



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Puzzling pyrophosphates: synthetic methodologies for ADP-ribosylated biopolymers

Wijngaarden, S.

Citation

Wijngaarden, S. (2026, February 20). *Puzzling pyrophosphates: synthetic methodologies for ADP-ribosylated biopolymers*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4292395>

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/1887/4292395>

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

Appendix

A

Nederlandse samenvatting

“De Pyrofosfaat Puzzel — Synthetische methodologieën voor ADP-geribosyleerde biomoleculen”

ADP-ribosylering is een dynamische post-translationele modificatie van biomoleculen die een cruciale rol speelt in diverse cellulaire processen. De biosynthese, signalering en afbraak van ADP-ribose worden strikt gereguleerd door gespecialiseerde enzymen. Eén enkele modificatie van een eiwit met ADP-ribose resulteert in mono-ADP-ribosylering, terwijl herhaalde modificatie leidt tot de vorming van een poly-ADP-riboseketen. Beide vormen bezitten unieke biochemische eigenschappen en vervullen verschillende functies. ADP-ribosylering kan plaats vinden op vrijwel alle nucleofiele aminozuurresiduen van eiwitten, maar ook op andere biomoleculen zoals nucleïnezuren. De chemische diversiteit van ADP-ribose-bevattende biomoleculen bemoeilijkt het bestuderen van hun cellulaire functie en benadrukt de noodzaak van goed gedefinieerde synthetische modelsystemen. Dit proefschrift richt zich daarom op de ontwikkeling van nieuwe chemische strategieën voor de synthese van ADP-ribosylpeptiden en ADPr-oligomeren, met bijzondere aandacht voor de installatie van de pyrofosfaatgroep.

Hoofdstuk één biedt een algemene inleiding tot de biochemische en chemische achtergrond van ADP-ribosylering. Het centrale structurele element in het molecuul ADP-ribose is de pyrofosfaatfunctionaliteit. In dit hoofdstuk worden verschillende chemische strategieën besproken voor de vorming van de pyrofosfaatbinding, waarvan enkele het fundament vormen voor de synthetische benaderingen die in de volgende hoofdstukken worden uitgewerkt.

Hoofdstuk twee beschrijft de ontwikkeling van een synthetische route voor fluorescente peptiden die op twee cysteïneresiduen tegelijk zijn gemodificeerd met ADP-ribose. De constructen zijn geïnspireerd op de androgeenreceptor, waarvan bekend is dat specifieke cysteïnes worden gemodificeerd door de ADPr-transferase PARP7. Deze ADP-geribosyleerde peptiden fungeerden als geïsoleerd modelsysteem voor de androgeenreceptor en werden gebruikt om de bindingsaffiniteit met het DTX3L/PARP9-complex te bepalen. Voor de synthese werd een Boc-beschermde ribofuranosylcysteïne-bouwsteen ontworpen die compatibel is met Fmoc-gebaseerde vaste-drager synthese voor peptiden. Deze beschermgroepstrategie was essentieel voor het voorkomen van ongewenste migratie van beschermgroepen tijdens de ontscherming van het volledige ADPr-peptideconstruct, zoals eerder waargenomen werd bij PMB-bescherming. De resulterende peptiden, uitgerust met een fluorescente label, werden getest op binding aan het DTX3L/PARP9-complex. Alleen het tandem ADP-geribosyleerde peptide vertoonde sterke binding aan het oligomere complex, terwijl corresponderende mono-ADP-ribosylpeptiden nauwelijks interactie

vertoonden. Dit wijst op multivalente herkenning, waarbij twee ruimtelijk nabije ADP-ribose-eenheden essentieel zijn voor effectieve interactie met het eiwittencomplex.

Hoofdstuk drie presenteert een synthetische strategie voor peptiden die op aspartaat (Asp) en glutamaat (Glu) zijn gemodificeerd met ADP-ribose. Daartoe werden Fmoc-beschermde Asp- en Glu-bouwstenen gekoppeld aan de 3'-alcohol van ribose via een esterbinding. Deze bouwstenen bleken compatibel met de bedachte vaste-drager synthese en werden gebruikt voor het synthetiseren van Asp/Glu-ADPr-peptiden. NMR-analyse toonde migratie van de acylgroep van de 3"-positie naar de 2"-positie van de ribose, resulterend in een mengsel van regio-isomeren, overeenkomend met enzymatisch gegenereerde ADPr-peptiden. Daarnaast werd de chemische hydrolyse van Asp- en Glu-ADPr-peptiden onderzocht, waaruit bleek dat deze sneller hydrolyseren onder basische condities en bij hogere temperatuur. Ook werden verschillende bekende Asp/Glu-ADPr-hydrolasen getest op hun vermogen de synthetische peptiden te hydrolyseren. Verder werd in dit hoofdstuk een strategie ontwikkeld om de labiele esterbinding om te zetten in een stabielere amide-isosteer via een 3"-deoxy-3"-azido-variant en een Staudinger-type omlegging, resulterend in een glutamine-ADPr-isosteer.

Hoofdstuk vier introduceert een nieuwe methodologie voor de synthese van pyrofosfaat-bevattende thymidinedifosfaat (TDP)-oligomeren via volledig beschermde pyrofosfaatintermediaren. Bescherming van de pyrofosfaatgroep tijdens vaste-drager synthese voorkomt ongewenste reacties die voortkomen uit het nucleofiele karakter van de onbeschermde pyrofosfaatfunctionaliteit. De volledig beschermde pyrofosfaat werd verkregen door condensatie van een fosfaatdiester met een P(V)-halofosfaat, gegenereerd *in situ* via Atherton-Todd-oxidatie van het corresponderende H-fosfonaat. Een combinatie van de base-gevoelige CINPE-groep als permanente pyrofosfaatbescherming en de zuur-labele *tert*-butylgroep als tijdelijke fosfaatbescherming bleek de optimale beschermgroepstrategie. Toepassing van deze strategie resulteerde in de synthese van een oligo-TDP-fragment met acht herhalende eenheden. Desondanks werden ook kortere fragmenten waargenomen, wat wordt toegeschreven aan het ontleden van het pyrofosfaat-tetraester intermediair aan de vaste drager tijdens het verlengen van de keten door de aanwezigheid van sporen water of andere nucleofielen. Deze methode werd in **Hoofdstuk vijf** toegepast voor de synthese van ADPr-oligomeren. De vaste-drager synthese leverde goed gedefinieerde poly-ADPr-fragmenten op, variërend van dimeer tot een tot nu toe synthetisch niet-bereikbare decameer.

Hoofdstuk zes beschrijft een convergente strategie voor de synthese van ADP-geribosyleerde peptiden via chemoselectieve fosfaatcondensatie. De reactie verloopt via nucleofiele aanval van een fosfaatmonoëster op een elektrofiel fosforimidazolide, geactiveerd door zinkchloride als Lewis zuur. De regio- en chemoselectiviteit van deze reactie maakt het gebruik van beschermgroepen overbodig en maakt het mogelijk de

pyrofosfaatbinding in een laat stadium van de synthese te installeren. De methode bleek compatibel met een breed scala aan peptiden die op verschillende aminozuuracceptoren waren uitgerust met fosforibose. Bovendien maakte deze strategie de eerste chemische synthese van een di-ADPr-peptide mogelijk.

Hoofdstuk zeven biedt een samenvatting van het in dit proefschrift beschreven onderzoek en formuleert aanbevelingen voor toekomstig onderzoek.