

FORMULÁR ZS1**Záverečná správa o riešení projektu****Evidenčné číslo projektu:** 011706**Názov projektu:** Počítačové modelovanie, syntéza a biologické testovanie selektívnych inhibítorov Golgi manozidázy II**Meno zodpovedného riešiteľa:** Juraj Kóňa**Príjemca:** 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 za posledný rok u príjemcu, ako aj spolupríjemcov podpory APVV vzhľadom na harmonogram riešenia projektu**1a. Počítačové modelovanie****Zefektívnenie vedeckých výpočtov na multiprocesorových serveroch**

V priebehu roku 2009 boli vykonané nasledovné práce na zefektívnenie vedeckých výpočtov:

- Rozšírenie pamäťovej kapacity pre každý výpočtový nód na 16 resp. 32 GB RAM
- Rozširovanie diskovej kapacity výpočtových nódov až na 4.5 TB a s tým súvisiaca konfigurácia diskového poľa, optimalizácia výkonu a porovnanie benchmarkových testov pre I/O výkon.
- Zabezpečenie diskovej redundancie centrálne zdieľaného diskového poľa tvoreného 12x320GB SAS. Konfigurácia automatického dopĺňovania degradovaného poľa a systému včasného varovania zlyhania diskov.
- Inštalácia a konfigurácia 2 ks nízkolatenčných sieťových kariet Infiniband, kompilácia príslušných ovládačov do systémového jadra, kompilácia príslušných modulov do LAM-MPI a OPENMPI programov a ich implementácia do programov AMBER a GROMACS. Testovanie a porovnávanie benchmarkových testov pre rýchlosť komunikácie prostredníctvom týchto kariet na MPI úrovni.
- Konfigurácia SMTP servera na centrálnom počítači pre automatické zasielanie notifikácii užívateľom o stave ich výpočtov.
- Inštalácia a konfigurácia dátového servera o celkovej kapacite 3.7 TB pre účely archivácie a zálohovania dát súvisiacich s výskumnými úlohami, programového vybavenia a systémových záloh z výpočtového klastra. Optimalizácia diskového poľa a zabezpečenie automatickej detekcie chybných diskových jednotiek.
- Inštalácia a konfigurácia firewall-u pre bezpečnosť a zrýchlenie dátovej komunikácie v rámci výpočtovej skupiny.

Štruktúrálny dizajn inhibítorov manozidáz.

Bol dokončený virtuálny skrínig pre organické molekuly z databázy ZINC (skupina Everything, viac ako 21 milión. zlúčenín, marec 2009), z ktorej bola vytvorená cieľená knižnica zlúčenín s pracovným názvom "Diol-Man-ZINC" (cca 50 tisíc zlúčenín). Ďalej bola filtrovaná CSD databáza (Cambridge Structural Database, set Organic compounds, viac ako 200 tisíc zlúčenín, marec 2009), z ktorej bola vytvorená cieľená knižnica zlúčenín s pracovným názvom "Diol-Man-CSD" (cca 4400 zlúčenín). Obidve vytvorené databázy boli preformátované pre spracovanie programami v balíku Schrodinger a boli pre ne počítané ADME vlastností pomocou programu Qikprop. Všetky zlúčeniny z Diol-Man databáz boli dokované do aktívnych miest dvoch enzýmov, drosiphila Golgi α -manozidázy (dGM) a ľudskej lyzozomálnej manozidázy (hLM).

Nasyntetizované zlúčeniny pracovnou skupinou Dr. Polákovej (deriváty manózy substituované v polohe 1) ako aj navrhnuté nové deriváty boli dokované do dGM a dLM a vyselektované deriváty s najlepším dokovacím skóre pre ďalšie výskumné úlohy.

K vytvorenému QSAR modelu (viac detailov v správe 2007), ktorý pozostával z 3 deskriptorov na predpoveď selektívnych inhibítorov ľudskej Golgi manozidázy boli korelované ďalšie štruktúralne a chemické deskriptory s K_i a IC_{50} hodnotami dostupných manozidázových inhibítorov s cieľom dosiahnuť presnejší opis interakcie inhibitor-Zn²⁺ iónový kofaktor.

Bol namodelovaný prvý katalytický reakčný stupeň hydrolýzy substátu Golgi α -manozidázou pomocou hybridných QM/MM výpočtov (MO5-2X/6-31G(d,p):OPLS2005) v programe Qsite-Schrodinger. Boli štruktúralne opísané tri reakčné štruktúry systému enzym-substrát: Michaelisov complex, tranzitný stav zániku glykozidovej väzby v substráte a kovalentný intermediát enzym-substrát. Reakčné štruktúry druhého katalytického stupňa, hydrolýzy kovalentného intermediátu, sú vo fáze počítania (predpokladané ukončenie: December 2010-Jún 2011)

- časť napočítaných výsledkov bola spracovaná do štyroch publikácií, z ktorých dve boli zaslané do tlače, ďalšie v stave spisovania:

J. Kóňa, I. Tvaroška "Comparative DFT study on the alpha-glycosidic bond in reactive species of galactosyl diphosphates", *Chem. Papers*, **2009**, 63, 598-607.

S. T. Ali, S. Jahangir, S. Karamat, W. M. F. Fabian, K. Nawara, J. Kóňa "Theoretical Study on the Redox Cycle of Bovine Glutathione Peroxidase GPx1: pK_a Calculations, Docking and Molecular Dynamics Simulations", *J. Chem. Theory Comput.*, **2009**, poslané editorovi

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

U. Das, M. A. A. Mezianne, D. A. Kuntz, H. Strachan, J. Glushka, J. Kóňa, I. Tvaroška, D. R. Rose, K. Moremen, A. Siriwardena, "Rapid Synthesis of a Dihydroxylated Pyrrollopyrimidinone that Inhibits the Human Golgi alpha-Mannosidase II but not its glycosyl hydrolase Family 38 paralog, the broad-specificity Lysosomal alpha-Mannosidase", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, rozpracované

1b. Organická syntéza

Pre 9 nasyntetizovaných zlúčenín (derivátov manózy substituovanej v polohe 1 (viac informácií na štvorstupňovú syntézu: M. Poláková, M. Beláňová, L. Petruš, K. Mikušová, "Synthesis of alkyl and cycloalkyl α -D-mannopyranosides and derivatives thereof and their evaluation in mycobacterial mannosyltransferase assay, *Carbohydrate Research*, **2010**, poslané editorovi) pracovnou skupinou Dr. Polákovej boli uskutočnené testovania biologickej

aktivity (IC_{50}) voči rekombinantným lyzozomálnym dLM408, dLM252, dLM407 a Golgi dGMIIb manozidázam, kde dve zlúčeniny (MP-163 a MP-150) vykazovali aktivitu (2-5mM). Pomocou počítačového dizajnu bol pre aktívne štruktúry navrhnutý nový derivát (MP-150-A1) s cieľom zvýšiť jeho potenciu a selektivitu na mikromolárnu úroveň. Navrhnutá látka bude syntetizovaná v priebehu roku 2010 pracovnou skupinou Dr. Polákovéj.

Ďalej bol testovaný analóg manostatínu TG-01 nasyntetizovaný pracovnou skupinou Prof. Graczu (STU Bratislava) voči dLM408, dGMIIb a „Jack bean“ lyzozomálnej manozidázy.

1c. Molekulárna biológia

Molekulárne klonovanie

V roku 2009 základným cieľom projektu bolo pokračovať v *in vitro* experimentálnom testovaní analógov - inhibítorov v systéme enzýmovej reakcie. Preto, naše aktivity boli zacielené najmä na :

- produkciu rekombinantných manozidáz a ich modifikáciu na proteínovej úrovni ako podmienky ich ďalšej izolácie a purifikácie z kondičného média
- testovanie heterológnych expresných systémov z hľadiska optimálnej produkcie rekombinantných manozidáz

Gén kódujúci manozidázu Golgi-ho typu dGMII (klonovaný z *Drosophila melanogaster* , rekombinantný klon poskytnutý laboratóriom z Univerzity v Toronte – skupinou Dr. Roseho) bol inzerovaný do dvoch rôznych komerčných expresných vektorov:

- kódujúca časť DNA solubilného proteínu bola inzerovaná do expresného vektora *Pichia pastoris* -pPICYalpha His- FLAG (aplikovaný už pri expresii dGMIIb -správa 2008, kde expresia proteínu je riadená AOX1 promótorom). Výsledný DNA rekombinant po transformácii do hostiteľa bol potvrdený na prítomnosť transgénu.

- v spolupráci s Viedenským laboratóriom BOKU Univerzity (Prof. Wilson) bol modifikovaný úsek dGMII inzerovaný do expresného vektora pre tranzientnú expresiu v *Drosophila* expresnom systéme (S2-bunky, DES). Pre expresiu rekombinantnej manozidázy v S2 – bunkách bol úsek kódujúci solubilnú manozidázu klonovaný do expresného vektora pMTBiPHis (expresia riadená Cd^{2+} indukovateľným promótorom). Všetky experimentálne postupy prípravy rekombinantných molekúl zahrňovali metodológiu štandardne vybaveného laboratória: pri príprave modifikovanej DNA a diagnostike, amplifikácii úsekov génu, ligácii DNA úsekov, transfekcii/transformácii rekombinantov, kultivácii a príprave rekombinantných proteínov.

Z dôvodu rozšírenia *in vitro* testovacích možností zameraných na selektivitu inhibície, pokračovali sme v príprave rekombinantných expresných vektorov, ktoré nesú modifikovaný gén kódujúci ľudskú Golgi manozidázu hGMII. Po predchádzajúcej neúspešnej expresii nami klonovanej Hs GMII v systéme *Pichia pastoris* (potvrdená mutácia génu, správa - 2008), bol ľudský homológ Golgi manozidázy poskytnutý laboratóriom v USA (Dr. Michiko Fukuda) a po úprave inzerovaný do expresného vektora pMTBiPHis-Doug (modifikovaný vektor, ktorý kóduje úsek pre fúziu affi- a imuno-peptidov v N-terminálnej časti rekombinantného proteínu) a formou transfekcie inkorporovaný do genómu hostiteľa (S2-buniek).

Ďalšie molekulárno-biologické práce boli zamerané na prípravu modifikovanej rekombinantnej manozidázy dLM408, ktorá v N-terminálnej časti proteínu nesie imunoafinitný peptid (polyhistidin - FLAG-tag). Tento koncový fúzovaný úsek umožní špecifickú detekciu proteínu a zároveň selektívnu purifikáciu na Ni-NTA agaróze, prip. na HisTrap kolone.

Heterológna expresia rekombinantných manozidáz

Metódou elektroporácie boli rekombinantné plazmidy transformované do hostiteľa *P. pastoris* a metódou transfekcie (Effective transfection – QIAGEN) inkorporované do genómu S2-

buniek (DES). Všetky selektované klony boli analyzované na prítomnosť transgénu a produkciu - sekréciu rekombinantného enzýmu. V systéme *P. pastoris* boli rekombinantné proteíny indukované metanolom a sekrétované do kultivačného média za selekčných podmienok. Exprimovaný proteín bol testovaný v prítomnosti pNP-alpha-mannopyranozidu (syntetický substrát manozidáz) na katalytickú aktivitu za štandardných reakčných podmienok. V prípade absencie očakávanej katalytickej aktivity bola prítomnosť proteínu overená Western blotom pomocou špecifických protilátok k imuno-peptidu. V systéme S2-buniek bol rekombinant indukovaný v prítomnosti Cd^{2+} ionov a sekrétovaný do kondičného média. Prítomnosť proteínu bola overená ako v prípade exprese v *P. pastoris*.

Optimalizácia purifikácie rekombinantnej manozidázy dLM408

Pre potreby ďalšej charakterizácie rekombinantnej manozidázy dLM408 bol selektovaný expresný klon *P. pastoris* s relatívne najlepšou produkciou rekombinantu (klon: pPICZalfa His6/FLAG-4). Izolácia a purifikácia proteínu z kondičného média pozostávala z nasledovných krokov:

- frakčná precipitácia proteínu v oblasti $pH=pI$ nasýteným roztokom síranu amónneho.
- dialýza oproti ekvilibračnému roztoku (100mM MES, $pH=6.3$)
- purifikácia na Ni-NTA agaróze, resp. na HisTrap kolóne

Stupeň prečistenia proteínu bol overený SDS-PAGE a imunoblotom použitím anti - FLAG primárnych protilátok a sekundárnych protilátok s viazanou HRP (peroxydáza).

Testovanie inhibície rekombinantných manozidáz *in vitro* (dLMs, dGMIIb a „Jack bean“ /Sigma/)

- Inhibičný účinok analógu SAV-31, v rozsahu koncentrácií: 50-2000 μM , bol testovaný v prítomnosti dGMIIb (homológ ľudskej manozidázy hGMIIx) a syntetického substrátu pNF-mannopyranozidu za štandardných reakčných podmienok. Závislosť inhibičného účinku od pH reakčného prostredia bola študovaná v 100 mM acetátovom pufrí pri $pH=5.4$, 5.8 a 6.5. Hodnoty IC_{50} a K_i boli odvodené z grafického priebehu poklesu relatívnej aktivity enzýmu, resp. výpočtom z grafického vyjadrenia podľa Dixona.

-Inhibičný účinok derivátov manózy (séria 9 produktov označených ako MP-XY), v rozsahu koncentrácií: 100- 5000 μM a komerčne dostupného inhibítora proteínáz NNGH(MMP3-N-isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl)glycylhydroxamic Acid) v rozsahu koncentrácií: 50-1000 μM , sa sledoval k rekombinantným manozidázam dLM408 a dGMIIb, a komerčnej manozidáze „Jack bean“ v prítomnosti syntetického substrátu pNF - manopyranozidu za štandardných reakčných podmienok.

Časť nameraných výsledkov bola spracovaná do dvoch publikácií, z ktorých jedna bola zaslaná do tlače, ďalšia je v stave spisovania:

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*, rozpracované

P. Both, L. Sobczak, C. Breton, S. Hann, K. Nöbauer, K. Paschinger, I. B.H. Wilson, J. Mucha "Distantly-related plant and nematode core $\alpha 1,3$ -fucosyltransferases display similar trends in structure-function relationships", *Glycobiology*, **2009**, poslané editorovi

2. Rozbor výsledkov za celé obdobie riešenia vzhľadom na stanovené ciele

Hlavným cieľom projektu bolo pochopiť vzťah medzi štruktúrou a funkciou ľudskej Golgi a lyzozomálnej α -manozidázy, hlavne ich substratovú špecifitu, aby bolo možné navrhnúť selektívny inhibítor pre hGM, následne ho nasyntetizovať a otestovať jeho biologické účinky. Doposiaľ známe inhibítory hGM, ktoré sa ukázali byť efektívne pri liečbe rakoviny majú

vedľajšie toxické účinky, pretože okrem cieľenej hGM inhibujú aj príbuzný enzým, lyzozomálnu α -manozidázu. Cieľom prvej fázy dizajnu bol návrh inhibítora, ktorý by vykazoval viditeľnú selektivitu (pomer hLM/hGM = 10-100) pričom by si zachovával biologickú aktivitu voči hGM na nano až mikro molárnej úrovni. Na tieto ciele boli vykonané nasledovné úlohy:

2a. Počítačové modelovanie

Multiprocessorový server

V priebehu rokov 2007-2009 bol uvedený do prevádzky multiprocessorový HPC (High Performance Computing) server pozostávajúci z 32 ks Intel serverov (2 CPU x 4-core, spolu 256 CPUs) a ďalšie hardvérové príslušenstvo ako UPS záložný zdroj, dátový a grafický server, klimatizácia (cca 30% financované z projektu APVV). Riešitelia APVV projektu spolu s externými pracovníkmi navrhli softvérovú architektúru a vykonali inštaláciu operačného systému (Linux, distribúcia Gentoo) a chemického softvéru (Schrodinger, Gaussian, ADF, Gromacs, Amber). Výpočtový server je v 24-hod prevádzke a je servisovaný externým administrátorom. Prevádzka serveru bude pokračovať minimálne ďalšie 3 roky s cieľom ukončiť vedecké úlohy v rámci APVV projektu ako aj ďalšie vedecké výpočty v rámci už bežiacich projektov.

Homológne modelovanie 3-D štruktúr enzýmov

Keďže cieľené enzýmy sa nepodarilo k dnešnému dňu vykryštalizovať, boli pripravené na projektové účely 3-D modely hGM a hLM ako aj ich príbuzných enzýmov pomocou programu Modeller. Tieto enzýmové modely boli použité pri dokovaní zlúčenín do katalytických centier a pri virtuálnom skríningu kde bol postavený 3-D E-farmakofór (programami Phase a Glide, Schrodinger).

Trojrozmerné modely hGM a hLM postavené na základe jedného templátu (kryštalové štruktúry dGM alebo bLM) dosahovali požadovanú presnosť v rozsahu celej proteínovej sekvencie (okrem terminálnych residuii) vďaka vysokej identite aminokyselinových rezidui medzi templátom a modelom (38-83 %). Hlavný dôraz sa kládol na dosiahnutie maximálnej geometrickej presnosti aktívneho centra enzýmov (štruktúra cca do 1.5 nm od naviazaného kovového kofaktora, Zn^{2+} iónu). Časť nesprávne umiestnených bočných reťazcov si vyžiadala set niekoľkých po sebe nasledujúcich optimalizačných procedúr spojených s 1 ns molekulovou dynamikou enzýmového systému s naviazaným swainsonínom a kovovým kofaktorom. Konfigurácie bočných reťazcov ionizujúcich aminokyselinových rezidui, ako sú asparágínová alebo glutámová kyselina atď., boli ionizované podľa pK_a výpočtov v Propka programe. Pre hGM pre pH=7 a pre hLM pre pH=5. Tu sa ukázalo, že napriek vysokej podobnosti a identite aminokyselinových rezidui medzi hGM a hLM v aktívnom centre enzýmu, protonizované stavy ich ionizujúcich rezidui nie sú vo všetkých miestach identické. To má za následok, že interakcie manozidázových inhibítora UDII. Tento inhibítora obsahuje aminoskupinu s neštandardne nízkou pK_a hodnotou [$pK_a(QM)$ výpočty] = 6.5 a následne experimentálne merania pK_a = 5.8]. V kyslom prostredí (pH = 5) lyzozomálnej α -manozidázy nesie UDII neutrálnu konfiguráciu aminoskupiny a má preto slabú väzbovú afinitu voči aktívnemu miestu hLM, zatiaľ čo v neutrálnom prostredí (pH = 6.5-7.0) Golgi α -manozidázy je inhibítora s protonizovanou aminoskupinou a vykazuje väzbovú afinitu voči hGM na mikromolárnej úrovni ($K_i=63 \mu M$).

K homológnym 3-D modelom hGM a hLM vytvorených v prvej fáze projektu (2007), boli v druhej fáze (2008) vytvorené aj 3-D 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 Ix (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). Vzájomným porovnávaním štruktúr bolo zistené, že aktívne miesta príbuzných Golgi manozidáz sú sekvenčne aj priestorovo identické (analýza pre rádius menší ako 1.5 nm v okolí Zn^{2+} iónového kofaktora). Naopak študované lyzozomálne manozidázy vykazovali neidentické priestorové usporiadanie niektorých hlavných reťazcov v aktívnom mieste ako aj sekvenciu aminokyselín. Sekvencia Leu257-Pro258-Asn259-Met260 (číslovanie podľa kryštálovej štruktúry bLM) sa nezachovávala pre ostatné študované lyzozomálne manozidázy, kde napr. hLM mala v analyzovanom priestore sekvenciu Leu257-Pro258-Asn259-Gly260 a cieľová hGM Pro350-Phe351-Tyr352-Ser353. Výsledky ďalej poukázali 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 rozdielov ako aj zo štruktúrnych dát dostupných kryštálových komplexov manozidáz s naviazanými nanomolárnymi inhibítormi bol navrhnutý 3-D farmakofórny model pre dizajn selektívnych inhibítorov ľudskej Golgi manozidázy II. Dizajn selektívnych inhibítorov hGM bol zameraný na vývoj štruktúry, ktorá dokáže špecificky interagovať s bočným reťazcom Tyr352 pomocou hydrofóbných interakcií pričom si zachová biologickú aktivitu na úrovni swainsonínu alebo manostatínu. Pre tieto účely boli optimalizované štruktúry látok, ktoré vykazovali v našich inhibičných testoch biologickú aktivitu (viac informácií v sekcii 2b. Organická syntéza)

Virtuálny skrining

Pomocou programu Matchmol boli z databáz ZINC a CSD vyfiltrované databázy zlúčenín Diol-Man-ZINC a Diol-Man-CSD, ktoré obsahujú vo svojej štruktúre diolovú skupinu OH-CH(R)-CH(R)-OH. Ako kritérium bola vybraná diolová skupina, keďže korelácia geometrie kryštálových štruktúr dGM:inhibítor s inhibičnými konštantami poukázala na jej nevyhnutnú prítomnosť v štruktúre aktívneho inhibítora. Zlúčeniny z DIOL-MAN databáz boli dokované do aktívneho miesta dGM ako aj do hLM. Počítačová analýza nenašla v Diol-Man databázach žiadnu štruktúru, ktorá by mala podobnú alebo lepšiu väzbovú afinitu voči dGM ako známe nanomolárne swainsonínové inhibítory. Ďalej bol uskutočnený virtuálny skrining databázy ZINC (skupina All purchasable, viac ako 11 milión. zlúčenín, marec 2009) pomocou vytvoreného 3-D E-farmakofóra. Pre vyselektované zlúčeniny boli počítané ADME vlastnosti pomocou programu Qikprop a uskutočnená ďalšia filtrácia. Výsledná databáza látok bola dokovaná do dGM a hLM. Počítačovou analýzou bolo opäť potvrdené, že v nadokovanej databáze sa nenachádza žiadna štruktúra, ktorá by mala podobnú alebo lepšiu väzbovú afinitu voči dGM ako známe nanomolárne swainsonínové inhibítory.

Štruktúrny dizajn inhibítorov

Presnosť dokovacieho programu Glide bola testovaná na sade cca 40 manozidázových inhibítorov, pre ktoré sme mali prístupné kryštalografické štruktúry v komplexe s dGM. Väčšia časť predpovedaných póz naviazaných inhibítorov (cca 70 %) bola v súlade s experimentom, pričom presnosť predpovedí závisela od viacerých faktorov: správnej konfigurácii ionizovateľných bočných reťazcov aminokyselinových reziduí v aktívnom mieste enzýmu, konfigurácii aminoskupín v inhibítorech, konformácii kruhov pri cyklických štruktúrach inhibítorov a hlavne od parametrizácie atómových nábojov na enzýme a inhibítore. Konfigurácia aminoskupín v inhibítorech bola definovaná na základe ich pK_a hodnôt napočítaných pre vodné prostredie použitím presných kvantovo-chemických výpočtov (DFT-B3LYP) v programe Jaguar. Atómové náboje na enzýme a kovovom kofaktore (Zn^{2+}) boli počítané pomocou hybridnej QM/MM metódy (DFT-M05-2X/6-31G(d,p):OPLS2005) v programe Qsite. Dramatická redistribúcia nábojov (cca až do 30 %) oproti štandardne používaným atómovým nábojom parametrizovaných pre molekulovú mechaniku bola zaznamenaná pre atómové náboje na Zn^{2+} ióne a aminokyselinách priamo s ním interagujúcich.

Dokovanie tréningového setu malých organických zlúčenín (inhibítory so známymi IC_{50} alebo K_i hodnotami a kryštalovými komplexami manozidáza:inhibítory) 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 manózových jednotiek. Substrátová špecificita sa začala prejavovať až po zahrnutí GlcNAc (N-acetylglukozamín) jednotky do substrátu, kde bola zaznamenaná interakcia substrátu s Tyr267. Tieto výsledky ďalej potvrdzujú navrhnutý model pre štrukturálny dizajn selektívnych inhibítorov založený na špecifickej interakcii medzi inhibítorom a tyrozinom v Golgi manozidáze II.

QSAR model na predpoveď väzbovej afinity medzi inhibítorom a GM bol vytvorený z testovacej sady cca 40 inhibítorov s použitím programu Liaison. Presnosť skórovacej funkcie varíovala v závislosti od použitých konfigurácií inhibítorov (neutrálne versus protonizované aminoskupiny) a dokovacích modelov (homológne modely versus kryštalografické štruktúry), kde sa RMS chyba pohybovala v rozmedzí 0.4-0.8 kcal/mol pre predpoveď väzbovej afinity inhibítorov v aktívnych centrách dGM, hGM, bLM a hLM. Na presnejší opis interakcie inhibítor: Zn^{2+} iónový kofaktor boli v priebehu roku 2009 vyvíjané štrukturálne a chemické deskriptory založené na geometrických parametroch koordinácie ligand: Zn^{2+} a charge-transfer a disperzných interakciách medzi ligandom a Zn^{2+} iónom.

Katalytický mechanizmus retenujúcich α -manozidáz

hGM a hLM patria medzi retenujúce glykozylyhydrolázy, pre ktoré bol na základe kinetických meraní a kryštalových štruktúr navrhnutý dvojstupňový mechanizmus cez kovalentný intermediat enzým-substrát. Takýto mechanizmus pozostáva z 5 reakčných štruktúr: Michaelisovho komplexu, tranzitného stavu zániku glykozidovej väzby v substráte, kovalentného intermediatu enzým-substrát, druhého tranzitného stavu hydrolýzy kovalentného intermediatu a produktov enzymovej reakcie. V priebehu roka 2009 bol namodelovaný na QM/MM úrovni (DFT-M05-2X/6-31G(d,p):OPLS2005) prvý reakčný stupeň a štrukturálne charakterizované prvé tri horeuvedené reakčné štruktúry pre enzymový systém dGM. Prvý tranzitný stav (TS1) bol charakterizovaný zanikajúcou glykozidovou väzbou [$d(C1-O1) = 0.216$ nm] a vznikajúcou väzbou medzi substrátom a enzýmom (Asp204) [$d(C1-O_{Asp204}) = 0.244$ nm]. Ďalšou charakteristickou štrukturálnou črtou TS1 bola planarita manózového kruhu v okolí reakčného centra C1 [$\phi(C5-O1-C1-C2) = -6.8^\circ$].

2b. Organická syntéza

Organickí chemici neboli spoluriešitelia APVV projektu ale v rámci medzinárodnej a inštitucionálnej spolupráce pripravili zlúčeniny pre APVV projekt [organická syntéza financovaná z vlastných zdrojov Dr. Siriwardenu (Univerzita v Amiens), Dr. Marchalína (STU Bratislava), Dr. Polákovej (CHU SAV) a Prof. Graczu (STU Bratislava)]. Dané pracovné skupiny poskytli na biologické testovanie (IC_{50} , K_i a pH závislosť voči manozidázam) v priebehu rokov 2007-2009 nasledovné zlúčeniny a ich kryštalové komplexy s dGM:

Analógy swainsonínu

Nový swainsonínový analóg (UDII) 7,8-dihydroxyhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrimidin-6(7H)-ón a jeho deriváty so substitúciou v polohe N1 (3-aminopropylou a 3-acetamidopropylou funkčnou skupinou) boli nasyntetizované v laboratóriu Dr. Siriwardenu na Univerzite v Amiens (viac informácií na ich syntézu: U. Das, M. A. A. Meziarne, D. A. Kuntz, H. Strachan, J. Glushka, J. Kóňa, I. Tvaroška, D. R. Rose, K. Moremen, A. Siriwardena, "Rapid Synthesis of a Dihydroxylated Pyrrolopyrimidinone that Inhibits the Human Golgi alpha-Mannosidase II but not its glycosyl hydrolase Family 38 paralog, the broad-specificity Lysosomal alpha-Mannosidase", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, rozpracované). Jeden derivát (MZSEL65) bol testovaný voči dLM408 *in vitro*. Hodnoty IC_{50} výrazne varíovali v závislosti od reakčného pH prostredia: zvyšovaním pH (4.2>6.5) hodnota IC_{50} klesala 2000 > 200 μ M. Dr. Siriwardena

poskytol pre počítačové modelovanie kryštálovej štruktúry 7 látok (UDII, CS48, CS88, KVN, LS5, LS6 a YLD5) v komplexe s enzýmom dGM ako aj ich IC_{50} a K_i hodnoty voči hLM a hGM. Dané látky boli zaradené do tréningovej sady inhibítorov pre QSAR model.

Pre 14 nasyntetizovaných nových indolizidínových derivátov s prikondenzovanými aromatickými kruhmi 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 (IC_{50}) za definovaných reakčných podmienok. Testovanie pri pH optime enzýmu (5.2) indikovalo inhibičný účinok enzýmu v prítomnosti dvoch zlúčenín: SAV-19 (cca 8%) a SAV-31 (36%). Inhibičný účinok výrazne vzrástol v závislosti od pH prostredia reakcie, vyjadrené v IC_{50} ($pH=5.2$) = 1200 μM a ($pH=6.5$) = 200 μM . Látka SAV-31 bola testovaná ja na dGMIIb, kde takisto vykazovala inhibíciu enzýmu na mikromolárnej úrovni (100 μM , $pH=6.5$). Na základe týchto meraní analóg SAV-31 vykazoval aj selektívne vlastnosti voči cieľovej α -manozidáze Golgi-ho typu kde bol dosiahnutý pomer LM/GM = 12. Vo všetkých prípadoch látky predstavovali reverzibilný typ inhibítora v kategórii kompetitívnej, prip. zmiešanej inhibície.

Analógy manostatínu

Pre 9 nasyntetizovaných zlúčenín (derivátov α -manózy substituovanej v polohe 1 alkylsulfónovou, alkyltiolovou a alkylalkoholovou skupinou) (detaily na syntézu: M. Poláková, M. Beláňová, L. Petruš, K. Mikušová, "Synthesis of alkyl and cycloalkyl α -D-mannopyranosides and derivatives thereof and their evaluation in mycobacterial mannosyltransferase assay, *Carbohydrate Research*, 2010, poslané editorovi) pracovnou skupinou Dr. Polákovej boli uskutočnené testovania biologickej aktivity (IC_{50}) voči rekombinantným lyzozomálnym dLM408, dLM252, dLM407 a Golgi dGMIIb manozidázam, kde dve zlúčeniny (MP-163 a MP-150) vykazovali aktivitu (2-5mM). Obidve aktívne zlúčeniny nevykazovali žiadnu selektivitu LM/GM.

Testovaný analóg manostatínu TG-01 nasyntetizovaný pracovnou skupinou Prof. Graczu (STU Bratislava) nevykazoval žiadnu aktivitu voči testovaný enzýmom (dLM408, dGMIIb a „Jack bean“ LM).

Dolaďovací cyklus na vybrané inhibítory

Pomocou počítačového dizajnu boli pre aktívne štruktúry navrhnuté nové deriváty s cieľom zvýšiť ich potenciú a selektivitu. 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-31-A1) alebo 2-butenylovou (SAV-31-A2)]. Podľa predpovede programom Glide by dané funkčné skupiny mali zvýšiť väzbovú afinitu a selektivitu vďaka špecifickej hydrofóbnej interakcie s Tyr267 u hGM. Medziprodukt pre optimalizovaný derivát SAV-31-A1 bol syntetizovaný pracovnou skupinou Dr. Marchalína v priebehu obdobia 2008-2009 (syntéza cieľového produktu k dnešnému dňu neukončená).

Navrhnutá látka s optimalizovaným alkylsulfónovým reťazcom (MP-150-A1) bude syntetizovaná v priebehu roku 2010 pracovnou skupinou Dr. Polákovej.

2c. Molekulárna biológia

Podmienkou vitality projektu bolo etablovanie *in vitro* analýzy biologického - inhibičného účinku komerčných a cielene syntetizovaných derivátov k manozidázam, ktoré sa líšia v špecificite rozpoznávania substrátu. Preto, molekulárno-biologická časť projektu pozostávala z klonovania, expresie a charakterizácie najmä nových, prvýkrát klonovaných manozidáz lyzozomálneho typu z *Drosophila melanogaster* (dLM407, dLM252) a manozidázy Golgi-ho typu (dGMIIb). Lyzozomálne manozidazy, spoločne s dLM408 (klonovaná a ešte nepublikovaná skupinou v Kanade) vykazujú vysokú proteínovú homológiu k ľudskej a

hovádzaj lyzozomálnej manozidáze. dGMIIb okrem vysokej proteínovej homológie k ľudskej manozidáze Golgi-ho typu (hGMIIx) vykazuje podobnosť aj v niektorých kinetických parametroch.

Lyzozomálne manozidázy z *D. melanogaster* podľa bioinformatickej analýzy a enzymatických parametrov sa začlenili do širokej skupiny glykozyhydroláz rodiny GH-38. Predstavujú nové, enzymaticky aktívne manozidázy, ktoré rozšírili rodinu glykozyhydroláz prvýkrát klonovaných a charakterizovaných z tohto modelového organizmu (je potrebné ešte dopracovať výsledky ich substrátovej špecificity).

Pre-selekcia analógov testovaných k homológnym rekombinantným manozidázam takto vytvára dobrý predpoklad aj ďalšieho komplexného štúdia inhibície *in vivo* biosyntézy N-viazaných glykánov eukaryotického modelového systému od *D. melanogaster* odvodenej S2 bunkovej kultúry.

Heterológna expresia modifikovanej cDNA v *P. pastoris*, ktorá kóduje Golgi manozidázu II z *D. melanogaster* (dGMII homológ ľudskej hGMII) nepotvrdila prítomnosť rekombinantného proteínu v médiu. Podobne, výsledok absencie proteínu v kultivačnom médiu S2-buniek indikuje na mutáciu v kódujúcej časti génu. Predpokladáme, že DNA sekvenčná analýza celého kódujúceho úseku potvrdí našu indíciu. V súčasnosti už paralelne prebiehajú experimenty na príprave rekombinantného vektora, ktorý nesie DNA úsek kódujúci ľudskú manozidázu hGMII so zámerom pripraviť stabilne produkujúci klon S2-buniek. Predpokladáme, že takto doplníme „zbierku“ rekombinantných manozidáz klonovaných z *D. melanogaster* o rekombinantnú manozidázu, ktorá je konečným cieľom testovania vysoko účinného a selektívneho inhibítora.

Čistota a integrita rekombinantnej manozidázy je základným predpokladom jej precíznej charakterizácie ako aj úspešnej prípravy proteínových kryštálov pre riešenie jej 3-D štruktúry. Z týchto dôvodov ďalšie experimenty boli smerované k modifikácii N-terminálnej časti lyzozomálnej manozidázy - dLM408 formou fúzie polyhistidínu a FLAG-u čo umožnilo jednak špecifickú detekciu fúzovaného proteínu počas procesu purifikácie, ako aj jeho selektívnu purifikáciu afinitnou chromatografiou. Tento purifikačný proces bude aplikovaný v ďalšej príprave a akumulácii dLM408 pre účely prípravy proteínových kryštálov. Purifikácia na HisTrap kolónkach sa ukázala účinnejšia v porovnaní s kolónou Ni-agarózy.

Zo série experimentov pri testovaní inhibičného účinku rôznych analógov voči manozidázam významný inhibičný efekt v mikro až milimolárnej oblasti vykazovali najmä analógy manózy a swainsonínu (MP-150, MP-163 a SAV-31). V prípade SAV31 kinetika inhibície potvrdila reverzibilný typ účinku voči lyzozomálnej manozidáze, ktorý sa mení v závislosti od pH reakčného prostredia. Inhibičný účinok SAV-31 bol reprodukovateľne potvrdený aj v prípade Golgi manozidázy dGMIIb a vykazoval závislosť od pH reakčného prostredia. Z porovnania výsledkov inhibície vyplýva, že na dosiahnutie 50 % inhibície (IC_{50}) dGMIIb v závislosti od pH, je potrebná takmer polovičná koncentrácia inhibítora ako v prípade dLM408. Tento koncentračný rozdiel výslednej inhibície pre dGMIIb (pri pH 5.2= 680 μ M; pH5.8=200 μ M; pH 6.5=100 μ M) a pre dLM408 (pH5.2=1200 μ M a pH6.5 =200 μ M) indikuje na rozdiel v špecificite-selektivite účinku inhibítora ako dôsledok heterogenity mikroprostredia katalytického miesta manozidáz. Výsledky testov inhibičného účinku analógov s definovanou štruktúrou dávajú dobrý predpoklad do ďalších krokov pri vývoji nových, účinnejších a selektívnejších inhibítorov.

3. Zoznam výstupov a prínosov projektu za posledný rok

– uveďte v prílohe, formulár „VPP“

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

Podpis: Mgr. Juraj Kóňa, PhD
zodpovedný riešiteľ

Dátum: 28.1.2010

Podpis: Ing. Igor Tvaroška, DrSc.
štatutárny zástupca

Pečiatka