



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthesis of ribitol phosphate based wall teichoic acids

Ali, S.

Citation

Ali, S. (2022, February 10). *Synthesis of ribitol phosphate based wall teichoic acids*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3270894>

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/1887/3270894>

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

Nederlandse samenvatting

Antibioticaresistentie is wereldwijd een groeiend medisch probleem. Door veelvuldig gebruik van antibiotica zijn multiresistente stammen ontstaan van *Staphylococcus aureus* en *Enterococcus faecalis* zoals, Methicillin-resistent *S. aureus* (MRSA) en Vancomycin-resistent enterococci (VRE). Deze multiresistente stammen zijn moeilijk te bestrijden met de huidige antibiotica. Daarnaast wordt het lastiger en risicovoller om medische interventies die afhankelijk zijn van antibiotica uit te voeren, zoals operaties en transplantaties. Daarom bestaat er een grote behoefte om nieuwe behandelingen te ontwikkelen. Een veelbelovende aanpak behelst het gebruik van passieve of actieve vaccinatie. Voor het opwekken van een immuunrespons tegen bacteriën zijn bacterie-specifieke structuren nodig. Uit eerdere studies is gebleken dat teichoïnezuren (teichoic acids, TAs) als antigenen kunnen fungeren voor een vaccin. Celwand teichoïnezuren (wall teichoic acids, WTAs) zijn negatief geladen polymeren die op de gehele bacteriële celwand aanwezig zijn en die covalent gebonden zijn aan de peptidoglycaanlaag. Ze spelen een fundamentele rol in de fysiologie van Gram-positieve bacteriën zoals celvorming en celdeling. Ze moduleren de gevoeligheid voor antibiotica en zijn bijvoorbeeld vereist voor β -lactam resistentie. WTAs zijn opgebouwd uit repeterende ribitolfosfaat (RboP) monomeren, die willekeurig gemodificeerd zijn met *N*-acetyl glucosamine (GlcNAc) residuen en/of *D*-alanine esters. Voor *S. aureus* zijn drie glycosyltransferases bekend namelijk, TarP, TarM en TarS die verantwoordelijk zijn voor de GlcNAc modificatie op de RboP keten. TarP introduceert een β -GlcNAc op de RboP C-3 positie van de repeterende eenheid. TarM en TarS zijn verantwoordelijk voor de introductie van respectievelijk een α -GlcNAc en β -GlcNAc op de RboP C-4. *D*-alanine esters spelen een belangrijke rol in de biologische activiteit van WTAs. Uit voorgaande studies is gebleken dat bacteriële stammen met teichoïnezuren zonder *D*-alanine esters niet alleen gevoeliger zijn voor antimicrobiële peptiden, maar ook gevoeliger zijn voor Vancomycin en andere glycopeptide antibiotica.

Dit proefschrift beschrijft de synthese van verschillende teichoïnezuur fragmenten van *Staphylococcus aureus* en *Enterococcus faecalis*. De isolatie van deze teichoïnezuren uit de bacteriën is lastig, omdat dit resulteert in polyribitolketens van verschillende lengte met verschillende substitutiepatronen terwijl bovendien nog biologische verontreinigingen aanwezig kunnen zijn. Het is dus technisch zeer moeilijk om specifieke polyribitol fragmenten met een gedefinieerde structuur te isoleren. Dit proefschrift beschrijft methoden voor de organische synthese van ribitolfosfaat fragmenten met een bekende moleculaire structuur. Het is mogelijk gebleken om deze ribitolfosfaat fragmenten in voldoende hoeveelheden te verkrijgen voor immunologische studies. Deze verbindingen werden gesynthetiseerd met en zonder *N*-acetyl glucosamine (GlcNAc) residuen en/of *D*-alanine esters (*D*-ala). Het substitutiepatroon van deze fragmenten bestond uit α - en β -GlcNAc residuen op de RboP C-4, β -GlcNAc op de RboP C-3 en *D*-ala esters op de

RboP C-2, naar analogie van het substitutiepatroon van WTAs zoals deze voorkomen in *S. aureus*. De uitgevoerde synthese methode maakte gebruik van fosforamidiet chemie, die eertijds ontwikkeld is voor de synthese van DNA-fragmenten. De syntheses zijn niet alleen uitgevoerd in oplossing maar er zijn ook automatische vaste-drager syntheses ontwikkeld. Verder zijn er ook twee complexe teichoïnezuur fragmenten die voorkomen in *E. faecalis* gesynthetiseerd. Deze fragmenten hebben als repeterende eenheid een *N*-acetyl- β -D-galactosaminyl ribitol fosfaat residu met een α -L-rhamnose vertakking op de C-3 van het galactosamine residu.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de ontwikkelingen in de synthese van goed-gedefinieerde teichoïnezuurfragmenten voor vaccin toepassingen. Dit hoofdstuk behandelt de synthese van teichoïnezuren die voorkomen in de celwand van *S. aureus*, *E. Faecalis*, *E. faecium*, en *Clostridium difficile*. Voor het bestuderen van de biologische activiteit van deze teichoïnezuren is onder andere gebruik gemaakt van micro-arrays, waarmee de affiniteit onderzocht is van de verschillende teichoïnezuurfragmenten met antilichamen in serum.

Hoofdstuk 2 beschrijft de synthese van niet-gesubstitueerde ribitolfosfaat oligomeren met een lengte van drie tot acht repeterende eenheden en voorzien van een 6-amino-hexanol-spacer om verdere biologische studies mogelijk te maken. De bouwstenen, die ontwikkeld werden voor de synthese in oplossing, konden ook worden gebruikt voor de synthese van een octa- en dodecameer met behulp van een automatische vaste-drager synthesizer. Het gesynthetiseerde hexameer is gebruikt om de werking van het recent ontdekte *S. aureus* glycosyltransferase TarP te onderzoeken en heeft het mogelijk gemaakt een kristalstructuur te verkrijgen van het enzym met het substraat om zo de regiochemie van de glycosylering te begrijpen. In een andere toepassingen werden de fragmenten gekoppeld aan magnetische beads, waarvoor de fragmenten eerst werden voorzien van een biotine label. Vervolgens werden de gebiotinyleerde fragmenten enzymatisch geglycosyleerd door gebruik te maken van TarM, TarS en TarP. De geglycosyleerde fragmenten werden vervolgens gekoppeld aan streptavidine-gecoate magnetische beads en daarna toegepast om teichoïnezuur-specifieke IgG antilichamen te detecteren in humaan serum. De methode is een snelle en schone methode om antilichaam levels te meten en biedt de mogelijkheid om de interactie te bestuderen tussen teichoïnezuren en andere relevante biologische samples. De enzymatische glycosylering met behulp van TarS is ook uitgevoerd op grotere schaal waarbij er 0.5 mg geglycosyleerd teichoïnezuur fragment werd verkregen.

Hoofdstuk 3 beschrijft de synthese van een set ribitol fosfaat fragmenten die geglycosyleerd zijn op de C-4 van de RboP repeterende eenheid, met een enkele of dubbele

α - of β -GlcNAc substituent aan de RboP-keten. Met behulp van een micro-array werd de binding onderzocht tussen de geglycosyleerde fragmenten met humaan langerin, een belangrijke receptor die zich bevindt op Langerhans cellen. Daarnaast werden het hexameer en dodecameer (Hoofdstuk 2) enzymatisch geglycosyleerd, gebonden aan magnetische beads, waarmee ook de binding met humaan langerin werd onderzocht. Uit beide technieken is gebleken dat langerin specifiek bindt aan teichoïnezuurfragmenten met de β -GlcNAc configuratie. Tot slot werden er twee trimeren gesynthetiseerd met een enkele α -GlcNAc of β -GlcNAc op de tweede RboP eenheid zonder een spacer. Deze trimeren kunnen worden toegepast voor kristallisatiestudies met langerin en monoklonale antilichamen.

Hoofdstuk 4 beschrijft de synthese van ribitolfosfaat hexameren gemodificeerd met zowel een enkele- als een dubbele β -GlcNAc op de C-3 positie van de repeterende eenheid. Voor de synthese van deze fragmenten werd gebruik gemaakt van zowel oplossings- als vaste-drager synthese. De fragmenten werden verkregen op multi-miligram schaal. Deze fragmenten en de fragmenten uit hoofdstuk 3 zijn volledig gekarakteriseerd met behulp van NMR zodat, ze als referentie kunnen dienen voor structuurbepaling van teichoïnezuuren afkomstig van bacteriële stammen. De gesynthetiseerde teichoïnezuur fragmenten met twee α -GlcNAc of β -GlcNAc groepen werden gekoppeld aan magnetische beads zoals beschreven in hoofdstuk 2. Vervolgens werden de beads gebruikt om binding met anti- α -1,4-GlcNAc monoklonale teichoïnezuur antilichamen (anti- α) en anti-1,4- β -GlcNAc teichoïnezuur antilichamen (anti- β) te onderzoeken. Hieruit is gebleken dat het anti- α -GlcNAc mAb concentratie-afhankelijk en selectief het α -1,4-GlcNAc teichoïnezuurfragment bond. Verder bond het anti- β -GlcNAc mAb concentratie-afhankelijk en selectief zowel het 1,4- β -GlcNAc- als het 1,3- β -GlcNAc fragment. De binding was sterker met het 1,4- β -GlcNAc fragment. De binding met monoklonale antilichamen werd ook onderzocht met de ongesubstitueerde fragmenten en de C-4 α - en β -geglycosyleerde fragmenten met behulp van de micro-array. Uit de resultaten van de micro-array bleek dat de monoklonale antilichamen alleen de teichoïnezuurfragmenten herkennen die een GlcNAc groep dragen. Verder werd bevestigd dat de monoklonale antilichamen heel specifiek aan de GlcNAc configuratie (α of β) binden waartegen ze zijn opgewekt. Een enkele GlcNAc groep was voldoende voor effectieve binding. Zoals verwacht bond het fragment, dat zowel een α - als een β -GlcNAc substituent bevat, aan beide antilichamen.

Hoofdstuk 5 behandelt een syntheseroute naar een teichoïnezuur ribitolfosfaat heptameer met een D-alanine esters op de C-2 positie van twee repeterende eenheden. Om het effect van D-alanine ester modificatie op biologische activiteit te onderzoeken zijn goed gedefinieerde synthetische fragmenten nodig. Uit de synthese is gebleken dat het

erg belangrijk is om de laatste ontschermingscondities licht zuur te houden vanwege de hoge labiliteit van de D-alanine esters. Een specifiek zuiveringsprotocol was nodig om het risico op hydrolyse van de labiele D-alanine esters te voorkomen.

Hoofdstuk 6 behandelt de synthese van twee goed gedefinieerde fragmenten van een specifiek teichoïnezuur dat voorkomt in de celwand van *Enterococcus faecalis*, een Gram-positieve bacterie die onderdeel is van de darmflora van mensen en dieren. *E. faecalis* is onschadelijk voor gezonde mensen, maar bij patiënten met een verminderde afweer kan het ernstige infecties veroorzaken zoals endocarditis, alsook wond- en urineweginfecties. Deze infecties worden behandeld met antibiotica, maar door het grote gebruik heeft dit geleid tot resistente stammen zoals Vancoymicin Resistente Enterococci (VRE). De gesynthetiseerde teichoïnezuur fragmenten zijn opgebouwd uit een -6-[[((GalNAc)- α (3-1)-L-Rha)- β (1-1)-RboP]-repeterende eenheid en voorzien van een 6-aminohexanol-spacer voor toekomstige immunologische studies. De trimeer repeterende eenheid werd opgebouwd doormiddel van een regioselectieve glycosylering tussen een rhamnose donor met een participerende benzoyl groep op de C-2 voor de stereoselective vorming van de α -glycosidische band en een C-3, C-4-diol GalNAc acceptor. De C-4 hydroxyl groep werd vervolgens gemaskeerd met een benzoyl groep, waarna er koppeling plaatsvond met een ribitol acceptor. Het verkregen trimeer werd na de verwijdering van een allyl groep omgezet in een fosforamidiet bouwsteen. Condensatie van het fosforamidiet trimeer met een trimeer alcohol vormde het hexameer fragment. De hydrogenering van het beschermde tri- en hexameer resulteerde in de isolatie van beide doelfragmenten in een relatief lage opbrengst. Dit kan verklaard worden door de gedeeltelijke afbraak van de zuur labiele rhamnose banden door HCl dat gevormd werd bij de reductie van de trichlooracetyl groepen. Desalniettemin zijn de fragmenten in voldoende hoeveelheden verkregen voor toekomstige immunologische studies.

