



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Discovery and characterization of new glucosylated metabolites: pathophysiological consequences

Meijer, H.N.J.

Citation

Meijer, H. N. J. (2023, November 2). *Discovery and characterization of new glucosylated metabolites: pathophysiological consequences*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3655909>

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/1887/3655909>

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

Samenvatting

In deze thesis staat het ontdekken en onderzoeken van transglycosylering van sterolen centraal. Allereerst, ligt de onderzoeksfocus op de ontwikkeling van een methode waarmee accuraat geglycosyleerde metabolieten gedetecteerd en gekwantificeerd kunnen worden, in biologisch materiaal. Vervolgens, wordt er geconcentreerd op het bestuderen van de formatie en aanwezigheid van specifieke geglycosyleerde metabolieten, in het speciaal glucosyl-desmosterol (GlcDesm), glucosyl-7-dehydrocholesterol (Glc7DHC) en geglycosyleerd vitamin D₃ (GlcD₃).

Hoofdstuk 1 introduceert lysosomen en lysosomale ziekten. Speciale aandacht wordt geschonken aan de lysosomale β -glucosidase genaamd glucocerebrosidase (GBA). Een overerfbare deficiëntie in dit enzym is oorzaak van de ziekte van Gaucher, een relatieve veel voorkomende lysosomale stapelingsziekte, gekarakteriseerd door de stapeling van glucosylceramide, de meest eenvoudige glycosphingolipide. De eigenschappen van GBA worden beschreven, met nadruk op de katalytische functie. Naast hydrolyse, is het enzym in staat om onder speciale omstandigheden te transglycosyleren, d.w.z., overdracht van glucose van een substraat naar een sterol acceptor zoals cholesterol. Geglycosyleerd cholesterol, alom vertegenwoordigd in weefsels, wordt op deze manier gevormd. Vervolgens, worden twee andere cellulaire β -glucosidases, de membraan-geassocieerde nonlysosomale glucosylceramidase (GBA2) en de breed-specifieke cytosolische β -glucosidase (GBA3) geïntroduceerd, en hun rol in glycolipide metabolisme wordt bediscussieerd. Het introducerende hoofdstuk sluit af met een discussie over de fysiologische relevantie van transglycosylatie en het mogelijke bestaan van additionele acceptoren voor transglycosylatie. Hierbij wordt aandacht geschonken aan andere sterolen naast cholesterol.

Hoofdstuk 2 beschrijft de ontwikkeling van een (sensitieve) LC-MS/MS methode voor het kwantificeren van geglycosyleerde metabolieten in natuurlijke materialen zoals cel- en weefsel extracten en plasma. Hierbij wordt aandacht geschonken aan de optimalisatie van de extractie procedure en de LC-MS/MS detectie. Voor de accurate en sensitieve kwantificatie van de geglycosyleerde metabolieten is gebruik gemaakt van gesynthetiseerde ¹³C-gelabelde standaarden. De aandacht is hier gefocust op GlcChol, GlcDesm (geglycosyleerd desmosterol) en Glc7DHC (geglycosyleerd-7-dehydrocholesteol). Deze studie heeft geleid tot een bruikbare en gevoelige methode voor het kwantificeren van GlcChol, GlcDesm en Glc7DHC in biologisch materiaal.

De geglycosyleerde lipiden werden geëxtraheerd met behulp van twee opeenvolgende extractie methodes, Bligh and Dyer gevolgd door een butanol/water extractie vooraf aan de analyse met LC-MS/MS. Dit hoofdstuk focust op LC-MS/MS methode ontwikkeling, beginnend met bediscussie van lineariteit van de calibratie curve, samen met de corresponderende limiet van detectie

(LVD), limiet van kwantificatie (LVK) en de signaal-ruis ratio (S/R). Gevolgd door massa spectrometrische analyse, fragmentatie en elutie spectrums van de lipiden van interesse. Tevens, intra/inter assay variatie en carryover van de lipiden is onderzocht. Vervolgens, is de opslag van geglycosyleerde lipiden in biologische material (huid, plasma, borstvoeding) gecontroleerd. Onzuiverheden in de lipidestandaarden zijn ook onderzocht. Als laatste, wordt de detectie van de geglycosyleerde lipiden in biologische monsters getoond.

Hoofdstuk 3 rapporteert de vorming, degradatie en aanwezigheid van GlcDesm, een metabool sterk lijkend op GlcChol welke daadwerkelijk een vergelijkbare modificatie ondergaat met glucose. De studie onthult de *in vitro* vorming en degradatie van GlcDesm door GBA en GBA2 vanuit een β -glucoside donor en desmosterol. Bovendien, de natuurlijke aanwezigheid van GlcDesm in humane milt werd gedemonstreerd. Patiënten met de ziekte van Gaucher deficiënt in GBA, laten verhoogde waarden van GlcDesm. Gegeven de overeenkomst tussen desmosterol en cholesterol, is de transglycosylering van eerstgenoemde metabool niet onverwacht. Aan de hand van de bevindingen kan er geconcludeerd worden dat GBA een belangrijke rol speelt in lysosomale afbraak van GlcDesm en dat de synthese bemiddeld wordt door GBA2.

Hoofdstuk 4 rapporteert het onderzoek naar glycosylering van 7-dehydrocholesterol (7DHC) en zijn metabool vitamine D₃. De vorming, degradatie en natuurlijke aanwezigheid van de geglycosyleerde metabolieten Glc7DHC en GlcD₃ werd bestudeerd. *In vitro* vorming van Glc7DHC door GBA en GBA2 werd geobserveerd. Degradatie werd alleen gedetecteerd voor Glc7DHC door GBA. De natuurlijke aanwezigheid van Glc7DHC in milt en huid werd waargenomen. In het geval van GlcD₃ werd vorming door GBA en GBA2 ook gedemonstreerd. Bijkomend werd de omzetting van Glc7DHC in GlcD₃ onder invloed van UVB straling waargenomen.

Hoofdstuk 5 beschouwd het vermogen van de breed-specifieke β -glucosidase (GBA3) om te hydrolyseren en transglycosyleren. Onderzoeken naar GBA3-gemedieerde vorming van GlcChol evenals degradatie van GlcChol, Glc7DHC, GlcD₃ en GlcDesm waren negatief. Een krachtige conclusie dat GBA3 niet actief is jegens de bestudeerde metabolieten moet met verdere experimenten met zuivere recombinante GBA3 in hogere hoeveelheden waargemaakt worden.

Hoofdstuk 6 voorziet in een algemene discussie over het werk in deze thesis en een toekomst visie. Het bespreekt de verkenning naar aanvullende metabolieten die onderworpen kunnen worden aan transglycosylatie, met de focus op afgeleiden van cholesterol, zoals oxysterolen, steroid hormonen en galzuren. Vervolgens, een mogelijke biologische functie en pathofysiologische relevantie van de geglycosyleerde metabolieten en afwijkingen in acceptoren wordt bespreekt. Toekomstig onderzoek betreft ongerichte ontdekking van

geglycosyleerde metaboliëten, door gebruik te maken van een zogenoemde ‘transbody’ (een gemodificeerde glucose donor) en de vorming en aanwezigheid van gexylosyleerde metaboliëten. Concluderend, het werk gepresenteert in deze thesis beschrijft verscheidene nieuw richtingen voor potentieel onderzoek.

Addendum I is een gepubliceerd artikel over voormalig werk over transglucosylering van GlcChol in zoogdieren [1]. Het artikel rapporteert over de vorming en afbraak van GlcChol door GBA en GBA2. Het gepresenteerde werk in deze publicatie initieert het onderzoek in deze thesis.

Addendum II bevat een gepubliceerd artikel over de capaciteit van GBA om te transxylosyleren, vorming xylosyl-cholesterol [2]. Dit werk spoort aan tot het onderzoeken van de vorming en afbraak van gexylosyleerde metaboliëten, zoals xylosyl-desmosterol, xylosyl-7-dehydrocholesterol of xylosyl-vitamin D₃.

Bronnen

1. Marques, A.R., Mirzaian, M., Akiyama, H., et al., *Glucosylated cholesterol in mammalian cells and tissues: formation and degradation by multiple cellular beta-glucosidases*. J Lipid Res, 2016.
2. Boer, D.E., et al., *Human glucocerebrosidase mediates formation of xylosyl-cholesterol by β -xylosidase and transxylosidase reactions*. J Lipid Res, 2021. **62**: p. 100018.