

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIHA ČERVEK

**RAČUNALNIŠKO PODPRTO ODKRIVANJE IN NAČRTOVANJE  
POTENCIALNIH ZAVIRALCEV O-GLCNAC TRANSFERAZE**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIHA ČERVEK

**RAČUNALNIŠKO PODPRTO ODKRIVANJE IN NAČRTOVANJE  
POTENCIALNIH ZAVIRALCEV O-GLCNAC TRANSFERAZE**

**COMPUTER-AIDED DISCOVERY AND DESIGN OF POTENTIAL O-GLCNAC  
TRANSFERASE INHIBITORS**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem izdelal na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

#### Zahvala

Iskreno hvala staršema za vso podporo skozi vsa leta študija.

Rad bi se zahvalil tudi svojemu mentorju doc. dr. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za pomoč in vodenje med nastajanjem magistrske naloge.

#### Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Miha Červek

Ljubljana, 2017

# VSEBINA

1. UVOD .....	- 1 -
1.1 ZGODOVINSKA UMESTITEV .....	- 1 -
1.2 PREDSTAVITEV TARČE .....	- 1 -
1.2.1 Fiziološka vloga.....	- 2 -
1.2.2 Struktura OGT.....	- 3 -
1.2.3 Heksozaminska biosintezna pot (HBP).....	- 5 -
1.2.4 Vloga OGT vpri rakavih obolenjih.....	- 6 -
1.2.5 Vpliv OGT na sladkorno bolezen .....	- 6 -
1.2.6 Mehanizem delovanja OGT .....	- 7 -
1.3 ISKANJE ZAVIRALCEV .....	- 8 -
1.3.1 Dosedanji dosežki.....	- 8 -
1.4 RAČUNALNIŠKA PODPORA PRI ISKANJU NOVIH BIOLOŠKO AKTIVNIH SPOJIN .....	- 13 -
1.4.1 Virtualno rešetje.....	- 14 -
2. NAMEN DELA.....	- 16 -
3. METODE .....	- 18 -
3.1 PRIPRAVA KNJIŽNICE .....	- 18 -
3.2 IZBOR KRISTALNE STRUKTURE IN PRIPRAVA VEZAVNEGA MESTA ENCIMA OGT .....	- 18 -
3.3 SIDRANJE .....	- 19 -
3.4 MOLEKULSKO MODELIRANJE .....	- 20 -
3.5 PREDSTAVITEV REZULTATOV SIDRANJA.....	- 21 -
3.6 RAČUNALNIŠKA OPREMA.....	- 21 -
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	- 22 -
4.1 REZULTATI VIRTUALNEGA REŠETANJA .....	- 22 -
4.2 STRUKTURNO PODPRTO VIRTUALNO REŠETANJE FRAGMENTOV V VEZAVNO MESTO ZA GlcNAc ENCIMA OGT.....	- 23 -
4.3 STRUKTURNO PODPRTO VIRTUALNO REŠETANJE FRAGMENTOV V VEZAVNO MESTO ZA UDP ENCIMA OGT .....	- 30 -
4.4 REZULTATI LABORATORIJSKIH TESTIRANJ IZBRANIH KANDIDATOV.....	- 36 -
4.5 PRIPRAVA SPOJIN ZA VEZAVO V UDP DEL VEZAVNEGA MESTA OGT.....	- 39 -
4.6 REZULTATI NAČRTOVANJA NOVIH POTENCIALNIH ZAVIRALCEV OGT NA OSNOVI STRUKTURE BISUBSTRATNEGA ZAVIRALCA.....	- 41 -
5. SKLEP .....	- 45 -
6. LITERATURA.....	- 47 -

## POVZETEK

Popolno poznavanje delovanja encima O-GlcNAc transferaza (OGT) predstavlja pomemben del raziskav, ki bi povezale dosedanja dognanja o vplivu encima OGT na razvoj številnih bolezni. S svojevrstnim pogledom na problem smo se naloge lotili z računalniškim iskanjem spojin vodnic, ki bi zavirale encimsko aktivnost OGT. Kot izhodišče smo uporabili naravni substrat encima, in sicer UDP-GlcNAc. Do sedaj razviti zaviralci OGT so večinoma pokazali aktivnost le v *in vitro* sistemih, saj so bili premalo selektivni za OGT, večina izmed njih pa je izkazovala tudi slabo prehajanje celične membrane. Metoda virtualnega reševanja knjižnic kemijskih spojin na osnovi strukture encima je ponudila nov pogled v načrtovanje zaviralcev OGT, pri čemer so bili še posebej zanimivi rezultati sidranja knjižnice fragmentov v vezavno mesto UDP dela molekule UDP-GlcNAc. Med najvišje uvrščenimi spojinami se je večkrat ponovila struktura kinolin-2-on-4-karboksamida, ki je nato služila tudi kot osnova za sintezo manjše knjižnice spojin na Katedri za farmacevtsko kemijo. Še posebej navdušujoči so bili rezultati *in vitro* testiranja sintetiziranih fragmentov, izmed katerih sta dve spojini (UL-AAS-4 in UL-AAS-5c) povsem zavrla aktivnost encima OGT pri koncentraciji 1 mM. Hkrati so velik potencial pokazale tudi spojine, ki smo jih kupili iz na tržišču dostopnih knjižnic spojin, tako je denimo relativna aktivnost OGT glede na kontrolo za spojino UL-OGT-01 pri 1 mM koncentraciji znašala le 36%. Uspešnost na encimskem testiranju hkrati dobro potrjuje učinkovitost uporabljene računalniške metode iskanja novih biološko aktivnih spojin. Večina najvišje uvrščenih spojin je imela molekulsko maso manjšo od 300 g/mol, pogled na njihovo predvideno vezavo v modelu OGT pa razkriva še veliko možnosti za dodatne interakcije s proteinom, kar nam daje še veliko manevrskega prostora pri načrtovanju in optimizaciji spojin do še boljših zaviralcev. Opravili smo šele prvi korak v dolgi verigi razvoja novih učinkovin, vendar menimo, da zelo koristnega in pomembnega.

Ključne besede: OGT, UDP-GlcNAc, virtualno reševanje, zaviralec

## ABSTRACT

Full understanding of the enzyme O-GlcNAc transferase and all of its functional mechanisms and roles may represent the last piece in the jigsaw, which would confirm that errors in regulation of O-GlcNAcylation of proteins lead to numerous diseases, including type 2 diabetes, cancer and Alzheimer's disease. We used computer-aided drug design methodology to search for novel lead compounds, which would effectively inhibit OGT enzymatic activity. Our starting point was the OGT's natural substrate UDP-GlcNAc. Majority of the so far developed and tested inhibitors were active only in *in vitro* experiments and exhibited insufficient target specificity. In addition, most of them also suffer from a large degree of cell impermeability. Structure-based virtual screening method of compound libraries offered us a new insight in the inhibitor design. Screening results of docking compounds into the UDP binding pocket of the OGT active site offered some really interesting results. Structure of 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-4-carboxamide was a common structural feature of several compounds ranked amongst the best 25 hits. Researchers from the Chair of medicinal chemistry used it as a template structure for the synthesis of 22 new derivatives. *In vitro* testing results for these derivatives were very encouraging with some of the compounds (UL-AAS-4 and UL-AAS-5c) completely inhibiting the OGT activity at the tested concentration. Inhibition was also achieved with some other compounds ranked on the list of the best 25 hits. These laboratory tests results also confirmed the efficiency of the used methods for identifying new lead compounds. Most of the top ranked compounds have a molecular mass lower than 300 g/mol, which gives us a lot of space for future design and optimization of the selected compounds. With this work we merely made the first step in the long process of finding better inhibitors, though a very useful and important one.

Keywords: OGT, UDP-GlcNAc, inhibitor, virtual screening

## SEZNAM OKRAJŠAV

2D	dvodimenzionalen
3D	tridimenzionalen
Å	ångström
CAD	s trkom aktivirane disociacije (angl. Collision-Activated Dissociation)
CAZY	baza encimov, ki delujejo na ogljikove hidrate (angl. Carbohydrate-Active enZymes Database)
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GLUT4	glukočni transporter tipa 4
GT41	glikoziltransferaze 41
HCF-1	faktor 1 gostiteljske celice
IC <sub>50</sub>	srednja zaviralna koncentracija
kDa	kilodalton
MALDI-MS	ionizacija v matriksu z desorpcijo z laserjem, sklopljena z masno spektrometrijo
NMR	nuklearna magnetna resonanca
OGA	$\beta$ - <i>N</i> -acetilglukozaminidaza
OGT	difosfo- <i>N</i> -acetilglukozamin:polipeptid $\beta$ - <i>N</i> -acetilglukozaminiltransferaza
p53	tumor supresorski protein p53
PDB	Protein Data Bank – podatkovna baza struktur proteinov
UDP	uridin-difosfat

# 1. UVOD

## 1.1 ZGODOVINSKA UMEŠTITEV

Prve omembe in potrditve obstoja encima difosfo-*N*-acetilglukozamin:polipeptid  $\beta$ -*N*-acetilglukozaminiltransferaza (O-GlcNAc transferaza ali OGT) sta že pred več kot 30 leti raziskovala in dokazala Torres in Hart. S tem odkritjem sta razbila do tedaj veljavne dogme, da so glikozilacije proteinov omejene zgolj na endoplazemski retikulum, Golgijev aparat, celično površino in zunajcelični matriks. Poleg tega sta glikozilacijo potrdila še v jedru, citoplazmi in mitohondrijih (1). Za natančnejše poznavanje encima pa smo morali počakati še nekaj let, saj je bilo to močno odvisno od vzporednega tehnološkega napredka. Da je bilo potrebnega toliko časa za dokazovanje obstoja OGT, je posledica dejstev, da je *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) majhna in nenabita molekula, ki redko spremeni potovanje proteinov celo pri gelskih elektroforezah visokih ločljivosti, hkrati pa O-GlcNAc s težavo zaznavajo tudi metode masne spektrometrije, kot sta CAD in MALDI-MS. Poleg tega se v vseh celicah nahajajo številne hidrolaze, ki GlcNAc hitro odstranijo iz proteinov ob morebitnih celičnih poškodbah (2). Nepoznavanje kristalne strukture OGT pa je bila tudi glavna ovira pri preučevanju molekularnih mehanizmov, načrtovanju zaviralcev in razumevanju prepoznavanja substratov (3).

## 1.2 PREDSTAVITEV TARČE

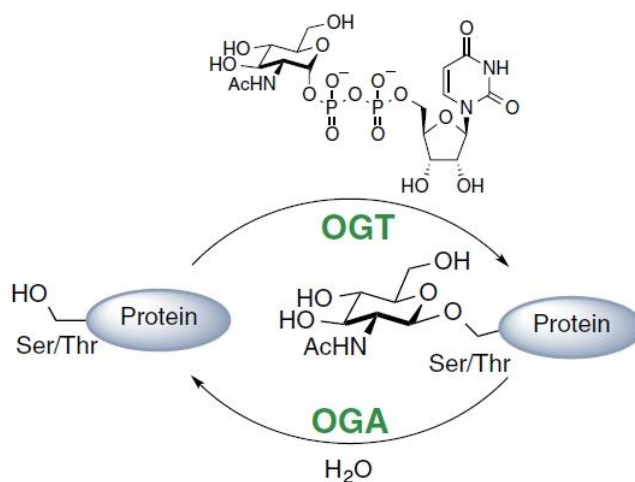
Razlog za številne raziskave encima OGT je njegova vključenost v številne procese v celici. Sposobnost zaznavanja in odzivanja na različne pogoje in količino hranil v okolju je ključna za razvoj in rast vseh organizmov. Eden takih sistemov pri evkariontih je esencialni encim OGT, ki preko uridin-difosfat-*N*-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) zaznava znotrajcelično koncentracijo glukoze (3). Niti encima OGT niti GlcNAc vezanega na OH skupine serina ali treonina niso našli v raziskavah prokariontov in kvasovk, kar nakazuje, da se je encim najverjetneje razvijal preko večceličnih organizmov (4). Produkt delovanja encima OGT je več kot 100 modificiranih proteinov različnih funkcijskih razredov znotraj celice, med katerimi so transkripcijski faktorji, proteini citoskeleta, jedrni proteini (porini), tumorski zaviralci, kinaze in različni prenašalci signalov. Modificirani proteini imajo zato spremenjeno aktivnost, stabilnost, lokacijo ali interakcije z ostalimi biološkimi molekulami (5). OGT je prisoten nespecifično v vseh celicah evkariontov in kaže tudi nizko



specifičnost za razporeditev po posameznih tkivih ali organih. Pri človeku se pojavlja v nekoliko višjih koncentracijah v celicah T in B ter makrofagih, v znižanih koncentracijah pa v  $\beta$ -celicah pankreasa in centralnem živčnem sistemu (6). Pojavlja se v treh izoformah, in sicer v jetrih kot heterotrimer, sestavljen iz dveh 110 kDa in ene 78 kDa velike podenote. 110-kDa obliko je moč zaznati v vseh tkivih, obstaja tudi kot homotrimer, medtem ko so obstoj 78-kDa podenote potrdili le v ledvicah, jetrih in mišicah (7). Tretjo obliko predstavlja 103 kDa velika podenota značilna za mitohondrije, ki jo najpogosteje zaznamo pri rastlinah (8). OGT uvrščamo v družino glikoziltransferaz 41 (GT41) iz naddružine glikoziltransferaz znotraj klasifikacijskega sistema baze encimov, ki delujejo na ogljikove hidrate (CAZY) (9). Baza CAZY opisuje in razvršča družine strukturno podobnih katalitskih in ogljikove hidrate vezočih modulov ali funkcionalnih domen v encimih, ki spreminjajo, tvorijo ali cepijo glikozidne vezi (10). Kljub vsem dosedanjim spoznanjem ne moremo z gotovostjo potrditi načina in posledic delovanja OGT, nepravilnosti v regulaciji dodajanja ali odstranjevanja enote GlcNAc na proteinih pa naj bi igrale pomembno vlogo pri razvoju raka ter Alzheimerjeve in sladkorne bolezni (5).

### 1.2.1 Fiziološka vloga

Vloga encima OGT je pripenjanje ene sladkorne enote GlcNAc iz sladkornega nukleotidnega prekursorja UDP-GlcNAc preko  $\beta$ -glikozidne vezi na serinske ali treoninske hidroksilne skupine peptidov in proteinov, pri čemer pride do inverzije konfiguracije na anomernem centru GlcNAc (11). Nasprotno delovanje pa ima encim  $\beta$ -N-acetilglukozaminidaza (OGA), ki preko hidrolize odstranjuje O-GlcNAc iz proteinov (shema predstavljena v sliki 1).



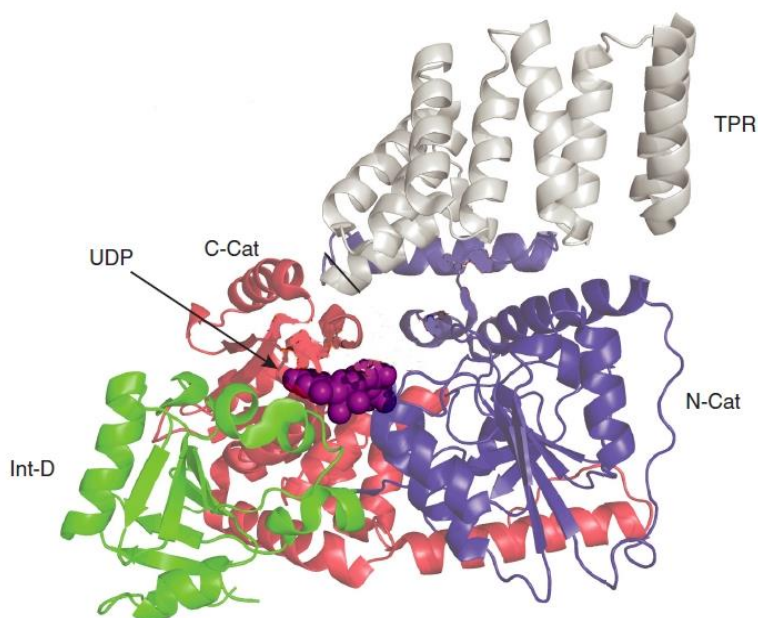
**Slika 1:** Poenostavljena shema pripenjanja in odstranjevanja sladkorne enote GlcNAc na serinsko ali treoninsko hidroksilno skupino s pomočjo encimov OGT in OGA. Prerejeno po (12).

Na upravljanje tega procesa lahko gledamo kot na nekakšen senzorski sistem, v katerem se OGT in OGA odzivata glede na količino celične glukoze, ki jo sistem zaznava preko koncentracije UDP-GlcNAc (3). V tem pogledu se močno razlikuje od ostalih podobnih procesov glikozilacije proteinov, saj je omenjeno pripenjanje GlcNAc na hidroksilno skupino Ser ali Thr ostankov edinstven, obsežen in reverzibilen post-translacijski proces, ki poteka različno hitro na različnih mestih proteina, zaradi česar močno spominja na proces fosforilacije (13). Primerjava ni naključna, oba procesa tekmujeta bodisi za ista bodisi za sosednja vezavna mesta na proteinih in se hitro odzivata na spremembe pogojev v celicah, ki jih ustvarjajo stres, hormoni in količina hranil, vendar zamišljati si, da sta si procesa enostavno recipročna, prestavlja preveliko poenostavitev (14). Kot primer lahko navedemo njuno prepletanje pri proteinu p53, kjer pripenjanje GlcNAc na mestu Ser149 zmanjša fosforilacijo na Thr155 ter znižuje preko ubikvitina nadzorovano razgradnjo proteina p53 (15). Veliko razliko med obema procesoma opazimo v njuni regulaciji, pri čemer fosforilacijo regulira preko 500 kinaz in 150 fosfataz (16), na drugi strani pa imamo OGT, za katerega je pri sesalcih in insektih odgovoren zgolj en gen, ki kodira njegovo katalitično podenoto, pri čemer enako velja tudi za OGA (7). Gen za OGT pri ljudeh se nahaja na kromosomu X q13. Ko so pri miših izbrisali zapis za OGT, se je to odražalo pogubno že na embrionalnem nivoju, saj te živali pogosto niso živele dlje kot 10 dni (4). Odkritje iz leta 2011 pripisuje pomembno vlogo OGT tudi pri proteolitskem zorenju epigenetskega regulatorja HCF-1. Slednji je vpleten v številne ključne komplekse, udeležene pri spremembah kromatina, vključno z napredovanjem med posameznimi fazami celičnega cikla od G1 do S in M faze (17). Nadaljnje raziskave so pokazale, da OGT uporablja UDP-GlcNAc kot ko-substrat za cepitev HCF-1, pri čemer naj bi do cepitve prišlo v enakem aktivnem mestu kot pri vezavi GlcNAc na Ser ali Thr proteinov (18).

### **1.2.2 Struktura OGT**

Prve vpoglede v tridimenzionalno strukturo OGT so pridobili prek ortologa OGT iz bakterije *Xanthomonas campestris* (XcOGT), ki ima 36% enakost aminokislinskega zaporedja človeške OGT (16). Iskanje primerjav med bakterijsko in človeško OGT nam dovoljuje dejstvo, da sta gena za OGT in OGA visoko ohranjena in esencialna v živalskem kraljestvu,

vse od gliste *Caenorhabditis elegans* do človeka (2). Strukturni kompleksi XcOGT z analogi UDP in UDP-GlcNAc so razkrili aktivno mesto, znotraj tega pa tri značilne domene. To so N-končna domena (N-Cat), C-končna domena (C-Cat) ter vmesna domena (Int-D) (16). Njihova strukturna razporeditev je predstavljena na sliki 2.



**Slika 2:** Prostorska predstavitev človeškega encima OGT s ključnimi področji: C-končna domena (C-cat), obarvana rdeče, je glavna nosilka encimske aktivnosti OGT, N-končna domena (N-Cat), obarvana vijolično, skupaj s 4,5 tetratrikopeptidnimi ponovitvami (TPR), obarvanimi belo, so ključni v prepoznavanju proteinskih substratov ter njihovi interakciji, funkcija vmesne domene (Int-D), obarvane zeleno, pa še ni poznana (prirejeno po (12)).

N-Cat in C-Cat vsebujeta strukture podobne Rossmannovim zvitjem, ki so značilne za naddružino glikoziltransferaz B (GT-B). Poleg večdomenske katalitične enote pomemben delež N-Cat predstavlja skupek ponavljajočih se motivov, imenovanih tetratrikopeptidne ponovitve (TPR) (12). Gre za degenerirane motive iz 34 aminokislin, ki se tipično zvijejo parno, antiparalelno v  $\alpha$ -vijačnice. Največjo vlogo TPR pripisujemo pri tvorbi interakcij protein-protein in prepoznavi proteinskih substratov (19). Na podlagi števila TPR na N-koncu ločimo 3 fiziološke izoforme OGT. Najdaljšo s 13,5 TPR označujemo kot jedrno in citoplazemsko OGT (ncOGT). Krajša oblika z 9 TPR se nahaja na notranji mitohondrijski membrani, medtem ko najmanjša z le 2,5 TPR (sOGT) ostaja najslabše raziskana. sOGT in ncOGT se v enaki meri izražata v jedru in citoplazmi (12). N-Cat vsebuje tudi za OGT

specifični dodatni vijačnici H1 in H2, ki sta ključni komponenti aktivnega mesta (3). Med N-Cat in C-Cat se nahaja povezovalna domena, sestavljena iz 120 aminokislin (Int-D), ki jo najdemo samo pri živalih. Čeprav poznamo njeno strukturo, pa njeno delovanje in funkcija še nista znani (9). Kljub temu, da OGT glikozilira veliko različnih peptidov, vseeno daje prednost tistim, pri katerih je mesto glikozilacije obdano z aminokislinskim zaporedjem, ki omogočajo iztegnjeno konformacijo proteina. Kot primer naj omenimo prolin, valin ter izolevcin ( $\beta$ -razvejane aminokislina), ki zaradi svoje strukture dopuščajo le manjše število konformacij in zvitij glavne verige, hkrati pa je otežena tudi tvorba  $\alpha$ -vijačnic (3). Zanimiva je tudi sposobnost encima OGT, da se po vezavi peptida preko UDP-GlcNAc v aktivnem mestu odprtina med obema katalitskima poloblama razširi, dodaten prostor za večje peptidne substrate pa pridobi še preko mehanizma tečaja, pri katerem se TPR zavrti okrog osi med TPR 12 in 13, iz česar lahko sklepamo tudi na odprto ali zaprto stanje aktivnega mesta (3). V raziskavi, pri kateri so uporabili UDP-S-GlcNAc in XcOGT, so prišli do pomembnih ugotovitev, in sicer da uracilni obroč UDP tvori 3 vodikove vezi v vezavnem žepu, ki ga tvorijo aminokislina Lys441 do His444 in poteka vzporedno s stransko verigo Tyr447. Ribozna enota tvori vodikovo vez z Asp471, ki je ključna za vezavo, saj je mutacija XcOGT, v kateri so zamenjali Asp471 za Ala, povzročila nezmožnost OGT za vezavo UDP-GlcNAc (13).

### **1.2.3 Heksozaminska biosintezna pot (HBP)**

HBP je ena izmed vej metabolizma glukoze, pri čemer se porabi 2-3% celotne celične glukoze. HBP si prva dva koraka deli z glikolizo, in sicer heksokinaze glukozo fosforilirajo do glukoza-6-fosfata, ki se naprej pretvori v fruktoza-6-fosfat preko fosfoglukozne izomeraze. Tu se poti HBP in glikolize ločita. Hitrost omejujoči encim v HBP predstavlja glutamin-fruktoza-6-fosfat amidotransferaza (GFAT), ki pretvarja fruktozo-6-fosfat v glukozamin-6-fosfat. Ob tem pride do ireverzibilnega prenosa amino skupine iz glutamina in izomerizacije fruktoza-6-fosfata v glukozamin-6-fosfat in glutamat (5). Njegovo delovanje je preko povratne zanke regulirano s koncentracijo glukozamin-6-fosfata ter UDP-GlcNAc, ki je končni produkt HBP. UDP-GlcNAc velja za drugo najbolj zastopano visoko energijsko spojino v telesu (približno 40 nmol/g tkiva), saj zaostaja le za adenozin-trifosfatom (ATP; približno 100 nmol/g tkiva) (20). Stanja dolgo trajajoče hiperglikemije, ki se lahko pojavijo pri sladkorni bolezni ali ob povečanem privzemu glukoze v rakavih

celicah, se odražajo v prekomerni vezavi GlcNAc na hidroksilne skupine Ser ali Thr proteinov preko OGT, kar povezujejo s škodljivimi vplivi na celice (3).

#### **1.2.4 Vloga OGT vpri rakavih obolenjih**

Ena izmed tipičnih značilnosti rakavih celic je njihov spremenjen metabolizem, ki ga zaznamo kot povečano porabo glukoze in glutamina, od katerih je močno odvisna HBP. Tako začnejo proizvajati visoko energijske molekule ATP neodvisno od koncentracije kisika, ki je potreben za nastanek ATP preko oksidativne fosforilacije (21). Ta fenomen imenujemo Warburgov efekt. V normalnem stanju preko oksidativne fosforilacije iz ene molekule glukoze nastaneta dve molekuli ATP ter dve molekuli piruvične kisline, iz katerih nadalje preko acetil-koencima A, ki vstopa v Krebsov cikel, nastane celokupnih 38 molekul ATP. Ob pomanjkanju kisika, do katerega pride zaradi preobširnega razrasta celic, pa proces nastajanja ATP postane izredno neučinkovit. Piruvična kislina se ne pretvori v acetil-koencim A, temveč v mlečno kislino preko anaerobnega celičnega dihanja, iz česar nastaneta samo 2 molekuli ATP (22). Ker glikoliza ne pokrije vseh potreb, rakave celice primanjkljaj kompenzirajo s povečanim privzemom glukoze (21). Nedavna odkritja so pokazala povišano aktivnost encima OGT in obsežnejšo vezavo GlcNAc na proteine v celicah raka na dojki. Znižanje teh vrednosti v *in vitro* ter *in vivo* poskusih je zaviralo rast in upočasnilo metastaziranje te vrste rakavih celic pri miših (23). Regulacija rasti raka na dojkah s pomočjo OGT je odvisna od regulacije onkogenega transkripcijskega faktorja FoxM1, saj preko znižanja vezave GlcNAc na proteine povečamo obseg razgradnje FoxM1. Slednji nam služi kot pomemben indikator pri raku trebušne slinavke, pljuč, jeter ali prostate, saj so v vseh teh primerih njegove koncentracije povišane (21).

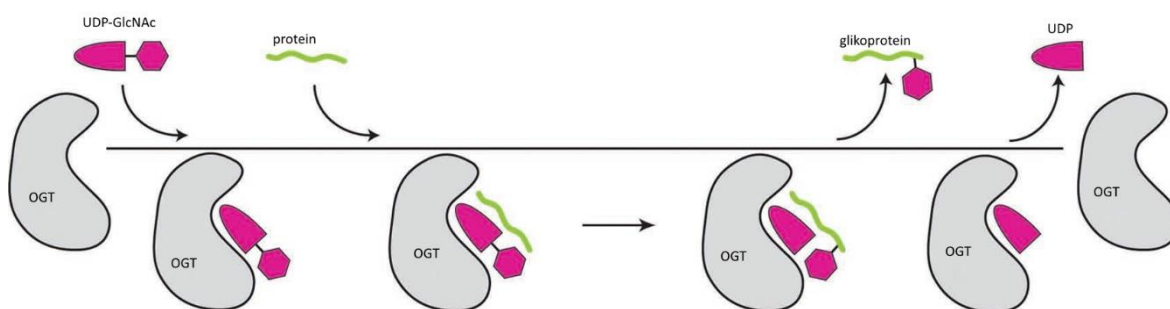
#### **1.2.5 Vpliv OGT na sladkorno bolezen**

Sladkorna bolezen (SB), predvsem diabetes tipa 2, predstavlja čedalje večji zdravstveni problem v razvitih državah, ki skupaj s povišanim krvnim pritiskom in višjim deležem telesnih maščob ogrožajo stanje srčno-žilnega sistema. Ob normalnih celičnih pogojih se OGT večinoma nahaja v jedru, vendar se del tega ob dolgo trajajoči inzulinski stimulaciji premesti na celično membrano. V naslednjem koraku pride do povezave OGT z inzulinskim receptorjem, kar vodi do fosforilacije tirozina OGT in posledično v povišano aktivnost encima OGT (14). Sočasno zvišana koncentracija glukoze značilna za diabetes tipa 2, ki se preko HBP pretvori tudi v UDP-GlcNAc, vodi v obsežno vezavo GlcNAc na

hidroksilne skupine Ser in Thr na številnih proteinih in prenašalcih signala, med drugim tudi na substratu inzulinskega receptorja 1 (IRS1) (24). Vezava GlcNAc na IRS1 zniža obseg fosforilacije Tyr608 na IRS1, zaradi česar se poveča obseg fosforilacije na Ser632 ter Ser635, vse to pa se v nadaljnjih stopnjah odraža v oslavljenem signalu posredovanem preko inzulina. Posledice so znižana sinteza glikogena ter znižan privzem glukoze preko receptorjev GLUT4, medtem ko pri kratkotrajnejših dražljajih normalno prihaja do glikogeneze in privzema glukoze in posledičnega zniževanja koncentracije glukoze v krvi (14). Omenjeno si lahko razlagamo kot povsem naraven mehanizem postopnega zniževanja inzulinskega signala pri zdravih posameznikih. Prehitro zaviranje inzulinskega signala ali preobsežne vezave enote GlcNAc na OH skupine Ser ali Thr s posledično zvišanimi krvnimi koncentracijami glukoze pa nedvomno na dolgi rok prinaša škodljive učinke na krvožilnem sistemu in preobremenitev trebušne slinavke (14).

### 1.2.6 Mehanizem delovanja OGT

Sprva je veljalo prepričanje, da reakcija pripenjanja GlcNAc na hidroksilne skupine Ser in Thr poteka po naključnem bi-bi mehanizmu (25), a so kasnejše informacije o strukturi kompleksa med OGT, UDP in peptidom pokazale, da se v aktivno mesto najprej veže UDP-GlcNAc, kasneje vstopajoči peptid pa prekrije žepek, v katerem se nahaja UDP-GlcNAc, kar pomeni, da OGT deluje po zaporednem mehanizmu reakcije prikazanem na sliki 3 (11).



**Slika 3:** Prikaz zaporednega mehanizma reakcije ob pripenjanju enote GlcNAc na protein. Prirejeno po (11).

Sledi napad akceptorske verige peptida na anomerni ogljik UDP-GlcNAc, pri čemer se tvori nova  $\beta$ -glikozidna vez. Ta teorija je podprta s študijami z različnimi zaviralci OGT, pri katerih so pridobili kristalne strukture kompleksov OGT-zaviralec (3). Za razliko od velikega števila proteinskih kinaz, ki pri svoji aktivnosti izkoriščajo prepoznavanje značilnih zaporedij aminokislin v substratu, česa podobnega še niso odkrili pri OGT (26). UDP-

GlcNAc lahko tudi sam deluje kot katalitična baza, kar omogoča prenos GlcNAc na tarčni serin ali treonin (27). Dolgo časa so predvidevali, da sta za glikozilacijo nujno potrebna dva koraka, in sicer najprej aktivacija izstopajoče skupine na glikozilnem donorju, nato pa odstranitev protona iz hidroksilne skupine na glikozilnem akceptorju (12). Encimi iz naddružine glikoziltransferaz GT-A za proces aktivacije izstopajoče skupine uporabljajo kovinski atom, OGT in ostale glikoziltransferaze naddružine GT-B pa delujejo po drugačnem mehanizmu, saj so neodvisne od kovinskega atoma (28). Zgoraj omenjeni proces aktivacije izstopajoče skupine se pri OGT začne prek vsidranja  $\beta$ -fosfata iz UDP-GlcNAc preko vodikovih vezi na N-konec  $\alpha$ -vijačnice, pri čemer so ključne interakcije z His920, Thr921 in Thr922. Dodatna stabilizacija iz te verige izhaja iz elektrostatskih interakcij med negativno nabitim fosfatom in celokupnim dipolom verige (11). Stranska veriga z Lys842 se nahaja natančno pod  $\beta$ -fosfatom, katerega reaktivnost in pomembnost v encimski aktivnosti OGT je bila že prej omenjena. Vsi ti dejavniki aktivirajo UDP-GlcNAc za nukleofilni napad. Sledi zasuk sladkorne enote proč od  $\beta$ -fosfata v neposredno bližino akceptorske hidroksilne skupine. Kako pa pride do aktivacije hidroksilne skupine na serinu ali treoninu, pa zaenkrat še ni znano (12).

### **1.3 ISKANJE ZAVIRALCEV**

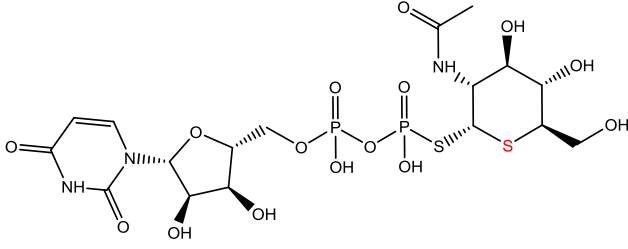
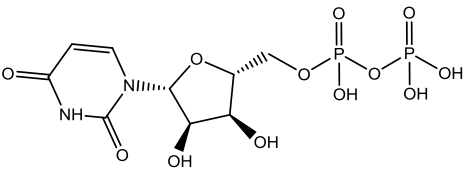
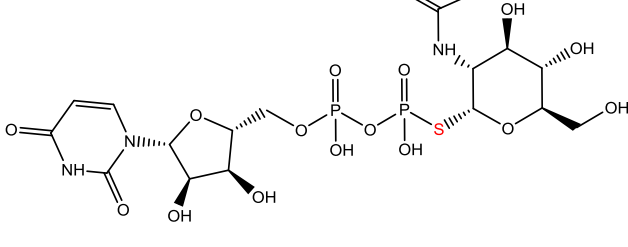
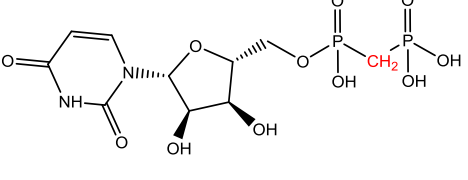
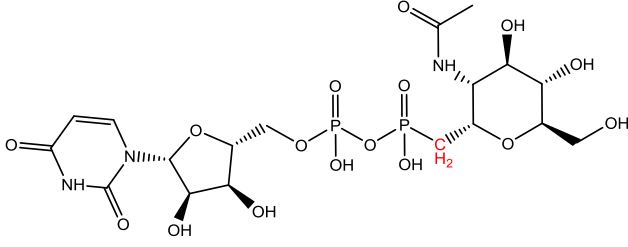
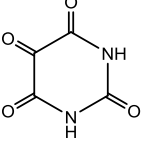
V iskanju razumevanja delovanja in poznavanja funkcij posameznih glikoziltransferaz so bili dosedanji naporji večinoma usmerjeni v iskanje njihovih zaviralcev, ki so jih načrtovali v obliki analogov substratov encimov, v našem primeru UDP-GlcNAc (29). Vendar pa se ta naloga še naprej izkazuje za zelo trd oreh, saj idealnega zaviralca še niso razvili. Velike omejitve predstavljajo specifičnost za mesto delovanja, neselektivna vezava na ostale celične sisteme ter prehodnost preko celične membrane (30).

#### **1.3.1 Dosedanji dosežki**

Kot najmočnejši inhibitor se je do sedaj pokazal kar UDP kot končni produkt encimske reakcije OGT, ki tako prek negativne povratne zanke vpliva na delovanje encima (27). UDP je za raziskave inhibicije neuporaben, saj ne prehaja celičnih membran, je centralni metabolit vpleten v biosintezo nukleinskih kislin (RNA) in v aktivacijo monosaharidov kot glikozilni donator za biosintezo glikokonjugatov. Kar 6 od 9 nukleotidnih sladkorjev pri sesalcih predstavljajo UDP-sladkorji. Tako obstaja velika možnost interakcij

analogov UDP z različnimi skupinami encimov, kot so oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze in izomeraze (31).

**Preglednica 1:** Analogi UDP-GlcNAc kot zaviralci OGT. Prirejeno po (13).

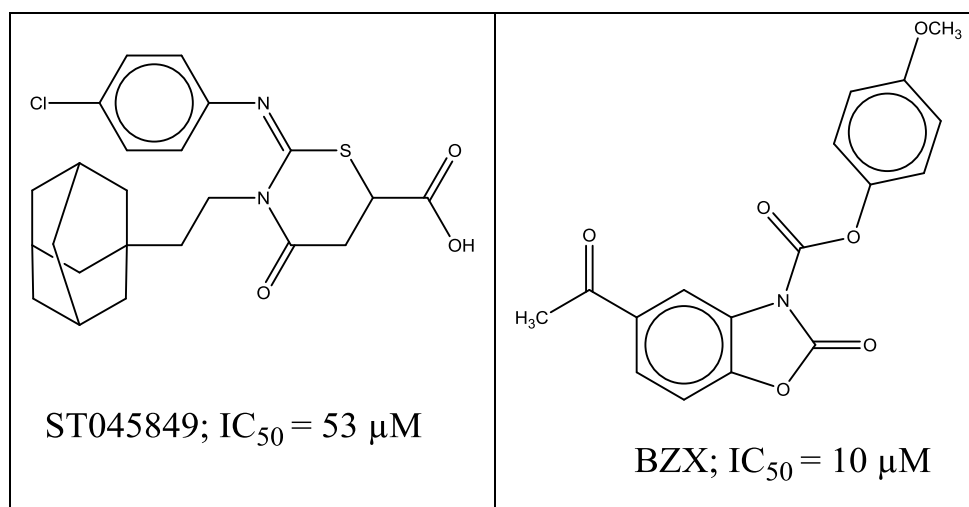
 <p>UDP-5S-GlcNAc</p>	 <p>UDP; <math>IC_{50} = 1,8 \mu M</math></p>
 <p>UDP-S-GlcNAc; <math>IC_{50} = 93 \mu M</math></p>	 <p>C-UDP; <math>IC_{50} = 9 \mu M</math></p>
 <p>UDP-C-GlcNAc; <math>IC_{50} = 41 \mu M</math></p>	 <p>aloksan; <math>IC_{50} = 18 \mu M</math></p>

Zaviralce, ki so jih razvili in ovrednotili do sedaj, bi lahko strukturno razdelili v tri skupine. Te se med seboj pomembno razlikujejo v idejnem pristopu do njihove sinteze in načinih, ki so jih raziskovalci uporabili za njihovo pridobitev. V prvo skupino uvrščamo analoge substrata UDP-GlcNAc (prikazani v preglednici 1). Ti se od naravnega substrata razlikujejo le v nekaj atomih. Kot prvi inhibitor OGT so uporabili uracilni analog, 2,4,5,6-tetraoksimidazin oz. aloksan. Slednji je sicer šibkejši zaviralec kot UDP, njegova prednost pa se nahaja v sposobnosti prehajanja celičnih membran, ker za svoj vstop v celice uporablja glukozne transporterje. Slabost pa so številni učinki na druge tarče in toksičnost za celice zaradi sposobnosti tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti ter kratek razpolovni čas v fizioloških



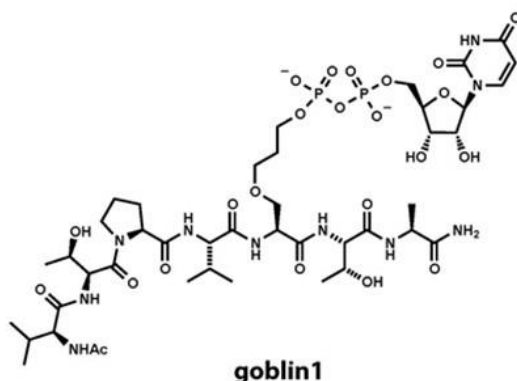
pogojih (32). Po uspešni sintezi UDP-GlcNAc je nato sledila še generacija analogov, kot so UDP-S-GlcNAc, UDP-C-GlcNAc in C-UDP. Zadnji se je pokazal kot najbolj učinkovit, vendar ne prehaja celičnih membran. Manjšo posebnost izkazuje UDP-5S-GlcNAc, ki zaradi zamenjave kisikovega za žveplov atom postane odporen na glikolizo ter hidrolizo. Ta analog je tudi preprečil cepitev epigenetskega faktorja HCF-1, iz česar sklepamo, da ima nukleotidni sladkor poleg strukturne tudi funkcionalno vlogo (11). Drugo skupino predstavljajo spojine, pridobljene s pomočjo rešetanja velikih knjižnic spojin, ki vsebujejo spojine z lastnostmi zdravnih učinkovin. Raziskava je bila usmerjena v iskanje spojin, ki bi tekmovali za vezavo v aktivnem mestu s sladkorno enoto UDP-GlcNAc. Kot zanimivi sta se izkazali 3-(2-adamantiletil)-2-[(4-klorofenil)azametilen]-4-okso-1,3-tiazaperhidroin-6-karboksilna kislina (ST045849) in 4-metoksifenil-5-acetil-2-oksobenzo[*d*]oksazol-3(2*H*)-karboksilat (BZX) (preglednica 2) (30). Študija je pokazala, da zaviranje OGT s ST045849 zmanjša razvoj celic  $\beta$  v trebušni slinavki ter znižuje nastajanje inzulina (33).

**Preglednica 2:** Inhibitorja OGT najdena na podlagi visoko zmogljivega rešetanja (HTS). Prirejeno po (30).



BZX je bil uporabljen v raziskavi zdravljenja raka na dojkah z rezultati, ki so pokazali zaviralni učinek na rast ter invazivnost rakavih celic preko modulacije transkripcijskega faktorja FoxM1 (23). Kljub potencialno ugodnemu terapevtskemu učinku je največja pomankljivost BZX njegov mehanizem delovanja, ki je posledica bikarbamatne strukture. Zaradi tega deluje kot kovalentni zaviralec, ki se v aktivnem mestu OGT preko acilne karbonylne skupine poveže z Lys842 in Cys917 (34). Potrditev je dala analiza z uporabo masne spektrometrije, pri kateri se je po inkubaciji encima z zaviralcem BZX na OGT

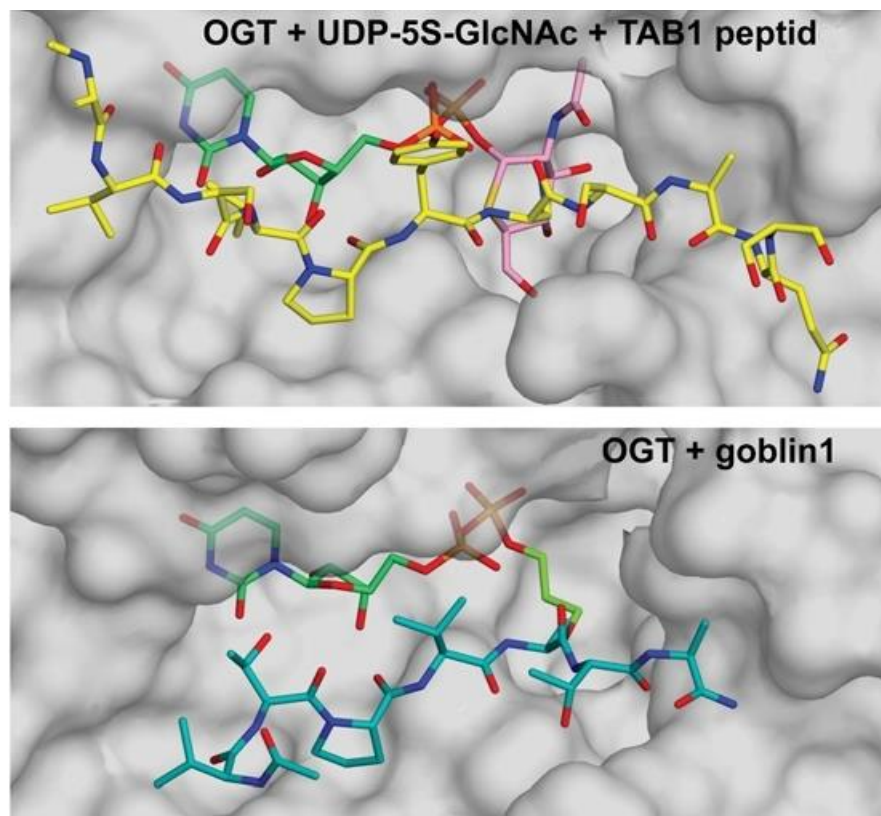
pojavljala dodaten fragment velikosti 26 Da, ki ustreza karbonilni spojini (34). Nastala tiokarbamatna povezava ima lahko za posledico neselektivno delovanje in morebitne toksične učinke. Po temu mehanizmu naj bi prvi napadel Lys842, kar so dokazali z načrtno mutacijo, v kateri so Lys842 zamenjali z Ala, zaradi česar je prišlo do izgube encimske aktivnosti OGT (34).



**Slika 4:** Struktura bisubstratnega inhibitorja OGT goblin1.

V tretjo skupino uvrščamo bisubstratne inhibitorje. K razvoju teh so bistveno doprinesla nova spoznanja o strukturi in mehanizmu delovanja OGT, na osnovi katerih lahko racionalno pristopimo k načrtovanju novih kompetitivnih zaviralcev tega encima, pri čemer v eno spojino poskušamo združiti tako donorski kot tudi akceptorski substrat z namenom doseganja selektivnega zaviranja OGT (30).

Inhibitorja goblin 1 (OGT bisubstratno vezani inhibitor 1), prikazan na sliki 4, in goblin 2 sta bila načrtovana iz akceptorskega peptida ter UDP, GlcNAc enoto pa je zamenjal kratek distančnik, ki ohranja enako prostorsko ureditev (31). Primerjava vezave UDP-5S-GlcNAc in peptida TAB1 (TGF- $\beta$  aktivirana kinaza 1 (MAP3K7) vezoči protein 1) v OGT v primerjavi z vezavo goblin1 v OGT nazorno kaže idejo o implementaciji podobne prostorske razporeditve med dvema različnima ligandoma (slika 5). V *in vitro* pogojih je goblin1 inhibiral OGT z vrednostjo  $IC_{50} = 18 \mu M$ , kar bi bil zelo zanimiv rezultat, če bi spojina prehajala celično membrano (31).

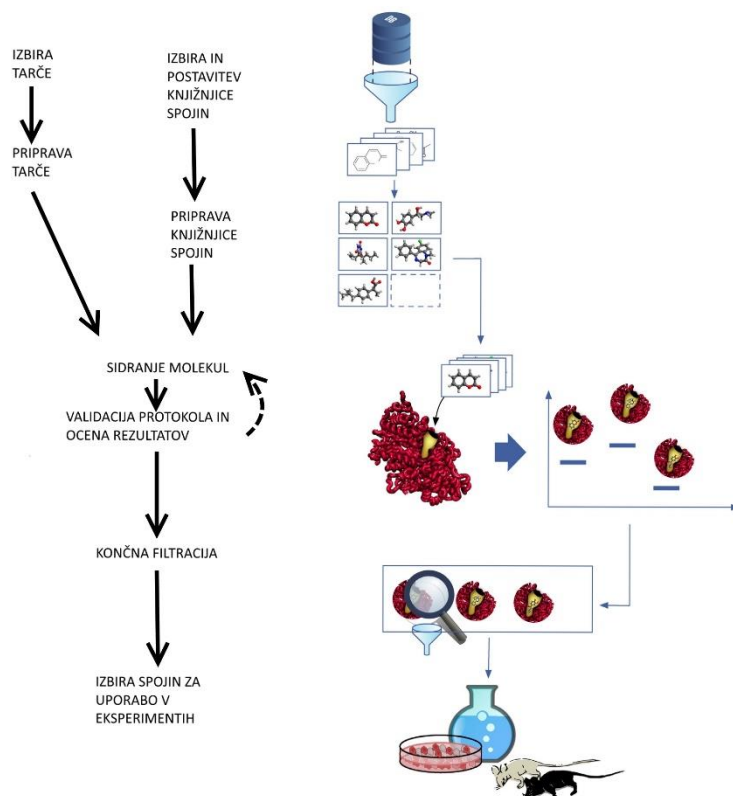


**Slika 5:** Posnemanje prostorske strukture zaviralca goblin1 (modra barva) v aktivnem mestu po zgledu zaviralca UDP-5S-GlcNAc (zelena ter rožnata barva) ter peptida TAB1 (rumena barva). Prirejeno po (31).

Krajši povzetek spoznanj iz študij zgoraj naštetih zaviralcev nam pove marsikaj uporabnega. Med bolj zanimivimi je dejstvo, da GlcNAc enota vzpostavi zelo malo interakcij z encimom in komajda prispeva k celokupni vezavi (27). Določanje vezavne afinitete za produkt in substrat je pokazalo 30-krat večjo konstanto disociacije za UDP-GlcNAc kot za UDP (27). To se je potrdilo v testiranju bisubstratnega zaviralca goblin1, kjer so GlcNAc zamenjali s krajšo propilensko verigo in hkrati ohranili afiniteto do OGT v nizkem mikromolarnem območju (31). Ogromno oviro pri načrtovanju novih zaviralcev predstavlja ustrezna nadomestitev fosfatnih skupin, ki veliko prispevajo k vezavni afiniteti, a zelo neučinkovito prehajajo preko membrane, njihovo nadomeščanje z nevtralnimi strukturnimi elementi pa vodi do izgube afinitete (34). Strukturno načrtovani poizkusi mutageneze so pokazali, da je Lys842 ključnega pomena pri vezavi UDP v človeški OGT, prav tako ob mutaciji pride do izgube katalitične vloge pri cepitvi HCF-1 (27). Svojo pomembnost Lys842 dokazuje tudi v interakciji z BZX, saj ta tvori kovalentno povezavo med Lys842 ter Cys917 v aktivnem mestu OGT (34).

## 1.4 RAČUNALNIŠKA PODPORA PRI ISKANJU NOVIH BIOLOŠKO AKTIVNIH SPOJIN

V okviru te magistrske naloge bomo za iskanje novih zaviralcev OGT uporabili računalniško podprto iskanje biološko aktivnih spojin. Slednje je pomembno spremenilo način in hitrost dela na področju načrtovanja in iskanja novih potencialno bioaktivnih spojin, k čemur stremi tudi farmacevtska industrija. Uporabo računalnikov v te namene moramo razumeti kot dodaten kamenček v mozaiku interdisciplinarnosti tovrstnih raziskav (35). V procesu razvoja novih zdravilnih učinkovin sta zelo pomembna dva dejavnika, in sicer čas in finančni stroški. S pomočjo računalniško podprtih raziskav lahko v primerjavi s klasičnim iskanjem bioaktivnih spojin, ki je temeljilo na poskusih in napakah, čemur je sledil racionalnejši pristop k modifikaciji že obstoječih in poznanih naravnih in sinteznih spojin, močno skrajšamo čas in privarčujemo denar potreben za nadaljnje vrednotenje. Seveda se vsega ne da opraviti *in silico*, nas pa ta način mnogo hitreje pripelje na pravo pot, k bolj usmerjenemu in poglobljenemu raziskovanju, saj programi na podlagi vse bolj dovršenih algoritmov dovolj dobro napovedujejo realno stanje.



**Slika 6:** Proces računalniško podprtega iskanja novih bioaktivnih spojin. Na levi strani je predstavljen idejni postopek, ki ga na desni strani vzporedno spremlja *in silico* proces. (prirejeno po (35)).

Idejni proces ostaja enak - najprej izberemo bolezen oz. stanje, ki nas zanima (slika 6). Sledi iskanje vzroka za bolezen, iskanje biološke makromolekule katere delovanje želimo modulirati s ciljem ozdraviti bolezen ali vsaj izboljšati določeno bolezensko stanje. Poznavanje tarčnega mesta in vseh vpletenih spojin (substratov, produktov, znanih zaviralcev) nam omogoča načrtovanje novih spojin z delovanjem na izbrano tarčno makromolekulo. Računalniški programi nam omogočajo vrednotenje strukture molekul, med drugim tudi izračun molekulskih opisovalnikov kot so porazdelitveni koeficient, ploščina polarne površine, vse možne konformacije, število vodikovih vezi ter indeks učinkovitosti vezave v izbranem tarčnem mestu.

#### **1.4.1 Virtualno rešetanje**

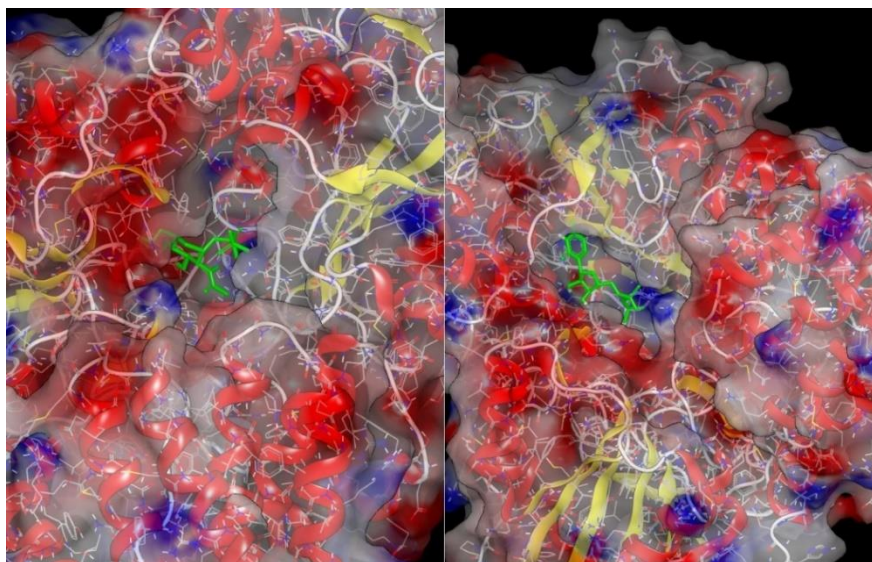
Proces virtualnega rešetanja (VR) lahko razumemo kot nadomestek oziroma dopolnilo rešetanja visoke zmogljivosti (HTS), pri katerem so bile ogromne baze spojin večinoma pripravljene s pomočjo kombinatorne sintezne kemije (36). Metoda VR nam pomaga zožiti nabor kandidatov iz digitalnih knjižnic za nadaljnja testiranja v laboratoriju, ki vsebujejo nekaj milijonov spojin, na vsega nekaj deset do tisoč spojin, ki ustrezajo zaradi filtriranja na podlagi izbranih parametrov. S tem se želimo predvsem znebiti vseh neaktivnih spojin, ki bi jih v primeru uporabe HTS vseeno testirali (36). Iskane kandidate iščemo po dveh različnih idejnih poteh v dvodimenzionalni ali tridimenzionalni obliki zapisa. Prva pot je osnovana na strukturi liganda in deluje na podlagi predpostavke, da podobne spojine delujejo podobno (35). V celotnem naboru zato iščemo spojine, ki bodo referenčni spojini podobne v funkcionalnih skupinah oziroma farmakoforih in njihovi razporeditvi, strukturi ali ujemanju in prekrivanju ostalih molekulskih opisovalnikov. Razvrstitev rezultatov rešetanja je odvisna od stopnje podobnosti z referenčno spojino (37). Več kot dobrodošle so spojine, pri katerih dosežemo skeletni preskok, kar se odraža v drugačni elementni in strukturni sestavi skeleta glede na referenčni ligand.

Druga pot temelji na receptorju/encimu, pri kateri je nujno potrebno dobro poznavanje tridimenzionalne strukture tarče, do katere pridemo s pomočjo rentgenske kristalografije, NMR spektroskopije, krioelektronske mikroskopije ali pa jo zgradimo z računalniško metodo homolognega modeliranja (37). Sidranje daje preko računskih operacij informacije in napovedi o položaju, konformaciji in orientaciji izbranega liganda v danem vezavnem mestu receptorja/encima, zato je zelo uporabno tako za identifikacijo kot optimizacijo spojin

vodnic. Naslednji korak predstavlja ocena aktivnosti oziroma vezavne energije, glede na katero algoritem razvrsti večje baze spojin po predvideni jakosti vezave (37). Programi, ki jih povprečni namizni računalniki zmorejo poganjati in v doglednem času tudi vrniti rezultate, zaradi poenostavitve predvidevajo rigidnost tarčnega mesta. Ligand je lahko bodisi fleksibilen, ali pa mu predhodno pripravimo bazo različnih konformacij, ki jih nato rigidno sidramo v receptor. Tak princip denimo uporablja program FRED, ki smo ga za sidranje uporabili tudi sami. Cenilne funkcije delimo na tri vrste: prve delujejo na principu polja sil, druge so empirične, tretje pa t.i. »knowledge-based« cenilne funkcije katerih bistvo se skriva v analizi parnih potencialov, ki predstavljajo statistično analizo frekvenc razdalj med atomi liganda in receptorja (37).

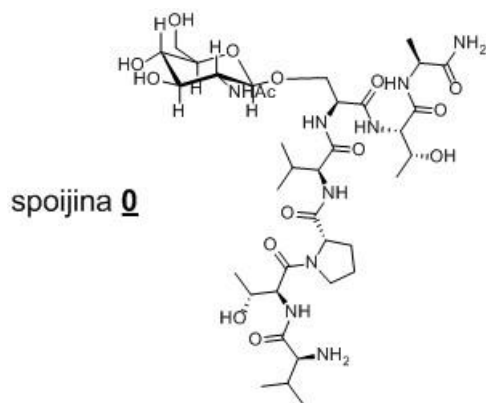
## 2. NAMEN DELA

Raziskovanje vzrokov bolezni kot so rak, diabetes tipa 2 ali Alzheimerjeva bolezen je vse prevečkrat dobilo presenetljiv skupni imenovalec. Poznavanje mehanizmov delovanja encima OGT bi tako lahko prineslo številne potrditve ali zavrnitve hipotez glede zgoraj omenjenih bolezenskih stanj. Namen magistrske naloge je s pomočjo virtualnega rešetanja najti spojine, ki bi se uspešno vezale v aktivno mesto encima OGT, saj imajo do sedaj poznani zaviralci omejeno uporabnost bodisi zaradi slabe selektivnosti napram drugim encimom bodisi zaradi nezmožnosti prehajanja celične membrane. Najprej bomo generirali knjižnico fragmentov (molska masa do 300 g/mol), tako da bomo vanjo združili spojine, ki so komercialno dostopne pri izbranih ponudnikih spojin. Knjižnico bomo ustrezno pripravili, da jo bomo lahko uporabili v naslednji stopnji. Sidranje bomo izvedli dvakrat, in sicer v vezavno mesto za UDP in v vezavno mesto za GlcNAc (slika 7). V prvem poskusu bomo tako iskali zaviralce, ki se potencialno vežejo v vezavnem mestu za GlcNAc, v drugem poskusu pa bomo spojine sidrali v vezavni žep za UDP. Sidranje večjih spojin (molska masa večja od 300 g) z lastnostmi podobnimi zdravilnim učinkovinam ponuja precej manj maneverskega prostora za kasnejšo optimizacijo zadetka do končnega zaviralca.



**Slika 7:** Levo je prikazano aktivno mesto OGT z vezanim GlcNAc (obarvan zeleno), na desni sliki pa z UDP.

Na podlagi že znanega inhibitorja goblin1 bomo tudi sami pripravili manjšo knjižnico spojin, ki bo temeljila na izhodiščni spojini **1** (slika 8).



**Slika 8:** Izhodiščna spojina **0** bo služila kot osnova za oblikovanje spojin za sidranje v OGT. Nekaj najboljše ovrednotenih spojin iz virtualnega rešetanja bomo na podlagi rezultatov tudi naročili in preverili njihovo zaviranje OGT v *in vitro* testnem sistemu. Laboratorijsko delo bo potekalo na Fakulteti za farmacijo ter v sodelovanju z Univerzo v Utrechtu. Spojine s povsem novimi skeletnimi strukturami bi lahko tvorile podlago za novo generacijo zaviralcev OGT, česar do sedaj raziskovalci pri laboratorijskih poskusih še niso imeli na voljo. Delo bo predstavljalo podlago in šele prvi korak pri iskanju in sintezi zaviralcev OGT, saj bo potrebno najboljše potencialne spojine ustrezno nadgraditi in optimizirati.



## 3. METODE

### 3.1 PRIPRAVA KNJIŽNICE

V prvem koraku smo se izmed ogromne množice ponudnikov odločili za digitalne knjižnice formata SDF podjetij Asinex, ChemBridge, ChemDiv, Enamine, Life chemicals, Key Organics, Maybridge ter Otava. Zapis SDF je okrajšava za »structure-data file«, kar pomeni datoteko s podatki o tridimenzionalni strukturi spojine. Taka datoteka vsebuje podatke o atomih, njihovi povezanosti in prostorskih koordinatah molekule. Primer strukture zapisa SDF je predstavljen v sliki 9.

```
ZINC18274777 -oechem-04121702223D 20 20 0 0 0 0 0 0 0 0 0999 v2000 -2.1938 1.4701 0.6085 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 -2.1691 -0.0367 0.6077 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 -3.0611 -0.6582 1.1456 O 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 -1.1538 -0.6938 0.9094 N 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 -1.0811 -2.0905 0.0916 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0.1554 -2.7160 0.1778 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0.2283 -4.0925 0.2593 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 -0.9336 -4.8504 0.2546 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 -2.1693 -4.2261 0.1680 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 -2.2439 -2.8493 0.0927 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 -0.8611 -6.2059 0.3344 O 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 -3.0822 1.8186 1.1352 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 -1.3026 1.8478 1.1098 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 -2.2144 1.8337 -0.4188 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 -0.4783 -0.1997 -0.4782 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 1.0601 -2.1261 0.1808 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1.1901 -4.5792 0.3264 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 -3.0735 -4.8168 0.1636 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 -3.2062 -2.3631 0.0301 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 -0.8763 -6.5480 1.2387 H 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 2 1 0 0 0 0 1 12 1 0 0 0 0 1 13 1 0 0 0 0
1 14 1 0 0 0 0 2 3 2 0 0 0 0 2 4 1 0 0 0 4 5 1 0 0 0 0 4 15 1 0 0 0 0 5 10 2 0 0 0 0 5 6 1 0
0 0 0 6 7 2 0 0 0 0 6 16 1 0 0 0 0 7 8 1 0 0 0 0 7 17 1 0 0 0 0 8 9 2 0 0 0 0 8 11 1 0 0 0 0
10 1 0 0 0 0 9 18 1 0 0 0 0 10 19 1 0 0 0 0 11 20 1 0 0 0 0 0M ENDS555
```

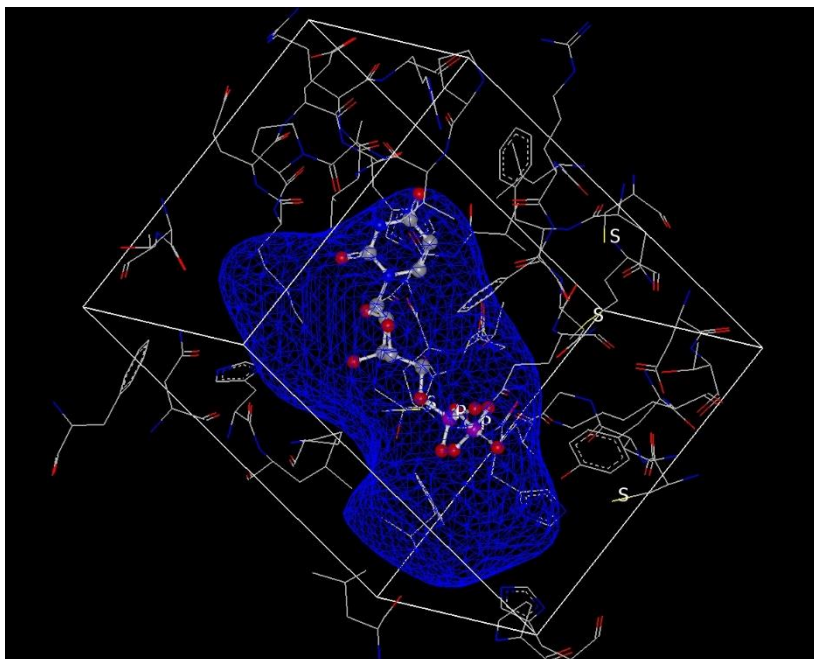
**Slika 9:** Primer zapisa SDF za spojino paracetamol.

Da bi proces sidranja v nadaljevanju potekal hitreje, smo manjše knjižnice posameznih proizvajalcev združili v eno datoteko ter vsaki izmed spojin s pomočjo programa OMEGA 2.5.1.4. (OpenEye Scientific Software) pripravili knjižnico konformerov, ki smo jih kasneje sidrali v aktivno mesto encima OGT.

### 3.2 IZBOR KRISTALNE STRUKTURE IN PRIPRAVA VEZAVNEGA MESTA ENCIMA OGT

Ključno vlogo pri eksperimentalnem delu magistrske naloge je nosila 3D kristalna struktura človeškega encima OGT, pridobljena iz podatkovne baze Protein Data Bank (PDB) z oznako 4N39, ki smo jo izbrali na osnovi najvišje ločljivosti, ki je znašala 1,78 Å. Izbrani 3D model smo uporabili za definiranje dveh vezavnih mest v strukturi OGT s programom Make Receptor (OpenEye Inc.) z ligandoma UDP in difosfat-5S-GlcNAc. Velikost prostora, ki obdaja ligand, znotraj katerega smo pripravili vezavno mesto za difosfat-5S-GlcNAc, je bila dimenzij 16,77 Å \* 15,63 Å \* 16,28 Å z volumnom 4812 Å<sup>3</sup>, pri UDP pa dimenzij 16,67 Å \* 15,00 Å \* 20,33 Å z volumnom 5083 Å<sup>3</sup>. V naslednjem koraku znotraj tega definiranega vezavnega mesta program izriše obliko receptorskega mesta, končni volumen tega žepa pa je tako znašal 702 Å<sup>3</sup> za difosfat-5S-GlcNAc ter 919 Å<sup>3</sup> za UDP (slika 10). Pri pripravi

vezavnega mesta za UDP smo aminokislino Ala896 definirali kot akceptor in donor pri tvorbi vodikovih vezi, saj tvori dve vodikovi vezi z uracilnim obročem UDP, kar je pomembno za prepoznavo in vezavo molekule UDP.



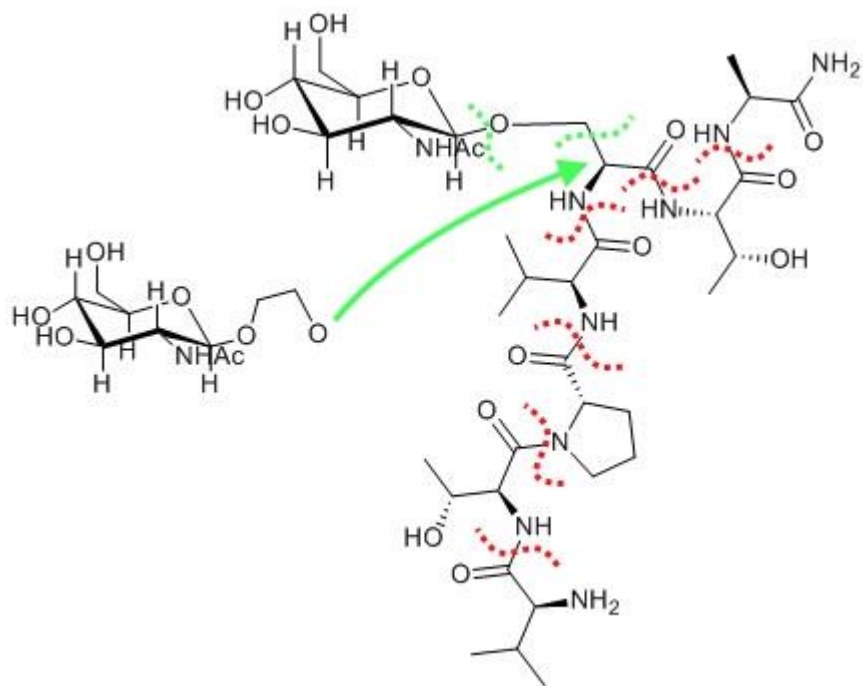
**Slika 10:** Vezavno mesto znotraj vnaprej določenega prostora v strukturi OGT okrog liganda. Na sliki je predstavljen primer molekule UDP (predstavljen s paličicami), modro obarvana površina pa predstavlja zunanjo mejo vezavnega mesta.

### 3.3 SIDRANJE

Knjižnica spojin, ki smo jo pripravili in nadalje uporabili za iskanje novih zaviralcev OGT, je vsebovala 199.217 spojin. Virtualno reševanje na osnovi strukture tarče je potekalo s pomočjo programa OEDocking 3.0.1., iz paketa OpenEye Scientific Software. OEDocking platforma združuje dva programa za sidranje molekul, in sicer sta to FRED in HYBRID, pri čemer smo za sidranje združene knjižnice uporabili program FRED, ki zaradi poenostavljene rigidizacije vezavnega mesta deluje hitreje, vendar za sidranje zahteva vnaprej pripravljeno knjižnico konformerov. Sidranje je zaradi obsežnosti celotne knjižnice potekalo dalj časa, zahtevnejše so tudi potrebe po procesorski zmogljivosti, zato smo ta korak izvedli na Fakulteti za farmacijo z zmogljivejšim računalnikom.

### 3.4 MOLEKULSKO MODELIRANJE

Znotraj dela v okviru magistrske naloge smo nekaj spojin načrtovali in oblikovali tudi sami. Izhodiščni spojini **0**, ki je bila izpeljana na osnovi bisubstratnega inhibitorja goblin1, smo priredili distančnik ter uporabili različne izpeljanke peptida. Za oblikovanje in risanje novih spojin v 2D obliki smo uporabili program ChemDraw Professional 15.0.0.106, proizvajalca PerkinElmer Informatics, Inc. Za pretvorbo spojin iz 2D v 3D obliko se je za uporabnega izkazal tudi program Notepad, v katerega smo v tekstovni obliki zapisali SMILES kode spojin. SMILES programski jezik vsebuje poenostavljen enovrstični zapis spojine. Glavni informaciji sta definicija vsebujočih atomov ter njihovih povezav, pri čemer so dobro razvidne tudi konfiguracije dvojnih vezi in kiralnost, ne ponuja pa informacij o 2D ali 3D strukturi. Nastali dokument s končnico .smi smo nato obdelali s pomočjo programa OMEGA 2.5.1.4 iz paketa OpenEye Scientific Software v datoteke s končnico .oeb.gz in tako pripravili 3D spojine z različnimi konformacijami, ki jih lahko sidramo v aktivno mesto OGT. Za to nalogo lahko uporabimo programe kot so Omega, OpenBabel ali ChemBio3D, ki strukture energijsko minimizirajo in generirajo njihove različne konformacije. Glavne modifikacije smo naredili na peptidnem delu molekule, ki smo ga v ta namen skrajšali tako na N-koncu kot na C-koncu, vendar smo ohranili prvotno aminokislinsko zaporedje, pri tem pa oblikovali različne kombinacije di-, tri- in tetrapeptidov. Spreminjali smo tudi distančnik med sladkorno enoto GlcNAc ter peptidom, pri čemer smo ga v eni izmed serij preoblikovali v etilenglikolno enoto. Shema je predstavljena na sliki 11.



**Slika 11:** Shema derivatov spojine **0**. Z rdečo prekinjeno črto so označena mesta cepitve vezi, na katerih smo odstranjevali posamezne aminokisljine, z zeleno puščico pa je označeno mesto, na katerem smo zamenjali distančnik (metilenoksi skupina) med GlcNAc in peptidom z etilenglikolno enoto.

### 3.5 PREDSTAVITEV REZULTATOV SIDRANJA

Dobljene rangirane rezultate smo pregledali s programom VIDA 4.2.1. (OpenEye). Zaradi vsebujočega vmesnika FRED je omogočena tudi grafična predstavitev rezultatov sidranja, zato se je dobro obnesel tudi v pridobivanju številnih slik, ki so predstavljene v nadaljevanju naloge.

### 3.6 RAČUNALNIŠKA OPREMA

Molekulsko sidranje je bilo opravljeno na računalniku na Fakulteti za farmacijo: 4x 8 core AMD Opteron Magny-Cours CPUs, 3 TB HDD, 32 GB RAM, Matrox G200ew, OS Ubuntu 64bit ter na osebem računalniku s specifikacijami: Intel Core i5 750 s 2.67 GHz, 4 GB RAM-a ter 1 TB trdega diska z operacijskim sistemom Windows 7 Ultimate 64-bit.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 REZULTATI VIRTUALNEGA REŠETANJA

Še tako dobro zastavljeni in opravljeni poskusi in delo ne morejo dati kvalitetne ocene, če nimamo pridruženih ustreznih tehnik vrednotenja rezultatov. To je prav tako pomembno v našem primeru virtualnega rešetanja, ko je celotna povratna informacija zapakirana v numerične vrednosti programskega jezika uporabljenega računalniškega programa. Z razumevanjem dobljenih rezultatov lahko ustrezno predvidimo in obrazložimo obnašanje vpletenih spojin na molekularnem nivoju in tako predlagamo tudi morebitne spremembe. Temelj sledečih rezultatov, predstavljenih v tabelah in njihovi razvrstitvi po jakosti vezave, se skriva v cenilni funkciji Chemgauss4. Slednja je nadgradnja cenilne funkcije Chemgauss3 in zajema štiri glavna področja vrednotenja, to so oblika, tvorba H-vezi med ligandom in proteinom, vpliv topila na tvorbo H-vezi ter interakcije s kovinami v proteinu in kelatorskimi skupinami v ligandu. Podlaga vseh štirih kriterijev je ocena razdalje med vsakim izbranim parom atomov. Te interakcije so projektirane na mrežo, ki je ukrivljena s sferično Gaussovo funkcijo, ki zgladi potencial in jo tako napravi manj občutljivo za manjše spremembe v položaju liganda. Uporabljena računska funkcija nam v tem primeru služi za dva namena. Najprej nam omogoča, da lahko sidranje opravimo pri nižjih ločljivostih, saj manjše spremembe ne vplivajo veliko na končni rezultat, hkrati pa zmanjša tudi napako, povezano s tem, da protein predstavimo kot rigidno strukturo, kar ne zajema manjših konformacijskih prilagoditev receptorja ob sidranju liganda.

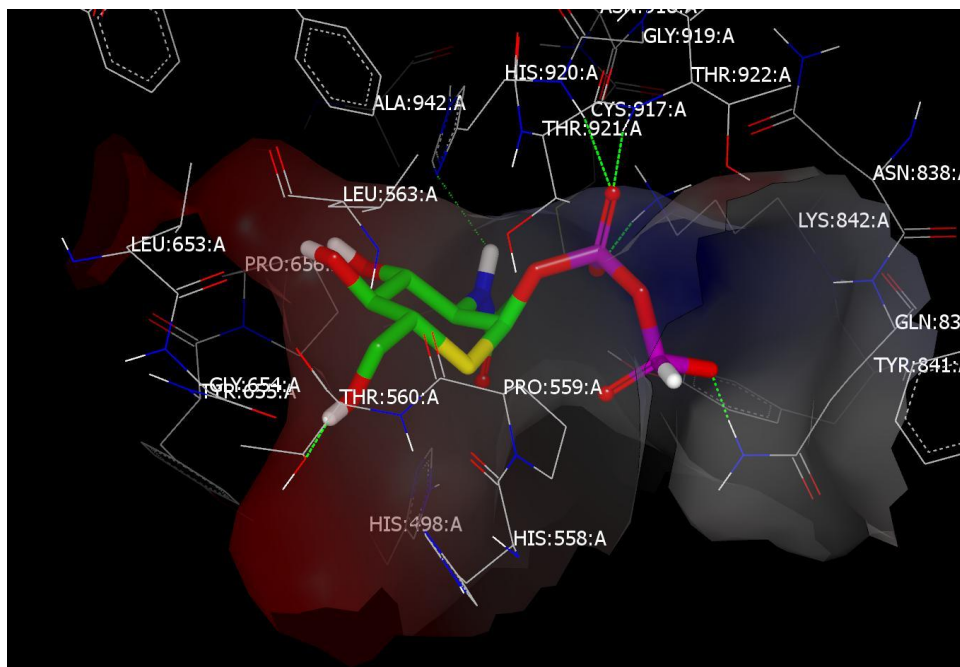
V našem primeru na rezultate najbolj vplivata dve lastnosti, in sicer oblika liganda ter tvorba vodikovih vezi med ligandom in proteinom. Za izračun oblike program vzame v poštev vse atome razen vodika. Vsakemu atomu liganda izračuna razdalje do pripadajočih okoliških atomov proteina, razdalje pa uredi v dva razreda. V prvem razredu so tiste, pri katerih je razdalja med atomoma manjša od vsote van der Waalsovih radijev atomskega para in označujejo trk med atomom, program pa takemu atomskemu paru dodeli negativen, kazenski rezultat. V drugem razredu so vsi atomski pari z razdaljo med 1,25 do 2,5 kratnikom vsote van der Waalsovih radijev. Za primerjavo, atomi znotraj 2,5 kratne razdalje rezultatsko štejejo le eno desetino vrednosti tistih atomov, ki so znotraj 1,25 kratne razdalje. Rezultate program uredi v mrežo točk, razporejenih znotraj vezavnega mesta. Izračun vodikovih vezi poteka na podobnem nivoju, pri čemer je potrebno upoštevanje značilnosti vodikovih vezi,

in sicer njihovo usmeritev in število možnih interakcij. Če se donorski in akceptorski par pozicijsko ujemata, je za potrditev tvorbe H-vezi potrebna le še določitev razdalje med njima. H-vez bo zaznana in ji bo pripisana konstantna vrednost, ko bosta poziciji atoma ligand ter njegovega komplementarnega atoma na proteinu, ki tvorita H-vez, znotraj območja 1 Å. Rezultat je vsota vseh potencialnih parov, prav tako prenesenih na mrežo znotraj vezavnega mesta.

V programu Vida 4.2.1 smo pregledali 5 najbolje ocenjenih poz vsake spojine, pri čemer smo upoštevali najboljšo. Rezultati so razvrščeni tako, da je najboljši ligand ocenjen z najbolj negativno vrednostjo cenilne funkcije.

#### 4.2 STRUKTURNO PODPRTO VIRTUALNO REŠETANJE FRAGMENTOV V VEZAVNO MESTO ZA GlcNAc ENCIMA OGT

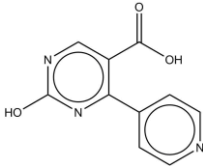
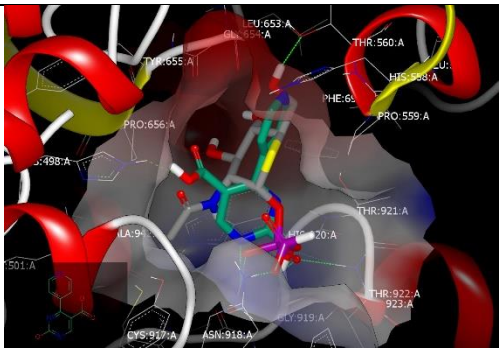
Rangirani rezultati sidranja spojin v preglednici 3 na prvi pogled ne kažejo veliko strukturnih podobnosti. Naš referenčni ligand je bil v tem primeru UDP-5S-GlcNAc, vendar smo mu odstranili nukleotidni sladkor, obdržali pa vmesno difosfatno povezavo. Kot tak, ligand z vezavnim mestom vzpostavi 5 vodikovih vezi, in sicer z aminokislinskimi ostanki Thr560, Gln839, Lys842, His920 in Thr922 (slika 12).



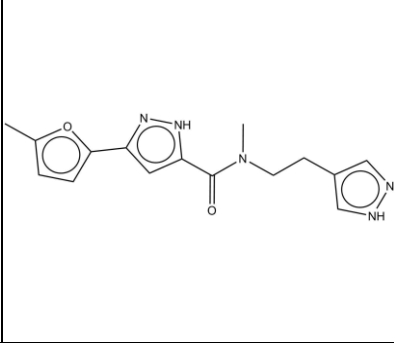
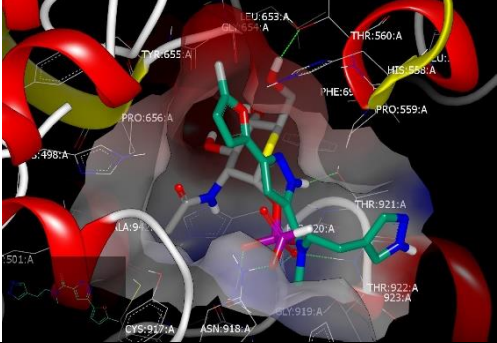
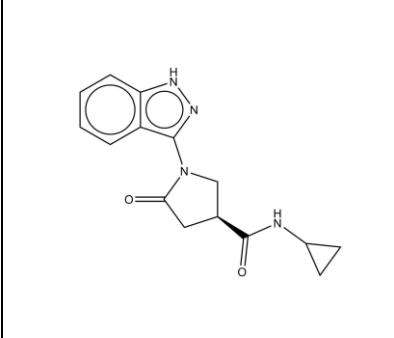
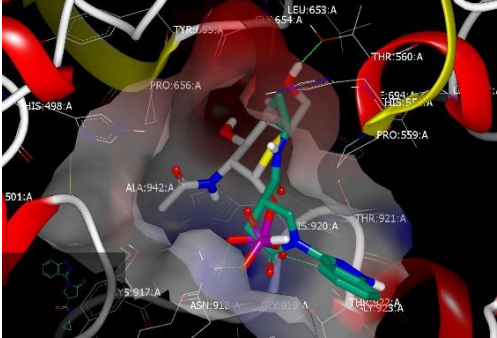
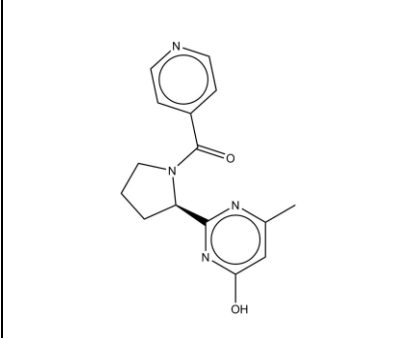
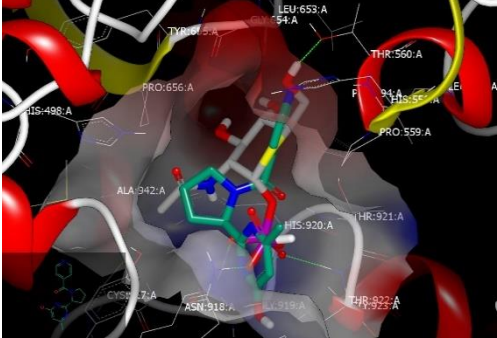
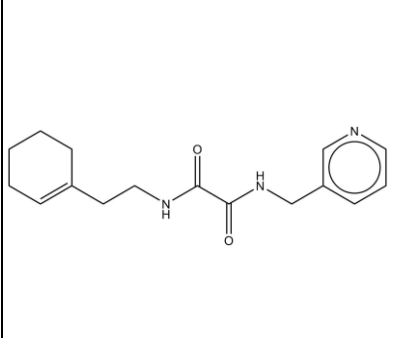
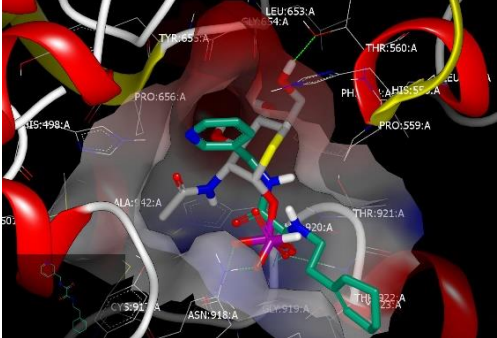
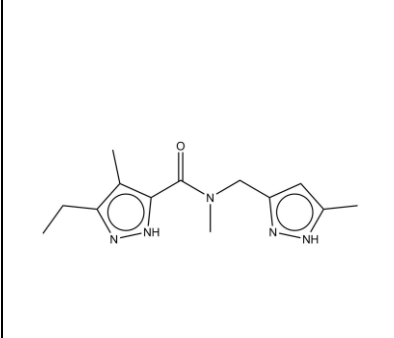
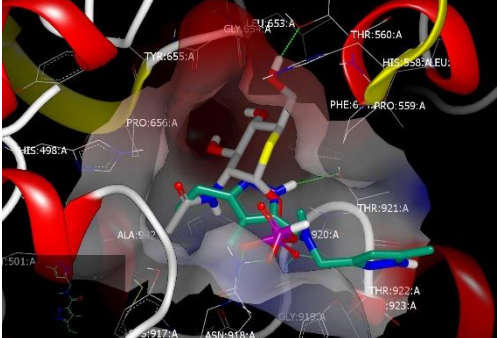
**Slika 12:** Prikaz vzpostavljenih vodikovih vezi (zelene črtkane povezave) znotraj receptorskega mesta OGT z ligandom difosfat-5S-GlcNAc (predstavljen z modelom palic in kroglic).

Po številu H-vezi sta se referenčnemu ligandu najbolj približali spojini z rangom 1 in 8. Najvišje rangirana spojina (MO00827) tvori H-vezi z His498, Lys842, His920 in Thr921, spojina na osmem mestu (LEG 12453641) pa z Leu653, Gln839, His920 in Thr922. Tudi preostale rangirane spojine v vezavnem mestu tvorijo H-vezi, vendar se te pojavljajo na različnih aminokislinskih ostankih, prostorska postavitev spojin pa ne zapolnjuje receptorskega mesta tako kot je to v primeru liganda difosfat-5S-GlcNac. Spojine se sicer nahajajo znotraj označenega receptorskega mesta, vendar so tam različno umeščene, tako željeno prekrivanje struktur liganda in sidranih spojin pa je nezaznavno. Iz teh razlogov se nismo odločili za nakup vzorcev spojin od pripadajočih ponudnikov. Spojine so sicer bogate z aromatskimi obroči in njihovimi derivati, pogosto vsebujejo npr. piridin, pirimidin in pirazol, kar predstavlja možnost tvorbe H-vezi. V 19 od 25 spojin je prisotna amidna vez, njena glavna značilnost je onemogočena rotacija, zaradi česar spojini doda rigidnost, zaradi elektron donorskih in akceptorskih sposobnosti pa omogoča tudi tvorbo H-vezi. Povprečna molekulska masa spojin znaša 276,09 g/mol, najvišji vrednosti pa sta bili dve, in sicer 299,33 g/mol, kar je skladno s tem, da smo za sidranje uporabili knjižnico fragmentov.

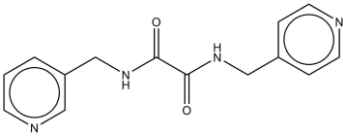
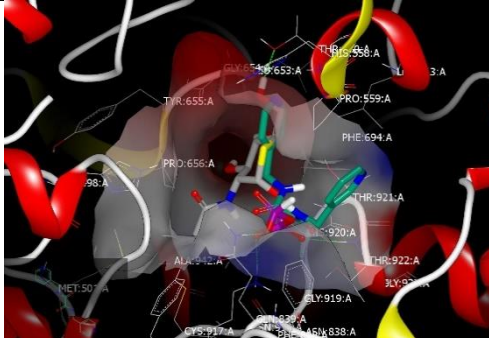
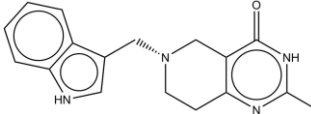
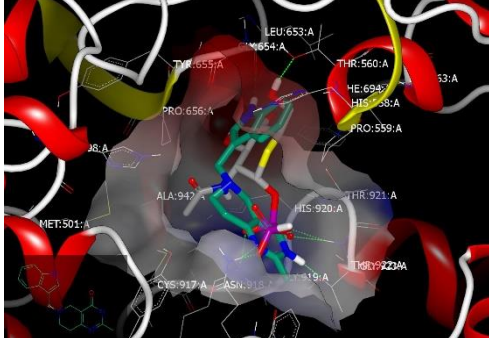
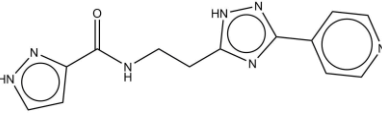
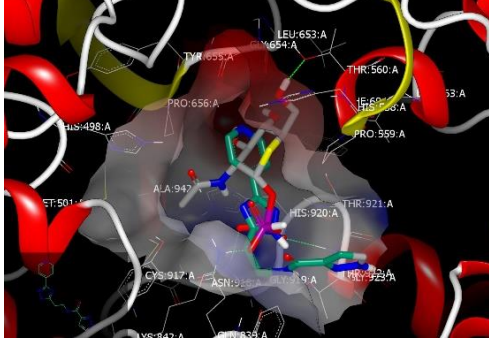
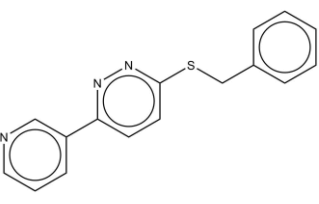
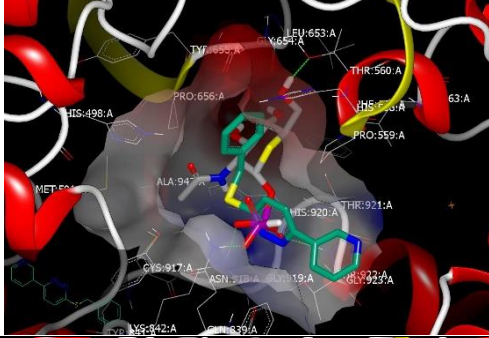
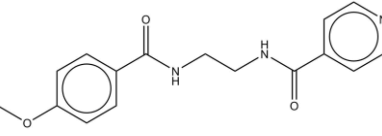
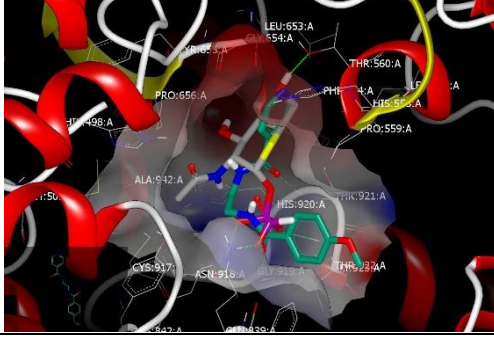
**Preglednica 3:** Najboljših 25 zadetkov sidranja fragmentov v receptor OGT na mestu GlcNac (sidrana spojina je predstavljena z modro-zeleno barvo, poleg je za primerjavo postavljen ligand 5S-GlcNac-difosfat v sivi barvi).

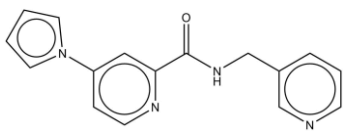
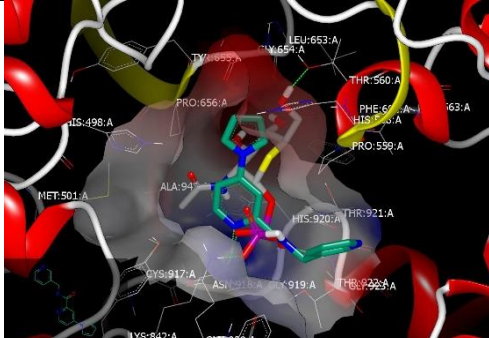
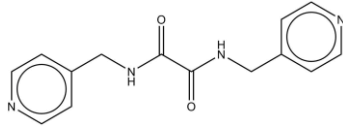
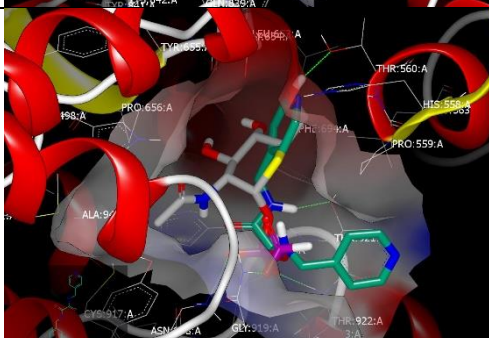
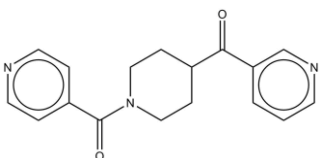
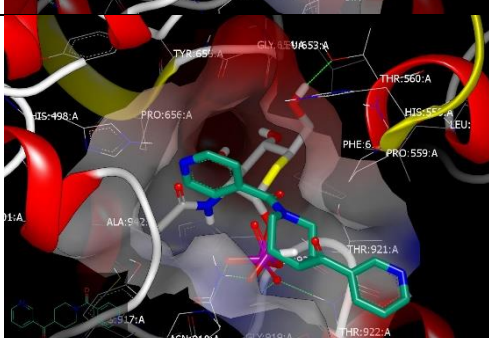
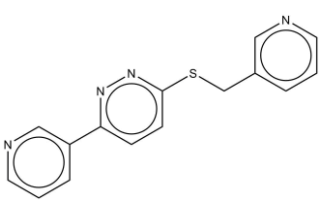
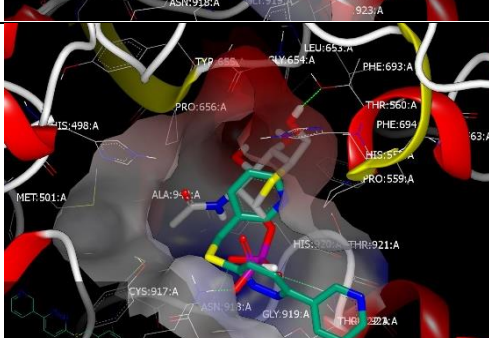
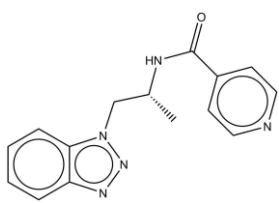
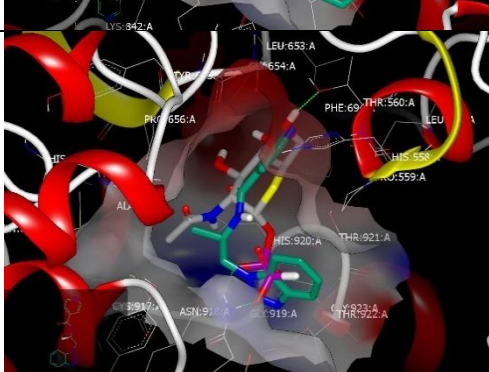
Rang	Struktura fragmenta	Koda produkta	Proizvajalec	Chemgauss4	Vezava fragmenta v vezavnem mestu za GlcNac encima OGT
1		MO00827	Maybridge	-12,7397	

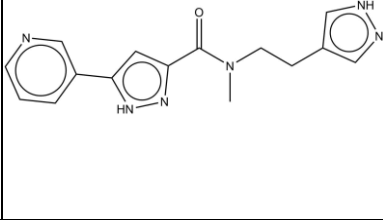
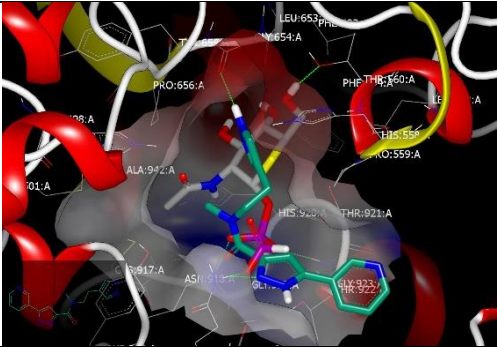
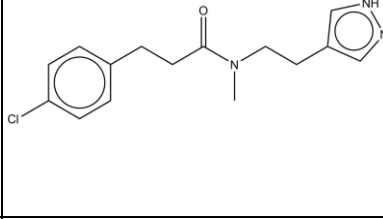
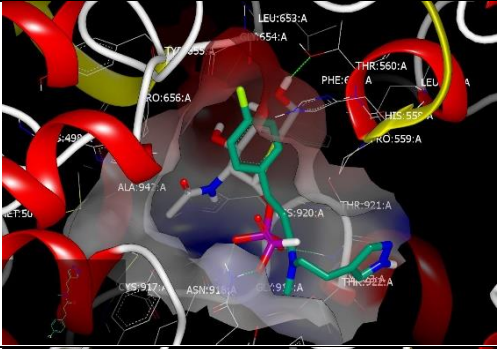
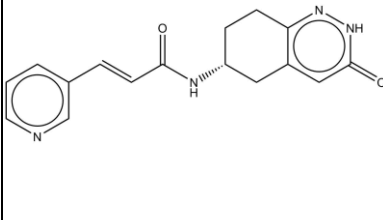
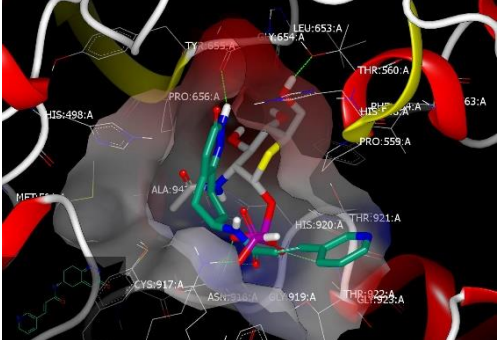
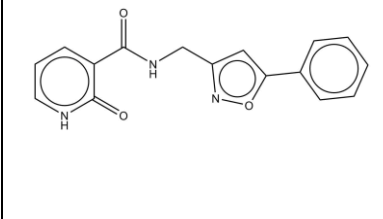
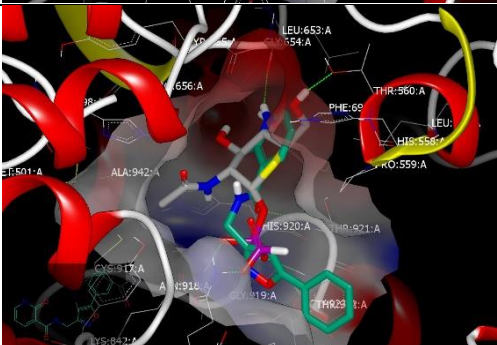
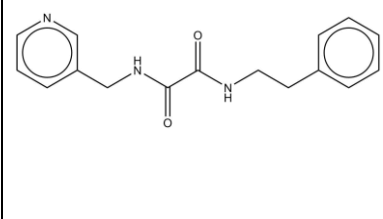
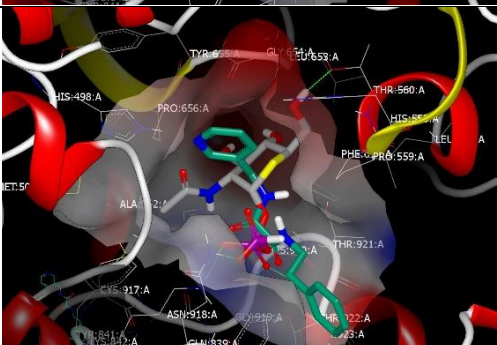


2		SYN 15025409	Asinex	-12,6653	
3		F7139126	Otava	-12,6625	
4		ART 18547926	Asinex	-12,5948	
5		F2879-3981	Life Chemicals	-12,4186	
6		ART 14229956	Asinex	-12,3103	

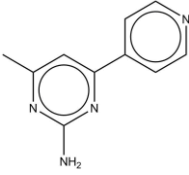
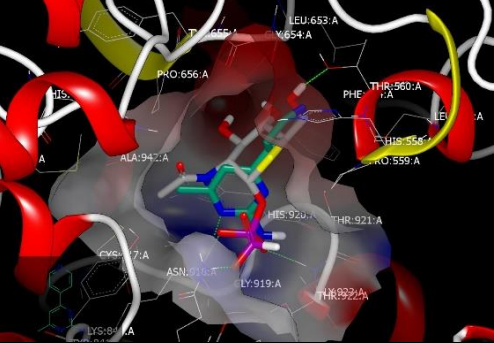
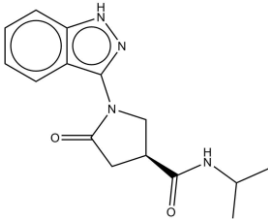
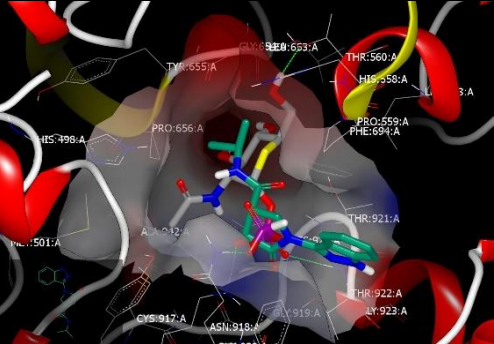
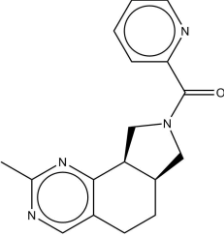
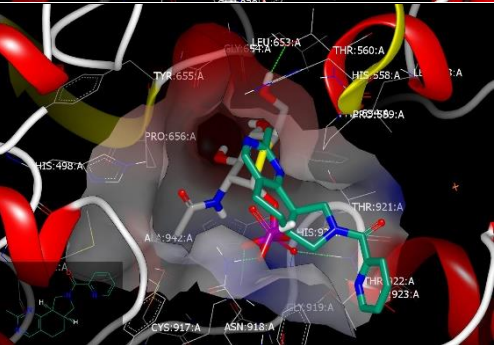
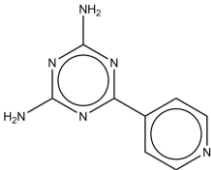
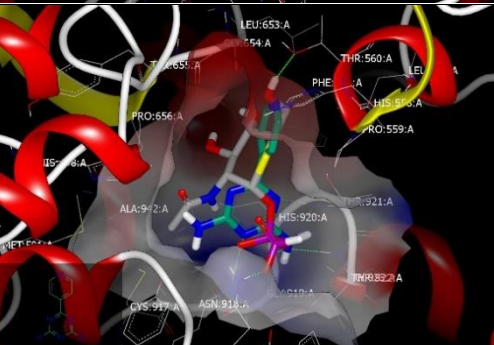


7		BAS 00753432	Asinex	-12,2003	
8		LEG 12453641	Asinex	-12,1709	
9		ART 10821039	Asinex	-11,9882	
10		F2005-0008	Life Chemicals	-11,9385	
11		BAS 02078527	Asinex	-11,9128	

12		F6389-0310	Life Chemicals	-11,9091	
13		BAS 00881309	Asinex	-11,8512	
14		ART 11340789	Asinex	-11,8152	
15		F2005-0149	Life Chemicals	-11,7385	
16		AAM 12338320	Asinex	-11,7151	

17		ART 15027082	Asinex	-11,7043	
18		SYN 15348365	Asinex	-11,6749	
19		F6523-4183	Life Chemicals	-11,6526	
20		F2493-2570	Life Chemicals	-11,5490	
21		F0904-4711	Life Chemicals	-11,4913	



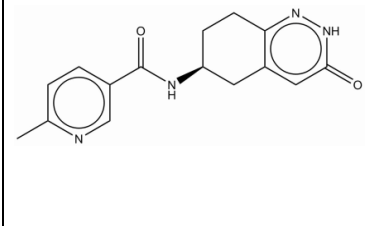
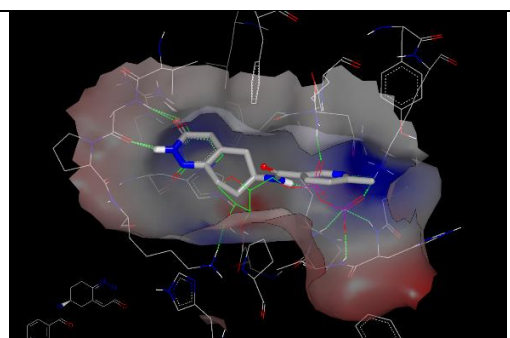
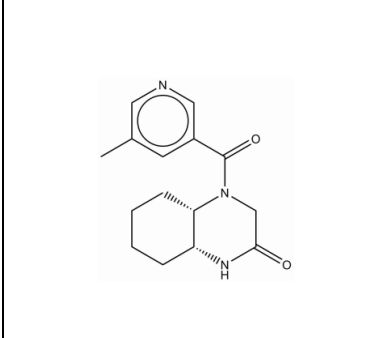
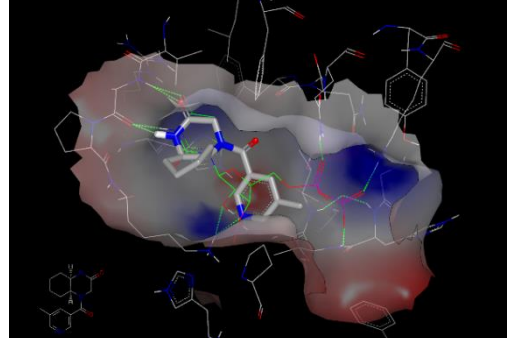
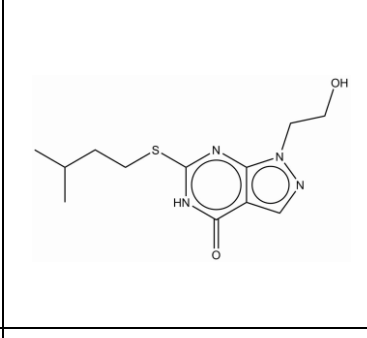
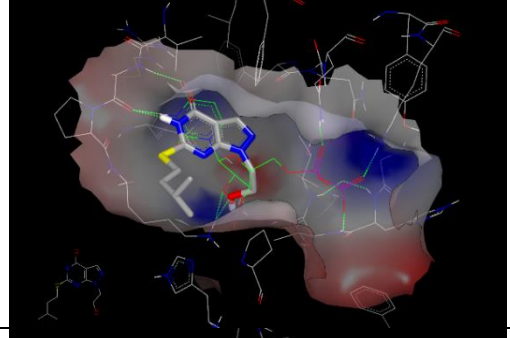
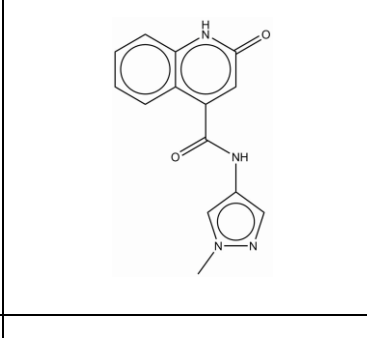
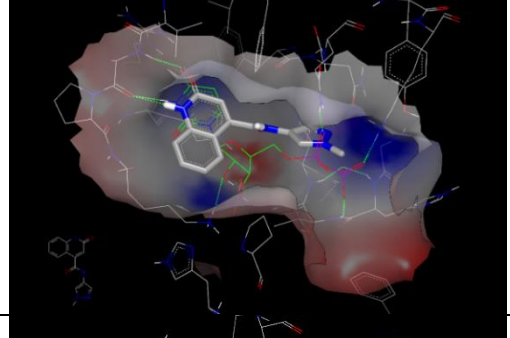
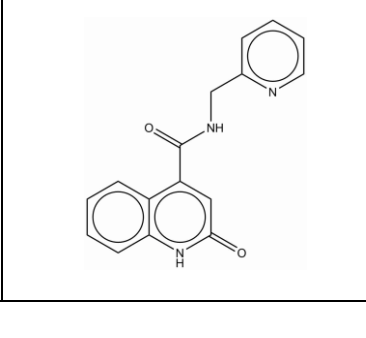
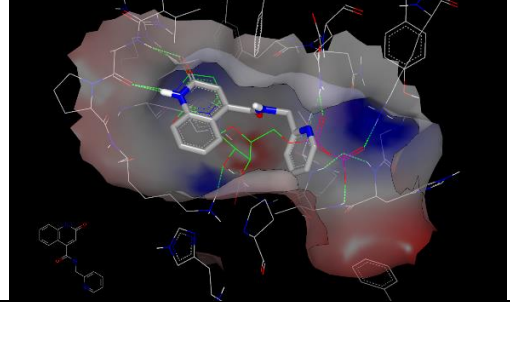
22		460406	Key Organics	-11,4895	
23		F7139119	Otava	-11,4683	
24		ART 13126609	Asinex	-11,4632	
25		RDR01973	Maybridge	-11,4494	

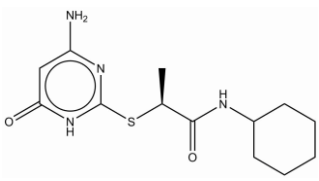
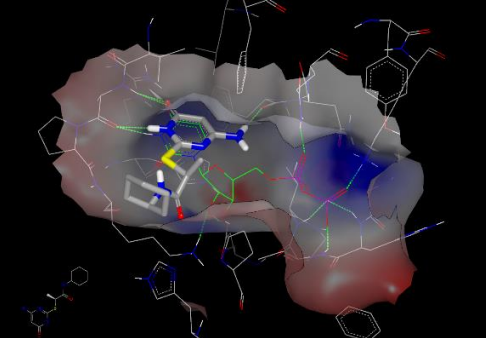
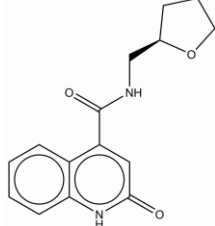
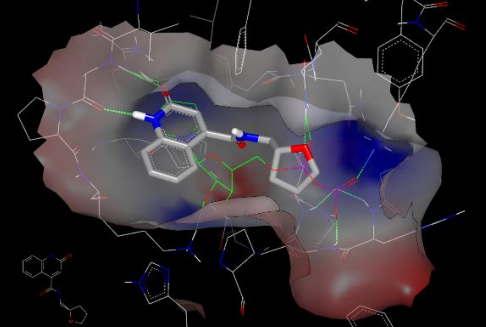
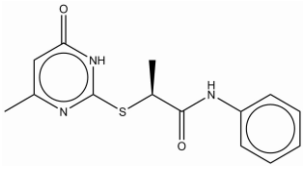
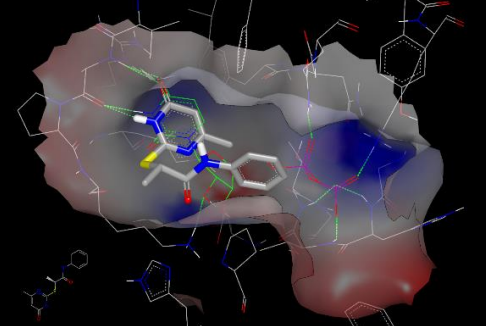
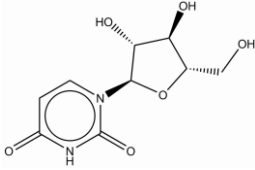
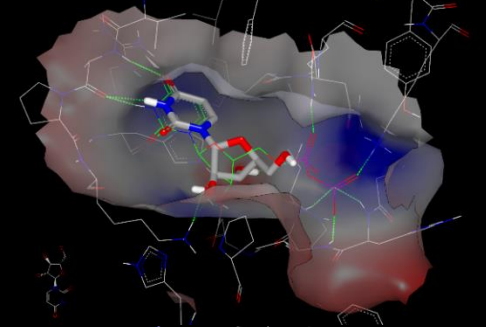
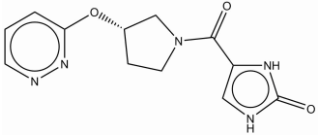
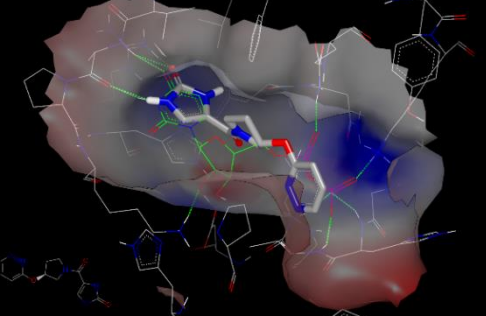
### 4.3 STRUKTURNO PODPRTO VIRTUALNO REŠETANJE FRAGMENTOV V VEZAVNO MESTO ZA UDP ENCIMA OGT

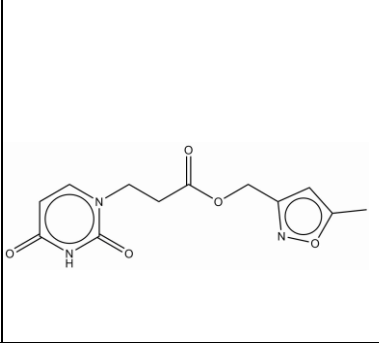
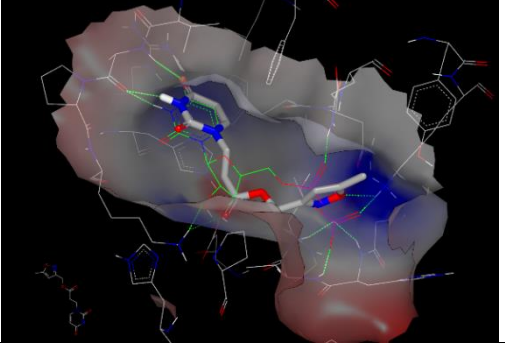
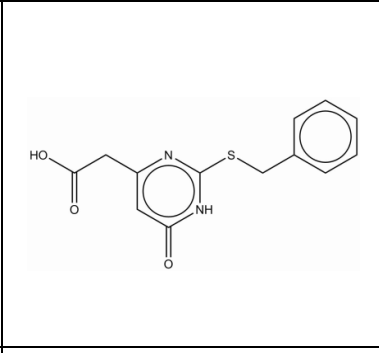
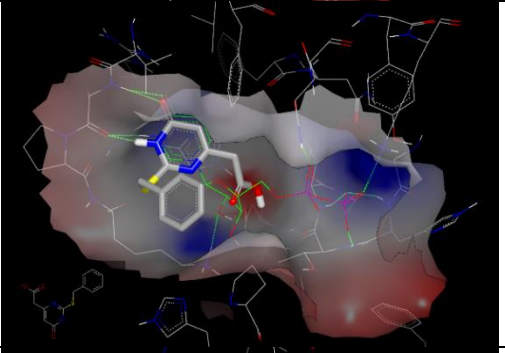
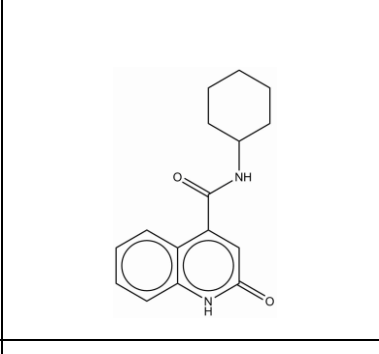
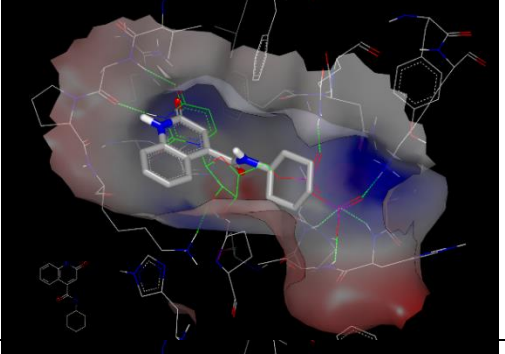
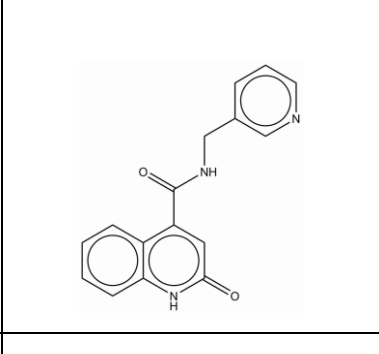
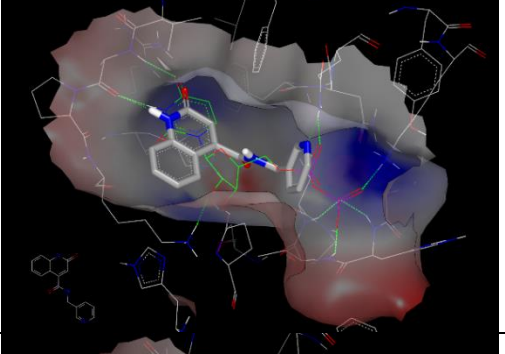
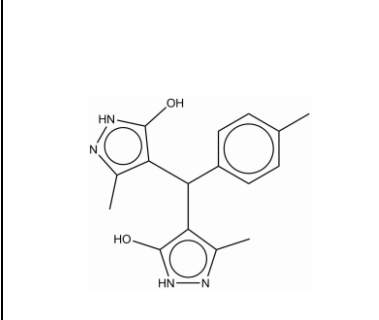
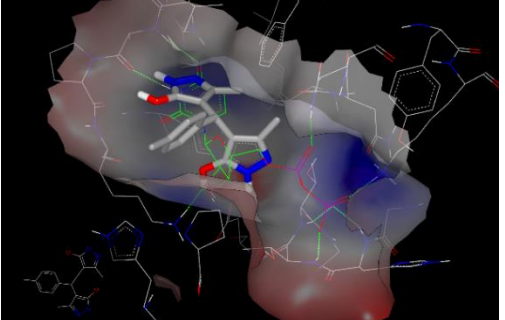
Sidranje knjižnice fragmentov v vezavno mesto za UDP encima OGT smo načrtovali na podlagi številnih predhodnih raziskav, iz katerih je bilo jasno razvidno pozicioniranje uracilnega obroča UDP v vezavnem mestu. Ključen žep za vezavo uracilnega obroča UDP so že pri kompleksu modela UDP in XcOGT predstavljale aminokisliline Lys441, Leu442, Pro442 ter His444, kar po analogiji pri človeškem OGT predstavlja aminokisliline Val895, Ala896, Pro897 in Lys898. Zato smo kot farmakoforno zahtevo uporabili tvorbo H-vezi z Ala896, zaradi česar imajo tudi vsi zadetki donor in akceptor H-vezi na sosednjih položajih. Najboljših 25 zadetkov zbranih v preglednici 4 poleg izkazovanja nekaterih skupnih značilnosti odlikuje izjemno dobro prekrivanje spojin z uracilnim obročem referenčnega liganda UDP. Najbolj očitna strukturna podobnost je, da se kar v sedmih spojinah (rang št. 4, 5, 7, 13, 14, 15, 20, 21) pojavi kinolin-2-on, ki je dodatno substituiran preko karboksamidne skupine pripete na mesto 4. Skupaj tako te spojine tvorijo strukturni razred kinolin-2-on-4-karboksamidov, ki se glede na poze ligandov pri sidranju popolnoma prekrivajo. 2-okso skupina ter amino skupina kinolina tvorita dve vodikovi vezi z Ala896, karboksamidna vez pa skrbi za primerno usmerjenost preostalega dela molekule proti vezavnemu mestu za difosfat. Dodatna vodikova vez z Gln839 se tvori pri spojinah z rangom 5 in 14 prek dušikovega atoma v piridinu, v spojnini z rangom 7 pa preko kisika v tetrahidrofuranskem obroču. Zanimariti ne gre niti dejstva, da se prav v vsakem izmed 25 zadetkov pojavi vsaj en aromatski obroč. Povprečna molekulska masa spojin znaša 275,59 g/mol, največja posamična molekulska masa pa znaša 298,35 g/mol.

**Preglednica 4:** Najvišje rangiranih 25 spojin pri sidranju fragmentov v vezavno mesto za UDP encima OGT. Sidrana spojina je predstavljena z modelom paličic v sivi barvi, referenčni ligand UDP pa z zelenimi črtami. Zelene črtkane povezave predstavljajo H-vezi.

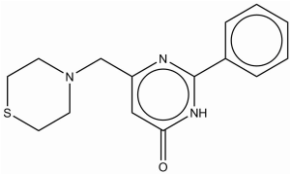
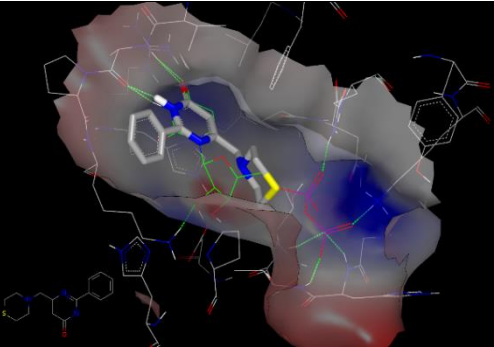
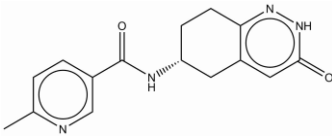
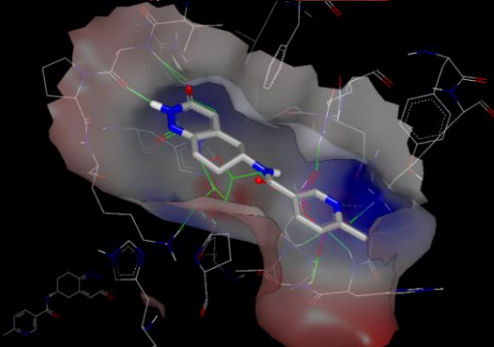
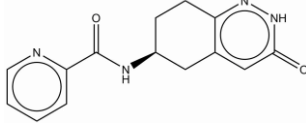
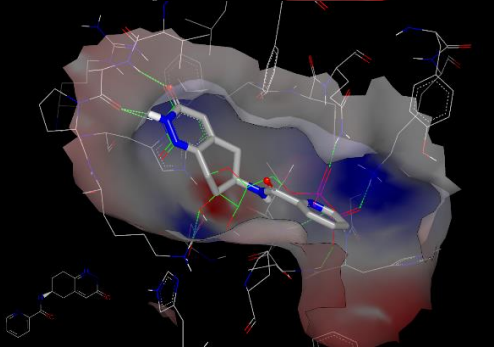
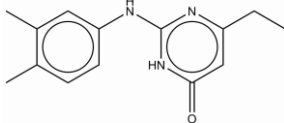
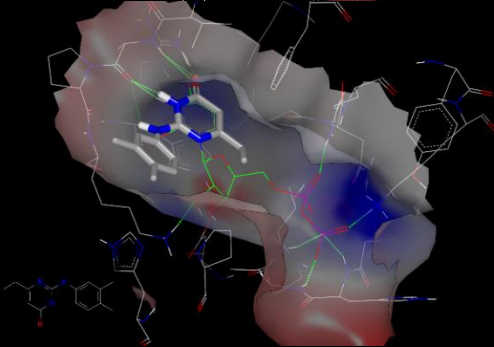
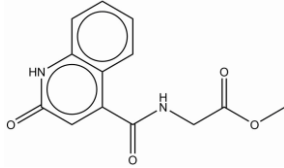
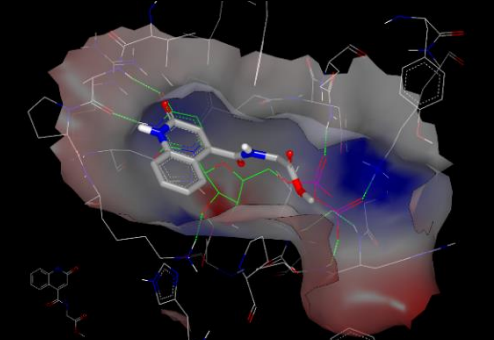
Rang	Struktura fragmenta	Koda produkta	Proizvajalec	Chemgauss4	Vezava fragmenta v vezavnem mestu za UDP encima OGT
------	---------------------	---------------	--------------	------------	---

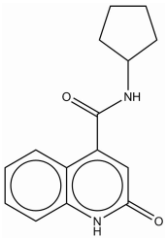
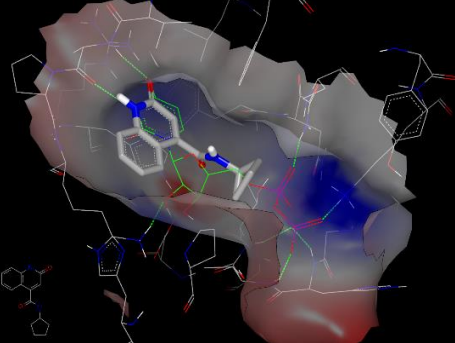
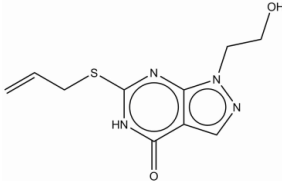
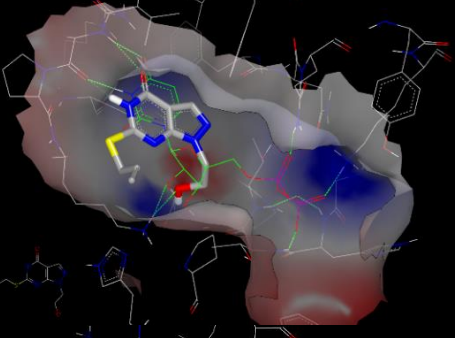
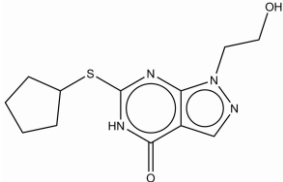
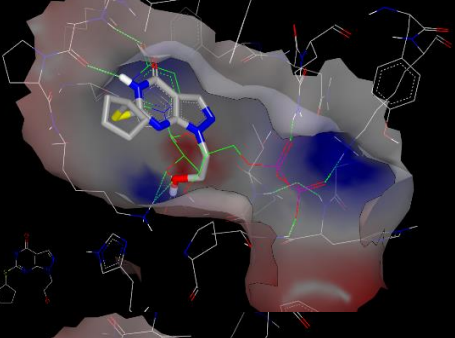
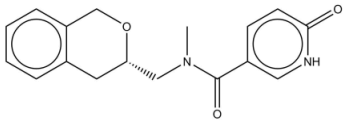
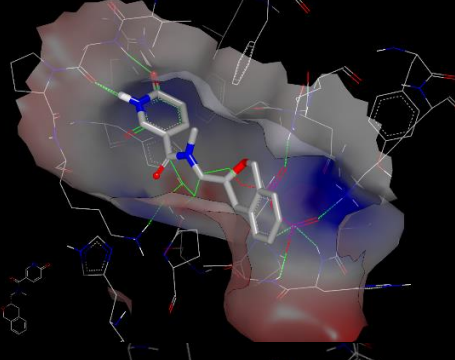
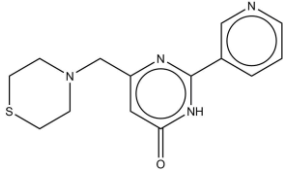
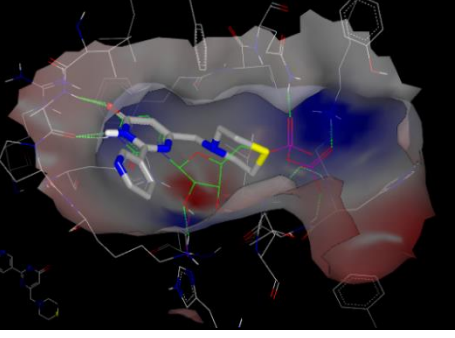
1		F6523-4185	Life Chemicals	-12,8450	
2		Z1411899349	Enamine	-12,6633	
3		F2207-0007	Life Chemicals	-12,6172	
4		F6246095	Otava	-12,5841	
5		F3462508	Otava	-12,5191	

6		BAS 06111363	Asinex	-12,4334	
7		Z31490778	Enamine	-12,3765	
8		BAS 06111347	Asinex	-12,2901	
9		F1443-3169	Life Chemicals	-12,2219	
10		F6489-0287	Life Chemicals	-12,1864	

11		F2496-2109	Life Chemicals	-12,1024	
12		F2158-0421	Life Chemicals	-12,1002	
13		Z31484754	Enamine	-12,0975	
14		F3459725	Otava	-12,0530	
15		BAS 03349249	Asinex	-11,9408	



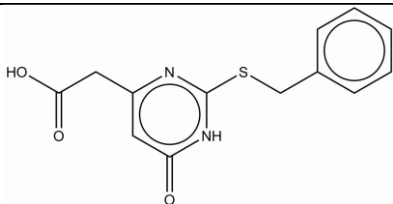
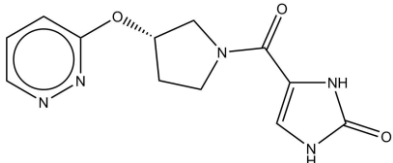
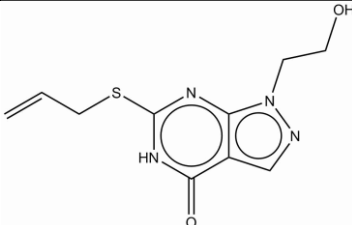
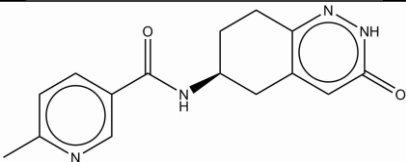
16		P198-0019	ChemDiv	-11,9049	
17		F6523-4185	Life Chemicals	-11,8657	
18		F6523-4124	Life Chemicals	-11,8180	
19		F7020300720	Otava	-11,7773	
20		Y040-5281	ChemDiv	-11,7748	

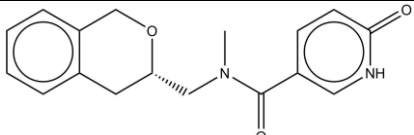
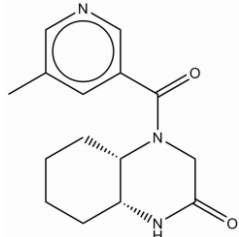
21		Z32414458	Enamine	-11,7728	
22		F2207-0009	Life Chemicals	-11,7621	
23		F2207-0011	Life Chemicals	-11,7358	
24		F6487-0589	Life Chemicals	-11,7222	
25		P198-0658	ChemDiv	-11,7138	

#### 4.4 REZULTATI LABORATORIJSKIH TESTIRANJ IZBRANIH KANDIDATOV

Izmed najboljših 25 zadetkov sidranja knjižnice fragmentov v vezavnem mestu za UDP encima OGT smo izbrali 6 kandidatov za laboratorijsko *in vitro* testiranje, ki so ga za nas opravili kolegi iz Univerze v Utrechtu. Izbrane spojine so med seboj strukturno raznolike, s čimer smo želeli pokriti čim širši spekter dobljenih rezultatov, njihov rang pri virtualnem rešetanju pa pri tem ni bistveno vplival na našo izbiro. Ker so spojine kinolin-2-onskega tipa sintezno dokaj enostavno dostopne, spojin s takim strukturnim ogrođjem nismo naročali. V preglednici 5 so zbrane strukture šestih izbranih spojin uporabljenih v encimskem testiranju, veliko veselja pa nam daje, da smo med njimi že našli nekaj aktivnih spojin, nadaljnje pozornosti bodo definitivno deležne spojine UL-OGT-01, UL-OGT-04 ter UL-OGT-05.

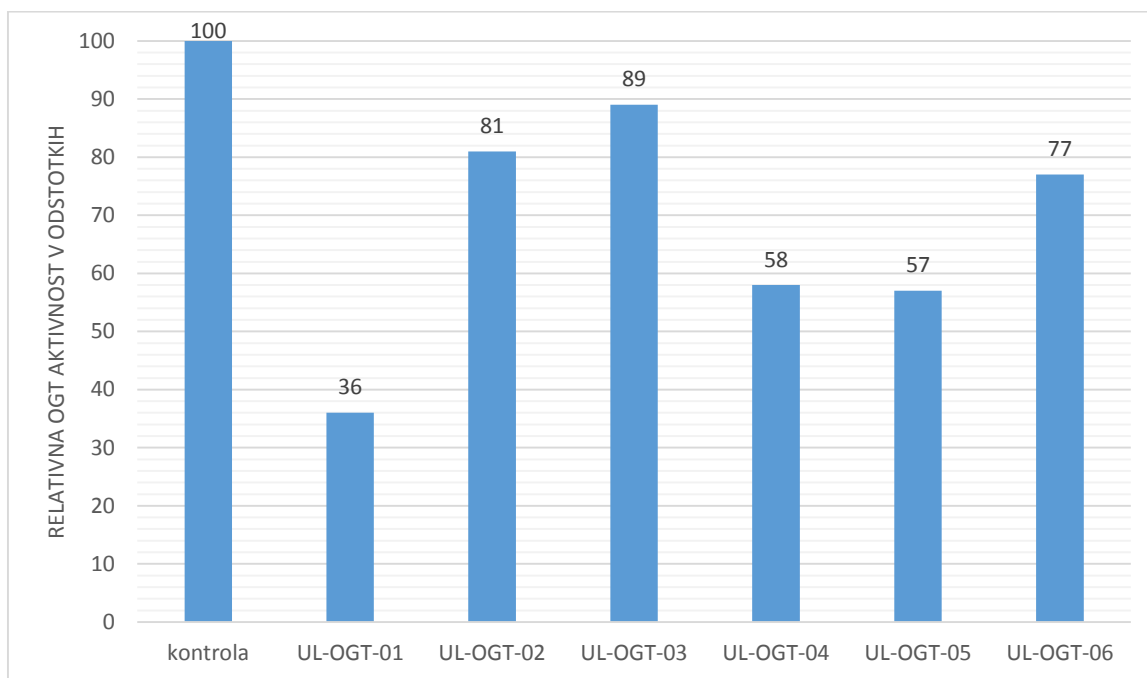
**Preglednica 5:** Tabelirane vrednosti izbranih spojin uporabljenih v encimskem testiranju relativne aktivnosti OGT.

Ime spojine	Šifra spojine	Struktura	Rang	Molekulska masa [g/mol]
UL-OGT-01	F2158-0421		12	276,31
UL-OGT-02	F6489-0287		10	275,27
UL-OGT-03	F2207-0009		22	252,29
UL-OGT-04	F6523-4185		1	284,32

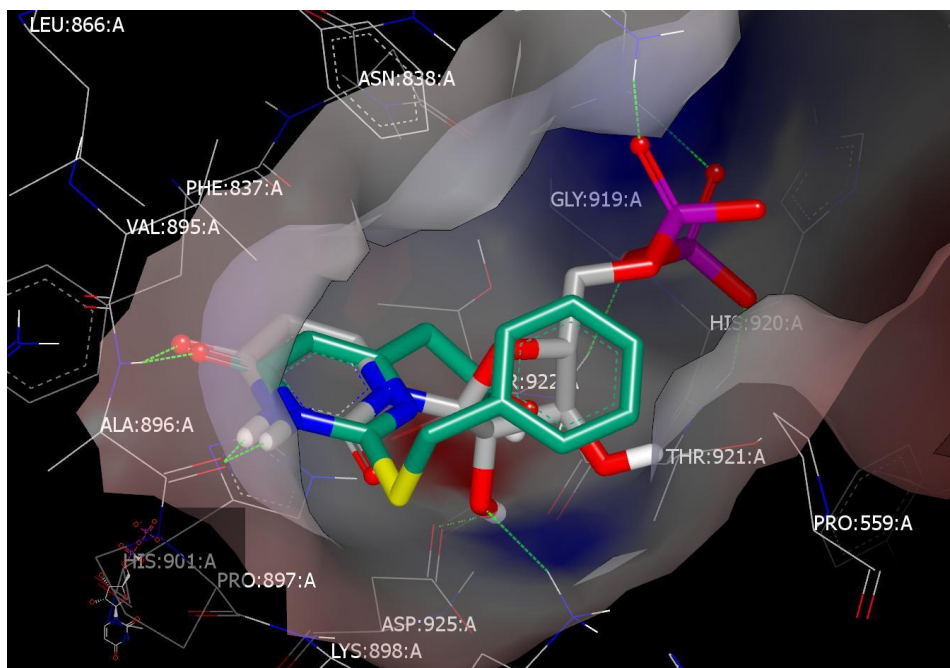
UL-OGT-05	F6487-0589		24	298,34
UL-OGT-06	Z14118993 49		2	273,34

V začetnih poizkusih nas je zanimala relativna aktivnost spojin pri koncentraciji 1 mM. Izbrana koncentracija je precej visoka, vendar so v tej fazi raziskovanja izbrane spojine še na nivoju neoptimiziranih fragmentov, mi pa smo šele v postopku izbire potencialnih spojin zadetkov. Testiranje je bilo izvedeno v prisotnosti 0,1 mM peptida RBL2 (sladkorni akceptor) ter 0,1 mM UDP-GlcNAc (sladkorni donor) v sistemu za testiranje UDP-Glo. Kot topilo smo uporabili DMSO, ki je hkrati služilo tudi kot negativna kontrola, s čimer smo se prepričali, da ne vpliva na encimsko aktivnost encima OGT. Rezultati so podani kot relativna aktivnost OGT glede na kontrolo, pri čemer nižja vrednost izraža močnejši zaviralni učinek spojine. Glede na to, da govorimo o spojinah z molekulsko maso pod 300 g/mol, so rezultati neverjetno zanimivi in spodbudni (graf 1), saj spojine tekmujejo za vezavno mesto v OGT z UDP-GlcNAc (molekulska masa 607,35 g/mol), ki je sposoben tvorbe številnih vodikovih vezi in elektrostatskih interakcij. Zelo impresivna je aktivnost spojine UL-OGT-01. Z nadaljnjim načrtovanjem in optimiziranjem lahko rezultate definitivno še izboljšamo, za začetek si želimo boljše jakosti vezave spojine v vezavno mesto, s čimer bi lahko znižali koncentracije spojine potrebne za zaviranje encimske aktivnosti OGT v *in vitro* testiranjih.

**Graf 1:** Relativna aktivnost OGT pri 1 mM koncentraciji testirane spojine.



Spojina UL-OGT-01 je izmed 6 testiranih spojin najmočnejše zavirala encim OGT, njena vezava v vezavnem mestu v primerjavi z UDP je predstavljena v sliki 13. Najbolj opazno je prekrivanje uracilnega obroča UDP in 6-okso-pirimidinskega obroča spojine UL-OGT-01, ter tvorba dveh vodikovih vezi na istem aminokislinskem ostanku (Ala896). Tiobenzilni element pripet na mesto 2 6-okso-pirimidinskega obroča strukturno dobro zapolni praznino nad žepom, v katerega se veže uracilna enota UDP. Dodatne interakcije bi bilo smiselno iskati na aminokislinskih ostankih Lys898 in Asp925, kjer ima ribozna enota UDP že vzpostavljeni dve vodikovi vezi. Velik izziv pa bo nadomestiti difosfat, ki vzpostavi številne povezave z receptorskim mestom in tako močno vsidra ligand UDP, v ta namen bo v veliko pomoč očetna kislina na mestu 4 pirimidinskega obroča spojine UL-OGT-01, ki preko karboksilne skupine omogoča podaljšanje strukture v smeri difosfatov, npr. s tvorbo estrov ali amidov.



**Slika 13:** Predvidena vezava spojine UL-OGT-01 (obarvana modro-zeleno) v vezavnem mestu OGT v primerjavi z UDP (obarvan sivo), črtkane zelene povezave nakazujejo H-vezi.

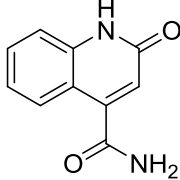
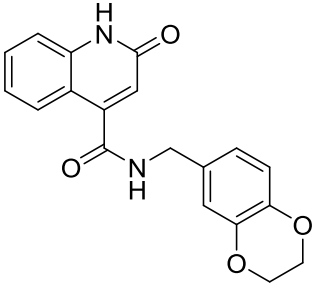
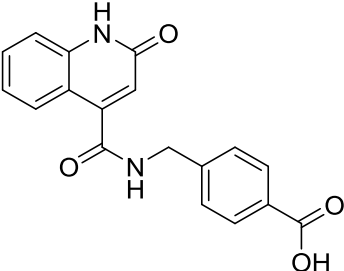
Primerjava relativne aktivnosti OGT pri 1 mM koncentraciji encimsko testiranih spojin z rangiranjem rezultatov pri virtualnem rešetanju ne kaže premosorazmerne odvisnosti. Spojina z rangom 24 (UL-OGT-05) je tako pokazala drugi najboljši zaviralni učinek na encimskem testiranju, medtem ko je bila spojina z rangom 1 (UL-OGT-04) pri tem za en procent manj učinkovita. Pogled v tabelo rangiranih rezultatov sidranja v vezavno mesto za UDP encima OGT nam pove, da se spojini razlikujeta v vrednosti Chemgauss4 cenilne funkcije za 1,123, kar vsekakor ni zanemarljivo. Vendar kot je že bilo omenjeno v uvodu, *in silico* metoda ne more biti nadomestek za *in vitro* raziskave, usmerjajo nas le na pravo in hitrejšo pot.

#### 4.5 PRIPRAVA SPOJIN ZA VEZAVO V UDP DEL VEZAVNEGA MESTA OGT

Iz rezultatov virtualnega rešetanja v vezavno mesto za UDP encima OGT smo ugotovili, da veliko število spojin vključuje kinolin-2-on-4-karboksamid. V tem koraku so namesto naročanja vzorcev spojin od pripadajočih ponudnikov raziskovalci iz Katedre za farmacevtsko kemijo sintetizirali 22 različnih derivatov kinolin-2-on-4-karboksamida, pri čemer so uporabili različne amine za sintezo amidne vezi. V preglednici 6 sta poleg

izhodiščne spojine predstavljeni tudi spojini z najboljšim odzivom na encimskem testiranju. Pri sintetiziranih derivatih so bile modifikacije opravljene izključno na karboksamidni skupini, preko uporabe različnih vhodnih aminov.

**Preglednica 6:** Prikazani so podatki o izhodiščni spojini kinolin-2-on-4-karboksamidu ter njenih dveh derivatih sintetiziranih na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki sta v danem encimskem testu popolnoma zavrla encimsko aktivnost OGT.

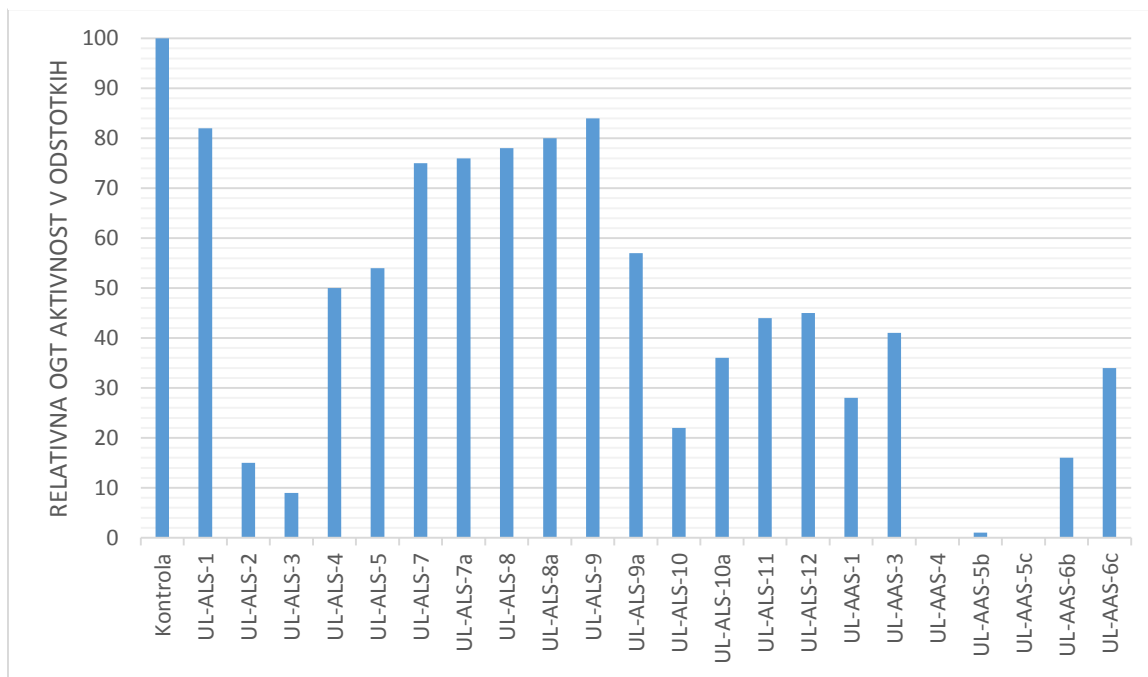
Ime spojine	Struktura	Molekulska masa [g/mol]
Kinolin-2-on-4-karboksamid		188,19
UL-AAS-4		336,35
UL-AAS-5c		322,32

V spodnjem grafu so prikazane relativne aktivnosti OGT glede na kontrolo, ki je vsebovala kot negativno kontrolo DMSO (6%), 0,1 mM peptid RGLB2 (sladkorni akceptor) ter 0,1 mM UDP-GlcNAc (sladkorni donor). Z negativno kontrolo se želimo prepričati, da vsebovano topilo DMSO (6%) ne vpliva na aktivnost encima OGT. Kot zelo obetavne so se izkazale spojine UL-AAS-4, UL-AAS-5b ter UL-AAS-5c, ki so močno zavirale delovanje OGT pri testirani koncentraciji. Skupna značilnost spojin je določena fleksibilnost substituenta vezanega na mesto 4, ki je očitno pomemben za ustrezno usmeritev spojine proti



vezavnemu mestu za difosfat molekule UDP. Tako večina najbolj aktivnih spojin vključuje substituiran benzilni strukturni element, medtem ko imajo derivati anilina in alifatskih cikličnih aminov šibkejšo zaviralno aktivnost.

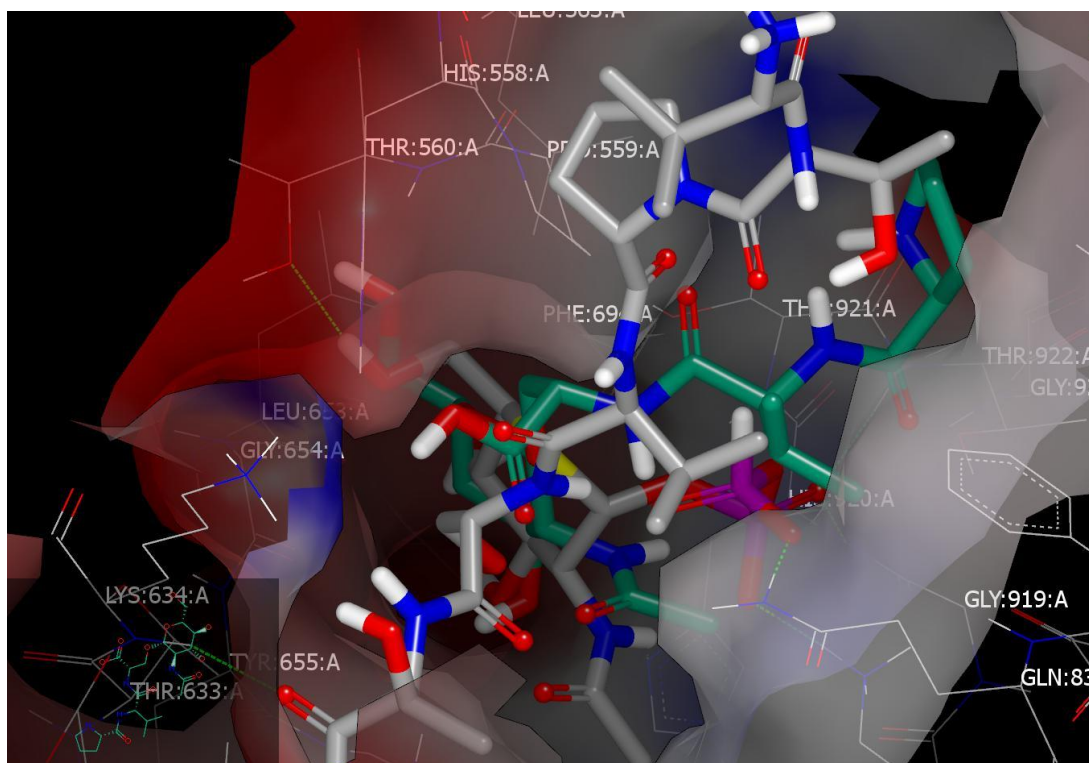
**Graf 2:** Relativna aktivnost OGT pri 1 mM koncentraciji testirane spojine.



#### 4.6 REZULTATI NAČRTOVANJA NOVIH POTENCIALNIH ZAVIRALCEV OGT NA OSNOVI STRUKTURE BISUBSTRATNEGA ZAVIRALCA

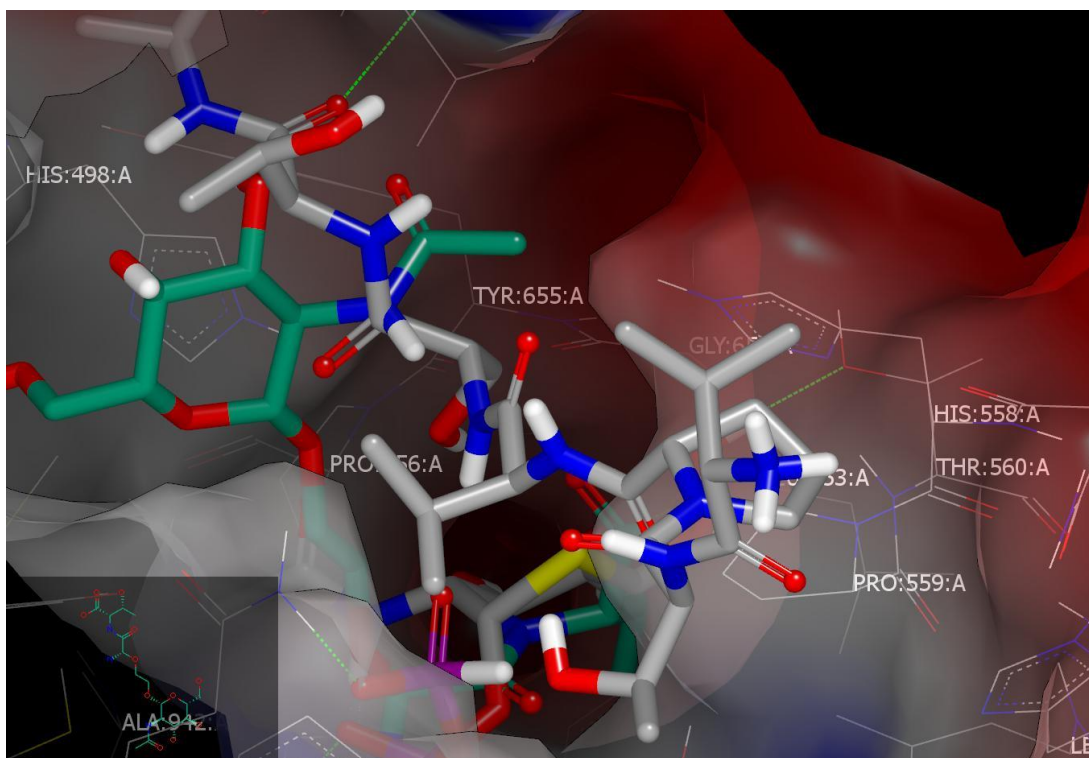
V sklopu molekulskega modeliranja smo sidrali tudi načrtovane spojine (slika 15), ki so temeljile na spojini **0**, ki je bila tudi naš referenčni ligand. Prvotno smo za sidranje uporabili program FRED. Dobljeni rezultati so bili tukaj precej nenavdušujoči, saj so se spojine glede na sidrano vezavo v OGT nepričakovano obračale in pozicionirale glede na referenčni ligand, kar pomeni, da so slabo zavzele prostor vezavnega mesta. Ker smo želeli preveriti ali res ni možno bolje sidrati spojin, smo v program ob sidranju vpisali še dva dodatna parametra. Prvi se je nanašal na ločljivost. Standardna ločljivost sidranja poteka pri 1,0 Å za translacijske in 1,5 Å za rotacijske zasuke liganda, tako med določanjem položaja v vezavnem mestu kot tudi med sledečo optimizacijo vezave. Z višjo ločljivostjo pa sidranje poteka pri 1,0 Å pri translacijskih in 1,0 Å pri rotacijskih zasukih. Za preverjanje rezultatov smo vpisali še ukaz, ki se nanaša na število shranjenih poz ob koncu sidranja. Tudi ogled

večjega števila poz ligandov v vezavnem mestu ni zadovoljil naših želja po prileganju spojin v vezavno mesto OGT (slika 14), saj je npr. enota GlcNAc pozicijsko nekako bila sidrana pravilno, vendar se ni prekrivala z referenčno enoto GlcNAc, poleg tega pa je pogosto prebadala zunanjo površino receptorskega mesta, proteinske verige pa so se obračale po naključnem vzorcu in se redko prilegale referenčnemu ligandu.



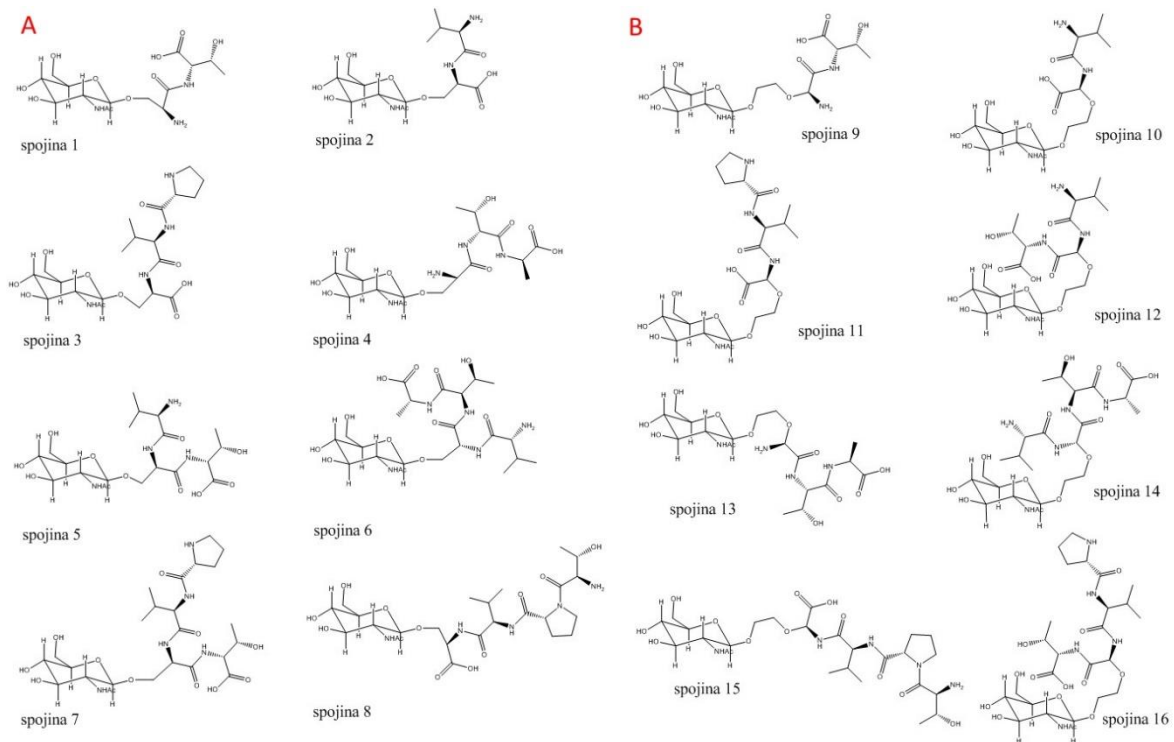
**Slika 14:** Vezava GlcNAc-peptida (obarvan modro-zeleno) v receptorsko mesto OGT z referenčnim ligandom (obarvan sivo).

Zato smo se v iskanju alternativnih rezultatov obrnili še k programu HYBRID. Ta pri sidranju spojin za večjo optimizacijo, kot dodatno izboljšavo v primerjavi s programom FRED, poleg strukture receptorja upošteva tudi strukturo referenčnega liganda. Tako je poznavanje strukture referenčnega liganda nujni pogoj za uporabo programa HYBRID. Tudi menjava programa nam na žalost ni postregla z zadovoljivimi rezultati, nekaj spojin je bilo pozicioniranih še slabše kot pri uporabi FRED-a, saj je denimo enota GlcNAc popolnoma zgrešila žep, v katerem je bila sidrana referenčna enota GlcNAc (slika 15).



**Slika 15:** Primer GlcNAc-peptida z vmesno etilenglikolno povezavo (modro-zeleno obarvan) ob referenčnem ligandu (sivo obarvan).

Neustrezna predvidena vezava se je odražala tudi na vrednostih cenilne funkcije Chemgauss4, ki so bile visoke, saj je najboljše sidrana spojina derivata GlcNAc-peptida z etilenglikolno povezavo dosegla vrednost -3,4960, kar je le približno ena četrtnina vrednosti, ki jo je dosegla najboljša spojina v sidranju za UDP v encimu OGT. Vseeno pa lahko tudi iz tega potegnemo pomemben nauk. Naš nevtralni distančnik, ki je nadomeščal UDP del liganda, več kot očitno ne zadošča potrebam po vzpostavitvi številnih interakcij prek elektrostatskih sil in vodikovih vezi. Hkrati so derivati sladkorjev zahtevni za sintezo, medtem ko je zaradi fleksibilnosti peptidnega dela molekule težko pravilno napovedati njihovo vezavo z računalniškimi metodami.



**Slika 16:** Prikaz vseh načrtovanih spojev izpeljanih iz spojine **0**, pri čemer se levi blok A ter desni blok B razlikujeta v vmesnem povezovalnem členu med enoto GlcNAc ter derivati peptidov, pri čemer smo metilenoksi člen zamenjali za etilenglikolnega.

## 5. SKLEP

Do sedaj znani zaviralci OGT zaradi svoje velikosti in naboja slabo prehajajo celično membrano, zaradi česar nobeden izmed njih ni izkazoval aktivnosti v celičnih testiranjih. Naš namen je bil z računalniškimi metodami na podlagi poznavanja kristalne strukture OGT poiskati nove spojine, ki bi jih lahko v naslednjih fazah dodatno optimizirali z namenom pridobitve novih močnih zaviralcev encima OGT. Delo je bilo razdeljeno v dva sklopa, pri čemer je prvi sklop zajemal načrtovanje bisubstratnih derivatov GlcNAc-peptidov in njihovo sidranje v vezavno mesto encima OGT. Kaj kmalu je postalo jasno, da smo tudi sami v iskanju novih zaviralcev OGT glede na dobljene rezultate stopili na pot naših predhodnikov. Velike peptidne spojine so se izkazale za neuporabne že na virtualnem nivoju, saj se je kot težavno izkazalo že predvidevanje njihove vezave v aktivno mesto, brez dvoma pa bi bila tudi njihova sinteza dolgotrajna in zapletena.

Zato smo vso preostalo energijo vložili v iskanje novih majhnih spojin kot zaviralcev OGT s pomočjo virtualnega rešetanja. V ta namen smo sestavili knjižnico fragmentov, sestavljeno iz skoraj 200.000 spojin, ki smo jo sidrali v vezavno mesto UDP ter GlcNAc encima OGT. Najboljše rangirani fragmenti po velikosti večinoma ne presegajo molekulske mase 300 g/mol in zato predstavljajo idealno izhodišče za nadaljnjo optimizacijo. Rezultati encimskih testiranj spojin, ki smo jih bodisi kupili, ali pa so jih sintetizirali raziskovalci Katedre za farmacevtsko kemijo, so pokazali zaviralno aktivnost že na nivoju fragmentov, zato jih bomo v prihodnje zagotovo še razvijali in optimizirali, s čimer želimo v prvi vrsti povečati afiniteto vezave. Največje pozornosti bodo deležni derivati kinolin-2-on-4-karboksamida, med njimi še posebej izstopata spojini UL-AAS-4 in UL-AAS-5c, ki sta v danih eksperimentalnih pogojih popolnoma zavrla encim OGT. Rezultati *in vitro* testiranj so sicer pokazali drugačne jakosti afinitete spojin do encima OGT, kot je to predvidel program FRED. Kljub temu ne moremo zanikati ogromne prednosti v iskanju novih spojin, ki nam jo nudijo računalniki.

Rezultati sidranja fragmentov v vezavno mesto za GlcNAc so bili sicer podobno ocenjeni s Chemgauss4 kot najboljši fragmenti v vezavnem mestu UDP, vendar niso izkazovali podobnih interakcij kot naravni ligand. Razlike so bile opazne v pozicioniranju spojin glede na sladkorno enoto GlcNAc, kot tudi v zapolnitvi prostora v vezavnem mestu. To je tudi botrovalo temu, da vzorcev izbranih najboljših spojin nismo niti kupili niti sintetizirali. Nadomestitev difosfata bo še naprej ostala ključni problem, saj zaradi tvorbe številnih

vodikovih vezi ter elektrostatskih interakcij predstavlja hrbtenico vezave UDP-GlcNAc v vezavno mesto OGT. Prav tako bo zanimiva vključitev fragmenta GlcNAc, saj se je ta element izkazal kot težko nadomestljiv, kljub temu da na samo vezavo v aktivno mesto nima velikega vpliva.

## 6. LITERATURA

1. Torres CR, Hart GW: Topography and Polypeptide Distribution of Terminal *N*-Acetylglucosamine Residues on the Surfaces of Intact Lymphocytes. *J Biol Chem* 1984; 259: 3308-17
2. Hart GW, Housley MP, Slawson C: Cycling of O-linked  $\beta$ -*N*-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 2007; 224: 1017-22
3. Lazarus MB, Nam Y, Jiang J, Sliz P, Walker S: Structure of human *O*-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature* 2011; 469: 564-7
4. Slawson C, Housley MP, Hart GW: O-GlcNAc cycling: How a Single Sugar Post-Translational Modification Is Changing the Way We Think About Signaling Networks. *J Cell Biochem* 2006; 97: 71-83
5. Dias WB, Hart GW: *O*-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst* 2007; 3: 766-72
6. Hanover JA, Krause MW, Love DC: The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800: 80-95
7. Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW: Dynamic Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 1997; 272: 9308-15
8. Love DC, Kochan J, Cathey RL, Shin SH, Hanover JA: Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J Cell Sci.* 2003; 116: 647-54
9. Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B: An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *J Mol Biol* 2003; 328: 307-17
10. CAZY Carbohydrate-active enzymes: <http://www.cazy.org/> (dostopano: 5.3.2017)
11. Lazarus MB, Jiang J, Gloster TM, Zandberg WF, Whitworth GE, Vocadlo DJ, Walker S: Structural snapshots of the reaction coordinate for *O*-GlcNAc transferase. *Nat Chem Biol* 2012; 8: 966-68



12. Janetzko J, Walker S: The Making of a Sweet Modification: Structure and Function of *O*-GlcNAc Transferase. *J Biol Chem* 2014; 289: 34424-32
13. Dorfmüller HC, Borodkin VS, Blair DE, Pathak S, Navratilova I, van Aalten DMF: Substrate and product analogues as human *O*-GlcNAc transferase inhibitors. *Amino Acids* 2011; 40: 781-92
14. Slawson C, Copeland RJ, Hart GW: *O*-GlcNAc signaling: a metabolic link between diabetes and cancer? *Trends Biochem Sci* 2010; 35: 547-55
15. Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS, Cho JW: Modification of p53 with *O*-linked *N*-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1074-83
16. Clarke AJ, Hurtado-Guerrero R, Pathak S, Schüttelkopf AW, Borodkin V, Shepherd SM, Ibrahim AFM, van Aalten DMF: Structural insights into mechanism and specificity of *O*-GlcNAc transferase. *EMBO J* 2008; 27: 2780-88
17. Capotosti F, Guernier S, Lammers F, Waridel P, Cai Y, Jin J, Conaway JW, Conaway RC, Herr W: *O*-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell*. 2011; 144: 376-88
18. Lazarus MB, Jiang J, Kapuria V, Bhuiyan T, Janetzko J, Zandberg WF, Vocadlo DJ, Herr W, Walker S: HCF-1 is Cleaved in the Active Site of *O*-GlcNAc Transferase. *Science* 2013; 342: 1235-39
19. Allan RK, Ratajczak T: Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell stress chaperon* 2011; 16: 353-67
20. McClain DA, Crook ED: Hexosamines and Insulin Resistance. *Diabetes*. 1996; 45: 1003-09
21. Lynch TP, Ferrer CM, RaElla Jackson S, Shahriari KS, Vosseller K, Reginato MJ. Critical Role of *O*-linked  $\beta$ -*N*-Acetylglucosamine Transferase in Prostate Cancer Invasion, Angiogenesis and Metastasis. *J Biol Chem* 2012; 287: 11070-81
22. Devic S: Warburg Effect - a Consequence or the Cause of Carcinogenesis? *J Cancer* 2016; 7: 817-22

23. Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, Vosseller K, Reginato MJ: Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 2010; 29: 2831-42
24. Whelan SA, Lane MD, Hart GW: Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. *J Biol Chem* 2008; 283: 21411-17
25. Kreppel LK, Hart GW: Regulation of a Cytosolic and Nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the Tetratricopeptide Repeats. *J Biol Chem* 1999; 274: 32015-22
26. Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, Venus So W, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ, Evans RM: Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 2008; 451: 964-969
27. Schimpl M, Zheng X, Borodkin VS, Blair DE, Ferenbach AT, Schuttelkopf AW, Navratilova I, Aristotelous T, Albarawi O, Robinson DA, Macnaughtan MA, van Aalten DMF: O-GlcNAc transferase invokes nucleotide sugar pyrophosphate participation in catalysis. *Nat Chem Biol* 2012; 8: 969-74
28. Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG: Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem* 2008; 77: 521-55
29. Izumi M, Yuasa H, Hashimoto H: Bisubstrate analogues as glycosyltransferase inhibitors. *Curr Top Med Chem* 2009; 9: 87-105
30. Trapannone R, Rafie K, van Aalten MF: O-GlcNAc transferase inhibitors: current tools and future challenges. *Biochem Soc T* 2016; 44: 88-93
31. Borodkin VS, Schimpl M, Gundogdu M, Rafie K, Dorfmueller HC, Robinson DA, van Aalten DMF: Bisubstrate UDP-peptide conjugates as human O-GlcNAc transferase inhibitors. *Biochem J* 2014; 457: 497-502
32. Konrad JR, Zhang F, Hale JE, Knierman MD, Becker GW, Kudlow JE: Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 207-12
33. Filhoulaud G, Guillemain G, Scharfmann R: The Hexosamine Biosynthesis Pathway Is Essential for Pancreatic Beta Cell Development. *J Biol Chem* 2009; 284: 24583-94

34. Jiang J, Lazarus MB, Pasquina L, Sliz P, Walker S: A neutral diphosphate mimic crosslinks the active site of human O-GlcNAc transferase. *Nat Chem Biol* 2012; 8: 72-77
35. Cerqueira NM, Gesto D, Oliveira EF, Santos-Martins D, Bras NF, Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ: Receptor-based virtual screening protocol for drug discovery. *Arch Biochem Biophys* 2015; 582: 56-67
36. Schneider G: Virtual screening: an endless staircase? *Nat Rev Drug Discov* 2010, 9: 273-6
37. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: *Farmaceutvska kemija III: Vaje in seminarji*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.