



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Inhibitors and probes targeting PslG

Ruijgrok, G.

Citation

Ruijgrok, G. (2024, September 12). *Inhibitors and probes targeting PslG*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4083640>

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/1887/4083640>

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

Nederlandse samenvatting

Suikers zijn overal om ons heen. Naast het gebruik als brandstof, spelen suikers een belangrijke rol in veel andere processen. Zo maken bacteriën gebruik van suikers die niet in het menselijke lichaam te vinden zijn om zich te kunnen beschermen tegen bijvoorbeeld antibiotica en het menselijke immuunsysteem.

Suikers hebben over het algemeen 4 of 5 stereocentra waardoor de 3D structuur verandert als een van deze stereocentra verandert. Hierdoor zijn er voor de suikers met 5 stereocentra $32 (2^5)$ verschillende 3D vormen. Suikers kunnen ook nog aan elkaar worden gekoppeld waardoor het aantal mogelijkheden in de 3D structuur exponentieel toeneemt met elke volgende suiker die aan een keten wordt gekoppeld. Dit betekent dat als er slechts 5 suikers aan elkaar worden gekoppeld (vaak zijn het er nog meer) er al $32^5 = 33.554.432$ mogelijkheden zijn. Ook zijn er suikers die stikstof atomen bevatten in plaats van zuurstofatomen, wat de complexiteit verder verhoogt. Met theoretisch een oneindig aantal mogelijkheden, is het van belang dat het opbouwen, afbreken en modificeren van suiker ketens met grote precisie gebeurt.

Glycosidases zijn de enzymen die verantwoordelijk zijn voor het afbreken van suikerketens (ook bekend als oligosachariden), waardoor bepaalde signalen kunnen worden gegeven of suikers worden vrijgemaakt voor brandstof. Doordat er een grote verscheidenheid is aan suikers is er ook een grote verscheidenheid aan glycosidases, welke kunnen worden gevonden in de CAZy database. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich op het onderzoeken van PslG, een glycosidase die tot expressie komt in de bacterie *Pseudomonas aeruginosa*. Deze bacterie kan een biofilm vormen waardoor deze wordt afgeschermd van de omgeving. Hiermee kan *P. aeruginosa* zich beschermen tegen meerdere typen antibiotica en het immuunsysteem. *P. aeruginosa* veroorzaakt vooral infecties bij mensen die een verzwakt immuunsysteem hebben en door het vormen van een biofilm kan dit tot chronische ontstekingen leiden.

P. aeruginosa kan drie verschillende exopolysachariden produceren: alginaat, Pel en Psl. Deze exopolysachariden vormen allen een belangrijk onderdeel van de biofilm. PslG is een glycosidase dat Psl kan afbreken, maar waarom *P. aeruginosa* PslG tot expressie brengt en hoe Psl wordt afgebroken is niet precies bekend. Psl is opgebouwd uit repeterende pentasacharides die bestaan uit D-mannose, D-glucose en L-rhamnose. In de literatuur is voorgesteld dat PslG een mannosidase is, dat tussen een D-mannose en het L-rhamnose residue van de pentasacharide repeterende eenheid knipt.

De precieze plek in Psl waar PslG zou kunnen knippen is eerder onderzocht met behulp van activity based protein profiling (ABPP). ABPP is een methode waarbij alleen enzymen die daadwerkelijk actief zijn reageren met een remmer of probe. Om dit mogelijk te maken, moet de remmer/probe op de juiste manier ontworpen worden zodat die alleen reageert met een actief enzym. Op basis van het in de literatuur voorgestelde mechanisme is er eerder een cyclophellitol-type probe gemaakt gebaseerd op D-mannose. Vervolgens is de inhibitie van PslG door dit molecuul getest met behulp van ABPP, waaruit bleek dat het molecuul PslG niet kon remmen. In dit proefschrift wordt het mechanisme van PslG verder onderzocht met andere op cyclophellitol gebaseerde probes.

In **Hoofdstuk 2** staat de synthese beschreven van drie nieuwe probes om de werking van PslG op te helderen. De electrofiële val die in deze probes ingebouwd zijn, zijn gebaseerd op een D-mannose, D-glucose of L-rhamnose-geconfigureerde cyclophellitol. Daarnaast bestaat elke probe uit drie suikers wat zowel de complexiteit van de synthese als de mogelijke herkenning door PslG verhoogt. Nadat elke potentiële probe was gesynthetiseerd is de inhibitie van PslG door deze probes bepaald door middel van ABPP. Hieruit bleek dat alleen de probe gebaseerd op D-glucose cyclophellitol reageerde met het enzym, wat impliceert dat PslG geen mannosidase maar een glucosidase is. Deze vinding is verder uitgediept in **Hoofdstuk 3**, waar de synthese is beschreven van een pentasacharide en decasacharide gebaseerd op het Psl motief. Vervolgens zijn deze synthetische fragmenten blootgesteld aan PslG om de fragmenten in goed gedefinieerde stukjes te knippen, welke vervolgens met massaspectrometrie geanalyseerd zijn. Doordat de exacte structuur van het substraat bekend was konden de gevonden massa's gekoppeld worden aan specifieke fragmenten, welke allemaal D-glucose aan het reducerende eind hadden, wat bevestigde dat PslG een glucosidase is.

In **Hoofdstuk 4** zijn drie remmers gesynthetiseerd gebaseerd op basis van de structuur van Psl en de glucosidase activiteit van PslG. De eerste gesynthetiseerde remmer is een trisacharide, de tweede een tetrasacharide en de derde een pentasacharide. De activiteit van de remmers is bepaald met behulp van de probe uit Hoofdstuk 2. De pentasacharide remmer is het meest potent, en uit deze resultaten is gebleken dat de vertakte mannose residu van groot belang is voor herkenning door het enzym. Vervolgens is er met de trisacharide en pentasacharide remmers een kristalstructuur gemaakt in complex met het enzym. Op deze manier kon op atomair niveau worden bepaald hoe de remmers aan het enzym binden. Hieruit bleek dat de remmers inderdaad

covalent aan het enzym binden in de verwachte 4C_1 conformatie. Als laatste zijn er in **Hoofdstuk 5** twee niet-covalente remmers gemaakt: een trisacharide en pentasacharide, met een azasuiker op het 'reducerende' uiteinde, die goed aan het katalytische residue in het actief centrum van PslG kan binden. Ook deze remmers zijn met behulp van de probe uit Hoofdstuk 2 getest en hieruit bleek dat de probe zoveel beter bindt aan het enzym dat de activiteit van beide remmers niet bepaald kon worden. Dit komt waarschijnlijk doordat de remmers te weinig affiniteit hebben voor het enzym en dat de gebruikte probe een covalente remmer is.