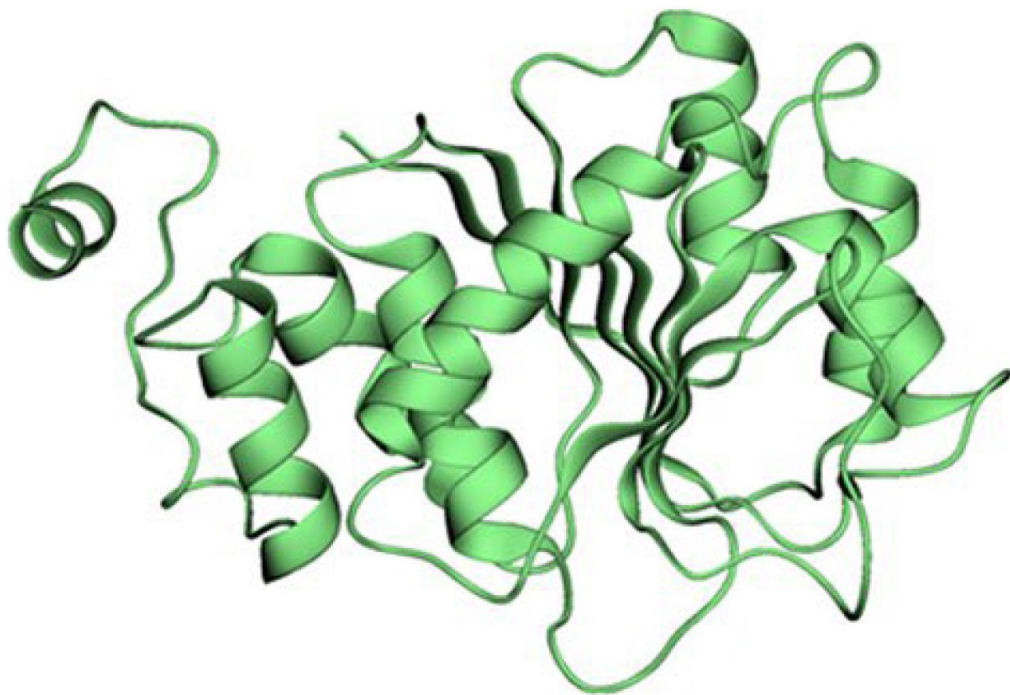


# HÆMNING AF SPERMIOGENESE VHA. INHIBERING AF FOSFO-GRTH

Udvikling af en nonhormonel p-pille til mænd



*Kristine DueHammershøj*

*Sønderborg Statsskole*

*SUND*

*Projekt Forskerspirer 2019*



## Indholdsfortegnelse

<b>Indledning</b> .....	<b>2</b>
<b>Problemformulering og formål</b> .....	<b>2</b>
<i>Afgrænsning</i> .....	3
<b>Metodevalg og teori</b> .....	<b>3</b>
<i>Spermatogenesisen</i> .....	3
<i>GRTH</i> .....	4
<i>Structure-based drug design og virtuel screening</i> .....	4
<b>Projektets udførsel</b> .....	<b>5</b>
<i>Tidsramme og budget</i> .....	6
<b>Konklusion og perspektivering</b> .....	<b>7</b>
<b>Tak</b> .....	<b>7</b>
<b>Litteraturliste</b> .....	<b>8</b>
<b>Bilag</b> .....	<b>9</b>



## Indledning

På trods af mange forskellige muligheder for prævention er næsten halvdelen af alle graviditeter i verden uønskede. Kvinder kan vælge imellem præventionsmidler som spiral, p-piller etc. Nogle kan dog af helbredsmæssige eller andre årsager ikke gøre brug af dem. Mænd har i dag kun to muligheder for prævention: kondomer eller vasketomi. I over 50 år har forskere forsøgt at finde nye præventionsformer for mænd men uden et effektivt resultat. En ny præventionsform for mænd ville have stor betydning for reproduktiv sundhed i hele verden, da det ville mindske mængden af uønskede graviditeter (Plana 2017) (Mara og Amory 2016).

De forskningsprojekter, der har været/er i gang vedrørende udvikling af præventionsformer til mænd omfatter mange forskellige fremgangsmåder. Der skelnes mellem hormonelle og nonhormonelle præventionsmidler. Eksempelvis er der forskellige undersøgelser af, hvordan man kunne udvikle en hormonel p-pille til at standse sædproduktionen. Der forskes også i udvikling af andre produkter, som eksempelvis en indsprøjtning eller en gel til at smøre på huden. Disse forskellige forskningsprojekter har dog alle dét til fælles, at de endnu ikke har fundet frem til et færdigt, effektivt produkt, der ikke giver for mange bivirkninger (Plana 2017).

I april 2019 udgav en gruppe forskere en artikel om karakteriseringen af fosforyleringsstedet på enzymet Gonadotropin-reguleret testikulær RNA helicase, GRTH, også kaldet DDX25. Fosforyleret GRTH spiller en vigtig rolle i den sidste modningsproces af sædcellerne i sædproduktionen kaldet spermiogenesen. Enzymet er med i processen, hvor den runde spermatid udvikler en hale. Beskrivelsen af enzymets struktur og funktion har åbnet op for muligheden for at udvikle en nonhormonel præventionspille, der kan inhibere dette enzym (Dufau, Hassan, et al. 2019).

## Problemformulering og formål

Fosforyleret GRTH har en essentiel rolle i udviklingen af en spermatid til en motil, moden spermatozo. Denne observation tyder på, at blokering eller inhibering af fosfo-GRTH har potentiale til at inhibere spermatogenesen.

Jeg vil derfor undersøge følgende problemformulering:

*Er det muligt at finde en inhibitor til fosfo-GRTH, således at spermiogenesen hæmmes og færdiggørelsen af spermatogenesen forhindres?*

Min hypotese er, at man vha. structure-based drug design og virtuel screening kan finde en enzym-inhibitor for fosfo-GRTH. Ved at blokere eller inhibere enzymet, kan man stoppe sædcellernes udvikling af en hale, hvilket vil gøre dem immotile. Når de ikke er i stand til at bevæge sig, kan de ikke befrugte et æg.

Formålet er at finde en reversibel metode til at standse produktionen af modne spermatozoer hos mænd, således at man videre kan bruge denne i udviklingen af en p-pille til mænd.



## Afgrænsning

I forskningsartiklen af Dufau et al. fokuseres der på, at man kan udvikle en mandlig p-pille ved at inhibere fosforyleringen af GRTH, da det er fosfor-formen af GRTH, der tager del i spermiogenesen (Dufau, Hassan, et al. 2019). Jeg har valgt at fokusere på at inhibere selve fosfo-GRTH's funktion. Eftersom GRTH er et RNA-helicase, kan man inhibere ATP-forsyningen til enzymet, således at det ikke får tilført nok energi, eller man kan inhibere GRTH's translation i polyribosomerne i stamcellerne (Dufau, Hassan, et al. 2019). Det er vigtigt, at enzyminhibitoren skal være specifik for fosfo-GRTH, dvs. det skal kun inhibere fosfor-formen og ikke den normale form af GRTH, fordi det kun er den fosforylerede form, der er vigtig for spermiogenesen.

Jeg har også valgt ikke at strukturbestemme fosfo-GRTH "fra bunden", da dette ville være alt for ressource- og tidskrævende. Det ville indebære fremstilling af enzymet via udtryk, oprensning, karakterisering, krystallisering og herefter strukturbestemmelse af proteinet, hvilket ikke ville være realistisk for mit projekt. Jeg vil bruge samme metode som Dufau et al. bruger til at karakterisere strukturen i artiklen. De bruger homologi til at modellere en 3D-struktur af DDX25. Eftersom de argumenterer for, at dette er en acceptabel fremgangsmåde i artiklen, og jeg har vurderet at Maria Dufau er en kapacitet indenfor GRTH, mener jeg, at det også ville være et acceptabelt valg i mit projekt (Dufau, Hassan, et al. 2019).

Min synopsis vil desuden kun indebære at designe en enzyminhibitor *in silico*. Dvs. at jeg har valgt ikke at teste det eksperimentelt bagefter, da det ville være for omkostningsfuldt. Jeg vil heller komme ind på, hvordan selve præventionsmidlet skal produceres, efter inhibitoren er fundet. Udvikling af lægemidler er en kompleks og kostbar proces, der tager mange år. Det indebærer bl.a. formulering og prækliniske forsøg for at undersøge tolerabilitet og sikkerhed. Udvikling af en enzyminhibitor ville til gengæld være det første skridt på vejen mod et nyt præventionsmiddel. Derfor vil jeg fokusere på det som et indledende studie.

## Metodevalg og teori

I mit projekt arbejder jeg ud fra en hypotetisk-deduktiv metode, eftersom jeg har opstillet en hypotese, som jeg vil efterprøve i min forskning.

Jeg har valgt at bruge structure-based drug design og virtuel screening, for at finde en enzyminhibitor til fosfo-GRTH. Denne metode er succesfuldt blevet brugt siden 1990'erne til at finde gode kemiske forbindelser, der senere kunne bruges til at udvikle nye lægemidler (Anderson 2003).

## Spermatogenesisen

Mænd producerer dagligt flere hundrede millioner færdige sædceller. Denne produktion foregår i testiklerne og bitestiklerne og kaldes spermatogenesis. I testiklerne findes sædkanaler, hvor spermatogonier, dvs. stamceller, findes. Udover stamcellerne, findes også Sertoliceller, der stimulerer sædcelleforstadiernes udvikling og sørger for næring undervejs.



Spermatogenesisen kan deles op i tre faser af lignende længde: spermatocytogenese, meiotiske delinger og spermiogenese. Under spermatocytogenesen deler stamcellerne sig ved mitose. Den ene dattercelle bliver tilbage og erstatter den gamle stamcelle, således at sædcelleproduktionen kan fortsætte konstant. Den anden dattercelle, der skal udvikles til spermatozo, gennemgår først en mitoselignende øgning til at blive en primær spermatocyt, der har fordoblet DNA-indhold. Herefter gennemgår den meiose to gange, hvorledes den bliver til fire runde haploide spermatider. Så indtræffer spermiogenesen, hvor spermatiderne modnes til at blive sene spermatider med hale. De løsrives fra Sertollicellerne og transporteres videre til bitestiklerne, hvor de modnes færdig til at blive motile, modne spermatozoer. (Kretser, Loveland og O'Bryan 2016)

## GRTH

Gonadotropin-reguleret testikulær RNA helicase (også kaldet DDX25) er et multifunktionelt enzym, der findes i stamcellerne i testiklerne. Det er medlem af DEAD-box-familien af RNA-helicaser og tager del i mRNA-transport og translation i polyribosomerne. Humaniserede GRTH knock-in mus var sterile, fordi deres runde spermatider ikke formåede at udvikle en hale. Musene havde normal seksuel adfærd og upåvirkede niveauer af gonadotropiner og testosteron. De mistede fosfo-GRTH i cytoplasmaet i stamcellerne, men beholdt GRTH-formen uden fosfor, hvilket beviste fosfo-GRTH's essentielle rolle i færdiggørelsen af spermatogenese (Han, et al. 2019) (Dufau og Kavarthapu 2019).

## Structure-based drug design og virtuel screening

Ved structure-based drug design designer og optimerer man en kemisk struktur for at udvikle en lead<sup>1</sup> egnet til klinisk test, der senere skal være kandidat til et nyt lægemiddel – i dette tilfælde et nyt præventionsmiddel. Man bruger virtuel screening ved SBDD for at finde de kemiske forbindelser, som man vil optimere til en lead.

SBDD har nogle forskellige cykler, man ofte går igennem flere gange, før lead går videre til kliniske tests. Disse er illustreret i bilag 1. Den første cyklus består i, at man bestemmer 3D-strukturen for det ønskede drug target<sup>2</sup>, et protein eller en nukleinsyre, vha. forskellige metoder. Herefter begynder virtuel screening. Strukturen analyseres og man finder et bindested på strukturen, hvorefter man vha. computeralgoritmer tager forskellige kemiske forbindelser fra en database og positionerer dem ind i bindestedet. Dette kaldes docking. De forskellige forbindelser rangeres efter kvaliteten af deres forudsatte interaktion med bindestedet på drug target. Den højst rangerede kemiske forbindelse, lead, anskaffes eller syntetiseres herefter og testes eksperimentelt (Lionta, et al. 2014).

I anden cyklus foretager man strukturbestemmelse af drug target i kompleks med lead for at finde steder på den kemiske forbindelse, der kan optimeres for at øge styrken.

<sup>1</sup> Lead = den førende kemiske forbindelse. Den forbindelse, der er bedst kvalificeret til at blive inhibitor for drug target og senere en kandidat til et nyt lægemiddel.

<sup>2</sup> Drug target = det valgte protein eller nukleinsyre, der skal findes inhibitor for.



Yderligere cykler omfatter syntese af den optimerede lead, strukturbestemmelse af drug target og optimeret lead-kompleks og evt. yderligere optimering af lead. Efter adskillige cykler af drug design-processen viser den optimerede kemiske forbindelse normalt en markant forbedring i binding og ofte specificitet til drug target. Når den er optimeret tilstrækkeligt, kan lead videreføres til kliniske forsøg og potentielt bruges til udviklingen af et nyt lægemiddel (Anderson 2003).

Fordelene ved virtuel screening er, at det er billigere og hurtigere at bruge computeralgoritmer til at finde leads end at udføre fysiske eksperimenter. Desuden er man ikke afhængig af kemiske forbindelser, der allerede eksisterer fysisk, men man kan designe kemiske forbindelser der ikke findes, hvis det er nødvendigt. Der findes mange gode docking programmer og scoringsfunktioner, og der har været flere succesfulde fund af gode leads, der viser den intenderede biologiske aktivitet. Men der er også ulemper ved VS. Ulemperne kan være, at kemiske forbindelser, der bliver fundet eksperimentelt, ofte er mere bioaktive end dem, der bliver fundet vha. virtuel screening. Det er også sjældent at meget stærke leads bliver fundet igennem VS. Brug af forudsete proteinstrukturer fra homologi modellering (som i dette projekt) og forudsete protein-lead-komplekser kan også resultere i falsk positive/negative resultater (Lionta, et al. 2014).

## Projektets udførelse

I artiklen af Dufau et al. har de ikke bestemt krystalstrukturen af DDX25, men modelleret en struktur af DDX25 vha. threading<sup>3</sup> af aminosyresekvenserne på strukturen af DDX19 (det medlem af DEAD-box-familien, der minder mest om DDX25.) Der er 65% identitet mellem de to proteiner, hvilket er vurderet til at være acceptabelt. Jeg vil basere min screening på den samme homologimodel. Professor i Computational Chemistry/Molecular Modelling, Flemming Steen Jørgensen, har tilbudt at lave 3D-modellen for mig, så jeg som udgangspunkt for mit arbejde har en model af DDX25. 3D-strukturen lavet af Dufau et al. kan ses i bilag 2 sammen med strukturen for DDX19 (Dufau, Hassan, et al. 2019).

Projektet udføres i samarbejde med Professor Jacob Kongsted og hans forskningsgruppe på SDU. Da de har licens til Schrödinger's softwarepakke, vil vi bruge programmet Glide fra denne pakke til at finde inhibitor-bindested, lave virtuel screening og docking og scoring af kemiske forbindelser.

### Fase 1:

Strukturen af fosfo-GRTH analyseres og potentielt inhibitor-bindested findes.

### Fase 2:

Der søges efter kemiske forbindelser i den gratis database ZINC. Eftersom vi ikke vil screene hver eneste kemiske forbindelse på databasen, begrænses/filtreres vores bibliotek. Information fra analysen af fosfo-GRTH og bindingsstedet, f.eks. kendte molekyler, der binder til enzymet (en cofactor

<sup>3</sup> Threading = proteinmodellering, hvor man bruger kendte proteinstrukturer til at modellere proteiner med samme foldning men ukendt struktur (Ma, et al. 2013).



eller vands binding på specifikke steder af GRTH), bruges til at "favorere" nogle molekyler, der kunne minde om de kendte, og derfor kunne have større chance for at binde til fosfo-GRTH. Giftige stoffer filtreres væk. Man kan bruge Lipinski's "Rule of Five", dvs. molekylerne skal have en molekylær vægt under 500 dalton, have mindre end 5 hydrogenbindingsdonorer etc. Derudover kan man også bruge "Rule of Three", hvor man kigger på fragmenter af molekyler i stedet for at kigge efter store molekyler. Disse regler skal dog ikke overholdes for strengt (Lionta, et al. 2014). Lead skal desuden være et simpelt molekyle (Calit2ube 2015).

### **Fase 3:**

De kemiske forbindelser dockes vha. Glide.

### **Fase 4:**

De forskellige kemiske forbindelser rangeres efter bindingsstyrke og selektivitet. Dette kaldes scoring. For at reducere antallet af forbindelser, der skal analyseres, dockes de kemiske forbindelser igen ved forskellige "stillinger" af fosfo-GRTH, og den stilling, der viser størst konsistens i resultater vælges.

### **Fase 5:**

De bedste forbindelser analyseres. Der kigges på, hvor egnede de er som potentielle lægemiddelsestoffer og deres toksicitet. Lead vælges, og dens binding og selektivitet optimeres. Til sidst skulle vi gerne stå tilbage med en lovende kemisk forbindelse, der kunne være en inhibitor for fosfo-GRTH.

## **Tidsramme og budget**

Mit projekt forventes sammenlagt at tage ca. 2 måneder.

Jeg vil bruge penge fra mit budget på at tage til SDU i Odense og tilbringe noget tid hos Professor Jacob Kongsted og hans forskningsgruppe. Gruppen arbejder med udvikling og anvendelse af kvantekemi og simuleringer relevant for biologisk orienteret forskning med det generelle mål at udvikle og designe nye molekyler med bestemte egenskaber – bl.a. inden for medicinalkemi. I deres forskning gør de meget brug af supercomputere, altså arbejder de en del med drug design og er derfor meget kvalificerede til at være mine samarbejdspartnere. De vil hjælpe mig med udførslen af mit projekt og lære mig om deres forskellige metoder og brug af software, så jeg kan tage del i det praktiske arbejde. Jeg regner med at tilbringe en uge med forskningsgruppen to gange under forløbet.

Hvis muligt, vil jeg bruge størstedelen af mit budget på en rejse til at besøge Maria L. Dufau ved National Institutes of Health i Bethesda, Maryland, USA, da hun er den absolutte kapacitet indenfor GRTH. Et besøg hos hende kunne give mig vigtig indsigt i enzymets struktur og funktion, som jeg kan bruge i min forskning. Dette besøg ville blive lagt forud for udførslen af mit projekt.



3D-model af DDX25, lavet af Professor Flemming Steen Jørgensen	0 kr.
Adgang til software og databaser	0 kr.
Rejseudgifter og logi i Odense	7.000 kr.
Rejseudgifter og logi i Bethesda	13.000 kr.
<b>Sum</b>	<b>20.000 kr.</b>

## Konklusion og perspektivering

Mit projekt vil forhåbentligt vise, at GRTH er et lovende drug target og at det er sandsynligt, at der kan udvikles et præventionsmiddel mod GRTH. Jeg forventer, at vi vil finde kemiske forbindelser, som kan tjene som udgangspunkt for et større og mere omfattende projekt:

Hvis min hypotese bekræftes, og det er muligt at finde en eller flere lovende kandidater til inhibering af fosfo-GRTH, vil det næste skridt være eksperimentelle forsøg, for at undersøge om lead inhiberer fosfo-GRTH *in vitro*. Hvis lead består disse eksperimentelle tests, vil det åbne op for muligheden for at udvikle enzyminhibitoren til et lægemiddelstof og senere bruge dette i formuleringen af en potentiel nonhormonel p-pille til mænd. Det er til gengæld vigtigt at pointere, at det er meget få lægemidler, som udvikles på universiteter. På et tidspunkt ville det blive nødvendigt til at få tilført midler og derved overdrage projektet til en virksomhed, enten ved at sælge et eventuelt patent/ideen eller ved at oprette egen virksomhed og derefter søge at frembringe den nødvendige kapital.

## Tak

Jeg vil først og fremmest sige tak til Birgitte Schantz Laursen, lektor, cand.cur., PhD, ved Aalborg Universitet for at være en hjælpsom forskerkontakt og rådgive mig og skaffe relevant litteratur for mig. Der skal også lyde en stor tak til Flemming Steen Jørgensen, Professor i Computational Chemistry / Molecular Modelling, PhD, ved Københavns Universitet for at være en kæmpe hjælp med vejledning til mit forskningsdesign og desuden at tilbyde mig praktisk hjælp i min forskning. Hans hjælp har været uundværlig for mit projekt. Tak til Jacob Kongsted, Professor ved Institut for of Fysik, Kemi og Farmaci, ved Syddansk Universitet for at være åben overfor et samarbejde om den praktiske udførsel af mit projekt. Tak til Niels Jørgensen, speciallæge i endokrinologi, EAA certificeret Androlog og PhD, ved Rigshospitalet for vejledning og korrekturlæsning af min synopsis. Til sidst vil jeg takke mine forældre, venner, koordinatorene på mit gymnasium og ikke mindst mine medspirer for motivation og opbakning.





## Litteraturliste

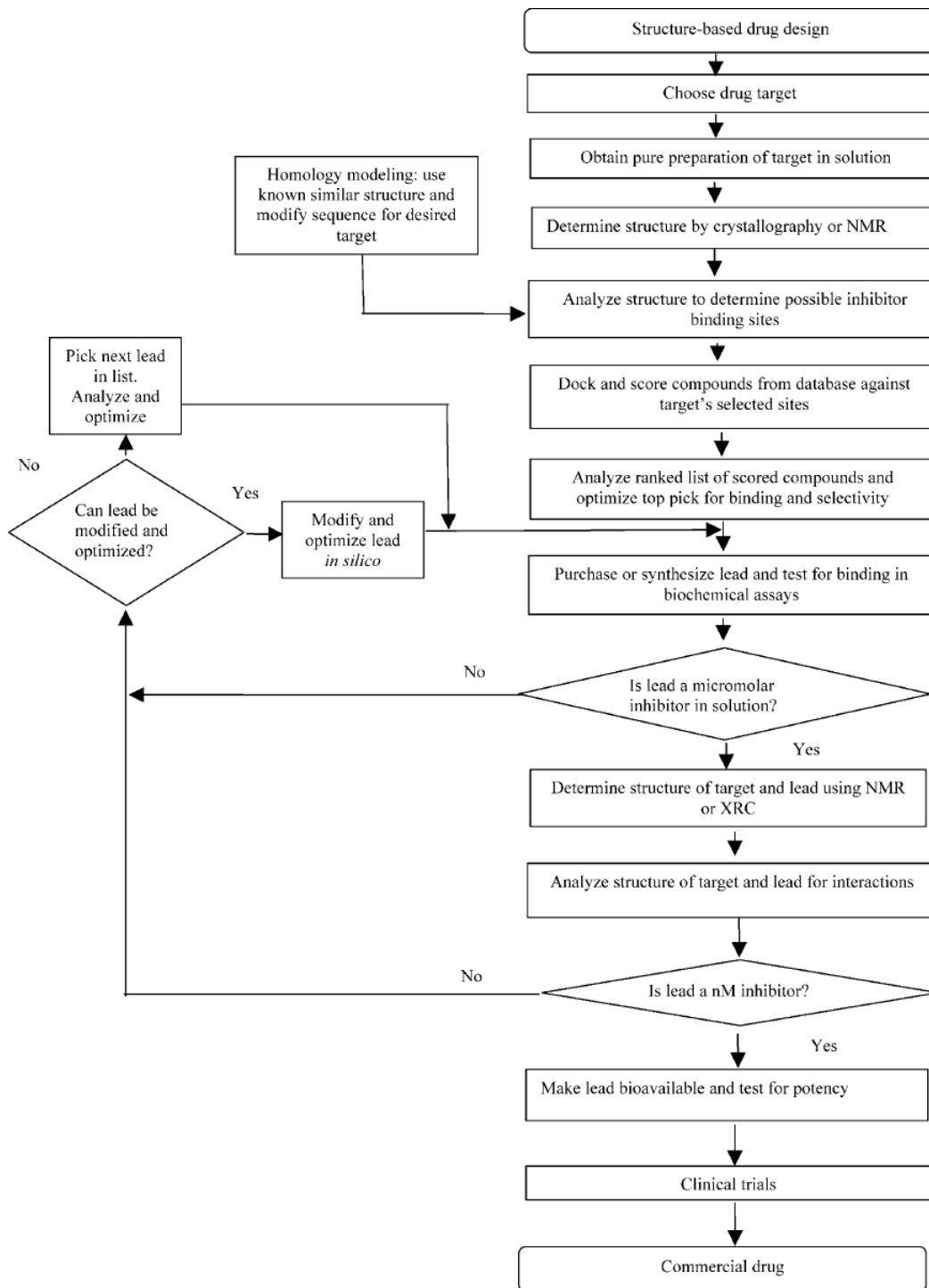
- Anderson, Amy C. 2003. "The Process of Structure Based Drug Design." *Chemistry & Biology*, September: 787-797.
- Calit2ube. 2015. *Introduction to Virtual Screening - Stefano Forli*. Oktober 14.  
<https://www.youtube.com/watch?v=8Q0tk6HtRuc>.
- Dufau, Maria L., Sergio A. Hassan, Murugananthkumar Raju, Raghuv eer Kavarthapu, and Rajakumar Anbazhagan. 2019. "Characterization of the Phosphorylation Site of GRTH/DDX25 and Protein Kinase A Binding Interface Provides Structural Basis for the Design of a Non-Hormonal Male Contraceptive." *Scientific Reports*.
- Dufau, Maria L., and Raghuv eer Kavarthapu. 2019. "Gonadotropin Regulation Testicular RNA Helicase, Two Decades of Studies on Its Structure Function and Regulation From Its Discovery Opens a Window for Development of a Non-hormonal Oral Male Contraceptive." *Frontiers in Endocrinology*, August 29.
- Han, Yongli, Chen Liang, Ram Kumar Manthari, Yuxiang Yu, Yan Gao, Yu Liu, Shanshan Jiang, Chiranjeevi Tikka, Jundong Wang, and Jianhai Zhang. 2019. "Arsenic influences spermatogenesis by disorganizing the elongation of spermatids in adult male mice." *Chemosphere*.
- Kretser, David M. de, Kate Loveland, and Moira O'Bryan. 2016. "Spermatogenesis." In *Endocrinology: Adult and Pediatric*, by J. Larry Jameson, David M. de Kretser, Ashley B. Grossman, John T. Potts, Jr., Leslie J. De Groot, Linda C. Giudice, Shlomo Melmed and Gordon C. Weir, 2325-2353. Elsevier Inc.
- Lionta, Evanthia, George Spyrou, Demetrios K. Vassilatis, and Zoe Cournia. 2014. "Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances." *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1923–1938.
- Ma, Jianzhu, Sheng Wang, Feng Zhao, and Jinbo Xu. 2013. "Protein threading using context-specific alignment potential." *Bioinformatics*.
- Mara, Roth Y., and John K. Amory. 2016. *Beyond the Condom: Frontiers in Male Contraception*. HHS.
- Plana, Olivia. 2017. "Male Contraception: Research, New Methods, and Implications for Marginalized Populations." *American Journal of Men's Health*.



## Bilag

### Bilag 1 (Anderson 2003):

Figur over structure-based drug design's cykler.



**Bilag 2** (Dufau, Hassan, et al. 2019):

Model af GRTH/DDX25 ud fra DDX19.

*Venstre side:* Krystalstruktur af DDX19-helicasen med domæne 1 (grøn) og 2 (blå) indikeret; det co-krystalliserede fragment af RNA og en ATP analog er også vist.

*Højre side:* Snapshot ved slutningen af en Molecular Dynamics-simulation (en computersimulationsmetode man bruger til at studere de fysiske bevægelser af atomer og molekyler) af modellen af domæne 1 af DDX25, fundet ved threading af den korresponderende sekvens af strukturen af domæne 1 af DDX19. Lokalisering af fosforyleringssiden er vist med den røde pil.

DDX19 (~65% identity; PDB: 3G0H)

