



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## Synthesis and applications of cell wall glycopolymer fragments from Staphilococci and Enterococci

Berni, F.

### Citation

Berni, F. (2023, October 19). *Synthesis and applications of cell wall glycopolymer fragments from Staphilococci and Enterococci*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3645889>

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/1887/3645889>

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

# Nederlandse samenvatting

Stafylokokken en enterokokken zijn Gram-positieve bacteriën die behoren tot onze natuurlijke bacteriële microbiota. Ze worden beschouwd als onschadelijke commensalen bij gezonde personen, maar onder bepaalde omstandigheden kunnen ze de oorzaak zijn van verschillende infecties en endocarditis, sepsis of peritonitis veroorzaken. Door het wijdverbreide en intensieve gebruik van antibiotica hebben deze bacteriën de afgelopen decennia een hoge resistentie tegen antibiotica ontwikkeld. Om deze reden richt het onderzoek, beschreven in dit proefschrift, zich op de ontwikkeling van alternatieve mogelijkheden om deze bacteriën te bestrijden, waaronder de ontwikkeling van vaccins en monoklonale antilichamen. Het werk gepresenteerd in dit proefschrift richt zich op de synthese van koolhydraatstructuren die kenmerkend zijn voor de celwand van deze bacteriën en de toepassing van methoden om de interactie van deze mogelijke kandidaat-antigenen met geschikte antilichamen te bestuderen.

**Hoofdstuk 1** geeft een algemeen beeld van de belangrijkste polysacchariden die aanwezig zijn op de celwand van *Staphylococcus aureus*. Voor elk van deze worden gebruikte synthesesmethoden beschreven om goed gedefinieerde structuren te verkrijgen en, indien aanwezig, de gerapporteerde immunologische evaluatie. In het bijzonder worden de syntheses van fragmenten van het capsulaire polysaccharide van *S. aureus* type 5 (CP5) gepresenteerd en worden de teichoïnezuren, anionische polyfosfaten die aanwezig zijn in vrijwel alle Gram-positieve bacteriën maar die voorkomen met verschillende moleculaire structuren, geïntroduceerd.

**Hoofdstuk 2** beschrijft de synthese van zowel een trimeer als een hexameer van CP5. Voor de synthese van het hexameer werd een [3+3] benadering gebruikt. Het gebruikte trisaccharide was zo ontworpen dat het een acetylgroep op de anomere positie heeft om het overeenkomstige imidaat te vormen, en een naftylgroep op de C3-positie van het L-fucose 189residu, om na glycosylering een acetylgroep te introduceren, alsmede een silylgroep op de C3-positie van D-mannose voor verlenging. De ontwikkelde strategie maakte het mogelijk om het gewenste trimeer en hexameer te verkrijgen met en zonder de acetylsubstituent op C3-positie van de L-fucose eenheid. Met de aldus verkregen moleculen zal het mogelijk zijn om het effect van de acetyl groep en de lengte van de oligosacchariden op de immunogeniciteit te evalueren.

Lipoteichoïnezuren die in de celwand van stafylokokken en enterokokken worden aangetroffen, zijn opgebouwd uit glycerolfosfaat of

ribitolfosfaat ketens, waarvan de alcohol groepen van de glycerol en ribitol eenheden gebonden kunnen zijn aan enkelvoudige of complexe suikers. Met behulp van eerder gesynthetiseerde teichoïnezuur structuren, op basis van glycerol of ribitolfosfaat eenheden, die verschillen in lengte en type, aantal en positie van de koolhydraat decoratie, is in **Hoofdstuk 3** microarray-technologie ontwikkeld om de interactie van deze moleculen met monoklonale antilichamen of sera efficiënt te evalueren. De toepasbaarheid van deze techniek werd eerst geverifieerd met behulp van een commercieel verkrijgbaar monoklonaal antilichaam, opgewekt tegen de teichoïnezuren van *S. epidermidis*. De verkregen resultaten bevestigden de toepasbaarheid van de techniek, maar lieten ook zien dat het alleen gebruikt kan worden voor kwalitatieve doeleinden, aangezien de gemeten binding niet altijd evenredig was met de verschillende hoeveelheid antigenen die gebruikt was om de antigenen aan te brengen op de microarray objectglasjes. Vervolgens is de kwalitatieve analyse beschreven van meer complexe biologische monsters zoals konijnensera verkregen door immunisatie met geïsoleerde teichoïnezuren van *Enterococcus faecalis* of met een synthetisch conjugaat alsmede met sera van gezonde menselijke proefpersonen.

De eerder verkregen glycerolfosfaat lipoteichoïnezuur fragmenten zijn gefunctionaliseerd met een linker die gepositioneerd is aan de kant van de oligomeren die formeel uit de bacteriewand steekt om zodoende een reeks te genereren met de niet-natuurlijke *sn*-3-GroP-stereochemie. In **Hoofdstuk 4** wordt de bibliotheek uitgebreid door zes hexameren te synthetiseren met de natuurlijke *sn*-1-GroP-stereochemie, die variëren in de positie van de glucose substituent langs de keten. Vanuit synthetisch oogpunt zijn verbeteringen aangebracht in het maken van de geglycosyleerde glycerol bouwsteen. Er is een glycosylering toegepast, waarbij trifenylfosfine oxide en trimethylsilyl jodie zijn gebruikt om de glucosyl donor te activeren en er is waargenomen dat de  $\alpha/\beta$ -selectiviteit van de koppeling wordt beïnvloed door zowel de stereochemie als de beschermgroepen van de glycerol bouwsteen. De binding van de moleculen aan antilichamen werd vervolgens geanalyseerd met behulp van het microarray-systeem dat in het vorige hoofdstuk is beschreven, met behulp van het konijnenserum dat werd gegenereerd door immunisatie met LTA van *E. faecalis* en met het conjugaat vaccin dat was gegenereerd met een geglycosyleerd *sn*-3-GroP hexameer (WH7-BSA). Er werd waargenomen dat de interactie met de antilichamen sterk wordt beïnvloed door de stereochemie van de glycerolfosfaat keten.

Uit eerdere studies is gebleken dat een *sn*-3-GroP-hexameer met een glucose substituent aan het einde van de keten (WH7) in staat is om opsonische

antilichamen tegen zowel stafylokokken als enterokokken op te wekken. Dit synthetische conjugaat werd gebruikt om via het hybridomaproces een monoklonaal antilichaam te genereren. Nadat het monoklonale antilichaam WH7.01mAB was geselecteerd en geproduceerd, werden verschillende technieken gebruikt om de binding aan het doel epitoom te karakteriseren. Microarray-technologie werd gebruikt om de interactie van WH7.01mAB met een relatief grote en gevarieerde bibliotheek van glycerolfosfaat teichoïne-zuren, die in de voorgaande hoofdstukken is gepresenteerd, te onderzoeken. Omdat zelfs structuren die geen glucose substituent droegen werden herkend is de evaluatie van de antilichaam-ligand-interactie verdiept met behulp van analyse methoden zoals ELISA, SPR en STD-NMR. De resultaten van deze analyses lieten zien dat het belangrijkste epitoom dat wordt herkend door het monoklonale antilichaam de glycerolfosfaatketen is en dat de glucose substituent een kleinere rol speelt, maar wel van belang is. In het bijzonder wanneer het glucose residu aanwezig is op de terminale positie van een sn-3-GroP-keten, zoals in het geval van WH7, is de interactie groter dan met het substituentvrije ligand. De hypothese is dat de aanwezigheid van het glucose residu een conformatie van de glycerol fosfaat keten kan induceren die meer lijkt op de vorm die ligand aanneemt in complex met het antilichaam. In de toekomst kan de ontwikkelde methodologie gebruikt worden om een bibliotheek van monoklonale antilichamen te genereren en te evalueren.

Het laatste hoofdstuk beschrijft kort het in dit proefschrift gepresenteerde werk met een overzicht van mogelijke toepassingen en toekomstige implicaties. Met de strategie die in hoofdstuk 2 wordt gepresenteerd, zal het mogelijk zijn om de bibliotheek van fragmenten gerelateerd aan *S. aureus* CP5 uit te breiden, waardoor de synthese van gedefinieerde moleculen met verschillende graden van acetylering mogelijk wordt. De toepassing van de teichoïnezuur microarray kan worden verbreed door gebruik te maken van receptoren van het aangeboren immuunsysteem zoals DC-SIGN en Langerin. Ten slotte is een strategie gepresenteerd voor de synthese van glycerolfosfaten met  $\alpha$ -N-acetylgalactosamine substituenten op de keten.