



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Chemical biology studies on retaining α -glucosidases

Su, Q.

Citation

Su, Q. (2024, November 6). *Chemical biology studies on retaining α -glucosidases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4107652>

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/1887/4107652>

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

Chemisch-biologische studies aan retaining exo- β -glucosidases

Dit proefschrift beschrijft chemisch-biologisch onderzoek aan retaining exo- β -glucosidases met behulp van activiteit-gebaseerde probes (ABP's). Retaining exo- β -glucosidases zijn enzymen die in organismen voorkomen en de hydrolyse van β -glucosides katalyseren: ze spelen een belangrijke rol in zowel gezondheid als ziekte. In menselijke cellen zijn drie β -glucosidases geïdentificeerd: lysosomale zure β -glucosidase GBA1 (ook bekend als glucosylceramidase, GCase), niet-lysosomale β -glucosidase GBA2, en cytosolische β -glucosidase GBA3. De eerste twee enzymen zijn betrokken bij de afbraak van glucosylceramide (GlcCer, ook wel glucocerebroside genoemd). Reduced glucosylceramide metabolisme is geassocieerd met de ziekte van Gaucher (GD), een lysosomale stapelingsziekte die het gevolg is van mutaties in het GBA1-gen die leiden tot enzym-deficiëntie. GD-patiënten vertonen doorgaans klinische symptomen als hepatosplenomegalie, en skelet-manifestaties, en in ernstige gevallen ook klachten in het centrale zenuwstelsel, als gevolg van de ophoping van glucosylceramide. Bovendien worden mutaties in GBA1 herkend als veelvoorkomende genetische risicofactor voor de ziekte van Parkinson. De rol van GBA2 en GBA3 in GD en hun functies in het menselijk metabolisme zijn nog niet volledig begrepen. Activiteitsgebaseerde eiwitprofieling (ABPP), een sleuteltechniek in de moderne chemische biologie, maakt gebruik van ABP's om de actieve doeleiwitten in complexe biologische monsters te detecteren. Op dit moment is een reeks ABP's specifiek voor glycosidases ontwikkeld, inclusief probes die gericht zijn tegen retaining exo- β -glucosidases.

Hoofdstuk 1 biedt een overzicht van de menselijke retaining exo- β -glucosidases, als ook fundamentele informatie over ABP's die selectief β -glucosidases kunnen labelen. Beschreven worden de biologische functies van β -glucosidases, ebeknopt de ziekte van Gaucher, het mechanisme van hydrolyse van β -glucosides, en de ontwikkeling en toepassing van β -glucosidase ABP's. Eerder onderzoek heeft geleid tot de ontwikkeling van ABP's die in staat zijn β -glucosidases selectief te labelen, waarbij cyclophellitol wordt gebruikt als een scaffold, een krachtige en actieve GBA1- en GBA2-remmer. Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling van nieuwe ABP's voor het selectief labelen van retaining β -glucosidases en de toepassing van bestaande ABP's en remmers in chemisch-biologische studies aan menselijke retaining exo- β -glucosidases en hun homologe enzymen in andere soorten.

Hoofdstuk 2 beschrijft het gebruik van ABPP en het fluorescente substraat 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside om de activiteit en selectiviteit van β -D-xyloside verbindingen tegen menselijke retaining exo- β -glucosidases te onderzoeken. Eerdere studies wezen uit dat menselijk GBA1 chemische modificaties aan de C8-positie van cyclophellitol kan accommoderen, terwijl GBA2 dat niet kan. Bijvoorbeeld, een cyclophellitol met C8-verwijdering (bv. conduritol B epoxide, CBE) heeft een lagere affiniteit voor GBA2 dan voor GBA1. In vergelijking met cyclophellitol missen β -D-xyloside verbindingen de hydroxymethyl-zijketen op de C8-positie, waarvan werd verondersteld dat deze selectief voor GBA1 was. Hoofdstuk 2 bevestigt dat β -D-xyloside epoxide inderdaad meer selectief is voor GBA1 dan voor andere menselijke β -glucosidases (GBA2 en GBA3). β -D-xyloside aziridines vertonen ook selectiviteit voor GBA1. Echter, vergeleken met β -D-xyloside, vertonen β -D-xyloside aziridines een kleinere GBA1 selectiviteitsvenster vanwege hun betere affiniteit voor GBA2. β -D-xyloside aziridine ABP's kunnen breed menselijke β -glucosidases labelen (GBA1, GBA2, en GBA3), vergelijkbaar met cyclophellitol aziridine ABP's. Bovendien toonde lipide analyse van zebrafishlarven die met β -D-xyloside verbindingen werden behandeld verhoogde niveaus van glucosylsphingosine (GlcSph), een biomarker die kenmerkend is voor een GD-model veroorzaakt door GBA1-deficiëntie.

Hoofdstuk 3 onderzoekt de activiteit en selectiviteit van β -D-arabinofuranose-geconfigureerde aziridineverbindingen op menselijke retaining exo- β -glucosidases, in het bijzonder GBA2. De rol van GBA2 in de ziekte van Gaucher (GD) vereist verder onderzoek. Defecten in het GBA2-gen in verband gebracht met erfelijke spastische paraplegie. Anderzijds, remming van GBA2 activiteit is gemeld om symptomen te verlichten bij patiënten met type 1 GD en de ziekte van Niemann-Pick C (NPC), wat GBA2

tot een potentieel therapeutisch doelwit maakt. Voorafgaand aan het onderzoek dat in dit hoofdstuk wordt gepresenteerd, waren er geen covalente GBA2-selectieve remmers of ABP's geïdentificeerd. Dit hoofdstuk rapporteert de ontdekking van β -D-arabinofuranose aziridine ABP's die een goede selectiviteit vertonen voor GBA2, met lagere schijnbare IC₅₀-waarden voor GBA2 vergeleken met GBA1 en GBA3. Verdere ABPP-experimenten bevestigden de selectiviteit van β -D-arabinofuranose aziridine ABP's voor GBA2. Deze ABP's labelen GBA2 selectief, zowel *in vitro* als *in situ*, waarbij fluorescentiemicroscopie het selectieve labelen van GBA2 to overexpressie gebracht in cellen bevestigt. Een kristalstructuur studie toonde aan dat β -D-arabinofuranose aziridineverbindingen covalent binden aan een bacteriële GBA2-homoloog enzym met een vergelijkbaar actief centrum als dat van menselijk GBA2. Competitieve ABPP toonde aan dat de β -D-arabinofuranose aziridine ABP's GBA2 onomkeerbaar labelen. Bovendien blijken β -D-arabinofuranose aziridine ABP's selectief voor GBA2-homologen in zebravissen en muizen. De bevindingen in dit hoofdstuk wijzen op het potentieel van β -D-arabinofuranose aziridine scaffold voor de ontwikkeling van nieuwe GBA2-selectieve covalente remmers en ABP's.

Hoofdstuk 4 beschrijft een verkenning van fluorescente substraten en ABP's die door GBA3 gehydrolyseerd kunnen worden. GBA3 was eerder bekend tot hydrolyse van verschillende glycosidesubstraten (bijvoorbeeld β -D-glucosides, β -D-galactosides en α -L-arabinosides) en waargenomen was dat het gelabeld werd door cyclophellitol aziridine ABP's. De rol van GBA3 in het menselijke metabolisme blijft echter onduidelijk, en er waren voor deze studie geen fluorescente substraten of ABP's bekend die specifiek aan GBA3 konden binden. Dit hoofdstuk evalueert verschillende 4-methylumbelliferyl glycoside fluorescente substraten en ABP's voor hun activiteit tegen β -glucosidases. De studie leerde dat β -D-fucoside en α -L-arabinopyranoside substraten relatiefselectief worden gehydrolyseerd door GBA3 enzym vergeleken met andere retaining exo- β -glucosidases. Deze substraten kunnen echter ook worden gehydrolyseerd door andere enzymen (mogelijk β -D-galactosidases), wat hun toepassing voor selectieve GBA3-activiteitsdetectie beperkt. Daarnaast werden twee ABP's met relatief hoge selectiviteit voor GBA3 geïdentificeerd: α -L-arabinopyranoside aziridine ABP's en β -D-galactoside ABP's, die *in vitro* een grotere selectiviteit vertoonden voor GBA3 ten opzichte van andere β -glucosidases (GBA1, GBA2). Deze ABP's labelen echter ook β -galactosidases, waardoor ze geen ideale GBA3-selectieve ABP's zijn.

Hoofdstuk 5 onderzoekt β -glucosidases in het organisme *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), dat vaak wordt gebruikt in biologisch onderzoek aan koolhydraat- en lipide metabolisme dat vrij overeenkomstig is met zoogdieren. Door sequentie-alignment met menselijke β -glucosidases werden verschillende potentiële β -glucosidase-kandidaten in *C. elegans* geïdentificeerd. Onderzoek toonde aan dat *C. elegans*-homogenaten in staat zijn 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside-substraat en een kunstmatig GlcCer-analoog, C12-NBD-GlcCer, te hydrolyseren. Bovendien labelden de ontwikkelde β -glucosidase ABP's eiwitten binnen de homogenaten van *C. elegans*. Proteomics analyse gebruik makend van pull-down-experimenten met biotine-gelabelde ABP's voor pull-down-experimenten resulteerde in aanzienlijke verrijking van twee β -glucosidase-kandidaten uit de homogenaten van *C. elegans*. Deze β -glucosidase-kandidaten vertoonden kenmerken vergelijkbaar met respectievelijk menselijke GBA1 of GBA2, zoals binding aan specifieke remmers of ABP's en het hebben van vergelijkbare optimale pH-waarden, wat suggereert dat ze homoloog kunnen zijn aan het menselijke GBA1 en GBA2.

Hoofdstuk 6 onderzoekt een β -glucosidasekandidaat-eiwit (B56) dat in tabak werd geïdentificeerd. Eerdere studies hebben aangetoond dat B56 interactie vertoonde met een GBA1-selectieve ABP en verrijkt werd in pull-down assays met biotine-gelabelde β -glucosidase ABP's. In dit hoofdstuk werd B56 tot expressie gebracht in menselijke embryonale nier (HEK293T) cellen, waarin de endogene β -glucosidases waren uitgeschakeld, om de karakterisering ervan te onderzoeken. B56 vertoont verschillende overeenkomsten met menselijke GBA1, waaronder een zure optimale pH voor activiteit,

het vermogen om 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside en 4-methylumbelliferyl- β -D-xylopyranoside te hydrolyseren, de binding van GBA1-selectieve ABP's en remmers, en de aanwezigheid van high-mannose N-glycanen. Fluorescentiemicroscopie toonde dat de subcellulaire locatie van B56 sterk overlapt met lysosomale geassocieerd membraanewit 1 (LIMP-1), wat wijst op een primaire locatie in lysosomen. B56 verschilt echter ook van menselijke GBA1 op verschillende punten, zoals een hogere thermische stabiliteit bij 60°C en een verminderde enzymactiviteit in de aanwezigheid van bepaalde toevoegingen. Het meest opmerkelijke is dat de experimentele gegevens in dit hoofdstuk aangeven dat B56 in HEK293T-cellen, glucosylceramide niet afbreekt zoals menselijke GBA1 doet en dus niet functioneel kan substitueren voor menselijke GBA1.

Hoofdstuk 7 biedt een samenvatting van de onderzoeksresultaten, bespreekt de vragen die zijn opgeworpen en beschrijft de vooruitzichten voor toekomstig gerelateerd onderzoek.

Deze dissertatie beschrijft de ontdekking van nieuwe tools voor β -glucosidase onderzoek, waaronder activiteit-gebaseerde probes (ABP's) en remmers, en de gerelateerde chemisch-biologische methoden die zijn gebruikt voor de identificatie en karakterisering van retaining β -glucosidases met behulp van deze bestaande ABP's en remmers. Het werk dat in deze dissertatie wordt gepresenteerd biedt nieuwe tools voor de studie van β -glucosidases en verkent potentiële homologe enzymen in andere soorten, waardoor nieuwe inzichten worden geboden voor onderzoek op het gebied van retaining β -glucosidases.