



Doctoral Thesis

## Structure-activity relationships of complex carbohydrates

**Author(s):**

Hecht, Marie-Lyn

**Publication Date:**

2010

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006199890> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 19220

**Structure-Activity Relationships of  
Complex Carbohydrates**

A dissertation submitted to  
ETH Zurich

For the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES

Presented by  
**MARIE-LYN HECHT**

Dipl. Natw. ETH, ETH Zurich  
January 25<sup>th</sup> 1981  
Citizen of Buchrain (LU)

Accepted on the recommendation of  
Prof. Michael Detmar  
Prof. Peter H. Seeberger  
Prof. Christian Wolfrum

2010

## Abstract

Carbohydrates are a structurally complex class of macromolecules that modulate many cellular processes in addition to providing structural support and supplying energy. Study of the diverse functions of carbohydrates has been hampered by the restricted availability of structurally defined glycans. Access to carbohydrates is limited because there are no amplification methods to generate large quantities of pure glycans to date and the isolation of single molecular species remains challenging. A powerful strategy to overcome these limitations is the chemical synthesis of oligosaccharides. Using chemically synthesized oligosaccharides, the goal of this thesis was to assess the structure-activity relationships of selected structurally complex carbohydrates. Novel techniques such as glycan microarrays and surface plasmon resonance measurements gave profound insight into the interaction of these glycans with proteins, their bioactivity and their immunogenicity.

In the first part of this thesis, a comprehensive testing system was established to assess the insulin-mimetic activity of small molecules. Using this system, a set of synthetic inositol phosphoglycans was examined with regard to their ability to mimic the action of the peptide hormone insulin. Adipose tissue from rat and mouse served as a model system. Preliminary data were acquired by measuring PKB/Akt activation and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. Subsequently, PKB/Akt activation, glucose transport and lipogenesis were monitored in primary adipocytes. In addition, insulin tolerance tests were carried out in non-diabetic and ob/ob mice. None of the inositol phosphoglycans tested induced PKB/Akt phosphorylation, glucose uptake or lipogenesis in adipocytes. Furthermore, none of the inositol phosphoglycans had any effect in *in vivo* insulin tolerance assays. The studies presented here conclusively revealed that none of the tested inositol phosphoglycans have insulin effector functions *in vitro* or *in vivo*, showing that the minimal active inositol phosphoglycan structure remains elusive. These results contradict two

previous reports claiming lipogenic activity of short inositol phosphoglycans in primary adipocytes. Unlike former studies the results presented here are supported by different assays in different rodent animal models.

In the second part of this thesis, the structure-activity relationship of heparan sulfate was assessed. Heparan sulfate constitutes a family of polysaccharides with a variety of different modifications and this structural diversity permits its participation in a number of biological processes. In this thesis, a glycomics approach was chosen to study the interaction of heparan sulfate with the three cytotoxicity receptors of the innate immune systems, NKp30, NKp44 and NKp46D2, and the morphogen Sonic hedgehog. A library of synthetic heparan sulfate oligosaccharides allowed for screening for binding partners, determination of the affinity of the identified interactions and validation of the data in the biological system (in collaboration with A. Porgador, Ben Gurion University of the Negev, Israel). This approach revealed that the three natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46D2 bind to different heparan sulfate epitopes with different affinities. Furthermore, it was found that 2-*O*-sulfation of L-iduronic acid at the non-reducing end of heparan sulfate is a crucial modification for the interaction of heparan sulfate with Sonic hedgehog. This finding was corroborated by *in vitro* and *in vivo* experiments (performed in collaboration with Prof. R. Segal at Harvard Medical School, USA).

Finally, this thesis evaluated whether three different species-specific glycans expressed by *Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile* and *Caenorhabditis elegans*, respectively could serve as a diagnostic tool or form the basis for a vaccine against the respective pathogens. All three oligosaccharides elicited IgG antibody responses in mice when coupled to a carrier protein. Monoclonal anti-glycan antibodies were generated against the three antigens. Further tests on the specificity of these antibodies and challenge studies will be required to evaluate whether the development of a vaccine is feasible.

## Zusammenfassung

Kohlenhydrate sind strukturell komplexe Makromoleküle, die wichtig sind für die Architektur und Energieversorgung der Zelle und ausserdem zahlreiche biologische Abläufe beeinflussen. Die Untersuchung der Funktion von Kohlenhydraten ist schwierig, weil der Zugang zu definierten Glykanen limitiert ist. So gibt es zur Zeit keine Vervielfältigungsmethoden, die grosse Mengen and bestimmten Glykanen liefern könnten. Ausserdem ist die Isolation und Aufreinigung von strukturell identischen Glykanen anspruchsvoll. In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur-Wirkungsbeziehung von komplexen Glykanen unter Verwendung von chemisch synthetisierten Oligosacchariden untersucht. Glykanmicroarray- und Oberflächenplasmonresonanz (SPR)- Messungen haben dazu beigetragen, die Interaktionen dieser Glykane mit Proteinen besser zu verstehen. In zusätzlichen Experimenten wurde die Bioaktivität und Immunogenizität von ausgewählten Glykanen analysiert.

Im ersten Teil dieser Doktorarbeit wurde ein solides Testsystem etabliert um die insulin-mimetische Wirkung von kleinen Molekülen zu ermitteln. Mit diesem Testsystem wurde untersucht, ob ein Satz synthetischer Inositol-Phosphoglykane in der Lage ist, die Wirkung des Peptidhormons Insulin nachzuahmen. Als Modellsystem wurde Fettgewebe von Mäusen und Ratten herangezogen. Erste Erkenntnisse wurden gewonnen, indem die Phosphorylierung von PKB/Akt und der Glukose-Transport in 3T3-L1 Adipozyten untersucht wurde. Anschliessend wurde die insulin-mimetische Wirkung der Glykane auf die Phosphorylierung von PKB/Akt, den Glukose-Transport und die Lipogenese in primären Adipozyten analysiert. Zusätzlich wurden auch *in vivo* Messungen in normalen und diabetischen Mäusen durchgeführt. Die Auswertung der Resultate aller Experimente führte zum Schluss, dass keines der getesteten Inositol-Phosphoglykane insulin-mimetische Wirkung hat. Dieses Resultat widerspricht zwei früheren Berichten, die eine insulin-mimetische Wirkung von zwei der getesteten Inositol-Phosphoglykan-Molekülen belegen. Im Gegensatz zu

diesen früheren Arbeiten wurde in der vorliegenden Arbeit ein umfassendes Testsystem mit verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Experimenten eingesetzt.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit, wurde die Struktur-Wirkungsbeziehung von Heparansulfat untersucht. Die Familie der Heparansulfat-Moleküle zeichnet sich durch eine grosse strukturelle Diversität aus, welche es ihr erlaubt, mit zahlreichen Proteinen zu interagieren und dadurch eine Vielzahl von biologischen Abläufen zu modulieren. In dieser Doktorarbeit wurde die Struktur-Funktionsbeziehung der drei natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren NKp30, NKp44 und NKp46D2, sowie des Morphogens Sonic Hedgehog untersucht. Dazu wurde eine Sammlung von synthetischen Heparansulfat-Molekülen verwendet. Microarray und SPR Experimente ergaben, dass NKp30, NKp44 und NKp46D2 unterschiedliche Heparansulfat-Epitope bevorzugen und mit ungleicher Affinität an Heparansulfate binden (in Zusammenarbeit mit A. Porgador, Ben Gurion University of the Negev, Israel). Für Sonic Hedgehog ergab die Bindungsstudie, dass die 2-O-Sulfatation der Iduronsäuren am nicht-reduzierenden Ende des Heparansulfate-Moleküls wichtig für die Bindung ist. In Zusammenarbeit mit R. Segal (Harvard Medical School, USA) wurden *in vitro* und *in vivo* Tests durchgeführt, die diese Hypothese bestätigt haben.

Schliesslich wurde untersucht, ob artenspezifische Oberflächenglykane von *Bacillus anthracis*, *Clostridium difficile* und *Caenorhabditis elegans* als diagnostische Werkzeuge und/oder Impfstoffe gegen die Pathogene eingesetzt werden könnten. Die Immunisierung von Mäusen ergab, dass jedes einzelne Glykan immunogen ist und eine IgG Immunantwort in den Mäusen auslöst. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden monoklonale Antikörper gegen die einzelnen Antigene hergestellt. Weitere Untersuchungen bezüglich der Spezifität der Antikörper und Impfstudien werden aufzeigen, ob die drei Antigen zur Impfstoffentwicklung herangezogen werden können.