

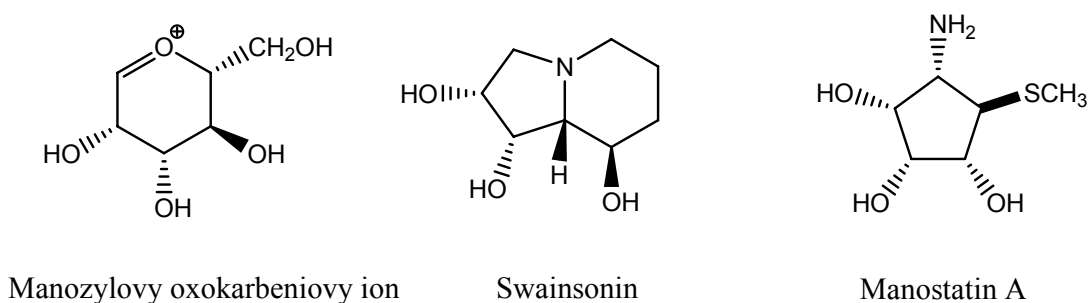
- 1. Súčasný stav problematiky a prínos výsledkov riešeného projektu**
 - a) Popíšte súčasný stav riešenej problematiky vo svetovom merítku vrátane relevantných odkazov na odbornú literatúru
 - b) Popíšte schopnosť návrhu projektu posunúť hranice poznania v skúmanej problematike
 - 2. Ciele projektu**
 - a) Popíšte ciele projektu na celú dobu riešenia projektu a na jeho jednotlivé etapy
 - b) Definujte v čom spočíva originalnosť a inovatívnosť návrhu cieľov
 - 3. Metodológia**
 - a) Popíšte postupy, ktoré použijete na dosiahnutie cieľov projektu
 - b) Charakterizujte plánovanú metodológiu v kontexte poznania v danej oblasti
 - c) Stručne popíšte postup riešenia projektu, tak aby bolo možné posúdiť realnosť vytýčených cieľov
 - 4. Profesionálna kvalita výskumného tímu, jeho riadenie a infraštruktúra pracovísk**
 - a) Popíšte profesionálnu kompetentnosť a komplementaritu riešiteľov resp. spoluriešiteľských organizácií s ohľadom na predkladaný projekt
 - b) Popíšte ako bude zabezpečená koordinácia a riadenie v rámci riešiteľského kolektívu
 - c) Popíšte existujúcu infraštruktúru potrebnú na riešenie projektu
 - 5. Výstupy a dopady projektu**
 - a) Popíšte aké výsledky a výstupy projektu v jeho jednotlivých cieľoch očakávate a kvantifikujte ich
 - b) Popíšte plán diseminácie (rozšírenia) výsledkov riešenia projektu
 - 6. Prepojenie výskumu a vzdelávania**
 - a) Ako sa zabezpečí aplikácia výsledkov základného výskumu vo formálnom alebo neformálnom vzdelávacom procese
 - b) Popíšte plán na popularizáciu výsledkov vášho projektu
-

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

1. Súčasný stav problematiky a prínos výsledkov riešeného projektu:

Pri rakovine prs, hrubého čreva a kože sú chorobný rast a metastázy asociované s abnormálnym množstvom komplexných sacharidových štruktúr na povrchu buniek.¹⁻³ Takáto pozmenená distribúcia sacharidových štruktúr je spojená s abnormalitami v *N*-glykozylačných procesoch, kde inhibícia kľúčového enzýmu Golgi α -mannosidase II (EC 3.2.1.114, GM) sa ukázala byť účinný spôsob pri liečbe rakoviny. GM patrí medzi glykozyl hydrolázy skupiny 38⁴ a zastáva centrálnu úlohu v *N*-glykozylacii⁵ kde špecificky štiepi dva manózové zvyšky z rozvetveného manózového intermediátu GlcNAcMan₅GlcNAc₂ za vzniku GlcNAcMan₃GlcNAc₂ štruktúry, prekursora pre ďalšiu adíciu *N*-acetylglukózoaminových jednotiek.

V predbežných klinických testoch s pacientami v pokročilom štádiu rakoviny, ktorým sa podával netoxický orálne aplikovateľný swainsonín, bol indikovaný znížený rast nádorov a metastáz.^{1,6-11} Swainsonín [(1*S*,2*R*,8*R*,8*aR*)-trihydroxy-indolizidín, obr. 1] je indolizidínový alkaloid nachádzajúci sa v hojnom množstve v austrálskych a severoamerických rastlín. Zasahuje do glykozylačného procesu, kde sa neväzbovo viaže do aktívneho miesta GM a spôsobuje nahromadenie hybridných glykánových štruktúr. Predpokladá sa, že jeho biologická aktivita je založená na štrukturálnej podobnosti s manozylovým oxokarbeniovým kationóm - GM intermediátom (obr. 1). Jeho inhibičné konštanty sú na nanomolárnej úrovni (20-50 nM), a preto sa stal vedúcou štruktúrou v dizajne nových syntetických inhibítorov glykozidáz.^{12,13} Akokoľvek, swainsonín a jeho syntetické analógy vykazujú nežiadúci bočný efekt, kde blokujú katabolizmus oligosacharidov v lyzozómoch inhibíciou ľudskej lyzozomálnej α -manozidázy (LM) príbuznej Golgi α -manozidázy II.^{1,7}



Obr. 1

Manostatín A (obr. 1), izolovaný z pôdneho mikroorganizmu *Streptoverticillus*, je manozidázový inhibítor s vysokou biologickou účinnosťou ($IC_{50} = 36$ nM)¹⁴ a je popri swainsonínu ďalšou vedúcou štruktúrou pre dizajn selektívnych GM inhibítorov.¹⁵⁻¹⁷ Manostatín je reverzibilný kompetitívny inhibítor, ktorý nevykazuje fenomén pomalého viazania zistený pre swainsonín a jeho analógy.^{15,17,18} Akokoľvek, manostatíny majú ten istý bočný efekt - inhibujú ľudskú LM.

Z doterajších poznatkov je zrejmé, že na vývoj efektívneho manozidázového inhibítora bude potrebné navrhnuť novú vedúcu štruktúru, ktorá si zachová potentné účinky na úrovni swainsonínu a manostatínu, pričom bude vysoko selektívna pre ľudskú Golgi α -manozidázu II s minimálnym efektom voči ľudskej lyzozomálnej manozidáze. Na tento cieľ, využitie kryštalografických a pokročilých techník počítačového štrukturálneho dizajnu môže byť kľúčovým faktorom pre úspešné napredovanie. V súčasnosti sú dostupné kryštalové štruktúry dvoch typov α -manozidáz, *Drosophila melanogaster* Golgi α -manozidázy II⁵ a lyzozomálnej α -manozidázy z obličiek hovädzieho dobytká.¹⁹ Pre *Drosophila* GM je dostupných niekoľko kryštalových štruktúr s naviazanými inhibítormi vrátane swainsonínu a manostatínu v aktívnom centre enzýmu pripravenými pracovnou skupinou Roseho.⁵ *Drosophila* GM vykazuje vysokú sekvenčnú identitu s ľudskou GM (41 % identity, 61 % podobnosti), a porovnateľné kinetické vlastnosti, substrátovú špecificitu a citlivosť na inhibítory v porovnaní s cicavčiami GM.⁵ Preto príprava 3D štruktúry ľudskej GM z *Drosophila* GM pomocou počítačového homológneho modelovania by mala byť dostatočne kvalitným štrukturálnym zdrojom pre racionálny štrukturálny dizajn nových typov inhibítorov ľudskej GM. Na druhej strane, nízka sekvenčná identita medzi LM a GM (25 % identity v aktívnom centre enzýmov)¹⁹ dáva priestor na úspešný dizajn

selektívnych manozidázových inhibítorov, čo je hlavným úsilím výskumných skupín pracujúcich na vyvoji nových glykozidázových inhibítorov a hlavným cieľom tohoto projektu.

2. Ciele projektu:

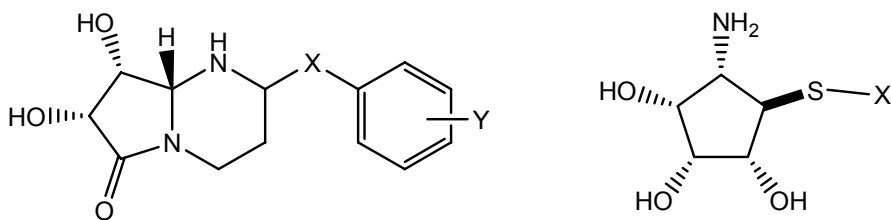
Hlavným cieľom projektu je dizajn nových inhibítorov s antirakovinotvornými účinkami, analógov swainsonínu a manostatínu, ktoré budú vysoko selektívne voči ľudskej Golgi α -manozidáze II s minimálnymi bočnými efektami voči ľudskej lyzozomálnej α -manozidáze (Štruktúry obidvoch navrhovaných typov inhibítorov sú schématicky zobrazené na obr. 2). Na tieto ciele:

a) 3D štruktúry ľudskej GM a LM budú pripravené pomocou počítačového homológneho modelovania.

b) Následne, bude uskutočnený racionálny štruktúrny dizajn za pomoci dokovacích techník, simulácii molekulovej dynamiky a kvantovo-mechanických výpočtov aplikovaný na obidva enzýmové systémy v komplexe s inhibítormi. Počítačové modelovanie bude uskutočnené pracovnou skupinou Dr. Tvaroška na Chemickom ústave SAV.

c) Vybrané inhibítory budú syntetizované vo Francúzsku pracovnou skupinou organických syntetikov Dr. Siriwardenu na Univerzite Jules Vernes v Amiens. Táto skupina úzko spolupracuje so skupinou kryštalografův Dr. Roseho z Inštitútu rakoviny a katedry medicínskej biofyziky na Univerzite v Toronte v Kanade, autorov v súčasnosti dostupných kryštalových štruktúr GM s inhibítormi.⁵

d) Následne biologická aktivita nasyntetizovaných štruktúr bude testovaná pracovnou skupinou Dr. Muchu na Chemickom ústave SAV. Ľudské GM a LM budú klonované a podrobené expresii pre inhibičné štúdie.



Inhibitory analogy swainsoninu

Inhibitory analogy manostatínu

Obr. 2

3. Metodológia:

Počítačové modelovanie. 3D štruktúry ľudskej GM a LM budú pripravené pomocou homológneho modelovania použitím programu PRIME z programového balíka SCHRODINGER. Následne budú štruktúry analyzované a optimalizované pomocou simulačných techník molekulovej dynamiky použitím programov AMBER a GROMACS. Optimalizované štruktúry enzýmov budú použité na racionálny štruktúrny dizajn nových manozidázových inhibítorov, analógov swainsonínu a manostatínu (obr. 2) pomocou dokovacieho modelovania použitím programu GLIDE z programového balíka SCHRODINGER. Vyselektované štruktúry inhibítorov budú ďalej optimalizované na vyššej úrovni pomocou molekulovej dynamiky a kvantovo mechanických výpočtov použitím programov AMBER, GROMACS, GAUSSIAN a JAGUAR z programového balíka SCHRODINGER. Inhibítory s najlepšie predpovedanými

vlastnosťami budú syntetizované a testovaná ich biologická účinnosť voči ľudskej GM a LM. V záverečnom dolad'ovacom cycle budú otestované účinné inhibítory podrobené chemoinformatickej analýze a ďalšiemu vývoju za pomoci programového balíku SCHRODINGER.

Organická syntéza. Vyselektované manozidázové inhibítory budú syntetizované pracovnou skupinou Dr. Siriwardenu na Univerzite v Amiens, ktorá úzko spolupracuje so skupinou kryštalografu Dr. Roseho z Univerzity v Toronte. Navrhované štruktúry dvoch typov inhibítorov sú schématicky zobrazené na obr. 2. Návrhy ich syntetických postupov sú rozpracované skupinou Dr. Siriwardenu (k dnešnému dňu nie je možné ich zverejnenie z dôvodov patentovej ochrany).

Molekulárne klonovanie, expresia a purifikácia ľudskej Golgi α -manozidázy II:

Primárnym cieľom testovania špecifických inhibítorov bude ľudská GM lokalizovaná v mediálnom Golgiho aparáte. Predchádzajúce štúdie topológie ľudského enzýmu indikovali, že ľudská GM patrí do tzv. skupiny-II transmembránových proteínov s krátkou cytoplazmatickou a transmembránovou N-terminálnou doménou, ktorá nie je významná pre enzýmovú katalýzu. Preto, pre naše potreby štúdia inhibičného účinku nových látok naklonujeme a exprimujeme enzým v jeho skrátenej forme. Táto forma predstavuje tzv. solubilnú časť enzýmu (N-koncová časť enzýmu skrátená o cytoplazmatickú a transmembránovú časť reprezentujúca 32 aminokyselinových zvyškov). Sekvencia pre mRNA kodujúcu ľudskú GM je uložená v Génovej databáze (s prístupovým kódom U31520, 3599 bp mRNA -ORF 1144 aminokyselinových zvyškov) a predstavuje dostatočnú informáciu na zostrojenie špecifických oligonukleotidov pri konštrukcii kódujúcej oblasti pomocou PCR. cDNA kódujúca ľudskú GM bude syntetizovaná z poly-(A) RNA izolovaná z ľudských lymfocytov, alebo ako alternatíva použitím komerčnej cDNA knižnice pripravenej z ľudskej pečene (Stratagene)²⁰. Ako heterológny expresný systém použijeme systém odvodený z *Drosophila melanogaster* overený na produkciu rekombinantného enzýmu.²¹ DNA fragment, ktorý kóduje deletovanú formu ľudskej GM - Δ 32, bude overený automatickým DNA sekvenovaním a následne preklonovaný do DES expresného vektora pMTBiP His-J/V, do úseku za polyhistidinom a peptidom rozpoznávaným enterokinázou v čele s BiP sekréčnym signálom. Sekrétovaný rekombinantný enzým bude purifikovaný z rastového média pomocou chelátovanej sepharózy nabitej Ni^{+2} ionami, podľa už publikovaného protokolu.²² Integrita proteínu bude analyzovaná na SDS- polyakrylamidovom géli, a ak to bude potrebné blotovaním na Hybon-C membránu a detekciou pomocou anti -polyhistidin špecifických protilátok. Koncentrácia proteínu bude stanovená metódou podľa Bradforda, použitím od BioRad-u dostupným kitom na kvantitatívne stanovenie proteínov.

Enzýmová aktivita: stanovenie enzýmovej aktivity ľudskej GM sa uskutoční v podmienkach popísaných Raboille et al.²³ v prítomnosti *p*-nitrophenyl α -D-mannopyranozidu (Sigma) ako substrátu. Účinnosť a špecificita nových inhibítorov bude vyjadrená výpočtom IC_{50} a inhibičnej konštanty (K_i) pre purifikovaný rekombinantný enzým principiálne podľa reakčných podmienok určených pre stanovenie GM aktivity a v prítomnosti analógov inhibítorov.

Z dôvodu stanovenia selektivity inhibičného účinku, kinetické merania sa uskutočnia tiež pre ľudskú LM. Pre tento účel pripravíme rekombinantný enzým podľa protokolu, ktorý je popísaný Liao et al.²⁴ s využitím údajov depozitovaných v GeneBank-e pod prístupovým kódom U 68567.

4. Profesionálna kvalita výskumného tímu, jeho riadenie a infraštruktúra pracovísk:

Pracovný tím je zložený z expertov z rôznych vedeckých oblastí: molekulevého modelovania, organickej syntézy a molekulárnej glykobiológie, ktoré sú dôležité pre úspešné zvládnutie cieľov tohoto projektu. Všetci zúčastnení, okrem organických chemikov sú zamestnanci Chemického ústavu SAV a boli vybraní na základe ich vedeckých skúseností a výsledkov pre splnenie cieľov predkladaného multidisciplinárneho projektu. Organickí chemici sú zamestnanci na Univerzite Jules Vernes v Amiens vo Francúzsku (Fakulta vied, laboratórium sacharidov, pozri priložený certifikát). Šesť výskumných pracovníkov bude participovať na projekte: 1 vedúci samostatný vedecký pracovník s hodnosťou DrSc., dvaja s hodnosťou PhD, dvaja postgraduálni študenti a jeden technický pracovník. Profesionálne skúsenosti starších a entuziazmus mladších pracovníkov sú vo výskumnom tíme vhodne kombinované.

Chemický ústav SAV Slovenskej akadémie vied založený v 1953 je medzinárodne uznávané vedecké pracovisko, ktoré sa špecializuje v glykochémii a glykobiológii. Hlavné vedecké výsledky získal v oblastiach syntézy biologicky dôležitých sacharidov, štruktúry a funkčných vlastnostiach rastlinných a mikrobiálnych polysacharidoch, ich aplikácii v biotechnológiách a medicíne, štruktúre, funkcii a mechanizme účinku industriálne dôležitých glykozylyhydroláz a glykozyltransferáz, a fyziologickej úlohe sacharidov vo vývoji a diferenciacii rastlín. Chemický ústav je vybavený prístrojmi, ktoré môžu byť použité výskumným tímom: GC-MS spektrometer - Finnigan, MALDI IV- Kratos, GC chromatograf, Hewlett-Packard, NMR spektrometer, 300 MHz, Bruker, člen konzorcia 600 MHz NMR spektrometra, UV spektrometer, Nicolet, Micro-analyzátor, Fissons, Analyzátor aminokyselín, HPLC chromatograf, päť 8- a tri 4-procesorové počítače. Ďalej je ústav vybavený na prácu s bunkovými kultúrami, purifikáciu a molekulárnu biológiu proteínov a má značnú paletu zariadení na ultrafiltráciu, ultracentrifugáciu, lyofilizáciu, elektroforézu a chromatografiu.

Mgr. Juraj Kóňa, PhD., zodpovedný riešiteľ, má 8 ročnú vedeckú prax v aplikáciách počítačových metód (metódy molekulevej a kvantovej mechaniky) na problémy v organickej chémii (mechanizmy nukleofilných substitúcií), biochémií (katalytické procesy glykozyltransferáz, peroxidáz a asparáginových proteáz) a biofyzike (transport draslíkových iónov cez transmembránové kanále, aktivácia OxyR transkripčného faktora), štruktúrnom dizajne liečiv (ireverzibilné epoxidové inhibítory HIV-1 proteázy), v homológnom modelovaní a dokovacích technikách. Je expertom v modelovaní mechanizmov chemických reakcií (lokalizácia tranzitných stavov a intermediátov pozdĺž reakčných koordinát) pomocou kvantovo-mechanických metód a hybridných kvantových/klasických mechanických metód. Má skúsenosti v simuláciách molekulevou dynamikou (MD) biofyzikálnych procesov (konformačné zmeny v proteínoch a aktívnych miestach enzýmov) a v používaní pokročilých počítačových techník na výpočty voľnej energie (nerovnovážne riadené MD simulácie, „umbrella sampling“ MD simulácie, FEP (free energy perturbation) výpočty. Autor 8 vedeckých publikácií publikovaných v medzinárodných vedeckých periodikách (*J. Org. Chem.*, *J. Chem. Soc.*, *Int. J. Quantum. Chem.*, *Org. Biomol. Chem.* atď.), so 16 citáciami a 5 príspevkami na medzinárodných vedeckých konferenciách.

Ing. Igor Tvaroška, DrSc., zástupca zodpovedného riešiteľa, má viac ako 30 ročné skúsenosti v molekulevom modelovaní a štruktúrnych štúdiách biomolekúl. Jeho hlavným zameraním je štúdium vzťahu medzi štruktúrou, vlastnosťami a funkciou biomolekúl, interpretácia stereoelektrónových efektov (anomérny, exo-anomérny a gauche efekt); vývoj metód skúmania

trojrozmenej štruktúry sacharidov v roztoku; popis konformačných vlastností oligo- a polysacharidov v roztoku kombináciou NMR metódy a molekulového modelovania; modelovanie reakčných mechanizmov glykozylydroláz a glykozyltransferáz; určenie štruktúry aktivovaného komplexu; QSAR; ADMET; dizajn liekov s asistenciou počítačov. Autor 120 vedeckých článkov, zahrňujúcich 9 kapitol v monografiách, 5 US patentov, a viac ako 190 ďalších príspevkov, 23 pozvaných prednášok na medzinárodné konferencie a vyše 1600 citácií.

RNDr. Ján Mucha, PhD., biochemik a v poslednej dekáde sa venoval hlavne molekulárnej biológii vyšších eukaryotov. Získal teoretické a praktické skúsenosti v štúdiu vzťahu štruktúra-funkcia glykozyltransferáz použitím komplementárnych metód molekulárnej biológie, napr. proteínového inžinierstva, cielenej mutagenézy a heterológnej expresii vyšších eukaryotov. Významným príspevkom v oblasti glykozylácie rastlinných proteínov je klonovanie kľúčových glykozyltransferáz zúčastňujúcich sa biosyntézy *N*-viazaných oligosacharidov. Výsledky vedeckej aktivity publikoval v mnohých článkoch v renomovaných časopisoch. Je spoluautorom dvoch patentov registrovaných v USA a EÚ, ktoré sa zaoberajú metodológiou molekulárnej biológie aplikovateľnej na heterológnu produkciu klinicky dôležitých glykoproteínov v rastlinách.

Mgr. Stanislav Kozmon, postgraduálny študent – počítačový chemik, má 4 ročnú prax v molekulovom modelovaní sacharidov, glykolipidov a enzýmov, vo výpočtoch fyzikálnych a chemických vlastností organických zlúčenín vykazujúcich biologickú účinnosť. Jeho hlavný záujem je zameraný na riešenie mechanizmov organických reakcií ako aj enzymatických reakcií pomocou hybridných QM/MM metód, a na štúdium štruktúrnych konformácií biologicky aktívnych zlúčenín v rozpúšťadlách pomocou simulácií založených na molekulovej dynamike, homológneho modelovania, dokovacích analýz interakcií enzým-substrát. Je spoluautorom 3 vedeckých publikácií v CC časopisoch.

Mgr. Peter Both, postgraduálny študent, jeho doterajšia krátka vedecká kariéra predstavuje oblasť výskumu biochémie a molekulárnej biológie vyšších eukaryotov. Získal teoretické a praktické znalosti v klonovaní, heterológnej expresii a charakterizácii glykozyltransferáz z rôznych zdrojov.

Dr. Aloysius Siriwardena, Univerzita Jules Vernes, Fakulta vied, Laboratórium sacharidov (UMR 6219, 33, rue saint Leu, 80039 Amiens, priložený certifikát), organický chemik, ma bohaté skúsenosti v syntéze sacharidov a inhibítorov glykozidáz.
(http://www.u-picardie.fr/jsp/fiche_pagelibre.jsp?STNAV=&RUBNAV=&CODE=31540425&LANGUE=0).

5. Výstupy a dopady projektu:

Očakáva sa že budú dosiahnuté nasledovné výsledky:

- Príprava dvoch 3D štruktúr glykozylydroláz: ľudskej Golgi a lyzozomálnej α -manozidázy nevyhnutných pre štruktúrny dizajn selektívnych inhibítorov.
- Dizajn dvoch nových štruktúr selektívnych inhibítorov ľudskej GM – analógov swainsonínu a manostatínu za pomoci počítačovo asistovaného štruktúrneho dizajnu.
- Identifikácia reziduí aktívneho miesta ľudskej GM a LM, ktoré participujú v biologickej účinnosti a selektivite navrhnutých inhibítorov.

d) Syntéza dvoch nových selektívnych inhibítorov ľudskej GM, analógov swainsonínu a manostatínu. Pre inhibítory s najlepšimi biologickými účinkami budú vyvinuté optimálne syntetické postupy.

e) Príprava rekombinantnej ľudskej GM a LM expresiou z *E. coli* systémú v dostatočnom množstve pre biochemické testovanie.

f) Testovanie potencie a selectivity nasyntetizovaných inhibítorov voči rekombinantnej ľudskej GM a LM vyjadrených výpočtom IC_{50} a inhibičnej konštanty (K_i)

g) Publikácie výsledkov z trojročného projektu v karentovaných časopisoch. (Predpokladáme 2 publikácie ročne)

h) Medzinárodná spolupráca v rámci riešenia projektu s pracovnou skupinou organických syntetikov Dr. Siriwardenu na Univerzite v Amiens.

i) Zaškolenie 2 postgraduálnych študentov v oblasti dizajnu, vývoja a testovania nových glykozidázových inhibítorov.

j) Každý rok počas trvania projektu budeme organizovať pokročilý kurz pre postgraduálnych študentov Chemického ústavu, ktorý bude spracovaný aj v elektronickej podobe na internete. Prednášky a praktické cvičenia budú tematicky zamerané na teóriu a aplikácie v počítačovom modelovaní liečiv.

6. Prepojenie výskumu a vzdelávania:

a) V trojročnom projekte budú participovať dvaja postgraduálni študenti, dvaja počítačovní chemici a jeden molekulárny biológ. Obidvaja študenti budú mať príležitosť naučiť sa pokročilé techniky molekulového modelovania a molekulárnej biológie, konkrétne dizajn, vývoj a testovanie biologickej activity nových manozidázových inhibítorov. Naučia sa efektívne pracovať multidisciplinárnom vedeckom tíme, kde vedecký manažment a intenzívna komunikácia medzi počítačovými chemikmi, organickými chemikmi a molekulárnymi biológmi je kľúčovým faktorom na úspešne zvládnutie stanovených cieľov.

b) participujúci študenti budú prezentovať svoje výsledky na medzinárodných vedeckých konferenciách zameraných na chémiu sacharidov a počítačový chémiu organizovaných v Európe perióde 2007-2009 (EUROCARB 14, EUROCARB 15, EUCCO-CC7, EUCCO-CC8, EUCCO-CC9).

c) zodpovedný riešiteľ projektu bude organizovať každý rok počas trvania projektu pokročilý kurz pre postgraduálnych študentov Chemického ústavu SAV. Prednášky a praktické cvičenia budú zamerané na teóriu a aplikácie v počítačovom modelovaní a dizajne liečiv. Výsledky a skúsenosti nadobudnuté počas riešeného projektu budú využité ako prípadová štúdia v hore uvedených prednáškach.

References:

- (1) Goss, P. E.; Baker, M. A.; Carver, J. P.; Dennis, J. W. Inhibitors of carbohydrate processing: A new class of anticancer agents. *Clin Cancer Res* **1995**, *1*, 935-944.
- (2) Dennis, J. W.; Granovsky, M.; Warren, C. E. Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays* **1999**, *21*, 412-421.
- (3) Dennis, J. W.; Granovsky, M.; Warren, C. E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Bba-Gen Subjects* **1999**, *1473*, 21-34.

- (4) Henrissat, B. A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino-Acid-Sequence Similarities. *Biochem. J.* **1991**, *280*, 309-316.
- (5) van den Elsen, J. M. H.; Kuntz, D. A.; Rose, D. R. Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *Embo J* **2001**, *20*, 3008-3017.
- (6) Dennis, J. W.; Laferte, S. Recognition of Asparagine-Linked Oligosaccharides on Murine Tumor-Cells by Natural-Killer Cells. *Cancer Res* **1985**, *45*, 6034-6040.
- (7) Goss, P. E.; Reid, C. L.; Bailey, D.; Dennis, J. W. Phase IB clinical trial of the oligosaccharide processing inhibitor swainsonine in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* **1997**, *3*, 1077-1086.
- (8) Kiyohara, T.; Dennis, J. W.; Roder, J. C. Double Restriction in Nk Cell Recognition Is Linked to Transmethylation and Can Be Triggered by Asparagine-Linked Oligosaccharides on Tumor-Cells. *Cell Immunol* **1987**, *106*, 223-233.
- (9) Dennis, J. W.; Koch, K.; Yousefi, S.; Vanderelst, I. Growth-Inhibition of Human-Melanoma Tumor Xenografts in Athymic Nude-Mice by Swainsonine. *Cancer Res* **1990**, *50*, 1867-1872.
- (10) Bowlin, T. L.; Sunkara, P. S. Swainsonine, an Inhibitor of Glycoprotein Processing, Enhances Mitogen Induced Interleukin-2 Production and Receptor Expression in Human-Lymphocytes. *Biochem Bioph Res Co* **1988**, *151*, 859-864.
- (11) Olden, K.; Breton, P.; Grzegorzewski, K.; Yasuda, Y.; Gause, B. L.; Oredipe, O. A.; Newton, S. A.; White, S. L. The Potential Importance of Swainsonine in Therapy for Cancers and Immunology. *Pharmacol Therapeut* **1991**, *50*, 285-290.
- (12) Kumar, N. S.; Pinto, B. M. Synthesis of thioswainsonine as a potential glycosidase inhibitor. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1685-1691.
- (13) Siriwardena, A.; Strachan, H.; El-Daher, S.; Way, G.; Winchester, B.; Glushka, J.; Moremen, K.; Boons, G. J. Potent and selective inhibition of class II alpha-D-mannosidase activity by a bicyclic sulfonium salt. *Chembiochem* **2005**, *6*, 845-+.
- (14) Kojiri, K.; Morishima, H.; Yamamoto, T.; Aoyagi, T.; Takeuchi, T.; Umezawa, H. Structure Determination of Alphostatin, a Novel Alkaline-Phosphatase Inhibitor. *J Antibiot* **1989**, *42*, 489-490.
- (15) Li, B.; Kawatkar, S. P.; George, S.; Strachan, H.; Woods, R. J.; Siriwardena, A.; Moremen, K. W.; Boons, G. J. Inhibition of Golgi mannosidase II with mannostatin a analogues: Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationship studies. *Chembiochem* **2004**, *5*, 1220-1227.
- (16) Uchida, C.; Kimura, H.; Ogawa, S. Synthesis and biological evaluation of potent glycosidase inhibitors: N-phenyl cyclic isourea derivatives of 5-amino- and 5-amino-C-(hydroxymethyl)-1,2,3,4-cyclopentanetraols. *Bioorgan. Med. Chem.* **1997**, *5*, 921-939.
- (17) Ogawa, S.; Morikawa, T. Synthesis of a potent aminocyclitol alpha-mannosidase inhibitor, 1L-(1,2,3,5/4)-5-amino-4-O-methyl-1,2,3,4-cyclopentanetetrol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1047-1050.
- (18) Ogawa, S.; Morikawa, T. Synthesis and alpha-mannosidase inhibitory activity of three deoxy derivatives of mannostatin A. *Eur J Org Chem* **2000**, 1759-1765.
- (19) Heikinheimo, P.; Helland, R.; Leiros, H. K. S.; Leiros, I.; Karlsen, S.; Evjen, G.; Ravelli, R.; Schoehn, G.; Ruigrok, R.; Tollersrud, O. K.; McSweeney, S.; Hough, E. The structure of bovine lysosomal alpha-mannosidase suggests a novel mechanism for low-pH activation. *J Mol Biol* **2003**, *327*, 631-644.

- (20) Misago, M.; Liao, Y. F.; Kudo, S.; Eto, S.; Mattei, M. G.; Moremen, K. W.; Fukuda, M. N. Molecular-Cloning and Expression of Cdnas Encoding Human Alpha-Mannosidase-Ii and a Previously Unrecognized Alpha-Mannosidase-Iix Isozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 11766-11770.
- (21) Numao, S.; Kuntz, D. A.; Withers, S. G.; Rose, D. R. Insights into the mechanism of *Drosophila melanogaster* Golgi alpha-mannosidase II through the structural analysis of covalent reaction intermediates. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48074-48083.
- (22) Mucha, J.; Svoboda, B.; Frohwein, U.; Strasser, R.; Mischinger, M.; Schwihla, H.; Altmann, F.; Hane, W.; Schachter, H.; Glossl, J.; Mach, L. Tissues of the clawed frog *Xenopus laevis* contain two closely related forms of UDP-GlcNAc :alpha 3-D-mannoside beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I. *Glycobiology* **2001**, *11*, 769-778.
- (23) Rabouille, C.; Kuntz, D. A.; Lockyer, A.; Watson, R.; Signorelli, T.; Rose, D. R.; van den Heuvel, M.; Roberts, D. B. The *Drosophila* GMII gene encodes a Golgi alpha-mannosidase II. *J Cell Sci* **1999**, *112*, 3319-3330.
- (24) Liao, Y. F.; Lal, A.; Moremen, K. W. Cloning, expression, purification, and characterization of the human broad specificity lysosomal acid alpha-mannosidase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28348-28358.