

# *O*-连接 *N*-乙酰葡萄糖胺转移酶抑制剂的 筛选与活性分析

刘宇博, 张娜娜, 陈锦娇, 朱 彤, 张嘉宁, 李文利

(大连理工大学生命与医药学院, 盘锦 124221)

**摘要** 利用药物发现软件 Discovery Studio 4.5 (DS), 以基于结构的虚拟筛选天然产物化合物库的方法, 获得 *O*-连接 *N*-乙酰葡萄糖胺转移酶 (OGT) 天然产物抑制剂阿曼托双黄酮 (AF). AF 能够在体外抑制 OGT 的酶活. 分子动力学 (MD) 模拟实验结果表明, AF 能够稳定结合在 OGT 蛋白的底物结合口袋中, 并与口袋附近多个氨基酸形成氢键. 细胞内活性检测结果表明, AF 能够有效抑制蛋白质的 *O*-GlcNAc 修饰, 具有良好的 OGT 抑制活性.

**关键词** *O*-连接 *N*-乙酰葡萄糖胺转移酶; *O*-连接 *N*-乙酰葡萄糖胺修饰; 抑制剂; 虚拟筛选

**中图分类号** O626.32

**文献标志码** A

糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰 (PTMs)<sup>[1]</sup>, 在众多生物学过程中发挥着重要作用. *O*-连接 *N*-乙酰葡萄糖胺 (*O*-GlcNAc) 修饰是一种重要的单糖修饰<sup>[2]</sup>, 由 *O*-GlcNAc 糖基转移酶 (OGT) 催化, 将 *N*-乙酰葡萄糖胺基团连接在蛋白质的丝氨酸/苏氨酸羟基末端上<sup>[3]</sup>. 研究发现, *O*-GlcNAc 修饰的蛋白广泛分布于细胞质和细胞核中, 参与几乎所有的细胞生理过程<sup>[4]</sup>. 而且, 异常的 *O*-GlcNAc 糖基化<sup>[5]</sup> 与癌症<sup>[6]</sup>、糖尿病并发症<sup>[7]</sup> 及神经退行性疾病<sup>[8]</sup> 等重大疾病相关. 抑制 OGT 的活性能够调控胞内蛋白的 *O*-GlcNAc 修饰. 因此, OGT 抑制剂不但可以作为分子探针用于研究 *O*-GlcNAc 糖基化修饰, 参与细胞生理过程及多种重大疾病的分子机制, 还将有助于进一步阐释 OGT 作为疾病治疗靶点的有效性.

目前, OGT 抑制剂的开发并不理想, 所获分子通常具有细胞内活性差等缺点<sup>[9]</sup>. 本文利用基于结构的虚拟筛选方法, 以 OGT 晶体结构 (3PE3) 为受体, 从天然产物化合物库中筛选得到了 10 个 OGT 抑制活性分子. 在此基础上, 经过分子动力学模拟 (MD)<sup>[10]</sup>、体外活性检测<sup>[11]</sup> 及细胞内活性检测<sup>[12]</sup>, 确认阿曼托双黄酮 (AF) 具有良好的 OGT 抑制活性, 能够有效抑制体外和细胞内的蛋白质 *O*-GlcNAc 修饰.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

体外活性检测所用试剂均购自云南西力生物股份有限公司; *O*-连接 *N*-乙酰葡萄糖胺转移酶 (OGT) 多肽底物 (CKII 肽, 氨基酸序列为 KKKYPGGSTPVSSANMM), 苏州强耀公司; 小分子 OGT 抑制剂 (ST045849), 美国 TimTec 公司; 尿苷二磷酸-*N*-乙酰葡萄糖胺 (UDP-GlcNAc) 和二甲亚砜 (DMSO), 分析纯, 美国 Sigma 公司; *O*-GlcNAc 特异性抗体, 美国 CST 公司; OGT 活性分析试剂盒, 美国 Promega 公司; 非洲绿猴肾细胞系 (Cos7) 由本实验室保存.

二氧化碳细胞培养箱、Pico17 型高速低温离心机 and Nanodrop 型微量分光光度仪, 美国赛默飞公司; Synergy H1 型全功能荧光酶标仪, 美国 BioTek 公司; FluorChem HD2 型化学发光成像仪, 美国伯乐公司; 分子对接与分析软件 Discovery Studio 4.5 (DS 软件), 美国 Accelrys Software 公司.

收稿日期: 2017-12-15. 网络出版日期: 2018-05-22.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 31570802, 21502015) 和中央高校基本科研业务费 (批准号: DUT17CJ21) 资助.

联系人简介: 李文利, 男, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要从事分子生物学方面的研究. E-mail: biolwl@dlut.edu.cn

## 1.2 实验方法

1.2.1 受体分子建模 以蛋白质结构数据库(PDB)中人源 OGT/尿苷二磷酸(UDP)的 X 射线晶体结构(3PE3)为模板<sup>[13]</sup>, 利用 DS 软件去掉晶体中的水分子, 并移除 UDP 分子. 以 OGT 蛋白上 UDP 结合口袋中脯氨酸(Pro)559 的侧链为中心, 建立一个 2.2 nm×2.2 nm×2.2 nm 的盒子, 以覆盖 OGT 的 UDP 绑定口袋<sup>[14]</sup>.

1.2.2 虚拟筛选 首先使用 DS 软件<sup>[15]</sup>对含有 5100 多个天然产物的西力生物化合物库进行吸收、分配、代谢、排泄和毒性(ADMET)分析, 获得符合条件的分子. 具体标准包括: 分子质量为 200~600, 分配系数  $\lg P$  为 -0.4~5.6, 可转动键数量  $\leq 10$ , 极性表面积  $\leq 1.4 \text{ nm}^2$ , 氢键供体和受体总数量  $\leq 12$ . 以这些分子为配体, 使用 DS 软件中的刚性对接算法(Lib-Dock)进行基于 OGT(3PE3)的分子对接<sup>[16]</sup>. 使用 Addsol 程序计算受体的溶剂参数, 在对接过程中配体分子根据需要设为柔性结构, 分子内的旋转键由 DS 程序识别并在对接过程中任意旋转; 使用 Lamarckian 遗传算法和局部能量搜索相结合(GALS)的方法对构象进行搜索, 并进行 100 次对接计算, 通过聚类分析结果和 DS 软件自带的评分函数打分的高低保留 10 个构象. 对接中以受体 OGT 蛋白的分子建模盒子作为配体结合位置, 以此筛选出可能具有 OGT 抑制活性的分子. 输出 Lib-Dock 计算得到受体与配体结合自由能<sup>[17]</sup>. 使用 DS 中的半柔性对接方法(C-Docker)对配体分子进行对接筛选. 使用能量最小化工具(Full Minimization)对配体分子进行能量最优化处理. 使用受体优化工具(Prepare Protein)对 OGT 蛋白晶体结构进行去水及加氢等操作. 在 C-Docker 模块中进行对接运算, 输出受体与配体的结合自由能<sup>[18]</sup>. 对 2 种算法获得的自由能进行平均值最低排序, 利用 DS 聚类分析算法选择自由能最低的 10 种化合物作为候选分子.

1.2.3 分子动力学模拟 对候选分子使用 DS 软件进行能量最优处理, 使用 DS 软件中的分子动力学模拟模块进行受体与配体的 MD 优化 20 ns, 输出优化后的结合模式. 受体和配体的结构均来源于分子对接结果. 将对接复合物溶解于立方体显性水分子模型中, 溶质原子与边界之间的距离为 0.5 nm, 模拟采用 Amber 力场, 并向体系添加抗衡离子( $\text{Na}^+$ )保持其电中性. MD 模拟在 pH=7.4 和 298 K 条件下进行, 并使用郎格万方法控制体系温度. 其中, MD 积分步长为 2 fs, 采样间隔为 100 ps. 进一步计算在 MD<sup>[19]</sup>优化过程中 OGT 蛋白每一个氨基酸均方根波动(RMSF)的情况.

1.2.4 体外 OGT 酶活抑制率的测定 在无细胞反应体系中测定体外 OGT 酶活, 利用 OGT 活性分析试剂盒检测候选分子对 OGT 酶活的抑制情况<sup>[12]</sup>. 反应中所用 OGT 酶和核孔蛋白 62(Nup62)使用大肠杆菌表达系统进行原核表达和纯化. 以 OGT 底物肽段 CKII 肽作为糖基受体, 在底部为白色的 96 孔酶标板上参照试剂盒说明书进行实验. 反应体系包含下列组分: 250 nmol/L 的 OGT 蛋白、125  $\mu\text{mol/L}$  的 CKII 肽、40  $\mu\text{mol/L}$  的 UDP-GlcNAc 糖供体及反应缓冲液(150 mmol/L NaCl + 1 mmol/L EDTA + 25 mmol/L Tris-HCl, pH=7.4), 于 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h. 使用荧光酶标仪进行 3 组平行测量, 计算  $\text{IC}_{50}$  值.

1.2.5 免疫印迹实验 使用候选分子处理 Cos7 细胞不同时间, 提取细胞总蛋白进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 转膜后使用抗体检测细胞内蛋白 O-GlcNAc 修饰改变情况. 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参.

## 2 结果与讨论

### 2.1 基于结构的 OGT 抑制剂虚拟筛选

对 OGT/UDP 的晶体结构(3PE3)进行建模分析后发现, UDP 能与 OGT 的 Gln839, Lys842, Ala896, Lys89, Arg904, His920, Thr921 和 Thr922 氨基酸残基发生相互作用, 并形成氢键(见图 1). 因此, 本文以上述氨基酸残基所在位置作为虚拟筛选的受体结合口袋, 使用 DS 软件进行虚拟筛选. 经过 ADMET 分析, 天然产物化合物库中共有 2329 个分子符合条件. 进一步将这些分子进行 Lib-Dock 和 C-Docker 筛选, 分别统计这些分子的结合自由能[图 2(A)]. 所使用的 2 种算法既包含刚性对接, 也包含半柔性对接, 能够较全面地反映配体分子与受体 OGT 蛋白的对接情况. 经过聚类分析, 综合考虑配体打分、结合模式以及化合物结构新颖度和类药性, 选出在 2 种筛选模式下均排名靠前的 10 个分子作为候选化合物做进一步的实验验证. 这 10 个分子与受体 OGT 蛋白的结合模式见图 2(B).

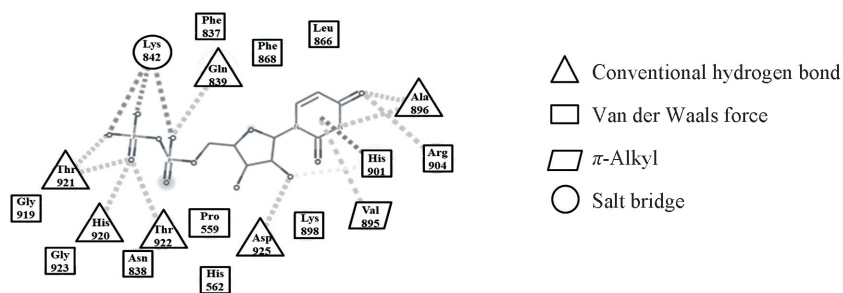


Fig.1 Binding mode analysis of UDP-OGT

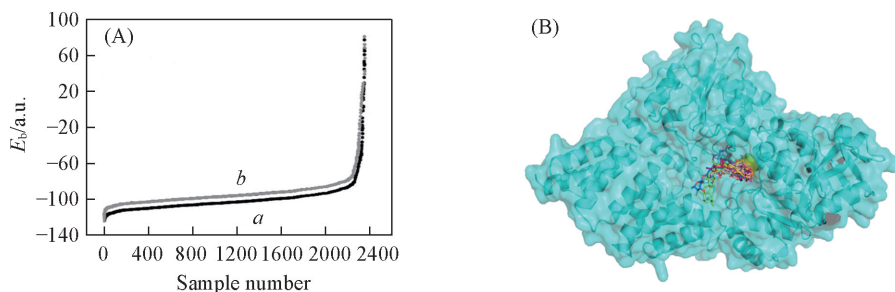


Fig.2 Identification of novel OGT inhibitors from a virtual screen

(A)  $E_b$  distribution of the docking results about ligands, Lib-Dock (a) and C-Docker (b); (B) binding mode of ten hit compounds in human OGT by docking studies using Lib-Dock and C-Docker.

10 个候选分子的已知生物活性、Lib-Dock 和 C-Docker 结合能情况及与 OGT 蛋白的氨基酸残基氢键形成情况如表 1 所示。

Table 1 Scoring results of virtual screening of candidate moleculars

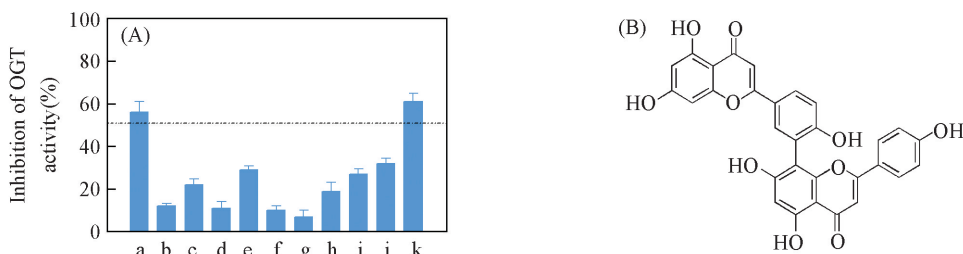
No.	Compd.	Biological activity	$E_b / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$		Hydrogen bond
			Lib-Dock	C-Docker	
1	Amentoflavone	Anti-inflammatory, anti-fungal	-146.7	-137.5	7
2	Robinin	Hydragogue	-130.5	-124.3	3
3	Griffipavixanthone	Cytotoxic	-127.5	-115.6	3
4	Dihydroxy-14-serratene-16-one	Cytotoxic	-126.3	-116.1	2
5	Daturametelin I	Anti-fungal, cytotoxic	-125.4	-114.3	2
6	Bisandrographolide A	Ion channelsagonist	-124.5	-113.9	2
7	Chloramultilide D	Anti-fungal, anti-inflammatory	-124.2	-111.4	2
8	Tetrahydrochnaflavone	Anti-fungal, anti-inflammatory	-123.1	-110.9	2
9	Pre-schisanartanin B	Cytotoxic	-122.9	-111.2	1
10	Isorhoifolin	Anti-fungal, anti-inflammatory, cytotoxic	-110.1	-109.2	1

## 2.2 候选分子的体外活性初步检测

将虚拟筛选得到的 OGT 抑制剂候选分子在无细胞反应体系中初步测定其抑制活性。使用  $50 \mu\text{mol/L}$  的候选分子进行 OGT 酶活抑制实验, 利用 OGT 活性分析试剂盒测定小分子的抑制率。由图 3(A) 可见, 10 个候选分子中有 7 个分子具有 OGT 抑制活性, 但是除 AF 分子外, 其它分子的抑制活性不超过 50%。因此, 将 AF 作为 OGT 抑制剂候选化合物做进一步分析。图 3(B) 给出化合物 AF 的化学结构, 分子量 538.46, 属双黄酮类化合物, 具有较好的水溶性, 据文献[20]报道 AF 具有抗炎、抗真菌活性。

## 2.3 AF 与 OGT 蛋白结合模式分析

使用 MD 优化 AF 分子与受体 OGT 蛋白(3PE3)的对接结果<sup>[13]</sup>, 经过 20 ns 优化后, 挑选结构稳定时间段输出多个动态构象, 以 cutoff 0.2 进行聚类, 提取稳定状态下最大聚类的典型构象, 该聚类在 20 ns 的模拟轨迹中出现频率约为 63.2%。由图 4(B) 可见, 双黄酮类化合物 AF 的 C 环羟基与 Lys842, His920, Thr921 和 Thr922 形成了 5 个较稳定的氢键相互作用; D 环羟基与 Lys842 形成了较稳定的氢键相互作用; F 环羟基与 Asn557 形成了较稳定的氢键相互作用; A, B 和 F 环与 His558, Pro559 和

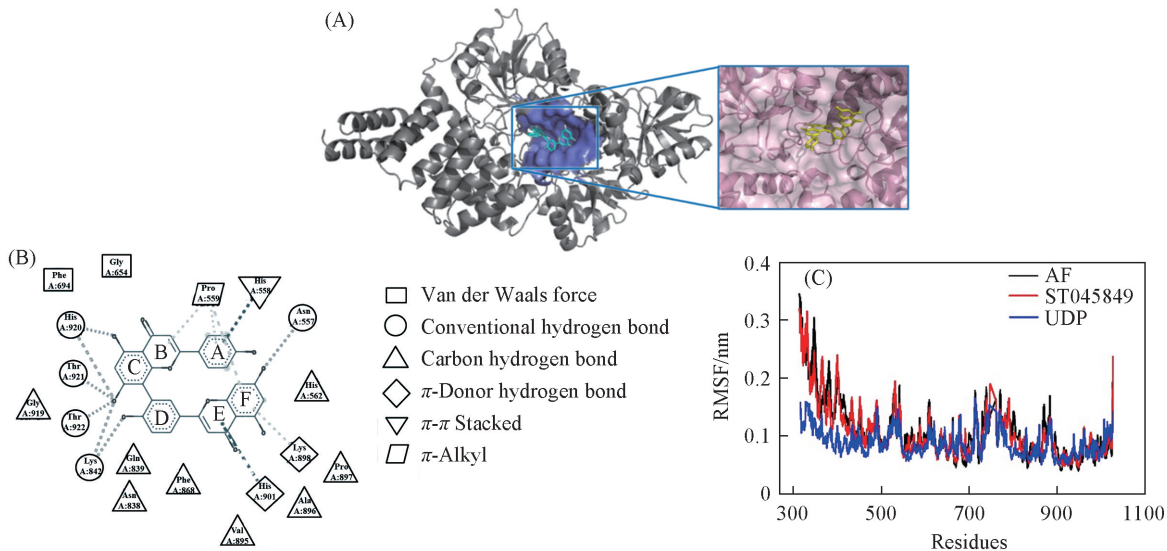


**Fig.3** *In vitro* activity of candidate compounds

(A) Effect of candidates on OGT activities in a cell free reaction system, all the compounds were used at 50  $\mu\text{mol/L}$ . ST045849 was used as a positive control. a. Amentoflavone; b. robinin; c. griffipavixanthone; d. dihydroxy-14-serraten-16-one; e. daturametelin I; f. bisandrographolide A; g. chloramultilide D; h. tetrahydrochnaflavone; i. pre-schisanartanin B; j. isorhoifolin; k. ST045849.

(B) the chemical structure of AF.

Lys898 残基形成了 3 个  $\pi$ - $\pi$  键相互作用. 化合物与活性口袋处的 His562, Gly654, Phe694, Asn838, Gln839, Phe868, Val895, Ala896, Pro897 和 Gly919 残基形成一个范德华力网, 这些相互作用使 AF 能稳定地结合于 OGT 蛋白的底物结合口袋处[图 4(A) 和(B)]. 使用 RMSF 表征 MD 优化过程中受体 OGT 蛋白每个氨基酸残基的空间位置稳定性, 结果表明, Gln839, Lys842, Ala896, Lys898, His920, Thr921 和 Thr922 等与 AF 相互作用的氨基酸残基在 MD 优化过程中空间位置变化较小, 处于其附近区域的最低点, 波动不大. 使用阳性对照 ST045849 和天然底物 UDP 获得了类似的结果. 这说明与 AF 相互作用的氨基酸残基较稳定, 也证明了 AF 能较稳定地结合于 OGT 蛋白的底物结合口袋处[图 4(C)].



**Fig.4** Binding mode analysis of AF and OGT by MD

(A) Binding pose of AF with OGT after MD; the residues of binding pocket were shown by surface; AF interacts with residues in the UDP-binding pocket of OGT; (B) binding mode analysis of UDP-OGT; (C) the root mean square fluctuation(RMSF) of OGT over 20 ns MD simulation.

## 2.4 AF 的 OGT 体外抑制活性

使用 0.025~500  $\mu\text{mol/L}$  浓度梯度的 AF 作用于 OGT 无细胞反应体系, 利用 OGT 活性分析试剂盒测定 AF 的抑制率. 由图 5(A) 可见, AF 分子能够在体外以浓度梯度的方式抑制 OGT 催化的糖基转移反应, 具有良好的 OGT 抑制活性. 经计算, AF 的 OGT 半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ 值)为 48.1  $\mu\text{mol/L}$ . 进一步检测了 AF 分子在无细胞体系中对单一蛋白的 *O*-GlcNAc 糖基化修饰抑制情况. 核孔蛋白 Nup62 是能够进行多位点 *O*-GlcNAc 糖基化修饰的蛋白<sup>[21]</sup>, 多个位点的 *O*-GlcNAc 修饰会增加该蛋白的分子量, 因此未发生 *O*-GlcNAc 修饰的 Nup62 蛋白在电泳中表现出更快的迁移速率. 使用 50  $\mu\text{mol/L}$  的 AF 作用于 Nup62 蛋白为底物的 OGT 无细胞反应体系, 以 50  $\mu\text{mol/L}$  的 ST045849 作为阳性对照. 利用免疫印迹法检测了 Nup62 蛋白的 *O*-GlcNAc 修饰以及分子量的变化情况[图 5(B)]. *O*-GlcNAc 修饰的特异性抗体

免疫印迹检测结果表明, AF 分子能够有效抑制 OGT 蛋白对 Nup62 蛋白的 *O*-GlcNAc 修饰, 并且 AF 分子处理的反应组 Nup62 蛋白表现出较快的电泳迁移速度, 证明 Nup62 的分子量变小, 从另一角度佐证 AF 分子具有 OGT 抑制活性. 这一结果与阳性对照 ST045849 处理组类似. 以上结果说明, AF 能够在体外有效抑制 OGT 的糖基转移酶活性.

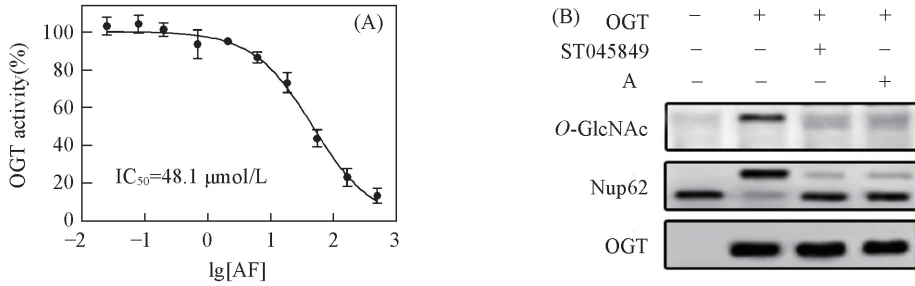


Fig.5 AF inhibits OGT *in vitro*

(A) AF inhibited OGT activity in a dose-dependent manner; (B) AF (50  $\mu\text{mol/L}$ ) inhibited *O*-GlcNAc modification of recombinant Nup62 in a cell-free reaction system.

## 2.5 AF 的 OGT 细胞内抑制活性

为了确定 AF 分子的细胞内 OGT 抑制活性, 进一步在培养的 Cos7 细胞系上检测了 AF 的 OGT 抑制活性. 使用 20~150  $\mu\text{mol/L}$  的 AF 处理 Cos7 细胞 24 h, 采用免疫印迹法检测细胞内 *O*-GlcNAc 修饰蛋白变化情况. 随着 AF 浓度的增加, 细胞内 *O*-GlcNAc 修饰呈现减少趋势, 说明 AF 能够以浓度依赖方式抑制细胞内的 OGT 酶活性[图 6(A)]. 进一步使用 50  $\mu\text{mol/L}$  的 AF 处理 Cos7 细胞 6~24 h, 采用免疫印迹法检测细胞内 *O*-GlcNAc 修饰蛋白变化情况. 随着时间的延长, 细胞内的 *O*-GlcNAc 修饰逐渐减少, 说明 AF 能够以时间依赖方式抑制细胞内的 OGT 酶活性[图 6(B)]. 以上结果表明, AF 能够在细胞内有效抑制 OGT 酶活性, 降低细胞内蛋白的 *O*-GlcNAc 糖基化修饰.

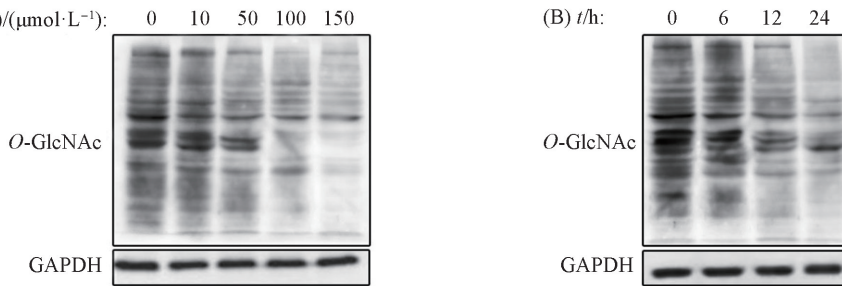


Fig.6 AF inhibites OGT in cells

(A) Western blots of Cos7 cell lysates after AF treatment at different doses(0—150  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h;

(B) western blots of Cos7 cell lysates after 50  $\mu\text{mol/L}$  AF treatment for 6—24 h.

综上所述, 利用基于结构的虚拟筛选方法, 通过药物发现软件 Discovery Studio 4.5 从天然产物化合物库中筛选得到 1 个 *O*-连接 *N*-乙酰葡萄糖胺转移酶(OGT)的抑制剂——双黄酮类分子阿曼托双黄酮(AF). 分子对接与分子动力学模拟实验证明, AF 能够与 OGT 蛋白形成多个氢键, 从而较稳定地结合在 OGT 蛋白的天然底物尿苷二磷酸(UDP)结合口袋处. 体外 OGT 抑制实验结果表明, AF 能够以浓度梯度方式有效抑制该酶的糖基转移酶活性, 并且能够有效降低核孔蛋白 62(Nup62)蛋白的 *O*-连接 *N*-乙酰葡萄糖胺修饰(*O*-GlcNAc 修饰). 进一步的细胞内浓度和时间梯度实验证明, AF 分子在细胞内具有 OGT 酶抑制活性, 以浓度和时间依赖的方式抑制细胞内的 *O*-GlcNAc 修饰. AF 的发现验证了基于结构的虚拟筛选方法用于 OGT 抑制剂开发的可行性.

## 参 考 文 献

- [1] Moremen K. W., Tiemeyer M., Nairn A. V., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2012**, 13(7), 448—462
- [2] Wells L., Vosseller K., Hart G. W., *Science*, **2001**, 291(5512), 2376—2378

- [ 3 ] Torres C. R., Hart G. W., *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259(5), 3308—3317
- [ 4 ] Levine Z. G., Walker S., *Ann. Rev. Biochem.*, **2016**, 85, 631—657
- [ 5 ] Zheng J. P., Liu H. T., Du Y. G., *Acta Microbiologica Sinica*, **2017**, 57(8), 1141—1151(郑军平, 刘洪涛, 杜昱光. 微生物学报, **2017**, 57(8), 1141—1151)
- [ 6 ] Caldwell S. A., Jackson S. R., Shahriari K. S., Lynch T. P., Sethi G., Walker S., Vosseller K., Reginato M. J., *Oncogene*, **2010**, 29(19), 2831—2842
- [ 7 ] Brownlee M., *Nature*, **2001**, 414(6865), 813—820
- [ 8 ] Bond M. R., Hanover J. A., *Ann. Rev. Nutrition*, **2013**, 33, 205—229
- [ 9 ] Trapannone R., Rafie K., van Aalten D. M., *Biochemical Society Transactions*, **2016**, 44(1), 88—93
- [ 10 ] Wang Y., Zheng Q. C., Zhang J. L., Xie M., Zhan J. Y., Zhang H. X., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2015**, 31(6), 1029—1038
- [ 11 ] Cheng S. Q., Liang G. D., Jiang X. F., Wang C., Liu K. L., *Chem. J. Chinese Universities*, **2016**, 37(7), 1287—1292(程思琦, 梁国栋, 王潮, 刘克良. 高等学校化学学报, **2016**, 37(7), 1287—1292)
- [ 12 ] Ortiz R. F., Jiang J., Lazarus M. B., Orman M., Janetzko J., Fan C., Dubeau D. Y., Tan Z. W., Thomas C. J., Walker S., *ACS Chemical Biology*, **2015**, 10(6), 1392—1397
- [ 13 ] Lazarus M. B., Nam Y., Jiang J., Sliz P., Walker S., *Nature*, **2011**, 469(7331), 564—567
- [ 14 ] Duan Y. B., Yin Y., Meng F. L., Zhao L. H., Liu Y. K., Yuan Z., Feng Y. B., *Chem. J. Chinese Universities*, **2017**, 38(9), 1568—1577(段永斌, 殷燕, 孟凡丽, 赵连花, 刘玉坤, 袁哲, 冯阳波. 高等学校化学学报, **2017**, 38(9), 1568—1577)
- [ 15 ] Wang Q., He J., Wu D., Wang J., Yan J., Li H., *Journal of Luminescence*, **2015**, 164, 81—85
- [ 16 ] Totrov M., Abagyan R., *Current Opinion in Structural Biology*, **2008**, 18(2), 178—184
- [ 17 ] Xiong Z. J., Du P., Li B., Xu L. L., Zhen X. C., Fu W., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2011**, 27(4), 655—660
- [ 18 ] Meraj K., Mahto M. K., Christina N. B., Desai N., Shahbazi S., Bhaskar M., *Bioinformatics*, **2012**, 8(23), 1139—1146
- [ 19 ] Han Y., Zhu L. L., Zhang Y. Y., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2016**, 32(4), 641—646
- [ 20 ] Lee E., Shin S., Kim J. K., Woo E. R., Kim Y., *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **2012**, 33(9), 2878—2882
- [ 21 ] Gloster T. M., Zandberg W. F., Heinonen J. E., Shen D. L., Deng L., Vocadlo D. J., *Nature Chemical Biology*, **2011**, 7(3), 174—181

## Discovery and Activity Verification of a *O*-GlcNAc Transferase Inhibitor by Structure-based Virtual Screening<sup>†</sup>

LIU Yubo, ZHANG Nana, CHEN Jinjiao, ZHU Tong, ZHANG Jianing, LI Wenli\*  
(School of Life Science and Medicine, Dalian University of Technology, Panjin 124221, China)

**Abstract** A specific natural-product *O*-GlcNAc transferase(OGT) inhibitor(Amentoflavone, AF) was identified from a structure-based virtual screening analysis. X-ray structure of the human OGT binding to uridine diphosphate(UDP) was used as the receptor in Discovery Studio 4.5. AF effectively inhibited OGT in a dose dependent and time dependent manner *in vitro*. The IC<sub>50</sub> value of this compound was 48.1 μmol/L. Western blot showed that *O*-GlcNAc modification of Nup62 by OGT in a cell free reaction system was decreased along with a shift in molecular weight by AF treatment. Furthermore, AF reduced global *O*-GlcNAcylation in a dose and time-dependent manner in Cos7 cells. Molecular dynamics analysis suggested that AF might form multiple hydrogens bonds with OGT in the same positions as the sugar donor UDP. This study validated the use of structure-based molecular docking to discover novel inhibitors of OGT. AF may be employed as a useful scaffold for the development of more potent OGT inhibitors in the future.

**Keywords** *O*-GlcNAc transferase; *O*-GlcNAc; Inhibitor; Virtual screening

(Ed.: P, H, W, K)

<sup>†</sup> Supported by the National Natural Science Foundation of China(Nos. 31570802, 21502015) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China(No. DUT17CJ21).