



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthetic methods to glycerol teichoic acids

Hogendorf, W.F.J.

Citation

Hogendorf, W. F. J. (2012, November 22). *Synthetic methods to glycerol teichoic acids*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20172>

Version: Corrected 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/1887/20172>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20172> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Hogendorf, Wouter Frederik Johan

Title: Synthetic methods to glycerol teichoic acids

Issue Date: 2012-11-22

Nederlandse Samenvatting

Synthetische methodologiën naar glycerol teichoïnezuren

Teichoïnezuren kunnen in het algemeen worden gekarakteriseerd als polymeren opgebouwd uit repeterende gesubstitueerde glycerol of ribitol eenheden, die door middel van fosfodiësters verbonden zijn. Het substitutiepatroon kan per repeterende eenheid verschillen en kan bestaan uit verschillende koolhydraatstructuren en/of D-alanine esters. Teichoïnezuren komen voor in de celwand van Gram-positieve bacteriën en zijn kenmerkend voor een bacteriesoort. Teichoïnezuren vervullen een scala van functies die voor een bacterie van levensbelang zijn en spelen een rol bij de interactie van de bacterie met de omgeving. Zo kunnen teichoïnezuren worden herkend door het menselijk immuunsysteem.

Door de toenemende resistentie van bacteriën tegen antibiotica wordt er veel aandacht besteed aan de ontwikkeling van andere geneeswijzen zoals nieuwe soorten van (synthetische) vaccins. Teichoïnezuren kunnen vanwege hun antigene eigenschappen wellicht een rol spelen bij de ontwikkeling van dergelijke vaccins. Op grond van de mogelijke antigene eigenschappen van teichoïnezuren is een onderzoek gestart om deze verbindingen synthetisch toegankelijk te maken en om de immunologische eigenschappen van deze gedefinieerde, synthetische teichoïnezuren vast te stellen.

Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling van drie methoden voor de synthese van glycerol teichoïnezuur fragmenten van verschillende lengte en met verschillende glycosylerings patronen. In samenwerking met de groep van Professor Huebner (Freiburg Universitair Medisch Centrum) werden de gesynthetiseerde teichoïnezuur fragmenten geëvalueerd op hun immunologische eigenschappen.

In het inleidende **hoofdstuk 1** wordt aandacht besteed aan de ontdekking, de structurele classificatie en de fysiologische en immunologische aspecten van teichoïnezuren. Tevens wordt een overzicht gegeven van bestaande syntheseswegen naar fragmenten van teichoïnezuren van verschillende bacteriële oorsprong.

De synthese van een 2'- α -kajibiosyl (een α -1 \rightarrow 2 verknoopt glucosyl disaccharide) bevattend fragment van het teichoïnezuur van *Enterococcus faecalis* is het onderwerp van **hoofdstuk 2**. In oplossing werd met behulp van fosforamidiet chemie een glycerol fosfaat hexameer met één 2'- α -kajibiosyl eenheid gesynthetiseerd. Het eerste stadium van de synthese route omvat de bereiding van de orthogonaal beschermde glycerol fosforamidieten, zoals die voorzien van de 2'- α -kajibiosyl eenheid. Vanuit dibenzylglycerol wordt het hexameer vervolgens stap voor stap opgebouwd doormiddel van de volgende verlengingsprocedure: 1) vorming van een fosfietriester door koppeling van een fosforamidiet met het vrije alcohol. 2) Oxidatie van het fosfiet triester intermediair. 3) Het ontschermen van de 4,4'-dimethoxytrityl groep, met als resultaat het verkrijgen van een nieuw vrij alcohol. Deze 3-staps verlengings-

procedure vormt de basis van alle oligoglycerol fosfaat syntheses beschreven in dit proefschrift.

De fosforamidietchemie beschreven in **hoofdstuk 2** kon worden toegepast in onderzoek naar een geautomatiseerde vaste drager synthese van teichoïnezuur fragmenten. In **hoofdstuk 3** wordt beschreven hoe een aangepaste DNA synthesizer kan worden gebruikt om enkele milligrammen van de teichoïnezuur fragmenten efficiënt en snel te produceren. Met deze techniek werd een kleine bibliotheek aan verbindingen verkregen bestaande uit 6-, 10-, 14- en 20-meren glycerol-1,3-fosfaat en twee geglycosyleerde hexaglycerol fosfaat teichoïnezuur fragmenten. De verkregen fragmenten werden getest op hun affiniteit voor antilichamen in immuunserum opgewekt in konijnen tegen geïsoleerd lipoteichoïnezuur van *E. faecalis*. Hieruit bleek dat het 20-meer glycerol fosfaat en de twee geglycosyleerde fragmenten het meest effectief aan de antilichamen binden.

Hoofdstuk 4 doet verslag van een nieuwe syntheseprocedure waarbij teichoïnezuur fragmenten worden gesynthetiseerd en geïsoleerd met behulp van een *fluorous* (perfluoroalkyl) beschermende groep. De perfluorooctylpropylsulfonylethyl (F-Pse) groep werd onderzocht als fosfaat beschermende groep. Het hoge gehalte aan fluoratomen in deze groep zorgt er voor dat een beschermd teichoïnezuur oligomeer voorzien van de F-Pse groep uitstekend bindt aan ge(per)fluoreerde materialen zoals *fluorous* silica, zodat zuivering na iedere elongatie sequentie kan plaatsvinden op basis van deze eigenschap. Met deze techniek werden enkele tientallen milligrammen van een 12-meer glycerol fosfaat, twee hexaglycerolfosfaten met (*N*-acetyl)glucosaminy substituties en een hexameer van (*N*-acetyl)glucosaminyglycerol fosfaat verkregen. Een belangrijk verschil met de fragmenten beschreven in **hoofdstuk 2 en 3** is dat de teichoïnezuren beschreven in **hoofdstuk 4** een terminale fosfaat bevatten. De fragmenten bleken in de immunologische evaluatie niet actief te zijn.

Om door middel van zuivering met behulp van *fluorous* silica, teichoïnezuur fragmenten zonder terminale fosfaat toegankelijk te maken werd een alternatieve hydroxyl *fluorous* beschermende groep ontwikkeld. **Hoofdstuk 5** behandelt de synthese van enkele geglycosyleerde teichoïnezuur fragmenten met behulp van een *fluorous* beschermende groep welke is gebaseerd op een succinyl ester. Tevens wordt uitgelegd hoe een "zuur-stabiel" 2'-(tetra-*O*-benzyl- α -glucosyl)glycerol fosforamidiet kan worden verkregen. Deze glucosyl substitutie is stabiel tijdens de standaard detrityleringscondities en kan daardoor op een iedere positie in een teichoïnezuur fragment worden ingebouwd.

In **hoofdstuk 6** wordt beschreven hoe het immunologisch meest interessante teichoïnezuur fragment (geglycosyleerd hexaglycerol fosfaat) wordt geconjugeerd aan BSA, een immunogeen drager-eiwit. Met dit experimentele vaccin werden konijnen geïmmuniseerd en met behulp van opsonofagocytische testen werd aangetoond dat het serum verkregen van deze konijnen antilichamen bevat welke efficiënt aan teichoïnezuren van *E. faecalis* bindt. Het bleek dat het konijnen antiserum zelfs in zeer

verdunde toestand in staat was *E. faecalis* te opsonizeren en dus potentieel als therapeutisch vaccin zou kunnen functioneren. Verrassend genoeg werden door dit serum ook *E. faecium* (in meerdere mate) en *Staphylococcus aureus* (in mindere mate) geopsoniseerd. Uit een endocarditis model experiment in ratten bleek dat het eerder genoemde antiserum gebruikt kan worden om passief te immunizeren en zo bescherming te bieden tegen infecties veroorzaakt door *E. faecalis*.

