



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cyclophellitol and its derivatives: synthesis and application as beta-glycosidase inhibitors

Li, K.J.

Citation

Li, K. J. (2014, December 11). *Cyclophellitol and its derivatives: synthesis and application as beta-glycosidase inhibitors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/30102>

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/1887/30102>

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

Samenvatting

Glycosidases zijn enzymen die betrokken zijn bij de afbraak van koolhydraten (suikers) en glycoconjugaten (koolhydraat gekoppeld aan een eiwit of lipide). Deze enzymen vervullen belangrijke functies in diverse biologische processen waaronder communicatie tussen cellen, signaaloverdracht, celgroei en celdifferentiatie. Ze spelen ook een rol in verscheidene ziektes. De exacte rol van deze enzymen in zowel fysiologische als pathofysiologische processen zijn echter niet volledig bekend. Een veelvuldig gebruikte methode om de functies van glycosidases te bestuderen is de desbetreffende activiteit te manipuleren met remmers. Zodoende kunnen de effecten op het proces, na het wegvallen van het desbetreffende enzym bepaald worden.

In de laatste decennia is een nieuwe methode, genaamd “activity-based-protein profiling” ontwikkeld waar men in staat is de activiteit van het gewenste enzym zichtbaar te maken in een complex biologisch systeem. Dit is bewerkstelligd door het ontwerpen van een moleculair gereedschap, de zogeheten “activity-based probes” (ABPs). Deze probes zijn uitgerust met een herkenningselement en/of reactive groep en een label. Het eerstgenoemde onderdeel is verantwoordelijk voor de selectieve herkenning en irreversibele binding van het gewenste enzym. Het label, vaak een fluorescente groep, maakt het mogelijk om het enzym te visualiseren en te kwantificeren.

Het aantal ABPs voor glycosidases is tot op heden beperkt gebleven doordat deze enzymen een nauwe substraatspecificiteit bezitten. Tevens vertonen de tot nu toe ontwikkelde ABPs niet altijd de gewenste selectiviteit en potentie. Een grote stap voorwaarts is de ontwikkeling van een ABP, gebaseerd op de natuurstof cyclophellitol, die bekend staat om zijn selectieve en effectieve remming van diverse glycosidases. Het introduceren van een fluorofloor in dit molecuul had geen eenduidige remmende invloed op glycosidases. Het remmende effect van de op cyclophellitol-gebaseerde ABP werd met een factor van honderd vergroot voor glucocerebrosidase, een glycosidase die betrokken is bij de lysosomale stapelingsziekte, ziekte van Gaucher en naar alle waarschijnlijkheid ook de ziekte van Parkinson. Alleen zorgde de eenzelfde modificatie (introdunctie van een fluorofloor) dat andere relevante glycosidases niet meer geremd werden.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gericht op het ontwikkelen van cyclophellitol en derivaten, die gebruikt kunnen worden als “mechanism-based” en competitieve remmers om de rol van glycosidases te bestuderen in zowel ziekte als gezondheid. Tevens, kunnen deze ABPs ook van belang zijn voor het bestuderen van biotechnologische processen waar glycosidases veelvuldig worden toegepast. In **Hoofdstuk 1** worden verschillende aspecten van glycosidases besproken waaronder hun mechanisme en toepassingen in het laboratorium en industrie. Verder wordt er een korte overzicht gegeven van irreversibele remmers met hun daarbehorende ABPs.

Het ontwikkelen van ABPs voor glycosidases wordt bemoeilijkt door de ruimtelijke structuur van hun actieve centrum. Deze is zodanig vormgegeven dat de meeste glycosidases alleen remmers of andere moleculen kunnen tolereren die vergelijkbaar zijn met het natuurlijke substraat. Kennis van de ruimtelijke structuur en het mechanisme van glycosidases zijn essentieel voor het ontwerpen van ABPs voor glycosidases. In **Hoofdstuk 2** worden deze ontwerpbeginnselen besproken met name voor glycosidases met een “retaining” mechanisme waarbij een covalent enzym-substraat intermediair wordt gevormd. Twee klassen van ABPs, gebaseerd op 2-deoxy-2-fluorosuikers and cyclophellitol worden hierbij betrokken. Verder wordt er ook een aantal toepassingen van cyclophellitol-gebaseerde ABPs besproken in de context van de ziekte van Gaucher, een lysosomale stapelings ziekte.

Bij aanvang van het hier beschreven onderzoek was er een grote hoeveelheid van de natuurstof cyclophellitol en zijn stikstof variant, cyclophellitol aziridine nodig. Deze twee moleculen vormen de basis voor het onderzoek dat verder in het proefschrift wordt gepresenteerd. **Hoofdstuk 3** beschrijft de optimalisatie van een bestaande literatuurprocedure richting cyclophellitol en een nieuwe synthese route voor cyclophellitol aziridine.

Hoofdstuk 4 behandelt de synthese en biologische evaluatie van een *N*-geacyleerde cyclophellitol aziridine ABP voor glycosidases met een “retaining” mechanisme. Hieruit bleek dat de synthese en zuivering van deze *N*-geacyleerde aziridine ABP onder zuurvrij condities uitgevoerd dienden te worden om opening van de aziridine groep te voorkomen. Tevens bleek de beschreven ABP in staat was om, naast glucocerebrosidase (GBA), drie andere humane (GBA2, GBA3 and LPH) en bacteriële glycosidases te labelen. Het verschil in labelingspecificiteit tussen cyclophellitol-ABP en cyclophellitol aziridine-ABP is te verklaren door de positie van het label. Het label van cyclophellitol-ABP ligt in het “glycon” (suiker)-gebied van het actieve centrum, waar normaal gesproken alleen kleine modificaties worden getolereerd. Het is daarom ook zeer opmerkelijk te noemen, dat glucocerebrosidase een grote fluorofoor accepteert.

Daarentegen is het label van cyclophellitol aziridine ABP in een gebied gepositioneerd dat niet specifiek is voor suikers, het zogeheten “aglycon” (niet-suiker) gedeelte van het actieve centrum.

Hoofdstuk 5 behandelt de synthese van een kleine bibliotheek van cyclophellitol en cyclophellitol aziridine derivaten, die werden getest op hun remmende werking voor drie humane glycosidases GBA, GBA2 en GBA3. De meest potente remmer bleek de *N*-gealkyleerde cyclophellitol aziridine te zijn. Een bijkomend voordeel van dit molecuul is dat, in tegenstelling tot de *N*-geacyleerde variant, de synthese en zuivering niet onder speciale zuurvrije condities uitgevoerd hoeven te worden. Deze bevinding kan als leidraad worden gebruikt voor het ontwerpen van *N*-gealkyleerde cyclophellitol aziridines, die naar alle waarschijnlijk makkelijker zijn te hanteren dan de in **Hoofdstuk 4** beschreven *N*-geacyleerde aziridine ABP.

Hoofdstuk 6 and **7** beschrijven de ontwikkeling van cellobiose cyclophellitol-en cyclophellitol aziridine remmers en ABPs voor *H. jecorina* cellulases. Deze cellulolytische enzym mix wordt vaak voor industriële doeleinden gebruikt, met name in de productie van bio-brandstof ethanol met biomassa als grondstof. De cyclophellitol aziridine derivaten werden vervaardigd via een chemisch-enzymatisch methode. Hierbij werd er gebruik gemaakt van glycosynthase Abg2F6. De cyclophellitol derivaten waren in staat om de vier verschillende cellulase van *H. jecorina* (CBHI, CBHII, EGI, EGII) te remmen terwijl de aziridine variant een selectieve remmer voor EGII bleek te zijn. Labeling met de cellobiose cyclophellitol aziridine ABP varianten kwam overeen met de remmings data. Alleen EGII kon met behulp van deze ABP gevisualiseerd worden.

Hoofdstuk 8 behandelt een studie naar de remmingsactiviteit van exo-*N*-cyclische deoxynojirimycin en derivaten op enzymen, die een belangrijke rol vervullen in de afbraak en opbouw van glucosylceramide. Deoxynojirimycin en derivaten zijn belangrijke en potente remmers van glycosidases and glycosyltransferases. Het verplaatsen van de stikstof uit de ring zorgde voor een drastische verandering in de remmende activiteit. De vervaardigde exo-*N*-cyclische derivaten bleken inactief te zijn voor de geteste enzymen, GBA, GBA2, GBA3 en glucosylceramide synthase.