



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Synthetic peptides, nucleic acids and molecular probes to study ADP-Ribosylation

Voorneveld, J.

### Citation

Voorneveld, J. (2022, September 8). *Synthetic peptides, nucleic acids and molecular probes to study ADP-Ribosylation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3455319>

Version: Publisher's Version

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3455319>

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



# Appendix

Samenvatting



## Samenvatting

ADP-ribosylering is een post-translationele modificatie van voornamelijk eiwitten waarbij NAD<sup>+</sup> wordt verbruikt om ADPr over te dragen op de zijketen van een specifiek aminozuur in het betreffende eiwit. Deze modificatie, die in de jaren 60 is ontdekt, wordt gekatalyseerd door een familie enzymen genaamd ARTs. De eerste chemische karakterisering van het gevormde product dateert uit 1974 waarbij arginine werd beschreven als substraat van ADP-ribosylering. Sinds die tijd is er veel onderzoek verricht naar de functie van deze modificatie, hetgeen resulteerde in belangrijke inzichten over de rol die ADP-ribosylering speelt met betrekking tot het behoud van de integriteit van het genoom, de regulering van de transcriptie, het verouderingsproces en cellulaire apoptose. In 2016 is ontdekt dat ook serine fungeert als acceptor van ADPr en sindsdien is duidelijk geworden dat, na het optreden van DNA-schade, de zijketen van serine het meest voorkomende en wellicht ook meest belangrijke doel van ADP-ribosylering is. Dit proefschrift is gericht op de ontwikkeling van een methodologie voor de organische synthese van ADP-geribosyleerde moleculen. Dergelijke moleculen vormen een zeer nuttig onderdeel in het arsenaal van technieken om ADP-ribosylering te onderzoeken, temeer daar biologisch gewonnen materiaal niet homogeen kan worden verkregen.

In hoofdstuk 2 wordt een methode, eerder gebruikt voor de vaste drager synthese van asparagine-, glutamine- en citrulline-ADP-geribosyleerde peptiden, toegepast om serine-ADP-geribosyleerde peptiden te synthetiseren. Kenmerkend voor deze methode is het gebruik van een beschermd aminozuur dat voorzien is van een gefosforyleerd ribose welke in oplossing wordt gesynthetiseerd. De pyrofosfaat functie wordt tijdens de vaste-drager synthese geïntroduceerd met behulp van een adenosine fosforamidiet. De gesynthetiseerde serine-ADP-geribosyleerde peptiden hebben zowel een  $\alpha$ - als een  $\beta$ -anomere configuratie. Daardoor kon met een serine-ADPr hydrolase assay worden aangetoond dat ARTD1 (de meest onderzochte ART en beter bekend als PARP1) serine op een  $\alpha$ -selectieve wijze ADP-ribosyleert. Dit komt overeen met het gegeven dat ARTD1 andere substraten zoals arginine, asparaginezuur en glutaminezuur, ook op een  $\alpha$ -selectieve manier modificeert. Daarnaast is de chemische stabiliteit van de serine-ADPr verbinding onderzocht door het gebruik van condities die veelal worden gebruikt in biologische experimenten. Hieruit bleek dat behandeling van het peptide met een base zoals NaOH, het ingebouwde serine-ADPr  $\beta$ -eliminatie ondergaat waarbij dehydroalanine overblijft op de plek van modificatie.

Hoofdstuk 3 is gewijd aan het ontwikkelen van een nieuwe synthetische methode voor ADP-geribosyleerde peptiden. Deze methode verschilt met die van hoofdstuk 2 door het gebruik van geribosyleerde aminozuur bouwstenen, waardoor zowel de fosforylering van het ribose en de introductie van het pyrofosfaat aan de vaste drager plaats dient te vinden. Zo wordt de synthese in oplossing van deze bouwstenen vergemakkelijkt door vermindering van

het aantal benodigde en arbeidsintensieve reacties. Ook werd het beschermende groep patroon zoveel mogelijk aangepast aan de gangbare vaste-drager synthese van peptiden waardoor het gebruik van zuur-labele beschermgroepen zoals trityl en 4-methyltrityl mogelijk werd. Met deze nieuwe methode zijn peptiden ADP-geribosyleerd op serine, threonine en cysteine gesynthetiseerd en vervolgens gebruikt voor het verkrijgen van kristalstructuren van ARH3. Ook is met dit materiaal de eerste cysteine-ADPr hydrolase geïdentificeerd welke is gevonden in *Streptococcus pyogenes*.

De methode die in hoofdstuk 3 wordt behandeld is ook toegepast voor de synthese van peptiden ADP-geribosyleerd op tyrosine. In hoofdstuk 4 wordt besproken dat de glycoside binding tussen tyrosine en ribose onvoldoende stabiel bleek te zijn tijdens zure omstandigheden die bij deze methode gebruikt worden tijdens de laatste verwijdering van de beschermende groepen. Door de zuurgevoelige groepen in het adenosine fosforamidite te vervangen door basegevoelige groepen bleek het mogelijk om de tyrosine-ADPr modificatie in peptiden te introduceren. De gesynthetiseerde peptiden, ADP-geribosyleerd op tyrosine, zijn getest als substraat voor verschillende hydrolasen waaruit bleek dat tyrosine-ADPr gehydrolyseerd wordt door PARG. Dit enzym stond bekend als een hydrolase dat ADPr polymeren afbreekt tot de overeenkomstige mono-ADPr eiwitten. Deze nieuwgevonden activiteit van PARG ten opzichte van tyrosine-ADPr kan verstrekkende gevolgen hebben voor de juiste interpretatie van veel proteomics experimenten waar een hydrolyse stap van de lysaten met PARG, een onderdeel is van het protocol.

In hoofdstuk 5 wordt de synthese van peptiden ADP-geribosyleerd op arginine behandeld. De ontwikkelde methode onderscheidt zich van die beschreven in de hoofdstukken 2, 3 en 4, door het ontbreken van een geglycosyleerde arginine bouwsteen in de vaste drager synthese. In plaats daarvan werd orthogonaal beschermd ornithine ingebouwd, waarna aan de vaste drager de reactie van het amine van ornithine met een ribosyl isocyaanate bouwsteen een peptide met een geribosyleerd arginine residu opleverde. Echter het beschermende groep patroon in de bouwstenen en bijbehorende condities bleek van grote invloed op het succes van deze methode. Omdat het duidelijk is geworden dat elk aminozuur een eigen reactiviteit en stabiliteit heeft, zijn de methodologieën van zowel hoofdstuk 3 alsmede hoofdstuk 4 geprobeerd. Hieruit bleek dat een behandeling met een nucleofiele base, nodig voor de hybride methodologie van hoofdstuk 4, niet verenigbaar is met de aanwezigheid van ribosylguanidine functie. De methode ontwikkeld in hoofdstuk 3 bleek wel toepasbaar te zijn om peptiden te synthetiseren met de arginine-ADPr modificatie. Uiteindelijk werden verschillende peptiden met een arginine-ADPr modificatie als ook ubiquitine met een ADPr-modificatie op Arg42 gesynthetiseerd. Daarmee zijn niet alleen voor de eerste keer peptiden ADP-geribosyleerd op arginine toegankelijk gemaakt maar ook het eerste, volledig synthetische eiwit gemodificeerd met ADPr op arginine.

De hierboven genoemde hoofdstukken zijn allemaal gecentreerd om aminozuren als substraat voor ADPr. Daar nucleïnezuren ook ADP-geribosyleerd kunnen worden is hoofdstuk 6 gericht op de ontwikkeling van een vaste-drager methode om ADP-geribosyleerd DNA en RNA te synthetiseren. Hiervoor is een nieuwe, bifunctionele ribosyl bouwsteen ontworpen en het is vervolgens in oplossing getest of deze bouwsteen geschikt is voor het synthetiseren van RNA-ADPr. Deze ribosyl bouwsteen is daarna toegepast voor een synthese op de vaste drager en na optimalisatie is het eerste ADP-geribosyleerde nucleotide gesynthetiseerd.

Hoofdstukken 7 en 8 richten zich op het ontwikkelen van moleculen of probes, die het mogelijk maken om de activiteit van enzymen, betrokken bij ADP-ribosylering in kaart te brengen. Hoofdstuk 7 beschrijft het ontwerp en de synthese van twee zogenoemde “activity based probes” (ABPs) gericht op het enzym CD38. Deze ABPs zijn gebaseerd op NAD<sup>+</sup> en zodanig ontworpen om na interactie een covalente binding met een functionele groep in de actieve site van CD38 te vormen. Na vorming van deze binding zijn er verschillende mogelijkheden om de activiteit van het enzym te bepalen waaronder gelelektroforese en massa-spectrometrische analyse.

In hoofdstuk 8 wordt een foto-affiniteit techniek toegepast om de activiteit van ARTD1 (PARP1) in levende cellen te onderzoeken. Hiervoor werden twee foto-affiniteit ABPs ontworpen op basis van het medicijn olaparib, dat een specifieke ‘small molecule inhibitor’ voor ARTD1 is. De structuur van olaparib werd op twee verschillende wijzen voorzien van een zijketen met een diazirine als foto-reactieve functionaliteit en een alkyne als een handvat voor labeling. Na een voorspoedige synthese van deze ABPs werd hun effectiviteit getest door incubatie van levende cellen, behandeling met UV-licht, lysis van de cellen en analyse van het lysaat met SDS-PAGE analyse gekoppeld aan western blots alsmede tandem massa spectrometrie. Beide analyse-methoden wezen uit dat de probes in staat waren om ARTD1 op een significante en selectieve wijze zichtbaar te maken en hebben de potentie te worden gebruikt om de activiteit van ARTD1 in cellen te onderzoeken.