

# Istraživanje interakcije spojeva iz masline s tirozin kinazom HGFR/C-MET pomoću molekuskog uklapanja

---

Jagar, Fran

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:244119>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Fran Jagar**

**Istraživanje interakcije spojeva iz masline s tirozin kinazom  
HGFR/c-Met pomoću molekuskog uklapanja**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen na Institutu Ruđer Bošković i Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom dr. sc. Višnje Stepanić i izv. prof. dr. sc. Monike Barbarić.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se svojim mentoricama dr. sc. Višnji Stepanić i izv. prof. dr. sc. Moniki Barbarić, na prihvaćanju moje molbe za mentorstvom, na pruženoj prilici, profesionalnom i dobronamjernom pristupu te znanju koje su podijelile sa mnom.

Zahvaljujem se mentorici, dr. sc. Višnji Stepanić, na uloženom vremenu, na omogućenom polaženju radionice *Introduction to Molecular Modeling in Drug Discovery* u organizaciji tvrtke Schrödinger, LLC, prijateljskom pristupu, na nesebičnoj podijeli znanja i na mnogo motivacije i poticaja.

Zahvaljujem se internacionalnoj tvrtki Schrödinger, LCC i djelatnici Riti Podzuni koji su mi omogućili besplatno korištenje njihovog programa za izradu mog diplomskog rada.

Hvala mojim roditeljima koji su oduvijek tu za mene, koji su me odgojili i oblikovali kao osobu i omogućili mi i više nego što je potrebno.

Hvala mojim prijateljima koji su mi uljepšali obrazovanje i sudjelovali u kreaciji brojnih uspomena.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Protein kinaze.....	2
1.1.1. Ljudske, eukariotske protein kinaze.....	4
1.1.2. Atipične protein kinaze.....	7
1.1.3. Lipid kinaze.....	7
1.2. Arhitektura protein kinaza.....	7
1.2.1. Reakcija protein kinaza.....	8
1.2.2. Struktura kinazne domene.....	8
1.3. Receptor za faktor rasta hepatocita (HGFR).....	10
1.4. Tipovi inhibicije kinaza.....	12
1.4.1. ATP-kompetitivni kinazni inhibitori.....	12
1.4.2. ATP-nekompetitivni kinazni inhibitori.....	13
1.5. Molekulsko uklapanje.....	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	19
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1. Stvaranje virtualne biblioteke spojeva za molekulsko uklapanje.....	20
3.2. Web servis SwissTargetPrediction za predviđanje proteinskih meta.....	31
3.3. Molekulsko uklapanje pomoću programa Glide.....	34
3.3.1. Program glide.....	34
3.3.2. Priprema spojeva/liganada za molekulsko uklapanje.....	36
3.3.3. Priprema proteina c-Met za molekulsko uklapanje.....	36
3.3.4. Protokol za molekulsko uklapanje.....	37
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	39
4.1. Odabir kinaze HGFR/c-Met kao mete pomoću web servisa SwissTargetPrediction.....	39
4.2. Molekulsko uklapanje u ATP vezno mjesto kinaze c-Met.....	43
4.2.1. Reprodukcijski kristalnog načina vezanja u strukturi 4MXC.....	45
4.2.2. Vezanje poznatih referentnih inhibitora.....	49
4.3. Vezanje spojeva masline.....	51
5. ZAKLJUČCI.....	56
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	57
7. LITERATURA.....	58
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	62
9. PRILOZI.....	64
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD.....	65

## 1. UVOD

Stanovništvo mediteranskih zemalja ima najniže vrijednosti incidencije infarkta miokarda (Tunstall-Pedoe i sur., 1999). Jedan od faktora koji doprinosi poboljšanju zdravlja je upotreba maslinovog ulja u prehrani. Pozitivni učinci maslinovog ulja na zdravlje poznati su i zabilježeni još od antičkih vremena. Danas se zna da pozitivni učinci maslinovog ulja na zdravlje dolaze od fenolne frakcije (*olive oil phenolic compounds*, OOPC), odnosno fenolnih spojeva koji su sastavni dio maslinovog ulja (Martín-Peláez i sur., 2013).

Vrsta i udio pojedinih fenolnih spojeva u različitim maslinovim uljima ili listu masline variraju ovisno o sorti masline, starosti drveta, poljoprivrednim tehnikama koje se koriste u uzgoju masline, zrelosti ploda, sastavu tla, klimi, tehnikama prerade ploda masline i načinu pohrane kako ploda tako i maslinovog ulja. Proučavanju kemijskog sastava fenolnih spojeva porijeklom iz masline posvećeno je mnogo vremena. Fenolni spojevi nazivaju se i polifenoli, a mogu se podijeliti na 4 veće skupine: jednostavne fenole, flavonoide, sekoiridoide i lignane. Najzastupljeniji polifenoli maslinovog ulja su jednostavni fenoli tirozol i hidrokstirozol te sekoiridoidi oleacein te oleokantal (Martín-Peláez i sur., 2013).

Fenolni spojevi porijeklom iz masline imaju antioksidativni učinak i mogu djelovati kao prva linija obrane stanica protiv slobodnih radikala u oksidativnom stresu koji je promotor patofizioloških promjena poput koronarne bolesti srca, karcinoma i neurodegenerativnih bolesti te promjena koje su uzrokovane starenjem (Wang i Bennett, 2012). Većina slobodnih radikala tzv. reaktivnih kisikovih vrsta (*Reactive Oxygen Species*, ROS) nastaje u našem organizmu kao derivati kisika, npr. aerobnim metabolizmom ili u Fentonovoj reakciji s ionima željeza  $Fe^{2+}$ . Kao mete ROS-a ističu se lipidi, DNA i proteini. Oksidativni stres je povezan s upalnim procesima. Osim izazivanja oksidacijskog stresa, slobodni radikali aktiviraju i pro-upalne i protu-upalne citokine (Valko i sur., 2007).

Ekstradjevičansko maslinovo ulje (*Extra virgin olive oil*, EVOO) je vrsta maslinovog ulja najbolje kvalitete, prepoznatljivo po niskom udjelu slobodne oleinske kiseline i čije sastavnice imaju snažan protuupalni učinak u *in vitro* i u *in vivo* ispitivanjima koji je usporediv sa protuupalnim učinkom ibuprofena. Osim antioksidativnog i protuupalnog učinka, fenolni spojevi masline posjeduju i antimikrobni učinak. Mehanizmi kojima postižu spomenute učinke međusobno su različiti i, vrlo vjerojatno, međusobno povezani, tj. sinergistički (Karihtala i Soini, 2007).

Fenolni spojevi maslinovog ulja OOPC mogu utjecati i na ekspresiju gena, ekspresiju proteina te, posljedično tome, na produkciju metabolita (Karihtala i Soini, 2007).

Epidemiološke studije pokazale su inverznu povezanost između unosa maslinovog ulja i učestalosti pojave različitih vrsta karcinoma. Smatra se da se protutumorski učinak OOPCeva bazira na njihovom utjecaju na redoks status i inflamatorni status (Martín-Peláez i sur., 2013). Ilavarsi i sur., (2011) utvrdili su da hidroksitirozol (100  $\mu$ M) povećava staničnu održivost na način da normalizira antioksidativne enzime i smanjuje razinu slobodnih radikala u ljudskim perifernim mononuklearnim krvnim stanicama koje su tretirane poznatim karcinogenom - 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksinom. OOPCevi interferiraju s osnovnim staničnim funkcijama povezanim sa staničnim ciklusom. Tako hidroksitirozol interferira s G1 fazom staničnog ciklusa i apoptozom u ljudskim stanicama adenokarcinoma kolona i promijelocitnim stanicama kod leukemije u koncentracijama od 50 do 100  $\mu$ M. Također, u ljudskim stanicama adenokarcinoma kolona, hidroksitirozol (50 mg/ml) inhibira p38/CREB fosforilaciju, COX-2 ekspresiju, zaustavlja stanični ciklus u G2/M fazi i inhibira rast stanica ovisno o dozi (5-200  $\mu$ M). Oleuropein i hidroksitirozol uzrokovali su smanjenje upalne angiogeneze u ljudskim vaskularnim stanicama endotela u koncentracijama od 0,1 do 50  $\mu$ M. Smatra se da su mehanizmi kojima su postignuti navedeni učinci: interakcija sa steroidnim receptorima i receptorima faktora rasta, interakcija sa specifičnim protein kinazama i onkogenima/onkoproteinima, inhibicija enzima povezanih s promocijom tumora i metastaza te direktan učinak na nukleinske kiseline i nukleoproteine. Ove eksperimentalne studije ukazuju na potencijalnu dobrobit OOPCeva kao dio zdrave prehrane u smanjenju pa čak i prevenciji karcinoma (Martín-Peláez i sur., 2013).

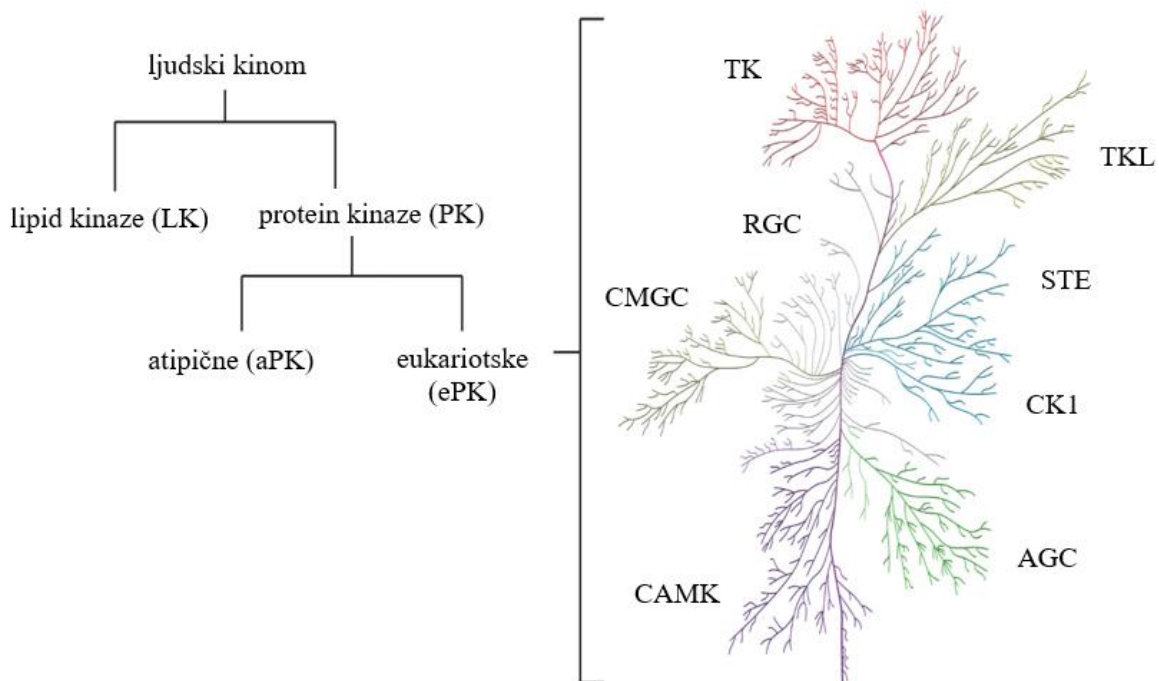
### **1.1. Protein kinaze**

Protein kinaze su enzimi koji kataliziraju proces fosforilacije, odnosno prijenos fosfatne skupine s visokoenergetskog donora (obično je to ATP, a rjeđe GTP) na proteine supstrate. Akceptori fosfata na proteinu supstratu su hidroksilne skupine serina, treonina ili tirozina (Duong-Ly i Peterson, 2013). Proces fosforilacije važan je dio mnogih staničnih signalnih puteva koji uključuju stanični rast, diferencijaciju, proliferaciju, angiogenezu, staničnu smrt i metabolizam (Kuhn, 2010). Neke protein kinaze su onkogeni. Od sredine 20. stoljeća, kada je ustanovljeno da je aktivnost glikogen fosforilaze regulirana reverzibilnom fosforilacijom, dolazi do velikog porasta interesa za proces fosforilacije proteina te za ulogu koju ona ima u

regulaciji funkcije proteina (Hunter, 1987). Pojavom DNA kloniranja i sekvenciranja sredinom 70-ih godina prošlog stoljeća, postalo je jasno da postoji velika porodica eukariotskih protein kinaza te je pretpostavljeno da genom kraljevnjaka može kodirati i do 1001 različitih protein kinaza (Manning i sur., 2002). Kad je završeno sekvenciranje sveukupnog ljudskog genoma, identificirane su gotovo sve ljudske protein kinaze. Ukupni broj ljudskih protein kinaza (tzv. kinom) je otprilike upola manji od pretpostavljenog i iznosi 518. Geni za ljudske protein kinaze čine 1,7% svih ljudskih gena (Manning i sur., 2002). Od ukupno 518 ljudskih protein kinaza, 478 ih pripada superporodici eukariotskih protein kinaza (ePK) kojima je zajednička struktura katalitičke domene (ePK domena). Ostalim 40 kinazama nedostaje sličnost ePK domeni, ali imaju kinaznu aktivnost pa zbog toga spadaju u skupinu atipičnih protein kinaza (aPK) (Duong-Ly i Peterson, 2013).

Članovi ePK superporodice dalje se klasificiraju, s obzirom na sličnost primarne sekvence, u 8 velikih skupina (Duong-Ly i Peterson, 2013):

- I. TK (tyrosin kinase)
- II. TKL (tyrosine kinase-like)
- III. STE (STE20, STE11, STE8 related)
- IV. CK1 (casein kinase 1)
- V. AGC (protein kinase A, protein kinase G, protein kinase C related)
- VI. CAMK (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase)
- VII. CMGC (Cdk, MAPK, GSK, Cdk-like related)
- VIII. RGC (receptor guanylyl cyclase)



Slika 1. Prikaz ljudskog kinoma

### 1.1.1. Ljudske, eukariotske protein kinaze

#### *Tirozin kinaze (TK)*

Skupina TK sastoji se od receptorskih tirozin-kinaza (RTK) i ne-receptorskih odnosno citosolnih tirozin-kinaza. RTKe su transmembranski proteini koji sudjeluju u staničnoj signalizaciji (Duong-Ly i Peterson, 2013). Dio RTK koji se nalazi izvan stanice stupa u interakcije s ligandima i prenosi signale preko stanične membrane u citoplazmu. Iako se RTK jako razlikuju po izvanstaničnim domenama, sve imaju unutarstaničnu kinaznu domenu. Neke RTK imaju C-terminalni „rep“ na kojem se nalaze mjesta za fosforilaciju koja posreduju u nizvodnoj signalizaciji, odnosno prijenosu signala duž signalnog puta. Vežanje liganda za izvanstaničnu domenu RTK uzrokuje oligomerizaciju receptora što dovodi do aktivacije unutarstanične kinazne domene. RTK skupini pripadaju receptor ljudskog epidermalnog faktora rasta (HER/EGFR), receptor inzulina (IR) i, srodan mu, inzulinu-sličan receptor faktora rasta 1 (IGF1-R), receptori trombocitnog faktora rasta (PDGFRs) i receptori faktora rasta fibroblasta (FGFRs). Svaka od navedenih RTKa povezana je s razvojem karcinoma. Ova



skupina obuhvaća većinu meta na koje djeluju kinazni inhibitori koji su trenutno u kliničkoj primjeni (Duong-Ly i Peterson, 2013).

Ostatak skupine TK čine ne-receptorske tirozin-kinaze, npr. Src, Abl i JAK kinaze. JAK kinaze su u sponi s takozvanim STAT (*signal transducer and activator of transcription*) proteinima te se aktiviraju tijekom interakcije s ranije spomenutim C-terminalnim „repovima“ RTKa. Njihovo djelovanje primarno je posredovano kroz transkripcijsku regulaciju genske ekspresije (Duong-Ly i Peterson, 2013). Abl kinaze mogu stupati u vezu s proteinom regije klusterske prijelomne točke (*breakpoint cluster region*, BCR) čime nastaje fuzijski protein Bcr-Abl. Razine ovog nereguliranog fuzijskog proteina koreliraju sa smanjenom apoptozom i povećanom staničnom proliferacijom u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji. Također, ovaj protein je bio meta prvog klinički odobrenog kinaznog inhibitora, imatiniba (Gleevec, 2001) (Duong-Ly i Peterson, 2013).

#### *Kinaze nalik tirozin kinazama (TKL - tyrosine kinase-like)*

Članovi TKL skupine imaju sekvence nalik onima iz TK skupine. Ovu skupinu čine uglavnom serin/treonin-kinaze i u nju se ubrajaju kinaza povezana s interleukin-1 receptorom, RAF kinaze, kinaze s LIM domenom (LIMK) i receptori za transformirajući faktor rasta beta (TGFβ) (Duong-Ly i Peterson, 2013).

#### *STE skupina kinaza*

STE kinaze klasificiraju se u 3 porodice s obzirom na njihovu homologiju s proteinima kvasaca STE20 (MAP4K), STE11 (MAP3K) i STE7 (MAP2K). Istaknuti članovi ove porodice uključuju p21-aktivirane kinaze (Paks) koje su kritični regulatori u raznim signalnim putevima, a prevelika ekspresija Pak1 javlja se u nekoliko tipova tumora (Duong-Ly i Peterson, 2013).

#### *CSNK/CK1 skupina kinaza*

U CSNK/CK1 skupinu spadaju kazein kinaza 1 (CK1) te njoj homologne kinaze. Ovi enzimi su serin/treonin-kinaze koje su konstitutivno eksprimirane. Fosforiliraju vrlo širok spektar supstrata uključenih u funkciju citoskeleta i transkripcijsku regulaciju (Duong-Ly i Peterson, 2013).

#### *AGC skupina kinaza*

AGC skupina je dobila ime po porodicama enzima protein kinaze A (PKA), protein kinaze B (PKG) i protein kinaze C (PKC). Akt odnosno protein kinaze B (PKB) posebno su važne u

regulaciji staničnog rasta, proliferacije, sinteze proteina, metabolizma glukoze te preživljavanja. PKB su supstrati 3-fosfoinozitol-ovisne kinaze 1 (PDK1) koja također pripada u AGC skupinu, a aktivira i druge AGC kinaze uključujući p70S6 kinazu, p90RSK i SGK (Duong-Ly i Peterson, 2013).

#### *CAMK skupina kinaza*

Kinaze koje se ubrajaju u ovu skupinu uključene su u signalizaciju kalcija i u normalnim okolnostima su autoinhibirane. Prilikom vezanja  $Ca^{2+}$ /kalmodulin kompleksa na kinazu, dolazi do prestanka autoinhibicije. Posebno važne kinaze ove skupine jesu kinaze kontrolnih točaka staničnog ciklusa, CHK1 i CHK2. Ovi enzimi se aktiviraju oštećenjem DNA pri čemu započinju fosforilacijsku kaskadu koja rezultira zaustavljanjem staničnog ciklusa i popravkom DNA (Duong-Ly i Peterson, 2013).

#### *CMGC skupina*

CMGC skupina je vrlo raznolika skupina kinaza. Poput kinaza kontrolnih točaka, ciklin-ovisne kinaze (CDK) centralni su regulatori progresije staničnog ciklusa. Ostale važne kinaze ove skupine su mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) koje su uključene u staničnu proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu. Osim njih tu su i glikogen sintaze kinaze (GSK) koje su uključene u metabolizam glikogena te CDK-slične kinaze (Duong-Ly i Peterson, 2013).

#### *RGC skupina*

Receptorske gvanilil ciklaze predstavljaju najmanju skupinu kinaza. Ovu skupinu u potpunosti čine pseudokinaze kojima nedostaju određeni aminokiselinski ostaci koji su ključni za transfer fosfata. Kao što im samo ime govori, svi enzimi iz skupine su gvanilil ciklaze, tj. kao visokoenergetsku molekulu koriste GTP umjesto ATP (Duong-Ly i Peterson, 2013).

#### *Skupina ostalih kinaza*

Preostalih 83 ePK kinazama koje su indentificirali Manning i sur. (2002) nedostaje dostatna sličnost u sekvenci da bi se svrstale u neku od 8 gore opisanih skupina. Ovdje spadaju primjerice CK2 i I $\kappa$ B kinaze (IKK). CK2 ima stotine karakteriziranih supstrata i vrlo neobično svojstvo da i GTP i ATP mogu biti donor fosfata. IKK (IKK $\alpha$  i IKK $\beta$ ) su važne u upali jer formiraju kompleks koji fosforilira I $\kappa$ B protein što omogućava translokaciju proupalnog NF $\kappa$ B transkripcijskog faktora u jezgru i sintezu proupalnih medijatora (Duong-Ly i Peterson, 2013).

### 1.1.2. Atipične protein kinaze (aPK)

U aPK skupini nalaze se kinaze čija se domena razlikuje od domene ePK skupine, ali bez obzira na različitost one također ispoljavaju kinaznu aktivnost (Duong-Ly i Peterson, 2013). U istaknute aPK kinaze ubrajaju se piruvat dehidrogenaza kinaza, bromodomenske kinaze te fosfoinozitol-3-kinazom povezane kinaze (PIKK). Posljednja navedena porodica kinaza spada u skupinu kinaza serin/treoin-kinaza tipa i ime je dobila po tome što dijeli homologiju s kinaznom domenom lipid kinaze fosfoinozitol-3-kinaze (PI3K). U ovu porodicu spada kinaza mTOR – meta rapamicina kod sisavaca, koja formira dva kompleksa (mTORC1 i mTORC2) s nekoliko drugih proteina te svaki kompleks ima drugačiji spektar supstrata. U sastavu kompleksa, kinaza mTOR povezuje se s brojnim signalnim putevima koji su uključeni u ekspresiju proteina, proliferaciju stanica, pokretljivost i stanični rast (Duong-Ly i Peterson, 2013).

### 1.1.3. Lipid kinaze

Postoji oko 20 lipid kinaza i one fosforiliraju lipide. Dijele se na sfingolipid kinaze i fosfoinozitolid kinaze. Posebno važne kinaze koje su dio nizvodnih signalnih puteva brojnih RTKa su fosfoinozitolid-3 kinaze (PI3Ks). PI3Ke fosforiliraju mjesto 3 na inozitolnom prstenu fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (PIP2) čime nastaje fosfoinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP3), molekula koja služi kao sidro na membrani za koje se proteini koji sadržavaju PH (*Pleckstrin-homology*) domenu mogu vezati, npr. kinaze AGC skupine (Duong-Ly i Peterson, 2013). Mutacije kinaza PI3K povezuju se s nekolicinom karcinoma, uključujući karcinome dojke i kolona (Wood i sur., 2007).

## 1.2. Arhitektura protein kinaza

Protein kinaze posreduju u većini prijenosa signala u eukariotskim stanicama na nekoliko načina: modifikacijom aktivnosti supstrata, kontroliranjem mnogih staničnih procesa poput metabolizma, transkripcije gena, progresije staničnog ciklusa, preuređivanja citoskeleta i kretanja stanica, stanične smrti i diferencijacije stanica. Osim protein kinaza, postoje i lipid kinaze koje fosforiliraju lipide. Fosforilacija proteina ima izuzetno važnu ulogu u međustaničnoj komunikaciji tijekom razvoja, u fiziološkom odgovoru, homeostazi te u funkcioniranju živčanog i imunskog sustava (Manning i sur., 2002). Akceptor fosfata može se

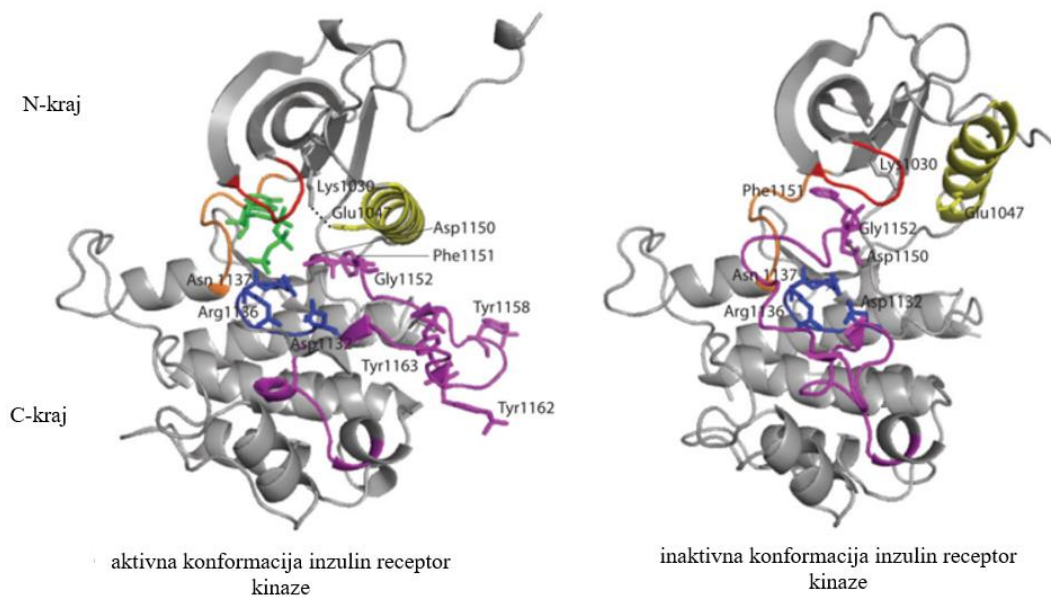
nalaziti na nekom drugom proteinu, ali može biti lociran i na samoj kinazi te tada proces fosforilacije nazivamo autofosforilacija (Duong-Ly i Peterson, 2013).

#### 1.2.1. Reakcija protein kinaza

Proces fosforilacije kojeg kinaze kataliziraju uključuje vezanje dvaju supstrata, ATP/GTP i proteina/lipida na katalitičko mjesto te transfer  $\gamma$ -fosfata s ATP-a/GTP-a na protein/lipid. Zatim slijedi otpuštanje fosforiliranog produkta i ADP/GDP iz katalitičkog mjesta. Kinazna domena sadržava aminokiselinske ostatke koji olakšavaju vezanje supstrata i iona magnezija, neophodnog kofaktora koji potpomaže stabilizaciji kompleksa, te aminokiselinskih ostataka koji pomažu u formiranju i otpuštanju produkata. Da bi ovaj proces uopće bio moguć, ePK domena prolazi kroz konformacijske promjene između aktivnog (katalitički sposobnog) i inaktivnog stanja (Duong-Ly i Peterson, 2013).

#### 1.2.2. Struktura kinazne domene

Domena ePK približno sadržava 250 aminokiselinskih ostataka (Duong-Ly i Peterson, 2013). Njeni N-terminalni (N-kraj) i C-terminalni kraj (C-kraj) su međusobno odijeljeni kratkom veznom regijom tzv. zglobom (obojana narančasto, Slika 2) koji sadržava ostatke koji čine vodikove veze s adeninskim prstenom ATP-a. N-kraj čini jedna  $\alpha$ -uzvojnica (C-heliks, žuto obojena na Slici 2) i nekoliko  $\beta$ -ploča. C-kraj pretežno čine  $\alpha$ -uzvojnice i on sadržava aminokiselinske ostatke važne za interakciju s akceptorom fosfata.

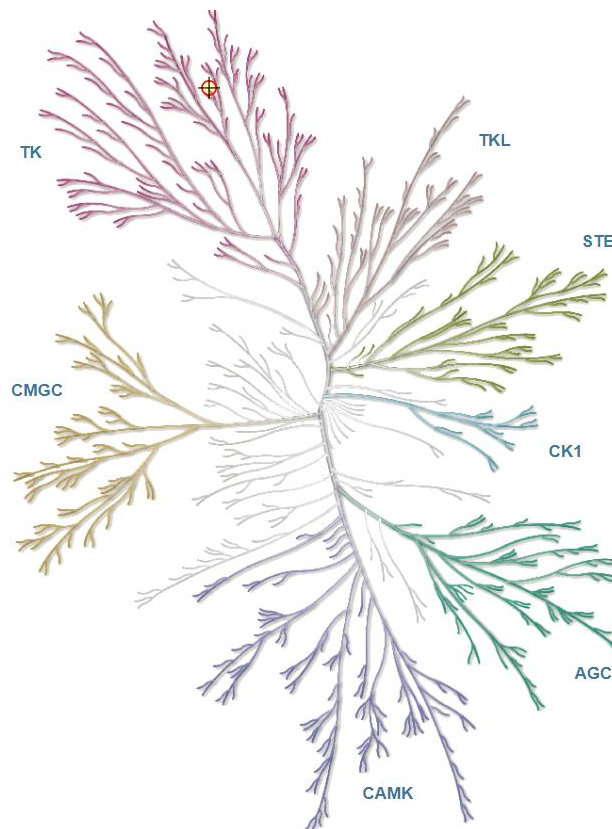


Slika 2. Prikaz aktivne i inaktivne konformacije inzulin kinaze (IP). Žutom bojom označen je C- $\alpha$ -uzvojnica, crveno P-petlja, narančasto područje zgloba, plavo katalitička petlja, a ljubičasto aktivacijska petlja (preuzeto i prilagođeno iz Duong-Ly i Peterson, (2013)). U kinazama očuvani DFG aminokiselinski ostatci za kinazu IP su Asp1150-Phe1151-Gly1152 i smješteni su na aktivacijskoj petlji.

Protein kinaze među najvećim su porodicama gena u eukariota i intenzivno su proučavane sve od njihovog otkrića 1970.-ih godina (Manning i sur., 2002). Zbog njihove brojnosti, postale su privlačna meta za detaljniju analizu distribucije gena u ljudskom genomu općenito. Glavna uloga kinaza u patofiziologiji bolesti istaknuta je nakon otkrića da mutacije kinaza mogu dovesti do disfunkcije u staničnoj signalizaciji (Zhang i sur., 2009). Takve mutacije mogu dovesti do dijabetesa, karcinoma, kardiovaskularnih, neurodegenerativnih, razvojnih i imunskih poremećaja te do poremećaja ponašanja (Lahiry i sur., 2010). Stoga su protein kinaze i lipidne kinaze važne kliničke mete brojnih spojeva - inhibitora kinaza u kliničkoj praksi i ispitivanjima. Od strane FDA-a više od 70 kinaznih inhibitora su registrirani kao lijekovi uglavnom za protutumorsku terapiju. Danas se intenzivno radi na otkrivanju inhibitora kinaza, posebno onih neistraženih dosad, s ciljem da se postigne povećana selektivnost i proširi primjena (Attwood i sur., 2021).

### 1.3. Receptor za faktor rasta hepatocita (HGFR)

Receptor za faktor rasta hepatocita (*Hepatocyte growth factor receptor*, HGFR) je produkt transkripcije (proto-onko) gena *MET*, a pripada skupini receptorskih TKa (Slika 3) (Sattler i sur., 2011). Naziva se još i c-Met kinaza i ima važnu ulogu u normalnoj staničnoj funkciji i u onkogenezi.



Slika 3. Prikaz lokacije receptora za faktor rasta hepatocita (HGFR) u ljudskom kinomu (<http://www.kinhub.org/kinmap/>).

Biološka aktivnost HGFR-a započinje vezanjem faktora rasta hepatocita (*Hepatocyte growth factor*, HGF) i može se očitovati na nekoliko različitih načina (Sattler i sur., 2011). Vezanje HGF-a za HGFR može rezultirati staničnim rastom, staničnom transformacijom, kretanjem stanice, metastaziranjem, promjenom epitelne u mezenhimsku stanicu, angiogenezom, zacjeljivanjem rana ili pak regeneracijom tkiva (Sattler i sur., 2011). Mutacije se mogu dogoditi na izvanstaničnoj ili na citoplazmatskoj domeni te dovode do prekomjerne aktivacije HGFR/HGF signalnog puta, a to uzrokuju na nekoliko mogućih načina. Mutacije mogu poremetiti mehanizme inhibicije same kinaze što dovodi do pojave rezistentnosti na postojeće

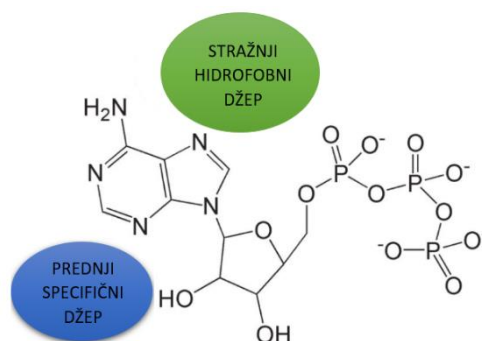
protutumorske lijekove, kinazne inhibitore (Sattler i sur., 2011). Usljed mutacija može doći do prekomjerne aktivnosti kinaze ili pak hiperreaktivnosti na podražaj, promjene u ekspresiji ili degradaciji kinaze tj. produljenja trajanja biokemijske signalizacije (Sattler i sur., 2011). HGFR nalazimo u brojnim tkivima (Tablica 1). Značajne mutacije su primijećene na ne-malim stanicama karcinoma pluća, malim stanicama karcinoma pluća, u melanomu, raku dojke, itd. (Sattler i sur., 2011). Stoga je HGFR meta za terapiju navedenih karcinoma. U kliničkim ispitivanjima nalaze se antitijela na HGFR/HGF te male molekule kao inhibitori kinazne domene HGFR-a. Na novim inhibitorima HGFR kinaze se i dalje radi (Wang i sur., 2022).

Tablica 1. Prikaz ekspresije kinaze HGFR u različitim tipovima zloćudnih tumora (Sattler i sur., 2011).

<b>Tip tumora</b>	<b>HGFR ekspresija (%)</b>
Mozak	54-88
Dojka	25-60
Cerviks	30-72
Kolon	55-78
Gastrični	75-90
Glava i vrat	52-68
Hepatom	68-69
Pluća (NSCLC)	41-72
Melanom	17-39
Mesoteliom	74-100
Multipli mijelom	48-80
Ovariji	64
Renalne stanice	54-87
Sarkom	20-87
Tiroidni	40-91

## 1.4. Tipovi inhibicije kinaza

Većina kinaznih inhibitora veže se kompetitivno na ATP vezno mjesto u kinaznoj domeni te su zbog toga općenito neselektivni zbog velike sličnosti kinazne domene. Primjerice staurosporin stupa u interakcije s minimalno 20% kinaza kinoma što je, između ostalog, razlog njegove toksičnosti (Duong-Ly i Peterson, 2013). Za razvoj selektivnijih inhibitora kinaza koriste se tzv. stražnji džep i prednji džep jer su manje očuvani u kinazama u odnosu na ATP vezno mjesto. Stražnji hidrofobni džep graniči s područjem u koje se veže adeninski prsten ATP-a. Prilaz k njemu je onemogućen u kinazama kod kojih aminokiselinski ostatak zvan „vratar“, ima veliki bočni lanac kao što je to u slučaju Leu, Phe ili Met. Međutim u ostalim slučajevima, taj džep se može koristiti za dizajn inhibitora selektivnih na kinaze s „vratarom“ koji ima mali pobočni lanac. Drugi, manji hidrofobni džep, koji se naziva prednji džep se nalazi na suprotnoj strani od adeninskog dijela (Slika 4).



Slika 4. ATP i susjedni džepovi na kinazama koji se mogu iskoristiti za razvoj selektivnih kinaznih inhibitora kroz optimizaciju interakcija između inhibitora i aminokiselinskih ostataka u džepovima

Kinazni inhibitori se mogu svrstati u jednu od 2 skupine; ATP-kompetitivne inhibitore i ATP-nekompetitivne inhibitore (Duong-Ly i Peterson, 2013).

### 1.4.1. ATP-kompetitivni kinazni inhibitori

U ovu skupinu ubrajaju se kinazni inhibitori čija potentnost ovisi o koncentraciji ATP-a i klasificiraju se kao inhibitori tipa I ili tipa II (Duong-Ly i Peterson, 2013). Inhibitori tipa I vežu se za aktivnu/“DFG-in“ konformaciju dok se inhibitori tipa II vežu za inaktivnu/“DFG-out“ konformaciju. Njihova važnost bit će objašnjena u odjeljku 4.2. prikaza rezultata.



Primjeri ATP-kompetitivnih inhibitora koji spadaju u inhibitore tipa I, strukturno su slični i imaju zajedničku metu – EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), jesu erlotinib i gefitinib (Slika 5). Oba sadrže kinazolinski fragment koji oponaša adeninsku bazu ATP-a i anilinski prsten koji sjeda u stražnji hidrofobni džep EGFR-a. Zbog toga se javlja rezistencija na oba inhibitora u slučaju mutacije Thr790Met kada je pristup stražnjem hidrofobnom džepu zapriječen. Erlotinib i gefitinib su odobreni za kliničku upotrebu u karcinomima pluća ne-malih stanica (Duong-Ly i Peterson, 2013). Jedan od najnovijih, visokoselektivnih inhibitora HGFR-a tipa I jest tepotinib („Tepmetko“) (Slika 5) koji je registriran 2021. godine kao oralni antineoplastik za liječenje karcinoma ne-malih stanica pluća do kojeg dolazi preskakanjem eksona 14 na *MET* (Wang i sur., 2021). Na terapiju tepotinibom je reagiralo djelomičnim povlačenjem tumora otprilike polovica pacijenata (Paik i sur., 2020). Primjer ATP-kompetitivnog inhibitora tipa II jest imatinib (Slika 5) čija meta je kinaza Bcr-Abl. Imatinib je odobren u terapiji kronične mijeloidne leukemije, nekoliko drugih leukemija te gastrointestinalnim stromalnim tumorima (Duong-Ly i Peterson, 2013).

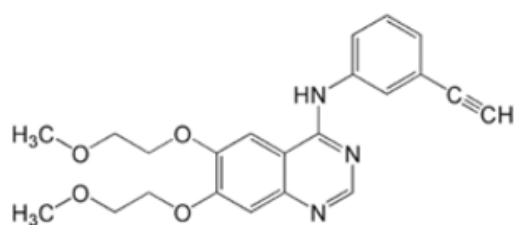
Treći primjer inhibitora, koji pokazuje karakteristike inhibitora tipa I i II, jest cis-3-[3-(4-metil-piperazin-1-il)-ciklobutil]-1-(2fenil-kinolin-7-il)-imidazo[1,5-a]pirazin-8-ilamin (PQIP) (Slika 5). Njegova meta jest inzulinu-nalik hormon rasta 1 receptor (IGF1R) (Duong-Ly i Peterson, 2013).

#### 1.4.2. ATP-nekompetitivni kinazni inhibitori

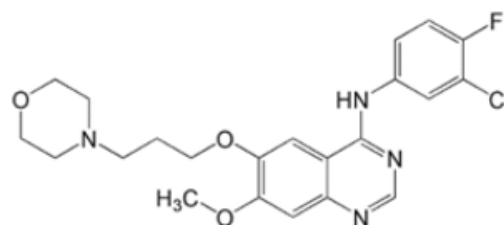
ATP-nekompetitivni inhibitori se vežu izvan veznog mjesta ATPa i nazivaju se još alosterički kinazni inhibitori. Visokosačuvana struktura ATP veznog mjesta u kinomu predstavlja izazov u razvoju selektivnih ATP-kompetitivnih kinaznih inhibitora kao što i relativno visoka unutarstanična koncentracija ATP-a ograničava potentnost ATP kompetitivnih kinaznih inhibitora u fiziološkim uvjetima (Duong-Ly i Peterson, 2013). U usporedbi s kompetitivnim inhibitorima, alosterički ATP-nekompetitivni kinazni inhibitori nisu osjetljivi na unutarstaničnu koncentraciju ATP-a. Oni se vežu na neočuvane regije kinaza pa postoji mogućnost razvoja selektivnijih inhibitora. Ove prednosti mogu se postići i kovalentnim vezanjem takvih inhibitora na kinaznu metu. Povećano vrijeme zadržavanja ovakvih inhibitora pruža mogućnost za poboljšanje efikasnosti i selektivnosti (Duong-Ly i Peterson, 2013).

Budući da se ovi inhibitori vežu za regije koje su jedinstvene za pojedine kinaze, selektivniji su od ATP-kompetitivnih inhibitora. Primjer inhibitora ove skupine je 2,2' – dihidroksi-1,1'-dinaftildisulfid (IPA-3) koji inhibira, tj. stabilizira Pak1 autoinhibitorski kompleks (Slika 5) (Duong-Ly i Peterson, 2013). Autoinhibitorski Pak1 je dimer sastavljen od regulatorne domene koja je vezana za katalitičku domenu i sprečava njezinu aktivnost. Ova autoinhibicija prestaje prilikom vezanja na p21 GTP-vezujuće proteine Rac ili Cdc42. IPA-3 se kovalentno veže na Pak1 regulatornu domenu te sprečava vezanje navedenih proteina (Duong-Ly i Peterson, 2013).

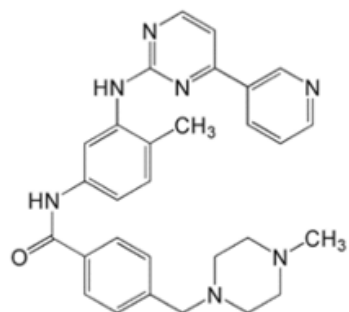
Drugi primjer alosteričkog kinaznog inhibitora je GNF-2 koji je alternativa imatinibu za inhibiciju Bcr-Abl kinaze (Duong-Ly i Peterson, 2013). Nekoliko mutacija u c-Abl odgovorne su za rezistenciju na imatinib. Neki od mutiranih oblika kinaze osjetljivi su na GNF-2 koji inhibira kinazu stabilizirajući njezinu inaktivnu konformaciju kinazne domene. Divlji tip c-Abl je miristoiliran, odnosno vezanjem miristoilne grupe na mjesto na C-kraju stabilizira inaktivnu formu c-Abl kinaze. Budući da Bcr-Abl fuzijski oblik ne može biti miristoiliran, ne postoji adekvatan autoinhibitorski mehanizam. Vezanje GNF-2 na Bcr-Abl oponaša vezanje miristoilne skupine na divlji tip c-Abl te na taj način stabilizira inaktivnu formu Bcr-Abl kinaze (Zhang i sur., 2010). Na Slici 6 vidi se da se GNF-2 i imatinib vežu na različita mjesta na kinazi te zbog toga pojava rezistencije na imatinib ne utječe na učinkovitost GNF-2.



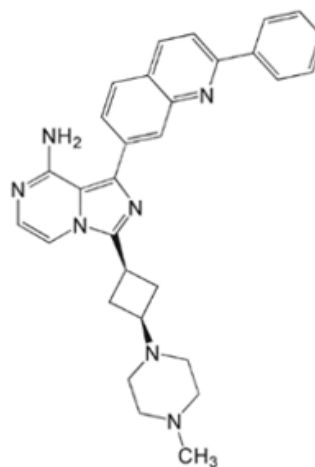
erlotinib



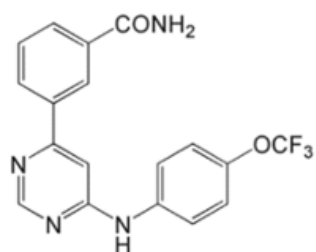
gefitinib



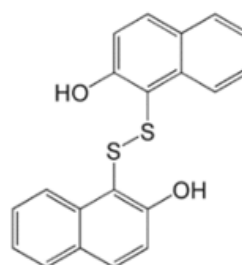
imatinib



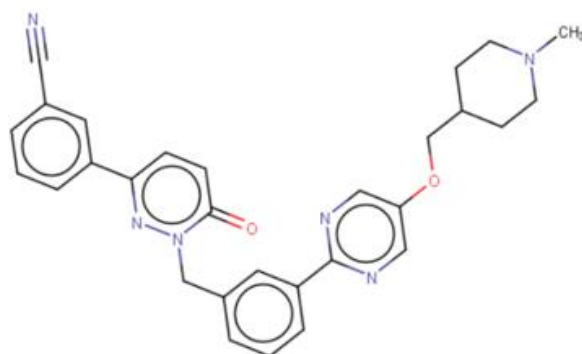
PQIP



GNF-2

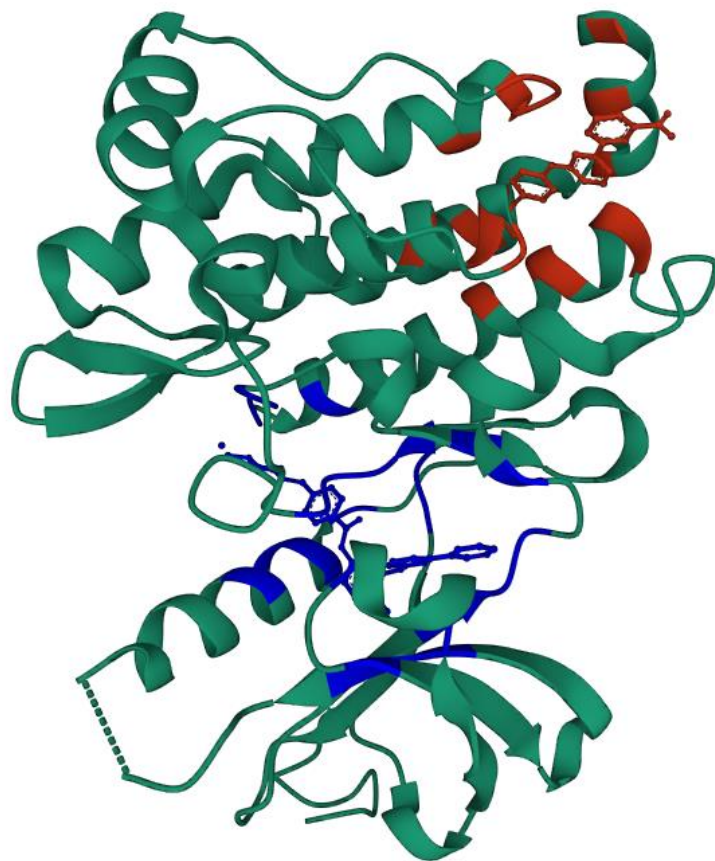


IPA-3



tepotinib

Slika 5. Prikaz kinaznih inhibitora opisanih u ovom odlomku. PQIP = cis-3-[3-(4-metil-piperazin-1-il)-ciklobutil]-1-(2fenil-kinolin-7-il)-imidazo[1,5-a]pirazin-8-ilamin;  
GNF-2 = 3-(6-((4-(Trifluorometoksi)fenil)amino)pirimidin-4-il)benzamid.  
IPA-3 = 2,2'-dihidroksi-1,1'-dinaftildisulfid



Slika 6. Prikaz veznih mjesta ATP-kompetitivnog inhibitora imatiniba (plavo) i ne-kompetitivnog inhibitora GNF-2 (crveno) na Bcr-Abl kinazi (PDB zapis 3K5V). Prikaz je napravljen korištenjem alata na Protein Data Bank web stranici.

## 1.5. Molekulsko uklapanje

Razvoj inhibitora protein kinaza, kao i ostalih vrsta lijekova mijenja se sa razvojem suvremene tehnologije. Broj poznatih kristalnih struktura u javno dostupnim bazama, primarno ProteinDataBank, je danas oko 200 000 (Kitchen i sur., 2004, <https://www.rcsb.org/>). Tome je tako zbog poboljšanja tehnologija za određivanje strukture, npr. visokoprotodne kristalografije X-zrakama te primjene kriogenske transmisivne elektronske mikroskopije (*cryo-EM*) (Blundell i sur., 2002).

Danas su računalne metode ključni dio rane faze u procesu otkrivanja lijekova. Računalne metode se koriste za identifikaciju *hit* molekula s  $\mu\text{M}$  afinitetom vezanja za danu metu kroz virtualni probir baziran na strukturi poznatih liganda ili strukturi biološke mete (*lead-/structure-based virtual screening*) te za optimizaciji tzv. *lead* molekula sa sub- $\mu\text{M}$  aktivnosti (Kitchen i sur., 2004, Wang i sur., 2019). Jedna od ključnih metoda – molekulsko uklapanje (*molecular docking*) malih molekula u vezno mjesto proteina – razvila se tijekom ranih 1980-ih godina i još uvijek je područje aktivnog razvoja (Gohlke i Klebe, 2002, Wang i sur., 2019). Virtualno uklapanje se primarno koristi kao visokoprotodni pristup za identifikaciju *hit* molekula iz velikog skupa molekula (par desetaka tisuća do milijun) kada je dostupna struktura mete i poznato aktivno odnosno vezno mjesto. Međutim, slični računalni pristupi koriste se i u kasnijim fazama razvoja za optimizaciju *lead* molekula, za pronalaženje strukturnih modifikacija na već aktivnim spojevima koji povećavaju afinitet vezanja na danu metu kroz postizanje boljih međumolekulskih interakcija (Kitchen i sur., 2004).

Proces molekulskog uklapanja uključuje predviđanje načina vezanja liganda, tj. konformacije liganda i njegov smještaj i orijentaciju unutar veznog mjesta ciljnog proteina. Općenito, postoje dva cilja molekulskog uklapanja: predviđanje vezne konformacije i smještaja u veznom mjestu i predviđanje jačine vezanja (tzv. *docking or binding score*) (Kitchen i sur., 2004, Brooijmans i Kuntz, 2003). Proces započinje primjenom algoritama koji postavljaju malu molekulu u aktivno mjesto mete i traže njene moguće konformacije u tom mjestu. Ovaj korak je računski izazovan iz razloga što kemijski spojevi mogu imati puno konformacijskih stupnjeva slobode, tj. mogu biti fleksibilni (Kitchen i sur., 2004) pri čemu za svaku generiranu konformaciju u veznom mjestu treba procijeniti i afinitet/ jačinu vezanja. Afinitet vezanja svake moguće vezne konformacije se aproksimira pomoću funkcije bazirane na upotrebi tzv. polja sila (tzv. *scoring function*). Proces vezanja liganda na metu vođen je kombinacijom entalpijskih i entropijskih učinaka čiji doprinosi ovise o ciljnom proteinu i o klasama spojeva koji se istražuju. To ponekad

predstavlja problem za funkcije ocjenjivanja/bodovanja, tj. procjenu energije vezanja jer one općenito stavljaju veći naglasak na entalpijski doprinos nego na entropijski koji za vezanje neke klase spojeva na proučavanu metu može biti važniji (Kitchen i sur., 2004). Postoje različiti pristupi tj. programi za molekularno uklapanje koji se razlikuju u načinu pretraživanja mogućih načina vezanja spojeva i funkcija za procjenu afiniteta ili energije vezanja. U ovom radu je korišten program Glide koji je dostupan unutar paketa za molekularno modeliranje od Schrödingera.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Rak je stoljećima ozbiljna prijetnja ljudskom zdravlju diljem svijeta, a njegova prevalencija raste zabrinjavajućom brzinom. Prema globalnoj statistici o raku (GLOBOCAN 2020), doći će do porasta za oko 47% u učestalosti raka do 2040. Uz stalne istraživačke napore znanstvenika i kliničara, višestruki modaliteti liječenja poput kirurgije, kemoterapije, radioterapije i imunoterapije razvijani su i poboljšavani tijekom niza godina te su intervencije liječenja dovele do smanjenja smrtnosti stope za oboljele od raka. Međutim, terapija općenito ne djeluje jednako uspješno za sve pacijente oboljele od malignih bolesti zbog razlike u osjetljivosti raka, odnosno vrsti raka, razvoju terapijske rezistencije i nuspojavama.

Posljednjih godina, različiti polifenolni spojevi biljnog podrijetla predmet su brojnih studija zbog blagotvornog učinka na ljudsko zdravlje. Polifenoli i drugi spojevi porijeklom iz lista, ploda i ulja masline u studijama iskazuju kemoprotektivno i antikancerogeno djelovanje na različitim vrstama stanica raka; raka dojke, debelog crijeva, prostate, melanoma, promijelocitične leukemije i dr.

U ovom diplomskom radu primjenom *in silico* metoda istražena je potencijalna antikancerogena djelotvornost spojeva porijeklom iz masline kroz modeliranje njihovog vezanja na metu, enzim protein kinazu HGFR/c-Met. Protein kinaza c-Met je neizostavni dio metabolizma i njegove regulacije te igra važnu ulogu u razvoju raznih bolesti. Prekomjerno je eksprimirana u raznim vrstama karcinoma te se koristi kao meta djelovanja nekoliko kemoterapeutika.

Za *in silico* eksperimentalni dio ovog rada formirana je biblioteka od dvije podgrupe spojeva: 17 spojeva koji su poznati inhibitori HGFR/c-Met kinaze i 31 spoj koji se nalaze u maslini (*Olea europea* L.). Od alata korišteni su web usluga SwissTargetPrediction za brzo određivanje mogućih meta za spojeve iz masline i računalni program Glide za molekulske uklapanje u ATP-vezno mjesto kinaze HGFR/c-Met.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Stvaranje virtualne biblioteke spojeva za molekulske uklapanje

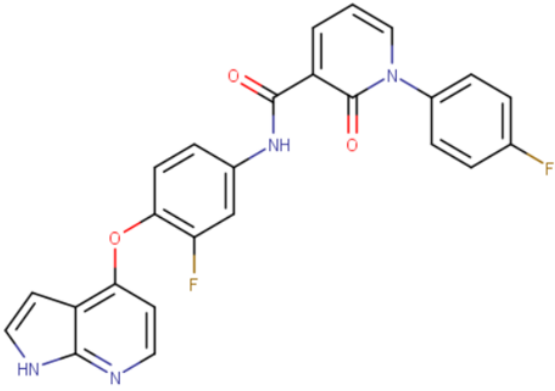
Skup molekula odabranih za molekulske uklapanje ili općenito neki (*in vitro* ili *in silico*) eksperiment naziva se biblioteka (*library*). Za istraživački dio ovog rada, biblioteka je formirana od dvije podgrupe spojeva: 17 spojeva koji su poznati inhibitori HGFR/c-Met kinaze (Slika 7, Tablica 2) i 31 spoj koji su sastavni dio biljke *Olea europea* (Slika 8, Tablica 3). Adenozin trifosfat (ATP) kao nativni ligand HGFR/c-Met kinaze također je uvršten u biblioteku.

Spojevi iz masline preuzeti su sa virtualne baze OliveNet™ (<https://mccordresearch.com.au/library/>). Odabirom određenog spoja, web preglednik preusmjerava na web lokaciju na PubChem bazu (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) gdje je preuzeta njegova 3D struktura u sdf formatu. OliveNet™ baza sadržava 676 spojeva povezanih s maslinom (*Olea europea*) od kojih je 222 fenolnih spojeva (Bonvino i sur., 2018). Spojevi su identificirani iz 181 znanstvene publikacije, a informacije o njihovoj farmakološkoj aktivnosti pronađene su u bazama PubChem, HMDB (*Human Metabolome Database*) i ChEBI (*Chemical Entities of Biological Interest*).

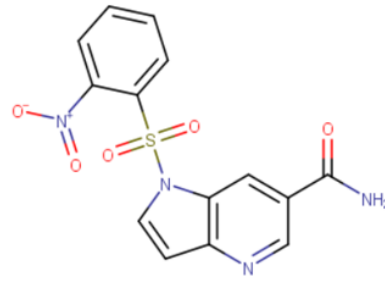
Poznati inhibitori HGFR/c-Met kinaze pronađeni su u bazi UniProt pretraživanjem stranice za HGFR (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P08581/entry#structure>) pod odjeljkom *Disease & Variants*. Kako je svaki inhibitor spojen preko hiperveze na bazu DrugBank, njihove strukture su preuzete s DrugBank-a također u sdf formatu.

Zapisi 3D struktura molekula u sdf formatu su korišteni kao ulazni podaci za program za molekulske uklapanje *Glide*. Točna priprema molekula liganada za molekulske uklapanje opisana je u poglavlju 3.3.2. Na Slikama 7 i 8, c-Met inhibitori i spojevi iz masline prikazani su u 2D prikazu, dok su u tablicama 2 i 3 dani zapisi/reprezentacije njihovih struktura u 1D zapisu SMILES. SMILES zapisi su korišteni kao ulazni podaci za pretraživanje mogućih meta spojeva na web-servisu SwissTargetPrediction. SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) je linijski zapis kemijske strukture koji omogućava predstavljanje kemijske strukture računalnim programima koristeći ASCII znakove (Šegota i sur., 2021).

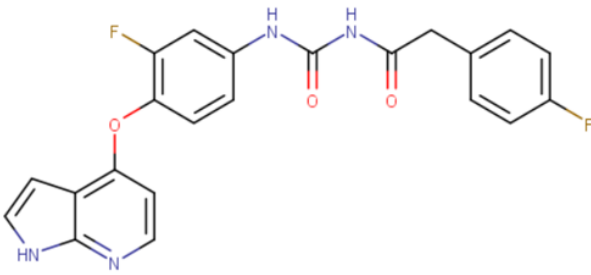




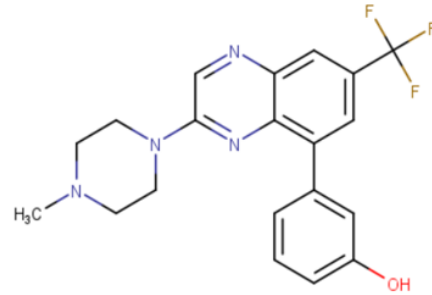
Spoj A



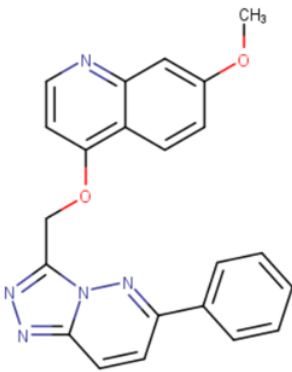
Spoj B



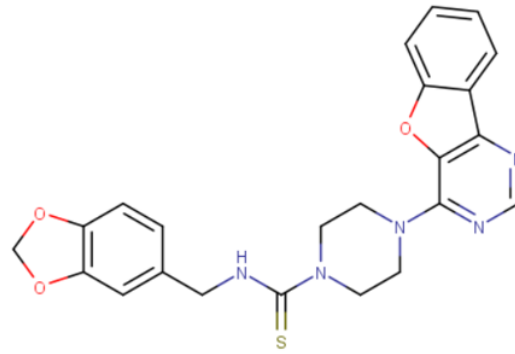
Spoj C



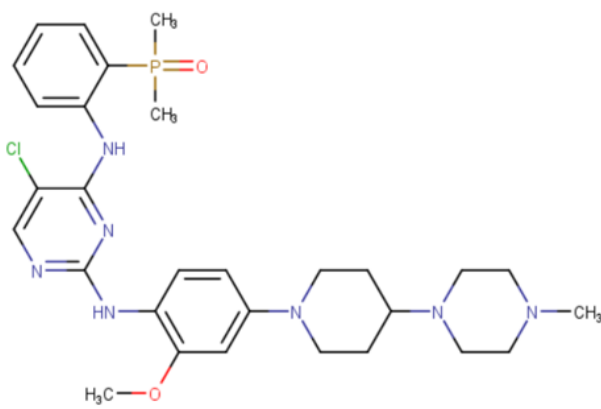
Spoj D



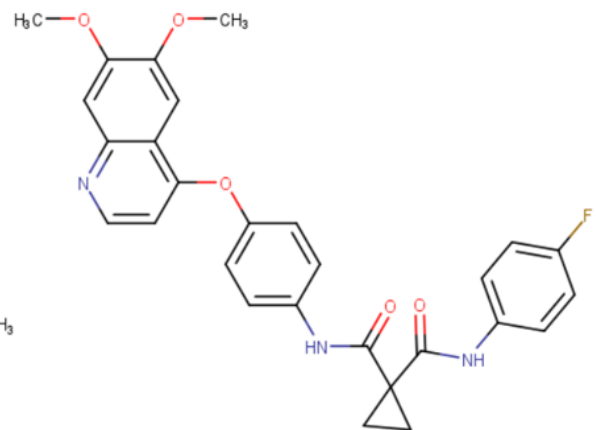
AMG - 208



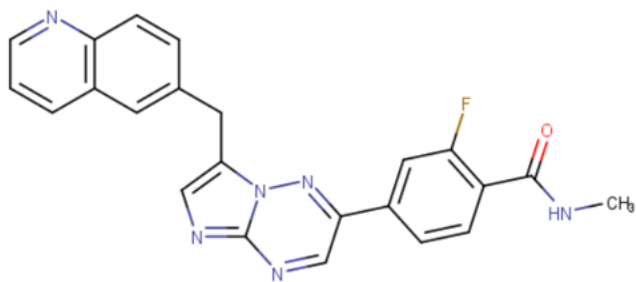
Amuvatinib



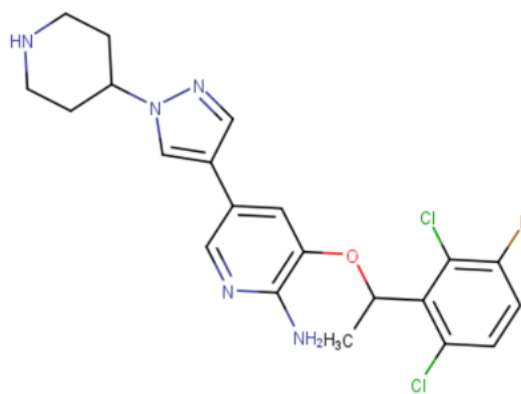
Brigatinib



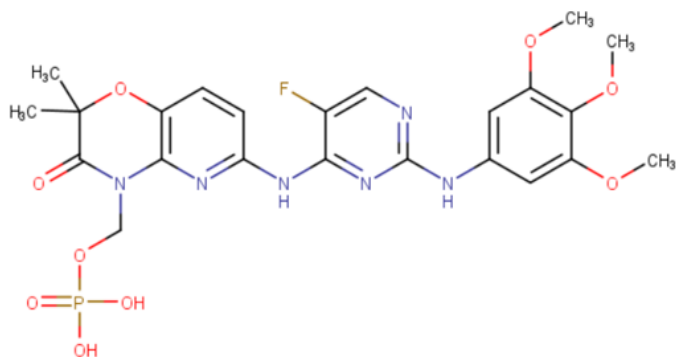
Cabozatinib



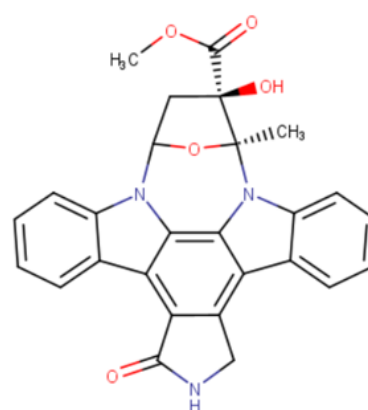
Capmatinib



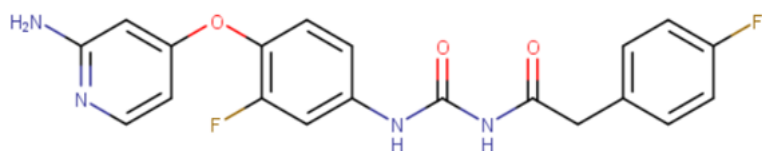
Crizotinib



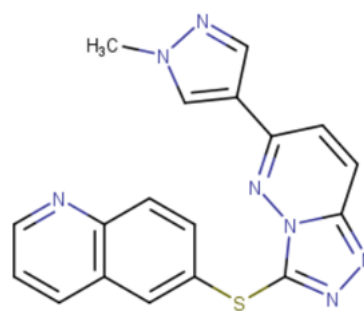
Fostamatinib



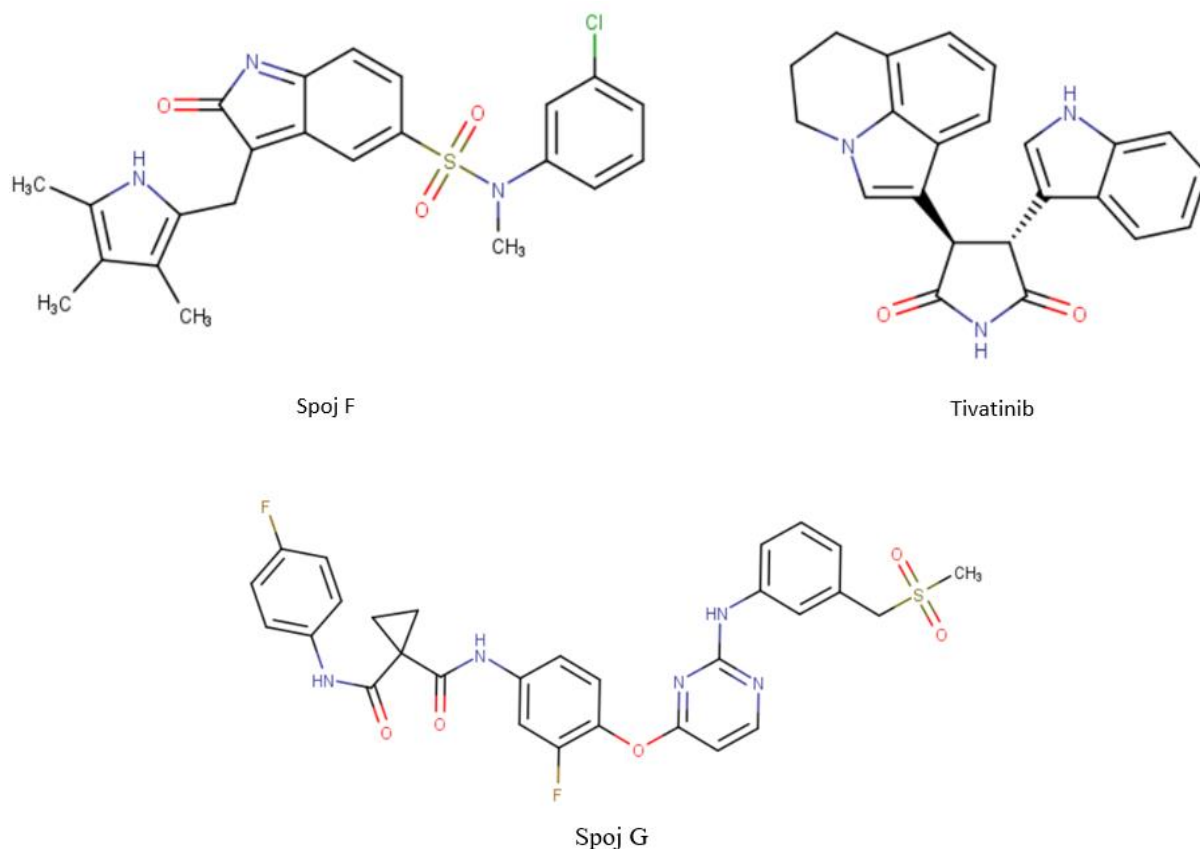
K252a



Spoj E



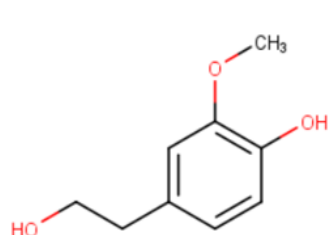
SGX - 523



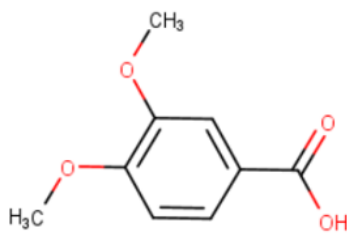
Slika 7. Prikaz 2D struktura i imena spojeva s inhibitornim učinkom na HGFR/c-Met kinazu. Spoj A = 1-(4-fluorophenyl)-N-[3-fluoro-4-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-yloxy)phenyl]-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide; Spoj B = 1-[(2-Nitrophenyl)sulfonyl]-1H-pyrrolo[3,2-B]pyridine-6-carboxamide; Spoj C = 2-(4-fluorophenyl)-N-{[3-fluoro-4-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-4-yloxy)phenyl]carbonyl}acetamide; Spoj D = 3-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)-7-(trifluoromethyl)quinoxalin-5-yl]phenol; Spoj E = N-({4-[(2-aminopyridin-4-yl)oxy]-3-fluorophenyl}carbonyl)-2-(4-fluorophenyl)acetamide; Spoj F = N-(3-chlorophenyl)-N-methyl-2-oxo-3-[(3,4,5-trimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl]-2H-indole-5-sulfonamide; Spoj G = N-(3-fluoro-4-{2-[(3-[(methylsulfonyl)methyl]phenyl} amino)pyrimidin-4-yl]oxy}phenyl)-N'-(4-fluorophenyl)cyclopropane-1,1-dicarboxamide

Tablica 2. Imena i SMILES zapisi 17 poznatih inhibitora HGFR/c-Met kinaza (Slika 7) u biblioteci. (Imena spojeva A, B, C, D, E, F definirana su u opisu Slike 7)

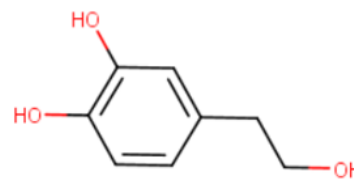
IME SPOJA	SMILES
Spoj A	<chem>FC1=CC=C(C=C1)N1C=CC=C(C(=O)NC2=CC=C(OC3=CC=NC4=C3C=CN4)C(F)=C2)C1=O</chem>
Spoj B	<chem>NC(=O)C1=CN=C2C=CN(C2=C1)S(=O)(=O)C1=CC=CC=C1[N+](=O)[O-]</chem>
Spoj C	<chem>FC1=CC=C(CC(=O)NC(=O)NC2=CC(F)=C(OC3=CC=NC4=C3C=CN4)C=C2)C=C1</chem>
Spoj D	<chem>CN1CCN(CC1)C1=NC2=C(C=C(C=C2N=C1)C(F)(F)F)C1=CC(O)=CC=C1</chem>
AMG - 208	<chem>COC1=CC2=NC=CC(OCC3=NN=C4C=CC(=NN34)C3=CC=CC=C3)=C2C=C1</chem>
Amuvatinib	<chem>S=C(NCC1=CC=C2OCOC2=C1)N1CCN(CC1)C1=NC=NC2=C1OC1=C2C=CC=C1</chem>
Brigatinib	<chem>COC1=CC(=CC=C1NC1=NC=C(C1)C(NC2=CC=CC=C2P(C)(C)=O)=N1)N1CCC(CC1)N1CCN(C)C=C1</chem>
Cabozatinib	<chem>COC1=CC2=C(C=C1OC)C(OC1=CC=C(NC(=O)C3(CC3)C(=O)NC3=CC=C(F)C=C3)C=C1)=CC=N2</chem>
Capmatinib	<chem>CNC(=O)C1=C(F)C=C(C=C1)C1=NN2C(CC3=CC4=C(C=C3)N=CC=C4)=CN=C2N=C1</chem>
Crizotinib	<chem>[H][C@](C)(OC1=CC(=CN=C1N)C1=CN(N=C1)C1CCNCC1)C1=C(C1)C=CC(F)=C1Cl</chem>
Fostamatinib	<chem>COC1=CC(NC2=NC=C(F)C(NC3=NC4=C(OC(C)(C)C(=O)N4COP(O)(O)=O)C=C3)=N2)=CC(OC)=C1OC</chem>
K252a	<chem>[H][C@]12C[C@](O)(C(=O)OC)[C@](C)(O1)N1C3=C(C=CC=C3)C3=C4CNC(=O)C4=C4C5=CC=CC=C5N2C4=C13</chem>
Spoj E	<chem>NC1=NC=CC(OC2=C(F)C=C(NC(=O)NC(=O)CC3=CC=C(F)C=C3)C=C2)=C1</chem>
Spoj F	<chem>CN(C1=CC(Cl)=CC=C1)S(=O)(=O)C1=CC2=C(CC3=C(C)C(C)=C(C)N3)C(=O)N=C2C=C1</chem>
SGX - 523	<chem>CN1C=C(C=N1)C1=NN2C(SC3=CC=C4N=CC=CC4=C3)=NN=C2C=C1</chem>
Tivantinib	<chem>O=C1NC(=O)[C@H]([C@@H]1C1=CNC2=CC=CC=C12)C1=CN2CCCC3=C2C1=CC=C3</chem>
Spoj G	<chem>CS(=O)(=O)CC1=CC(=CC=C1)NC2=NC=CC(=N2)OC3=C(C=C(C=C3)NC(=O)C4(CC4)C(=O)NC5=CC=C(C=C5)F)F</chem>



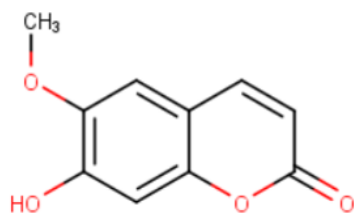
3,4-Dimetoksibenzoična  
kiselina



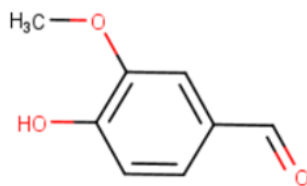
Homovanilin alkohol



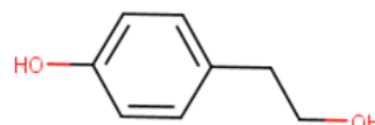
Hidroksitirozol



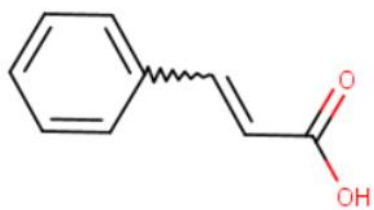
Skopoletin



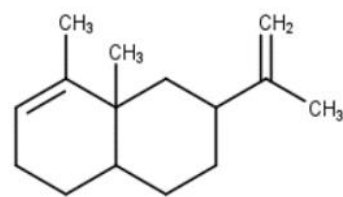
Vanillin



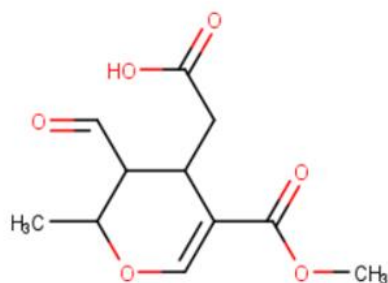
Tirosol



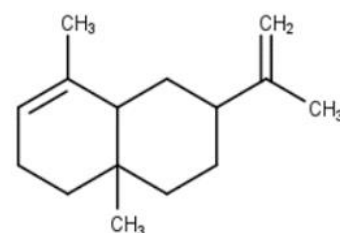
Cimetna kiselina



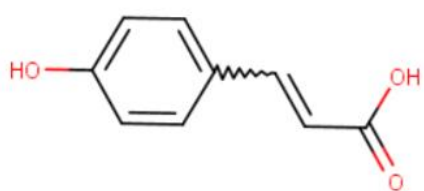
Eremofilen



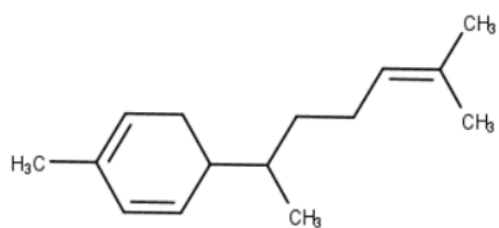
Elanonska kiselina



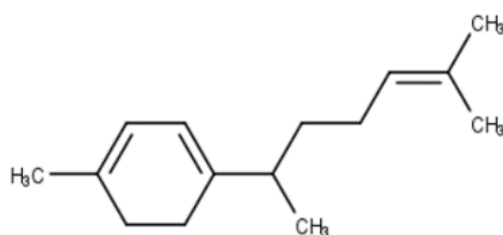
$\alpha$ -Selinen



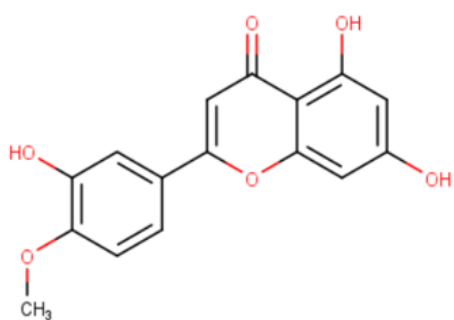
4-Hidroksicimetna kiselina



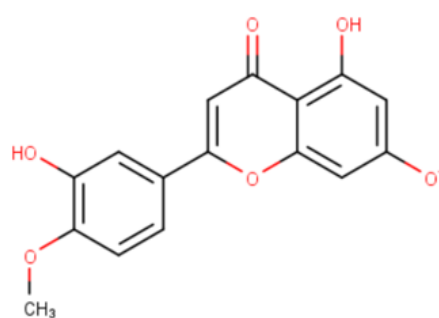
$\alpha$ -Zingiberen



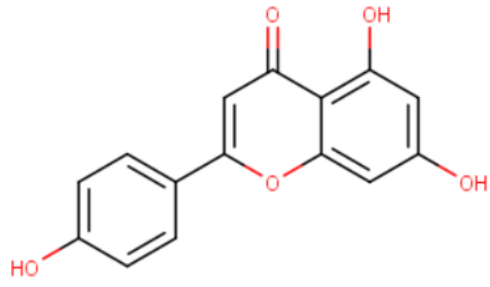
$\gamma$ -Kurkumen



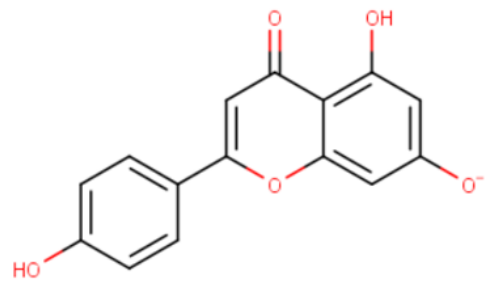
Diosmetin



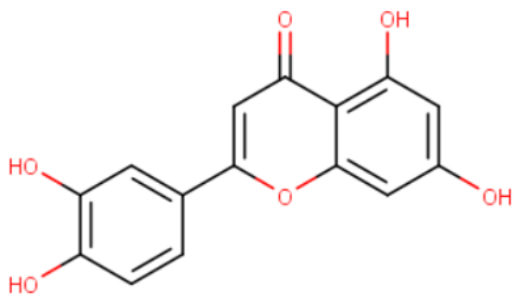
anion Diosmetina



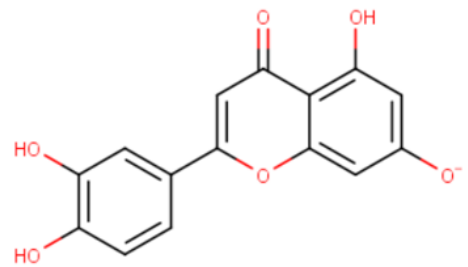
Apigenin



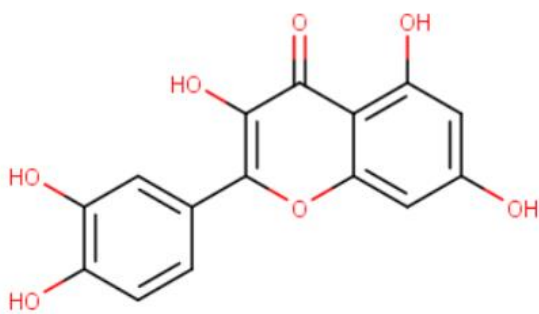
anion Apigenina



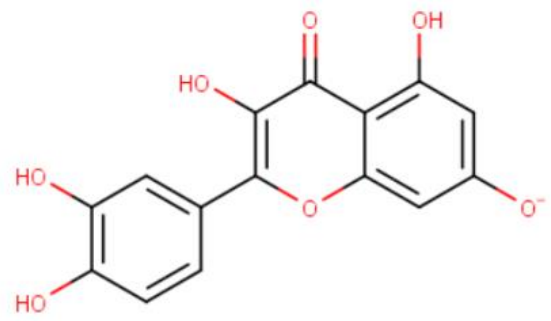
Luteolin



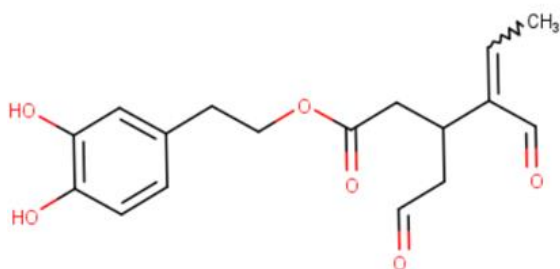
anion Luteolina



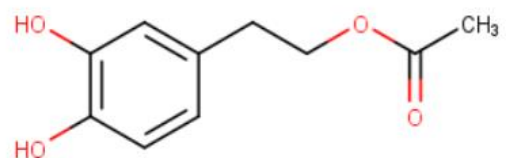
Kvercetin



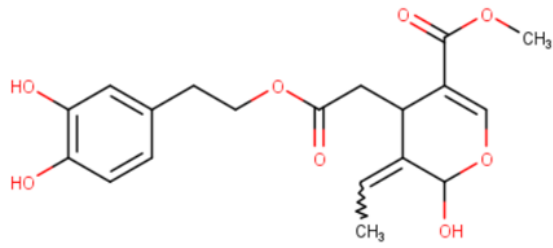
anion Kvercetina



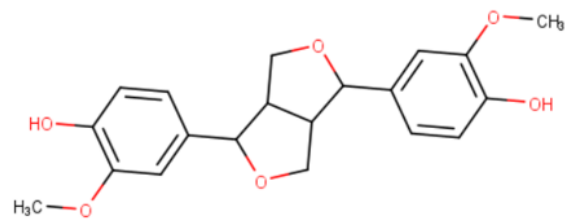
Oleacein



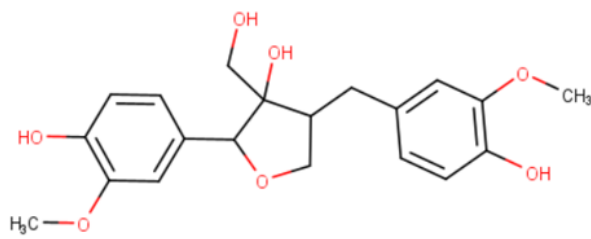
Hidroksitirozol  
acetat



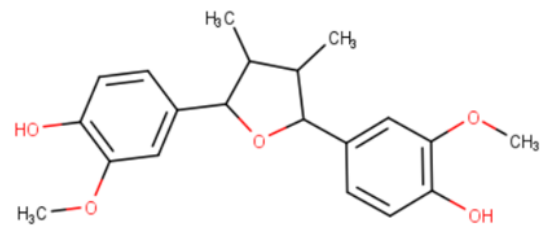
Oleuropein aglikon



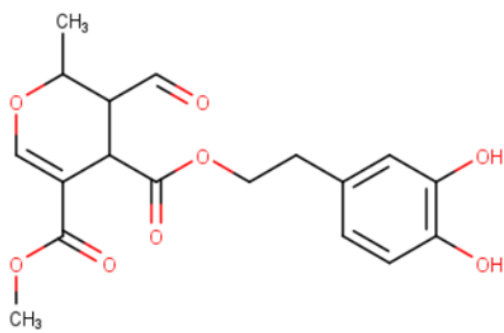
(+)-Pinorezinol



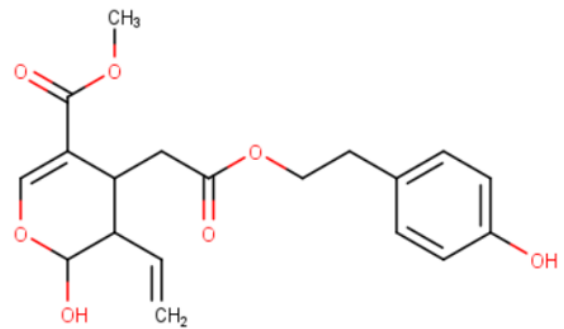
Berhemol



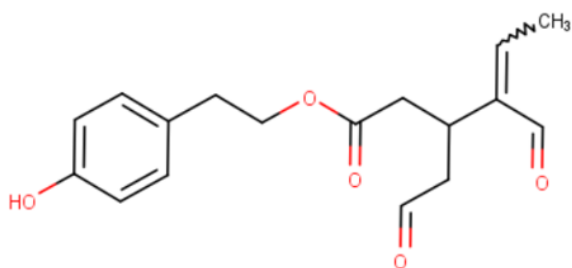
(+)-Verukozin



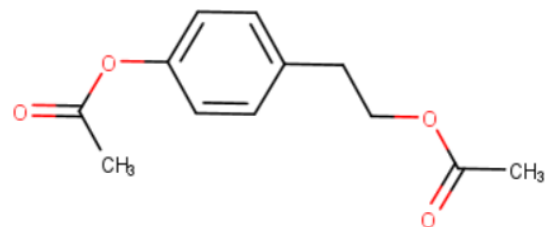
Hidroksitirozil elanolat



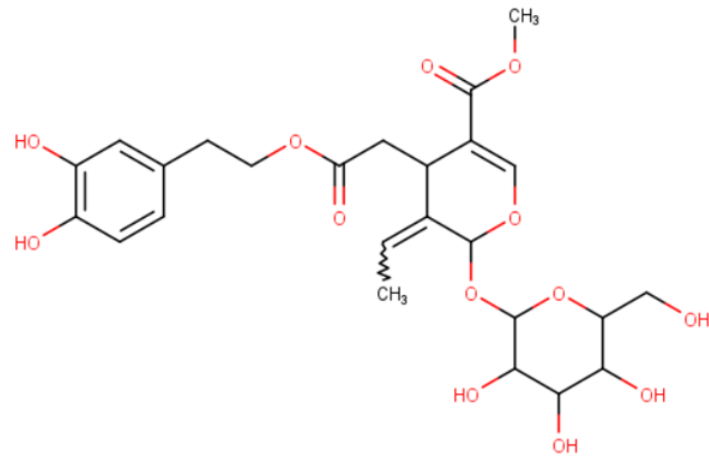
Ligstrozid aglikon



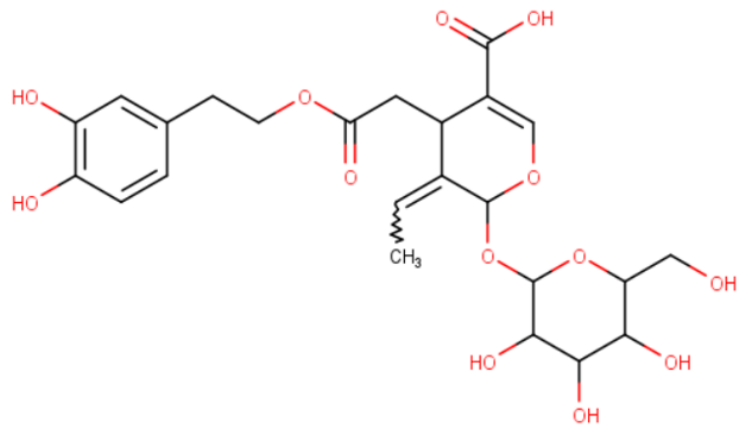
Oleokantal



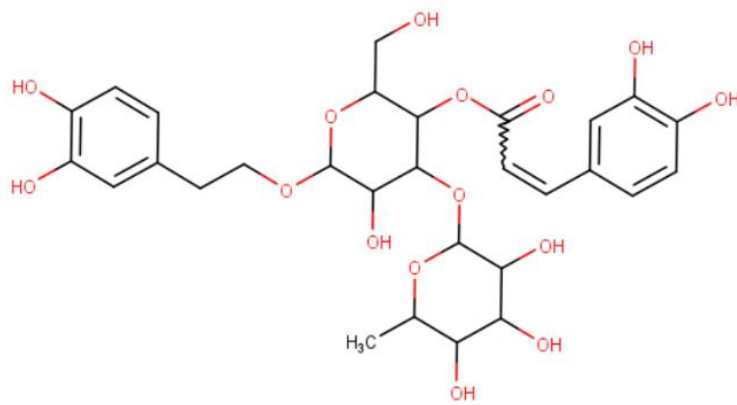
Tirozol acetat



Oleuropein

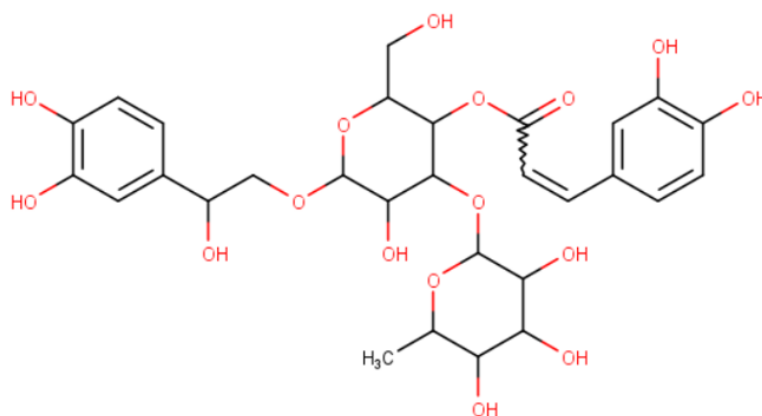


Demetiloleuropein



Verbaskozid





β-hidroksi Verbaskozid

Slika 8. Prikaz 2D struktura i nazivi spojeva iz biljne vrste maslina (*Olea europea*) koje su sastavni dio virtualne biblioteke za molekulske uklapanje.

Tablica 3. Naziv i SMILES zapis 31 odabranih spojeva iz biljne vrste *Olea europea* koji su sastavni dio biblioteke (Slika 8).

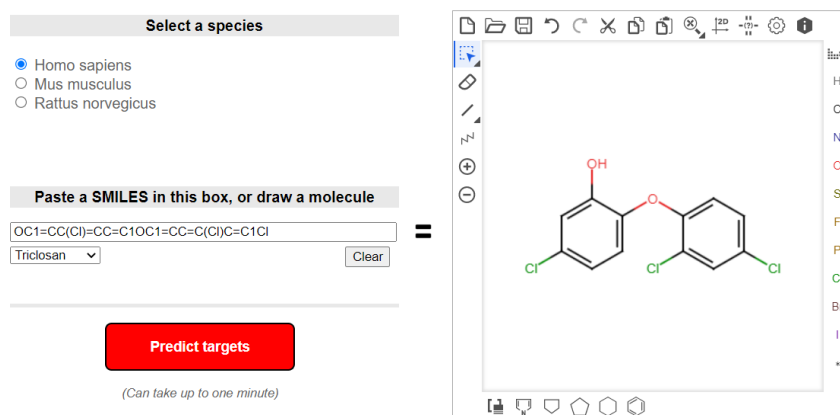
Naziv spoja	SMILES
3,4-Dimetoksi benzoična kiselina	<chem>COC1=C(C=C(C=C1)C(=O)O)OC</chem>
4-Hidroksicimetna kiselina	<chem>C1=CC(=CC=C1C(=O)O)O</chem>
α-Selinen	<chem>CC1=CCCC2(C1CC(C2)C(=C)C)C</chem>
Apigenin	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O</chem>
Berhemol	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)CC2COC(C2(CO)O)C3=CC(=C(C=C3)O)OC)O</chem>
β-hidroksi verbaskozid	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2C(C(OC(C2OC(=O)C=CC3=CC(=C(C=C3)O)O)CO)OCC(C4=CC(=C(C=C4)O)O)O)O)O)O</chem>
Cimetna kiselina	<chem>C1=CC=C(C=C1)C=CC(=O)O</chem>
Demetiloleuropein	<chem>CC=C1C(C(=COC1OC2C(C(C(C(O2)CO)O)O)O)C(=O)O)CC(=O)OCCC3=CC(=C(C=C3)O)O</chem>
Diosmetin	<chem>COC1=C(C=C(C=C1)C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O</chem>
Elenolna kiselina	<chem>CC1C(C(C(=CO1)C(=O)OC)CC(=O)O)C=O</chem>

Eremofilen	<chem>CC1=CCCC2C1(CC(CC2)C(=C)C)C</chem>
γ-Kurkumen	<chem>CC1=CC=C(CC1)C(C)CCC=C(C)C</chem>
Homovanilil alkohol	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)CCO)O</chem>
Hidroksi-tirozil elanoat	<chem>CC1C(C(C(=CO1)C(=O)OC)C(=O)OCCC2=CC(=C(C=C2)O)O)C=O</chem>
Hidroksi-tirozol	<chem>C1=CC(=C(C=C1CCO)O)O</chem>
Hidroksitirozol acetat	<chem>CC(=O)OCCC1=CC(=C(C=C1)O)O</chem>
Ligstrozid aglikon	<chem>COC(=O)C1=COC(C(C1CC(=O)OCCC2=CC=C(C=C2)O)C=C)O</chem>
Luteolin	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O</chem>
Oleacein	<chem>CC=C(C=O)C(CC=O)CC(=O)OCCC1=CC(=C(C=C1)O)O</chem>
Oleokantal	<chem>CC=C(C=O)C(CC=O)CC(=O)OCCC1=CC=C(C=C1)O</chem>
Oleuropein	<chem>CC=C1C(C(=COC1OC2C(C(C(C(O2)CO)O)O)O)C(=O)OC)CC(=O)OCCC3=CC(=C(C=C3)O)O</chem>
Oleuropein aglikon	<chem>CC=C1C(C(=COC1O)C(=O)OC)CC(=O)OCCC2=CC(=C(C=C2)O)O</chem>
(+)-pinorezinol	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C2C3COC(C3CO2)C4=CC(=C(C=C4)O)OC)O</chem>
(+)-verukozin	<chem>CC1C(C(OC1C2=CC(=C(C=C2)O)OC)C3=CC(=C(C=C3)O)OC)C</chem>
Kvercetin	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O)O</chem>
Skopoletin	<chem>COC1=C(C=C2C(=C1)C=CC(=O)O2)O</chem>
Tirozol	<chem>C1=CC(=CC=C1CCO)O</chem>
Tirozol acetat	<chem>CC(=O)OCCC1=CC=C(C=C1)OC(=O)C</chem>
Vanilin	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C=O)O</chem>
Verbaskosid	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2C(C(OC2OC(=O)C=CC3=CC(=C(C=C3)O)O)CO)OCCC4=CC(=C(C=C4)O)O)O)O)O</chem>
α-Zingiberen	<chem>CC1=CCC(C=C1)C(C)CCC=C(C)C</chem>

### 3.2. Web servis SwissTargetPrediction za predviđanje proteinskih meta

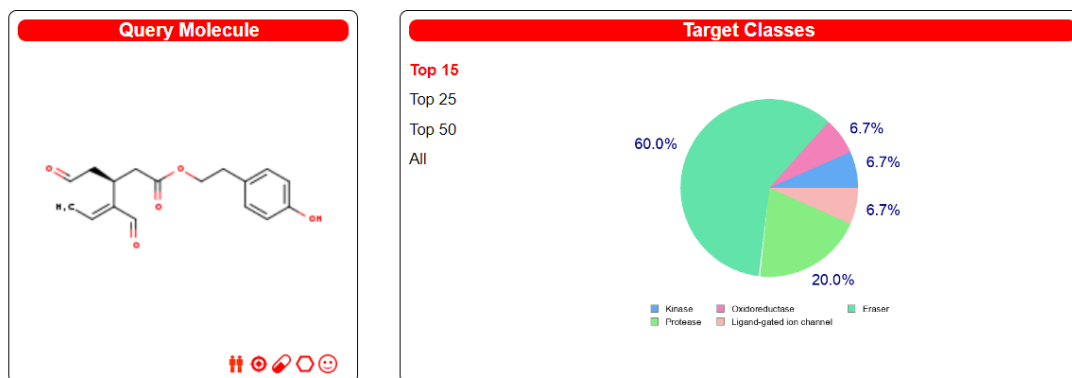
Za potrebe izrade ovog rada osim baza podataka s otvorenim pristupom korištena je i besplatna web usluga SwissTargetPrediction. Kako bi brzo odredili moguće mete za spojeve iz masline upotrijebili smo web uslugu formiranu za tu namjenu SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>). SwissTargetPrediction je razvijen na institutu Swiss Institute of Bioinformatics i dostupan je od 2014. godine (Daina i sur., 2019). Namijenjen je identifikaciji mogućih meta za ispitivani spoj/ligand. Općenito postoje dva pristupa kojim se mogu identificirati moguće mete uz pomoć računala s obzirom na to koristi li se trodimenzionalna struktura proteina ili liganada. Ukoliko se koristi struktura proteina, pristup se naziva *structure-based target prediction* (SBDD) odnosno predviđanje meta bazirano na strukturi proteina. Drugi način koji predviđa moguću metu na temelju struktura/konformacija poznatih liganada (inhibitora, agonista ili antagonista) naziva se *ligand-based target prediction* (LBDD) (Daina i sur., 2019). To znači da se spoj, za kojeg se želi predvidjeti meta, uspoređuje po sličnosti 2D i/ili 3D struktura sa strukturama spojeva iz baza podataka kojima je poznata meta. SwissTargetPrediction je baziran na LBDD pristupu. Kao ulazna informacija koristi se SMILES zapis, a moguće je i nacrtati/učitati željenu strukturu u prostor namijenjen za to (Slika 9). SwissTargetPrediction uspoređuje 2D i 3D strukture spoja sa strukturama spojevima za koje je eksperimentalno dokazano da su aktivni na 2092 ljudska, 535 štakorska i 441 mišja proteina (Daina i sur., 2019). U slučaju usporedbe 2D struktura kao mjera sličnosti koristi se Tanimoto indeks pri čemu su spojevi opisani tzv. FP2 binarnim *fingerprintima*. Binarni *fingerprint* je 1D reprezentacija molekula s obzirom na prisutnost (1) ili odustnost definiranih strukturnih fragmenata u njoj strukturi. FP2 fingerprint se zasniva na prisutnosti linearnih strukturnih segmenata do 7 atoma. Tanimoto indeks kao mjera sličnosti dva spoja se definira kao omjer broja zajedničkih strukturnih elemenata/fragmenta i ukupnog broja različitih fragmenta u obje molekule. Kao mjeru sličnosti 3D struktura SwissTargetPrediction koristi Manhattanovu udaljenost između molekula prikazanih u tzv. ES5D vektorskoj reprezentaciji. Manhattanova udaljenost ( $d = \sum_{s=1}^{18} |x_s - y_s|$ ) koristi se za usporedbu 18D vektora ( $x$  i  $y$ ) koji opisuju dvije različite molekule. Svaki ES5D vektor opisuje spoj po obliku, naboju i lipofilnosti i računa se iz 20 predviđenih konformacija za molekulu. Konačna vrijednost 3D sličnosti između molekule  $i$  i  $j$  dobiva se izrazom  $1 / (1 + \frac{1}{18}d_{i,j})$  pri čemu je  $d_{i,j}$  najmanja Manhattanova udaljenost između 20x20 udaljenosti izračunatih između svih konformacija molekula. Svaka od mjera sličnosti ima svoj prag odnosno vrijednost koja određuje je li sličnost dostatna. Za Tanimoto indeks prag

vrijednosti je 0,65, a za Manhattanovu udaljenost 0,85. Pretraživanje za spoj veličine prosječne molekule lijeka traje oko 15 do 20 sekundi.



Slika 9. Prikaz ulaznog sučelja SwissTargetPrediction usluge.

Rezultati pretraživanja (Slika 10) se mogu spremi u tekstualnom obliku. Rezultati su rangirani s obzirom na vjerojatnost da je protein meta ispitivane molekule. Vjerojatnost se izračunava iz 2D i 3D indeksa sličnosti naše molekule s najbližijim aktivnim molekulama unutar skupa svih aktivnih molekula za tu metu.



Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Hepatocyte growth factor receptor	MET	P08581	CHEMBL3717	Kinase	<div style="width: 60%;"></div>	211 / 4 <a href="#">↓</a>
Arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5	P09917	CHEMBL215	Oxidoreductase	<div style="width: 20%;"></div>	131 / 3 <a href="#">↓</a>
Histone deacetylase 6	HDAC6	Q9UBN7	CHEMBL1865	Eraser	<div style="width: 5%;"></div>	519 / 0 <a href="#">↓</a>
Histone deacetylase 2	HDAC2	Q92769	CHEMBL1937	Eraser	<div style="width: 5%;"></div>	273 / 0 <a href="#">↓</a>
Histone deacetylase 8	HDAC8	Q9BY41	CHEMBL3192	Eraser	<div style="width: 5%;"></div>	339 / 0 <a href="#">↓</a>
Histone deacetylase 5	HDAC5	Q9UQL6	CHEMBL2563	Eraser	<div style="width: 5%;"></div>	37 / 0 <a href="#">↓</a>
Histone deacetylase 1	HDAC1	Q13547	CHEMBL325	Eraser	<div style="width: 5%;"></div>	651 / 0 <a href="#">↓</a>
Histone deacetylase 11	HDAC11	Q96DB2	CHEMBL3310	Eraser	<div style="width: 5%;"></div>	66 / 0 <a href="#">↓</a>
Histone deacetylase 4	HDAC4	P56524	CHEMBL3524	Eraser	<div style="width: 5%;"></div>	77 / 0 <a href="#">↓</a>
Histone deacetylase 7	HDAC7	Q8WUJ4	CHEMBL2716	Eraser	<div style="width: 5%;"></div>	44 / 0 <a href="#">↓</a>
Bone morphogenetic protein 1	BMP1	P13497	CHEMBL3898	Protease	<div style="width: 5%;"></div>	139 / 0 <a href="#">↓</a>
Dipeptidyl peptidase IV	DPP4	P27487	CHEMBL284	Protease	<div style="width: 5%;"></div>	204 / 0 <a href="#">↓</a>
Histone deacetylase 3	HDAC3	O15379	CHEMBL1829	Eraser	<div style="width: 5%;"></div>	232 / 0 <a href="#">↓</a>
Serotonin 3a (5-HT3a) receptor (by homology)	HTR3A	P46098	CHEMBL1899	Ligand-gated ion channel	<div style="width: 5%;"></div>	21 / 0 <a href="#">↓</a>
Matrix metalloproteinase 3	MMP3	P08254	CHEMBL283	Protease	<div style="width: 5%;"></div>	345 / 0 <a href="#">↓</a>

Showing 1 to 15 of 100 entries

Previous 1 2 3 4 5 6 7 Next

Slika 10. Prikaz izlaznog SwissTargetPrediction sučelja za oleokantal. Tortni graf prikazuje udio klasa proteina za 15 najbolje rangiranih proteina kao potencijalnih meta. U tabličnom prikazu gledajući s lijeva na desno, u prvom stupcu nalaze se imena proteina koji su identificirani kao mete; u drugom stupcu prikazani su geni koji kodiraju za taj protein, i lijevim klikom miša na ime gena otvara se nova kartica u web pregledniku koja prikazuje gensku karticu tog gena na web stranici <https://www.genecards.org/>; treći stupac prikazuje Uniprot ID proteina dostupan lijevim klikom miša; četvrti stupac daje poveznicu na ChEMBL ID proteina; u petom stupcu nalazi se ime klase proteina; šesti stupac prikazuje vjerojatnost da je protein tog retka meta ispitivane molekule (napomena: prikazane vjerojatnosti ne ukazuju da ispitivana molekula ispoljava biološku aktivnost djelujući na pretpostavljenu metu, nego vjerojatnost da će se na metu vezati); u sedmom stupcu prvi/drugi broj prikazuje broj molekula aktivnih na danu metu kojima je slična ispitivana molekula uz korištenje 3D/2D struktura i pripadnih mjera sličnosti Manhattanova udaljenost / Tanimoto indeks.

### 3.3. Molekulsko uklapanje pomoću programa Glide

#### 3.3.1. Program Glide

U ovom diplomskom radu za istraživanje vezanja spojeva masline u kinazu c-Met korišteni su različiti Schrödingerovi algoritmi dostupni preko grafičkog sučelja Maestro, a molekulsko uklapanje provedeno je programom Glide (Glide verzija 2.5) (Friesner i sur., 2006., Friesner i sur., 2004.) Program Glide za pretraživanje načina vezanja liganda u definiranom veznom mjestu koristi hijerarhijski pristup pretraživanja (Slika 11). Ovaj algoritam za dani ligand prvo identificira skup realističnih konformacija variranjem unutarnjih torzijskih kutova i nakon toga pretražuje moguće pozicije i orijentacije tih konformacija u zadanom veznom mjestu koristeći metodu rešetke (Slika 12). Predefinirana rešetka opisuje ciljano vezno mjesto i reprezentirana je točkama u kojima je izračunati potencijal polja interakcija tj. doprinos energiji vezanja koji se koristi za ocjenjivanje položaja i konformacije liganada. Svaki generirani način vezanja (konformacija liganda plus smještaj u veznom mjestu) u procesu pretraživanja se boduje koristeći empirijsku funkciju ocjenjivanja stvorenu po uzoru na funkciju ChemScore. Najbolji načini vezanja se zatim kratko optimiziraju uz minimiziranje energije vezanja upotrebljavajući oblik polja sile OPLS-AA. Dobiveni načini vezanja se na kraju ocjenjuju koristeći točnije funkcije poznate pod imenima GlideScore SP ili GlideScore XP.



Slika 11. Hijerarhijski pristup određivanja načina vezanja liganda u ciljanom veznom mjestu pomoću programa Glide.

U prvom koraku pretraživanja konformacija i položaja u veznom mjestu, koristi se funkcija procjene afiniteta vezanja bazirana na tzv. funkciji ChemScore (Eldridge i sur., 1997). Ona se može zapisati na sljedeći način (Friesner i sur., 2004):

$$\Delta G_{\text{bind}} = C_0 + C_{\text{lipo}} \sum_i f(r_{\text{lr}}) + C_{\text{hbond}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + C_{\text{metal}} \sum_i f(r_{\text{lm}}) + C_{\text{rotb}} H_{\text{rotb}}$$

i uzima u obzir doprinose energiji vezanja od interakcija između lipofilnih atoma liganda i receptora (drugi član), vodikovih veza (treći član), interakcija između liganda i metalnog iona (npr. kofaktora, četvrti član) i entropijski doprinos uslijed promjene fleksibilnost zbog vezanja (peti član). U jednadžbi,  $f$ ,  $g$  i  $h$  su parametrizirane funkcije koje poprimaju vrijednosti ovisno o udaljenostima i veznim kutovima između atoma u interakciji. Npr. za vodikove veze,  $g(\Delta r)$  je 1,00 ako je H---X vodikova veza unutar 0,25 Å nominalne vrijednosti 1,85 Å, i doprinos se smanjuje linearno prema nuli kako se udaljenost povećava od 2,10 prema 2,50 Å. Slično tome,  $h(\Delta \alpha)$  je 1,00 ako je kut veze Z-H---X između 180° do 150° i smanjuje se prema nuli za promjenu kuta od 150° na 120°. Za konačno rangiranje predviđenih načina vezanja koristi se točnija GlideScore funkcija čiji oblik u tzv. SP (*standard precision*) modu predstavlja zbroj sljedećih doprinosa:

$$\Delta G_{\text{bind}} = C_{\text{lipo-lipo}} \sum_i f(r_{\text{lr}}) + C_{\text{hbond-neut-neut}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + C_{\text{hbond-neut-charged}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + C_{\text{hbond-charged-charged}} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + C_{\text{max-metal-ion}} \sum_i f(r_{\text{lm}}) + C_{\text{rotb}} H_{\text{rotb}} + C_{\text{polar-phob}} V_{\text{polar-phob}} + C_{\text{coul}} E_{\text{coul}} + C_{\text{vdw}} H_{\text{vdw}} + \text{solvatacija}$$

Prvi član odgovara doprinosu energiji vezanja uslijed interakcije lipofilnih dijelova liganda i receptora, drugi, treći i četvrti izraz opisuju vodikove veze između atoma liganda i receptora uzimajući u obzir ionizacijsko stanje atoma donora i akceptora, pri čemu je najvažniji drugi član. Peti izraz opisuje metal–ligand interakcije. Šesti izraz predstavlja entropijski doprinos od promjene u broju rotacija veza uslijed vezanja liganda. Sedmi izraz opisuje slučajeve u kojem se polaran, nevodikov atom može naći u hidrofobnoj regiji. Osmi i deveti izraz opisuju doprinose energija Coulombovih odnosno van der Waalsovih interakcija između liganda i receptora. Posljednji član uzima u obzir promjenu solvatacije nabijenih i polarnih skupina liganada i proteina uslijed njihovog vezanja.

### 3.3.2. Priprema spojeva/liganada za molekulske uklapanje

Pomoću Maestrovog modula *LigPrep*, 31 prirodni spoj iz masline i 17 sintetskih inhibitora kinaze HGFR/c-met su pripremljeni za molekulske uklapanje. Biblioteka 3D struktura svih spojeva je učitana u Maestro u sdf formatu. Propuštanjem kroz modul *LigPrep*, ulazne strukture su reoptimizirane korištenjem polja sile OPLS4 uz zadržavanje ulazne stereokemije. Uzeta je u obzir i moguća ionizacija spojeva kod fiziološkog pH 7.4 budući da su hidroksilne skupine polifenola kisele s ionizacijskim konstantama  $pK_a$  u rasponu od oko 7.5-8.5 (Stepanić i sur., 2013). U tu svrhu je korišten program *Epik*. Spojevi su prije uklapanja poravnani/preklopljeni upotrebom funkcije *Ligand Alignment* prema referentnom ligandu iz kristalne strukture 4MXC.

### 3.3.3. Priprema proteina c-Met za molekulske uklapanje

Za provedbu molekuskog uklapanja analizirano je više struktura kinaze c-Met dostupnih u bazi Protein Data Bank (PDB) (1R0P, 3DKC i 4MXC) (Tablica 4). Za pripremu ovih struktura za molekulske uklapanje korišten je Maestrov modul *Protein Preparation Wizard*. Iz kristalne strukture uklonjeni su sve molekule vode i dijelovi koji ne odgovaraju proteinu (tj. kokristalizirani inhibitor te ioni), asignirani su tipovi atoma i shodno tome dodani vodici. Nedostajući dijelovi proteina (na petlji daleko od veznog mjesta ATP-a) su nadopunjeni korištenjem algoritma *Prime*. Ionizirajuća stanja aminokiselinskih ostataka su određena kod pH 7.4 upotrebom algoritma *PROPKA* koji je također odredio H-veze unutar proteina. Naime, orijentacija hidroksilnih i tiolnih skupina, terminalnih amidnih skupina asparagina (Asn) i glutamina (Gln) i prstena histidina (His) se ne mogu odrediti iz kristalne strukture budući da se položaji vodikovih atoma ne mogu odrediti iz raspodjele elektronske gustoće. U pristupu rigidnog uklapanja, položaj tj. orijentacija OH grupa varira iz tog razloga. Ostavljena je mogućnost formiranja disulfidnih mostova. Konformacija proteina je zatim kratko minimizirana tako da se omogući relaksacija napregnutih dijelova do kojih je došlo uslijed gore opisanih modifikacija.

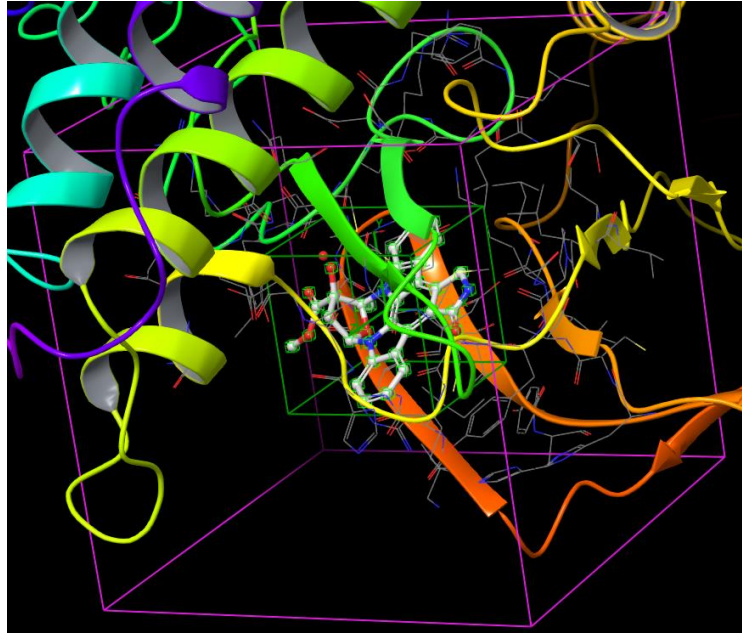


Tablica 4. PDB kodovi, kristalne rezolucije i ligandi sadržani u kompleksima kinaze c-Met s dva sintetska inhibitora i molekulom ATP. Naveden je i tip konformacije kinaze (za objašnjenje vidi poglavlje 4.2)

PDB kod	Rezolucija	Ligand	Konformacija
1R0P	1,80 Å	K252a	inaktivna
4MXC	1,63 Å	Spoj G	inaktivna
3DKC	1,52 Å	ATP	aktivna

#### 3.3.4. Protokol za molekulske uklapanje

Vezno mjesto u koje je provedeno uklapanje je definirano pomoću modula *Receptor Grid Generation*. Uklapanje je provedeno uz držanje strukture proteina fiksnom, tj. u tzv. rigidnom modu u kojem je moguća jedino slobodna rotacija OH grupa relevantnih aminokiselinskih ostataka. *Receptor Grid Generation* generira rešetku preko točaka u kojima se izračunavaju energijski doprinosi uslijed interakcije aminokiselinskih ostataka u definiranom veznom mjestu i uklapanih organskih liganada. Vezno mjesto je definirano pomoću središnjeg atoma u kokristaliziranom ligandu (Slika 12). Nakon što su određeni najbolji načini vezanja, provedena je relaksacija njihove strukture te izračunate ocjene vezanja pomoću funkcije GlideScore SP. Parametar RMSD (engl. *Root Mean Square Deviations*) za procjenu položaja vezanja uklopljenih struktura je određen prema referentom, kokristaliziranom ligandu.



Slika 12. Definicija veznog mjesta na primjeru strukture kinaze c-Met s PDB kodom 1R0P. Analogan pristup je korišten i za strukture 4MXC i 3DKC. Petlje,  $\beta$ -naborana ploča i  $\alpha$ -uzvojnice proteina prikazane su tzv. reprezentaciji *cartoon*. Ligand K252a je obojan bijelo i prikazan je u reprezentaciji kuglice-i-štapići. Pomoću linija su prikazani atomi i veze u aminokiselinskim ostacima koji su uključeni u definiciju veznog mjesta. Zeleni i ljubičasti paralelepiped zajedno definiraju rešetku veznog mjesta s centrom u središnjem atomu u kokristaliziranom ligandu. Zeleni paralelepiped s dimenzijama  $8\text{\AA} \times 8\text{\AA} \times 8\text{\AA}$  omeđuje prostor unutar kojeg se može kretati centar uklapanog liganda. Uklopljeni ligandi s centrom na bridovima zelenog kvadra ne smiju izaći izvan ljubičastog paralelepipeda.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Odabir kinaze HGFR/c-Met kao mete pomoću web servisa SwissTargetPrediction

Web servis SwissTargetPrediction je korišten za identifikaciju potencijalne mete za odabrane prirodne spojeve iz masline. Za oleokantal, prema predviđanju SwissTargetPrediction-a, između 15 meta predviđenih s najvećom vjerojatnošću su najčešće proteaze (60%) (Slika 10). Međutim, kao najvjerojatnija meta za oleokantal je predviđena kinaza HGFR/c-Met. Za ovaj sekoiridoid HGFR/c-Met kinaza je predviđena kao meta s vjerojatnošću 1, što znači da je ovaj spoj već eksperimentalno identificiran kao inhibitor ove kinaze i da se nalazi u skupu poznatih inhibitora HGFR/c-Met kinaze servisa SwissTargetPrediction. Elnagar i sur. su 2011. pomoću računalne metode virtualnog probira baziranog na molekulskom uklapanju istražili mogućnost vezanja (-)oleokantala u niz kinaza CDK1, CDK2, PKA, PKC, EGFR, GSK-3 $\beta$ , MEK1, JNK1, KIT, uključujući i c-Met (Elnagar i sur., 2011). Kinaza c-Met je bila identificirana kao potencijalna meta što je nadalje istraženo opsežnim molekulskim uklapanjem u više dostupnih i različitih kristalnih struktura kinaze c-Met i potvrđeno *in vitro* na odgovarajućem testu. Oleokantal je pokazao statistički značajan inhibitorni učinak ovisan o dozi na fosforilaciju c-Met kinazom s IC<sub>50</sub> vrijednošću od 4,8  $\mu$ M. Provedena su i *in vitro* ispitivanja na test proliferacije, test zacjeljivanja rana i *Cultrex cell invasion* test kojima su procijenjeni antiproliferativni, antimigratorni te antiinvazivni učinci oleokantala. Sa IC<sub>50</sub> vrijednostima u rasponu od 10-20  $\mu$ M, oleokantal je inhibirao proliferaciju i migraciju epitelnih staničnih linija ljudskog karcinoma dojke visokog metastatskog potencijala MDA-MB-231 i ER-pozitivnog ne-metastatskog ljudskog karcinoma dojke MCF7 u testu zacjeljivanja rana te invaziju ljudskog karcinoma prostate visokog metastatskog potencijala PC-3.

Ostali spojevi masline su također ispitani pomoću web-servisa SwissTargetPrediction. Rezultati su prikazani u tablici 5. Uz oleokantal, flavanoid kvercetin je također identificiran kao ATP kompetitivni inhibitor c-Met-a s vjerojatnošću 1 (Slika 13). Za kvercetin, kinaze su predviđene kao najvjerojatnije biološke mete (28 između 100 predviđenih meta su kinaze) što je u skladu s *in vitro* eksperimentalnim opažanjima (Baier i Szyszka, 2020).

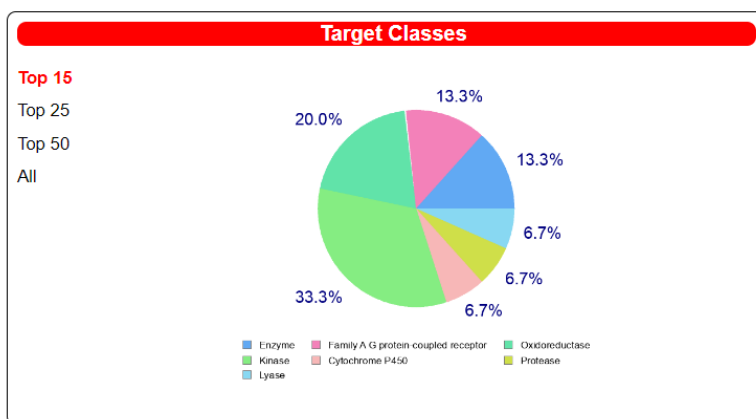
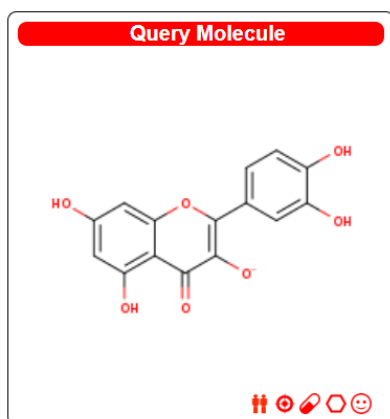
Tablica 5. Analiza rezultata predviđanja web servisa SwissTargetPredictora za proučavane spojeve iz masline.

Naziv spoja	Najzastupljenija klasa proteina u prvih 100 predviđenih (%)	Kinaze (%) među prvih 100 meta	c-Met u prvih 15 meta da/ne	Broj sličnih aktivni spojevi (3D/2D)
3,4-Dimetoksibenzoična kiselina	enzimi	10.0	ne	-
4-Hidroksicimetna kiselina	kinaze	18.0	ne	-
$\alpha$ -Selenin	enzimi	22.0	ne	-
Apigenin	kinaze	27.0	da (80, 0.125)	4/4
Berhemol	kinaze	28.0	ne	-
$\beta$ -hidroksi Verbaskozid	proteaze	13.0	ne	-
Cimetna kiselina	enzimi	11.0	ne	-
Demetiloleuropein	proteaze	7.0	ne	-
Diosmetin	kinaze	28.0	da (78, 0.127)	4/4
Elenolna kiselina	enzimi	5.0	ne	-
Eremofilen	enzimi	-	ne	-
$\gamma$ -Kurkumen	N/A	N/A	N/A	N/A
Homovanilil alkohol	N/A	N/A	N/A	N/A
Hidroksitirozil elanoat	kinaze	19.0	ne	-
Hidroksitirozol	N/A	N/A	N/A	N/A
Hidroksitirozol acetat	kinaze	29.0	ne	-
Ligstrozid aglikon	N/A	N/A	N/A	N/A
Luteolin	kinaze	27.0	da (79, 0.279)	3/4
Oleacein	kinaze	32.0	da (2, 0.185)	230/12

Oleokantal	kinaze	24.0	da (1)	211/4
Oleuropein	izlučeni proteini, enzimi	9.0	ne	-
Oleuropein aglikon	N/A	N/A	N/A	N/A
(+)-pinoresinol	izlučeni proteini	18.0	ne	-
(+)-Verrucosin	kinaze	31.0	ne	-
Kvercetin	kinaze	28.0	da (1)	2/4
Skopoletin	kinaze	32.0	da (53, 0.031)	24/2
Tirozol	enzimi	9.0	ne	-
Tirozol acetat	kinaze	41.0	ne	-
Vanillin	enzimi	14.0	ne	-
Verbaskosid	proteaze	14.0	ne	-
$\alpha$ -Zingiberen	N/A	N/A	N/A	N/A

<sup>a</sup> Ukoliko c-Met nije predviđena među prvih 15 meta, u zagradi je naveden (redni broj predviđenog c-Met i pripadna vjerojatnost). N/A označuje da SwissTargetPrediction nije našao sličnih molekula s poznatim metama.

Za 13 od 31 proučavanih spojeva iz masline, kinaze su najzastupljenije predviđene mete (Tablica 5). Za sedam spojeva: oleokantal, kvercetin, apigenin, luteolin, oleacein, skopoletin, diosmetin, c-Met je među predviđenim kinazama. c-Met i njegovi povezani signalni putovi klinički su važni terapijski ciljevi u liječenju malignih bolesti, a u literaturi je već navedeno da spojevi dobiveni iz prirodnih izvora mijenjaju ekspresiju i signalnu kaskadu tirozin kinaze u različitim modelima tumora. Rezultati dobiveni LBDD-pristupom SwissTargetPrediction su dalje u diplomskom radu istraženi upotrebom komplemetarnog SBDD pristupa molekuskog uklapanja. Razlike u vezanju između odabranih spojeva masline mogu pridonijeti u odabiru prirodnog spoja koji može pomoći u razvoju i otkrivanju novih polusintetskih lijekova protiv raka.



Target	Common name	Uniprot ID	CHEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Death-associated protein kinase 1	DAPK1	P53355	CHEMBL2558	Kinase	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	2 / 2 <a href="#">↓</a>
Dopamine D4 receptor	DRD4	P21917	CHEMBL219	Family A G protein-coupled receptor	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	1 / 1 <a href="#">↓</a>
Epidermal growth factor receptor erbB1	EGFR	P00533	CHEMBL203	Kinase	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	5 / 28 <a href="#">↓</a>
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 2	HSD17B2	P37059	CHEMBL2789	Enzyme	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	8 / 3 <a href="#">↓</a>
Focal adhesion kinase 1	PTK2	Q05397	CHEMBL2695	Kinase	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	1 / 2 <a href="#">↓</a>
G-protein coupled receptor 35	GPR35	Q9HC97	CHEMBL1293267	Family A G protein-coupled receptor	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	2 / 4 <a href="#">↓</a>
Glycogen synthase kinase-3 beta	GSK3B	P49841	CHEMBL262	Kinase	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	3 / 6 <a href="#">↓</a>
Glyoxalase I	GLO1	Q04760	CHEMBL2424	Enzyme	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	3 / 4 <a href="#">↓</a>
Hepatocyte growth factor receptor	MET	P08581	CHEMBL3717	Kinase	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	2 / 4 <a href="#">↓</a>
Insulin-like growth factor I receptor	IGF1R	P08069	CHEMBL1957	Kinase	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	3 / 3 <a href="#">↓</a>
Interleukin-8 receptor A	CXCR1	P25024	CHEMBL4029	Family A G protein-coupled receptor	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	1 / 1 <a href="#">↓</a>
Liver glycogen phosphorylase	PYGL	P06737	CHEMBL2568	Enzyme	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	1 / 1 <a href="#">↓</a>
Matrix metalloproteinase 13	MMP13	P45452	CHEMBL280	Protease	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	1 / 1 <a href="#">↓</a>
Matrix metalloproteinase 2	MMP2	P08253	CHEMBL333	Protease	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	2 / 2 <a href="#">↓</a>
Matrix metalloproteinase 3	MMP3	P08254	CHEMBL283	Protease	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: green;"></div>	1 / 1 <a href="#">↓</a>

Showing 31 to 45 of 100 entries

Previous 1 2 **3** 4 5 6 7 Next

Slika 13. Prvih 15 proteina predviđenih kao potencijalne mete za polifenol kvercetin. Prema rezultatima, kvercetin je već eksperimentalno pokazan kao inhibitor kinaze c-Met te se nalazi u bazi SwissTargetsPrediction-a.

## 4.2. Molekulsko uklapanje u ATP vezno mjesto kinaze c-Met

Sljedeći cilj *in silico* istraživanja ovog diplomskog rada bio je ispitati potencijalnu ATP kompetitivnu inhibiciju HGFR/c-Met kinaze s odabranim spojevima iz masline pomoću računala korištenjem SBDD-metode molekulskog uklapanja. U uvodnom dijelu spomenuto je nekoliko općenitijih informacija o strukturi protein kinaza, ali da bismo adekvatnije mogli razumjeti rezultate i o njima raspraviti, potrebno je detaljnije ući u samu strukturu protein kinaza te konformacija u kojima se one mogu nalaziti. Protein kinaze mogu se nalaziti u aktivnom ili u inaktivnom stanju te svako od tih stanja ima drugačiji prostorni raspored atoma tj. 3D strukturu veznih mjesta ATP-a i supstrata.

Aktivna stanja kinaza imaju visoko očuvanu konformaciju. Aktivacijska petlja nalazi se na C-režnju kinazne domene, a bočno joj se nalaze peptidni motivi Asp-Phe-Gly (DFG trijada) i Ala-Pro-Glu (APE trijada) (Slika 2). U aktivnom stanju, aktivacijska petlja proteže se suprotno od ATP veznog mjesta, a Asp iz DFG trijade usmjeren je prema veznom mjestu za ATP. Zbog tog usmjerenja, konformacija aktivnog stanja protein kinaze naziva se i *DFG-in* konformacija (Duong-Ly i Peterson, 2013).

Konformacije inaktivnih stanja kinaza, za razliku od aktivnih, se više međusobno razlikuju, te omogućuju postizanje veće selektivnosti inhibitora. U inaktivnom stanju aktivacijska petlja zauzima vezno mjesto supstrata te je vezno mjesto za ATP djelomično sterički zatvoreno. U inaktivnim stanjima kinaza, Asp ostatak iz DFG trijade uglavnom je usmjeren suprotno od ATP veznog mjesta. Zbog takvog usmjerenja Asp ostatka, ova konformacija naziva se i *DFG-out* konformacija (Duong-Ly i Peterson, 2013).

Unutar skupine ATP-kompetitivnih inhibitora također postoji podjela s obzirom na to vežu li se na aktivnu/*DFG-in* konformaciju (inhibitori tipa I) ili na inaktivnu/*DFG-out* konformaciju (inhibitori tipa II).

U bazi PDB postoji oko 100 kristalnih struktura kinaze HGFR/c-Met u čistom obliku ili kokristalu/kompleksu s inhibitorom. Molekulsko uklapanje je provedeno u tri različite strukture 4MXC, 1R0P i 3DKC kompleksa kinaze c-Met s dva sintetska inhibitora spoj G tj. K252a (Slika 7) te molekulom ATP (Tablica 4). Ovdje su analizirani rezultati molekulskog uklapanja dobivenog sa strukturom 4MXC s kinazom c-Met u inaktivnoj konformaciji budući da je većina referentnih inhibitora dobro uklopljena u ovu konformaciju (Slika 14). U kristalu 4MXC, c-Met je u kompleksu s ATP kompetitivnim inhibitorom nazvanim ovdje spoj G (Slika 7) koji je

sintetiziran kao dualni inhibitor kinaza c-Met i VEGFR-2 (Zhan i sur., 2014). U kompleksu 4MXC se c-Met nalazi u inaktivnoj konformaciji te je spoj G inhibitor tipa II. Upotrebom ove kristalne strukture, rezultati mogu ukazati jesu li neki od istraživanih spojeva masline ATP kompetitivni inhibitori kinaze c-Met, tipa II za kinazu u inaktivnoj konformaciji.

Metodom molekuskog uklapanja određuje se optimalan način vezanja promatranog spoja u dano vezno mjesto i procjenjuje se jačina vezanja, tzv. ocjena (*score*). Budući da se radi o aproksimiranim vrijednostima afiniteta vezanja, ove vrijednosti imaju smisla samo ako se gledaju relativno, tj. u odnosu na poznate referentne inhibitore s istim veznim mjestom. Što je vrijednost procijenjene energije vezanja negativnija, to je afinitet mete za taj spoj veći, tj. proces vezanja liganda na taj protein je egzotermniji. Korelacija između energija vezanja iz molekuskog uklapanja i konstante disocijacije  $K_d$  ( $\Delta G = -RT \ln K_d$ ) postoji jedino za seriju sličnih spojeva. Također, treba napomenuti da predviđeni „afiniteti vezanja“ ne trebaju korelirati s  $IC_{50}$  (pola maksimalne inhibitorne koncentracije) i  $EC_{50}$  (pola maksimalne učinkovite koncentracije), već omogućuju razlučivanje „dobre“ od „loših“ inhibitora tj. određivanje tzv. *hit* molekula za daljnja *in vitro* ispitivanja. Molekulsko uklapanje provedeno je bez prisutnosti vode i u fiksnu (do na rotaciju OH grupa relevantnih aminokiselinskih ostataka) strukturu proteina.



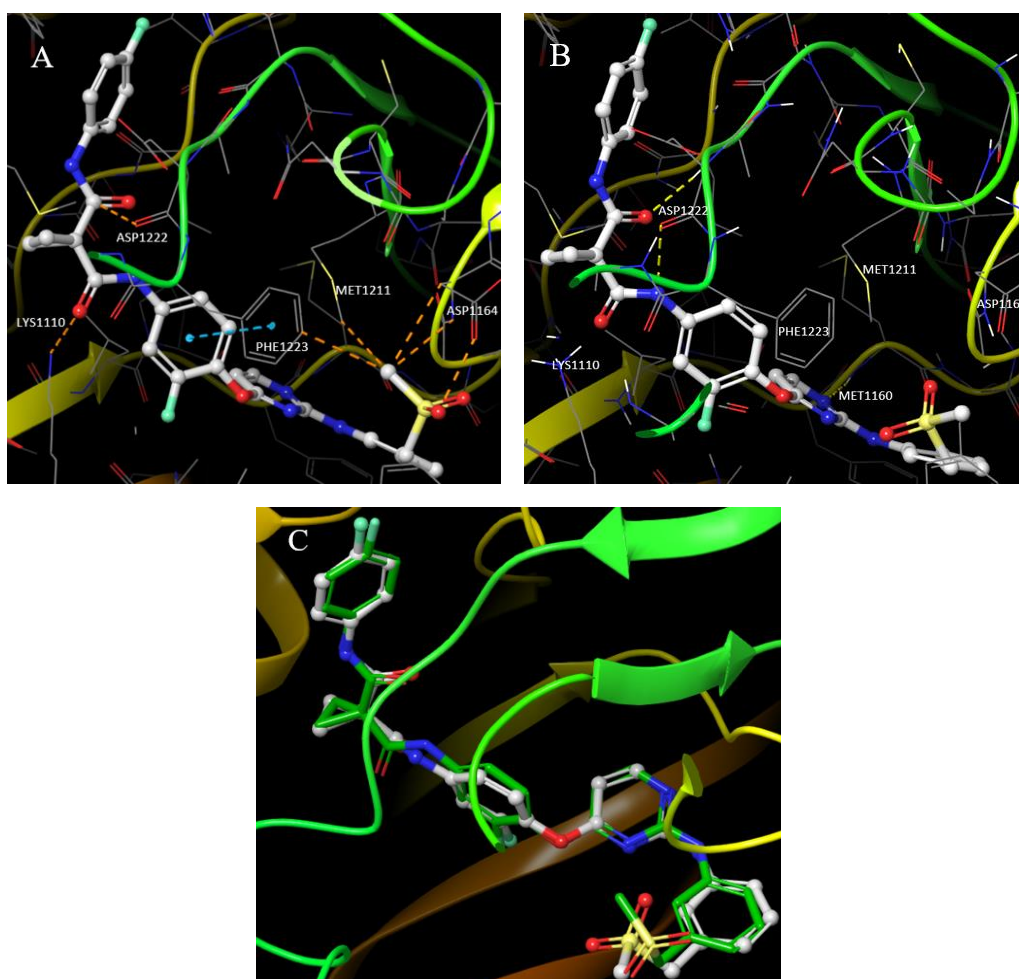
#### 4.2.1. Reprodukcijski kristalni način vezanja u strukturi 4MXC

Na Slici 14 generiranoj pomoću programa Maestro prikazan je kristalni kompleks 4MXC kinaze c-Met sa inhibitorom spojem G (Slika 7). Prilikom svakog istraživanja potrebno je provjeriti valjanost primijenjene metode kako bi se procijenila vjerodostojnost rezultata. U slučaju molekuskog uklapanja provjera protokola uklapanja (definicija veznog mjesta i odabir funkcija ocjenjivanja) odvija se usporedbom položaja liganda u kristalnoj strukturi s položajem tog liganda predviđenim s molekulskim uklapanjem (tzv. *re-docking*). Na Slici 15 prikazani su položaji u oba slučaja. Vidljive su narančaste i žute isprekidane linije te plava isprekidana linija. Narančastim linijama prikazane su sterički nepovoljne interakcije između liganda i proteina s obzirom na zadane granične vrijednosti udaljenosti i kutova u Maestru. Nepovoljne interakcije su češće u kristalnom smještaju spoja G nego u predviđenom načinu vezanja. Položaji liganda gotovo su identični te je RMSD vrijednost između kristalnog i predviđenog načina vezanja vrlo mala, 0.122 Å. Prilikom uklapanja dolazi do malih rotacija oko jednostrukih veza kako bi se spoj G oslobodio napetosti i zbog toga na Slici 15B nema nepovoljnih kontakata, već se vide žute isprekidane linije koje prikazuju H-veze između liganda i proteina. Plavom isprekidanom linijom prikazana je značajna  $\pi$ - $\pi$  interakcija između središnje fluorofenilne grupe spoja G i fenilnog prstena aminokiselinskog ostatka PHE1223 proteina iz DFG motiva.

Spoj G je kao ligand u kristalnoj strukturi 4MXC predviđen i s najboljim afinitetom vezanja od svih proučavanih molekula (Tablica 6). Takva ocjena može se pripisati relativno brojnim povoljnim interakcijama s c-Met-om i zbog njegove veličine. Spoj G je među najvećim uklapanim molekulama (Slike 7 i 8). Dobra reprodukcija kristalnog načina vezanja i vrlo povoljna ocjena vezanja upućuju na adekvatno odabran protokol za provođenje molekuskog uklapanja.



Slika 14. Smještaj inhibitora spoj G u ATP vezno mjesto u inaktivnoj konformaciji kinaze c-Met u kristalnoj strukturi 4MXC. DFG se nalazi na zeleno obojanoj petlji proteina (1222-1224).



Slika 15. Prikaz interakcija između kinaze c-Met i A) kristalnog spoja G u PDB strukturi 4MXC i B) uklopljenog spoja G. Narančastim, isprekidanim linijama prikazane su nepovoljne međumolekulske interakcije, a plavom, isprekidanom linijom povoljne  $\pi$ - $\pi$  interakcije. Žutim, isprekidanim linijama prikazane su povoljne vodikove veze. C) Prikaz preklopljenih struktura kristalnog i uklopljenog spoja G.

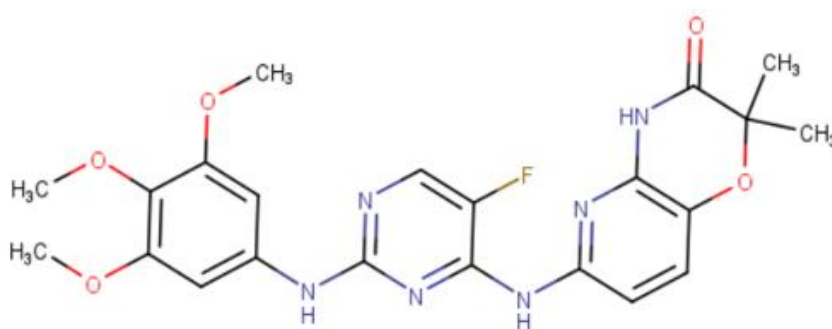
Tablica 6. Predviđeni relativni afiniteti vezanja spojeva iz masline (zeleno obojeni) i poznatih inhibitora kinaze c-Met u ATP vezno mjesto u konformaciju 4MXC kinaze c-Met.

NAZIV SPOJA	Ocjene vezanja
SPOJ G	-15,011
SPOJ A	-14,750
SPOJ C	-12,131
AMUVATINIB	-11,833
AMG-208	-10,687
SPOJ B	-10,561

CRIZOTINIB	-10,465
LUTEOLIN	-10,432
ANION LUTEOLINA	-10,253
APIGENIN	-10,199
ANION APIGENINA	-10,178
CABOZANTINIB	-10,025
KVERCETIN	-10,006
ANION KVERCETINA	-9,999
SPOJ E	-9,821
CAPMATINIB	-9,754
DIOSMETIN	-9,617
ANION DIOSMETINA	-9,601
SGX-523	-9,542
BERHEMOL	-8,999
(+)-VERUKOZIN	-8,607
OLEACEIN	-7,932
(+)-PINOREZINOL	-7,900
BRIGATINIB	-7,706
ATP	-7,591
TIVANTINIB	-7,554
SPOJ F	-7,515
SPOJ D	-7,316
OLEOKANTAL	-7,073
EREMOFIEN	-6,881
$\alpha$ -SELINEN	-6,799
4-HIDROKSI CIMETNA KISELINA	-6,740
TIROZOL ACETAT	-6,714
HIDROKSI-TIROZIL ELANOAT	-6,670
HOMOVANILIL ALKOHOL	-6,544
HIDROKSI-TIROZOL ACETAT	-6,538
TIROZOL	-6,431
ELENOLNA KISELINA	-6,411
VANILIN	-6,241
SKOPOLETIN	-6,233
CIMETNA KISELINA	-6,047
$\gamma$ -KURKUMEN	-6,006
$\alpha$ -ZINGIBEREN	-5,893
HIDROKSI TIROZOL	-5,877
3,4,-DIMETOKSIBENZOIČNA KISELINA	-5,783
LIGSTROZID AGLIKON	-4,947
OLEUROPEIN	-1,777

#### 4.2.2. Vežanje poznatih referentnih inhibitora

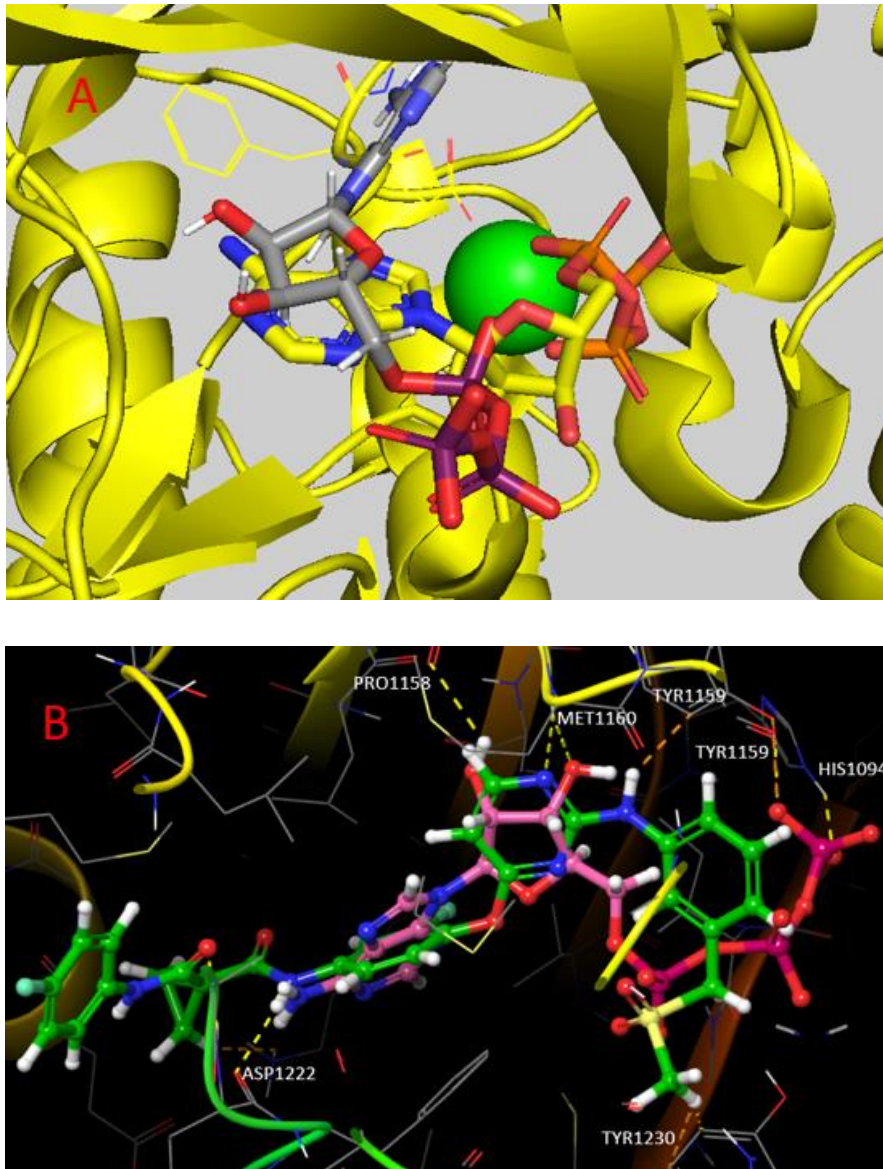
Uz Spoj G, 15 ostalih referentnih inhibitora je povoljno uklopljeno u rigidnu kristalnu strukturu 4MXC s afinitetom/ocjenom vežanja boljom od -7.0 (Tablica 6). Očekivano, spojevi slične veličine i strukture sa spojem G (Slika 7) se vežu sa sličnim predviđenim afinitetom. Fostamatinib i K252a su neuspješno uklopljeni. U slučaju fostamatiniba, razlog tome je krivo uzeta struktura molekulske uklapanje. Naime, fostamatinib je prolijek spoja R406, s fosfatnom skupinom (Slika 16). Moguće je da je fosfatna grupa u fostamatinibu uvjetovala predviđanje krivog načina vežanja s nedovoljno povoljnih interakcija sa c-Met-om. Ovo je primjer kako treba poznavati karakteristike aktivnih molekulskih specija (metabolita) kako bi se efektivno i točno mogli interpretirati rezultati.



R406

Slika 16. Prikaz spoja R406 čiji prolijek je fostamatinib.

Vežanje ATP-a u strukturu 4MXC uspoređeno je s vežanjem kokristaliziranog ATP-a u PDB strukturi 3DKC (Slika 17 A) i ATP-kompetitivnog inhibitora spoja G u istu strukturu (Slika 17 B). Procijenjena jačina vežanja ATP-a, koji je prirodni ligand c-Met kinaze u strukturi c-Met je -7.591 u usporedbi s jačinom vežanja spoja G od -15.011. Ovaj rezultat možemo objasniti činjenicom da se u fiziološkim uvjetima u vežnom mjestu c-Met kinaze nalaze kation  $Mg^{2+}$  i molekule vode koji stvaraju ionske veze tj. H-veze s molekulom ATP-a čime ju dodatno stabiliziraju. Vežanje ATP je znatno povoljnije procijenjeno uklapanjem u strukturu 3DKC posebno uz zadržavanje molekula vode u vežnom mjestu. Uklapanjem u aktivnu 3DKC-konformaciju kinaze c-Met, vežanje referentnih inhibitora je, očekivano, bilo puno nepovoljnije od vežanja substrata ATP (rezultati nisu prikazani u radu).

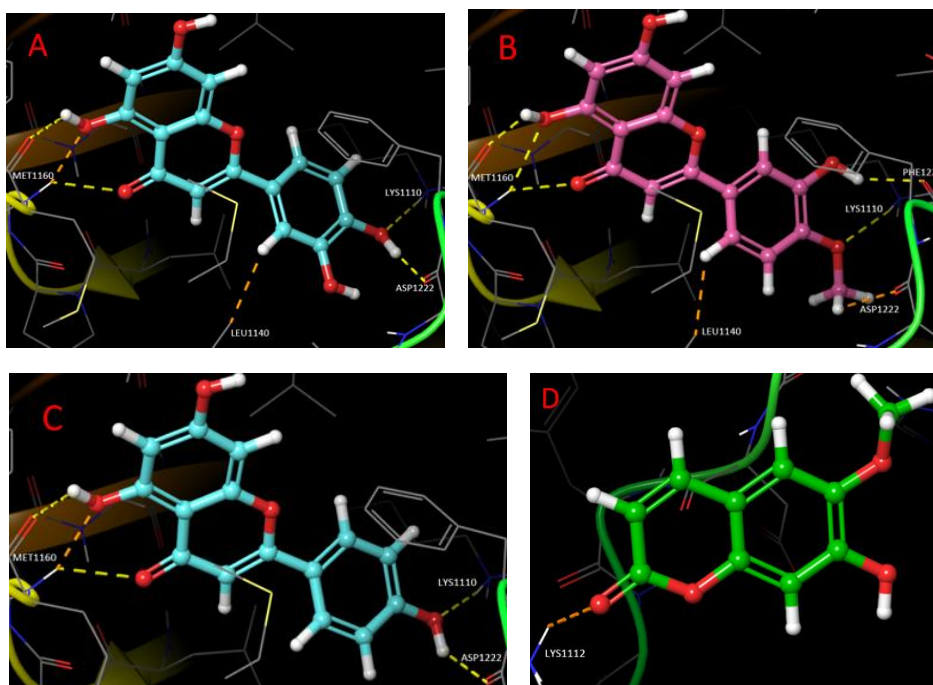


Slika 17. A) Prikaz vezanja ATP-a koji je prirodni ligand c-Met kinaze u PDB strukturi 3DKC žuto obojanim atomima ugljika. Predviđen način vezanja u praznoj strukturi 4MXC prikazan je sa sivim C-atomima. B) Prikaz usporedbe interakcija ATP-a i spoja G (zelen) sa c-Metom. Narančastim isprekidanim linijama prikazane su nepovoljne interakcije. Žutim, isprekidanim linijama prikazane su vodikove veze.

Crizotinib i cabozantinib su registrirani od strane FDA-a 2011./ 2012. kao lijekovi za liječenje karcinoma pluća ne-malih stanica tj. medularnog karcinoma štitnjače na temelju njihove inhibicije c-Met-a (Puccini i sur., 2019). Oni se nalaze među deset najbolje ocjenjenih različitih liganada u provedenom istraživanju. Njihov način vezanja analogan je onom od kristalnog liganda spoja G u PDB strukturi 4MXC.

### 4.3. Vežanje spojeva masline

Predviđanja dobivena molekulskim uklapanjem su potvrdila odabir kinaze c-Met kao mete na temelju rezultata servera SwissTargetPrediction za spojeve iz skupine flavonoida: kvercetin, luteolin, apigenin i diosmetin (Tablica 6). Ispitivanjem kvercetina pomoću SwissTargetPredictiona kao meta s 100%-tnom vjerojatnošću predviđen je i c-Met (Slika 13) te je njegova dobra ocjena vežanja u skladu s rezultatom servera SwissTargetPrediction tj. eksperimentalno opaženom inhibicijom kinaze s-Met s kvercetinom (Boly i sur., 2011). Svi istraživani flavonoidi svojim OH grupama tvore vodikove veze s aminokiselinskim ostatkom Asp1222 iz DFG trijade, te aminokiselinama MET1160, LYS1110 i LEU1140 (Slika 18 A-C).

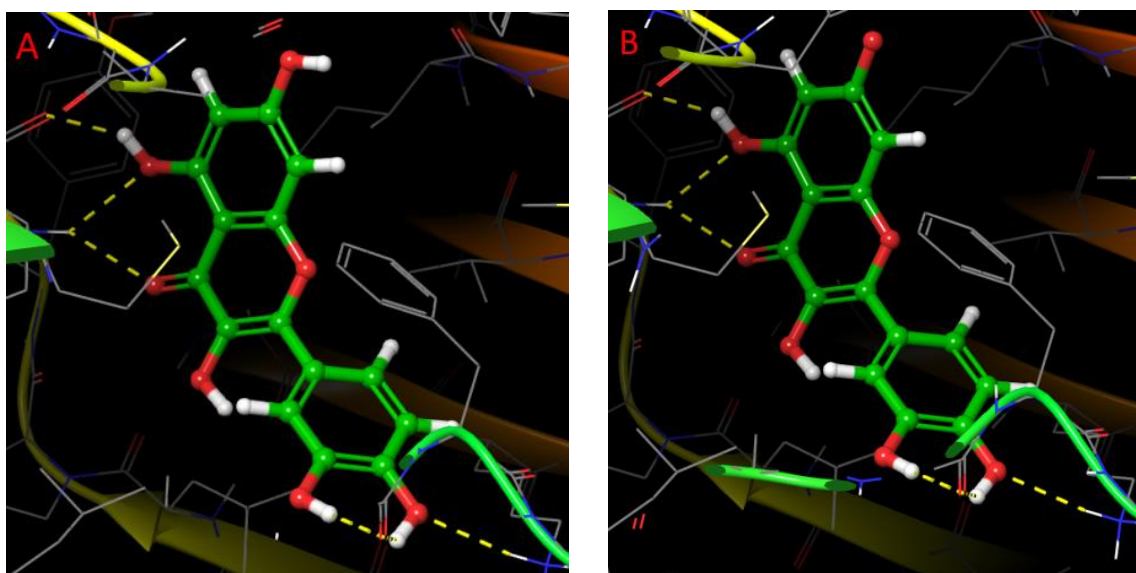


Slika 18. Prikaz položaja A) luteolina, B) diosmetina, C) apigenina i D) skopoletina nakon provedenog molekulskog uklapanja u vezno mjesto 4MXC kristalne strukture HGFR/c-Met kinaze. Žutim isprekidanim, linijama prikazane su vodikove veze, a narančastim nepovoljni kontakti.

Na prikazanim predviđenim načinima vežanja (Slika 18) vidljivo je da je položaj flavonoida u veznom mjestu vrlo sličan. Kako su ovi flavonoidi i strukturno slični, procijenjeni afiniteti vežanja, tj. ocjene uklapanja su također slične (Tablica 6). Generalno se međusobno razlikuju po -OH skupinama na različitim položajima, te dolazi do malog pomaka strukture u veznom mjestu što je vidljivo pojavom ili novih H-veza (žute, isprekidane linije) ili pojavom

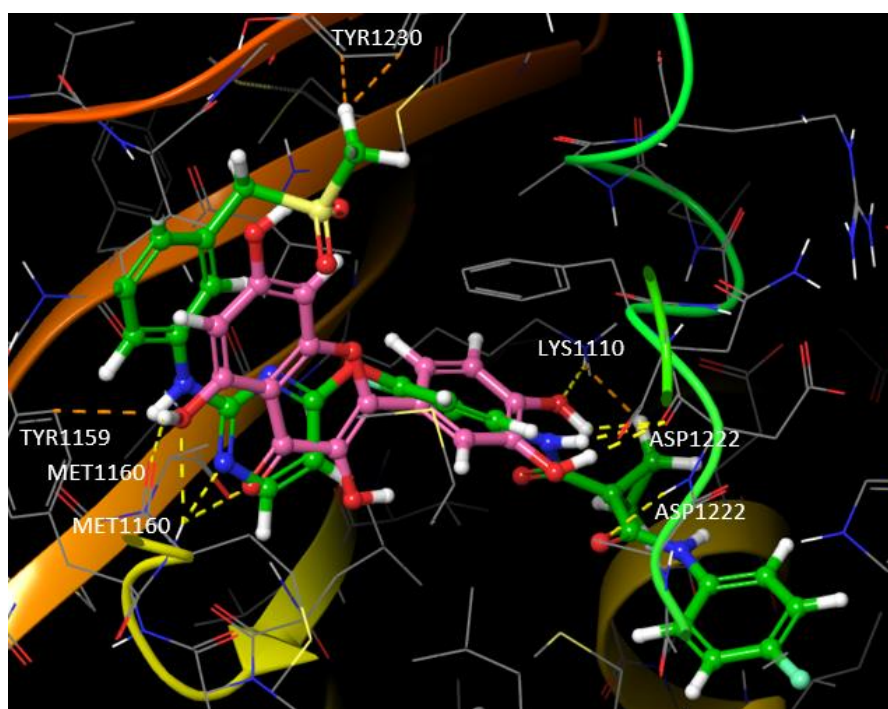
nepovoljnih kontakata (narančaste, isprekidane linije). Navedeni flavonoidi pri fiziološkom pH su ionizirani u anione te su zbog toga i njihovi anioni uključeni u ispitivanje kako bi prikazali utječe li ionizacija na njihov položaj u veznom mjestu. Ionizacija ne utječe na vezanje jer je deprotonirana 7-OH skupina smještena u dio gdje radi interakcije s molekulama vode. Na Slici 19 vidi se kako ionizacijsko stanje kvercetina ne utječe na njegovu prostornu orijentaciju i položaj u veznom mjestu.

Usporedbom položaja sličnih struktura u veznom mjestu, kao što je to u slučaju flavonoida, također se mogu izvesti zaključci o valjanosti protokola uklapanja. Za očekivati je da se strukturno slične strukture slično pozicioniraju u veznom mjestu što se vidi iz ovih prikaza.



Slika 19. Prikaz položaja A) kvercetina i B) njegovog aniona deprotoniranog na 7-OH skupini, nakon provedenog molekuskog uklapanja u vezno mjesto 4MXC kristalne strukture HGFR/c-Met kinaze. Žutim, isprekidanim linijama prikazane su vodikove veze.



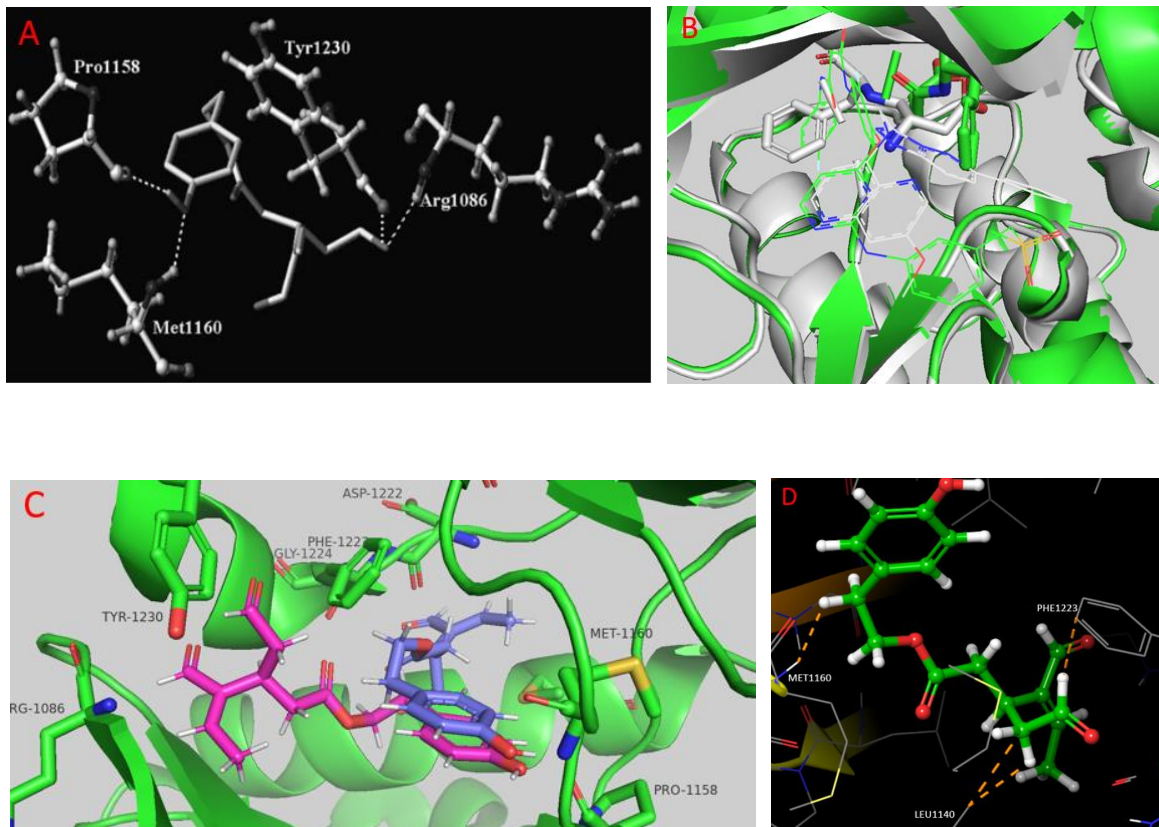


Slika 20. Prikaz usporedbe vezanja kvercetina i spoja G. Spoj G prikazan je kao zelena struktura, a kvercetin kao ružičasta struktura. Žutim, isprekidanim linijama prikazane su vodikove veze. Narančastim, isprekidanim linijama prikazane su nepovoljne interakcije.

Uz flavonoide, ali za razliku od web servera SwissTargetPrediction, lignani berhemol (u 2R, 3S, 4R konfiguraciji), (+)-verukoizin i (+)-pinorezinol su predviđeni da se vežu u ATP vezno mjesto s ocjenom vezanja usporedivom s onom od poznatih inhibitora (tj. negativnijom od -7.0, Tablica 6). Njihov položaj i način vezanja je sličan onima od flavanoida. U literaturi nisu pronađeni rezultati da su ovi prirodni produkti identificirani kao kompetitivni inhibitori kinaza općenito.

Za razliku od SwissTargetPrediction rezultata, prema rezultatima molekuskog uklapanja kumarin skopoletin nije predviđen kao inhibitor c-Met-a, dok su sekoiridoidi oleokantal (Slika 10) i oleacein predviđeni kao znatno slabiji inhibitori i od flavonoida i lignana zbog nepovoljnih interakcija s katalitičkom trijadom (Slika 21 D i Slika 22). U strukturu 4MXC korištenim protokolom za molekulsko uklapanje nisu uklopljeni aglikon oleuropeina i demetiloleuropein, te verbaskozid i  $\beta$ -hidroksi verbaksozid.

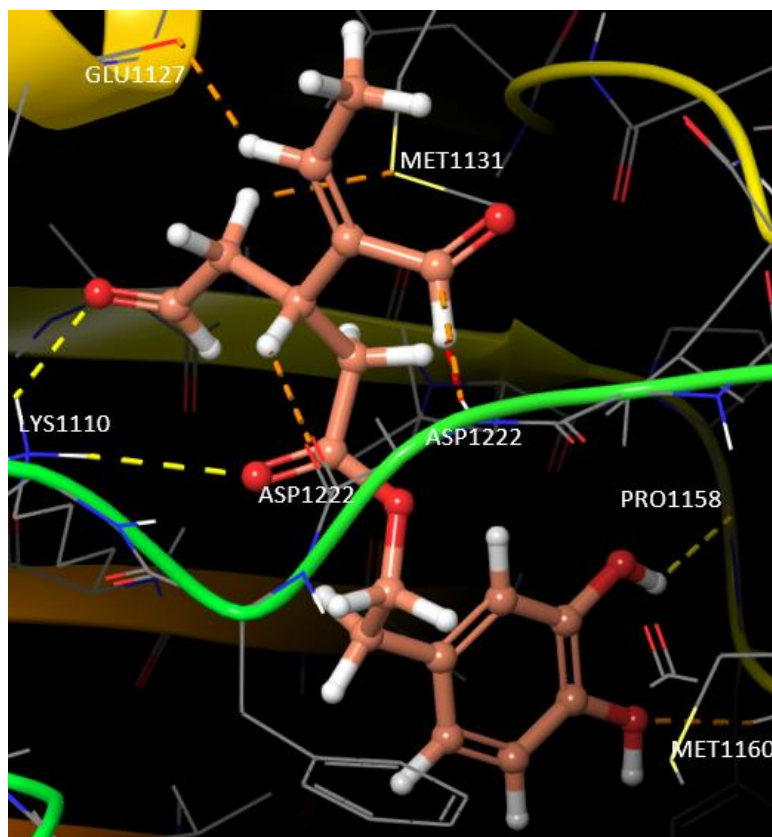
Usporedba rezultata položaja oleokantala iz ovog rada s literaturnim podacima prikazana je na Slici 21.



Slika 21. A) Prikaz položaja oleokantala nakon uklapanja u vezno mjesto 3I5N kristalne strukture HGFR/c-Met kinaze (preuzeto iz Elnagar i sur., 2011). B) Preklap struktura 4MXC (zelena) i 3I5N ukazuje na različiti smještaj PHE1223 (štapićasti prikaz) iz *in* DFG trijade u te dvije inaktivne konformacije c-Met-a što dovodi do različitog smještaja inhibitora (linijski prikaz) u njima. C) Različiti načini vezanja oleokantala u 4MXC (ljubičasti atomi) i 3I5N (ciklama). D) Prikaz vezanja oleokantala nakon eksperimentalno provedenog molekuskog uklapanja u 4MXC.

U odnosu na flavonoide s ocjenom vezanja oko -10, ocjena za oleokantal je znatno niža, -7.1. Na Slici 21 vidljive su razlike u predviđenom načinu vezanja oleokantala s vezanjem oleokantala predviđenog uklapanjem koje su proveli Elnagar i sur 2011 (Elnagar i sur., 2011). Oni su proveli uklapanje u tri različite strukture kinaze c-Met: 3I5N, 1R0P i 2RFS. Jedino su uklapanjem u strukturu 3I5N predvidjeli povoljno uklapanje oleokantala u c-Met (Slika 21 A). Metoda uklapanja ovog diplomskog rada kao i Elnagara i sur. bilo je rigidno uklapanje što znači da je struktura proteina bila fiksna i jedina moguća promjena bila je reorijentacija OH skupina aminokiselina. Različiti rezultati uklapanja su posljedica značajno različite konformacije c-Met u kristalnim kompleksima 4MXC i 3I5N. Zajednička interakcija je interakcija fenilnog prstena

s PRO158 i MET1160 dok se u ostalim interakcijama predviđeni načini vezanja razlikuju (Slika 21). Ovo je primjer kako rezultati molekuskog uklapanja ovise o odabranoj strukturi proteina.



Slika 22. Prikaz predviđenog načina vezanja oleaceina. Žutim, isprekidanim linijama označene su vodikove veze, narančastim, isprekidanim linijama označene su nepovoljne interakcije, a crvenim, isprekidanim linijama označene su izuzetno nepovoljne (s ASP1222) interakcije.

## 5. ZAKLJUČCI

Osnovni cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati potencijalne inhibitorne učinke odabranih spojeva koji potječu iz stabla ili ulja masline (*Olea europea* L.) na kinazi c-Met metodom molekuskog uklapanja u vezno mjesto za ATP. Od svih ispitanih molekula, najobčavajuće rezultate pokazali su spojevi iz skupine flavonoida diosmetin, apigenin, luteolin i kvercetin odnosno njihovi anioni, u skladu s literaturno dostupnim rezultatima dobivenim *in vitro* (Baier i Szyszka, 2020). Predviđeni načini i povoljne ocjene vezanja ukazuju na moguće djelovanje lignana berhemol (u 2R, 3S, 4R konfiguraciji), (+)-verukozin i (+)-pinorezinol kao izravnih ATP-kompetativnih inhibitora (tipa 2) na kinazu c-Met za što nisu pronađeni relevantni literaturni podaci, tj. za što bi trebalo provesti relevantna *in vitro* testiranja.

S računskog aspekta, određivanje inhibitornog učinka spojeva na kinazu c-Met značajno ovisi o odabranoj strukturi kinaze za molekulsko uklapanje u skladu s prijašnjim rezultatima Elnagara i sur. 2011 (Elnagar i sur., 2011). Kao bolja solucija za metodu uklapanja moguće je odabrati napredniju metodu *induced fit docking* (IFD) u kojoj se strukturi proteina u veznom mjestu pristupa kao dinamičnoj konformacijski fleksibilnoj strukturi. Budući da je IFD kompleksniji i zahtjevniji proces, za njegovo adekvatno izvođenje potrebno je uložiti više vremena i provesti ga na jačem računalu koje može obaviti puno operacija odjednom. Metoda rigidnog uklapanja dobra je inicijalna metoda za brže dobivanje okvirnih rezultata koje treba potvrditi složenijim računskim postupcima i odgovarajućim *in vitro* testiranjima.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

AGC = protein kinaze A, B, C

aPK = atipične protein kinaze

ATP = adenzin - trifosfat

CAMK = Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin ovisne kinaze

CK1 = kazein kinaze 1

COX-2 = ciklooksigenaza tip 2

DNA = deoksiribonukleinska kiselina

EGFR = receptor epidermalnog faktora rasta

ePK = eukariotske protein kinaze

EVOO = Ekstradjevičansko maslinovo ulje

GSK = glikogen sintaze kinaze

GTP = gvanozin – trifosfat

HGF = faktor rasta hepatocita

HGFR = receptor faktora rasta hepatocita

LBDD = ligand based drug design

MAPK = mitogenom aktivirane protein kinaze

OOPC = Fenolni spojevi maslinovog ulja

PDB = Protein Data Bank

RGC = receptorske gvanilil ciklaze

ROS = Reaktivne kisikove specije

RTK = recetorske tirozin kinaze

SBDD = structure based drug design

SMILES = Simplified Molecular Input Line Entry System

STE = kinaze povezane sa STE proteinima

TK = tirozin kinaze

TKL = kinaze nalik tirozin kinazama

## 7. LITERATURA

Aliebrahimi S, Montasser Kouhsari S, Ostad SN, Arab SS, Karami L. Identification of Phytochemicals Targeting c-Met Kinase Domain using Consensus Docking and Molecular Dynamics Simulation Studies. *Cell Biochem Biophys*. 2018, 76(1–2), 135–45.

Attwood MM, Fabbro D, Sokolov AV, Knapp S, Schiöth HB. Trends in kinase drug discovery: targets, indications and inhibitor design. *Nat Rev Drug Discov*. 2021, 20(11), 839–861.

Baier A, Szyszka R. Compounds from Natural Sources as Protein Kinase Inhibitors. *Biomolecules*. 2020, 10(11), 1546.

Bajorath J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nature Rev Drug Discov*. 2002, 1, 882–894.

Blundell TL, Jhoti H & Abell C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nature Rev. Drug Discov*. 2002, 1, 45–54.

Bonvino NP, Liang J, McCord ED, Zafiris E, Benetti N, Ray NB. OliveNet<sup>TM</sup>: a comprehensive library of compounds from *Olea europaea*. 2018, 2018, 1-9

Bresso E, Furlan A, Noel P, Leroux V, Maina F, Dono R. Large-Scale Virtual Screening Against the MET Kinase Domain Identifies a New Putative Inhibitor Type. *Molecules*. 2020, 25(4), 938.

Brooijmans N, Kuntz ID. Molecular recognition and docking algorithms. *Annu Rev Biophys Biolmol Struct*. 2003, 32, 335–373.

Buchanan SG, Hendle J, Lee PS, Smith CR, Bounaud PY, Jessen KA. SGX523 is an exquisitely selective, ATP-competitive inhibitor of the MET receptor tyrosine kinase with antitumor activity *in vivo*. *Mol Cancer Ther*. 2009, 8(12), 3181–3190.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Research*. 2019, 47(W1), W357–W364.

Duong-Ly KC, Peterson JR. The Human Kinome and Kinase Inhibition. *Curr Protoc Pharmacol* [Internet]. 2013, 0 2: Unit2.9. doi:10.1002/0471141755.ph0209s60

Eathiraj S, Palma R, Volckova E, Hirschi M, France DS, Ashwell MA. Discovery of a Novel Mode of Protein Kinase Inhibition Characterized by the Mechanism of Inhibition of Human Mesenchymal-epithelial Transition Factor (c-Met) Protein Autophosphorylation by ARQ 197. *J Biol Chem*. 2011, 286(23), 20666–20676.

Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini GV, Mee RP. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput.-Aided Mol. Des*. 1997, 11, 425-445.

- Elnagar A, Sylvester P, El Sayed K. (–)-Oleocanthal as a c-Met Inhibitor for the Control of Metastatic Breast and Prostate Cancers. *Planta Med.* 2011, 77(10), 1013–1019.
- Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J Med Chem.* 2004, 47(7), 1739–1749.
- Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. *J Med Chem.* 2006, 49(21), 6177–6196.
- Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42(W1), W32–W38.
- Gohlke H, Klebe G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew Chem Int Edit.* 2002, 41, 2644–2676.
- Hanks SK. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* 2003, 7.
- Hunter T. A thousand and one protein kinases. *Cell.* 50, 823–829.
- Ilavarasi K, Kiruthiga PV, Pandian SK, Devi KP. Hydroxytyrosol, the phenolic compound of olive oil protects human PBMC against oxidative stress and DNA damage mediated by 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere.* 2011, 84, 888–893.
- Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis.* 2007, 115, 81–103.
- Boly R, Gras T, Lamkani T, Guissou P, Serteyn D, Kiss R, Dubois J. Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology. *Int J Oncol.* 2011 38(3). Available from: <http://www.spandidos-publications.com/ijo/38/3/833>
- Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2004, 3(11), 935–49.
- Kuhn, D. Targeting Protein Kinases for Cancer Therapy. By David J. Matthews and Mary E. Gerritsen. *ChemMedChem.* 2010, 5(11), 1948–1949.
- Lahiry P, Torkamani A, Schork NJ, Hegele RA. Kinase mutations in human disease: interpreting genotype–phenotype relationships. *Nat Rev Genet.* 2010, 11(1), 60–74.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science, New Series.* 2002, 298(5600), 1912–1916;1933–1934.

Martín-Peláez S, Covas MI, Fitó M, Kušar A, Pravst I. Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol Nutr Food Res*. 2013, 57(5), 760–71.

Matthews DJ, Gerritsen ME. Targeting Protein Kinases for Cancer Therapy. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons; 2010.

Paik PK, Felip E, Veillon R, Sakai H, Cortot AB, Garassino MC. Tepotinib in Non–Small-Cell Lung Cancer with *MET* Exon 14 Skipping Mutations. *N Engl J Med*. 2020, 383(10), 931–943.

Puccini A, Marín-Ramos NI, Bergamo F, Schirripa M, Lonardi S, Lenz HJ. Safety and Tolerability of c-MET Inhibitors in Cancer. *Drug Saf*. 2019, 42(2), 211–233.

Sattler M, Hasina R, Reddy MM, Gangadhar T, Salgia R. The role of the c-Met pathway in lung cancer and the potential for targeted therapy. *Ther Adv Med Oncol*. 2011, 3(4), 171-184

Šegota SB, Anđelić N, Lorencin I, Musulin J, Štifanić D, Car Z. Preparation of Simplified Molecular Input Line Entry System Notation Datasets for use in Convolutional Neural Networks. *2021 IEEE 21st International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE)*. 2021, pp. 1-6

SIB Swiss Institute of Bioinformatics, 2014., *SwissTargetPrediction*, Listopad 2021., <http://www.swisstargetprediction.ch/>

Stepanić V, Gall Trošelj K, Lučić B, Marković Z, Amić D. Bond dissociation free energy as a general parameter for flavonoid radical scavenging activity. *Food Chem*. 2013, 141(2), 1562–1570.

Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mähönen M, Tolonen H, Ruokokoski E. Contribution of trends in survival and coronar y-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA Project populations. *The Lancet*. 1999, 353(9164), 1547–1557.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2007, 39, 44–84.

Wang B, Wu H, Hu C, Wang H, Liu J, Wang W. An overview of kinase downregulators and recent advances in discovery approaches. *Sig Transduct Target Ther*. 2021, 6(1), 423.

Wang C, Li J, Qu L, Tang X, Song X, Yang F, Chen X, Lin Q, Lin W, Zhou Y, Tu ZC, Chen Y, Zhang Z, Lu X. Discovery of D6808, a Highly Selective and Potent Macrocyclic c-Met Inhibitor for Gastric Cancer Harboring *MET* Gene Alteration Treatment. *J Med Chem*. 2022, 65 (22), 15140-15164.

Wang E, Sun H, Wang J, Wang Z, Liu H, Zhang JZH. End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. *Chem Rev*. 2019, 119(16), 9478–9508.



Wang JC, Bennett M. Aging and atherosclerosis. *Circ. Res.* 2012, 111, 245–259.

Wood A, Shukla A, Schneider J, Lee JS, Stanton JD, Dzuiba T. Ctk Complex-Mediated Regulation of Histone Methylation by COMPASS. *Mol Cell Biol.* 2007, 27(2), 709–720.

Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discov.* 2016, 21(1), 5–10.

Zhan Z, Ai J, Liu Q, Ji Y, Chen T, Xu Y. Discovery of Anilinopyrimidines as Dual Inhibitors of c-Met and VEGFR-2: Synthesis, SAR, and Cellular Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* 2014, 5(6), 673–678.

Zhang Y, Moqtaderi Z, Rattner BP, Euskirchen G, Snyder M, Kadonaga JT. Intrinsic histone-DNA interactions are not the major determinant of nucleosome positions in vivo. *Nat Struct Mol Biol.* 2009, 16(8), 847–852.


Zhang J, Adrián FJ, Jahnke W, Cowan-Jacob SW, Li AG, Iacob RE. Targeting Bcr–Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature.* 2010, 463(7280), 501–506.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

Protein kinaze su enzimi koji kataliziraju proces fosforilacije, poznati su onkogeni i posreduju većini prijenosa signala u eukariotskim stanicama modifikacijom aktivnosti supstrata, kontroliranjem mnogih staničnih procesa poput metabolizma, transkripcije gena, progresije staničnog ciklusa, preuređivanja citoskeleta i kretanja stanica, apoptoze i diferencijacije stanica. Glavna uloga kinaza u patofiziologiji bolesti istaknuta je nakon otkrića da mutacije kinaza mogu dovesti do dijabetesa, karcinoma, kardiovaskularnih, neurodegenerativnih, razvojnih i imunskih poremećaja. Protein kinaze važne su kliničke mete brojnih inhibitora kinaza u kliničkoj praksi te u kliničkim ispitivanjima. Predmet *in silico* istraživanja ovog diplomskog rada bio je receptor za faktor rasta hepatocita (*Hepatocyte growth factor receptor*, HGFR) koji je finalni produkt transkripcije (proto-onko) gena *MET*, a naziva se još i c-Met kinaza. Kinaza c-Met odabrana je kao meta na temelju rezultata web servera SwissTargetPrediction. Inhibitorna aktivnost odabranih spojeva iz masline (*Olea europea* L.) na c-Met kinazi ispitana je detaljno metodom molekuskog uklapanja (program Maestro), jednim od najmodernijih pristupa u ispitivanju potencijalnih novih lijekova. Za potrebe istraživačkog dijela ovog rada formirana je biblioteka od dvije podgrupe spojeva: 17 spojeva koji su poznati inhibitori HGFR/c-Met kinaze i 31 spoj koji se nalaze u maslini (*Olea europea* L.). Dobiveni rezultati sugeriraju kako bi flavonoidi diosmetin, apigenin, luteolin i kvercetin mogli imati inhibitorni učinak, što je u skladu s literaturnim podacima. Kao mogući novi ATP-kompetitivni inhibitori kinaze c-Met otkriveni su i lignani berhemol (u 2R, 3S, 4R konfiguraciji), (+)-verukozin i (+)-pinorezinol što bi trebalo potvrditi daljnjim *in vitro* testiranjem.

Protein kinases are enzymes which catalyze the process of phosphorylation, they are known oncogenes and mediate many cellular signaling pathways by modification of substrate activity and controlling many cell processes like metabolism, gene transcription, cell cycle activity, cytoskeletal rearrangement, apoptosis and differentiation. The key role of kinases in disease pathophysiology is underscored by the finding that mutation in kinases can lead to diabetes, cancer, cardiovascular, neurodegenerative, developmental, immune and behavioral disorders. Protein kinases are important clinical targets of numerous kinase inhibitors in clinical use or undergoing clinical trials. The main subject of this study is the kinase Hepatocyte growth factor receptor which is also called c-Met kinase and is the final product of the (proto-onco) gene *MET* transcription. Molecular docking, which is one of the newest approaches in drug discovery, was used for examination of the potential inhibitory activity of the selected compounds found in olive plant (*Olea europea* L.) on the c-Met kinase. Kinase c-Met was selected as a target based on the results of the SwissTargetPrediction web server. The group of molecules selected for examination in this study (library) was made of 17 known c-Met kinase inhibitors and 31 compounds found in olive plant (*Olea europea* L.). The obtained results suggest that the flavonoids diosmetin, apigenin, luteolin and quercetin could have an inhibitory effect, which is in accordance with literature data. As possible novel ATP-competitive inhibitors of c-Met kinase, the lignans berhemol (u *2R*, *3S*, *4R* stereoconfiguration), (+)-verrucosin and (+)-pinoresinol are also discovered, which should be confirmed by further *in vitro* testing.

## 9. PRILOZI



# CERTIFICATE

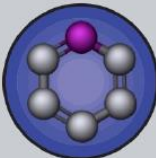
of Completion

This Certificate is Proudly Presented to


***Fran Jagar***

for the successful completion of *Introduction to Molecular Modeling in Drug Discovery*, a Schrödinger Online Course.

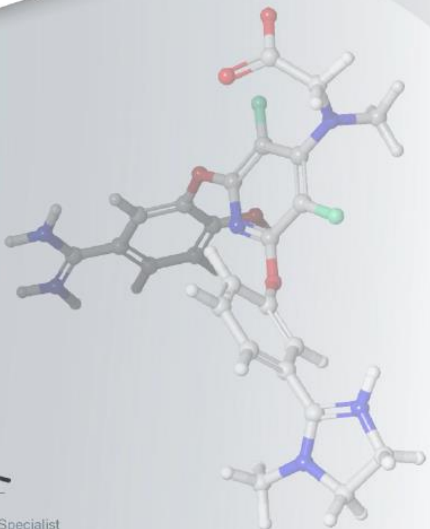
*November 13, 2021*



SCHRÖDINGER.



Dr. Jennifer Chambers  
Senior Scientist & Education Specialist  
Schrödinger



0001319

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku kemiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ISTRAŽIVANJE INTERAKCIJE SPOJEVA IZ MASLINE S TIROZIN KINAZOM HGFR/C-MET POMOĆU MOLEKULSKOG UKLAPANJA

**Fran Jagar**

Protein kinaze su enzimi koji kataliziraju proces fosforilacije, poznati su onkogeni i posreduju većini prijenosa signala u eukariotskim stanicama modifikacijom aktivnosti proteinskih supstrata, kontroliranjem mnogih staničnih procesa poput metabolizma, transkripcije gena, progresije staničnog ciklusa, preuređivanja citoskeleta i kretanja stanica, apoptoze i diferencijacije stanica. Glavna uloga kinaza u patofiziologiji bolesti istaknuta je nakon otkrića da mutacije kinaza mogu dovesti do dijabetesa, karcinoma, kardiovaskularnih, neurodegenerativnih, razvojnih i imunskih poremećaja. Protein kinaze važne su kliničke mete brojnih inhibitora kinaza u kliničkoj praksi te u kliničkim ispitivanjima. Predmet *in silico* istraživanja ovog diplomskog rada je bio receptor za faktor rasta hepatocita (*Hepatocyte growth factor receptor*, HGFR) koji je finalni produkt transkripcije (proto-onko) gena *MET*, a naziva se još i c-Met kinaza. Inhibitorna aktivnost odabranih spojeva iz masline (*Olea europea* L.) na c-Met kinazi ispitivana je procesom molekulskog uklapanja (program Maestro), jednim od najmodernijih pristupa u ispitivanju potencijalnih novih lijekova. Za potrebe istraživačkog dijela ovog rada formirana je biblioteka od dvije podgrupe spojeva: 17 spojeva koji su poznati inhibitori HGFR/c-Met kinaze i 31 spoj koji se nalaze u maslini (*Olea europea* L.). Dobiveni rezultati sugerirali su kako bi flavonoidi diosmetin, apigenin, luteolin i kvercetin mogli imati inhibitory učinak, što je u skladu s literaturnim podacima. Kao mogući novi ATP-kompetitivni inhibitori kinaze c-Met otkriveni su i lignani berhemol (u 2R, 3S, 4R konfiguraciji), (+)-verukozin i (+)-pinorezinol što bi trebalo potvrditi daljnjim *in vitro* testiranjem.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 66 stranica, 22 grafička prikaza, 6 tablica i 44 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Protein kinaze, HGFR, molekulsko uklapanje, c-Met kinaza

Mentori: **Dr. sc. Višnja Stepanić**, viši znanstveni suradnik, Laboratorij za strojno učenje i reprezentacije znanja, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

**Dr. sc. Monika Barbarić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Višnja Stepanić**, viši znanstveni suradnik, Laboratorij za strojno učenje i reprezentacije znanja, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

**Dr. sc. Monika Barbarić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: 28. veljače 2023.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Medicinal Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### STUDY OF INTERACTIONS BETWEEN OLIVE COMPOUNDS AND TYROSINE KINASE HGFR/C-MET USING MOLECULAR DOCKING

**Fran Jagar**

Protein kinases are enzymes which catalyze the process of phosphorylation, they are known oncogenes and mediate many cellular signaling pathways by modification of substrate activity and controlling many cell processes like metabolism, gene transcription, cell cycle activity, cytoskeletal rearrangement, apoptosis and differentiation. The key role of kinases in disease pathophysiology is underscored by the finding that mutation in kinases can lead to diabetes, cancer, cardiovascular, neurodegenerative, developmental, immune and behavioral disorders. Protein kinases are important clinical targets of numerous kinase inhibitors in clinical use or undergoing clinical trials. The main subject of this study is the kinase Hepatocyte growth factor receptor which is also called c-Met kinase and is the final product of the (proto-onco) gene *MET* transcription. Molecular docking, which is one of the newest approaches in drug discovery, was used for examination of the potential inhibitory activity of the selected compounds found in olive plant (*Olea europaea* L.) on the c-Met kinase. The group of molecules selected for examination in this study (library) was made of 17 known c-Met kinase inhibitors and 31 compounds found in olive plant (*Olea europaea* L.). The obtained results suggest that the flavonoids diosmetin, apigenin, luteolin and quercetin could have an inhibitory effect, which is in accordance with literature data. As possible novel ATP-competitive inhibitors of c-Met kinase, the lignans berhemol (u 2R, 3S, 4R stereoconfiguration), (+)-verrucosin and (+)-pinoresinol are also discovered, which should be confirmed by further in vitro testing.

This thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 66 pages, 22 figures, 6 tables i 44 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Protein kinases, HGFR, molecular docking, c-Met kinase

Mentors: **Dr. sc. Višnja Stepanić**, Senior Research Associate, Laboratory for machine learning and knowledge representation, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

**Dr. sc. Monika Barbarić**, Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Reviewers: **Dr. sc. Višnja Stepanić**, Senior research associate, Laboratory for machine learning and knowledge representation, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

**Dr. sc. Monika Barbarić**, Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, Assistant Professor Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

This thesis was accepted: 28. veljače 2023.