



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Visualization of vitamin A metabolism

Koenders, S.T.A.

Citation

Koenders, S. T. A. (2020, September 17). *Visualization of vitamin A metabolism*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136528>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/136528>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136528> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Koenders, S.T.A.

Title: Visualization of vitamin A metabolism

Issue date: 2020-09-17

Nederlandse Samenvatting

Algemene samenvatting

Aldehydedehydrogenases (ALDHs) zetten endogene en exogene aldehyden om in carbonzuren. Aangezien aldehyden reactief zijn en zich kunnen binden aan enzymen en DNA, verminderen ALDHs op deze manier mogelijke celschade (zie **Hoofdstuk 1**)¹⁻³. Daarnaast zijn ALDHs betrokken bij essentiële metabolische cellulaire processen⁴⁻⁷, zoals bijvoorbeeld de vorming van retinolzuur. Retinolzuur is een belangrijk signaallipide, dat verschillende cellulaire en fysiologische processen beïnvloedt door middel van genregulatie.⁸⁻¹³ Retinolzuur wordt gevormd door de omzetting van retinal door de retinaldehydrogenases ALDH1A1, ALDH1A2 en ALDH1A3. Deze eiwitten worden nauwgezet gereguleerd via induceerbare cellulaire expressie patronen en posttranslationale eiwit modificaties.^{14,15}

De huidige methodes stellen onderzoekers in staat om de expressie van specifieke enzymen of de algemene ALDH activiteit te meten. Het is echter niet mogelijk om de activiteit van individuele enzymen te bepalen. Nieuwe strategieën om de ALDH activiteit van specifieke enzymen te visualiseren en kwantificeren in modellen van ziekte en gezondheid zijn daarom gewenst. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was om nieuwe moleculaire sensoren (*probes*) te ontwikkelen, die gebruikt kunnen worden om de activiteit van ALDHs te bestuderen in gecompliceerde biologische milieus.

In **Hoofdstuk 2**, werden de recente ontwikkelingen samengevat op het gebied van chemische vetachtige *probes* om de lipide biologie te bestuderen. Tevens werden verschillende mogelijkheden voor toekomstig onderzoek besproken.¹⁶ Lipiden voeren talrijke functies uit in de cel. Deze variëren van structurele grondstof en energieopslag tot cellulaire communicatie. De werkingwijze van vele signallipiden is nog steeds ongrijpbaar door toedoen van hun geringe abundantie, hoge lipofiliciteit en intrinsieke instabiliteit. Verschillende chemisch biologische strategieën, zoals fotoaffiniteit- en activiteit-gebaseerde eiwitprofilering (*affinity- and activity-based protein profiling, ABPP and ABPP*), zijn recentelijk ontwikkeld om de rol van lipiden, lipide-eiwit interacties en lipide verwerkende enzymen te onderzoeken.

ABPP is bijvoorbeeld een krachtige techniek gebleken om enzymatische activiteit te profileren in complexe biologische monsters.^{17,18} *ABPP* maakt gebruik van activiteit-gebaseerde *probes*. Deze activiteit-gebaseerde *probes* beschikken over een reactieve groep, waarmee ze covalente kunnen reageren met actieve enzymen. Visualisatie van de doeleiwitten vindt plaats door het ligeren van een label, zoals een fluorofoor of een affiniteitslabel, aan het *probe*-eiwit complex door middel van ‘click’-chemie. De covalent gebonden enzymen kunnen na ligatie in kaart gebracht worden met behulp van respectievelijk gel-analyse (SDS-PAGE) of massaspectrometrie. Comparatieve en competitieve *ABPP* zijn de twee toepassingen die voornamelijk gebruikt worden in dit onderzoek. Comparatieve *ABPP* vergelijkt de activiteitsprofielen van verschillende biologische toestanden, terwijl competitieve *ABPP* gebruikt kan worden om de potentie en het selectiviteitsprofiel van een toekomstig geneesmiddel te bepalen door de activiteitsprofielen van behandelde en onbehandelde cellen te vergelijken.

Activiteit-gebaseerde eiwit profilering van retinaldehydedehydrogenases

Hoofdstuk 3 beschreef het ontwerp en de synthese van een retinal-gebaseerde activiteit-gebaseerde *probe* voor ALDHs. Met behulp van een eerder gerapporteerde kristalstructuur van ALDH1A1 werd de optimale locatie op het retinal molecuul bepaald voor de toevoeging van een alkyn groep, die in een later stadium gebruikt kan worden om visualisatie labels aan te bevestigen. Tevens werd de aldehyde groep veranderd in een vinyl keton.

Dit leidde tot het ontwerp van **LEI-945**, welke gesynthetiseerd werd door middel van een convergente synthese gebruikmakend van een Wittig reactie.¹⁹ Activiteit-gebaseerde *probe* **LEI-945** werd vervolgens biologisch gevalideerd in **Hoofdstuk 4**. **LEI-945** bleek in staat de enzymen ALDH1A1, ALDH1A2 en ALDH1A3 te visualiseren door middel van een covalente interactie met hun katalytische cysteïne. Vervolgens werd aangetoond dat de *probe* in staat was om ook endogeen tot expressie gebrachte ALDHs, waaronder ALDH2, ALDH3A2 en ALDH3B1, te visualiseren in levende cellen behorende tot de longkanker cellijn A549. **LEI-945** werd ook gebruikt om de potentie en selectiviteitsprofielen van de ALDH remmer, 4-diethylaminobenzaldehyde (DEAB), en het natuurlijke substraat, retinal, te bepalen door middel van de competitieve *ABPP* methode in levende A549 cellen.

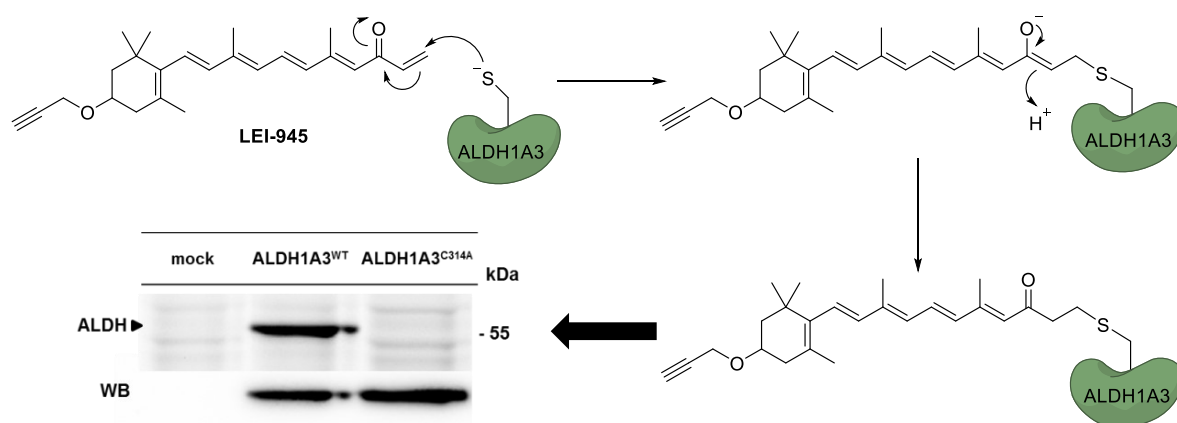


Fig. 9.1 | Visualisatie van de covalente interactie van LEI-945 met ALDH1A3. De reactieve groep van **LEI-945** reageert covalent met de katalytische cysteïne van ALDH1A3. De gevormde thio-ether kan niet gehydrolyseerd worden en vormt een onomkeerbare covalente interactie tussen het enzym ALDH1A3 en de activiteit-gebaseerde *probe* **LEI-945**. Visualisatie vindt plaats door middel van koppeling met de fluorofor AlexaFluor-647 en SDS-PAGE, dit laat een duidelijke band zien rond 55 kDa. Door de katalytische cysteïne te veranderen in een alanine verdwijnt de interactie tussen **LEI-945** en het enzym volledig.

Het in kaart brengen van ALDH activiteit in borstkanker subtypes

In **Hoofdstuk 5** werd **LEI-945** gebruikt om de activiteitsprofielen van ALDHs te vergelijken in verschillende borstkanker celtypes door middel van comparatieve *ABPP*. De verhoogde expressie van bepaalde ALDHs is eerder in verband gebracht met therapie bestendige kanker.²⁰ ALDH1A3 wordt bijvoorbeeld geassocieerd met een verminderd klinisch resultaat in borstkanker.^{21–25} De ALDEFLUOR techniek wordt routinematig gebruikt om de algemene cellulaire ALDH activiteit te bepalen, maar was niet in staat om het vermogen van borstkanker cellijnen om retinolzuur te produceren, te voorspellen.

Door gebruik te maken van **LEI-945** konden specifieke ALDH activiteitsprofielen gemaakt worden voor elke cellijn. Deze profielen konden vervolgens gebruikt worden om de verschillen in retinal omzettingsvermogen te verklaren gebaseerd op de mate waarin actieve ALDH1A1 en ALDH1A3 enzymen aanwezig waren in de verschillende cellijnen.

Interessant genoeg vertoonde de borstkanker cellijn SK-BR-3 de hoogste algemene cellulaire ALDH activiteit, maar was deze cellijn slechts in staat om een relatief kleine hoeveelheid retinal om te zetten. Op basis van het ALDH activiteitsprofiel kon de hoge ALDH activiteit verklaard worden door een exceptioneel hoge aanwezigheid van actieve ALDH2 enzymen, terwijl er slechts een lage mate van ALDH1A3 activiteit werd waargenomen. Deze bevinding suggereert dat de menselijke variant van ALDH2 geen biologisch relevante rol heeft in vitamine A metabolisme.

LEI-945 werd vervolgens gebruikt in een competitieve *ABPP* methode om het selectiviteitsprofiel van NCT-505²⁶, een vergevorderde selectieve ALDH1A1 remmer, te bepalen en interactie van de remmer van het doeleiwit (*target engagement*) aan te tonen in de MDA-MB-468 borstkanker cellijn. Vergelijking van de activiteitsprofielen van behandelde en onbehandelde cellen toonde aan dat NCT-505 niet alleen met ALDH1A1, maar ook met ALDH1A3 een interactie aan ging. Hierdoor werd de toegevoegde waarde van **LEI-945** in het ontwikkelingsproces voor selectieve ALDH remmers aangetoond.

De fysiologische effecten van ALDH1A1 en ALDH1A3 remming werden verder bestudeerd door de cellulaire ATP niveaus te bepalen en verschillende microscopische technieken waarbij levende cellen over tijd gevolgd kunnen worden (*live cell imaging*) te gebruiken. NCT-505 verminderde de cellulaire ATP niveaus en het mitochondriaal membraan potentieel.

Door middel van de FUCCI techniek werd bepaald dat behandelde cellen vastzaten in de G₁ fase van de celcyclus. Een significante toename van propidium iodide kleuring duidde erop dat behandelde cellen bezweken volgens de necrotische celdood route. Een combinatie therapie van NCT-505 met de glutathione peroxidase 4 (GPX4) remmer, RSL3^{27,28}, had een therapeutisch synergistisch effect.

Visualisatie van de rol van vitamine A metabolisme in immuun homeostase

Hoofdstuk 6 beschreef de zoektocht voor de specifieke retinaldehydedehydrogenases betrokken bij de omzetting van retinal in retinolzuur in de dunne darmen van muizen. Retinolzuur speelt een belangrijke rol in immuun homeostase. Het is verantwoordelijk voor de activatie en rekrutering van dendritische, T- en B-cellen.^{29,30} Comparatieve *ABPP* met **LEI-945** werd toegepast op darmcellen afkomstig van muizen die in het bezit waren van het ALDH1A1 enzym en muizen waarin het ALDH1A1 eiwit uit het genetisch materiaal verwijderd was (*knockout*). Op deze manier werd ALDH1B1 geïdentificeerd als een mogelijk additioneel ALDH enzym dat in staat is om retinolzuur te produceren in intestinale epitheliale cellen. *Aldh1a1^{-/-}/Aldh1b1^{-/-}* dubbele *knockout* muizen lieten een pro-inflammatoir fenotype zien. Dit duidde op de betrokkenheid van zowel ALDH1A1, als ALDH1B1 in de regulering van immuun homeostase.

Nieuw chemische gereedschappen om de interactie tussen vitamine A en eiwitten te bestuderen werden beschreven in **Hoofdstuk 7**. Deze klikbare vitamines bleken biologisch identiek aan hun endogene tegenhangers en werden gebruikt in *A₁BPP* toepassingen zonder de toevoeging van een fotoreactieve groep.

Ontwikkeling van een breedspectrum ALDH probe

Hoofdstuk 8 beschreef de ontwikkeling van een breedspectrum activiteit-gebaseerde *probe*, **STA-55**, voor de familie van ALDHs. Deze *probe* is gebaseerd op de eerder gerapporteerde ALDH remmer Aldi-2³¹ en is gekarakteriseerd als een breedspectrum *probe* voor de ALDH familie, die naast de door selectieve *probe* **LEI-945** gedetecteerde ALDHs ook ALDH1B1 en ALDH3A1 verrijkte in levende A549 cellen. De breedspectrum *probe* is vervolgens gebruikt om de potentie en selectiviteitsprofielen te bepalen drie ALDH remmers door middel van competitieve *ABPP*.

Dit leidde tot de ontdekking van verdere onbedoelde eiwit vinding van de ALDH1A1 remmer NCT-505²⁶ en onthulde ook breedspectrum remming van niet-doeleiwitten door de ALDH3A1 remmer CB7.³² Een verhoogde activiteit van ALDH1A1 of ALDH3A1 is een biologische indicatie van cyclofosfamide resistentie in kanker.³³ Aangezien **STA-55** in staat is zowel de activiteit van ALDH1A1, als ALDH3A1 te visualiseren, kan deze *probe* potentieel gebruikt worden om therapeutische effectiviteit te voorspellen door de activiteit van deze enzymen te kwantificeren in patiëntmateriaal. **STA-55** kan verder toegepast worden in het medicijnontwikkelingsproces door de selectiviteitsprofielen en *target engagement* van nieuwe ALDH remmers vast te stellen.

Tot slot

Dit proefschrift beschreef de ontwikkeling van diverse nieuwe chemische *tools*, die gebruikt kunnen worden om ALDHs te onderzoeken door middel van *ABPP* en *A_fBPP*. Toepassingen waarvoor de retinal-gebaseerde *probe*, **LEI-945**, gebruikt is, omvatten het in kaart brengen van de activiteitsprofielen van ALDHs in kanker en het visualiseren van vitamine A metabolisme in de dunne darmen. Naast deze op maat gemaakte retinal *probe* werd de synthese van klikbare vitamine A analoga en de ontwikkeling van een breedspectrum ALDH *probe* beschreven. Gezamenlijk geven deze chemische *tools* onderzoekers de beschikking over een uitgebreide chemische gereedschapskist om ALDH enzymen te kunnen bestuderen. De door het gebruik van deze *tools* behaalde resultaten laten de toegevoegde waarde zien van de toepassing van substraat-gebaseerde *probes* in het onderzoeken van pathologisch relevante enzymactiviteiten. Tevens belichten zij de algemene kracht van eiwit profilering in het ontdekken van nieuwe biologische inzichten en het nut hiervan in het medicijnontwikkelingsproces.

Referenties

1. Koppaka, V. *et al.* Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacol. Rev.* **64**, 520–539 (2012).
2. Duester, G., Mic, F. A. & Molotkov, A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. in *Chemico-Biological Interactions* **143–144**, 201–210 (Elsevier, 2003).
3. Vasilioi, V., Pappa, A. & Petersen, D. R. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem. Biol. Interact.* **129**, 1–19 (2000).
4. Kurys, G., Ambroziak, W. & Pietruszkos, R. Human Aldehyde Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264**, 4715–4721 (1989).
5. Kutzbach, C. & Stokstad, E. L. R. Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *BBA - Enzymol.* **250**, 459–477 (1971).
6. Chern, M. K. & Pietruszko, R. Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 561–568 (1995).
7. Jackson, B. *et al.* Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum. Genomics* **5**, 283–303 (2011).
8. Zile, M. H. Vitamin A and Embryonic Development: An Overview. *J. Nutr.* **128**, 455–458 (1998).
9. Wiseman, E. M., Bar-El Dadon, S. & Reifen, R. The vicious cycle of vitamin a deficiency: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**, 3703–3714 (2017).
10. Mora, J. R., Iwata, M. & Andrian, U. H. Von. Vitamin effects on the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 685–698 (2008).
11. Blomhoff, H. K. *et al.* Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production, and differentiation in normal B cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 23988–23992 (1992).
12. Carlberg, C. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *BioFactors* **10**, 91–97 (1999).
13. Balmer, J. E. & Blomhoff, R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J. Lipid Res.* **43**, 1773–808 (2002).
14. Wang, J. *et al.* Phosphorylation-dependent regulation of ALDH1A1 by Aurora kinase A: Insights on their synergistic relationship in pancreatic cancer. *BMC Biol.* **15**, 1–22 (2017).
15. Zhao, D. *et al.* NOTCH-induced aldehyde dehydrogenase 1A1 deacetylation promotes breast cancer stem cells. *J. Clin. Invest.* **124**, 5453–5465 (2014).
16. Koenders, S. T. A., Gagestein, B. & van der Stelt, M. Opportunities for lipid-based probes in the field of immunology. in *Current Topics in Microbiology and Immunology* **420**, 283–319 (Springer, Cham, 2018).
17. Serwa, R. & Tate, E. W. Activity-based profiling for drug discovery. *Chemistry and Biology* **18**, 407–409 (2011).
18. Cravatt, B. F., Wright, A. T. & Kozarich, J. W. Activity-Based Protein Profiling: From Enzyme Chemistry to Proteomic Chemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 383–414 (2008).
19. Koenders, S. T. A. *et al.* Development of a Retinal-Based Probe for the Profiling of Retinaldehyde Dehydrogenases in Cancer Cells. *ACS Cent. Sci.* **5**, 1965–1974 (2019).
20. Croker, A. K. & Allan, A. L. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDH hiCD44 + human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **133**, 75–87 (2012).
21. Qiu, Y. *et al.* The expression of aldehyde dehydrogenase family in breast cancer. *J. Breast Cancer* **17**, 54–60 (2014).
22. Marcato, P. *et al.* Aldehyde Dehydrogenase Activity of Breast Cancer Stem Cells Is Primarily Due To Isoform ALDH1A3 and Its Expression Is Predictive of Metastasis. *Stem Cells* **29**, 32–45 (2011).
23. Sládek, N. E., Kollander, R., Sreerama, L. & Kiang, D. T. Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: A retrospective study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **49**, 309–321 (2002).
24. Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T. & Hara, A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* **7**, 11018–32 (2016).
25. De Beca, F. F. *et al.* Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J. Clin. Pathol.* **66**, 187–191 (2013).
26. Yang, S. M. *et al.* Discovery of Orally Bioavailable, Quinoline-Based Aldehyde Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) Inhibitors with Potent Cellular Activity. *J. Med. Chem.* **61**, 4883–4903 (2018).
27. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).
28. Yang, W. S. *et al.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* **156**, 317–331 (2014).

NEDERLANDSE SAMENVATTING

29. Svensson, M. *et al.* CCL25 mediates the localization of recently activated CD8 $\alpha\beta$ +lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J. Clin. Invest.* **110**, 1113–1121 (2002).
30. Hamann, A., Andrew, D. P., Jablonski-Westrich, D., Holzmann, B. & Butcher, E. C. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J. Immunol.* **152**, 3282–93 (1994).
31. Khanna, M. *et al.* Discovery of a novel class of covalent inhibitor for aldehyde dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **286**, 43486–43494 (2011).
32. Parajuli, B., Fishel, M. L. & Hurley, T. D. Selective ALDH3A1 inhibition by benzimidazole analogues increase mafosfamide sensitivity in cancer cells. *J. Med. Chem.* **57**, 449–461 (2014).
33. Moreb, J. S., Muhoczy, D., Ostmark, B. & Zucali, J. R. RNAi-mediated knockdown of aldehyde dehydrogenase class-1A1 and class-3A1 is specific and reveals that each contributes equally to the resistance against 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **59**, 127–136 (2007).

