

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/77740> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Kuo, C.L.

Title: Applications for activity-based probes in biomedical research on glycosidases

Issue Date: 2019-09-10

Appendices

- Summary in Dutch (Nederlandse Samenvatting)
- Summary in Chinese (中文摘要)
- List of Publications
- *Curriculum vitae*

Nederlandse Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft de karakterisering en de toepassing van activity-based probes (ABPs) die lysosomale glycosidases labelen op een mechanism-based wijze. Lysosomale glycosidases zijn zure hydrolases die glycoconjugaten fragmenteren in lysosomen. Verschillende erfelijke stofwisselingsziekten worden veroorzaakt door de deficiëntie in een lysosomaal glycosidase. De bijbehorende lysosomale stapelingsziekten (LSDs) vertonen een karakteristieke lysosomale stapeling van niet afgebroken substraten. De algemene inleiding biedt een overzicht betreffende lysosomale glycosidases en hiermee verbonden LSDs. Beschreven worden huidige behandelingsmogelijkheden en diagnostiek. Aandacht wordt besteed aan de kennis over de levenscyclus van lysosomale glycosidases en hun katalytische mechanisme. Begrip van dat laatste heeft mogelijk gemaakt het ontwikkelen van activity-based probes (ABPs), verbindingen die selectief en irreversibel lysosomale glycosidases labelen in mechanism-based manier. De huidige ABPs voor lysosomale glycosidases zijn gebaseerd op cyclophellitol en cyclophellitol aziridine scaffolds. Dit proefschrift beschrijft hoe deze probes worden benut in het onderzoek aan ziekte-relevante enzymen.

Hoofdstuk 1 beschrijft de ontwikkelde protocollen voor detectie in gel en met microscopie van lysosomale glycosidases, in het bijzonder het β -glucosidase GBA, na zijn labeling *in vitro* en *in vivo* met een fluorescent ABP. Cyclophellitol-type ABPs met een elektrofiel epoxide en een BODIPY-fluorofoor visualiseren zeer specifiek en sensitief actieve GBA-moleculen middels irreversibele labeling hiervan. Labeling kan worden uitgevoerd *in vitro* met enzympreparaten ofwel cel- en weefsel-extracten. Vanwege de amfifiele aard van de gebruikte ABPs is *in situ* labeling en detectie van actieve GBA-moleculen mogelijk in cellen en organismen. De beschreven protocollen voor ABP labeling van GBA kunnen verbreed worden naar andere cyclophellitol- en cyclophellitol aziridine-based ABPs die andersoortige glycosidases labelen.

Hoofdstuk 2 betreft de bestudering van *in vivo* target engagement van conduritol B-epoxide

(CBE) en cyclophellitol (CP) in cellen en proefdieren. Gebruikt is gemaakt hierbij van een gel-based ‘competitive activity-based protein profiling’ (cABPP) benadering. CBE en CP zijn mechanisme-based irreversibele GBA remmers die volop gebruikt worden voor het genereren van modellen van de ziekte van Gaucher in cellen en proefdieren. Deze remmers kunnen echter *in vivo* additionele glycosidases naast GBA remmen, afhankelijk van gehanteerde dosis en incubatietijd. Voor kandidaat off-target glycosidases is een scala aan glycosidase ABPs beschikbaar waarmee de mogelijke interactie van CBE en CP hiermee kan worden aangetoond. Bestudering van CBE-behandelde cellen en zebravis larven liet zien dat bij hogere concentraties de remmer CBE *in vivo* ook reageert met niet-lysosomaal glucosylceramidase (GBA2) en lysosomaal α -glucosidase (GAA). Een nauw, maar acceptabel, window voor selectieve remming van GBA in het brein van de muis werd waargenomen. Anderzijds, CP bleek met eenzelfde affiniteit GBA en GBA2 te inactiveren en is derhalve ongeschikt voor het genereren van echte modellen van de ziekte van Gaucher.

Hoofdstuk 3 beschrijft nieuwe irreversibele remmers van GBA met een superieure selectiviteit. Deze klasse verbindingen bevat een relatief grote hydrofobe substituent op C8, zoals adamantyl en bifenyyl-groepen. Aangetoond kon worden met gel-based ABPP experimenten dat de nieuwe verbindingen veel krachtigere en selectievere irreversibele remmers zijn van GBA dan CBE, zowel *in vitro*, in gekweekte cellen als in zebravis larven. De remmer met een adamantyl groep bleek goed brein-permeabel en maakt het mogelijk om een authentiek model de voor neuropathische vorm van de ziekte van Gaucher te genereren in de zebravis door een blootstelling van de dieren aan de verbinding gedrenkt in het voedsel.

Cruciaal voor het optimale gebruik van nieuwe glycosidase ABPs in LSD onderzoek is een grondige biochemische karakterisering van hun eigenschappen, behelzend onderzoek aan het werkingsmechanisme, bepaling van kinetiek van remming, potentie *in vitro* en *in vivo*, en identificatie van off-target glycosidases.

Hoofdstuk 4 beschrijft de karakterisering van nieuw ontwikkelde ABPs voor de lysosomale glycosidases α -glucosidase (GAA) en β -glucuronidase (GUSB), enzymen die deficiënt zijn bij de ziekte van Pompe en mucopolysaccharidosis type VII (MPSVII; Sly Syndroom), respectievelijk. Deze ABPs labelen hun respectievelijke target enzymen (GAA en GUSB) met hoge affiniteit en op mechanisme-based wijze. Het α -glucose geconfigureerde ABP labelt niet alleen het lysosomale α -glucosidase GAA, maar ook het ER α -glucosidase II (GANAB). Waargenomen is dat bij een

hogere concentratie van het ABP het β -glucosidase GBA een off-target is. Door het veranderen van de pH tijdens de labeling, en het pre-incuberen van monsters met een specifieke GBA remmer, kan GAA en GUSB specifiek gevisualiseerd worden met ABPs, zowel *in vitro* als in lysaten van cellen die in situ behandeld zijn met de ABPs. De potentieel diagnostische waarde van het GAA ABP voor de biochemische bevestiging van de diagnose van de ziekte van Pompe is aangetoond met gekweekte huidfibroblasten van patiënten.

Hoofdstuk 5 documenteert α -L-iduronide geconfigureerde cyclophellitol aziridine ABPs voor human α -L-iduronidase, waarvan een erfelijke deficiëntie leidt tot mucopolysaccharidosis type I (MPS I, Hurler syndroom). De nieuwe ABPs blijken irreversibel te reageren op mechanism-based wijze met recombinant α -L-iduronidase (rIDUA, Aldurazyme®). De probes vertonen een relatief lage affiniteit van remming in vergelijking tot eerdere ABPs voor andere glycosidases, mogelijk vanwege conformatie beperkingen. The relatief lage affiniteit van de huidige ABP verhindert de detectie van endogeen IDUA in cellen en weefsels. Omdat met de fluorescent Cy5 ABP therapeutisch iduronidase *ex vivo* goed gelabeld kan worden, bleek het mogelijk de afvoer van dit enzym naar lysosomen van fibroblasten van MPS I patiënten goed te vervolgen. Een goede delivery naar lysosomen werd waargenomen, het beoogde doel van enzyme replacement therapy (ERT).

Hoofdstuk 6 rapporteert de biochemische evaluatie van α - en β -mannose geconfigureerde cyclophellitol aziridine ABPs voor retaining exo- α -mannosidases (Glycoside Hydrolase (GH) familie 38) en exo- β -mannosidase (GH familie 2)—enzyme geïmpliceerd in verschillende ziekten zoals kanker en LSDs. De ABPs labelen mannosidases op mechanism-based wijze en zijn micromolaire remmers. Alle vijf GH38 α -mannosidases aanwezig in homogenaten van muis-testis worden gelabeld door de α -mannose geconfigureerde ABPs. Elk van de vijf enzyme werd gelabeld in lysaten van cellen waarin het tot over-expressie was gebracht. Het unieke molecuul gewicht en pH optimum van elk mannosidase staat een simultane activity-based profiling toe in complexe biologische monsters. Die nieuwe probes kunnen van grote dienst zijn bij toekomstige screening voor small molecule inhibitors/activators van deze zeer relevante mannosidases.

β -Mannose geconfigureerde ABPs labelen het GH2 β -mannosidase (MANBA) in muis-nier extracten. Een co-labeling van GBA treedt op met de probes die voorkomen kan worden door pre-incubatie van monsters met een GBA-remmer.

Hoofdstuk 7 biedt een overzicht van de biochemische karakterisering β -galactose geconfigureerde cyclophellitol aziridine ABPs, beoogd om de lysosomale β -galactosidase (GLB1) en galactocerebrosidase (GALC) te labelen. Deficiëntie van GLB1 veroorzaakt GM1 gangliosidosis (en Morquio B syndroom) terwijl deficiëntie van GALC resulteert in de ziekte van Krabbe. De bestudeerde ABPs remmen en labelen in mechanism-based manier recombinant en endogeen GLB1 en GALC. Eveneens gelabeld worden GLB1-like proteïne 1 en 2 (GLB1L en GLB1L2), twee putatieve β -galactosidases met een grotendeels onbekende fysiologische rol. De β -glucosidases GBA en GBA2 zijn majeure off-targets van β -galactose geconfigureerde cyclophellitol aziridine ABPs. De nieuwe ABPs kunnen toekomstig fundamenteel en toegepast onderzoek aan humane β -galactosidases ondersteunen.

Dit proefschrift eindigt met een beschrijving van de voornaamste resultaten en bevindingen. Tot slot worden de huidige en toekomstige toepassingen voor cyclophellitol en cyclophellitol aziridine-based ABPs in het LSD onderzoek bediscussieerd.