

Kettenterminierende und durch Click-Chemie modifizierbare NAD⁺-Analoga zur Markierung von Zielproteinen der ADP-Ribosyltransferasen**

Yan Wang, Daniel Rösner, Magdalena Grzywa und Andreas Marx*

Abstract: ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) nutzen NAD⁺ als Substrat und spielen aufgrund der Übertragung von mehreren ADP-Ribose-Einheiten sowie der Bildung von Poly(ADP-Ribose)(PAR)-Ketten unterschiedlicher Länge an Zielproteinen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen wie der DNA-Schadensantwort und der Zellzyklusregulierung. Bestrebungen, die Zielproteine der PARYlierung sowie deren spezifischen ADP-Ribose-Akzeptorstellen zu identifizieren, müssen die Komplexität der PAR überwinden. Wir berichten hier von neuen NAD⁺-Analoga, die effizient durch Wildtyp-ARTs verarbeitet werden und infolge der Abwesenheit benötigter Hydroxygruppen zum Kettenabbruch führen, was zu einer Verringerung der Komplexität dieser Proteinmodifikation führt. Die Anwesenheit einer Alkylgruppe in den hier vorgestellten NAD⁺-Analoga ermöglicht die anschließende Markierung mit Farbstoffen oder Affinitätsmarkern mittels Click-Chemie. Diese Studie bietet Einsicht in das ART-Substratspektrum und könnte den Weg für weitere Entwicklungen chemischer Werkzeuge zur Erforschung des PAR-Metabolismus bereiten.

Aufgrund seiner unterschiedlichen Funktionen ist Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) bekannt dafür, an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Redoxmetabolismus, Signalwegen und posttranslationalen Modifikationen beteiligt zu sein. 1963 berichteten Chambon et al. erstmals von einem aus NAD⁺ hervorgehenden Nukleinsäure-ähnlichen Polymer, und zwar Poly(ADP-Ribose)^[1] (PAR) (Abbildung 1 A). ADP-Ribosylierung ist eine reversible, posttranslationale Proteinmodifikation, katalysiert durch die Enzymfamilie der ADP-Ribosyltransferasen (ARTs),^[2] mit ARTD1 (ADP-Ribosyltransferase Diphtherietoxin-ähnlich 1, früher bekannt als PARP-1) als bestbeschriebenem Mitglied. ARTs spielen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl biologischer Prozesse, darunter DNA-Reparatur, Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität^[3–5] und transkriptionelle Regulation.^[6,7] Im menschlichen Genom wurden 22 verschiedene Gene identifiziert, die für eine katalytische Domäne der ADP-Ribosyl-

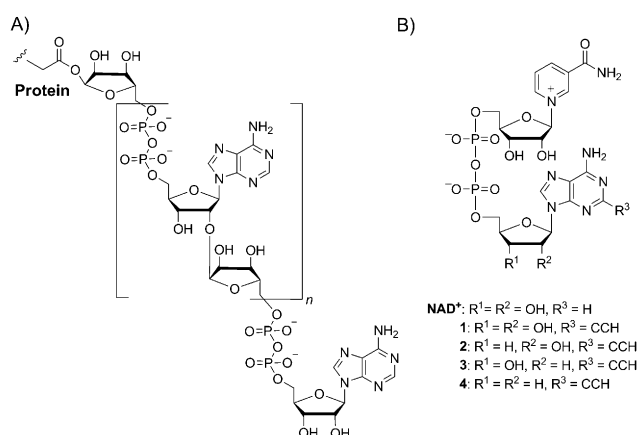


Abbildung 1. A) Struktur von Poly(ADP-Ribose) (A) und NAD⁺ sowie der hier verwendeten Analoga (B).

transferase kodieren.^[8] ADP-Ribosylierung umfasst die Übertragung von einem oder mehreren ADP-Riboseresten von NAD⁺ auf spezifische Aminosäureseitenketten eines Zielproteins, was zu dessen Mono(ADP-Ribosylierung) bzw. Poly(ADP-Ribosylierung) führt. In diesem Zusammenhang wurde eine kovalente Übertragung an Glutaminsäure-, Asparaginsäure- oder Lysinreste beschrieben.^[9]

Fortlaufende Übertragungsreaktionen von ADP-Ribose-Einheiten auf Protein-Mono(ADP-Ribose)-Addukte und anschließend auf die entstehende Kette bilden die Basis zum Aufbau von PAR, die aus bis zu 200 ADP-Ribose-Einheiten besteht, verknüpft durch ein 2'-O-α-D-Ribofuranosyladenosindiphosphat-Rückgrat.^[10,11]

Bestrebungen, direkte Zielproteine der ARTs sowie deren spezifische ADP-Ribose-Akzeptorstellen zu identifizieren, müssen die Komplexität von PAR überwinden, welche die nachfolgenden Analysen erschweren. Die zurzeit entwickelten Herangehensweisen machen sich mutierte ARTs, die lediglich Mono(ADP-Ribosylierung) katalysieren, zunutze, benutzen proteinbasierte oder chemische Strategien zur Anreicherung oder spalten PAR-Ketten vom Substrat ab, was zu einer Markierung führt,^[13] oder benutzen chemisch veränderte NAD⁺-Analoga.^[12b,14]

Wir berichten hier von neuen NAD⁺-Analoga, die effizient durch Wildtyp-ARTs eingebaut werden und a) durch Abwesenheit der benötigten Hydroxygruppe zum PAR-Kettenabbruch führen und b) einen Affinitätsmarker tragen, der Manipulationen wie Markierungen und Anreicherungen von Proben ermöglicht (Abbildung 1 B). Da bisher nur wenig^[14,15] über das Substratspektrum von ARTs bekannt ist, haben wir vier NAD⁺-Analoga (1–4, Abbildung 1 B) mit systematischer

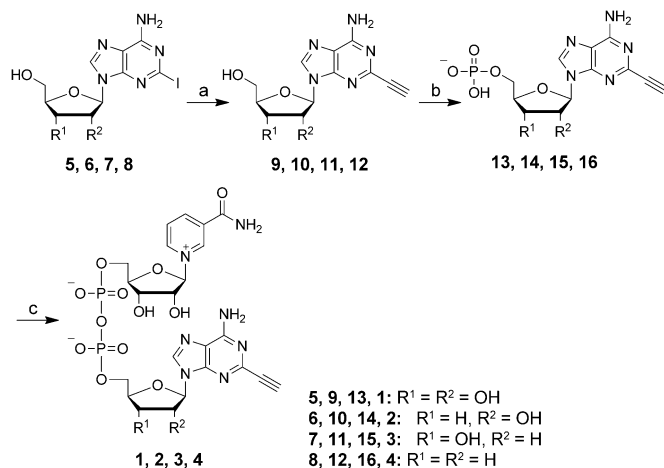
[*] Y. Wang, D. Rösner, M. Grzywa, Prof. Dr. A. Marx
 Fachbereich Chemie, Universität Konstanz
 Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
 E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de
 Homepage: <http://www.uni-konstanz.de/chemie/~agmarx/>

[**] Wir danken der DFG für die anteilige finanzielle Unterstützung innerhalb des SPP 1623 und A. Bürkle (Konstanz) für regelmäßige Diskussionen. NAD = Nicotinamidadenindinukleotid.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201404431> zu finden.

Desoxygenierung der Hydroxygruppen am Adenosin sowie einer Alkylgruppe an der Nukleobase entwickelt. Diese Modifikationen ermöglichen uns, den Einfluss der jeweiligen OH-Gruppe auf die Aktivität von ARTs (d.h. ARTD1) zu untersuchen.

Die Synthese der Analoga **1–4** wurde durchgeführt, indem zuerst die Adenosinrundgerüste **5–8** synthetisiert wurden, die ein Iodat an Position 2 tragen (Schema 1 sowie Hin-



Schema 1. a) 1. CuI, Trimethylsilylacetylen, [Pd(PPh₃)₂Cl₂], Et₃N, DMF, RT, 16 h; 2. NH₃/MeOH, RT, 1.5 h, Ausbeute 45 % für **9** in 2 Stufen, 80 % für **10** in 2 Stufen, 81 % für **11** in 2 Stufen, 82 % für **12** in 2 Stufen. b) Protonenschwamm, POCl₃, Trimethylphosphat, 0 °C, 5 h, 40 % für **13**, 47 % für **14**, 44 % für **15**, 61 % für **16**. c) β-NAM, CDI, Triethylamin, DMF, RT, 96 h, 20 % für **1**, 23 % für **2**, 25 % für **3** und **4**. β-NAM = β-Nicotinamidmonophosphat, CDI = N,N'-Carbonyldiimidazol.

tergrundinformationen Schemata S1 und S2). Danach wurde die Alkylgruppe durch eine Sonogashira-Reaktion^[16] eingeführt, um **9–12** zu erhalten, welche anschließend durch Phosphorylierung^[17] in die Monophosphate **13–16** überführt wurden (Schema 1). Mittels Reaktion mit aktiviertem β-Nicotinamidmonophosphat (β-NAM) konnten die Monophosphate in die entsprechenden NAD⁺-Analoga **1–4** umgewandelt werden (Schema 1).^[18]

Die vorliegenden vier NAD⁺-Analoga **1–4** wurden in In-vitro-Untersuchungen zur ADP-Ribosylierung mit ARTD1, dem am besten untersuchten Mitglied der ART-Familie, herangezogen. Während der ADP-Ribosylierung fungiert ARTD1 einerseits als sein eigener Akzeptor^[12] in einem als Auto(ADP-Ribosylierung) bekannten Prozess, andererseits modifiziert es Zielproteine durch sogenannte Trans(ADP-Ribosylierung). Wir untersuchten daher das Substratspektrum von ARTD1 bezüglich der Akzeptanz von **1–4** in der Auto(ADP-Ribosylierung) (siehe Abbildung S5) und der Trans(ADP-Ribosylierung) (Abbildung 2). Für die Trans(ADP-Ribosylierung) wurden ARTD1 und Histon H1.2, welches der Hauptakzeptor von ADP-Ribose^[19] ist und von ARTD1 und ARTD3 in vitro^[20] modifiziert wird, mit jedem der NAD⁺-Analoga in Anwesenheit eines oktameren, doppelsträngigen Oligonukleotids, welches ARTD1 aktiviert,^[21] inkubiert. Die Verwendung von natürlichem NAD⁺ diente als Positivkontrolle, wohingegen die Negativkontrolle in der

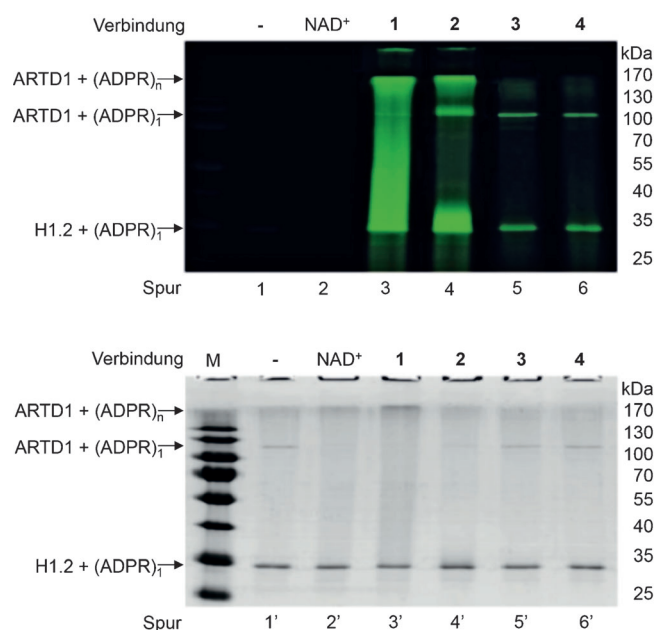


Abbildung 2. Modifikation von Histon H1.2 und ARTD1 mit NAD⁺-Analoga. Der obere Teil zeigt das Bild der Sulfo-Cy5-Fluoreszenz, während unten dasselbe Gel mit Coomassieblau gefärbt wurde. Spuren 1 und 1': Negativkontrolle: ADP-Ribosylierung ohne doppelsträngiges Oligonukleotid (weitere Experimente siehe Abbildung S2); Spuren 2 und 2': Positivkontrolle: ADP-Ribosylierung mit natürlichem NAD⁺; Spuren 3 und 3': ADP-Ribosylierung mit **1**; Spuren 4 und 4': mit **2**; Spuren 5 und 5': mit **3**; Spuren 6 und 6': mit **4**. Die Konzentration aller NAD⁺-Analoga betrug 1 mM.

Abwesenheit des aktivierenden, doppelsträngigen Oligonukleotids bestand. Nach der enzymatischen Reaktion wurde die Click-Chemie durchgeführt, um den Fluoreszenzfarbstoff Sulfo-Cy5-Azid (siehe Abbildung S1) an die alkinmodifizierten ADP-Ribose-Einheiten, die vom Einbau der NAD⁺-Analoga stammten, zu konjugieren. Nach Entfernung von nichtumgesetztem Sulfo-Cy5-Azid wurde die Reaktionsmischung mit SDS-PAGE analysiert, die Fluoreszenzmarkierung erfasst und mit dem Coomassieblau-gefärbten Gel verglichen. Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, werden alle NAD⁺-Analoga in der Trans(ADP-Ribosylierung) von H1.2 durch ARTD1 (Abbildung 2, Spuren 3–6) akzeptiert, wobei **1** und **2** aufgrund der Bildung von langen PAR-Ketten und vielfachem Einbau von Alkinfunktionalitäten die stärksten Fluoreszenzsignale aufwiesen (Abbildung 2, Spuren 3 und 4). Im Fall von **1** wurden sowohl ARTD1 als auch H1.2 umfangreich poly(ADP-ribosyliert). Unterschiede in der Zusammensetzung der angehängten PAR verursachten verschiedene Retentionseigenschaften von H1.2 und ARTD1 in der PAGE-Analyse (Abbildung 2, Spuren 3 und 3'). Interessanterweise beobachteten wir ein ähnliches Ergebnis bei Detektion der PAR unter Verwendung von **1** und Click-Chemie und konventionellem Western-Blot mit Antikörpern. Für **2** beobachteten wir, dass die Abwesenheit der 3'-OH-Gruppe in **2** die Bildung von PAR (Abbildung 2, Spur 4) beeinflusste. Denn obwohl dieses Analogon eindeutig eingebaut wurde (zu erkennen durch das erfolgreiche Anfärben mittels Click-Chemie), besteht im Muster der Automodifikation eine Ver-

änderung im Vergleich zum Produkt, welches mit **1** erhalten wurde. Dies deutet auf eine unerwartete Beteiligung der 3'-OH-Gruppe in der ARTD1-Katalyse hin. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die mit **1** und **2** erhalten wurden, verhinderte die Verwendung von **3** und **4** die Bildung von langen PAR-Ketten, was zeigt, dass sie als Kettenterminatoren wirken, da lediglich scharfe Banden von markiertem H1.2 und ARTD1 beobachtet wurden (Abbildung 2, Spuren 5 und 6). Interessanterweise konnte die PAR-Bildung durch die Bereitstellung der 3'-OH-Gruppe mit **3** nicht wiederhergestellt werden, und ein Modifikationsmuster vergleichbar mit dem des Didesoxy-Analogons **4** wurde beobachtet (Abbildung 2, Spuren 5 und 6). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die 2'-OH-Gruppe für den Aufbau von PAR durch ARTD1 essentiell ist.

Ermotigt durch diese Resultate, untersuchten wir, ob unsere Methode eine Biotinmarkierung der (ADP-ribosylierten) Produkte zulässt. Tatsächlich gelang es uns, Biotin kovalent an die Reaktionsprodukte, die durch die Verwendung der modifizierten NAD⁺-Analoga **1–4** (siehe Abbildung S4) erhalten wurden, zu koppeln. Interessanterweise wurden ähnliche Resultate erzielt, als wir die Auto(ADP-Ribosylierung) von ARTD1 untersuchten (Abbildung S5).

Um herauszufinden, ob die NAD⁺-Analoga kompetitive Substrate für die ARTD1-katalysierte ADP-Ribosylierung sind, haben wir **4** in einer Reaktion mit natürlichem NAD⁺ getestet. Für diese Experimente wurde die enzymatische Reaktion wie oben beschrieben durchgeführt, allerdings mit verschiedenen Verhältnissen von Analoga zu natürlichem NAD⁺. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass **4** in der Gegenwart von natürlichem NAD⁺ durch ARTD1 eingebaut wird (Abbildung 3). Bereits in Gegenwart von lediglich 25 % von **4** wurde nach der Click-Reaktion mit Sulfo-Cy5-Azid ein zur eingebauten Alkinfunktionalität zugehöriges Fluoreszenzsignal nachgewiesen (Abbildung 3, Spuren 3–6). Bemerkenswerterweise scheint die ADP-Ribosylierung von H1.2 mit **4** bei allen eingesetzten Konzentrationen von **4** stattzufinden. Dies steht im Gegensatz zu ARTD1, wo eine (ADP-Ribosylierung) nur beobachtet wurde, wenn ausnahmslos **4** eingesetzt wurde. Dies weist darauf hin, dass ARTD1 **4** effizienter für die Trans(ADP-Ribosylierung) von H1.2 als für die ADP-Ribosylierung von sich selbst nutzt (Abbildung 3, Spuren 3–6). Ähnliche Resultate wurden mit den Analoga **1–3** erzielt (siehe Abbildung S6).

Zusammenfassend haben wir hier über die Gestaltung und die Synthese von vier neuen NAD⁺-Analoga berichtet, die am Purinring und in der Anzahl der Hxdroxygruppen am Adenosin verändert wurden. Alle modifizierten NAD⁺-Analoga **1–4** wurden in enzymatischen Untersuchungen eingesetzt, in denen sie sich als effiziente Substrate von ARTD1 zeigten, sowie zur Markierung von ADP-ribosylierten Proteinen (hier ARTD1 und H1.2) verwendet. Mit der systematischen Modifikation der Hydroxygruppen am Adenosin erforschten wir das Substratspektrum von ARTD1 bezüglich dessen Abhängigkeit vom Vorhandensein der 2'-OH- bzw. 3'-OH-Gruppe bei der Synthese von Poly(ADP-Ribose). Während **1** zum Aufbau von langer PAR führte, führten **3** und **4** zum Kettenabbruch, sobald sie in Auto- oder Trans(ADP-

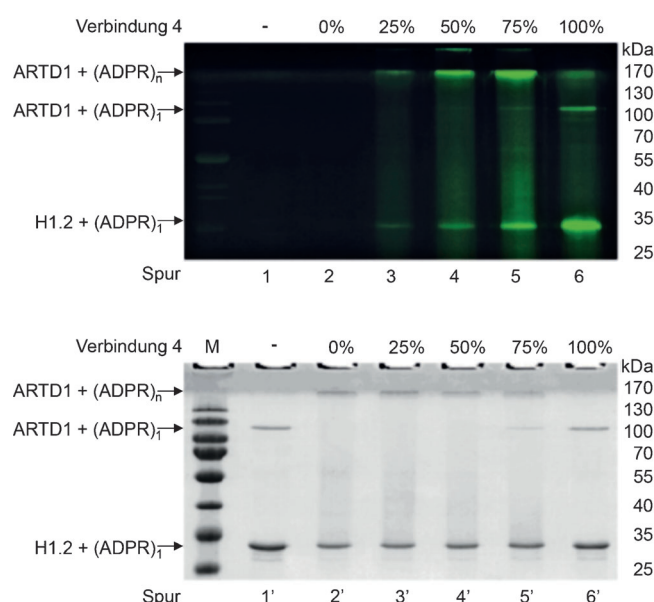


Abbildung 3. Markierung von ARTD1 und H1.2 mit **4**. Der obere Teil zeigt das Bild der Sulfo-Cy5-Fluoreszenz, während unten dasselbe Gel mit Coomassieblau gefärbt wurde. Spuren 1 und 1': Negativkontrolle: Trans(ADP-Ribosylierung) ohne doppelsträngiges Oligonukleotid (weitere Experimente siehe Abbildung S2); Spuren 2 und 2': Positivkontrolle: Trans(ADP-Ribosylierung) mit 100 % natürlichem NAD⁺; Spuren 3 und 3': Trans(ADP-Ribosylierung) mit 75 % natürlichem NAD⁺ und 25 % **4**; Spuren 4 und 4': mit 50 % natürlichem NAD⁺ und 50 % **4**; Spuren 5 und 5': mit 25 % natürlichem NAD⁺ und 75 % **4**; Spuren 6 und 6': 100 % **4**. Die Gesamtkonzentration aller NAD⁺-Analoga betrug 1 mM.

Ribosylierungsreaktionen eingesetzt wurden. Dies bestätigt die Notwendigkeit der 2'-OH-Gruppe bei der PAR-Synthese und zeigt, dass die Abwesenheit dieser Gruppe nicht durch die Anwesenheit der 3'-OH-Gruppe kompensiert werden kann. Darüber hinaus wurde eine Beteiligung der 3'-OH-Gruppe in der ADP-Ribosylierung durch ARTD1 festgestellt, indem der Einsatz von **2**, verglichen mit einem Analogon, welches beide OH-Gruppen 2' und 3' aufweist (**1**), zu einer weniger effizienten Synthese von PAR führte. Weiterhin fanden wir heraus, dass die Modifikationen von **4** diese Verbindung in einen effektiven Kettenterminator der PAR-Synthese in ADP-Ribosylierungsreaktionen mit natürlichem NAD⁺ umwandeln. Die hier erzielten Ergebnisse geben Einblick in das Substratspektrum von ARTD1 sowie dessen katalytischen Mechanismus in der Auto- und Trans(ADP-Ribosylierung). Zudem bereichern die hier vorgestellten NAD⁺-Analoga **1–4** das momentan beschränkte Repertoire an Werkzeugen, das zur Untersuchung von ADP-Ribosylierungsprozessen zur Verfügung steht. Die kettenterminierenden Analoga sollten die Identifizierung und Analyse von Zielproteinen der ADP-Ribosylierung in der Proteomikforschung erleichtern, da erste Resultate mit Markierungen von Histon H1.2 in Zelllysaten sehr vielversprechend verliefen (siehe Abbildung S7) und daher den Weg zur Entwicklung neuer chemischer Werkzeuge für die Aufklärung des PAR-Metabolismus ebnet.

Eingegangen am 17. April 2014
Online veröffentlicht am 2. Juli 2014

Stichwörter: ADP-Ribosylierung · ARTD1 · NAD⁺ ·
Poly(ADP-Ribosylierung) · Posttranslationale Modifikationen

- [1] P. Chambon, J. D. Weill, P. Mandel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, *11*, 39.
- [2] B. A. Gibson, W. L. Kraus, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 411.
- [3] H. L. Ko, E. C. Ren, *Biomolecules* **2012**, *2*, 524.
- [4] M. Christmann, M. T. Tomicic, W. P. Roos, B. Kaina, *Toxicology* **2003**, *193*, 3.
- [5] A. Bürkle, *BioEssays* **2001**, *23*, 795.
- [6] P. O. Hassa, M. O. Hottiger, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1534.
- [7] P. O. Hassa, C. Buerki, C. Lombardi, R. Imhof, M. O. Hottiger, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45145.
- [8] M. O. Hottiger, P. O. Hassa, B. Lüscher, H. Schüler, F. Koch-Nolte, *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 208.
- [9] D. Cervantes-Laurean, D. E. Minte, E. L. Jacobson, M. K. Jacobson, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1528.
- [10] A. Bürkle, *FEBS J.* **2005**, *272*, 4576.
- [11] a) V. Schreiber, F. Dantzer, J. C. Ame, G. de Murcia, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 517; b) S. Messner, M. O. Hottiger, *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 534.
- [12] a) Z. Tao, P. Gao, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14258; b) I. Carter-O'Connell, H. Jin, R. K. Morgan, L. L. David, M. S. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5201.
- [13] a) J. D. Chapman, J.-P. Gagné, G. G. Poirier, D. R. Goodlett, *J. Proteome Res.* **2013**, *12*, 1868; b) Y. j. Zhang, J. q. Wang, M. Ding, Y. h. Yu, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 981; c) S. Jungmichel, F. Rosenthal, M. Altmeyer, J. Lukas, M. O. Hottiger, M. L. Nielsen, *Mol. Cell* **2013**, *52*, 272.
- [14] H. Jiang, J. H. Kim, K. M. Frizzell, W. L. Kraus, H. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9363.
- [15] a) H. Mendoza-Alvarez, R. Alvarez-Gonzalez, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3948; b) H. Mendoza-Alvarez, R. Alvarez-Gonzalez, *J. Mol. Biol.* **2004**, *336*, 105; c) R. Alvarez-Gonzalez, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 17690; d) R. Alvarez-Gonzalez, J. Moss, C. Niedergang, F. R. Althaus, *Biochemistry* **1988**, *27*, 5378.
- [16] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467.
- [17] a) T. Kovács, L. Ötvös, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4525; b) M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 5065.
- [18] C. Moreau, G. K. Wagner, K. Weber, A. H. Guse, B. V. L. Potter, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5162.
- [19] A. Huletsky, G. de Murcia, S. Muller, M. Hengartner, L. Ménard, D. Lamarre, G. G. Poirier, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8878.
- [20] a) H. Okazaki, C. Niedergang, P. Mandel, *Biochimie* **1980**, *62*, 147; b) S. L. Rulten, A. E. Fisher, I. Robert, M. C. Zuma, M. Rouleau, L. Ju, G. Poirier, B. Reina-San-Martin, K. W. Caldecott, *Mol. Cell* **2011**, *41*, 33.
- [21] a) J. Fahrer, R. Kranaster, M. Altmeyer, A. Marx, A. Bürkle, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e143; b) O. Popp, S. Veith, J. Fahrer, V. A. Bohr, A. Bürkle, A. Mangerich, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 179.