



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Exploring the versatility of human β -glucosidases and related glycosylated metabolites with novel chemical tools

Bannink, S.

Citation

Bannink, S. (2025, October 24). *Exploring the versatility of human β -glucosidases and related glycosylated metabolites with novel chemical tools*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4281749>

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/1887/4281749>

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

Nederlandse Samenvatting

“Het Verkennen van de Veelzijdigheid van Humane β -Glucosidasen en Gerelateerde Geglycosyleerde Metabolieten met Nieuwe Chemische Hulpmiddelen”

Het overkoepelende doel van het onderzoek gepresenteerd in dit proefschrift is het ontwikkelen en toepassen van chemische tools (voornamelijk substraten) voor glucosylhydrolasen om hun functie en relatie tot ziektebeelden beter te begrijpen.

Hoofdstuk 1 introduceert de lysosomale stapelingsziekte Gaucher Disease (GD) en het betrokken glucosylhydrolase enzym GBA1. Ook worden hedendaagse therapieën en in kaart gebracht en de huidige bij de diagnostiek van Gaucher patiënten als ook karakteristieke biomarkers van de ziekte. De structuur en karakteristieke eigenschappen van de drie glucosylhydrolasen GBA1, GBA2 en GBA3 worden beschreven en de samenhang van de drie enzymen en de gerelateerde metabolieten word geïllustreerd. Er zijn ongeveer 300 verschillende mutaties in het GBA1 gen die kunnen leiden tot de ziekte maar een duidelijke relatie tussen mutaties en de ernst van ziekte is niet evident. Recent onderzoek heeft aangetoond dat niet alleen het substraat van GBA1 genaamd glucosylceramide (GlcCer) ophoopt in het lysosoom van macrofagen maar ook andere geglycosyleerde metabolieten (glucolieten) zoals glucosylcholesterol (GlcChol). Deze glucolieten worden gevormd door een transreactie die tevens worden gekatalyseerd door de GBA1 en GBA2 enzymen. Het idee dat er potentieel meerdere glucolieten zijn naast GlcCer en GlcChol die ophopen in GD word geïntroduceerd en de potentiële relevantie hiervan tegenover GD en PD word uitgelegd.

Hoofdstuk 2 beschrijft het ontwerp en de synthese van 6-*O*-geacyleerde en 6-*O*-gealkyleerde, 4MU-gebaseerde fluorogene substraten met GBA1-specificiteit ten opzichte van GBA2 en GBA3. De synthese van vier verschillende 6-*O*-geacyleerde fluorogene substraten wordt besproken. Uit enzymatische activiteit assays bleek dat, in vergelijking met het ongemodificeerde glucose-4MU-substraat (4MU- β -Glc), de maximale hydrolysesnelheid ($V_{\max}$) ongeveer tien keer lager lag. Op basis van deze data en vanwege de intrinsieke instabiliteit van de 6-*O*-geacyleerde esterbindingen, werd besloten om derivaten van het gepalmitoyleerde substraat te maken met verschillende linkers op C-6. Het meest veelbelovende substraat, een etherverbinding (6-*O*-alkyl-4MU- β -Glc), vertoonde de beste kinetische eigenschappen, met een $V_{\max}$ die nog slechts drie keer lager lag dan die van 4MU- β -Glc. Dit substraat toonde bovendien goede GBA1-selectiviteit en werd verder onderzocht op zijn specificiteit in miltlysaten. Uit deze tests bleek dat 6-*O*-alkyl-4MU- β -Glc in staat is om zonder toegevoegde inhibitoren de specifieke activiteit van GBA1 weer te geven in miltlysaten van zowel gezonde personen

als Gaucher-patiënten. De waargenomen hydrolyse van het 6-*O*-acyl-4MU- β -Glc-substraat door GBA1 leidde vervolgens tot een zoektocht naar natuurlijk voorkomende geglucosyleerde sterolen en hun geacyleerde derivaten in de menselijke milt, met behulp van LC-MS/MS-analyse. Deze analyse bracht verhoogde niveaus aan het licht van zowel endogene als plantaardige sterylglucosiden (SG's) bij patiënten met de ziekte van Gaucher (GD). De studie toont aan dat Glc-fytosterolen en hun 6-*O*-geacyleerde derivaten als substraten voor GBA1 kunnen fungeren en zich ophopen in de milt van Gaucher-patiënten.

Hoofdstuk 3 bouwt voort op het GBA1-specifieke substraat dat in hoofdstuk 2 is gesynthetiseerd, en onderzoekt de door GBA1 gekatalyseerde transglucosylering van cholesterol met behulp van dit substraat. Om de hypothese te ondersteunen dat meerdere metabolietaacceptoren, naast cholesterol, betrokken kunnen zijn bij GBA1-gemedieerde transglucosylering, werd 6-*O*-alkyl-4MU- β -Glc getransglucosyleerd naar een selectie van vier zorgvuldig gekozen acceptoren (cholesterol, desmosterol, retinol en vitamine D₃). HPTLC-analyse toonde aan dat alle vier de acceptoren door GBA1 werden getransglucosyleerd, wat bevestigt dat meerdere verschillende glucolieten mogelijk betrokken zijn bij het ziektebeeld van de ziekte van Gaucher (GD). Vervolgens werd de alkylgroep van 6-*O*-alkyl-4MU- β -Glc voorzien van een geladen groep, met het oog op de toekomstige identificatie van nieuwe, laag-abundante glucolieten via reverse lipidomics-experimenten. Uit de literatuur blijkt dat een geladen trimethylammonium- (TMA) groep kan bijdragen aan de detectie van dergelijke verbindingen via LC-MS/MS technieken. De synthese van het fluorogene 6-*O*-alkylTMA-4MU- β -Glc-substraat en een ceramide-afgeleid 6-*O*-alkylTMA- β -GlcCer-substraat wordt beschreven, evenals hun vermogen om (NBD)-cholesterol te transglucosyleren, wat *in vitro* werd geëvalueerd met behulp van HPTLC en LC-MS/MS. Uit de resultaten blijkt dat er nog verdere optimalisatie nodig is om permanent geladen moleculen betrouwbaar te kunnen detecteren met LC-MS/MS, terwijl de vorming van ongeladen GlcChol via de door GBA1 gekatalyseerde transglucosylering van GlcCer en cholesterol wel goed en reproduceerbaar kan worden aangetoond.

Hoofdstuk 4 rapporteert over de synthese en karakterisering van beide epimeren van geglucosyleerde en gegalactosyleerde 2-arachidonylglycerol (2-AG) standaarden. 2-AG is een lipide ligand voor de CB₁- en CB₂-endocannabinoïdereceptoren en speelt een rol in de regulatie van diverse fysiologische processen. Aangezien eerder werd aangetoond dat GBA1 en GBA2 meerdere metabolieten kunnen glycosyleren via een transglycosyleringsreactie, werd 2-AG gekozen als potentiële acceptor. Dit leidde tot de behoefte aan de synthese van geglucosyleerde en gegalactosyleerde 2-AG-standaarden.

Deze synthetische standaarden bleken instabiel te zijn vanwege migratie van de vetzuurgroep naar de vrije primaire hydroxylgroep van glycerol, wat resulteerde in de vorming van geglucosyleerde en gegalactosyleerde 1-arachidonylglycerol (1-AG) bijproducten. Omdat migratie van de acylgroep niet te voorkomen is bij de natuurlijke metaboliet, en om het effect van de gemigreerde 1-AG-standaarden op endocannabinoïdeactivatie te onderzoeken, werden in totaal acht verschillende standaarden gesynthetiseerd. De synthese van deze acht standaarden wordt beschreven aan de hand van twee verschillende beschermgroepstrategieën. Beide strategieën leidden tot succesvolle synthese van de producten, maar de Troc-beschermgroepstrategie toonde meer potentieel op het gebied van opschaling en verdere modificaties. Migratiesnelheden werden gekwantificeerd met behulp van ¹H-NMR- en LC-MS-analyse, en enkele stabiliteitsstudies van de standaarden worden eveneens gepresenteerd.

Hoofdstuk 5 onderzoekt het ontwerp, de synthese en de evaluatie van GBA2-selectieve fluorogene substraten, met als uiteindelijke doel het identificeren van nieuwe glucolieten, op een vergelijkbare wijze als beschreven in hoofdstuk 3. Verschillende suikerconformaties die in de literatuur enige voorkeur voor GBA2-specificiteit vertoonden, werden gekoppeld aan een fluorogeen aglycon, al dan niet voorzien van een lipofiele adamantyl-extensie. Als basis voor de potentiële GBA2-specifieke fluorogene substraten werden de disacharide gentiobiose, de van GBA2-selectieve ABP's afgeleide β -D-arabinofuranose, en de van iminosuiker afgeleide L-idose geselecteerd. De synthese van alle reguliere, op 4MU gebaseerde fluorogene substraten wordt beschreven, terwijl de adamantyl-afgeleide 4MU-substraten niet zijn gesynthetiseerd voor de L-idose geconfigureerde suikers, aangezien deze synthese niet mogelijk bleek met behulp van de in dit hoofdstuk beschreven synthese routes. Activiteitsassays van de gesynthetiseerde substraten tegen alle drie de GBA-enzymen toonden aan dat geen van de substraten GBA2-specificiteit vertoonde. Echter, de toevoeging van een lipofiele adamantyl-extensie aan het fluorogene aglycon lijkt niet getolereerd te worden door GBA3, wat perspectief biedt voor toekomstig onderzoek naar enzymselectiviteit en GBA2 selectieve substraatontwikkeling.

Hoofdstuk 6 vat het in dit proefschrift beschreven werk samen en geeft suggesties voor vervolgonderzoek voor elk van de afzonderlijke onderwerpen.