Universiteit
Leiden
The Netherlands

Peptide-based probes for protein N-Methyltransferases

Zhang, Y.

Citation
Zhang, Y. (2022, June 2). *Peptide-based probes for protein N-Methyltransferases*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3307258

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/1887/3307258

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

Chapter 6

Summary
Samenvatting

Summary

The work described in this thesis focuses on the development of linear and cyclized peptide probes targeting protein arginine N-methyltransferases (PRMTs) and nicotinamide N-methyltransferase (NNMT). These probes were used to characterize the recognition of specific substrate(s) by PRMTs and NNMT and in so doing providing further insights into inhibitor design and assessment.

In Chapter 1 a general introduction is given on peptide based inhibitors of protein methyltransferases (PMTs). A detailed overview is provided on the work that has been done with respect to the development of the peptide inhibitors of the specific PRMTs. The dysfunction of PMTs are involved in a wide range of diseases, including many forms of cancer. All reported inhibitors were derived from their natural substates which are generally highly specific for the corresponding enzyme. After modification and optimization, the inhibitors' affinity and stability were largely increased also enabling new structural insights into PMT substrate binding. While the endogenous substrates of PMTs are by definition peptide/protein based, peptide-based probes and inhibitors can be of value guiding the development of more drug-like small molecular inhibitors.

Chapter 2 describes the synthesis and evaluation of transition state mimics of PRMT1 and PRMT6, marking the extended application of a methodology recently developed in our group for the production of peptide-based transition state mimicking PRMT inhibitors. Using this approach, an adenosine moiety, mimicking that of the S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) cofactor, is covalently linked to the guanidine side chain of a target arginine residue contained in a peptidic fragment derived from a PRMT substrate protein (Figure 1). Histone H4 tail peptide-based transition state mimics were synthesized wherein the adenosine group was linked to the Arg3 residue of a H4 tail peptide based on the first seven amino acids (Figure 1). H4R3 is a substrate for multiple PRMTs, including PRMT1 and PRMT6. The inhibition results obtained with these new H4-based transition state mimics show low micromolar IC_{50} values against PRMT1 and PRMT6, indicating that the methodology is applicable to the broader family of PRMTs.

Another PRMT family member, PRMT4, also known as coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1), was investigated in Chapter 3. Peptidomimetics that recapitulate the transition state of protein arginine N-methyltransferases were designed based on the H3 peptide wherein the target Arg^{17} was flanked by either a free or an acetylated lysine. The inclusion of the acetylated or non-acetylated Lys^{18} residue allowed us to also probe the impact of lysine acetylation on CARM1 substrate binding. Structural studies with these peptidomimetics and the catalytic domain of CARM1 provide new insights into the

binding of the H3 peptide within the enzyme active site (Figure 2). While the co-crystal structures reveal that lysine acetylation results in minor conformational differences for both CARM1 and the H3 peptide, acetylation of Lys18 does lead to additional interactions (Van der Waals and hydrogen bonding) and likely reduces the cost of desolvation upon binding, resulting in increased affinity. Informed by these findings a series of smaller peptidomimetics were also prepared and found to maintain potent and selective CARM1 inhibition.

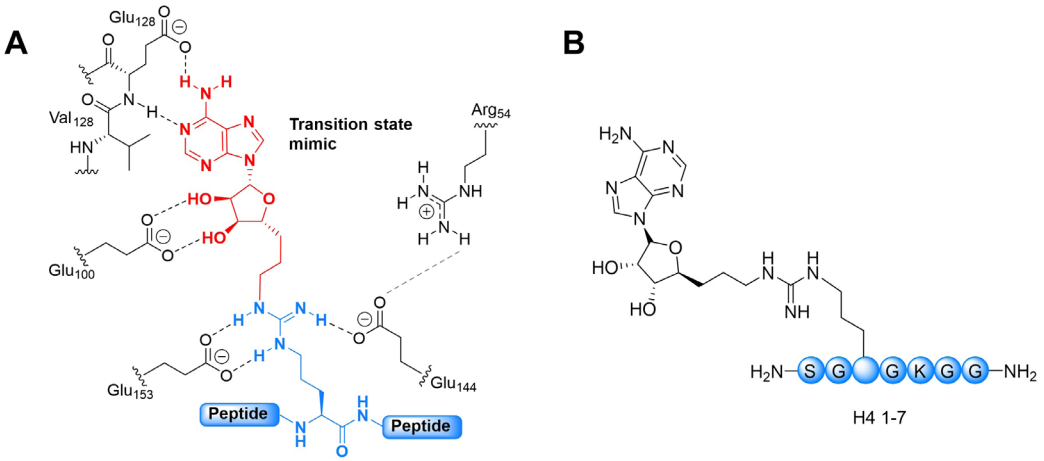


Figure 1. A) The design of the transition state mimics is based on the covalent linkage of the adenosine group (as shown in red) to the arginine sidechain in a peptide (as shown in blue). B) Transition state mimic based on histone $H4^{1-7}$

The aberrant expression of CARM1 has been linked to tumorigenesis, leading to increased interest in targeting CARM1 as a potential therapeutic target. In order to evaluate the effects of inhibitors and tool compounds on the activity of CARM1, sensitive and specific analytical methods are needed. Chapter 4 describes the development of a convenient assay employing peptide substrates derived from poly(A)-binding protein 1 (PABP1), a natural substrate of CARM1. This operationally straightforward LC-MS/MS-based approach allows for the direct detection of substrate methylation with minimal workup. The method was validated and its value in characterizing CARM1 activity and inhibition demonstrated through a comparative analysis involving a set of established small molecule and peptide-based CARM1 inhibitors.

Chapter 5 focusses on the screening, synthesis, and assessment of cyclic peptide inhibitors of nicotinamide N-methyltransferase (NNMT). The complexity of the role of NNMT in healthy and disease states is slowly being elucidated with indications that it may be an interesting therapeutic target for a variety of diseases. The small molecule NNMT inhibitors developed to date are typically structurally related to one or both of its substrates. In the search for structurally diverse NNMT inhibitors, an mRNA display screening technique was used to identify macrocyclic peptides which bind to NNMT. Several of the cyclic peptides identified in this manner showed

potent inhibition of NNMT in biochemical assays and some were also found to reduce nicotinamide methylation in cellular assays. Notably, substrate competition experiments reveal that these cyclic peptide inhibitors are noncompetitive with either AdoMet or nicotinamide indicating they may be the first allosteric inhibitors reported for NNMT.

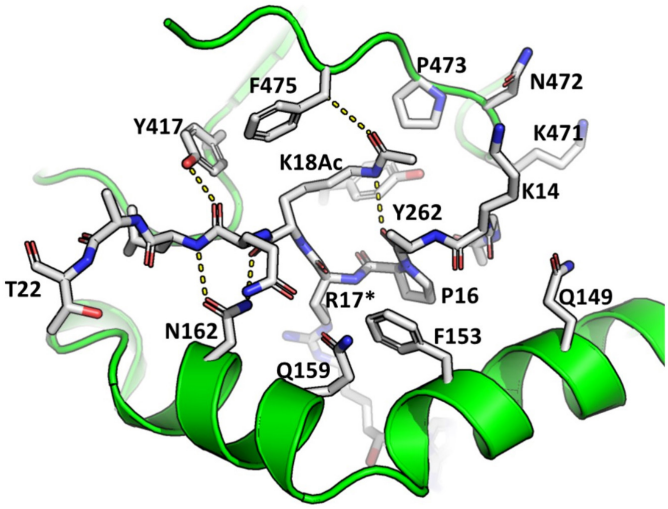
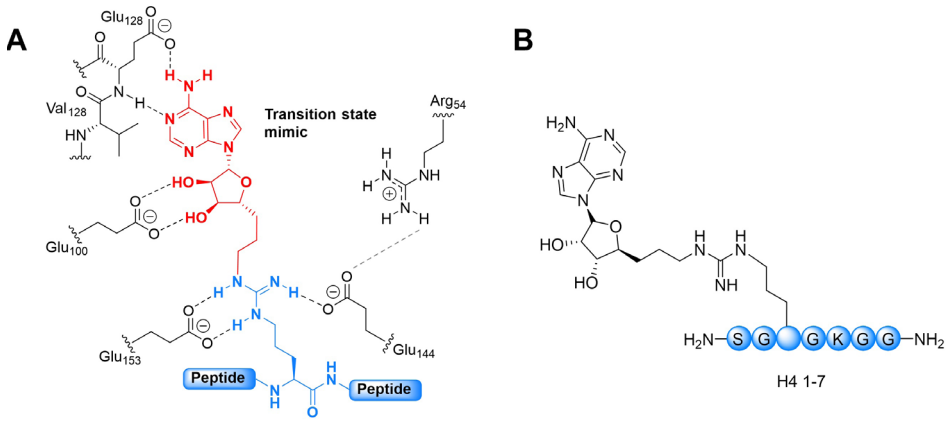


Figure 2. Co-crystal structure of H3$^{13-31}$ Lys^{18}Ac peptide bound to CARM1 catalytic domain (PDB code 7OKP.) H-bonds are shown as dash lines with cartoon and stick representation of the peptidomimetics bound to mmCARM1.

Samenvatting

Het werk beschreven in dit proefschrift richt zich op de ontwikkeling van lineaire en gecycliseerde peptidesondes die zich richten op proteïne arginine N-methyltransferases (PRMT's) en nicotinamide N-methyltransferase (NNMT). Deze sondes werden gebruikt om de herkenning van specifieke substraten door PRMT's en NNMT te karakteriseren en op deze manier meer inzicht te verschaffen in het ontwerp en de beoordeling van remmers van deze enzymen.

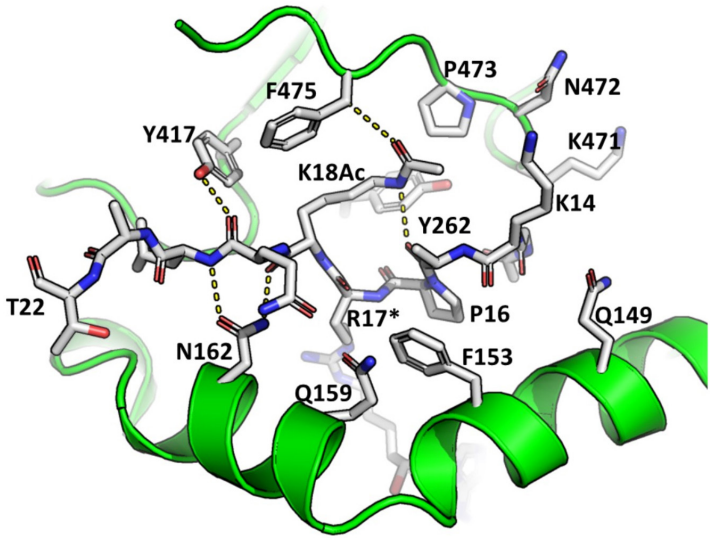
In Hoofdstuk 1 wordt een algemene inleiding gegeven over op peptiden gebaseerde remmers van proteïne methyltransferases (PMT's). Er wordt een gedetailleerd overzicht gegeven van het werk dat is gedaan met betrekking tot de ontwikkeling van peptideremmers van de specifieke PRMT's. De verstoorde werking van PMT's is betrokken bij een breed scala aan ziekten, waaronder vele vormen van kanker. Alle gerapporteerde remmers waren afgeleid van hun natuurlijke substraten die over het algemeen zeer specifiek zijn voor het overeenkomstige enzym. Na modificatie en optimalisatie waren de affiniteit en stabiliteit van de remmers grotendeels verhoogd, wat ook nieuwe structurele inzichten in PMT-substraatbinding mogelijk maakte. Hoewel de natuurlijke substraten van PMT's per definitie op peptiden/eiwitten zijn gebaseerd, kunnen op peptiden gebaseerde probes en remmers waardevol zijn bij de ontwikkeling van meer geneesmiddelachtige kleine moleculaire remmers.



Figuur 1. A) Het ontwerp van de mimetica van de overgangstoestand is gebaseerd op de covalente koppeling van de adenosinegroep (zoals weergegeven in rood) aan de argininezijketen in een peptide (zoals weergegeven in blauw). B) Overgangstoestand mimeticum op basis van histon $H4^{1-7}$.

Hoofdstuk 2 beschrijft de synthese en evaluatie van mimetica van overgangstoestanden van PRMT's gericht op PRMT1 en PRMT6, wat de uitgebreide toepassing laat zien van een methodologie die recentelijk in onze groep is ontwikkeld voor de productie van op peptiden gebaseerde overgangstoestanden

die deze PRMT-remmers nabootsen. Met behulp van deze benadering wordt een adenosine-eenheid, zoals aanwezig in de S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) cofactor, covalent gekoppeld aan de guanidine-zijketen van een geselecteerd arginine-residu dat zich in een peptide fragment bevindt dat is afgeleid van een PRMT-substraateiwit (Figuur 1). Op het histon H4-peptide gebaseerde mimetica van de overgangstoestand werden gesynthetiseerd waarbij de adenosinegroep was gekoppeld aan de Arg3-residu van een H4-peptide op basis van de eerste zeven aminozuren van de N-terminus van histon H4 (Figuur 1). H4R3 is een substraat voor meerdere PRMT's, waaronder PRMT1 en PRMT6. De remmingsresultaten die zijn verkregen met deze nieuwe op H4-gebaseerde overgangstoestand-nabootsers vertonen laag-micromolaire IC_{50}-waarden tegen PRMT1 en PRMT6, wat aangeeft dat de methodologie toepasbaar is op de bredere familie van PRMT's.



Figuur 2. Co-kristalstructuur van $H3^{13-31}$ Lys^{18}Ac-peptide gebonden aan CARM1-katalytisch domein (PDB-code 7OKP.) H-bindingen worden weergegeven als streepjeslijnen met cartoon- en stokweergave van de peptidomimetica gebonden aan mmCARM1.

Een ander lid van de PRMT-familie, PRMT4, ook bekend als co-activator-geassocieerde arginine methyltransferase 1 (CARM1), werd onderzocht in hoofdstuk 3. Peptidomimetica die de overgangstoestand van de eiwit arginine N-methyltransferasen recapituleren werden ontworpen op basis van het H3-peptide waarin het doelwit Arg17 was geflankeerd door een vrij of een geacetyleerd lysine residu. De inclusie van het geacetyleerde of niet-geacetyleerde Lys18-residu stelde ons in staat om ook de impact van lysine acetylering op CARM1-substraatbinding te onderzoeken. Structurele studies met deze peptidomimetica en het katalytische domein van CARM1 bieden nieuwe inzichten in de binding van het H3-peptide in de actieve site van het enzym (Figuur 2). Terwijl de co-kristalstructuren onthullen dat lysine-acetylering resulteert in kleine verschillen in conformatie voor zowel CARM1

als het H3-peptide, leidt acetylering van Lys18 tot extra interacties (Van der Waals interacties en waterstofbruggen) en vermindert het waarschijnlijk de kosten van desolvatie bij binding, resulterend in een verhoogde affiniteit. Geïnformeerd door deze bevindingen werd ook een reeks kleinere peptidomimetica gesynthetiseerd welke krachtige en selectieve CARM1-remming wisten te behouden.

De afwijkende expressie van CARM1 is in verband gebracht met tumorigenese, wat heeft geleid tot een verhoogde interesse in onderzoek naar CARM1 als een potentieel therapeutisch doelwit. Om de effecten van remmers en gereedschapsverbindingen op de activiteit van CARM1 te evalueren, zijn gevoelige en specifieke analytische methoden nodig. Hoofdstuk 4 beschrijft de ontwikkeling van een geschikte test die gebruik maakt van peptidesubstraten afgeleid van poly(A)-bindend eiwit 1 (PABP1), een natuurlijk substraat van CARM1. Deze operationeel eenvoudige LC-MS/MS-gebaseerde aanpak zorgt voor de directe detectie van substraat-methylering met minimale monsteropwerking. De methode werd gevalideerd en de waarde ervan bij het karakteriseren van CARM1-activiteit en -remming werd aangetoond door een vergelijkende analyse met een reeks bekende CARM1-remmers op basis van kleine moleculen en peptiden.

Hoofdstuk 5 richt zich op de screening, synthese en beoordeling van cyclische peptideremmers van nicotinamide N-methyltransferase (NNMT). De complexiteit van de rol van NNMT in gezonde en ziektetoestanden wordt langzaam opgehelderd met aanwijzingen dat het een interessant therapeutisch doelwit kan zijn voor een verscheidenheid aan ziekten. De tot nu toe ontwikkelde NNMT-remmers met kleine moleculen zijn doorgaans structureel verwant aan één of beide substraten. Bij het zoeken naar structureel diverse NNMT-remmers, werd een mRNA-display screeningtechniek gebruikt om macrocyclische peptiden te identificeren die aan NNMT binden. Verschillende van de op deze manier geïdentificeerde cyclische peptiden vertoonden krachtige remming van NNMT in biochemische testen en sommige bleken ook de methylering van nicotinamide in cellulaire testen te verminderen. Met name blijkt uit substraatcompetitie-experimenten dat deze cyclische peptideremmers niet-competitief zijn met AdoMet of nicotinamide, wat aangeeft dat ze mogelijk de eerste allosterische remmers zijn die zijn gerapporteerd voor NNMT.