



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Understanding functional dynamics and conformational stability of beta-glycosidases

Ben Bdira, F.

Citation

Ben Bdira, F. (2018, February 20). *Understanding functional dynamics and conformational stability of beta-glycosidases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/61148>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/61148>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:
<http://hdl.handle.net/1887/61148>

Author: Ben Bdira, F.

Title: Understanding functional dynamics and conformational stability of beta-glycosidases

Issue Date: 2018-02-20

NEDERLANDSE SAMENVATTING

B-glycosidasen spelen een fundamentele rol bij het handhaven van de cellulaire homeostase in levende organismen. Bovendien heeft deze wijdverspreide groep van enzymen de afgelopen decennia meerdere industriële toepassingen gevonden. Het belang van deze enzymfamilie maakt het karakteriseren van de biofysische eigenschappen van β -glycosidasen zeer relevant. Daarmee kunnen we een beter begrip krijgen van hun structuur/functie relatie. **Hoofdstuk 1** is een algemene inleiding waarin de biofysische en structurele kenmerken van β -glycosidasen die tot de GH5, GH11 en GH30 families behoren, worden beschreven, alsmede de vaak gebruikte remmers die hun activiteiten moduleren.

In de mens bestaat het katabolisme van gangliosiden uit de sequentiële hydrolyse van hun oligosaccharidegroep door verschillende exo β -glycosidasen. Het ontbreken van de activiteit van één van de ganglioside verwerkende enzymen vormt de oorzaak van een reeks metabole aandoeningen die collectief worden geclassificeerd als glycosfingolipidosen. In bacteriën volgt het metabolisme van gangliosiden een ander pad, waarbij de gehele oligosaccharideketen in een enkele stap van het ceramideel wordt verwijderd. Een van de eerst ontdekte enzymen die deze reactie kunnen uitvoeren, is endoglycoceramidase II (EGCII) van *Rhodococcus* sp. In theorie zou dit enzym kunnen worden toegepast om menselijke glycosfingolipidosen te behandelen. Inzicht in factoren die de stabiliteit van EGCII beïnvloeden, is een belangrijke voorwaarde voor eventuele toepassing ervan als therapeutisch. **Hoofdstuk 2** beschrijft de karakterisering van EGCII met behulp van *activity based probes* (ABPs) die aanvankelijk waren ontwikkeld voor humaan glucocerebrosidase GBA. EGCII is warmtelabiel en de stabiliteit wordt aanzienlijk verbeterd door de vorming van covalente complexen met ABPs op basis van cyclofellitol, gesubstitueerd met hydrofobe groepen, zoals blijkt uit een verhoogde smelttemperatuur, resistentie tegen tryptische digestie, veranderingen in ^{15}N - ^1H NMR-spectra van het enzym en in de hoeveelheid hydrofoob eiwitoppervlak, zoals bepaald door 8-anilino-1-naftaleensulfonzuurfluorescentie.

Een verlaagde of afwezige activiteit van GBA leidt bij de mens tot accumulatie van het glucocerebrosidesubstraat in het lysosomale compartiment van de cel, waardoor een syndroom ontstaat dat de ziekte van Gaucher wordt genoemd. De toepassing van kleine chemische verbindingen die de activiteit van GBA-mutanten bij Gaucherpatiënten kunnen verhogen, wordt intensief onderzocht. Deze nieuwe therapeutische aanpak vertegenwoordigt een veelbelovend vorm van behandeling van Gaucher-symptomen, in het bijzonder voor de neurale manifestatie ervan. De effecten van die verbindingen op de eiwitconformatie in oplossing zijn echter nog onduidelijk. Daarom beschrijft **hoofdstuk 3** de karakterisatie van de effecten van een serie verbindingen op de stabiliteit van GBA. De experimenten laten zien dat de toename in cellulaire niveaus van GBA door ABPs en

NEDERLANDSE SAMENVATTING

door de reversibele remmers ten dele wordt veroorzaakt door hun vermogen om de gevouwen vorm van GBA te stabiliseren, waardoor de weerstand tegen afbraak door lysosomale proteasen toeneemt. Deze effecten zijn het duidelijkst voor de amfifiele ABPs, vermoedelijk vanwege hun hoge lipofiele karakter, die compactheid van GBA kan bevorderen door middel van hydrofobe interacties.

Ondanks de verschillen in vouwing en in substraatspecificiteiten tussen de β -glycosidasen, delen deze enzymen een gemeenschappelijk katalytisch mechanisme, waarbij twee katalytische residuen samenwerken om de glycosidische binding te hydrolyseren. Het mechanisme van deze reactie is algemeen geaccepteerd, wat op de een of andere manier de studie naar de rol van conformatieveranderingen en dynamiek van het enzym in de katalyse heeft beperkt. In **hoofdstuk 4** wordt dit onderwerp bestudeerd door de dynamiek van *Bacillus circulans* xylanase te karakteriseren voor de opeenvolgende stappen van de katalyse, met behulp van standaard en geavanceerde NMR spectroscopische technieken. In de rusttoestand vertoont het enzym een geringe dynamiek op de milliseconde tijdschaal. De Michaelis-complexvorming lijkt een geïnduceerde fit-mechanisme te volgen en de uitwisseling tussen de twee gebonden vormen van het enzym blijkt langzaam te zijn. Er wordt voorgesteld dat deze conformatieverandering met een hoge activeringsenergie nodig is voor substraatpositionering en -vervorming. Dit zou de snelheidsbeperkende stap van de reactie zou kunnen zijn. In de toestand van de covalente intermediair laat het enzym hetzelfde dynamisch gedrag zien als in de rusttoestand, hoewel het een andere conformatie heeft. Een drastische verhoging van de dynamiek op de millisecondetijdschaal van het enzym in de laatste stap van de reactie suggereert dat het enzym een actieve rol speelt bij de productdissociatie. Deze studie leverde het eerste bewijs voor dynamiek en conformationele veranderingen bij β -glycosidasen en impliceert betrokkenheid van de enzymmatrix bij het paradigmatische hydrolysemechanisme.

Hoofdstuk 5 bespreekt de nieuwe inzichten beschreven in dit proefschrift en schetst enkele toekomstperspectieven voor onderzoek en toepassing.