



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Inhibitor discovery of phospholipases and N-acyltransferases

Zhou, J.

Citation

Zhou, J. (2020, November 11). *Inhibitor discovery of phospholipases and N-acyltransferases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/138014>

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/1887/138014>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138014> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Zhou, J.

Title: Inhibitor discovery of phospholipases and N-acyltransferases

Issue date: 2020-11-11

Chinese summary

小结

Inhibitor discovery of phospholipase and N-acyltransferases

磷脂酶和 N-酰基转移酶抑制剂的发现

在**第一章**中，内源性大麻素（N-花生四烯酸乙醇胺，AEA）被认为是一种能够激活大麻素受体的内源性配体。除了 AEA，还介绍了其他几种与 AEA 结构类似的 N-酰基乙醇胺（NAE），例如棕榈酰基乙醇酰胺（PEA），油酰基乙醇酰胺（OEA），硬脂酰基乙醇酰胺（SEA）和二十二碳六烯基乙醇酰胺（DHEA），以及它们的生物合成途径。N-酰基转移酶（NAT）在 NAE 的生物合成中的第一步限速步骤中发挥作用。NATs 有两类： Ca^{2+} 依赖型的 NAT（Ca-NAT）和非 Ca^{2+} 依赖型的 NAT（PLAAT1-5）。最近，Cravatt 及其同事报道了 PLA2G4E（也称为 cPLA2 ϵ ）也是一种 Ca-NAT。该蛋白可以将酰基链从磷脂酰胆碱（PC）的 sn-1 位置转移到磷脂酰乙醇胺（PE）的胺基上，从而有效地产生 NAPEs。PLA2G4E 属于胞质磷脂酶 A2 IV 组（PLA2G4）蛋白家族，该家族中有六个成员（PLA2G4A, PLA2G4B, PLA2G4C, PLA2G4D, PLA2G4E 和 PLA2G4F）。与其他家族成员不同的是，与磷脂水解反应相比，PLA2G4E 对 N-酰基转移反应有很强的选择性。

人类磷脂酶 A /酰基转移酶（PLAAT1-5）家族由五个成员组成（即 PLAAT 1-5），其中两个在啮齿动物中不存在（即 PLAAT2 和 PLAAT4）。它们是 Hras1s 基因编码的蛋白质。PLAATs 在体外具有非 Ca^{2+} 依赖型的磷脂酶活性，反应的底物为磷脂酰胆碱（PC）和磷脂酰乙醇胺（PE）。所有蛋白质成员都具有 O-酰基转移酶活性，并优先选择溶血磷脂酰胆碱（lyso-PC）的 sn-1 位置。这些蛋白同时也具有 N-酰基转移酶的活性：通过将甘油磷脂的 sn-1 位置的酰基链转移到 PE 的胺基上来生成 N-酰基磷脂酰乙醇胺（NAPE）。除 PLAAT3 外，所有酶均显示 PLA1 活性优于 PLA2 活性。在不同的测试条件下，PLAAT3 的底物偏好可能会发生变化。

总之，PLAAT 和 PLA2G4E 参与了 NAE 的主要生物合成途径，这使得在特定的疾病情况下如果需要操纵 NAE 的水平时，它们便成为非常好的药物靶标。本论文中的研究课题主要是开发基于活性的蛋白质谱的活性测试方法，并用该方法寻找这些酶的抑制剂。

在**第二章**中，之前开发用于监测二酰基甘油酯脂肪酶- α/β 活性的基于活性的探针（ABP）MB064 被用于分析 PLAAT3 蛋白的活性。MB064 能够以活性依赖性方式在棕色和白色脂肪组织中标记内源性 PLAAT3。使用竞争性 ABPP 的活性测试方法和重组过表达的蛋白质，以 10 μM 的浓度筛选一个包含 50 个脂肪酶抑制剂的化合物库来寻找 PLAAT3 的抑制剂。结果

发现了在 10 μM 时几乎完全抑制 PLAAT3 活性的 α -酮酰胺（化合物 1）。化合物 1 也抑制 PLAAT 家族的其他成员，但是对其他丝氨酸水解酶具有选择性。

在**第三章**中，描述了对 α -酮酰胺先导化合物的优化和构效关系。结果表明， α -酮基和酰胺基上的取代基对于抑制活性至关重要。发现 3-苯基丙烷基部分（如化合物 37 中所示）是作为 α -酮取代基的最佳片段。化合物 49 和 50 对 PLAAT5 有很强的抑制活性和选择性，而化合物 48 和 60（也称为 LEI110）是对 PLAAT3 和 5 都具有很强的抑制活性和选择性的抑制剂。

第四章中介绍了 LEI110 的生物学分析结果。LEI110 是对 PLAAT3 有效的，选择性的和细胞渗透性的抑制剂。在 PLAAT3 过表达的 U2OS 细胞中，LEI110 可以降低细胞花生四烯酸水平。在人类 HepG2 细胞中，LEI110 降低了中油酸诱导的脂肪变性。为了深入了解 α -酮酰胺与 PLAAT3 相互作用的分子机制，LEI110 和化合物 1 被对接到 PLAAT3 晶体结构中。LEI110 和化合物 1 共价连接到 Cys113，并进行了分子动力学模拟。观察到氧负离子可以与 His23 形成氢键，同时与 Tyr21 的 π - π 堆积作用。可以预期，LEI110 是针对肥胖和/或普通感冒的新型分子疗法的基于结构的药物开发的绝佳起点。

在**第五章**，开发了以 TAMRA-FP 为探针的 ABPP 测试方法来分析 PLA2G4E 的活性。在 10 μM 的浓度下，筛选了含有 200 多种化合物的化合物库，来寻找人类 PLA2G4E 的抑制剂。八个抑制剂显示人类 PLA2G4E 的残留活性不到 20%。ESC386 和 ESC387 是最有效的抑制剂， $p\text{IC}_{50}$ 值分别为 6.2 ± 0.1 和 6.1 ± 0.1 。这些化合物代表 PLA2G4E 的最新的抑制剂，为进一步的探针开发提供了非常好的起点。

第六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。