



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Chemical biology studies on retaining $\alpha$ -glucosidases

Su, Q.

### Citation

Su, Q. (2024, November 6). *Chemical biology studies on retaining  $\alpha$ -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).

## (Summary in Chinese 中文总结)

保留型外切- $\beta$ -葡萄糖苷酶的化学生物学研究

本论文主要描述了应用活性分子探针 (activity-based probes, ABPs) 对保留型外切- $\beta$ -葡萄糖苷酶(retaining exo- $\beta$ -glucosidases)进行的化学生物学研究。保留型外切- $\beta$ -葡萄糖苷酶是一类普遍存在于生物体中的可用于催化 $\beta$ -葡萄糖苷水解的酶, 在健康和疾病中都扮演着重要角色。人体细胞中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶主要有三种: 溶酶体 (lysosomal) 酸性 $\beta$ -葡萄糖苷酶 GBA1 (又称葡萄糖神经酰胺酶 glucosylceramidase, GCase), 非溶酶体 (non-lysosomal)  $\beta$ -葡萄糖苷酶 GBA2, 和胞质 (cytosolic)  $\beta$ -葡萄糖苷酶 GBA3。这三种酶均能降解葡萄糖神经酰胺 (glucosylceramide, GlcCer, 又称葡萄糖脑苷脂 glucocerebroside)。葡萄糖神经酰胺的代谢异常与戈谢病 (Gaucher Disease, GD) 相关。戈谢病, 是基因突变造成的 GBA1 酶缺陷所致的一种遗传性溶酶体贮积症 (lysosome storage disorder), 患者因体内葡萄糖神经酰胺降解障碍并导致其大量异常贮积, 从而出现肝脾肿大, 骨骼受侵及中枢神经系统受累等临床症状。另据报道, GBA1 的基因变异也属于常见的帕金森病 (Parkinson disease) 的遗传危险因素。而目前, 除 GBA1 外, GBA2 和 GBA3 在戈谢病中的作用与影响以及它们在人体代谢中所扮演的角色尚未完全探明。活性蛋白表达谱 (activity-based protein profiling, ABPP), 即应用活性分子探针对复杂生物样品中的靶标蛋白进行活性检测, 是化学生物学研究中的一种重要技术手段。经过不断的发展, 一系列用于特异性标记糖苷酶 (包括保留型外切 $\beta$ -葡萄糖苷酶) 的 ABPs 已得到了开发。

在本论文中, 第 1 章简要介绍了人体保留型外切- $\beta$ -葡萄糖苷酶, 以及能特异性标记  $\beta$ -葡萄糖苷酶的 ABPs 的基本信息。主要包括:  $\beta$ -葡萄糖苷酶的生物学功能、戈谢病的概况、 $\beta$ -葡萄糖苷的水解机制以及 $\beta$ -葡萄糖苷酶 ABPs 的设计和应用。在本论文之前, 以能与 $\beta$ -葡萄糖苷酶高效且特异性结合的活性分子六元环多醇 cyclophellitol 为骨架, 已经开发出了能够选择性标记 $\beta$ -葡萄糖苷酶的 ABPs。本论文描述了关于新型选择性标记保留型 $\beta$ -葡萄糖苷酶 ABPs 的研究开发工作, 以及利用已有的工具化合物 (ABPs 及抑制剂) 对人体中保留型外切 $\beta$ -葡萄糖苷酶以及它们在其他物种中的同源基因酶所进行的化学生物学研究。

第 2 章介绍了利用 ABPP 及 4-甲基伞形酮- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) 荧光底物揭示  $\beta$ -D-木糖类化合物对人体保留型外切  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性和选择性的工作。早期有研究报道了人体 GBA1 可以适应 cyclophellitol 碳 8 位的化学结构修饰, 而 GBA2 则无法兼容在该位的修饰, 故 cyclophellitol 8 位碳的移除 (比如 conduritol B epoxide, CBE 结构) 会导致其对 GBA2 亲和作用的显著降低。与 cyclophellitol 相比,  $\beta$ -D-木糖型化合物缺失了位于碳 8 位 (或吡喃葡萄糖编号中的 碳 6 位) 的羟甲基支链, 因此被假定为具有 GBA1 选择性的化合物。本章的研究证实了 $\beta$ -D-木糖类环氧化合物的确对 GBA1 显示出相对于其他人体 $\beta$ -葡萄糖苷酶 (GBA2 和 GBA3) 更高的选择性。 $\beta$ -D-木糖类氮丙啶 (aziridine) 化合物对 GBA1 也有较好的选择性, 但相对 $\beta$ -D-木糖类环氧化合物而言, 因其同时对 GBA2 也表现出相对较好的亲和性, 所以显示了相对更小的 GBA1 选择性窗口。 $\beta$ -D-木糖类氮丙啶 ABPs 可以如 cyclophellitol 氮丙啶 ABPs 一样广泛地标记人体的 $\beta$ -葡萄糖苷酶 (GBA1, GBA2 及 GBA3)。此外, 当将斑马鱼幼苗置于包含 $\beta$ -D-木糖类化合物 (GBA1 选择性抑制剂) 的环境中生长约五天后, 通过 LC-MS 对斑马鱼幼苗中的脂质组分进行定量分析, 结果表明 $\beta$ -D-木糖类化合物处理后的斑马鱼幼苗显示出与 GBA1 缺陷导致的戈谢病模型相似的特征性的葡萄糖基鞘氨醇 (glucosyl sphingosine, GlcSph) 浓度水平上升。

第 3 章研究了 $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖氮丙啶( $\beta$ -D-arabinofuranose-configured aziridine)化合物对人体保留型外切 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性和选择性。GBA2 在戈谢病中所起的作用尚未完全清楚。GBA2 的基因缺陷与遗传性痉挛截瘫 (小脑共济失调) 疾病相关。另有报道表明 GBA2 的抑制可

能有助于改善戈谢病 I 型和 Niemann-Pick C (NPC) 病人的临床症状。因此, GBA2 为这些疾病潜在的治疗靶点。在本章之前, 尚未发现能选择性地与 GBA2 相互作用的共价抑制剂和 ABPs。本章研究发现了 $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖氮丙啶 ABPs 具有较为明显的 GBA2 选择性, 它们对 GBA2 显示出相对于 GBA1 及 GBA3 更低的表现半数抑制浓度 (apparent  $IC_{50}$ )。后续通过 ABPP 进一步验证了 $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖氮丙啶 ABPs 对于 GBA2 的选择性。 $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖类氮丙啶 ABPs 可以在体外 (*in vitro*) 以及细胞原位 (*in situ*) 选择性地标记 GBA2, 并且荧光显微镜检测结果表明其还可以灵敏且特异性地标记细胞内过表达的 GBA2。三维晶体结构分析表明,  $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖氮丙啶化合物通过和 cyclophellitol 相似的结合模型, 与来源于细菌的具有和 GBA2 活性位点相似的同源酶 (TxGH116) 进行共价结合。竞争性 ABPP 也证明了 $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖氮丙啶 ABPs 不可逆地标记 GBA2。另外,  $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖类氮丙啶 ABPs 对于斑马鱼和小鼠中的 GBA2 同源基因酶也表现出了相应的 GBA2 选择性。因此, 本章所发现的 $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖氮丙啶结构有望用于开发更多新的 GBA2 选择性共价抑制剂及 ABPs。

**第 4 章**介绍了可被 GBA3 水解的 4-甲基伞形酮糖苷底物以及可以标记人体 GBA3 的 ABPs。GBA3 早前被报道可催化多种糖苷底物的水解 (如  $\beta$ -D-葡萄糖苷、 $\beta$ -D-半乳糖苷、 $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷类底物等), 且可以被如 cyclophellitol 氮丙啶 ABPs (为广泛的保留型外切  $\beta$ -葡萄糖苷酶 ABPs) 所标记。目前 GBA3 在人体代谢中所起的作用仍未完全探明, 且能够选择性检测 GBA3 酶活性的荧光底物以及选择性标记 GBA3 的 ABPs 尚未得到报道。为了寻找潜在的具有 GBA3 选择性的 4-甲基伞形酮糖苷荧光底物以及 ABPs, 本章评估了几种 4-甲基伞形酮糖苷荧光底物以及 ABPs 对于  $\beta$ -葡萄糖苷酶的活性。研究发现 $\beta$ -D-岩藻糖苷 (fucoside) 以及 $\alpha$ -L-阿拉伯吡喃糖苷 (arabinopyranoside) 类底物在保留型外切  $\beta$ -葡萄糖苷酶中只能被 GBA3 水解, 但由于这两种荧光底物的糖苷键也可以被另外的酶 (推测为 $\beta$ -D-半乳糖酶) 水解, 故不是理想的选择性检测 GBA3 酶活性的荧光底物。另外, 本章还介绍了两种对于 GBA3 具有相对较好选择性的 ABPs, 即 $\alpha$ -L-阿拉伯吡喃糖类氮丙啶 ABPs 和 $\beta$ -D-半乳糖类 ABPs。他们能够在体外以优于其他  $\beta$ -葡萄糖苷酶 (GBA1, GBA2) 的选择性对 GBA3 进行标记, 其中  $\beta$ -D-半乳糖类环氧化物 ABPs 可以在细胞原位标记实验中保持其 GBA3 的选择性, 然而它们也同时标记  $\beta$ -半乳糖苷酶, 因此不是理想的 GBA3 选择性 ABPs。

**第 5 章**研究了秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中存在的 $\beta$ -葡萄糖苷酶。秀丽隐杆线虫是生物学研究中常用的生物模型, 该线虫具有与哺乳动物相似的碳水化合物和脂质代谢途径。与人体 $\beta$ -葡萄糖神经酰胺酶进行的氨基酸序列比对揭示了几种秀丽隐杆线虫中可能的 $\beta$ -葡萄糖苷酶候选蛋白。目前有关线虫中 $\beta$ -葡萄糖苷酶的信息仍然有限, 因此将秀丽隐杆线虫作为 $\beta$ -葡萄糖苷酶研究模型的可能性仍需进行更多验证。在本章实验中, 发现线虫匀浆可以使 4-甲基伞形酮 $\beta$ -葡萄糖苷底物以及人工合成的 GlcCer 类似物 C12-NBD-GlcCer 水解, 且已有的 $\beta$ -葡萄糖苷酶 ABPs 通过 ABPP 标记出了线虫体内的一些可相互作用的蛋白, 表明了线虫中存在 $\beta$ -葡萄糖苷酶。蛋白组学 (Proteomics) 使用带有生物素 (biotin) 标记的 ABPs 进行钓靶 (Pull-down) 实验, 从线虫匀浆中显著富集到了两种 $\beta$ -葡萄糖苷酶候选蛋白。这两种 $\beta$ -葡萄糖苷酶分别表现出了与人体 GBA1 或 GBA2 相似的特征, 如可与特定选择性抑制剂或 ABPs 结合, 具有相近的最适 pH 值等。因此, 它们或许分别为秀丽隐杆线虫中的 GBA1 和 GBA2 同源基因酶。

**第 6 章**介绍了烟草中的一种 $\beta$ -葡萄糖苷酶候选蛋白 (B56)。之前有研究发现 B56 可以与 GBA1 选择性 ABPs 发生反应, 并且可以被带有生物素标记的  $\beta$ -葡萄糖苷酶 ABPs 通过钓靶实验富集。本章中, B56 被表达在人体胚胎肾细胞 (HEK293T) 中 (细胞中的人源 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因已被提前敲除) 用于表征实验。表达于 HEK293T 细胞中的 B56 与人体 GBA1 有许多相似之处。B56 拥有酸性的最佳活性 pH 值, 可以如人体 GBA1 一样水解 4-甲基伞形酮- $\beta$ -D-葡萄糖苷和 4-甲基伞形酮- $\beta$ -D-木糖苷, B56 可与 GBA1 选择性 ABPs 和抑制剂高效结合, 并且 B56 同样含有高甘

露糖型 N-聚糖。荧光显微镜检测显示 B56 与位于溶酶体的溶酶体相关膜蛋白 1 (LIMP-1) 的细胞内分布位置高度重合, 表明 B56 蛋白主要表达于细胞中的溶酶体。然而, B56 也在某些方面与人体 GBA1 不同, 比如 B56 可耐受 60°C 高温以及它的活性会受添加剂影响而降低, 最重要的不同之处在于: 目前的实验结果表明表达于 HEK293T 细胞内的 B56 无法像人体 GBA1 一样降解葡萄糖神经酰胺从而起到代替人体 GBA1 作用的功能。

**第 7 章**介绍了目前所取得的研究成果, 讨论了实验中发现的问题, 并描述了相关研究的未来前景。

本论文描述了新型 $\beta$ -葡萄糖苷酶工具化合物 (ABPs 和抑制剂) 的发现, 并阐述了应用已有的 $\beta$ -葡萄糖苷酶 ABPs 和抑制剂对保留型 $\beta$ -葡萄糖苷酶进行鉴定和表征的化学生物学研究方法。本论文所述工作为研究 $\beta$ -葡萄糖苷酶提供了新的工具化合物、以及探究了其他物种中可能的 $\beta$ -葡萄糖苷酶同源基因酶, 为保留型 $\beta$ -葡萄糖苷酶领域的相关研究思考提供了新的启示。