

INHIBITORY GALAKTOSYLTRANSFERAS

IREKHJARGAL JAMBAL, KAREL KEFURT
a JITKA MORAVCOVÁ*Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Jitka.Moravcova@vscht.cz*

Došlo 20.1.12, přijato 28.2.12.

**Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby
urychleného publikování.**Klíčová slova: galaktosyltransferasa, mechanismus, inhibi-
tory

Obsah

1. Úvod
2. Galaktosyltransferasy, mechanismus účinku
3. Inhibitory jako analogy donoru
4. Inhibitory mimikující tranzitní stav
5. Inhibitory jako bisubstrátové analogy
6. Závěr

1. Úvod

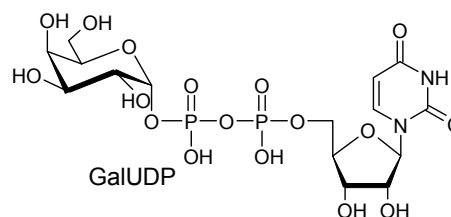
Pro existenci života jsou nezbytné čtyři hlavní skupiny makromolekul: nukleové kyseliny, proteiny, lipidy a sacharidy. Sacharidy se svými vlastnostmi vymykají ostatním biomakromolekulám, protože jako jediné mohou tvořit rozvětvené struktury a jejich monosacharidové jednotky mohou být pospojovány glykosidovou vazbou za vzniku nepřeberného množství isomerů. Tyto unikátní vlastnosti je předurčují zastávat funkci informačního systému v organismu¹. Aby totiž skupina látek mohla vystupovat jako biologický „hardware“, musí splňovat několik požadavků: a) specifické kódování, neboť informace musí být jednoznačná a musí být i dešifrovatelná s nízkou pravděpodobností špatné interpretace; b) šifrovací aktivní sekce biomolekuly musí mít malou velikost proto, aby její syntéza nebyla energeticky náročná; c) aktivní sekce musí být dobře prostorově přístupná; d) typ kódovací sloučeniny musí mít dostatečný potenciál pro rychlé strukturální změny. Všechny tyto znaky efektivně pracujícího kódovacího systému vykazují sacharidy vázané na proteiny nebo lipidy. Studium biosyntézy glykokonjugátů, jejich vlastností a interakcí s příslušnými receptory vede k porozumění a ovlivňování základních biologických procesů, jako je např. vzájemná interakce a komunikace buněk, která má

obrovský význam při léčení virových a bakteriálních infekcí, onkologických onemocnění, při hledání léčiv s cíleným účinkem² nebo při studiu genetických poruch. Kdybychom dokázali přerušit prvotní komunikaci hostitel-ské buňky s patogenem, pak se od léčení nemoci posuneme k prevenci.

Biosyntéza glykokonjugátů probíhá krok za krokem v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Exogenní monosacharidy penetrují do buňky a jsou přeměněny do stavebních bloků, které jsou dále transformovány na oligosacharidy a navázány na lipidickou nebo proteinovou kosturu. Jakmile se glykokonjugáty dostanou na povrch buňky, slouží jako ligandy. Biosyntéza glykokonjugátů je katalyzovaná především glykosyltransferasami, enzymy, které přenášejí sacharid z aktivovaného donoru, typicky glykosylnukleotidu, na vhodný akceptor buď se zachováním nebo s inverzí konfigurace na anomerním centru.

2. Galaktosyltransferasy, mechanismus účinku

Glykosyltransferasy³ se dělí podle podobnosti sekvence aminokyselin do 65 rodin⁴ a patří mezi ně i galaktosyltransferasy (GalT), které u savců přenášejí D-galaktosu z α -D-galaktosyluridindifosfátu (GalUDP) na různé akceptory za vzniku β (1-4), β (1-3), α (1-4) a α (1-3) glykosidové vazby⁵. Prvotní teorie byla, že vznik každé glykosidové vazby katalyzuje specifický enzym, ale po objevení isoenzymů pro mnohé GalT aktivity se opustila a nyní je zastávána teorie, že vznik jednoho typu glykosidové vazby může být katalyzován řadou enzymů. Skutečně byly charakterizovány různé enzymy pro každý typ GalT aktivity a v databázích jsou řazeny podle kódujících genů (<http://www.cazy.org>)⁶. Doposud sedm známých β (1-4)GalT využívá jako akceptor N-acetylglukosamin (GlcNAc) samotný nebo vázaný v N-glykanech, O-glykanech či glykolipidech a některé využívají rovněž D-glukosu za vzniku laktosy. Enzymů s β (1-3) aktivitou je rovněž sedm a akceptorem je opět GlcNAc. Galaktosa vázaná α (1-4) glykosidovou vazbou se nachází pouze v glykolipidech a je přenášena z donoru dvěma GalT na terminální β -galaktosu. Tři strukturně podobné α (1-3)GalT přenášejí D-galaktosu na terminální β -D-galaktopyranosu glykolipidů či glyko-



proteinů a jsou důležité tím, že lidé a primáti starého světa nemají geny kódující tyto enzymy, což způsobuje tzv. hyperakutní odmítnutí transplantovaného orgánu či tkáně pozorovanou při xenotransplantacích z vepřů na člověka⁷.

Pro racionální návrh inhibitorů GalT je výhodné znát 3D strukturu GalT, která je pro všechny doposud charakterizované GalT dána přítomností jednoho ze dvou základních strukturních motivů označovaných GT-A a GT-B a nebo nově objeveného GT-C, ale žádná korelace mezi katalytickým mechanismem enzymu a strukturním typem bohužel neexistuje⁸. Nicméně se předpokládá, že navázání donoru i akceptoru do aktivního místa enzymu s sebou přináší konformační změnu smyčky. Zdá se, že pro návrh inhibitorů má zatím větší význam znalost mechanismu, kterým GalT působí. Invertující GalT sledují jednoduchý mechanismus nukleofilní substituce S_N2 , kdy rychlost reakce je zvyšována účastí bazické skupiny aktivního místa na deprotonaci akceptoru a koordinací odstupující skupiny s kofaktorem (Schéma 1). Zachování konfigurace anomerního centra vyžaduje buď dvě následné S_N2 substituce s glykosylovaným enzymem jako meziproduktem (Schéma 2A), nebo uplatnění mechanismu označovaného jako S_Ni , pro který je charakteristický vznik těsného iontového páru umožňující přístup akceptoru pouze z opačné strany, než je odstupující skupina (Schéma 2B). V obou případech má tranzitní stav reakce podobu oxokarboniového iontu. Design studovaných inhibitorů se odvíjí od struktury donoru nebo tranzitního stavu a nově přicházejí bisubstrátové analogy spojující vlastnosti donoru a akceptoru. Nezanedbatelnou nepříjemností při studiu inhibice GalT je i fakt, že donor je prakticky pro všechny GalT stejný, že většina enzymů potřebuje jako kofaktor Mn^{2+} ionty a že donor je v aktivním místě vázán poměrně slabě. Odstupující uridindifosfát (UDP) je bohužel slabým inhibitorem a při enzymových reakcích je často odstraňován alkalickou fosfátasou. V dalším textu se budeme věnovat nejčastěji studovaným galaktosyltransferasám $\beta(1-4)$

GalT (cit.⁹), které jsou důležité v rozvoji onkogenních onemocněních, a $\alpha(1-3)$ GalT pro jejich roli v xenotransplantacích, pro ostatní odkazujeme na přehledové články^{10,11}.

3. Inhibitory jako analogy donoru

Jednou z taktik hledání inhibitorů je náhrada esterové C1-O-P vazby nebo difosfátového můstku v GalUDP stabilnějším uskupením. Pozornost byla proto zcela logicky soustředěna již před 20 lety na C-glykosidy, které jsou stabilní k hydrolýze a navíc mohou být užitečnými výchozími látkami pro bisubstrátové analogy. Přesto, že byla připravena celá řada C-analogů, údaje o jejich inhibiční aktivitě jsou více než skoupé; mnoho jich testováno vůbec nebylo. Neisosterní analog **1** s nehydrolyzovatelnou C1-P vazbou byl¹² kompetitivním inhibitorem $\beta(1-4)$ GalT (EC 2.4.1.38) s K_i 165 μ M srovnatelně účinným s uridintrifosfátem (UTP, K_i 128 μ M), zatímco K_m pro GalUDP bylo 13,7 μ M. Naproti tomu jednoduché galaktopyranosylfosfonáty **2-4** byly jen velmi slabými inhibitory $\beta(1-4)$ GalT a $\alpha(1-3)$ GalT, což opět ukazuje na důležitou roli D-ribofuranosy a nukleobáze pro navázání inhibitoru do aktivního centra enzymu. Škoda, že pro difosfát **5** připravený¹³ v roce 2000 nebyla publikována jeho aktivita proti $\beta(1-4)$ GalT; až později bylo zjištěno, že ani analog **5** ani jeho β -isomer inhibitory $\alpha(1-3)$ GalT nejsou¹⁴. Náhrada difosfátové vazby donoru můstkem z kyseliny vinné nebo malonové efektivní nebyla až na sloučeninu **6**, která byla slabým inhibitorem (K_M 1 mM) zřejmě jenom díky pyrrolidinovému kruhu¹⁵. Žádná aktivita proti $\beta(1-4)$ GalT nebyla nalezena, když byla difosfátová vazba nahrazena alkylem¹⁵; překvapivě ale zařazení D-glukosy jako můstku nesnížilo afinitu tohoto modifikovaného donoru **7** k $\beta(1-4)$ GalT (cit.¹⁵). Ani záměny difosfátové skupiny v GalUDP triazolovou jednotkou připojenou na C-1 galaktosy methy-

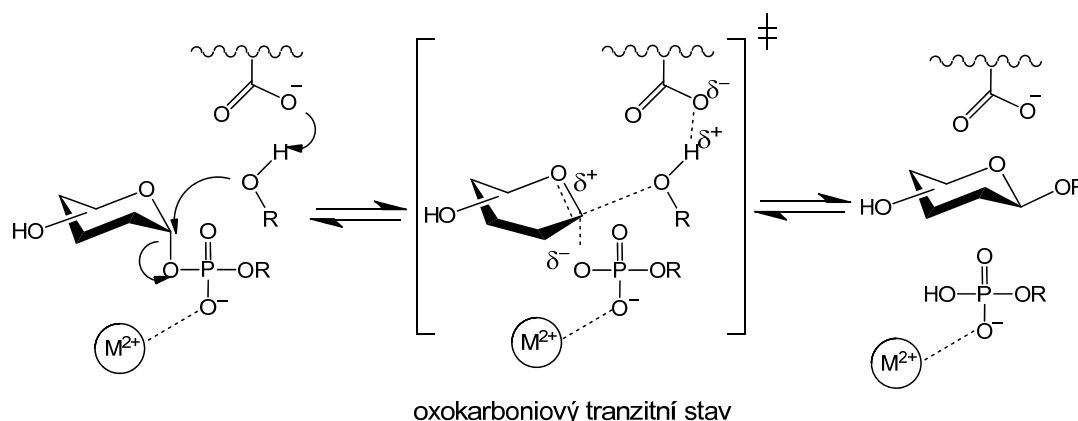


Schéma 1

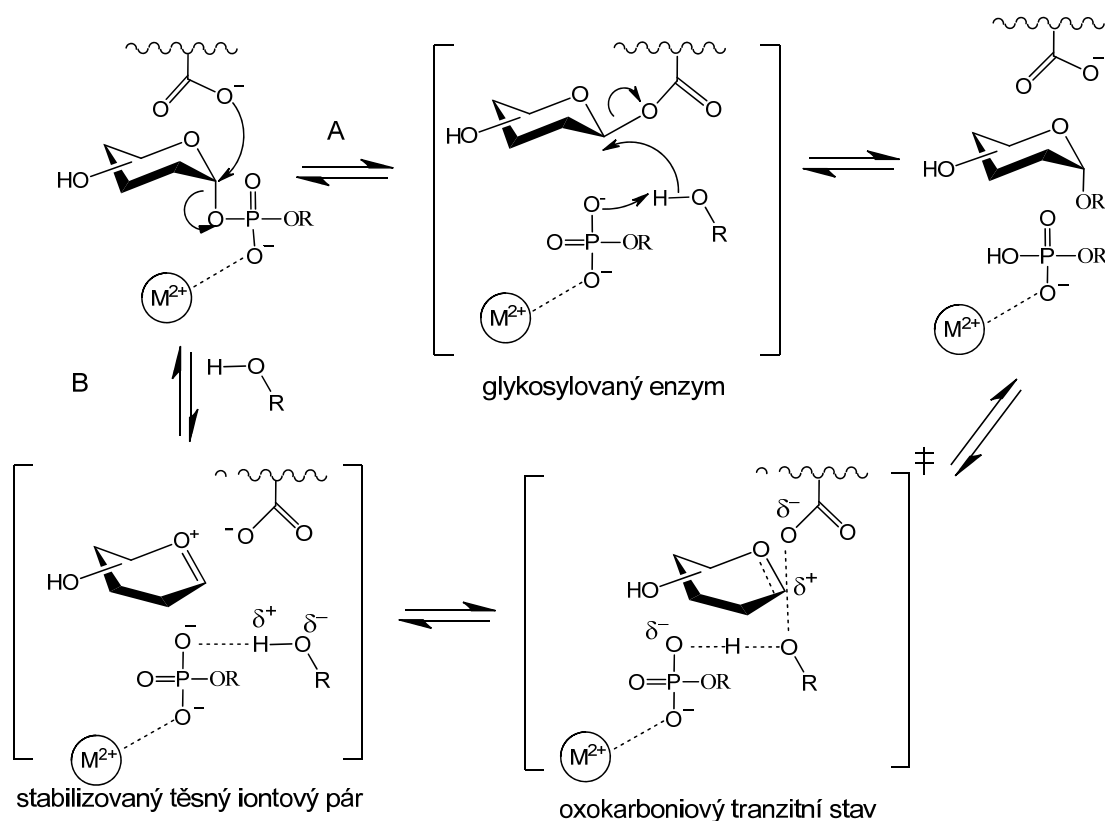


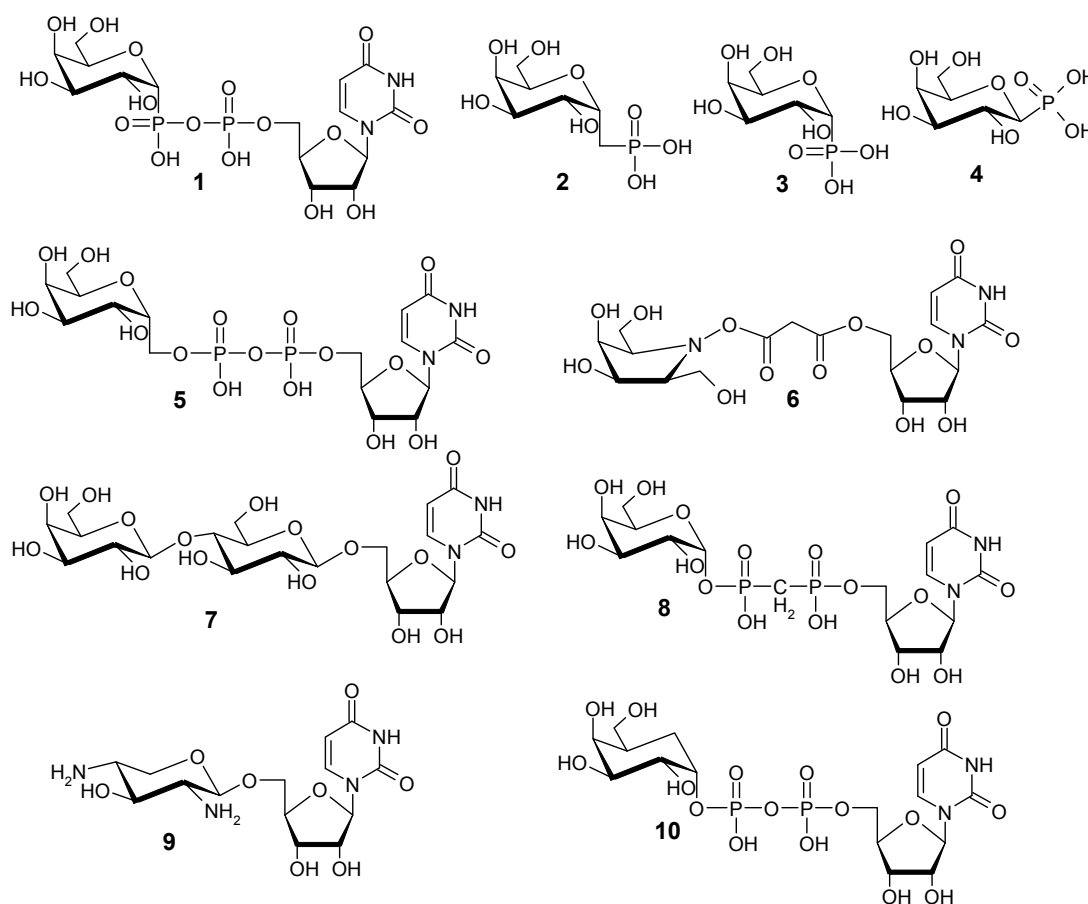
Schéma 2

lenovou spojkou účinný inhibitor neposkytl¹⁶. Pokud byl kyslík anhydridové vazby nahrazen methylenovou skupinou, byl získán účinný analog donoru **8** (K_i 97 μM)¹⁷. Myšlenka, že diaminodideoxysacharid by mohl napodobovat difosfátový můstek v interakci s kationtem kovu díky změně konformace pyranosy, vedla k přípravě několika potenciálních inhibitorů¹⁸, z nichž nejaktivnější byl β -xyloanalog **9** se 45% inhibicí $\beta(1-4)\text{GalT}$ a který podle NMR studie skutečně interagoval se Zn^{2+} kationty za současné změny $^4\text{C}_1$ konformace na $^1\text{C}_4$.

Další modifikace nabízí galaktopyranosa. Strukturně-aktivitní studie z roku 1996 využila selektivně methylovanou GalUDP a náhradu D-galaktosy v donoru D-mannosou a L-fukosou¹⁹. Nejsilnějšími inhibitory $\beta(1-4)\text{GalT}$ byly 2-, 3- a 6-O-methylderiváty GalUDP ve shodě s dřívějšími výsledky získanými pro deoxyderiváty²⁰. Rozdíl mezi nimi byl v tom, že 2-O-methyl-GalUDP byla přenášena na akceptor s relativní rychlostí 0,2 % v porovnání s GalUDP, zatímco zbývající mono-O-methylethery substráty nebyly vůbec. Nahrazení určité hydroxylové skupiny fluorem je obvyklá strategie ve výzkumu biologicky aktivních látek odvozených od sacharidů. 6-Deoxy-6-fluor-GalUDP inhi-

boval²¹ aktivitu jak $\beta(1-4)\text{GalT}$, tak $\alpha(1-3)\text{GalT}$ s účinností až 75 % při poměru inhibitor/GalUDP = 10. Zajímavé zjištění bylo, že pro všechny testované enzymy nebyl 6-deoxy-6-fluor-GalUDP substrátem. Atom fluoru v poloze 2 pyranosového kruhu obecně zvyšuje stabilitu glykosidové vazby, neboť jeho vysoká elektronegativita destabilizuje oxokarboniový ion v tranzitním stavu. Tento fakt vedl k syntéze 2-deoxy-2-fluor-GalUDP, relativně silného inhibitoru $\beta(1-4)\text{GalT}$ (90% inhibice, $\text{IC}_{50}=120 \mu\text{M}$)²². Bylo publikováno i několik prací, které popisují přípravu analogů donoru, ve kterých je některá hydroxylová skupina nahrazena skupinou thiolovou, ale bohužel opět bez inhibiční aktivity. Rovněž bez aktivity byly analogy donoru, ve kterých D-galaktosa byla v poloze 6 modifikována 2-nitrobenzyllovou skupinou²³, nebo dokonce nahrazena benzylem²⁴. Karbaanalog **10** je dalším poměrně dobrým inhibitorem $\beta(1-4)\text{GalT}$ (K_i 58 μM) (cit.²⁵).

Zatím neúčinnějším inhibitorem $\beta(1-4)\text{GalT}$ s K_i 1,86 μM je analog **11**, ve kterém je důležitým prvkem naftalenové jádro interagující s aminokyselinou ³¹⁰Trp, která se nachází blízko aktivního centra enzymu²⁶.



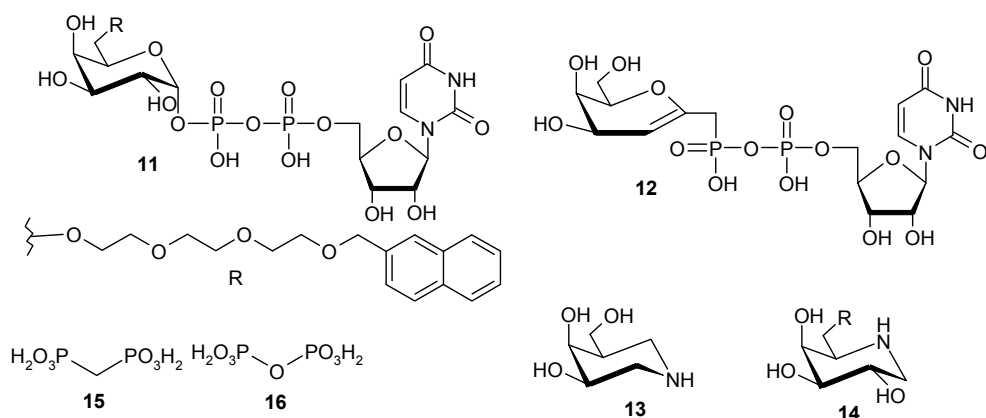
4. Inhibitory mimikující tranzitní stav

Pro tento typ inhibitorů je charakteristické zploštění židličkové konformace galaktopyranosy tak, aby stereochemie anomerního centra měla planární uspořádání napodobující sp^2 hybridizaci tranzitního stavu. První takovou strukturou byl analog **12** s K_i 62 μ M proti $\beta(1-4)$ GalT (cit.²⁷). Dále byly testovány různé iminocukry známé jako silné inhibitory glykosidas, ale žádný z nich neinhiboval $\beta(1-4)$ GalT (cit.²²). Ovšem pro galaktoiminocyklitol **13** v porovnání s cyklitolem **14** byla nalezena významná selektivita proti $\alpha(1-3)$ GalT, ačkoliv iminocyklitol **13** byl dříve popsán jako silný inhibitor β -glykosidasy (K_i 4,1 nM), zatímco **14** inhiboval α -glykosidasu (K_i 1,6 nM)²⁸. Detailní studie prokázala, že iminocyklitol **13** není překvapivě kompetitivním inhibitorem proti GalUDP, ale naopak je nekompetitivním inhibitorem jak proti donoru, tak akceptoru s K_i 75 a 35 μ M. Obecně je nekompetitivní inhibice spojována s navázáním inhibitoru na jiné místo enzymu než je aktivní centrum, ovšem v tomto případě autoři předpokládají, že iminocyklitol **13** je i schopen se vázat mechanismem S_N1 (Schéma 2B) do aktivního centra volného či s navázaným donorem nebo akceptorem. Další zajímavostí

je, že i velmi jednoduché sloučeniny, jakými jsou difosfonáty **15** a **16**, byly schopny inhibovat $\beta(1-4)$ GalT při koncentraci 1 mM s 95 a 90% účinností, pravděpodobně díky napodobování difosfátové části přirozeného donoru v aktivovaném komplexu²². Substituce methylenové skupiny alkylem, aminoalkylem či hydroxylovou skupinou nevedla ke zvýšení inhibiční aktivity. Autoři této práce rovněž zkoumali vliv koncentrace iontů na hodnotu inhibiční konstanty a zjistili, že vyšší koncentrace snižuje K_i .

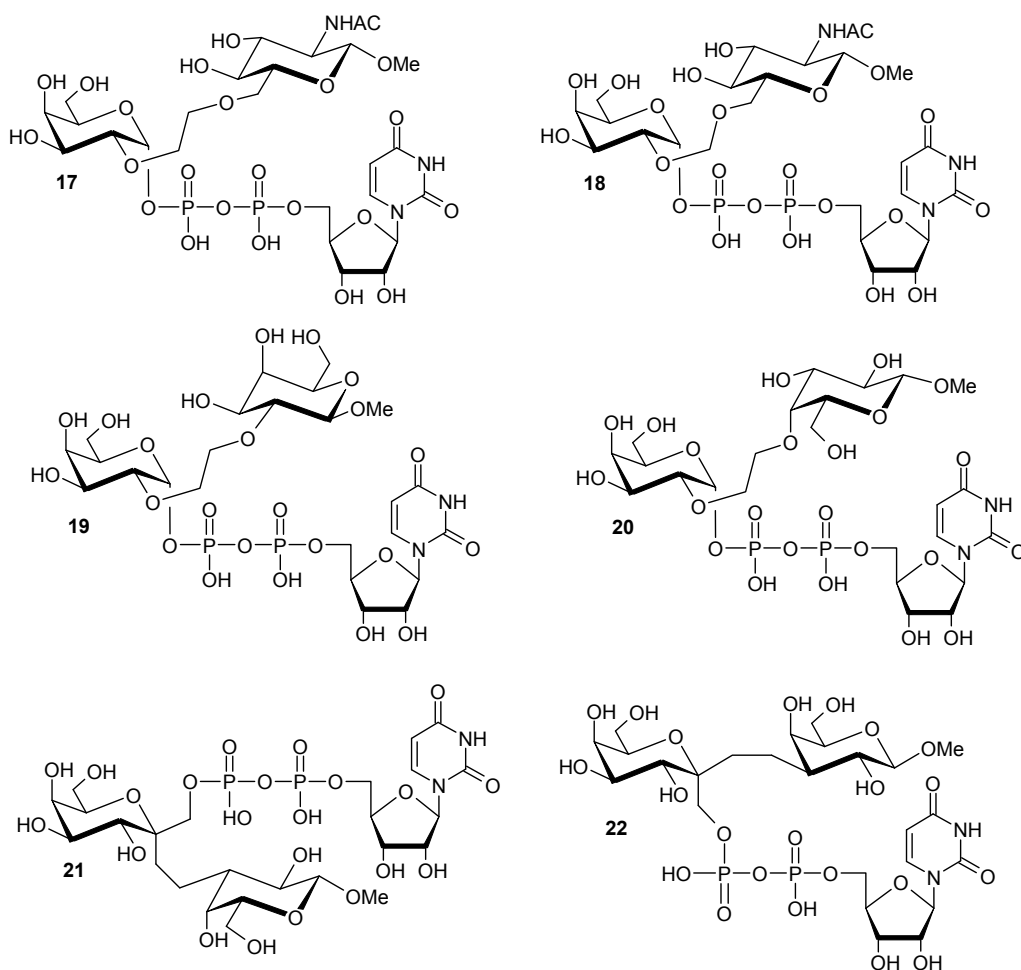
5. Inhibitory jako bisubstrátové analogy

Pro návrh inhibitorů postavených na kombinaci donoru a akceptoru je nutné mít informace o prostorovém uspořádání aktivního centra enzymu, aby bylo možné správně orientovat donorovou a akceptorovou část molekuly inhibitoru s cílem zajistit maximální efektivitu interakcí. Ačkoliv počet krystalografických, NMR a výpočetních studií v posledních letech utěšeně narůstá, je počet popsaných bisubstrátových analogů stále nízký, takže zatím není možné definovat obecněji platné závěry o vztahu struktura – biologická aktivita.



Inhibitory **17** a **18** byly navrženy podle orientace donoru a akceptoru v aktivním centru, která ukazuje na blízkost anomerního centra galaktosy a hydroxylové skupiny v poloze 4. Sloučenina **17** s ethylenovým můstkem byla nekompetitivním inhibitorem $\beta(1-4)\text{GalT}$ vzhledem k donoru (K_i 7,6 μM) a akceptoru (K_i 1,95 μM), zatímco látka **18** s můstkem o uhlík kratším byla inhibitorem kompetitivním proti akceptoru (K_i 1,35 μM) a víceméně kom-

petitivním proti donoru (K_i 3,3 μM)^{29,30}. Další obměnou struktury **17** tím, že 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosidová jednotka byla nahrazena methyl β -D-galaktopyranosidem vázaným přes polohu 2 (**19**) nebo 4 (**20**), byly získány selektivní inhibitory $\alpha(1-3)\text{GalT}$. Bisubstrátový analog **19** byl kompetitivním inhibitorem jak proti donoru (K_i 8,5 μM), tak *N*-acetylglukosaminu jako akceptoru (K_i 42,5 μM)³⁰.



Bisubstrátové analogy **21** a **22** mají akceptorovou D-galaktopyranosu a nukleotidovou část vázané na anomerním centru nehydrolyzovatelnou vazbou³¹. Překvapivě pouze látka **21** byla účinným inhibitorem $\alpha(1-3)\text{GalT}$ s IC_{50} 5 μM .

6. Závěr

Přes veškerý pokrok chemických, biochemických a biologických disciplín je stále racionální návrh potenciálních inhibitorů jakékoliv transferasy obtížným úkolem. Inhibitory napodobující strukturu přirozeného donoru nebo aktivovaného komplexu mohou být aktivní díky tomu, že přirozený donor má relativně vysokou afinitu k enzymu; Michaelisova konstanta je obvykle v mikromolech. Analogy akceptoru příliš nadějně jako inhibitory nejsou, neboť vazba akceptoru v aktivním centru je totiž asi 1000krát slabší než donoru. Na druhou stranu, je to právě akceptor, který rozhoduje o stereo- a regioselektivitě enzymového přenosu sacharidu. Bisubstrátové analogy tak v sobě spojují jak očekávanou inhibiční aktivitu, tak selektivitu a pravděpodobně tak tvoří nejperspektivnější směr výzkumu. I když jejich syntéza není jednoduchá.

Práce vznikla v rámci výzkumného záměru MŠMT č. MSM 6046137305.

LITERATURA

- Davis B. G.: *Chemistry&Industry* 2000, 134.
- Schutzbach J., Brockhausen I.: *Methods Mol. Biol.* 534, 359 (2009).
- Lairson L. L., Henrissat B., Davies G. J., Withers S. G.: *Annu. Rev. Biochem.* 77, 521 (2008).
- Coutinho P. M., Deleury E., Davies G. J., Henrissat B.: *J. Mol. Biol.* 328, 307 (2003).
- Hennet T.: *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1081 (2002).
- Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B.: *Nucleic Acids Res.* 37, 233 (2009).
- Gastinel L. N., Bugnon C., Misra A. K., Hindsgaul O., Sharper J. H., Joziassse D. H.: *EMBO* 20, 638 (2001).
- Bourne Y., Henrissat B.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 593 (2001).
- Qasba P. K., Ramakrishnan B., Boeggeman E.: *Curr. Drug Targets* 9, 292 (2008).
- Compain P., Martin O. R.: *Bioorg. Med. Chem.* 9, 3077 (2001).
- Kajimoto T., Node M.: *Synthesis* 19, 3179 (2009).
- Vaghefi M. M., Bernacki R. J., Dalley N. K., Wilson B. E., Robins R. K.: *J. Med. Chem.* 30, 1383 (1987).
- Schäfer A., Theim J.: *J. Org. Chem.* 65, 24 (2000).
- Waldscheck B., Streiff M., Notz W., Kinzy W., Schmidt R. R.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 4007 (2001).
- Wang R., Steensma D. H., Takaoka Y., Yun J. W., Kajimoto T., Wong C.-H.: *Bioorg. Med. Chem.* 5, 401 (1997).
- Yeoh K. K., Butters T. D., Wilkinson B. L., Faibanks A. J.: *Carbohydr. Res.* 344, 586 (2009).
- Vaghefi M. M., Bernacki R. J., Dalley N. K., Wilson B. E., Robins R. K.: *J. Med. Chem.* 30, 1391 (1987).
- Mitsuhashi N., Yuasa H.: *Eur. J. Org. Chem.* 10, 1598 (2009).
- Endo T., Kajihara Y., Kodama H., Hashimoto H.: *Bioorg. Med. Chem.* 4, 1939 (1996).
- Srivastave G., Hindsgaul O., Palcic M.: *Carbohydr. Res.* 245, 137 (1993).
- Schengrund C. L., Kovac P.: *Carbohydr. Res.* 319, 24 (1999).
- Takayama S., Chung S. J., Igarashi Y., Ichikawa Y., Sepp A., Lechler R. L., Wu J., Hayashi T., Siuzdak G., Wong C.-H.: *Bioorg. Med. Chem.* 7, 401 (1999).
- Mannerstedt K., Hindsgaul O.: *Carbohydr. Res.* 343, 875 (2008).
- Bhattacharya A. K., Stolz F., Kurzeck J., Rüger W., Schmidt R. R.: *Bioorg. Med. Chem.* 10, 1129 (2002).
- Yuasa H., Palcic M., Hindsgaul O.: *Can. J. Chem.* 73, 2190 (1995).
- Takaya K., Nakahori N., Kurogochi M., Furuike T., Miura N., Monde K., Lee Y. C., Nishimura S.: *J. Med. Chem.* 48, 6054 (2005).
- Schmidt R. R., Frische K.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3, 1747 (1990).
- Ichikawa Y., Igarashi Y., Ichikawa M., Suhara Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 120, 3007 (1998).
- Hashimoto H., Endo T., Kajihara Y.: *J. Org. Chem.* 62, 1914 (1997).
- Izumi M., Yuasa H., Hashimoto H.: *Curr. Top. Med. Chem.* 9, 87 (2009).
- Waldscheck B., Streiff M., Notz W., Kinzy W., Schmidt R. R.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 4007 (2001).

I. Jambal, K. Kefurt, and J. Moravcová
(*Department of Chemistry of Natural Compounds, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Galactosyltransferase Inhibitors**

Oligosaccharides in glycoconjugates form a sugar code in cell-cell recognition processes. Since galactosyltransferases are responsible for the biosynthesis of galactose-containing oligosaccharides, inhibitors of these enzymes are targets for drug design. In this review, the current state of the development of galactosyltransferase inhibitors, based on the donor and transition-state structures and bisubstrate analogues, is summarised.