



FORMULÁR RS1

Ročná správa o riešení projektu

Evidenčné číslo projektu: 0117-06

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

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

Organizácia žiadateľa: Chemický ústav SAV Bratislava

Začiatok riešenia projektu (MM/RR): 02/07

Koniec riešenia projektu (MM/RR): 12/09

Sumy uvádzajte v Sk na 2 desatinné miesta

1	Pridelené finančné prostriedky z APVV v roku 2007	2055000,00
2	Vyčerpané v roku 2007	2053762,54
3	Nevyčerpané v roku 2007 (1-2)	1237,46

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

Podpis:
zodpovedný riešiteľ

Podpis:
štatutárny zástupca

Dátum: 30.1.2008

Pečiatka



Evidenčné číslo projektu: 0117-06

Rozbor riešenia projektu

Uved'te podľa nasledovnej záväznej osnovy (max. 10 strán):

1. Postup prác pri riešení projektu na pracovisku žiadateľa a spoluriešiteľov vzhľadom na harmonogram riešenia projektu.

Počítačové modelovanie:

Konfigurovanie 24-hod prevádzky multiprocessorových serverov

V dňoch od 1.4.2007 bol do prevádzky uvádzaný multiprocessorový HPC (High Performance Computing) server pozostávajúci z 15 ks intel serverov (2 cpu x 4-core) a 9 ks intel serverov (2 cpu x 1-core). Bola vykonaná inštalácia hardwaru, pripravená kabeláž a rackové umiestnenie, spolu s optimalizovaním a pripojením PWU (Power Distribution Unit) a záložného zdroja. Bola navrhnutá architektúra sieťových rozvodov na báze 1GB linky. Na počítače bola inštalovaná bezdisková verzia 32-bitového operačného systému Linux (distribúcia Gentoo) formou distribuovaného zdieľania z centrálného servera. Operačný systém bol optimalizovaný na paralelné HPC výpočty. Vytvoril sa centrálny dátový server pre ukladanie a zálohovanie výpočtov pozostávajúci z vysokorýchlostného diskového poľa o kapacite 1 TB. Následne prebehlo odladenie operačného systému a príprava základného softwarového vybavenia pre užívateľov vrátane PBS a iných programov určených na monitorovanie a beh multiprocessorových klastrov. Niektoré programové balíky vyžadovali vlastnú kompiláciu a inštaláciu pre špecifický druh počítačovej architektúry. Administrácia počítačového klastra spočívala v monitorovaní a optimalizácii vyťaženia, odstraňovania prípadných porúch, výmeny nefunkčných kusov hardwaru, školenie užívateľov, príprava a úpravy nového programového vybavenia podľa požiadaviek užívateľov, 24 hod. poruchový servis. Konkrétne boli pre užívateľov pripravené a nainštalované chemické balíky Gaussian 2003, Gromacs 3.3.2, Schrodinger 8, ADF 2006, ADF 2007, VMD, AMBER 8.

Príprava 3D štruktúr ľudských manozidáz homológym modelovaním

Na základe prístupných kryštalografických štruktúr Golgi α -manozidázy II z *Drosophila Melanogaster* (dGM) a lyzozomálnej α -manozidázy z *Bos Taurus* (bLM), a proteínových sekvencií ľudských manozidáz boli pripravené trojrozmerné modely ľudskej Golgi manozidázy (lGM) a lyzozomálnej manozidázy (hLM) pomocou programových balíkov Modeller v9 a Prime 1.6. Geometria pripravených modelov bola ďalej upresňovaná optimalizáciou na úrovni molekulovej mechaniky aplikáciou Amberu ff99. Stabilita výsledných štruktúr s dôrazom na aktívne centrum enzýmu bola testovaná molekulovou dynamikou použijúc programový balík AMBER 8 a parametre z Ammber FF99. Vhľadom na to, že obidva študované enzýmy pracujú *in vivo* pri výrazne rozdielnom pH (hGM, pH=7 a hLM, pH=4.5), ich štruktúty boli ďalej upresňované pomocou programu Propka 2. Tento program umožňuje predpovedať pK_a hodnoty ionizujúcich aminokyselín priamo v enzýme s možnosťou zahrnutia do výpočtu kofaktor poprípade iné ligandy ako sú substráty alebo inhibítory.

Štruktúrálny dizajn swainsonínových inhibítorov pomocou molekulového dokovania

V priebehu roku 2007 bola uskutočnená prvá fáza dokovacích výpočtov s cieľom overiť presnosť dokovacieho programu Glide 4.5 a vytvoriť modelovú skórovaciu funkciu pre koreláciu a predpoveď väzbovej afinity medzi inhibítorom a enzýmom. Presnosť dokovania bola založená na porovnávaní predpovedaných geometrických póz inhibítora v aktívnom mieste enzýmu s experimentálne dostupnými ca. 15 kryštalografickými štruktúrami komplexov enzýmu s inhibítorom. Teoretické hodnoty väzbovej afinity napočítané na úrovni molekulovej mechaniky (OPLS 2001 ff) boli fitované s experimentálnymi inhibičnými konštantami K_i swainsonínových a manostatínových štruktúrnych mimetik. Teoretická metóda lineárnej interakčnej energie (LIE) bola použitá pri výpočtoch hodnôt α , β a γ korelačných koeficientov pre elektrostatické, solvatačné a van der Waalove deskripty fitovaných na testovacej sade ca 30 inhibítorov s použitím programu Laison 4.5. Vytvorená skórovacia



funkcia bude použitá v ďalších dokovacích fázach na zvýšenie presnosti predpovedaných K_i hodnôt *de novo* inhibítorov a štruktúr filtrovaných z virtuálneho skríningu.

Molekulárna biológia:

Cieľom molekulárno –biologickej časti projektu bolo uplatnenie metódy heterológnej funkčnej expresie pri analýze putatívnych ortológov lyzozomálnych mannozidáz *D. melanogaster* (typ Canton S), ktoré svojou sekvenčnou homológiou patria do rodiny, ktorej členom je aj mannozidáza s vyriešenou 3D štruktúrou. Tieto ortológy boli už skôr identifikované cez analýzu génovej databázy *D. melanogaster* použitím ľudského homológu lyzozomálnej mannozidázy a uplatnením, tzv. PFAM motívu glykozylyhydrolázovej rodiny GH 38 metódou ClustalX a Treeview. Metódou BLAST pri identifikácii kódujúcich častí sme vychádzali z depozitovaných DNA sekvencií sprístupnených v databáze génov s príslušným označením. Amplifikáciou pomocou RT-PCR a použitím gén-špecifických oligoprimerov a mRNA izolovanej z dospelých mušiek *D. melanogaster* boli korešpondujúce DNA fragmenty daných ortológov naklonované do expresného vektora pPICZa pod kontrolu AOXI indukovateľného promótoru.

Klonovanie lyzozomálnej mannozidázy z *D. melanogaster* /dLM 408/ (NP 609408).

-Izolácia celkovej RNA z *D. melanogaster* CS: RNA bola izolovaná metódou zmrazovania homogenátu *D. melanogaster* v tekutom dusiku s použitím „SV Total RNA Isolation System“ (Promega)

- Príprava cDNAs: cDNAs boli pripravené z celkovej RNA použitím „ImProm-II™ Reverse Transcriptase“ (Promega) a oligo dT₁₈ primeru.

-Amplifikácia génu kódujúceho solubilnú časť lyzozomálnej mannozidázy dLM 408: DNA úsek, ktorý predstavuje proteín zbavený cytoplazmatickej a transmembránovej domény, počnúc aminokyselinou Cys-34 a končiac Stop-kodonom, bol získaný PCR metódou s použitím gén-špecifických oligoprimerov so zabudovanou sekvenciou pre restriktívnu endonukleázu *KpnI*.

-Klonovanie PCR produktu kódujúceho solubilnú časť dLM 408: Purifikovaný PCR produkt, opracovaný restriktívnu endonukleázou *Kpn I* bol klonovaný do linearizovaného kvasinkového expresného plazmidu pPICZa-A (Invitrogen). Rekombinantný plazmid bol transformovaný do *E. coli* (Nova Blue), amplifikovaný a následne preparatívne izolovaný pomocou plazmidového izolačného kitu (Qiagen).

-Transformácia *Pichia pastoris* GS115: po predchádzajúcej linearizácii rekombinantného plazmidu restriktívnu endonukleázou *PmeI* a metódou elektroporácie bol na prítomnosť transgénu selektovaný pozitívny kvasinkový klon.

Heterológna expresia lyzozomálnej mannozidázy dLM 408 v *P. pastoris*.

Kódujúca časť homológu lyzozomálnej mannozidázy (NP 609408), ktorá nevykazovala bodovú mutáciu bola exprimovaná v systéme *P. pastoris* a metódou ďalšej funkčnej analýzy k syntetickému substrátu pNP-alpha-mannopyranozid-u.

Stanovenie enzymovej aktivity rekombinantnej mannozidázy dLM408.

Hydrolyza pNP-alpha-mannopyranozidu sa uskutočnila pri 37 C použitím 1-5 ul rekombinantného enzýmu /podľa špecifickej aktivity/ v celkovom objeme 50 ul reakčnej zmesi. Katalýza sa uskutočnila v prostredí 100mM acetátového tlmivého roztoku pri optimálnom pH 5,2 a v absencii ionov. Po ukončení reakcie, pridaním 100 ul uhličitanu sodného do výslednej koncentrácie 150mM, bol produkt reakcie analyzovaný meraním absorbancie pri λ 410. Pre účely stanovenia selektivity swainsonínu k rekombinantnej mannozidáze bol inhibítor pripravený v redestilovanej H₂O a testovaný v oblasti koncentrácií 0.1 – 10 μ M. Pri určení pH optima aktivity enzýmu, reakcia sa uskutočnila použitím McIlvaine tlmivého roztoku v oblasti pH 3,5 až 7,0

Syntéza:

Nové swainsonínové mimetikum 7,8-dihydroxyhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrimidín-6(7H)-ón bolo nasyntetizované v laboratóriu Dr. Siriwardenu na Univerzite v Amiens a testovaná jeho biologická aktivita voči hGM a hLM mannozidázam *in vitro*. Následne bolo pripravených niekoľko jeho derivátov



so substitúciou v polohe 2. Predbežná biologická aktivita jedného derivátu bola testovaná v našom laboratóriu voči rekombinantnej *drosophila* lysozomálnej manozidáze (dLM) a meraná závislosť K_i hodnôt od pH prostredia enzýmu s cieľom optimalizovať podmienky na následné merania s hGM a hLM enzýmami.

2. Rozbor výsledkov riešenia vzhľadom na stanovené ciele.

Počítačové modelovanie:

Konfigurovanie 24-hod prevádzky multiprocessorových serverov

32-bitová linuxová architektúra sa ukázala ako stabilná verzia operačného systému umožňujúca bezproblémovú kompiláciu chemických programov a ich efektívny chod pre paralelné a distribuované výpočty. Programy ADF a Gaussian pri paralelných výpočtoch škálovali takmer lineárne do 8 procesorov (80 %), čo umožní realizovať časovo náročné *ab initio* a DFT výpočty systémov substrát-kofaktor, substrát-aktívne centrum enzýmu popri prípade substrát-kofaktor-enzým v prípade hybridných QM/MM výpočtov. Programy Amber, Jaguár a Qsite sa ukázali byť menej efektívne a nestabilné pri viac ako štvorprocesorových výpočtoch. Hlavná príčina ich nízkeho škálovania je spôsobená v definovanej komunikácii medzi procesorovými nódmí prostredníctvom programu MPICH1, nestabilitu pri Jaguári spôsoboval častý výskyt konfliktov pri svapovacích zápisoch na hardisk. Vzhľadom na neefektívne škálovanie chemických programov s MPICH1, bol Gromacs pre výpočty molekulovej dynamiky paralelizovaný prostredníctvom balíka LAM7, kde nastalo vylepšenie škálovania do 8 procesorov (47 %) a bolo možné uskutočniť náročné výpočty pre systémy s viac ako 100 tisíc atómami.

Distribuované výpočty týkajúce sa virtuálneho skríningu uskutočnené programami v balíku Schrodinger (Ligprep, Qikprop, Glide, Liaison) škálovali lineárne na maximálny počet procesorov s limitom na počet zakúpených licencií. Distribuovaný spôsob výpočtov umožní efektívne skrínovať databázy zlúčenín ako napr. ZINC databáza (6 miliónov zlúčenín) v ďalšej fáze projektu.

Limity použitej 32-bitovej architektúry sa objavili pri náročných výpočtoch, kde na komunikáciu programov s veľkými dátovými súbormi bolo vyžadované použitie viac ako 2GB fyzickej pamäte RAM. (analýza trajektórii z molekulovej dynamiky, preprocessing a filtrovanie databázových súborov, *ab initio* post Hartree-Fockové výpočty systémov z viac ako 50 atómami). Preto plánujeme v ďalšej fáze projektu prekonfigurovať operačný systém na 64-bitovú architektúru, ktorým sa budú eliminovať limity týkajúce veľkosti použitia RAM pri náročných výpočtoch.

Príprava 3D štruktúr ľudských manozidáz homológny modelovaním

Trojrozmerné modely hGM a hLM postavené na základe jedného templátu (buď dGM alebo bLM) vykazovali významné štrukturálne chyby. Až s použitím obidvoch kryštalografických templátov sa dosiahla požadovaná presnosť homológnych modelov v rozsahu celej proteínovej sekvencie pre každý model. Hlavný dôraz sa kládol na dosiahnutie maximálnej geometrickej presnosti aktívneho centra enzýmov (štruktúra ca do 1,5 nm od naviazaného kovového kofaktora, Zn^{2+} iónu). Časť nesprávne umiestnených bočných reťazcov si vyžiadala set niekoľkých po sebe nasledujúcich optimalizačných procedúr spojených s 1 ns molekulovou dynamikou enzýmového systému s naviazaným swainsonínom a kovovým kofaktorom. Konfigurácie bočných reťazcov ionizujúcich aminokyselinových reziduí, ako sú asparágínová alebo glutámová kyselina atď., boli ionizované podľa pK_a výpočtov Propka programu. Pre hGM pre pH=7 a pre hLM pre pH=5. Tu sa ukázalo, že napriek vysokej podobnosti a identite aminokyselinových reziduí medzi hGM a hLM v aktívnom centre enzýmu, protonizované stavy ich ionizujúcich reziduí nie sú vo všetkých miestach identické. To má za následok, že interakcie manozidázových inhibítorov v aktívnom mieste obidvoch enzýmov môžu vykazovať odlišné väzbové afinity. Tento predpoklad sa budeme snažiť potvrdiť na experimentálnej úrovni v ďalších fázach projektu, keďže sa ukazuje ako jeden z kľúčových faktorov pre štruktúrny dizajn selektívnych manozidázových inhibítorov hGM s antirakovinotvornými účinkami. Druhá stratégia pre počítačový dizajn selektívnych inhibítorov hGM bola navrhnutá na základe primárnych a sekundárnych rozdielov medzi aktívnymi centrami v obidvoch homológnych modeloch hGM a hLM enzýmov vizualizovaných v superpozícii. Hlavný rozdiel bol indikovaný v aminokyselinovej



sekvencii Pro350-Phe351-Tyr352-Ser353 v hGM, ktorý prislúchal sekvencii Leu257-Pro258-Asn259-Gly260 v hLM, pričom bočné reťazce Tyr352-Ser353 v hGM boli orientované smere, v ktorom sa viažu manozidázové inhibítory do aktívneho centra a naopak pri hLM bol bočný reťazec v Asn259 orientovaný od aktívneho centra, plus Gly260 postráda bočný reťazec. Výsledkom takéhoto štruktúrného usporiadania je vznik hydrofóbneho vrečka, ktoré je pri hGM definované polohou bočného reťazca Tyr352. Pri hLM je hydrofóbny priestor oveľa väčší a otvorený do priestoru vďaka geometrii sekvencie Asn259-Gly260. Preto bude štruktúrny dizajn selektívnych inhibítorov hGM zameraný na vývoj štruktúry, ktorá dokáže špecificky interagovať s bočným reťazcom Tyr352 pomocou hydrofóbných interakcií pričom si zachová biologickú aktivitu na úrovni swainsonínu alebo manostatínu.

Štruktúrny dizajn swainsonínových inhibítorov pomocou molekulového dokovania

Presnosť dokovacieho programu Glide 4.5 bola testovaná na sade ca 15 manozidázových inhibítorov, pre ktoré sme mali prístupné kryštalografické štruktúry komplexov dGM s inhibítormi. Väčšia časť predpovedaných póz naviazaných inhibítorov (ca 70 %) bola v súlade s experimentom, pričom presnosť predpovedí závisela od viacerých faktorov: správnej konfigurácii ionizovateľných bočných reťazcov aminokyselinových reziduí v aktívnom mieste enzýmu, konfigurácii aminoskupín v inhibítoroch, konformácii kruhov pri cyklických štruktúrach inhibítorov a hlavne od parametrizácie atómových nábojov na enzýme a inhibítore. Konfigurácia aminoskupín v inhibítoroch bola definovaná na základe ich pK_a hodnôt napočítaných pre vodné prostredie použitím presných kvantovo-chemických výpočtov (DFT-B3LYP) v programe Jaguar. Atómové náboje na enzýme a kovovom kofaktore (Zn^{2+}) boli počítané pomocou hybridnej QM/MM metódy (DFT-B3LYP/6-31G(d,p):OPLS2001) pomocou programu Qsite 4.5. Dramatická redistribúcia nábojov (ca až do 30 %) oproti štandardne používaným atómovým nábojom parametrizovaných pre molekulovú mechaniku bola zaznamenaná pre atómové náboje na Zn^{2+} ióne a aminokyselinách priamo interagujúcich s týmto kofaktorom.

Modelová skórovacia funkcia pre koreláciu a predpoveď väzbovej afinity medzi inhibítorom a enzýmom bola vytvorená z testovacej sady ca 30 inhibítorov s použitím programu Liaison 4.5. Presnosť skórovacej funkcie variovala v závislosti od použitých konfigurácií inhibítorov (neutrálne *versus* protonizované aminoskupiny) a dokovacích modelov (homológne modely *versus* kryštalografické štruktúry), kde sa RMS chyba pohybovala v rozmedzí 0.4-0.8 kcal/mol pre predpoveď väzbovej afinity inhibítorov v aktívnych centrách dGM, hGM, bLM a hLM.

Molekulárna biológia:

Charakterizácia rekombinantnej manozidázy dLM408:

Kódujúca časť klonovanej manozidázy predstavuje dĺžku 3141 bp a kóduje proteín o veľkosti 1047 aminokyselinových zvyškov. Rekombinantná manozidáza dLM408 vykazuje aktivitu v rozmedzí pH : 4-6 s reakčným optimom pri pH : 5,2. Teplotné optimum enzymovej reakcie je v širokej oblasti od 25 do 40 C, hodnota K_m pre pNP-alpha-mannopyranozid je 2mM. Swainsonine, reverzibilný inhibítor manozidáz, v koncentrácii 1uM inhiboval rekombinantný enzým za daných reakčných podmienok na 100%.

Pôvodným vedeckým cieľom v prvej fáze projektu bolo klonovanie a expresia ľudskej manozidázy II a IIx Golgiho aparátu. Vzhľadom nato, že náš spolupracujúci partner na univerzite vo Viedni už pripravil klonovanú Man II a IIx v *P. pastoris*, naše ďalšie experimenty budú zamerané na štúdium ich expresie a funkčnej analýze. dLM 408 predstavuje novú manozidázu klonovanú z bezstavovcov, ktorá svojimi vlastnosťami sa začleňuje medzi ortológy manozidáz lyzozomálneho typu z *D. melanogaster*.