



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthetic affinity-based probes for ADP-Ribose interactome studies

Heijden, F.L.A.M. van der

Citation

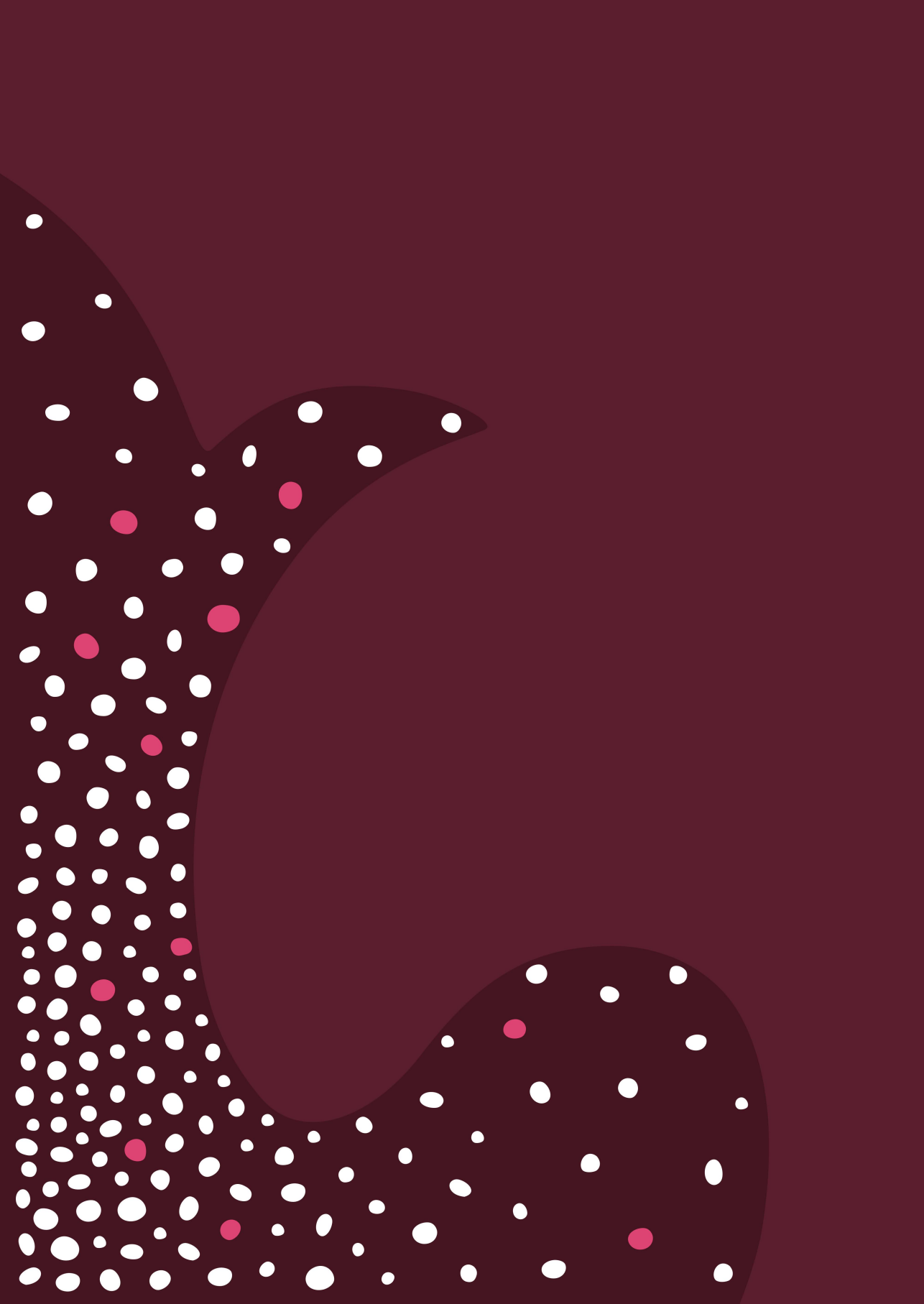
Heijden, F. L. A. M. van der. (2026, March 19). *Synthetic affinity-based probes for ADP-Ribose interactome studies*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4297337>

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/1887/4297337>

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



Appendix



A

Nederlandse samenvatting

Synthetische affiniteitsprobes voor onderzoek naar het ADP-ribose-interactoom

Adenosinedifosfaatribosylering (ADP-ribosylering) is een fascinerende post-translationele modificatie (PTM) die betrokken is bij diverse cellulaire processen en ook een rol speelt bij verschillende ziekten, waaronder kanker en virale infecties. Om deze PTM beter te begrijpen en vervolgens effectieve geneesmiddelen te ontwikkelen voor ziektes, waarbij deze PTM betrokken is, is het van belang om de eiwitten te bestuderen die betrokken zijn bij ADP-ribosylering. Deze eiwitten omvatten niet alleen de enzymen die ADP-ribose verwerken (*ADP-ribosyltransferases* en *ADP-ribosylhydrolases*), maar ook de eiwitten die de ADP-ribosylering herkennen en daarmee interacties aangaan (*ADP-ribosyl-interactoren*).

In de werking van deze eiwitten is een analogie te trekken naar “schrijven, lezen en uitgummen”. Hierbij is de glycosyleringsreactie die ADP-ribosyltransferases (ARTs) uitvoeren te zien als “schrijven”; de werking van de ADP-ribosyl-interactoren kan worden vergeleken met “lezen”, en de werking van ADP-ribosylhydrolases (ARHs) kan worden gezien als “uitgummen”. Daarom worden in de context van ADP-ribosylering als PTM de ART's aangeduid als “*writers*”, de ARHs als “*erasers*” en de interactoren als “*readers*”.

Eerder onderzoek naar ADP-ribosyltransferases en ADP-ribosylhydrolases heeft geleid tot de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen kanker, zoals olaparib, en nieuwe antivirale geneesmiddelen gericht tegen COVID-19. Er is ook veel potentieel in het onderzoeken van de *readers* van ADP-ribose, aangezien deze de stroomafwaartse processen van ADP-ribosylering reguleren en daarom mogelijk interessante therapeutische doelwitten kunnen vormen. Om een duidelijker beeld te krijgen van deze *readers*, is het van belang te bepalen welke van deze *readers* interactie aangaan met de verschillende vormen van ADP-ribose: mono-ADP-ribose, lineair poly-ADP-ribose en vertakt poly-ADP-ribose. Moleculaire probes zijn chemische hulpmiddelen die in deze context verdere inzichten kunnen verschaffen. Dit proefschrift is daarom gericht op de ontwikkeling van nieuwe moleculaire probes met als doel de *readers* van ADP-ribose in meer detail te bestuderen.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de rol van ADP-ribosylering in verschillende cellulaire processen en ziekten, met de nadruk op de rol van de *readers* van ADP-ribose. Het hoofdstuk vat ook de bestaande literatuur samen over moleculaire probes die reeds gebruikt zijn om *readers* van ADP-ribosylering te bestuderen. Deze probes kunnen op twee manieren worden gesynthetiseerd: via chemo-enzymatische procedures of via volledig synthetische methoden. Hoofdstuk 1 beschrijft beide methoden en gaat in op de syntheseproducten van deze methoden, gevolgd door een evaluatie van de voor- en nadelen van deze probes voor onderzoek naar *readers* van ADP-ribose.

In **Hoofdstuk 2** is de ontwikkeling beschreven van moleculaire probes voor het bestuderen van de directe *readers* van mono-ADP-ribose. Twee foto-affiniteitsprobes (*photoaffinity-based probes*) zijn beschreven, elk met een natieve mono-ADP-ribosestructuur, een *photo-cross-linker* voor covalente binding aan interactoren na UV-activatie, en een biotinegroep voor het verrijken van de gebonden eiwitten. Om de meest geschikte *photo-cross-linker* voor deze toepassing te bepalen, is in één probe een lichtgevoelige diazirinegroep gebruikt, terwijl in een andere probe een benzofenongroep is toegepast. De probes zijn gesynthetiseerd door conjugatie van een propargyl-mono-ADP-ribose aan nieuw ontwikkelde, gebiotinyleerde *photo-cross-linkers* via een efficiënte koper(I)-gekatalyzeerde azide-alkyne-cycloadditie (CuAAC) klikreactie. Via een proteomics screening zijn daarna de directe interactoren van mono-ADP-ribose in HeLa-cellysaten geïdentificeerd, waarbij meerdere *readers* werden gedetecteerd met zowel de diazirine- als de benzofenonprobe.

Vervolgens is in **Hoofdstuk 3** een nieuwe affiniteitsprobe (*affinity-based probe*) ontwikkeld om de *readers* van vertakte poly-ADP-riboseketens te onderzoeken, die tot dusverre weinig zijn bestudeerd. Deze probe, *b3ADPrf* genoemd, heeft een minimalistisch ontwerp met een vertakt tri-ADP-ribosefragment dat via het ribosyluiteinde verbonden is met een PEG₃-linker en een biotinegroep. De probe is gesynthetiseerd door gepropargyleerd vertakt tri-ADP-ribose te verkrijgen met behulp van vastedragersynthese, die gebaseerd was op P(V)-P(III)-koppelingen, waarna de biotine-bevattende linker is geïnstalleerd door middel van CuAAC-klikchemie. Met behulp van deze probe zijn vervolgens talrijke vermeende *readers* van vertakte ADP-riboseketens geïdentificeerd in proteomics studies met extracten van HeLa-cellen.

Naast (foto-)affiniteitsprobes vormen oligo-ADP-geribosyleerde peptiden een andere belangrijke categorie van moleculaire hulpmiddelen voor het bestuderen van *readers* van ADP-ribose. Deze peptiden maken het namelijk mogelijk om de rol van de peptideketen in de interacties van poly-ADP-ribose te onderzoeken. In **Hoofdstuk 4** is daarom een nieuwe syntheseroute beschreven voor het verkrijgen van deze peptiden, gebaseerd op een P(V)-P(V)-condensatiestrategie. Daarbij zijn fosforibosylpeptiden en fosfoadenosyl-ADP-ribose-fragmenten gebruikt als uitgangsmaterialen. Voor de synthese van de fosfoadenosyl-ADP-ribose-fragmenten is een P(V)-P(III)-vastedragersynthese toegepast, waarin nieuw ontworpen bouwstenen zijn gebruikt. Daarnaast wordt in dit hoofdstuk, met behulp van de genoemde P(V)-P(V)-condensatiestrategie, ook de synthese van een di-ADP-geribosyleerd peptide beschreven. Hiermee is een praktische methode verschaft om ADP-ribose hulpmiddelen te verkrijgen, die verder onderzoek naar *readers* van poly-ADP-ribose mogelijk maken.

Naast het bestuderen van belangrijke interactoren die betrokken zijn bij ADP-ribosylering, zoals de hiervoor genoemde *readers*, kunnen moleculaire probes ook worden ingezet om geneesmiddelen te onderzoeken die gericht zijn op het ADP-ribosyleringsproces. Voorbeelden hiervan zijn poly-ADP-ribose-polymeraseremmers (PARP-remmers), die doelgericht de ADP-ribosyltransferases blokkeren. Tot op heden is de bekendste en meest gebruikte PARP-remmer olaparib, een geneesmiddel voor de behandeling van BRCA-gemuteerde kankers, waaronder

eierstok- en borstkanker. Door een moleculaire probe te ontwikkelen op basis van een PARP-remmer, kan de werking van deze geneesmiddelen verder worden bestudeerd. In **Hoofdstuk 5** is daartoe een foto-affiniteitsprobe op basis van olaparib beschreven met een diazirine *photo-cross-linker* en een biotinegroep. Deze olaparib-probe is vervolgens gebruikt in een proteomics screening met HeLa-cellysaten, waarbij verschillende olaparib-interactoren zijn gevonden, waaronder nieuwe, voorheen onbekende interactie partners, naast de eerder gerapporteerde interactoren CDK8 en CDK19.

Tot slot sluit dit proefschrift af met **Hoofdstuk 6**, waarin zowel een samenvatting van dit proefschrift is gegeven als voorstellen worden gedaan voor nieuwe moleculaire probes voor verder onderzoek naar *readers* van ADP-ribose en geneesmiddelen gericht op het ADP-ribosyleringsproces.