Universiteit Leiden
The Netherlands

Inhibitors and probes targeting endo-glycosidases

Boer, C. de

Citation

Boer, C. de. (2021, February 11). *Inhibitors and probes targeting endo-glycosidases*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3135040

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/1887/3135040

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

Cover Page

Universiteit Leiden

Leiden University Repository

The handle https://hdl.handle.net/1887/3135040 holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Boer, C. de
Title: Inhibitors and probes targeting endo-glycosidases
Issue Date: 2021-02-11

Nederlandse samenvatting

Glycosidases zijn enzymen die de hydrolyse van een glycosidische binding katalyseren. De enzymen kunnen onder andere geclassificeerd worden als endo- en exo-glycosidases. De exo-varianten hydrolyseren de eindstandige koolhydraat van een langere keten, terwijl de endo-varianten activiteit op de gehele keten kunnen hebben. Glycosidases spelen een belangrijke rol in uiteenlopende processen in levende systemen en zijn dus overal in de natuur te vinden.

Natuurlijk voorkomende glycosidases kunnen toegepast worden om op een milde en selectieve wijze glycosiden af te breken, bijvoorbeeld om producten te maken uit biomassa of om schadelijke biofilms op te lossen. Ook kunnen in sommige gevallen mensen met bepaalde aandoeningen gebaat zijn bij de remming van een glycosidase. Vanwege al deze toepassingen wordt er veel onderzoek gedaan naar het vinden, karakteriseren en remmen van glycosidases met uiteenlopende specificiteit.

In dit proefschrift staat de chemische synthese en de biologische toepassing van irreversibel covalente remmers van endo-glycosidases beschreven. De structuur van de ontworpen en gesynthetiseerde moleculen is opgebouwd rond de in de natuur gevonden enzymremmer cyclophellitol. De structuur van cyclophellitol wordt door de glycosidase herkent als een koolhydraat, maar in tegenstelling tot een koolhydraat bevat cyclophellitol een epoxide die fungeert als electrofiele val. Hierdoor kan het enzym wel een covalente interactie met de remmer aangaan maar deze niet meer hydrolyseren en wordt de activiteit van het enzym blijvend geremd. De covalente remmers kunnen uitgerust worden met een label waardoor de enzymen die covalent aan de remmers gebonden zijn gedetecteerd kunnen worden. Dit soort moleculen, die selectief enzymen met een bepaalde activiteit detecteerbaar kunnen maken, staan in de Engelstalige vakliteratuur bekend als ‘activity-based probes’ (ABPs). Tot op heden zijn de meeste ABPs ontwikkeld voor exo-glycosidases. In dit proefschrift ligt de nadruk op de ontwikkeling van ABPs en covalente remmers van verschillende endo-glycosidases.

In hoofdstuk 1 wordt de voorkennis, opgedaan in voorgaande studies met cyclophellitol ABPs, samengevat aan de hand van voorbeelden van ontwerpstrategieën en toepassingen van op cyclophellitol gebaseerde ABPs. Het hoofdstuk beschrijft ook de huidige kennis over de mechanistische en conformationele aspecten van de reactie tussen cyclophellitol derivaten en verschillende klassen van — voornamelijk exo — glycosidases. Aan het eind van het

hoofdstuk wordt een overzicht gegeven van de meest gangbare experimenten die met een ABP uitgevoerd kunnen worden.

Hoofdstuk 2 richt zich op glycosidases die gebruikt kunnen worden om stugge biomassa om te zetten in makkelijk te verwerken bouwstenen. Om voldoende binding met de endo-glycosidase enzymen te bewerkstelligen moeten de ABPs een uitgebreider herkenningselement bevatten dan de bekende ABPs voor exo-glycosidases. In het hoofdstuk wordt de chemische synthese van ABPs voor cellulases, xyloglucanases en α-xylosidases beschreven. Deze ABPs kunnen de opsporing, karakterisatie en activiteitscontrole van de enzymen vergemakkelijken. De cellulase en xyloglucanase ABPs worden gesynthetiseerd via chemische glycosyleringen, onder pre-activatie condities, op cyclophellitol nucleofielen. De activiteit van de gesynthetiseerde endo-glycosidase ABPs bleek, in de enzymmengsels uitgescheiden door de schimmel *Aspergillus niger,* geen overlap te vertonen met exo-glycosidase ABPs. Dit nieuwe ABP ontwerp blijkt dus ABPs selectief voor endo-glycosidases op te kunnen leveren. Ook lieten de ABPs ontwikkeld voor cellulases en xyloglucanases verschil in specificiteit zien, wat erop kan wijzen dat met verschillend gesubstitueerde ABPs aparte subklassen van enzymen onderscheiden kunnen worden.

In hoofdstuk 3 worden drie verschillende ontwerpen voor ABPs en een set covalente remmers voor heparanase (HPSE) gesynthetiseerd. HPSE is de enige bekende endo-glycosidase in de extracellulaire matrix met activiteit voor heparansulfaat. Hoge HPSE activiteit wordt in verband gebracht met een verscheidenheid aan aandoeningen. De detectie en remming van HPSE activiteit zou dus kunnen bijdragen aan de diagnose en behandeling van verschillende ziekten. De remmers werden gesynthetiseerd uit één gezamenlijk tussenproduct en verschillen in substitutie op de -2 positie waardoor een structuur-activiteitsrelatie voor deze positie gemaakt kan worden. Het is gebleken dat sulfatering op de 6’O en acetylering of verwijdering van de 2’N positief effect hebben op de HPSE remming. Het installeren van een 2’amine of een 2’ azido acetyl bleek geen potente remmers op te leveren. Twee van de remmers zijn effectief bevonden in verschillende HPSE inhibitie testen. Deze remmers kunnen gebruikt worden om het effect van HPSE inhibitie in detail te bestuderen en als beginpunt voor de ontwikkeling van een nieuwe klasse HPSE remmers voor medicinale toepassingen. ABPs met een label op de 2’N bleken, in lijn met de activiteit van de remmers, ook niet actief te zijn en cyclophellitol met een label op de 4O was niet selectief voor HPSE. Uiteindelijk bleek de disaccharide ABP met het label op de 4’O selectief voor HPSE.

In hoofdstuk 4 wordt de synthese beschreven van een azide gelabeld cyclophellitol derivaat gelijkend op de chemische structuur van de polysacharide, genaamd Psl. Deze polysaccharide wordt gevonden in de biofilms van de pathogene bacterie *Pseudomonas aeruginosa*. Het molecuul werd gesynthetiseerd door middel van een selectieve β-mannosylering op een mannose geconfigureerd cyclophellitol alkeen derivaat. Vervolgens werd het volledige molecuul ontschermd waarna een stereoselectieve epoxidering met een peroxycarbonzuur in loog het gewenste product opleverde. Het door dezelfde bacterie tot expressie gebrachte enzym PslG is in staat deze biofilms af te breken. De verwachting was dat de gesynthetiseerde ABP zou kunnen reageren met dit enzym. Dit was echter niet het geval, wat aanleiding zou kunnen geven om de karakterisatie van PslG te herzien. De ABP zou gebruikt kunnen worden om andere enzymen te vinden die met deze specificiteit Psl zouden kunnen afbreken.

Afsluitend staat in hoofdstuk 5 een samenvatting van de verkregen resultaten met aanbevelingen voor vervolgonderzoek.