

# Razvoj potencijalnih inhibitora humanog G3BP1/2 proteina

---

Farkaš, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:117005>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**I**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Klara Farkaš**

**RAZVOJ POTENCIJALNIH INHIBITORA HUMANOG G3BP1/2 PROTEINA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2023./2024.**

**Mentor:**

**doc. dr. sc. Dario Leskur**

**Split, listopad 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

### DIPLOMSKI RAD

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet**  
**Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija**  
**Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti

**Znanstveno polje:** Farmacija

**Tema rada:** prihvaćena je na 79. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 35. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 24. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

**Mentor:** doc. dr. sc. Dario Leskur

### RAZVOJ POTENCIJALNIH INHIBITORA HUMANOG G3BP1/2 PROTEINA

Klara Farkaš, broj indeksa: 201908

#### Sažetak

**Cilj:** Cilj istraživanja je razviti nove inhibitore G3BP1/2, na temelju strukture poznatog inhibitora, N proteina SARS-CoV-2.

**Metode:** U ovom istraživanju proučavana je kristalografska struktura G3BP proteina koristeći Protein Data Bank baze podataka, posebno strukture 7suo, 8th1 i 8v11. Provedena je analiza vezivanja N proteina SARS-CoV-2 virusa na G3BP protein koristeći Discovery Studio, čime su identificirane ključne regije za interakciju. Na temelju dobivenih farmakofornih mapa izvršen je probir molekula pomoću ZINCPharmer servisa. Struktura proteina i liganada obrađena je u programima Chimera i Open Babel, a molekulske sidrenje provedeno je korištenjem AutoDock Vina na superračunalu Supek. Validacija sidrenja izvršena je usporedbom RMSD vrijednosti između eksperimentalno potvrđenog inhibitora i najpovoljnije poze nakon sidrenja. Nakon toga, ChimeraX korišten je za vizualizaciju kompleksa, a PRED-hERG alat za predviđanje srčane toksičnosti liganada. Konačno, RDKit je upotrijebljen za procjenu fizikalno-kemijskih svojstava liganada, na temelju čega su odabrani najperspektivniji kandidati.

**Rezultati:** U istraživanju je izdvojeno 20 liganada s najpovoljnijim afinitetom vezanja na G3BP protein. Najpovoljniji afiniteti vezanja, izuzimajući kardiotoksične ligande, su -11,11, -10,94 i -10,87, što je znatno bolje od eksperimentalno potvrđenog inhibitora G3BP (G3Ia) s afinitetom -6,11. Ti ligandi imaju molekulske mase između 423,16 i 434,14 g/mol, dok G3Ia ima masu od 713,41 g/mol. LogP vrijednosti su 3,09, 4,39 i 4,10 u usporedbi s 2,99 liganda G3Ia. Najbolji ligandi imaju maksimalno 3 donora i 4 akceptora vodikovih veza, dok G3Ia ima 5 donora i 7 akceptora.

**Zaključak:** Identificirano je 10 novih potencijalnih inhibitora G3BP1/2 s boljim afinitetom vezanja i fizikalno-kemijskim svojstvima od postojećih inhibitora G3Ia i G3Ib. Ove molekule predstavljaju obećavajuće kandidate za razvoj lijekova koji inhibiraju stvaranje stres granula, što bi moglo biti korisno u liječenju tumora i neurodegenerativnih bolesti. Daljnji koraci uključuju eksperimentalnu validaciju i optimizaciju ovih spojeva za terapijsku primjenu.

**Ključne riječi:** inhibitori, G3BP1/2, molekularno sidrenje, stres granule

**Rad sadrži:** 52 stranice, 20 slika, 1 tablicu i 76 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Vedrana Čikeš Čulić – član – predsjednica povjerenstva
2. doc. dr. sc. Benjamin Benzon, dr. med. – član
3. doc. dr. sc. Dario Leskur – član – mentor

**Datum obrane:** 25. listopada 2024.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Medicinskog fakulteta u Splitu, Šoltanska 2

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and Faculty of Medicine  
Integrated Undergraduate and Graduate Study in Pharmacy  
University of Split, Republic of Croatia**

**Scientific field:** Biomedical Sciences

**Scientific branch:** Pharmacy

**Thesis topic:** Approved at the 79th session of the Council for Pharmacy Studies and confirmed at the 35th session of the Faculty Council of the Faculty of Chemistry and Technology and the 24th session of the Faculty Council of the Faculty of Medicine

**Mentor:** Assist. Prof. Dario Leskur, PhD

### DEVELOPMENT OF POTENTIAL INHIBITORS OF HUMAN G3BP1/2 PROTEINS

Klara Farkaš, student ID number: 201908

#### Summary

**Objective:** The objective of this research is to develop new inhibitors of G3BP1/2 proteins, based on the structure of the known SARS-CoV-2 N protein inhibitor.

**Methods:** In this study, the crystallographic structure of the G3BP proteins was examined using the Protein Data Bank database, specifically the structures 7suo, 8th1, and 8v11. The binding of the SARS-CoV-2 N protein to the G3BP protein was analyzed using Discovery Studio, identifying key regions for interaction. Based on the resulting pharmacophore maps, molecule screening was performed using the ZINCPharmer service. The structures of proteins and ligands were processed using Chimera and Open Babel software, and molecular docking was carried out using AutoDock Vina on the Supek supercomputer. Docking validation was performed by comparing RMSD values between the experimentally confirmed inhibitor and the most favorable docking pose. ChimeraX was used for complex visualization, and the PRED-hERG tool was employed for predicting the cardiotoxicity of ligands. Finally, RDKit was used to evaluate the physicochemical properties of the ligands, based on which the most promising candidates were selected.

**Results:** The study identified 20 ligands with the most favorable binding affinities to the G3BP protein. The most favorable binding affinities, excluding cardiotoxic ligands, were -11.11, -10.94, and -10.87, which are significantly better than the experimentally confirmed G3BP inhibitor (G3Ia) with an affinity of -6.11. These ligands have a molecular mass between 423.16 and 434.14 g/mol, while G3Ia has a mass of 713.41 g/mol. The LogP values are 3.09, 4.39, and 4.10 compared to G3Ia's LogP of 2.99. The best ligands have a maximum of 3 hydrogen bond donors and 4 hydrogen bond acceptors, while G3Ia has 5 donors and 7 acceptors.

**Conclusion:** Ten new potential inhibitors of G3BP1/2 with better binding affinities and physicochemical properties than the existing G3Ia and G3Ib inhibitors have been identified. These molecules represent promising candidates for the development of drugs that inhibit stress granule formation, which could be beneficial in the treatment of tumors and neurodegenerative diseases. Future steps include experimental validation and optimization of these compounds for therapeutic use.

**Keywords:** inhibitors, G3BP1/2, molecular docking, stress granules

**The thesis contains:** 52 pages, 20 figures, 1 table and 76 references

**Original language:** Croatian

#### Defense Committee:

1. Professor Vedrana Čikeš Čulić, PhD – member – chair person
2. Assist. Prof. Benjamin Benzon, MD. PhD – member
3. Assist. Prof. Dario Leskur, PhD – member – supervisor

**Defense date:** October 25th, 2024.

**The thesis is stored in both printed and electronic (PDF format) forms** in the Library of the Faculty of Medicine in Split, Šoltanska 2

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	9
1.1 Stres granule.....	2
1.2 Uloga stres granula u akutnom i kroničnom stresu.....	4
1.3 Stres granule u virusnim infekcijama.....	4
1.4 COVID-19.....	6
1.4.1. Prevencija COVID-19 .....	7
1.4.2. Liječenje COVID-19 .....	7
1.5. Stres granule u zarazi SARS-CoV-2.....	8
1.6. Razvitak inhibitora stres granula na temelju N proteina koronavirusa.....	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	10
3. METODE .....	12
3.1. Pronalazak kristalografske strukture receptora pregledom baze podataka .....	13
3.2. Analiza vezivanja N proteina različitih sojeva koronavirusa na G3BP protein .....	14
3.3. Probir baze podataka.....	14
3.4. Obrada strukture receptora.....	14
3.5. Priprema fleksibilnog i rigidnog dijela receptora za molekulske sidrenje.....	15
3.6. Priprema liganda .....	15
3.7. Molekularno sidrenje .....	15
3.8. Validacija molekularnog sidrenja.....	16
3.9. Obrada rezultata sidrenja .....	16
3.10. Predviđanje potencijalne toksičnosti pronađenih liganada .....	16
3.11. Predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava liganada.....	17
4. REZULTATI .....	18
4.1. Analiza vezivanja N proteina dvaju sojeva koronavirusa za G3BP1/2.....	19
4.2. Probir baze podataka.....	20
4.3. Rezultati sidrenja .....	21
4.4. Validacija molekularnog sidrenja .....	35
5. RASPRAVA.....	36
6. ZAKLJUČCI .....	39
7. LITERATURA .....	41
8. SAŽETAK .....	47
9. SUMMARY.....	49
10. ŽIVOTOPIS .....	51

## **ZAHVALA**

*Prije svega, želim izraziti duboku zahvalnost svom mentoru, doc. dr. sc. Dariu Leskuru, na neizmjerne podršci i strpljenju kroz cijeli proces izrade ovog diplomskog rada. Njegovi savjeti i stručno znanje bili su ključni za njegov uspješan završetak, a njegova dostupnost i spremnost za pomoć omogućili su mi da napredujem i kad se činilo najtežim.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj obitelji, majci Svjetlani, ocu Damiru i sestri Ivoni. Njihova neprestana podrška, ohrabrenje i ljubav pružali su mi snagu i motivaciju. Hvala vam što ste vjerovali u mene i omogućili mi da ostvarim ovaj uspjeh.*

*Na kraju, želim zahvaliti svojim prijateljima i kolegama koji su činili ovaj put mnogo ljepšim i lakšim. Vaša podrška, razgovor i ponekad samo vaše društvo bili su neprocjenjivi. Hvala vam na pet godina punih uspomena, smijeha, izazova i zajedničkih pobjeda. Bez vas, ovaj put ne bi bio isti.*

## POPIS KRATICA

Caprin1 – protein povezan sa staničnim ciklusom 1, engl. *Cell Cycle Associated Protein 1*

COVID-19 – bolest uzrokovana koronavirusom 2019, engl. *coronavirus disease 2019*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*

dsRNA – dvolančana RNA, engl. *double stranded RNA*

eIF2 – eukariotski inicijacijski faktor 2, engl. *eukaryotic initiation factor 2*

G3BP1/2 – protein vezan za Ras GTPazni aktivirajući protein 1 i 2, engl. *Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 and 2*

GTP – gvanozin trifosfat, engl. *guanosine triphosphate*

HBA – akceptor vodikove veze, engl. *hydrogen bond acceptor*

HBD – donor vodikove veze, engl. *hydrogen bond donor*

IFN – interferon tip 1, engl. *interferon type 1*

IRF3 – regulatorni faktor za interferon 3, engl. *IFN-regulatory factor 3*

ISG – geni stimulirani interferonom, engl. *interferon-stimulated genes*

MERS-CoV – koronavirus bliskoistočnog respiratornog sindroma, engl. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*

Met-tRNA<sub>i</sub> – metionil inicijatorska prijenosna RNA, engl. *methionyl initiator transfer RNA*

mRNA – glasnička RNA, engl. *messenger RNA*

mRNP – glasnički ribonukleoprotein, engl. *messenger ribonucleoprotein*

MHV – mišji hepatitisni virus, engl. *mouse hepatitis virus*

N protein – nukleokapsidni protein, engl. *nucleocapsid protein*

NTF2L – faktor za nuklearni transport 2-sličan, engl. *nuclear transport factor 2-like*

PDB – Banka proteinskih podataka, engl. *Protein Data Bank*

PKR – protein kinaza R, engl. *protein kinase R*

RBP – protein koji veže RNA, engl. *RNA binding protein*

RNA – ribonukleinska kiselina, engl. *ribonucleic acid*

RNA<sub>i</sub> – interferencija RNA, engl. *RNA interference*

RNP – ribonukleoprotein, engl. *ribonucleoprotein*

RRM – motiv prepoznavanja RNA, engl. *RNA Recognition Motif*

SARS-CoV-2 – koronavirus teškog akutnog respiratornog sindroma 2, engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

TIA-1 – intracelularni antigen T-stanica 1, engl. *T-cell-restricted intracellular antigen 1*

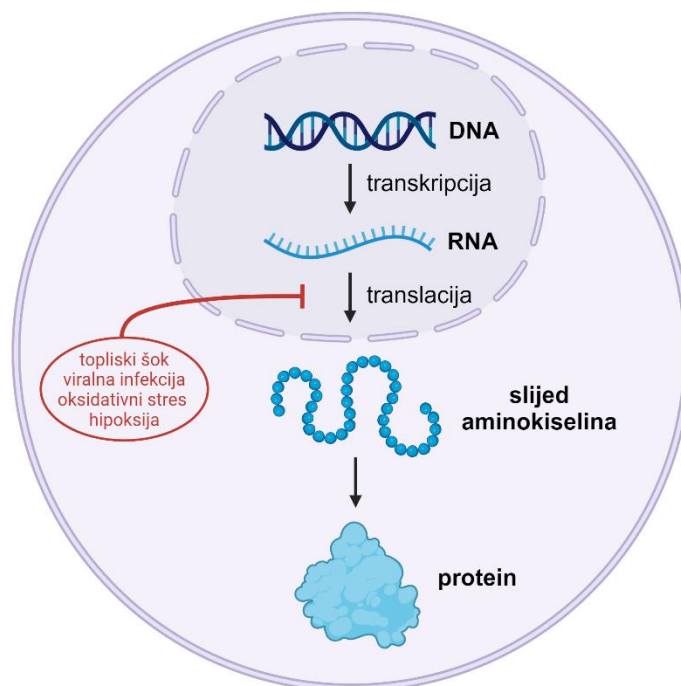


## **1. UVOD**

## 1.1 Stres granule

Sinteza proteina u eukariotskim stanicama je proces koji se odvija u dva glavna koraka: transkripcija i translacija. Transkripcija započinje u jezgri stanice gdje se nasljedni materijal deoksiribonukleinska kiselina (DNA) prepisuje, odnosno transkribira u ribonukleinsku (RNA) u obliku glasničke, odnosno *messenger* RNA. Glasnička RNA potom izlazi iz jezgre u citoplazmu gdje se odvija njena translacija u specifičan slijed aminokiselina koje čine protein (Slika 1). Da bi sinteza bila uspješna, moraju biti zadovoljeni uvjeti za odvijanje obaju koraka, uključujući podkorake translacije: inicijaciju, elongaciju i terminaciju (1).

Vrlo često sinteza proteina biva privremeno obustavljena zbog nepovoljnih okolišnih uvjeta u stanici kao što su npr. topliski šok, viralna infekcija, oksidativni stres i hipoksija (Slika 1). Sinteza može biti obustavljena u bilo kojem koraku, a često je to između koraka transkripcije i translacije (2).



**Slika 1.** Sinteza proteina može biti inhibirana nepovoljnim uvjetima, najčešće u koraku translacije (3).

U tom slučaju, genetski materijal se nalazi u obliku prepisane mRNA za koju je proces inicijacije translacije privremeno obustavljen. U stresnim uvjetima, takve mRNA molekule se pomoću RNA vezujućih proteina (RBP-*RNA binding protein*) vežu u mRNP (engl. *messenger ribonucleoprotein*) granule.

Stres granule su vrsta RNP (ribonukleoproteinskih) granula koje su svoj naziv dobile zbog visokog udjela proteina i RNA. Radi se o staničnim odjeljcima koji nisu obavijeni membranom, a sastoje se od nakupina mRNA, RNA vezujućih i nevezujućih proteina te od inicijacijskih faktora (4).

Prema nekoliko teorija, njihovu strukturu čine dvije podstrukture: unutarnji dio nalik jezgri te vanjski dio ili ljuska. Razlika je u stabilnosti jezgre odnosno većoj dinamičnosti ljuske čiji se sastav mijenja većom brzinom. Eksperimenti su pokazali da njihov sastav može varirati u različitim uvjetima, no približno 50% jezgre čine RNA vezujući proteini (2).

Neki od sveprisutnih RNA vezujućih proteina koji olakšavaju agregaciju stres granula su Ras GTPaza-aktivirajući protein-vezujući proteini 1 i 2 (G3BP1/2), protein povezani sa staničnim ciklusom 1 (Caprin1) i T-stanični intracelularni antigen 1 (TIA-1) (5, 6). Zbog toga se često koriste u istraživanjima kao proteinski markeri za stres granule. Važan dio čine i komponente signalnih puteva koji ukazuju da formiranje stres granula može mijenjati signaliziranje u stanicama. Ostatak čine drugi RNA nevezujući proteini kao što su post-translacijski modificirajući enzimi, metabolički enzimi i remodelirajući kompleksi koji mogu utjecati na sastavljanje i rastavljanje stres granula (7, 8).

Mehanizam njihovog nastanka se razlikuje ovisno o vrsti stanica i vrsti stresa kojima su podvrgnute, no generalno vrijedi da je za stvaranje stres granula ključan kompleks eIF2-GTP-Met-tRNAi. Eukariotski inicijacijski faktor 2 (eIF2) je usko reguliran. Kada eukariotska stanica naiđe na štetan vanjski podražaj,  $\alpha$  podjedinica eIF2 se fosforilira na serinskom 51 ostatku putem stresom induciranih kinaza. Time je spriječen nastanak trojnog kompleksa što rezultira inhibicijom translacije. Glasničke RNA koje su zaustavljene u translaciji su regrutirane od strane RBP-ova kako bi potaknuli stvaranje stres granula (9–14). Međutim, fosforilacija eIF2 $\alpha$  ne uzrokuje nužno stvaranje stres granula.

Vjeruje se da su stres granule samo privremeno mjesto pohrane i trijaže za mRNA tijekom staničnog stresa. Nakon nestanka stresnog podražaja, unutar nekoliko minuta se odvija njihov klirens iz citoplazme. Ljuska i jezgra se rastavljaju, a mRNA se zatim usmjeravaju na jedno od dva potencijalna odredišta. Mogu se usmjeriti prema polisomu i translacija se

nastavlja. Drugi smjer je prema P-tijelima za skladištenje ili degradaciju (15–19). Rastavljanje stres granula ovisi o aktivaciji proteina toplinskog šoka i defosforilaciji eIF2 $\alpha$  (2).

## 1.2 Uloga stres granula u akutnom i kroničnom stresu

Stres granule su uključene u brojne ljudske bolesti uključujući rak, neurodegenerativne bolesti, autoimune bolesti i virusne infekcije. One utječu na višestruke putove presretanjem i izdvajanjem različitih signalnih komponenti (20–24). Kada su izložene stresnom okruženju, stanice mogu zaustaviti stanični ciklus i popraviti oštećenja izazvana stresom ili nastaviti s apoptozom. Akutne, stresom inducirane stres granule selektivno regrutiraju i isključuju mRNA, čime potiču translaciju odgovornih gena povezanih sa stresom i omogućuju stanicama da se brzo vrate u normalno stanje nakon stresa. Suprotno tome, ako je stvaranje stres granula blokirano tijekom stresa, stopa preživljavanja stanica je značajno smanjena. Doduše, stres granule inducirane patološkim kroničnim stresom (neurodegeneracija, manjak nutrijenata) nemaju neke od standardnih sastavnica stres granula koje doprinose njihovoj funkciji za preživljavanje te imaju proapoptotsku funkciju (25, 26).

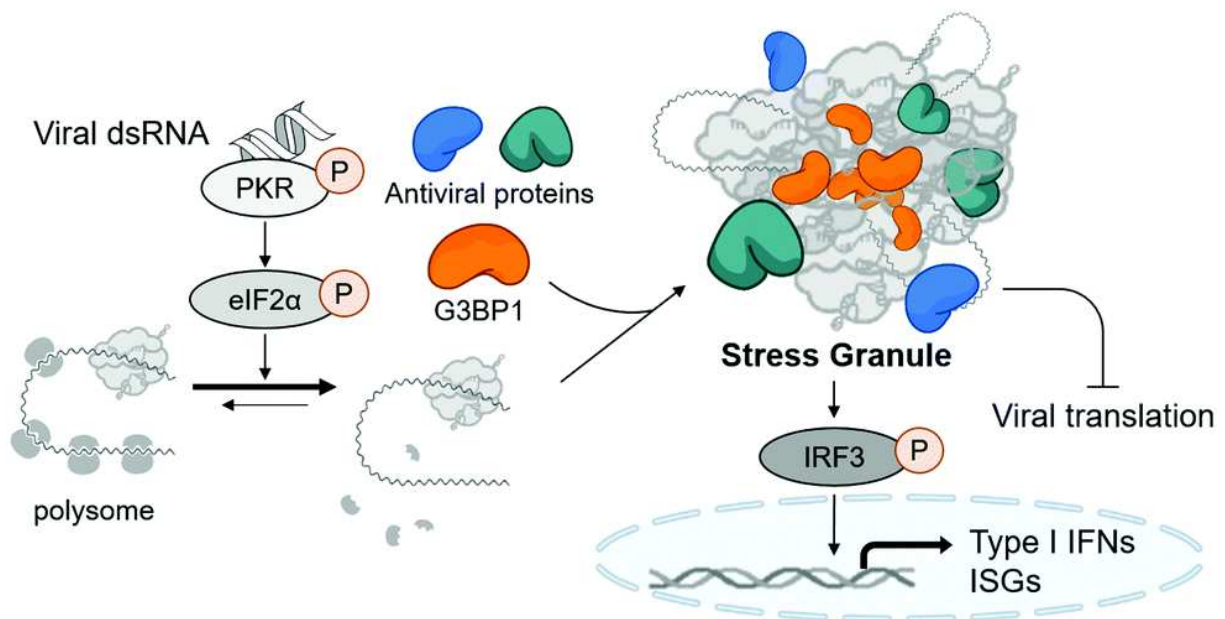
## 1.3 Stres granule u virusnim infekcijama

Virusi su vrsta neželjenog akutnog stresa stanici domaćinu. Djeluju na razini izmjene genske ekspresije zaraženih stanica i antivirusni odgovor organizma potiče nastanak stres granula kako bi se kontroliralo umnažanje virusne RNA.

Kada virusna dvolančana RNA (dsRNA od engl. *double stranded RNA*) uđe u stanicu, aktivira se PKR (RNA-regulirana protein kinaza od engl. *RNA-regulated protein kinase*) koja je osjetljiva na prisustvo stranih RNA molekula, kao što je virusna RNA. PKR tada prolazi kroz proces autofosforilacije (označeno sa "P" na Slici 2). Fosforilirani PKR zatim fosforilira protein eIF2 $\alpha$ , što blokira normalnu funkciju ovog faktora u procesu inicijacije translacije i smanjuje ukupnu translaciju mRNA u stanici. Ovo pomaže stanici da zaustavi sintezu i virusnih proteina. Kada je eIF2 $\alpha$  fosforiliran, dolazi do disocijacije ribosoma (polisoma) koji sadrže mRNA, što rezultira formiranjem slobodnih mRNA molekula. Ove mRNA, zajedno sa proteinima poput G3BP1 i antivirusnih proteina, formiraju stresne granule. Aktivacija ovih procesa također pokreće antivirusni imuni odgovor putem fosforilacije faktora IRF3 (IFN-regulacijski faktor 3),

što dovodi do indukcije sinteze tip I interferona (IFN) i interferonom stimuliranih gena (ISG). Ovi faktori dodatno pomažu u borbi protiv virusne infekcije aktiviranjem imunoloških mehanizama.

Virusi su razvili mehanizme kontroliranja nastanka stres granula, odnosno inhibicije nastanka ili olakšavanja nastanka ovisno o potrebama virusa. S obzirom na način reguliranja formiranja stres granula, virusi se mogu svrstati u više grupa. Prva grupa privremeno potiče stvaranje stres granula rano u replikacijskom ciklusu, ali u kasnijem stadiju ga ograničava. Ovdje ubrajamo poliovirus (27). Druga grupa inhibira stvaranje stres granula tijekom cijelog procesa infekcije. Njoj pripadaju virus influence tipa A i SARS-CoV-2 (28, 29). Treća grupa uključuje respiratorni sincicijski virus, a virusi te skupine mogu imati koristi od poticanja stvaranja stres granula. To je dio mehanizma pomoću kojeg inhibiraju sintezu proteina stanica domaćina i na taj način inhibiraju urođeni imunitet organizma (30).



**Slika 2.** Shematski prikaz stvaranja stres granula i njihove antivirusne funkcije (31).

Na slici je prikazan mehanizam formiranja stresnih granula u odgovoru na prisustvo virusne dvostruke lančane RNA (dsRNA) tokom virusne infekcije, uključujući ulogu ključnih proteina kao što su PKR, eIF2 $\alpha$ , G3BP, i antivirusnih proteina.

## 1.4 COVID-19

COVID-19 (engl. *coronavirus disease*) je zarazna bolest dišnih puteva uzrokovana SARS-CoV-2 virusom. Radi se o teškom akutnom respiratornom sindromu koronavirus 2 (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*). SARS-CoV se prvi put pojavio u Kini 2002. godine i uzrokovao epidemiju koja je trajala 8 mjeseci. Zabilježeno je preko 8 tisuća slučajeva sa stopom smrtnošću od skoro 11%. Nakon toga se opet pojavljuje 2012. godine, ovaj puta u Saudijskoj Arabiji u obliku bliskoistočnog respiratornog sindroma koronavirusa (MERS-CoV od engl. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*), sa nešto manje od 2500 slučajeva, ali s velikom stopom smrtnošću od 34,77% (32).

Posljednji, SARS-CoV-2 soj, je otkriven u Kini krajem 2019. godine. Bolest koju uzrokuje u pravilu ima najnižu stopu smrtnosti (procjena na 3,4%), ali se zbog svog kapljičnog načina prijenosa prenosi brže i šire od svojih prethodnika (33). Tako je u roku od nekoliko mjeseci od njegovog otkrića, u ožujku 2020. godine, od strane Svjetske zdravstvene organizacije proglašena pandemija COVID-19. Pandemiji je kraj proglašen tek u svibnju 2023. godine, a od njenog početka, od posljedica zarazom SARS-CoV-2 umrlo je više od sedam milijuna ljudi (34).

Iako je pandemija službeno gotova, slučajevi zaraza se i dalje bilježe u 2024. godini. Prema trenutnim podacima, samo u periodu od 11. do 18. kolovoza 2024. je prijavljeno gotovo 60 tisuća novih slučajeva u svijetu (35).

Najčešće tegobe su povišena tjelesna temperatura, kašalj i dispneja, a rjeđe gastrointestinalni simptomi poput proljeva (36). Česta je pojava nestanak okusa i olfaktorni poremećaji u ranom stadiju zaraze (37). Jedna od ozbiljnih i čestih komplikacija kod pacijenata primljenih na bolničko liječenje su trombotski događaji i pogađaju čak 31% takvih pacijenata (38). Starija dobna skupina (65 godina ili stariji) ima veći rizik od razvoja teške infekcije izazvane SARS-CoV-2 zbog većeg udjela utvrđenih komorbiditeta (36). Čimbenici koji se često povezuju s većom prevalencijom trajnih simptoma uključuju ženski spol, stariju dob, teške bolesti tijekom akutne faze COVID-19, više komorbiditeta, produljeno trajanje boravka u bolnici i visok indeks tjelesne mase. Veliki broj pacijenata je prijavilo i trajne posljedice koji su prisutni nakon prestanka infekcije, a najčešći su umor, dispneja, posttraumatski stresni poremećaj, anksioznost i depresija (39).

### 1.4.1. Prevencija COVID-19

Za prevenciju je razvijeno 8 cjepiva za hitnu upotrebu, a nekoliko cjepiva je u stadiju kliničkih pokusa. Imunost izazvana cjepivom i imunost stečena prebolijevanjem zaraze pružaju snažnu zaštitu od teškog oblika bolesti uzrokovanom naknadnom infekcijom SARS-CoV-2 te smanjuju vjerojatnost potrebe za hospitalizacijom ili prijemom na intenzivnu njegu. Visoka pokrivenost cijepljenjem postignuta u nekim zemljama prije visokih stopa zaraze virusom pomogla je smanjiti stopu teških ishoda. Najjača zaštita dolazi od hibridnog imuniteta, koji je imunitet razvijen kombinacijom cijepljenja i prethodnih infekcija (40).

### 1.4.2. Liječenje COVID-19

Postojeća istraživanja liječenja COVID-19 koristila su registrirane lijekove koji kao indikaciju imaju liječenje COVID-19, a u nekima su korišteni i lijekovi koji su indicirani za liječenje influenze i pneumonije. Često im je meta djelovanja RNA polimeraza, a mehanizam djelovanja inhibicija replikacije virusne RNA (41). Primjerice, sistemski pregled randomiziranih kliničkih ispitivanja koja su koristila antivirusni lijek favipiravir, lijek indiciran za liječenje influenze, je pokazao da uz njegovu primjenu nije utvrđeno kliničko poboljšanje, smanjena potreba za hospitalizacijom niti smanjenje smrtnosti (42). Rađen je i sustavni pregled korištenja lijeka remdesivira, lijeka registriranog za liječenje COVID-19, koji je pokazao da remdesivir vjerojatno ima malo ili nimalo učinka na sveukupnu smrtnost ili bolničku smrtnost pojedinaca s umjerenom do teškom bolešću COVID-19 (43). Dostupni dokazi o učinku liječenja antivirusnim lijekovima tijekom akutnog COVID-19 i smanjenom riziku od razvoja dugotrajnog COVID-a su proturječni. Heterogeni dokazi upućuju na to da bi remdesivir ili nirmaltrevir/ritonavir mogli imati potencijalni zaštitni učinak kod dugotrajnog COVID-a. Ograničen broj studija pokazao je potencijalnu korist drugih lijekova kao što su deksametazon ili metformin, ali potrebno je više studija (44).

S obzirom da učinkoviti lijek još nije pronađen niti razvijen, glavna terapija za COVID-19 je podupiruća njega. Za većinu simptoma moguća je simptomatska terapija, no kod nekih pacijenata dolazi i do sekundarnih bakterijskih infekcija koje se tretiraju antibioticima. Za pacijente s ozbiljnom infekcijom primarna terapija je terapija kisikom (31).

## 1.5. Stres granule u zarazi SARS-CoV-2

Kao što je već napomenuto, stvaranje stres granula može inhibirati sintezu proteina, ograničiti potrošnju energije i popraviti štetu izazvanu stresom. Sveukupni učinak je preživljavanje stanica u stresnim uvjetima te je bitan obrambeni mehanizam stanica domaćina. Kod zaraze SARS CoV-2, što se smatra akutnim stresom za organizam, dolazi do inhibicije navedenog obrambenog mehanizma, odnosno ne dolazi do stvaranja stres granula.

SARS-CoV-2 koristi svoj nukleokapsidni protein (N protein) kako bi inhibirao stvaranje stresnih granula, ključnog mehanizma antivirusne obrane. N protein se veže na G3BP1, važan stanični protein za formiranje stres granula, koristeći tekuće-tekuće odvajanje faza (engl. *liquid-liquid phase separation*). Interakcija N-proteina s G3BP1 odvija se putem hidrofobnog džepa u G3BP1, gdje N protein umeće svoj fenilalaninski ostatak (F17) u NTF2L (od engl. *nuclear transport factor 2-like*) domenu G3BP1. Ova interakcija blokira formiranje stres granula, omogućujući virusu efikasniju replikaciju i izbjegavanje imunološkog odgovora (45, 46).

G3BP1 ima ključnu ulogu u agregaciji proteina i RNA u stresnim granula te se sastoji od više domena, uključujući NTF2L (koji omogućuje interakciju s drugim proteinima), RNA-vezujuću domenu (RRM, od engl. *RNA Recognition Motif*) i arginin-glicinski bogate regije. Ove komponente omogućuju formiranje stres granula koje usporavaju virusne infekcije. Virusni N protein iskorištava navedeni mehanizam tako što se natječe s drugim staničnim proteinima za vezivanje za G3BP1, ometajući njegovu funkciju. Ova konkurencija je ključna za sprječavanje stvaranja stres granula (45, 46).

Eksperimentalna istraživanja pokazala su da mutacija na N proteinu, odnosno njegovom F17A ostatku, poništava sposobnost ovog proteina da se veže za G3BP1, čime se omogućuje formiranje stres granula i smanjuje replikacija virusa (45, 46).

## 1.6. Razvitak inhibitora stres granula na temelju N proteina koronavirusa

S obzirom da SARS-CoV-2 dokazano inhibira nastanak stres granula pomoću svog N proteina, njegova struktura može koristiti za pronalazak postojećih i sintezu novih lijekova kao terapijska mogućnost kod bolesti kojima je patogenezna pretjerano stvaranje stres granula. Primjerice, u nekoliko vrsta raka je dokazana korelacija veće količine stres granula i povećanog



preživljavanja stanica tumora putem mehanizama kao što su olakšano preživljavanje i otpornost na kemoterapiju (23).

Kod raka gušterače, mutirane stanice raka pod stresom mobiliziraju stres granule kako bi se poboljšala sposobnost tumora za preživljavanje (47). Smanjena količina G3BP1 u ksenograftima, presađenim stanicama sarkoma, sprječava *in vivo* stvaranje stres granula i invaziju tumora te potpuno blokira metastaze sarkoma na plućima u mišjim modelima (48). Kod glioma, ukazano je da bi stvaranje stres granula u njihovim stanicama moglo biti odgovorno za otpornost malignih glioma na kemoterapijske lijekove (49). Slično tomu, lijek sorafenib inducira stvaranje stres granula u različitim stanicama raka uključujući hepatocelularni karcinom, za čije liječenje je indiciran (50).

Također, povećana količina stres granula povezuje se i s mehanizmom pogoršanja nekih neurodegenerativnih bolesti. Kada se stres granule ne uspiju pravilno rastaviti, mogu potaknuti nakupljanje toksičnih proteinskih fibrila. Ova patološka fibrilacija RBP-a u stres granulama osigurava vezu između produljenog staničnog stresa i razvoja neurodegenerativnih bolesti (51).

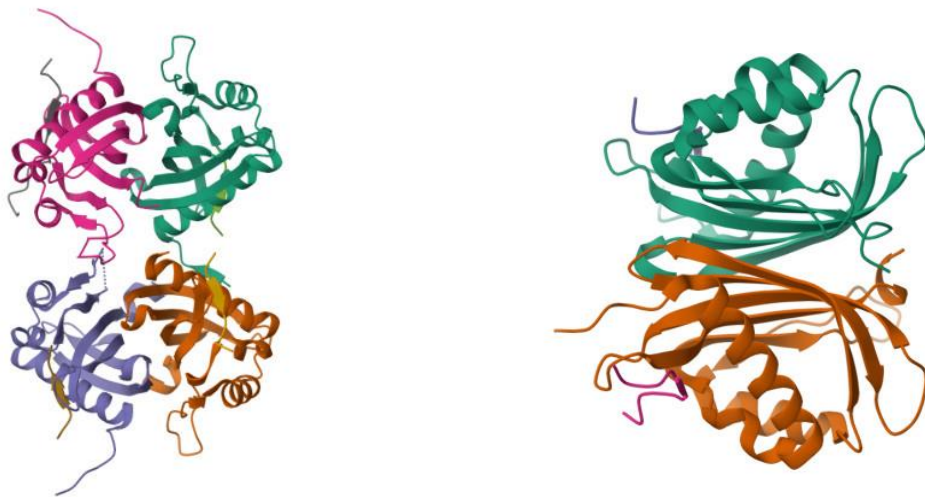
## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je razviti nove inhibitore G3BP1/2, na temelju strukture poznatog inhibitora, N proteina SARS-CoV-2.

### **3. METODE**

### 3.1. Pronalazak kristalografske strukture receptora pregledom baze podataka

U bazi podataka Protein Data Bank (52) pronađene su kristalografske strukture G3BP proteina pod šiframa 8th1, 7suo i 8v11. Prve dvije strukture predstavljaju strukture G3BP proteina u kompleksu s SARS-CoV-2 N proteina dvije varijante COVID-19 virusa - divlji tip (7suo) i alfa varijanta (8th1), dok 8v11 predstavlja G3BP protein u kompleksu s eksperimentalno potvrđenim inhibitorom, G3Ia.



**Slika 3.** Strukture G3BP proteina u kompleksu s SARS-CoV-2 N proteina dvije varijante COVID-19 virusa: lijevo: alfa varijanta (8th1) (45), desno: divlji tip (7suo) (53).



**Slika 4.** G3BP protein u kompleksu sa svojim eksperimentalno potvrđenim inhibitorom G3Ia (54).

### 3.2. Analiza vezivanja N proteina različitih sojeva koronavirusa na G3BP protein

Discovery Studio (55) je program je korišten za analizu.

Na temelju pronađenih kristalografskih struktura 7suo i 8th1 je određeno vezivanje N proteina dviju varijanti koronavirusa (alfa varijanta i divlji tip). Uspoređivane su razlike u vezivanju aminokiselina G3BP proteina s aminokiselinama N proteina i vrstama veza u svim interakcijama.

Usporedom analizom pronađene su zajedničke regije na koje se veže N protein oba tipa koronavirusa. Na taj način smo identificirali ključne farmakofore N proteina za vezanje na G3BP protein.

### 3.3. Probir baze podataka

Nakon pronalaska farmakofora koji omogućavaju vezanje za G3BP1/2 protein, korišten je mrežni servis ZINCPharmer (56). On sadrži bazu molekula koja se može pretraživati.

Mrežni servis je korišten za izradu mape farmakofora odnosno prikaza dijelova strukture koji su bitni za vezanje za G3BP protein. Nakon toga je proveden probir molekula (engl. *screening*) tako što su pronađene sve molekule koje imaju identične farmakofore kao izrađena mapa farmakofora.

### 3.4. Obrada strukture receptora

Idući korak je sidrenje pronađenih molekula i referentnih molekula na receptor. Za sidrenje su potrebni ligandi i receptor, odnosno meta djelovanja liganada – G3BP protein.

Odabrana struktura proteina je pronađena u bazi podataka Protein Data Bank (šifra 8v11).

Kako bi sidrenje moglo biti provedeno, receptor i ligande je potrebno obraditi. To je većinski napravljeno pomoću programa Chimera (57).

Postupci za pripremanje molekula za sidrenje:

- uklanjanje otapala
- uklanjanje liganda

- uklanjanje nepotrebnih peptidnih lanaca
- dodavanje vodika i naboja
- popravljjanje aminokiselinskih lanaca koji su nedostajali koristeći Dunbrackovu 2010 knjižicu rotamera (58)
- provođenje minimizacije energije proteina pomoću AMBER programa integriranog u Chimera (59,60)

### **3.5. Priprema fleksibilnog i rigidnog dijela receptora za molekulske sidrenje**

AutoDock Tools (verzija 1.5.6.) (61) je program korišten za konačnu pripremu proteina (receptora) za molekulske sidrenje. Odabrani su fleksibilni i rigidni dio receptora te datoteke pripremljene za fleksibilni i rigidni dio receptora koji su bili meta sidrenja.

### **3.6. Priprema liganda**

Open Babel (62) je program korišten za početnu obradu liganda, odnosno za dodavanje vodika na strukture. Nakon toga je korišten program Meeko (63) za daljnju obradu liganda:

- dodjeljivanje tipova atoma
- dodavanje naboja
- provjera protonacije
- spajanje nepolarnih vodika
- definiranje rotabilnih veza

### **3.7. Molekularno sidrenje**

AutoDock Vina (verzija 1.1.2.) (64–66) je program korišten za molekularno sidrenje. Nalazi se na superračunalu Supek koji se nalazi na Znanstveno-učilišnom kampusu Borongaj Sveučilišta u Zagrebu te mu je pristupljeno vezom na daljinu.

Za molekularno sidrenje je korišten jedan čvor superračunala s 64 procesorske jezgre i 128GB radne memorije.

Provedeno je fleksibilno sidrenje molekula pri čemu su aminokiselinski ostatci arginin na položaju 32 i lizin na položaju 123 činili fleksibilni dio receptora dok je ostatak receptora bio rigidan. Postavke sidrenja su postavljene tako da je temeljitost sidrenja bila 300 i maksimalni broj poza koje će se generirati tijekom sidrenja 100.

### **3.8. Validacija molekularnog sidrenja**

G31a je eksperimentalno potvrđeni inhibitor G3BP1/2 čija je kristalografska struktura poznata te je dostupna u bazi podataka PDB.

Kako bismo validirali molekulske sidrenje, strukturu potvrđenog inhibitora smo preklapili s najboljom pozom liganda. Rezultate preklapanja smo ocjenjivali prema RMSD (od engl. *root-mean-square deviation*) vrijednosti. Uobičajeni pristup za usporedbu struktura biomolekula ili čvrstih tijela je translacija i rotacija jedne strukture u odnosu na drugu kako bi se navedena vrijednost smanjila. RMSD predstavlja kvantifikaciju razlike između eksperimentalne i predviđene pozicije inhibitora. Ako je RMSD manji od 2 Å, sidrenje se smatra uspješnim.(67) Dokazali smo da je model validan jer je RMSD vrijednost <2.

### **3.9. Obrada rezultata sidrenja**

ChimeraX (68,69) je program korišten za stvaranje slika kompleksa ligand-receptor nakon sidrenja te za preuzimanje kompleksa za daljnju analizu vezanja putem Discovery Studio programa.

### **3.10. Predviđanje potencijalne toksičnosti pronađenih liganada**

PRED-hERG (70,71) je mrežni računalni alat korišten za predviđanje srčane toksičnosti preko hERG kalijevih kanala. Ako dođe do blokade hERG kalijevih kanala lijekom, može doći do ozbiljnih srčanih aritmija i smrti. Zbog toga se koristi za predviđanje srčane toksičnosti uzrokovane ispitivanim molekulama kako bi se blokatori navedenih receptora eliminirali iz daljnjeg istraživanja potencijalnih liganada za G3BP receptor.

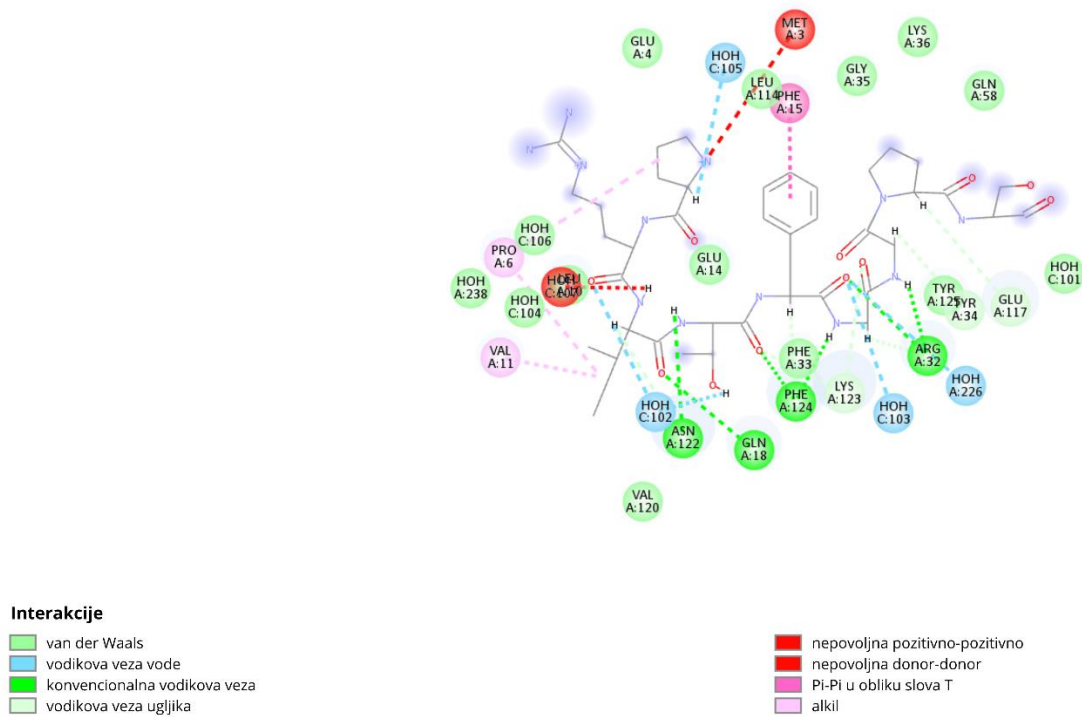


### **3.11. Predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava liganada**

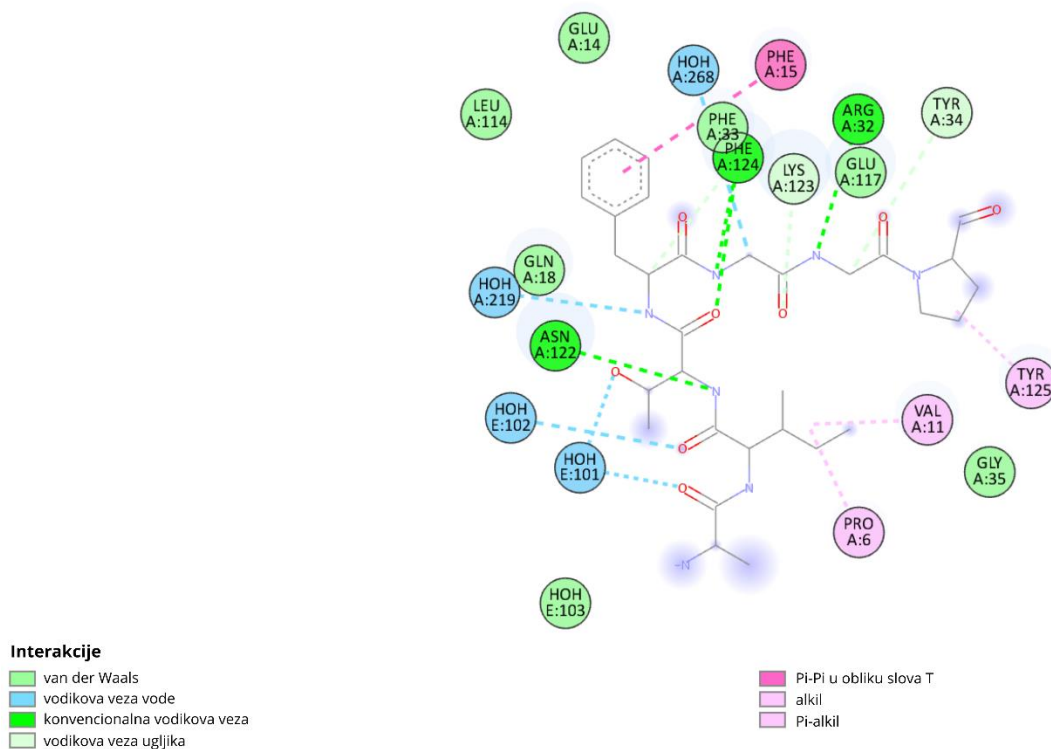
RDKit (72) je program kojim smo izračunali fizikalno-kemijska svojstva liganada. Ligande smo rangirali u tablici prema ocjeni sidrenja, fizikalno-kemijskim svojstvima i predviđenoj kardiotsičnosti.

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Analiza vezivanja N proteina dvaju sojeva koronavirusa za G3BP1/2



Slika 5. Vezivanje N proteina divljeg tipa koronavirusa za G3BP1/2



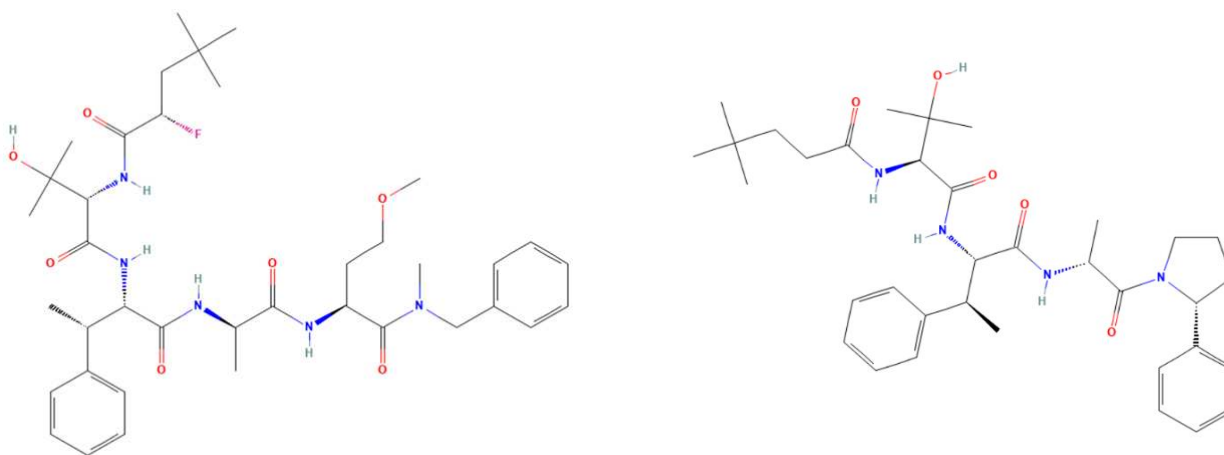
Slika 6. Vezivanje N proteina alfa tipa koronavirusa za G3BP1/2

Slike 5 i 6 (iznad) prikazuju analizu vezivanja N proteina iz dvaju sojeva koronavirusa za G3BP1/2. Vezani spojevi su analizirani te je putem toga je zaključeno koje su zajedničke aminokiseline potrebne za njihovo vezivanje za receptor. Na taj način su dobivene potencijalne farmakofore. Te aminokiseline su prolin 6, valin 11, fenilalanin 124, asparagin 122, fenilalanin 15 i fenilalanin 33.

Odabran je fragment N proteina koji omogućuje vezanje svih pet aminokiselina koje su potencijalne farmakofore i na temelju toga konstruiran spoj uzor koji je služio za izradu farmakoforne mape. Spoj uzor predstavlja fragment N proteina koji se veže na G3BP.

## 4.2. Probir baze podataka

Na temelju spoja uzora je izrađena farmakoforna mapa u ZincPharmeru. Pronađeno je 9022 molekule koje svojim farmakoforima odgovaraju našoj farmakofornoj mapi. Nakon uklanjanja duplikata i molekula koje su bile defektne, ostalo je 5921 molekula koje su preuzete na računalo. Pridodana su još dva liganda: referentni ligandi G3Ia i G3Ib (Slika 7.) što ukupno čini 5924 liganda.



**Slika 7.** Strukture eksperimentalno dokazanih inhibitora G3BP  
a) G3BP inhibitor a (G3Ia) (47) b) G3BP inhibitor b (G3Ib) (73)

### 4.3. Rezultati sidrenja

U rezultatima sidrenja (Tablica 1), izdvojeno je 20 liganada s najpovoljnijim afinitetom vezanja, po čemu su i poredani. Za svaki spoj su navedena i svojstva: molekulska masa, kardiotoksičnost, logP te broj donora i akceptora vodikovih veza u svakom spoju.

Ligandi s najpovoljnijim afinitetom vezanja, a koji nisu kardiotoksični imaju afinitete -11,11, -10,94 i 10,87. Eksperimentalno potvrđeni inhibitor G3BP ima afinitet -6.11.

Ligandi s najpovoljnijim afinitetom imaju molekulske mase 434,14, 423,16 i 429,21 g/mol. G3Ia ima molekulsku masu 713,41 g/mol.

Spomenuti ligandi imaju logP vrijednosti 3,09, 4,39 i 4,10 dok G3Ia ima logP vrijednost 2,99.

G3Ia ima 5 donora i 7 akceptora vodikove veze, dok spomenuti ligandi imaju maksimalno 3 donora, odnosno 4 akceptora vodikove veze.

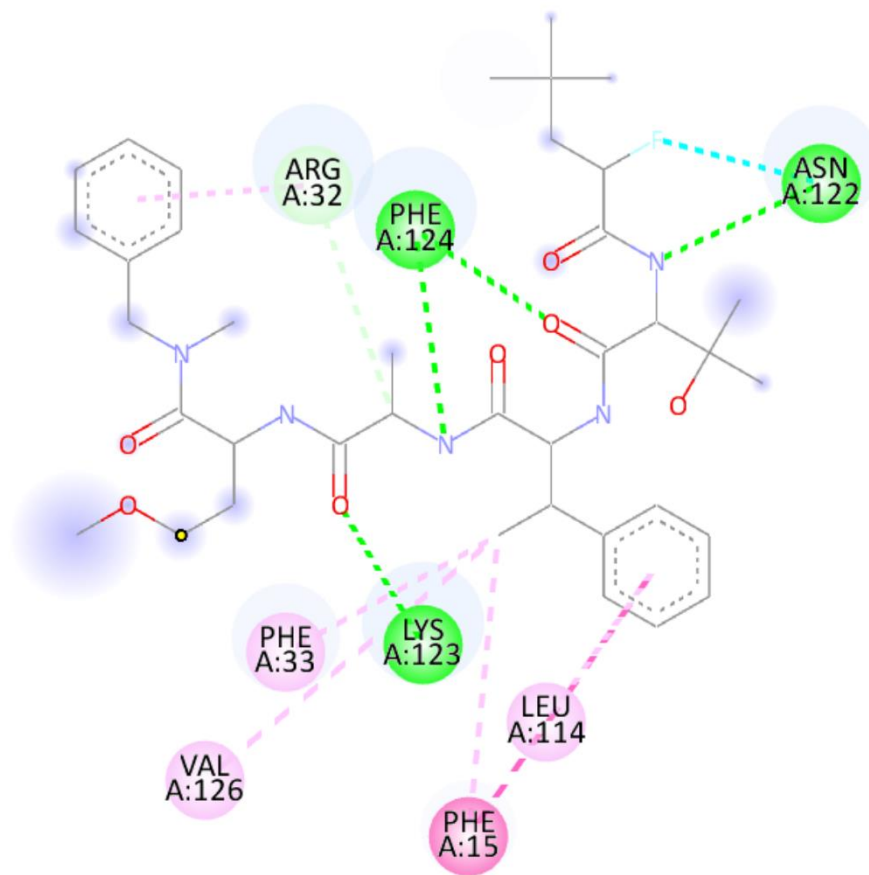
**Tablica 1.** 20 liganada s najpovoljnijim afinitetom vezanja, fizikalno kemijskim svojstvima i procjeni kardiotoksičnosti.

Ime liganda	Afinitet	Molekulska masa (g/mol)	Kardiotoksičan	LogP <sup>a</sup>	HBD <sup>b</sup>	HBA <sup>c</sup>
G3Ia	-6,11	713,416377352	ne	2,9895	5	7
G3Ib	-7,8	606,3781207	ne	4,2253	4	5
ZINC40390689	-11,14	465,1800896	da	3,5503	3	5
ZINC09793391	-11,11	434,1390333	ne	3,0942	3	4
ZINC08966180	-10,94	423,1582915	ne	4,3987	2	3
ZINC08644755	-10,87	429,2052417	ne	4,10104	2	3
ZINC46055806	-10,77	492,3009393	da	4,98672	2	2
ZINC08644707	-10,76	451,1895917	ne	4,6374	2	3
ZINC13112445	-10,68	455,2208918	ne	4,363	2	3
ZINC03459302	-10,67	433,2365419	ne	4,029	2	3
ZINC40383601	-10,6	445,2113897	da	3,4699	3	5
ZINC08644752	-10,56	429,2052417	ne	4,10104	2	3
ZINC12806625	-10,56	467,2208918	ne	4,29264	2	3
ZINC40388864	-10,53	431,1957397	da	3,2239	3	5
ZINC03275368	-10,52	441,1688562	ne	3,8969	2	4
ZINC05440358	-10,51	449,1863178	ne	2,7288	3	6
ZINC10217601	-10,49	469,1750042	da	2,5019	2	5
ZINC40399629	-10,49	443,1393677	da	3,8703	4	5
ZINC40383598	-10,48	445,2113897	da	3,4699	3	5
ZINC09577803	-10,46	470,1954053	ne	3,64154	3	4
ZINC08899739	-10,45	470,1954053	da	3,64154	3	4
ZINC40389097	-10,43	431,1957397	da	3,3664	3	5

<sup>a</sup> omjer raspodjele spoja između otapala oktanola i vode

<sup>b</sup> donor vodikove veze od engl. *hydrogen bond donor*

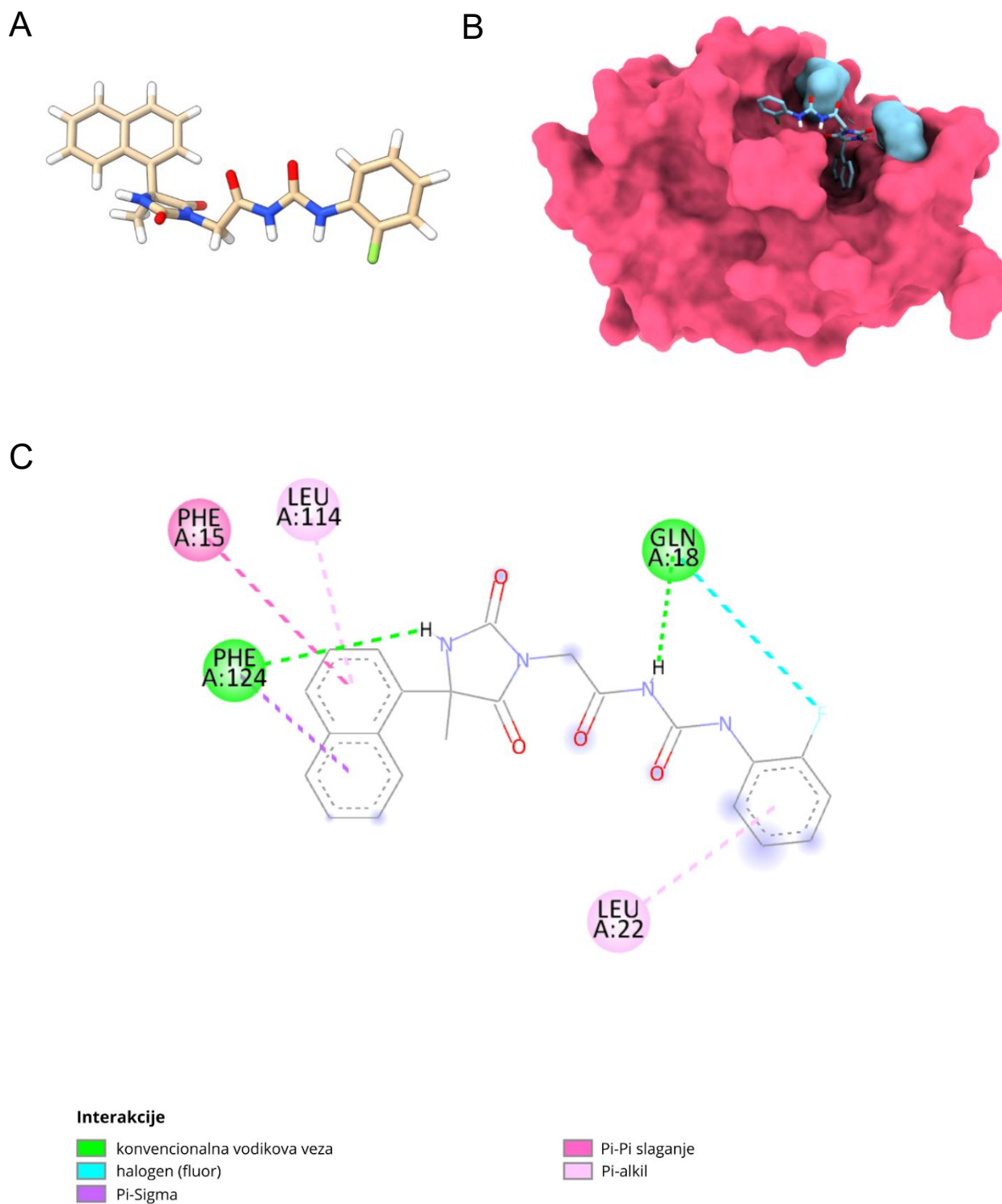
<sup>c</sup> akceptor vodikove veze od engl. *hydrogen bond acceptor*



### Interakcije

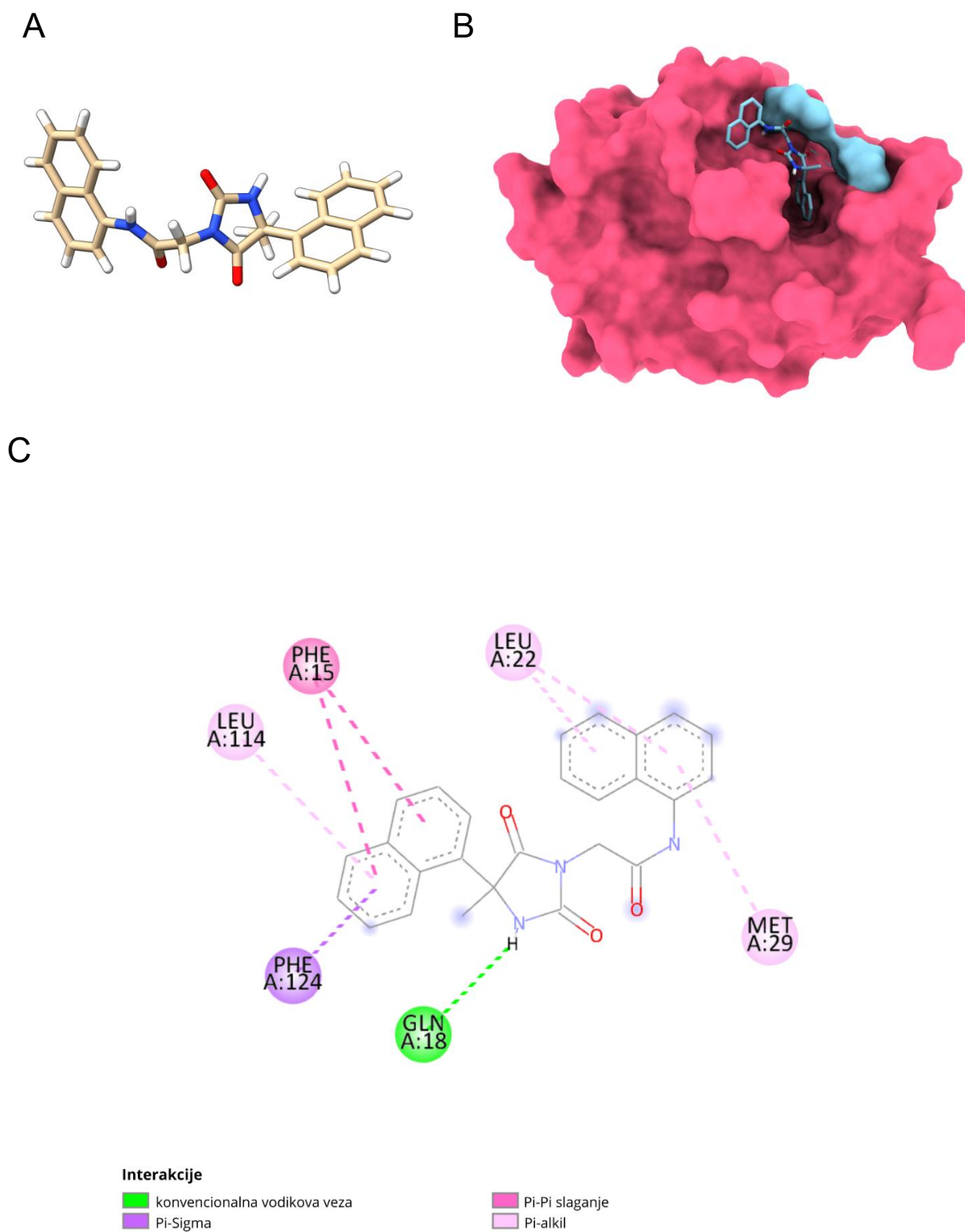
- |   |   |
|---|---|
| <span style="color: green;">■</span> konvencionalna vodikova veza | <span style="color: magenta;">■</span> Pi-Pi u obliku slova T |
| <span style="color: lightgreen;">■</span> vodikova veza ugljika   | <span style="color: lightpink;">■</span> alkil                |
| <span style="color: cyan;">■</span> halogen (fluor)               | <span style="color: magenta;">■</span> Pi-alkil               |

**Slika 8.** Referentni spoj G3Ia i njegove interakcije s veznim mjestom na receptoru.

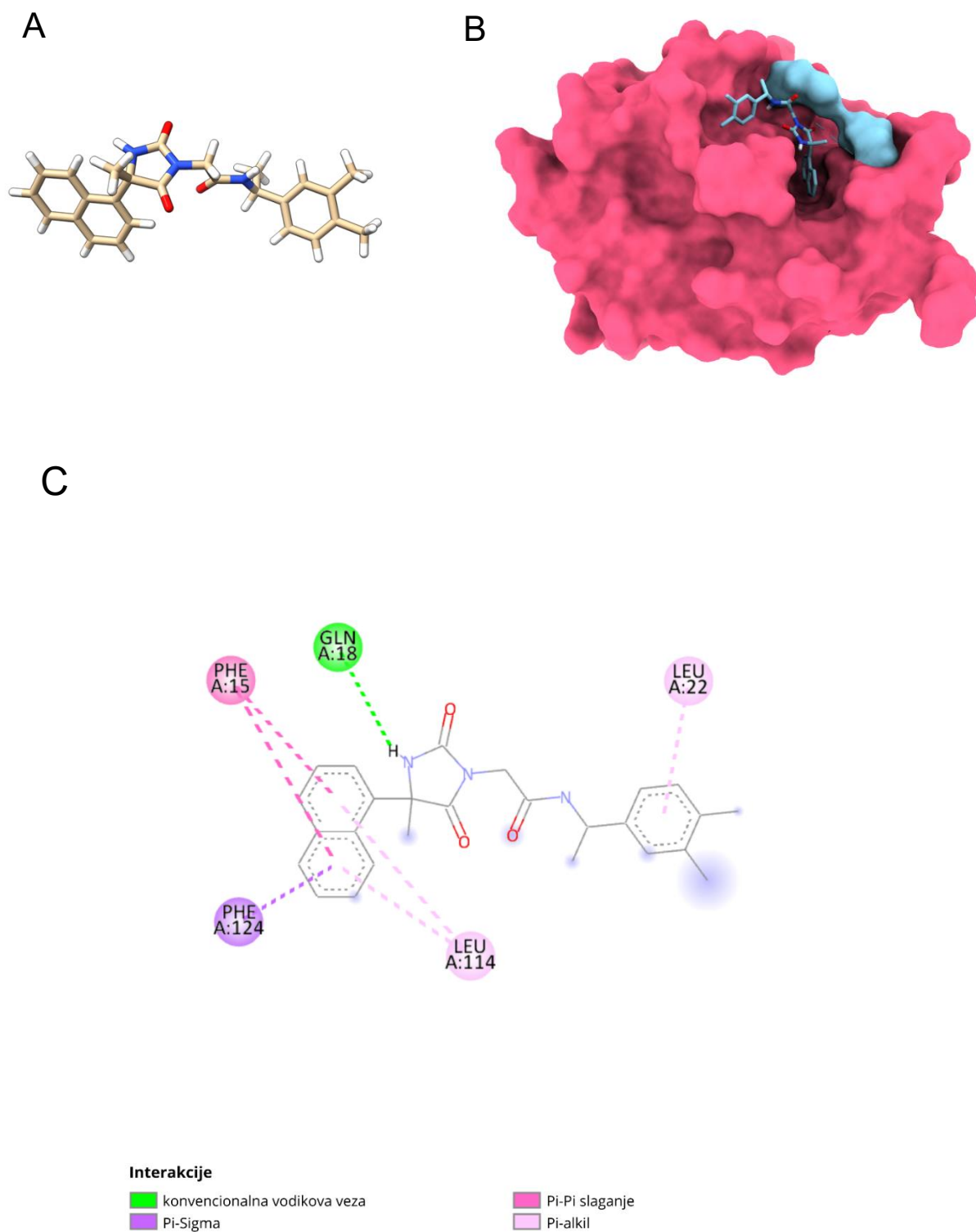


**Slika 9.** a) ligand ZINC09793391, b) ligand usidren u receptor (ružičasto-rigidni dio receptora, plavo-fleksibilno dio receptora), c) aminokiseline receptora putem kojih je ligand vezan te vrste interakcija između receptora i liganda

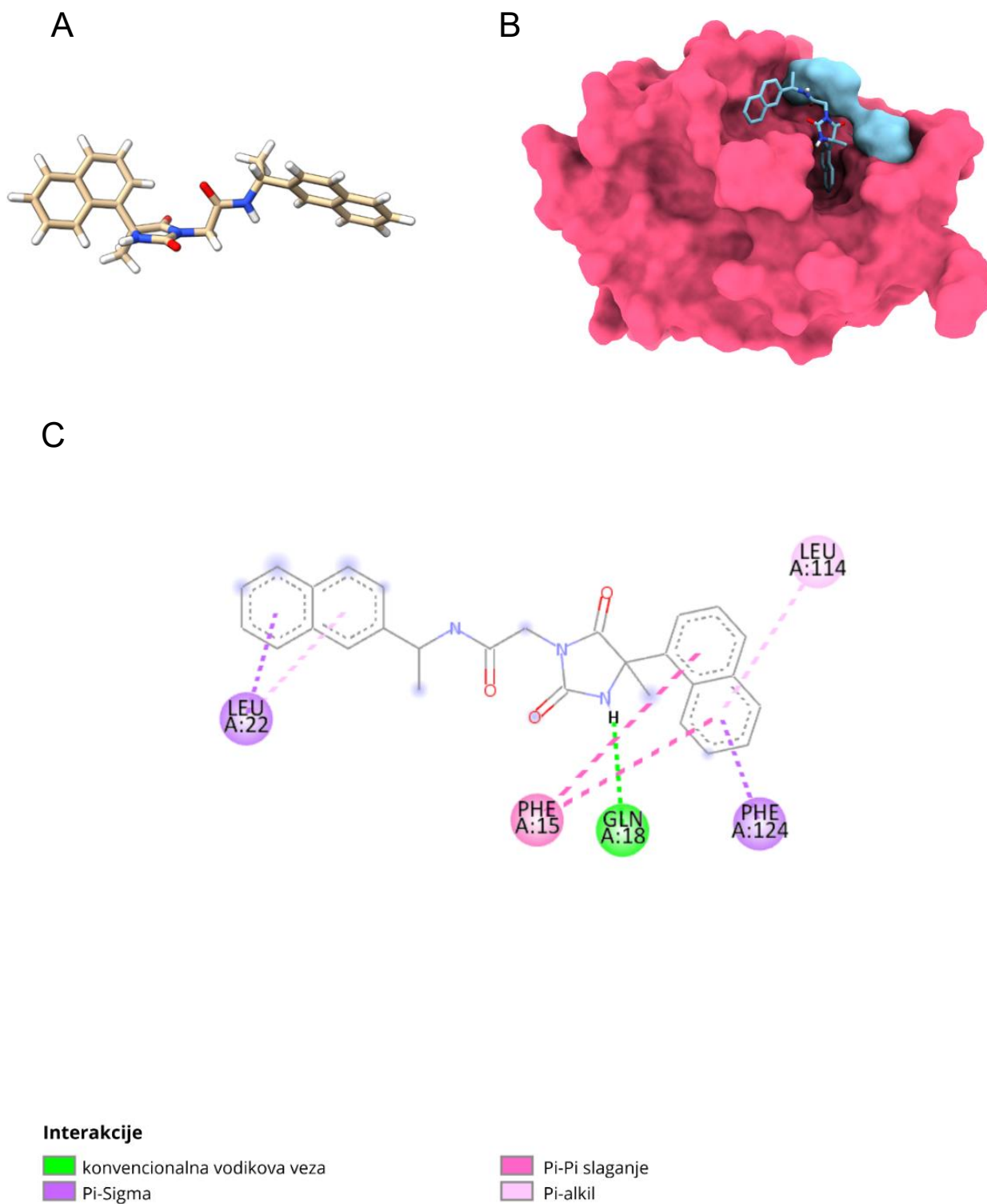




**Slika 10.** a) ligand ZINC08966180, b) ligand usidren u receptor (ružičasto-rigidni dio receptora, plavo-fleksibilno dio receptora), c) aminokiseline receptora putem kojih je ligand vezan te vrste interakcija između receptora i liganda

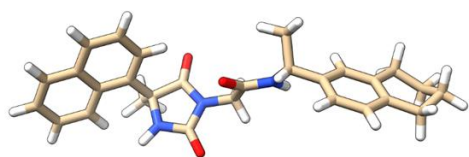


**Slika 11.** a) ligand ZINC08644755, b) ligand usidren u receptor (ružičasto-rigidni dio receptora, plavo-fleksibilno dio receptora), c) aminokiseline receptora putem kojih je ligand vezan te vrste interakcija između receptora i liganda

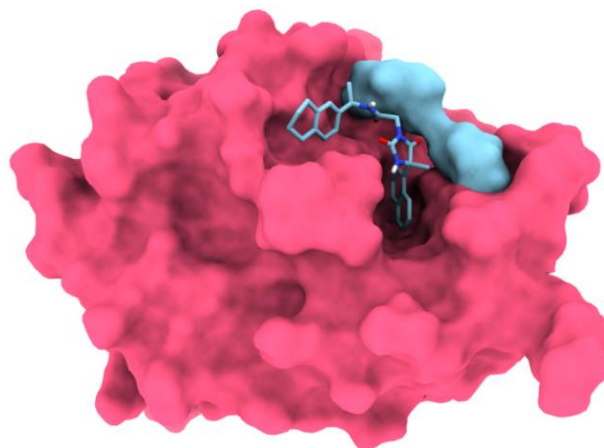


**Slika 12.** a) ligand ZINC08644707, b) ligand usidren u receptor (ružičasto-rigidni dio receptora, plavo-fleksibilno dio receptora), c) aminokiseline receptora putem kojih je ligand vezan te vrste interakcija između receptora i liganda

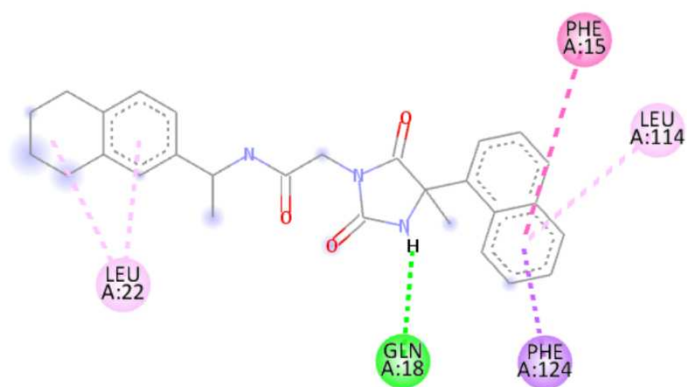
A



B



C



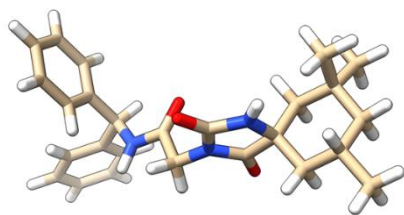
#### Interakcije

- konvencionalna vodikova veza
- Pi-Sigma
- Pi-Pi slaganje

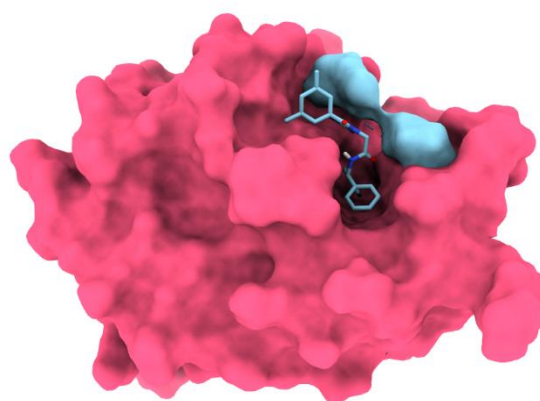
- alkil
- Pi-alkil

**Slika 13.** a) ligand ZINC13112445, b) ligand usidren u receptor (ružičasto-rigidni dio receptora, plavo-fleksibilno dio receptora), c) aminokiseline receptora putem kojih je ligand vezan te vrste interakcija između receptora i liganda

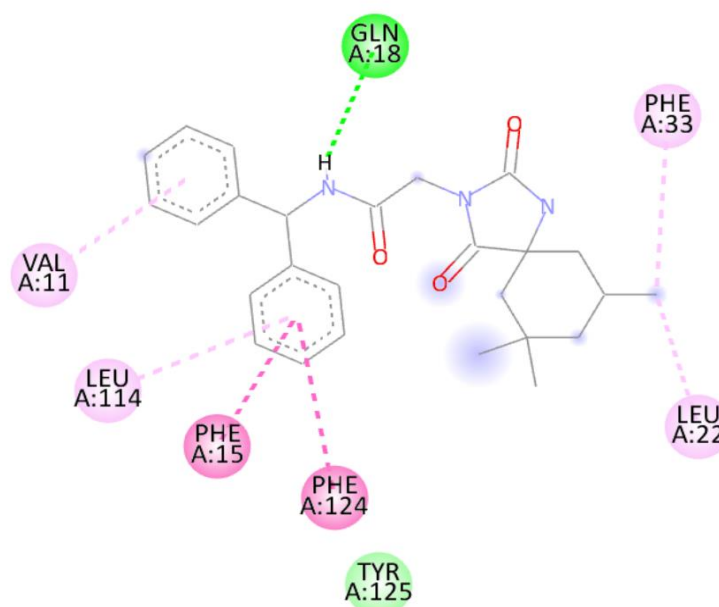
A







B



C

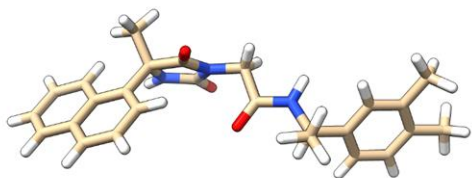


#### Interakcije

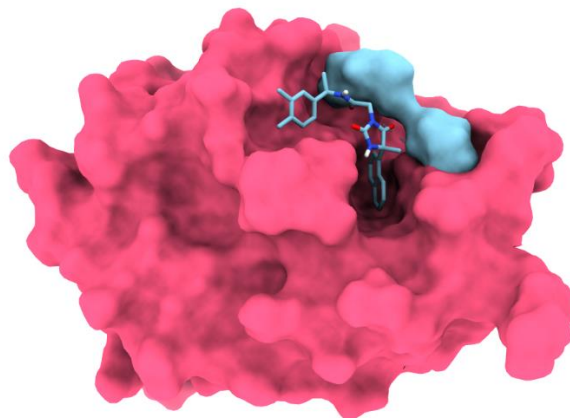
- |  |  |
|--|--|
|  van der Waals                |  amid-Pi slaganje |
|  konvencionalna vodikova veza |  alkil            |
|  Pi-Pi u obliku slova T       |  Pi-alkil         |

**Slika 14.** a) ligand ZINC03459302, b) ligand usidren u receptor (ružičasto-rigidni dio receptora, plavo-fleksibilni dio receptora), c) aminokiseline receptora putem kojih je ligand vezan te vrste interakcija između receptora i liganda

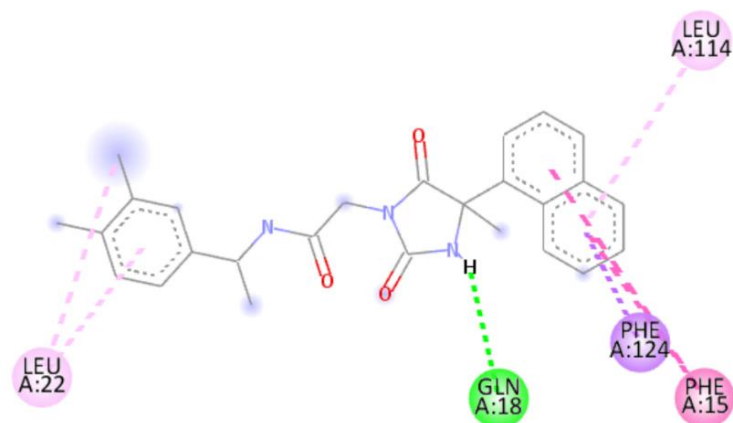
A



B




C



#### Interakcije

 konvencionalna vodikova veza

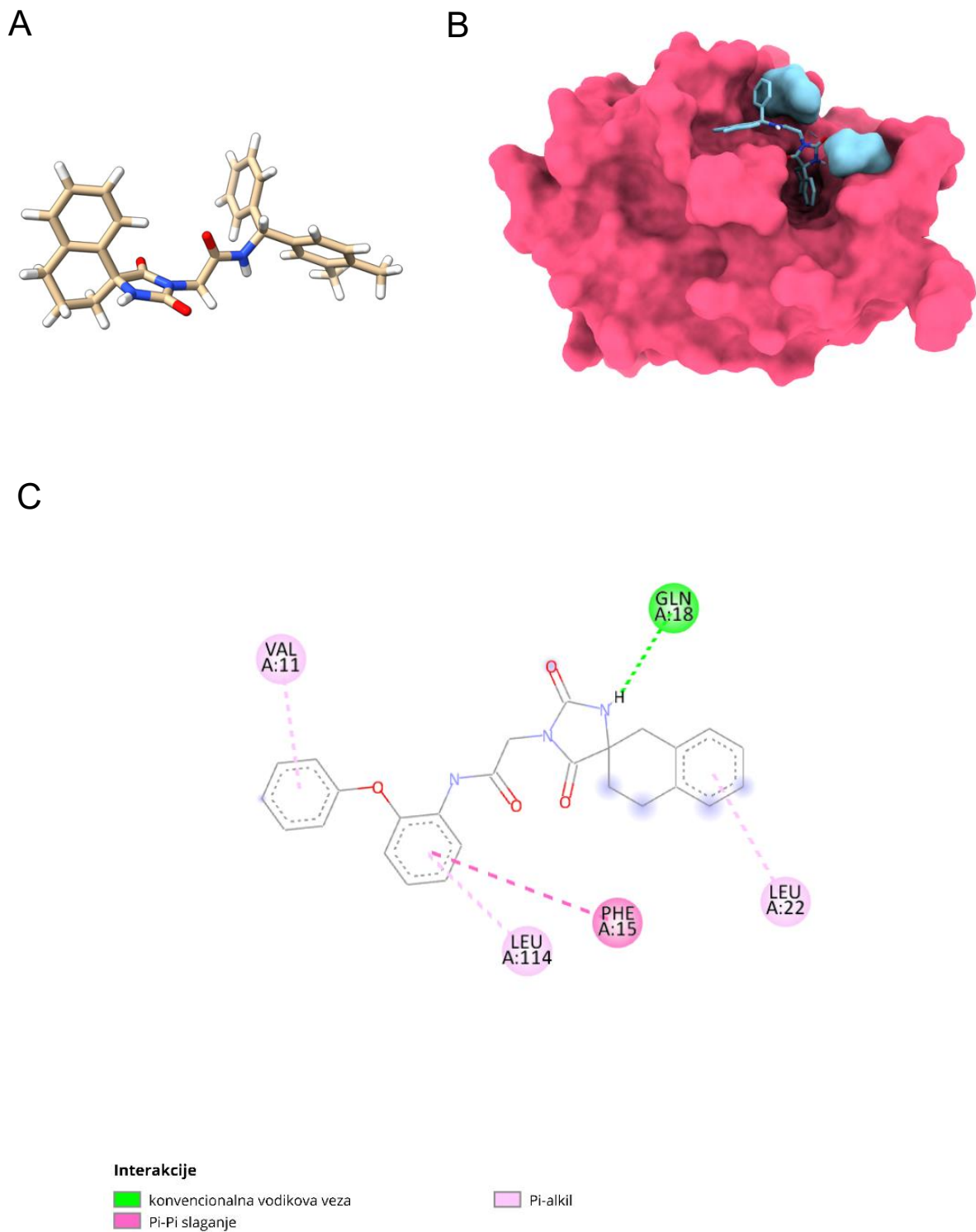
 Pi-Sigma

 Pi-Pi slaganje

 alkil

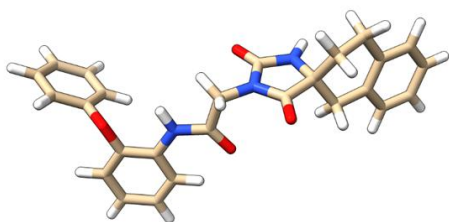
 Pi-alkil

**Slika 15.** a) ligand ZINC08644752, b) ligand usidren u receptor (ružičasto-rigidni dio receptora, plavo-fleksibilno dio receptora), c) aminokiseline receptora putem kojih je ligand vezan te vrste interakcija između receptora i liganda

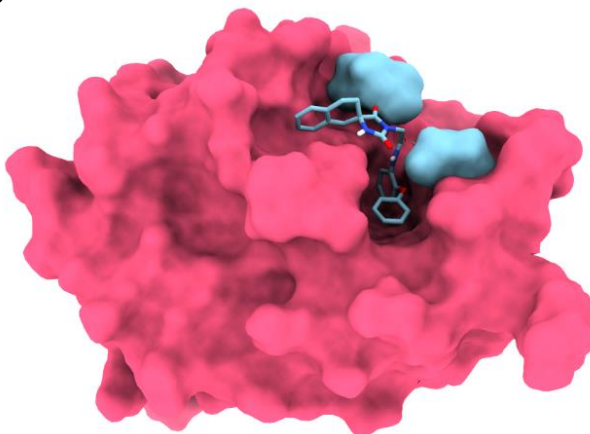


**Slika 16.** a) ligand ZINC12806625, b) ligand usidren u receptor (ružičasto-rigidni dio receptora, plavo-fleksibilno dio receptora), c) aminokiseline receptora putem kojih je ligand vezan te vrste interakcija između receptora i liganda

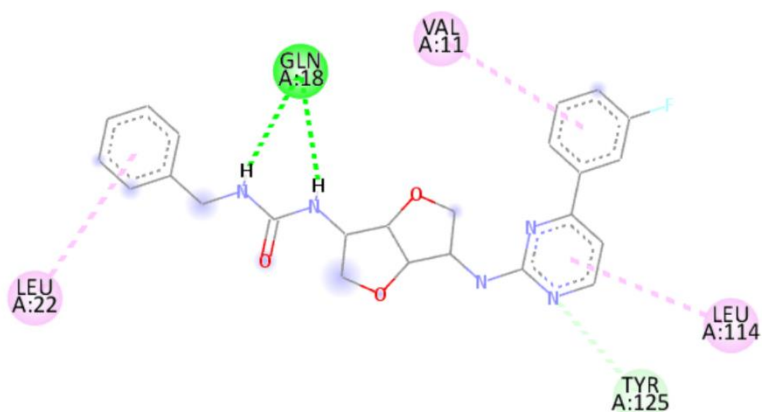
A



B



C



#### Interakcije

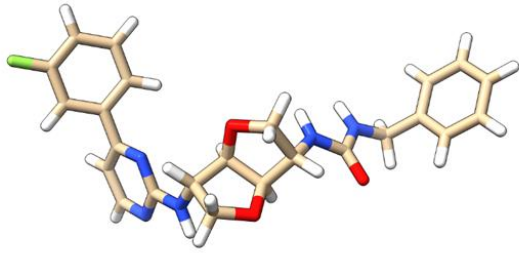
■ konvencionalna vodikova veza  
■ vodikova veza ugljika

■ Pi-alkil

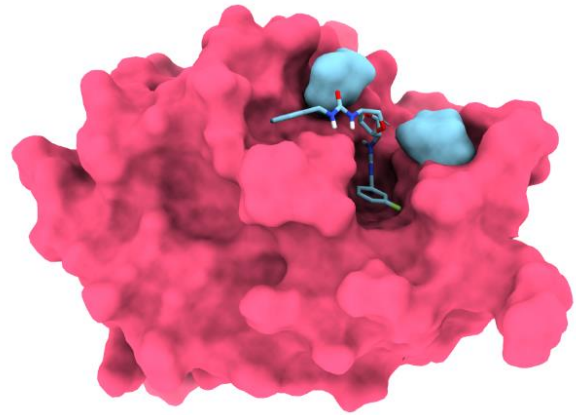
**Slika 17.** a) ligand ZINC03275368, b) ligand usidren u receptor (ružičasto-rigidni dio receptora, plavo-fleksibilno dio receptora), c) aminokiseline receptora putem kojih je ligand vezan te vrste interakcija između receptora i liganda



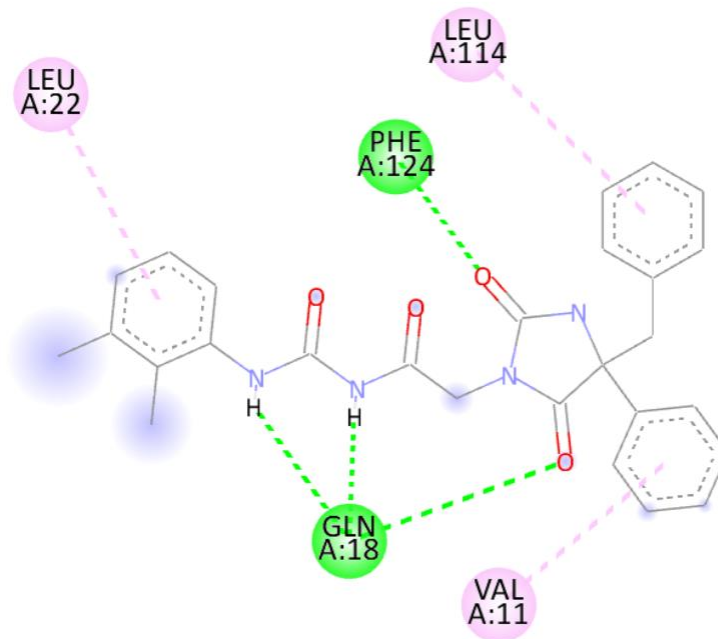
A



B



C



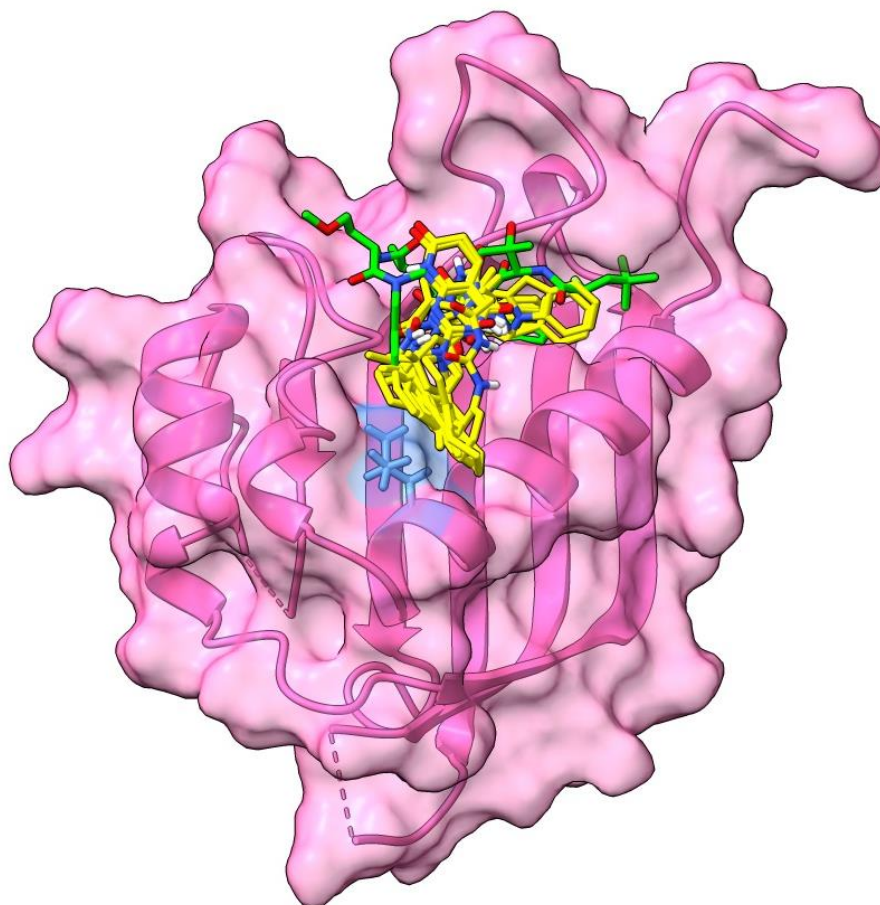
#### Interakcije

■ konvencionalna vodikova veza

■ Pi-alkil

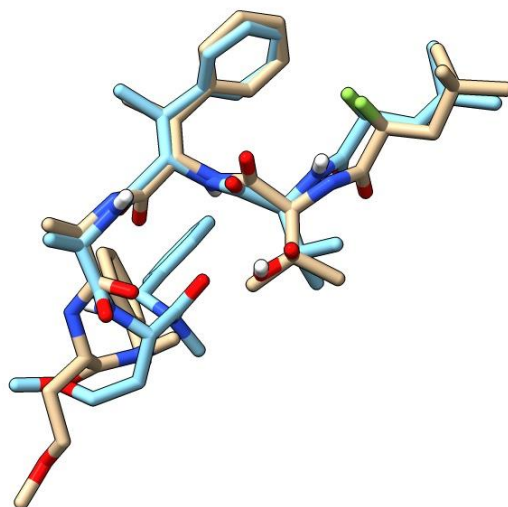
**Slika 18.** a) ligand ZINC05440358, b) ligand usidren u receptor (ružičasto-rigidni dio receptora, plavo-fleksibilno dio receptora), c) aminokiseline receptora putem kojih je ligand vezan te vrste interakcija između receptora i liganda

Uspoređujući farmakofornu mapu koju smo koristili za sidrenje, koja je uključivala asparagin 122, fenilalanin 15, fenilalanin 124, valin 11 i prolin 6, s farmakofornom mapom liganada G3Ia, uviđamo da novootkriveni ligandi imaju nekoliko novih zajedničkih interakcija s veznim mjestom receptora: glicin 18 vezan vodikovom vezom te leucin 114 i 22 koji s receptorom stupaju u pi-alkilnu interakciju. Posebno je značajna interakcija leucina 22 jer se on veže putem hidrofobnog džepa.



**Slika 19.** Vežanje novootkrivenih liganada (žuto) i referentnog liganda (zeleno) na vezno mjesto G3BP (ružičasto) s novim veznim mjestom leucina 22 (plavo).

#### 4.4. Validacija molekuskog sidrenja



**Slika 20.** Prikaz eksperimentalne poze referentnog liganda G3Ia (bež) i njegove poze nakon sidrenja (plavo).

Nakon provedbe validacije molekuskog sidrenja, dokazano je da je molekulsko sidrenje valjano jer RMSD vrijednost iznosi manje od 2 Å.

## **5. RASPRAVA**

U našem istraživanju, koristeći strukture N proteina dvaju sojeva SARS-CoV 2 virusa (dokazani inhibitor stvaranja stres granula), identificirali smo farmakofore potrebne za njihovo vezanje na G3BP1/2 (sastavni dio stres granula i bitna komponenta za njihov nastanak). Pomoću farmakofora smo izradili spoj uzor te prema njemu pronašli potencijalnih 9022 molekula za molekulske sidrenje u G3BP1/2 receptor. Uklanjanjem defektnih molekula i duplikata, došli smo do 5921 molekule koje smo uz eksperimentalno dokazane inhibitore (G3Ia i G3Ib) (54) i spoj uzor virtualno sidrili u G3BP1/2. Analizirali smo rezultate sidrenja i prikazali rezultate 10 molekula koje pokazuju najpovoljniji afinitet vezanja.

Povoljniji afinitet ovih molekula može se pripisati njihovoj sposobnosti da iskorištavaju dodatno vezno mjesto na G3BP, hidrofobni džep u blizini aminokiseline leucina 22 što dodatno stabilizira interakciju između liganada i proteina. Novopronađene molekule također imaju dodatna vezna mjesta preko aminokiselina glicina 18 i leucina 114.

Fizikalno-kemijska svojstva molekula su analizirana pomoću Lipinski pravila petice. Pravilo petice ukazuje na to da je veća vjerojatnost da će doći do slabe apsorpcije molekule kada:

1. postoji više od 5 donora vodikove veze
2. postoji više od 10 ( $5 \times 2$ ) akceptora vodikove veze
3. molekularna masa je veća od 500 Da ( $5 \times 100$ )
4. izračunati log P je veći od 5

Prema Lipinski pravilu petice, jedna od smjernica za predviđanje dobre oralne bioraspoloživosti lijeka je da spoj ne bi trebao imati više od 5 donora vodikovih veza i 10 akceptora vodikovih veza. Spojevi koji imaju više od ovih graničnih vrijednosti često imaju problema s apsorpcijom i permeabilnošću bioloških membrana. (74)

Manja molekulska masa se povezuje s boljom apsorpcijom zbog lakšeg prolaženja bioloških membrana te zbog generalne korelacije veće molekulske mase s većim brojem donora i akceptora vodikove veze čime također dolazi do slabije apsorpcije i permeabilnosti. (75)

LogP je mjera lipofilnosti molekule koja opisuje koliko se tvar preferencijalno otapa u organskom otapalu u usporedbi s vodom. Ova vrijednost se odnosi na omjer raspodjele spoja između dva nespojiva otapala – obično n-oktanol (kao predstavnik organske faze) i vode. Važan je pokazatelj za predviđanje biološke aktivnosti, farmakokinetike i apsorpcije lijekova jer utječe na sposobnost molekula da prođu kroz biološke membrane. (76)

Izdvojene molekule ne krše niti jednu stavku Lipinski pravila petice.

Osim boljeg afiniteta vezanja i zadovoljenog Lipinski pravila petice, novopronađene molekule imaju povoljnija fizikalno-kemijska svojstva u usporedbi s referentnim molekulama G3Ia i G3Ib zahvaljujući odsutnosti peptidnih veza, što teorijski povećava njihovu bioraspoloživost i potencijalno poboljšava farmakokinetiku.

Ovi rezultati predstavljaju bitan korak u pronalasku novih lijekova za liječenje tumora kao što su primjerice rak gušterače, plućni sarkom, hepatocelularni karcinom te za liječenje neurodegenerativnih bolesti. Obje skupine obuhvaćaju bolesti koje u svojoj patofiziologiji imaju povećanje broja stres granula kao mehanizam pogoršanja bolesti.

Iako naši rezultati pokazuju veliki potencijal, važno je naglasiti da su oni isključivo računalni i nisu eksperimentalno potvrđeni. To znači da su potrebna daljnja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja kako bi se predložene molekule validirale. Također, jedna od ograničenja našeg modela je nedostatak uloge vode. Voda, koja igra važnu ulogu u veznim interakcijama, nije uključena u naš model, što može utjecati na točnost predikcija. Zbog toga je moguće da će kasnija analiza, uključujući vodu, zahtijevati prilagodbu ili poboljšanje molekulskih modela. Također, ove molekule mogu zahtijevati daljnje optimizacije kako bi se dodatno poboljšala njihova farmakokinetička svojstva i smanjila potencijalna toksičnost.

## **6. ZAKLJUČCI**

Pomoću poznatih inhibitora, pronašli smo nove potencijalne inhibitore G3BP1/2 te analizirali i prikazali 10 molekula koje pokazuju najpovoljniji afinitet vezanja. Izdvojene molekule također imaju bolja fizikalno-kemijska svojstva od eksperimentalno dokazanih inhibitora G3Ia i G3Ib što ih sveukupno čini boljim kandidatima za razvoj novih lijekova za inhibiciju stvaranja stres granula. Ovaj mehanizam djelovanja ima značajan potencijal kao terapija za tumore i neurodegenerativne bolesti. Sljedeći korak je eksperimentalna validacija i optimizacija molekula kako bi se razvili lijekovi sa što boljim svojstvima za terapijsku primjenu.



## **7. LITERATURA**

1. Christine Miller. Human Biology: Human Anatomy and Physiology [Internet]. Pressbooks by Thompson Rivers University; 2020 [citirano 9. svibnja 2024.]. Dostupno na: <https://jwu.pressbooks.pub/humanbiology/>
2. Wang F, Li J, Fan S, Jin Z, Huang C. Targeting stress granules: A novel therapeutic strategy for human diseases. *Pharmacol Res.* 2020;161:105143.
3. Scientific Image and Illustration Software | BioRender [Internet]. [citirano 10. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://www.biorender.com/>
4. Protter DSW, Parker R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol.* 2016;26:668–79.
5. Gilks N, Kedersha N, Ayodele M, Shen L, Stoecklin G, Dember LM i sur. Stress Granule Assembly Is Mediated by Prion-like Aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell.* 2004;15:5383–98.
6. Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E i sur. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP mediates stress granule assembly. *J Cell Biol.* 2023;222:e200212128072023new.
7. Kedersha N, Ivanov P, Anderson P. Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem Sci.* 2013;38:494–506.
8. Dang Y, Kedersha N, Low WK, Romo D, Gorospe M, Kaufman R i sur. Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$ -independent Pathway of Stress Granule Induction by the Natural Product Pateamine A. *J Biol Chem.* 2006;281:32870–8.
9. Srivastava SP, Kumar KU, Kaufman RJ. Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Mediates Apoptosis in Response to Activation of the Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem.* 1998;273:2416–23.
10. Anderson P, Kedersha N. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci.* 2008;33:141–50.
11. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M i sur. Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Mol Cell.* 2000;6:1099–108.
12. McEwen E, Kedersha N, Song B, Scheuner D, Gilks N, Han A i sur. Heme-regulated Inhibitor Kinase-mediated Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Inhibits Translation, Induces Stress Granule Formation, and Mediates Survival upon Arsenite Exposure. *J Biol Chem.* 2005;280:16925–33.
13. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Mol Cell.* 2000;5:897–904.
14. Anderson P, Kedersha N. Stressful initiations. *J Cell Sci.* 2002;115:3227–34.
15. Decker CJ, Parker R. P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4:a012286–a012286.
16. Buchan JR, Muhlrud D, Parker R. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 2008;183:441–55.
17. Wheeler JR, Matheny T, Jain S, Abrisch R, Parker R. Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. *eLife.* 2016;5:e18413.
18. Buchan JR, Kolaitis RM, Taylor JP, Parker R. Eukaryotic Stress Granules Are Cleared by Autophagy and Cdc48/VCP Function. *Cell.* 2013;153:1461–74.

19. Ganassi M, Mateju D, Bigi I, Mediani L, Poser I, Lee HO, et al. A Surveillance Function of the HSPB8-BAG3-HSP70 Chaperone Complex Ensures Stress Granule Integrity and Dynamism. *Mol Cell*. 2016;63:796–810.
20. McCormick C, Khapersky DA. Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:647–60.
21. Wolozin B, Ivanov P. Stress granules and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2019;20:649–66.
22. Cao X, Jin X, Liu B. The involvement of stress granules in aging and aging-associated diseases. *Aging Cell*. 2020;19:e13136.
23. Gao X, Jiang L, Gong Y, Chen X, Ying M, Zhu H, et al. Stress granule: A promising target for cancer treatment. *Br J Pharmacol*. 2019;176:4421–33.
24. Mahboubi H, Stochaj U. Cytoplasmic stress granules: Dynamic modulators of cell signaling and disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2017;1863:884–95.
25. Reineke LC, Neilson JR. Differences between acute and chronic stress granules, and how these differences may impact function in human disease. *Biochem Pharmacol*. 2019;162:123–31.
26. Fujimura K, Sasaki AT, Anderson P. Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of non-canonical stress granules. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:8099–110.
27. White JP, Lloyd RE. Regulation of stress granules in virus systems. *Trends Microbiol*. 2012;20:175–83.
28. Khapersky DA, Hatchette TF, McCormick C. Influenza A virus inhibits cytoplasmic stress granule formation. *FASEB J*. 2012;26:1629–39.
29. Luo L, Li Z, Ma P, Zou Y, Li P, Liang A i sur. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Impairs SG Assembly by Partitioning into G3BP Condensate. *SSRN Electron J [Internet]*. 2020 [citirano 5. rujna 2024.]; Dostupno na: <https://www.ssrn.com/abstract=3646571>
30. Lindquist ME, Lifland AW, Utley TJ, Santangelo PJ, Crowe JE. Respiratory Syncytial Virus Induces Host RNA Stress Granules To Facilitate Viral Replication. *J Virol*. 2010;84:12274–84.
31. Byun WG, Lee J, Kim S, Park SB. Harnessing stress granule formation by small molecules to inhibit the cellular replication of SARS-CoV-2. *Chem Commun*. 2021;57:12476–9.
32. Meo SA, Alhowikan AM, Al-khlaiwi T, Meo IM, Halepoto DM, Iqbal M i sur. Novel coronavirus 2019-nCoV: prevalence, biological and clinical characteristics comparison with SARS-CoV and MERS-CoV. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24:2012–9.
33. Ochani R, Asad A, Yasmin F, Shaikh S, Khalid H, Batra S i sur. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. *Infez Med*. 2021;29:20–36.
34. datadot [Internet]. [citirano 10. rujna 2024.]. COVID-19 deaths | WHO COVID-19 dashboard. Available from: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>
35. datadot [Internet]. [citirano 9. rujna 2024.]. COVID-19 cases | WHO COVID-19 dashboard. Available from: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>
36. Zhang J jin, Dong X, Cao Y yuan, Yuan Y dong, Yang Y bin, Yan Y qin i sur. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*. 2020;75:1730–41.

37. Giacomelli A, Pezzati L, Conti F, Bernacchia D, Siano M, Oreni L i sur. Self-reported Olfactory and Taste Disorders in Patients With Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 Infection: A Cross-sectional Study. *Clin Infect Dis*. 2020;71:889–90.
38. Klok FA, Kruip MJHA, Van Der Meer NJM, Arbous MS, Gommers DAMPJ, Kant KM i sur. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res*. 2020;191:145–7.
39. Luo D, Mei B, Wang P, Li X, Chen X, Wei G i sur. Prevalence and risk factors for persistent symptoms after COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2024;30:328–35.
40. Sharma K, Li-Kim-Moy J. COVID-19 vaccines in 2023. *Aust Prescr*. 2023;46:60–3.
41. Furuta Y, Komeno T, Nakamura T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Jpn Acad Ser B*. 2017;93:449–63.
42. Korula P, Alexander H, John JS, Kirubakaran R, Singh B, Tharyan P i sur. Favipiravir for treating COVID-19. *Cochrane Infectious Diseases Group*, editor. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2024 [citirano 9. rujna 2024.]. Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD015219.pub2>
43. Grundeis F, Ansems K, Dahms K, Thieme V, Metzendorf MI, Skoetz N i sur. Remdesivir for the treatment of COVID-19. *Cochrane Haematology Group*, editor. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2023 [citirano 9. rujna 2024.];2023(1). Dostupno na: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD014962.pub2>
44. Fernández-de-las-Peñas C, Torres-Macho J, Catahay JA, Macasaet R, Velasco JV, Macapagal S i sur. Is antiviral treatment at the acute phase of COVID-19 effective for decreasing the risk of long-COVID? A systematic review. *Infection*. 2024;52:43–58.
45. Yang Z, Johnson BA, Meliopoulos VA, Ju X, Zhang P, Hughes MP i sur. Interaction between host G3BP and viral nucleocapsid protein regulates SARS-CoV-2 replication and pathogenicity. *Cell Rep*. 2024;43:113965.
46. Nabeel-Shah S, Lee H, Ahmed N, Burke GL, Farhangmehr S, Ashraf K i sur. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein binds host mRNAs and attenuates stress granules to impair host stress response. *iScience*. 2022;25:103562.
47. Evaluating Stress Granules in Pancreatic Cancer In Vitro and In Vivo. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [citirano 17. rujna 2024.]. Dostupno na: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8879-2\\_17](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8879-2_17)
48. Somasekharan SP, El-Naggar A, Leprivier G, Cheng H, Hajee S, Grunewald TGP i sur. YB-1 regulates stress granule formation and tumor progression by translationally activating G3BP1. *J Cell Biol*. 2015;208:913–29.
49. Vilas-Boas FDAS, Da Silva AM, De Sousa LP, Lima KM, Vago JP, Bittencourt LFF i sur. Impairment of stress granule assembly via inhibition of the eIF2alpha phosphorylation sensitizes glioma cells to chemotherapeutic agents. *J Neurooncol*. 2016;127:253–60.
50. Adjibade P, St-Sauveur VG, Quevillon Huberdeau M, Fournier MJ, Savard A, Coudert L i sur. Sorafenib, a multikinase inhibitor, induces formation of stress granules in hepatocarcinoma cells. *Oncotarget*. 2015;6:43927–43.
51. Molliex A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, Kim HJ i sur. Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization. *Cell*. 2015;163:123–33.

52. Berman HM. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:235–42.
53. Biswal M, Lu J, Song J. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Targets a Conserved Surface Groove of the NTF2-like Domain of G3BP1. *J Mol Biol.* 2022;434:167516.
54. Freibaum BD, Messing J, Nakamura H, Yurtsever U, Wu J, Kim HJ i sur. Identification of small molecule inhibitors of G3BP-driven stress granule formation. *J Cell Biol.* 2024;223:e202308083.
55. Ref. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2024, San Diego: Dassault Systèmes, 2024.
56. Koes DR, Camacho CJ. ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:W409–14.
57. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC i sur. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25:1605–12.
58. Shapovalov MV, Dunbrack RL. A Smoothed Backbone-Dependent Rotamer Library for Proteins Derived from Adaptive Kernel Density Estimates and Regressions. *Structure.* 2011;19:844–58.
59. D.A. Case, H.M. Aktulga, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, J.T. Berryman, S.R. Brozell i sur. Amber 2024, University of California, San Francisco. Amber 2024.
60. D.A. Case, H.M. Aktulga, K. Belfon, D.S. Cerutti, G.A. Cisneros, V.W.D. Cruz eiro i sur. AmberTools. *J. Chem. Inf. Model.*
61. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS i sur. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009;30:2785–91.
62. O’Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminformatics.* 2011;3:33.
63. forlilab/Meeko [Internet]. Forli Lab; 2024 [citirano 10. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://github.com/forlilab/Meeko>
64. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31:455–61.
65. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J Chem Inf Model.* 2021;61:3891–8.
66. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc.* 2016;11:905–19.
67. Coutsiar EA, Wester MJ. RMSD and Symmetry. *J Comput Chem.* 2019;40:1496–508.
68. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI i sur. UCSF CHIMERAX : Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* 2021;30:70–82.
69. Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH i sur. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci.* 2018;27:14–25.
70. Braga RC, Alves VM, Silva MFB, Muratov E, Fourches D, Lião LM i sur. Pred-hERG: A Novel web-Accessible Computational Tool for Predicting Cardiac Toxicity. *Mol Inform.* 2015;34:698–701.
71. Braga R, Alves V, Silva M, Muratov E, Fourches D, Tropsha A i sur. Tuning hERG Out: Antitarget QSAR Models for Drug Development. *Curr Top Med Chem.* 2014;14:1399–415.

72. Greg Landrum, Paolo Tosco, Brian Kelley, Ricardo Rodriguez, David Cosgrove, Riccardo Vianello i sur. RDKit. 2024.
73. PubChem. N-[(2S)-3-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1-[[[(2S,3S)-1-oxo-1-[[[(2R)-1-oxo-1-[(2R)-2-phenylpyrrolidin-1-yl]propan-2-yl]amino]-3-phenylbutan-2-yl]amino]butan-2-yl]-4,4-dimethylpentanamide [Internet]. [citirano 10. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/170836225>
74. Lipinski's Rule of Five - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [citirano 18. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/lipinskis-rule-of-five>
75. Zhong H, Mashinson V, Woolman T, Zha M. Understanding the Molecular Properties and Metabolism of Top Prescribed Drugs. *Curr Top Med Chem*. 2013;13:1290–307.
76. Martin YC. How medicinal chemists learned about log P. *J Comput Aided Mol Des*. 2018;32:809–19.

## **8. SAŽETAK**

**Naslov:** Razvoj potencijalnih inhibitora humanog G3BP1/2 proteina

**Cilj:** Cilj istraživanja je razviti nove inhibitore G3BP1/2, na temelju strukture poznatog inhibitora, N proteina SARS-CoV-2.

**Metode:** U ovom istraživanju proučavana je kristalografska struktura G3BP proteina koristeći Protein Data Bank baze podataka, posebno strukture 7suo, 8th1 i 8v11. Provedena je analiza vezivanja N proteina SARS-CoV-2 virusa na G3BP protein koristeći Discovery Studio, čime su identificirane ključne regije za interakciju. Na temelju dobivenih farmakofornih mapa izvršen je probir molekula pomoću ZINCPharmer servisa. Struktura proteina i liganada obrađena je u programima Chimera i Open Babel, a molekulska sidrenja provedeno je korištenjem AutoDock Vina na superračunalu Supek. Validacija sidrenja izvršena je usporedbom RMSD vrijednosti između eksperimentalno potvrđenog inhibitora i najpovoljnije poze nakon sidrenja. Nakon toga, ChimeraX korišten je za vizualizaciju kompleksa, a PRED-hERG alat za predviđanje srčane toksičnosti liganada. Konačno, RDKit je upotrijebljen za procjenu fizikalno-kemijskih svojstava liganada, na temelju čega su odabrani najperspektivniji kandidati.

**Rezultati:** U istraživanju je izdvojeno 20 liganada s najpovoljnijim afinitetom vezanja na G3BP protein. Najpovoljniji afiniteti vezanja, izuzimajući kardiotoksične ligande, su -11,11, -10,94 i -10,87, što je znatno bolje od eksperimentalno potvrđenog inhibitora G3BP (G3Ia) s afinitetom -6,11. Ti ligandi imaju molekulska masa između 423,16 i 434,14 g/mol, dok G3Ia ima masu od 713,41 g/mol. LogP vrijednosti su 3,09, 4,39 i 4,10 u usporedbi s 2,99 liganda G3Ia. Najbolji ligandi imaju maksimalno 3 donora i 4 akceptora vodikovih veza, dok G3Ia ima 5 donora i 7 akceptora.

**Zaključak:** Identificirano je 10 novih potencijalnih inhibitora G3BP1/2 s boljim afinitetom vezanja i fizikalno-kemijskim svojstvima od postojećih inhibitora G3Ia i G3Ib. Ove molekule predstavljaju obećavajuće kandidate za razvoj lijekova koji inhibiraju stvaranje stres granula, što bi moglo biti korisno u liječenju tumora i neurodegenerativnih bolesti. Daljnji koraci uključuju eksperimentalnu validaciju i optimizaciju ovih spojeva za terapijsku primjenu.



## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Development of potential inhibitors of human G3BP1/2 protein

**Objectives:** The aim of this research is to develop new G3BP1/2 inhibitors based on the structure of known inhibitors, the N protein of the SARS-CoV-2.

**Methods:** The crystallographic structure of the G3BP protein was studied using the Protein Data Bank database, focusing on the structures 7suo, 8th1, and 8v11. Binding analysis of the N protein of the SARS-CoV-2 virus to the G3BP protein was conducted using Discovery Studio, identifying key interaction regions. Based on the obtained pharmacophore maps, molecule screening was performed using the ZINCPharmer service. The structure of proteins and ligands was processed using Chimera and Open Babel, and molecular docking was performed using AutoDock Vina on the Supek supercomputer. Docking validation was carried out by comparing RMSD values between the experimentally confirmed inhibitor and the most favorable positions after docking. ChimeraX was then used for visualizing the complexes, and the PRED-HERG tool was used to predict cardiac toxicity of the ligands. Finally, RDKit was employed to evaluate the physicochemical properties of the ligands, based on which the most promising candidates were selected.

**Results:** The study identified 20 ligands with the most favorable binding affinity to the G3BP protein. The most favorable binding affinities, excluding cardiotoxic ligands, were -11.11, -10.94, and -10.87, significantly better than the experimentally confirmed G3BP inhibitor (G3Ia) with an affinity of -6.11. These ligands have a molecular weight between 423.16 and 434.14 g/mol, whereas G3Ia has a weight of 713.41 g/mol. Their logP values are 3.09, 4.39, and 4.10, compared to 2.99 for G3Ia. The best ligands have a maximum of 3 hydrogen bond donors and 4 acceptors, while G3Ia has 5 donors and 7 acceptors.

**Conclusion:** Ten new potential G3BP1/2 inhibitors with more favorable binding affinity and physicochemical properties than existing inhibitors G3Ia and G3Ib have been identified. These molecules represent promising candidates for the development of drugs that inhibit stress granule formation, which could be beneficial in the treatment of tumors and neurodegenerative diseases. Further steps include experimental validation and optimization of these compounds for therapeutic application.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## OSOBNI PODACI:

- Ime i prezime: Klara Farkaš

## OBRAZOVANJE

- 2007. – 2015. Osnovna škola kralja Tomislava Našice
- 2015. – 2019. Opća gimnazija, Srednja škola Isidora Kršnjavog Našice
- 2019. – 2024. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije

## RADNO ISKUSTVO:

- pomoćni radnik u Ljekarni Sokač-Osmak Našice
- stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Grad

## POSEBNE VJEŠTINE

- aktivno služenje engleskim i njemačkim jezikom
- rad na računalu: Microsoft Office, Eskulap 2000

## AKTIVNOSTI

- povjerenica za promidžbu i sponzorstva splitske podružnice Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske, CPSA
- volonter na Student-mentor programu na Medicinskom fakultetu, Split
- volonter na Plivinoj školi ljekarničke skrbi u Splitu