



Universiteit
Leiden

The Netherlands

The development of molecular tools for investigating NAD+ metabolism and signalling

Minnee, H.

Citation

Minnee, H. (2024, May 23). *The development of molecular tools for investigating NAD+ metabolism and signalling*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3754203>

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/1887/3754203>

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

Nederlandse samenvatting

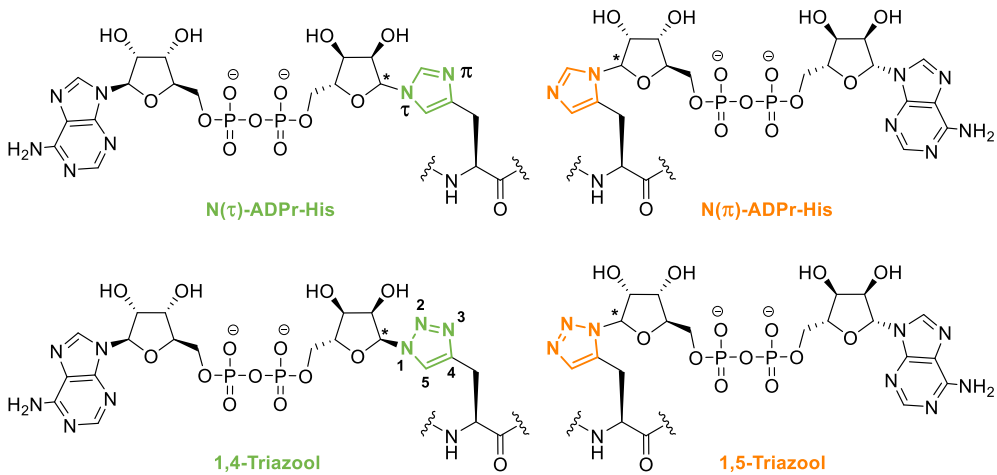
Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek was het synthetiseren van moleculaire gereedschappen, die gebruikt kunnen worden om nicotinamide adenosine dinucleotide (NAD⁺) gerelateerde processen op te helderen. Een bijzondere nadruk werd gelegd op de post-translationele modificatie (PTM) genaamd adenosine difosfaat ribosylering (ADP-ribosylering) waarmee de functionele groep van histidine gemodificeerd kan worden. Hiervoor zijn vaste-drager syntheses, gecombineerd met fosfaatchemie, nucleotide chemie, en suikerchemie, om tot goed gedefinieerde ADP-geribosyleerde peptide fragmenten te komen.

Hoofdstuk 1 bestaat uit een veelomvattend overzicht van zowel chemo-enzymatische als synthetische procedures voor het maken van mono-ADP-geribosyleerde peptide fragmenten. Alhoewel het gebruik van enzymen tot op heden onmisbaar is voor het produceren van oligo-ADPr constructen, is de grote variatie aan ADP-geribosyleerde aminozuren met name te danken aan de synthetische methodes die gedurende de afgelopen decennia zijn opgezet en doorontwikkeld. Daarbovenop biedt de synthetische benadering de mogelijkheid tot het ontwerpen van zogeheten isosteren waarin chemische eigenschappen van de biologische doelmoleculen naar wens gestuurd kunnen worden.

Uit recent massa-spectrometrisch onderzoek van het ADP-ribosyloom in HeLa cellen is gebleken dat een ADP-ribose molecuul met regelmaat wordt geïntroduceerd op de functionele zijgroep van histidine (Figuur 1). Deze imidazoolring kan in theorie op twee plekken worden gemodificeerd die doorgaans worden omschreven als de *tele* ('ver', afgekort als τ) en *pros* ('dichtbij', afgekort als π) posities. Door ontbrekend spectroscopisch bewijs is op voorhand niet met zekerheid te zeggen welke van de twee modificaties biologisch relevant is. De synthese van goed gekarakteriseerde ADP-geribosyleerde histidine peptiden, of nauw verwante isosteren daarvan, is daarom ook onmisbaar om het exacte isomeer van deze specifieke PTM op histidine te achterhalen. Zodoende beschrijft **Hoofdstuk 2** de convergente synthese van 1,4-gesubstitueerde triazolen als uitgelezen isosteren voor N(τ)-ADP-geribosyleerde histidine. Hiervoor is de regio-specifieke koper(I)-gekatalyseerde 'klik reactie' benut tussen een azide-gemodificeerde ADP-ribose analoog (alfa- of beta-geconfigureerd) en een oligopeptide naar keuze waarbij het histidine in kwestie is ingeruild voor een propargyl glycine. Een viertal aan ADP-geribosyleerde conjugaten, afgeleid van de eiwitten PARP1 en HPF1, waren succesvol gesynthetiseerd en naderhand onderworpen aan de tot dusver bekende verzameling aan menselijke ADP-ribose hydrolases. Hiervan bleek ARH3 als enige in staat om de alfa-geconfigureerde ADP-ribose modificatie langzaam maar zeker te hydrolyseren. Deze resultaten zouden erop kunnen wijzen dat ARH3 een rol speelt in de regulatie van ADP-ribosylering op histidine residuen.

Waar de geometrie van een 1,4-gesubstitueerde triazool erg verwant is aan N(τ)-ADP-geribosyleerd histidine, corresponderen 1,5-gesubstitueerde triazolen juist met de N(π)-regioisomeren (Figuur 1). Aangezien de strategie behandeld in het voorgaande hoofdstuk gelimiteerd was tot het gebruik van de koper(I)-gekatalyseerde 'klikreactie', is in **Hoofdstuk 3** een alternatieve route ontwikkeld die

compatibel is met de minder bekende ruthenium(II)-gekatalyseerde cycloadditie. Hiervoor zijn geribosyleerde aminozuur bouwstenen bereid en met behulp van vaste-drager-synthese ingebouwd in een peptidesequentie naar keuze. Het resterende deel van de ADP-ribose modificatie kon daarna op de vaste-drager worden geïntroduceerd volgens een geoptimaliseerde reeks aan reacties, wat resulteerde in een complete set aan ADP-geribosyleerde histidine isosteren. In tegenstelling tot de matige, en voorafgaand waargenomen, activiteit ten opzichte van de alfa-geconfigureerde 1,4-triazool, bleek ARH3 zeer efficiënt in het hydrolyseren van de α -geconfigureerde 1,5-isosteer. Deze observatie versterkt niet alleen de hypothese rondom ARH3 als regulerend enzym van ADP-ribosylering op histidine, maar suggereert daarbovenop dat histidine onder natuurlijke omstandigheden alfa-selectief wordt gemodificeerd op de N(n)-positie.



Figuur 1 | De mogelijke structuren van ADP-geribosyleerd histidine (boven) en de corresponderende triazool isosteren (onder), waarbij de τ/π nomenclatuur en nummering zijn uitgelicht. De anomere centra aangegeven met (*) kunnen zowel α - als β -geconfigureerd zijn.

De natuurgetrouwe analogen van ADP-geribosyleerd histidine zijn nodig om de hierboven beschreven veronderstellingen te toetsen. **Hoofdstuk 4** rapporteert de synthese van α -N(n)- én α -N(τ)-ADP-geribosyleerd histidine via de in Hoofdstuk 2 geoptimaliseerde methode op vaste drager. De hiervoor benodigde geribosyleerde histidine bouwstenen zijn verkregen middels een Mukaiyama-afgeleide glycosyleringsreactie, gebruik makend van een sterisch gehinderde base. De verkregen histidine constructen bleken erg stabiel in het bijzijn van een sterke base (0.1 M NaOH), een sterk zuur (0.1 M TFA) of een nucleofiel (0.5 M NH_2OH). Verassend genoeg waren beide isomeren van ADP-geribosyleerd histidine ook volledig bestand tegen de hydrolytische activiteit van ARH3. De geobserveerde hydrolyse van de triazool isosteren is dus niet van biologisch belang en valt waarschijnlijk te wijten aan de lagere pKa van een triazool ten opzichte van de natuurlijke imidazool (9.4 versus 14.5 respectievelijk). Het is mogelijk dat een vooralsnog onontdekte ADP-ribosyl hydrolase verantwoordelijk is voor de regulatie van deze modificatie op histidine. De hier beschreven ADP-geribosyleerde constructen kunnen desalniettemin gebruikt worden om uitsluitel te bieden wanneer nieuwe kandidaat enzymen worden gevonden.

