

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138670> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Gagestein, B.

**Title:** Chemical tools to study lipid signaling

**Issue Date:** 2020-12-16

# Nederlandse samenvatting

*Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek was het ontwikkelen en toepassen van chemisch gereedschap (tools) waarmee metabolisme, transport en signaleringsfuncties van lipiden onderzocht kunnen worden.*

**Hoofdstuk 1** besprak de diversiteit van lipiden en het gebruik van bioorthogonale chemie om ze te bestuderen. Lipiden zijn structureel en functioneel diverse biomoleculen die moeilijk te onderzoeken zijn, met name de lokalisatie en eiwitinteractiepartners. Dit komt door de geringe grootte, vettigheid en snelle metabolisme. De meeste methodes om lipiden te onderzoeken vereisen de extractie van de lipiden uit gehomogeniseerd biologisch materiaal, wat nauwkeurige detectie mogelijk maakt, maar waarbij alle ruimtelijke informatie verloren gaat.

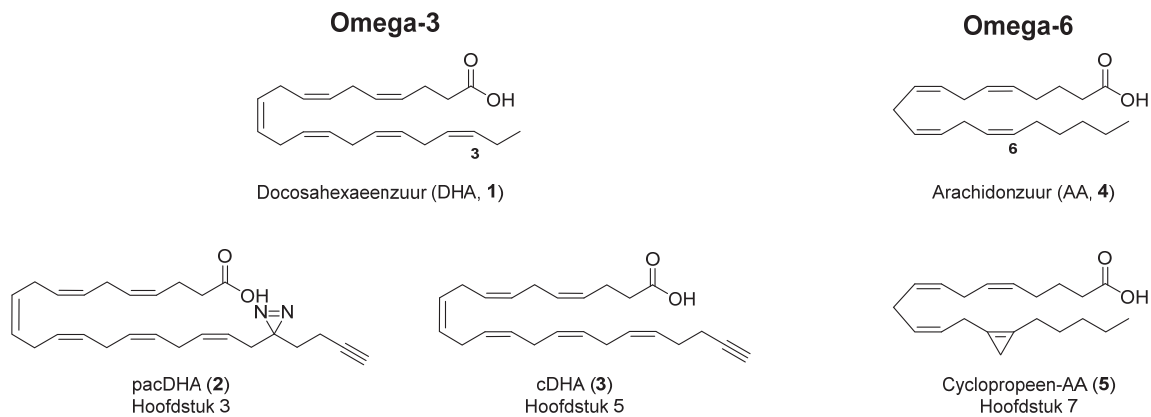
Bioorthogonale chemie heeft het mogelijk gemaakt om lipiden op een veelzijdigere manier te onderzoeken. Een klein bioorthogonaal handvat, zoals een alkyn, kan worden toegevoegd aan een lipide. Daarmee wordt het mogelijk om het te koppelen aan een detectiemolecuul via bioorthogonale chemie, zoals de koper(I)-gekatalyseerde azide-alkyn cycloadditie (CuAAC). Dit stelt de *tool* ertoe in staat om verschillende eigenschappen van het lipide te bestuderen, zoals de lokalisatie, het metabolisme, het transport en de incorporatie in eiwitten als posttranslationele modificatie. Daarbij kan een fotoreactieve groep worden toegevoegd aan de *tool* om niet-covalente interacties tussen lipiden en eiwitten te bestuderen. Het bestralen van een fotoreactieve groep resulteert in de vorming van een reactief intermediair, wat een covalente binding kan maken met een lipide-bindend eiwit. De

combinatie van een bioorthogonaal handvat en fotoreactieve groep resulteert in chemische sensoren (*probes*) die een grote bijdrage hebben geleverd aan onderzoek naar lipide-eiwit interacties. Voor het onderzoeken van meervoudig onverzadigde vetzuren is deze aanpak veelbelovend, aangezien deze lipiden in steeds grotere mate worden gewaardeerd als signaalmoleculen met belangrijke functies, met name in het immuunsysteem. De beschikbaarheid van chemische *tools* gebaseerd op dit soort vetzuren is echter ontoereikend, onder andere dankzij de synthetische uitdaging die deze moleculen vormen.

**Hoofdstuk 2** gaf een samenvatting van de op lipiden gebaseerde fotoreactieve *probes* van het afgelopen decennium. De eerste voorbeelden van fotoreactieve *probes* bevatten radioactieve isotopen of omvangrijke fluoroforen en waren vaak alleen in staat om interacties met vooraf bepaalde eiwitten te bestuderen. De laatste jaren hebben *probes* een verschuiving laten zien naar diazirine- en alkyngroepen, deels door verbeteringen in synthetische mogelijkheden en deels door de grotere beschikbaarheid van compatibele reagentia.

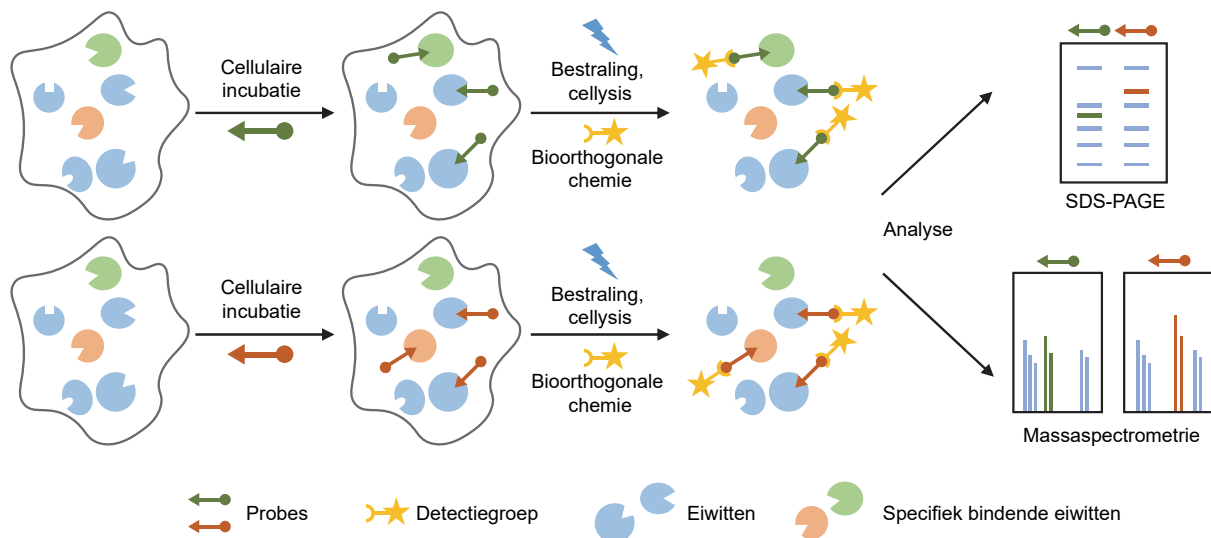
De ambitie van projecten met fotoreactieve *probes* is ook verschoven naar het grootschalig in kaart brengen van lipidebindende eiwitten en het aanpakken van uitdagende biologische kwesties. Er blijven echter grote uitdagingen bestaan in het gebruik van dit soort *probes*. Een grote aanwezigheid van aspecifiek bindende eiwitten maakt het bijvoorbeeld moeilijk om bonafide interactiepartners te onderscheiden. Een overzicht van promiscue eiwitten is beschikbaar in hoofdstuk 2 ter referentie. In de toekomst zal verbeterde synthetische beschikbaarheid—doorgaans gevolgd door commerciële beschikbaarheid—evenals uitgebreidere functionaliteit van chemische *tools* zorgen voor een completer begrip van de eigenschappen en functies van lipiden.

**Hoofdstuk 3** omschreef de synthese en het gebruik van chemische *tools* gebaseerd op een omega-3 vetzuur, docosahexaeenzuur (DHA, **1**, Figuur 1) en een oxidatief metabool, 17-HDHA. DHA ondergaat verschillende oxidatieve transformaties die resulteren in signaalmoleculen met anti-inflammatoire en pro-resolutie eigenschappen. 17-HDHA is een belangrijk intermediair in dit proces. De rol van 17-HDHA in het immuunsysteem werd onderzocht door middel van comparatieve fotoaffiniteit-gebaseerde eiwitprofilering (*Affinity-based protein profiling*, AfBPP) (Figuur 2). Voor dit doeleinde werden twee *probes*, pac-DHA (**2**) en pac-17-HDHA, gesynthetiseerd om de eiwitinteractiepartners te onderzoeken in menselijke immuuncellen.



**Figuur 1 | Structuren van de vetzuren, chemische *tools* en *probes* centraal in deze thesis.**

Comparatieve AfbPP in menselijke macrofagen resulteerde in de identificatie van PTGR1 als pac-17-HDHA-specifiek bindend eiwit wat in staat is om 17-HDHA te converteren naar 17-oxo-DHA. Dit gaf aan dat PTGR1 een centrale rol heeft in oxidatief metabolisme van meervoudig onverzadigde vetzuren, aangezien het pro-inflammatoire signaallipiden kan inactiveren en anti-inflammatoire signaallipiden kan produceren. Dit liet ook zien dat comparatieve AfbPP een effectieve methode is om bonafide interactiepartners van *probes* te onderscheiden.



**Figuur 2 | Schematische weergave van comparatieve AfbPP met fotoreactieve *probes*.**

**Hoofdstuk 4** beschreef de synthese en de toepassing van een *probe* gebaseerd op een neurobeschermend en anti-inflammatoir derivaat van DHA, docosahexaeenzuur ethanolamide (DHEA). De eiwitinteractiepartners van deze *probe* werd onderzocht in microglia, een neuronale immuuncel. Elf specifieke interactiepartners van de DHEA *probe* werden geïdentificeerd door middel van comparatieve AFBPP. Drie van deze eiwitten werden verder onderzocht. NENF, een neurotrofe factor, verlaagde de immuunrespons van microglia, zij het niet in combinatie met DHEA. Stabiele overexpressie van APMAP en GSTM1, de twee andere targets, versterkte de immuunrespons. Dit was meetbaar door een verhoogde NO en IL-6 productie. Dit effect kon deels worden teruggedraaid door behandeling met DHEA, wat aangeeft dat interacties met deze eiwitten deels verantwoordelijk zijn voor de anti-inflammatoire eigenschappen van DHEA in de hersenen. Omdat er weinig bekend is over GSTM1 en APMAP, is meer onderzoek nodig naar de functie van deze eiwitten en het effect hierop van DHEA.

**Hoofdstuk 5** beschreef de ontwikkeling van een vereenvoudigde en geoptimaliseerde methode voor de synthese van een alkyngelabeld derivaat van DHA, cDHA (**3**, Figuur 2). Synthese van derivaten van meervoudig onverzadigde vetzuren, zoals beschreven in Hoofdstuk 3, is een moeizaam proces dat wordt vergezeld door de vorming van verscheidene ongewenste bijproducten. Een alternatieve syntheseroute voor cDHA (**3**) werd ontwikkeld beginnende vanuit DHA zelf. Het gebruik van cDHA (**3**) voor onderzoek naar metabolisme en cellulaire uitwisseling werd gedemonstreerd. Deze betere synthetische strategie kan worden toegepast voor het maken van andere vetzuurderivaten die voorheen lastig te verkrijgen waren. Omdat alkyn- of isotoopgelabelde vetzuren breed inzetbaar zijn voor het onderzoeken van deze biomoleculen is deze synthetische route waardevol voor verder onderzoek.

**Hoofdstuk 6** richtte zich op een ander vetzuur dat een belangrijke rol speelt in de hersenen, anandamide (AEA). AEA is afgeleid uit arachidonzuur (**4**, Figuur 1) en is een signaalmolecuul in het endocannabinoïde systeem (ECS), waar het neurotransmissie reguleert. Farmacologische interventie in dit proces zou interessant zijn voor verschillende toepassingen, maar het transportproces van AEA en de identiteit van een eventueel transporteiwit is nog onduidelijk. Recentelijk werd een remmer van AEA transport gerapporteerd, WOB437. Het is aangetoond dat dit molecuul concentratieafhankelijk de opname van AEA remt in de Neuro-2a cellijn en in primaire neuronen. In muizen was WOB437 oraal beschikbaar en resulteerde in CB1R-afhankelijke anti-inflammatoire en verdovende effecten. Echter werd in dit proefschrift gevonden dat WOB437 de opname van AEA verhoogt en een verlaging van cellulair AEA en gerelateerde *N*-acylethanolamines veroorzaakt. Een *probe* gebaseerd op de structuur van WOB437 resulteerde in de identificatie van drie WOB437-interacterende eiwitten, SCCPDH, VAT1 en FECH. Manipulatie van SCCPDH en VAT1 op genetisch niveau toonde echter aan dat deze eiwitten niet verantwoordelijk zijn voor de cellulaire verlaging van AEA. Verder onderzoek is nodig naar de verlaging van *N*-acylethanolamines, aangezien dit conflicteert met de theoretische inhibitie van een transporteiwit.

Om transport van AEA in levende cellen te kunnen bestuderen, werd in **Hoofdstuk 7** onderzocht of bioorthogonale handvaten beschikbaar zijn die dit mogelijk maken. De katalysator die nodig is in het gebruik van alkyngelabelde lipiden is toxisch, wat onderzoek in levende cellen uitsluit. In plaats daarvan wordt het gebruik van een cyclopropeengroep onderzocht, die een *inverse electron demand Diels–Alder* (IEDDA) reactie kan ondergaan met gesubstitueerde tetrazines. Een plantaardig vetzuur met een 1,2-gesubstitueerde cyclopropeengroep werd onderzocht in U2OS cellen in combinatie met een tetrazinegebonden fluorofoor. Dit resulteerde in succesvolle cellulaire IEDDA reactie en uitstekend fluorescent signaal, wat aangeeft dat cyclopropeengroepen gebruikt kunnen worden om lipiden te visualiseren. Gedreven door deze resultaten werd arachidonzuur met een cyclopropeengroep (**5**, Figuur 1) succesvol gesynthetiseerd en geïsoleerd. Het gevormde molecuul bleek echter instabiel te zijn, zelfs in de afwezigheid van zuurstof en licht. Bij toekomstig gebruik van deze *tool* zullen deze eigenschappen in acht genomen moeten worden.

## Tot slot

Lipiden zijn een diverse klasse biomoleculen die verschillende rollen spelen in de cel, van energieopslag en membraanorganisatie tot signalering in verscheidene cellulaire processen. De distributie van lipiden en hun rol in signalering wordt gereguleerd door een complex netwerk van transporteiwitten en metabole enzymen. Alhoewel technologische vooruitgang er voor heeft gezorgd dat een steeds groter repertoire van lipiden kan worden gedetecteerd en gekwantificeerd, is het nog altijd lastig om de bijbehorende eiwitten in kaart te brengen. Dit aspect is juist interessant voor meervoudig onverzadigde vetzuren, waarvan vele een rol spelen in het immuunsysteem, maar waarvan het mechanisme onduidelijk is. Voor het gelijktijdig onderzoeken van lokalisatie, metabolisme, cellulaire uitwisseling en signaleringsfuncties is een innovatieve aanpak benodigd.

Chemische biologie is een aanpak die de benodigde flexibiliteit aanbiedt. Met dezelfde chemische *tool* kunnen verschillende aspecten worden onderzocht. Met bijvoorbeeld alkyn-gemodificeerde vetzuren kan lokalisatie worden onderzocht met fluorescentiemicroscopie of flowcytometrie, metabolisme door massaspectrometrie of dunnelaagchromatografie evenals binding van de *tool* aan eiwitten als posttranslationele modificatie of als elektrofiel metaboliet. Deze *tools* zouden baat hebben bij verbeterde synthetische of commerciële beschikbaarheid en een breder scala aan procedures om ze toe te passen. Deze toegankelijkheid zal zorgen voor een bredere inzet in verschillende disciplines, wat essentieel is om lipiden beter te kunnen bestuderen.

In dit proefschrift wordt de synthese en toepassing van verschillende chemische tools gerapporteerd voor het onderzoeken van verschillende biologische aspecten van lipiden. De focus was meervoudig onverzadigde vetzuren, die ondervertegenwoordigd zijn in het veld van chemische biologie door hun synthetische uitdaging. De fotoactiveerbare probes en de comparatieve AfBPP aanpak in Hoofdstuk 3 en 4 werden gebruikt om nieuwe lipide-eiwitinteracties te ontdekken en uitleg te geven voor de anti-inflammatoire eigenschappen van DHA en metabolieten. De ontwikkelde synthetische methode gerapporteerd in Hoofdstuk 5 maakt synthetische derivaten van DHA toegankelijker en toonde de veelzijdigheid van alkyngelabelde lipiden aan. De fotoactiveerbare *probe* gerapporteerd in Hoofdstuk 6 maakte het mogelijk om doelwitten te ontdekken van een remmer van AEA transport, al blijft dit proces open ter discussie. Het gebruik van 1,2-gesubstitueerde cyclopropeenvetzuren voor het in beeld brengen van lipiden in levende cellen werd beschreven in Hoofdstuk 7, samen met de synthese van een cyclopropeengelabeld derivaat van arachidonzuur voor het onderzoeken van anandamide.

