



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Activity-based proteomics of the endocannabinoid system

Rooden, E.J. van

### Citation

Rooden, E. J. van. (2018, September 11). *Activity-based proteomics of the endocannabinoid system*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/65174>

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/1887/65174>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/65174> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Rooden, E.J. van

**Title:** Activity-based proteomics of the endocannabinoid system

**Issue Date:** 2018-09-11

# Samenvatting

Het doel van het onderzoek dat de basis vormt voor dit proefschrift was om ons begrip van het endocannabinoïde systeem te verbeteren door gebruik te maken van de *activity-based proteomics* methode.

In **hoofdstuk 1** wordt het endocannabinoïde systeem geïntroduceerd. Het endocannabinoïde systeem bestaat uit twee cannabinoïde receptoren, hun liganden en de enzymen die de hoeveelheid van deze liganden reguleren. De cannabinoïde receptoren zijn ontdekt als de doelwitten van THC, de psychoactieve stof in marijuana. De endogene liganden van deze receptoren zijn de lipides 2-arachidonoylglycerol en anandamide. Het endocannabinoïde systeem reguleert verschillende neurologische processen en daarom zijn de endocannabinoïde enzymen interessante doelwitten voor nieuwe medicijnen. Voor dit proefschrift zijn de enzymen diacylglycerol lipase (DAGL) en het  $\alpha/\beta$  hydrolase domein met proteïne 6 (ABHD6) nader bestudeerd.

*Activity-based protein profiling* (ABPP) is een krachtige methode in de zoektocht naar nieuwe medicijnen, vooral voor het endocannabinoïde systeem. De ABPP methode wordt uitgelegd in **hoofdstuk 2**. ABPP is een methode om het enzymatisch actieve deel van eiwitten te bestuderen. Deze methode gebruikt chemische *probes* die covalent reageren met actieve enzymen. Een label op de *probe* (zoals een fluorofoor of biotine) maakt het mogelijk om de doelenzymen te meten. Als het label voor analyse de affiniteit voor het doelenzym vermindert, dan kan een zogenaamde twee-staps *probe* worden gebruikt. Twee-staps *probes* hebben geen label maar een kleine bioorthogonale groep, die kan worden gebruikt om, nadat het doelenzym is gebonden, een label voor analyse te introduceren. Een scala aan *probes* is ontwikkeld voor verschillende type enzymen, waaronder serine hydrolases, proteases, deubiquitinasen, glycosidases, cytochroom P450s en kinases. *Activity-based probes* (ABPs) zijn beschikbaar voor de meerderheid van de enzymen in het endocannabinoïde systeem.

Verschiedende technieken zijn beschikbaar om *probe*-gebonden enzymen te visualiseren, identificeren en kwantificeren. Afhankelijk van het doel en type experiment, de beschikbare hoeveelheid eiwit, de hoeveelheid monsters en de eisen voor gevoeligheid, kan een geschikt analyseplatform worden gekozen. ABPP kan zo niet alleen worden toegepast om nieuwe doelwitten voor medicijnen te ontdekken, maar ook voor het bepalen van de sterkte en selectiviteit van remmers.

De ABPP methode wordt in **hoofdstuk 3** toegepast in de zoektocht naar nieuwe doelwitten voor medicijnen. Het endocannabinoïde systeem wordt beschouwd als een verdedigingssysteem in verschillende neurodegeneratieve ziektes. De ziekte van Niemann-Pick Type C is een neurodegeneratieve lysosomale stapelingsziekte waarin de rol van het endocannabinoïde systeem nog niet is onderzocht. In **hoofdstuk 3** is de serine hydrolase activiteit in hersenen van een Niemann-Pick Type C muismodel gemeten met ABPP en vergeleken met gezonde muizen. Er is geen verschil gevonden in een van de enzymen van het endocannabinoïde systeem. Met een gevoelige massaspectrometrie methode zijn evenwel drie enzymen gevonden waarvan de activiteit is verhoogd in de hersenen van het Niemann-Pick Type C muismodel vergeleken met die van gezonde muizen. Deze enzymen zijn interessant voor verdere validatie studies.

In dit onderzoek zijn twee verschillende massaspectrometrie methodes gebruikt voor de relatieve kwantificatie van *probe*-gelabelde enzymen. De eerste methode maakt gebruik van dimethyl labels, waarbij peptides worden gemodificeerd met isotoop gelabelde formaldehyde. Deze gelabelde peptides werden gemeten op een Orbitrap massaspectrometer. De tweede methode is label-vrij, waarbij peptides worden gemeten op een Synapt massaspectrometer en speciale software wordt gebruikt om het signaal van elk peptide te vergelijken in de verschillende monsters.

**Hoofdstuk 4** bestaat uit een geoptimaliseerd protocol waarmee de selectiviteit van een remmer kan worden bepaald in een levend systeem. De ABPP methode wordt gebruikt met label-vrije kwantificatie. Als voorbeeld is de diacylglycerol lipase remmer DH376 toegediend aan muizen en vervolgens is de resterende enzymactiviteit in het brein, de lever, de nieren en de testes gemeten. Het protocol beschrijft het maken van lysaat van de organen, de incubatie met een *probe*, de verrijking van met *probe* gebonden enzymen, de voorbereiding van het monster, de metingen met behulp van chromatografie en massaspectrometrie, de verwerking van de ruwe data en de data analyse. De resultaten zijn 1) bewijs dat de remmer het doelenzym bindt in een levend systeem en 2) de identificatie van andere enzymen die worden geremd. Label-vrije kwantificatie blijkt zo dus de mogelijkheid te bieden om meerdere monsters onderling te vergelijken en het identificeren van meer peptides per eiwit, wat een verbetering is ten opzichte van eerder gebruikt technieken.

In **hoofdstuk 5** worden de synthese en het karakteriseren van de eerste gerapporteerde *quenched activity-based probe* voor een metabolische serine hydrolase beschreven. Een *quenched probe* is minder fluorescent totdat deze bindt aan het doelenzym. De *probes* bevatten een triazool urea als electrofiële val om covalent te binden aan de katalytische serine van het enzym. De eerste *probe* is actief tegen DAGLa, bevat een BODIPY-FL en 2,4-dinitroaniline als fluorophoor en *quencher* en is ongeveer driemaal minder fluorescent. De tweede probe bevat een Cy5 fluorophoor en cAB40 quencher en was 12-maal minder fluorescent. Deze *probe* kon endogeen ABHD6 labelen in lysaat, maar bleek niet in een cel te kunnen

doordringen.

In **hoofdstuk 6** zijn tweestaps *probes* voor DAGL $\alpha$  omschreven met verschillende groepen geschikt voor bioorthogonale chemie: een alkyn, alkeen of norborneen. Er zijn twee regio-isomeren van elke *probe* gemaakt en gekarakteriseerd met NMR analyse, ondersteund met DFT berekeningen. De selectiviteit van de *probes* is bekeken met ABPP en de norborneen *probe* is geselecteerd als de meest selectieve *probe* voor DAGL. Deze *probe* is een potente remmer van endogeen DAGL $\alpha$  en is succesvol gebruikt als tweestaps probe om DAGL te labelen met een fluorophoor in levende cellen.

Met dit alles beschrijft dit proefschrift verschillende nieuwe strategieën en verbeterd gereedschap voor de ABPP methode om de zoektocht naar nieuwe medicijnen te ondersteunen. In de loop van het onderzoek is een nieuwe label-vrije kwantificatie methode voor ABPP ontwikkeld. Dankzij deze methode kunnen meerdere monsters onderling worden vergeleken in hetzelfde experiment. Dit wordt geïllustreerd door de doelenzymen van de diacylglycerol lipase remmer DH376 in kaart te brengen in verschillende organen. Met deze methode is het gelukt nieuwe potentiële medicijn doelenzymen te identificeren voor de ziekte van Niemann-Pick Type C. Verder zijn nieuwe probes ontwikkeld, *quenched* en tweestaps, voor diacylglycerol lipases. Te verwachten valt dat deze label-vrije methode en dit nieuwe gereedschap zullen helpen in de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor ziektes waarin afwijkende 2-arachidonoylglycerol signalering een rol speelt.