

Dizajn inhibitora ubikvitin tioesteraze OTUB1 pomoću superračunala

Grizelj, Paulina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:804412>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-28**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Paulina Grizelj

Dizajn inhibitora ubikvitin tioesteraze OTUB1 pomoću superračunala

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Istraživanje i razvoj lijekova

Paulina Grizelj

Dizajn inhibitora ubikvitin tioesteraze OTUB1 pomoću superračunala

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: dr.sc. Željko M. Svedružić, docent

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Graduate program

Drug research and development

Paulina Grizelj

Structure-based design of novel ubiquitin thioesterase OTUB1 inhibitors
using supercomputer

Graduate thesis

Rijeka, 2020.

Mentor: Željko M. Svedružić, PhD., assistant professor

Diplomski rad obranjen je dana 17. rujna 2020. godine pred povjerenstvom:

1. prof. dr. sc. Miranda Mladinić Pejatović
2. izv. prof. dr. sc. Karlo Wittine
3. doc. dr. sc. Željko Svedružić

Rad ima 52 stranice, 23 slike, 2 tablice i 27 literaturnih navoda.

Sažetak

Značaj: Ubikvitinacija je modifikacija u kojoj se na protein kovalentno veže ubikvitin (Ub). Deubikvitinacija je reverzibilni proces ubikvitinaciji, modifikacija u kojoj se uklanja ubikvitin sa proteina. Ravnoteža tih dvaju procesa održava razinu i aktivnost proteina u stanici, a njihova disfunkcija dovodi do nastanka različitih patoloških stanja. Deubikvitinaciju u stanici provode deubikvitinirajući enzimi, kao što je protein ubikvitin tioesteraza OTUB1. Ubikvitin tioesteraza regulira aktivnost proteina p53 i ubikvitinaciju RAS proteina. Zbog povezanosti sa proteinima koji sudjeluju u nastanku tumora, inhibicija ubikvitin tioesteraze u stanici bi mogla biti potencijalna meta u razvoju protutumorskih lijekova.

Rezultati: Virtualnim probirom pronalaze se spojevi koji su komercijalno dostupni. Odabrani spojevi mogu kompetitivno inhibirati ubikvitin tioesterazu zbog svoje strukture i načina vezanja na vezno mjesto ubikvitina na proteinu. Vezno mjesto ubikvitina na proteinu ima aminokiselinske ostatke fenilalanina. Poželjno je da spoj kandidat ima aromatske prstene u strukturi, da bi se na protein mogao vezati π - π stacking interakcijama. Simulacijama molekularne dinamike prikazuje se inhibicija proteina ubikvitin tioesteraze. Koliko je dobra inhibicija proteina ovisi o interakcijama između spojeva i veznog mjesta na proteinu. Računalnim metodama određuju se ADME svojstva spojeva kandidata te pronalaze strukture slične biološke aktivnosti (bioizosteri).

Zaključak: Određeni komercijalno dostupni spojevi mogu inhibirati deubikvitinirajući enzim ubikvitin tioesterazu OTUB1. Inhibitori ubikvitin tioesteraze mogli bi se koristiti kao protutumorski lijekovi. Molekularna dinamika može se koristiti za razvoj takvih kandidata za lijekove.

Ključne riječi: ubikvitin tioesteraza OTUB1, inhibitori enzima, molekularna dinamika, protutumorski lijekovi, dizajn lijekova

Abstract

Background: Ubiquitination modifies proteins by covalent attachment of ubiquitin (Ub). Deubiquitination, the reversible process of ubiquitination, removes ubiquitin from the proteins. Balance between these two processes regulates cellular protein levels and activity. Dysfunction of ubiquitination and deubiquitination leads to development of pathological conditions in the cell. Deubiquitinases are enzymes that carry out protein deubiquitination. Deubiquitinase ubiquitin thioesterase OTUB1 regulates activity of p53 protein and RAS protein ubiquitination. Cellular inhibition of ubiquitin thioesterase could be a potential target in development of antitumour agents.

Results: Virtual screening of commercially available compounds can be performed using computer aided drug design. Some compounds can competitively inhibit ubiquitin thioesterase OTUB1. Ubiquitin binding site on protein OTUB1 has phenylalanine residues. Therefore, it is preferable that compound has an aromatic ring in its structure. That way it can bind on ubiquitin binding site with π - π stacking interactions. Molecular dynamics simulations show ubiquitin thioesterase inhibition. Interactions between drug candidates and binding site determine how good is the protein inhibition. ADME properties can be defined using computer methods, as well as the chemical compounds with similar structures (bioisosteres).

Conclusion: Certain commercially available compounds can inhibit deubiquitinase ubiquitin thioesterase OTUB1. Inhibitors of ubiquitin thioesterase could be used as antitumour agents. Molecular dynamics can be used to develop such drug candidates.

Keywords: ubiquitin thioesterase OTUB1, enzyme inhibitors, molecular dynamics, antitumour agents, drug design

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Ubikvitinacija – označavanje proteina za razgradnju u proteasomu	3
1.2 Deubikvitinacija i deubikvitinirajući enzimi (DUBs)	7
1.3 Deubikvitinirajući enzim OTUB1 potiče razvoj tumora inhibirajući ubikvitinaciju RAS	8
1.4 Inhibitori ubikvitinacije kao potencijalni lijekovi	9
1.5 <i>In silico</i> dizajn lijekova i simulacije molekularne dinamike	13
2. Cilj rada	17
3. Materijali i metode	17
4. Rezultati	19
4.1 Vezno mjesto ubikvitina na ubikvitin tioesterazi OTUB1	19
4.2 Odabir kemijskih spojeva (inhibitora) koji se mogu vezati na vezno mjesto ubikvitina na proteinu OTUB1	21
4.3 Simulacije molekularne dinamike prikazuju vezanje inhibitora na protein OTUB1	28
4.4 Analiza inhibicije proteina OTUB1 <i>in vitro</i>	36
4.5 ADME (Apsorpcija, Distribucija, Metabolizam i Ekskrecija) svojstva inhibitora	37
5. Rasprava	41
5.1 Ispitivani inhibitori se vežu specifično na hidrofobno vezno mjesto ubikvitina na proteinu OTUB1	41
5.2 Inhibitori se na različite načine vežu na protein OTUB1 i različito ga inhibiraju	43
5.3 Bioizosteri	45
6. Zaključak	47
7. Literatura	48
8. Životopis	51

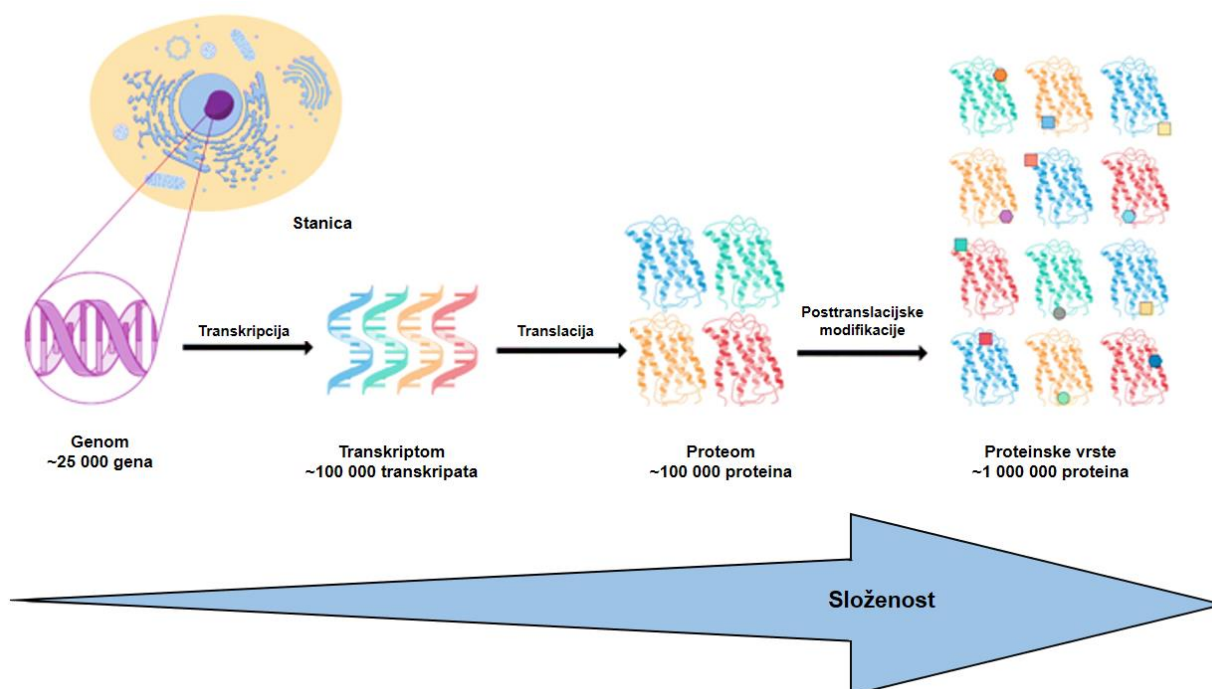
1. Uvod

Sve stanice organizma sadrže iste kopije genetičke informacije (genom). Genetičke informacije u stanici određuju strukturne i funkcionalne osobine organizma. Većinom su identične u svakoj stanici, u stanicama različitih tkiva i razdobljima života stanica. Međutim, stanice u različitim tkivima zahtjevaju sposobnost obavljanja različitih funkcija. Proteini u stanici (proteom) su vrlo raznoliki. Raznolikost proteina je nužna da bi mogli obavljati specifične funkcije u stanici. Proteini u stanici se značajno razlikuju u različitim tkivima i razdobljima života¹.

Proteini se u stanicama neprestano sintetiziraju. Lanci nukleinskih kiselina (DNA) se prevode u lance nukleotida (RNA), a zatim u aminokiseline koje grade proteine. S obzirom na različite funkcije stanica u tkivima, potrebno je sintetizirati proteine specifičnih funkcija za određeno tkivo. Specifičnost i složenost proteina ostvaruje se u dva procesa tijekom transkripcije i sinteze proteina. Prvi je proces splicing, u kojem se nekodirajuće sekvence (introni) izrezuju, a kodirajuće (egzoni) ligiraju u mRNA i tvore različite proteinske izoforme. Drugi proces su posttranslacijske modifikacije. Posttranslacijske modifikacije proteina odvijaju se nakon sinteze proteina. Sudjeluju u kontroli velikog broja staničnih procesa i povećanju složenosti i raznolikosti proteasoma¹ (slika 1).

Posttranslacijske modifikacije imaju niz važnih fizioloških i bioloških uloga u stanici. Istraživanje posttranslacijskih modifikacija doprinosi razumijevanju funkcioniranja stanica na molekularnoj razini. Posttranslacijske modifikacije se koriste i u istraživanju biomarkera i njihovom korištenju u dijagnostici. Također sudjeluju u karakterizaciji proteina koji mogu biti potencijalni biološki i bioslični lijekovi¹.

Posttranslacijske modifikacije dijele se u dvije kategorije: kovalentno vezanje funkcionalnih grupa i cijepanje peptidnih veza u procesu pretvorbe propeptida u zreli oblik proteina. U širem kontekstu i druga neenzimatska vezanja funkcionalnih grupa i strukturne promjene se ubrajaju u posttranslacijske modifikacije, na primjer stvaranje disulfidnih mostova, racemizacija, i slični procesi¹. U posttranslacijske modifikacije ubraja se i ubikvitinacija. Ubikvitinacija modificira protein vezanjem drugog proteina na njegovu površinu. Ta modifikacija sudjeluje u određivanju sudbine i funkcije stanice².



Slika 1. Posttranslacijske modifikacije povećavaju složenost proteasoma u stanicima. Genom je jednak u svim stanicama organizma, ali proteini moraju biti različiti. Da bi proteini bili različiti, podliježu posttranslacijskim modifikacijama. Tako se povećava njihova specifičnost u stanicama organizma. (Slika preuzeta iz: Virág D, Dalmadi-Kiss B, Vékey K, Drahos L, Klebovich I, Antal I *et al.* Current Trends in the Analysis of Post-translational Modifications. Chromatographia. 2020; **83**. doi:10.1007/s10337-019-03796-9. Prevedeno na hrvatski.)

1.1 Ubikvitinacija – označavanje proteina za razgradnju u proteasomu

Ubikvitinacija je posttranslacijska modifikacija u kojoj se mali protein ubikvitin kovalentno veže na protein supstrat. Na protein se može vezati jedna ili više jedinica proteina ubikvitina. Tim vezanjem se protein supstrat označuje za razgradnju u proteasomu³⁴. Ubikvitin (Ub) je kratki polipeptid građen od 76 aminokiselina, veličine 8.5 kDa. Evolucijski je visoko konzerviran u eukariota⁴⁵. Ubikvitin je linearni fuzijski protein. Kodiraju ga četiri gena: *UBA52*, *UBA80*, *UBB* i *UBC*⁶.

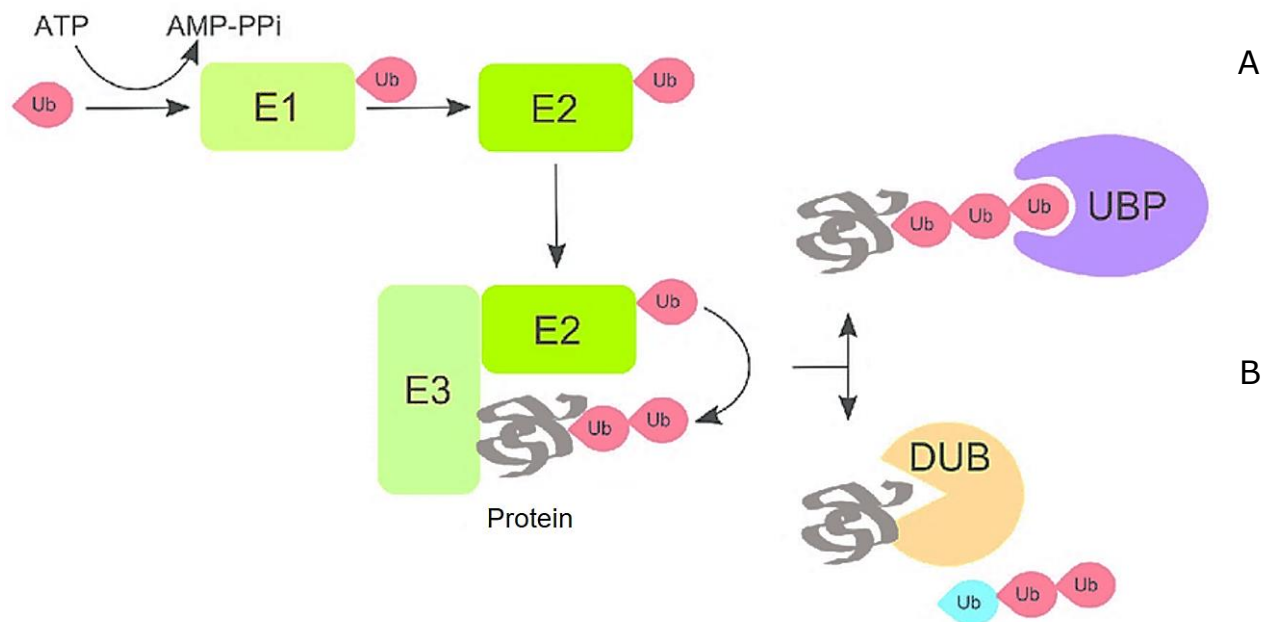
Za vezanje ubikvitina na protein potrebno je uzastopno djelovanje nekoliko enzima. Poznate su tri vrste enzima: E1, ubikvitin aktivirajući enzim, E2, ubikvitin konjugirajući enzim, i E3, ubikvitin ligirajući enzim.

Redoslijed reakcija započinje enzim E1 koji aktivira ubikvitin. U reakciji aktivacije ubikvitina potrebna je hidroliza ATP-a. Zatim E1 prenosi ubikvitin na enzim E2. Enzim E3 je u isto vrijeme u interakciji s enzimom E2 (koji ima vezan ubikvitin) i s proteinom supstratom. Enzim E3 posreduje u stvaranju izopeptidne veze između C (karboksi) kraja ubikvitina i aminokiselinskog ostatka lizina (Lys) na proteinu supstratu⁴⁶ (slika 2).

Ubikvitin se na protein supstrat najčešće veže na aminokiselinske ostatke lizina. Sedam aminokiselinskih ostataka lizina na ubikvitinu omogućuju stvaranje izopeptidne veze: Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys 33, Lys 48 i Lys 63⁶⁷. Najčešće se vežu na Lys48 i Lys63⁸. Osim lizina, ubikvitin se može vezati svojim N (amino) krajem aminokiselinskog ostatka metionina (Met1) na protein supstrat. Vezanjem na metionin se najčešće stvaraju linearni poliubikvitinski lanci⁶.

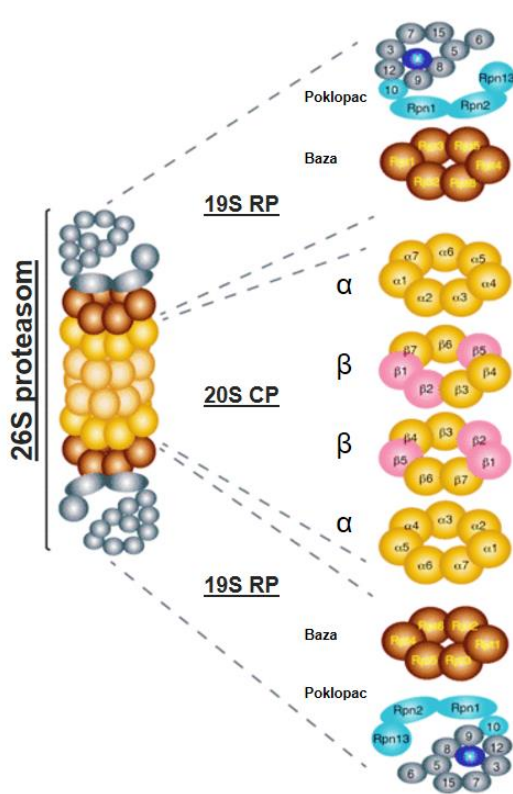
Ako se u procesu ubikvitinacije veže više monomernih jedinica ubikvitina na protein supstrat, stvaraju se polimerni linearni lanci ubikvitina⁷. Struktura ubikvitina vezanog na protein supstrat i mjesto vezanja određuju njegovu

funkciju i sudbinu u stanici. Strukture lanaca određuju uloge u staničnom ciklusu, NF- κ B signalnom putu i signalizaciji stanične smrti⁶. Struktura i mjesto vezanja također određuju prepoznaju li ubikvitinirani protein ubikvitinirajući ili deubikvitinirajući enzimi u stanici (slika 2).



Slika 2. Enzimski kataliza ubikvitinacije proteina. Za ubikvitinaciju proteina potrebno je nekoliko enzima koji katalizu provode redosljedno. Prvi korak ubikvitinacije ovisan je o hidrolizi ATP-a. (A) Nakon ubikvitinacije, ubikvitinirani protein mogu vezati različiti stanični proteini koji imaju ubikvitin vezajuću domenu (eng. UBP – ubiquitin binding proteins). Ti proteini posreduju u staničnim funkcijama ubikvitinacije. (B) Ubikvitinirane proteine mogu vezati i deubikvitinirajući enzimi (eng. DUBs – deubiquitinases). Oni također imaju ubikvitin vezujuću domenu, a funkcija im je uklanjanje ili modificiranje ubikvitina na proteinu. (Slika preuzeta iz: Rudnicka A, Yamauchi Y. Ubiquitin in influenza virus entry and innate immunity. *Viruses*. 2016; **8**. doi:10.3390/v8100293.)

Ubikvitinacija ima različite funkcije u stanici. Najznačajnija je proteolitička funkcija, odnosno označavanje proteina za razgradnju u proteasomu. Ubikvitinom označeni proteini razgrađuju se u proteasomu na manje polipeptidne jedinice⁴. Većina proteina iz citosola i jezgre stanice u eukariotskim organizmima razgrađuje se preko ubikvitin-proteasom sustava. Sustav za razgradnju proteina u eukariota je 26S proteasom, veličine 2.5 Mda. Sastoji se od dvije podjedinice: 20S podjedinice i 19S podjedinice (slika 3). Bačvasta podjedinica 20S na jednom ili oba kraja ima kapu od 19S regulatorne podjedinice. Regulatorna podjedinica 19S omogućuje vezanje ubikvitina na ubikvitinom označenom proteinu i ulazak u 20S podjedinicu. Proteini se razgrađuju nakon ulaska u 20S podjedinicu⁷.



Slika 3. Struktura 26S proteasoma.

26S proteasom sastoji se od jedne 20S podjedinice (eng. CP – Core Particle) i dvaju 19S podjedinica (eng. RP – Regulatory Particle). 19S podjedinica ima „poklopac“ (eng. lid) koji se sastoji od 13 ne-ATP-aznih podjedinica (Rpn1-13 – Regulatory Particle Non-ATP-ase) i „bazu“ (eng. base) koja se sastoji od 6 različitih AAA+ ATP-aznih podjedinica (Rpt1-6 – Regulatory Particle Triple A)⁹. (Slika preuzeta iz: Turakhiya A. *Functional characterization of the role of ZFAND1 in stress granule turnover*. 2018. Prevedeno na hrvatski.)

Razgradnja proteina u proteasomu ima ulogu u održavanju homeostaze stanice. 26S proteasom katalizira razgradnju većine proteina u eukariotskim

stanicama, otprilike 80%. U proteasomu se odvija i brza razgradnja pogrešno smotanih i regulatornih proteina, kao i sporo cijepanje velikih staničnih proteina u manje polipeptide. Proteoliza je ireverzibilan proces. U stanici nastaje niz negativnih posljedica ako proteasom razgradi proteine neselektivno ili ako ne razgradi proteine koje treba razgraditi¹⁰. Iako je ubikvitinacija važna u razgradnji proteina, ne razgrađuju se svi ubikvitinirani proteini u stanici. Proteasom je evoluirao da selektivno prepozna i provodi proteolizu¹⁰.

Ubikvitinacija ima više različitih neproteolitičkih funkcija u stanici. U neproteolitičke procese ubrajaju se internalizacija i regulacija broja receptora, sinteza multiproteinskih kompleksa, sudjelovanje u mehanizmima prijenosa unutar stanice, signalizacija upalnih procesa, autofagija, popravak DNA, regulacija enzimske aktivnosti, promjena lokacije ili aktivnosti u stanici te regulacija protein-protein interakcija⁴¹¹. Svi navedeni procesi su povezani sa upravljanjem staničnih signalnih puteva. Ubikvitinacija kontrolira signalne puteve regulacijom interakcija i akcija između proteina⁷.

Promjene u regulaciji ubikvitinacije utječu na signalne puteve u stanici. Deregulacija ubikvitinacije dovodi do aktivacije ili deaktivacije signalnih puteva u stanici. Aktivirati ili deaktivirati se mogu signalni putevi uključeni u onkogenezu ili metabolizam stanice. Zbog deregulacije ubikvitinacije može doći do nepravilne ili nedovoljne sinteze proteinskih kompleksa, na primjer tijekom regulacije upalnih odgovora ili procesa popravaka DNA. Također može doći do akumulacije pogrešno smotanih proteina i pogrešnog lokaliziranja proteina u stanici. Promjene i pogreške u mehanizmu ubikvitinacije dovode do nepravilnog funkcioniranja stanica. Zbog nepravilnog funkcioniranja stanica uzrokovanog pogreškama u ubikvitinaciji, nastaju urođeni defekti, tumori te pedijatrijske i neurodegenerativne bolesti²⁴.

1.2 Deubikvitinacija i deubikvitinirajući enzimi (DUBs)

Ubikvitinacija je reverzibilan proces. Deubikvitinacija je proces suprotan ubikvitinaciji. Deubikvitinaciju provode deubikvitinirajući enzimi (DUBs). Oni uklanjaju ubikvitin sa proteina označenog za razgradnju (slika 2). Deubikvitinirajući enzimi cijepaju izopeptidnu vezu između ubikvitina i proteina supstrata⁷. Sudjeluju u staničnim procesima apoptoze, rasta stanice, kontrole staničnog ciklusa i popravka genetičkog materijala u stanici³. Deubikvitinacija u stanici održava dinamičnost i ravnotežu između procesa ubikvitinacije i deubikvitinacije. Regulacijom razina i aktivnosti proteina u stanici održava se ravnoteža između ta dva procesa⁷.

Deubikvitinirajući enzimi su proteaze. Proteaze kataliziraju razgradnju (proteolizu) proteina. Poznato je sedam obitelji deubikvitinirajućih enzima. Od njih je šest (USP, UCH, OTU, MJD, MINDY I ZUP1) klasificirano kao cisteinske proteaze, a jedna (JAMM/MPN) kao metaloproteaza ovisna o cinku⁷. Deubikvitinirajući enzimi moraju biti specifičnih aktivnosti i preferencija vezanja. Deubikvitinirajući enzimi su selektivni zato što se ubikvitin veže na različite načine i na različita mjesta na proteinu. Kao i ubikvitinirajući enzimi, DUBs mogu vezati različite tipove ubikvitinskih lanaca i na različitim mjestima vezanja ubikvitinskih lanaca. Specifičnost vezanja određuje biološku funkciju u stanici, na primjer razgradnja u proteasomu, popravak DNA, signalizacija u urođenom imunitetu⁷.

Deubikvitinirajući enzimi u jezgri (nukleusu) vežu različite tipove ubikvitinskih lanaca i reguliraju smatanje, strukturu i funkciju kromatina, te popravak DNA. Citosolni i endosomalni deubikvitinirajući enzimi imaju ulogu u procesima i signalnim putevima u stanici: u regulaciji imunoloških odgovora (na primjer NF- κ B signalnom putu), autofagiji, u regulaciji staničnog ciklusa⁷.

1.3 Deubikvitinirajući enzim OTUB1 potiče razvoj tumora inhibirajući ubikvitinaciju RAS

Obitelj enzima RAS GTP-aze su mali enzimi, važni u regulaciji staničnih procesa u eukariota. Sudjeluju u procesima stanične proliferacije, organizacije citoskeleta i transportu unutarstanične membrane. Molekularni mehanizam djelovanja RAS GTP-aza je prijelaz iz inaktivnog oblika u aktivni oblik proteina. Na inaktivnom obliku proteina je vezana molekula guanozin difosfata (GDP), a na aktivnom obliku molekula guanozin trifosfata (GTP). Prijelaz između GDP i GTP vezanog oblika proteina reguliraju guanin nukleotidni faktori izmjene (eng. guanine nucleotide exchange factors – GEF) i GTP-azni aktivirajući proteini (eng. GTP-ase activating proteins – GAP)¹².

RAS proteini aktiviraju se u kaskadi reakcija u stanici. Signalni put MAPK/ERK također se naziva i Ras-Raf-MEK-ERK signalni put. U signalnom putu proteini primaju signal na površini stanice. Primljeni signal prenose u jezgru stanice gdje aktiviraju određene transkripcijske faktore. Aktivacijom transkripcijskih faktora mijenja se ekspresija genetičkog materijala (DNA)¹².

RAS GTP-aze se zbog mutacija u RAS onkogenima povezuju s nastankom tumora. Mutacije najčešće „ciljaju“ prijelaz između inaktivnog i aktivnog oblika proteina. Uz mutacije u RAS onkogenima, u nastanak tumora su uključeni i regulatori prijelaza GTP-GDP. Mutacije RAS onkogeni pojavljuju se u karcinomima pluća ne-malih stanica, i to najviše u adenokarcinomima. Međutim, mehanizmi nastanka tumora nisu u potpunosti razjašnjeni. I drugi signalni putevi uključeni su u nastanak tumora. Na primjer, kod divljeg tipa (eng. wild-type – wt) KRAS tumora MAPK signalni put je prekomjerno aktiviran¹².

Neke od posttranslacijskih modifikacija reguliraju RAS GTP-aze, na primjer fosforilacija, lipidacija i acetilacija. Ubikvitinacija je također značajna

posttranslacijska modifikacija za RAS GTP-aze. RAS proteini podliježu mono- i di-ubikvitinaciji. Ubikvitinacija i kod RAS proteina ima važnu proteolitičku ulogu – označavanje za razgradnju u proteasomu. Ubikvitin ligaza (enzim E3) kontrolira stabilnost RAS proteina¹².

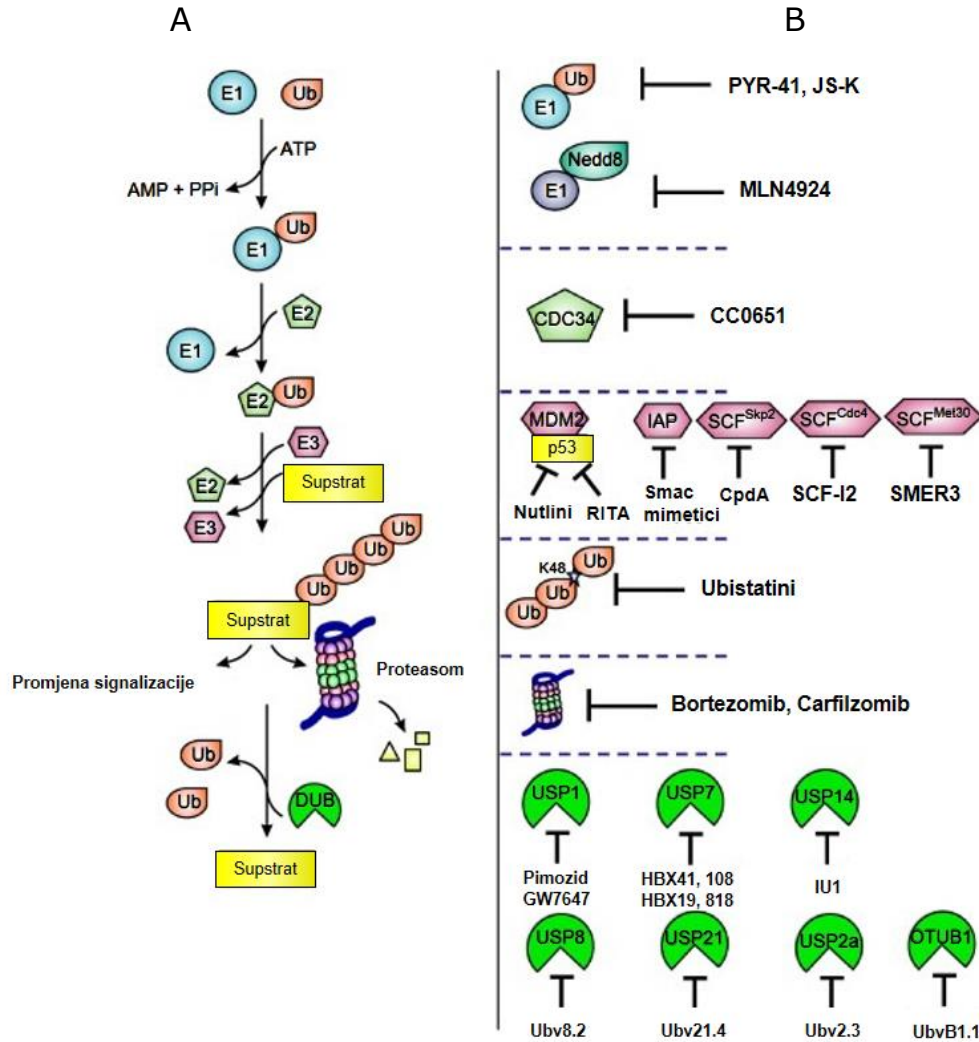
I deubikvitinirajući enzimi utječu na nastanak i razvoj tumora. Deubikvitinirajući enzimi utječu na ekspresiju proteina koji sudjeluju u RAS signalnom putu. Reverzibilna ubikvitinacija RAS GTP-aza povećava njihovu aktivnost. Deubikvitinirajući protein ubikvitin tioesteraza OTUB1 (eng. ovarian tumour domain-containing Ub aldehyde-binding protein 1) je negativni regulator ubikvitinacije RAS proteina. OTUB1 inhibira ubikvitinaciju RAS proteina neovisno o svojoj katalitičkoj aktivnosti. Mutanti sa inaktivnom katalitičkom jedinicom inhibiraju ubikvitinaciju, što pokazuje neovisnost inhibicije o katalitičkoj aktivnosti. OTUB1 inhibira ubikvitinaciju tako da se veže na enzime E2 (na primjer Ubc13 i Ubc H5C). OTUB1 povećava aktivnost RAS proteina i tumorigenezu u RAS stanicama divljeg tipa. Povećanje ekspresije OTUB1 uočeno je u karcinomu pluća ne-malih stanica povezanom s KRAS. Predpostavlja se da deregulacija RAS ubikvitinacije predstavlja alternativni mehanizam aktivacije RAS onkogenog signalnog puta tijekom razvoja karcinoma pluća¹².

1.4 Inhibitori ubikvitinacije kao potencijalni lijekovi

Ubikvitin-proteasom sustav ima važnu ulogu u regulaciji funkcije proteina. Disfunkcija tog sustava je odgovorna za nastanak različitih patoloških stanja u organizmu, kao što su maligne, kardiovaskularne, viralne i neurodegenerativne bolesti⁸. Proučavani su različiti mehanizmi ubikvitinacije i deubikvitinacije kako bi se koristili u terapijske svrhe. To je omogućio napredak proteomske masene spektrometrije. Proteomska masena

spektrometrija je tehnika koja se koristi u istraživanju posttranslacijskih modifikacija. Uz razvoj tehnike, razvijena su i specifična protutijela za ubikvitin i regulatorni enzimi ubikvitina. Identificirani su kao potencijalne mete u razvoju selektivnih terapijskih spojeva¹.

Proteosomalni inhibitori inhibiraju razgradnju (proteolizu) proteina u stanici. Prvi proteosomalni inhibitor je Bortezomib (PS341/Velcade, Millenium Pharmaceuticals). Američka Agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila ga je 2003. godine za terapiju multiplog mijeloma. Bortezomib je prvi klinički uspješan lijek usmjeren na inhibiciju ubikvitin-proteasom sustava. On je reverzibilni inhibitor aktivnosti 20S podjedinice 26S proteasoma. Djeluje selektivno citotoksično na maligno transformirane stanice⁸. Nakon uspješnog razvoja Bortezomiba, sve se više istražuju različiti koraci u ubikvitin-proteasom sustavu koji bi se mogli koristiti kao terapija malignih bolesti, ali i metaboličkih i neurodegenerativnih bolesti⁴ (slika 4).



Slika 4. Inhibitori ubikvitin-proteasom sustava. (A) Koraci u kaskadi ubikvitinacije proteina. (B) Inhibitori koji blokiraju različite korake u mehanizmu ubikvitinacije. (Slika preuzeta iz: Zhang W, Sidhu SS. Development of inhibitors in the ubiquitination cascade. *FEBS Lett* 2014; **588**: 356–367. Prevedeno na hrvatski.)

Tumorski protein p53 je genski produkt tumor-supresorskog gena *TP53*. Transkripcijski faktor p53 može potaknuti apoptozu ili spriječiti rast stanice/starenje stanice (eng. cellular senescence). p53 to čini kao odgovor na oštećenje DNA⁷. Ubikvitinacija regulira mehanizme tumor-supresora i tumor-promotora te njihovih signalnih puteva. Stoga je moguće utjecati na

aktivnost tumor-supresora i tumor-promotora preko mehanizma ubikvitinacije. Razgradnju proteina p53 provodi enzim E3 ligaza MDM2. U normalnim uvjetima u jezgri stanice, deubikvitinirajući enzim veže se na MDM2 i sprječava ubikvitinaciju i razgradnju p53. U stanicama koje nisu u normalnim uvjetima i imaju veliku koncentraciju MDM2, p53 se ubikvitinira i razgrađuje u stanici. To dovodi do većeg broja transformiranih stanica i posljedično nastanka tumora. Protein p53 je poželjan u velikoj koncentraciji u stanici. Stoga se razvijaju inhibitori ubikvitin ligaze MDM2⁷.

Ubikvitin ligaze obično mogu vezati više različitih supstrata. Upravo zato su česta meta u dizajnu lijekova usmjerenih na ubikvitin-proteasom sustav⁴. Istraživanja su pokazala da je *HUWE1*, gen koji kodira HECT E3 ligazu, visoko eksprimiran u karcinomu pluća, dojke i kolorektalnom karcinomu. Mutacijska inaktivacija BRCA1 E3 ligaze povećava predispoziciju za nastanak karcinoma dojke. Također je povećana ekspresija MDM2 ubikvitin ligaze povezana sa nastankom više vrsta tumora⁸. Ovih nekoliko primjera pokazuju da je razvoj inhibitora ubikvitin ligaze kao antitumorskog lijeka rasprostranjen za različite vrste tumora. Neki od poznatih inhibitora E3 ligaza su nutlini (analozi cis-imidazolina) i RITA (eng. Reactivating p53 and Inducing Tumor Apoptosis)⁸ (slika 4).

Signalni put p53-MDM2 uključen je u nastanak više različitih vrsta tumora. Stoga se i drugi koraci u kaskadi reakcija ubikvitinacije istražuju kao potencijalna meta za razvoj inhibitora. Jedan od koraka ubikvitinacijske kaskade za kojeg se razvijaju inhibitori je korak deubikvitinacije. Aktualan deubikvitinirajući enzim za istraživanje je ubikvitin tioesteraza OTUB1. Protein OTUB1 je novootkriveni regulator aktivnosti p53. OTUB1 izravno zaustavlja MDM2 posredovanu ubikvitinaciju p53 u stanicama i *in vitro*¹³. Inhibitori deubikvitinirajućih enzima zaustavljaju deubikvitinaciju proteina p53. Razvoj inhibitora proteina OTUB1 područje je koje se aktivno istražuje. Dobro istraženi inhibitor OTUB1 mogao bi voditi razvoju novih antitumorskih lijekova.

1.5 *In silico* dizajn lijekova i simulacije molekularne dinamike

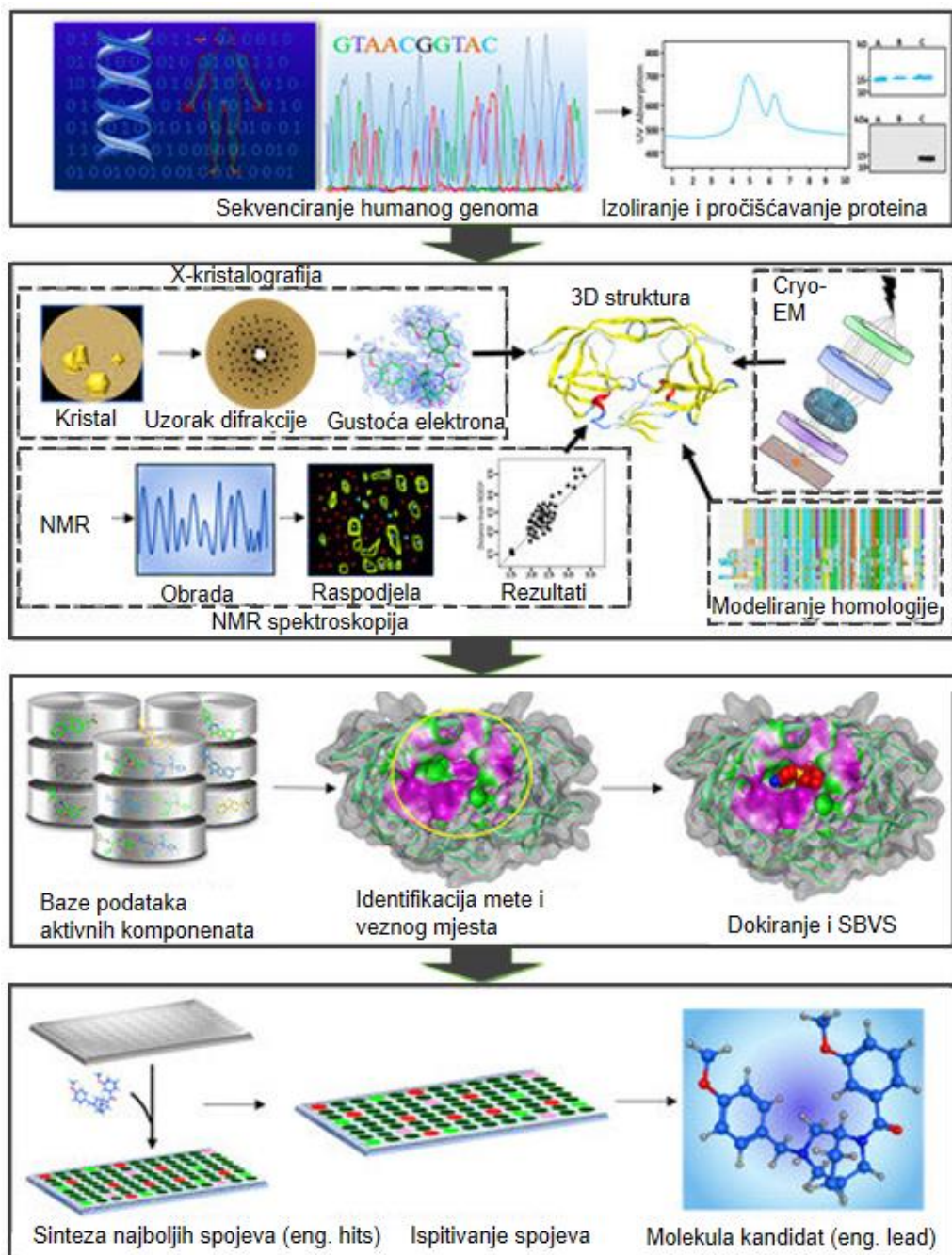
U razvoju lijekova namjenjenih za određenu bolest ili poremećaj važno je da su specifični. Mete (eng. target) su najčešće biološke molekule koje su povezane s bolešću za koju se istražuje lijek. Poželjno je da odabrana meta ima neki korak neophodan da bi funkcionirala. Na primjer, vezanje male molekule na određeno mjesto na proteinu (meti)¹⁴. Specifičnost lijeka poželjna je i na način da lijek djeluje samo na transformirane stanice (kod antitumorskih lijekova) ili samo na dijelove stanica uključene u nastanak i razvoj bolesti. Da bi započeo proces razvoja lijeka, potrebna su znanja o biološkoj aktivnosti molekula meta i kemijskim strukturama molekula lijeka.

Aktivnost bioloških molekula može se predvidjeti pomoću računalnih programa (*in silico*). Kemijske strukture mogu se pronaći u knjižnicama dostupnih spojeva na računalu. Teoretska znanja kemije postavila su osnovu računalnoj kemiji. Dugo se sumnjalo u pouzdanost računalne kemije. Razvojem i usavršavanjem tehnologije, računalna kemija postala je točan i povjerljiv izvor informacija. Računalne metode nisu samo pretpostavke koje računalno postavlja, nego kompleksni izračuni koje ono provodi. Računalna kemija nezaobilazna je i u razvoju novih lijekova. Računalne metode istraživanja koriste se u određenim fazama razvoja lijekova. Glavne prednosti njihovog poznavanja i korištenja u razvoju lijekova su smanjenje vremena i cijene istraživanja¹⁵.

Structure-based drug design (SBDD) je pojam koji označava dizajniranje lijekova prema strukturi mete na koju će lijek djelovati. Razvoj računalne kemije omogućio je razvoj SBDD-a. Pomoću računala može se odrediti struktura i mjesto vezanja na metu. Također se može odrediti i modificirati struktura lijeka koji se dizajnira. Znanja dobivena iz završenog projekta humanog genoma, nova znanja o strukturi molekula, razvoj proteomike i

genomike te informacijskih tehnologija, postavili su SBDD kao temelj istraživanja novih lijekova u budućnosti¹⁴. SBDD koriste farmaceutske kompanije i znanstvenici. Postoje mnogi lijekovi na tržištu koji su nastali upravo ovakvom vrstom dizajna. Neki od njih su amprenavir, inhibitor HIV proteaze i antibiotik norfloksacin¹⁶.

Proces dizajniranja lijekova prema strukturi mete ima više koraka koji zahtjevaju različita znanja i vještine. Geni mete, odnosno biološke molekule (najčešće proteina), se kloniraju. Biološka molekula se ekspresira i pročisti da bude homogena. Tehnikama kristalografije i NMR (eng. Nuclear Magnetic Resonance) odredi se struktura mete. Zatim se pretražuju knjižnice dostupnih spojeva, odnosno računalno odvija probir (eng. screening) molekula kandidata za lijek. Nadalje se određuje mjesto vezanja i provodi vezanje spojeva na biološku molekulu (eng. docking). Taj korak u SBDD-u provodi se na računalima. Obično se koriste naprednija računala, klasteri računala ili superračunala. Oni povećavaju brzinu identifikacije molekule kandidata i njegove evaluacije *in silico*. Spojevi (eng. hits) koji pokazuju najbolje rezultate vezanja *in silico* identificiraju se i testiraju *in vitro*. Ovisno o dobivenim rezultatima tih spojeva, oni se modificiraju i proces se ponavlja sve dok se ne dobije molekula kandidat (eng. lead) željenih svojstava¹⁴¹⁶ (slika 5).



Slika 5. Slikovni prikaz tijeka rada SBDD-a. Potrebno je nekoliko različitih tehnika i metoda da bi se dizajnirao lijek prema strukturi mete. Kratice: Cryo-EM – Cryogenic electron microscopy; SBVS – structure-based virtual screening. (Slika preuzeta iz: Batool M, Ahmad B, Choi S. A structure-based drug discovery paradigm. *Int J Mol Sci* 2019; 20. doi:10.3390/ijms20112783. Prevedeno na hrvatski.)

Molekula kandidat dobivena ovim procesom nije završni proizvod (lijek). Dobivena molekula kandidat mora imati barem mikromolarni afinitet vezanja prema meti. Potrebno je ispitati svojstva molekula kandidata koja ih čine dobrim ili lošim lijekovima (eng. drugability). To su svojstva apsorpcije, distribucije, metabolizma, ekskrecije i toksičnosti, skraćeno ADMET. Neki od njih mogu se pretpostaviti pomoću računalnih programa. ADMET svojstva se ispituju u pretkliničkim istraživanjima. Nakon pretkliničkih, slijede klinička istraživanja. Ako je potrebno, ponavljaju se određene faze cijelog procesa kako bi se lijek poboljšao¹⁶.

Dokiranje je proces vezanja spojeva na biološku molekulu metu koristeći računalo. Prema steričkim i elektrostatskim interakcijama molekule kandidata sa metom računalo određuje koliko je dobro vezanje molekule. Spojevi koji se vežu mogu biti preuzeti iz knjižnice komercijalno dostupnih spojeva ili se mogu *de novo* sintetizirati. *De novo* sintezom mogu se dizajnirati točno određene strukture. Međutim, potrebno je uspješno sintetizirati zamišljeni spoj u laboratoriju. Također je moguće dokiranje provesti samo s određenim funkcionalnim grupama, odnosno fragmentima. Dokiranjem s fragmentima se bolje istražuje vezno mjesto nego dokiranje već određenog spoja¹⁶.

Simulacije molekularne dinamike prikazuju gibanje atoma i molekula u kemijskim sustavima. Gibanje se određuje prema Newtonovim jednadžbama gibanja. Sile i energije gibanja atoma i molekula se računaju po empirijski dobivenim poljima sila (eng. force fields). Razvijeni su računalni programi koji provode simulacije molekularne dinamike. Oni simuliraju biološke (makro)molekule u vodenim otopinama i membranama. GROMACS je često korišten program za računanje molekularne dinamike. Simulacije molekularne dinamike omogućuju izračune procesa u vremenskoj skali nanosekunda. Neki se biološki procesi odvijaju na puno većoj vremenskoj skali. Stoga se takve simulacije provode u prijelazu iz jednog ravnotežnog stanja u drugi¹⁷.

2. Cilj rada

Prethodna istraživanja pokazala su da deubikvitinirajući enzim ubikvitin tioesteraza OTUB1 regulira aktivnost proteina p53¹³. Ubikvitin tioesteraza OTUB1 je negativni regulator ubikvitinacije RAS proteina¹². Zbog uključenosti deubikvitinirajućih enzima u signalni put proteina p53 istražuje se mogućnost inhibicije njihove aktivnosti. Inhibitori deubikvitinirajućih enzima koriste se kao antitumorski lijekovi.

U ovom istraživanju želimo dizajnirati inhibitore deubikvitinirajućeg enzima ubikvitin tioesteraze OTUB1. Želimo pronaći komercijalno dostupne spojeve kandidate. Koristeći *in silico* metode, želimo odrediti mjesto na koje bi se vezao inhibitor da uspješno inhibira protein OTUB1.

Da bismo istražili kako spojevi kandidati inhibiraju protein OTUB1, proveli smo simulacije molekularne dinamike. Svi izračuni provedeni su na superračunalu Bura.

3. Materijali i metode

Kristalna struktura ljudske ubikvitin tioesteraze OTUB1 sa kompleksom ubikvitina preuzeta je sa web stranice Protein Data Bank (PDB kod 4I6L)¹⁸. Koordinate proteina sa varijantom ubikvitina vizualizirane su pomoću UCSF Chimere¹⁹.

Pretraženi su komercijalno dostupni kemijski spojevi koje se mogu vezati na mjesto vezanja ubikvitina na proteinu OTUB1. Virtualni *in silico* probir (eng. HTVS – High throughput virtual screening) je proveden koristeći RxDock, interni program u razvoju. Pretražene su strukture spojeva u Maybridge knjižnici dostupnih kemijskih spojeva²⁰. Od pronađenih 1000 spojeva u prvom

probiru odabrano je četiri spoja kandidata, a u drugom probiru od pronađenih 1000 odabran je jedan spoj kandidat.

Dokiranje (eng. rigid-body-docking) spojeva kandidata provedeno je pomoću plug-in aplikacije Autodock Vina 1.1.2 u UCSF Chimera²¹. Vezno mjesto ubikvitina označeno je kao meta za vezanje spojeva kandidata. Varijanta ubikvitina i molekule vode su uklonjene sa proteina da bi se proučavali inhibitori koji se mogu vezati na mjesto ubikvitina na proteinu.

Parametrizacija spojeva za simulacije biomolekularnih sustava provedena je pomoću CHARMM-GUI web programa²². CHARMM-GUI Ligand Reader & Modeller korišten je za pripremu i modifikaciju liganada. CHARMM-GUI Solution Builder korišten je za simulaciju biološkog sustava u vodenoj otopini. U CHARMM-GUI Ligand Reader & Modeller učitani su pojedinačno dokirani spojevi kandidati s proteinom. Dokirani spojevi su prikazani kao ligandi, te su modificirani neki njihovi atomi po potrebi. Topologija i parametri liganda iz CHARMM-GUI Ligand Reader & Modellera učitani su u CHARMM-GUI Solution Builder. U svim parametrizacijama korištena je jednaka koncentracija otopine KCl 0.15 M. Dodani su ioni kalija (K) i klora (Cl) kako bi neutralizirali otopinu. Izračunat je broj iona ovisno o veličini vodenog sustava (eng. waterbox) u kojoj se otapa protein sa inhibitorom. U svim parametrizacijama udaljenost od ruba proteina do ruba vodene kutije iznosila je 30 Å. Korišten je TIP3 model molekula vode. Temperatura sustava podešena je na 303.15 K, a tlak sustava na 1 bar.

Simulacije molekularne dinamike provedene su koristeći GROMACS verziju 2019.2¹⁷. Da bi se biološki sustav pravilno relaksirao, u simulacijama je postavljen jedan minimizacijski korak i četiri ekvibracijska koraka. Interakcije vezanja kemijskih spojeva i proteina provode se u vremenskom trajanju od 100 nanosekundi (ns), sa vremenskim korakom od 2 femtosekunde (fs), odnosno 35-150 frame-ova koji se mogu vizualizirati u

VMD-u. Svi izračuni su provedeni na Bullx DLC720 superračunalu Bura. Za jedan izračun korišteno je 50-100 čvorova.

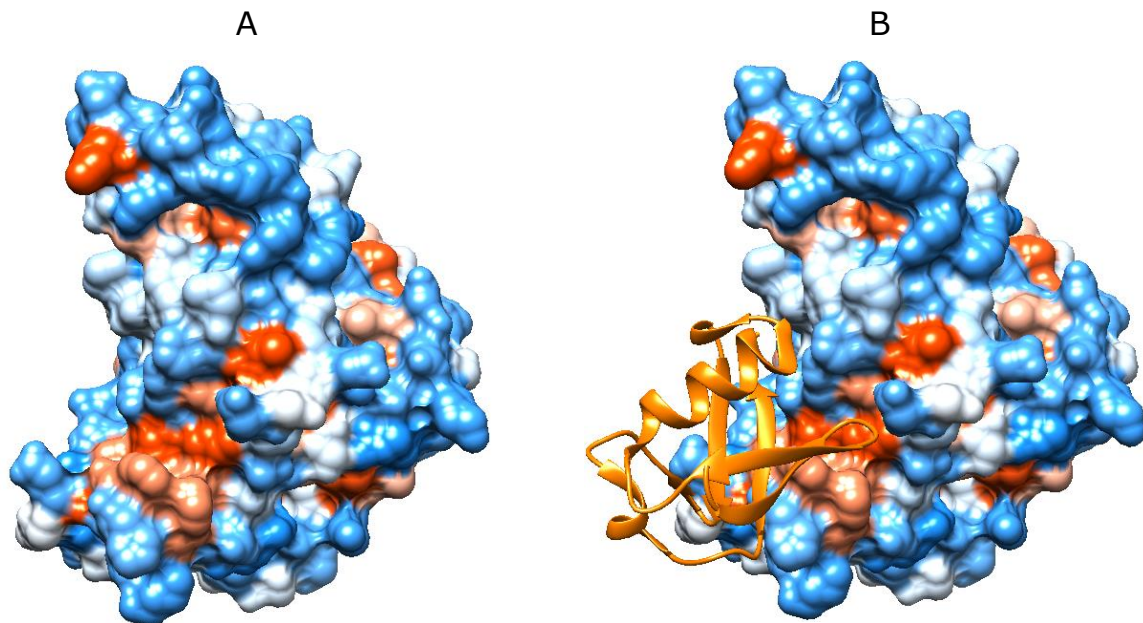
Dobiveni rezultati simulacija molekularne dinamike proteina OTUB1 i spojeva kandidata vizualizirane su koristeći VMD²³.

Strukture kemijskih spojeva prikazane su u programu ChemAxon Marvin²⁴. Predviđeni ADME parametri i fizikalno-kemijska svojstva inhibitora izračunati su koristeći web stranicu SwissADME (swissadme.ch)²⁵.

4. Rezultati

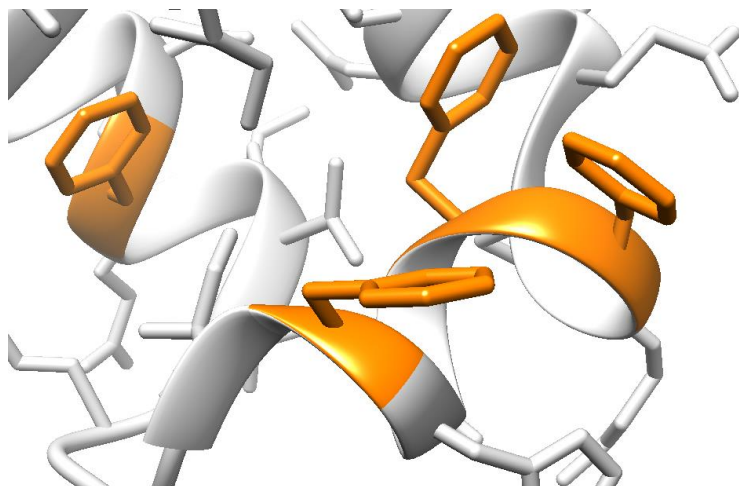
4.1 Vezno mjesto ubikvitina na ubikvitin tioesterazi OTUB1

Protein ubikvitin tioesterazu OTUB1 i varijantu ubikvitina vezanu na njegovu površinu preuzeli smo iz baze podataka Protein Data Bank (PDB). Proučili smo vezno mjesto ubikvitina na proteinu kako bismo pronašli kompetitivni inhibitor ubikvitin tioesteraze (slika 6). Vezno mjesto na proteinu je hidrofobno zbog aminokiselinskih ostataka fenilalanina (slika 7). Bočni lanac fenilalanina (fenil) je aromatski prsten. Inhibitor koji također ima aromatski prsten u svojoj strukturi, mogao bi se vezati na vezno mjesto ubikvitina π - π stacking interakcijama.



Slika 6. Vezno mjesto ubikvitina na OTUB1 proteinu (PDB ID: 4I6L).

(A) Protein OTUB1 je prikazan prema hidrofobnosti površine (hydrophobicity surface): bijela područja su nepolarna (hidrofobna), zelena područja polarna, crvena područja negativno nabijena, a plava područja pozitivno nabijena. (B) Protein OTUB1 je prikazan prema hidrofobnosti površine, a ubikvitin je prikazan kao vrpca (ribbon) narančaste boje.

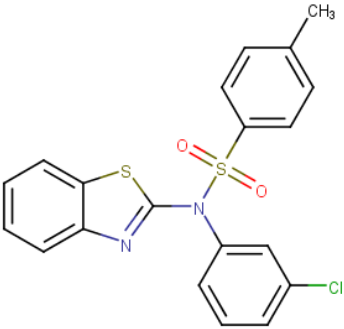
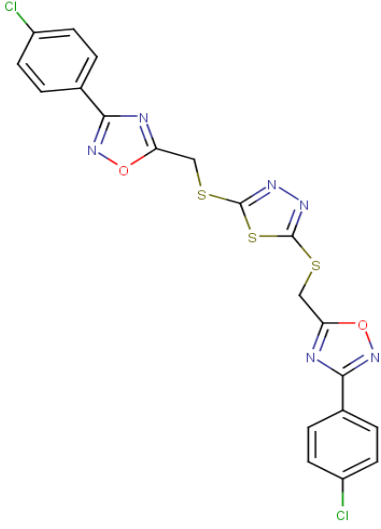


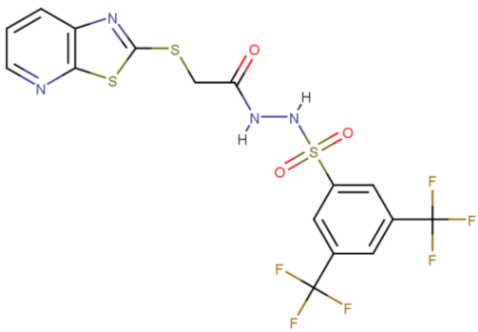
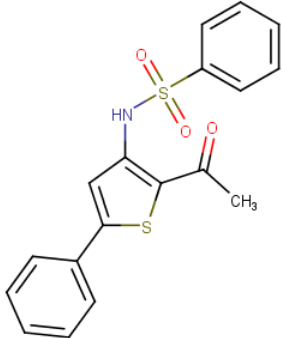
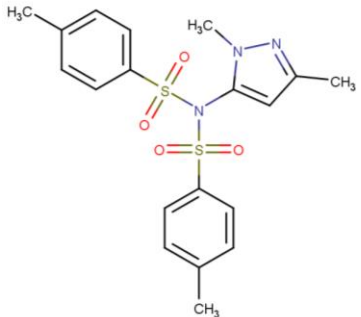
Slika 7. Aminokiselinski ostaci fenilalanina u veznom mjestu na proteinu OTUB1. Fenil je bočna skupina aminokiseline fenilalanin, ovdje prikazana narančastom bojom. Ostatak proteinskog lanca prikazan je kao bijela vrpca.

4.2 Odabir kemijskih spojeva (inhibitora) koji se mogu vezati na vezno mjesto ubikvitina na proteinu OTUB1

Pretražili smo komercijalno dostupne kemijske spojeve koji se mogu vezati na mjesto vezanja ubikvitina na proteinu OTUB1. U prvom probiru od pretraženih tisuću kemijskih spojeva iz Maybridge knjižnice, odabrali smo četiri spoja. U drugom probiru smo od pretraženih tisuću spojeva odabrali jedan spoj. Tih pet spojeva smo odabrali zbog njihove strukture i načina vezanja na protein OTUB1. Zbog aminokiselinskih ostataka fenilalanina i pretpostavke π - π stacking interakcija, svi odabrani spojevi imaju aromatske prstenove. Strukture inhibitora i njihovi kemijski nazivi prikazani su u Tablici 1., a u nastavku rada korišteni su navedeni nazivi u tablici.

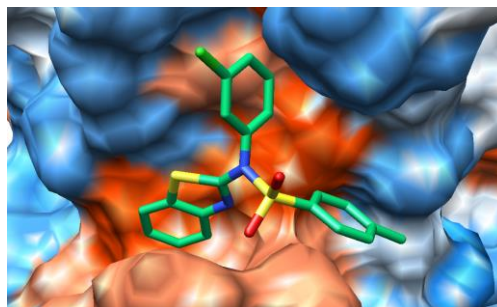
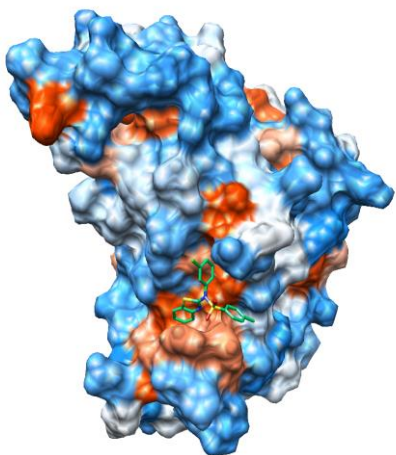
Tablica 1. Inhibitori i njihove strukture, kemijski naziv na engleskom jeziku, Maybridge šifra te naziv koji se koristi u radu. Struktura spojeva prikazana je pomoću programa ChemAxon Marvin. Kemijski naziv spoja na engleskom jeziku pronađen je u bazi podataka kemijskih struktura ChemSpider. Maybridge šifra preuzeta je iz Maybridge knjižnice dostupnih spojeva. Nazivi spojeva korištenih u radu odabrani su tijekom istraživanja zbog lakšeg prepoznavanja.

	Kemijski naziv	N-(1,3-Benzothiazol-2-yl)-N-(3-chlorophenyl)-4-methylbenzenesulfonamide
	Maybridge šifra	MFCD00115769
	Naziv korišten u radu	Inhibitor 7.3
	Kemijski naziv	5,5'-[1,3,4-Thiadiazole-2,5-diylbis(sulfaneyldimethylene)]bis[3-(4-chlorophenyl)-1,2,4-oxadiazole]
	Maybridge šifra	MFCD00119181
	Naziv korišten u radu	Inhibitor 8.1

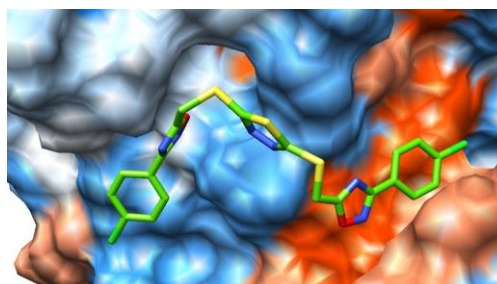
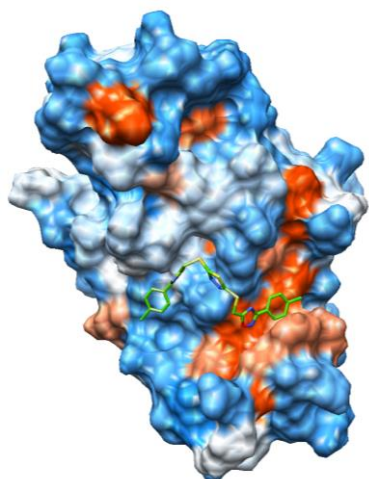
	Kemijski naziv	N'-[2-(pyrido[3,2-d][1,3]thiazol-2-ylthio)acetyl]-3,5-di(trifluoromethyl)benzene-1-sulfonohydrazide
	Maybridge šifra	MFCD00220019
	Naziv korišten u radu	Inhibitor 9.1
	Kemijski naziv	N-(2-Acetyl-5-phenyl-3-thienyl)benzenesulfonamide
	Maybridge šifra	MFCD02089711
	Naziv korišten u radu	Inhibitor 10.1
	Kemijski naziv	N-(1,3-Dimethyl-1H-pyrazol-5-yl)-4-methyl-N-[(4-methylphenyl)sulfonyl]benzenesulfonamide
	Maybridge šifra	MFCD01312729
	Naziv korišten u radu	Inhibitor 248

Proveli smo dokiranje (eng. rigid-body docking) spojeva kandidata koristeći Autodock Vina plug in aplikaciju u UCSF Chimeri. Pokazano je da se svi inhibitori se vežu na protein, ali na različit način (slika 8). S obzirom na aromatske prstene u svojoj strukturi, inhibitori 8.1, 9.1 i 10.1 su cilindrične strukture, a inhibitori 7.3 i 248 trigonalne strukture. Aromatski prsteni inhibitora većinom su orijentirani prema aromatskim prstenima aminokiselinskih ostataka fenilalanina u veznom mjestu na proteinu, što upućuje na predpostavljene π - π stacking interakcije.

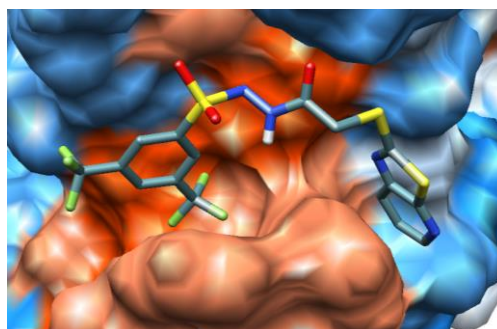
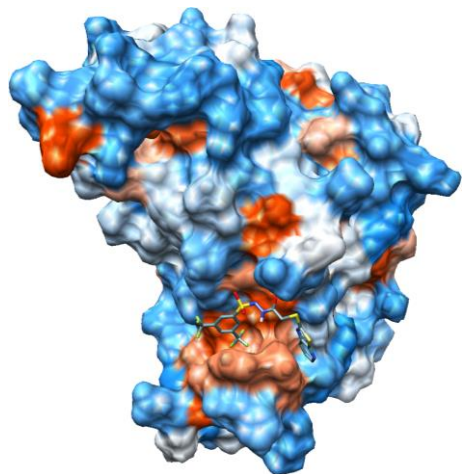
Inhibitor 7.3



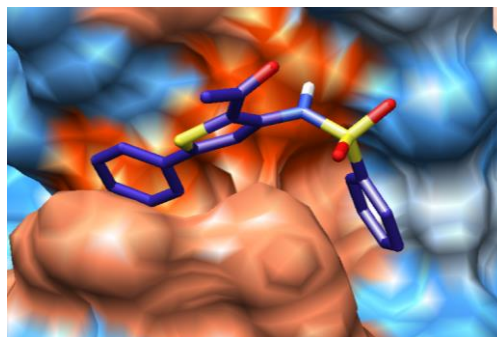
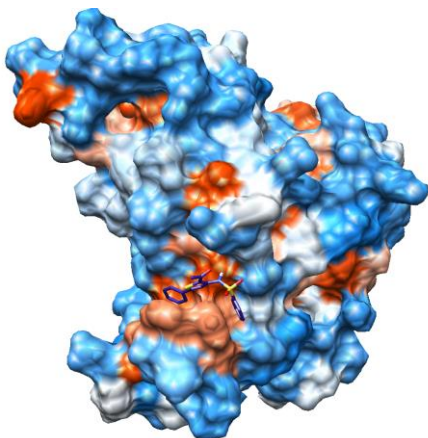
Inhibitor 8.1



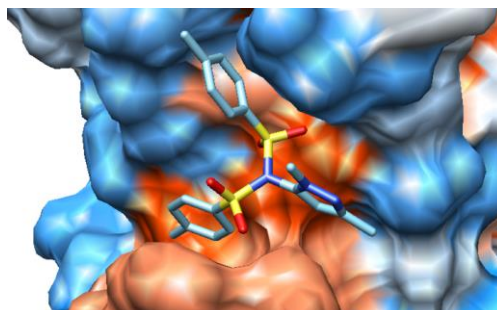
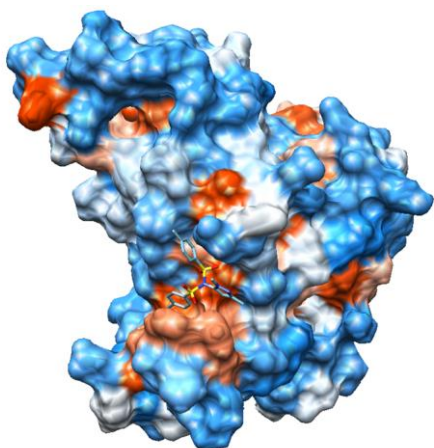
Inhibitor 9.1



Inhibitor 10.1

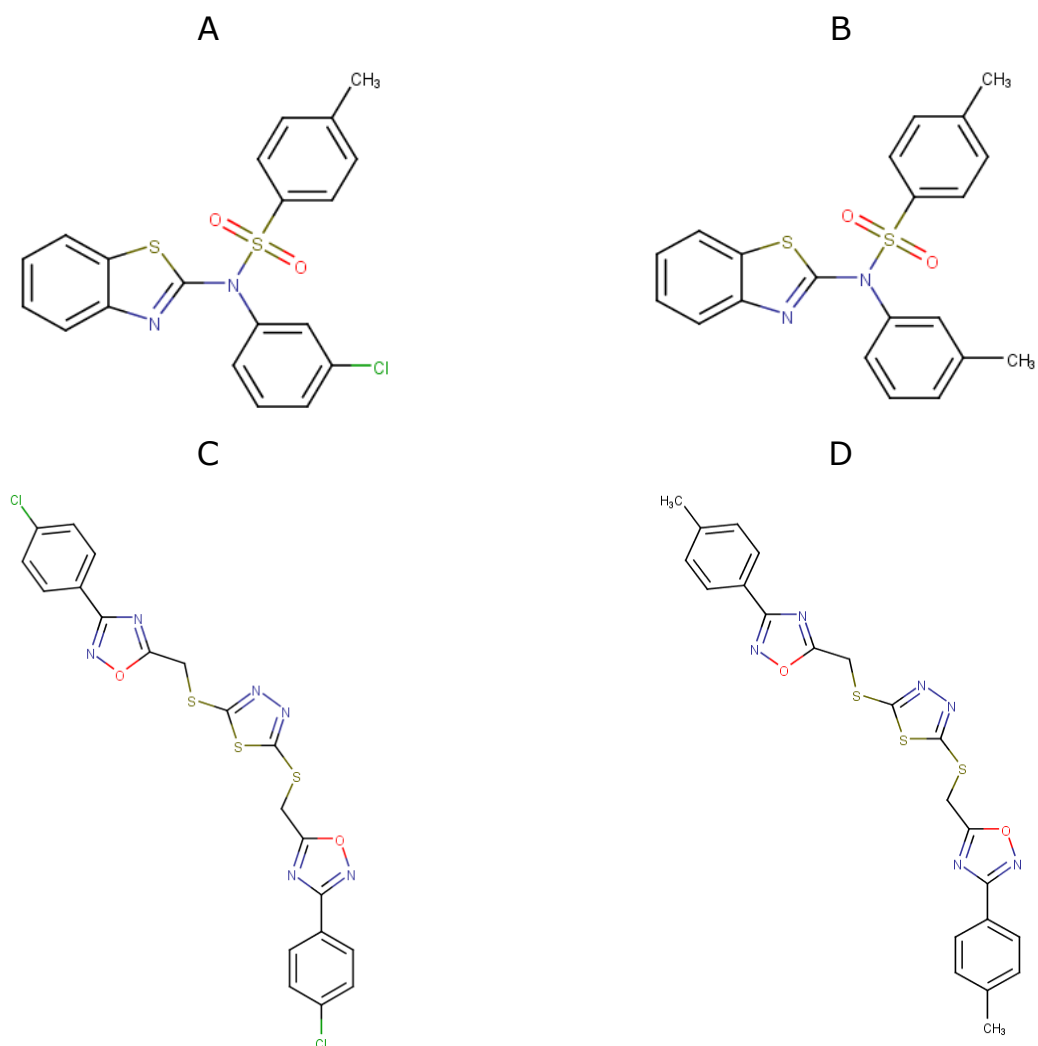


Inhibitor 248



Slika 8. Dokiranje inhibitora na vezno mjesto ubikvitina na proteinu OTUB1. Protein OTUB1 je prikazan prema hidrofobnosti površine (hydrophobicity surface). Inhibitori su prikazani prema vrsti atoma. Vežanje spojeva prikazano je pomoću UCSF Chimere. Lijeva slika prikazuje inhibitor dokiran (vezan) u vezno mjesto ubikvitina na proteinu. Desna slika je povećani prikaz tog vežanja.

Parametrizirali smo svaki od inhibitora pojedinačno. Parametrizaciju smo proveli kako bismo pripremili inhibitore za simulacije molekularne dinamike. Tijekom parametrizacije u CHARMM-GUI Ligand Reader & Modelleru modificirali smo strukture inhibitora 7.3 i 8.1. Zbog nemogućnosti učitavanja atoma klora (Cl) u strukturama inhibitora 7.3 i inhibitora 8.1, klor smo zamijenili metilnom skupinom (-CH₃) (slika 9). Izmijenjene strukture smo koristili dalje u simulacijama molekularne dinamike na superračunalu. Zbog slične veličine metilne skupine i klora, pretpostavili smo sličnost gibanja u simulacijama i vezanja na protein. Izmijenjene strukture nismo pronašli u knjižnici kemijskih spojeva Maybridge niti na ChemSpider-u.



Slika 9. Modifikacije struktura inhibitora 7.3 i 8.1. Strukture svih spojeva prikazane su u programu ChemAxon Marvin. (A) Struktura inhibitora 7.3 pronađenog u Maybridge knjižnici spojeva. Inhibitor 7.3 ima atom klor na trećoj poziciji u klorofenilnom prstenu. (B) Modificirana struktura inhibitora 7.3*. Inhibitor 7.3* umjesto klor na trećoj poziciji klorofenilne skupine, ima metilnu skupinu na trećoj poziciji metilfenilnog prstena. (C) Struktura inhibitora 8.1 pronađenog u Maybridge knjižnici spojeva. Inhibitor 8.1 ima dva klorofenilna prstena, kojima je atom klor na četvrtoj poziciji. (D) Modificirana struktura inhibitora 8.1*. Inhibitor 8.1* umjesto dvije klorofenilne skupine ima dvije metilfenilne skupine. Metilne skupine su na metilfenilnim prstenu na četvrtoj poziciji.

4.3 Simulacije molekularne dinamike prikazuju vezanje inhibitora na protein OTUB1

Simulacijama molekularne dinamike ispitali smo koliko su stabilne interakcije između inhibitora i proteina za svaki pojedini inhibitor. Sve simulacije smo proveli koristeći GROMACS na superračunalu. Simulacije molekularne dinamike prikazali smo koristeći VMD.

Sve provedene simulacije molekularne dinamike su simulacije sustava svih atoma (eng. all atom). Tako je prikazano gibanje cijelog sustava u vodenoj otopini. Da bi jasnije prikazali vezanje inhibitora na protein, u rezultatima smo prikazali samo gibanje proteina i inhibitora, za svaki inhibitor pojedinačno (slike 10, 12, 14, 16 i 19).

Gibanje molekula sastoji se od više različitih vrsta gibanja: rotacijsko, translacijsko i vibracijsko gibanje te savijanje molekula. Smanjenje efekta rotacijskog i translacijskog gibanja olakšava analizu gibanja. Zato smo protein centrirali (eng. align) u VMD-u i tako u prikazu gibanja smanjili efekt rotacijskog i translacijskog gibanja. Frame-ovi prikaza se poravnavaju s referentnim frame-om, odnosno s nultim frame-om.

RMSD (eng. Root Mean Square Deviation) je statistička mjera koja se računa:

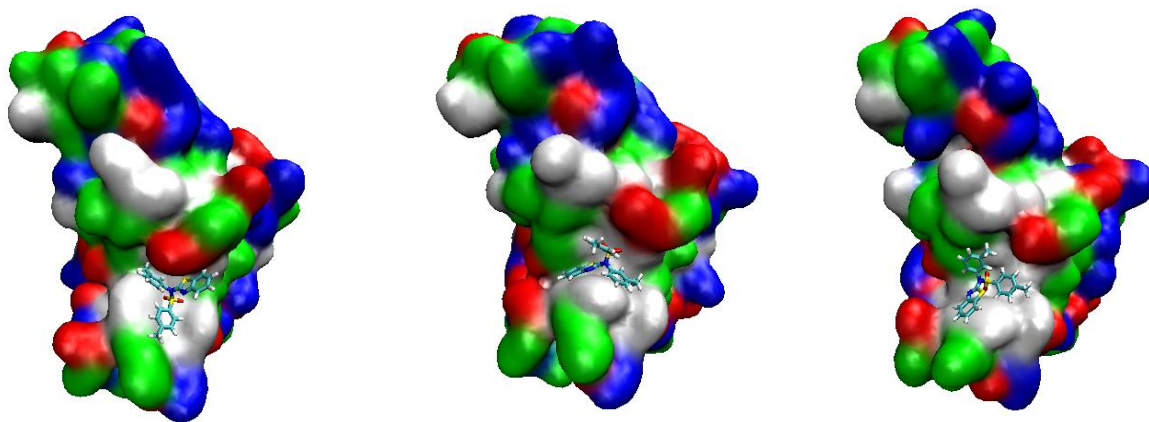
$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

gdje je δ_i udaljenost između atoma i inhibitora i proteina, a N broj ekvivalentnih atoma. RMSD vrijednosti u simulacijama molekularne dinamike prikazuju prosječnu udaljenost između atoma. U RMSD dijagramu RMSD vrijednosti su u ovisnosti o frame-ovima. Frame-ovi su vremenski koraci simulacije u nanosekundama.

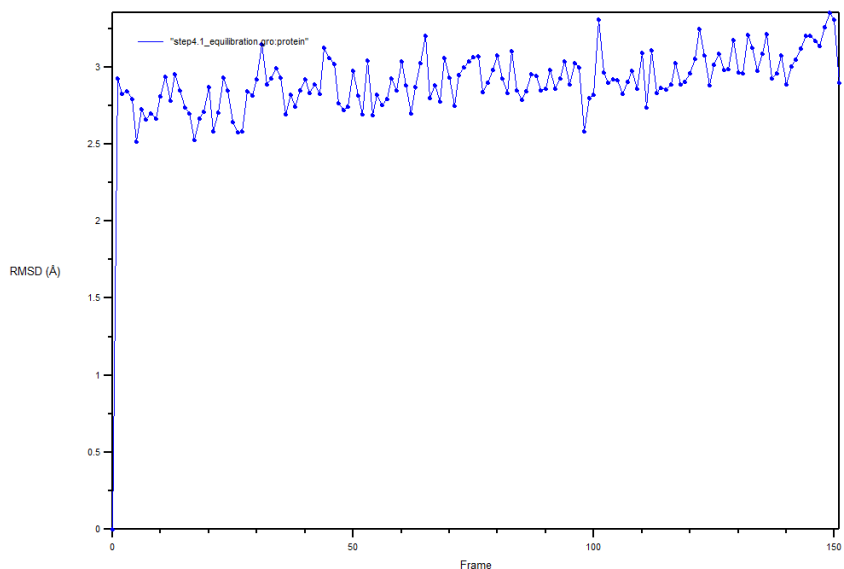
Oscilacije na RMSD dijagramu označavaju gibanje liganda, odnosno prikazuju kako ligand izlazi iz veznog mjesta. Ravne linije na dijagramu prikazuju ostanak liganda u proteinu. RMSD dijagrami prikazuju izračune mobilnosti struktura biomolekula u sustavu i stabilnost simuliranog sustava. (slike 11, 13, 15, 17 i 20).

Inhibitor 7.3*

Inhibitor 7.3* je trigonalno simetrične strukture s obzirom na aromatske prstene. Aromatski prsteni u njegovoj strukturi se na vezno mjesto ubikvitina na proteinu vežu u tri smjera. U simulaciji molekularne dinamike, inhibitor 7.3* ostaje vezan na proteinu OTUB1 u 100 nanosekundi simulacije (slika 10).



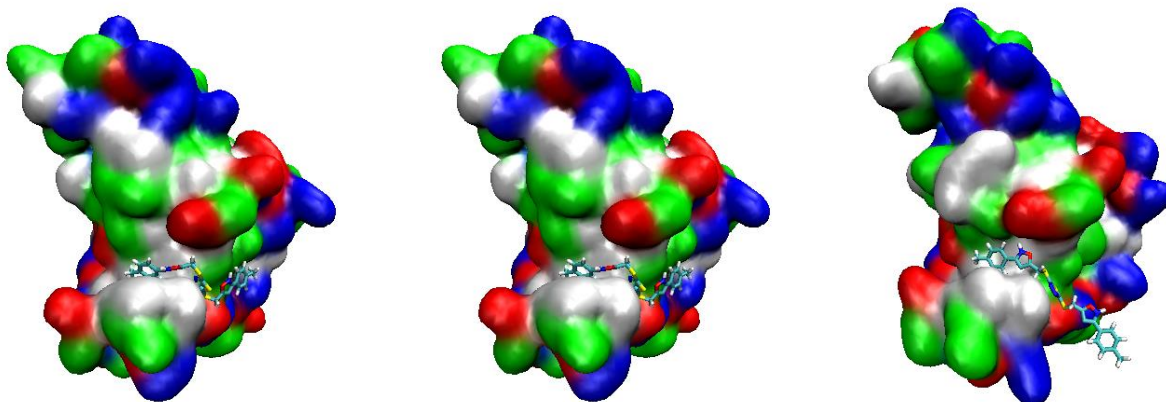
Slika 10. Inhibitor 7.3* ostaje vezan na protein OTUB1 nakon 100 nanosekundi simulacije molekularne dinamike. Površina proteina prikazana je prema gustoći atoma (eng. QuickSurf), a obojan je prema vrsti aminokiselinskih ostataka (ResType). Atomi inhibitora su prikazani kao sfere, a veze između atoma kao cilindri (Licorice). Inhibitori su obojani prema vrsti atoma: klor zelena, sumpor žuta, kisik crvena, dušik plava.



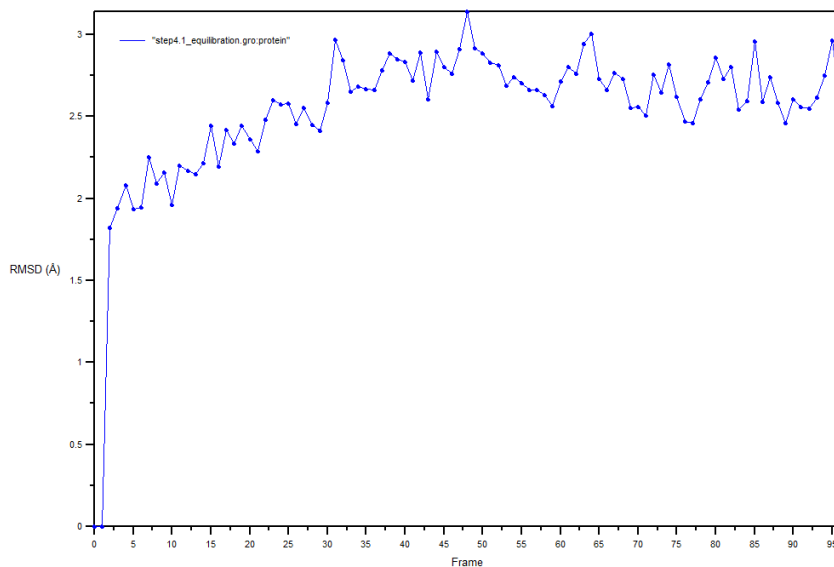
Slika 11. RMSD dijagram za inhibitor 7.3* nakon 100 nanosekundi simulacije molekularne dinamike. Na y-osi prikazane su RMSD vrijednosti, a na x-osi su prikazani frame-ovi.

Inhibitor 8.1*

Inhibitor 8.1* ima cilindričnu strukturu s obzirom na aromatske prstene. U vezno mjesto ubikvitina na proteinu se veže jednim dijelom strukture, sa dva aromatska prstena. U simulaciji molekularne dinamike inhibitor 8.1* ostaje vezan na proteinu OTUB1 u 100 nanosekundi simulacije (slika 12).



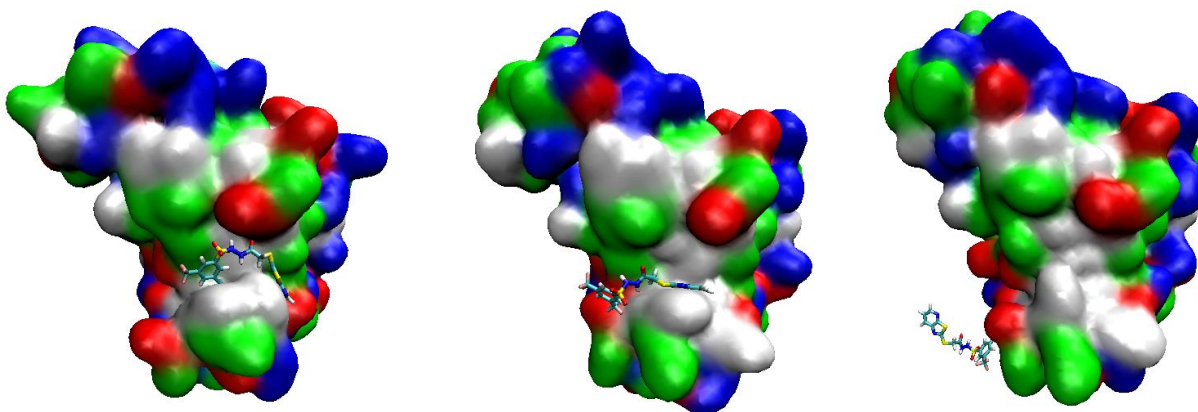
Slika 12. Inhibitor 8.1* ostaje vezan na protein OTUB1 nakon 100 nanosekundi simulacije molekularne dinamike. Površina proteina prikazana je prema gustoći atoma (eng. QuickSurf), a obojan je prema vrsti aminokiselinskih ostataka (ResType). Atomi inhibitora su prikazani kao sfere, a veze između atoma kao cilindri (Licorice). Inhibitori su obojani prema vrsti atoma: klor zelena, sumpor žuta, kisik crvena, dušik plava.



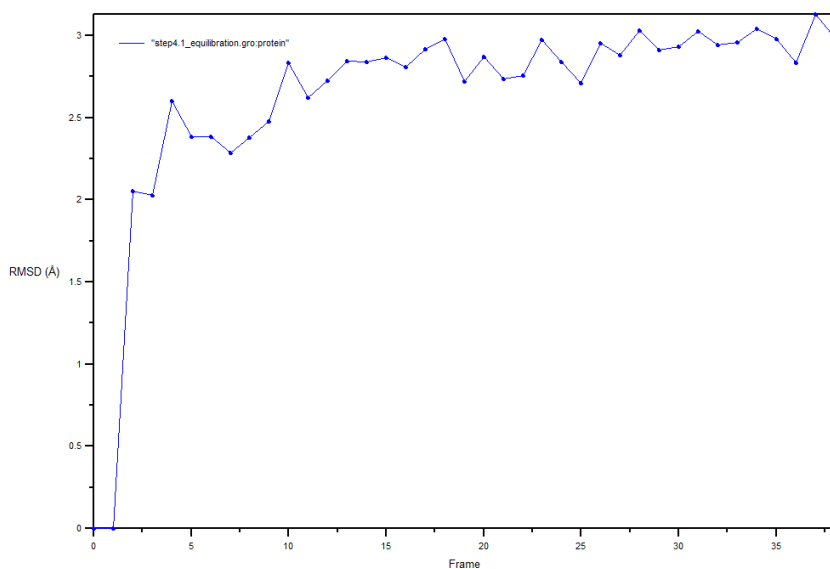
Slika 13. RMSD dijagram za inhibitor 8.1* nakon 100 nanosekundi simulacije molekularne dinamike. Na y-osi prikazane su RMSD vrijednosti, a na x-osi su prikazani frame-ovi.

Inhibitor 9.1

Inhibitor 9.1 ima cilindričnu strukturu s obzirom na aromatske prstene. Dvije aromatske strukture inhibitora su okrenute prema aminokiselinskim ostacima fenilalanina u veznom mjestu ubikvitina na proteinu. U simulaciji molekularne dinamike, inhibitor 9.1 disocira brzo nakon vezanja na protein (slika 14).



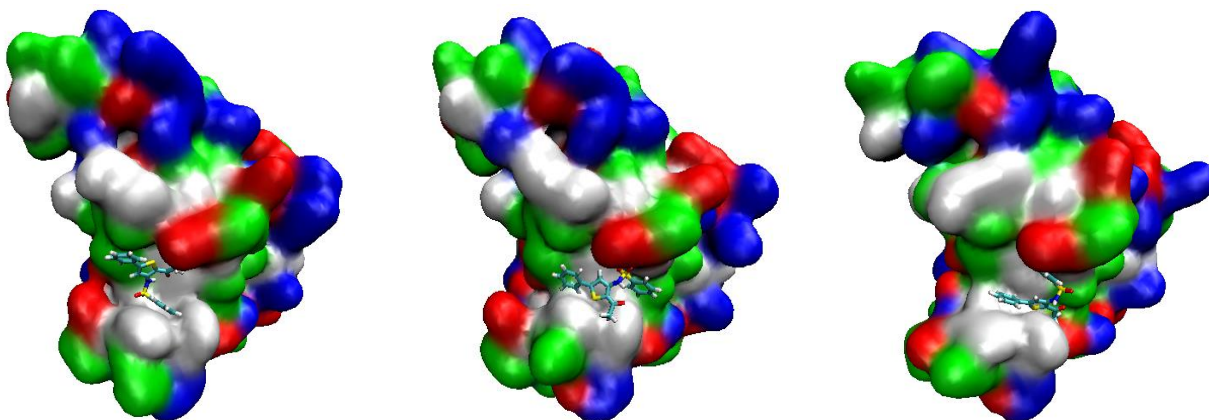
Slika 14. Inhibitor 9.1 nema stabilnih interakcija s proteinom OTUB1 u 100 nanosekundi simulacije molekularne dinamike. Površina proteina prikazana je prema gustoći atoma (eng. QuickSurf), a obojan je prema vrsti aminokiselinskih ostataka (ResType). Atomi inhibitora su prikazani kao sfere, a veze između atoma kao cilindri (Licorice). Inhibitori su obojani prema vrsti atoma: klor zelena, sumpor žuta, kisik crvena, dušik plava.



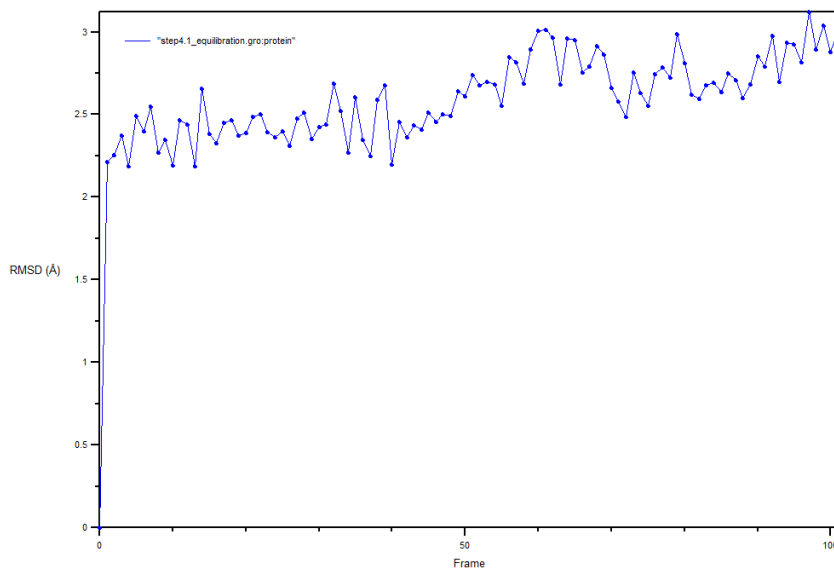
Slika 15. RMSD dijagram za inhibitor 9.1 nakon 100 nanosekundi simulacije molekularne dinamike. Na y-osi prikazane su RMSD vrijednosti, a na x-osi su prikazani frame-ovi.

Inhibitor 10.1

Inhibitor 10.1 ima cilindričnu strukturu s obzirom na aromatske prstene. Međutim, zbog acetilne skupine u strukturi inhibitora 10.1, njegovo vezanje nalikuje trigonalno simetričnom. U simulaciji molekularne dinamike inhibitor 10.1 ostaje vezan na proteinu OTUB1 u 100 nanosekundi simulacije (slika 16).



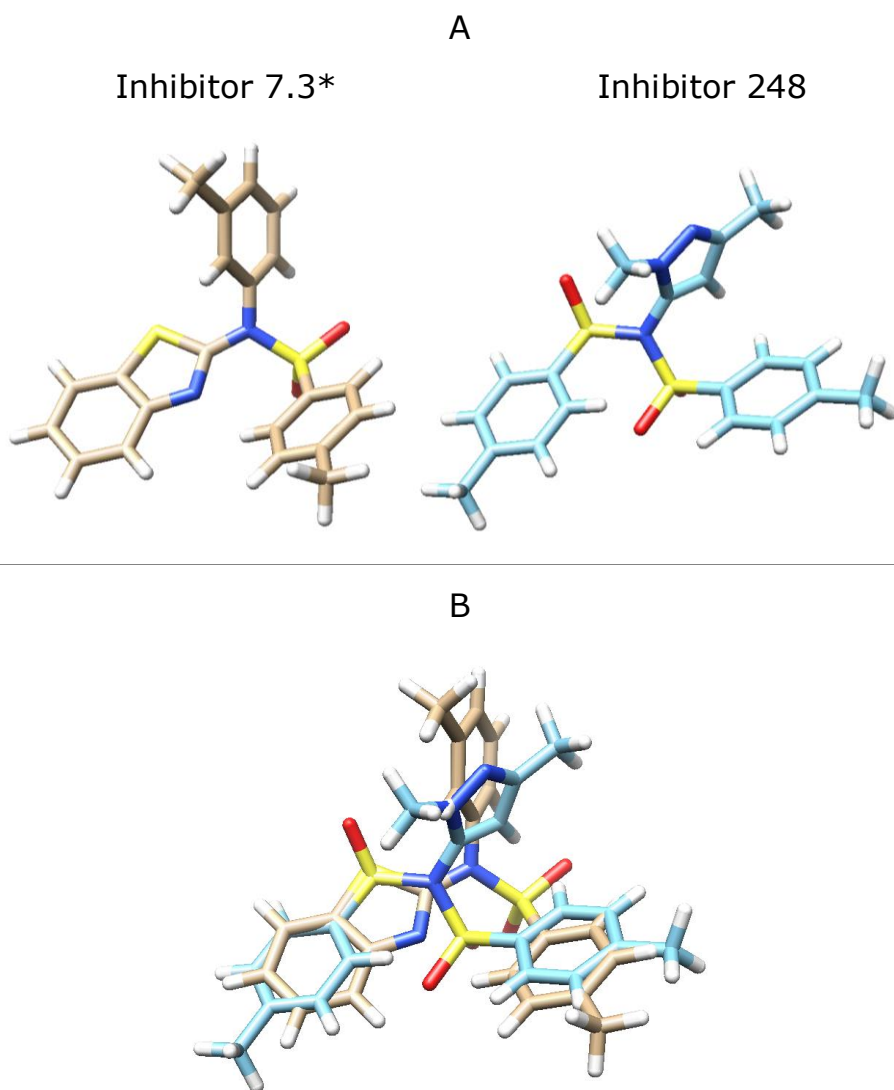
Slika 16. Inhibitor 10.1 ostaje vezan na protein OTUB1 nakon 100 nanosekundi simulacije molekularne dinamike. Površina proteina prikazana je prema gustoći atoma (eng. QuickSurf), a obojan je prema vrsti aminokiselinskih ostataka (ResType). Atomi inhibitora su prikazani kao sfere, a veze između atoma kao cilindri (Licorice). Inhibitori su obojani prema vrsti atoma: klor zelena, sumpor žuta, kisik crvena, dušik plava.



Slika 17. RMSD dijagram za inhibitor 10.1 nakon 100 nanosekundi simulacije molekularne dinamike. Na y-osi prikazane su RMSD vrijednosti, a na x-osi su prikazani frame-ovi.

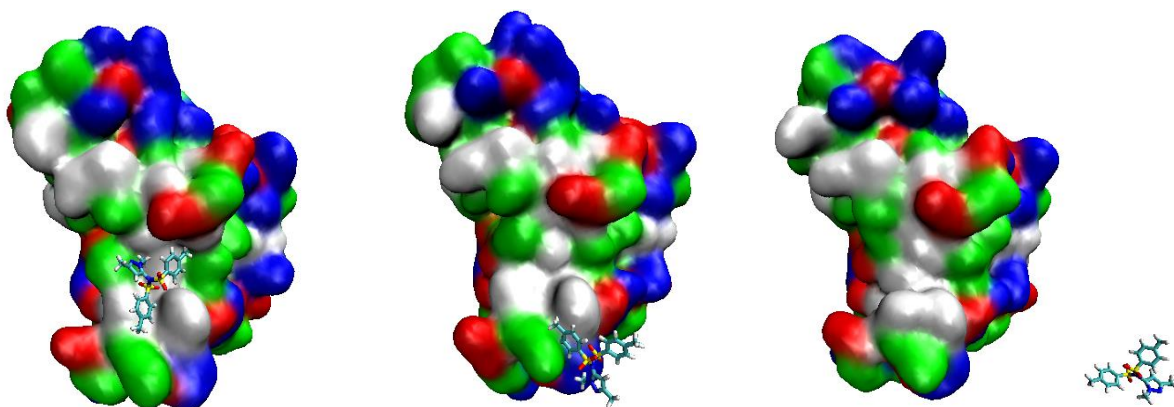
Inhibitor 248

Inhibitor 7.3* je zbog svoje trigonalne strukture u simulacijama molekularne dinamike pokazao dobro vezanje na protein. U drugom probiru pretražili smo spojeve slične strukture kao inhibitor 7.3*. Pronašli smo inhibitor 248, strukturno sličan inhibitoru 7.3* (slika 18).

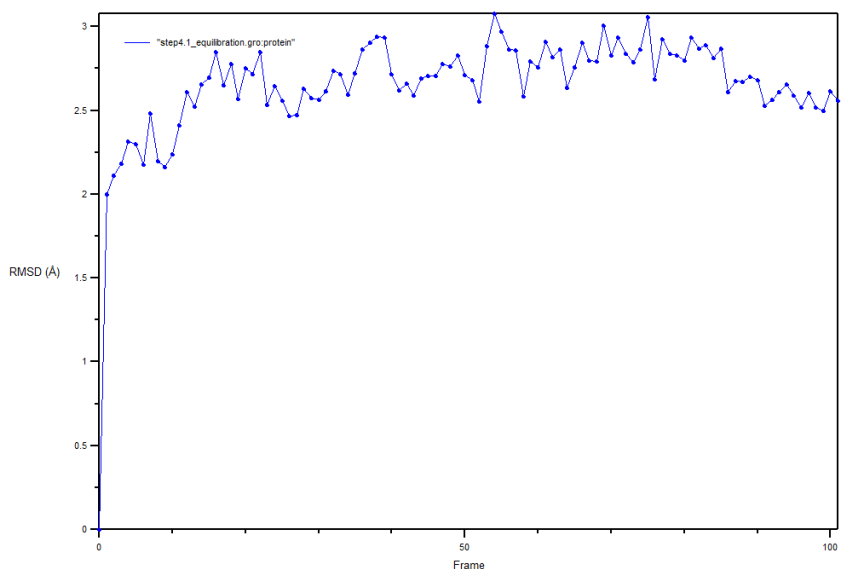


Slika 18. Inhibitori 7.3* i 248 imaju sličnu strukturu. (A) Strukture inhibitora 7.3* i 248. (B) Aromatski prsteni oba inhibitora se preklapaju. 3D preklapanje (eng. 3D alignment) provedeno je u programu MarvinSketch i Chimera.

Inhibitor 248 je trigonalne strukture s obzirom na aromatske prstene. Aromatski prsteni u njegovoj strukturi se na vezno mjesto ubikvitina na proteinu vežu u tri smjera. U simulaciji molekularne dinamike inhibitor 248 stvara stabilne interakcije s proteinom OTUB1, ali nakon nekog vremena disocira sa veznog mjesta ubikvitina na proteinu (slika 19).



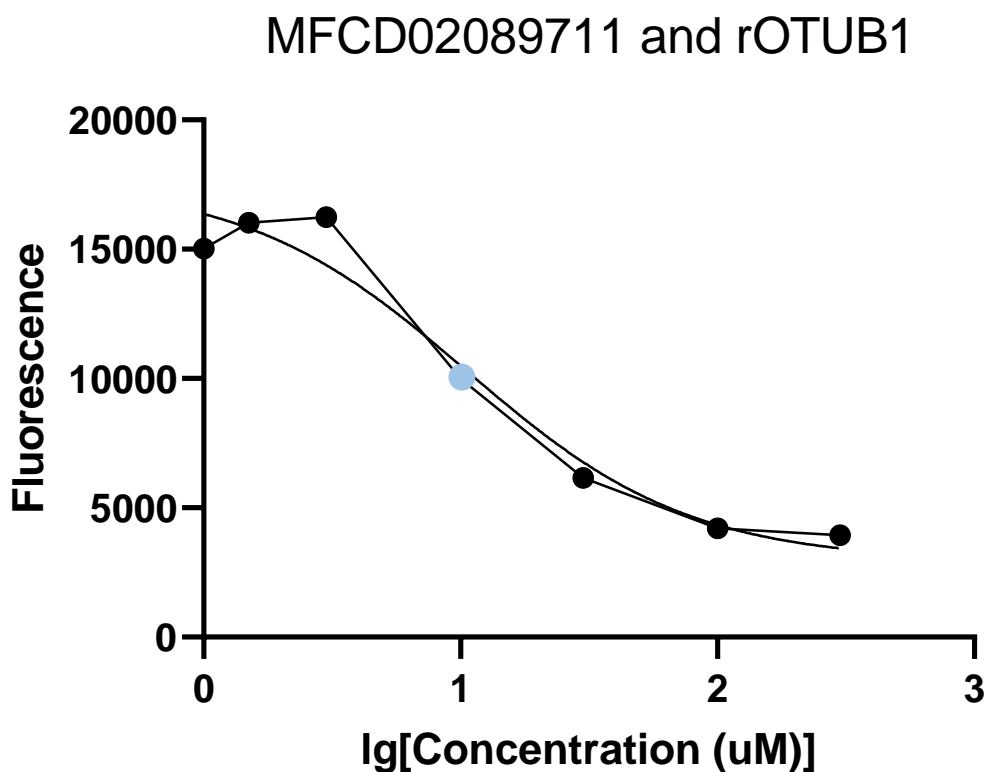
Slika 19. Inhibitor 248 disocira sa proteina OTUB1 u 100 nanosekundi simulacije molekularne dinamike. Površina proteina prikazana je prema gustoći atoma (eng. QuickSurf), a obojan je prema vrsti aminokiselinskih ostataka (ResType). Atomi inhibitora su prikazani kao sfere, a veze između atoma kao cilindri (Licorice). Inhibitori su obojani prema vrsti atoma: klor zelena, sumpor žuta, kisik crvena, dušik plava.



Slika 20. RMSD dijagram za inhibitor 248 nakon 100 nanosekundi simulacije molekularne dinamike. Na y-osi prikazane su RMSD vrijednosti, a na x-osi su prikazani frame-ovi.

4.4 Analiza inhibicije proteina OTUB1 *in vitro*

Četiri spoja pronađena u prvom probiru (inhibitori 7.3, 8.1, 9.1 i 10.1) testirani su *in vitro*. Od četiri ispitana spoja, jedan je inhibirao protein OTUB1. Inhibitor 10.1 inhibirao je protein OTUB1. Pola maksimalne inhibitorne koncentracije (IC₅₀) za tu inhibiciju iznosi 10.59 μM. Povećanje koncentracije inhibitora 10.1 smanjuje fluorescenciju proteina OTUB1, odnosno inhibitor 10.1 inhibira protein OTUB1 (slika 21).



Slika 21. Inhibitor 10.1 (Maybridge šifra: MFCD02089711) inhibira protein OTUB1. Grafički prikaz inhibicije proteina OTUB1. Inhibicija je prikazana kao ovisnost fluorescencije proteina OTUB1 o logaritamskoj koncentraciji inhibitora izraženoj u mikromolima μM (M=mol/L). Logaritamska vrijednost IC₅₀ (LogIC₅₀) iznosi 1.025, odnosno IC₅₀ vrijednost 10.59 μM. Logaritamska vrijednost IC₅₀ označena je plavom točkom.

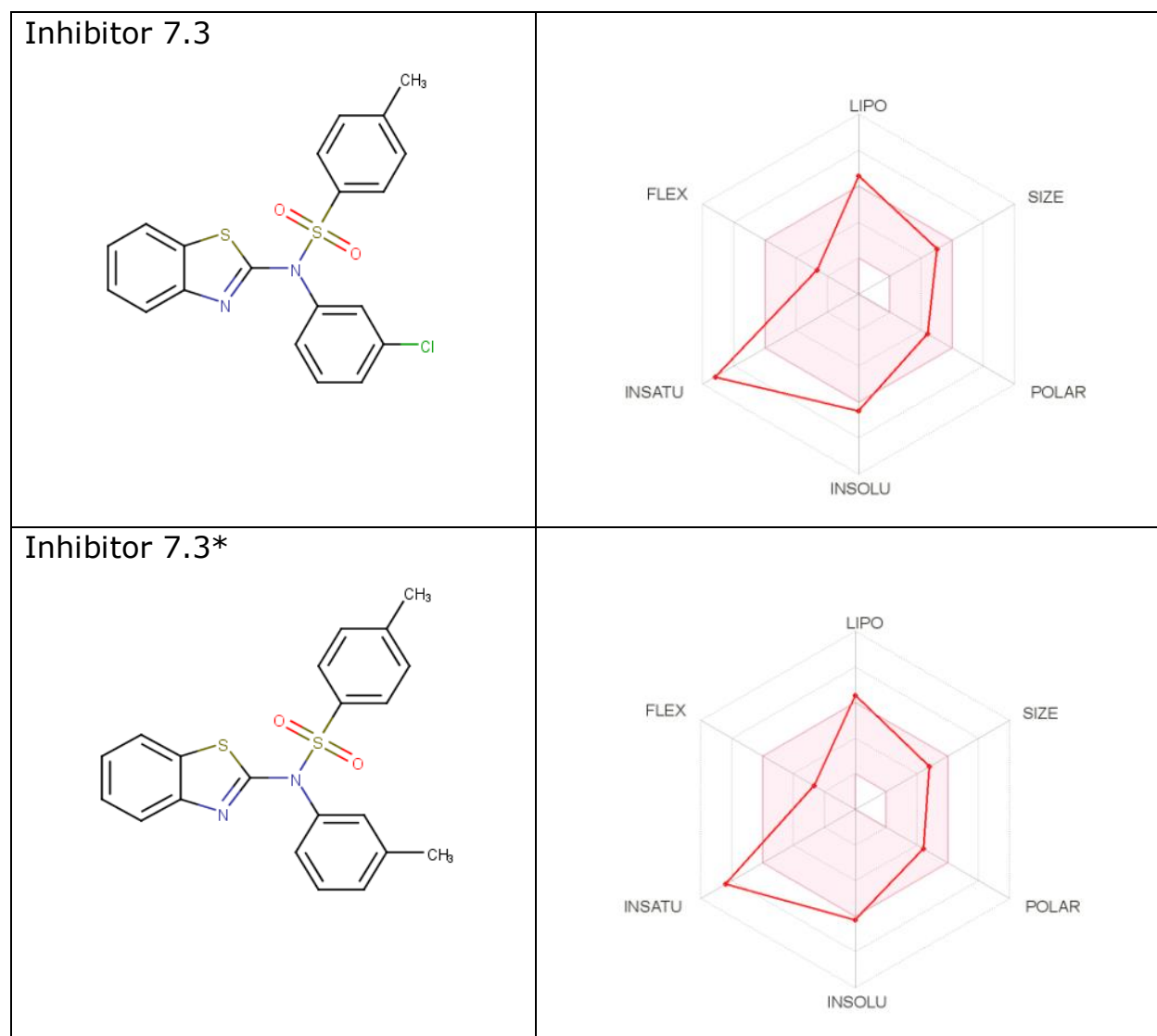
Prikazani rezultati dobiveni su ljubaznošću profesorice Anne Sabline i neobjavljenog rada njezinog laboratorija VIB Center for Cancer Biology, Department of Oncology, University of Leuven u Belgiji.

4.5 ADME (Apsorpcija, Distribucija, Metabolizam i Ekskrecija) svojstva inhibitora

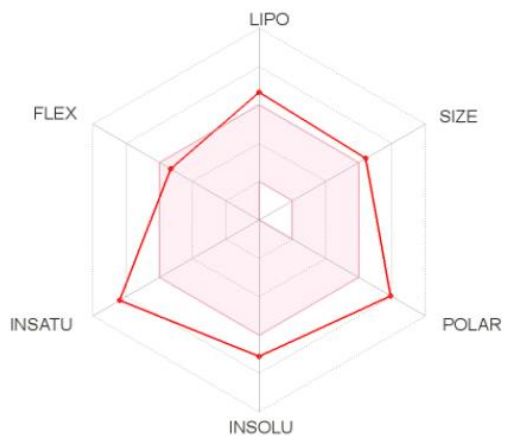
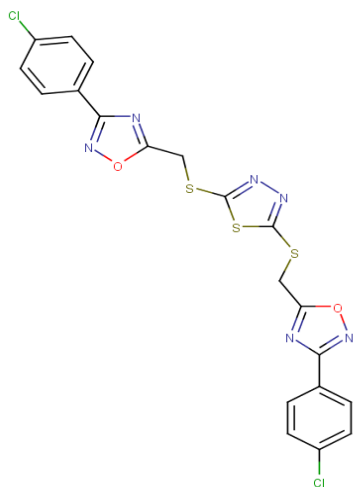
Svojstva apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije (ADME svojstva) inhibitora izračunali smo pomoću web stranice SwissADME. SwissADME za unesenu molekulu izračuna fizikalno-kemijska svojstva, lipofilnost, topljivost u vodi, farmakokinetička svojstva, svojstva molekule da bude dobar lijek (eng. druglikeness) i parametre medicinske kemije. Sažet prikaz tih svojstava prikazan je u radaru biorasploživosti.

Radar biorasploživosti prikazan je kao šesterokut kojemu su točke svojstva lipofilnosti, veličine molekule, polarnosti, topljivosti, zasićenosti i fleksibilnosti. Svaki od tih svojstava izračunat je u rasponima, a šesterokut ružičaste boje obuhvaća granične vrijednosti. Molekula za koju se računaju svojstva prikazana je crvenom linijom. Ako je molekula (crvena linija) unutar radara biorasploživosti (ružičastog okvira), onda je u okviru Lipinski pravila potencijalno dobar lijek. ADME svojstva za inhibitore prikazana su u Tablici 2.

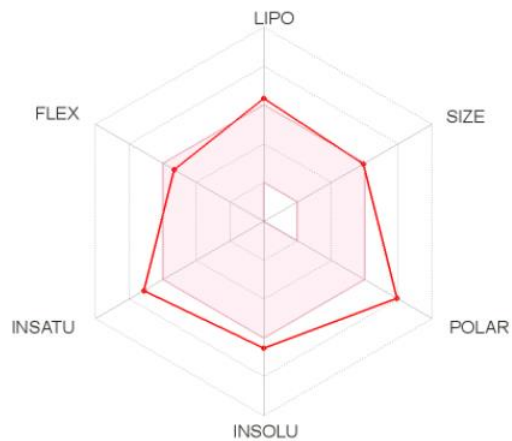
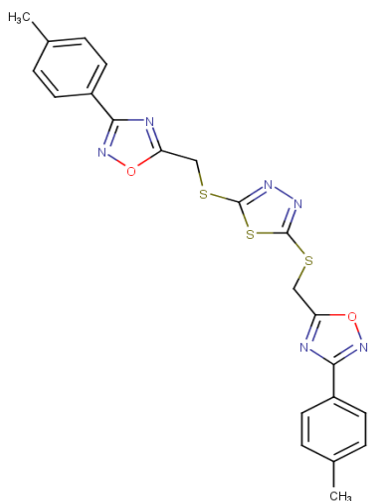
Tablica 2. Prikaz ADME svojstava inhibitora. Lijevi stupac prikazuje ime inhibitora i njegovu strukturu. Desni stupac prikazuje ADME svojstva pojedinog inhibitora. Ružičasto obojana zona šesterokuta prikazuje optimalne vrijednosti svojstava lijekova prema Lipinski pravilima. Crvena linija prikazuje vrijednosti za svaki pojedini inhibitor. Kratice: LIPO lipofilnost, SIZE veličina molekule, POLAR polarnost, INSOLU topljivost, INSATU zasićenost i FLEX fleksibilnost.



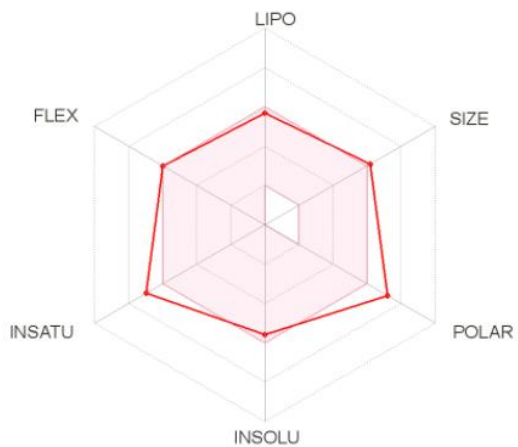
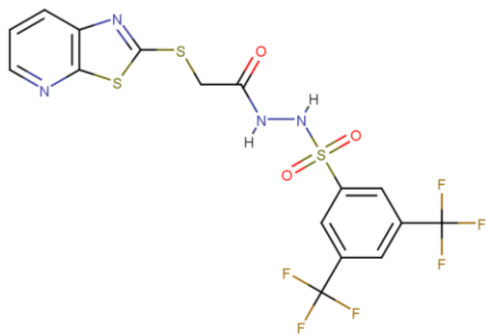
Inhibitor 8.1



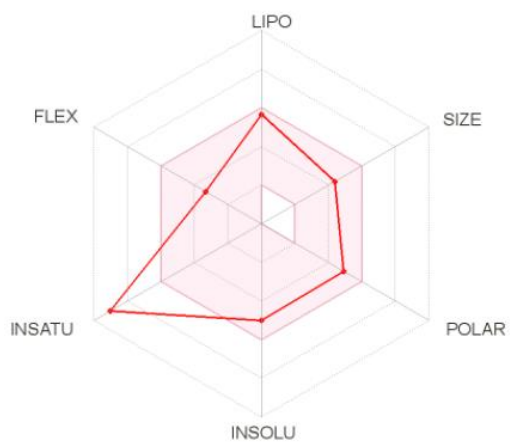
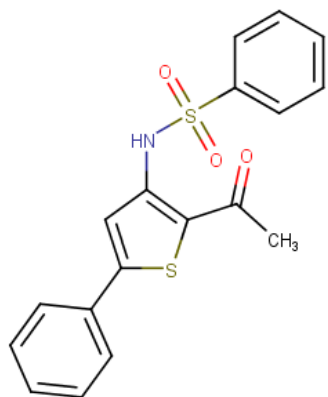
Inhibitor 8.1*



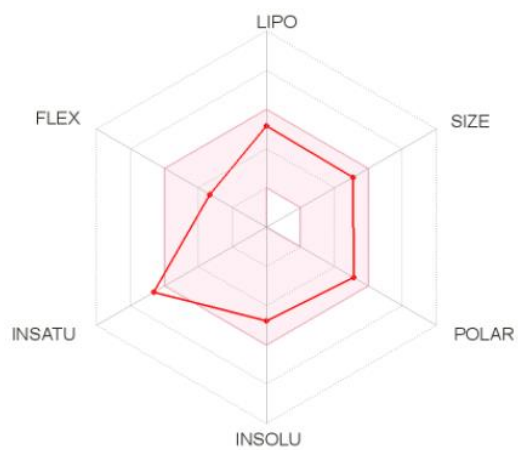
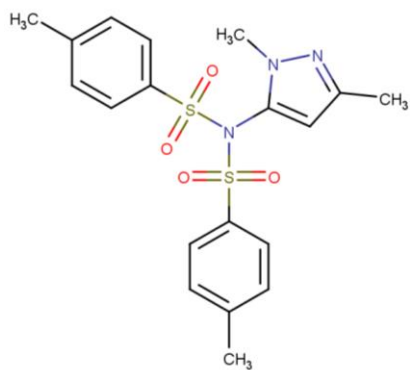
Inhibitor 9.1



Inhibitor 10.1



Inhibitor 248

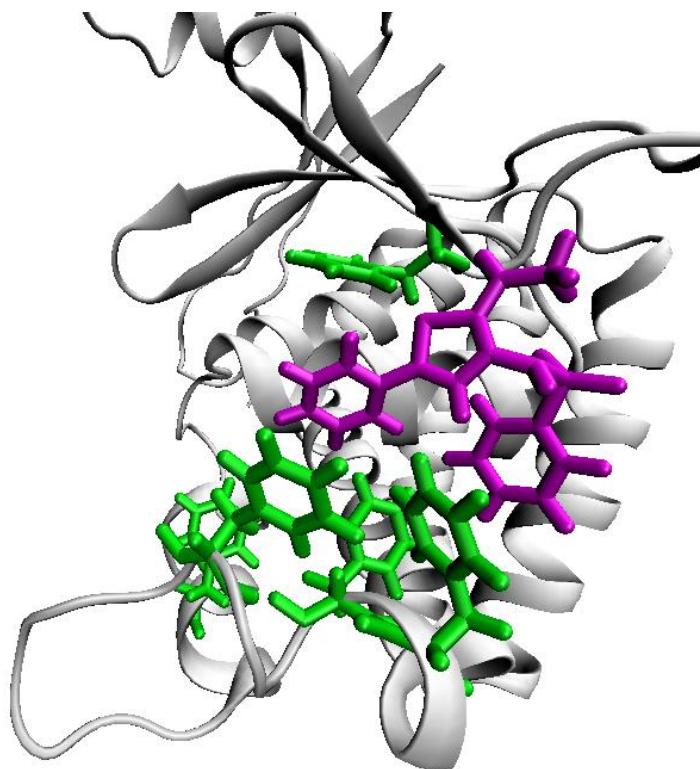


5. Rasprava

5.1 Ispitivani inhibitori se vežu specifično na hidrofobno vezno mjesto ubikvitina na proteinu OTUB1

Vezno mjesto ubikvitina na proteinu OTUB1 ima četiri aminokiselinska ostatka fenilalanina. Fenilalanin je hidrofobna aminokiselina. Stoga je vezno mjesto ubikvitina na proteinu hidrofobno. Bočna skupina fenilalanina je aromatski prsten fenil koji ima tri dvostruke veze i delokalizirane elektrone u prstenu. Zbog dvostrukih veza u aromatskim prstenima, vezno mjesto na proteinu može s drugim aromatskim spojevima stvarati π - π stacking interakcije. π - π stacking interakcije su nekovalentne interakcije. Nevalentne interakcije su slabije od kovalentnih i vodikovih interakcija. Jedna kovalentna veza ima energiju otprilike 200 kJ/mol, vodikova veza 25-40 kJ/mol, dok nekovalentna veza ima energiju manju od 10 kJ/mol. Organske strukture najčešće se stabiliziraju vodikovim vezama. Međutim, utvrđeno je da su uz vodikove veze π - π stacking interakcije glavne u održavanju stabilnosti poroznih struktura²⁶.

Zbog pretpostavke o π - π stacking interakcijama u veznom mjestu ubikvitina na proteinu OTUB1, svi odabrani spojevi imaju aromatske strukture. Predpostavili smo da će pet spojeva odabranih u računalno provedenom probiru pokazivati najviše veznih interakcija sa proteinom. Odabrani spojevi trebali bi se umjesto ubikvitina vezati na protein, odnosno kompetitivno inhibirati protein OTUB1. To bi značilo da π - π stacking interakcije između inhibitora i proteina imaju veću energiju vezanja nego interakcije između ubikvitina i proteina (slika 22).



Slika 22. π - π stacking interakcije između inhibitora 10.1 i aminokiselinskih ostataka fenilalanina na proteinu OTUB1. Inhibitor 10.1 je prikazan ljubičastom bojom, aminokiselinski ostaci fenilalanina ljubičastom bojom, a protein OTUB1 vrpcom bijele boje.

Inhibitor mora biti specifičan za vezanje na vezno mjesto ubikvitina na proteinu kako bi se postigla kompetitivna inhibicija. Vezanje svih odabranih inhibitora upravo u vezno mjesto ubikvitina govori o njihovoj specifičnosti. Međutim, to vezanje dobiveno je dokiranjem. Dokiranje prikazuje teoretsko vezanje inhibitora na protein, određeno steričkim i elektrostatskim interakcijama između inhibitora i proteina. Simulacije molekularne dinamike prikazuju gibanje proteina i inhibitora u vodenom sustavu. Takav prikaz vjerniji je stanju u stanici, gdje se protein nalazi. Svi inhibitori za koje su provedene simulacije vezali su se u vezno mjesto ubikvitina na proteinu. Kako bi se potvrdilo specifično vezanje u stanici, potrebna su daljnja istraživanja *in vitro* i *in vivo*.

Atome klora u strukturama inhibitora 7.3 i 8.1 nismo mogli učitati tijekom parametrizacije. Da bismo mogli provesti simulacije, modificirali smo inhibitore 7.3 i 8.1 tijekom parametrizacije. Predpostavili smo sličnost u

veliĉini tih dvaju skupina. Molekulska masa (eng. molecular weight=MW) inhibitora 7.3 iznosi 415, a modificiranog inhibitora 7.3* 395. Molekulska masa inhibitora 8.1 iznosi 535, a modificiranog inhibitora 8.1* 495. Inhibitori 7.3 i 8.1 koji imaju klor veći su nego modificirani inhibitori 7.3* i 8.1* koji imaju metilnu skupinu. U Tablici 2 prikazana su ADME svojstva prema radarima bioraspoloživosti inhibitora 7.3 i 8.1 te modificiranih inhibitora 7.3* i 8.1*. Vidljivo je da su ADME svojstva modificiranih i nemodificiranih inhibitora vrlo sliĉna.

Međutim, ta modifikacija nije u potpunosti opravdana. Klor je molekula koja ima naboj, dok metilna skupina nema naboj. Naboj mijenja vezanje inhibitora na protein. Mijenja se i polarnost i elektronegativnost molekule inhibitora. Nakon modifikacije, modificirane molekule nismo pronašli u Maybridge knjižnici dostupnih spojeva. U sluĉaju da su te molekule imale svojstva dobrih lijekova i željeli bismo ih dalje testirati, morali bismo ih sintetizirati u laboratoriju. Modifikacija inhibitora 7.3 i 8.1 je nedostatak istraživanja. Da bi se izbjegla ta modifikacija i u simulacije uĉitali komercijalno dostupni inhibitori, potrebno je popraviti greške u uĉitavanju molekula u CHARMM-GUI. Zatim bi se simulacije trebale ponovno provesti.

5.2 Inhibitori se na različite naĉine vežu na protein OTUB1 i različito ga inhibiraju

Nakon dokiranja, uočili smo da se inhibitori na protein vežu na dva različita naĉina prema aromatskim prstenima u strukturi: cilindriĉno i trigonalno. Predpostavili smo da će se cilindriĉni inhibitori (8.1, 9.1 i 10.1) bolje vezati nego trigonalni inhibitori (7.3 i 248). Cilindriĉni inhibitori vežu se na protein tako da su im aromatski prsteni u strukturi vezani u dva smjera prema aromatskim prstenima fenilalanina u veznom mjestu. Trigonalni inhibitori vežu

se na protein tako da su im aromatski prsteni u strukturi vezani u tri smjera: dva prema aromatskim prstenima fenilalanina i jedan prema gore u pozitivni dio površine proteina.

Inhibitor 7.3* je trigonalni inhibitor. U simulaciji molekularne dinamike inhibitor 7.3* stvara stabilne interakcije sa proteinom. RMSD dijagram prikazuje da se inhibitor 7.3* giba i mijenja svoju konformaciju u veznom mjestu na proteinu. Iako se giba u veznom mjestu, ne disocira sa veznog mjesta na proteinu kroz 100 nanosekundi simulacije. Prema radaru biorasploživosti inhibitor 7.3* ima svojstva lipofilnosti, topljivosti i zasićenosti izvan okvira Lipinski pravila.

Inhibitor 8.1* je cilindričan inhibitor. U simulaciji molekularne dinamike inhibitor 8.1* stvara stabilne interakcije sa proteinom. Na RMSD dijagramu je vidljivo gibanje inhibitora. Međutim, inhibitor 8.1* je čvrsto vezan sa dva aromatska prstena u svojoj strukturi na vezno mjesto ubikvitina na proteinu. Ostatak strukture inhibitora se u cijeloj simulaciji giba. Stoga oscilacije na RMSD dijagramu prikazuju udaljenosti između atoma ostatka strukture inhibitora i proteina. Prema radaru biorasploživosti inhibitor 8.1* ima sva svojstva osim fleksibilnosti izvan okvira Lipinski pravila.

Inhibitor 9.1 je cilindričan inhibitor. U simulaciji molekularne dinamike inhibitor 9.1 brzo je disocira sa proteina. Na RMSD dijagramu su vidljive oscilacije koje prikazuju veliku udaljenost između atoma inhibitora i proteina, odnosno izlazak inhibitora iz veznog mjesta na proteinu. Prema radaru biorasploživosti inhibitor 9.1 ima svojstva polarnosti i zasićenosti izvan okvira Lipinski pravila.

Inhibitor 10.1 je cilindrične strukture. Međutim, zbog acetilne skupine u svojoj strukturi, inhibitor 10.1 se veže u tri smjera (trigonalno) na vezno mjesto na proteinu. U simulaciji molekularne dinamike inhibitor 10.1 ne disocira sa proteina. Na RMSD dijagramu vidljive su oscilacije u gibanju. Oscilacije

prikazuju gibanje inhibitora 10.1 i promjene konformacija u veznom mjestu. Bez obzira na oscilacije, inhibitor 10.1 ostaje vezan u veznom mjestu na proteinu u 100 nanosekundi simulacije. Prema radaru bioraspoloživosti inhibitor 10.1 ima jedino svojstvo zasićenosti izvan okvira Lipinski pravila.

Inhibitor 248 je trigonalne strukture. U simulaciji molekularne dinamike disocira sa proteina nakon otprilike 50 nanosekundi, odnosno u polovici simulacije. Na RMSD dijagramu su vidljive oscilacije, odnosno gibanje u veznom mjestu i izlazak iz veznog mjesta na proteinu. Prema radaru bioraspoloživosti inhibitor 248 ima jedino svojstvo zasićenosti malo izvan okvira Lipinski pravila.

U *in vitro* esejima testirana su četiri inhibitora pronađena u prvom probiru. Od ta četiri inhibitora jedino je inhibitor 10.1 inhibirao protein OTUB1 i to IC_{50} vrijednošću 10.59 μ M. Takva *in vitro* inhibicija ukazuje na važnost ADME svojstava u *in vitro* testiranju kandidata za lijekove. Vidljivo je da inhibitori 7.3*, 8.1* i 9.1 imaju više svojstava važnih za inhibiciju proteina koji su izvan graničnih vrijednosti Lipinski pravila. Predpostavljamo da bi od ispitanih inhibitora, prema Lipinski pravilima, inhibitor 248 mogao biti dobar kandidat za lijek, s obzirom da su mu skoro sva svojstva unutar okvira Lipinski pravila. Inhibitor 248 bio bi dobar potencijalni kandidat ukoliko bi pokazao inhibiciju proteina OTUB1 u *in vitro* esejima. S obzirom da je taj spoj pronađen u drugom probiru, nije ispitan u *in vitro* esejima.

5.3 Bioizosteri

Od svih pet inhibitora koje smo ispitivali, ni jedan nije imao sva svojstva dobrog lijeka. Stoga bi se trebale potražiti strukture boljih svojstava a slične strukture kao ispitani inhibitori. Bioizosteri su molekule koje imaju sličnu strukturu ili svojstva određenoj molekuli od interesa. Imaju sličnu biološku

aktivnost, ali se razlikuju u određenim svojstvima. Koriste se u medicinskoj kemiji i dizajnu lijekova. Istraživanjem bioizostera moguće je pronaći spojeve bolje stabilnosti i boljih ADME svojstava od spoja od interesa²⁷.

Nastavak istraživanja inhibitora deubikvitinirajućeg proteina OTUB1 trebao bi uključivati bioizostere. Pretražiti se mogu spojevi koji imaju sličnu strukturu kao spojevi koji su pokazali dobru inhibiciju proteina. Bioizosteri se mogu pronaći na web stranici SwissSimilarity. Unosom strukture spoja od interesa, program će prikazati već postojeće spojeve koji imaju sličnu strukturu i svojstva kao spoj od interesa, dakle bioizostere (slika 23). Pronađenim spojevima su vidljiva ADME svojstva spajanjem na web stranicu SwissADME.

The screenshot displays the SwissSimilarity search results page. On the left, the 'Run parameters' section shows: Library screened: Virtual; Screening method: FP2; Date: Wed Jul 29 17:08:04 2020. A citation is provided: Zoete, V., Daina, A., Bovigny, C., & Michielin, O. SwissSimilarity: A Web Tool for Low to Ultra High Throughput Ligand-Based Virtual Screening. J. Chem. Inf. Model. 2016, 56(9), 1399-1404.

The 'Query Molecule' section shows the chemical structure of the query molecule: Cc1ccc(cc1)S(=O)(=O)Nc2nc3ccccc3n2.

The 'Results' section displays 16 search results in a grid, each with a score and a chemical structure. The results are as follows:

Score	Score	Score	Score
0031-0001076919 Score : 0.703	0031-0001071539 Score : 0.697	0031-0001082299 Score : 0.683	0047-0001139133 Score : 0.657
0051-0032373846 Score : 0.667	0047-0044995146 Score : 0.662	0031-0000015196 Score : 0.656	0033-0043919049 Score : 0.655
0033-0043919428 Score : 0.655	0051-0010459982 Score : 0.653	0051-0014699786 Score : 0.651	0043-0002670194 Score : 0.648

Slika 23.
Bioizosteri
inhibitora
dobiveni
virtualnim
probirom
pomoću
programa
SwissSimilarity.
 Nakon unosa
 strukture
 inhibitora 7.3
 (eng. Query
 Molecule) u
 rezultatima (eng.
 Results) se
 prikažu strukture
 slične unesenoj.

6. Zaključak

Deubikvitinirajući protein ubikvitin tioesteraza (OTUB1) sudjeluje u regulaciji ubikvitinacije proteina koji su povezani sa nastankom malignih bolesti. Inhibitori deubikvitinirajućeg proteina OTUB1 razvijaju se kako bi se koristili kao protutumorski lijekovi.

Proučili smo vezno mjesto ubikvitina na deubikvitinirajućem proteinu OTUB1 kako bismo dizajnirali kompetitivni inhibitor za taj protein. Korištenjem računalnih programa pretražili smo virtualne knjižnice postojećih spojeva i pronašli spojeve koji se vežu u vezno mjesto ubikvitina na proteinu. Inhibitori su se zbog aminokiselinskih ostataka fenilalanina u veznom mjestu vezali π - π stacking interakcijama.

Simulacijama molekularne dinamike ispitali smo i prikazali kako potencijalne molekule lijekovi inhibiraju ubikvitin tioesterazu OTUB1. Utvrdili smo da se inhibitori na protein mogu vezati cilindrično ili trigonalno s obzirom na aromatske prstene u strukturi. Neki od inhibitora pokazali su dobru inhibiciju, dok su drugi pokazali da ne mogu inhibirati protein OTUB1.

Prikazali smo okvirna svojstva apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije (ADME). Iz svojstava koja prikazuju koliko bi dobar lijek određena molekula bila, moguće je nastaviti istraživanja inhibitora proteina OTUB1.

Nemogućnost provedbe simulacija molekularne dinamike bez modifikacije inhibitora je nedostatak ovog istraživanja. Da bi se istraživanja inhibitora nastavila, potrebno je prepoznati i ispraviti računalne pogreške i ograničenja. Istraživanje bi se također moglo nadograditi pretraživanjem bioizostera inhibitora za koje smo proveli simulacije molekularne dinamike. Bez obzira na uspješnost inhibitora u inhibiciji proteina računalnim metodama, nije poznato kako bi spojevi inhibirali protein u stanicama. Potrebno je *in silico* rezultate potkrijepiti *in vitro* rezultatima.

7. Literatura


- 1 Virág D, Dalmadi-Kiss B, Vékey K, Drahos L, Klebovich I, Antal I *et al.* Current Trends in the Analysis of Post-translational Modifications. *Chromatographia*. 2020; **83**. doi:10.1007/s10337-019-03796-9.
- 2 Rape M. Post-Translational Modifications: Ubiquitylation at the crossroads of development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018; **19**: 59–70.
- 3 Sivakumar D, Kumar V, Naumann M, Stein M. Activation and selectivity of OTUB-1 and OTUB-2 deubiquitylases. *J Biol Chem* 2020; : jbc.RA120.013073.
- 4 Popovic D, Vucic D, Dikic I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat. Med.* 2014; **20**: 1242–1253.
- 5 Rudnicka A, Yamauchi Y. Ubiquitin in influenza virus entry and innate immunity. *Viruses*. 2016; **8**. doi:10.3390/v8100293.
- 6 Kobayashi M, Oshima S, Maeyashiki C, Nibe Y, Otsubo K, Matsuzawa Y *et al.* The ubiquitin hybrid gene UBA52 regulates ubiquitination of ribosome and sustains embryonic development. *Sci Rep* 2016; **6**: 1–11.
- 7 Clague MJ, Urbé S, Komander D. Breaking the chains: deubiquitylating enzyme specificity begets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; **20**: 338–352.
- 8 Zhang W, Sidhu SS. Development of inhibitors in the ubiquitination cascade. *FEBS Lett* 2014; **588**: 356–367.
- 9 Turakhiya A. *Functional characterization of the role of ZFAND1 in stress granule turnover*. 2018.
- 10 Collins GA, Goldberg AL. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* 2017;


- 169**: 792–806.
- 11 Schnell JD, Hicke L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 2003; **278**: 35857–35860.
 - 12 Baietti MF, Simicek M, Abbasi Asbagh L, Radaelli E, Lievens S, Crowther J *et al.* OTUB 1 triggers lung cancer development by inhibiting RAS monoubiquitination . *EMBO Mol Med* 2016; **8**: 288–303.
 - 13 Sun XX, Challagundla KB, Dai MS. Positive regulation of p53 stability and activity by the deubiquitinating enzyme Otubain 1. *EMBO J* 2012; **31**: 576–592.
 - 14 Anderson AC. The Process of Structure-Based Drug Design. *Chem Biol* 2003; **10**: 787–797.
 - 15 Jorgensen WL. The Many Roles of Computation in Drug Discovery. *Science (80-)* 2004; **303**: 1813–1818.
 - 16 Batool M, Ahmad B, Choi S. A structure-based drug discovery paradigm. *Int J Mol Sci* 2019; **20**. doi:10.3390/ijms20112783.
 - 17 Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* 2005; **26**: 1701–1718.
 - 18 Ernst A, Avvakumov G, Tong J, Fan Y, Zhao Y, Alberts P *et al.* A strategy for modulation of enzymes in the ubiquitin system. *Science (80-)* 2013; **339**: 590–595.
 - 19 Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004; **25**: 1605–1612.
 - 20 Shang J, Sun H, Liu H, Chen F, Tian S, Pan P *et al.* Comparative analyses of structural features and scaffold diversity for purchasable compound

- libraries. *J Cheminform* 2017; **9**. doi:10.1186/s13321-017-0212-4.
- 21 Trott O, Olson AJ. Software news and update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010; **31**: 455–461.
 - 22 Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem* 2008; **29**: 1859–1865.
 - 23 Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual Molecular Dynamics. 1996.
 - 24 Ishikawa Y. Software A Script for Automated 3-Dimensional Structure Generation and Conformer Search from 2-Dimensional Chemical Drawing. 2013.http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry.
 - 25 Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* 2017; **7**: 1–13.
 - 26 Deng JH, Luo J, Mao YL, Lai S, Gong YN, Zhong DC *et al*. π - π stacking interactions: Non-negligible forces for stabilizing porous supramolecular frameworks. *Sci Adv* 2020; **6**: 1–9.
 - 27 Hamada Y, Kiso Y. The application of bioisosteres in drug design for novel drug discovery: Focusing on acid protease inhibitors. *Expert Opin Drug Discov* 2012; **7**: 903–922.

8. Životopis

OSOBNJE INFORMACIJE Paulina Grizelj

 Bartola Kašića 14, 51000 Rijeka (Hrvatska)

 (+385) 989363836

 paulinagrizelj96@gmail.com

RADNO ISKUSTVO

- siječanj 2020.–kolovoz 2020. Izrada diplomskog rada
Odjel za biotehnologiju
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)
Tema: Dizajn inhibitora ubikvitin tioesteraze OTUB1 pomoću superračunala
Mentor: dr.sc. Željko M. Svedružić, docent
- veljača 2020. Demonstrator na kolegiju Kemoinformatika
Nositelj kolegija: dr.sc. Željko M. Svedružić, docent
- lipanj 2018. Stručna praksa
JGL d.d.
Svilno 20, 51000 Rijeka (Hrvatska)
Djelatnost ili sektor Proizvodnja

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

- 2015.–2018. Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova
Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)

2011.–2014. Završeno gimnazijsko obrazovanje
 Salezijanska klasična gimnazija
 Vukovarska 62, 51000 Rijeka (Hrvatska)

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Strani jezici

engleski

RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
C1	C1	C1	C1	C1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik

Digitalne vještine

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik

Ostale vještine

Iskusni korisnik Microsoft Office Suite, Windows OS
 Samostalni korisnik GROMACS, UCSF Chimera, PyMOL, VMD, Autodock Vina, GAMESS, Linux OS

Vozačka dozvola B

DODATNE INFORMACIJE

Priznanja i nagrade

Stipendije: višegodišnja dobitnica stipendije grada Rijeke za darovite učenike i studente.