

FORMULÁR RS1

**Ročná správa o riešení projektu
za rok: 2008**

Evidenčné číslo projektu:

Názov projektu: Počítačové modelovanie, syntéza a biologické testovanie selektívnych inhibítorov Golgi manozidázy II

Meno zodpovedného riešiteľa: Mgr. Juraj Kóňa, Ph.D.
--

Prijemca: Chemický ústav SAV Bratislava
--

Začiatok riešenia projektu (MM/RR): 02/07	Koniec riešenia projektu (MM/RR): 12/09
--	--

Rozbor riešenia projektu

Uvedte podľa nasledovnej záväznej osnovy (max. 10 strán):

1. Postup prác pri riešení projektu u prijemcu, ako aj spoluprijemcu podpory APVV vzhľadom na harmonogram riešenia projektu.**1a. Počítačové modelovanie:****Transformácia 24-hod prevádzky multiprocessorových serverov na 64-bitovú architektúru**

V priebehu roku 2008 boli vykonané nasledovné práce s cieľom umožniť realizáciu náročných QM, QM/MM výpočtov a spracovania objemných MD trajektorií a databáz zlúčenín:

- Inštalácia operačného system LINUX 64 (Gentoo) a kompilácia príslušných programových balíkov
- Návrh, zapojenie datového servera so zdieľaným diskovým poľom o veľkosti 5 TB
- Inštalácia a zapojenie ďalších 5 nodov na LINUX 64 výpočtový server
- Inštalácia a migrácia programového balíka ADF na tzv. "Floating type license"
- Návrh a inštalácia elektrickej a datovej siete pre LINUX výpočtové servery
- Inštalácia a odladenie MPI protokolu pre LINUX 64 výpočtové servery.
- Zálohovanie a 24 hod. prevádzka výpočtových serverov
- Optimalizácia knižníc pre výpočtové servery LINUX 64
- Inštalácia progamových balíkov AMBER, GROMACS, ADF, SCHRODINGER, GAUSSIAN a konzultačné služby súvisajúce s používaním daných balíkov
- Inštalácia a optimalizácia PBS servera pre správu veľkého počtu úloh
- Inštalácia 64-bitového grafického servera PALA

Príprava 3D štruktúr manozidáz homológny modelovaním

V priebehu roku 2009 bol vykonaný nasledujúci výskum s cieľom vytvoriť enzýmové modely manozidáz na štruktúrálnej dizajn selektívnych inhibítorov Golgi manozidázy II:

- párová a multipárová sekvenčná analýza Golgi manozidáz zo skupiny EC 3.2.1.114 a lyzozomálnych manozidáz zo skupiny EC 3.2.1.24 (programy EMBOSS a ClustalW2, GeneDoc)

- vytvorenie štyroch trojdimenzionálnych (3D) štruktúr Golgi manozidáz zo skupiny EC 3.2.1.114 [ľudskej Golgi manozidázy IIx (hGMx), myšacej Golgi manozidázy II (mGM), podkanej (rGM) a rastlinnej *Arabidopsis* (aGM)] (program Modeller 9v2)
- vytvorenie šiestich 3D štruktúr lyzozomálnych manozidáz zo skupiny EC 3.2.1.24 [myšacej lyzozomálnej manozidázy (mLM), prasačej (cLM), mačacej (fLM) a vinnej mušky drosophila (dlm252, dlm407, dlm408)] (program Modeller 9v2)
- pKa výpočty ionizovateľných funkčných skupín aminokyselín vo všetkých študovaných enzýmoch (program PropKa)

Dokovanie substrátov a inhibítorov do aktívneho centra manozidáz

- hybridné QM/MM výpočty (kvantovo-mechanické/molekulovo mechanické) atómových nábojov v aktívnom mieste enzýmov (aminokyseliny+iónový zinočnatý kofaktor) (program Qsite-Schrodinger)
- príprava dokovacieho gridu pre všetky analyzované enzýmové modely (z homológneho modelovania alebo z kryštálových štruktúr) zahrnutím QM atómových nábojov (program Glide-Schrodinger)
- dokovanie tréningového setu inhibítorov a intaktných substrátov do aktívneho centra enzýmov (program Glide-Schrodinger)

Štruktúrny dizajn inhibítorov manozidáz

- filtrovanie prístupných organických molekúl z databázy ZINC (viac ako 6 miliónov zlúčenín) a následná príprava „Diol-Man“ databázy (ca 47 tisíc zlúčenín) molekúl obsahujúcich diolovú funkčnú skupinu (program Matchmol)
- dokovanie molekúl z Diol-Man databázy do aktívneho centra dGM enzýmu (program Glide-Schrodinger)
- QM výpočty atómových nábojov pre 2000 zlúčenín z Diol-Man databázy s najlepším dokovacím skóre voči dGM (program Jaguár-Schrodinger)
- dokovanie nasyntetizovaných zlúčenín pracovnou skupinou Dr. Marchalína a Dr. Siriwardenu a následné návrhy na ich štruktúrnu modifikáciu s cieľom zvýšenia potencie a selektivity

1b. Organická syntéza

Organickí chemici nie sú spoluriešitelia APVV projektu ale v rámci našej medzinárodnej a inštitucionálnej spolupráce pripravujú zlúčeniny pre APVV projekt [organická syntéza financovaná z vlastných zdrojov Dr. Siriwardenu (Univerzita v Amiens) a Dr. Marchalína (STU Bratislava)]. Dané pracovné skupiny poskytli do projektu v priebehu roka 2008 nasledovné zlúčeniny:

- boli pripravené deriváty UDII (7,8-dihydroxyhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrimidín-6(7H)-ónu) substituované 3-aminopropylou a 3-acetamidopropylou funkčnou skupinou v polohe N1 pracovnou skupinou Dr. Siriwardenu (plánované syntézy derivátov UDII substituované v polohe C2 neboli zatiaľ uskutočnené vzhľadom na vážne zdravotné problémy Dr. Siriwardenu a chýbajúce pracovné kapacity v jeho skupine v roku 2008)
- na 14 nasyntetizovaných nových indolizidínových derivátoch s fuzovanými aromatickými kruhmi pracovnou skupinou Dr. Marchalína (publikovaných *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, *19*, 467; *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 697; *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4743) boli testované biologické aktivity voči dLM408 (IC₅₀ a K_i pre vyselektované inhibítory)

1c. Molekulárna biológia

Vitálnym cieľom projektu bolo klonovanie, expresia a charakterizácia manozidáz geneticky modelového organizmu: *D.melanogaster*, ako základnej podmienky *in vitro* testovania potencie a selektivity inhibítorov glykozyl hydroláz-manozidáz, ktoré vykazujú rôznu špecifitu k prirodzenému substrátu. Na základe proteínovej podobnosti a uplatnením už skôr publikovaných údajov o proteínovej sekvencii hovädzej a ľudskej lyzozomálnej

manozidázy identifikovali sme v genomickej databáze *D. melanogaster* sedem putatívnych foriem lyzozomálnych manozidáz s kódovým označením /NP723591.1 , NP609408.1*, NP 609252.1*, NP 609253.1, NP 609250.1, NP 609251.1, NP 609407.1*/ a dve formy kódujúce Golgi- typ manozidáz /s označením NP524291.2-opísaná ako α dGMII a putatívnu formu NP650494.2 označenú ako dGM IIb /. Na základe ich proteínovej podobnosti /ClustalW a analýza fylogenetického stromu (TreeTop)/ pre ďalšiu charakterizáciu boli selektované cDNA s označením NP 609407.1* , NP 609252.1* a NP650494.2 / pracovne označenie dLM 407, 252 a dGMIIb/. cDNA s označením NP609408.1* /LM 408/ bola klonovaná a charakterizovaná už skôr /správa za 2007/. Korešpondujúce úseky cDNA , ktoré predstavujú kódovanie solubilnej formy enzýmu boli klonované do expresného vektora pPICZa His/FLAG pod kontrolu AOX1 indukovateľného promotóra.

Klonovanie lyzozomálnych manozidáz a Golgi manozidázy IIb z *D. melanogaster*

Pre amplifikáciu a ďalšiu modifikáciu relevantných cDNA bola použitá celková cDNA pripravená už skôr pri klonovaní dLM408 z *D. melanogaster* /typ Canton S/.

Úsek génu kódujúci solubilnú časť enzýmu dLM407, 252 a dGMIIb /z N-terminusu 15-34 aminokyselinových zvyškov LM a CT domény Golgi enzýmu / bol klonovaný do linearizovaného, pre účely purifikácie proteínu modifikovaného vektora pPICZa His/FLAG a transformovaný do bakteriálneho hostiteľa DH5alpha /His- a FLAG –affi peptidy tvoria N-terminálny koniec fúzaného rekombinantného enzýmu/. Metódou elektroporácie bol amplifikovaný rekombinantný plazmid transformovaný do hostiteľa *P. pastoris* a všetky pozitívne klony skrinované na prítomnosť transgénu a produkciu rekombinantného enzýmu.

Heterológna expresia rekombinantných manozidáz z *D. melanogaster* v *P. pastoris*

Homológy rekombinantných manozidáz / dLM 407, 252 a dGMIIb, pozn: kódujúca DNA sekvencia overená sekvenčnou analýzou/, boli indukované-sekrétované hostiteľským systémom za selekčných podmienok do kultivačného média a podrobené enzymovej analýze v prítomnosti pNP-alpha-mannopyranozidu ako syntetického substrátu.

Bioinformatická a biochemická analýza rekombinantných manozidáz klonovaných z *D. melanogaster*

Porovnaním predikovaných proteínových sekvencií /ClustalW, Genedoc /boli identifikované konzervatívne úseky typické pre lyzozomálne- a Golgi -typ manozidázy rodiny GH -38 / štruktúrna oblasť proteínu –potencionálne glykozylačné miesto pre fosforyláciu manózy , konzervatíva cysteínov, peptidový motív s katalytickým nukleofilom/

V ďalších experimentoch boli rekombinantné enzýmy podrobené molekulárno-biochemickej charakterizácii: produkcia, stabilita, určenie pH- a teplotného optima katalýzy, vplyv kovových iónov na aktivitu. Základný enzymový parameter, K_m -hodnota k syntetickému substrátu pNP mannopyranozid-u/ grafické vyjadrenie podľa Lineweaver–Burk-a/ predstavuje pre dLM 408: 2,03mM, dLM407: 1,87mM a dLM252:1,13mM, dGMIIb: 0,83 mM.

Inhibícia rekombinantných lyzozomálnych manozidáz a dGM IIb v prítomnosti komerčných, glykoprotein-procesujúcich inhibítorov /Swainsonine, Mannostatin A/. Testovanie sa uskutočnilo za štandardných podmienok optimálnej reakcie k substrátu pNP-alpha-mannopyranozidu v prítomnosti nano- a mikromolárnej koncentrácie inhibítorov. Hodnoty IC_{50} a inhibičné konštanty / K_i / pre rekombinantné enzýmy boli určené z grafického priebehu poklesu relatívnej aktivity, resp. výpočtom z grafického vyjadrenia podľa Dixon. Kým inhibičný účinok k testovaným enzýmom, vyjadrený hodnotami IC_{50} a K_i pre Swainsonine predstavuje oblasť nanomolárnych koncentrácií : IC_{50}/K_i (pH5.2) pre dLM408 =12/6,4nM, dLM407=60/62,5nM, dLM252=145/92,5 nM; v prípade Mannostatínu A bol tento posunutý do mikromolárnej oblasti: IC_{50}/K_i (pH5.2) pre dLM408 =3/3,6 uM, dLM407=3/1,13uM,

dLM252=15/12 uM/. Signifikantná inhibícia sa prejavila v prípade testovania aktivity rekombinantnej dGMIIb v prítomnosti Mannostatínu A :Ki (pH5,8) = 80nM.

Inhibícia dLM 408 v prítomnosti analógov „SAV“

Séria 14 analógov syntetizovaných partnerom na STUBA /prof. Marchalin/ bola v prvej fáze experimentov testovaná k rekombinantnej lyzozomálnej manozidáze dLM408 za definovaných reakčných podmienok. Testovanie pri pH- optime enzýmu /5.2/ bol pozorovaný inhibičný účinok enzýmu v prítomnosti dvoch analógov: SAV -19 /cca 8%/ a SAV- 31 /36%/ . Inhibičný účinok výrazne vzrástol v závislosti od pH prostredia reakcie, vyjadrené v IC50 /pH5.2/=1200uM a /pH6.5/ =200uM , resp. V oboch prípadoch analógy predstavujú reverzibilný typ inhibítora v kategórii kompetitívnej, prip. zmiešanej inhibície.

Inhibícia dLM 408 v prítomnosti MZSELAL 65

Analóg UDII inhibítora bol syntetizovaný partnerom v lab Dr. Siriwardenu , štruktúrne predstavuje konjugované heterocykly, pôvodne pripravený ako inhibitor galaktózy –mutázy. Hodnoty IC50 výrazne varírovali v závislosti od reakčného pH prostredia: zvyšovaním pH: 4,2>6,5 hodnota IC50 klesala 2000> 200µM.

2. Rozbor výsledkov riešenia vzhľadom na stanovené ciele.

2a. Počítačové modelovanie

Transformácia 24-hod prevádzky multiprocessorových serverov na 64-bitovú architektúru

V priebehu roku 2008 boli dokúpené ďalšie nody s procesormi, čím celková výpočtová kapacita multiprocessorového klastra presiahla 200 procesorov. Transformácia na 64-bit architektúru umožnila realizáciu náročných výpočtov a spracovania objemných analýz vyžadujúcich použitie viac ako 2GB fyzickej pamäti na jeden výpočtový proces. Konkrétne sa jednalo o spracovanie objemnej (50 GB) databázy zlúčenín ZINC, analýz z MD simulácii (homológne modely manozidáz) a hybridné QM/MM výpočty (optimalizácia aktívneho centra, výpočty QM atómových nábojov). Ďalej na tieto účely boli dané do prevádzky grafický a dátový server.

Príprava 3D štruktúr manozidáz homológnym modelovaním

K homológnym modelom ľudskej Golgi manozidázy (IGM) a lyzozomálnej manozidázy (hLM) vytvorených v prvej fáze projektu (2007), boli v druhej fáze vytvorené aj 3D homológne modely príbuzných enzýmov ku Golgi (skupina EC 3.2.1.114) a lyzozomálnej manozidáze (skupina EC 3.2.1.24). Konkrétne sa jednalo o enzýmy s dostupnými aminokyselinovými sekvenciami: ľudská Golgi manozidáza IIx (hGMIIx), myšacia Golgi manozidáza II (mGM), podkania (rGM), rastlinná *Arabidopsis* (aGM), myšacia lyzozomálna manozidáza (mLM), prasačia (cLM), mačacia (fLM) a drosophila (dLM252, dLM407 a dLM408). Cieľom tohoto modelovania bolo potvrdiť identitu dvoch aminokyselín Tyr a Ser v sekvencii Pro265-Phe266-Tyr267-Ser268 (číslovanie podľa kryštálovej štruktúry drosophila Golgi manozidázy (dGM)) v aktívnom mieste u príbuzných enzýmov Golgi manozidázy. Podobne pri príbuzných enzýmoch lyzozomálnej manozidázy sa tiež jednalo o overenie zachovania dvoch aminokyselín Met a Asn v sekvencii Leu257-Pro258-Asn259-Met260 (číslovanie podľa kryštálovej štruktúry hovädzej lyzozomálnej manozidázy (bLM)). Aj keď superpozícia 3D štruktúr oboch skupín enzýmov poukazuje na identické umiestnenie hlavného reťazca daných sekvencií, štruktúra ich bočných reťazcov môže meniť väzobné vlastnosti komplexu enzým:ligand (alebo enzým:inhibítora) v prípade, že sa nezachováva identita hore uvedených aminokyselín. Na základe homológneho modelovania bol navrhnutý 3D model pre dizajn selektívnych inhibítorov ľudskej Golgi manozidázy II (viac detailov v sekcii Štruktúrny dizajn inhibítorov manozidáz). Sekvenčné porovnanie a homológne modelovanie bolo uskutočnené pomocou programu Modeller 9v2. Multisekvenčná analýza bola uskutočnená

pomocou programu ClustalW2. Vizualizácia 3D štruktúr a ich superpozícia bola uskutočnená programom VMD 1.8.6. Výsledky poukazujú na zachovanie Tyr-Ser sekvencie u všetkých študovaných Golgi manozidáz. Naopak u lyzozomálnych manozidáz Asn-Met sekvencia v bLM nie je identická pre ostatné študované lyzozomálne manozidázy a mení sa nasledovne: Asn-Asn (mLM a cLM), Asn-Ile (fLM), Asn-Gly (hLM), Asn-Phe (dLM252), Asn-His (dLM407) a Asn-Asn (dLM408). Na základe týchto výsledkov bol navrhnutý model pre dizajn selektívnych inhibítorov Golgi manozidázy II, v ktorom by mala byť selektivita inhibítorov založená na ich špecifickej interakcii so sekvenciou Tyr-Ser v hGM. Simultánne by mal daný selektívny inhibítor mať nepreferujúcu interakciu so sekvenciou Asn-Gly v hLM. Keďže Tyr-Ser je identická u všetkých študovaných Golgi manozidázach ako štrukturálny model bola použitá kryštalová štruktúra dGM (PDB ID: 3BLB). Pre dokovanie do lyzozomálnej manozidázy bol použitý homológný model hLM (so sekvenciou Asn-Gly).

Dokovanie substrátov a inhibítorov do aktívneho centra manozidáz

Pomocou QM/MM výpočtov (DFT-M05-2X/OPLS2005) boli upresnené geometrie aktívnych centier príslušných homológných modelov a atómové náboje na presnejší opis elektrostatických interakcií. Ako najdôležitejšie sa ukázalo umiestnenie a nábojové rozloženie na iónovom zinočnatom kofaktore. Oproti formálnemu náboju +2 (OPLS2005) sa jeho hodnota upravila na +1.3 (DFT-M05-2X, neobsadené aktívne miesto enzýmu) a +0.7 (DFT-M05-2X, obsadené aktívne miesto enzýmu inhibítorom swainsonínom). Zmena náboja na kofaktore indukovala významne aj zmenu atómových nábojov na enzýme a ligande. Dané výsledky poukazujú, že na presnejší opis väzbovej afinity medzi enzýmom a ligandom okrem korigovaného deskriptora elektrostatických interakcií bude nevyhnutné definovať deskriptor na charge-transfer interakcie medzi kofaktorom a ligandom. Na dokovanie organických zlúčenín do aktívneho miesta manozidáz boli použité enzýmové modely s QM atómovými nábojmi napočítanými pre enzýmy s neobsadenými aktívnymi miestami. Dokovanie tréningového setu malých organických zlúčenín (inhibítory zo známymi inhibičnými konštantami a kryštalovými komplexami manozidáza:inhibítor) poukázali na identický (alebo veľmi podobný) spôsob viazania sa do aktívneho miesta pri oboch typoch manozidáz (GM versus LM), čo je v súlade s experimentami, že dané inhibítory nevykazujú významnú selektivitu voči Golgi manozidáze II. Podobné výsledky boli nájdené aj pri dokovaní intaktných substrátov veľkosti do troch manozových jednotiek. Substrátová špecificita sa začala prejavovať až po zahrnutí GlcNAc (N-acetylglukózamín) jednotky do substrátu, kde bola zaznamenaná interakcia substrátu s Tyr267 (Tyr267 je diskutovaný v sekcii Príprava 3D štruktúr manozidáz homológnym modelovaním). Tieto výsledky ďalej potvrdzujú navrhnutý model pre štrukturálny dizajn selektívnych inhibítorov založený na špecifickej interakcii medzi inhibítorom a tyrozínom v Golgi manozidáze II.

Štrukturálny dizajn inhibítorov manozidáz

Pomocou programu Matchmol bola z databázy ZINC (viac ako 6 milionov zlúčenín) vyfiltrovaná databáza zlúčenín DIOL-MAN (ca 47 tisíc zlúčenín), ktoré obsahujú vo svojej štruktúre diolovú skupinu OH-CH(R)-CH(R)-OH. Ako kritérium bola vybraná diolová skupina, keďže korelácia geometrie kryštalových štruktúr dGM:inhibítor s inhibičnými konštantami poukázala na jej nevyhnutnú prítomnosť v štruktúre aktívneho inhibítora. Zlúčeniny z DIOL-MAN databázy boli dokované do aktívneho miesta dGM (detaily enzýmového modelu opísané v sekcii Príprava 3D štruktúr manozidáz homológnym modelovaním). Analýza a vyhodnocovanie výsledkov z DIOL-MAN databázy prebieha a bude ukončené v poslednej fáze projektu v roku 2009 spolu s analýzou Cambridge Structural Database (CSD). Komerčne dostupné zlúčeniny s predpovedanou aktivitou budú testované voči Golgi a lyzozomálnej manozidáze.

Pomocou programu Glide boli dokované nasyntetizované swainsonínové mimetiká pracovnými skupinami Dr. Siriwardenu (Univerzity Amiens) a Dr. Marchalína (STU Bratislava). Boli navrhnuté nasledovné modifikácie: substitúcia UDII inhibítora do polohy C2

hydrofóbnou funkčnou skupinou (fenylová a etenylová) s krátkym reťazcom (2-3 atómy konfigurácie -C-C-, -C-O-, atď.) a substitúcia SAV-31 inhibítora do polohy 7 hydrofóbnou funkčnou skupinou [alylová (SAV-31A1) alebo 2-butenylovou (SAV-31A2)]. Podľa predpovede programom Glide by dané funkčné skupiny mali zvýšiť väzbovú afinitu a selektivitu vďaka špecifickej hydrofóbnej interakcie s Tyr267 u hGM.

2b. Organická syntéza

Pre 14 nasyntetizovaných štruktúr pracovnou skupinou Dr. Marchalína (viac informácií na ich syntézu: *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 467; *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 697; *Tetrahedron* **2005**, 61, 4743) boli uskutočnené testovania biologickej aktivity voči hLM408 (IC₅₀) kde jedna zlúčenina vykazovala aktivitu (200 μM pH=6.5). 2 deriváty zlúčeniny UDII pripravené pracovnou skupinou Dr. Siriwardenu vykazovali aktivitu voči hLM408 (IC₅₀) na milimolárnej úrovni.

2c. Molekulárna biológia

Klonovanie, expresia a charakterizácia manozidáz z *D. melanogaster*

V priebehu uplynulého roka sme klonovali a ďalej charakterizovali nové manozidázy lyzozomálneho typu / dLM 407-950aa, dLM 252-982aa/ a Golgi-ho typu / dGMIIb - 1249aa/, ktoré spolu s dLM 408 -1080aa na úrovni proteínov sú homológne s ľudskou a hovädzou lyzozomálnou manozidázou a ľudskou manozidázou Golgi-ho typu /hGMIIx/.

Klonované lyzozomálne manozidázy podľa determinovaných molekulárno -biologických a biochemických údajov, patria do širokej skupiny glykozyl hydroláz rodiny GH -38. Predstavujú nové, enzymaticky aktívne manozidázy, ktoré rozšírili rodinu glykozyl hydroláz prvýkrát klonovaných a charakterizovaných z tohto modelového organizmu. Katalyticky aktívna manozidáza Golgi-ho typu / dGMIIb/ predstavuje homológ ľudskej manozidázy /hGMIIx /. Enzýmy s rôznou špecificitou /a lokalizáciou v bunkách/ predstavujú *in vitro* experimentálny model testovania potentnosti a selektivity analógov inhibítorov. Preselekciami analógov testovaných k rekombinantným manozidázam takto vytvára aj predpoklad ďalšieho komplexného štúdia inhibície glykozylačného procesu *in vivo* eukaryotického modelového systému- od *D. melanogaster* odvodenej S2 bunkovej kultúry.

cDNA, ktorá kóduje Golgi manozidázu II z *Drosophily melanogaster* / homológ ľudskej hGMII/ je v procese modifikácie kódujúcej časti na heterológnu expresiu v *Pichia pastoris*.

/Ako komplementárny cieľ v testovaní potentnosti a selektivity inhibítorov pripravujeme expresiu ľudských rekombinantných manozidáz (po úspešnom klonovaní , žiaľ neúspešnej expresii v systéme *Pichia pastoris*) v novom expresnom eukaryotickom systéme- S2 bunkách.

Inhibícia rekombinantných lyzozomálnych manozidáz a dGM IIb v prítomnosti komerčných, glykoprotein-procesujúcich inhibítorov /Swainsonine, Mannostatin A/

Izoformy lyzozomálnych manozidáz vykazujú napriek podobnosti niektorých biochemických parametrov /pH optimum katalýzy, citlivosť voči kovovým iónom, Km- hodnoty/ a podobnosti na úrovni proteínu /percento identity-podobnosti/ rozdiel vo „vnímavosti“ na prítomnosť inhibítora čo pravdepodobne poukazuje na ich štruktúrnu heterogenitu mikroprostredia katalytického miesta.

Inhibícia rekombinantnej manozidázy dLM408 novými analógmi inhibítorov “SAV“ a “UDII”

Doterajšie inhibičné testy ukázali , že nosyntetizované /nekomerčné/ analógy vykazujú inhibičný efekt v mikromolárnej oblasti. Ďalšie štúdium topológie aktívneho miesta manozidáz formou dockovania analógov a modifikácia testovaných analógov vytvára predpoklad modulácie ich potentnosti a selektivity.

3. Upresnenie harmonogramu prác a cieľov na nasledujúci rok.

3a. Počítačové modelovanie

V priebehu budúceho roku 2009 sa predpokladajú nasledovné výskumné aktivity:

- spracovanie a dokončenie analýzy Diol-Man databázy zlúčenín
- filtrovanie CSD databázy s cieľom doplniť Diol-Man knižnicu, ktorá zatiaľ obsahuje len selektované zlúčeniny zo ZINC databázy
- dokovanie Diol-Man databázy zlúčenín do aktívnych miest dGM a hLM enzýmov. V prípade nájdenia komerčne dostupných zlúčenín vykazujúcich dokovacie skóre na úrovni swainsoninu alebo zlúčenín interagujúcich preferenčne s Tyr267, budú dané látky objednané a testovaná ich biologická aktivita a selektivita voči obojmu dGM a hLM manozidázam
- vytvorenie QSAR modelu na predpoveď selektivity inhibítorov Golgi manozidázy
- štruktúrna charakterizácia tranzitného stavu pre systém dGM:intaktný substrát na QM/MM úrovni
- príprava výsledkov na publikáciu (planujeme v priebehu roku 2009 zaslať 2 publikácie týkajúce sa počítačového modelovania manozidáz:

J. Kóňa, I. Tvaroška "Comparative DFT study on the α -glycosidic bond in reactive species of galactosyl diphosphates", *Chem. Pap. - Chem. Zvesti*, poslané

J. Kóňa, I. Tvaroška, A. Nawara, S. Kozmon, I. Tomčová, J. Mucha, P. Both, "Theoretical study on Golgi and lysosomal α -mannosidases II: Insights from homology modeling, docking and pK_a calculations", *Proteins*, rozpracované

3b. Organická syntéza

Organickí chemici spolupracujúci v APVV projekte nie sú jeho spoluriešitelia [organická syntéza financovaná z vlastných zdrojov Dr. Siriwardenu (Univerzita v Amiens) a Dr. Marchalína (STU Bratislava)] a vzhľadom na pretrvávajúce vážne zdravotné problémy Dr. Siriwardenu a Dr. Šafára, nevieme v súčasnom stave presne odhadnúť progres pre organickú syntézu na rok 2009. Po vzájomnej dohode by mali dané pracovné skupiny poskytnúť na testovanie v priebehu roka 2009 znovu nasyntetizovaný inhibítor SAV-31 na potvrdenie nameranej biologickej aktivity voči obojmu dGM a hLM manozidázam a na kryštalografické merania komplexu dGM:SAV-31. Kryštalografické merania by mala uskutočniť spoluriešiteľka APVV projektu Dr. Tomčová v laboratóriu Dr. Roseho na Univerzite v Toronte v priebehu budúceho roku. Očakáva sa, že sa dokončia rozbehnuté syntézy počítačovo navrhnutých dvoch derivátov SAV-31, a to SAV-31A1 a SAV-32. Pre dané látky budú merané ich biologické aktivity a uskutočnené kryštalografické merania komplexov enzým:ligand. Syntéza UDII derivátov so substitúciou na C2 a plánovaného manostatínového derivátu MANSWA je zatiaľ otvorená vzhľadom na horeuvedené zdravotné problémy členov pracovných skupín organickej syntézy.

3c. Molekulárna bioógia

Definovať enzýmovú špecifitu klonovaných lyzozomálnych manozidáz použitím natívneho substrátu Man8(9)-tripeptidu v spolupráci s Viedenským laboratóriom BOKU univerzity /MALDI-TOF analýza reakčného produktu/.

Príprava rekombinantnej dGMII expresiou/indukciou v *Pichia pastoris*, a v spolupráci s Viedenským laboratóriom transfekciou v *Drosophila expresnom systéme*.

Pokračovať v testovaní inhibičného účinku analógov, najmä SAV-31 a jeho derivátov k dLM407, dLM252, dGMII a dGMIIb. V prípade úspešnej expresie aktívnych foriem ľudských manozidáz zaradiť tieto do testovacích experimentov.

Pripravovaný manuskript: I.B. Wilson, I. Tomčová, S. Šesták, J. Kóňa, I.Tvaroška, J. Mucha,“

Cloning , expression and characterisation of four different lysosomal mannosidases from *D. melanogaster*", *Glycobiology Journal*, rozpracované

Príloha: **Zoznam výstupov a prínosov projektu** – formulár „VPP“

Potvrdzujeme, že údaje uvedené v správe a jej prílohách sú pravdivé a úplné.

Podpis:.....
zodpovedný riešiteľ

Podpis:.....
štatutárny zástupca

Dátum: 29.1.2009

Pečiatka