



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cyclophellitol analogues for profiling of exo- and endo-glycosidases

Schröder, S.P.

Citation

Schröder, S. P. (2018, May 17). *Cyclophellitol analogues for profiling of exo- and endo-glycosidases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/62362>

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/1887/62362>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/62362> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Schröder, Sybrin P.

Title: Cyclophellitol analogues for profiling of exo- and endo-glycosidases

Date: 2018-05-17

Nederlandse samenvatting

Glycosidases zijn enzymen die voorkomen in alle vormen van leven. Glycosidases zijn essentieel voor de afbraak van (complexe) koolhydraten, zoals tafelsuiker, maar ook glycolipiden en glycoproteïnes. Koolhydraten zijn lange ketens van monosacchariden die aan elkaar geketend zijn via acetaal bindingen. Deze bindingen zijn van nature erg stabiel in waterig milieu en zullen dus niet eenvoudig verbreken. Om een gezonde stofwisseling te behouden (in bijvoorbeeld het menselijk lichaam) is de afbraak van koolhydraten van essentieel belang voor energietoevoer, maar ook om correcte functie van eiwitten en cellulaire processen te behouden. Glycosidases katalyseren ('versnellen') de afbraak van koolhydraten door ze eigenhandig in stukken te knippen door middel van een hydrolyse reactie met water. Wanneer een glycosidase enzym niet goed werkt (door bijvoorbeeld een genetische afwijking) kunnen de suikers die zij normaliter afbreekt ophopen, hetgeen zorgt voor een verstoring in belangrijke cellulaire processen. Omdat er vele verschillende typen glycosidases bestaan, staan deze enzymatische defecten aan de grondslag van verschillende ziektes, zoals de lysosomale stapelingsziektes van Gaucher en Fabry. Tevens wordt verstoorde glycosidase functie onder andere in verband gebracht met kanker, Parkinson en Alzheimer.

De functie en activiteit van glycosidases kan bestudeerd worden met een recentelijk ontwikkelde techniek: activity-based protein profiling (ABPP). Deze techniek berust op het toedienen van een reactieve verbinding (probe) aan een biologische monster waarbij de probe reageert met het enzym van interesse en daarbij andere enzymen ongemoeid laat. De probe is gebaseerd op de natuurlijke verbinding cyclophellitol, dat sterk lijkt op een koolhydraat en ook als zodanig herkend zal worden door het glycosidase enzym. Het enzym zal proberen de probe in stukken te knippen, maar gaat daarbij een niet-reversibele reactie aan met de probe waardoor het enzym niet meer los kan laten. Hierbij word tevens de enzymatische functie uitgeschakeld. De probe bevat een fluorescerende kleurstof en kleurt daarbij het enzym indirect aan, waardoor het met speciale scan-apparatuur gevisualiseerd kan worden. Met dit soort probes kan dus de aan- of afwezigheid van bepaalde glycosidases in biologische monsters worden bepaald (diagnostiek).

Omdat er vele verschillende soorten glycosidases bestaan, zijn er veel verschillende probes nodig om elk soort specifiek te kunnen bestuderen. Hoewel er al meerdere

probes gesynthetiseerd zijn om bijvoorbeeld α - en β -glucosidases, mannosidases, galactosidases en fucosidases aan te kunnen kleuren, dekken deze niet de lading van het grote scala aan glycosidases. Het onderzoek dat staat beschreven in dit proefschrift omvat de synthese en biochemische evaluatie van nieuwe glycosidase probes, die gebruikt kunnen worden om niet eerder verkende soorten glycosidases te kunnen bestuderen in biologische context.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie over glycosidases, hun functie en de reactiepaden die zij doorlopen bij het hydrolyseren van een suikerketen. Tevens wordt de ABPP techniek toegelicht, en worden de probes die voorheen gepubliceerd zijn in de literatuur besproken.

Hoofdstuk 2 beschrijft de synthese van een glycosidase probe die bestaat uit de xylose configuratie. De belangrijkste stap in deze synthese bestaat uit een asymmetrische allyleringsreactie met een chiraal allyl-boraan reagens. De probe blijkt uitstekend te reageren met β -xylosidases en kan dus gebruikt worden om deze in biologische context beter te bestuderen. Omdat de xylose configuratie sterk lijkt op de glucose configuratie (met als verschil de hydroxymethyleen groep op positie C-5), is onderzocht of deze probe tevens met glucosidases reageert. Dat blijkt mogelijk; er is dus enige kruisreactiviteit van β -glucosidases met xylose geconfigureerde probes.

Hoofdstuk 3 borduurt voort op bovenstaande bevinding. Ditmaal worden probes gesynthetiseerd die hydroxyl groepen missen op positie C-4 en C-2. De alcoholgroepen op deze posities maken het onderscheid tussen de glucose-, mannose- en galactose configuraties. Door deze groepen weg te laten zou de probe in theorie tegelijk glucosidases, mannosidases en galactosidases kunnen binden waardoor simultaan glycosidases van verschillende klassen bestudeerd kunnen worden. De werkelijkheid blijkt subtieler; door het weghalen van hydroxylgroepen op C-2 en C-4 verliest de probe zijn potentie, maar het verwijderen van enkel de alcohol groep op C-4 geeft een probe die selectief reageert met glucosidases en galactosidases.

Tot nu toe bestaan alle glycosidase probes gebaseerd op het natuurproduct cyclophellitol uit een 6-ring en lijken daarmee sterk op het natuurlijke suiker substraat. In **Hoofdstuk 4** wordt de synthese beschreven van glycosidase probes bestaande uit een 5-ring. Er is onderzocht of deze verbindingen tevens in staat zijn om glycosidases te binden, maar dit bleek niet het geval.

In de jaren '90 hebben de groepen van Tatsuta en Vasella uitgebreid onderzoek gedaan aan gluco-azolen; azool ringen gefuseerd aan een glucose geconfigureerde piperidine als niet-covalente (reversibele) remmers voor β -glucosidases. Van deze reeks gluco-azolen bleek glucoimidazool (met een exocyclisch stikstof atoom op de plek van het aglycon en een stikstof op de plek van het endocyclisch zuurstof atoom in glucose) de sterkste remmer te zijn. Echter er ontbrak één structuur in deze reeks; de imidazool-gefuseerde verbinding waarbij beiden stikstof atomen exocyclisch zitten ten opzichte van de glucose ring. **Hoofdstuk 5** beschrijft de synthese van deze nieuwe klasse van remmers, genaamd de gluco-1*H*-imidazolen. De synthese vereiste een andere synthetische route dan gebruikt voor de andere gluco-azolen, en wordt gemaakt vanuit een bouwsteen voor cyclophellitol. Hoewel gluco-1*H*-imidazool een reversibele remmer is voor β -glucosidases, is zij minder potent dan glucoimidazool. De reden hiervoor is achterhaald met behulp van kristallografie, isothermale titratie calorimetrie en DFT calculaties, en valt toe te wijzen aan een gebrek aan basiciteit van het exo-cyclisch stikstof atoom, alsmede een verminderde electrostatische interactie met het katalytisch nucleofiel van het enzym na protonering van de azool ring. Desalniettemin valt via de ontwikkelde syntheseroute de 'suiker' ring evenals de subsituent op de imidazool ring gemakkelijk aan te passen, hetgeen gezorgd heeft voor reversibele inhibitors met nanomolaire activiteit tegen lysosomale glucocerebrosidase (GBA1), met hoge selectiviteit over GBA2 en glucocerebrosidase synthase. Deze remmers zouden dus gebruikt kunnen worden als medicijnen tegen de ziekte van Gaucher via chaperone therapie.

Hoofdstuk 6 beschrijft de synthese van twee potentiële covalente remmers van *endo*- α -1,2-mannanases van glycosidase familie GH99. Doordat een van de katalytische aminozuren zich op een ongebruikelijke positie bevindt in het katalytische centrum van het enzym, is er gespeculeerd dat *endo*- α -1,2-mannanases een ander reactiepad gebruiken om hun substraat om te zetten (via het 1,2-anhydro epoxide). De gesynthetiseerde spiro-epoxyglycosides bestaan uit disaccharides gefunctionaliseerd met een spiro-epoxide op positie C-2, dat dient als het electroofiel voor irreversiebele reactie met het enzym. Met behulp van ABPP technieken wordt aangetoond dat deze verbindingen inderdaad labelen met recombinant GH99 enzym, en de labeling lijkt plaats te vinden in het katalytisch centrum.

In **Hoofdstuk 7** wordt een andere klasse van *endo*-glycosidases bestudeerd; de *endo*-xylanases. Tot noch toe waren alle cyclophellitol-gebaseerde probes monomeer van

structuur, en labelden daardoor voornamelijk glycosidases die enkel een monomeer in hun katalytisch centrum toelaten (*exo*-glycosidases). Dit hoofdstuk beschrijft een methode om gemakkelijk een *xylo*-cyclophellitol probe te verlengen met een xylose suiker residu, via directe chemische glycosylering. Hierdoor ontstaat een disaccharide probe die in staat is om *endo*-xylanases te labelen. Dit wordt gedemonstreerd met het labelen van het secretoom van de industrieel relevante schimmel *Aspergillus niger*. Met deze probes kan het pH optimum, alsmede de temperatuur stabiliteit van xylanases in het secretoom gemakkelijk bestudeerd worden.

Ten slotte wordt in **Hoofdstuk 8** een meer gedetailleerde samenvatting gegeven van de bevindingen in dit Proefschrift, verwoven met hierop gebaseerde voorstellen voor vervolgonderzoek.

