

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA KOTAR  
MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANITA KOTAR

ŠTUDIJ INTERAKCIJ LIGANDOV RECEPTORJA DC-SIGN  
Z METODO JEDRSKE MAGNETNE REZONANCE

INTERACTION STUDIES OF DC-SIGN LIGANDS USING NUCLEAR MAGNETIC  
RESONANCE

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha. NMR meritve in analizo podatkov sem izvedla v Nacionalnem centru za NMR spektroskopijo visoke ločljivosti na Kemijskem inštitutu pod somentorstvom prof. dr. Janeza Plavca.

## **Zahvala**

Zavalujem se mentorju za zanimive razprave, pomoč in nasvete, ki sem jih prejela tekmo študija in izdelave magistrske naloge.

Posebno se želim zahvaliti somentorju za vso posredovano znanje, spodbudne besede, koristne nasvete in možnost, da sem lahko zares od blizu spoznala znanstveno-raziskovalno dejavnost.

Hvala dr. Martini Lenarčič Živković, da me je uvedla v NMR svet, ter za vsestransko pomoč, nasvete, debate in spodbude. Hvala dr. Damjanu Makucu za pomoč pri asignaciji in splošnem reševanju iz težav. Obdobje izdelave naloge je popestrila in polepšala celotna ekipa NMR. Vsakemu posebej se zahvaljujem za pomoč, koristne nasvete in debate ob kavi.

Hvala mojim prijateljem, ki so naredili študentska leta nepozabna, Maticu, ki me ima rad takšno kot sem, celo v izpitnem obdobju, in mami, bratu ter ostali družini za neskončno podporo tekom študija!

Magistrsko nalogo posvečam mami Mojci.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha in somentorstvom prof. dr. Janeza Plavca.

Anita Kotar

Predsednica magistrske komisije: prof. dr. Julijana Kristl

Članica magistrske komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički

## Vsebina

|   |     |
|---|-----|
| I. Povzetek .....   | I   |
| II. Abstract .....  | II  |
| III. Seznam uporabljenih okrajšav .....   | III |
| 1. Uvod .....   | 1   |
| 1. Imunski odziv in dendritične celice .....  | 1   |
| 1.1.1. DC-SIGN: prijatelj in hkrati sovražnik .....                                   | 2   |
| 1.1.2. Zgradba DC-SIGN .....  | 4   |
| 1.2. Virus HIV in zdravljenje .....   | 5   |
| 1.2.1. Lokalni mikrobicidi kot alternativa mehanski zaščiti .....                     | 6   |
| 1.2.2. Načrtovanje antagonistov DC-SIGN .....   | 7   |
| 1.3. Molekulske interakcije in njihovo preučevanje v (pato)fizioloških procesih ..... | 9   |
| 1.3.1. STD NMR: priljubljena metoda za preučevanje molekulskih interakcij .....       | 11  |
| 2. Načrt za delo ali delovna hipoteza .....   | 15  |
| 3. Materiali in metode .....  | 17  |
| 3.1. Reagenti in topila .....   | 17  |
| 3.2. Laboratorijska oprema .....  | 17  |
| 3.3. Računalniška oprema .....  | 17  |
| 3.4. Priprava vzorcev .....   | 18  |
| 3.4.1. Monovalentni in dendronski D-manozni ligandi .....                             | 18  |
| 3.4.2. Priprava proteina DC-SIGN .....  | 18  |
| 3.4.3. Priprava NMR vzorcev za asignacijo .....                                       | 18  |
| 3.4.4. Priprava vzorcev za STD NMR eksperimente .....                                 | 19  |
| 3.5. Obdelava STD NMR podatkov .....  | 19  |
| 4. Eksperimentalno delo .....   | 21  |
| 4.1. NMR meritve .....  | 21  |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.1.1. | Spektralna karakterizacija in asignacija NMR spektrov.....                      | 21 |
| 4.1.2. | STD NMR .....   | 25 |
| 4.1.3. | DOSY NMR .....  | 26 |
| 5.     | Rezultati.....  | 27 |
| 5.1.   | NMR asignacija in konformacijske lastnosti ligandov .....                       | 27 |
| 5.1.1. | Monovalentni antagonisti <b>1-4</b> .....                                       | 27 |
| 5.1.2. | Dendronski antagonist <b>5</b> .....  | 28 |
| 5.2.   | STD NMR eksperimenti monovalentnih antagonistov <b>1-4</b> .....                | 31 |
| 5.2.1. | Strukturno ovrednotenje ligandov <b>1-4</b> .....                               | 33 |
| 5.2.2. | Odvisnost STD efektov od časa nasičevanja.....                                  | 35 |
| 5.2.3. | Karakterizacija in primerjava vezavne konformacije med ligandi <b>1-4</b> ..... | 40 |
| 5.2.4. | Ovrednotenje vezavne afinitete med DC-SIGN in ligandi <b>1-4</b> .....          | 43 |
| 5.3.   | STD NMR eksperimenti dendronskega antagonista <b>5</b> .....                    | 46 |
| 6.     | Razprava .....  | 49 |
| 7.     | Sklep.....  | 56 |
| 8.     | Literatura .....  | 58 |

## I. Povzetek

Kljub razvoju številnih protiretrovirusnih terapij je virus HIV še vedno med vodilnimi vzroki za obolevnost in umrljivost ljudi po vsem svetu. Virus se najpogosteje prenaša s spolnimi odnosi skozi površino sluznice, zato posvečajo veliko pozornost razvoju mikrobicidov za vaginalno in rektalno uporabo, ki bi predstavljali alternativo in/ali dopolnilo mehanski zaščiti pri preprečevanju prenosa okužbe. Za vdor virusa v organizem je odgovoren za dendritične celice specifični, medcelično adhezijsko molekulo-3 vežoč neintegrin (DC-SIGN), ki je lektinski receptor tipa C izražen posebno na dendritičnih celicah. Vodilna ideja pri oblikovanju antagonistov DC-SIGN je posnemanje nativnih ligandov receptorja in njihovo preoblikovanje v farmakološko bolj uporabne glikomimetike. S pomočjo 1D  $^1\text{H}$  in STD (razlika v prenosu nasičenja) NMR spektroskopije smo dobili nove strukturne in mehanistične podrobnosti o interakcijah med petimi različnimi manoznimi glikomimetiki **1–5** in DC-SIGN. Ugotovili smo, da je manozni obroč najbližje površini receptorja in je posledično najpomembnejši pri vezavi liganda v ortosterično vezavno mesto receptorja. Pri interakcijah z receptorjem sodelujejo tudi aromatske skupine, vendar ne tako močno kot sladkorna enota. Opazili smo, da intenziteta STD efektov dobro korelira s substitucijo fenilne skupine pri **1–3** kot tudi z lipofilnostjo posameznega liganda. Pokazali smo, da je vezavni način manoznega obroča zelo podoben za **1–4**. Dobro ujemanje med ligandi smo zaznali tudi za proton naftalenskega obroča, kar nakazuje na podobne interakcije te skupine v hidrofobnem žepku vezavnega mesta DC-SIGN. Eksperimentalni podatki kažejo, da se vezava dendronskega liganda **5** na DC-SIGN razlikuje v primerjavi z monovalentnimi ligandi **1–4**, in sicer se ligand **5** v vezavnem mestu zadrži dlje, saj ne oddisocirajo vsi dendronski kraki naenkrat. Za ligande **1–4** smo ovrednotili tudi afiniteto vezave, vrednosti  $K_D$  so bile v submilimolarnem območju. Opažena je bila tudi hitra izmenjava ligandov v vezavnem mestu. Na podlagi danih rezultatov smo zaključili, da je za povečanje afinitete monovalentnih antagonistov pomembna večja lipofilnost in manjša fleksibilnost spojin. Oblikovanje učinkovitih antagonistov DC-SIGN ne obeta samo preprečevanja okužb z virusom HIV-1, ampak tudi z drugimi patogeni, ki jih veže receptor.

Ključne besede: HIV-1, DC-SIGN, manozni antagonisti, STD NMR spektroskopija, afiniteta vezave.

## II. Abstract

Virus HIV is still one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide despite the effort to develop new anti-HIV therapeutics. Since HIV-1 infections occur mainly via sexual transmission through mucosal surfaces, microbicides for topical vaginal or rectal administration constitute a promising therapeutic approach. In the future topical microbicides can be used as an alternative and/or supplement to mechanical protection in prevention of HIV-1 transmission. Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) is a C-type lectin expressed specifically on dendritic cells and is responsible for HIV-1 invasion. Inhibition of interactions between DC-SIGN and HIV-1 has become a potential therapeutic strategy since it aims at preventing pathogen entry and impeding the infection of immune defence cells. In the present study we investigated interactions between five mannose-based ligands **1-5** and DC-SIGN using combination of 1D  $^1\text{H}$  and saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy. D-mannose sugar moiety was in the closest contact with the surface of DC-SIGN and showed the highest relative STD effects in the case of all studied ligands. The interactions between aromatic groups and DC-SIGN were observed as well, but they exhibited weaker STD effects in comparison to the mannose moiety. Differences in ligands' binding affinities can be correlated with the position of carboxylic group on the phenyl moiety in **1-3** as well as lipophilicity of each of the ligands. Ligands **1-4** showed comparable binding mode of mannose moiety. The normalized build-up curves for naphthalene proton exhibited excellent correspondence and confirmed analogous binding conformation of this group in hydrophobic groove of DC-SIGN. For ligand **5** quite different binding mode in comparison to monovalent ligands **1-4** was observed. Determined  $K_D$  values were in lower milimolar range for **1-4**. The data also showed fast exchange of ligands in active site of DC-SIGN. Based on our results we can conclude that less flexible ligands should be designed to increase the binding affinity of monovalent ligands. The effective antagonists of DC-SIGN are not only promising prevention of HIV-1 infections, but also number of other pathogens that are recognised by receptor.

Keywords: HIV-1, DC-SIGN, mannose antagonists, STD NMR, NMR spectroscopy, binding affinity.

### III. Seznam uporabljenih okrajšav

|                     |  |
|---------------------|--|
| 1D                  | enodimenzionalno   |
| 2D                  | dvodimenzionalno (v ravnini)   |
| 3D                  | tridimenzionalno, trirazsežno (v prostoru)   |
| AK                  | aminokislina   |
| APC                 | antigenpredstavitvene celice   |
| CMV                 | citomegalovirus  |
| COSY                | korelacijska spektroskopija ( <i>ang.</i> correlation spectroscopy)  |
| CRD                 | domena za prepoznavo ogljikovih hidratov ( <i>ang.</i> carbohydrate recognition domain)  |
| DC                  | dendritične celice   |
| DC-SIGN             | za dendritične celice specifični, medcelično adhezijsko molekulo-3 vežoč neintegrin ( <i>ang.</i> dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) |
| DOSY                | difuzijsko odrejena spektroskopija ( <i>ang.</i> diffusion ordered spectroscopy)   |
| DMSO-d <sub>6</sub> | devteriran dimetil sulfoksid   |
| H5N1                | podtip virusa (ptičje) gripe   |
| HCV                 | virus hepatitisa C   |
| HIV                 | virus humane imunske pomanjkljivosti   |
| HIV-1               | virus humane imunske pomanjkljivosti tipa 1  |
| HMBC                | heteronuklearna več-kvantna korelacija ( <i>ang.</i> heteronuclear multiple quantum coherence/correlation)   |
| HSV                 | herpes simpleks virus  |
| HSQC                | heteronuklearna enojno-kvantna korelacija ( <i>ang.</i> heteronuclear single quantum coherence/correlation)  |
| INPHARMA            | opazovanje efektov NOE med ligandi z namenom ovrednotenja farmakofora ( <i>ang.</i> interligand NOEs for pharmacophore mapping)  |
| ICAM-2              | intercelularna adhezijska molekula 2 ( <i>ang.</i> intercellular adhesion molecule 2)  |
| ICAM-3              | intercelularna adhezijska molekula 3 ( <i>ang.</i> intercellular adhesion molecule 3)  |
| k <sub>sat</sub>    | hitrostna konstanta nasičenja  |
| MHC                 | poglavitni histokompatibilnostni kompleks  |
| MM                  | molekulska masa  |
| NMR                 | jedrska magnetna resonanca ( <i>ang.</i> nuclear magnetic resonance)   |
| NOE                 | jedrski Overhauserjev efekt ( <i>ang.</i> nuclear Overhauser effect)   |
| NOESY               | spektroskopija jedrskega Overhauserjevega efekta ( <i>ang.</i> NOE spectroscopy)   |
| PAMP                | s patogeni povezani molekulske vzorci ( <i>ang.</i> pathogen-associated molecular patterns)  |
| PRR                 | vzorčno prepoznavni receptorji ( <i>ang.</i> pattern recognition receptors)  |



|                     |  |
|---------------------|--|
| r                   | razdalja   |
| SAR                 | odnos med strukturo in aktivnostjo ( <i>ang.</i> structure-activity relationship)  |
| SARS-CoV            | korona virus, ki povzroča sindrom akutne respiratorne stiske   |
| STD                 | razlika v prenosu nasičenja ( <i>ang.</i> saturation transfer difference)  |
| STDD                | dvojna razlika v prenosu nasičenja ( <i>ang.</i> saturation transfer double difference)  |
| STD-AF              | STD-amplifikacijski faktor   |
| STD <sub>maks</sub> | maksimalna STD intenziteta   |
| $\tau_c$            | korelacijski čas   |
| TINS NMR            | presejanje z imobiliziranimi tarčnimi receptorji ( <i>ang.</i> target immobilized NMR screening)                               |
| TLR                 | Tollu podobni receptorji ( <i>ang.</i> Toll-like receptors)  |
| TOCSY               | celotna korelacijska spektroskopija ( <i>ang.</i> total correlation spectroscopy)  |
| trNOESY             | spektroskopija prenesenega jedrskega Overhauserjevega efekta ( <i>ang.</i> transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy) |
| UNAIDS              | skupni program Združenih narodov o virusu HIV in AIDS-u  |
| UNICEF              | Mednarodni sklad Združenih narodov za otroke   |
| WHO                 | Svetovna zdravstvena organizacija  |
| waterLOGSY          | opazovanje vode okrog liganda z gradientno spektroskopijo ( <i>ang.</i> water ligand observation with gradient spectroscopy)   |

## 1. Uvod

Okužbe, ki jih povzročajo virusi, bakterije, kvasovke in paraziti, imajo že od nekdaj pomemben vpliv na človekovo življenje, njegovo obolevnost in umrljivost (1). Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije so infekcijske bolezni še vedno med desetimi najpogostejšimi vzroki smrti na svetu in glavni vzrok smrti v državah v razvoju (2). Med največje svetovne »ubijalce« spadajo virus HIV, *Mycobacterium tuberculosis*, respiratorni virusi, virusi gripe, malarija, virus ebole in virusa hepatitisa B ter C (3).

### 1. Imunski odziv in dendritične celice

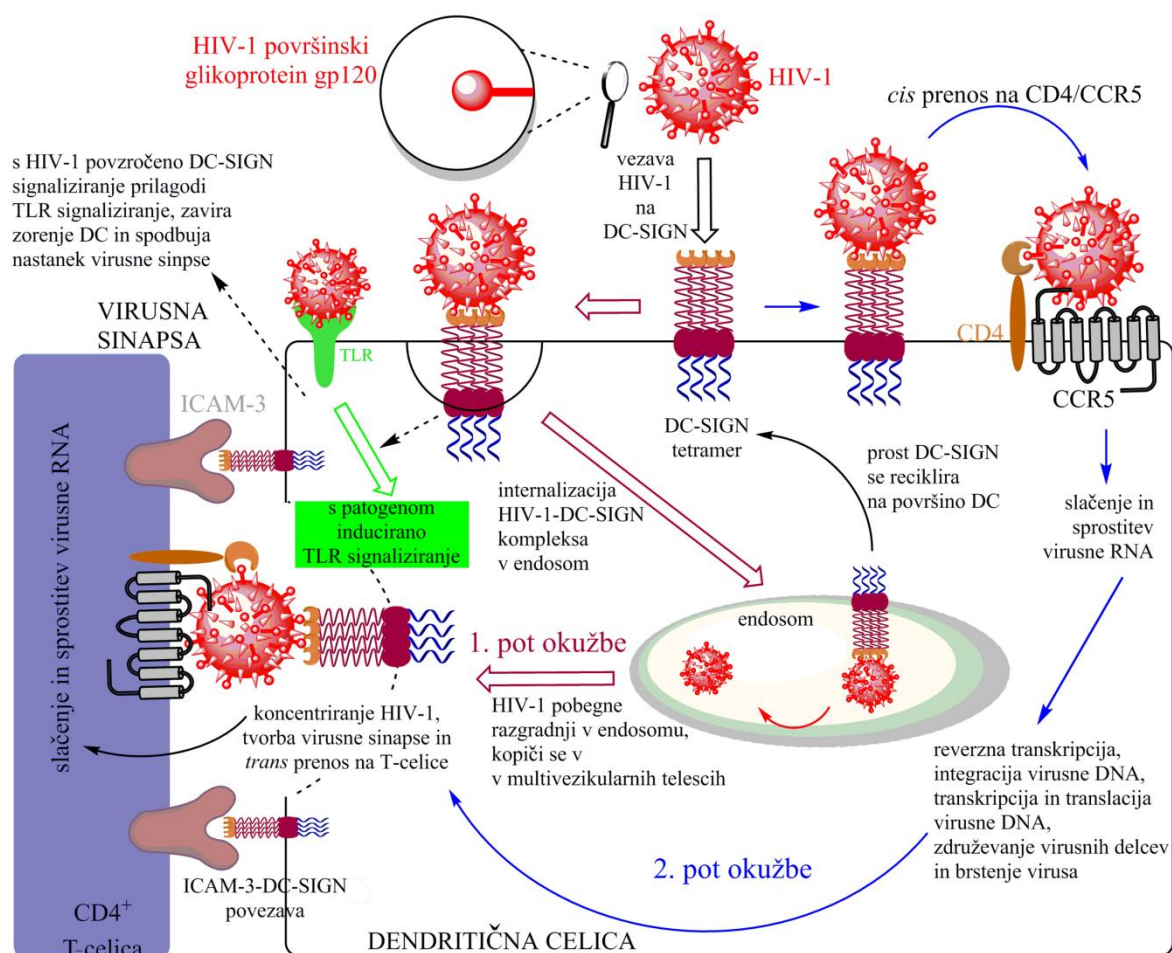
Človeški organizem ima za boj proti škodljivim vplivom iz okolja dva sistema: naravno odpornost in imunski odziv. Slednji je specifičen, kar pomeni, da lahko razlikuje med telesu lastnimi in tujimi molekulami ter ima spomin, zato se lahko ob naslednjih srečanjih z enakim antigenom odzove bistveno hitreje in učinkoviteje (4). Ključni dogodek za sprožitev imunskega odziva je aktivacija limfocitov T. Limfocite T aktivirajo le profesionalne antigenpredstavitvene celice (APC), kot so makrofagi, limfociti B in dendritične celice (DC) (4). Zadnje imajo največjo zmožnost aktivacije limfocitov T in so »glavno poveljstvo« imunskega odziva. Čeprav so DC raznolika celična populacija, vse združujejo podobne morfološke lastnosti, kot so potovanje skozi tkiva in interakcije z limfociti T in B ter naravnimi celicami ubijalkami (5). DC na periferiji vzorčijo antigene, ki so prisotni v tkivih, in nato zbrane informacije o naravi patogena, o njegovem patogenem potencialu in o značilnostih naravne obrambe prenašajo v sekundarne limfatične organe (4). Informacije prenesejo neaktiviranim limfocitom T, ki se tako seznanijo o dogajanju v telesu. Ker DC zavzemajo osrednjo mesto v obrambi organizma, so zanimive tudi kot mesto delovanja različnih učinkovin, s katerimi bi lahko *in situ* modulirali njihove lastnosti (5). V zadnjih letih so bile DC in vzorčno prepoznavni receptorji (PRR), ki jih izražajo, predmet številnih raziskav (6-9). PRR, kot so Toll-u podobni receptorji (TLR-ji), Nod-u podobni receptorji in lektinski receptorji tipa C, prepoznavajo evolucijsko ohranjene, s patogeni povezane molekulske vzorce (PAMP), kot so na primer strukture z bakterijskih sten, virusnih ovojnica in gliv ter virusna DNA/RNA. V zadnjih letih so se kot nove potencialne terapevtske tarče pojavili lektinski receptorji (10). To so receptorji, ki selektivno prepoznavajo in vežejo veliko število

različnih ogljikovih hidratov (10-12). Specifično prepoznavanje sladkorjev se izkorišča v številnih bioloških procesih, tako v fizioloških (prepoznava in vzpostavljanje stikov med celicami ter migracija celic) kot v patofizioloških (kontakt med patogenom in celico). Prav zaradi slednjega oblikovanje antagonistov lektinskih receptorjev obeta razvoj novih antimikrobnih zdravil. Najpogostejši in najpomembnejši so lektini tipa C. Zanimivo je, da je od vseh 174 proteinov, ki prepoznavajo sladkorje, kar 120 uvrščenih med lektine tipa C (10). V to skupino spada tudi receptor DC-SIGN, ki sodeluje pri okužbi s številnimi pomembnimi mikroorganizmi.

### **1.1.1. DC-SIGN: prijatelj in hkrati sovražnik**

DC-SIGN (za dendritične celice specifični, medcelično adhezijsko molekulo-3 vežoč neintegrin) je lektinski receptor tipa C, izražen posebno na DC (6, 13-15). DC-SIGN deluje kot adhezijska molekula, ki omogoča migracijo DC in njihovo interakcijo z limfociti T preko intercelularne adhezijske molekule ICAM-3. Veže tudi molekule ICAM-2, prisotne na žilnem in limfnem endoteliju, kar omogoči migracijo zrelih DC iz perifernih tkiv v bezgavke. DC-SIGN kot PRR selektivno prepoznava PAMP-vzorke, bogate z D-manozo in L-fukozo na virusih (HIV, HCV, CMV, denga, ebola, SARS-CoV, HSV, korona virusi, H5N1, virus zahodnega Nila, virus ošpic), bakterijah (*Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leptospira interrogans*), glivah (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) in nekaterih parazitih (*Leishmania*, *Schistosoma mansoni*) (15-17). Osrednja vloga DC-SIGN je privzemanje, procesiranje in predstavitev antigenov. Pri tem se sprožijo tudi znotrajcelične signalne poti in oblikovanje ustreznega imunskega odgovora v telesu. Ob vezavi patogena na receptor nastopi internalizacija kompleksa DC-SIGN-patogen (slika 1). V lizosomu zaradi kislega pH-ja kompleks razpade in pride do razgradnje patogena na manjše fragmente. Ti delci, konjugirani s proteini MHC II, so potem izpostavljeni na površini DC in pomagajo sprožiti humoralni imunski odziv. Nekateri mikroorganizmi znajo zaobiti proces razgradnje in tako uidejo nadzoru imunskih celic (16, 17). Virus HIV tipa 1 (HIV-1) je najbolj znan primer izkoriščanja naravne funkcije DC-SIGN za okužbo (6, 18). Virus izrabi DC kot trojanskega konja, da doseže limfatično tkivo (predvsem CD4<sup>+</sup> T celice) (13, 15, 17, 19, 20). Prvi stik med virusom HIV-1 in DC je vezava virusnih glikoproteinov gp120 na DC-SIGN. Po endocitozi kompleksa virus-receptor pride do razpada kompleksa v kislem okolju endosoma in do razgradnje večine virusov, medtem ko se prosti DC-SIGN reciklira nazaj na površino DC

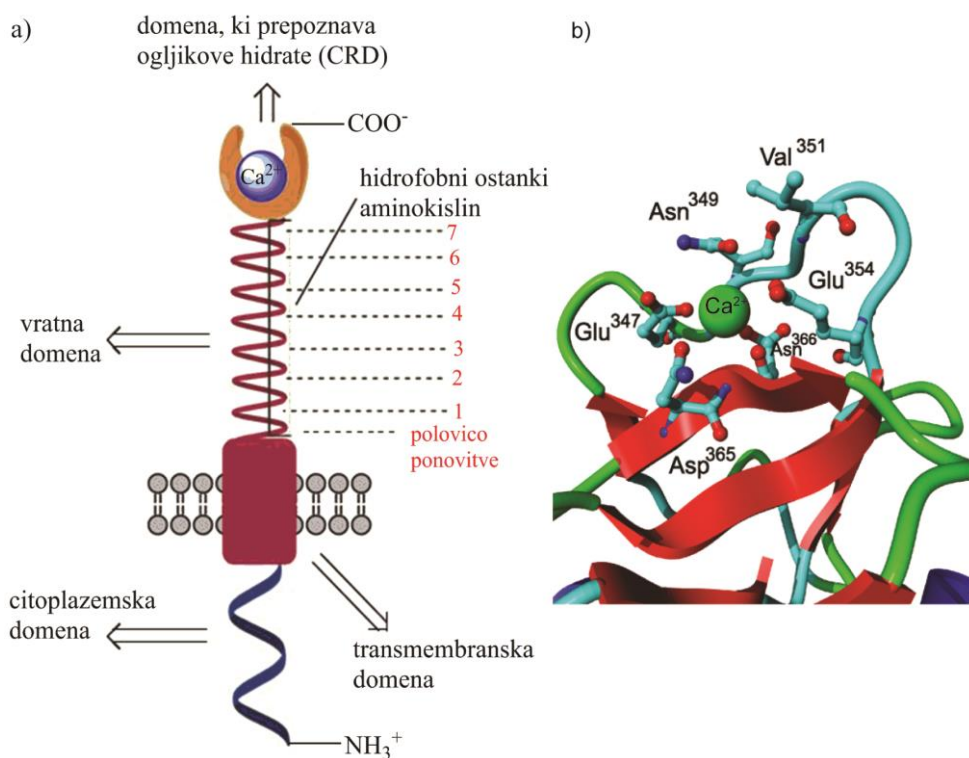
(20). Majhnemu številu virusov uspe pobegniti razgradnji in ostanejo vezani na DC-SIGN in skriti v t. i. multivezikularnih telescih (21). HIV-1 v DC preprečuje zorenje teh celic, hkrati pa spodbuja nastanek virusnih sinaps, ki so sicer značilne le za zrele DC. Okužene DC prenesejo virus preko infekcijske virusne sinapse na CD4<sup>+</sup> T-celice, ki so glavna tarča virusa, to imenujemo tudi *trans* prenos ali transfekcija (22). Virus izkoristi DC-SIGN tudi za modulacijo TLR-jev in z njimi povezanih signalnih poti, da lažje pobegne nadzoru imunskega sistema (zeleni puščice na sliki 1) (15). Obstaja tudi alternativni (2. pot okužbe na sliki 1) način vstopa virusa v celico preko tako imenovanega *cis* prenosa. Po vezavi na DC-SIGN je virus prenesen prečno na CD4/CCR5-receptorje, ki so izraženi na nezrelih DC (23), temu sledi zlitje virusne ovojnice z membrano celice in sprostitvev virusne DNA, kar tudi povzroči okužbo DC.



**Slika 1:** Prikaz okužbe z virusom HIV-1 preko DC-SIGN (rdeče in modre puščice). Z zelenimi puščicami je prikazana modulacija signalizacije DC-SIGN. Prirejeno po (15).

### 1.1.2. Zgradba DC-SIGN

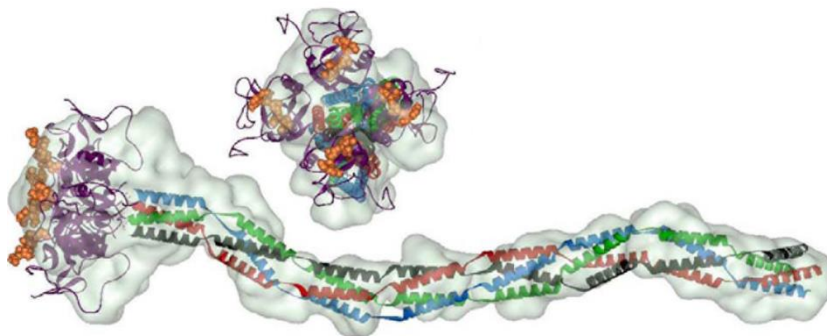
DC-SIGN je transmembranski receptor, sestavljen iz štirih domen: citoplazemske, transmembranske, vratne in domene za prepoznavo ogljikovih hidratov (CRD) (slika 2a) (10, 15). Zadnji dve domeni sta zunajcelični in najpomembnejši za funkcijo DC-SIGN. CRD prepozna in veže visoko glikozilirane proteine na površini patogenov (15, 18). Interakcije v vezavnem mestu so odvisne od kalcijevih ionov, kar je značilno za vse lektinske receptorje tipa C. V CRD DC-SIGN je oktakoordiniran kalcijev ion, ki tvori šest koordinacijskih vezi z aminokislinskimi (AK) ostanki v CRD (slika 2b) in dodatni dve s sladkornim ostankom patogena (15, 17, 24). Za AK-ostanke, ki sestavljajo CRD, tudi velja, da izražajo preferenco za vezavo hidroksilnih skupin monosaharida na poziciji 3 in 4.



**Slika 2.** a) Struktura monomera DC-SIGN z označenimi domenami. b) Prikaz CRD z AK-ostanki in  $\text{Ca}^{2+}$  ionom. Prirejeno po a) (10) in b) (17).

Vratna domena je sestavljena iz sedem in pol ponovitev, vsaka ponovitev vsebuje 23 AK-ostankov, zadnja polovična le 15 AK-ostankov. Sedem hidrofobnih AK-ostankov, iz vsake ponovitve po eden, je izpostavljenih, da lahko pride do tetramerizacije receptorjev DC-SIGN (slika 3). Tetramerizacija ima velik vpliv na vezavno afiniteto receptorja DC-SIGN in je odvisna od pH (15). Tako je vratna domena odličen senzor, ki uravnava ravnotežje

med monomerom in tetramerom ter posledično afiniteto DC-SIGN do patogena. V kislem okolju endosoma pride do razpada tetramera in sprostitve patogena z receptorja, kar omogoča njegovo razgradnjo. Tetrameri tudi stabilizirajo CRD-je in jih usmerijo stran od celičnega površja.



**Slika 3:** Model tetramerizacije zunajceličnih domen DC-SIGN. CRD in vratna domena se organizirata v obliko navite tuljave. CRD je prikazan z vijolično, sladkorne enote v CRD so prikazane z oranžno, z zeleno, rdečo, modro in zeleno so prikazane vratne domene štirih receptorjev DC-SIGN (PDB-koda 1k9i). Prirejeno po (25).

## 1.2. Virus HIV in zdravljenje

Kljub napredku in trudu, ki je bil vložen v razvoj učinkovitih zdravil in cepiv proti virusu HIV, so te okužbe še vedno med vodilnimi vzroki za obolevnost in umrljivost po vsem svetu (26-28). Po poročanju organizacij UNAIDS, WHO in UNICEF se je v zadnjih desetih letih število novih okužb z virusom HIV in smrti, povezanih z njim, sicer zmanjšalo za 30 % (35,0 milijonov okuženih in 1,5 milijona umrlih v letu 2013) (29-31), vendar je epidemija virusa HIV še vedno velika grožnja predvsem v državah v razvoju (32). Zmanjšanje širjenja virusa je odraz boljše dostopnosti obolelih do protivirusne terapije in aktivno ozaveščanje prebivalstva o preventivi (29). Protivirusna terapija je običajno sestavljena iz kombinacije treh zdravilnih učinkovin (ZU), ki jo zdravnik izbere glede na stanje pacienta in priporočene smernice (33). Optimalna začetna retrovirusna terapija pri pacientih, ki se odzivajo na zdravljenje, je sestavljena iz dveh nukleozidnih inhibitorjev reverzne transkriptaze v kombinaciji s tretjo protiretrovirusno učinkovino, ki spada ali v skupino nenukleozidnih inhibitorjev reverzne transkriptaze ali v skupino inhibitorjev HIV-proteaze, okrepljenimi z ritonaviro, ali v skupino inhibitorjev HIV-

integreze. Kombinacija zmanjša verjetnost razvoja rezistence, hkrati pa imajo ZU različna mesta učinkovanja in tako skupaj delujejo sinergistično z namenom zmanjšanja razmnoževanja virusa v telesu (33). Najpogostejša načina prenosa virusa sta s spolnimi odnosi (horizontalni prenos) in z mame na otroka (vertikalni prenos) (19, 30, 34). Splošno velja, da je virus HIV težko prenosljiv; tveganje za okužbo je največje pri nezaščitenem analnem receptivnem odnosu (35). Zanimivo je, da se pri heteroseksualnem spolnem odnosu virus nekajkrat lažje prenese z okuženega moškega na žensko kot obratno (35, 36). Pomembni dejavniki, ki povečajo možnost okužbe, so suhost nožnice, ektopija cervikalne sluznice in bakterijske vaginoze (34). Tudi zmanjšana plast ploščatoceličnih epiteljskih celic zaradi uporabe hormonske kontracepcije, mehanskih poškodb ali okužbe z drugimi spolno prenosljivimi boleznimi lahko povečajo možnost okužbe. Čeprav je najboljša preventiva še vedno uporaba mehanske zaščite (kondoma), pa bi bili izjemno uporabni tudi drugi varni alternativni načini (npr. lokalni mikobiciidi), ki bi zavrlji prenos in epidemijo bolezni (36). Odkar je nedvoumno dokazano, da je receptor DC-SIGN pomemben za okužbo DC z virusom HIV-1 ali njegov prenos in je odgovoren za vdor virusa v organizem, so bili uporabljeni različni pristopi pri razvoju protimikrobnih zdravil, ki inhibirajo interakcije med DC-SIGN in virusom HIV (6).

### **1.2.1. Lokalni mikrobicidi kot alternativa mehanski zaščiti**

Poglavitna ideja uporabe lokalnih mikrobicidov je zaščititi ženske v državah v razvoju pred okužbo s HIV-1, saj so tudi bolj dovzetne za prenos virusa z okuženega moškega. lokalni mikobicidi predstavljajo možno alternativo mehanski zaščiti (npr. kondomu) pri preprečevanju ne samo okužb s HIV-1, ampak tudi z drugimi spolno prenosljivimi boleznimi (24, 34). Farmacevtske oblike za lokalno uporabo na sluznici bi morale biti varne, učinkovite in cenovno dovolj ugodne. Idealno bi bilo, da ta sredstva ne bi imela vonja, barve in bi nudila zaščito dalj časa ter bi tako omogočila uporabo tudi brez vednosti partnerja (34). Pri tem je ključnega pomena tudi, da zdravilo ne bi vplivalo na naravno integriteto sluznice ali jo kakor koli poškodovalo glede na dejstvo, da se v takih primerih možnost za okužbo znatno poveča. Z lokalno aplikacijo na sluznico bi lahko dosegli tudi dovolj visoke koncentracije zdravilne učinkovine za učinkovito antagonistično delovanje na DC-SIGN tudi za ZU, ki imajo vrednosti  $IC_{50}$  v milimolarnem območju (13).

### 1.2.2. Načrtovanje antagonistov DC-SIGN

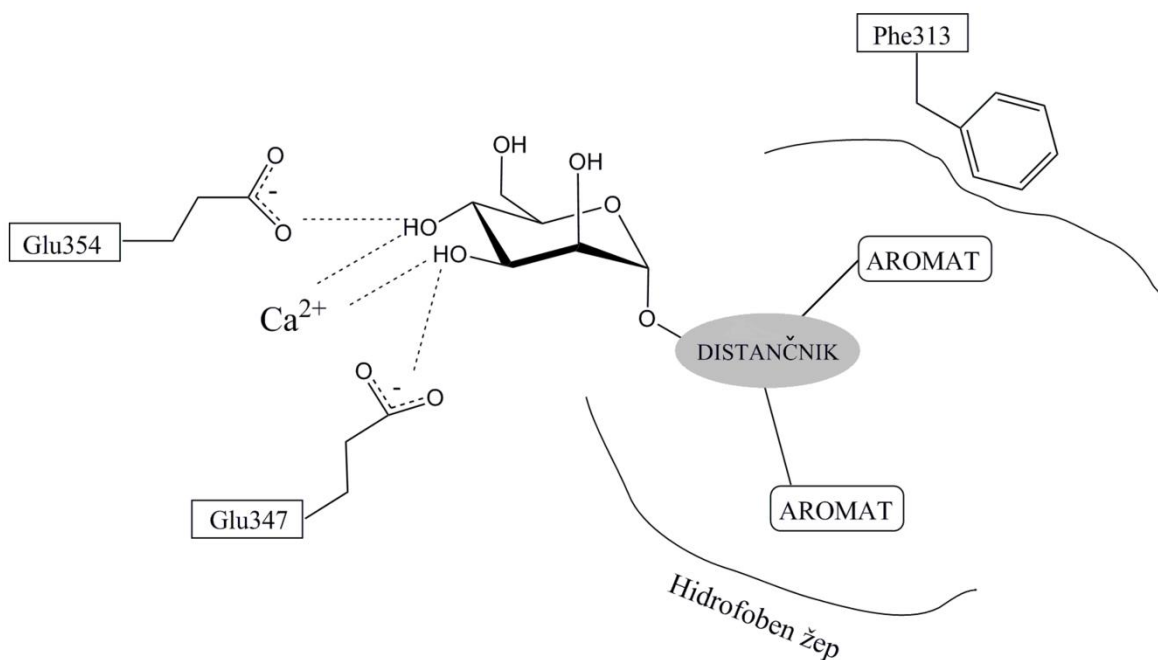
Trenutni antagonisti DC-SIGN se razlikujejo tako v strukturi kot v značilnostih, vendar vsi izkoriščajo dejstvo, da DC-SIGN veže različne manozne in fukozne glikane, izpostavljene na površini mikroorganizmov (15, 18, 24). Pomanjkljivost nativnih sladkornih ligandov so njihove slabe farmakokinetične lastnosti, saj so zelo polarni in metabolično nestabilni, zato so raziskovalci oblikovali farmakološko bolj uporabne glikomimetike (37). Čeprav je afiniteta DC-SIGN do D-manoze ( $K_i=13,1$  mM) in L-fukoze ( $K_i = 6,7$  mM) šibka, lahko s primernim načrtovanjem manoznih in fukoznih glikomimetikov dosežemo visoko afiniteto spojin do DC-SIGN, kar je osnova za terapevtsko uporabo le-teh pri omejevanju prenosa HIV-1 (13, 16, 24, 38). Velja omeniti, da so se antagonisti na osnovi manoze izkazali za bolj učinkovite kot fukozni antagonisti (13, 37). Glavni razlog za to gre iskati v PAMP-vzorcih mikroorganizmov, saj so le-ti večinsko manozilirani (HIV-1: gp120, *M. tuberculosis*: ManLAM in drugi).

Raziskave oblikovanja terapevtsko učinkovitih antagonistov so krenile v tri različne smeri:

- monovalentni glikomimetiki,
- večvalentni monosaharidi/oligosaharidi ali glikomimetiki,
- neglikozidni ligandi.

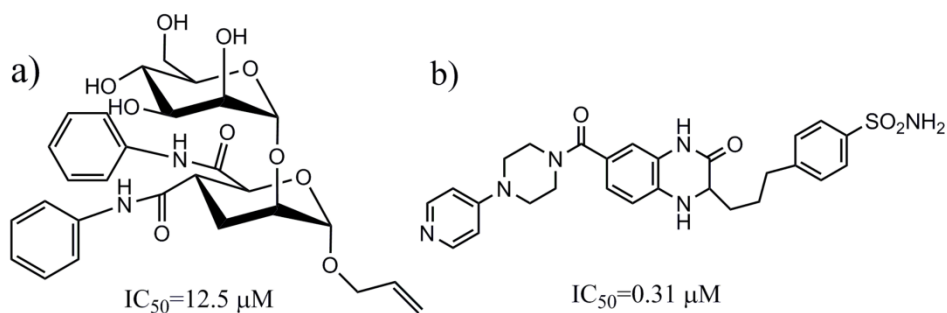
Monovalentni manozni glikomimetiki so sestavljeni iz enega ali več manoznih obročev in imajo v povprečju vrednosti  $IC_{50}$  v zgornjem milimolarnem območju (13). Največja slabost teh ligandov je njihova nizka afiniteta do receptorja in posledično nizka jakost. Pred kratkim so bile objavljene knjižnice spojin antagonistov DC-SIGN, ki imajo na manozni obroč pripete najrazličnejše aromatske skupine povezane z distančnikom (slika 4) (24, 37). Manozna skupina služi kot sidro, ki pripne spojino v CRD-receptorja, kjer tvori dve koordinacijski vezi s kalcijevim ionom in dve vodikovi vezi z glutamatnima aminokislinskima ostankoma. Z aromatskimi skupinami, vključenimi v strukturo, so ciljali različne interakcije v hidrofobnem žepu vezavnega mesta DC-SIGN. Kot najboljši se je izkazal glicerolni distančnik.





**Slika 4:** Interakcije manoznega monomera v vezavnem mestu DC-SIGN. Prirejeno po (24).

Za najučinkovitejše spojine iz te knjižnice so bile določene vrednosti  $IC_{50}$  v spodnjem mikromolarnem območju in predstavljajo najmočnejše monovalentne antagoniste DC-SIGN glede na trenutna poročanja (slika 5a).



**Slika 5:** a) Monovalentni manozni in b) neglikozidni antagonist DC-SIGN. Prirejeno po a) (13) in b) (39).

Možnost oblikovanja še močnejših antagonistov je ponudila narava kar sama, saj se s tetramerizacijo DC-SIGN vezavna afiniteta in avidnost receptorja do ligandov povečata. Oblikovanje spojin, ki se vežejo na tetramerni receptor, predstavlja način, kako oblikovati antagoniste z višjo afiniteto do receptorja (13). Med večvalentne spojine, ki posnemajo

nativne ligande, spadajo tudi dendrimeri\*. To so makromolekule z definirano globularno strukturo in večvalentno predstavitvijo monomernih ligandov. Njihove vrednosti  $IC_{50}$  se gibajo v nanomolarnem območju (13, 40). Če uporabimo monomerne ligande z višjo afiniteto do DC-SIGN, ni potrebnih veliko ponovitev dendrimernih krakov, pripetih na jedro (41). Tako že tetramerni dendron s štirimi enakimi kopijami monomerov z distančniki, pripetimi na kontaktno točko, zelo uspešno prepreči interakcije med DC-SIGN in gp120 (13, 41).

Posebno skupino antagonistov DC-SIGN predstavljajo neglikozidni ligandi, ki so bili identificirani s pomočjo visoko zmogljivega rešetanja knjižnice spojin (13). Za te ligande se vrednosti  $IC_{50}$  gibajo v spodnjem mikromolarnem območju (13, 39, 44, 45) (slika 5b). Zanimiva posebnost teh ligandov je, da ne vsebujejo sladkornih enot ali jih kakor koli posnemajo. Za učinkovit antagonizem receptorja DC-SIGN sladkorna struktura ni nujno potrebna, so pa imele vse te spojine skupino, ki je lahko vezala kalcijev ion (13). Značilnost teh ligandov je tudi, da je mehanizem delovanja drugačen in ne gre samo za enostavni kompetitivni antagonizem kot pri sladkornih antagonistih.

### **1.3. Molekulske interakcije in njihovo preučevanje v (pato)fizioloških procesih**

Kot je bilo prikazano na primeru DC-SIGN, imajo interakcije med biološkimi molekulami pomembno vlogo tako v fizioloških funkcijah (prepoznavna med celicami, replikacija, premikanje, imunski odziv ipd.) kot v procesih, ko so normalne funkcije okvarjene. Prav raziskovanje obeh vodi do novih znanj in posledično tudi identificiranja novih terapevtskih tarč (46). Običajno opazujemo interakcije med makromolekularnimi *receptorji* (proteini, nukleinske kisline [DNA, RNA], lipidi [fosfolipidi, lipopolisaharidi]) in manjšimi molekulami, *ligandi* (majhne organske molekule, peptidi ali nukleotidi s krajšim zaporedjem) (47). V farmacevtski industriji in raziskovalnih ustanovah se za preučevanje interakcij uporabljajo različne metode. Pogosta je X-žarkovna kristalografija, ki podaja pomembne informacije o strukturi liganda v vezavnem mestu *receptorja* (48). Informacije

---

\* Termin dendrimer izhaja iz grške besede dendros, kar v grščini pomeni drevo. Nanaša se na razvejano strukturo sintetiziranih makromolekul s ponavljajočimi se strukturnimi motivi. Sestavljen je iz dendronskega jedra (lociran v središču molekule), iz katerega izhajajo razvejane ročice (posamično nanizane monomerne enote). Dendron je izraz, ki se uporablja za strukturo dendrimera, ki ima namesto jedra kontaktno točko (s kemijsko naslovljivo skupino) (42, 43).

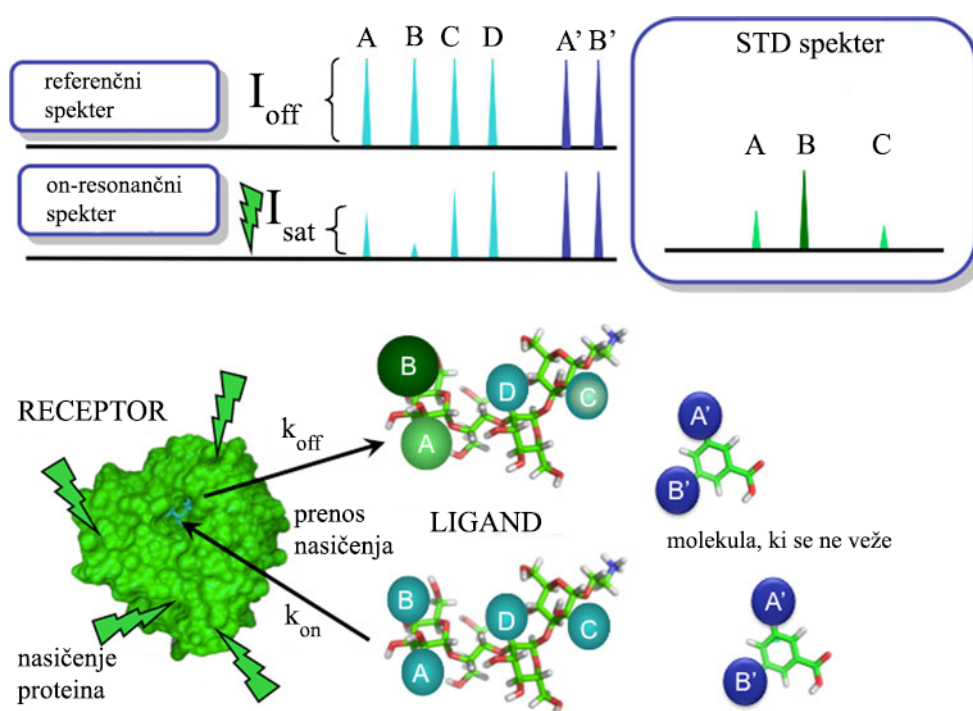
o kinetiki vezave podajajo površinska plazmonska resonanca, izotermna kalorimetrija, mikroskalna termoforeza in bioplastna interferometrija (46, 49-51). Vedno bolj uveljavljena in priljubljena metoda za preučevanje molekularskih interakcij je tudi spektroskopija jedrske magnetne resonance (NMR) (46, 47). Prednost te metode je, da opazujemo vezavo liganda in receptorja v raztopini in ni tveganja za strukturne spremembe receptorja, kot je to mogoče pri imobilizaciji ali kristalizaciji receptorja, ki sta potrebni pri drugih metodah (51-53). Prav tako pri meritvah ne poškodujemo ali izgubimo vzorca. Z NMR spektroskopijo lahko ovrednotimo tudi različne načine vezave liganda v ortosterično vezavno mesto receptorja, ki jih z drugimi tehnikami ne moremo določiti (46, 54). Pri presajanju velikih knjižnic spojin se uporabljata predvsem dva pristopa, ki temeljita na NMR metodah (46, 47). Pri prvem pristopu opazujemo spremembe kemijskih premikov za določena jedra atomov opazovanega receptorja v prisotnosti in odsotnosti liganda (*ang.* receptor-based screening). Sem spadajo klasični dvojno in trojno resonančni NMR eksperimenti, ki se uporabljajo tudi pri NMR študijah makromolekul. Te metode, najbolj znana je »SAR by NMR«, podajo informacije o spremembah v vezavnem mestu receptorja po vezavi liganda. Za še posebno uporabne in uspešne so se izkazale pri iskanju antagonistov interakcij med dvema proteinoma z velikima in ploščatima vezavnima mestoma. Pri drugem pristopu opazujemo spremembe v NMR spektru liganda pred in po vezavi na receptor (*ang.* ligand-based screening). Na tem pristopu temelji kar nekaj metod, kot so opazovanje sprememb kemijskih premikov in oblike signalov, trNOESY, NOE črpalni eksperiment (*ang.* NOE pumping experiment), waterLOGSY, INPHARMA in TINS (46, 47, 55, 56). Med najbolj uporabljenimi pa je STD (*ang.* saturation transfer difference) NMR eksperiment, ki smo ga uporabljali tudi pri našem raziskovalnem delu (46, 47, 53, 55, 56).

Fenomen, ki omogoča opazovanje interakcij pri večini zgoraj omenjenih NMR metod, imenujemo jedrski Overhauserjev efekt (*ang.* Nuclear Overhauser Effect (NOE)). Efekt opazimo med dvema atomoma, ki sta si v prostoru blizu ( $< 5 \text{ \AA}$ ) ne glede na kovalentno strukturo. NOE lahko definiramo kot spremembo intenzitete signala določenega jedra zaradi vzbujanja ali nasičevanja resonančne frekvence drugega jedra (57). Učinkovitost prenosa NOE z enega spina na drugega je močno odvisna od njune razdalje (proporcionalno pada z razdaljo  $[\text{\AA}]$ ,  $r^{-6}$ ) in gibanja molekule (57, 58). Zaradi odvisnosti od

razdalje je NOE glavno orodje pri ovrednotenju strukturnih značilnosti in stereokemije molekul v raztopini.

### 1.3.1. STD NMR: priljubljena metoda za preučevanje molekulskih interakcij

STD NMR pulzno zaporedje je leta 1979 prvič objavila skupina prof. Wüthricha (59), od leta 1999 pa se širše uporablja pri študijah vezave ligandov na receptorje (53, 60). STD NMR eksperiment temelji na prenosu nasičenja z receptorja na vezan ligand (55, 61, 62). To dosežemo tako, da selektivno nasičimo protone receptorja s kaskado mehkih Gaussianovih pulzov (slika 6) (61).



**Slika 6:** Skica 1D STD NMR spektra (zgoraj), ki sta prikazana za primer proteinskega receptorja in dveh molekul, ki sta v koncentracijskem presežku (spodaj). Prirejeno po (63).

Magnetizacija se s spinsko difuzijo hitro prenese po celotnem receptorju. Če se v tem trenutku ligand nahaja v vezavnem mestu, se nasičenje z intermolekularno relaksacijo z receptorja prenese tudi na ligand. Protoni, ki se prostorsko nahajajo bližje površini receptorja (protona A in B na sliki 6), sprejmejo večji delež nasičenja. Medtem ko je ta delež manjši pri protonih, ki so bolj oddaljeni (protona C in D na sliki 6). Na protone ligandov, ki se ne vežejo, se ne prenese nasičenje (protona A' in B' na sliki 6). Ko ligand

oddisocira z vezavnega mesta, odnese to nasičenje s seboj v raztopino. Nasičen prost ligand nato opazujemo pri metodi STD NMR.

STD NMR eksperimenti so 1D protonski NMR eksperimenti liganda, kjer selektivno izbiramo on- in off-frekvence nasičevanja, kot je opisano v nadaljevanju. Rezultat selektivnega on-nasičevanja receptorja je on-resonančni spekter. Pri tem je pomembno, da nastavimo frekvenco nasičevanja receptorja vsaj 700 Hz proč od resonanc liganda, to je običajno v območju med  $\delta$  0 in 1 ppm ali okrog  $\delta$  8 ppm, če ligand ne vsebuje aromatskih skupin (61). Natančna izbira on-frekvence omogoči, da opazimo optimalen prenos nasičenja z receptorja na ligand in posledično najboljše ovrednotimo vezavo (63). Signale v on-resonančnem spektru primerjamo z referenčnim off-resonančnim spektrom. Slednji je posnet pod enakimi pogoji kot on-resonančni spekter, le da frekvenco nasičevanja nastavimo daleč proč od resonanc receptorja in liganda, običajno je to okrog  $\delta$  30 ppm. Razlika med off- in on-resonančnim spektrom je STD spekter, kjer opazimo samo signale, ki pripadajo protonom molekule, ki se vežejo na receptor. S STD NMR eksperimentom dobimo informacije o tem, kateri del liganda vstopa v interakcije z receptorjem in tudi kako močno. Metoda je uporabna tudi pri presejalnih testih večjih knjižnic spojin in pri identifikaciji skupin in lastnosti na ligandu, ki so pomembne za vezavo (53, 55, 61, 62, 64, 65). Posledično prispeva pomembne informacije pri oblikovanju farmakofora in strukture spojine vodnice. Metoda ima kar nekaj prednosti:

- i) STD eksperiment je hiter in enostaven,
- ii) koncentracija potrebnega receptorja je zelo majhna, saj je že prisotnost 1 nmol receptorja (> 10 kDa) v vzorcu dovolj, da opazimo STD efekte (47, 55, 62),
- iii) velikost receptorja ni pomembna, velja celo, da večji kot je receptor, bolj opazni so STD efekti (61),
- iv) ne potrebujemo izotopsko označenih ligandov ali receptorjev,
- v) STD eksperiment je možno izvajati celo za mešanico ligandov (do osem) v istem vzorcu z namenom razlikovanja med aktivnimi in neaktivnimi spojinami.

S STD NMR metodo lahko ovrednotimo tudi afiniteto liganda do receptorja, ki jo izrazimo s konstanto disociacije ( $K_D$ ) (61-63, 66).  $K_D$  je inverzno merilo afinitete liganda do receptorja.  $K_D$  v termodinamskem ravnotežju predstavlja razmerje med hitrostjo razpada ( $k_{off}$ ) in hitrostjo tvorbe ( $k_{on}$ ) kompleksa receptor-ligand. Ker je  $k_{on}$  običajno difuzijsko

nadzorovana, ima hitrostna konstanta  $k_{\text{off}}$  poglaviten vpliv na življenjsko dobo kompleksa in posledično tudi na vrednost  $K_D$ .

Metoda ima tudi nekaj pomanjkljivosti. Glavna je ta, da ni primerna za opazovanje vseh ligandov. Za uspešno izvedbo STD eksperimenta mora biti vrednost  $K_D$  liganda med  $10^{-8}$  in  $10^{-2}$  M (55, 61, 62). Za ligande z visoko afiniteto ( $K_D < 10^{-9}$  M) ne opazimo STD efektov, ker so ligandi podvrženi manjši kemijski izmenjavi in se dlje zadržijo v vezavnem mestu receptorja. Ligand preide v ravnotežno stanje še preden zapusti vezavno mesto. Posledično ne pride do prenosa nasičenja v raztopino in zato ne opazimo STD efektov. Tudi za ligande s šibko vezavo velja podobno. Le-ti vezavno mesto zapustijo še preden bi prišlo do prenosa nasičenja z receptorja na ligand, zato STD efekti niso opazni. Za preučevanje takih ligandov so boljše druge NMR metode. Pri STD NMR eksperimentih se uporablja velik koncentracijski presežek liganda glede na receptor. Posledično so signali ligandov v NMR spektru intenzivnejši, dosežemo tudi boljše razmerje signal : šum in tako lažje opazimo STD efekte. Koncentracije ligandov pa vseeno ne smejo presegati vrednosti, pri kateri bi prišlo do nasičenja receptorja. V tem primeru opazimo STD efekte, ki so manjši od realnih vrednosti (61). Optimalen je do stokratni koncentracijski presežek liganda. Pri teh koncentracijah preprečimo tudi nespecifične interakcije, saj STD NMR ne loči med specifičnimi in nespecifičnimi interakcijami. Kljub vsem prednostim omenjene metode se moramo zavedati, da s STD NMR eksperimenti opazujemo ligand in dobimo le informacije v povezavi z njim. Ničesar ne izvemo o vezavnem mestu receptorja, kar niti ni potrebno, če je le-to že znano.

Dolgo je veljalo, da je STD NMR primeren le za opazovanje interakcij med sladkornimi ligandi in proteinskimi receptorji. V zadnjih nekaj letih pa se je STD NMR metoda uveljavila tudi za druge vrste ligandov in receptorjev, kot so manjši peptidi, lipopolisaharidi, ki tvorijo micelle, virusi in virusom podobni delci, mogoče je celo opazovati interakcije znotraj celic (*ang.* in-cell). Z razvojem novih aplikacij in povezovanjem STD z drugimi NMR eksperimenti (STDD NMR,  $^{13}\text{C}$  STD HSQC,  $^{15}\text{N}$  STD HSQC, 1D STD TOCSY) se širi tudi uporabnost, robustnost in občutljivost metode ter kompleksnost informacij, ki jih posreduje (47, 65, 67-73). Vzporedno z metodo se razvijajo tudi računalniški pristopi, ki omogočajo teoretični izračun STD efektov (74). Primerjava eksperimentalnih in teoretičnih rezultatov da informacijo o različnih načinih vezave liganda v isto vezavno mesto in verjetnosti za posamezen način, potrjuje, ali je

izbrani teoretični strukturni model pravilen, ter omogoča kvantitativno analizo STD podatkov (47, 54, 74-76). STD NMR metoda je torej vsestranska tehnika, ki omogoča preučevanje širokega spektra makromolekul in njihovih interakcij z namenom ovrednotenja aktivnih ligandov in delov molekule, ki so odgovorni za vezavo.

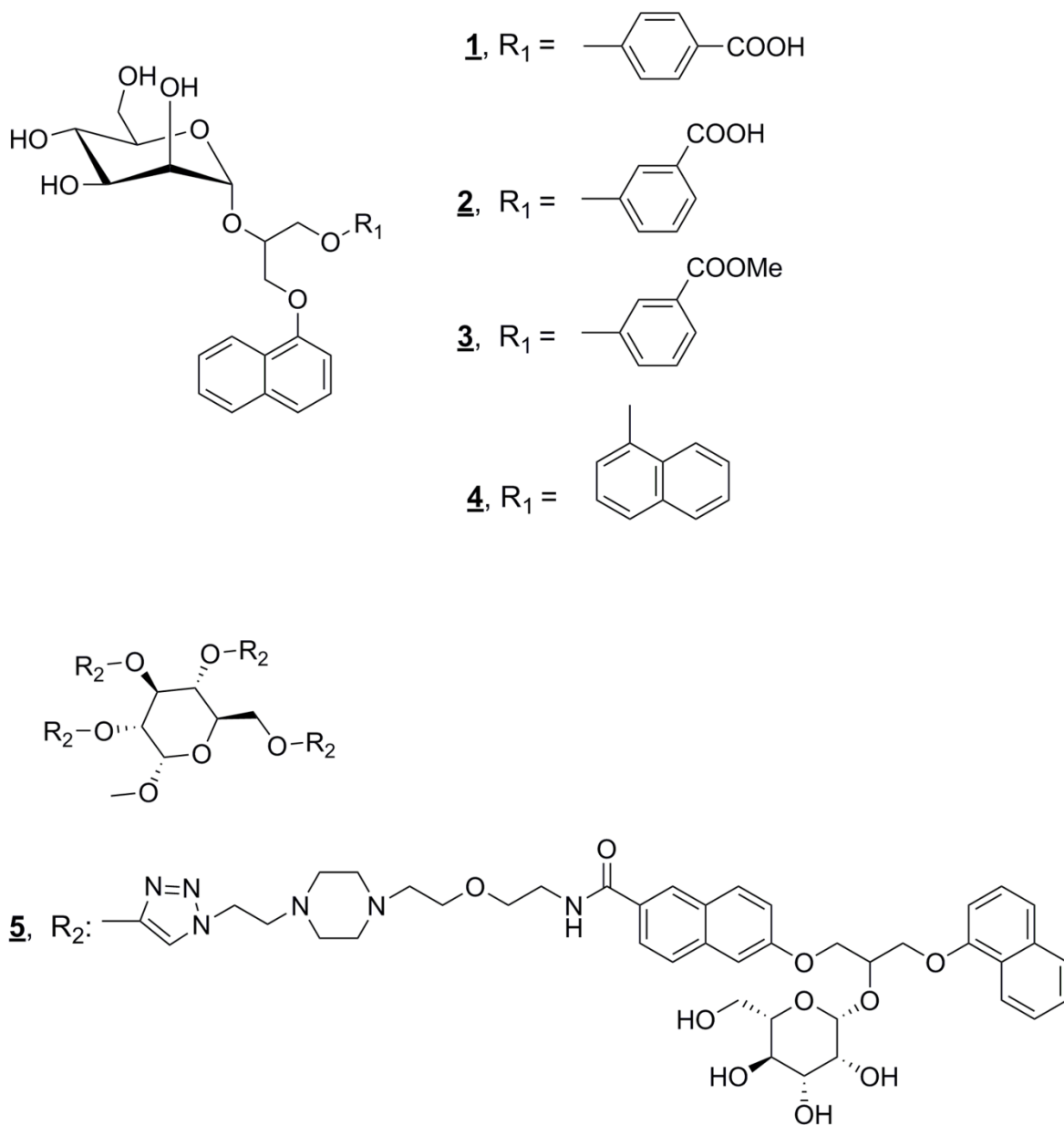
## 2. Načrt za delo ali delovna hipoteza

Ovrednotenje interakcij med majhno molekulo in receptorjem na atomskem nivoju nosi pomembne informacije, ki so bistvenega pomena pri iskanju novih zdravilnih učinkovin, oblikovanju spojine vodnice in pri določitvi pomembnosti posameznega strukturnega fragmenta za vezavo. V okviru magistrske naloge bomo preučevali interakcije med zunajcelično domeno lektinskega receptorja DC-SIGN (v nadaljevanju imenovan kot DC-SIGN) in petimi strukturno različnimi glikomimetiki z uporabo NMR spektroskopije (slika 7).

S kombinacijo 1D in 2D NMR eksperimentov bomo natančno identificirali, kateremu protonu pripada posamezen signal v  $^1\text{H}$  spektru. Celovita in popolna asignacija NMR spektrov bo pri nadaljnjem preučevanju interakcij ključna. Pridobili bomo tudi informacije o konformacijskih posebnostih ligandov v raztopini. Za te vzorce bomo uporabili enake pogoje priprave kot za vzorce pri nadaljnjih eksperimentih v prisotnosti DC-SIGN.

Za študijo interakcij med ligandi in receptorjem bomo uporabili STD NMR metodo. Preučevali bomo različne monovalentne in dendronske manozne antagoniste DC-SIGN, ki so bili načrtovani tako, da se manozni del strukture zasidra v CRD, različne aromatske skupine pa ciljajo hidrofobno področje v vezavnem mestu. Z natančno analizo NMR spektrov bomo poskušali kvantitativno okarakterizirati vezavo med posameznim ligandom in DC-SIGN. S pomočjo dobljenih STD efektov bomo strukturno ovrednotili ligande in določili pomembnost posameznih skupin za vezavo. Ocenili bomo tudi vpliv strukturnih fragmentov na afiniteto vezave, ki jo bomo izrazili v obliki disociacijskih konstant ligandov. Primerjava med ligandi bo prinesla dodatna pojasnila o razlikah v načinu vezave na receptor in vezavnimi konformacijami med ligandi ter dodatne informacije za oblikovanje še boljših antagonistov DC-SIGN.





**Slika 7:** Kemijska struktura preučevanih monomernih ligandov **1–4** in dendronskega liganda **5**.

### 3. Materiali in metode

#### 3.1. Reagenti in topila

Pri raziskavi smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Cambridge Isotope laboratories, Inc. in Sigma-Aldrich. Vsebnost devterija je bila v tris-d<sub>11</sub> 98 % in 99,8 % v <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O in DMSO-d<sub>6</sub>.

#### 3.2. Laboratorijska oprema

- Tehnica Mettler Toledo AX105 DataRange
- Liofilizator PFEIFFER Vacum, Hetosic
- Stresalnik Vortex-T Genie
- Ultrazvočna kadička Elma S30 Helmasonic
- Pipete Biohit Proline Plus (0,5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)
- Pipeta z iglo Automated Analytical Syringe SGE Analytical science (2-50 µL)
- Centrifuga Rotina 35R Hettich Zentrifugen
- UV-VIS-spektrometer Cary 100 Bio UV-VSI Varian
- pH-meter 780 pH-meter Metrohm
- 600 MHz NMR spektrometer Agilent Technologies DD2, opremljen s hladno resonančno probo HCN

#### 3.3. Računalniška oprema

Za risanje spojin smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 11.0 podjetja PerkingElmer. NMR spektre smo procesirali in analizirali z uporabo programov VNMRJ 3.2 podjetja Agilent in MestReNova 10.0 podjetja Mastrelab Research. Za statistično obdelavo podatkov in prilagajanje matematičnih krivulj eksperimentalnim podatkom smo uporabili Origin 8.1 podjetja OriginLab Northampton MA.

### 3.4. Priprava vzorcev

#### 3.4.1. Monovalentni in dendronski D-manozni ligandi

Vsi testirani ligandi **1–5** so bili sintetizirani in očiščeni v laboratoriju izr. prof. dr. Marka Anderluha na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo (24). Do uporabe smo jih hranili v temi pri sobni temperaturi v epicah, zavutih v parafilm. Po potrebi smo vzorce spojin, raztopljene v DMSO-d<sub>6</sub>, liofilizirali in se tako znebili odvečne vode, ki jo je vezala spojina. NMR spektri pred in po liofilizaciji so se razlikovali le v signalu, ki je pripadal vodi. V spektrih po liofilizaciji je bil signal vode veliko manjši.

#### 3.4.2. Priprava proteina DC-SIGN

Ekspresija in čiščenje zunajcelične domene DC-SIGN (aminokislina 44–606) je bila opravljena na Inštitutu za strukturno biologijo v Grenoblu (25, 77, 78). Protein je bil raztopljen v 25 mM tris puftru s 150 mM NaCl in 4 mM CaCl<sub>2</sub>. Vzorcem proteina smo izmenjali pufer s tris-d<sub>11</sub> pufrom z 99,8 % <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (pD=8,0). Pri tem smo uporabili metodo centrifugiranja skozi ultra filter 10 kDa (Filter Amicon Ultra centrifugal filter units, Ultra 4 MWCO 10 kDa Sigma-Aldrich) s tremi spiranji pri 277 K in RFM 5000. Za manjše količine proteina se je kot boljša pri izmenjavi pufera izkazala dializa skozi dializno membrano 7 kDa (Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units 7000 MWCO, Thermo Scientific), ki je potekala 12 ur pri sobni temperaturi pri razmerju volumnov 1:55. Z UV-VIS-spektrometrom smo izmerili absorbanco vzorca proteina in s pomočjo enačbe *I* izračunali koncentracijo proteina v vzorcu. Vzorec z DC-SIGN smo razdelili na manjše alikvote in jih shranili pri 193 K do uporabe.

$$A = \epsilon c l$$

Enačba *I*,

kjer *A* predstavlja izmerjeno absorbanco, *c* je koncentracija proteina, *l* je dolžina poti žarka skozi kiveto (1 cm) in  $\epsilon$  je ekstinkcijski koeficient (za zunajcelično domeno DC-SIGN je 70275 l cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>).

#### 3.4.3. Priprava NMR vzorcev za asignacijo

Najprej smo pripravili raztopino 25 mM tris-d<sub>11</sub> pufera s 150 mM NaCl, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 99,8 % <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O in vrednostjo pD 8,0. V vodnem puftru je bil dovolj stabilen in topen samo ligand **1** s koncentracijo 3.8 mM. Pri ligandih **3** in **4** so se pojavile težave pri raztapljanju,

zato smo se odločili, da vzorce za asignacijo ligandov 2–5 posnamemo v DMSO-d<sub>6</sub>. Uporabljene koncentracije so bile 3,4 mM za 2, 2,2 mM za 3, 2,3 mM za 4 in 5,3 mM za 5.

#### 3.4.4. Priprava vzorcev za STD NMR eksperimente

Vse vzorce za STD NMR eksperimente smo pripravili na enak način, pod enakimi pogoji in z enako sestavo. Pripravili smo si večje količine bolj koncentriranih raztopin. Iz njih smo pripravili 25 mM tris-d<sub>11</sub> pufer s 150 mM NaCl, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 mM NaN<sub>3</sub>, vrednostjo pD 8,0 in 99,8 % <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. Pripravljeno raztopino smo tudi prefiltrirali skozi membrano Filterpur S 0.2, da smo se znebili morebitnih mikroorganizmov, ki bi lahko povzročili razgradnjo proteina. V vseh STD eksperimentih smo uporabili 8 μM koncentracijo zunajcelične domene DC-SIGN. Pripravili smo tudi 5 mM raztopine ligandov, ki smo jih redčili do zelenih koncentracij v vzorcih. Pri strukturnem ovrednotenju ligandov smo uporabili koncentracijo 400 μM. Pri titracijskih študijah smo uporabili koncentracije 80, 240, 400, 560 in 800 μM. Da smo dosegli optimalno raztapljanje ligandov, smo vzorcem dodali 25 % DMSO-d<sub>6</sub>.

### 3.5. Obdelava STD NMR podatkov

STD efekte smo izrazili in analizirali na tri načine: z absolutnimi in relativnimi STD vrednostmi ter s STD-amplifikacijskimi faktorji (STD-AF). Absolutne STD vrednosti (enačba 2) so razmerje med razliko intenzitet signalov v off- in on-spektru ( $I_{\text{off}} - I_{\text{sat}}$ ) in intenziteto signalov v off-spektru ( $I_{\text{off}}$ ). Absolutna STD vrednost je torej razmerje med intenziteto signalov v STD spektru ( $I_{\text{STD}}$ ) in intenziteto signalov v off-spektru ( $I_{\text{off}}$ ).

$$\frac{I_{\text{off}} - I_{\text{sat}}}{I_{\text{off}}} = \frac{I_{\text{STD}}}{I_{\text{off}}} \quad \text{Enačba 2}$$

Absolutne STD vrednosti smo za lažjo primerjavo med ligandi pretvorili v relativne. Protonu, ki je imel pri določenem času nasičevanja najvišji STD efekt, smo pripisali 100 % relativno STD vrednost. Premosorazmerno smo določili vrednost tudi za ostale protone, ki so izkazovali STD efekte.

Vrednosti STD-AF so enake absolutnim STD vrednostim, pomnoženim s presežkom liganda glede na receptor (enačba 3).

$$\text{STD} - \text{AF} = \frac{I_{\text{off}} - I_{\text{sat}}}{I_{\text{off}}} * \frac{[\text{L}]}{[\text{R}]} \quad \text{Enačba 3,}$$

kjer sta  $I_{\text{sat}}$  in  $I_{\text{off}}$  intenziteta signalov v on- in off-spektrih STD eksperimentov,  $[\text{L}]$  predstavlja koncentracijo liganda in  $[\text{R}]$  koncentracijo receptorja. STD efekte v obliki STD-AF smo izrazili pri eksperimentih rastočih krivulj, kjer smo opazovali povečevanje STD efektov pri podaljšanju časa nasičevanja. Krivulje na grafu STD-AF v odvisnosti od časa nasičevanja smo z metodo najmanjših kvadratov prilagodili monoeksponentni matematični krivulji (enačba 4).

$$\text{STD} - \text{AF} = \text{STD}_{\text{mak}} (1 - e^{(-k_{\text{sat}} * t)}) \quad \text{Enačba 4,}$$

kjer STD-AF predstavlja STD-amplifikacijski faktor pri določenem času nasičevanja  $t$ ,  $\text{STD}_{\text{maks}}$  je maksimalna STD intenziteta pri dolgih časih nasičenja in  $k_{\text{sat}}$  je hitrostna konstanta nasičevanja.

Hiperbolično obnašanje krivulj iz grafov STD-AF v odvisnosti od koncentracije liganda smo opisali z enačbo 5.

$$\text{STD} - \text{AF} = \frac{\alpha_{\text{STD}} * [\text{L}]}{K_{\text{D}} + [\text{L}]} \quad \text{Enačba 5,}$$

kjer STD-AF predstavlja STD-amplifikacijski faktor,  $\alpha_{\text{STD}}$  je maksimalni amplifikacijski faktor,  $[\text{L}]$  je koncentracija liganda in  $K_{\text{D}}$  je konstanta disociacije.

Eksperimentalnim podatkom iz grafov  $\text{STD}_0$  v odvisnosti od koncentracije liganda smo prilagodili enačbo 6.

$$\text{STD}_0 = \frac{\alpha_{\text{STD}} * [\text{L}]}{K_{\text{D}} + [\text{L}]} \quad \text{Enačba 6,}$$

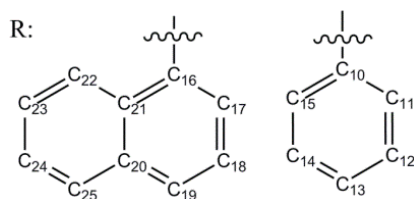
kjer  $\text{STD}_0$  predstavlja začetni naklon STD rastočih krivulj pri času nasičevanja 0 s. Izračuna se ga kot zmnožek konstant  $k_{\text{sat}}$  in  $\text{STD}_{\text{maks}}$ , ki se jih pridobi s pomočjo enačbe 4.  $\alpha_{\text{STD}}$  je maksimalni amplifikacijski faktor,  $[\text{L}]$  je koncentracija liganda in  $K_{\text{D}}$  je konstanta disociacije.

## 4. Eksperimentalno delo

### 4.1. NMR meritve

#### 4.1.1. Spektralna karakterizacija in asignacija NMR spektrov

Strukturne in konformacijske lastnosti ligandov smo ovrednotili z 1D in 2D NMR eksperimenti. Vse  $^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  NMR spektre smo posneli na Agilent Technologies DD2 600 MHz NMR spektrometru pri 298 K. Kot referenco pri meritvah smo uporabljali signale rezidualnih topil;  $^2\text{H}_2\text{O}$  pri  $\delta$  4,8 ppm za **1** in DMSO- $d_6$  pri  $\delta$  2,5 ppm v  $^1\text{H}$  (599,67 MHz) in  $\delta$  39,5 ppm v  $^{13}\text{C}$  (150,80 MHz) spektrih za **2–5**. Asignacijo  $^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  resonanc ligandov smo izvedli z analizo 1D protonskega in ogljikovega spektra ter z 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, TOCSY in NOESY ter 2D  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC in HMBC eksperimenti.

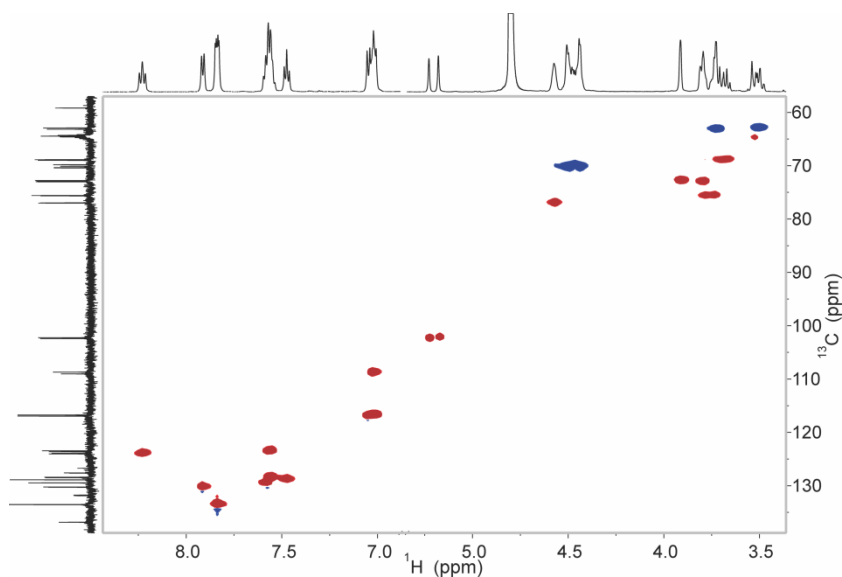


**Shema 1:** Oštevilčenje atomov aromatskih skupin ( $R_1$  skupin na sliki 7), ki smo ga uporabili pri NMR asignaciji.

Ligand **1**: asignacija in  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC NMR spekter spodaj

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  3,47-3,54 (m, 2H, H-6, CH), 3,66-3,81 (m, 4H, H-3, H-4, H-5, H-6'), 3,91 (s, 1H, H-2), 5,18, 5,23 (s, 1H, H-1, H-1\*), 4,44-4,51 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 4,58 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 7,01-7,05 (m, 3H, H-11, H-15, H-17), 7,47 (m, 1H, H-18), 7,54-7,60 (m, 3H, H-19, H-23, H-24), 7,84 (dd, 2H,  $J_1=8,4$  Hz,  $J_2=3,3$  Hz, H-12, H-14), 7,91 (d, 1H,  $J_1=8,4$  Hz, H-25), 8,22 (d, 1H,  $J_1=9,3$  Hz, H-22), 8,24 (d, 1H,  $J_1=9,3$  Hz, H-22\*) ppm.

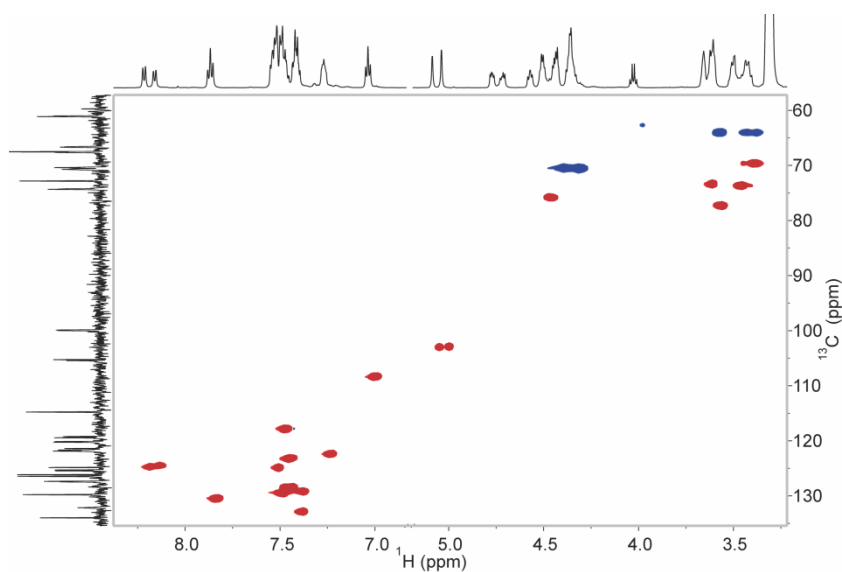
**$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  62,9; 63,2 (C-6), 68,9; 69,0 (C-4), 69,9; 70,40 (2x  $\text{CH}_2$ ), 72,8; 72,83 (C-2), 72,9; 73,0 (C-3), 75,6; 75,7 (C-5), 76,9; 77,0 (CH), 102,3; 102,4 (C-1), 108,7; 109,1 (C-17), 116,8; 116,9 (C-11; C-15), 123,5; 123,7 (C-23), 123,9; 124,0 (C-22), 127,6 (C-21), 128,4; 128,5 (C-19), 128,9 (C-18), 129,5 (C-24), 130,26; 130,3 (C-25), 131,9 (C-13), 133,5; 133,6 (C-12; C-14), 136,9 (C-20), 156,2; 156,5 (C-16), 163,0; 163,2 (C-10), 177,7 (CO) ppm.



Ligand **2**: asignacija in  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC NMR spekter spodaj

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  3,41-3,51 (m, 3H, H-3, H-4, H-6), 3,61-3,66 (m, 3H, H-2, H-5, H-6'), 4,33-4,45 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 4,50-4,51 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 5,04, 5,07 (s, 1H, H-1, H-1\*), 7,03 (d, 1H,  $J_1=7,2$  Hz, H-17), 7,04 (d, 1H,  $J_1=7,2$  Hz, H-17\*), 7,26-7,28 (m, 1H, H-15), 7,40-7,44 (m, 2H, H-14, H-18), 7,46-7,55 (m, 5H, H-11, H-13, H-19, H-23, H-24), 7,86 (d, 1H,  $J_1=8,1$  Hz, H-25), 7,87 (d, 1H,  $J_1=8,1$  Hz, H-25\*), 8,16 (d, 1H,  $J_1=8,2$  Hz, H-22), 8,22 (d, 1H,  $J_1=8,2$  Hz, H-22\*) ppm.

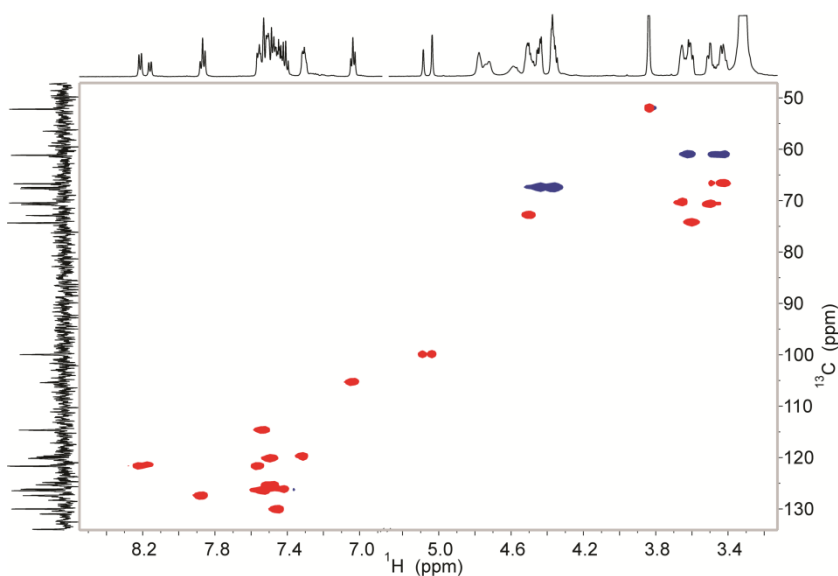
**$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  61,0; 61,2 (C-6), 66,7 (C-4), 67,5; 67,7 (2x  $\text{CH}_2$ ), 70,4 (C-2), 70,7 (C-3), 72,8; 72,9 (CH), 74,3; 74,4 (C-5), 99,9; 100,0 (C-1), 105,4; 105,7 (C-17), 114,8; 114,82 (C-13), 119,2; 119,5 (C-15), 120,2; 120,3 (C-19), 121,4; 121,7 (C-22), 121,8; 121,9 (C-11), 124,9 (C-21), 125,3; 125,5 (C-23), 126,2 (C-18), 126,4; 126,5 (C-24), 127,4; 127,5 (C-25), 129,7; 129,8 (C-14), 132,8 (C-12), 133,9; 134,0 (C-20), 153,7; 153,8 (C-16), 158,3; 158,5 (C-10), 167,0 (CO) ppm.



Ligand **3**: asignacija in  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC NMR spekter spodaj

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,43-3,51 (m, 3H, H-3, H-4, H-6), 3,59-3,66 (m, 3H, H-2, H-5, H-6'), 3,84 (s, 1H, Me), 4,34-4,45 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 4,48-4,51 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 5,04, 5,09 (s, 1H, H-1, H-1\*), 7,03 (d, 1H,  $J_1=7,2$  Hz, H-17), 7,05 (d, 1H,  $J_1=7,2$  Hz, H-17\*), 7,30-7,32 (m, 1H, H-15), 7,40-7,57 (m, 7H, H-11, H-13, H-14, H-18, H-19, H-23, H-24), 7,86 (d, 1H,  $J_1=7,9$  Hz, H-25), 7,88 (d, 1H,  $J_1=7,9$  Hz, H-25\*), 8,16 (d, 1H,  $J_1=8,2$  Hz, H-22), 8,21 (d, 1H,  $J_1=8,2$  Hz, H-22\*) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  52,2 (Me), 61,2 (C-6), 66,8 (C-4), 67,5; 67,7 (2x  $\text{CH}_2$ ), 70,4; 70,5 (C-2), 70,75; 70,8 (C-3), 73,0 (CH), 74,3; 74,4 (C-5), 99,9; 100,0 (C-1), 105,3; 105,5 (C-17), 114,6; 114,7 (C-11), 119,7; 119,9 (C-15), 120,2; 120,3 (C-19), 121,4 (C-22), 121,7 (C-13), 124,9 (C-21), 125,3; 125,5 (C-23), 126,2 (C-18), 126,4; 126,5 (C-24), 127,4 (C-25), 130,0 (C-14), 131,0 (C-12), 134,0 (C-20), 153,7 (C-16), 158,5 (C-10), 166,0 (CO) ppm.

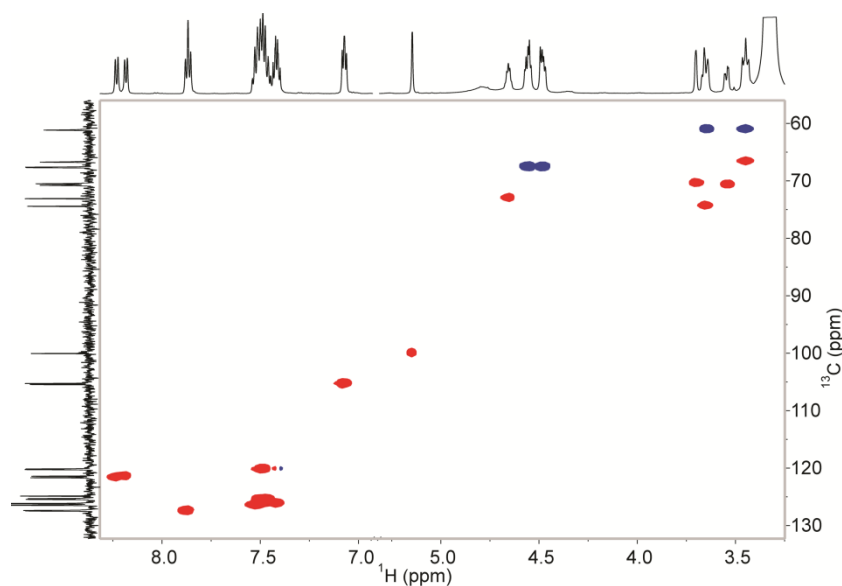


Ligand **4**: asignacija in  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC NMR spekter spodaj

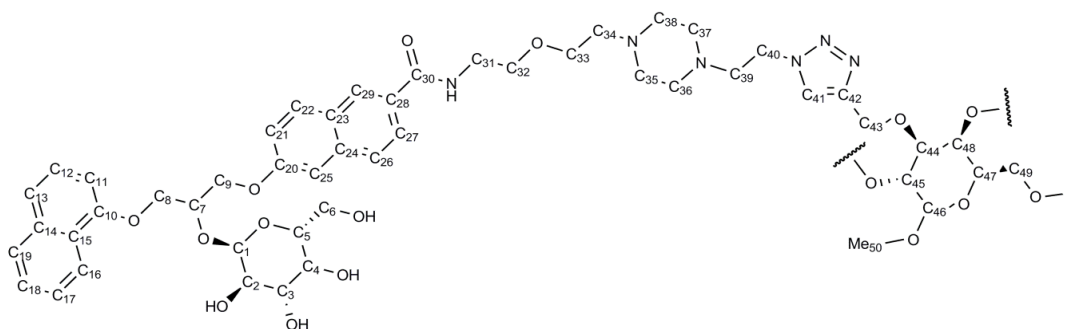
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  3,43-3,46 (m, 2H, H-4, H-6), 3,53-3,55 (m, 2H, H-5, H-6'), 3,63-3,67 (dd, 1H,  $J_1=9$  Hz,  $J_2=3$  Hz, H-3), 3,70 (m, 1H, H-2), 4,47-4,57 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 4,65 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ), 5,14 (s, 1H, H-1), 7,07 (m, 2H, H-17, H-17'), 7,40-7,54 (m, 8H, H-18, H-18', H-19, H-19', H-23, H-23', H-24, H-24'), 7,86 (d, 1H,  $J_1=7,8$  Hz, H-25), 7,87 (d, 1H,  $J_1=8,4$  Hz, H-25'), 8,18 (d, 1H,  $J_1=8,2$  Hz, H-22), 8,23 (d, 1H,  $J_1=8,2$  Hz, H-22') ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  61,2 (C-6), 66,8 (C-4), 67,6; 67,7 (2x  $\text{CH}_2$ ), 70,5 (C-2), 70,8 (C-3), 73,1 (CH), 74,5 (C-5), 100,1 (C-1), 105,3; 105,5 (C-17), 120,2; 120,3 (C-19), 121,4; 121,7 (C-22), 124,8; 124,9 (C-21), 125,5 (C-23), 126,2 (C-18), 126,4; 126,5 (C-24), 127,4; 127,5 (C-25), 134,0 (C-20), 153,8; 153,9 (C-16) ppm.





Ligand **5**: asignacija in  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC NMR spekter spodaj

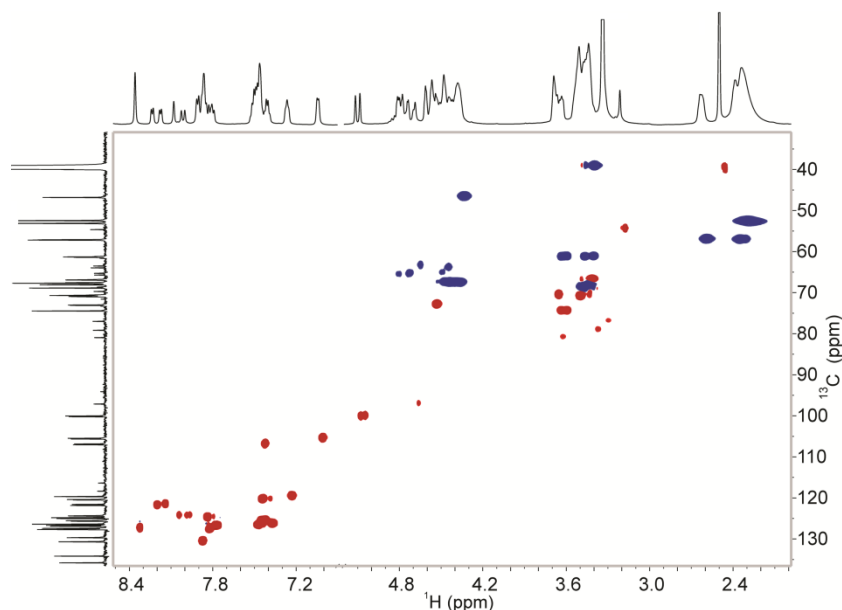


**Shema 2:** Prikaz enega kraka spojine **5** in oštevilčenje atomov, uporabljeno pri NMR asignaciji.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  2,30-2,37 (m, 5H, H-34, H-35; H-36, H-37, H-38), 2,60 (m, 1H, H-39), 3,20 (s, 1H,  $\text{Me}_{50}$ ), 3,38-3,65 (m, 3H, H-45, H-47, H-48), 3,43-3,49 (m, 3H, H-31, H-32, H-33), 3,44-3,68 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), 4,41-4,56 (m, 3H, H-7, H-8, H-9), 4,34-4,82 (m, 4H, H-40, H-43, H-44, H-49), 5,07, 5,10 (s, 1H, H-1), 7,02 (d, 1H,  $J=7,4$  Hz, H-11), 7,25 (t, 1H,  $J=7,2$  Hz, H-21), (7,39-7,50 (m, 5H, H-12, H-13, H-17, H-18, H-25), 7,80-7,86 (m, 3H, H-19, H-26, H-27), 7,90 (d, 1H,  $J=8,2$  Hz, H-22), 7,96, 7,99, 8,04, 8,05 (s, 4x 1H, H-41), 8,16 (d, 1H,  $J_1=8,1$  Hz, H-16), 8,21 (d, 1H,  $J_1=8,2$  Hz, H-22\*), 8,33 (s, 1H, H-29) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  39,0 (C-31), 46,7 (C-40), 52,4 (C-36; C-37), 53,0; 53,1 (C-35; C-38), 54,5 (C-50), 57,0 (C-39), 57,1; 57,1 (C-34), 61,2; 61,3 (C-6), 63,4; 63,9; 65,2 (C-43), 65,6 (C-49), 66,8 (C-4), 67,5 (C-9), 67,6 (C-8), 68,0 (C-33), 68,8 (C-32), 70,5; 70,6 (C-2), 70,9 (C-5), 73,0 (C-7), 74,3 (C-3), 7,4 (C-48), 79,1 (C-45), 80,9 (C-47), 94,0 (C-46), 97,1 (C-44), 100,0; 100,1 (C-1), 105,4; 105,6 (C-11), 106,7; 107,0 (C-25), 199,6 (C-21); 120,3; 120,4 (C-13); 121,5; 121,8 (C-16); 124,3; 124,4 (C-41); 124,7; 124,8 (C-27),

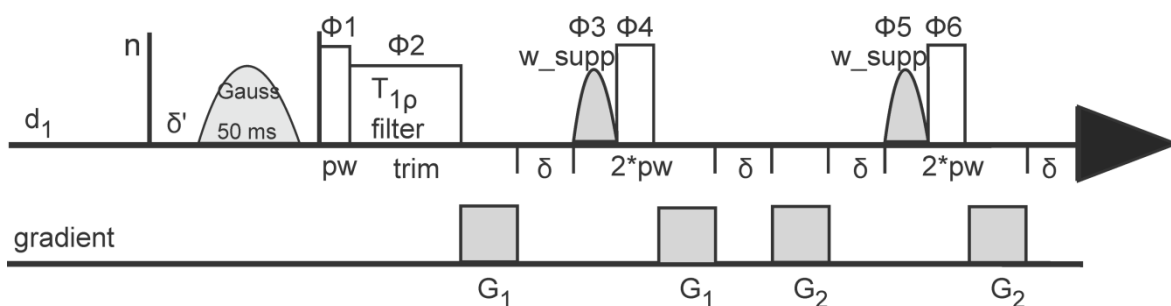
125,0 (C-15), 125,5; 125,6 (C-17), 126,3 (C-12), 126,6 (C-18), 126,8 (C-26), 127,3 (C-29), 127,5 (C-19), 127,6; 127,7 (C-23), 129,6 (C-28), 130,6 (C-22), 134,1 (C-14), 135,7; 135,8 (C-24), 143,6; 143,8; 143,9; 144,2 (C-42), 153,8; 153,9 (C-10), 157,6; 157,7 (C-20), 166,6 (C-30) ppm.



Oznake: \* konformacijski izomer, ' simetrični atom

#### 4.1.2. STD NMR

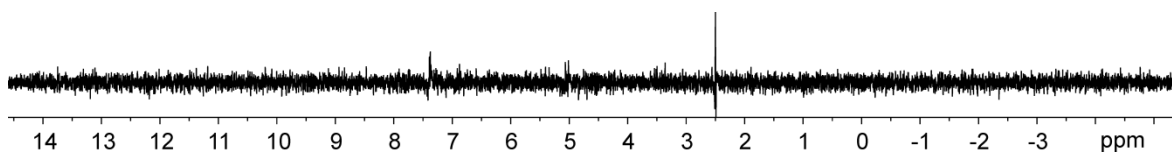
Pri STD NMR meritvah smo uporabili psevdo-2D STD NMR pulzno zaporedje (slika 8).



**Slika 8:** Pulzno zaporedje uporabljenega STD NMR eksperimenta. Prirejeno po (79).

Vse NMR spektre smo posneli na 600 MHz spektrometru v NMR cevkah podjetja Shigemi Co. pri 298 K. Za eliminacijo signala vode smo uporabili pulzno sekvenco DPFGESE (*ang.* double pulsed field gradient spin-echo). Spektre smo posneli s 16384 podatkovnimi točkami, 512 ponovitvami in s 3- do 6-sekundnim zamikom med posameznimi meritvami. Za čase nasičevanja 0,1–2,0 s smo uporabili zamik 3 s, pri daljših časih je bil zamik med meritvami za 1 s daljši kot sam čas nasičevanja. Za selektivno nasičenje receptorja so bili

uporabljeni Gaussianovi pulzi z dolžino 50 ms in močjo 10 dB z 0,1 ms zamiki. Za eliminacijo signalov proteina v NMR spektru smo uporabili 30 ms spin-lock filter ( $T_{1\rho}$ ) s  $\cong 40$  dB močjo. Pri eksperimentih strukturnega ovrednotenja in pri titracijskih študijah smo uporabili čas nasičevanja 2 s. Za pridobitev STD build-up krivulj smo uporabili čase nasičevanja: 0,1; 0,3; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 in 5,0 s. On-resonančna frekvenca je bila pri 0,9 ppm in off-resonančna pri 30 ppm. Ustreznost teh frekvenc smo preizkusili s slepim STD eksperimentom, kjer smo pridobili STD spektre brez prisotnega receptorja (slika 9).



**Slika 9:** Kontrolni STD NMR spekter liganda **2** v odsotnosti proteina DC-SIGN. Pogoji priprave vzorca in snemanja so bili identični kot pri vzorcih s proteinom.

V kontrolnem STD NMR spektru ni bilo opaznih nobenih značilnih signalov, kar dokazuje ustreznost izbranih frekvenc nasičevanja. Pri tem velja opozoriti, da je STD NMR spekter razlika med on- in off-resonančnima spektroma. Odštevanje dveh NMR signalov z veliko intenziteto je lahko netočno, zato lahko opazimo anomalije v STD NMR spektru, kar je še posebno opazno pri signalu, ki pripada topilu DMSO ( $\delta$  2,5 ppm). Artefakte, ki so nastali pri odštevanju, smo ovrednotili tudi s kontrolnim eksperimentom, kjer smo tako on- kot off-frekvenci nasičevanja nastavili na enako vrednost; 0,9 ppm.

#### 4.1.3. DOSY NMR

Pri difuzijskih eksperimentih smo uporabili DgcsteSL\_dpgse pulzno zaporedje (80). Vse NMR spektre smo posneli na 600 MHz spektrometru pri 298 K. Pri eksperimentih smo uporabili 15 gradientnih pulzov za vsako koncentracijo liganda **4** (20, 40, 80, 400, 800 in 1200  $\mu\text{M}$ ). Jakost prvega gradientnega pulza je bila 1300  $\text{G cm}^{-1}$  in jakost zadnjega je bila 32500  $\text{G cm}^{-1}$ . Spektre smo posneli s 16000 podatkovnimi točkami, 32 ponovitvami in 3-sekundnim zamikom med posameznimi meritvami.

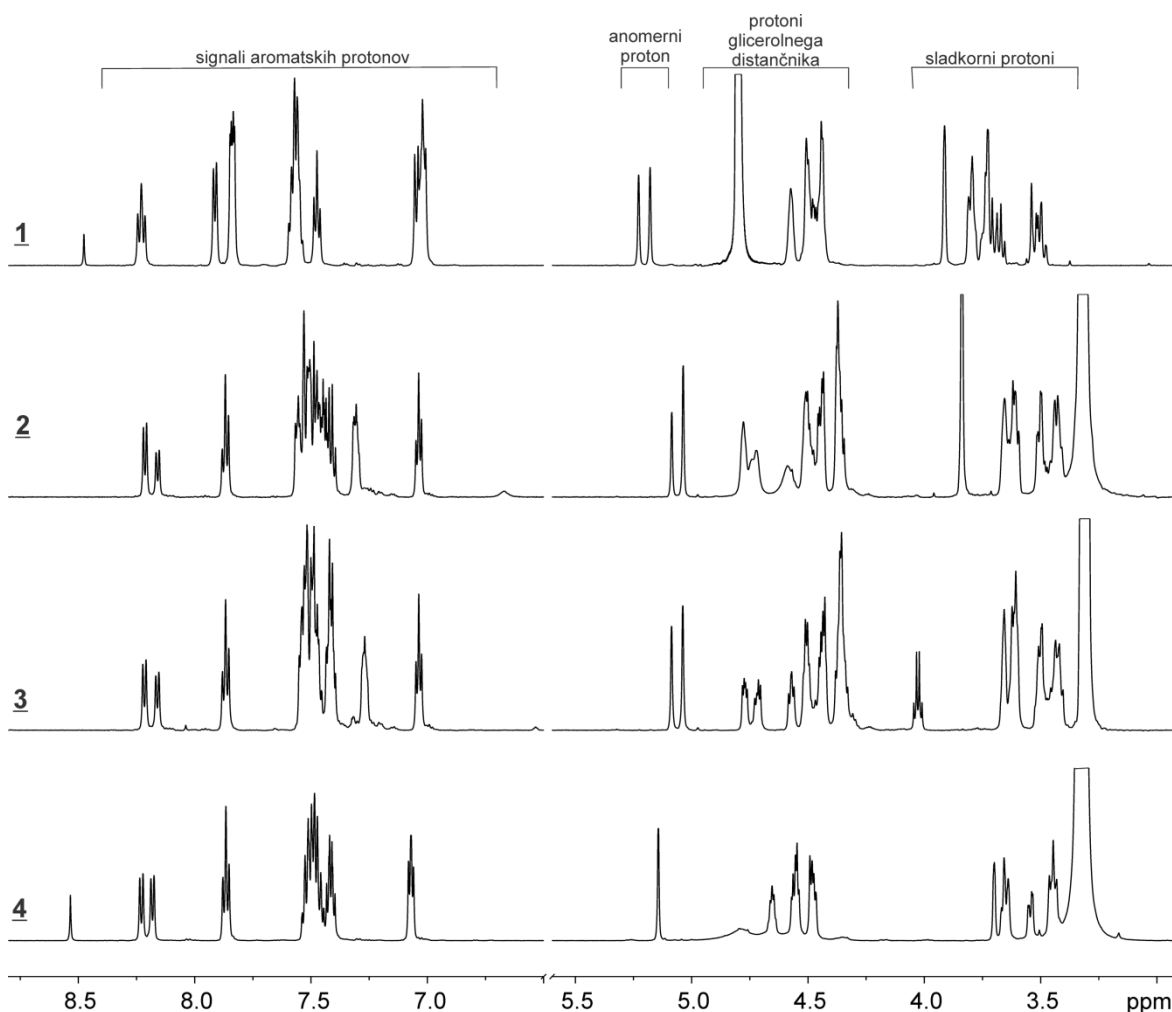
## 5. Rezultati

### 5.1. NMR asignacija in konformacijske lastnosti ligandov

#### 5.1.1. Monovalentni antagonisti 1–4

Za potrditev strukturnih in konformacijskih lastnosti sintetiziranih ligandov 1–4 smo najprej posneli sete 1D in 2D NMR spektrov. Za nadaljnje STD NMR študije smo namreč potrebovali natančno asignacijo signalov v NMR spektrih.  $^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  resonance ligandov 1–4 smo asignirali na podlagi karakterističnih kemijskih premikov in multiplicitete signalov v 1D protonskih in ogljikovih spektrih,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  korelacij v 2D COSY, TOCSY in NOESY spektrih ter  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  korelacij v 2D HSQC in HMBC spektrih (podrobne informacije o kemijskih premikih in o spektrih so podane v eksperimentalnem delu). NMR spektri so ustrezali predvidenim strukturam ligandov, ki imajo  $\alpha$ -D-manozo in dve aromatski skupini povezani z glicerolnim distančnikom (slika 7). Pri vseh štirih spojinah signali v 1D  $^1\text{H}$  NMR spektru v območju med  $\delta$  3,3 in 3,9 ppm pripadajo protonom sladkorne enote, z izjemo anomernega protona, ki resonira pri približno  $\delta$  5,1 ppm. Med  $\delta$  4,2 in 4,8 ppm se nahajajo signali protonov glicerolnega distančnika. Na 1D  $^1\text{H}$  NMR spektrih ligandov 2–4, ki so bili posneti v DMSO- $d_6$ , smo opazili tudi signale, ki pripadajo hidroksilnim vodikovim atomom s sladkornega obroča ( $\delta$  4,5–4,9 ppm). Glavne razlike med spektri lahko opazimo v območju med  $\delta$  6,8 in 8,4 ppm, ki je značilno za aromatske protone. Konfiguracija manozne enote ( $\alpha$ -D-manosa) je določena, kar opazimo tudi iz NMR spektrov. Pri ligandih 1–3 se pojavi dodaten asimetrični center zaradi različnih substituentov na glicerolnem distančniku. Sinteza tega dela ni potekala stereoselektivno, zato sta na tem kiralnem centru mogoči tako R- kot S-konfiguraciji. Posledično zaradi prisotnosti dveh diastereoizomerov v NMR spektrih opazimo podvajanje signalov tako v protonskem kot v ogljikovem spektru. Nasprotno pa ima ligand 4 simetrično strukturo skupin na glicerolnem distančniku, zato opazimo samo en set signalov za atome sladkorne enote. Podvojeni signali atomov dveh naftalenskih obročev liganda 4 nakazujejo, da rotacija obročev v prostoru ni povsem prosta. Opazimo lahko tudi različne solvacijske lastnosti uporabljenih topil (DMSO- $d_6$  in  $^2\text{H}_2\text{O}$ ), kar se odraža v elektronskih efektih aromatskih obročev in posledično v obliki signalov v NMR spektrih. Na sliki 10 lahko opazimo tudi signale vode, ki so na spektru liganda 1 pri  $\delta$  4,8 ppm in pri  $\delta$  3,3 ppm za ligande 2–4. Konformacije prostih ligandov smo ovrednotili z 2D NOESY NMR spektri.

Ti spektri kažejo prosto rotacijo okoli enojnih vezi znotraj spojine. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da ligandi **1–4** ne zavzemajo prioritete 3D-strukture v raztopini.

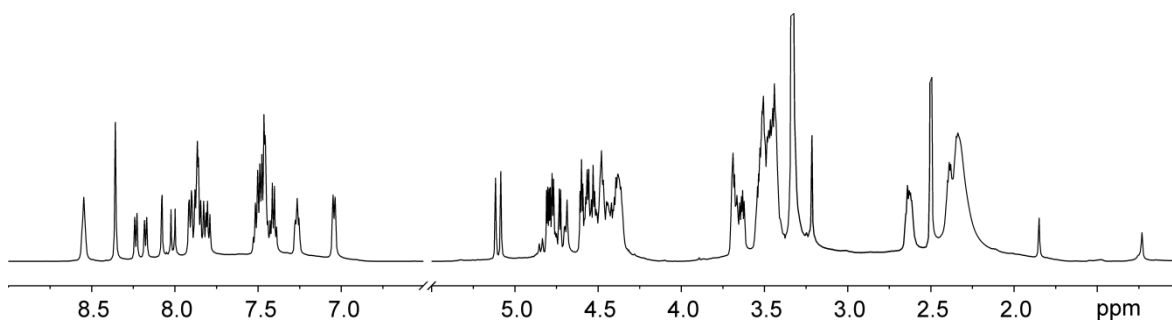


**Slika 10:** 1D <sup>1</sup>H NMR spektri ligandov **1–4**. Na levi strani je oznaka liganda, ki mu pripada spekter. Spektri so bili posneti na 600 MHz spektrometru v <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O za **1** in v DMSO-d<sub>6</sub> za **2–4** pri 298 K.

### 5.1.2. Dendronski antagonist **5**

Z 1D in 2D NMR eksperimenti smo ovrednotili tudi strukturo in konformacijske lastnosti liganda **5**. NMR asignacija je bila izziv zaradi velikosti molekule in simetrije ter števila identičnih skupin. NMR spektri kažejo strukturo dendrona, sestavljenega iz štirih identičnih krakov, pripetih na centralni sladkorni obroč (podrobne informacije o kemijskih premikih in o spektrih so podane v eksperimentalnem delu). Assignacija je tako še dodatno potrdila tudi rezultate z masne spektrometrije. Zaradi velikega števila protonov lahko

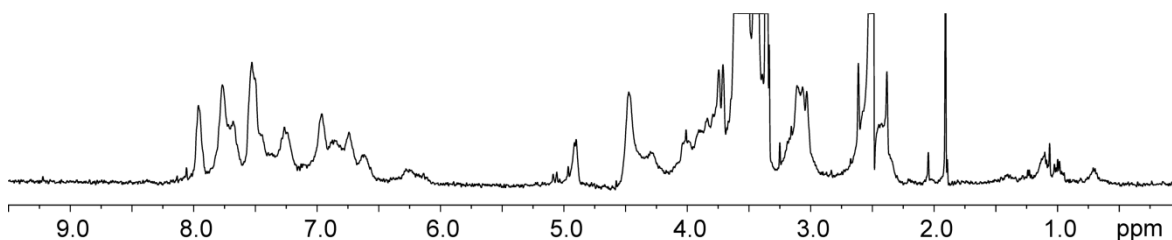
opazimo prekrivanje signalov tako v območju, kjer resonirajo alifatski protoni distančnikov in sladkornih obročev (signali med  $\delta$  2,0 in 5,2 ppm) kot tudi v območju med  $\delta$  6,8 in 8,5 ppm, kjer lahko opazimo signale aromatskih protonov. Po drugi strani pa so bili signali nekaterih protonov naftalenskih obročev dobro ločeni od ostalih (signali pri kemijskih premikih  $\delta$  7,02; 7,25; 8,16; 8,21 in 8,33 ppm). Kljub precejšnjemu prekrivanju so signali v protonskem spektru posnetem v DMSO- $d_6$  ostri (slika 11).



**Slika 11:**  $^1\text{H}$  NMR spekter liganda **5**, posnet na 600 MHz spektrometru v DMSO- $d_6$  pri 298 K.

Zaradi simetrije liganda ne moremo ločiti med protoni s posameznega kraka, ampak vidimo le povprečje signalov protonov z vseh štirih krakov. Izjema so signali protona triazolnega obroča, ki se nahajajo v območju med  $\delta$  7,98 in 8,05 ppm in se toliko ločijo med seboj, da lahko razlikujemo med posameznimi kraki dendronskega liganda. Ti štirje signali so dodatno potrdili, da je ligand **5** sestavljen iz štirih krakov. Poleg tega se tudi integrali v protonskem spektru ujemajo s predvidenim številom protonov pri ligandu **5**. Konformacijo liganda **5** v raztopini smo določili z 2D NOESY NMR spektrom. Opazili nismo nobenih posebnih NOE kontaktov, ki bi nakazovali na določeno 3D-strukturo prostega liganda, kar kaže na prosto rotacijo okoli enojnih vezi znotraj liganda. Zaznali smo tudi, da je ligand **5** zelo higroskopen. Velika vsebnosti vode (s kemijskim premikom  $\delta$  3,33 ppm v NMR spektru), ki jo je vezal ligand, je motila analizo vzorca. Poleg težav pri izvedbi same NMR meritve je njen signal prekril tudi ostale manjše signale liganda **5** in tako onemogočil asignacijo v območju med  $\delta$  3,2 in 3,7 ppm. Vode v vzorcu smo se znebili tako, da smo vzorec raztopili v DMSO- $d_6$  in vzorec liofilizirali čez noč. Že po enkratnem liofiliziranju je bil delež vode dovolj majhen, da smo lahko opazili tudi signale med  $\delta$  2,9 in 3,8 ppm (slika 11). Zanimive so bile tudi spremembe v NMR spektrih, ki smo jih opazili ob spremembi topila DMSO- $d_6$  v tris- $d_{11}$  vodni pufer, ki smo ga uporabljali za STD

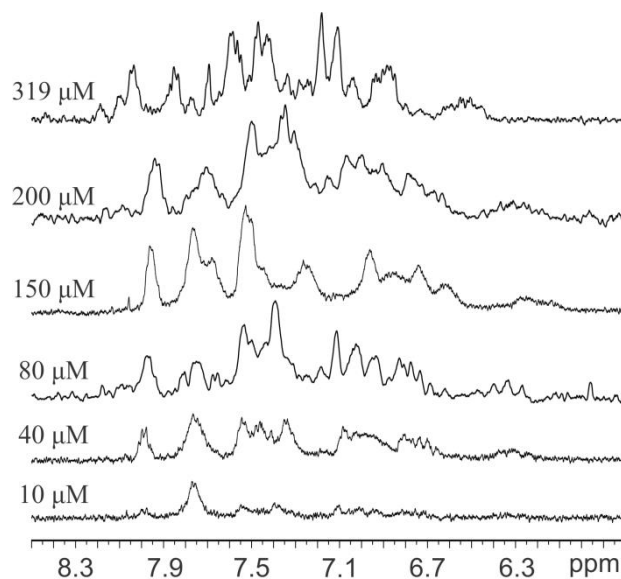
eksperimente. Linije v NMR spektru liganda **5** so se razširile, spremenili so se tudi kemijski premiki signalov (slika 12).



**Slika 12:**  $^1\text{H}$  NMR spekter **5**, posnet v tris- $\text{d}_{11}$  vodnem pufru in 25 % DMSO- $\text{d}_6$  pri 150  $\mu\text{M}$  koncentraciji liganda.

Spremembe so bile posledica nastanka agregatov v vodnem mediju, saj je za vodo značilno, da slabše kot DMSO raztaplja molekule, sorodne ligandu **5**. Poleg tega lipofilen značaj molekule z osmimi naftalenskimi obroči predstavlja dobre pogoje za hidrofobni efekt in  $\pi$ - $\pi$  interakcije med aromatskimi obroči. Z namenom preprečevanja tovrstnega nalaganja aromatskih obročev znotraj ene molekule so bili v strukturo dendrona vključeni piperazinski obroči. Njihova protonacija naj bi povzročila odboj med kraki in posledično preprečila interakcije med aromatskimi obroči. S tem namenom smo v vzorec dodali tudi štiri ekvivalente kisline  $\text{CF}_3\text{COOD}$ , ki je povzročila le delno izboljšanje spektra. Sprememba NMR spektrov liganda **5** po menjavi topila je naznanila težave pri STD eksperimentih. Razširitev linij v spektrih bi si želeli šele po dodatku DC-SIGN, saj bi taki rezultati pomenili močno vezavo med ligandom in receptorjem. Za boljše razumevanje dogajanja v vodnem vzorcu smo posneli več spektrov pri različnih pogojih. Ugotovili smo, da je agregate, ki se tvorijo pri danih pogojih, zelo težko razbiti tako z razredčevanjem kot povečevanjem deleža sotopila DMSO ali z višanjem temperature. Najostrejše signale smo opazili na spektrih sveže pripravljenih vzorcev. Na sliki 13 je prikazanih šest NMR spektrov pri različnih koncentracijah liganda **5**. Na spektrih smo opazili dvig bazne linije na delu spektra, kjer resonirajo aromatski protoni, ki je še posebno očiten pri višjih koncentracijah liganda **5**. Pri koncentracijah liganda nad 400  $\mu\text{M}$  smo opazili motnost vzorca pri pripravi in raztapljanju liganda **5**. Dvig bazne linije, širjenje signalov in opažena bela oborina v vzorcu jasno nakazujejo na prisotnost agregatov v vzorcu. Z zniževanjem koncentracije liganda se sicer bazna linija zravnava, vendar so signali slabše opazni zaradi poslabšanja občutljivosti meritve. Zanimiv je tudi premik signalov proti nižjim kemijskim premikom, če postopoma zmanjšujemo delež DMSO- $\text{d}_6$  od 100 % do 25 %. Na sliki 13 je

pokazana tudi razlika v kemijskih premikih pri vzorcih s 40 % in 25 % vsebnostjo DMSO-d<sub>6</sub>. Spremembe v spektrih smo zaznali tudi pri povišanju temperature. Pri 310 K smo opazili dodatne cepitve signalov, ki jih pri 298 K nismo mogli razločiti.



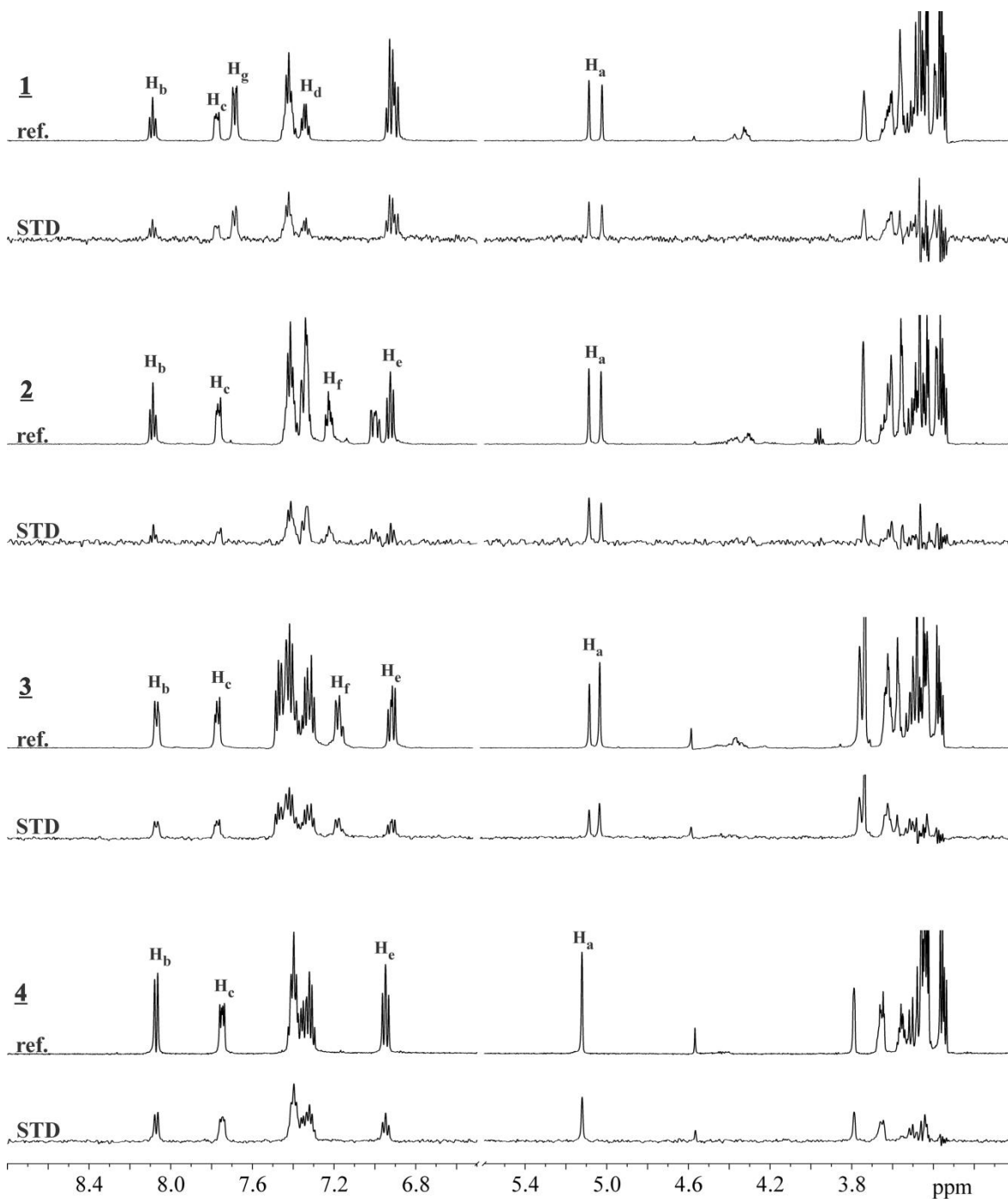
**Slika 13:** Spreminjanje signalov aromatskih protonov pri različnih koncentracijah liganda **5**. Koncentracije so označene na levi strani spektrov. Vzorec z najvišjo koncentracijo vsebuje 40 %, vsi ostali pa 25 % DMSO-d<sub>6</sub>.

## 5.2. STD NMR eksperimenti monovalentnih antagonistov 1-4

S STD NMR eksperimenti smo dobili vpogled v naravo vezave ligandov **1–4** na DC-SIGN. Tako v referenčnih kot v STD NMR spektrih vseh štirih ligandov smo opazili ostre in dobro ločene signale (slika 14). Čeprav je v STD spektrih razmerje med signalom in šumom veliko manjše v primerjavi z referenčnimi spektri, so signali še vedno dobro opazni. STD efekti, ki smo jih določili za ligande **1–4**, nedvoumno dokazujejo vezavo ligandov na DC-SIGN. Hkrati opaženi STD signali nakazujejo tudi hitro izmenjavo ligandov med vezanim in prostim stanjem. Če bi bila izmenjava med vezanim in prostim ligandom še hitrejša ali če bi bila izmenjava zelo počasna (vezava v nanomolarnem območju) signalov v STD NMR spektrih zaradi narave eksperimenta ne bi opazili. Z željo po čim bolj točnih rezultatih smo analizirali le dobro ločene in izolirane signale v NMR spektrih. Tako smo se izognili negotovosti pri določanju prispevka posameznega protona k



vezavi, ki se pojavi pri prekrivanju signalov. Na sliki 14 so ti protoni in pripadajoči NMR signali označeni s črkami H<sub>a</sub>-H<sub>g</sub>.

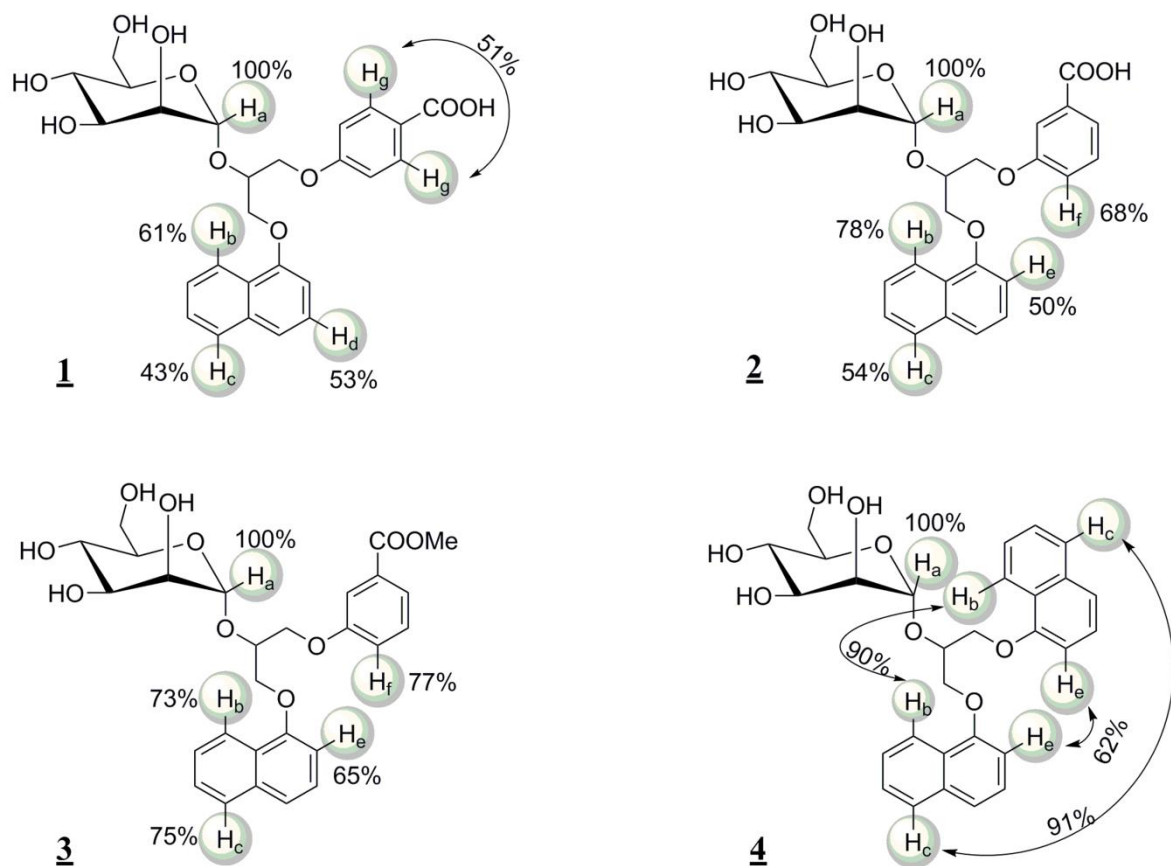


**Slika 14:** Referenčni in STD NMR spektri ligandov **1–4** v prisotnosti receptorja DC-SIGN. Signali, ki smo jih analizirali, so označeni s črkami H<sub>a</sub>-H<sub>g</sub>, skladno z oznakami na sliki 15. Vsi <sup>1</sup>H NMR spektri so bili posneti na 600 MHz spektrometru pri 298 K, časom nasičevanja 2 s, 400 μM koncentraciji liganda in 1:50 razmerju med receptorjem in

ligandom v 25 mM tris- $d_{11}$  (pD=8,0), 150 mM NaCl, 4 mM  $CaCl_2$  v  $^2H_2O$  in 25 % DMSO- $d_6$ .

### 5.2.1. Strukturno ovrednotenje ligandov 1–4

Pri strukturnem ovrednotenju ligandov smo na atomskem nivoju določili, kakšen je prispevek posamezne skupine ligandov 1–4 k vezavi. Naredili smo kvantitativno analizo STD spektrov pri razmerju med receptorjem in ligandom 1:50. Takšno razmerje je bilo izbrano z namenom zmanjšanja vpliva navzkrižne ponovne vezave liganda, kjer že nasičen ligand znova vstopi v vezavno mesto receptorja. Z natančno analizo STD NMR spektrov smo določili intenzitete signalov in jih pretvorili v STD efekte s pomočjo enačbe 2. Protonu, katerega signal je imel najvišjo intenziteto in posledično tudi najvišji STD efekt, smo pripisali najbližji kontakt s površjem DC-SIGN in najpomembnejšo vlogo pri interakcijah. Največje intenzitete STD signalov smo opazili v območju med  $\delta$  3,3 in 3,9 ppm, kar nakazuje, da je D-manoza v najtesnejšem stiku s površino receptorja. Teh signalov nismo mogli kvantitativno opredeliti zaradi prekrivanja. Edini signal s sladkorne enote, ki je bil dobro ločen pri vseh štirih ligandih, je signal protona  $H_a$  (pribl.  $\delta$  5,1 ppm), ki pripada anomernemu protonu D-manoze. Poleg tega je bil ta signal tudi najintenzivnejši v primerjavi z ostalimi protonskimi signali v STD NMR spektru, ki smo jih opazovali pri oceni interakcij med ligandi in receptorjem. Zato smo signal protona  $H_a$  uporabili kot referenco z arbitrarno določeno relativno STD vrednostjo 100 %. Intenzitete ostalih signalov so bile izražene relativno glede na signal  $H_a$  (slika 15). Največje in najbolj zanimive razlike med ligandi so bile opažene zaradi različnih aromatskih skupin, pripetih na glicerolni distančnik. Tudi za te smo lahko določili STD efekte, ki pa so bili manjši v primerjavi z manozim obročem. Za oba fenilna protona  $H_g$  liganda 1 smo določili 51 % STD efekt. Pri tem velja opozoriti, da v STD spektru nismo mogli ločiti med prispevkom posameznih, simetričnih protonov  $H_g$  k vezavi. Protoni  $H_b$ ,  $H_c$  in  $H_d$  na naftalenskem obroču liganda 1 so izkazovali 61 %, 43 % in 53 % STD efekte. Tudi za ostale aromatske protone smo opazili STD efekte, vendar je bila kvantitativna analiza zaradi prekrivanja signalov nemogoča.



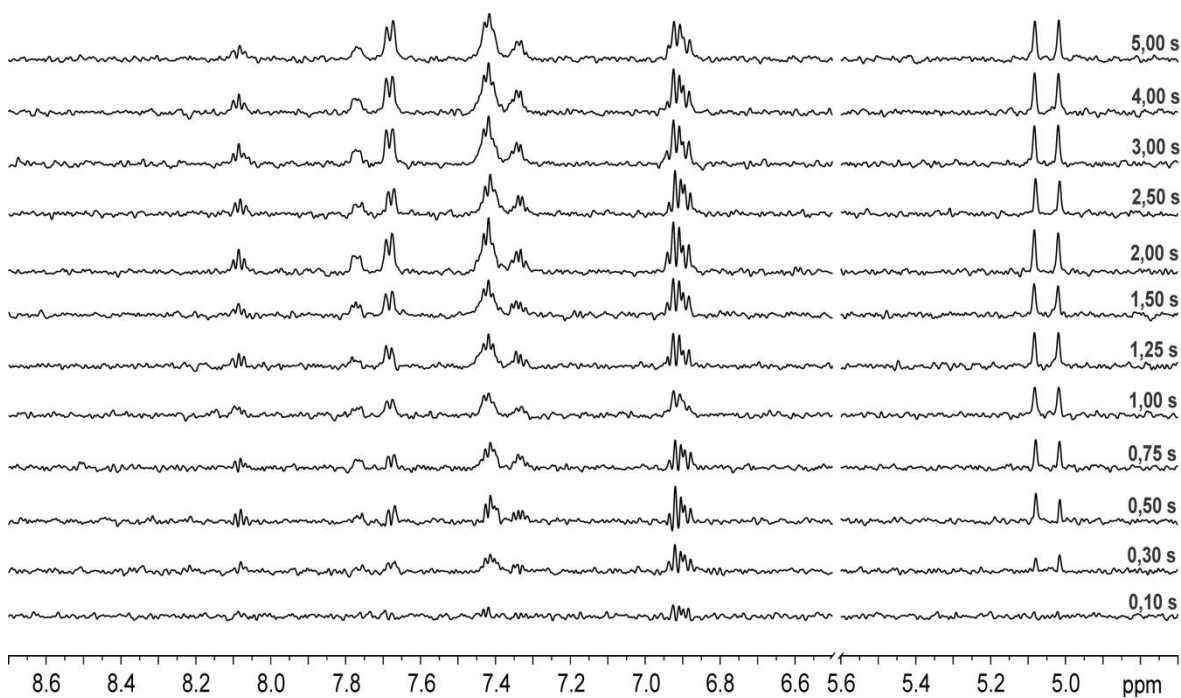
**Slika 15:** STD efekti za ligande **1–4** ob interakcijah z receptorjem. Označeni protoni  $H_a$ – $H_g$  imajo dobro ločene in izolirane signale v  $^1H$  NMR spektrih. Pri posameznem protonu je označena relativna STD vrednost normalizirana na proton  $H_a$ . Puščice nakazujejo, da smo za simetrične protone lahko določili le skupno STD vrednost.

Pri ligandu **2** je fenilni proton  $H_f$  pokazal 68 % STD efekt, medtem ko so protoni  $H_b$ ,  $H_c$ , ter  $H_e$  naftalenskega obroča dosegli 78 %, 54 % in 50 % STD efekte. Liganda **1** in **2** se med seboj razlikujeta po položaju karboksilne skupine na fenilnem obroču, kar se odraža v razlikah v NMR spektrih. Pri ligandu **1** sta bila dobro ločena signala protonov  $H_d$  in  $H_g$ . Nasprotno sta bila pri ligandu **2** dobro ločena signala protonov  $H_e$  in  $H_f$ . Signala protonov  $H_b$  in  $H_c$  sta bila dobro ločena pri obeh ligandih. Podobno kot za **2** smo opazili tudi za liganda **3** in **4**. Zaradi navedenih razlik je potrebna previdnost pri direktni medsebojni primerjavi ligandov **1–4**. Pri strukturnem ovrednotenju liganda **3** smo določili, da imajo protoni  $H_b$  in  $H_c$  naftalenske skupine in  $H_f$  fenilnega obroča zelo podobne STD vrednosti med 73 % in 77 %. Malo manjši STD efekt je dosegel proton  $H_e$  (65 %). Eksperimentalno

opaženi STD efekti za ligand **4** za protona H<sub>b</sub> in H<sub>c</sub> na obeh naftalenskih obročih so bili 90 % in 91 %. STD efekt za protona H<sub>e</sub> je bil občutno manjši (62 %). V NMR spektrih zaradi simetrije liganda nismo mogli ločiti med protoni s posameznega naftalenskega obroča. Določeni STD efekti zato odgovarjajo skupnemu prispevku obeh protonov k vezavi.

### 5.2.2. Odvisnost STD efektov od časa nasičevanja

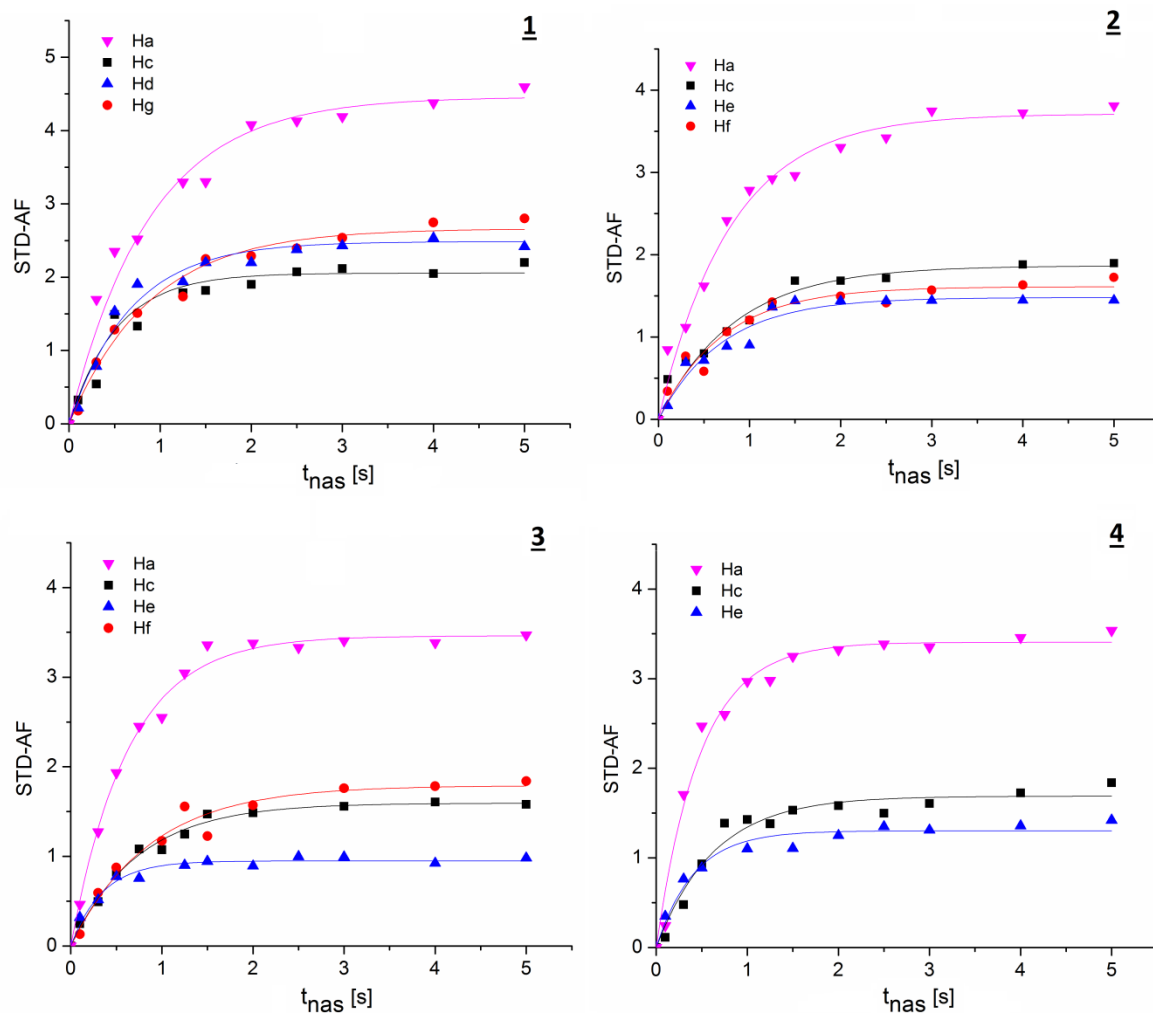
STD rastoče krivulje za ligande **1–4** smo določili tako, da smo posneli dvanajst STD NMR spektrov pri različnih časih nasičevanja od 0,1 do 5,0 s. Daljši ko je bil čas nasičevanja, močnejše STD efekte smo opazili, kar nakazuje na to, da obseg prenosa nasičenja na protone liganda narašča s časom nasičevanja. Slika 16 prikazuje spremembe intenzitet STD signalov s podaljševanjem časa nasičevanja za ligand **1**.



**Slika 16:** STD NMR spektri liganda **1**, posneti pri različnih časih nasičevanja od 0,1 do 5,0 s.

Dobljene STD efekte smo izrazili v obliki amplifikacijskih faktorjev (STD-AF) (enačba 3). Vrednost STD-AF ustreza povprečnemu številu molekul, pri katerih je prišlo do prenosa nasičenja z enega receptorja pri konstantnem času nasičevanja. Hkrati STD-AF odraža tudi bližino liganda do receptorja. Odvisnost intenzitete signalov od časa nasičevanja smo prikazali v obliki STD rastočih krivulj na grafu STD-AF v odvisnosti od časa

nasičevanja (slika 17). Eksperimentalnim podatkom smo z metodo najmanjših kvadratov prilagodili monoeksponentno matematično krivuljo z enačbo 4. Eksperimentalni podatki in najboljše se prilagajoče krivulje za ligande 1–4 so prikazane na sliki 17.



**Slika 17:** Grafi STD-AF kot funkcije časa nasičevanja za ligande 1–4. Eksperimentalnim podatkom smo prilagodili matematično enačbo 4 z namenom določitve vrednosti  $STD_{maks}$  in  $k_{sat}$ . Simboli predstavljajo eksperimentalne podatke, neprekinjene črte predstavljajo matematične krivulje prilaganja z metodo najmanjših kvadratov.

Eksperimentalni podatki se dobro ujemajo z izračunanimi krivuljami ob uporabi enačbe 4 z vrednostmi  $\chi^2$  pod 0,1. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je bil izbrani model, ki opisuje naš sistem, ustrezen. Rastoče krivulje za posamezen proton so plato dosegle pri različnih časih nasičevanja, ta čas je bil odvisen predvsem od hitrosti relaksacije nasičenega

prostega liganda v raztopini do ravnotežne oblike. Za vse ligande lahko rečemo, da je bil plato dosežen pri časih nasičevanja daljših od 2,5 s. Oblika rastočih krivulj nosi informacijo tudi o splošnih vezavnih karakteristikah posameznega liganda na DC-SIGN. Iz oblike krivulj na grafih STD-AF v odvisnosti od časa nasičevanja smo razbrali podobne vezavne značilnosti, kot smo jih opazili pri strukturnem ovrednotenju liganda. Za sladkorni proton H<sub>a</sub> smo določili pomembno višje STD-AF vrednosti kot za aromatske protone. Medtem so bile variacije v STD-AF med aromatskimi protoni zelo majhne. Matematično enačbo 4 smo prilagajali eksperimentalnim podatkom z namenom določitve dveh konstant, maksimalne STD intenzitete, STD<sub>maks</sub>, in hitrostne konstante nasičevanja, k<sub>sat</sub>. STD<sub>maks</sub> je asimptotični maksimum STD rastočih krivulj, k<sub>sat</sub> je povezana z lastnostmi posameznega protona in podaja informacijo o tem, kako hitro rastoče krivulje dosežejo plato. Vrednosti konstant so podane v preglednici I.

**Preglednica I:** Vrednosti parametrov interakcij ligandov **1–4** z receptorjem DC-SIGN.\*

| Ligand   | Proton         | STD <sub>maks</sub> | k <sub>sat</sub>            | R <sup>2</sup> | χ <sup>2</sup> |
|----------|----------------|---------------------|-----------------------------|----------------|----------------|
| <b>1</b> | H <sub>a</sub> | 4,46 ± 0,13         | 1,13 ± 0,13 s <sup>-1</sup> | 0,923          | 0,098          |
|          | H <sub>c</sub> | 2,06 ± 0,07         | 1,93 ± 0,20 s <sup>-1</sup> | 0,881          | 0,072          |
|          | H <sub>d</sub> | 2,49 ± 0,06         | 1,48 ± 0,17 s <sup>-1</sup> | 0,954          | 0,10           |
|          | H <sub>g</sub> | 2,66 ± 0,08         | 1,12 ± 0,10 s <sup>-1</sup> | 0,954          | 0,043          |
| <b>2</b> | H <sub>a</sub> | 3,71 ± 0,09         | 1,26 ± 0,10 s <sup>-1</sup> | 0,982          | 0,028          |
|          | H <sub>c</sub> | 1,87 ± 0,07         | 1,20 ± 0,14 s <sup>-1</sup> | 0,948          | 0,013          |
|          | H <sub>e</sub> | 1,48 ± 0,08         | 1,43 ± 0,23 s <sup>-1</sup> | 0,956          | 0,012          |
|          | H <sub>f</sub> | 1,61 ± 0,07         | 1,41 ± 0,20 s <sup>-1</sup> | 0,948          | 0,016          |
| <b>3</b> | H <sub>a</sub> | 3,44 ± 0,05         | 1,19 ± 0,08 s <sup>-1</sup> | 0,993          | 0,010          |
|          | H <sub>c</sub> | 1,58 ± 0,03         | 1,38 ± 0,09 s <sup>-1</sup> | 0,990          | 0,003          |
|          | H <sub>e</sub> | 1,08 ± 0,02         | 2,45 ± 0,30 s <sup>-1</sup> | 0,973          | 0,003          |
|          | H <sub>f</sub> | 1,77 ± 0,02         | 1,35 ± 0,15 s <sup>-1</sup> | 0,969          | 0,014          |
| <b>4</b> | H <sub>a</sub> | 3,41 ± 0,07         | 2,08 ± 0,18 s <sup>-1</sup> | 0,980          | 0,028          |
|          | H <sub>c</sub> | 1,69 ± 0,06         | 1,59 ± 0,20 s <sup>-1</sup> | 0,962          | 0,014          |
|          | H <sub>e</sub> | 1,30 ± 0,04         | 2,44 ± 0,32 s <sup>-1</sup> | 0,964          | 0,008          |

\* Navedene vrednosti smo določili iz prilegajočih se krivulj eksperimentalnim podatkom za opazovane protone H<sub>a</sub>-H<sub>g</sub>. k<sub>sat</sub>: hitrostna konstanta nasičevanja, STD<sub>maks</sub>: najvišja STD vrednost, R<sup>2</sup>: koeficient določanja, χ<sup>2</sup>: porazdelitev hi-kvadrat

Pri ligandu **1** je najvišjo vrednost  $STD_{maks}$  dosegel proton  $H_a$  (4,46), medtem ko so bile vrednosti za aromatske protone  $H_c$ ,  $H_d$ , in  $H_g$  (2,06; 2,49; 2,66) občutno nižje. Za protone liganda **1** smo izračunali vrednosti  $k_{sat}$ , ki se gibajo med 1,12 in 1,93  $s^{-1}$ . Za ligand **2** so bile vrednosti  $STD_{maks}$  za protone  $H_a$ ,  $H_c$ ,  $H_e$  in  $H_f$  3,71; 1,87; 1,48 in 1,61. Zanimivo je, da se vrednosti  $k_{sat}$  med protoni liganda **2** niso bistveno razlikovale, saj so bile vse vrednosti okrog 1,30  $s^{-1}$ . Tudi v primeru liganda **3** smo najvišjo  $STD_{maks}$  izračunali za proton  $H_a$  (3,44). Občutno nižje vrednosti smo določili za aromatske protone  $H_c$  (1,58),  $H_d$  (1,08) in  $H_g$  (1,77). Velike razlike med protoni **3** smo opazili tudi v primeru vrednosti  $k_{sat}$ , ki so bile med 1,19 in 2,45  $s^{-1}$ . Podoben razpon vrednosti  $k_{sat}$  med 1,59 in 2,44  $s^{-1}$  smo opazili tudi v primeru liganda **4**. Vrednosti  $STD_{maks}$  za protone **4** so bile 3,41 za  $H_a$  in 1,69 ter 1,30 za protona  $H_c$  in  $H_e$  na naftalenskih obročih.

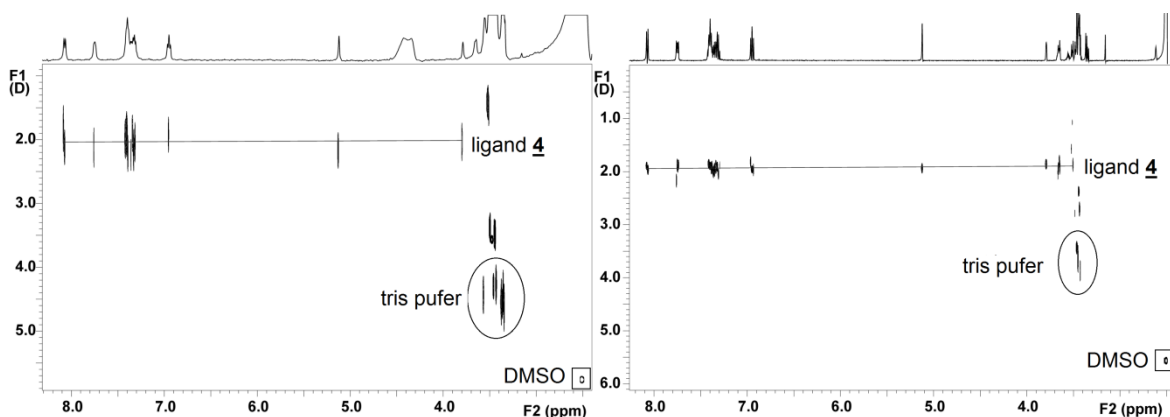
Zmnožek  $k_{sat}$  in  $STD_{maks}$  predstavlja začetni naklon premice pri ničtem času nasičevanja. Ta vrednost ustreza  $STD$  intenziteti ( $STD_0$ ) v odsotnosti vplivov  $T_1$  relaksacije in je odvisna samo od bližine liganda v vezavnemu mestu receptorja. Za vrednotenje vplivov  $T_1$  relaksacije smo izračunali vrednosti  $STD_0$  za protone  $H_a$ - $H_g$  in jih primerjali s  $STD$  efekti pri času nasičevanja 2 s ( $STD_{2s}$ ). Za lažjo primerjavo smo  $STD$  intenzitete normalizirali glede na proton  $H_a$ , ki ima vrednost 100 (preglednica II).

**Preglednica II:** Normalizirani  $STD$  efekti pri času nasičevanja 2,0 s in  $STD_0$ .<sup>a</sup>

|            |       | <b>1</b>        | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b>       |
|------------|-------|-----------------|----------|----------|----------------|
| $STD_{2s}$ | $H_c$ | 43              | 54       | 75       | 91             |
|            | $H_d$ | 53              | nd       | nd       | nd             |
|            | $H_e$ | nd <sup>b</sup> | 50       | 65       | 62             |
|            | $H_f$ | nd              | 68       | 77       | / <sup>c</sup> |
|            | $H_g$ | 51              | nd       | nd       | /              |
| $STD_0$    | $H_c$ | 62              | 48       | 53       | 38             |
|            | $H_d$ | 73              | nd       | nd       | nd             |
|            | $H_e$ | nd              | 45       | 65       | 45             |
|            | $H_f$ | nd              | 49       | 58       | /              |
|            | $H_g$ | 46              | nd       | nd       | /              |

<sup>a</sup> Normalizirane intenzitete za protone  $H_c$ - $H_g$  pri s času nasičevanja 2,0 s glede na  $STD$  efekt protona  $H_a$ , ki ima arbitrarno določeno vrednost 100.  $STD_0$  ustreza  $STD$  normaliziranim vrednostim, izračunanim po enačbi 4. <sup>b</sup> Nedoločeno zaradi prekrivanja signalov. <sup>c</sup> Ligand ne vsebuje tega protona.

Vrednosti  $STD_0$  so bile v primerjavi z vrednostmi  $STD_{2s}$  nižje. Izjemi sta bila protona  $H_c$  in  $H_d$  liganda **1**, za katera smo določili precej višje vrednosti  $STD_0$  kot  $STD_{2s}$ . Vrednosti  $STD_0$  in  $STD_{2s}$  za proton  $H_g$  liganda **1** sta bili primerljivi. Za ligand **2** smo za protona  $H_c$  in  $H_e$  izračunali zelo podobni vrednosti  $STD$ . Največje razlike pri ligandu **2** smo opazili za proton  $H_c$ . Zanimivo je, da je imel proton  $H_e$  liganda **3** enaki vrednosti  $STD_0$  in  $STD_{2s}$ , medtem ko smo za protona  $H_c$  in  $H_f$  določili nižje vrednosti  $STD_0$  v primerjavi s  $STD_{2s}$ . Po drugi strani smo največje razlike med vrednostmi  $STD$  določili pri ligandu **4**, še posebno za proton  $H_c$ . Opažene razlike med vrednostmi  $STD_0$  in  $STD_{2s}$  smo pripisali vplivu  $T_1$  relaksacije za ligande **1–4**. Ker so bile razlike med  $STD_0$  in  $STD_{2s}$  za proton  $H_c$  liganda **4** občutno nižje v primerjavi z ostalimi tremi ligandi, smo preverili tudi vplive drugih efektov, ki bi lahko vplivali na  $STD$  vrednosti. Dogajanje v vzorcu liganda **4** smo natančneje preučili z difuzijskimi eksperimenti. Pri različnih koncentracijah liganda med 20 in 1200  $\mu\text{M}$  smo posneli DOSY (*ang.* diffusion ordered spectroscopy) spektre, iz katerih smo lahko razlikovali med različno velikimi molekulami. Izračun difuzije je bil enostaven in hiter. V 2D DOSY spektrih, kjer so na abscisni osi kemijski premiki in na ordinatni osi vrednosti difuzijskih koeficientov, so razvidni trije seti signalov, ki pripadajo ligandu, DMSO in tris pufru (slika 18).



**Slika 18:** 2D DOSY NMR spektra **4** pri 40  $\mu\text{M}$  (levo) in 800  $\mu\text{M}$  (desno) koncentraciji liganda.

Pri nižjih koncentracijah liganda so njegovi signali poravnani v eno vrsto z difuzijskim koeficientom  $2,1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ , medtem ko opazimo pri višjih koncentracijah signale

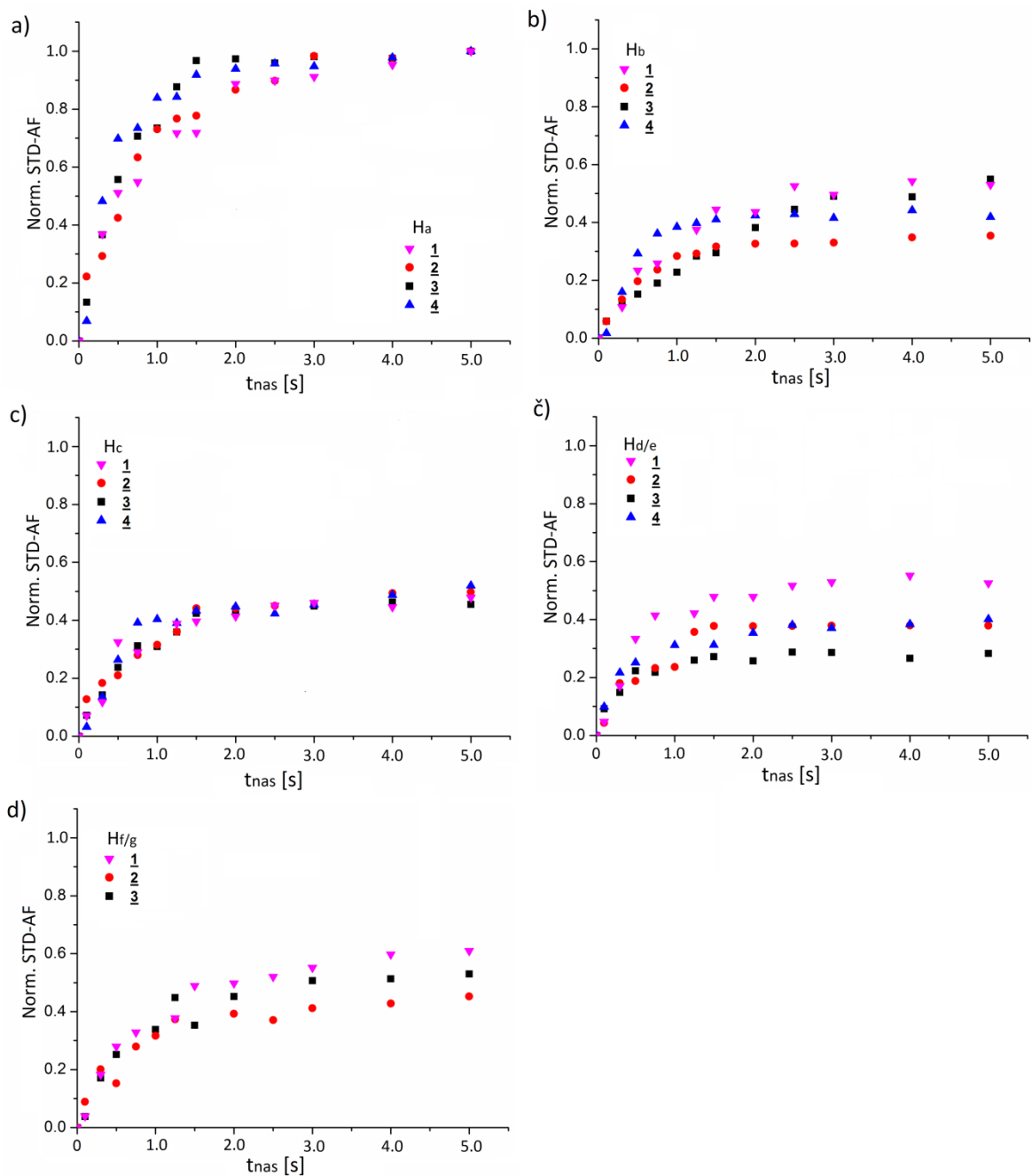


poravnane v ravno vrsto z nižjim difuzijskim koeficientom ( $1,9 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da s povečevanjem koncentracije **4** prihaja do tvorbe majhnih agregatov. Zanimivo je, da pri koncentracijah nad  $800 \mu\text{M}$  ti trdni delci postanejo tako veliki, da v vzorcu opazimo belo oborino, medtem ko v DOSY spektru opazimo samo en set signalov z difuzijskim koeficientom  $2,1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ . Pri višjih koncentracijah torej ne opazimo tvorbe nanoagregatov, ampak imamo ravnotežje med neraztopljenimi trdimi delci in molekulami v raztopini. Presenetljivo je tudi, da je to ravnotežje zelo počasno, saj v NMR spektrih ne opazimo sprememb v obliki signalov.

### 5.2.3. Karakterizacija in primerjava vezavne konformacije med ligandi **1–4**

Za boljšo primerjavo med ligandi smo oblikovali normalizirane krivulje STD efektov kot funkcije časa, s katerimi smo pridobili dodatne informacije o načinu vezave in vezavni konformaciji ligandov v vezavnem mestu DC-SIGN. STD-AF vrednosti obravnavanih protonov smo normalizirali glede na STD efekt protona  $H_a$  pri času nasičevanja 5 s znotraj istega liganda, ki smo ga po dogovoru določili na 1. Med seboj smo primerjali normalizirane STD-AF vrednosti za isti proton na različnih ligandih (slika 19). Veliko podobnost v splošnem trendu med STD rastočimi krivuljami lahko opazimo za proton  $H_a$  za ligande **1–4** (slika 19a). Dobro ujemanje nakazuje podobno konformacijo manoznega obroča za ligande **1–4** pri vezavi na receptor. V območju med časoma nasičevanja 1 in 2 s so na prevoju krivulje majhne razlike med ligandi, pri krajših in daljših časih nasičevanja pa je ujemanje podatkov znotraj eksperimentalnih napak. Normalizirane rastoče krivulje kažejo zelo dobro ujemanje tudi za proton  $H_c$  (slika 19c). Dobra korespondenca vrednosti znotraj eksperimentalnih napak kaže, da je način vezanja za  $H_c$  med ligandi primerljiv in da so interakcije med  $H_c$  na naftalenskem obroču in hidrofobnim žepom vezavnega mesta zelo podobne ne glede na spremembe v strukturi ligandov. Največja odstopanja med rastočimi krivuljami smo opazili za protone  $H_b$ ,  $H_d$ ,  $H_e$ ,  $H_f$  in  $H_g$ . Primerjava rastočih krivulj za proton  $H_b$  je razkrila podobnost STD efektov za ligande **1**, **3** in **4**, medtem ko so STD efekti liganda **2** nižji (slika 19b). Opazimo lahko tudi razlike v naklonih rastočih krivulj in kako hitro dosežejo plato. Liganda **2** in **4** ga dosežeta zelo hitro, nasprotno pa liganda **1** in **3** dosežeta plato pri daljših časih nasičevanja. Razlike v obliki rastočih krivulj za protona  $H_d$  in  $H_g$  liganda **1** smo pričakovali, saj se nahajata na drugih pozicijah na

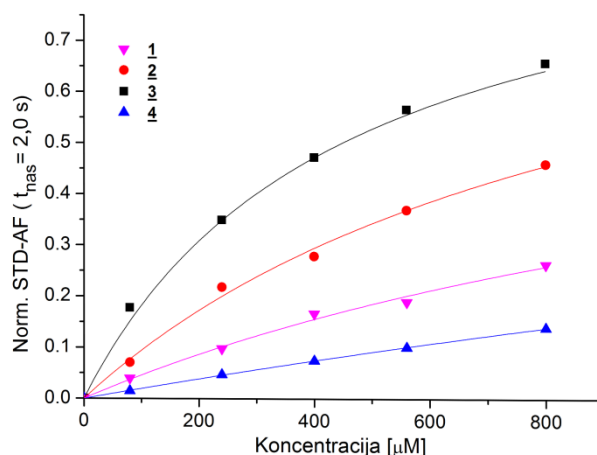
aromatskih obročih glede na H<sub>e</sub> ligandov 2–4 in H<sub>f</sub> ligandov 2 ter 3 (sliki 19č in d). Nasprotno pa je bila razlika v STD efektih za proton H<sub>e</sub> ligandov 2–4 presenetljiva, saj ima ta proton pri vseh treh ligandih enako mesto na naftalenskem obroču. Kljub temu lahko opazimo, da je način vezave naftalenskega protona H<sub>e</sub> ligandov 2 in 4 zelo podoben. Torej druga aromatska skupina ligandov 2 in 4 vpliva na orientacijo naftalenskega obroča v vezavnem mestu DC-SIGN na zelo podoben način. Spremembe v STD efektih, ki smo jih zaznali preko opazovanja protona H<sub>e</sub>, omogočajo še natančnejšo ovrednotenje tudi majhnih razlik v vezavnih značilnostih ligandov. Pri primerjavi strukturnih značilnostih in položaja protona H<sub>d</sub> liganda 1 in H<sub>e</sub> ligandov 2–4 je razvidno, da je proton H<sub>d</sub> na naftalenskem obroču na bolj ugodnem mestu za vezavo kot H<sub>e</sub> (slika 19č). Nadaljnja primerjava protonov H<sub>f</sub> in H<sub>g</sub> na fenilnem obroču pri ligandih 1–3 je razkrila, da je pozicija protona H<sub>f</sub> na aromatskem obroču bližje površini receptorja v primerjavi s položajem protona H<sub>g</sub>. Ligand 3 je metilni ester liganda 2 in primerjalna analiza med njima je razkrila, da proton H<sub>f</sub> liganda 3 leži bližje površini receptorja kot proton H<sub>f</sub> liganda 2 (slika 19d). Ti rezultati nakazujejo, da povečanje lipofilnosti skupaj s konformacijsko spremembo omogoča močnejše interakcije liganda 3 z receptorjem.



**Slika 19:** Normalizirane STD rastoče krivulje za protone  $H_a$ - $H_g$ . Prikazani grafi posredujejo informacije za primerjavo vezavne konformacije in načina vezave med ligandi 1-4. Protoni, ki smo jih preučevali, pripadajo a) manozni skupini, b), c), č) naftalenskemu obroču in d) fenilnemu obroču.

#### 5.2.4. Ovrednotenje vezavne afinitete med DC-SIGN in ligandi 1–4

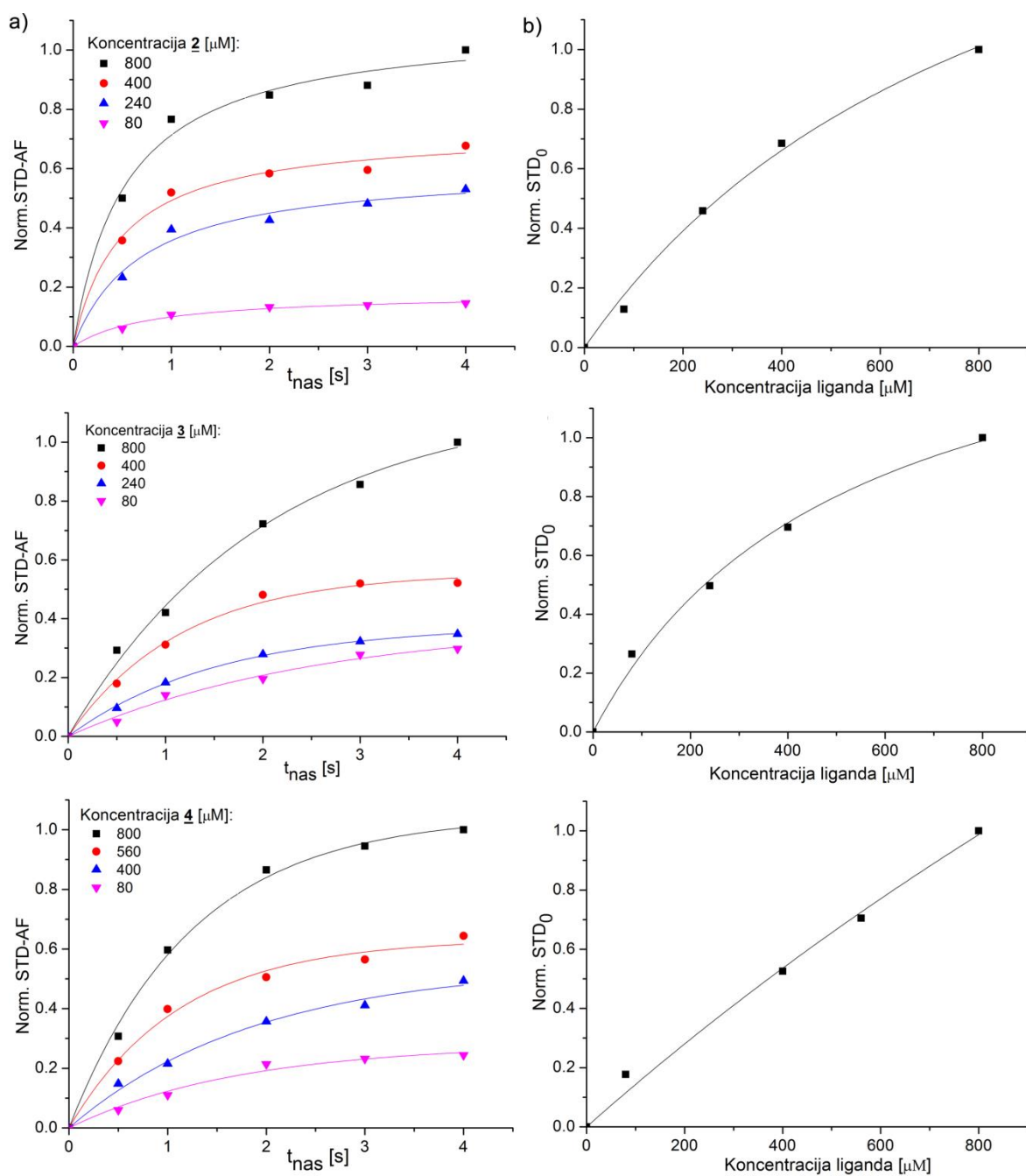
Določanja afinitete med ligandom in receptorjem *in vitro* smo se lotili, ker rezultati predstavljajo dober nadomestek za ovrednotenje učinkovitosti ligandov v *in vivo* pogojih. Odvisnost STD efektov od koncentracije liganda nam je omogočila določitev disociacijskih konstant ( $K_D$ ) s pomočjo STD NMR titracijskih eksperimentov. Spremljali smo intenzitete signalov v STD spektrih pri petih različnih razmerjih med receptorjem in ligandom (1 : 10, 1 : 30, 1 : 50, 1 : 70, 1 : 100) in konstantnem času nasičevanja (2 s). Tako določenim STD efektom, ki smo jih izrazili kot STD-AF, smo prilagodili hiperbolično matematično funkcijo, ki jo opisuje enačba 5. Velja opozoriti, da enačba 5 velja le, ko je koncentracija liganda v velikem presežku glede na receptor, kot je bilo tudi v našem primeru. Na sliki 20 so prikazane normalizirane STD-AF vrednosti za proton  $H_{d/e}$  v odvisnosti od koncentracije ligandov 1–4.



**Slika 20:** Normalizirane STD-AF krivulje kot funkcije koncentracije ligandov.  $K_D$  je bila določena s pomočjo enačbe 5 in je  $1,6 \pm 0,5$  mM ( $R^2=0,992$ ) za 1,  $0,96 \pm 0,08$  mM, ( $R^2=0,999$ ) za 2,  $0,45 \pm 0,05$  mM ( $R^2=0,997$ ) za 3 in  $4,9 \pm 0,7$  mM ( $R^2=0,999$ ) za 4.

Iz slike 20 je razvidno, da pri danih koncentracijah noben ligand ni dosegel maksimalne STD-AF vrednosti, kar nakazuje na to, da je izmenjava med prostim in vezanim ligandom hitra. Razlike v izmenjalni kinetiki med ligandi 1–4 se odražajo tudi v različnih naklonih hiperboličnih krivulj. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da je izmenjalna kinetika najhitrejša za ligand 4 in najpočasnejša za 3. Torej ligand 3 ostane v vezavnem mestu

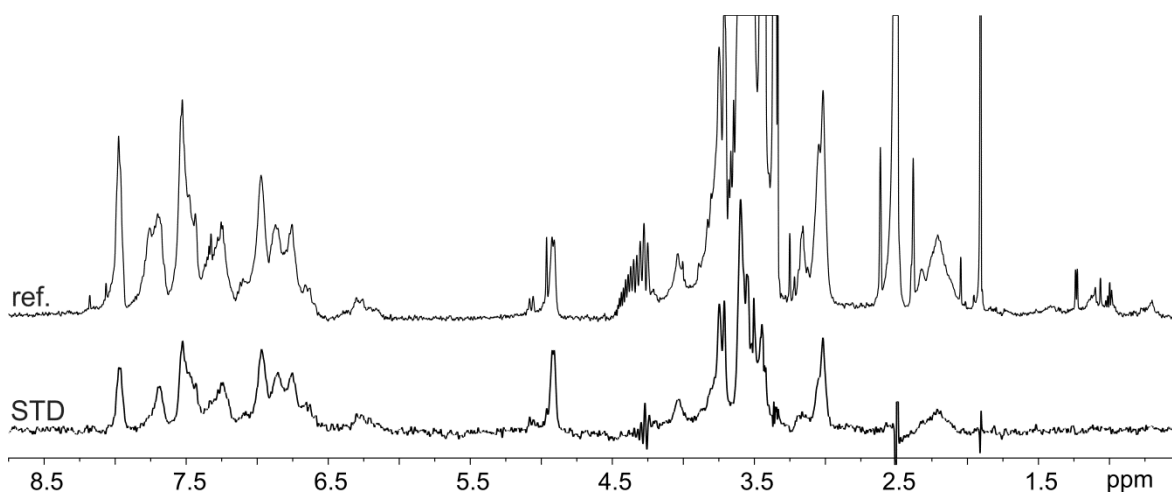
daljše časovno obdobje v primerjavi z drugimi ligandi. Po prilagajanju enačbe 5 eksperimentalnim podatkom smo izračunali vrednosti  $K_D$ . Za liganda **2** in **3** so bile določene vrednosti  $K_D$  v milimolarnem območju, in sicer 0,96 mM in 0,45 mM zaporedoma. Za liganda **1** in **4** smo opazili šibkejšo vezavo z vrednostma  $K_D$  1,6 mM in 4,9 mM zapovrstjo. Določene vrednosti  $K_D$  potrjujejo hitro izmenjavo ligandov v vezavnem mestu. Pri določevanju vrednosti  $K_D$  s pomočjo STD eksperimentov velja omeniti, da so te konstante praviloma večje ali enake pravim termodinamskim vrednostim. Direktna primerjava med vrednostmi  $K_D$  ligandov je otežena zaradi vpliva različnih eksperimentalnih faktorjev (čas nasičevanja, čas zadrževanja liganda v kompleksu z receptorjem, intenziteta signalov, akumulacija prenesenega nasičenja pri prostem ligandu), ki lahko vplivajo na določitev konstante. Z namenom ocenitve občutljivosti preučevanega sistema ligandov in DC-SIGN na učinkovitost prenosa nasičenja smo analizirali STD-AF za **2–4** pri različnih koncentracijah liganda (80–800  $\mu$ M) in pri različnih časih nasičevanja (0,5–4,0 s). Iz dobljenih podatkov smo načrtali STD rastoče krivulje in iz njihovega začetnega naklona določili vrednosti  $STD_0$ . Odvisnost teh vrednosti od koncentracije smo prilagodili enačbi 6 in izračunali vrednosti  $K_D$ , ki niso bile odvisne od spektralnih značilnostih opazovanih signalov (slika 21). Zanimivo je, da smo pri izračunu vrednosti  $K_D$  iz začetnih naklonov dobili primerljive vrednosti direktnim titracijskim eksperimentom pri konstantnem času nasičevanja. Vrednosti  $K_D$  brez vpliva spektralnih značilnostih so bile 0,90 mM za **2**, 0,51 mM za **3** in 3,0 mM za **4**. Te vrednosti  $K_D$  še dodatno potrjujejo, da ima ligand **3** najmanjšo hitrostno konstanto  $k_{off}$ , ki določa hitrost razpada kompleksa, in je tako najdaljši čas del kompleksa z DC-SIGN. Na sliki 21a opazimo tudi, da STD krivulje pri nižjih koncentracijah dosežejo plato pri krajših časih nasičevanja. Poleg tega smo ugotovili, da hitrostna konstanta nasičevanja ni konstantna, ampak se spreminja s koncentracijo ligandov. Pri nižjih koncentracijah ligandov je dinamično ravnovesje doseženo pri krajših časih nasičevanja, vendar je pri teh koncentracijah liganda tudi verjetnost za ponovno vezavo že nasičenega liganda v vezavno mesto večja.



**Slika 21:** a) Graf STD-AF kot funkcije časa nasičevanja pri različnih koncentracijah ligandov 2 (zgoraj), 3 (sredina) in 4 (spodaj). b) Odvisnost vrednosti STD<sub>0</sub> od koncentracije ligandov 2 (zgoraj), 3 (sredina) in 4 (spodaj). Eksperimentalnim podatkom smo prilagodili enačbo 6 in tako določili vrednosti  $K_D$  brez vpliva spektralnih značilnosti.

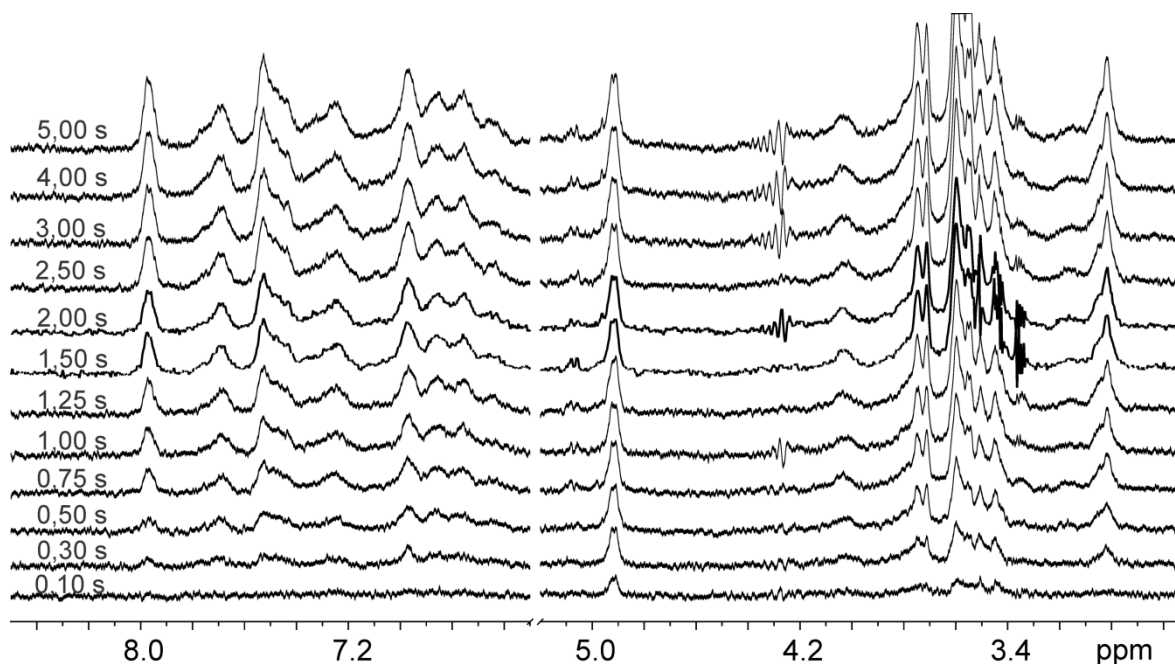
### 5.3. STD NMR eksperimenti dendronskega antagonista **5**

S STD NMR eksperimenti smo želeli preučiti tudi interakcije med DC-SIGN in ligandom **5**. Opaženi signali v STD spektru potrjujejo interakcije med receptorjem in ligandom **5** (slika 22). V STD NMR spektru ne opazimo signalov, ki pripadajo nečistotam (okrog  $\delta$  1 ppm), saj ne sodelujejo v vezavi. Kvantitativno analizo STD NMR spektrov so preprečili slaba topnost liganda **5** pri višjih koncentracijah, prekrivanje signalov in tvorba agregatov. Kljub temu lahko trdimo, da v vezavi sodelujejo aromatski protoni naftalenskih obročev in manozni sladkorni obroči. Opazimo lahko tudi STD signale v območju, kjer resonirajo protoni distančnikov (med  $\delta$  2,04 in 2,38 ppm), vendar je njihova intenziteta manjša v primerjavi z aromatskimi in sladkornimi protoni.



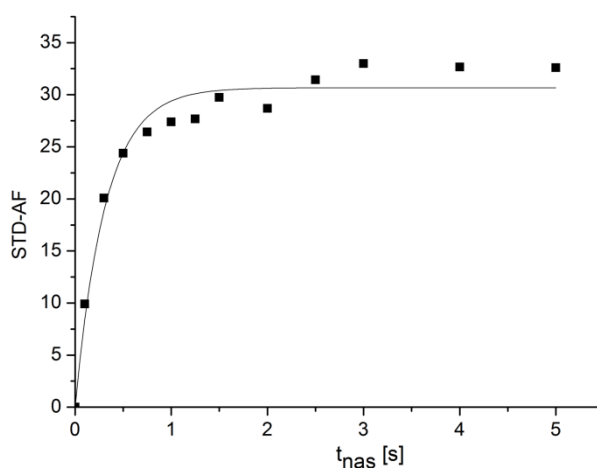
**Slika 22:** Referenčni in STD NMR spekter liganda **5** v prisotnosti receptorja. Oba spektra sta bila posneta na 600 MHz NMR spektrometru pri 298 K, času nasičevanja 2 s, koncentraciji liganda 400  $\mu$ M in 1 : 50 razmerju med receptorjem in ligandom v 25 mM tris- $d_{11}$  (pD=8,0), 150 mM NaCl, 4 mM  $CaCl_2$  v  $^2H_2O$  in 25 % DMSO- $d_6$ .

Pri primerjavi NMR spektrov brez receptorja in z receptorjem smo opazili, da so kemijski premiki signalov, ki pripadajo ligandu, po dodatku receptorja premaknjeni proti višjemu polju (proti nižjim  $\delta$  vrednostim v ppm). Za nekatere signale smo opazili razširitev linij in posledično spremembo oblike signalov. Za signale, ki so pripadali pufru, sotopilu ali nečistotam, teh sprememb nismo opazili. V nadaljevanju nas je tudi zanimalo, kako se spreminja intenziteta signalov v STD spektrih pri časih nasičevanja od 0,1 do 5,0 s (slika 23).



**Slika 23:** STD NMR spektri liganda **5**, posneti pri različnih časih nasičevanja od 0,1 do 5,0 s.

S podaljševanjem časa nasičevanja so STD efekti nedvoumno rasli. Že pri kratkih časih nasičevanja smo opazili STD efekte, ki pripadajo manoznim sladkornim obročem. Kljub prekrivanju v NMR spektrih liganda **5** je anomerni proton manoznega obroča (okrog  $\delta$  5 ppm) še vedno ločen od ostalih. Za ta proton smo načrtali STD rastočo krivuljo na grafu STD-AF kot funkcijo časa nasičevanja z namenom primerjave dendronskega liganda **5** z monovalentnimi ligandi **1–4**. Eksperimentalnim podatkom smo prilegali matematično krivuljo z enačbo 4 (slika 24).



**Slika 24:** Graf STD-AF kot funkcije časa nasičevanja za proton  $H_a$  liganda **5**. Eksperimentalnim podatkom smo prilegali matematično enačbo 4.



Zanimivo je, da se eksperimentalni podatki ne ujemajo dobro z izračunanimi krivuljami ob uporabi enačbe 4 ( $\chi^2$  je 3,0). Krivulja je že pri kratkih časih nasičevanja dosegla vrednosti  $STD_{maks}$ , ki so bile občutno večje kot pri monovalentnih ligandih. Pri direktni primerjavi z monovalentnimi ligandi se moramo zavedati, da hkrati opazujemo štiri manozne obročje, ki se vežejo na tetramerni receptor, kar se najverjetneje odraža tudi v izračunanih STD efektih. Pri tem je potrebna tudi dodatna previdnost, saj pravzaprav ne vemo, ali opazujemo STD efekte za celoten ligand, ki je oddisociral z vezavnih mest, ali le za posamezne krake. Rezultati nakazujejo, da se interakcije liganda 5 z receptorjem razlikujejo v primerjavi z monovalentnimi ligandi 1–4.

## 6. Razprava

Naša raziskava je prinesla nove strukturne in mehanistične podrobnosti o interakcijah med manoznimi glikomimetiki in zunajcelično domeno DC-SIGN na atomskem nivoju ločljivosti. Izmerjeni STD efekti nedvoumno dokazujejo vezavo manoznih antagonistov na receptor. Vezavna afiniteta za **1–5** do DC-SIGN je med  $10^{-8}$  in  $10^{-2}$  M, kar je ravno v območju, ki jo zahteva STD NMR eksperiment, da opazimo prenos nasičenja in posledično STD signale. Za uspešno izvedbo STD NMR eksperimentov je dovolj že majhna koncentracija receptorja ( $8 \mu\text{M}$ ). Posledično so bile tudi količine uporabljenih ligandov majhne, kar je dodatna prednost uporabljene metodologije, saj smo običajno omejeni s količinami spojin pri začetnem testiranju.

Strukturno ovrednotenje ligandov **1–4** je razkrilo, da je manopiranozni obroč pri vseh štirih v najtesnejšem stiku z receptorjem. STD efekti tudi jasno nakazujejo, da se manozni sladkorni obroč veže najmočneje glede na skupine v strukturi posameznega liganda. Ti rezultati se zelo dobro ujemajo z že znanimi vezavnimi karakteristikami D-manoznega obroča z DC-SIGN (24, 38, 76). Objavljene študije kažejo, da naj bi hidroksilni skupini na mestih 3 in 4 na manoznem obroču tvorili dve koordinacijski in dve vodikovi vezi v vezavnem mestu in bili tako najpomembnejši za vezavo (24). V območju, kjer resonirajo protoni na mestih 3 in 4 z D-manoze, smo sicer opazili močne STD efekte, vendar le-teh nismo mogli kvantitativno ovrednotiti zaradi prekrivanja signalov. STD efekte smo opazili tudi za aromatske obročje ligandov **1–4**, ki pa so bili nižji v primerjavi z manoznim obročem. Odkrili smo tudi, da strukturne spremembe na fenilni skupini ne vplivajo samo na njene vezavne lastnosti, ampak tudi na vezavne značilnosti naftalenske skupine. Liganda **1** in **2** se med seboj razlikujeta po mestu vezave karboksilne skupine na fenilnem obroču. Opazimo lahko, da *meta* lega substituenta na fenilni skupini pri ligandu **2** doprinese k povišanju STD efektov v primerjavi z ligandom **1**, kjer je karboksilna skupina vezana na *para* mestu. Višje STD efekte smo določili tudi na naftalenskem obroču liganda **2**, še posebno za proton  $H_b$ . Pri ligandu **3**, ki je metilni ester liganda **2**, smo preučevali razlike v STD efektih pri majhnih spremembah lipofilnosti liganda. Opazili smo znatno povišanje STD efektov za oba aromatska obročja v primerjavi z ligandom **2**. Izjema je bil proton  $H_b$ , za katerega so vrednosti ostale zelo podobne. Ligand **4** je z dvema naftalenskima obročema najbolj lipofilen izmed ligandov **1–4**. Zaradi ugotovitve, da povečanje lipofilnosti pozitivno vpliva na STD efekte, smo predvidevali, da bodo STD

efekti za ta ligand najvišji. Določeni STD efekti za ligand **4** so bili res visoki, vendar je potrebno opozoriti, da so bili ti efekti določeni za ista protona na obeh naftalenskih obročih. Zaradi simetrije liganda in posledično omejitve razlikovanja signalov protonov s posameznega naftalenskega obroča v NMR spektrih se je pojavilo vprašanje, kakšen je pravzaprav doprinos posameznega protona k vezavi. Vendar sama STD NMR metoda na to vprašanje ni dala odgovora.

Zgoraj opisano strukturno ovrednotenje ligandov pri konstantnem času nasičevanja se običajno opravi na začetku STD študij, saj poda bistvene informacije o tem, ali se ligand sploh veže ter kako blizu so posamezni deli liganda vezavnemu mestu receptorja. Informacije o vezavi pridobimo zelo hitro, čas meritve pa je odvisen od koncentracije liganda, ločljivosti, ki jo zahtevamo, uporabljenega spektrometra itd. Kadar želimo natančnejše podatke, je potrebno preveriti tudi druge vplive, ki lahko vplivajo na STD rezultate. Zato smo opazovali STD efekte pri različnih časih nasičevanja in načrtali STD rastoče krivulje z namenom preprečevanja možnih napačnih razlag. Mayer in Meyer sta namreč pokazala, da velikost določenih STD efektov ni odvisna samo od bližine liganda do receptorja, ampak na opažen prenos nasičenja v vezavnem mestu vplivata tudi longitudinalni relaksacijski čas  $T_1$  protonov prostega nasičenega liganda in kinetika vezave (60). Pri daljših časih nasičevanja se je v vezavnem mestu izmenjalo večje število ligandov in posledično smo opazili večje STD efekte. Vendar pri časih nasičevanja, daljših od 2,5 s, nismo več opazili bistvenega spreminjanja intenzitet signalov v STD spektrih. Nadaljnjo rast STD efektov, kljub temu, da je bilo nasičenih vedno več molekul, je preprečevala relaksacija prostih nasičenih ligandov v raztopini. Iz prileganja matematične enačbe rastočim STD krivuljam smo izračunali konstanti  $STD_{maks}$  in  $k_{sat}$ . Pri obeh vrednostih smo opazili razlike med protoni znotraj posameznega liganda kot tudi med ligandi. Zanimivo je bilo opaženje, da je najvišjo  $STD_{maks}$  dosegel ligand **1**, medtem ko so bile te vrednosti malo nižje in podobne za **2–4**. Zmnožek konstant  $STD_{maks}$  in  $k_{sat}$  je  $STD_0$ , ki predstavlja naklon krivulje pri času nasičevanja 0 s in odsotnosti  $T_1$  efektov. Zaradi vpliva  $T_1$  relaksacije smo razlike med STD pri času nasičevanja 2 s ( $STD_{2s}$ ) in  $STD_0$  pričakovali, pri tem pa so splošne vezavne karakteristike za protone ostale podobne. Najmanjše razlike med  $STD_{2s}$  in  $STD_0$  smo opazili za **2**, medtem ko smo največja odstopanja določili za **4**. Relaksacijske lastnosti protonov se odražajo tudi v vrednostih  $k_{sat}$ . Za protone liganda **2** so vrednosti  $k_{sat}$  zelo podobne, kar se odraža v majhnih razlikah med  $STD_{2s}$  in  $STD_0$  za ta ligand. Malo

večje razlike med  $STD_{2s}$  in  $STD_0$  smo opazili za **1** in **3** ter še večja za **4**, kar dobro korelira tudi z razponom vrednosti  $k_{sat}$  za protone posameznega liganda. Odstopanja med vrednostmi  $STD_0$  in  $STD_{2s}$  so bila največja za proton  $H_c$  pri **4**. Za vse štiri ligande lahko trdimo, da so opažene razlike v vrednostih STD posledica relaksacijskih lastnosti protonov na posameznem ligandu. Zaradi občutno manjših vrednosti  $STD_0$  v primerjavi s  $STD_{2s}$  za proton  $H_c$  na **4** smo želeli poleg  $T_1$  relaksacijskih vplivov preveriti tudi druge efekte, ki bi lahko vplivali na STD vrednosti. Ligand **4** je z dvema naftalenskima obročema, vključenima v strukturo, najbolj lipofilen izmed vseh štirih. Posledično bi  $\pi$ - $\pi$  zlaganje med aromatskimi obroči lahko povzročilo tvorbo (nano)agregatov, ki jih s prostim očesom ne vidimo, vendar vseeno lahko vplivajo na določitev STD efektov. Z difuzijskimi eksperimenti smo želeli identificirati morebitne različno velike molekule/agregate v vzorcu. Če bi bili v raztopini agregati, bi bili večji kot posamezne molekule **4** in bi opazili vsaj dva seta signalov z različnima difuzijskima koeficientoma. Pri različnih koncentracijah liganda **4** smo dobili dva seta signalov v 2D DOSY spektrih z majhnimi razlikami v difuzijskih koeficientih, kar dokazuje, da se ligand nahaja v obliki posameznih molekul in agregatov. Na podlagi danih rezultatov lahko sklepamo, da na opažene razlike za **4** v vrednostih  $STD_{2s}$  in  $STD_0$  poleg relaksacije vplivajo tudi (nano)agregati liganda, prisotni v raztopini.

Primerjava normaliziranih STD rastočih krivulj je podala informacije o razlikah v vezavnih konformacijah med ligandi **1–4**. Dobro ujemanje med ligandi smo opazili za D-manozo, kar pomeni, da se le-ta veže na podoben način pri ligandih **1–4**. Angulo s sodelavci je pokazal, da  $Man\alpha 1-2Man$  zavzema dva različna vezavna načina osrednje manozne skupine v vezavnem mestu DC-SIGN (76). To bi lahko tudi pojasnilo majhne razlike med STD rastočimi krivuljami med časoma nasičevanja 1 in 2 s. Zelo dobro ujemanje med ligandi **1–4** za proton  $H_c$  lahko najverjetneje pojasnimo s hidrofobnimi in  $\pi$ - $\pi$  interakcijami s fenilalaninskim ostankom Phe313 v hidrofobnem žepu receptorja. Pred kratkim je bila objavljena študija podobnih monovalentnih manoznih antagonistov DC-SIGN, kjer so podrobneje obravnavali tudi ligand **4** (24). Rezultati molekulske dinamike, ki so jo opravili, kažejo, da en od naftalenskih obročev predvidoma tvori interakcije s Phe313, kar se dobro ujema tudi z zgornjimi zaključki. Glede na to bi pričakovali podobne interakcije tudi za druge protone naftalenskega obroča,  $H_b$ ,  $H_d$  liganda **1** in  $H_c$  ligandov **2–4**, vendar ujemanje med STD rastočimi krivuljami teh protonov ni bilo tako dobro kot za  $H_c$ . Na

podlagi tega lahko sklepamo, da pozicija naftalenskega obroča v hidrofobnem žepku DC-SIGN ni čisto enaka za ligande **1–4**. Ugotovili smo tudi, da je pozicija protona H<sub>d</sub> bolj ugodna za vezavo kot pa položaj protona H<sub>e</sub>, kar se ujema s sliko prikaza povprečne MD-strukture (24). Čeprav je za ligande **1–4** značilna velika fleksibilnost skupin na ligandih, lahko na podlagi STD rastočih krivulj predvidevamo, da aromatska obroča medsebojno vplivata na konformacijo ligandov v vezavnem mestu DC-SIGN. Zaznali smo pomembne razlike tudi pri analizi konformacije fenilnega obroča. Opazili smo, da protoni na različnih mestih na fenilnem obroču ne sodelujejo enako močno pri vezavi. Bolj je ugoden položaj protona H<sub>g</sub> kot H<sub>f</sub>. Dodatna primerjava ligandov **2** in **3** je razkrila, da povečanje lipofilnosti dodatno spremeni usmerjenost obroča, kar pozitivno vpliva na povečanje interakcij. Ti rezultati dobro sovpadajo tudi z opažanji pri strukturnem ovrednotenju ligandov. Na podlagi primerjalne analize STD rastočih krivulj za ligande **1–4** lahko zaključimo, da variacije v strukturah ligandov vplivajo tako na vezavno konformacijo kot na način vezave ligandov v vezavnem mestu DC-SIGN. Za natančnejše informacije o konformaciji ligandov v vezavnem mestu DC-SIGN bi lahko uporabili tudi prenesene NOE eksperimente. Razlika med NOESY spektri vezanega in prostega liganda nosi informacije o bioaktivni konformaciji ligandov.

Pred našo študijo vezavnih afinitet v obliki vrednosti K<sub>D</sub> za ligande **1–4** ni določal še nihče. Interakcije med lektini in ogljikovimi hidrati so tipično šibke (μM–mM) in vse izračunane vezavne afinitete v mikromolarnem območju predstavljajo že velik dosežek, čeprav si splošno želimo nanomolarnih zaviralcev. S STD NMR metodami smo izračunali K<sub>D</sub> za **1–4** v submilimolarnem območju. Za vse ligande smo opazili veliko fleksibilnost glicerolnega distančnika z dvema aromatskima skupinama že v prostem stanju v raztopini. Ta fleksibilnost je najverjetneje tudi razlog, da so bile določene šibke afinitete vezave za ligande **1–4**, kar so dodatno potrdile študije molekulske dinamike za ligand **4**, saj zaradi velike rotacijske svobode aromatskih obročev ne tvori optimalnih interakcij v vezavnem mestu, kot je bilo predvideno pri računalniškem načrtovanju učinkovin (24). Tomašič s sodelavci je tudi testiral biološko aktivnost liganda **4**. Izmerjena vrednost IC<sub>50</sub> zanj je bila 40 μM. Ligand **4** je bil tako najmočnejši poročan monovalentni antagonist DC-SIGN (24). Vrednost K<sub>D</sub> za ligand **4**, ki smo jo določili s STD NMR metodami, je bila občutno višja (3 mM). Upoštevati je potrebno dejstvo, da so vrednosti K<sub>D</sub>, določene s STD NMR metodami, običajno višje ali enake pravim ravnotežnim vrednostim. Vendar tako velike

razlike med določenima vrednostma  $K_D$  in  $IC_{50}$  vseeno nismo pričakovali, saj nam obe konstanti prinašata podobno informacijo o vezavni afiniteti liganda **4**. Pri tem je potrebno opozoriti tudi, da priprava vzorca ni bila enaka. Glavne razlike med našimi in vzorci pri testiranju biološke aktivnosti so bile v sestavi pufra. Koncentracija tris pufra (20 mM) in  $CaCl_2$  (1 mM) je bila nižja kot v našem primeru. Pomembna razlika je bila tudi, da smo mi uporabili sotopilo  $DMSO-d_6$  (25 %) za lažje raztapljanje, medtem ko so pri merjenju biološke aktivnosti uporabili Tween-20 (0,1 %), da bi se izognili nespecifični inhibiciji DC-SIGN v primeru tvorbe agregatov. Potrebno je tudi omeniti, da so interakcije v vezavnem mestu odvisne od prisotnosti kalcijevih ionov. Določeno je bilo, da je pri 1 mM koncentraciji kalcijevih ionov vezava HIV-1 gp120 na DC-SIGN 95 %, pri 5 mM koncentraciji pa je ta vezava 100 % (81). Glede na te podatke je bila koncentracija v obeh primerih zadostna za optimalno vezavo in razlike v vezavni afiniteti niso bile posledica drugačne koncentracije kalcijevih ionov. Pri STD NMR meritvah so bile uporabljene koncentracije liganda **4** že na začetku višje, kot je bila njegova vrednost  $IC_{50}$ . Glede na 2D DOSY NMR spektre pri različnih koncentracijah lahko sklepamo, da pri 40  $\mu M$  koncentraciji liganda **4** še ne prihaja do agregacije, medtem ko pri koncentraciji 80  $\mu M$  že lahko opazimo dva seta signalov torej tudi agregate. Na tem mestu bi izpostavili, kako pomembno je, da so molekule, ki jih opazujemo pri STD eksperimentih dobro topne in stabilne v raztopini. Pri STD meritvah se težave s topnostjo rešuje na dva načina, z zmanjšanjem koncentracije liganda ali z dodajanjem sotopila. Pri naših eksperimentih so bile uporabljene koncentracije že zelo nizke, zato jih nismo še zniževali. Smo pa uporabili sotopilo (DMSO) z namenom izboljšanja topnosti, ki pa očitno še vedno ni mogel popolnoma preprečiti tvorbe majhnih agregatov v primeru liganda **4**. Možno je, da je zaradi tega v večji meri prišlo do nespecifičnih interakcij med ligandom **4** in receptorjem kot v primeru ligandov **1–3**, kar bi imelo za posledico tudi povečanje vrednosti  $K_D$ . Slednje spada med slabše lastnosti STD NMR eksperimentov, saj ne ločijo med specifičnimi in nespecifičnim interakcijami. Drugo možno razlago sprememb STD vrednosti, ki smo jih opazili pri analizi STD rastočih krivulj, in odstopanja vezavne afinitete z že objavljenimi rezultati je mogoče iskati tudi v sami kinetiki vezave. V literaturi poročajo, da lahko  $k_{on}$  ali  $k_{off}$  hitrostni konstanti vplivata na STD efekte in posledično ni nujno, da nižji STD efekti pomenijo tudi nižjo vezavno afiniteto liganda **4** do DC-SIGN (53).

Oblika krivulj v grafu STD-AF v odvisnosti od koncentracije liganda je podala informacije o izmenjalni kinetiki v vezavnem mestu DC-SIGN, ki je običajno najbolj odvisna od disociacijske hitrostne konstante,  $k_{\text{off}}$ . Ligandi **1–4** niso dosegli maksimalnega STD-AF pri koncentraciji 800  $\mu\text{M}$ , kar kaže na to, da je izmenjava molekul ligandov v vezavnem mestu hitra. Pri primerjavi ligandov med seboj lahko rečemo, da je izmenjava najpočasnejša za ligand **3**. Ta ligand bi glede na obliko in naklon krivulje dosegel maksimalni STD-AF pri nižjih koncentracijah glede na **1**, **2** in **4**. Zanimivo je tudi, da koncentracijske krivulje ne dosežejo platoja, kot je to značilno za STD rastoče krivulje. Ko vzorec pretitriramo in nasitimo vsa vezavna mesta receptorja ( $[\text{L}] \gg K_{\text{D}}$ ), začnejo STD-AF vrednosti padati, saj intenzitete signalov v referenčnem spektru naraščajo z rastočo koncentracijo liganda, STD efekti pa se zaradi nasičenja receptorja ne spreminjajo več. Posledično takšni rezultati odražajo prenizko vrednost glede na realno stanje in zato se tovrstnega pretitriranja pri STD NMR titracijskih eksperimentih izogibamo. Lahko rečemo tudi, da STD NMR eksperiment podaja samo delni vpogled v vezavno kinetiko med ligandi in receptorjem. S kombinacijo eksperimentalnih podatkov in popolnimi relaksacijskimi matričnimi kalkulacijami je možno določiti tudi velikost hitrostne disociacijske konstante ( $k_{\text{off}}$ ) in tako dobiti natančnejšo sliko kinetike vezave (82).

Na določitev vrednosti  $K_{\text{D}}$  s STD NMR spektroskopijo lahko vpliva kar nekaj eksperimentalnih faktorjev (čas nasičevanja, čas zadrževanja liganda v kompleksu, intenziteta signala, akumulacija nasičenja pri prostem ligandu). Z namenom minimizacije možnih artefaktov smo za analizo rezultatov pri direktni titraciji izbrali proton  $\text{H}_a$  liganda **1** in  $\text{H}_c$  ligandov **2–4**, saj sta imela najbolj ustrezno razmerje med signalom in šumom. Pri signalih z največjo intenziteto zaradi dobrega razmerja med signalom in šumom ne dobimo nujno najboljših rezultatov  $K_{\text{D}}$ . Dokazano je bilo, da je pri obsežni in hitri ponovni vezavi nasičenih ligandov, ki še niso prešli v ravnotežno stanje, napaka najbolj očitna prav pri signalih z najvišjo intenziteto (66). Rezultate pri direktni titraciji smo preverili s pomočjo začetnih naklonov rastočih krivulj, ki naj bi bili manj občutljivi na spektralne značilnosti opazovanih signalov. V obeh primerih smo določili zelo podobne vrednosti  $K_{\text{D}}$ . Ti rezultati lahko pomenijo dvoje, ali sistem ligandov **1–4** in DC-SIGN ni občutljiv na že omenjene faktorje, ali pa so bili pogoji direktnih titracij dovolj skrbno izbrani z namenom minimizacije vseh vplivov.

Ideja, ki vodi načrtovanje in razvoj dendronskih antagonistov, kot je ligand **5**, se zdi kot idealna rešitev za nizke vezavne afinitete monovalentnih manoznih antagonistov do DC-SIGN. V tej študiji so bile spojine dendronskega tipa prvič preučevane s pomočjo STD NMR eksperimentov. Signali v STD NMR spektrih so pokazali, da je prišlo do interakcij med ligandom **5** in receptorjem. Čeprav teh spektrov nismo mogli kvantitativno analizirati, smo vseeno opazili razlike med posameznimi kemijskimi skupinami liganda. Najmočnejše STD efekte smo opazili za protone D-manoze, močni so bili tudi STD efekti protonov naftalenskih obročev. Nižje STD efekte smo opazili v območju, kjer so resonirali protoni distančnikov. S podaljševanjem časa nasičevanja smo opazili tudi rast signalov, kar pomeni, da se je pri daljšem času izmenjalo večje število ligandov. Vendar je zanimivo, da STD rastoča krivulja, ki smo jo načrtali za anomerne protone sladkornih obročev, plato doseže že pri zelo kratkih časih (okrog 1 s), kar je precej hitreje v primerjavi z monovalentnimi antagonisti **1–4**. To pomeni, da je dinamično ravnovesje doseženo pri krajših časih nasičevanja, in hkrati nakazuje, da je za ligand **5** značilna bolj obsežna ponovna vezava že nasičenega liganda v vezavno mesto receptorja. Ena od možnih razlag za takšne rezultate je, da po vezavi liganda **5** na tetramerni receptor ne odiscirajo vsi kraki istočasno. Posledično je zato velika verjetnost, da se bo tak že nasičen krak liganda ponovno vezal v vezavno mesto receptorja. Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da metoda STD NMR ni najprimernejša za vrednotenje afinitete dendronov, kot je ligand **5**.



## 7. Sklep

S pomočjo kombinacije  $^1\text{H}$  in STD NMR spektroskopskih metod smo pokazali nove strukturne in mehanistične podrobnosti interakcij med manoznimi glikomimetiki in zunajcelično domeno DC-SIGN na atomskem nivoju resolucije. Ti rezultati pripomorejo k razumevanju interakcij v vezavnem mestu in tako doprinašajo nova znanja, ki so korak bližje uspešnemu preprečevanju horizontalnega prenosa okužb s HIV-1 z uporabo loklanih mikroboicidov.

S pomočjo 1D in 2D NMR spektrov smo potrdili strukturo uporabljenih ligandov ter pridobili informacije o strukturi ligandov v raztopini. Kot pričakovano za ligande **1–4** nismo opazili razlik v konformaciji stola D-manoznega sladkornega obroča glede na razlike v skupinah, pripetih na njen anomerni ogljik. Celovita asignacija signalov v protonskih spektrih ligandov **1–5** je omogočila tudi strukturno ovrednotenje ligandov pri nadaljnjih STD NMR eksperimentih. Pridobljeni STD NMR rezultati za ligande **1–5** nedvoumno dokazujejo vezavo manoznih antagonistov na DC-SIGN. Za ligande **1–4** smo lahko STD rezultate tudi kvantitativno ovrednotili, medtem ko za ligand **5** to ni bilo mogoče zaradi prekrivanja signalov v NMR spektrih. Strukturno ovrednotenje ligandov **1–4** je razkrilo, da je D-manoza v najtesnejšem stiku z zunajcelično domeno DC-SIGN in je zato tudi najpomembnejši za vezavo. To je potrdilo domneve o pomembnosti sladkornega obroča za interakcije v vezavnem mestu DC-SIGN. Tudi aromatske skupine so kazale STD efekte, vendar so bili ti nižji v primerjavi z D-manozo. Opazili smo, da višina STD efektov dobro korelira s substituenti fenilne skupine ligandov **1–3** kot tudi lipofilnostjo posameznega liganda. Za ligand **1** so bili določeni STD efekti za aromatske skupine okrog 50 %, medtem ko so bili ti efekti okrog 60 % pri ligandu **2**. Liganda **1** in **2** se med seboj razlikujeta po poziciji karboksilne skupine na fenilnem obroču. Ligand **3** je metilni ester **2** in takšno povečanje lipofilnosti je doprineslo k povečanju STD efektov na okrog 70 %. Močne STD efekte smo opazili tudi pri ligandu **4**, ki je najbolj lipofilen izmed **1–4**, vendar je to le skupni prispevek simetričnih protonov, saj v NMR spektrih nismo mogli ločiti med protoni s posameznega naftalenskega obroča zaradi simetrije liganda. Ugotovili smo, da na opažene STD efekte ligandov **1–4** vpliva tudi  $T_1$  longitudinalni relaksacijski čas prostih nasičenih ligandov v raztopini. Najmanjši vpliv ima relaksacija pri ligandu **2** in največjega pri ligandu **4**. Za dendronski antagonist **5** smo opazili, da najmočnejše STD efekte izkazujejo protoni manoznih obročev. Pri vezavi liganda na DC-SIGN so močno sodelovali

tudi aromatski protoni naftalenskih skupin, medtem ko so protoni distančnikov izkazovali najnižje STD efekte.

Primerjava normaliziranih STD rastočih krivulj je razkrila, da je konformacija sladkornega obroča v vezavnem mestu DC-SIGN enaka za ligande **1–4**. Prav tako je vezavni način zelo podoben pri ligandih **1–4** za proton H<sub>c</sub> naftalenske skupine, kar najverjetneje kaže na interakcije s fenilalaninskim ostankom v hidrofobnem žepku vezavnega mesta. Razlike med rastočimi krivuljami, ki smo jih opazili za ostale protone obeh aromatskih obročev, kažejo na to, da variacije v strukturah ligandov medsebojno vplivajo tako na vezavno konformacijo kot tudi na način vezave obeh obročev. Za natančnejšo informacijo bi lahko uporabili tudi prenesene NOE eksperimente, kjer razlika med NOESY NMR spektri vezanega in prostega liganda nosi informacije o bioaktivni konformaciji ligandov.

S STD NMR direktnimi titracijskimi metodami smo ligandom **1–4** določili vrednosti K<sub>D</sub> in tako ocenili njihovo afiniteto vezave do zunajcelične domene DC-SIGN. Vrednosti K<sub>D</sub> so bile v submilimolarnem območju. Najverjetnejši razlog za takšne rezultate je velika fleksibilnost glicerolnega distančnika z aromatskimi obroči, zaradi česar ligandi ne tvorijo optimalnih interakcij v vezavnem mestu, kot je bilo prvotno načrtovano. Ker na določitev K<sub>D</sub> preko direktnih titracijskih metod vplivajo različni eksperimentalni faktorji, smo njihov vpliv preverili s pomočjo začetnih naklonov rastočih STD krivulj. Rezultati obeh meritev so se zelo dobro ujemale, kar nakazuje na to, da so bili eksperimentalni pogoji titracij ustrezno izbrani.

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da je za povečanje afinitete monovalentnih antagonistov pomembna večja lipofilnost in manjša fleksibilnost spojin. Za bolj natančne študije interakcij med dendronskimi antagonisti in DC-SIGN je potrebno spojine načrtovati tako, da se bo njihova topnost še povečala. Oblikovanje učinkovitih antagonistov DC-SIGN ne obeta samo preprečevanja okužb z virusom HIV-1, ampak tudi z drugimi številnimi patogeni, ki jih veže receptor. Takšna nova znanja in odkritja so pomembna in dobrodošla pri visokem porastu protimikrobne odpornosti, ki jo beležimo v zadnjih letih.

## 8. Literatura

1. Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito SW: Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 7. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfija, 2013: 15–18, 48, 49, 61–104, 1074.
2. WHO, Fact sheet N°310: The top 10 causes of death. 2014, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (dostopano: 29. 1. 2015).
3. Global Health Policy: The U.S. Government & Global Emerging Infectious Disease Preparedness and Response, <http://kff.org/global-health-policy/fact-sheet/the-u-s-government-global-emerging-infectious-disease-preparedness-and-response/> (dostopano: 15. 1. 2015).
4. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ: Immunobiology. The immune system in health and disease. 5. izdaja, Garland Publishing, New York, 2001.
5. Hart DNJ, MacDonald K, Vuckovic S, Clark GJ: Phenotypic characterization of dendritic cells. Dendritic Cells. Biology and clinical applications. 2. izdaja, Academic Press, London, 2001.
6. van den Berg LM, Gringhuis SI, Geijtenbeek TBH: An evolutionary perspective on C-type lectins in infection and immunity. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1253 (1): 149–158.
7. Dzopalic T, Rajkovic I, Dragicevic A, Colic M: The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunol Res* 2012; 52 (1-2): 20–33.
8. Gordon S: Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. *Cell* 2002; 111 (7): 927–930.
9. Takeuchi O, Akira S: Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010; 140 (6): 805–820.
10. Anderluh M, DC-SIGN Antagonists – A Paradigm of C-Type Lectin Binding Inhibition. Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. InTech: 2012. Dostopno na: <http://www.intechopen.com/books/carbohydrates-comprehensive-studies-on-glycobiology-and-glycotechnology/dc-sign-antagonists-a-paradigm-of-c-type-lectin-binding-inhibition>.
11. Loris R: Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572 (2-3): 198–208.
12. Audfray A, Varrot A, Imberty A: Bacteria love our sugars: Interaction between soluble lectins and human fucosylated glycans, structures, thermodynamics and design of competing glycoconjugates. *C R Chim* 2013; 16 (5): 482–490.
13. Anderluh M, Jug G, Svajger U, Obermajer N: DC-SIGN antagonists, a potential new class of anti-infectives. *Curr Med Chem* 2012; 19 (7): 992–1007.
14. Soilleux EJ: DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) and DC-SIGN-related (DC-SIGNR): friend or foe? *Clin Sci* 2003; 104 (4): 437–446.
15. Svajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N: C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal* 2010; 22 (10): 1397–1405.
16. Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K: A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem* 2001; 276 (31): 28939–28945.
17. van Kooyk Y, Geijtenbeek TB: DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3 (9): 697–709.
18. Danial M, Klok HA: Polymeric anti-HIV therapeutics. *Macromol Biosci* 2015; 15 (1): 9–35.
19. da Silva RC, Segat L, Crovella S: Role of DC-SIGN and L-SIGN receptors in HIV-1 vertical transmission. *Hum Immunol* 2011; 72 (4): 305–311.

20. Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR: DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 2002; 16 (1): 135–144.
21. Trumpfheller C, Park CG, Finke J, Steinman RM, Granelli-Piperno A: Cell type-dependent retention and transmission of HIV-1 by DC-SIGN. *Int Immunol* 2003; 15 (2): 289–298.
22. Hodges A, Sharrocks K, Edelmann M, Baban D, Moris A, Schwartz O, Drakesmith H, Davies K, Kessler B, McMichael A, Simmons A: Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat Immunol* 2007; 8 (6): 569–577.
23. Sodhi A, Montaner S, Gutkind JS: Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5 (12): 998–1012.
24. Tomašič T, Hajšek D, Luzar J, Obermajer N, Petit-Haertlein I, Fieschi F, Anderluh M: Monovalent mannose-based DC-SIGN antagonists: Targeting the hydrophobic groove of the receptor. *Eur J Med Chem* 2014; 75: 308–326.
25. Tabarani G, Thepaut M, Stroebel D, Ebel C, Vives C, Vachette P, Durand D, Fieschi F: DC-SIGN neck domain is a pH-sensor controlling oligomerization: SAXS and hydrodynamic studies of extracellular domain. *J Biol Chem* 2009; 284 (32): 21229–21240.
26. Altfeld M, Fadda L, Frleta D, Bhardwaj N: DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat Rev Immunol* 2011; 11 (3): 176–186.
27. Liu H, Bi W, Wang Q, Lu L, Jiang S: Receptor Binding Domain Based HIV Vaccines. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 1–9.
28. Haigwood NL: HIV: Tied down by its own receptor. *Nature* 2015; 519 (7541): 36–37.
29. UNAIDS: Report on the Global AIDS epidemic. 2012.
30. UNAIDS, WHO, Unicef, GLOBAL AIDS RESPONSE PROGRESS REPORTING., [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/GARPR\\_2014\\_guidelines\\_en\\_0.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/GARPR_2014_guidelines_en_0.pdf) (dostopano: 26. 2. 2015).
31. WHO, Fact sheet N°360: HIV/AIDS. 2014, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/> (dostopano: 20. 2. 2015).
32. UNAID. World drug report: more needs to be done to tackle injecting drug use and HIV. 2014, <http://www.unaids.org/en/resources/presscentre/featurestories/2014/june/20140626worlddrugreport> (dostopano: 20. 2. 2015).
33. AIDSinfo. <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf> (dostopano: 20. 2. 2015).
34. Lederman MM, Offord RE, Hartley O: Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nat Rev Immunol* 2006; 6 (5): 371–382.
35. Slovensko društvo za boj proti nalezljivim boleznim, <http://www.drustvo-bpnb.si/> (dostopano: 17. 1. 2015).
36. WHO, Microbicides., <http://www.who.int/hiv/topics/microbicides/microbicides/en/> (dostopano: 20. 2. 2015).
37. Obermajer N, Sattin S, Colombo C, Bruno M, Svajger U, Anderluh M, Bernardi A: Design, synthesis and activity evaluation of mannose-based DC-SIGN antagonists. *Mol Diversity* 2011; 15 (2): 347–360.
38. Guo Y, Feinberg H, Conroy E, Mitchell DA, Alvarez R, Blixt O, Taylor ME, Weis WI, Drickamer K: Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11 (7): 591–598.
39. Mangold SL, Prost LR, Kiessling LL: Quinoxalinone Inhibitors of the Lectin DC-SIGN. *Chem Sci* 2012; 3 (3): 772–777.

40. Becer CR, Gibson MI, Geng J, Ilyas R, Wallis R, Mitchell DA, Haddleton DM: High-affinity glycopolymer binding to human DC-SIGN and disruption of DC-SIGN interactions with HIV envelope glycoprotein. *J Am Chem Soc* 2010; 132 (43): 15130–15132.
41. Sattin S, Daggetti A, Thépaut M, Berzi A, Sánchez-Navarro M, Tabarani G, Rojo J, Fieschi F, Clerici M, Bernardi A: Inhibition of DC-SIGN-Mediated HIV Infection by a Linear Trimannoside Mimic in a Tetravalent Presentation. *ACS Chem Biol* 2010; 5 (3): 301–312.
42. Astruc D, Boisselier E, Ornelas C: Dendrimers Designed for Functions: From Physical, Photophysical, and Supramolecular Properties to Applications in Sensing, Catalysis, Molecular Electronics, Photonics, and Nanomedicine. *Chem Rev* 2010; 110 (4): 1857–1959.
43. Boas U, Christensen JB, Heegaard PMH: Dendrimers in Medicine and Biotechnology: New Molecular Tools. The Royal Society of Chemistry UK, 2006.
44. Borrok MJ, Kiessling LL: Non-Carbohydrate Inhibitors of the Lectin DC-SIGN. *J Am Chem Soc* 2007; 129 (42): 12780–12785.
45. Prost LR, Grim JC, Tonelli M, Kiessling LL: Noncarbohydrate glycomimetics and glycoprotein surrogates as DC-SIGN antagonists and agonists. *ACS Chem Biol* 2012; 7 (9): 1603–1608.
46. Barile E, Pellecchia M: NMR-based approaches for the identification and optimization of inhibitors of protein-protein interactions. *Chem Rev* 2014; 114 (9): 4749–4763.
47. Bhunia A, Bhattacharjya S, Chatterjee S: Applications of saturation transfer difference NMR in biological systems. *Drug Discov Today* 2012; 17 (9-10): 505–513.
48. Merz KM, Ringe D, Reynolds CH: Drug design: structure- and ligand-based approaches. Cambridge University Press, New York, 2010: 17–29.
49. Duhr S, Braun D: Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (52): 19678–19682.
50. Pierce MM, Raman CS, Nall BT: Isothermal Titration Calorimetry of Protein–Protein Interactions. *Methods* 1999; 19 (2): 213–221.
51. Schasfoort RBM, Tudos AJ: Handbook of Surface Plasmon Resonance. The Royal Society of Chemistry, UK, 2008.
52. Feng W, Pan LF, Zhang MJ: Combination of NMR spectroscopy and X-ray crystallography offers unique advantages for elucidation of the structural basis of protein complex assembly. *Sci China Life Sci* 2011; 54 (2): 101–111.
53. Mayer M, Meyer B: Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* 2001; 123 (25): 6108–6117.
54. Scheepstra M, Nieto L, Hirsch AK, Fuchs S, Leysen S, Lam CV, in het Panhuis L, van Boeckel CA, Wienk H, Boelens R, Ottmann C, Milroy LG, Brunsveld L: A natural-product switch for a dynamic protein interface. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014; 53 (25): 6443–6448.
55. Bertini I, McGreevy KS, Parigi G: NMR of Biomolecules. Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
56. Zerbe O: BioNMR in drug research WILEY-VCH, Weinheim, 2003.
57. Claridge TDW: High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. 2. izdaja, Tetrahedron Organic Chemistry Series, Pergamon, 2009: Vol. 27.
58. Brand T, Cabrita EJ, Berger S: Intermolecular interaction as investigated by NOE and diffusion studies. *Prog Nucl Mag Res Sp* 2005; 46: 159–196.
59. Keller RM, Wüthrich K: Assignment of the heme c resonances in the 360 MHz <sup>1</sup>H NMR spectra of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 1978; 533 (1): 195–208.

60. Mayer M, Meyer B: Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed* 1999; 38 (12): 1784–1788.
61. Haselhorst T, Lamerz AC, Itzstein M: Saturation transfer difference NMR spectroscopy as a technique to investigate protein-carbohydrate interactions in solution. *Methods Mol Biol* 2009; 534: 375–386.
62. Viegas A, Manso J, Nobrega FL, Cabrita EJ: Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J Chem Educ* 2011; 88 (7): 990–994.
63. Angulo J, Nieto PM: STD-NMR: application to transient interactions between biomolecules—a quantitative approach. *Eur Biophys J* 2011; 40 (12): 1357–1369.
64. Mayer M, James TL: NMR-based characterization of phenothiazines as a RNA binding scaffold. *J Am Chem Soc* 2004; 126 (13): 4453–4460.
65. Tanoli SKA, Tanoli NU, Usmani S, Zaheer Ul H, Ferreira AG: The exploration of interaction studies of smaller size, mostly ignored yet intrinsically inestimable molecules towards BSA; An example of STD and DOSY NMR. *Cent Eur J Chem* 2014; 12 (3): 332–340.
66. Angulo J, Enriquez-Navas PM, Nieto PM: Ligand-receptor binding affinities from saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy: the binding isotherm of STD initial growth rates. *Chemistry* 2010; 16 (26): 7803–7812.
67. Johnson MA, Pinto BM: Saturation transfer difference 1D-TOCSY experiments to map the topography of oligosaccharides recognized by a monoclonal antibody directed against the cell-wall polysaccharide of group A streptococcus. *J Am Chem Soc* 2002; 124 (51): 15368–15374.
68. Mari S, Serrano-Gomez D, Canada FJ, Corbi AL, Jimenez-Barbero J: 1D saturation transfer difference NMR experiments on living cells: the DC-SIGN/oligomannose interaction. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004; 44 (2): 296–298.
69. Streiff JH, Juranic NO, Macura SI, Warner DO, Jones KA, Perkins WJ: Saturation transfer difference nuclear magnetic resonance spectroscopy as a method for screening proteins for anesthetic binding. *Mol Pharmacol* 2004; 66 (4): 929–935.
70. Barelier S, Pons J, Marcillat O, Lancelin JM, Krimm I: Fragment-Based Deconstruction of Bcl-xL Inhibitors. *J Med Chem* 2010; 53 (6): 2577–2588.
71. Guzzi C, Muñoz-García JC, Enriquez-Navas PM, Rojo J, Angulo J, Nieto PM: NMR studies on carbohydrate interactions with DC-SIGN towards a quantitative STD analysis. *Pure Appl Chem* 2013; 85 (9): 1771–1787.
72. Zhou X, Li X, Chen X: Binding mechanism of Orange G to human serum albumin: Saturation transfer difference-NMR, spectroscopic and computational techniques. *Dyes Pigm* 2013; 98 (2): 212–220.
73. Shi Y, Ardá A, Pinto BM: Combined molecular dynamics, STD-NMR, and CORCEMA protocol yields structural model for a UDP-galactopyranose mutase–inhibitor complex. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; 25 (6): 1284–1287.
74. Jayalakshmi V, Krishna NR: Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *J Magn Reson* 2002; 155 (1): 106–118.
75. Enriquez-Navas PM, Guzzi C, Munoz-Garcia JC, Nieto PM, Angulo J: Structures of Glycans Bound to Receptors from Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy: Quantitative Analysis by Using CORCEMA-ST. *Methods Mol Biol* 2015; 1273: 475–487.

76. Angulo J, Díaz I, Reina JJ, Tabarani G, Fieschi F, Rojo J, Nieto PM: Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy Characterization of Dual Binding Mode of a Mannose Disaccharide to DC-SIGN. *ChemBioChem* 2008; 9 (14): 2225–2227.
77. Tabarani G, Reina JJ, Ebel C, Vives C, Lortat-Jacob H, Rojo J, Fieschi F: Mannose hyperbranched dendritic polymers interact with clustered organization of DC-SIGN and inhibit gp120 binding. *FEBS Lett* 2006; 580 (10): 2402–2408.
78. Timpano G, Tabarani G, Anderluh M, Invernizzi D, Vasile F, Potenza D, Nieto PM, Rojo J, Fieschi F, Bernardi A: Synthesis of novel DC-SIGN ligands with an alpha-fucosylamide anchor. *Chembiochem* 2008; 9 (12): 1921–1930.
79. Agilent Technologies: Agilent BioPack Experiment Guide. 2012: stran 81.
80. Varian NMR Systems with VnmrJ Software : NMR Spectroscopy, User Guide. 2007: Stran 169.
81. Ludwig IS, Lekkerkerker AN, Depla E, Bosman F, Musters RJP, Depraetere S, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH: Hepatitis C Virus Targets DC-SIGN and L-SIGN To Escape Lysosomal Degradation. *J Virol* 2004; 78 (15): 8322–8332.
82. Angulo J, Langpap B, Blume A, Biet T, Meyer B, Krishna NR, Peters H, Palcic MM, Peters T: Blood group B galactosyltransferase: insights into substrate binding from NMR experiments. *J Am Chem Soc* 2006; 128 (41): 13529–13538.