerd en ter vergelijking

werden dezelfde oligomeren gesynthetiseerd. Deze oligomeren bevatten ook een terminale pyrofosfaat groep die, met de methodologie uit hoofdstuk 4, in de gesynthetiseerde oligonucleotiden werden geïntroduceerd door de terminale fosfaat monoëster te laten reageren met een beschermd fosforamidiet. Terwijl door intensieve analyse van de verkregen verbindingen hun structuur werd bewezen bleken de gepubliceerde analytische gegevens van dezelfde verbindingen niet overeen te komen. Ook werd vastgesteld dat de gepubliceerde methode niet te reproduceren was doordat het gebruikte fosforylerings reagens niet eenduidig te synthetiseren was. Er kan dan ook worden geconcludeerd dat de in dit proefschrift beschreven methodologie voor pyrofosfaat formatie veelzijdig en breed inzetbaar is. Verder onderzoek van deze reactie zal niet alleen de weg openen naar langere en vertakte ADPr oligomeren maar ook naar andere moleculen waarin zowel pyrofosfaat als fosfodiester verbindingen aanwezig zijn.

List of publications

- **New quantitative mass spectrometry approaches reveal different ADP-ribosylation phases dependent on the levels of oxidative stress**
Bilan, V.; Selevsek, N.; Kistemaker, H. A. V.; Abplanalp, J.; Feurer, R.; Filippov, D. V.; Hottiger, M. O., *Molecular and Cellular Proteomics*, **2017**, mcp.O116.065623
- **ADP-ribosylhydrolase activity of Chikungunya virus macrodomain is critical for virus replication and virulence**
McPherson, R. L.; Abraham, R.; Sreekumar, E.; Ong, S. E.; Cheng, S. J.; Baxter, V. K.; Kistemaker, H. A. V.; Filippov, D. V.; Griffin, D. E.; Leung, A. K., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2017**, 114 (7), 1666-1671.
- **Synthesis and Macrodomain Binding of Mono-ADP-Ribosylated Peptides**
Kistemaker, H. A. V.; Nardoza, A. P.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Ladurner, A. G.; Filippov, D. V., *Angewandte Chemie International Edition*, **2016**, 55, 10634-10638.
- **Solid-Phase Synthesis of Oligo-ADP-Ribose**
Kistemaker, H. A. V.; Meeuwenoord, N. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Filippov, D. V., *Current Protocols Nucleic Acid Chemistry*, **2016**, 64:4.68.1-4.68.27
- **On the synthesis of oligonucleotides interconnected through pyrophosphate linkages**
Kistemaker, H. A. V.; Meeuwenoord, N. J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Filippov, D. V., *European Journal of Organic Chemistry*, **2015**, (27), 6084-91
- **Branching of poly(ADP-ribose): Synthesis of the Core Motif**
Kistemaker, H. A. V.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Filippov, D. V., *Organic Letters*, **2015**, 7 (17), 4328-31
- **Chemoselective Cleavage of p-Methoxybenzyl and 2-Naphthylmethyl Ethers Using a Catalytic Amount of HCl in Hexafluoro-2-propanol**
Volbeda, A. G.; Kistemaker, H. A. V.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Filippov, D. V.; Codée, J. D. C., *Journal of Organic Chemistry*, **2015**, 80, 8796-8806