

University of Groningen

## Rerouting 'coenzyme A' biosynthesis

Srinivasan, Balaji

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2015

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Srinivasan, B. (2015). *Rerouting 'coenzyme A' biosynthesis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

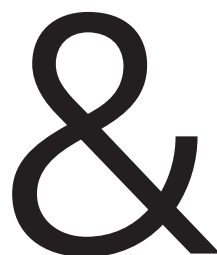
# APPENDICES

Samenvatting in het Nederlands

Acknowledgements

Curriculum vitae

List of publications





## SAMENVATTING IN HET NEDERLANDS

### Alternatieven voor de aanmaak van Coenzym A

In alle organismen zijn stofwisselingsproducten aanwezig die een vitale rol spelen om de cellen, waaruit organismen opgebouwd zijn, goed te kunnen laten functioneren. Coenzym A (CoA) is zo'n stofwisselingsproduct die betrokken is bij meer dan 4% van alle stofwisselingsreacties in onze cellen. Deze reacties zijn nodig voor processen zoals de citroenzuur cyclus, het verbranden en het maken van vetzuren, de aanmaak van keton lichamen, sterolen en nog veel meer. Recentelijk hebben andere wetenschappers ontdekt dat CoA ook een rol speelt in een ander soort cellulaire processen zoals autophagy, epigenetica en signaal transductie. Dit onderzoek toont aan dat CoA niet slechts een metabole cofactor is maar ook onvoorziene andere invloeden en functies heeft. Deze worden ook wel "moonlighting" functies genoemd. Omdat CoA een molecuul is met zoveel verschillende en belangrijke functies is het nodig om precies te weten wat de structuur, biosynthese, regulatie en functie is van CoA. Deze kennis is nodig om de complete fysiologische rol van CoA te begrijpen in gezonde en in zieke mensen.

Structureel gezien bestaat CoA uit pantothenaat, cysteine en een adenosine fosfaat groep. De nieuwe aanmaak van CoA in cellen gebeurt in verschillende stappen met behulp van specifieke enzymen. Het begin product is Vitamine B5 (ook wel pantothenaat genoemd). Vitamine B5 is in voldoende hoeveelheid aanwezig in ons dieet, bovendien produceren bacteriën in onze darmen dit enzym ook. De enzymatische stappen van de aanmaakroute van CoA zijn evolutionair erg goed geconserveerd en de genen die coderen voor deze enzymen zijn geïdentificeerd in verschillende organismen. Het molecuul CoA kreeg meer aandacht nadat ontdekt was dat mutaties in genen die coderen voor twee van de CoA biosynthese enzymen, pantothenaat kinase (PANK) en CoA synthase (COASY), geassocieerd zijn met specifieke subvormen van neurodegeneratie met ijzer stapeling in de hersenen. In het Engels wordt dit Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation genoemd, afgekort NBIA. Mutaties in PANK leiden tot PKAN en mutaties in COASY leiden tot CoPAN. Patienten met PKAN en CoPAN hebben een progressief verlies van hun extrapyramidale en pyramidale functies, dystonie, problemen met slikken en hun spraak. Het aanwezig zijn van de defecte genen PANK en COASY in deze vormen van NBIA, duidt op een link tussen neurodegeneratie en de aanmaak van CoA en suggereert dat een intacte homeostase van CoA zeer essentieel is voor het normaal functioneren van het brein. Echter tot op heden is de pathofysiologie van deze ziekte nog onbekend en er is nog geen therapie beschikbaar. Ook is het onduidelijk hoe een defect in de aanmaak van CoA kan leiden tot deze specifieke subvormen van NBIA.

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was om meer te weten te komen over de aanmaak en de cellulaire functies van CoA. Om dit mogelijk te maken hebben we eerst een analytische methode ontwikkeld om selectief CoA en andere moleculen die een thiolgroep bezitten te kunnen meten. Voor ons onderzoek hebben we verschillende



*in vitro* en *in vivo* model systemen gebruikt, maar vooral hebben we gebruikt gemaakt van de fruitvlieg *Drosophila melanogaster* als model organisme. *Drosophila* wordt heel veel gebruikt in onderzoeksinstituten over de hele wereld om basale mechanismen te begrijpen in de levenswetenschappen op het niveau van moleculen, weefsel, ontwikkeling en gedrag. *Drosophila* wordt ook veel gebruikt als model om humane ziekten te bestuderen. Een ander doel van ons onderzoek was om alternatieve routes te identificeren, om buiten Vitamine B5 en pantothenaat kinase om, toch CoA te kunnen maken. We hebben verschillende substraten gevonden waarmee op een Vitamine B5 en PANK onafhankelijke manier CoA gemaakt kan worden in cellen en deze substraten hebben we verder onderzocht om te kijken of ze als mogelijke therapie zouden kunnen dienen voor de CoA-gerelateerde ziekte PKAN.

In hoofdstuk 2 hebben we onderzocht wat de consequenties zijn voor *in vitro* en *in vivo* *Drosophila* modellen als het CoA biosynthese enzym PKAN defect is. We hebben aangetoond dat het niet functioneren van het enzym PANK leidt tot een afname in de hoeveelheden CoA, niet functionerende mitochondriën, een toenemende eiwit oxidatie, abnormaliteiten in het bewegingsapparaat, neurodegeneratie en een sterk verkorte levensduur. Deze symptomen lijken op enkele symptomen die karakteristiek zijn voor PKAN patiënten. Vervolgens hebben we getest of er moleculen zijn die een reddend effect laten zien op verschillende experimentele modellen voor PKAN. Zo hebben we gevonden dat het molecuul pantethine, de hoeveelheden CoA kan herstellen en de meerderheid van de genoemde fenotypes werden sterk verbeterd. Ook kon het pantethine abnormaliteiten redden in humane cellen waarin het PANK gen uitgeschakeld was. Deze resultaten suggereerde dat pantethine een interessant molecuul kan zijn om verder te ontwikkelen als mogelijke therapie voor PKAN. Via pantethine kunnen cellen en organismen blijkbaar op een PANK onafhankelijke manier CoA maken.

In hoofdstuk 3 hebben we onderzocht welke consequenties mutaties in het PANK gen nog meer kunnen hebben. We hebben hier gekeken naar een mogelijke invloed van CoA op de acetylering van eiwitten. CoA is nodig om in cellen acetyl-CoA te maken en de acetyl groep in acetyl-CoA dient als acetyl donor voor de acetylering van eiwitten. Eiwit acetylering is een belangrijke posttranslationele modificatie en dit is bepalend voor de regulatie van veel eiwitten. Een mogelijke gevolg van een verlaagde hoeveelheid CoA op de acetylering van eiwitten was nog nooit onderzocht. We hebben laten zien dat in een PANK defecte achtergrond, de hoeveelheden acetylering van bepaalde eiwitten verlaagd was. Vooral de histonen en tubuline werden minder geacetyleerd als het PANK gen gemuteerd is. Ook hebben we laten zien dat bepaalde karakteristieken in de PKAN *in vitro* en *in vivo* model systemen komen door de verminderde acetylering van deze eiwitten. Pantethine, maar ook bepaalde histon deacetyleringsremmers herstelden de eiwit acetylering en daarmee werden bepaalde fenotypes gered. De hoeveelheid CoA bepaalt dus ook het niveau van eiwit acetylering en ook dit fenotype aanwezig in PKAN modellen is te redden met pantethine.



In hoofdstuk 4 hebben we de eventuele klinische toepassingen van pantethine verder onderzocht. Een mogelijk gebruik van pantethine in de kliniek om PKAN te behandelen wordt bemoeilijkt door het feit dat pantethine niet stabiel is in serum van mensen. In dit serum zijn enzymen aanwezig (de zogenaamde vanins of pantetheinases. Dit zijn hydrolyserende enzymen die pantethine snel afbreken in Vitamine B5 en cysteamine. In hoofdstuk 4 hebben we een derivaat van pantethine gemaakt, namelijk 4-thiobutyltriphenylphosphonium-pantetheine (TBTP-pantetheine) om het pantethine te stabiliseren. Het idee hierachter was om een pantethine derivaat te maken die stabiel is in het serum maar nog wel zijn werking kan doen. Met werking bedoelen we het in staat zijn om CoA te produceren op een PANK onafhankelijke manier. We hebben gevonden dat het TBTP-pantethine niet stabiel is dan pantethine. Blijkbaar voorkomt de extra groep aan het pantethine niet dat het molecuul afgebroken wordt.

In hoofdstuk 5 bekeken we of er nog meer manieren waren om efficiënt de niveaus van CoA te kunnen manipuleren met als doel het ontwikkelen van mogelijke therapieën voor PKAN. Ons onderzoek heeft aangetoond dat cellen en organismen een alternatieve manier hebben om intracellulaire niveaus van CoA te beïnvloeden, namelijk via het geven van CoA vanaf de buitenkant aan de cellen. Het CoA wordt extracellulair omgezet in 4'-phosphopantetheine via ecto-nucleotide-pyrophosphatases. Het 4'-phosphopantetheine is een stabiel molecuul in serum en wordt niet afgebroken. We hebben ook aangetoond dat 4'-phosphopantetheine door membranen kan worden opgenomen via passieve diffusie. Binnen in de cel wordt het 4'-phosphopantetheine weer omgevormd naar CoA en hierbij is het COASY enzym nodig. We hebben verschillende modellen getest die verminderde CoA hadden, zoals in cellen, wormen en vliegen. Toevoeging van CoA in het medium van de cellen of in het voedsel van de dieren zorgde voor verbetering van de PKAN-gerelateerde symptomen.

Samenvattend laat dit onderzoek zien dat CoA meer functies heeft dan louter en alleen het zijn van een metabole cofactor. En dat er alternatieve wegen mogelijk zijn voor cellen en organismen om aan CoA te kunnen komen. Deze kennis is een stevig uitgangspunt om een therapie te kunnen ontwikkelen voor de ziekte PKAN.





## ACKNOWLEDGEMENTS

Wow! Quite a journey I walked through. Perhaps, I might have started with empty hands. But now, my backpack is full of experiences which I learned over these years. Simply I can say “it’s amazing.” Here, I take the privilege to thank all those people who supported my journey for this milestone.

First and foremost, I share my sincere gratitude to my supervisor (Boss), **Prof. Ody Sibon**. Your persistent motivation and support made me complete my PhD successfully. Probably, some might even feel jealous of the work freedom you provided. But you taught me how to handle the responsibilities which come hidden under that freedom, to reach the research objectives. I appreciate your patience and friendly discussions. When your guidance and optimism moved my scientific path on a daily basis, you also showed good care and concern for my well-being. I am all grateful for the cherishing experiences I had with your support.

I sincerely also thank **Prof. Dirk-Jan Reijngoud** for guiding me promptly throughout my research work. Whenever both analytical and cellular metabolic path looked simply complex, you helped me understand that both are complexly simple, with easy examples. The roundtable discussions with you as a biochemist and Ody as a molecular biologist always gave a new dimension to my scientific work. I thank both of you for your eminent supervision.

There is always room for improvement. But first it is important to know the weakness and to analyze the situation critically. Particularly on this aspect, I convey my gratitude to **Prof. Harrie Kampinga**. You made me learn how to approach science with a broader perspective and to channelize the critics in a constructive manner. It remained a key for my self-confidence in research.

I share my genuine thanks to the reading committee, **Prof. Ivan Gout**, **Prof. Joost Schalkwijk** and **Prof. Dick Hoekstra**. I had the opportunity to discuss my research work with all of you on various occasions. The enthusiastic, at the same time, relevant questions which you all put forth helped me much in research work.

I truly thank **Anil Rana** and **Katarzyna Siudeja** for not only giving me apt guidance and teaching me fly and cell-based work, but also for tolerating my repeated questions during the initial years. You both taught me the art of performing research with hard work and critical experimental design.

I surely enjoy doing science. But a couple of years before during my PhD, I started to realize my two hands won’t be enough to complete many of my experiments on time. **Bart Kanon** and **Marianne van der Zwaag**, you both swept much of my worries away by handling parallel experiments for me. I personally always felt that we together made a good team also





for the special reason that I can discuss experimental plans around 7am before I finish off my night shift work. You both also showed great involvement and gave suggestions in executing experiments, for which I offer my valid thanks.

I owe my gratitude to **Prof. Ellen Nollen**, **Prof. Susan Hayflick**, **Dr. Valeria Tiranti** and **Cristina Colombelli** for their collaborative platform during my PhD. I also appreciate the suggestions and discussions with **Prof. Rob Coppes** and **Prof. Sven van Ijzendoorn**. My special thanks to **Steven Bergink** for his constant support and motivation, along with logical critics. I also acknowledge **Marianne de Villiers**, for providing me advice to understand the chemistry behind my project.

Indeed, the good team always drive the research with much focus and strength. The CoA team members **Nicola**, **Madina** and **Roald**, supported the research work covering various aspects and completing the story with bright colors. My thanks to all of you, especially Nico, for your great patience and support in drafting our manuscript in elegance.

I would like to thank my colleagues for their pleasing attitude over these years. **Wonde** and **Francesco**, thanks for both scientific and casual talks that we shared along. I also offer my thanks to **Jeanette**, **Willy**, **Erwin**, **Onno**, **Jannie**, **Lisa**, **Pascale**, **Jan**, **Anita**, **Yixian**, **Hette**, **Reinier**, **Mirjam**, **Maria**, **Cecile** and all others on our floor for providing friendly ambiance and support over the time. I thank **Annet**, **Greetje** and **Wya** in helping me with all the secretarial and paperwork assistance during my stay.

**Pieter** and **Ronald**, you both supported me with all my sample analysis and generously offered your analytical expertise to handle the HPLC troubleshooting process. I convey my gratitude to both of you. I also thank all others from your floor for providing cordial workspace over these years. I would also like to acknowledge the research and technical support provided by **Gregor**, **Hrvoje** and others from **Acies Bio**, and by **Theo** and **Freddy** from **Analytical Biochemical Laboratory**.

It is important to have some people in life, who can be a well-wisher, teacher and a friend at the same time. I am really happy for the guidance from Sirji's **Anil**, **Vinay**, **Prasanth**, **Veera Kumar** and **Mehul**. I share my respect and greatly appreciate your intention of shaping me as a good person/researcher. I also thank **Chetna**, **Nomisha** and **Kanchan** bhabhi for their good concern on me.

One cannot easily pull this PhD phase without the support of good friends as well. Thanks, **Herschel** (Bhai). I cherish our talks about various aspects of life and science irrespective of time, along with late night burgers and coffee. **Arun**, thanks for all your amicable support along my way. I also like to thank **Ray**, **Vijay**, **Balaji**, **Atze**, **Yamini**, **Chandhuru**, **Christaan**



and all my other friends for their encouragement and companionship. I share my special thanks to **Edyta**, who always took time in listening to my words and sharing your wishes and support. My best wishes for all your success ahead. I also thank **Kori, Masuda** and **Farshid** for their wishes and caring nature towards me. **Kris Rai** and **Elizabeth**, thanks for sharing kind acquaintance with me.

**Kasia**, words can't express my gratitude for your unlimited support and encouragement both in science and life. I owe you a big thanks in fine-tuning my optimism whenever needed. I am really happy for your understanding and supporting my well-being. I keep my fingers crossed for getting a long time slot ahead to support/care for you as well. My best of wishes for your upcoming success.

This accomplishment was not possible without the blessings of my family members. **Dad** and **Mom**, you both are amazing with your love, care and affection all along my life and moreover I know that you both will be happier than me reaching this milestone. I share my respect and love for both of you. Along with them, I specially thank both my sis **Banusri** and **Arunasri** and also both my **brother-in-laws** for their best of support and love. Akka, thanks a lot for all your motivation and shouldering me at tough times. Last but not the least, I owe my spiritual thanks to Guruji '**Lord Shiva**' for everything which I have had in my life. My belief and psychological trust for you will not wane. With all your wishes, I am now hoping to walk forward with stronger steps towards the next milestone.



(Balaji Srinivasan)





## CURRICULUM VITAE

### Personal details:

Name Balaji Srinivasan  
 Date and place of birth 8<sup>th</sup> May 1985; Dharmapuri, Tamil Nadu (India)

### Education:

2007 – 2009 Top Masters in Medical and Pharmaceutical Drug Innovation (MPDI),  
 University of Groningen, The Netherlands.  
 2007 Professional Diploma in Clinical Research (PDCR),  
 Catalyst Clinical Services, New Delhi, India.  
 2002 – 2006 Bachelor of Pharmacy (B.Pharm),  
 Delhi Institute of Pharmaceutical Science & Research, India.



### Professional experience:

2013 – 2015 Designing and developing patents (mentioned below) at the University  
 of Groningen, The Netherlands  
 2009 – 2015 PhD student at the University of Groningen, The Netherlands.  
 Supervisor: Prof. Dr. Ody Sibon  
 2007 – 2009 A. Proteome profiling in Multiple Sclerosis rat model and establishing micro  
 dialysis technique in proteomics. Supervisor: Prof. Dr. Rainer Bischoff.  
 B. Effect of pantothenate kinase depletion on Coenzyme A levels and  
 protein acetylation. Supervisor: Prof. Dr. Ody Sibon.  
 2002 – 2006 Trained pharmacist with experience in pharmaceutical techniques ranging  
 from formulation, quality control and pharmacological evaluation.

### Patents:

- Inventor of the patent 'Compositions and methods useful for treating diseases characterized by insufficient pantothenate kinase activity' (EP 15468006.0). Status: Application filed in 2015.
- Inventor of the patent 'Phosphopantetheine compounds alone or in combination with HMG-CoA reductase inhibitors for lowering serum cholesterol and serum triglycerides' (Appl. No. P-201400452). Status: Application filed in 2014.
- Inventor of the patent 'Stable pantetheine derivatives for the treatment of pantothenate kinase associated neurodegeneration (PKAN) and methods for the synthesis of such compounds' (EP 2868662 A1). Status: Application filed in 2013.

**Scholarships/Achievements:**

- Selected for flash talk at EMBO|EMBL Symposium: *Frontiers in Metabolism: From Molecular Physiology to Systems Medicine* (2014), Heidelberg, Germany.
- Selected for talk in the 'Late-Breaking News' session at NA-NBIA symposium in 2014, Italy.
- Achieved Cock Stichting scholarship during PhD research work in 2011.
- Designed PhD research proposal and achieved PhD scholarship from GUIDE, University of Groningen in 2009.
- Awarded 'Cum Laude' in TopMasters (MPDI) at University of Groningen in 2009.



## LIST OF PUBLICATIONS

1. Extracellular 4'-Phosphopantetheine is a source for intracellular coenzyme A synthesis. B. Srinivasan, M. Baratashvili, M. Van der Zwaag, B. Kanon, C. Colombelli, R.A. Lambrechts, O. Schaap, E.A.A. Nollen, A. Podgoršek, G. Kosec, H. Petković, S. Hayflick, V. Tiranti, D.J. Reijngoud, N.A. Grzeschik, Ody C.M. Sibon. *Nature Chemical Biology* (2015) DOI: 10.1038/NCHEMBIO.1906.
2. Coenzyme A, more than 'just' a metabolic cofactor. Balaji Srinivasan and Ody.C.M.Sibon. *Biochem. Soc. Trans.* 2014 Aug 1;42(4):1075-1079.
3. Synthesis and characterization of 4-thiobutyl triphenylphosphonium-pantetheine, a pantetheine derivative. Roald A. Lambrechts, Balaji Srinivasan, Edzard M. Geertsema, Gerrit J. Poelarends, Ody C.M. Sibon and Marianne de Villiers. *American Chemical Science Journal*. 2014 Sep;4(5):676-686.
4. Impaired Coenzyme A metabolism affects histone and tubulin acetylation in *Drosophila* and human cell models of pantothenate kinase associated neurodegeneration. Siudeja K, Srinivasan B, Xu L, Rana A, de Jong J, Nollen EA, Jackowski S, Sanford L, Hayflick S, Sibon OC. *EMBO Mol Med*. 2011 Dec;3(12):755-66.
5. Pantethine rescues a *Drosophila* model for pantothenate kinase-associated neurodegeneration. Rana A, Seinen E, Siudeja K, Muntendam R, Srinivasan B, van der Want JJ, Hayflick S, Reijngoud DJ, Kayser O, Sibon OC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 13;107(15):6988-93.



