

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

活性探針對糖苷水解酶在生醫研究中的應用

中文摘要

本論文主要研究能依反應機制標記溶小體糖苷水解酶(lysosomal glycosidase)的活性探針 (activity-based probes, ABPs) 之特性分析及應用。溶小體糖苷水解酶是酸性水解酶，在溶小體中裂解各種糖綴合物(glycoconjugates)。在人體中，有多種遺傳性疾病涉及這些水解酶的缺陷，而其導致的溶小體儲積症 (lysosomal storage disorder, LSD) 則會顯示在溶小體內積累了特定的未降解底物。**緒論**綜述了溶小體糖苷水解酶和相關的 LSD，以及這些 LSD 現有的治療選項和診斷方法。文中更整理了關於溶小體糖苷水解酶的生命週期及其催化機制的最新知識；對後者的知識尤其使得能固定標記溶小體糖苷水解酶的活性探針 (ABPs) 因此得以被開發及合成。目前，環殼醇(cyclophellitol)和環殼醇氮丙啶(cyclophellitol aziridine)為建構這些 ABP 的骨架。本論文闡述了在研究這些與疾病相關的水解酶上如何來多元應用這些 ABP。

第 1 章描述了利用凝膠電泳和螢光顯微鏡，在活體外或活體內用 ABP 標記溶小體糖苷水解酶(特別是 β -葡萄糖苷酶(GBA))的實驗步驟。這些環殼醇型 ABP 具有親電環氧基團和 BODIPY 螢光團，能專一及靈敏地顯示被固定標記的活性 GBA 分子。標記能在活體外(*in vitro*)進行，樣本包括酶製劑、細胞提取物、和組織提取物。而由於 ABP 的兩親性質，在細胞和生物體中來原位標記(*in situ* labeling)和檢測活性 GBA 也均可行。另外，本章 ABP 標記 GBA 的實驗步驟還可以進一步擴展到其他環殼醇和六元環多醇氮丙啶(configurational isomers of cyclophellitol aziridine)的 ABP，來標記其他不同類型的糖苷水解酶。

第 2 章使用了凝膠電泳來進行競爭活性蛋白質分析(cABPP)，研究了脫水肌醇(CBE)和環殼醇(cyclophellitol, CP)在細胞和動物體內的目標接合作用。CBE 和 CP 是 GBA 依反應機制型的不可逆抑制劑，已被用於在細胞和動物中產生高雪氏症(Gaucher disease, GD)疾病模型。根據施用的劑量和持續時間，這兩種抑制劑在活體內(*in vivo*)則可能有 GBA 以外的糖苷水解酶接合物。對於這些可能的額外接合物，一系列的 ABP 已被開發，並能被用於研究這些酶與 CBE 和 CP 的潛在交互作用。本研究顯示，在對被施以 CBE 的細胞和斑馬魚幼蟲中，較高濃度的 CBE 在體內還會與非溶小體葡糖神經酰胺酶(GBA2)和溶小體 α -葡萄糖苷酶(GAA)交互作用。在小鼠腦中，CBE 對

於 GBA 則有窄小但卻足夠的選擇性抑制窗口。另一方面，本研究還發現 CP 對於 GBA 和 GBA2 的親和力相同，因此其不適合用於產生真正的 GD 相關疾病模型。

第 3 章介紹了對於 GBA 的新型不可逆抑制劑；其對 GBA 的選擇性優異。這類抑制劑在 8 號碳帶有大體積的疏水取代基，包括金剛烷基(adamantyl)和聯苯基(biphenyl)。藉由凝膠電泳 cABPP 實驗，新化合物顯示了與 CBE 相比，其在活體外、培養細胞、和斑馬魚幼蟲中均是更有效和更有選擇性的 GBA 不可逆抑制劑。本研究並發現通過食物攝取，具有金剛烷基的新型抑制劑可滲透至斑馬魚腦部，而這允許了其被用於斑馬魚中產生真正的神經性 GD 疾病模型。

在 LSD 研究中，詳細的生物化學特性分析是來如何最佳應用新型糖苷水解酶 ABP 的關鍵。這些分析包括了 ABP 的作用機制，抑制動力學，活體外和活體內效力，以及非目標糖苷水解酶的鑑定。

第 4 章描述了對新開發的、針對溶小體糖苷水解酶 α -葡萄糖苷酶 (GAA) 和 β -葡萄糖醛酸酶 (GUSB) 的 ABP 的特性分析。這兩種水解酶分別在龐貝氏症(Pome disease) 和粘多糖貯積症第七型 (MPSVII；史萊式症(Sly syndrome)) 中缺陷。本研究發現這些 ABP 能依酶反應機制來有效地標記它們各自的目標酶 (GAA 和 GUSB)。而 α -葡萄糖構型的 ABP 不僅標記了溶小體 α -葡糖苷酶 GAA，還標記了內質網 α -葡糖苷酶 II (GANAB)。觀察顯示，在較高濃度下，兩種 ABP 的主要非目標酶為 GBA。而通過改變標記時的酸鹼值，和通過使用特定 GBA 抑制劑來預先混入樣品，相應的 ABP 則可用於活體外(包括用 ABP 原位標記的細胞之裂解液)來選擇性地檢測 GAA 和 GUSB。另外，利用體外培養的患者纖維母細胞(fibroblasts)，針對 GAA 的 ABP 顯示了其對龐貝氏症有診斷潛力。

第 5 章詳載了 α -L-艾杜糖苷構型之六元環多醇氮丙啶 ABP 的開發和特性分析。此類 ABP 為針對人類 α -L-艾杜糖醛酸酶而開發，而此酶的遺傳缺陷能導致粘多糖貯積症第一型 (MPS I，賀勒式症(Hurler syndrome))。此新類的 ABP 顯示它們能依酶反應機制與人類重組 α -L-艾杜糖醛酸酶 (rIDUA, Aldurazyme®艾德酶) 固定接合。不過與先前為其他保留型糖苷水解酶設計的 ABP 相比，它們表現出較低的效力和更慢的抑制動力學——而構象限制為可能的原因。本類 ABP 的相對低親和力使得檢測細胞和組織中的內源性艾杜糖醛酸酶具有挑戰性。不過 Cy5 螢光的 ABP 則可以有效地被用於離體標記用於治療用途的艾杜糖醛酸酶。通過螢光顯微鏡，於 MPS I 患者纖維母細胞中這些酶被成功的監測到被遞送至溶小體——正如酶替代療法 (ERT) 中所期盼的。

第 6 章介紹了 α -和 β -甘露糖構型的六元環多醇氮丙啶 ABP 對保留型外切- α -甘露糖苷酶(糖苷水解酶(GH)家族 38)和外切- β -甘露糖苷酶(GH 家族 2)的生化分析。這些酶與不同的疾病相關,包括癌症和 LSD。而甘露糖構型的 ABP 則顯示能以依酶反應機制的方式標記它們各自的目標甘露糖苷酶,並且是微摩爾抑制劑。於小鼠睪丸勻漿中, α -甘露糖構型的 ABP 標記了所有五種 GH38 α -甘露糖苷酶。在過表達時,每種酶在細胞裂解液中也均被此類 ABP 標記。而在復雜的生物樣品中,每種甘露糖苷酶的獨特分子量和最適酸鹼值則允許了它們能同時被進行活性表達譜分析(ABPP)。此結果應有助於將來篩選針對這些和生理及疾病高度相關的酶之小分子抑制劑/活化劑。

β -甘露糖構型的 ABP 則標記了小鼠腎提取物中的 GH2 β -甘露糖苷酶(MANBA)。通過用 GBA 抑制劑預先混入樣品,則可被避免 GBA 被此 ABP 共標記。

第 7 章提供了對 β -半乳糖構型的六元環多醇氮丙啶 ABP 的生化特性分析,這些 ABP 旨在用於標記溶酶體 β -半乳糖苷酶(GLB1)和半乳糖腦苷脂酶(GALC)。GLB1 的缺陷能導致 GM1 神經節苷脂儲積症(和莫奎歐氏症(Morquio syndrome)B 型),而 GALC 缺陷導致克拉伯病(Krabbe Disease)。據檢測,這些 ABP 是以依酶反應機制的方式抑制和標記重組或內源性的 GLB1 和 GALC。另外,這些 ABP 也同時標記了 GLB1 樣蛋白 1 和 2(GLB1L 和 GLB1L2)。這兩者目前均為假定的 β -半乳糖苷酶,而對其生理作用目前則所知甚少。 β -葡萄糖苷酶 GBA 和 GBA2 是 β -半乳糖構型的六元環多醇氮丙啶 ABP 的主要非目標物。這些新的 ABP 可協助未來對人類 β -半乳糖苷酶的基礎和應用研究。

最後,本論文於**討論**部分總結了最重要的發現,並著重探討了在 LSD 研究中帶有環殼醇和六元環多醇氮丙啶結構的 ABP 當前及未來的應用。

APPENDICES