Universiteit
Leiden
The Netherlands

Activity-based protein profiling of glucosidases, fucosidases and glucuronidases

Jiang, J.

Citation
Jiang, J. (2016, June 23). *Activity-based protein profiling of glucosidases, fucosidases and glucuronidases*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/41279

Version:	Not Applicable (or Unknown)
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/41279

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

Cover Page

Universiteit Leiden

The handle http://hdl.handle.net/1887/41279 holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Jiang Jianbing
Title: Activity-based protein profiling of glucosidases, fucosidases and glucuronidases
Issue Date: 2016-06-23

Chinese summary
小结

Activity-based protein profiling of glucosidases, fucosidases and glucuronidases
活性蛋白表达谱技术在葡萄糖苷酶、岩藻糖苷酶和葡糖醛酸酶研究中的应用

本书描述了六元环多醇氮丙啶 (cyclophellitol aziridine) 及以构象类似物为骨架的活性分子探针(activity-based probes, ABPs)的设计与合成，探讨了相应的 ABPs 应用于葡萄糖苷酶、岩藻糖苷酶和葡糖醛酸酶等保留型糖苷酶的化学生物学研究。

第一章简要介绍了 β-葡萄糖苷酶的一些性质，包括保留型/反转型酶分类的方法以及水解相应催化底物所采用的分子机制。其中，保留型葡萄糖苷酶是采用 Koshland 两步双取代机制。此外，本章节还简单描述了六元环多醇氮丙啶为基础的 ABPs 在保留型 β-葡萄糖苷酶活性蛋白表达谱(Activity-based protein profiling, ABPP)中的应用，此应用也是本研究的理论与实验依据。

第二章是关于六元环多醇氮丙啶及其类似物合成方法的文献综述。本章节首先介绍文献报道过的两种不同的六元环多醇氮丙啶合成策略，一种是以反转式环氧环为起始底物；另一种则是以高烯丙基醇分子内的碘环化反应为关键步骤的合成。随后介绍了这两种策略在其他六元环多醇氮丙啶构型与功能类似物合成中的应用。

第三章描述了将 ABPP 应用于保留型 α-L-岩藻糖苷酶 (FUCA) 的研究。保留型 FUCA 属于糖苷水解酶家族 29 (GH29)，人体内 FUCA 的缺失将会导致一种罕见性疾病——岩藻糖苷贮积症(fucosidosis)，它是众多溶酶体贮积病中的一种。在本章研究内容中，L-吡喃岩藻糖苷构型的六元环多醇氮丙啶化合物 (JJB237、JJB244、JJB256 和 JJB243) 在诸多体内和体外试验中都能够选择性的标记细菌、老鼠或人类的 GH29 FUCA。这一章还报道了八种 L-fuconojirimycin 构型异构体的合成方法，以及利用竞争性 ABPP 技术筛选这些化合物以便作为 FUCA 的潜在抑制剂。最后，透过多形拟杆菌 2970 的岩藻糖苷酶与 N-乙酰化-L-吡喃岩藻糖苷-环多醇氮丙啶化合物共结晶和 X-射线衍射分析，我们捕获了岩藻糖苷型异头碳与 FUCA 亲和活性位点共价连接的氮丙啶-糖苷酶复合物晶体及其反向扭船式结构，这也揭示了 FUCA 介导的 L-吡喃岩藻糖苷底物水解构象变化。

第四章着重介绍了基于 N-烷基化六元环多醇氮丙啶结构的保留型糖苷酶的 ABPs。本章节报道了两种 *N*-烷基化六元环多醇氮丙啶 ABPs 的合成以及它们在对于 β-葡萄糖苷酶、和 α-L-岩藻糖苷酶选择性标记中的应用。相较之前报道过的酰化氮丙啶 ABPs，烷基化氮丙啶 ABPs 合成策略更为简便且在弱酸弱碱环境下具有更高的稳定性，从而增强了其实用性。另外，β-葡萄糖苷构象的烷基化氮丙啶 ABPs 与相应的酰化 ABPs 具有相似的标记效力，而 α-L-岩藻糖苷构象的烷基化氮丙啶 ABPs 则比其对应的酰化 ABPs 标记活性略低。因此，烷基化氮丙啶 ABPs 在保留型糖苷酶 ABPs 设计中可以是一个更具竞争力的选择，对于

新型保留型糖苷酶 ABPs 的设计，烷基化和酰化氮丙啶 ABPs 都可作为理想的探针类型。

第五章阐述了一系列α-D-葡萄糖苷烷基化氮丙啶ABPs的合成，包括荧光探针JJB347、JJB382 和 JJB383 以及生物素探针 JJB384，介绍了这些探针结合 APP 技术在糖苷水解酶家族 31 (GH31) α-葡萄糖苷酶研究中的应用。α-葡糖苷酶参与人体多种生理过程，如胃肠中碳水化合物的分解，内质网 (ER) 中的糖蛋白加工和溶酶体中糖原分解代谢等。溶酶体 α-葡萄糖苷酶 (GAA) 的缺乏会导致庞贝氏(Pompe)症，一种比较常见的溶酶体糖原贮积症。酶活抑制实验和 X 射线晶体衍射分析的结果证明了新合成的 ABPs 是 GH31 α-葡萄糖苷酶的共价抑制剂。另外，这些 ABPs 可以特异性的标记保留型 α-葡萄糖苷酶，包括 GAA 和内质网 II 型 α-葡萄糖苷酶，而且标记效力与专一性依赖于 pH 值。此外，此章节还介绍了用以上 ABPs 来对庞贝氏症病人成纤维细胞进行诊断，并报道了其在肠道消化型α-葡萄糖苷酶，如蔗糖酶(Sis)和麦芽糖酶(MGAM)等的蛋白质组学分析中的应用。

第六章介绍了 β-葡糖醛酸构型的六元环多醇氮丙啶及其衍生物(JJB133、JJB144、JJB249、JJB355、JJB391、JJB392 和 JJB395)的合成策略。它们被用来作为糖苷水解酶家族 2 和 79 (GH2 和 GH79) α-葡糖醛酸酶的抑制剂与 ABPs。GH2 β-葡糖醛酸酶 (GUSB) 与糖胺聚糖 (GAG) 贮积症-Sly 疾病直接相关，GH79 β-葡糖醛酸酶与炎症，肿瘤血管生成和细胞迁移等有关。糖醛酸-*N*-烷基化六元环多醇氮丙啶比糖醛酸-*N*-酰化-六元环多醇氮丙啶较易合成，但以二者为基础制备的 ABPs 在抑制和标记 β-葡糖醛酸酶方面具有同等效力，这与第四章介绍的有关结论相一致。此外，通过晶体学分析荚膜醋杆菌(Acidobacterium capsulatum) β-葡糖醛酸酶(AcaGH79)与烷基化或酰化的糖醛酸氮丙啶的复合物进一步验证了酶亲和活性位点的共价修饰以及复合物的 $^{4}C_{1}$ 椅式构象。糖醛酸-*N*-烷基化六元环多醇氮丙啶 ABPs 的应用在**第七章**展开，包括使用 LC-MS/MS 方法准确地鉴定人类 GH2 溶酶体 β-葡糖醛酸酶 (GUSB) 和 GH79 肝素酶 (HPSE) 以及富集的 GUSB 的亲和活性位点。有趣的是，HPSE 作为一种内切糖苷酶(*endo*-GHs)也能被糖醛酸-*N*-烷基化六元环多醇氮丙啶衍生物抑制或标记，虽然单糖类似物一般是用来设计外切糖苷酶 (*exo*-GHs) 底物的。最后，此章节还比较分析了氮丙啶化合物 JJB355 与外切型 GUSB、外切型 AcaGH79 和内切型 HPSE 形成的复合物的共晶体结构，揭示了这些保留型糖苷酶的 Kosland 双取代催化机制以及 $^{1}S_{3}$-$^{4}H_{3}$-$^{4}C_{1}$ 类型的 β-葡糖醛酸水解过程。

第八章对本论文的实验工作进行了归纳和总结，并对未来的研究工作进行了展望。其中，以氮丙啶类化合物为基本骨架为其他保留型糖苷水解酶设计了一系列 ABPs，为内切型 HPSE 设计了二糖构型的氮丙啶 ABPs，最后引入螺环氮丙啶 (spiro-aziridine)为设计反转型糖苷酶 ABPs 提供新的思路。