

# In silico probir derivata kumarina i L-askorbinske kiseline na histonskoj demetilazi LSD1 - pametni dizajn novih kemoterapeutika

---

Ister, Rok

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:700716>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Rok Ister**

***In silico* probir derivata kumarina i *L*-askorbinske  
kiseline na histonskoj demetilazi LSD1 —  
pametni dizajn novih kemoterapeutika**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2018.**

Rad je napravljen i napisan pod mentorstvom doc. dr. sc. Donatelle Verbanac (Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet ) i pod neposrednim vodstvom dr.sc. Višnje Stepanić (Institut „Ruđer Bošković“) kojima se ovom prilikom zahvaljujem na posvećenom trudu i vremenu za ostvarenje ovog rada.

Spojevi na kojima su eksperimenti provedeni su sintetizirani na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr.sc. Silvane Raić-Malić. Računski dio rada proveden je na Hrvatskoj nacionalnoj „grid“ infrastrukturi (CRO NGI).

Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016/2017.

# SADRŽAJ

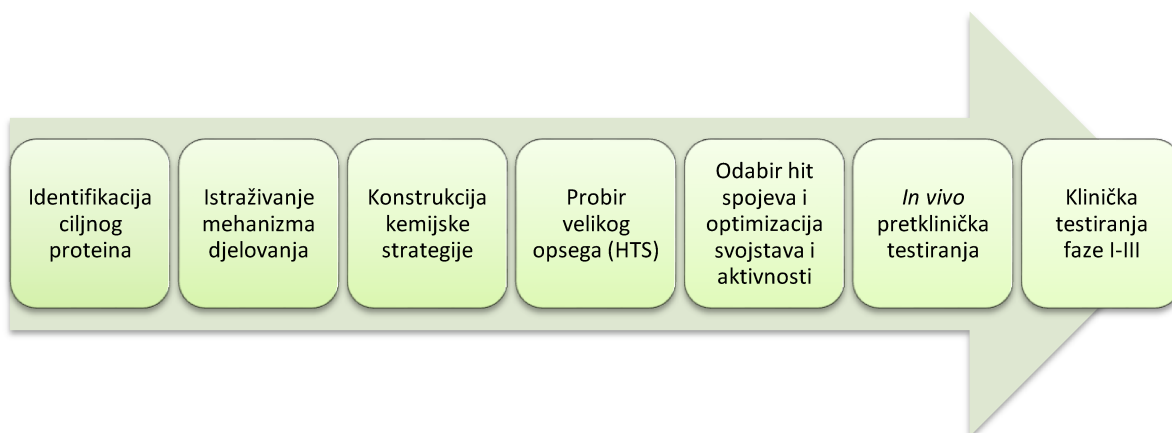
<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	Racionalni proces otkrivanja novih lijekova .....	1
1.2	Ciljni protein – lizin-specifična histonska demetilaza LSD1 (KDM1A) .....	2
1.3	Inhibitori demetilaze LSD1 .....	4
1.3.1	„Kovalentni“ inhibitori demetilaze LSD1 .....	4
1.3.2	Reverzibilni inhibitori demetilaze LSD1 .....	5
1.4	Novi kemijski derivati sa središnjim 1,2,3-triazolskim fragmentom.....	9
1.5	Keminformatička metoda molekulskog uklapanja .....	12
<b>2</b>	<b>METODE</b> .....	<b>14</b>
2.1	Molekulsko uklapanje u dva vezna mjesta .....	14
2.2	Analiza rezultata .....	17
<b>3</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>18</b>
3.1	Kontrolni heterociklički spojevi iz literature.....	18
3.1.1	Predviđeni načini vezanja .....	18
3.2	Određivanje graničnih vrijednosti veznih energija između aktivnih i neaktivnih spojeva .....	24
3.3	Analiza rezultata dobivenih uklapanjem derivata kumarina .....	28
3.4	Analiza rezultata dobivenih uklapanjem derivata askorbata.....	35
3.4.1	Derivati L-askorbinske kiseline (AA_diBz).....	35
3.4.2	2,3-dibenzilirani derivati L-askorbinske kiseline (AA_diBz).....	35
3.4.3	Derivati L-askorbinske kiseline s dvostrukom vezom C4=C5 (AA_DB).....	36

<b>4</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>SAŽETAK.....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>52</b>

# 1 Uvod

## 1.1 Racionalni proces otkrivanja novih lijekova

Moderna paradigma razvoja novih lijekova danas se poglavito temelji na bliskoj suradnji mnogih znanstvenih disciplina. Pod utjecajem konkurencije u farmaceutskoj industriji i sve većih troškova razvoja novog lijeka zbog rigoroznih kontrola procesa od strane nadležnih državnih i/ili nad-državnih institucija, stvorila se potreba za optimizacijom procesa razvoja lijeka. Iz tih razloga farmaceutska industrija je prepoznala sveobuhvatan interdisciplinarni racionalni pristup kao onaj koji daje najbolje rezultate po najmanjoj cijeni. U prosjeku cijeli proces za stavljanje lijeka na tržište traje oko 12 godina i troškovi iznose oko 1.8 milijarde američkih dolara[1][2]. Proces počinje identifikacijom i validacijom ciljanog proteina na čiju aktivnost je moguće djelovati malim molekulama (< 500Da), tzv. “druggable” proteina. Nakon upoznavanja mehanizma djelovanja proteina i njegovih strukturnih karakteristika vezanja liganda, izvodi se strategija sinteze spojeva, tzv. novih kemijskih entiteta(NCE<sup>1</sup>). Metodom probira velikog protoka (HTS<sup>2</sup>) iz mnoštva kemijskih spojeva odabiru se oni koji djeluju na ciljni protein, i generiraju se tzv. hit-molekule. To se, između ostalog, postiže primjenom niza računalnih kemijskih i bioinformatičkih metoda poznatih kao *in silico* pristup koji je korišten i u ovom radu. Nadalje, prije pretkliničkih i kliničkih testiranja, kreće optimizacija tih istih spojeva u smislu i farmakodinamske i farmakokinetičke aktivnosti. Konačno, probirani i optimizirani spojevi ulaze u faze pretkliničkih i kliničkih istraživanja i smatraju se kandidatima za daljnji razvoj (Slika 1).



Slika 1: Prikaz procesa razvoja novog lijeka.

\*\*

<sup>1</sup> Engl. New Chemical Entity

<sup>2</sup> Engl. High-Troughput Screening

Cijeli proces razvoja lijeka (R&D<sup>3</sup>) prolazi kroz mnoge prepreke tijekom svoje realizacije. Između pretkliničkih i kliničkih faza testiranja u R&D procesu, broj potencijalnih lijekova bude ugrubo prepolovljen, s najmanjim uspjehom u drugoj fazi kliničkih ispitivanja gdje u sljedeću III fazu prolazi tek njih 25% [3]. Glavni razlog za napuštanje R&D u toj fazi je nedovoljna efikasnost testiranog spoja, odnosno nemogućnost postizanja terapijskih koncentracija na željenom mjestu djelovanja ili ispoljavanje toksičnosti spojeva na neke testne biološke sustave. Budući je riječ o sofisticiranoj i skupoj fazi cjelokupnog R&D procesa (Slika 1), postaje jasno zašto farmaceutska industrija bilježi nezadovoljavajući omjer koristi i troškova. Upravo se zato ulažu velike nade u doprinos računalnih pristupa uključujući simulacije za povećanje produktivnosti i smanjenje cijene cjelokupnog R&D procesa prema logici „odustani od razvoja ranije, dok je trošak razvoja još relativno mali“.

## 1.2 Ciljni protein – lizin-specifična histonska demetilaza LSD1 (KDM1A)

U drugu ruku, nakon sekvencioniranja ljudskog genoma, u prvotnim istraživanjima, provedene su analize s ciljem da se aproksimira broj potencijalnih ciljnih proteina koji imaju 1.) ulogu u patogenezi poznatih bolesti i 2.) onih koji su pogodni za terapijsku metu tzv „druggable“ [4]. Od ~25000 funkcionalnih gena u ljudskom genomu, nakon njihove ekspresije u proteine, oba svojstva imalo je tek oko 600 ciljnih proteina [5]. To bi mogao biti dobar alibi za stagnaciju izlaska novih lijekova, kada novija istraživanja ne bi pokazivala da je taj broj podcijenjen npr. u slučaju genoma kinaza tzv. kinoma [6]. Među odnedavno otkrivenim novim potencijalnim ciljnim proteinima, pažnju dobivaju posebice skupine enzima koji modificiraju transkriptom utječući na epigenom[7]. Među njima se nalazi i ciljni protein lizin-specifična histonska demetilaza LSD1(KDM1A) na koji je *in silico* testirana aktivnost novih kemijskih spojeva u ovom radu.

U zadnjem desetljeću područje epigenetike se značajno razvilo. Kako je sekvenciranje gena postajao sve brži i jeftiniji postupak, sve je više bilo poznato o regulatornim genima koji kodiraju čimbenike koji moduliraju epigenetski status stanice. Sekvencioniranjem egzoma, tj. dijelova molekule DNA koji odgovaraju genima koji kodiraju proteine, i korištenjem masene

\*\*

<sup>3</sup> Engl. Research and Development

spektrometrije, otkriveno je kako u mnogim tumorima izražaj epigenetskih faktora značajno promijenjen [8][9]. U ovom radu predmet zanimanja je metilacija histona. Histoni zajedno s molekulom DNA čine osnovni dio epigenoma. Reverzibilne kemijske modifikacije kao što su metilacija, acetilacija ili fosforilacija, određenih aminokiselinskih ostataka histona su temeljni načini modulacije epigenoma tj. transkripcije ljudskog genoma. Metilacija histona odvija se na bočnim lancima određenih aminokiselinskih ostataka lizina i arginina, do određenog stupnja, Tako npr. dušikov atom lizina može biti mono-, di – i tri-metiliran.

Obitelj lizin-specifičnih histonskih demetilaza LSD<sup>4</sup>(KDM) u koju spada ciljni protein u ovom radu LSD1 je filogenetski povezana s dobro poznatim monoamino oksidazama MAOA i MAOB zbog kojih je aktivna katalitička domena nazvana AOL<sup>5</sup> domenom (Slika 2). Kofaktor enzima je flavin adenin dinukleotid (FAD), koji u demetilazi LSD1 sudjeluje u uklanjanju metilne skupine s lizina u obliku formaldehida [10][9]. LSD1 također sadrži domenu SWIRM koja je specifična za jezgrene proteine koji tvore interakcije s kromatinom. Služi za interakcije protein-protein unutar kompleksa zaduženih za regulaciju ekspresije gena [11]. Mjesto metilacije a time i djelovanja lizin-specifične histonske demetilaze označava se kao „HxKy“ gdje „x“ označava histon a „y“ lizinski ostatak u tom histonu koji je specifično metiliran. Na primjer, H3K4 označava da je lizinski aminokiselinski ostatak na položaju četiri histona H3 metiliran. Metilacijski status H3K4 se smatra među najvažnijim epigenetskim markerima koji određuju ekspresiju gena. Enzim LSD1 je demetilaza specifična za monometiliran H3K4me1 i dimetiliran H3K4me2 lizinski ostatak histona H3. Uz H3K4, LSD1 demetilira i 'Lys-9 (H3K9) histona H3, djelujući kao koaktivator ili korepresor transkripcije, ovisno o kontekstu.

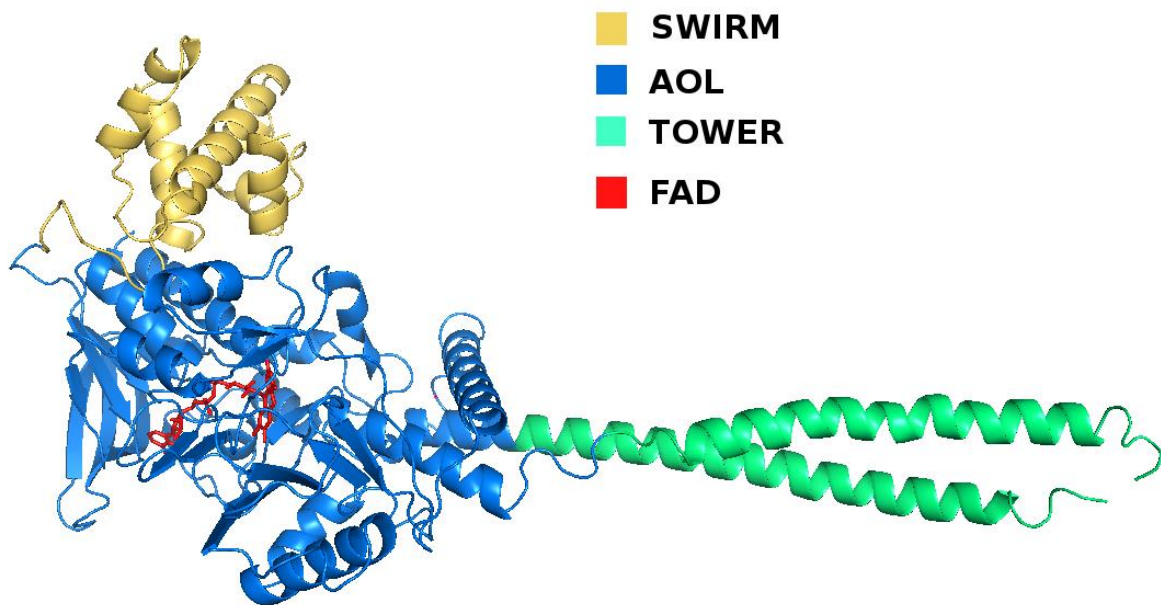
LSD1 je pojačano eksprimirana u ljudskim neoplastičnim stanicama. cDNA *microarray* analiza je pokazala transaktivaciju LSD1 u stanicama kolorektalnog karcinoma i karcinoma pluća [12]. Nadalje, kvantitativni reverzni transkripcijski PCR i Western blot su pokazali značajnu pojačanu ekspresiju ove demetilaze u stanicama visoko-rizičnih karcinoma prostate [13]. Isto tako, Schulte et al. su opazili snažnu ekspresiju LSD1 u stanicama slabo diferenciranog neuroblastoma [14]. U svim gore navedenim slučajevima autori su također dokazali funkcionalnu vezu LSD1 u karcinogenezi uspješno je inhibirajući čime se smanjila aktivnost stanične proliferacije danih tumora i time su ustanovili LSD1 kao dobar ciljni protein za razvoj budućih kemoterapeutika.

\*\*

<sup>4</sup> Eng. Lysine Specific Demethylase

<sup>5</sup> Eng. Amine-Oxidase Like



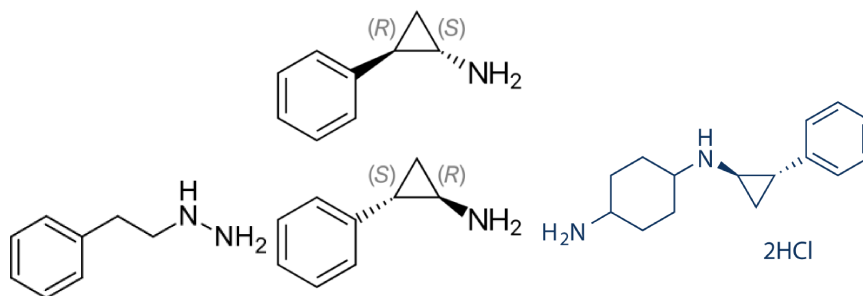


Slika 2: Prikaz domena u demetilazi LSD1; 3D struktura je uzeta iz baze Protein Data Bank [15] pod kodom 2Z3Y [16]; Prikazano programom PyMol[17–19].

### 1.3 Inhibitori demetilaze LSD1

#### 1.3.1 „Kovalentni“ inhibitori demetilaze LSD1

Poznati inhibitori aminoooksidaza MAOA i MAOB fenelzin i tranilcipromin (PCPA) su bili među prvim spojevima kojima je uspješno postignuta inhibicija demetilaze LSD1 (Slika 3). Oba spoja su pokazivali podjednaku inhibiciju sva tri enzima. Strukturne i mehanističke studije su pokazale da mehanizam inhibicije u oba slučajeve je stvaranje kovalentne veze s kofaktorom FAD-om, tzv. „samoubilačka“ inaktivacija enzima [20]. Kako se radi o vezanju na kofaktor zapravo se može reći da je posrijedi „pseudo-kovalentna“ inhibicija, koja je uzrok relativno slabom toksičnošću unatoč kovalentnom tipu vezanja.



**Slika 3: Poznati kovalentni inhibitori LSD1; s lijeva na desno: fenelzin, tranilcipromin i ORY-1001**

Poboljšanje u potentnosti i selektivnosti je postignuto deriviranjem tranilcipromina na aromatskom prstenu. Neki od tih derivata *in vitro* su inhibirali rast blastičnih stanica mišje akutne promijelocitne leukemije i pokazali sinergistički efekt s poznatim kemoterapeuticima koji se koriste za liječenje leukemije [21]. Neki derivati tranilcipromina pokazuju i sposobnost prodora kroz krvno-moždanu barijeru [22], što je vrlo obećavajuće imajući na umu da je kod leukemija važan izvor relapsa bolesti upravo središnji živčani sustav. Pretkliničke studije pokazuju dobre rezultate u liječenju akutne mijeloične leukemije s tranilciprominom [20]. Spoj temeljen na tranilciprominu, pod kodnim imenom ORY-1001 i visokom *in vitro* potentnošću ( $IC_{50}^6=20\text{nM}$ ), odobren je za prvo kliničko testiranje u prosincu 2013. godine (Slika 3) [23].

### 1.3.2 Reverzibilni inhibitori demetilaze LSD1

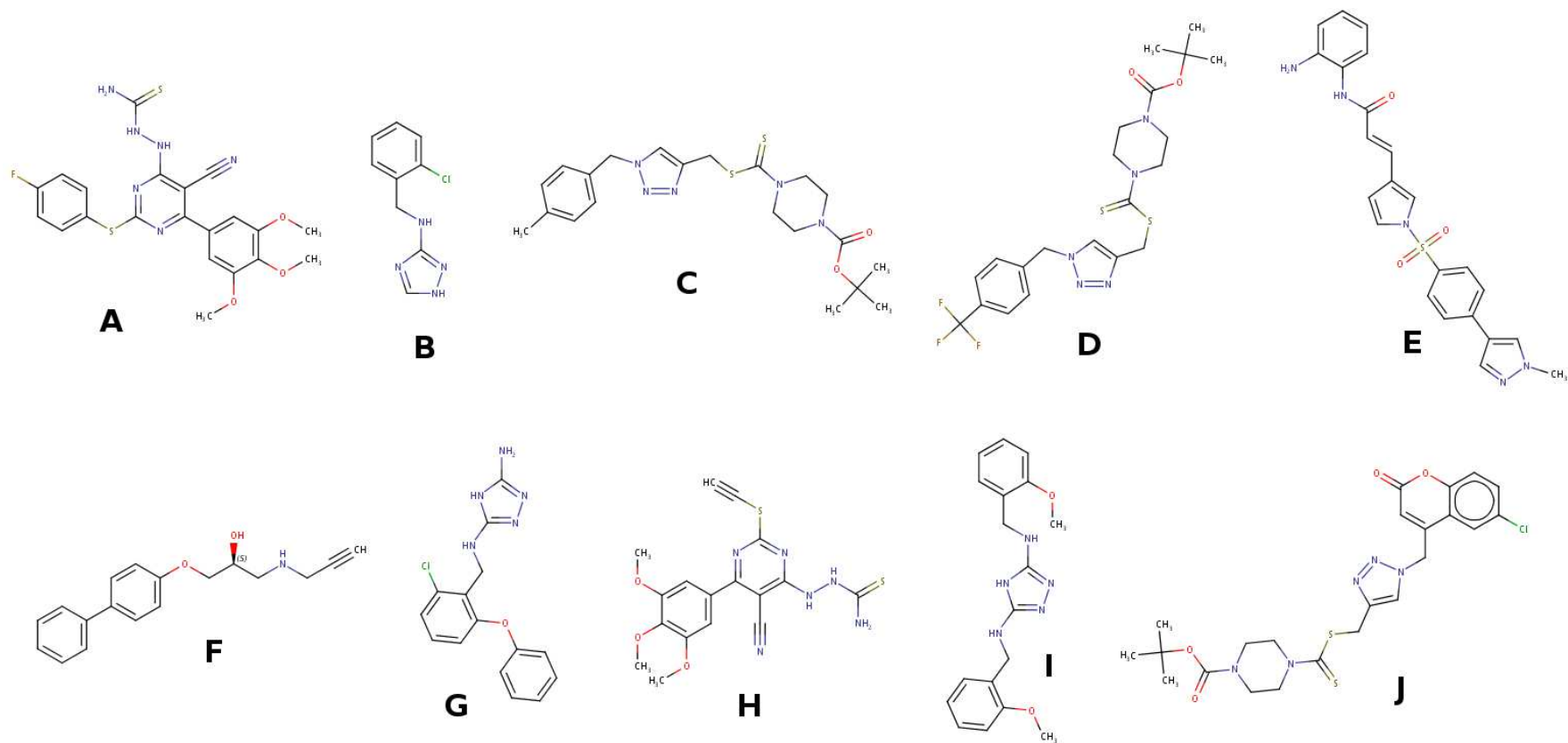
Uz „kovalentne“ inhibitore, intenzivno se radi na otkrivanju nekovalentnih, reverzibilnih inhibitora demetilaze LSD1 (Tablica 1)(Slika 4)(Slika 5)(Slika 6) [24-34]. Prema saznanju autora u trenutku pisanja ovog rada, za sada nema reverzibilni inhibitora demetilaze LSD1 koji su ušli u kliničku fazu testiranja. Mehanizam inhibicije enzima LSD1 ovih inhibitora nije općenito poznat.

\*\*

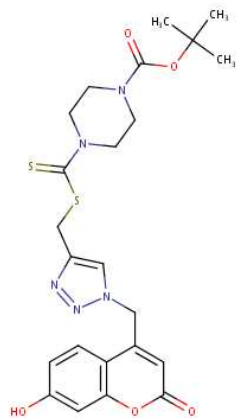
<sup>6</sup> Koncentracija kemijskog spoja potrebna da se inhibira 50% aktivnosti enzima

**Tablica 1: IC<sub>50</sub> vrijednosti za kemijske spojeve (Slika 4) iz literature testirane na inhibiciju izolirane demetilaze LSD1.**

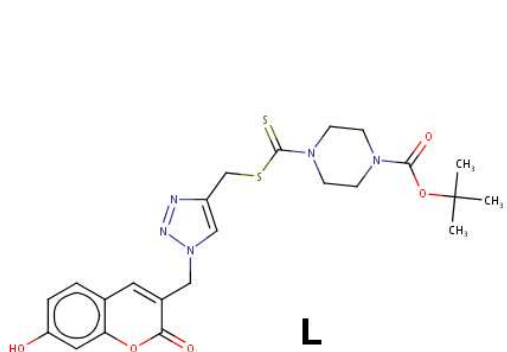
Oznaka	LSD1 inhibitor	Izvor	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
A	10b_JMedChem2015_Zheng	[24]	>125
B	12_MedChemComp2014_5	[26]	0,944
C	26_JMedChem2013_Zheng	[27]	2,1
D	30_JMedChem2013_Zheng	[27]	>125
E	4SC-202	[28]	~0.1
F	5a_JMedChem2013_Schmitt	[29]	44
G	6_MedChemComp2014_5	[26]	1,192
H	6b_JMedChem2015_Zheng	[24]	0,65
I	7_MedChemComp2014_5	[26]	2,22
J	8b_MedChemComp2014	[30]	>125
K	8k_MedChemComp2014	[30]	0,39
L	9b_MedChemComp2014	[30]	>125
M	amidoxime	[31]	16,8
N	aminothiazole_16k	[32]	7,5
O	aminothiazole_16l	[32]	15,8
P	aminothiazole_8	[32]	437
Q	curcumin_enol	[33]	~15
R	curcumin_enol_withHB	[33]	~15
S	curcumin_keto	[33]	~15
T	GSK354	[32]	1
U	namolin	[34]	51
V	quercetin	[33]	~35
W	resveratrol	[33]	10,54
X	SP2509 huntsman	[25]	0,013



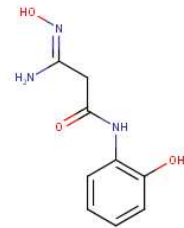
Slika 4: 2D strukture spojeva koji su testirani kao inhibitori demetilaze LSD1[24-34] i korišteni u ovom radu za postavljanje modela interakcije reverzibilnih inhibitora s ciljnom demetilazom LSD1 (Tablica 1).



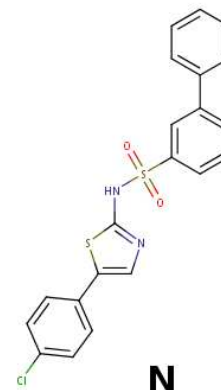
**K**



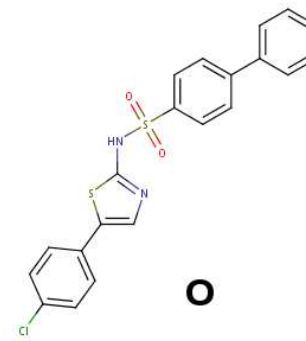
**L**



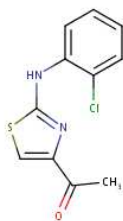
**M**



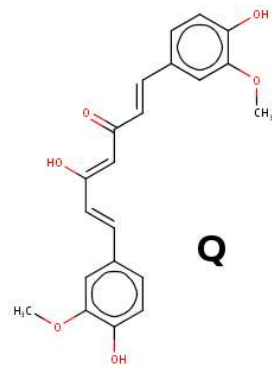
**N**



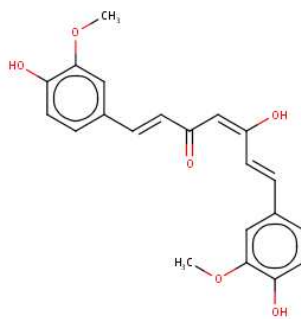
**O**



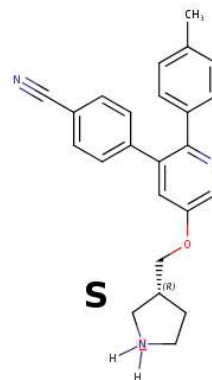
**P**



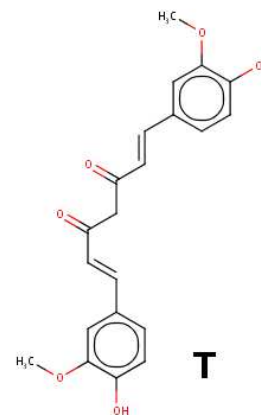
**Q**



**R**

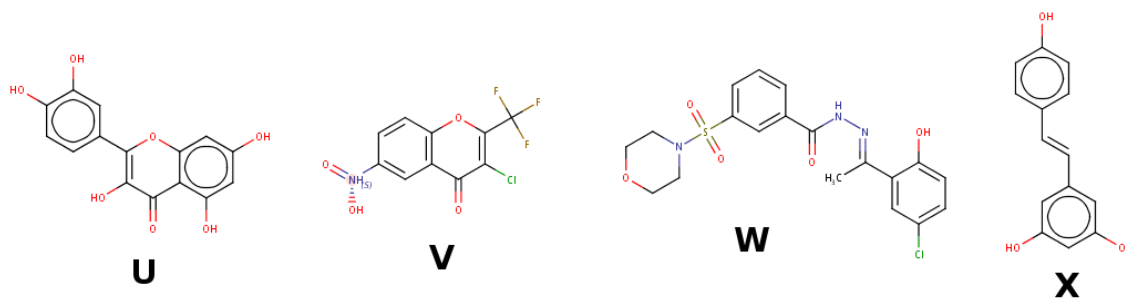


**S**



**T**

Slika 5: Vidi podnaslov slike 4

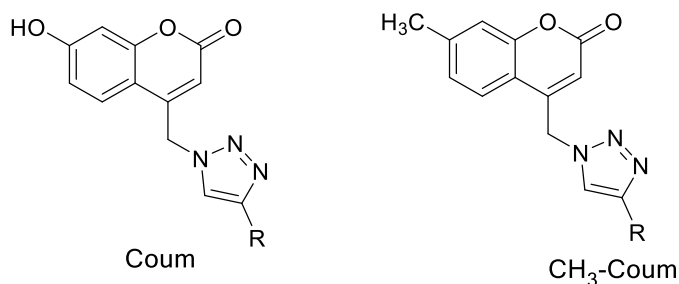


Slika 6: Vidi podnaslov slike 4

#### 1.4 Novi kemijski derivati sa središnjim 1,2,3-triazolskim fragmentom

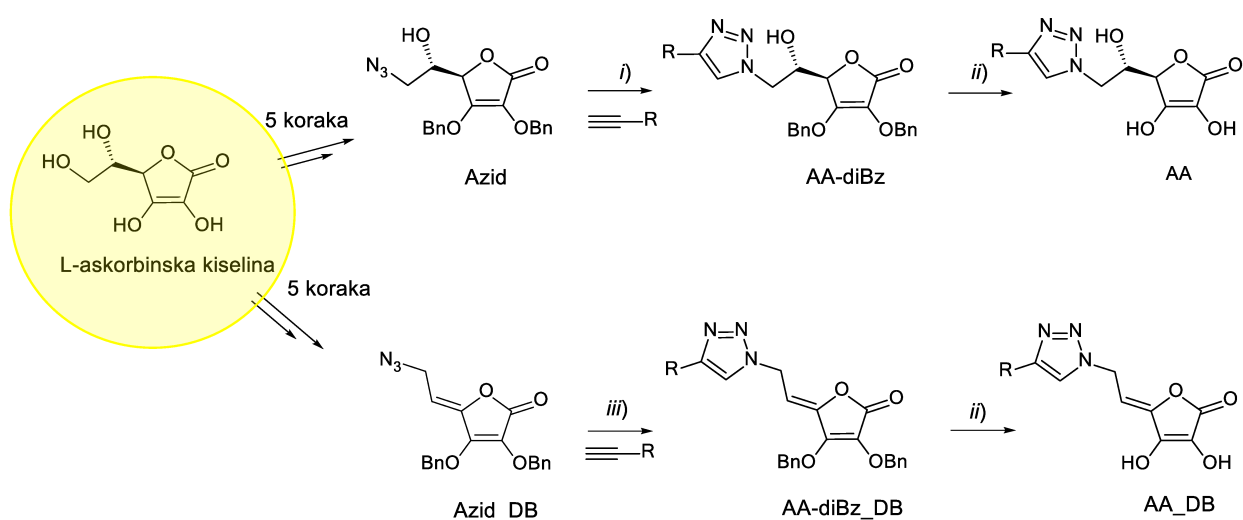
U Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu sintetiziran je niz novih kemijskih spojeva u okviru HRZZ projekta „Sinteza i citostatska ispitivanja biblioteke novih dušikovih heterocikla“, (IP-11-2013-5596) pod vodstvom prof. dr. sc. Silvine Raić-Malić. Većinu sinteza provele su dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević (derivati kumarina) i dr. sc. Andrijana Meščić (derivati *L*-askorbinske kiseline).

Hibridi 1,2,3-triazola i kumarina (Slika 7) s različitim supstituentima u položaju C-4 triazola (Tablica 2) sintetizirani su prema postupku objavljenom u literaturi [35].



Slika 7: 1,2,3-triazolni derivati kumarina sa 7-OH (Coum) i 7-metil kumarinskom (CH<sub>3</sub>-Coum) jezgrom.

Povezivanjem dva farmakofora, 1,2,3-triazola i *L*-askorbinske kiseline, sintetiziran je i niz 1,2,3-triazolnih derivata *L*-askorbinske kiseline (AA) AA\_diBz, AA , AA\_diBz \_DB, AA\_DB; gdje diBz označuje 2,3-dibenzilirane derivate i DB dvostruku vezu C4=C5 (Slika 8).



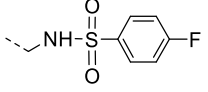
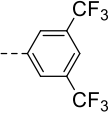
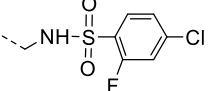
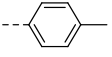
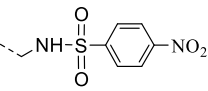

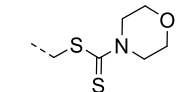
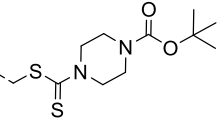
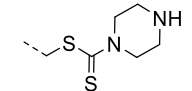

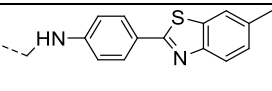
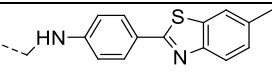
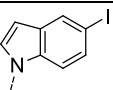

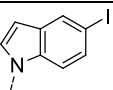
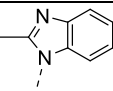
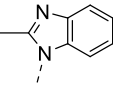

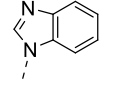
**Slika 8: Sinteza novih 1,4-disupstituiranih-1,2,3-triazolnih derivata L-askorbinske kiseline.**

*Reagensi i uvjeti: i) Cu, 1M CuSO<sub>4</sub>, tert-butanol, DMF, H<sub>2</sub>O, sinteza u mikrovalnom reaktoru; ii) boron-triklorid, diklormetan, -60 °C; iii) Cu(OAc)<sub>2</sub>, metanol.*

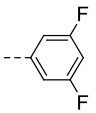

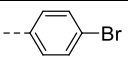
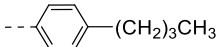
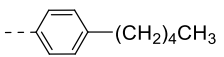
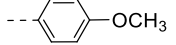
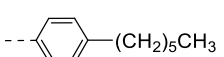
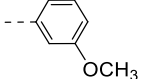
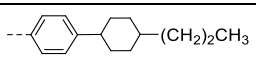
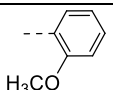
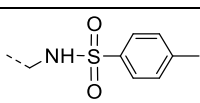
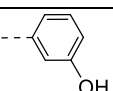
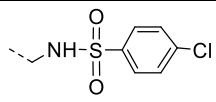
C-6 azidni derivati (Azid, Azid\_DB) izolirani su nakon niza reakcija selektivne zaštite i skidanja zaštite na hidroksilnim skupinama L-askorbinske kiseline prema postupku objavljenom u literaturi [36]. Klik reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije različitih terminalnih alkina i C-6 azido derivata L-askorbinske kiseline (Azid) te C-6 azido 5,6-nezasićenog derivata L-askorbinske kiseline (Azid\_DB) sintetizirani su različito supstituirani 1,2,3-triazolni derivati L-askorbinske kiseline (AA-diBz) te odgovarajući 1,2,3-triazolni derivati 4,5-didehidro-5,6-dideoksi-L-askorbinske kiseline (AA-diBz\_DB). Kao izvor Cu(I) iona, korištena je kombinacija bakrovog sulfata i elementarnog bakra ili otopina bakrovog acetata u metanolu. Derivati sa slobodnih hidroksilnim skupinama (AA i AA\_DB) dobiveni su uklanjanjem benzilne zaštitne skupine s položaja C-2 i C-3 laktorskog prstena L-askorbinske kiseline reakcijom s boron-trikloridom u suhom diklormetanu (Shema 1).

Kako bi se što bolje dobio uvid u odnos strukture i aktivnosti, klik reakcije su provedene s različitim terminalnim alkinima: ravnolančani i razgranati alkilni, različito supstituirani fenilni, ciklopropilni te benzensulfonamidni alkini, a pripremljeni su i odgovarajući nesupstituirani 1,2,3-triazolni derivati (1) (Tablica 2).

**Tablica 2: Supstituenti na položaju 1 (R1) i 4 (R4) središnjeg 1,2,3-triazolnog prstena. Coum i CH<sub>3</sub>-Coum označavaju 7-hidroksi i 7-metil kumarinski fragment (Slika 7), AA je fragment L-askorbinske kiseline, AA diBz njen 2,3-dibenzilirani derivat i AA DB derivata**

Oznaka supstituenta	R1	R4	Oznaka supstituenta	R1	R
1	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB	H	22	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB	
2	AA, AA_diBz, AA_DB		23	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB	
3	AA, AA_diBz, AA_DB		24	Coum	
4	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB		25	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB	
5	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB	--(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> Cl	26	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB	
6	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB	--(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	27	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB	
7	Coum		28	Coum	
8	Coum	--(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH	29	CH <sub>3</sub> -Coum	
9	Coum	--(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> OH	30	Coum	
10	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB		31	CH <sub>3</sub> -Coum	
11	Coum	--(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	32	Coum	
12	Coum	--(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	33	CH <sub>3</sub> -Coum	
13	Coum	---(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - 	34	Coum	



14	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB		35	CH <sub>3</sub> -Coum	
15	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB		36	AA, AA_diBz, AA_DB	--(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>
16	Coum		37	AA, AA_diBz, AA_DB	--(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub>
17	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB		38	AA, AA_diBz, AA_DB	
18	Coum		39	AA, AA_diBz, AA_DB	
19	Coum		40	AA, AA_diBz, AA_DB	
20	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB		41	AA, AA_diBz, AA_DB	
21	Coum, AA, AA_diBz, AA_DB				

Većina sintetiziranih spojeva pokazala je antiproliferativnu aktivnost *in vitro* na razne stranične linije raka [35]. Međutim ciljne biološke makromolekule ovih spojeva nisu poznate.

### 1.5 Keminformatička metoda molekuskog uklapanja

Računalni pristupi danas se standardno koriste u dizajnu novih lijekova (Slika 1) [37]. Mnogi lijekovi registrirani zadnjih par godina rezultat su integriranog interdisciplinarnog pristupa u kojem je primjena računalnih metoda, bioinformatičkih i keminformatičkih, neizostavna i nužna da bi ukupni proces bio što brži i jeftiniji. Keminformatički pristupi i metode se primjenjuju u istraživanju molekula, njihove strukture i fizikalno-kemijskih svojstava, te međumolekulskih interakcija. U dizajniranju novih lijekova jedan od glavnih pristupa je pristup SBDD (engl. structure-based drug design) utemeljen na strukturi ciljne biomakromolekule [37]. Za primjenu metoda SBDD osnovni preduvjet je da je trodimenzionalna struktura aktivne konformacije biološke molekule, najčešće proteina, poznata. U bazi Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) dostupno je više od 120000 kristalnih struktura proteina.

Jedna od najčešće korištenih metoda SBDD u proučavanju interakcija kemijskih spojeva i ciljnih makromolekula je metoda molekuskog uklapanja (engl. molecular docking) [37][38]. U molekuskom uklapanju, proučavani kemijski spojevi, bilo prirodni ili sintetski, se uklapaju u najčešće predefinirano mjesto vezanja, što omogućuje predviđanje njihovih mogućih načina vezanja i relativnih afiniteta vezanja za proučavanu ciljnu makromolekulu. *In silico* proces u kojem se niz kemijskih spojeva uklapa u definirano vezno mjesto na ciljnoj makromolekuli naziva se virtualni probir (engl. virtual screening) i standardni je postupak obogaćivanja (engl. enrichment) skupa spojeva određenih za *in vitro* testiranje, onima koji su aktivni u odnosu na ostale, neaktivne. Time se proces otkrivanja aktivnih molekula znatno pojeftinjuje, ubrzava i čini efikasnijim u smislu otkrivanja aktivnih hit molekula.

Postoje brojni programi za molekulsko uklapanje koji se međusobno razlikuju po algoritmima koji se primjenjuju za svaki od dva osnovna koraka predviđanja načina vezanja liganda u vezno mjesto receptora molekuskim uklapanjem: 1.) pretraživanje konformacijskog prostora liganda i receptora 2.) procjene energije vezanja kompleksa ligand-receptor pomoću metoda baziranih na polju sile.

U ovom radu za molekulsko uklapanje korišten je besplatan program AutoDock4 [39]. Pretraživanje konformacijskog prostora u programu AutoDock4 provedeno je upotrebom Lamarckovog genetičkog algoritma (LGA) koji je hibrid između GA (genetički algoritam) i LS (eng. local search) i koji simulira biološke procese probira jedinki prema izračunatoj energiji vezanja liganda. GA, u užem smislu, je metoda pretrage konformacijskog prostora koja kao okosnicu koristi pravila Darwinove evolucijske teorije i Mendelova pravila nasljeđivanja. Svojevrsni geni u molekuskom uklapanju su koordinate liganda - njegova rotacija i orijentacija u prostoru, te torzijski kutevi između njegovih rotabilnih veza. GA počinje generiranjem početne populacije i završava selekcijom konformacije liganda koja ima najbolje karakteristike preživljavanja, prvenstveno energiju vezanja. Između toga odvijaju se mnogi računi u kojima se pokušava simulirati prirodni mehanizam selekcije pojedinki kao recimo *crossingover* i nasumične mutacije. U LGA algoritmu, osim navedenih pravila nasljeđivanja i selekcije, koristi se još lokalno pretraživanje za određen postotak populacije jedinki. Taj algoritam naziva se Lamarckov po uzoru na njegovu teoriju da se fenotipska obilježja stečena tijekom života prenose dalje u genetičkom kodu, u skladu s novim saznanjima u epigenetici [40]. Mjesto uklapanja promatranih spojeva u dani protein određuje se definiranjem vezne rešetke. Vezna rešetka u programu AutoDock4 ima 3D oblik kvadra koje istraživač namješta prema svojoj namjeri i znanju, npr. na otprije poznato mjesto vezanja već poznatih inhibitora. Vezna rešetka je podijeljena na točke u prostoru (standardna

udaljenost od 0.375Å) i za svaku se unaprijed izračunava vrijednosti energije vezanja za svaki atom u ligandu i proteinu te se izračunate informacije pohranjuju pomoću programa AutoGrid4 istih autora.

Jedna od primjena metode molekuskog uklapanja je i tzv. pecanje ciljne makromolekule (engl. target fishing) za skupove analognih (strukturno sličnih) spojeva za koje mehanizam djelovanja nije poznat [41] kao što su novosintetizirani derivati kumarina i askorbinske kiseline s 1,2,3-triazolskim fragmentom (Tablica 2).

## 1.6 Cilj rada

Cilj ovog rada bio je da se uz upotrebu keminformatičke metode molekuskog uklapanja odredi:

- 1.) jesu li novosintetizirani derivati kumarina i L-askorbinske kiseline mogući reverzibilni inhibitori katalitičke aktivnosti demetilaze LSD1 i
- 2.) virtualno proberu spojeve za daljnje *in vitro* testiranje na taj enzim.

Mnogi od reverzibilnih LSD1-inhibitora (Slika 4) sadrže fragmente slične novosintetiziranim spojevima (Slika 7)(Slika 8)(Tablica 2). Posebno, kumarinski derivati uključujući spoj K (Slika 5) inhibiraju katalitičku aktivnost demetilaze LSD1 sa submikromolarnom vrijednosti konstante inhibicije  $IC_{50}$  (Tablica 1) [29].

Ovaj pristup je također omogućio testiranje mogućih mehanizama vezanja reverzibilnih inhibitora. Naime, mehanizam inhibicije poznatih reverzibilnih inhibitora LSD1 (Tablica 1) nije općenito poznat. Testirali smo dva moguća kompetitivna mehanizma inhibicije: 1) reverzibilni inhibitori demetilaze LSD1 mehanizmom supstratne kompeticije koji time sterički ometaju vezanje supstrata npr. N-terminalnog dijela polipeptidnog lanca histona i time sprečavaju njegovu demetilaciju i 2) reverzibilni inhibitori koji se natječu za vezno mjesto s kofaktorom FAD-om i tako ometaju katalitičku aktivnost LSD1 za koju je FAD neizostavan.

## 2 Metode

### 2.1 Molekulsko uklapanje u dva vezna mjesta

U ovom radu za promatrane novosintetizirane kemijske spojeve, (Slika 7)(Slika 8)(Tablica 2) mjesta i načini vezanja u katalitičkom mjestu demetilaze LSD1 i njihovi relativni afiniteti vezanja određeni su *in silico* upotrebom pristupa molekuskog uklapanja provedenog uz pomoć programa Autodock4 [39].

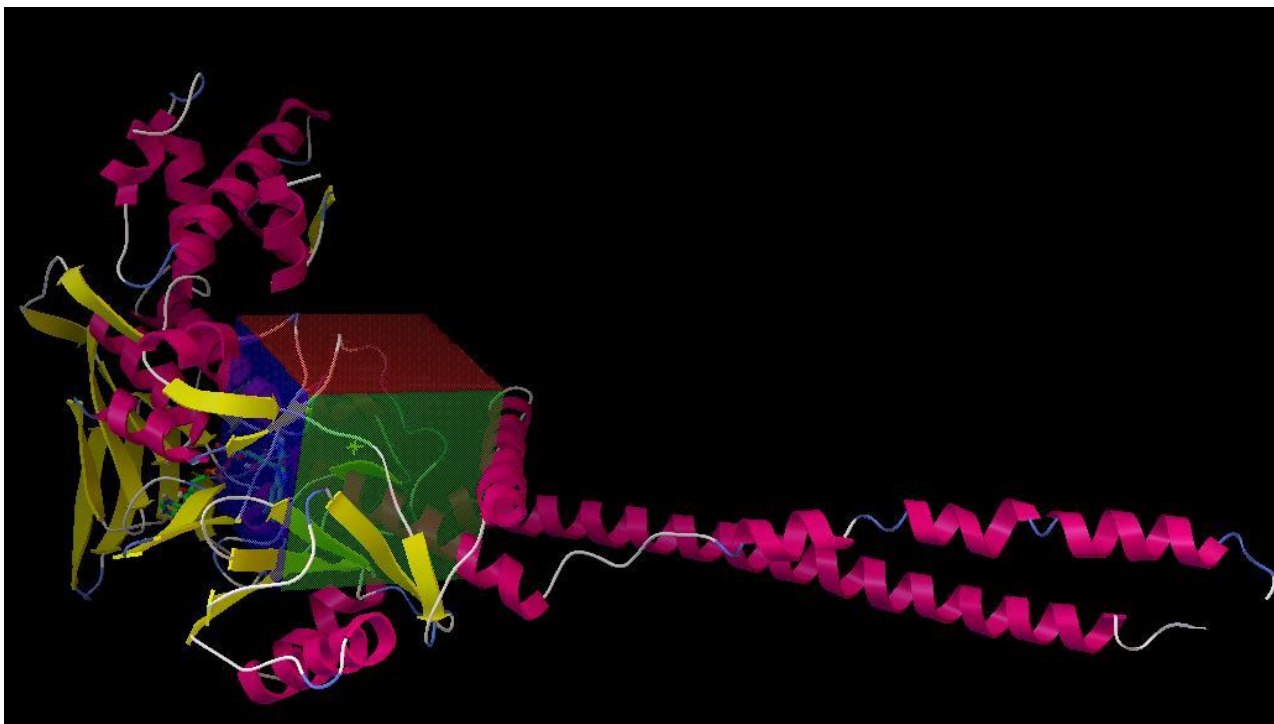
Parametri za veznu rešetku i uklapanje postavljeni su pomoću grafičkog sučelja AutoDockTools [39] koji je nadogradnja programa PMV<sup>7</sup> [42][43]. 3D kristalografska struktura LSD1 dobivena difrakcijom X-zrakama s rezolucijom od 2.25Å uzeta je iz baze PDB [15] pod kodnom oznakom 2Z3Y [16]. Pomoću Python skripte napisane za potrebe ovog rada zapisan je FASTA format sekvencije aminokiselina iz PDB formata da bi zatim uz BLAST *alignment* bila provjerena prisutnost svih aminokiselinskih ostataka u kristalografskoj strukturi. U AutoDockTools su izbrisane molekule vode, protonirani histidinski ostatci, dodani su atomi vodika i izračunati Gasteigerovi naboji za makromolekulu 2Z3Y. Pritom su nepolarni atomi vodika bili ugrađeni i protein pohranjen u PDBQT formatu. Također, izbrisan je kovalentni inhibitor vezan na FAD (PDB kodna oznaka aminokiselinskog ostatka F2N).

Zbog već navedenih razloga, virtualni probir spojeva je proveden uklapanjem u dva različito definirana vezna mjesta. Rešetka za (1) supstratno vezno mjesto je definirana kao kocka veličine 60x60x60 u jediničnim vrijednostima od 0.375Å (22.5Åx22.5Åx22.5Å) centrirana na koordinate x=34.957 y=55.06 z=44.289 kako bi zahvatili cijelo ulazno mjesto za supstrat (Slika 9). FAD je bio u svom veznom mjestu. Vezno mjesto (2) za mehanizam u kojem je pretpostavljena kompeticija s kofaktorom FAD, on je maknut u svrhu simuliranja kompeticije i rešetka je definirana kao kocka veličine 90x90x90 jediničnih vrijednosti od 0.375Å (33,75Åx33,75Åx33,75Å) i centrirana na koordinate x=29.703 y=48.369 z=38.129 (Slika 10). Za svaku rešetku su izračunate mape energija interakcije za svaku vrstu atoma prisutnom u svim ligandima, elektrostatska mapa, dielektrična mapa te mapa desolvatacije. Struktura proteina LSD1 je držana rigidnom, odnosno algoritmi konformacijskog pretraživanja se nisu odnosili na aminokiselinske ostatke na enzimu.

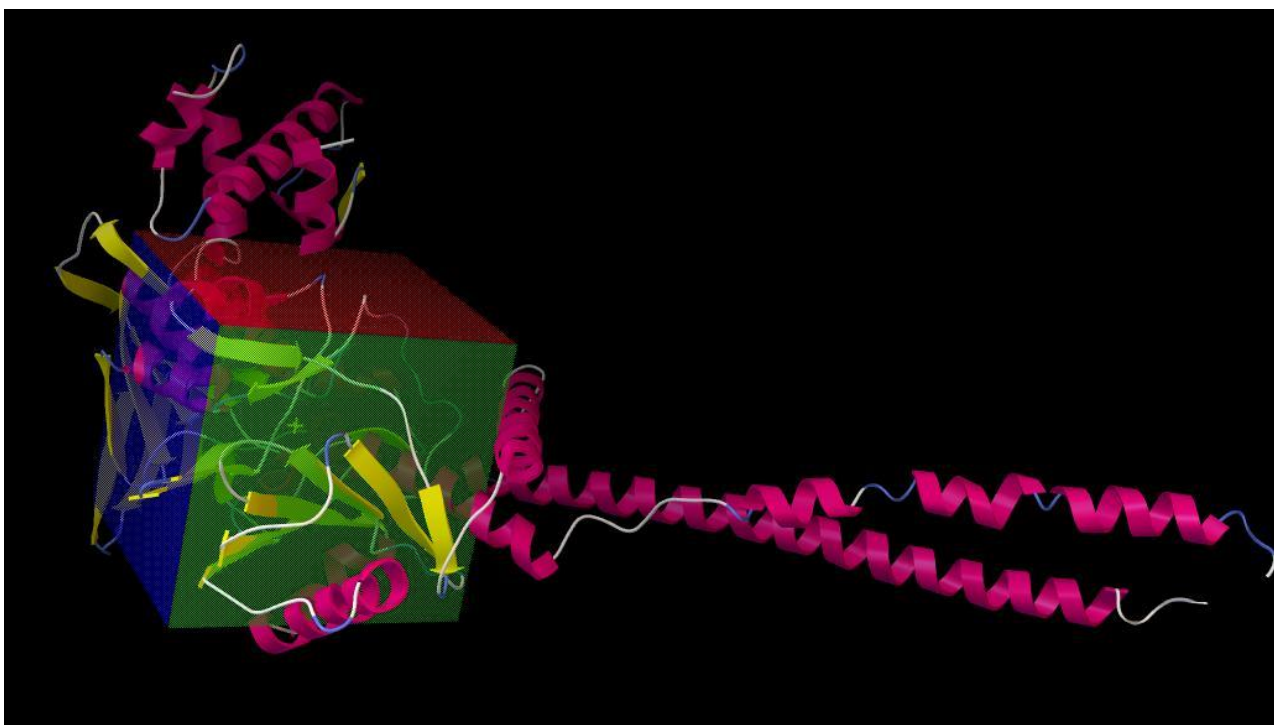
Svi kemijski spojevi su konvertirani u 3D oblik s dodanim atomima vodika iz zajedničke SMILES datoteke pomoću programa MarvinSketch (ver. 17.5.0 , <http://www.chemaxon.com>), te spremljeni u pojedinačne MOL2 datoteke. Nakon toga, koristeći Python skriptu `prepare_ligand4.py` priloženu uz originalnu distribuciju AutoDockTools, ligandima su dodijeljeni Gasteigerovi naboji, svakom je ustanovljeno torzijsko stablo, apsorbirani su nepolarni atomi vodika i ligandi pohranjeni u PDBQT format.

\*\*

<sup>7</sup> eng. Python Molecular Viewer



**Slika 9: Prikaz vezne rešetke za substratni tip inhibicije; FAD (zeleni štapići) je prisutan u svom veznom mjestu.**



**Slika 10: Prikaz vezne rešetke za inhibiciju mehanizmom kompeticije s FAD-om; FAD nije prisutan u veznom mjestu.**

Vrijednosti za postavke programa AutoDock4 su bile iste za oba promatrana vezna mjesta i iznosile su: veličina početne populacije 300, broj evaluacija energije 3000000, stopa genetske

mutacije 0.02, stopa *crossingovera* 0.8, s jednom konformacijom koja prolazi dalje u novu generaciju. Jedini parametri koji su bili mijenjani od njihovih originalnih postavki su broj početne populacije i broj evaluacija energije koji su adekvatno povećani da bi se kompenzirao velik broj točaka u veznoj rešetki za veliko vezno mjesto (2). Svaki spoj je prošao 100 puta kroz algoritam što je rezultiralo sa 100 veznih konformacija grupiranih u klastere prema sličnosti koja je definira kao vrijednost kvadratnog korijena prosječnog korijena odstupanja oko srednje vrijednosti molekulskih koordinata (RMSD<sup>8</sup>). RMSD vrijednost odstupanja s kojom se smatralo da se radi o istom pretpostavljenom načinu vezanja liganda unutar klastera bila je 2.0 Å. U analizi rezultata razmatrani su klasteri konformacija koji su imali najmanju tj. najpovoljniju vrijednost energija vezanja ili/i najnapučeniji klaster s najvećim brojem veznih konformacija.

Svi računi molekuskog uklapanja provedeni su u formi virtualnog visokoprotočnog probira pomoću programa Autodock4 [39] instaliranog na Hrvatskoj nacionalnoj grid infrastrukturi (CRO NGI, <http://www.srce.unizg.hr/en/cro-ngi>).

## 2.2 Analiza rezultata

Za analizu rezultata korištene su originalne Python skripte priložene uz AutoDockTools (Ver.1.5.6) pod zajedničkim imenom *Utilities*. Skripta `summarize_results4.py` korištena je za pregledan ispis ključnih rezultata u CSV fileu koji su kasnije kopirani u Excelov XLS format i poredani po željenom kriteriju. Skripta je modificirana u svrhu ispisa ranga najvećeg klastera i naboja molekula.

Referentni kemijski spojevi koji su upotrebljeni za definiciju veznih rešetki (Slika 9)(Slika 10) te određivanje graničnih vrijednosti (engl. cut-off) energija vezanja između aktivnih i neaktivnih eksperimentalnih spojeva (Tablica 2), odabrani su tako da se međusobno značajno razlikuju u eksperimentalno izmjerenim IC<sub>50</sub> vrijednostima (Tablica 1).

Za određivanje granične vrijednosti veznih energija između aktivnih i neaktivnih spojeva za oba vezna mjesta upotrijebljen je paket „Optimal cutpoints“ u okruženju programa R[44][45]. Program R je besplatna platforma za statističke račune i grafičko prikazivanje. Distribuiran je pod Free Software Foundation-ovom GNU General Public Licencom. Pomoću paketa „Optimal cutpoints“ izračunata je krivulja ROC<sup>9</sup> i optimalne granične vrijednosti su određene pomoću Youdenovog indexa za ocjenjivanje dijagnostičkih testova[46]. Tablice rezultata

\*\*

<sup>8</sup> engl. Root Mean Square Deviation

<sup>9</sup> engl. Receiver Operating Characteristic

kontrolnih spojeva za supstratno (1) i veliko (2) vezno mjesto su iz Excel XLS formata bili konvertirani u CSV format kako bi potom bili učitani u R.

Senzitivnost testa je bila izračunata po formuli  $TP^{10}/(FN^{11}+TP)$  gdje se pod TP smatraju slučajevi kada je test točno potvrdio pozitivan rezultat a FN tamo gdje je test krivo pokazao negativan rezultat. Specifičnost je bila izračunata po formuli  $TN^{12}/(FP^{13}+TN)$  gdje se pod TN smatraju slučajevi kada je test točno prikazao negativne rezultate a FP tamo gdje je test krivo pokazao pozitivan rezultat. Točnost testa je bila određena kao broj svih točnih predviđanja testa (TP+TN) podijeljen s ukupnim brojem testiranja.

Uz AutoDockTools, za prikaz struktura enzima LSD1 i njegovih kompleksa s istraživanim spojevima korišten je i program Pymol [17–19].

## 3 Rezultati i rasprava

### 3.1 Kontrolni heterociklički spojevi iz literature

#### 3.1.1 Predviđeni načini vezanja

Novosintetizirani heterociklički derivati (Slika 7)(Slika 8)(Tablica 2) testirani su MTT testom na različitim staničnim linijama raka i neki od njih pokazali su značajnu antiproliferativnu aktivnost na nekim od staničnim linijama raka kako je ilustrirano na Slika 11 za kumarinske derivate (Slika 7)(Tablica 2).

\*\*

<sup>10</sup> engl. True Positive

<sup>11</sup> engl. False Negative

<sup>12</sup> engl. True Negative

<sup>13</sup> engl. False Positive

Compd	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>					
	Cell lines					
	A549	HepG2	CFPAC-1	HeLa	SW620	3T3/WI38 <sup>b</sup>
4	91.71	>100	>100	>100	>100	37.98
5	30.07	>100	75.81	49.59	59.76	65.56
6	90.33	>100	>100	>100	>100	>100
7	>100	>100	>100	>100	>100	57.70
8	96.22	>100	>100	90.20	>100	40.83
9	>100	>100	>100	>100	>100	>100
10	67.59	>100	>100	81.08	>100	38.48
11	66.15	61.56	>100	59.01	>100	58.50 <sup>b</sup>
12	46.03	34.22	62.65	35.14	50.87	43.39 <sup>b</sup>
13	24.78	50.46	>100	35.05	84.38	>100
14	21.06	38.91	>100	27.61	66.73	>100
15	32.34	61.11	52.92	40.17	97.66	0.05
16	13.83	48.40	69.77	38.99	49.24	0.35
17	13.65	27.34	50.40	24.63	39.64	0.71
18	8.87	9.16	>100	8.73	36.79	13.96 <sup>b</sup>
19	41.03	30.41	52.79	34.26	37.52	7.91 <sup>b</sup>
20	46.40	29.84	68.86	55.71	92.19	0.03 <sup>b</sup>
21	47.93	31.40	81.91	58.46	>100	0.82 <sup>b</sup>
22	88.46	76.70	>100	>100	>100	24.95 <sup>b</sup>
23	91.86	74.82	>100	74.88	>100	1.45 <sup>b</sup>
24	>100	>100	>100	>100	>100	<0.01 <sup>b</sup>
25	70.17	99.35	56.30	40.80	≥100	59.15 <sup>b</sup>
26	35.41	56.94	88.52	47.95	>100	2.82 <sup>b</sup>
27	96.04	>100	>100	>100	>100	>100 <sup>b</sup>
28	16.16	52.82	10.54	7.26	89.95	5.01
29	46.24	94.74	34.89	51.42	≥100	18.24
30	28.63	8.57	29.89	14.16	34.34	25.84
31	34.09	38.06	41.71	34.43	70.02	8.31
32	>100	70.69	76.51	49.15	>100	97.46
33	16.85	0.90	59.41	17.48	>100	45.33
34	>100	78.06	>100	>100	>100	>100
35	40.13	22.52	80.55	23.91	>100	96.44

<sup>a</sup> Compound concentration required to inhibit tumor cell proliferation by 50%.

<sup>b</sup> Compounds 11, 12, 18–27 were tested in WI38 cell line.

**Slika 11: Neki od kumarinskih derivata pokazali su značajnu antiproliferativnu aktivnost. Tablica je izvađena iz rada [35].**

Cilj ovog rada bio je odrediti je li demetilaza LSD1 potencijalna biološka makromolekula za barem neke od novosintetiziranih heterocikličkih derivata primjenom molekuskog uklapanja u smislu tzv. pecanja ciljne makromolekule. U tu svrhu kao prvi korak bilo je potrebno postaviti model kojim se inhibitori razlikuju od neaktivnih spojeva. Iz literature su sakupljeni heterociklički spojevi, sintetski i prirodni, s određenim vrijednostima IC<sub>50</sub> tj. koncentracijama potrebnim da se inhibira 50% demetilazne aktivnosti proteina LSD1 danim u Tablica 1. Neki od odabranih spojeva su inhibitori demetilaze LSD1, a neki ne, što je omogućilo određivanje granične vrijednosti energije vezanja za potencijalne inhibitore.

Kako je za te molekule mehanizam inhibicije demetilaze LSD1 općenito nepoznat, testirali smo *in silico* njihovo vezanje na vezno mjesto (poli)peptidnih supstrata (1) (Slika 9) i vezno mjesto kofaktora FAD-a (2) (Slika 10). Izračunati parametri za 22 heterocikličke molekule



sakupljeni su u Tablicima 3 i 4. Prikazana je energija najstabilnije vezne konformacije unutar najnapučenijeg klastera, rang tog klastera na listi svih klastera predviđenih za danu molekulu poredanih po rastućoj energiji vezanja i ukupan broj veznih konformacija u tom klasteru.

**Tablica 3: Rezultati uklapanja kontrolnih spojeva (Slika 4)(Tablica 1) u supstratno vezno mjesto (1). Za dani spoj, CL je ukupan broj predviđenih klastera veznih konformacija, LC je broj veznih konformacija u najvećem klasteru, LC\_rang određuje njegov rang i LE\_LC je najniža energiju vezanja za taj klaster.**

Spoj	CL	LC	LC_rang	LE_LC	IC50_eksp	KLASA <sup>a</sup>	err <sup>b</sup>
6b_JMedChem2015_Zheng	31	17	1	-8.74	0.65	yes	FN
10b_JMedChem2015_Zheng	25	40	1	-9.92	> 125	no	FP
26_JMedChem2013_Zheng	22	18	3	-9.53	2.10	yes	
30_JMedChem2013_Zheng	20	26	2	-9.32	>125	no	
4SC-202	10	67	2	-9.61	~ 0.1	yes	
5a_JMedChem2013_Schmitt	26	21	3	-9.4	44.00	no	
6_MedChemComp2014_5	17	17	5	-10.53	1.192	yes	
7_MedChemComp2014_5	28	19	1	-12.62	2.22	yes	
12_MedChemComp2014_5	4	78	1	-7.54	> 125	no	
8b_MedChemComp2014	36	27	1	-11.79	> 125	no	FP
8k_MedChemComp2014	39	22	2	-11.44	0.39	yes	
9b_MedChemComm2014	32	14	1	-11.42	> 125	no	FP
amidoxime	25	24	2	-7.81	16.8	no	
aminothiazole_8	5	89	2	-6.43	437	no	
aminothiazole_16k	6	48	3	-10.02	7.5	yes	
aminothiazole_16l	14	25	5	-9.38	15.8	no	
curcumin_enol <sup>c</sup>	46	13	1	-10.55	~ 15	yes	
GSK354	8	29	3	-10.5	1	yes	
namolin	1	100	1	-7.16	51	no	
quercetin	5	68	1	-9.87	~35	no	FP
resveratrol	7	28	5	-7.08	10.54	yes	FN
SP2509_huntsman	35	17	2	-10.73	0.013	yes	

<sup>a</sup> Kontrolni spoj se smatrao aktivnim za  $IC_{50} \leq 15\mu M$ . <sup>b</sup> Pogrešno klasificirani spojevi uz graničnu veznu energiju od -9.53 kcal/mol (Grafikon 1). <sup>c</sup> Za kumarin je promatran i keto-tautomer. Dobiveni rezultati bili su slični.

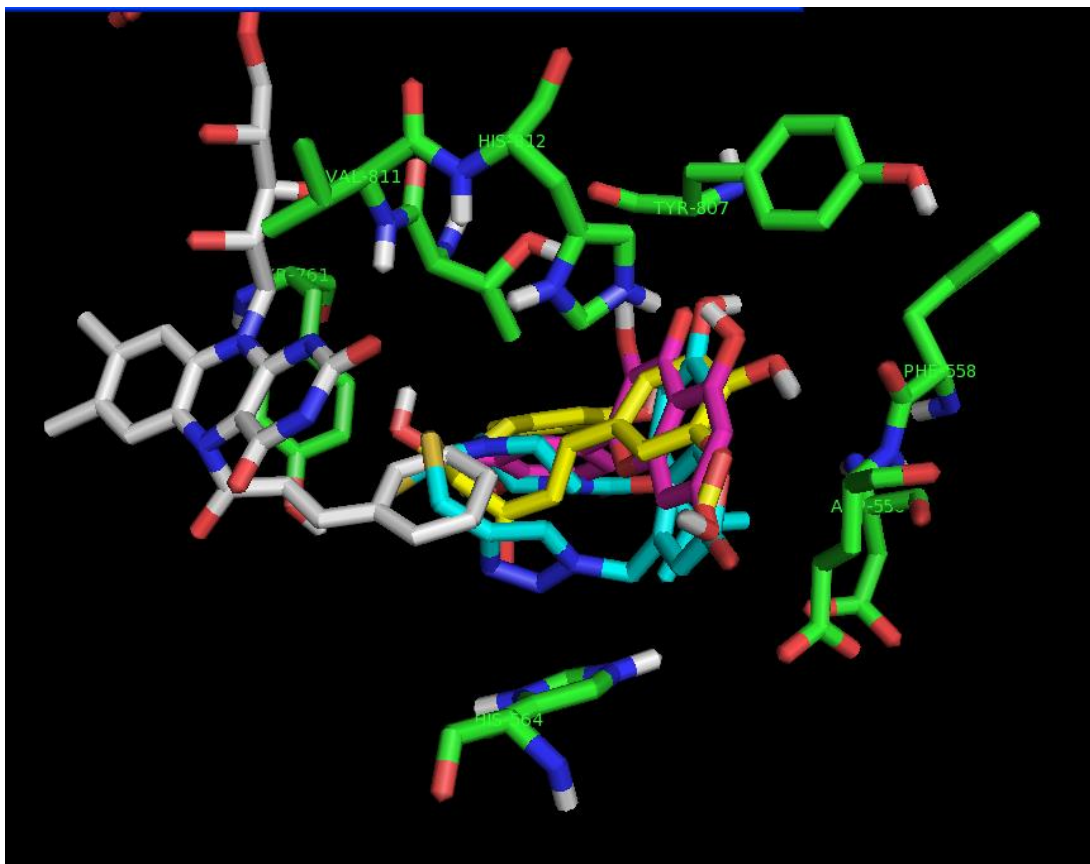
Tablica 4: Rezultati uklapanja kontrolnih spojeva (Slika 4)(Tablica 1) u veliko dvostruko vezno mjesto (2).Značenje parametara je objašnjeno kod Tablica 3.

Spoj	CL	LC	LC_rang	LE_LC	MJESTO VEZANJA	IC50_eksp	KLASA	Err <sup>a</sup>
6b_JMedChem2015_Zheng	45	9	1	-9.38	ulaz + flavinski dio	1.192	yes	FN
10b_JMedChem2015_Zheng	62	6	16	-8.56	ulaz: close to flavinski	> 125	no	
26_JMedChem2013_Zheng	39	25	7	-10.57	ulaz + flavinski dio	2.10	yes	
30_JMedChem2013_Zheng	41	16	6	-10.41	ulaz + flavinski dio	>125	no	
4SC-202	16	39	9	-11.73	ulaz + flavinski dio	~ 0.1	yes	
5a_JMedChem2013_Schmitt	42	14	5	-9.07	ulaz: udaljen od FAD-a	44.00	no	
6_MedChemComp2014_5	15	34	11	-9.93	ulaz: udaljen od FAD-a	0.65	yes	FN
7_MedChemComp2014_5	27	22	4	-12.06	ulaz: udaljen od FAD-a	2.22	yes	
12_MedChemComp2014_5	4	69	1	-7.44	ulaz: udaljen od FAD-a	>125	no	
8b_MedChemComp2014	45	11	4	-12.21	ulaz + flavinski dio	> 125	no	FP
8k_MedChemComp2014	45	13	2	-12.23	ulaz + flavinski dio	0.39	yes	
9b_MedChemComm2014	46	14	11	-11.26	FAD: flavinski dio	> 125	no	FP
amidoxime	28	28	2	-8.72	FAD: flavinski dio	16.8	no	
aminothiazole_8	20	34	1	-7.86	FAD: flavinski dio	437	no	
aminothiazole_16k	23	47	1	-13.17	FAD: flavinski dio	7.5	yes	
aminothiazole_16l	16	23	8	-11.38	FAD: flavinski dio	15.8	no	FP
curcumin_enol	45	19	1	-11.62	FAD: flavinski dio	~ 15	yes	
GSK354	9	44	2	-10.53	ulaz: blizu FAD-u	1	yes	
namolin	2	99	1	-8.99	FAD: flavinski dio	51	no	
quercetin	18	19	6	-9.88	ulaz: udaljen od FAD-a	~35	no	
resveratrol	23	14	1	-8.17	FAD: adeninski dio	10.54	yes	FN
SP2509_huntsman	60	9	2	-12.25	FAD: flavinski dio	0.013	yes	

<sup>a</sup> Pogrešno klasificirani spojevi uz graničnu veznu energiju od -10.53 kcal/mol (Grafikon 1).

Uklapanjem referentnih spojeva u vezno mjesto (2) koje je dvostruko u smislu da obuhvaća i vezno mjesto supstrata i vezno mjesto kofaktora FAD-a, većina spojeva se veže, barem djelomično, unutar veznog mjesta FAD-a, na isti dio kao njegov redoks-aktivni flavinski dio ili vrlo blizu tog dijela (Tablica 4). Jedino za reservatrol predviđeno vezno mjesto odgovara smještaju adeninskog dijela FAD-a. Za pet spojeva (Tablica 4): kvercetin, propargilamin 5a\_JMedChem2013\_Schmitt i tri 3,5-diamino-1,2,4-triazolska derivata (6\_, 7\_ i 12\_MedChemComp2014\_5) je predviđeno potpuno vezanje u supstratno vezno mjesto (1). Za kvercetin te spojeve 7\_ i 12\_MedChemComp2014\_5 su predviđeni jednaki načini (i položaj i vezna konformacija) vezanja, a za ostala tri spoja isti položaj vezanja (ali drugačija vezna konformacija) kao i uklapanjem u supstratno vezno mjesto s kofaktorom FAD u njegovom veznom mjestu.

Za sve te spojeve predviđeno vezno mjesto je postranični džep na samom ulazu u supstratno mjesto sačinjeno od aminokiselinskih ostataka Phe560, His564 i His812, Tyr807, Thr810 te površinskih Glu559 i Asp556 smještenim uglavnom na fleksibilnim dijelovima strukture 2Z3Y (Slika 12). Ovaj džep je dio veznog mjesta previđenog za svih 22 spoja molekulskim uklapanjem u supstratno vezno mjesto (1). Većina spojeva također zauzima isti dio supstratnog veznog mjesta kao i fenilni prsten vezan na atom N5 na FAD-u u ligandu F2N u strukturi 2Z3Y njegovog kompleksa s demetilazom LSD1.



Slika 12: Aminokiselinski ostaci (zeleni štapići) koji tvore džep u supstratnom veznom mjestu (1) gdje se je smješten kumarinski fragment spoja 8k\_MedChemComp2014 (K na Slici 2) (cijano) i odgovarajući fragmenti kvercetina (V,rozi) i kumarina (Q, žuti).

Za većinu molekula vezanje u vezno mjesto FAD-a je nešto povoljnije (Tablica 3)(Tablica 4). Međutim, predviđene vezne energije za vezna mjesta (1) i (2) se dosta dobro linearno koreliraju s  $r=0.789$  i spojevi predviđeni kao aktivni uklapanjem u oba mjesta su jednaki. Da bi se odredilo točno vezno mjesto trebalo bi provesti test *in vitro* koji utvrđuje izravno kompeticiju s FAD-om za njegovo vezno mjesto – promjena u dobivenim rezultatima s obzirom na test koji ne gleda mjesto vezanja (npr. KDM1/LSD1 Activity Quantification Assay Kit (Colorimetric) ab113459) indicirala bi kompetitivnu inhibiciju s kofaktorom FAD-om.

### 3.2 Određivanje graničnih vrijednosti veznih energija između aktivnih i neaktivnih spojeva

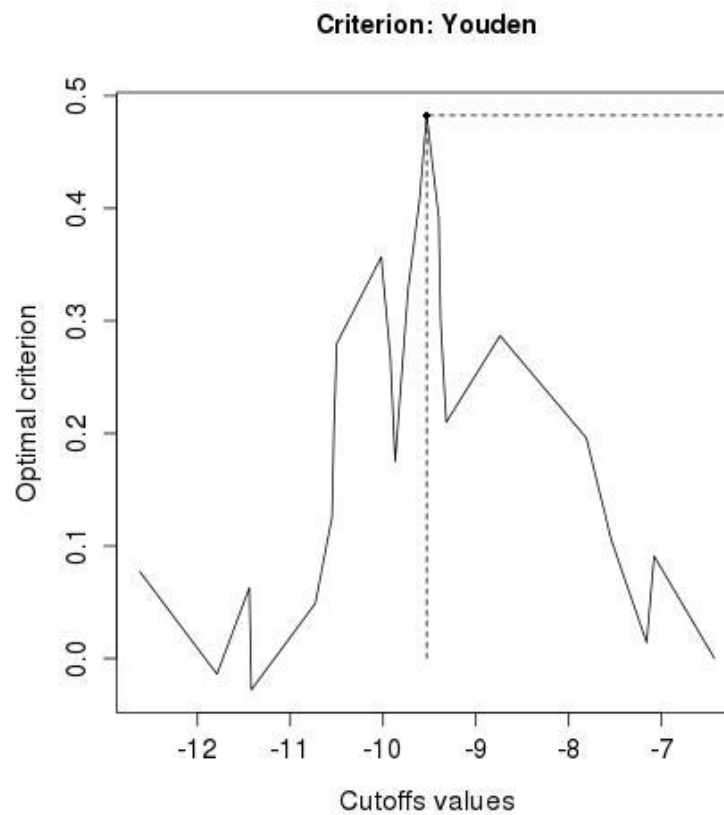
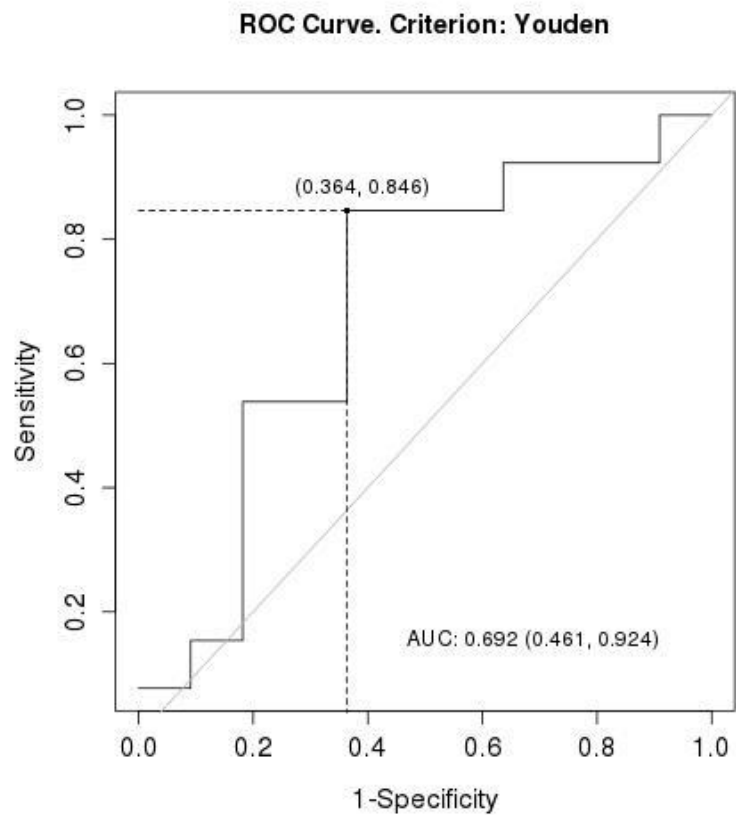
Energije vezanja izračunate za ovaj skup spojeva iskorištene su za određivanje granične vrijednosti energija vezanja kao kriterija za odabir inhibitora demetilirajuće aktivnosti enzima LSD1 među spojevima testiranim *in silico* u ovom radu. Kao kriterij da bi se kontrolni spoj

smatrao pozitivnom kontrolom odabrana je granična vrijednost eksperimentalne vrijednosti  $IC_{50} \leq 15\mu M$  čime je polovica spojeva proglašena aktivnom, odnosno neaktivnom. Uz takvu podjelu na aktivne i neaktivne spojeve i određivanje ROC krivulja za predviđene energije vezanja najnapučenijih klastera, granične vrijednosti energije vezanja određene su kao optimalne vrijednosti Youdenovog indeksa J koje maksimiziraju broj točno predviđenih spojeva, bilo aktivnih, bilo neaktivnih.

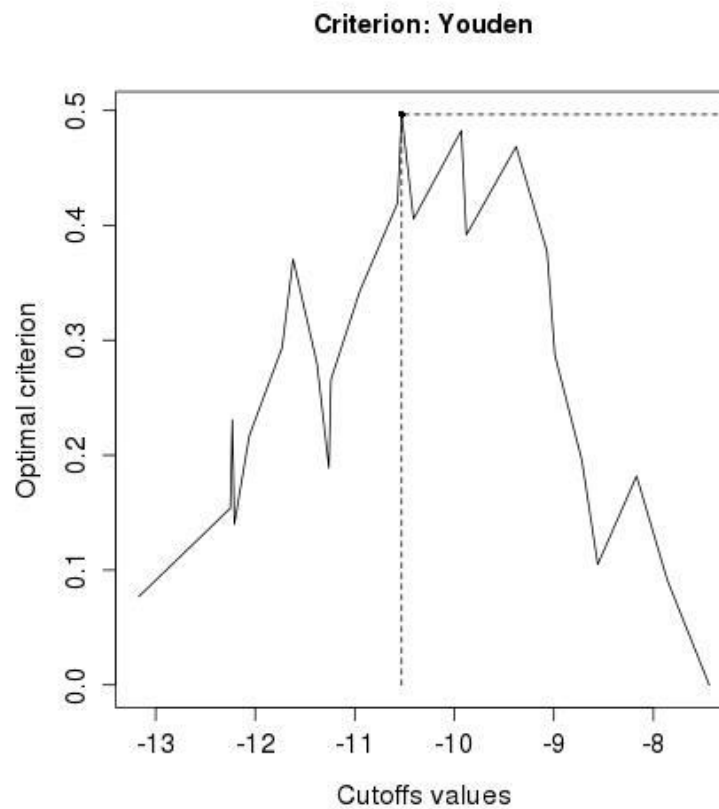
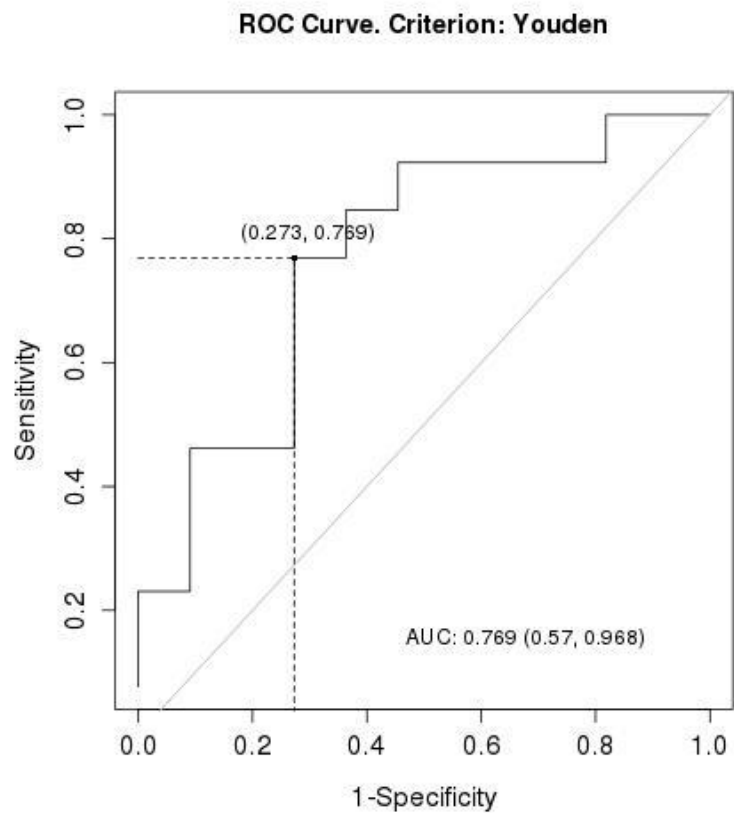
Youdenov indeks J odgovara maksimalnoj vertikalnoj udaljenosti između ROC krivulje i pravca koji odgovara nasumičnoj podijeli spojeva. On se definiše kao  $\text{maksimum}\{\text{senzitivnost}(c) + \text{specifičnost}(c) - 1\}$  preko svih graničnih vrijednosti  $c - \infty < c < \infty$ . Senzitivnost je definirana kao omjer  $TP/(TP+FN)$  i specifičnost kao omjer  $TN/(TN+FP)$  gdje su TP/TN broj aktivnih/neaktivnih spojeva koji su predviđeni kao aktivni/neaktivni i FN/FP broj aktivnih/neaktivnih spojeva koji su predviđeni kao neaktivni/aktivni. Tako senzitivnost predstavlja prediktivnu moć testa (granične vrijednosti) za aktivne spojeve, a specifičnost za neaktivne spojeve. U *in silico* probiru aktivnih molekula posebno se cijeni senzitivnost testa jer je manja šteta u *in vitro* esaju pokazati da spojevi za koje je *in silico* probir pokazao da su pozitivni tj. aktivni, ustvari negativni, tj. bolje je imati više FP-spojeva nego li FN-spojeva. Međutim, postoji protuteža tome a to je da se favoriziranjem senzitivnosti naspram specifičnosti umanjuje vrijednost same metode za probir aktivnih spojeva. Za potrebe ovog rada uzet je balansiran Youdenov kriterij koji jednaku važnost daje senzitivnosti i specifičnosti testa.

U slučaju uklapanja u supstratno vezno mjesto (1), kao granična energija vezanja određena je vrijednost od -9.53 kcal/mol (Grafikon 1). Takav model daje senzitivnost od 0.846 i specifičnost od 0.636 uz točnost testa od 0.75 (Tablica 3). Za dvostruko vezno mjesto (2) granična vrijednost vezne energije je -10.53 kcal/mol (Grafikon 2). Takav model daje senzitivnost od 0.769 i specifičnost od 0.727 uz istu točnost testa od 0.75 (Tablica 4).

Grafikon 1: ROC krivulja (lijevo) i krivulja odnosa kriterija Youdenovog indeksa i granične vrijednosti (desno) za supstratno vezno mjesto (1)



Grafikon 2: ROC krivulja (lijevo) i krivulja odnosa kriterija Youdenovog indeksa i granične vrijednosti (desno) za dvostruko vezno mjesto (2)





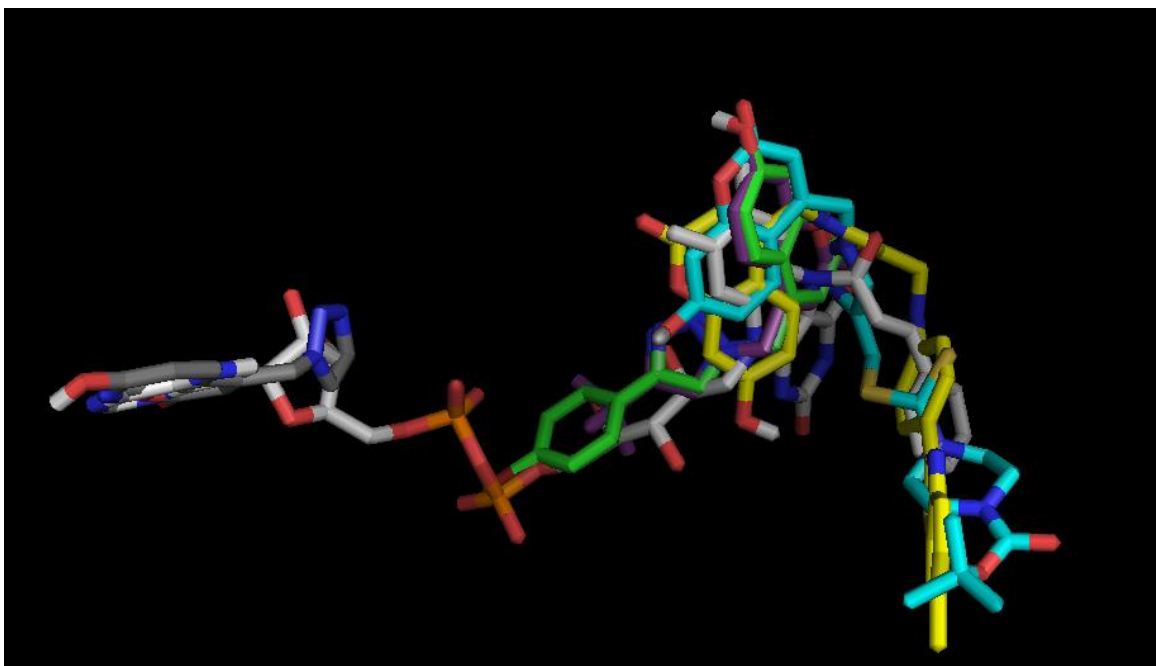
### 3.3 Analiza rezultata dobivenih uklapanjem derivata kumarina

Neki od hibridnih spojeva kumarina i 1,2,3-triazola su već identificirani kao potentni inhibitori demetilaze LSD1. Spoj coum\_26 odgovara kontrolnom spoju 8k\_MedChemComp2014 (K na Slika 2) koji je određen kao najaktivniji inhibitor demetilaze LSD1 između niza sintetiziranih analoga koji su se međusobno razlikovali po tipu i položaju supstituenata na benzenskom prstenu kumarinskog/ benzopirinskog fragmenta [30]. Međutim, mehanizam inhibicije nije naveden u tom radu.

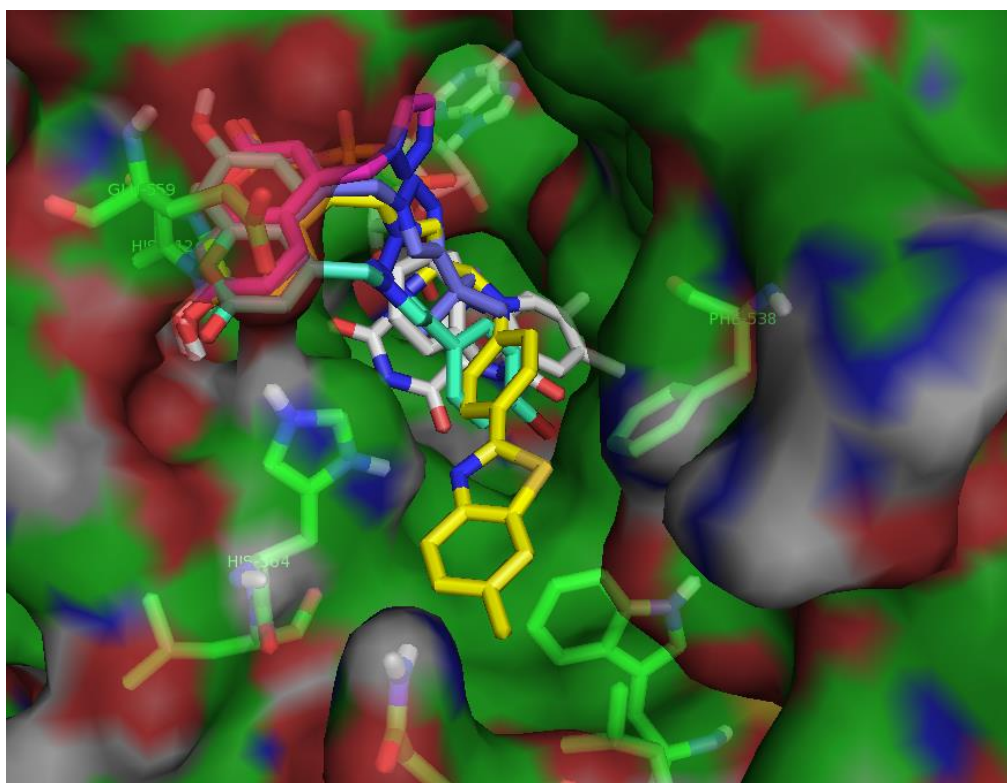
Na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, sintetizirano je sveukupno 33 derivata sa 7-OH ili 7-metil kumarinskim fragmentom supstituiranom na položaju 4 s niz različitih supstituenta (Tablica 2). Supstituenti su odabrani racionalno, s obzirom na raznolikost u fizikalno-kemijskim svojstvima i s obzirom na literaturne podatke za antiproliferativnu aktivnost spojeva koji sadrže određene fragmente [35].

Rezultati molekuskog uklapanja upućuju na generalno veću aktivnost kumarinskih derivata s aromatskim supstituentima, naspram onih s alifatskim (Tablica 2)(Tablica 5)(Tablica 6). U stvari gotovo svi kumarinsko-1,2,3-triazolski derivati s aromatskim supstituentom su predviđeni kao inhibitori demetilaze LSD1. Od 33 kumarinska derivata njih čak 21 (22 za vezno mjesto (2)) je dalo energije povoljnije od odgovarajućih granične vrijednosti za dano vezno mjesto (Tablica 5)(Tablica 6). Vrijednosti energije vezanja za coum\_14 su bliske graničnim vrijednostima i stoga bi u skup za *in vitro* testiranje trebalo uvrstiti i taj spoj.

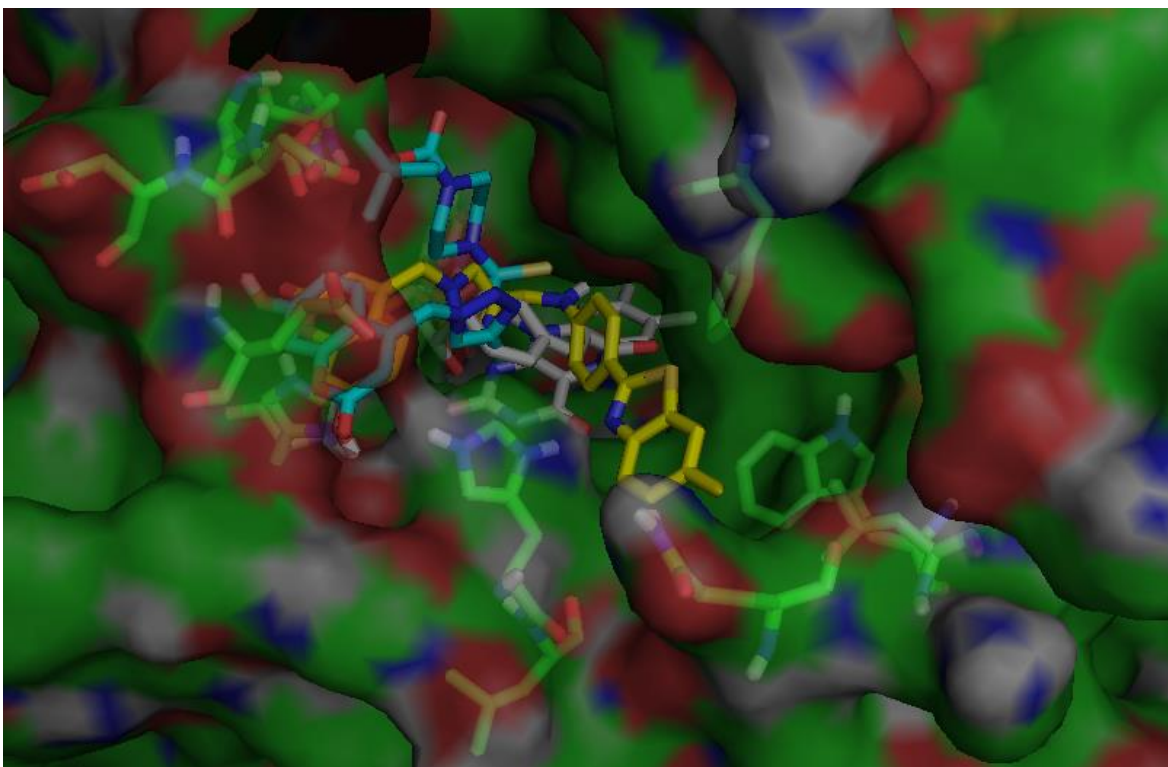
Slično kao kontrolni spojevi, kumarinski derivati mogu se vezati i u vezno mjesto kofaktora FAD-a (Slika 13) kao i supstrata (Slika 14). Uz to, načini vezanja predviđeni za kumarinske derivate uklapanjem u supstratno (1) i dvostruko (2) vezno mjesto su slični onima predviđenim za aktivne referentne spojeve. Vezanjem u dvostruko vezno mjesto, većina kumarinskih derivata se veže na mjesto vezanja FAD-a, s kumarinskim fragmentom na flavinskom dijelu dok se ostatak spoja pretežito veže u supstratnom ulaznom dijelu LSD1 (Slika 13).



Slika 13: Vežanje coum\_1 (sivi štapići), coum\_10 (ljubičasti), coum\_15 (zeleni), coum\_26 (8k\_MedChemComp2014 (K na Slici 2)) (cijano) i najaktivnijeg spoja coum\_28 (žuti) unutar dvostrukog veznog mjesta tj. na mjesto vežanje kofaktora FAD-a (bijeli štapići).



Slika 14: Vežanje coum\_1 (rozi štapići), coum\_10 (ljubičasti), coum\_15 (zeleni), i najaktivnijeg spoja coum\_28 (žuti) unutar supstratnog veznog mjesta. Vidljivo je preklapanje s fenilnim supstituentom na ligandu F2N (bijeli štapići) u strukturi 2Z3Y [16] korištenoj za uklapanje.



**Slika 15: Kumarinski i 1,2,3-triazolni fragmenti coum\_26 (8k\_MedChemComp2014 (K na Slici 2)) (cijano) i najaktivnijeg spoja coum\_28 (žuti) se vežu unutar supstratnog veznog mjesta na vrlo sličan način. Vežanje preostalih fragmenta ovisi o njihovoj veličini i tipu, npr. jesu li više polarni kao u coum\_26 ili više lipofilni kao u coum\_28. FAD (bijeli štapići) je u svom veznom mjestu.**

Za supstratno vezno mjesto (1) dobiveni su jednoznačniji rezultati, tj. predviđeni načini vezanja za sve spojeve su analogni i postoji mjesto vezanja kumarinskog fragmenta unutar supstratnog veznog mjesta (1) (Slika 14). Za većinu kumarinskih derivata način vezanja u supstratnom veznom mjestu (1) za vezne konformacije iz najnapučenijeg klastera odgovara onom predviđenom za aktivne kontrolne spojeve. Pritom je kumarinski fragment smješten u džepu bliskom ulazu u samo mjesto (Slika 15), dok je ostatak konformacije koji sadrži 1,2,3-triazolnu prenosnicu usmjeren prema dijelu kojeg zauzima fenilni supstituent liganda F2N (Slika 14). Način vezanja ostatka spojeva ovisi primarno o veličini fragmenta na položaju 4 1,2,3-triazola, a manje o njegovom tipu, kao što je ilustrirano na Slika 15. Tako npr. ditiokarbamatni dio spoja coum\_26 tj. 8k\_MedChemComp2014 je usmjeren prema alpha-uzvojnici izgrađenoj od negativno nabijenih uglavnom aspartatskih aminokiseliniskih ostataka, dok je benzotiazolni prsten najaktivnijeg kumarinskog derivata coum\_28 smješten u hidrofobnijem dijelu supstratnog

veznog mjesta (Slika 16). Coum\_15 pak tvori sa svojim *para*-bromom povoljnu interakciju s ostatkom Phe538.

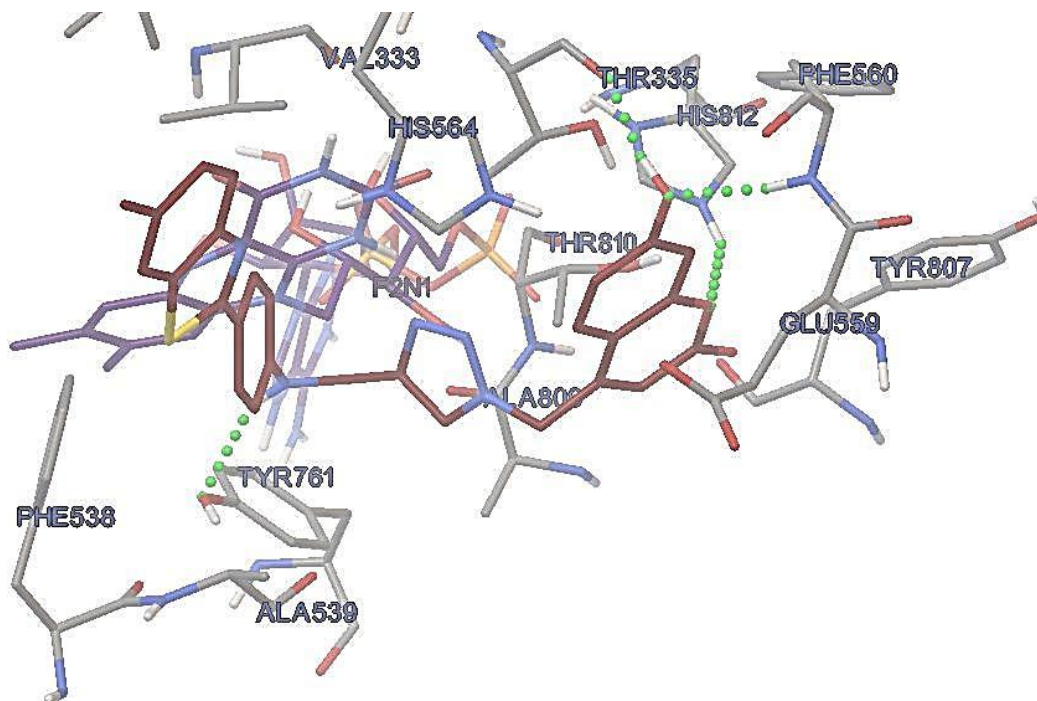
Supstitucija 7-OH grupe metilnom u parovima (coum\_28, coum 29) (30,31) i (34,35) ne utječe značajno na način vezanja i energiju vezanja (Tablica 5)(Tablica 6) tj. na aktivnost u skladu s rezultatima opaženim u radu [35]. Za par (coum\_32, coum 33) primijećen je učinak na način vezanja dok su mjesto i energija vezanja isti.

Afinitet vezanja je samo nešto povoljniji (u prosjeku  $1.12 \pm 0.61$  kcal/mol) za mjesto kofaktora u odnosu na mjesto vezanja supstrata, slično kao i za kontrolne spojeve ( $0.73 \pm 1.11$  kcal/mol). Međutim, isti su spojevi određeni kao aktivni u supstratnom tipu vezanja (1), kao i u vezanju na mjesto kofaktora u postupku uklapanja u dvostruko vezno mjesto (2) (razlika je u jednom spoju, coum\_35). Koeficijent linearne korelacije između predviđenih energija vezanja (Tablica 5)(Tablica 6) je visok,  $r = 0.889$ . Tako da za kumarinske derivate vrijedi jednak zaključak kao i referentne spojeve: da bi se dao definitivni zaključak o mehanizmu inhibicije LSD1 derivatima kumarina potrebna su daljnja *in-vitro* testiranja kojima se uz posebnu metodologiju to može zaključiti. Međutim, kako se svi kumarinski derivati vežu na isti način svojim kumarinsko-1,2,3-triazolskim dijelom i to na način kao i aktivni kontrolni spojevi, može se očekivati da je to njihov primarni način inhibicije enzima LSD1.

**Tablica 5: Rezultati kumarinskih derivata (Tablica 2) u supstratnom veznom mjestu (1). Crveno su označene vrijednosti iznad granične vrijdnosti, zeleno su označene vrijednosti ispod granične vrijdnosti od -9.53kcal/mol (Grafikon 1).<sup>a</sup>**

naziv spoja	CL	LC	LC_rang	LE_LC
coum_1	16	20	4	-6,67
coum_4	7	52	1	-7,99
coum_5	12	45	3	-8,08
coum_6	20	24	1	-8,22
coum_7	13	37	1	-8,48
coum_8	22	31	5	-7,73
coum_9	28	41	4	-8,41
coum_10	6	48	1	-8,82
coum_11	24	41	1	-8,95
coum_12	34	16	9	-8,67
coum_13	27	25	2	-9,62
coum_14	10	41	1	-8,96
coum_15	9	77	2	-9,71
coum_16	25	35	1	-10,97
coum_17	29	17	1	-10,87
coum_18	32	17	1	-11,04
coum_19	10	36	2	-10,54
coum_20	43	11	3	-11,1
coum_21	38	12	3	-11,21
coum_22	41	11	3	-10,84
coum_23	48	9	7	-10,19
coum_24	35	20	17	-9,85
coum_25	34	20	1	-9,71
coum_26	54	7	4	-10,72
coum_27	33	18	3	-10,73
coum_28	27	43	1	-12,37
coum_29	29	25	1	-12,14
coum_30	12	32	2	-10,7
coum_31	14	27	5	-10
coum_32	13	25	1	-10,06
coum_33	16	21	1	-9,69
coum_34	15	55	1	-9,7
coum_35	10	55	2	-9,21

<sup>a</sup> Značenje parametara je objašnjeno kod Tablica 3.



Slika 16: Prikaz vezanja konformacije coum\_28 (smeđi štapići) s aminokiselinskim ostacima s kojima je u interakciji; vodikove veze su označene zelenim isprekidanim linijama; vidljiva je interakcija s FAD-om(ljubičasti štapići)

**Tablica 6: Rezultati kumarinskih derivata u dvostrukom veznom mjestu (2). Crveno su označene vrijednosti iznad granične vrijednosti, zeleno su označene vrijednosti ispod granične vrijednosti od -10.53kcal/mol (Grafikon 2).<sup>a</sup>**

Spoj	CL	LC	LC_rang	LE_LC
coum_1	19	33	12	-7,83
coum_4	22	26	8	-8,93
coum_5	29	18	10	-9,16
coum_6	32	18	18	-8,77
coum_7	30	16	14	-8,97
coum_8	33	14	1	-10,25
coum_9	41	13	7	-9,77
coum_10	24	20	3	-9,74
coum_11	35	12	10	-9,77
coum_12	41	11	6	-10,34
coum_13	32	15	8	-10,63
coum_14	12	24	1	-10,28
coum_15	15	39	3	-11,15
coum_16	20	33	1	-11,62
coum_17	27	17	6	-11,24
coum_18	31	13	11	-10,91
coum_19	13	27	10	-11,85
coum_20	45	11	8	-11,52
coum_21	56	7	13	-11,72
coum_22	46	10	6	-11,11
coum_23	50	9	5	-11,26
coum_24	55	7	5	-12,49
coum_25	35	12	1	-11,11
coum_26	51	13	6	-11,67
coum_27	15	37	1	-11,44
coum_28	31	28	9	-13,26
coum_29	21	35	5	-13,73
coum_30	11	66	3	-11,86
coum_31	14	59	6	-11,68
coum_32	14	54	4	-11,33
coum_33	15	35	2	-11,55
coum_34	18	45	4	-10,97
coum_35	18	33	4	-11,2

<sup>a</sup> Značenje parametara je objašnjeno kod Tablica 3.

### 3.4 Analiza rezultata dobivenih uklapanjem derivata askorbata

#### 3.4.1 Derivati L-askorbinske kiseline (AA\_diBz)

Derivati L-askorbinske kiseline sa slobodnim 2-OH i 3-OH skupinama vežu se nešto povoljnije na vezno mjesto kofaktora nego li u supstratno vezno mjesto (Tablica 7)(Tablica 10). Njihovim uklapanjem u dvostruko vezno mjesto najnapučeniji klaster je zadržavao konformacije smještene najvećim svojim dijelom u flavinskom dijelu veznog mjesta FAD-a. Askorbinsko-1,2,3-triazolni dio u najaktivnijim spojevima, kao i sam nesupstituirani spoj AA\_1, smješten je u tom dijelu tvoreći interakcije s bočnim ogrankom Lys661 i/ili okosnicom Met332. Ostatak strukture ulazi u mjesto kofaktora, tj. derivati L-askorbinske kiseline zauzimaju riboflavinski dio veznog mjesta FAD-a.

Uklapanjem u supstratno vezno mjesto (1) nesupstituirani askorbinsko-1,2,3-triazolno hibrid se veže na isto mjesto u postranični džep uz ulaz u to vezno mjesto kao i nesupstituiran kumarinski-1,2,3-hibrid. Uvođenjem strukturno raznolikih supstituenata, predviđeni su različiti načini vezanja ovisno o tipu supstituenta. Tako svih četiri benzosulfanamida AA\_20 do AA\_23 se vežu na jednak način reprezentiran vezanjem *para*-kloro benzosulfanimida AA\_21 na (Slika 17). Taj spoj je predviđen kao najaktivniji među derivatima L-askorbinske kiseline. U tom načinu vezanja, askorbinsko-1,2,3-triazolni dio je smješten na ulazu u supstratno vezno mjesto i tvori interakcije s Asn235 i His564. Slično se veže i AA\_17. Druga skupina aktivnih spojeva AA\_15 i AA\_3 supstituirani s *para*-bromofenilnim supstituentom tj. *para*-metilnimfenilnim veže se u unutrašnjosti tog mjesta. Zajedničko tim dvama načinima vezanja je popunjavanje fenilnim /hidrofobnim dijelom R-supstituenta istog dijela prostora kojeg popunjava fenilni supstituenta liganda F2N u 2Z3Y strukturi (Slika 17).

#### 3.4.2 2,3-dibenzilirani derivati L-askorbinske kiseline (AA\_diBz)

2,3-dibenzilirani derivati L-askorbinske kiseline (AA\_diBz) najaktivniji su derivati askorbinske kiseline što se može pripisati i njihovoj veličini (Tablice 8 i 11).

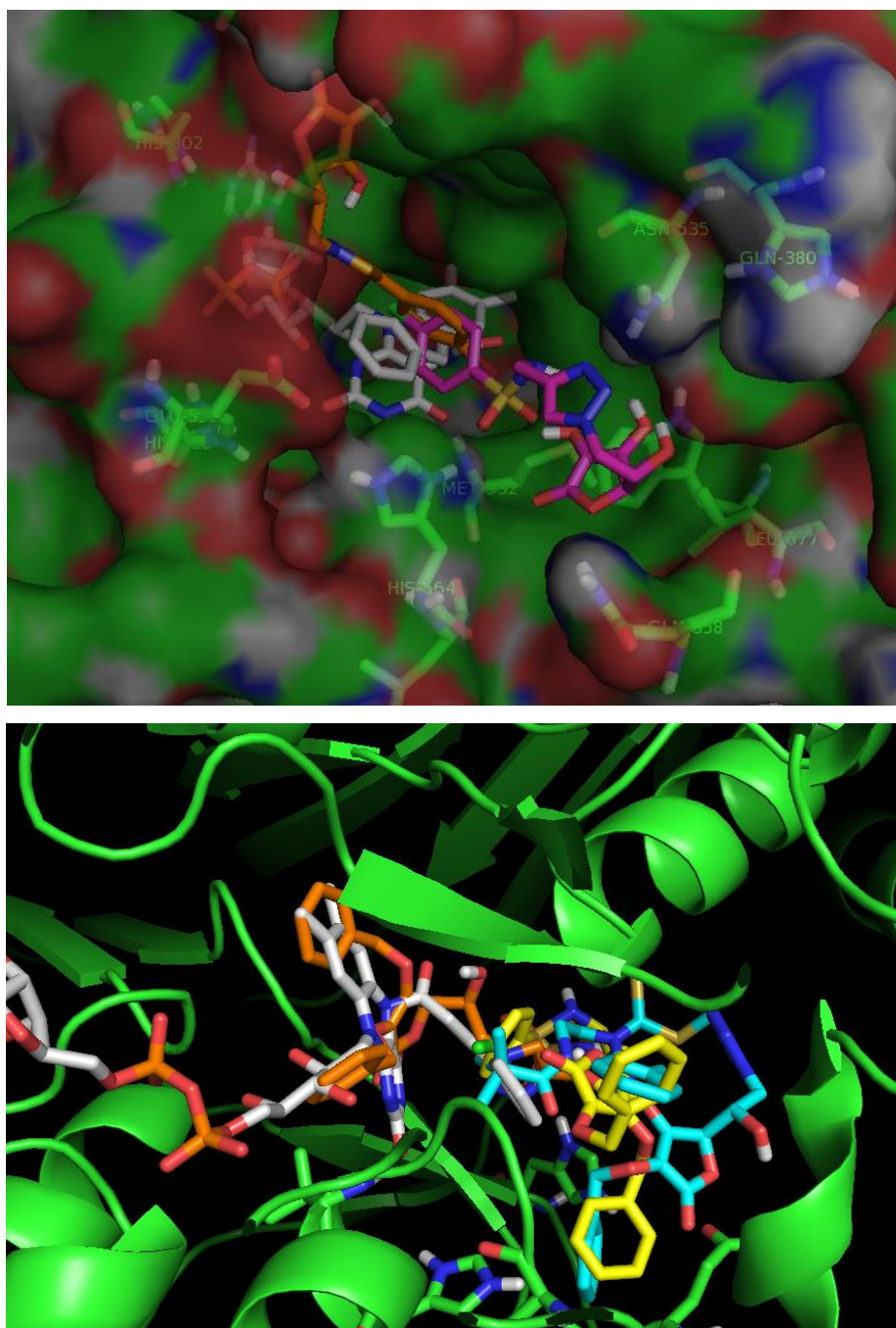
Uklapanjem najvećih promatranih spojeva, derivata L-askorbinske kiseline s benziliranim 2,3 hidroksi skupinama u laktonskom prstenu u dvostruko vezno mjesto, oni su većinom parcijalno popunili vezno mjesto kofaktora FAD-a. Svojim benzil-supstituentima smjestili su se u flavinski



dio veznog mjesta kofaktora, dok je ostatak molekula ovih derivata zauzima suspratno vezno mjesto (Slika 17). Uklapanjem u suspratno vezno mjesto (1), ovi spojevi se uklapaju tako da jednim benzilnim supstituentom popunjavaju postranični džep (Slika 14), dok drugim krajem molekule ukoliko je nepolaran popunjavaju dio kao i fenilni supstituent od liganda F2N, tj. zauzimaju iste dijelove ovog veznog mjesta kao i aktivni kontrolni spojevi i kumarinski derivati. Na Slika 17 je prikazano vezanje najaktivnijih spojeva AA\_diBz\_15 i AA\_diBz\_26.

### **3.4.3 Derivati L-askorbinske kiseline s dvostrukom vezom C4=C5 (AA\_DB)**

Derivati L-askorbinske kiseline s dvostrukom C4=C5 vezom se s najmanjim afinitetom vežu u aktivno mjesto demetilaze LSD1 (Tablica 9)(Tablica 11). Imaju veći afinitet za vezno mjesto kofaktora nego li supstrata. K tome, za razliku od ostalih spojeva promatranih u ovom radu, ovi spojevi se potpuno vežu unutar veznog mjesta FAD-a u različitoj orijentaciji. Način vezanja u suspratnom veznom mjestu odgovara analogima sa zasićenom C4 - C5-OH vezom u askorbinskoj kiselinu. Povoljnija energija vezanja derivata askorbinske kiseline može se pripisati interakciji C5-OH skupine s aminokiselinskim ostatkom Asn535.



Slika 17: Načini vezanja za Gore: AA\_15 (narančasti štapići) i AA\_diBz\_21 (rozi) u supstratnom veznom mjestu (1). Dolje: AA\_diBz\_15 u dvostrukom veznom mjestu (narančasti) te AA\_diBz\_15 (žuti) i AA\_diBz\_26 (cijano) u supstratnom veznom mjestu.

Tablica 7: Rezultati askorbinskih derivata (Slika 8)(Tablica 2) u supstratnom veznom mjestu (1). Crveno su označene vrijednosti iznad granične vrijednosti, zeleno su označene vrijednosti ispod granične vrijednosti od -9.53kcal/mol (Grafikon 1).<sup>a</sup>

Spoj	CL	LC	LC_rang	LE_LC
AA_1	27	29	1	-7,69
AA_2	37	17	1	-8,77
AA_3	31	20	1	-9,45
AA_4	39	16	6	-7,29
AA_5	49	9	4	-7,5
AA_6	65	6	2	-8,04
AA_10	42	9	2	-7,94
AA_14	48	11	2	-8,61
AA_15	30	14	2	-9,83
AA_17	44	15	8	-9,59
AA_20	70	10	7	-10,26
AA_21	83	5	5	-10,37
AA_22	74	7	4	-10,19
AA_23	76	9	1	-11,26
AA_27	55	7	2	-10,6
AA_36	60	5	6	-7,51
AA_37	75	6	37	-7,86
AA_38	39	13	10	-8,61
AA_39	52	13	6	-8,61
AA_40	50	14	6	-8,68
AA_41	44	10	3	-9,44

<sup>a</sup> Značenje parametara je objašnjeno kod Tablica 3.

**Tablica 8: Rezultati dibenziliranih askorbinskih derivata (Slika 8)(Tablica 2) u supstratnom veznom mjestu (1). Crveno su označene vrijednosti iznad granične vrijednosti, zeleno su označene vrijednosti ispod granične vrijednosti od -9.53kcal/mol (Grafikon 1).<sup>a</sup>**

Spoj	CL	LC	LC_rang	LE_LC
AA_diBz_1	54	6	1	-10,28
AA_diBz_2	79	3	5	-11,12
AA_diBz_3	66	6	3	-11,59
AA_diBz_4	64	13	9	-10,3
AA_diBz_5	90	3	1	-11,33
AA_diBz_6	75	5	3	-10,78
AA_diBz_10	51	14	2	-11,1
AA_diBz_14	61	16	3	-11,58
AA_diBz_15	73	6	11	-11,02
AA_diBz_17	86	5	8	-11,44
AA_diBz_20	96	3	15	-11,81
AA_diBz_21	95	2	7	-11,99
AA_diBz_22	97	2	15	-11,23
AA_diBz_23	97	2	10	-11,37
AA_diBz_26	94	2	10	-12,28
AA_diBz_36	69	7	3	-10,75
AA_diBz_37	95	3	46	-9,42
AA_diBz_38	74	6	23	-10,9
AA_diBz_39	84	4	21	-10,5

<sup>a</sup> Značenje parametara je objašnjeno kod Tablica 3.

**Tablica 9: Rezultati askorbinskih derivata s dvostrukom vezom C4=C5 (Slika 8)(Tablica 2) u supstratnom veznom mjestu (1). Crveno su označene vrijednosti iznad granične vrijednosti, zeleno su označene vrijednosti ispod granične vrijednosti od -9.53kcal/mol (Grafikon 1).<sup>a</sup>**

Spoj	CL	LC	LC_rang	LE_LC
AA_DB_1	9	63	1	-7,77
AA_DB_2	29	19	1	-8,55
AA_DB_3	28	17	2	-9,09
AA_DB_4	12	43	2	-7,32
AA_DB_5	40	17	6	-7,09
AA_DB_6	53	9	4	-7,84
AA_DB_10	13	30	3	-7,53
AA_DB_14	29	18	2	-8,09
AA_DB_15	29	19	10	-8,51
AA_DB_17	47	27	3	-9,32
AA_DB_20	71	4	6	-9,58
AA_DB_21	83	3	16	-9,37
AA_DB_22	72	6	6	-9,12
AA_DB_23	80	5	7	-9,34
AA_DB_27	66	9	11	-9,47
AA_DB_36	35	10	1	-7,36
AA_DB_37	80	4	20	-7,78
AA_DB_38	34	15	9	-8,23
AA_DB_39	35	23	2	-8,78
AA_DB_40	41	11	6	-8,02
AA_DB_41	33	14	2	-8,71

<sup>a</sup> Značenje parametara je objašnjeno kod Tablica 3.

Tablica 10: Rezultati askorbinskih derivata u dvostrukom veznom mjestu (2). Crveno su označene vrijednosti iznad granične vrijednosti, zeleno su označene vrijednosti ispod granične vrijednosti od -10.53kcal/mol (Grafikon 2).<sup>a</sup>

Spoj	CL	LC	LC_rang	LE_LC
AA_1	39	27	2	-8,61
AA_2	30	15	6	-10,09
AA_3	38	17	5	-10,93
AA_4	40	19	7	-8,95
AA_5	51	9	4	-9,23
AA_6	67	5	4	-9,24
AA_10	43	13	12	-8,91
AA_14	29	35	4	-10,52
AA_15	32	13	9	-10,69
AA_17	57	11	6	-11,12
AA_20	76	7	5	-12,1
AA_21	83	5	1	-12,46
AA_22	77	4	11	-10,87
AA_23	74	6	3	-11,72
AA_27	51	6	1	-11
AA_36	57	12	13	-8,8
AA_37	80	5	15	-9,93
AA_38	47	10	16	-9,75
AA_39	57	11	3	-10,8
AA_40	47	18	1	-10,88
AA_41	33	45	1	-10,89

<sup>a</sup> Značenje parametara je objašnjeno kod Tablica 3.

**Tablica 11: Rezultati dibenziliranih askorbinskih derivata u dvostrukom veznom mjestu (2). Crveno su označene vrijednosti iznad granične vrijednosti, zeleno su označene vrijednosti ispod granične vrijednosti od  $-10.53\text{kcal/mol}$  (Grafikon 2).<sup>a</sup>**

Spoj	CL	LC	LC_rang	LE_LC
AA_diBz_1	75	4	1	-13,11
AA_diBz_2	77	6	3	-13,13
AA_diBz_3	75	6	2	-13,82
AA_diBz_4	72	6	16	-11,72
AA_diBz_5	80	3	13	-11,05
AA_diBz_6	75	4	3	-12,65
AA_diBz_10	63	8	30	-10,56
AA_diBz_14	70	7	3	-13,8
AA_diBz_15	73	12	1	-14,94
AA_diBz_17	82	5	3	-14,61
AA_diBz_20	89	3	15	-13,13
AA_diBz_21	94	2	2	-13,98
AA_diBz_22	89	4	4	-13,68
AA_diBz_23	96	3	14	-12,74
AA_diBz_26	93	3	4	-14,06
AA_diBz_36	67	6	4	-12,42
AA_diBz_37	94	3	30	-10,99
AA_diBz_38	63	19	2	-14,15
AA_diBz_39	82	7	5	-12,98

<sup>a</sup> Značenje parametara je objašnjeno kod Tablica 3.

**Tablica 12: Rezultati askorbinskih derivata s dvostrukom veznom C4=C5 u dvostrukom veznom mjestu (2). Crveno su označene vrijednosti iznad granične vrijednosti, zeleno su označene vrijednosti ispod granične vrijednosti od -10.53kcal/mol (Grafikon 2).<sup>a</sup>**

Spoj	CL	LC	LC_rang	LE_LC
AA_DB_1	29	24	8	-7,23
AA_DB_2	22	22	6	-10
AA_DB_3	27	22	6	-10,34
AA_DB_4	30	13	2	-9,05
AA_DB_5	43	11	11	-8,39
AA_DB_6	52	10	1	-9,44
AA_DB_10	34	13	2	-9,71
AA_DB_14	29	35	2	-10,12
AA_DB_15	28	21	5	-10,9
AA_DB_17	44	8	1	-12,17
AA_DB_20	71	5	4	-11,69
AA_DB_21	74	5	3	-12,44
AA_DB_22	66	7	12	-10,55
AA_DB_22	71	4	5	-11,47
AA_DB_27	60	8	10	-9,61
AA_DB_36	37	15	3	-8,83
AA_DB_37	74	5	1	-11,1
AA_DB_38	34	23	4	-10,38
AA_DB_39	35	13	5	-10,22
AA_DB_40	35	13	6	-10,18
AA_DB_41	36	10	11	-9,62

<sup>a</sup> Značenje parametara je objašnjeno kod Tablica 3.



## 4 Zaključak

Primjenom keminformatičke metode molekuskog uklapanja, pokazano je da su neki od novosintetiziranih hibridne 1,2,3-triazolskih derivata kumarina i L-askorbinske kiseline mogući reverzibilni inhibitori katalitičke aktivnosti demetilaze LSD1. Spojevi s najpovoljnijim veznim energijama nižim od određenih graničnih energija između aktivnih i neaktivnih spojeva mogu se predložiti za *in vitro* testiranja. Kako se svi promatrani spojevi vežu i u supstratno vezno mjesto i u vezno mjesto kofaktora FAD-a, i vezanje u mjesto kofaktora je samo nešto povoljnije, potrebno će biti provesti specifičnije *in vitro* testove kao npr. izravna kompeticija s kofaktorom.

Aktivni spojevi iz bilo koje od promatranih skupina (referentni spojevi, kumarinski derivati, derivati askorbinske kiseline sa slobodnim i dibenziliranim C2-OH i C3-OH skupinama, te derivati askorbinske kiseline s dvostrukom C4=C5 vezom) popunjavaju jednake dijelove veznih mjesta. U slučaju vezanja u supstratno vezno mjesto, aktivni spojevi se vežu na analogan, specifičan način. Svi zauzimaju svojim hidrofobnim dijelovima dio uz N5 atom FAD-a na mjestu fenilnog supstituenta u ligandu F2N strukture 2Z3Y koja je korištena u ovom radu, te popunjavaju fleksibilan džep na ulazu u supstratno mjesto. Općenito, spojevi s aromatskim supstituentom R na položaju 4 1,2,3-triazolnog prstena su aktivniji od onih s alifatskim supstituentima, što je u skladu s rezultatima MTT testa za dane spojeve.

## 5 Literatura

1. Verbanac D, Stepanić V, Lučić B, Amić D. “ The Must ” of the Drug Discovery and Development is – Interdisciplinarity. *Bioinforma Biol Phys Proc Sci Meet.* 2013;179–90.
2. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry’s grand challenge. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2010;9(3):203–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20168317>
3. Bunnage ME. Getting pharmaceutical R&D back on target. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2011;7(6):335–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.581>
4. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(SUPPL.):4–17.
5. Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2002;1(9):727–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209152> *ninternal-pdf://3920824551/Hopkins\_2002\_NatRev - The druggable genome.pdf* *nhttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=9061576&site=ehost-live*
6. Fedorov O, Müller S, Knapp S. The (un)targeted cancer kinome. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2010 Mar;6(3):166–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.297>
7. Huston A, Arrowsmith CH, Knapp S, Schapira M. Probing the epigenome. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2015 Jul 21;11(8):542–5. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nchembio.1871>
8. You JS, Jones PA. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? *Cancer Cell.* 2012;22(1):9–20.
9. Højfeldt JW, Agger K, Helin K. Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2013 Nov 15;12(12):917–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4154>
10. Forneris F, Binda C, Vanoni MA, Mattevi A, Battaglioli E. Histone demethylation catalysed by LSD1 is a flavin-dependent oxidative process. *FEBS Lett.* 2005;579(10):2203–7.
11. Aravind L, Iyer LM. The SWIRM domain: a conserved module found in chromosomal proteins points to novel chromatin-modifying activities. *Genome Biol* [Internet]. 2002;3(8):RESEARCH0039. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12186646>

12. Hayami S, Kelly JD, Cho HS, Yoshimatsu M, Unoki M, Tsunoda T, et al. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *Int J Cancer*. 2011;128(3):574–86.
13. Kahl P, Gullotti L, Heukamp LC, Wolf S, Friedrichs N, Vorreuther R, et al. Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res*. 2006;66(23):11341–7.
14. Schulte JH, Lim S, Schramm A, Friedrichs N, Koster J, Versteeg R, et al. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: Implications for therapy. *Cancer Res* [Internet]. 2009 Feb 10;69(5):2065–71. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-08-1735>
15. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank [Internet]. *Nucleic Acids Research*. 2000. p. 235–42. Available from: [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)
16. Mimasu S, Sengoku T, Fukuzawa S, Umehara T, Yokoyama S. Crystal structure of histone demethylase LSD1 and tranlycypromine at 2.25Å. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2008 Feb;366(1):15–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X07024400>
17. Schrödinger, LLC. The {AxPyMOL} Molecular Graphics Plugin for {Microsoft PowerPoint}, Version~1.8. 2015.
18. Schrödinger, LLC. The {JyMOL} Molecular Graphics Development Component, Version~1.8. 2015.
19. Schrödinger, LLC. The {PyMOL} Molecular Graphics System, Version~1.8. 2015.
20. Thinnes CC, England KS, Kawamura A, Chowdhury R, Schofield CJ, Hopkinson RJ. Targeting histone lysine demethylases - Progress, challenges, and the future. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2014;1839(12):1416–32.
21. Binda C, Valente S, Romanenghi M, Pilotto S, Cirilli R, Karytinis A, et al. Biochemical, structural, and biological evaluation of tranlycypromine derivatives as inhibitors of histone demethylases LSD1 and LSD2. *J Am Chem Soc*. 2010;132(19):6827–33.
22. Neelamegam R, Ricq EL, Malvaez M, Patnaik D, Norton S, Carlin SM, et al. Brain-penetrant LSD1 inhibitors can block memory consolidation. *ACS Chem Neurosci*. 2012;3(2):120–8.
23. A phase I study of Human Pharmacokinetics and Safety of ORY-1001, and LSD1 inhibitor, in relapsed or refractory acute leukaemia (AL) [Internet]. Available from: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2013-002447-29/ES>
24. Ma L, Zheng Y, Wang S-Q, Wang B, Wang Z-R, Pang L, et al. Design, Synthesis, and Structure–Activity

Relationship of Novel LSD1 Inhibitors Based on Pyrimidine–Thiourea Hybrids As Potent, Orally Active Antitumor Agents. *J Med Chem* [Internet]. 2015 Feb 26;58(4):1705–16. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.5b00037>

25. Fiskus W, Sharma S, Shah B, Portier BP, Devaraj SGT, Liu K, et al. Highly effective combination of LSD1 (KDM1A) antagonist and pan-histone deacetylase inhibitor against human AML cells. *Leukemia* [Internet]. 2014;28(11):2155–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24699304>
26. Kutz CJ, Holshouser SL, Marrow EA, Woster PM. 3,5-Diamino-1,2,4-triazoles as a novel scaffold for potent, reversible LSD1 (KDM1A) inhibitors. *Medchemcomm* [Internet]. 2014;5(12):1863–70. Available from: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/md/c4md00283k>
27. Zheng YC, Duan YC, Ma JL, Xu RM, Zi X, Lv WL, et al. Triazole-dithiocarbamate based selective lysine specific demethylase 1 (LSD1) inactivators inhibit gastric cancer cell growth, invasion, and migration. *J Med Chem*. 2013;56(21):8543–60.
28. Maes T, Carceller E, Salas J, Ortega A, Buesa C. Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2015 Aug;23(1):52–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.009>
29. Schmitt ML, Hauser A-T, Carlino L, Pippel M, Schulz-Fincke J, Metzger E, et al. Nonpeptidic Propargylamines as Inhibitors of Lysine Specific Demethylase 1 (LSD1) with Cellular Activity. *J Med Chem* [Internet]. 2013 Sep 26;56(18):7334–42. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm400792m>
30. Ye X-W, Zheng Y-C, Duan Y-C, Wang M-M, Yu B, Ren J-L, et al. Synthesis and biological evaluation of coumarin–1,2,3-triazole–dithiocarbamate hybrids as potent LSD1 inhibitors. *Medchemcomm* [Internet]. 2014;5(5):650. Available from: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/md/c4md00031e>
31. Hazeldine S, Pachaiyappan B, Steinbergs N, Nowotarski S, Hanson AS, Casero RA, et al. Low Molecular Weight Amidoximes that Act as Potent Inhibitors of Lysine-Specific Demethylase 1. *J Med Chem* [Internet]. 2012 Sep 13;55(17):7378–91. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm3002845>
32. Hitchin JR, Blagg J, Burke R, Burns S, Cockerill MJ, Fairweather EE, et al. Development and evaluation of selective, reversible LSD1 inhibitors derived from fragments. *Medchemcomm* [Internet]. 2013;4(11):1513–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C3MD00226H>
33. Zheng Y-C, Ma J, Wang Z, Li J, Jiang B, Zhou W, et al. A Systematic Review of Histone Lysine-Specific Demethylase 1 and Its Inhibitors. *Med Res Rev* [Internet]. 2015 Sep;35(5):1032–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/med.21350>
34. Willmann D, Lim S, Wetzel S, Metzger E, Jandausch A, Wilk W, et al. Impairment of prostate cancer cell growth by a selective and reversible lysine-specific demethylase 1 inhibitor. *Int J Cancer* [Internet]. 2012

Dec 1;131(11):2704–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.27555>

35. Kraljević TG, Harej A, Sedić M, Pavelić SK, Stepanić V, Drenjančević D, et al. Synthesis, in vitro anticancer and antibacterial activities and in silico studies of new 4-substituted 1,2,3-triazole–coumarin hybrids. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2016;124:794–808. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.062>
36. Meščić A, Šalić A, Gregorić T, Zelić B, Raić-Malić S. Continuous flow-ultrasonic synergy in click reactions for the synthesis of novel 1,2,3-triazolyl appended 4,5-unsaturated -ascorbic acid derivatives. *RSC Adv* [Internet]. 2017;7(2):791–800. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA25244C>
37. Lounnas V, Ritschel T, Kelder J, McGuire R, Bywater RP, Foloppe N. Current Progress in Structure-Based Rational Drug Design Marks a New Mindset in Drug Discovery. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2013 Feb;5(6):1–14. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037014600398>
38. Huang N, Shoichet BK, Irwin JJ. Benchmarking Sets for Molecular Docking. *J Med Chem* [Internet]. 2006 Nov;49(23):6789–801. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm0608356>
39. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* [Internet]. 2009 Dec;30(16):2785–91. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.21256>
40. Skinner MK. Environmental epigenetics and a unified theory of the molecular aspects of evolution: A neo-Lamarckian concept that facilitates neo-Darwinian evolution. *Genome Biol Evol*. 2015;7(5):1296–302.
41. Zhou W, Wang Y, Lu A, Zhang G. Systems pharmacology in small molecular drug discovery. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):1–16.
42. Sanner MF, others. Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Model*. 1999;17(1):57–61.
43. Sanner MF, Stoffler D, Olson AJ. ViPEr , a Visual Programming Environment for Python Abstract : Environment. :1–15.
44. López-Ratón M, Rodríguez-Álvarez MX, Suárez CC, Sampedro FG. {OptimalCutpoints}: An {R} Package for Selecting Optimal Cutpoints in Diagnostic Tests. *J Stat Softw* [Internet]. 2014;61(8):1–36. Available from: <http://www.jstatsoft.org/v61/i08/>
45. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria; 2013. Available from: <http://www.r-project.org/>
46. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* [Internet]. 1950;3(1):32–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0142%281950%293%3A1%3C32%3A%3AAID->

CNCR2820030106%3E3.0.CO%3B2-3

## 6 SAŽETAK

### **In silico probir derivata kumarina i L-askorbinske kiseline na histonskoj demetilazi LSD1 — pametni dizajn novih kemoterapeutika**

Razvoj novih lijekova podrazumijeva dugotrajan i skup proces. Uključivanje stručnjaka iz svih područja omogućuje smanjivanje rizika od gubitka potencijalno kvalitetnih molekula tijekom tog procesa, te su danas interdisciplinarni timovi imperativ za osiguravanje uspješnosti i brzine odvijanja samog tijeka istraživanja i razvoja novih terapijskih opcija. Budući da je razvoj novih tehnologija i kompjuterskih/računskih programa omogućio relativno uspješno predviđanje ponašanja molekula u biološkim sustavima, te je doprinio i ukupnom smanjenju troškova razvoja, upotreba računalne kemije danas je od velikog značaja i uvelike se koristi u farmaceutskoj industriji i u ostalim sustavima koji se bave problematikom iznalaženja novih obećavajućih molekula. U ovom radu je sa skupom novosintetiziranih hibridnih spojeva (33 kumarinsko-1,2,3-triazolna i 61 askorbinsko -1,2,3-triazolna derivata) provedeno molekularno uklapanje na poznatoj ciljnoj molekuli enzimu, LSD1 (lizin-specifičnoj demetilazi 1) kako bi se između navedenog skupa spojeva probrale aktivne molekule i pokušao pretpostaviti mehanizam njihove inhibicije ciljanog enzima koji sudjeluje u epigenetskoj regulaciji stanice. LSD1 igra vrlo važnu ulogu u modifikaciji epigenetskog izražaja stanice uklanjajući metilne skupine s lizina na histonskim podjedinicama i pojačano je izražen u neoplastičnim stanicama određenih vrsta tumora. Model je postavljen koristeći poznate reverzibilne inhibitore LSD1 i pomoću određenih graničnih vrijednosti između aktivnih i neaktivnih spojeva proban je podskup spojeva za daljnja *in vitro* testiranja. Također, metodom definicije dva vezna mjesta predloženi su strukturni mehanizmi inhibicije otvarajući time mogućnost pametnog dizajniranja novih lijekova u bliskoj budućnosti koji ciljaju na enzim LSD1 kao mjesto djelovanja.

**Ključne riječi:** askorbinska kiselina, *in silico*, kemoterapija, kumarin, lizin-specifična demetilaza 1, molekularno uklapanje, virtualni probir

## 7 ABSTRACT

### **In silico screening of coumarin and L-ascorbic acid derivatives on human histone demethylase LSD1 — rational design of novel chemotherapeutics**

Development of a new drug has become an expensive and long endeavor. Of the ultimate importance is acting through the multi- and inter-disciplinary teams, minimizing in this way most of the risks while selecting the most promising molecules for the further development. Computational chemistry and new technologies have enabled significant reduction of the risk of attrition during preclinical drug development. In this work the results obtained on the set of newly synthesized hybrid compounds ( 33 coumarin-1,2,3-triazole and 61 and L-ascorbic acid-1,2,3-triazole derivatives) on which molecular docking on the target protein has been performed, are reported. The target protein lysine-specific histone demethylase 1 LSD1 is responsible for the epigenetic regulation within the cells. Epigenetics has been widely used in the last decade aiming also towards control of the proliferation and development of neoplastic growth. LSD1 plays an important role in modification of epigenetic behavior of the cell and as enzyme it is overexpressed in many types of malignancies. Our model was set-up utilizing known reversible inhibitors of LSD1 as comparable standards and utilizing results from the docking studies with the set of newly synthesized molecules. The results obtained are highly useful and will serve in rational drug development of further derivatives aimed to inhibit devastation activity of LSD1 as a target protein/enzyme.

**Keywords:** ascorbic acid, chemotherapy, coumarin, *in silico* studies, lysine-specific demethylase 1, molecular docking, virtual screening



## 8 ŽIVOTOPIS

### SREDNJA ŠKOLA:

2008.–2012. – I. Gimnazija Varaždin (smjer: prirodoslovno-matematički)

### VISOKO OBRAZOVANJE:

2012. – Upisan integrirani prediplomski i diplomski studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (3. mjesto na prijemnom ispitu za upis na fakultetu)

### REZULTATI, NAGRADE, POSTIGNUĆA:

2008. – Županijsko natjecanje iz fizike (prvo mjesto)

2012. – Gradsko natjecanje iz logike (prvo mjesto)

### AKADEMSKI I ZNANSTVENO-ISTRAŽIVAČKI RAD:

2014. – Stručna praksa na Sahlgrenska institutu u Gothenburgu, Švedska. Rad u laboratoriju profesora Bergoa pod vodstvom profesora Cisowskog, u trajanju od mjesec dana. Tijekom svog boravka od samog početka aktivno sam sudjelovao u laboratorijskom i pružao tehničku pomoć iz područja molekularne biologije (PCR, gel elektroforeze, određivanje DNA). Doprinos u radu laboratorija istaknut je u zahvali na radu publiciranom 2015. u časopisu *Oncogene* (Cisowski J, Sayin VI, Liu M, Karlsson C, Bergo MO, *Oncogene-induced senescence underlies the mutual exclusive nature of oncogenic KRAS and BRAF*; **Oncogene**. 2016 Mar 10;**35**(10):1328-33. doi: 10.1038/onc.2015.186. Epub 2015 Jun 1.)



Oncogene-induced senescence  
J Cisowski et al

6

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank R Ister for technical assistance. This study was supported by grants from the Swedish Cancer Society, the Swedish Research Council, the Göran Gustafsson Foundation, the Swedish Children's Cancer Fund, BioCARE—a strategic research program at the University of Gothenburg, and Ingabritt and Arne Lundberg's Research Foundation (to MOB); and the Assar Gabrielsson Foundation (to VIS).

2013/2014 demonstrator na kolegiju Anatomije za studente Medicine

2015 do danas – suradnja s doc.dr.sc. Donatella Verbanac i dr.sc. Višnja Stepanić na iznalaženju novih metoda primjenom računske kemije za bolju selekciju spojeva koji mogu zadovoljiti uvjete primarnog i sekundarnog *screeninga* tijekom istraživanja novih kemijskih entiteta u procesu potrage za novim terapijskim opcijama

### PODRUČJA POSEBNOG ZNANSTVENOG INTERESA:

2012. do danas – volontiranje u radu studentske organizacije CroMSIC

2015. do danas - Web administrator studentske organizacije CroMSIC