

Razvoj potencijalnih inhibitora humanog BRD2 proteina

Kranjčević, Elena

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:171:247555>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-26**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Elena Kranjčević

RAZVOJ POTENCIJALNIH INHIBITORA HUMANOG BRD2 PROTEINA

Diplomski rad

Akadska godina:
2023./2024.

Mentor:
doc. dr. sc. Dario Leskur

Split, listopad 2024.

**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 84. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 11. sjednici fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i 2. sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Dario Leskur

RAZVOJ POTENCIJALNIH INHIBITORA HUMANOG BRD2 PROTEINA

Elena Kranjčević, broj indeksa 201912

Sažetak

Cilj istraživanja: Otkriti nove potencijalne inhibitore humanog BRD2 proteina kako bi se koristili u terapiji liječenja tumora koji su povezani s aktivnošću ovoga proteina.

Metode: U PDB-u, za analizu je odabrana struktura BRD4 u kompleksu s LANA proteinom, pri čemu je LANA protein služio kao spoj uzor. Farmakofori su identificirani u softveru Discovery Studio 2024, dok je probir molekula proveden putem mrežnog servisa ZINCPharmer. Obrada receptora izvršena je u programu Chimera, a liganda u programima Open Babel i Meeko. Molekularno sidrenje provedeno je pomoću programa AutoDock Vina na superračunalu. Sidrenje je validirano mjerenjem RMSD vrijednosti između rezultata dobivenih u programima AutoDock Vina i AutoDock4. Vizualizacija kompleksa ligand-receptor napravljena je u ChimeraX, a analiza vezanja u Discovery Studio 2024. Srčana toksičnost predviđena je korištenjem računalnog alata PRED-hERG 5.0, dok su fizikalno-kemijska svojstva liganda izračunata pomoću RDKit-a. Ligandi su rangirani prema rezultatima sidrenja, fizikalno-kemijskim svojstvima i predviđenoj kardiotoksičnosti.

Rezultati: Prema farmakofornoj mapi izrađenoj na temelju vezivanja LANA proteina za ET domenu BRD4 proteina identificirano je 82 molekule potencijalnih inhibitora. Određen je afinitet vezanja za receptor, fizikalno-kemijske osobine i procijenjena kardiotoksičnost. Na temelju najpovoljnijeg afiniteta i isključenoj kardiotoksičnosti izabrano je 10 najboljih liganda koji su izdvojeni za daljnje analize.

Zaključak: Identificirane su molekule potencijalnih inhibitora ET domene humanog BRD2 proteina. Ove molekule potrebno je optimizirati, sintetizirati te dobivene rezultate eksperimentalno potvrditi kako bi se potencijalno nastavio razvoj ovih lijekova i time unaprijedili terapijski postupci u liječenju raka.

Ključne riječi: BRD2 protein, razvoj lijekova, inhibitori, terapija tumora, molekularno sidrenje

Rad sadrži: 53 stranica, 20 slika, 1 tablicu i 55 literaturnu referencu

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Ana Šešelja Perišin, predsjednica povjerenstva
2. doc. dr. sc. Angela Mastelić, član
3. doc. dr. sc. Dario Leskur, član - mentor

Datum obrane: 24. 10. 2024.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Scientific area: Biomedical sciences

Scientific field: Pharmacy

Thesis subject: was approved by Council Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, no. 84 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 11 and Faculty Council of School of Medicine, session no. 2

Mentor: Dario Leskur, asst. prof., PhD

DEVELOPMENT OF POTENTIAL INHIBITORS OF THE HUMAN BRD2 PROTEIN

Elena Kranjčević, indeks number: 201912

Summary

Objectives: To discover new potential inhibitors of the human BRD2 protein for use in tumor therapy associated with the activity of this protein.

Methods: In the PDB, the structure of BRD4 in complex with the LANA protein was selected for analysis, with LANA protein serving as a reference compound. Pharmacophores were identified using Discovery Studio 2024 software, while molecule screening was conducted through the ZINCPharmer web service. The receptor was processed in Chimera, and the ligands in Open Babel and Meeko. Molecular docking was performed using AutoDock Vina on a supercomputer. Docking was validated by measuring the RMSD values between results obtained from AutoDock Vina and AutoDock4. The ligand-receptor complex was visualized in ChimeraX, and binding analysis was conducted in Discovery Studio 2024. Cardiotoxicity was predicted using the PRED-hERG 5.0 computational tool, and the ligand's physicochemical properties were calculated using RDKit. Ligands were ranked based on docking results, physicochemical properties, and predicted cardiotoxicity.

Results: Based on the pharmacophore map created from the binding of the LANA protein to the ET domain of the BRD4 protein, 82 potential inhibitors were identified. The binding affinity for the receptor, physicochemical properties, and potential cardiotoxicity were determined. Ten top ligands were chosen for further research based on their optimal affinity and absence of cardiotoxicity

Conclusion: The molecules of potential inhibitors of the human BRD2 protein have been identified. These molecules need to be optimized, synthesized, and experimentally validated in order to potentially advance the development of these drugs and improve therapeutic approaches in cancer treatment.

Key words: BRD2 protein, drug development, inhibitors, tumor therapy, molecular docking

Thesis contains: 53 pages, 20 figures, 1 table and 55 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Ana Šešelja Perišin, asst. prof., PhD – chair person
2. Angela Mastelić, asst. prof., PhD - member
3. Dario Leskur, asst. prof., PhD - member - supervisor

Defense date: October 24, 2024

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Kromatin i posttranslacijske modifikacije | 2 |
| 1.2. BET proteini | 3 |
| 1.3. Uloga BRD2 proteina | 4 |
| 1.4. Povezanost BRD2 proteina i raka..... | 5 |
| 1.5. Razvoj inhibitora BET proteina..... | 8 |
| 1.6. Virtualni probir lijekova | 11 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 13 |
| 3. METODE | 15 |
| 3.1. Pronalazak kristalografske strukture receptora..... | 16 |
| 3.2. Analiza vezivanja LANA proteina | 17 |
| 3.3. Izrada mape farmakofora i probir molekula | 17 |
| 3.4. Obrada receptora i liganda..... | 18 |
| 3.5. Molekularno sidrenje | 18 |
| 3.6. Validacija molekularnog sidrenja | 19 |
| 3.7. Stvaranje slika kompleksa i analiza vezivanja..... | 19 |
| 3.8. Predviđanje srčane toksičnosti..... | 19 |
| 3.9. Fizikalno-kemijska svojstava liganda..... | 20 |
| 4. REZULTATI..... | 21 |
| 4.1. Mapa farmakofora | 22 |
| 4.2. Probir molekula | 23 |
| 4.3. Vizualizacija molekularnog sidrenja i analiza vezivanja | 25 |
| 4.4. Validacija molekularnog sidrenja..... | 35 |
| 5. RASPRAVA | 36 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 40 |
| 7. LITERATURA | 42 |
| 8. SAŽETAK | 48 |
| 9. SUMMARY | 50 |
| 10. ŽIVOTOPIS..... | 52 |

ZAHVALA

Prije svega, iskreno zahvaljujem mentoru, doc. dr. sc. Dariju Leskuru, za uloženi trud, smjernice i stručne savjete koji su mi pomogli tijekom izrade ovog rada te na pruženoj prilici za provedbu ovog istraživanja.

Posebnu zahvalu upućujem svim djelatnicama Ljekarne Blatine koje su me kroz stručno osposobljavanje i svakodnevni rad nesebično podučavale te pružile znanja i vještine koje ću primjenjivati u svojoj budućoj profesionalnoj karijeri.

Neizmjereno sam zahvalna svojim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali i olakšali proteklih pet godina. Posebno hvala Klari, Neri i Dori, na nebrojenim trenucima smijeha, razumijevanja, pomoći i podrške, bez kojih bi ovaj put bio nezamislivo teži.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji, osobito majci Meliti i ocu Renatu, hvala vam na razumijevanju i podršci kroz sve ove godine. Također, veliko hvala noni i barbi koji su uvijek bili uz mene i olakšali moj obrazovni put.

Na kraju, hvala svima koji su na bilo koji način bili dio ovog putovanja. Sve što sam postigla tijekom studija, dio je vas i vašeg doprinosa.

POPIS KRATICA

ADMET – apsorpcija, raspodjela, metabolizam, ekskrecija i toksičnost (engl. *absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity*)

ALL – akutna limfatična leukemija

AML – akutna mijeloična leukemija

Å – angstrom (jedinica duljine)

BET – engl. *bromodomain and extra-terminal domain*

BTK – Brutonova tirozin kinaza

CD4 – klaster diferencijacije 4, engl. *cluster of differentiation 4*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*

EBV – Epstein-Barr virus

ECM – izvanstanični matriks, engl. *extracellular matrix*

ET – ekstraterminalna domena

ERK – kinaza regulirana izvanstaničnim signalom, engl. *extracellular signal-regulated kinase*

GB – gigabajt

GBM – glioblastom

HAT – histonska acetil transferaza

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

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

HDAC – histonska deacetilaza

hERG – ljudski gen povezan s ether-a-go-go, engl. *human ether-a-go-go-related gene*

HIV – virus humane imunodeficijencije, engl. *human immunodeficiency virus*

IL – interleukin

KSHV – herpes virus povezan s Kaposijevim sarkomom, engl. *Kaposi sarcoma-associated herpesvirus*

LANA – antigen povezan s nuklearnom latentnošću, engl. *latency associated nuclear antigen*

LBVS – virtualni probir na temelju liganda, engl. *ligand-based virtual screening*

LogP – logaritamski koeficijent raspodjele, omjer raspodjele spoja između otapala oktanol i vode

MEK – kinaza mitogen-aktivirane proteinske kinaze, engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*

MES – mezenhimalne matične stanice, engl. *mesenchymal stem cells*

MLL – leukemija miješanog podrijetla, engl. *mixed-lineage leukemia*

mTOR – ciljna molekula rapamicina u sisavaca, engl. mammalian/mechanistic target of rapamycin

NAD⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid

NF-κB – nuklearni faktor kappa B, engl. *nuclear factor kappa B*

NH – amino skupina

NK – prirodne ubilačke stanice, engl. *natural killer cells*

NMC – NUT karcinom srednje linije, engl. *NUT midline carcinoma*

PDB – engl. *Protein Data Bank*

PTEN – homolog fosfataze i tenzina, engl. *phosphatase and tensin homolog*

RasGDP – Ras povezan s gvanozin-difosfatom, engl. *guanosine diphosphate-bound Ras*

RasGRP1 – Ras gvanil-otpuštajući protein 1 engl. *Ras guanyl-releasing protein 1*

RasGTP – Ras povezan s gvanozin-trifosfatom engl. *guanosine triphosphate-bound Ras*

RelA – REL-povezani protein, engl. *REL-associated protein*

RNA – ribonukleinska kiselina, engl. *ribonucleic acid*

RMSD – korijen srednje kvadratne devijacije, engl. *root mean square deviation*

RORγt – retinoidni X receptorom povezan neodređeni receptor gama t, engl. *retinoid X receptor-related orphan receptor gamma t*

SBVS – virtualni probir na temelju strukture, engl. *structure-based virtual screening*

T-LBL – T-stanični limfoblastični limfom

TAM – makrofazi povezani s tumorom, engl. *tumor-associated macrophages*

TME – tumorsko mikrookruženje, engl. tumor microenvironment

Th17 – T-pomagačke stanice, engl. *T-helper 17 cells*

Wnt – obitelji wingless tipa MMTV integracijske stranice, engl. *wingless-type MMTV integration site family*

1. UVOD

1.1. Kromatin i posttranslacijske modifikacije

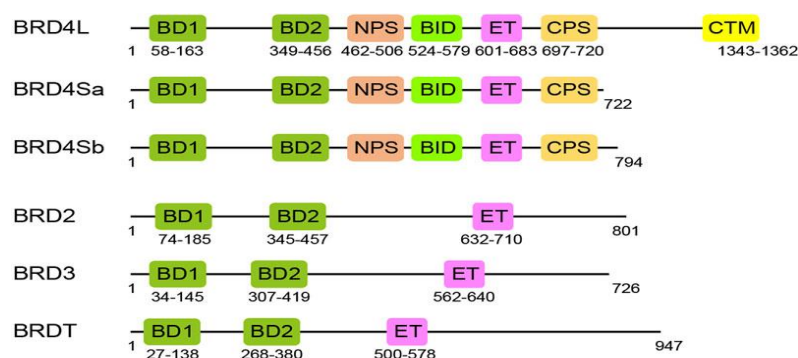
Osnovna jedinica eukaritoskog kromatina je nukleosom kojeg čine 146 parova baza DNA omotanih oko histonskog oktamera koji se sastoji od $(H3-H4)_2$ tetramera i dva H2A-H2B dimera (1). Ova četiri proteina imaju središnju jezgru te N-terminalne i C-terminalne krajeve (2). Ovisno o potrebama stanice za genskom ekspresijom, postoje dvije konformacije kromatina. U kompaktnoj konformaciji (heterokromatin) genska ekspresija je utišana, a u otvorenoj (eukromatin) DNA je dostupna za transkripciju. Regulacija konformacija je epigenetska, što znači da pri nasljednim promjenama aktivnosti gena ne dolazi do promjene u osnovnoj sekvenci nukleotida (1).

Posttranslacijske modifikacije uključuju acetilaciju, metilaciju, ubikvitinaciju, Sumoilaciju, butirilaciju, propionilaciju i krotonilaciju lizinskih ostataka, metilaciju, ribozilaciju i citrulinaciju argininskih ostataka te fosforilaciju i glikozilaciju serinskih i treoninskih ostataka. Mogu se pojaviti unutar savijenih domena histona ili na N-terminalnim i C-terminalnim krajevima. Na histonima epigenetski određuju strukturu i funkciju kromatina, izravno modulirajući afinitet DNA prema histonima, mijenjajući interakcije između histona te utjecajem na sposobnost histona da se vežu za šaperone. Također, služe kao mjesta za vezanje proteina koji ih specifično prepoznaju i koji mobiliziraju ili stabiliziraju faktore uključene u procese kao što su remodeliranje nukleosoma, transkripcija gena te rekombinacija, popravak i replikacija DNA. Dinamička kombinacija modifikacija histona naziva se kod histona (1).

Acetilacija lizina je jedna od najznačajnijih modifikacija proteina koja ima ulogu u kontroli transkripcije gena, metaboličkim procesima i signalizaciji unutar stanice (3). Kromatin prelazi u aktivno stanje acetiliranjem histona, dok se deacetilacijom potiskuje ekspresija gena. Aktivnošću enzima histonske acetil transferaze (HAT) i deacetilaze (HDAC) se određuje razina acetilacije histona. Njihovo djelovanje je kontrolirano metaboličkim produktima stanice kao što su Acetil-CoA i NAD⁺ kako bi se koordinirao energetska i redoks status stanice s ekspresijom gena i metaboličkom aktivnošću (4).

1.2. BET proteini

Proteini obitelji bromodomene i ekstra terminalne domene uključuju BRD2, BRD3, BRD4 i BRDT proteine. Prepoznavanjem acetiliranih ostataka na histonima kontroliraju transkripciju. Sadrže dvije N-terminalne bromodomene (BD1 i BD2) i ekstra terminalnu domenu (ET) na C-terminalnom kraju (Slika 1) (3). BD1 i BD2 bromodomene imaju funkciju prepoznavanja acetiliranog lizina na histonima ili transkripcijskim faktorima te čitanja tog istog signala pri transkripciji gena, dok ET domena regrutira proteine regulacije transkripcije i time omogućuje aktivaciju same transkripcije (5).



Slika 1. Funkcionalne domene BET proteina (5)

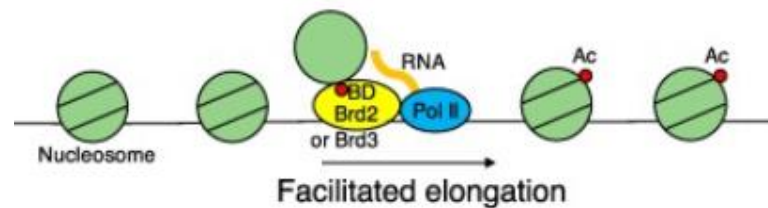
Elongacija transkripcije gena je najbolje proučena funkcija BET proteina, ali osim te uloge također su otkrivene i druge funkcije (5). Pa tako BET proteine možemo podijeliti u 9 skupina prema njihovim staničnim ulogama:

- Acetilacija lizina na histonima
- Metilacija lizina na histonima
- Remodeliranje kromatina
- Formiranje kromatina povezanog s replikacijom
- Aktivacija transkripcije
- Sumoilacija, ubikvitinacija i degradacija proteina
- Transkripcijska regulacija nuklearnih tijela promijelocitne leukemije
- Represija transkripcije, popravak DNA
- Kontrola oblika stanice, regulacija inzulina (3)

Osim što sudjeluju u fiziološkim procesima, također su uključeni i u patogenezu te napredovanju raka, čime se povećao interes za razvoj terapije koja će koristiti ove proteine (3).

1.3. Uloga BRD2 proteina

Ovaj protein uglavnom je lokaliziran u jezgri, a djeluje kao atipična proteinska kinaza (3). Aktivnost ove serin/treonin kinaze se povećava tijekom proliferacije stanica. BRD2 protein aktivira transkripciju gena pomoću bromodomene koja specifično prepoznaje acetilirane histone (6). Pri njihovom prepoznavanju bromodomena ima afinitet za H3 i H4 acetilirane domene (3). Interakcija bromodomene i acetiliranog lizina histona omogućuje djelovanje RNA polimeraze II čime se produžuju novi transkripti kroz hiperacetilirane nukleosome (Slika 2) (6). Primarna uloga uključuje i kontrolu transkripcije putem regrutiranja faktora, ko-aktivatora i represora transkripcije, pa tako aktivira E2F1 i E2F2 proteine (3). Ti proteini su transkripcijski faktori koji služe za aktivaciju sinteze proteina potrebnih za prijelaz iz G1 faze u S fazu staničnog ciklusa (6). Sudjeluje i prilikom remodeliranja kromatina regrutiranjem proteina kao što je histon deacetilaza (3).



Slika 2. Promocija genske transkripcije pomoću BRD2 proteina (6)

Kontrolira ekspresiju stotina gena, uglavnom onih koji su uključeni u kontrolu stanične signalizacije. BRD2 se veže na promotore gena i uglavnom kao pozitivni regulator potiče transkripciju, ali regulira i alternativno izrezivanje (engl. *alternative splicing*). Živčane stanice su pogotovo ovisne o alternativnom izrezivanju proteina te potencijalne promjene mogu narušiti staničnu komunikaciju (7).

Kritičan je za neurogenezu i embriogenezu jer vrhunac svoje funkcije postiže pri razvoju i zatvaranju neuralne cijevi (3). Nadalje, otkriveno je da je BRD2 protein lokus osjetljivosti kod neuroloških poremećaja kao što je juvenilna mioklonična epilepsija. Također se zapazilo na mišjim modelima da pri nedostatku ovoga proteina dolazi do smanjenja GABAnergičkih neurona u neokorteksu i strijatumu živčanih stanica koje su od velike važnosti za moždanu strukturu (6).

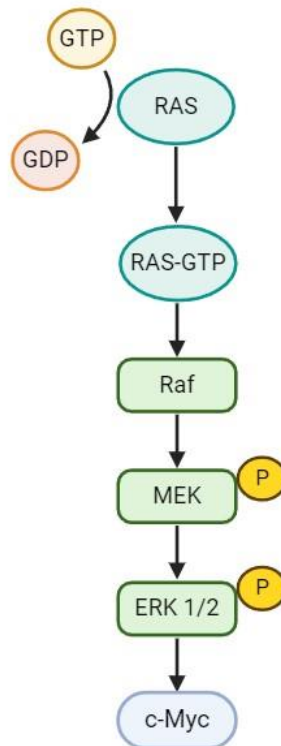
Zajedno uz ostale BET proteine, BRD2 je od velike važnosti u upalnom odgovoru posredovanom transkripcijskim faktorom NF- κ B, za vrijeme aktivacije i diferencijacije Th17 imunoloških stanica te u profibrotičkim procesima. Uz BRD4 protein regulira ključne citokine (IL-17, IL-21, IL-22, i IL-23R) i transkripcijske faktore (ROR γ t) za diferencijaciju CD4+ T-limfocita u Th17 stanice (8). Također BRD2 i BRD4 imaju ulogu u upalnim funkcijama NK stanica jer BET bromodomene kontroliraju ekspresiju proizvodnje proupalnih i protupalnih citokina unutar samih NK stanica (9). Nadalje, BRD2 regulira ekspresiju ciklina D1, A i E, a ciklin A je potreban za proliferaciju limfocita B (8).

1.4. Povezanost BRD2 proteina i raka

Tumori su kompleksne tvorevine koje se sastoje od populacija stanica koje se razlikuju prema svojim genomskim i fenotipskim profilima te koje međusobno koegzistiraju i uzajamno djeluju (10). Nastaju zbog genskih mutacija koje su povezane s epigenetskom regulacijom kromatina. Abnormalna acetilacija histona može utjecati na diferencijaciju stanica i apoptozu, a posljedično rezultira povećanom transkripcijom onkogeni (3). Stoga zaključujemo da modifikacije kromatina utječu na razvoj i napredovanje raka tako da moduliraju stanične fenotipove i inhibiraju ili pojačavaju maligna svojstva. Sposobnost BET proteina u regulaciji transkripcije ukazuje na bitnu ulogu pri razvoju raka (10).

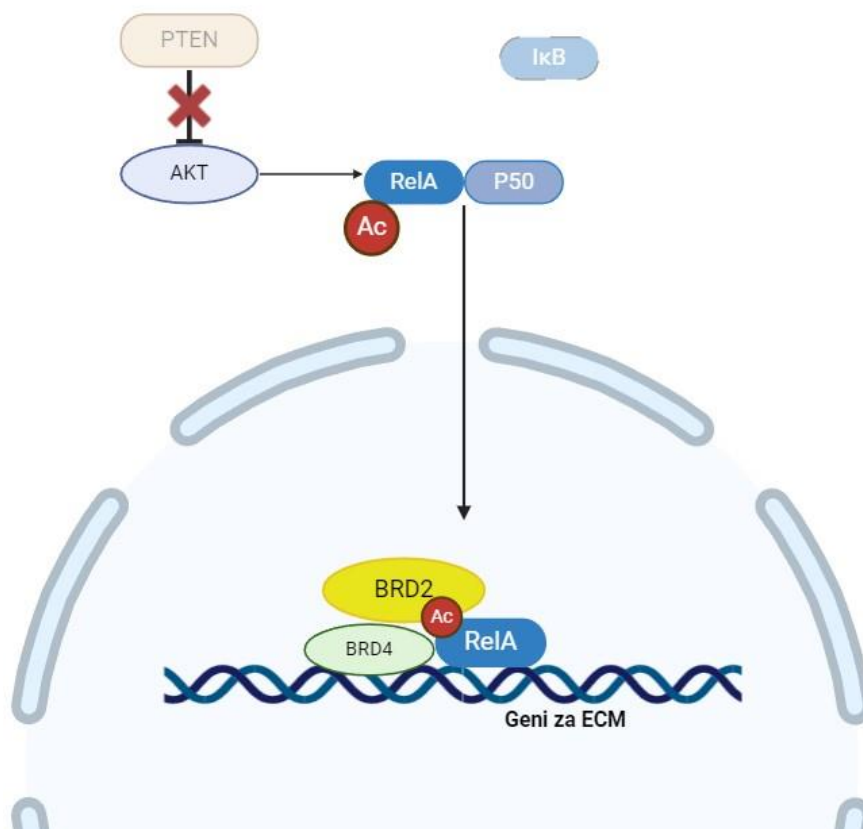
Akutna mijeloična leukemija (AML) je heterogena skupina genetski složenih maligniteta koštane srži povezane s njezinim zaustavljanjem sazrijevanja. Do zatajenja koštane srži dovodi klonska ekspanzija abnormalnih hematopoetskih progenitora. Uz patofiziološke mehanizme ulogu u nekontroliranoj staničnoj proliferaciji ima i neregulirana epigenetska kontrola transkripcije gena jer dolazi do modifikacije kromatina. Utvrđeno je da BET proteini omogućuju održavanje aberantnog stanja kromatina kod AML-a, ali i kod ostalih hematoloških bolesti kao što su akutna limfoblastična leukemija, multipli mijelom i limfom (11). Kako je BRD2 neophodan za hematopoezu, potiče i ekspanziju B stanica u odgovor na mitogen te je taj učinak proteina posredovan preko ciklina A. Konstitutivna ekspresija odnosno konstantna proizvodnja proteina BRD2 dovodi do maligniteta B stanica koje su najbližnje aktivnim B stanicama ljudskog difuznog velikostaničnog limfoma B stanica (12).

T-stanični limfoblastični limfom (T-LBL) je vrsta agresivnog ne-Hodgkin limfoma, a nastaje od prekursora T limfoblasta. BRD2 inducira terapijsku rezistenciju T-LBL stanica *in vitro*. Otpornost na terapiju se razvija putem aktivacije signalnog puta MEK/ERK/c-Myc (Slika 3). Uzvodni aktivator kaskade MEK/ERK kinaze je Ras te se signalni put aktivira ekspresijom RasGRP1. BRD2 aktivira faktor transkripcije E2F1 koji inducira ERK aktivaciju i pojačava ekspresiju RasGRP1. Aktivacijom dolazi do prelaska RasGDP u RasGTP, a zatim dolazi do MEK fosforilacije koja dovodi do aktivacije fosforiliranog ERK-a i potiče daljnji prijenos signala niz kaskadu. Dokazalo se da je razina RasGTP proteina povećana u stanicama T-LBL s prekomjernom ekspresijom BRD2 proteina. Povećan odgovor na BRD2 dovodi do porasta fosforilacije ERK1/2 te se pretpostavlja da aktivacija ERK signala dovodi do rezistencije na terapiju (13).



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz aktivacije signalnog puta MEK/ERK/c-Myc (14)

Glioblastom (GBM) je jedan od najagresivnijih vrsta tumora mozga, opisuje ga velika invazivnost i molekularna heterogenost. Mezenhimalni transkriptomski podtip (MES) povezan je s terapijskom rezistencijom, recidivima i povećanim brojem makrofaga koji su povezani s tumorom (TAM). Malignost se povezuje s aktivacijom NF- κ B signalnog puta i promjenom u PTEN genu koji služi kao negativni regulator puta. PTEN također ima ulogu u vezanju BRD2 i BRD4 proteina za kromatin, a regulacija je posredovana lokalizacijom transkripcijskog faktora RelA na kromatinu. Presudnu ulogu igra acetilacija lizina 310 na RelA jer o tome ovisi regrutiranje BRD2 proteina. On modulira tumorsko mikrookruženje (TME) koje je bitno za daljnju tranziciju MES-a. Interakcije između staničnih komponenti i izvanstaničnog matriksa (ECM) u TME-u značajno utječu na ishode liječenja jer ECM čini složenu strukturnu mrežu koja omogućuje rast, opstanak, sazrijevanje, diferencijaciju i migraciju tumora. Inaktivacijom PTEN-a omogućuje se regrutacija BRD2 na promotore gena za ECM čime se omogućava ekspresija tih gena (Slika 4). Posljedično dolazi do infiltracije tumorskih stanica u okolni moždani parenhim što ga čini neresektabilnim te kasnije rezultira recidivima tumora. Osim invazije dolazi i do rezistencije na terapiju (15).



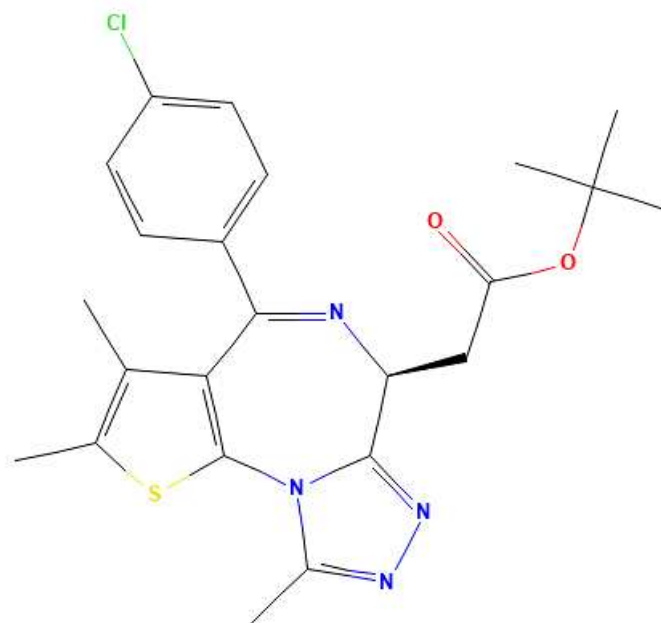
Slika 4. Pojednostavljeni prikaz aktivacije ECM gena (14)

1.5. Razvoj inhibitora BET proteina

Premda se zaključilo da BET proteini remodulacijom kromatina utječu na stanični ciklus, proliferaciju stanica te metastaze tumora, ciljanje inhibicije ovih proteina može pomoći neutralizirati terapijsku rezistenciju te time nudi novu strategiju liječenja tumora otpornih na kemoterapeutike (13).

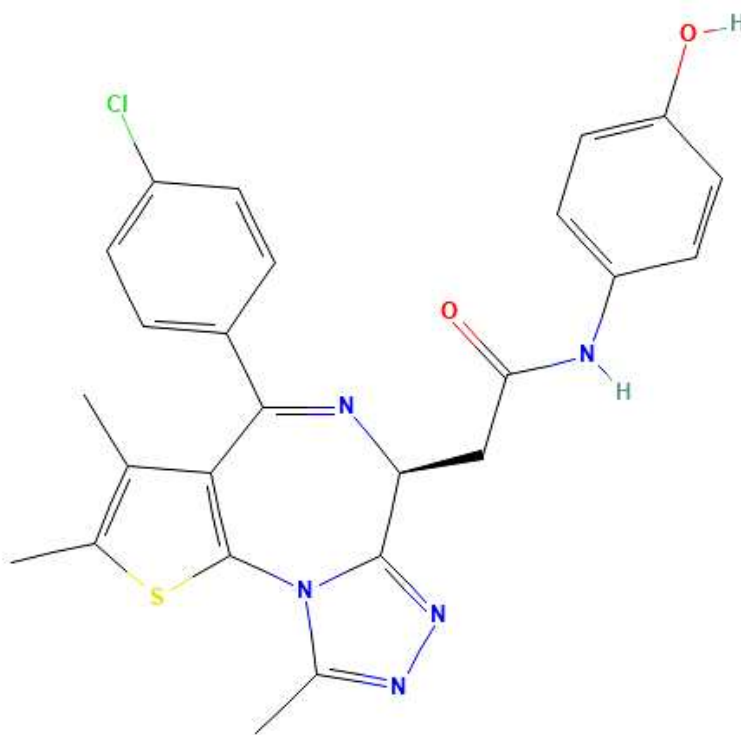
Osnova strukture BET inhibitora je tienodiazepinska skupina koja je modificirana kako ne bi vezala središnji benzodiazepinski receptor i time imala psihotropan učinak. Specifično se vežu za mjesto vezivanja acetil-lizina na bromodomenama BET proteina te pritom imaju nizak afinitet vezivanja na ne-BET proteine (16). Kako bi se zadržala učinkovitost lijeka i pritom smanjila mogućnost nuspojava teži se povećanjem specifičnosti vezanja BET inhibitora za BD1 bromodomenu. Naspram BD1 selektivnih BET inhibitora, selektivnost prema BD2 bromodomeni je pokazala neučinkovitost u istiskivanju BET proteina vezanih za kromatin (17).

JQ1 je tieno-triazolo-1,4-diazepin koji oponaša acetil-lizin (Slika 5). Visokim afinitetom se veže za BD1 i BD2 bromodomene tako da tvori vodikovu vezu s asparginskim ostatkom na veznom džepu. Ima jako antiproliferativno djelovanje na BRD4 ovisne stanične linije raka i protiv NMC-a. Nedostaci ovog kemoterapeutika su slaba oralna bioraspoloživost i poluvrijeme eliminacije od samo jednog sata (18).



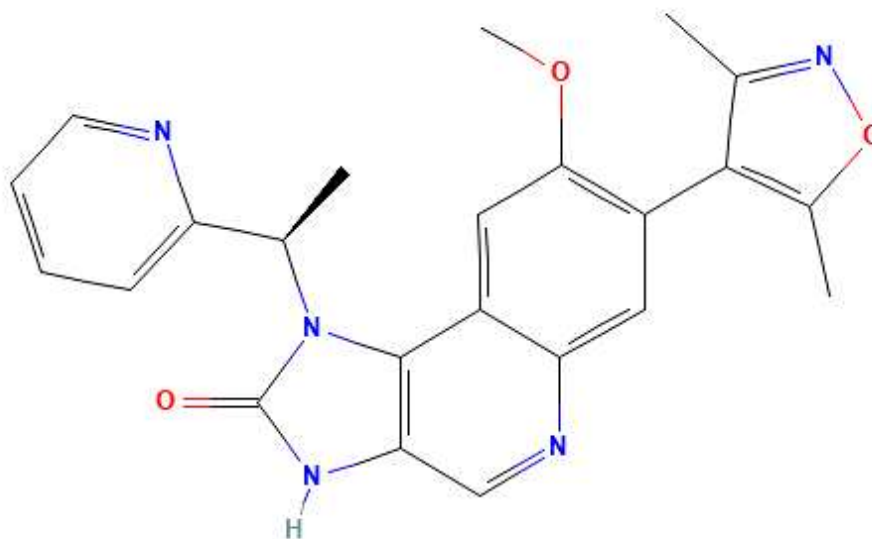
Slika 5. Kemijska struktura JQ1 (19)

OTX015 je prvi inhibitor ispitan u kliničkim istraživanjima hematoloških bolesti. On je analog JQ1 inhibitora što ga također čini tienotriazolodiazepinskim spojem (Slika 6) (11). Ima bolju bioraspoloživost u odnosu na JQ1. Korištenje ovoga lijeka je pokazalo zadovoljavajuće rezultate u liječenju hematoloških karcinoma (B-stanični limfom i multipli mijelom) te kod nekih vrsta solidnih tumora (mezoteliom i neuroblastom). Inhibira vezivanje BRD2, BRD3 i BRD4 proteina (18). Njegov učinak dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa, apoptoze i supresije rasta tumorskih stanica. U istraživanjima je utvrđen sinergistički učinak s mTOR i BTK inhibitorima (3).



Slika 6. Kemijska struktura OTX015 (19)

I-BET151 je nebenzodiazepinski spoj strukture slične JQ1 (Slika 7). Pokazuje značajnu antitumorsku aktivnost na mišjim modelima NMC-a, multiplog mijeloma, MLL-e, ALL-e, raka pluća i malignog tumora mozga (20). Ima dobru bioraspoloživost i produljeno poluvrijeme eliminacije. Veže se za BD1 bromodomena i time istiskuje BET proteine s kromatina u jezgri. Djeluje na BRD2, BRD3, BRD4 i BRD9. Njihovom selektivnom inhibicijom utječe na prijenos signala, tumorski mikrookoliš i kontrolira duljinu telomera, a posljedično dolazi do inhibicije proliferacije, migracije i invazije stanica raka te indukcije apoptoze (21).



Slika 7. Kemijska struktura I-BET151 (19)

BET inhibitori su pokazali učinkovitost protiv različitih vrsta raka ali rezistencija je i dalje značajan problem u kliničkom liječenju. Otpornost može biti primarna (naslijeđena) ili stečena kao rezultat prilagodbe na liječenje. Jedan od mogućih mehanizama razvoja neosjetljivosti je pojačana signalizacija Wnt/ β -katenin signalnim putem, dok je drugi potencijalno važan mehanizam hiperfosforilacija BRD4 proteina. Važno je nastaviti daljnja ispitivanja kako bi se utvrdile najučinkovitije kombinacije lijekova i spriječile rezistencije (3).

Najčešće nuspojave BET inhibitora prema dosadašnjim istraživanjima su mučnina, povraćanje, proljev, poremećaj okusa, smanjenje apetita, hiperglikemija, umor, anemija i trombocitopenija. Najozbiljnija nuspojava koja i ograničava doziranje lijeka je trombocitopenija te u težim slučajevima dovodi do poremećaja koagulacije i nekontroliranog krvarenja. U kliničkim ispitivanjima OTX015 inhibitora utvrdilo se da privremeni prekid terapije od tjedan dana nakon uzastopnog liječenja dva tjedna dovodi do oporavka trombocita, no ovakav način doziranja može dovesti do smanjene djelotvornosti i razvitka terapijske rezistencije. Nadalje, pokazalo se u određenim studijama da ovi lijekovi mogu potaknuti transaktivaciju virusnih genoma kao što su EBV, KSHV i HIV. Kod muškaraca moguća je atrofija testisa jer inhibicija BRDT proteina ima veliku ulogu u spermatogenezi. Inhibicija spermatogeneze je ispitana pomoću JQ1 inhibitora te se prema rezultatima ona čini reverzibilnom i bez utjecaja na hormone. Osim učinka na tumorske stanice BET inhibitori ostvaruju djelovanje i na netumorskim stanicama što može dovesti do oštećenja zdravoga tkiva.

Inhibicijom BRD4 proteina može doći do alopecije, hiperplazije kože i deficijencije matičnih stanica tankog crijeva, ali su sve promjene reverzibilne. Sinergistička terapija omogućava smanjenje doze lijekova te time i smanjenje citotoksičnosti, no treba naglasiti da pri odabiru lijekova treba biti oprezan jer pri primjeni određenih lijekova dolazi do iskazivanja istih čestih nuspojava (3).

Napredak u korištenju ovih lijekova u kliničkoj praksi ometaju moguće rezistencije i nuspojave, no djelovanje BET inhibitora posebno obećava ukoliko se kombiniraju s ostalim malomolekularnim inhibitorima i epigenetskim modulatorima pri liječenju. Također kako bi se riješili terapijski problemi i dalje se nastavljaju razvijati nove selektivne molekule (3).

1.6. Virtualni probir lijekova

Pod probirom lijekova podrazumijevamo provjeru vezanja različitih liganda odnosno kandidata za lijekove na receptor. Potencijalni ligandi se pronalaze pretraživanjem kemijskih knjižnica. Probir se može izvoditi na više načina, laboratorijskim ili računalnim (*in silico*) metodama. Nakon potvrde vezanja određenog liganda za željenu metu, treba provjeriti potentnost na staničnoj ili tkivnoj razini te utvrditi ADMET svojstva (22).

Virtualni probir je računalna metoda pretraživanja baza podataka kemijskih spojeva kojom se nastoji pronaći nove molekule koje mogu biti alternativa već postojećim ligandima ili biti polazišna točka razvoja liganda za neistražene navodne mete lijekova. Prednost ove metode je da spojevi ne moraju nužno postojati te pri njihovom testiranju ne dolazi do utroška materijala. Može se podijeliti u dvije kategorije, virtualni probir na temelju liganda (LBVS) te virtualni probir na temelju strukture (SBVS). Kod LBVS, identifikacijom poznatih aktivnih ili neaktivnih spojeva se otkrivaju potencijalno aktivne molekule, na temelju mjera sličnosti, zajedničkih farmakofora i deskriptorskih vrijednosti. Za razliku od LBVS-a, SBVS koristi eksperimentalno određenu trodimenzionalnu strukturu biološke mete za molekularno sidrenje spojeva kandidata te ih rangira na temelju predviđenog afiniteta vezanja ili komplementarnosti s veznim mjestom korištenjem računanih algoritama i funkcija bodovanja. Ovisno o dostupnim informacijama, metode se mogu koristiti pojedinačno ili u kombinaciji (23).

Molekularno sidrenje (engl. *docking*) je jedan od alata koji se često koristi pri *in silico* dizajniranju lijekova. Pomoću sidrenja se pokušava predvidjeti nativni položaj, orijentacija i konformacija liganda unutar veznog mjesta ciljne biološke molekule. Razumijevanjem interakcija između liganda i receptora omogućuje se procjena afiniteta vezanja i optimizacija liganda prije njegove sinteze. Iako se ova metoda široko koristi i njezina važnost je dokazana uspješnim studijama, postoje i određena ograničenja kao što je nedostatak univerzalno primjenjive funkcije bodovanja koja uspješno kombinira točnost i brzinu, ne uzimanje u obzir vodikove veze posredovane molekulama vode između liganda i receptora te samo djelomično razmatranje fleksibilnosti proteina prilikom sidrenja. Zbog navedenih ograničenja, rezultate molekularnog sidrenja treba uzeti s oprezom i smatrati ih polaznom točkom za provođenje daljnjih istraživanja (24).

Hipoteza ovog istraživanja je da se pomoću računalnih metoda kao što je virtualni probir i molekularno sidrenje, mogu identificirati nove molekule koje imaju potencijal inhibirati humani BRD2 protein te da se ove molekule mogu koristiti kao temelj za daljnji razvoj lijekova za liječenje bolesti povezanih s BRD2 proteinom, s fokusom na antitumorske lijekove. Ova hipoteza se temelji na pretpostavci da se računalnim tehnikama može uštedjeti vrijeme i resursi u odnosu na tradicionalne laboratorijske metode te omogućiti brži i precizniji odabir potencijalnih inhibitora za daljnje analize.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovoga istraživanja je otkriti nove potencijalne molekule koje će inhibirati humani BRD2 protein. Fokus je stavljen na otkrivanje spojeva koji bi se koristili u terapiji za liječenje tumora koji su povezani s aktivnošću ovoga proteina.

3. METODE

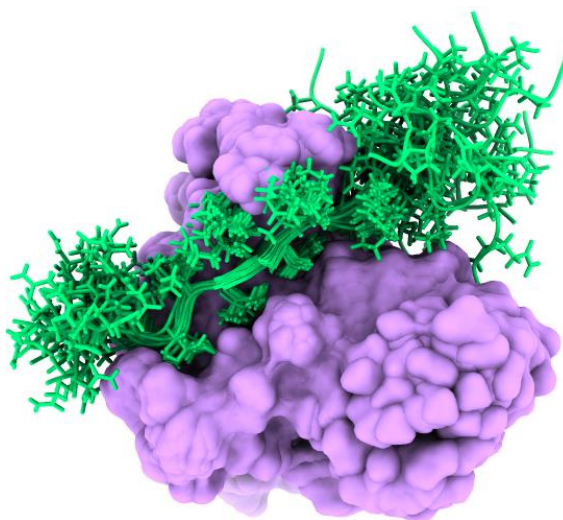
3.1. Pronalazak kristalografske strukture receptora

Za pronalazak potencijalnih molekula potrebna nam je kristalografska struktura receptora u spoju sa ligandom, u ovom slučaju BRD2 proteina, a za to je korištena internetska baza podataka Protein Data Bank (PDB) (25).

Bromodomene BRD2 proteina su mete djelovanja već otkrivenih potencijalnih lijekova koji su u raznim fazama istraživanja, dok za ET domenu nema provedenih istraživanja i još nije poznat malomolekularni ligand te je cilj pronaći inhibitor upravo te domene ovoga proteina. Pronađene su strukture BRD2 proteina, ali ne i struktura ET domene BRD2 proteina u kompleksu s ligandom te radi toga je uzeta struktura BRD4 proteina u kompleksu s ligandom u ET domeni. To je moguće napraviti zbog toga što BRD2 i BRD4 proteini spadaju u porodicu BET proteina koju karakteriziraju iste značajke kao što su dvije bromodomene i jedna ekstraterminalna domena te je ET regija visoko konzervirana što znači da sekvenca aminokiselina i struktura tog dijela proteina je većinom nepromijenjena između vrsta BET proteina (26).

Sama ekstraterminalna domena je nedovoljno istražena, no otkriveni su određeni virusi koji se vežu za tu domenu (27). U ovom istraživanju kao spoj uzor koristit ćemo LANA protein (engl. *Latency Associated Nuclear Antigen*) povezan s KSHV (engl. *Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus*) koji se veže za ET domenu. Ključni dijelovi LANA proteina za vezanje na ET domenu su poslužili kod izrade farmakoforne mape i pronalazak liganda odnosno molekula kandidata za novi lijek (28).

Zaključno u internetskoj bazi Protein Data Bank je pronađena kristalografska struktura ET domene BRD4 proteina u kompleksu s LANA proteinom kao ligandom, pod šifrom 2ND0 (Slika 8).



Slika 8. Trodimenzionalni prikaz strukture ET domene BRD4 proteina (ljubičasto) s LANA proteinom (zeleno)

3.2. Analiza vezivanja LANA proteina

Za analizu vezivanja LANA proteina na ET domenu BRD4 proteina korišten je program Discovery Studio 2024 (29). Na temelju pronađene kristalografske strukture 2ND0 odredili smo vezivanje LANA proteina. Identificirane su specifične regije LANA proteina koje su bitne za vezanje na BRD4 protein. Potom smo odredili ključne farmakofore za vezanje na ET domenu BRD4 proteina.

3.3. Izrada mape farmakofora i probir molekula

Nakon što su pronađeni farmakofori, potrebno je izraditi mapu farmakofora odnosno prikazati dijelove strukture koji su bitni za vezanje na BRD4 protein i provesti probir molekula (engl. *screening*) kako bi se pronašle molekule koje imaju identične farmakofore poput prethodno izrađene mape farmakofora. Za ovaj postupak se koristio mrežni servis ZINCPharmer koji sadrži bazu molekula koje se mogu pretraživati (30,31). Pronašli smo 82 molekule čiji se farmakofori podudaraju s onima u farmakofornoj mapi. Molekule smo zatim preuzeli na računalo.

3.4. Obrada receptora i liganda

Kako bi se provelo molekularno sidrenje potrebno je prethodno obraditi receptor i ligande. Obrada receptora se vršila u programu Chimera (32). Provelo se uklanjanje liganda, otapala i nepotrebnih peptidnih lanaca. Zatim se provela ostala priprema za sidrenje, koja uključuje dodavanje vodika i naboja te popravljavanje aminokiselinskih lanaca koji nedostaju uz pomoć Dunbrackove 2010 knjižnice rotamera (33). Nadalje, provedena je i minimizacija energije proteina pomoću AMBER programa integriranog u programu Chimera (34).

Za obradu liganda bili su nam potrebna dva programa. Prvi program je Open Babel u kojem su dodani vodici na strukture molekula (35). Zatim za daljnju obradu liganda korišten je program Meeko (36). Bilo je potrebno dodijeliti tipove atoma, dodati naboje, provjeriti protoinaciju, definirati rotabilne veze i spojiti nepolarne vodike.

3.5. Molekularno sidrenje

Nakon pronađenih molekula koje se potencijalno mogu vezati na receptor treba provesti molekularno sidrenje. Molekule koje su pronađene u ZINCPharmer-u služe kao ligandi, a meta djelovanja je receptor odnosno ET domena BRD4 proteina. Strukturu receptora smo pronašli u kolekciji proteinskih struktura Protein Data Bank pod šifrom 2ND0.

Poslije prethodne obrade receptora i svih liganda moguće je provesti molekularno sidrenje u programu AutoDock Vina (verzija 1.1.2.) (37–39). Ovaj program se nalazi na superračunalu Supek na Znanstveno-učilišnom kampusu Borongaj Sveučilišta u Zagrebu, a pristupljeno mu je vezom na daljinu. Za molekularno sidrenje je korišten jedan čvor superračunala s 64 procesorske jezgre i 128 GB radne memorije. Provedeno je isključivo rigidno sidrenje molekula što znači da prilikom sidrenja nije uzeta u obzir potencijalna fleksibilnost aminokiselinskih ostataka. Postavke sidrenja su bile:

- Temeljnost sidrenja: 300
- Maksimalni broj poza koje će se generirati tijekom sidrenja: 100

3.6. Validacija molekularnog sidrenja

Potrebno je provesti validaciju sidrenja. To smo napravili ponovnim sidrenjem nasumično odabranim ligandom, u ovom slučaju ligandom 50. Za ponovno sidrenje se koristio drugi program, AutoDock4 u AutoDock Tools programu (verzija 1.5.6.) (40). Nakon provedenog sidrenja, usporedili smo pozu liganda koju smo dobili koristeći oba programa, AutoDock Vina i AutoDock4. Kako bi se utvrdila podudarnost između te dvije poze potrebno je odrediti RMSD (engl. *root mean square deviation*) vrijednost. RMSD se koristi za procjenu sličnosti dviju konformacija molekula. Izračun uključuje 2 koraka. Prvotno treba napraviti poravnanje dviju molekula što znači da se svi ekvivalentni atomi moraju podudarati u svakoj konformaciji. Zatim je potrebno pronaći optimalno preklapanje rotiranjem i translacijom jedne strukture u odnosu na drugu tako da se zbroj kvadrata udaljenosti između odgovarajućih atoma u obje konformacije minimizira (41). Općenito, molekularno sidrenje će se smatrati uspješnim ako je vrijednost manja od 2 Å (24).

3.7. Stvaranje slika kompleksa i analiza vezivanja

Za kreiranje slika kompleksa ligand – receptor potreban je program ChimeraX, a također je potreban i za preuzimanje kompleksa za daljnju analizu vezanja (42,43).

Discovery Studio 2024 program je ponovno korišten nakon molekularnog sidrenja za analizu vezanja spojeva kandidata odnosno potencijalnih lijekova.

3.8. Predviđanje srčane toksičnosti

Važno je predvidjeti moguću kardiotoksičnost potencijalnih novih lijekova. Korišten je mrežni računalni alat PRED-hERG 5.0 za predviđanje srčane toksičnosti preko hERG kalijevih kanala. Blokada ovih kanala lijekom može dovesti do teških nuspojava, od ozbiljne srčane aritmije do smrti te je dobar pokazatelj moguće srčane toksičnosti (44–46).

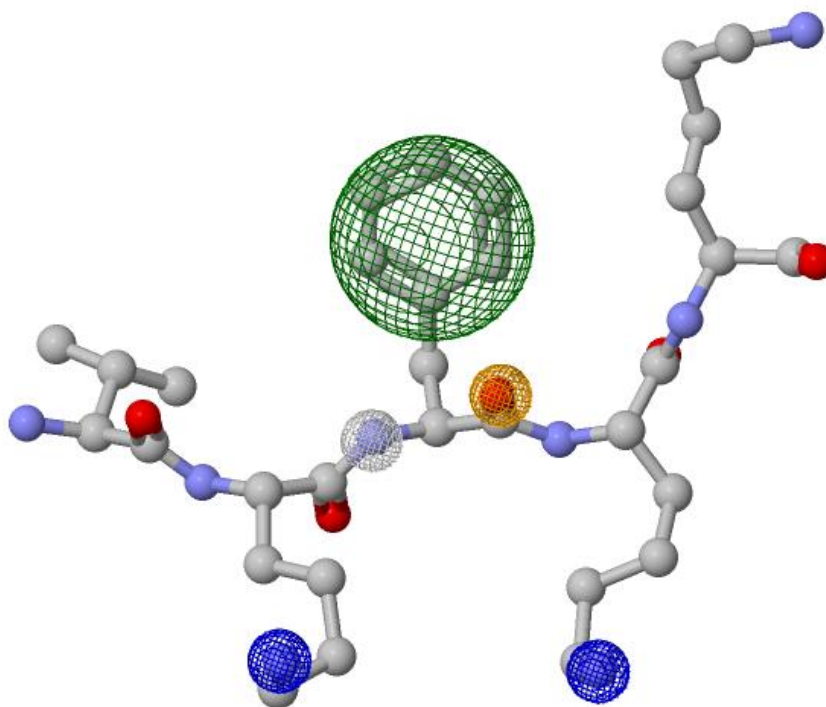
3.9. Fizikalno-kemijska svojstava liganda

RDKit program je korišten za izračunavanje fizikalno-kemijskih svojstava liganda (47). Ligandi su zatim rangirani prema ocjeni sidrenja, fizikalno-kemijskim svojstvima i predviđenoj kardiotoksičnosti.

4. REZULTATI

4.1. Mapa farmakofora

Određivanje farmakofora i izrada mape omogućuje probir molekula u postojećim bazama podataka koje imaju te strukturalne osobine. Za definiranje farmakofora se koristio spoj uzor, LANA protein. Mapa farmakofora prikazuje ključne dijelove fragmenta LANA proteina koji se vežu na ET domenu BRD4 proteina (Slika 9). Pomoću farmakoforne mape pronađeno je 82 potencijalnih inhibitora.



Slika 9. Mapa farmakofora

4.2. Probir molekula

Tablica 1. Izabranih 20 liganda s najpovoljnijim afinitetom vezanja za receptor, prikaz njihovih fizikalno-kemijskih osobina i procjene kardiotoksičnosti

| Broj liganda | Naziv liganda | Afinitet | Molekularna masa (g/mol) | LogP ^a | HBD ^b | HBA ^c | Kardiotoksičnost |
|--------------|---------------|----------|--------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| 40 | ZINC63266643 | -7,768 | 439,2 | -2,2075 | 4 | 2 | ne |
| 76 | ZINC63222054 | -7,761 | 390,2 | -4,4831 | 4 | 2 | ne |
| 12 | ZINC39024487 | -7,742 | 393,1 | -1,4002 | 3 | 3 | ne |
| 41 | ZINC63067939 | -7,374 | 490,1 | -6,6314 | 4 | 4 | ne |
| 61 | ZINC63908673 | -7,277 | 491,2 | -2,098 | 4 | 4 | ne |
| 31 | ZINC64348827 | -7,251 | 492,2 | -0,548 | 2 | 6 | ne |
| 32 | ZINC63919932 | -7,240 | 489,2 | -0,9302 | 4 | 2 | ne |
| 34 | ZINC63926242 | -7,204 | 411,1 | -2,0021 | 2 | 6 | ne |
| 39 | ZINC65385458 | -7,099 | 366,3 | 0,88404 | 3 | 2 | ne |
| 15 | ZINC63926246 | -7,050 | 411,1 | -2,0021 | 2 | 6 | ne |
| 30 | ZINC63919930 | -6,979 | 489,2 | -0,9302 | 4 | 2 | ne |
| 79 | ZINC26511691 | -6,947 | 464,1 | 1,5732 | 3 | 6 | ne |
| 74 | ZINC09747381 | -6,876 | 432,2 | 0,9056 | 2 | 7 | ne |
| 47 | ZINC63266653 | -6,775 | 398,2 | -3,5727 | 5 | 2 | ne |
| 9 | ZINC11879007 | -6,753 | 429,2 | 0,447 | 3 | 4 | da |
| 11 | ZINC63529288 | -6,724 | 477,1 | 2,169 | 2 | 4 | da |
| 22 | ZINC26511685 | -6,655 | 464,2 | 1,5732 | 3 | 6 | ne |
| 24 | ZINC02677478 | -6,649 | 463,2 | 2,19482 | 3 | 5 | da |
| 62 | ZINC44548936 | -6,631 | 402,1 | 4,9564 | 1 | 6 | da |
| 27 | ZINC72229090 | -6,61 | 403,2 | 2,53372 | 2 | 4 | ne |

^a omjer raspodjele spoja između otapala oktanola i vode

^b donor vodikove veze, engl. *hydrogen bond donor*

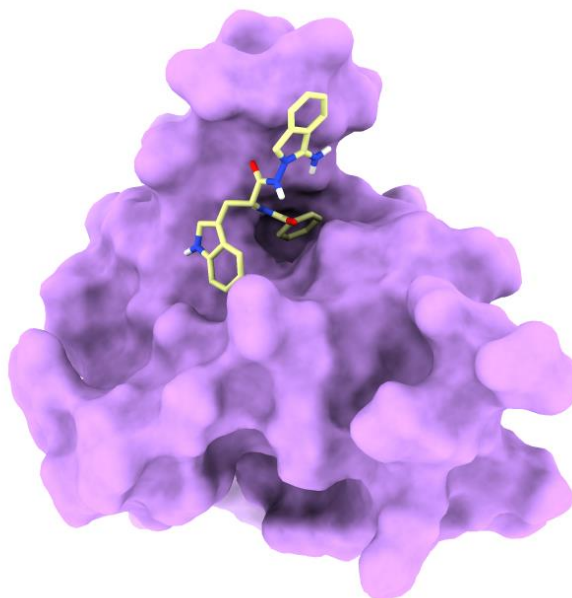
^c akceptor vodikove veze, engl. *hydrogen bond acceptor*

Među pronađenih 82 molekule izabrano je 20 najboljih liganda prema najpovoljnijem afinitetu vezanja za receptor, a da pritom zadovoljavaju Lipinski pravilo petice (engl. *Lipinski's rule of five*). Ligand pod brojem 40, ZINC63266643 ima najbolji afinitet vezanja s vrijednosti od -7,768. Utvrđene su njihove fizikalno-kemijske osobine kao što su molekularna masa, lipofilnost molekule koja je iskazana kao LogP vrijednost te broj donora odnosno akceptora vodikove veze u molekuli. Naposljetku je ustanovljena moguća kardiotoksičnost. Od 20 liganda, za one pod brojevima 9, 11, 24 i 62 se utvrdilo da blokiraju hERG kalijeve kanale te zaključujemo da mogu djelovati toksično na srce. Za analizu vezivanja odabrano je 10 liganda sa najboljim afinitetom vezanja, uz potvrđenu odsutnost kardiotoksičnosti.

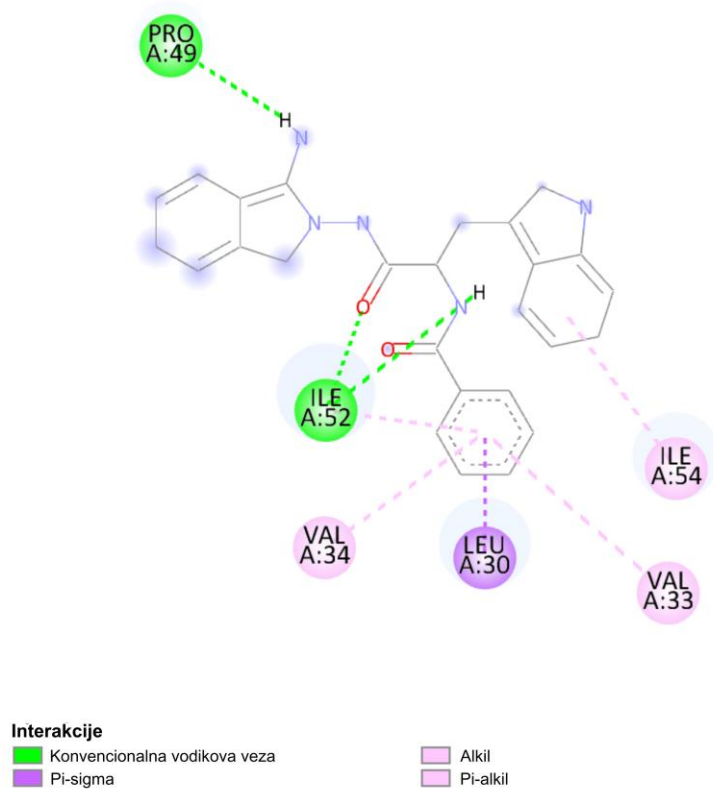
4.3. Vizualizacija molekularnog sidrenja i analiza vezivanja

Ligand 40, ZINC63266643

A



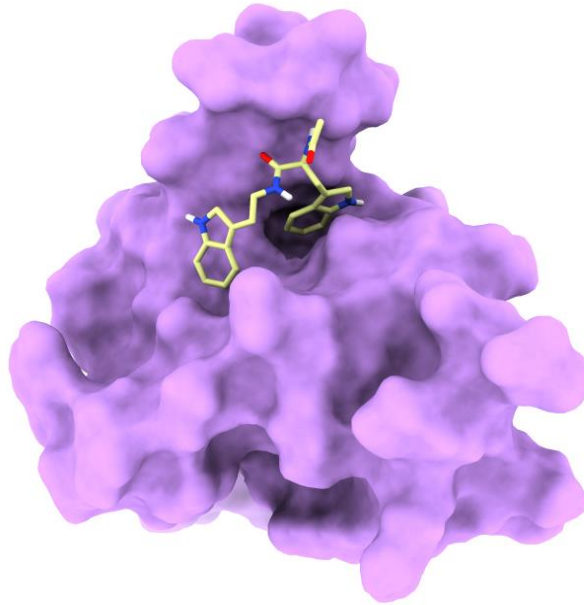
B



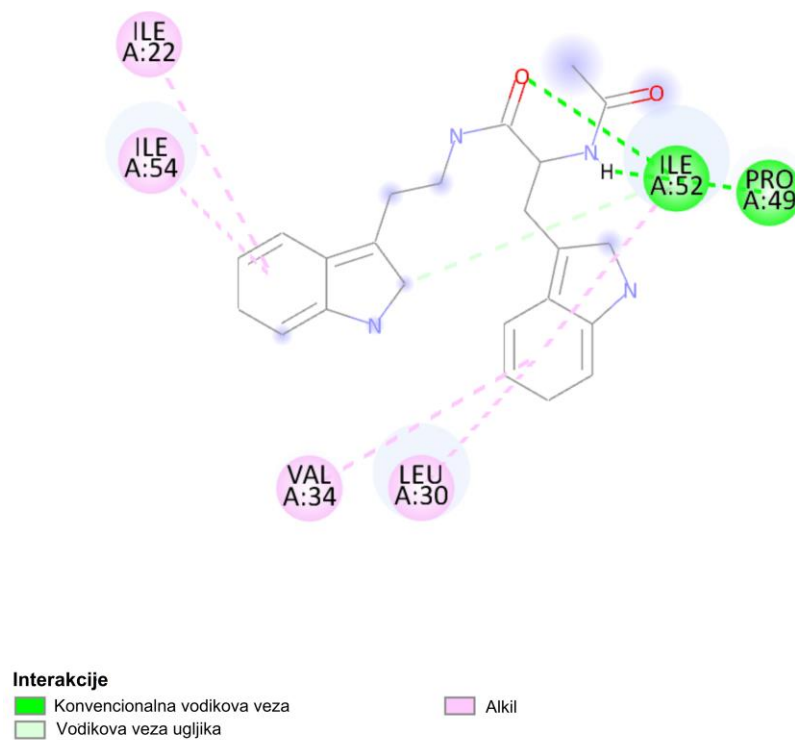
Slika 10. A) vizualizacija kompleksa liganda 40 i receptora, B) prikaz interakcija između liganda 40 i aminokiselina receptora

Ligand 76, ZINC63222054

A



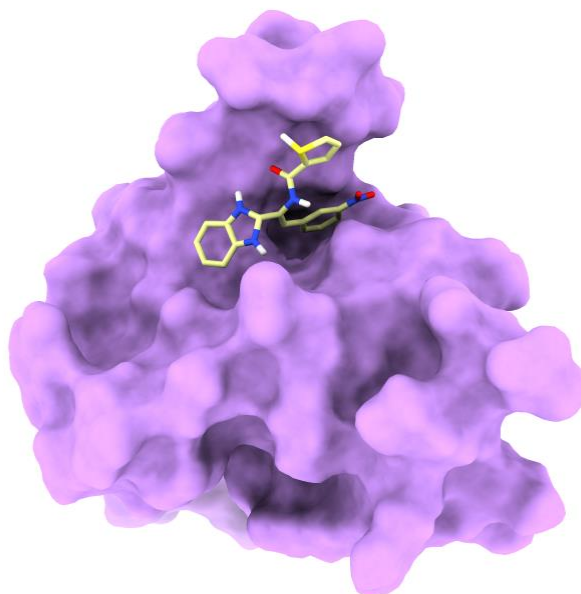
B



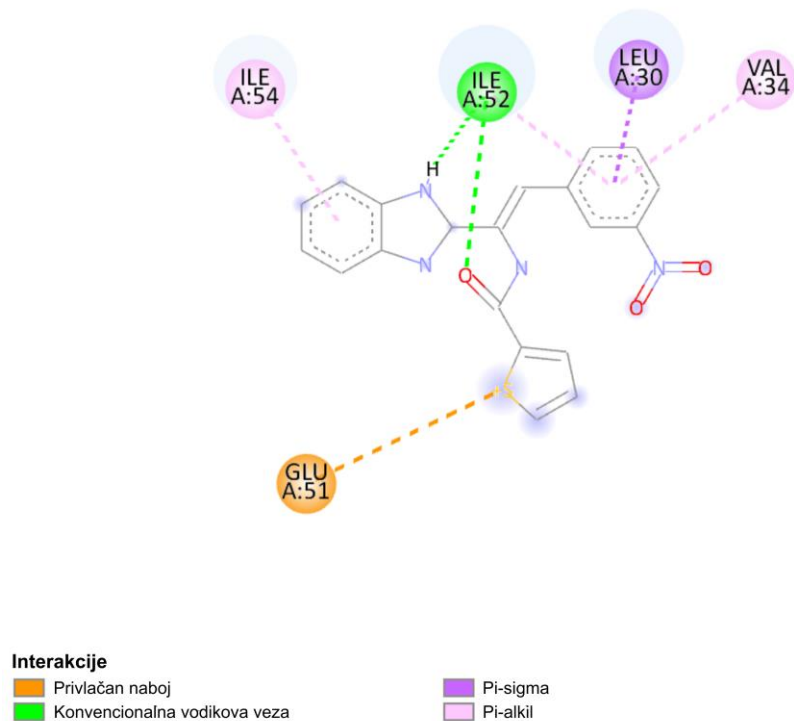
Slika 11. A) vizualizacija kompleksa liganda 76 i receptora, B) prikaz interakcija između liganda 76 i aminokiselina receptora

Ligand 12, ZINC39024487

A



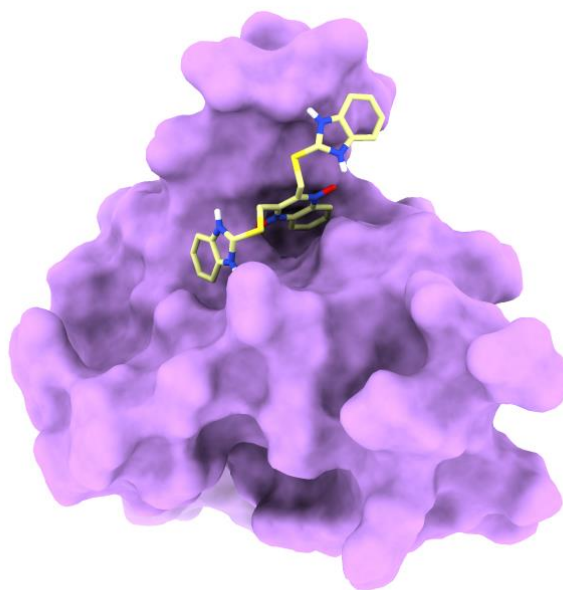
B



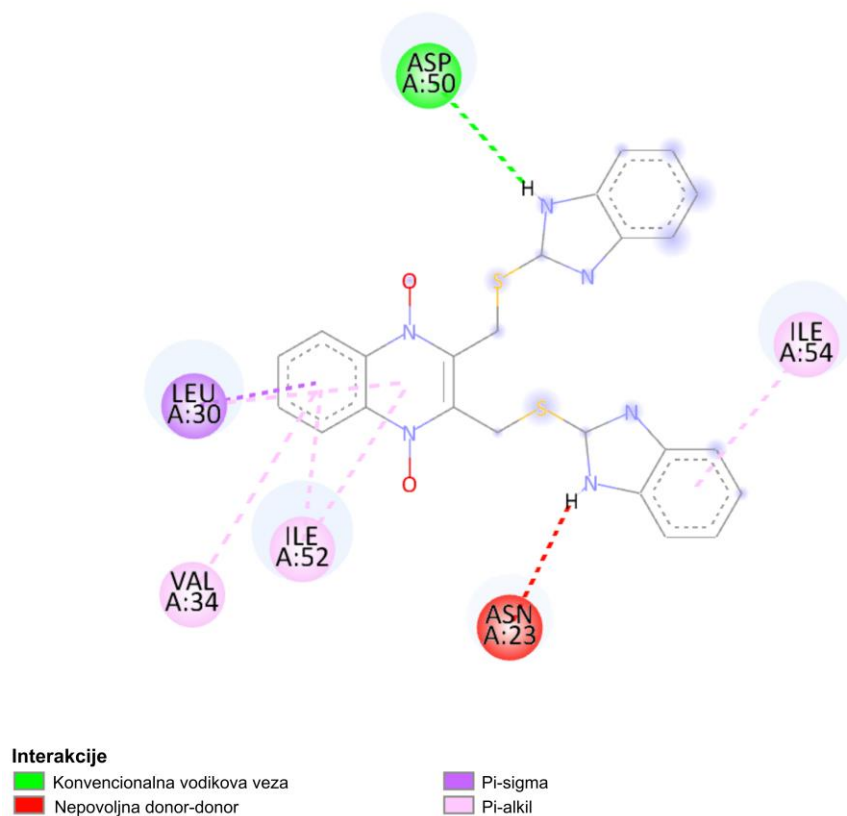
Slika 12. A) vizualizacija kompleksa liganda 12 i receptora, B) prikaz interakcija između liganda 12 i aminokiselina receptora

Ligand 41, ZINC63067939

A



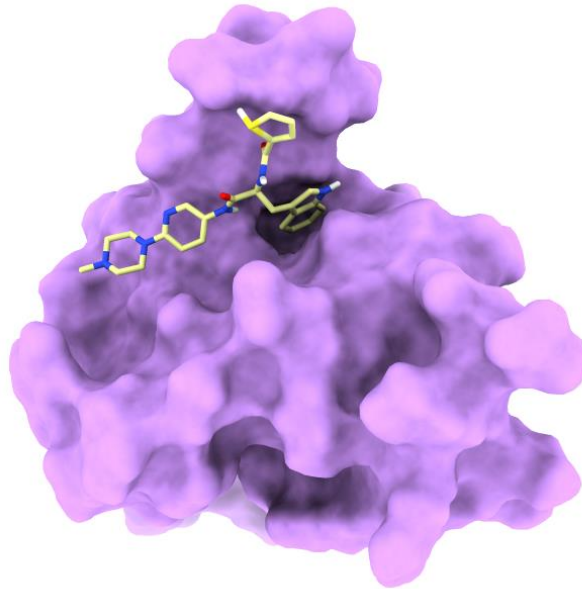
B



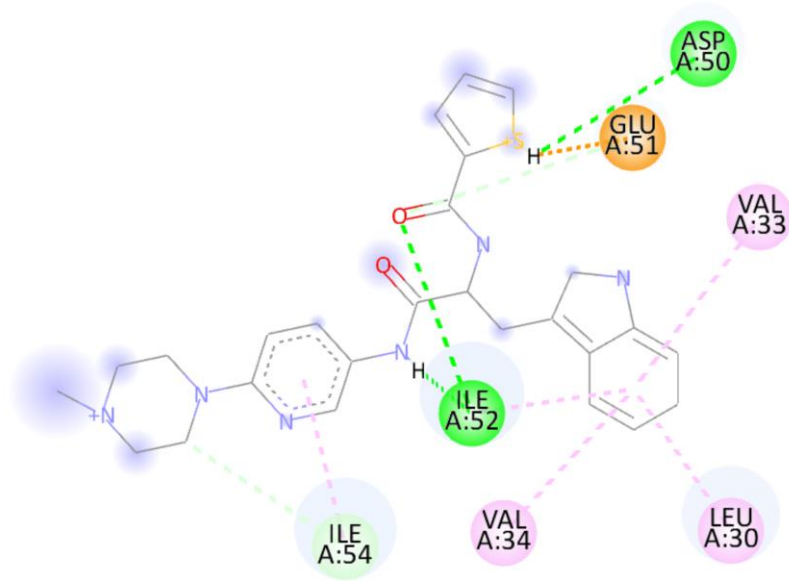
Slika 13. A) vizualizacija kompleksa liganda 41 i receptora, B) prikaz interakcija između liganda 41 i aminokiselina receptora

Ligand 61, ZINC63908673




A



B



Interakcije

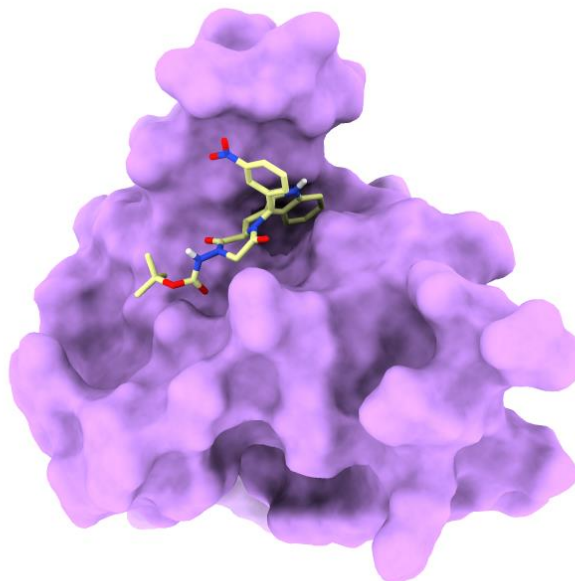
-  Solni most
-  Konvencionalna vodikova veza
-  Vodikova veza ugljika

-  Alkil
-  Pi-alkil

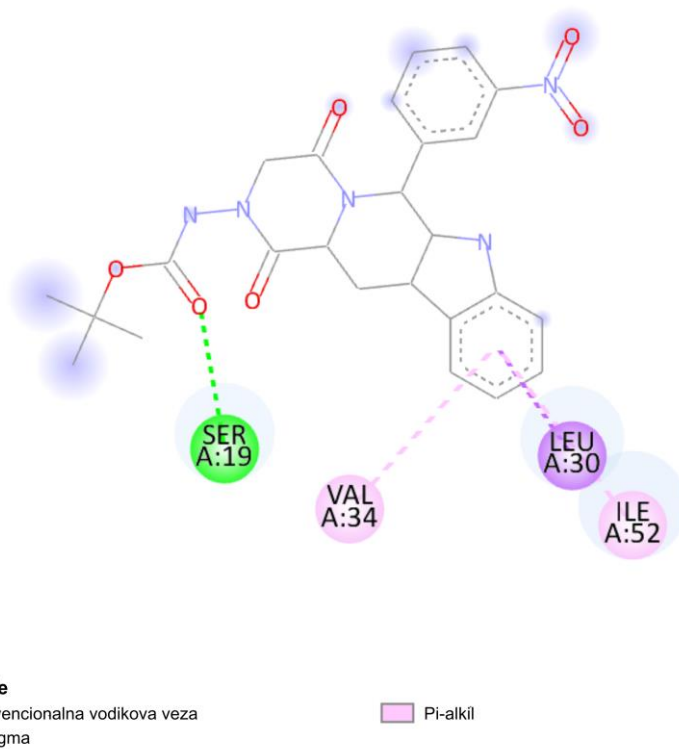
Slika 14. A) vizualizacija kompleksa liganda 61 i receptora, B) prikaz interakcija između liganda 61 i aminokiselina receptora

Ligand 31, ZINC64348827

A



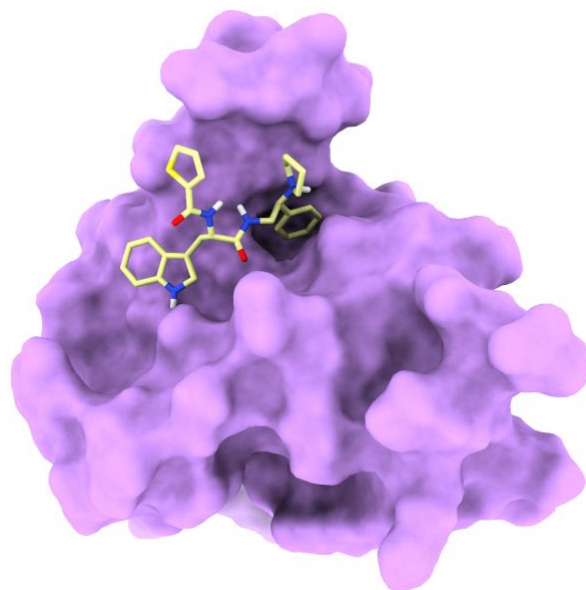
B



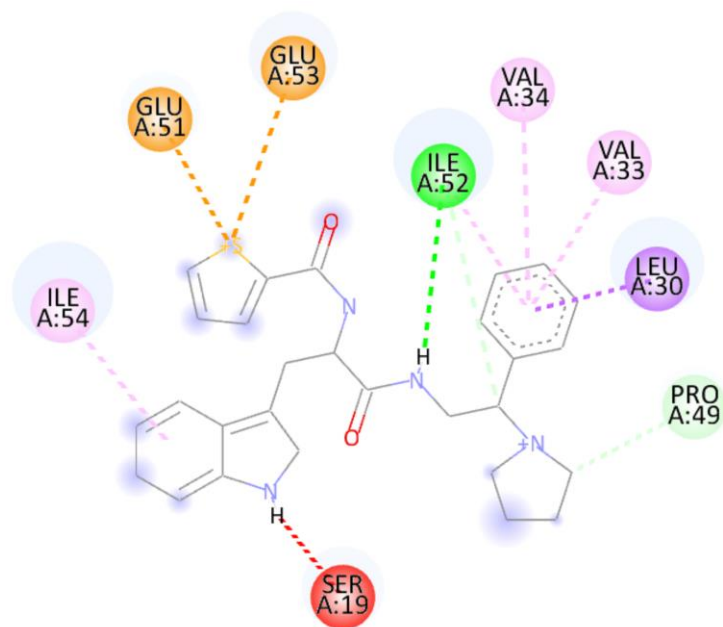
Slika 15. A) vizualizacija kompleksa liganda 31 i receptora, B) prikaz interakcija između liganda 31 i aminokiselina receptora

Ligand 32, ZINC63919932








A



B



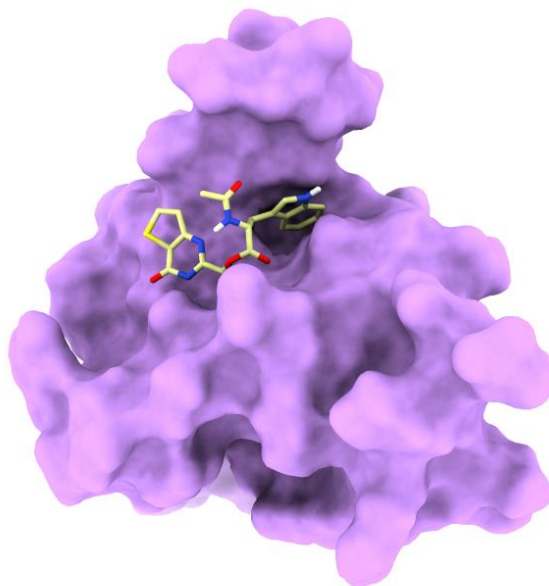
Interakcije

- | | | | |
|---|------------------------------|---|----------|
|  | Privlačan naboj |  | Pi-sigma |
|  | Konvencionalna vodikova veza |  | Alkil |
|  | Vodikova veza ugljika |  | Pi-alkil |
|  | Nepovoljna donor-donor | | |

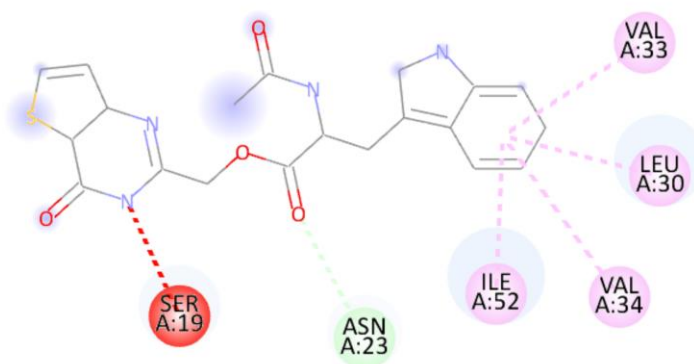
Slika 16. A) vizualizacija kompleksa liganda 32 i receptora, B) prikaz interakcija između liganda 32 i aminokiselina receptora

Ligand 34, ZINC63926242



A



B



Interakcije

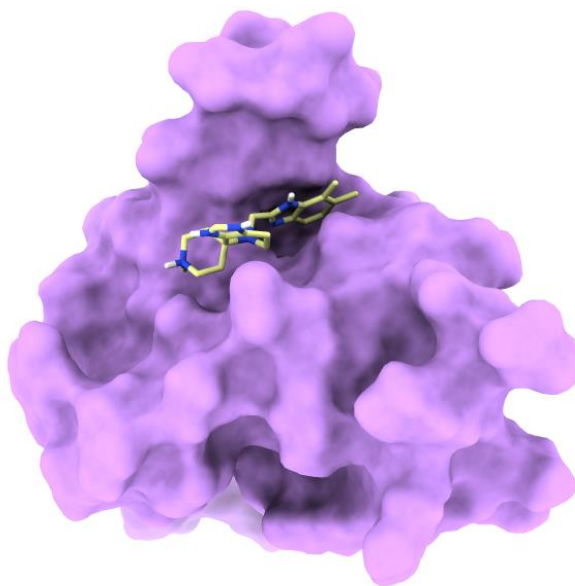
 Vodikova veza ugljika
 Nepovoljna donor-donor

 Alkil

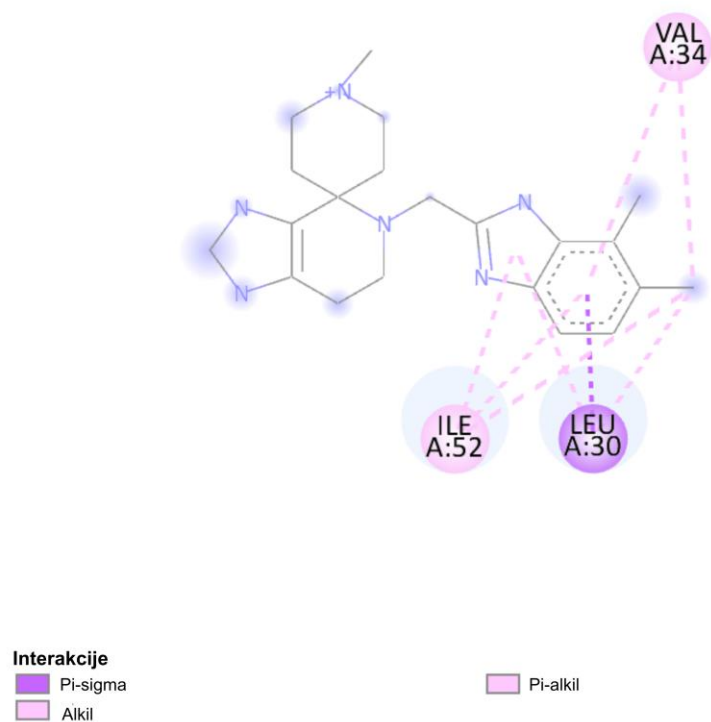
Slika 17. A) vizualizacija kompleksa liganda 34 i receptora, B) prikaz interakcija između liganda 34 i aminokiselina receptora

Ligand 39, ZINC65385458

A



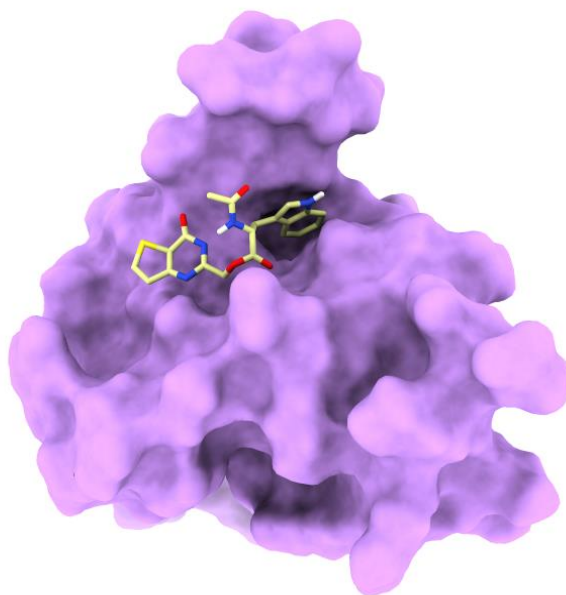
B



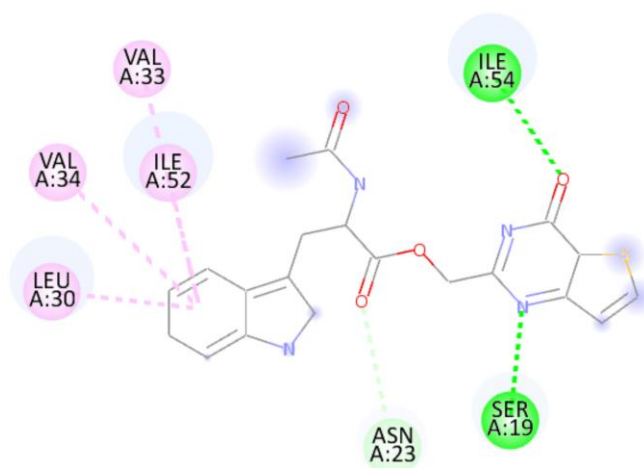
Slika 18. A) vizualizacija kompleksa liganda 39 i receptora, B) prikaz interakcija između liganda 39 i aminokiselina receptora

Ligand 15, ZINC63926246



A



B



Interakcije

 Konvencionalna vodikova veza
 Vodikova veza ugljika

 Alkil

Slika 19. A) vizualizacija kompleksa liganda 15 i receptora, B) prikaz interakcija između liganda 15 i aminokiselina receptora

Slike prikazuju molekularno sidrenje 10 najboljih liganda s receptorom te vrste interakcija u koje stupaju ligand i aminokiselinski ostaci receptora (Slike 10-19). Ligandi su izabrani prema dva uvjeta, afinitetu vezanja i kardiotoksičnosti. U užu krug su uzeti ligandi koji imaju najpovoljniji afinitet vezanja za receptor te oni koji ne djeluju toksično na srce. Odabrani ligandi su pod brojevima 40, 76, 12, 41, 61, 31, 32, 34, 39 i 15, a poredani su prema afinitetu vezivanja, od najboljeg prema lošijem.

4.4. Validacija molekularnog sidrenja

Za validaciju je korišten nasumično određen ligand 50, a uspoređivala se njegova najbolja poza pri sidrenju unutar dva različita programa. Mjerena je RMSD vrijednost koja je iznosila 1,985 Å te je zadovoljen uvjet da je vrijednost manja od 2 Å . Iz rezultata zaključujemo da se najbolje poze liganda u oba programa podudaraju i time je postupak molekularnog sidrenja validiran i može se smatrati uspješnim.



Slika 20. Optimalno poravnanje molekula liganda 50 u svrhu validacije molekularnog sidrenja

5. RASPRAVA

Za probir molekula iz kemijskih knjižnica bilo je potrebno odrediti farmakofore. Farmakofori predstavljaju fizikalno-kemijske aspekte molekula koje omogućuju prepoznavanje i interakciju liganda s receptorom (48). Njihovim određivanjem omogućen je precizan probir molekula, a time i racionalniji dizajn lijekova jer služe kao modeli za prepoznavanje molekula sa sličnim interakcijama sa željenom metom. Za izradu farmakoforne mape je korišten LANA protein koji se veže za ET domenu BRD4 proteina. Dobivene rezultate je moguće primijeniti na BRD2 protein zbog visoke konzerviranosti regije među BET proteinima. Virtualnim probirom je ustanovljeno 82 molekule koje bi potencijalno mogle inhibirati humani BRD2 protein.

Nakon analize vezivanja najboljih deset liganda opažamo da stupaju u interakcije s različitim aminokiselinskim ostacima receptora putem više vrsta kemijskih veza, ali mogu se uočiti i zajedničke karakteristike. Svih deset liganda je ostvarilo vezu s aminokiselinama izoleucin 52, leucin 30 te valin 34. Interakcije izoleucina 52 i liganda su se odvijale putem konvencionalnih vodikovih veza, alkilnih i pi-alkilnih veza. Leucin 30 uglavnom stupa u pi-sigma interakcije s ligandima, dok kod određenih liganda se zapažaju alkilne veze. Kod valina 34 primijećene su alkilne i pi-alkilne veze. Hidrofobne i vodikove veze su ključne za vezanje liganda za receptor jer stabiliziraju ligand, utječu na afinitet vezanja i samim time na učinkovitost lijeka (49). Vodikova veza predstavlja međumolekulsku vezu između vodika i atoma visoke elektronegativnosti kao što su kisik ili dušik. Uglavnom su donori vodika NH skupine liganda, no kisik u amidnoj skupini liganda također može biti i akceptor vodika dok donor vodika potiče od aminokiseline. Osim izoleucina 52, u vodikovim vezama sudjeluju i aminokiseline prolin 49, asparaginska kiselina 50, serin 19 i izoleucin 54. Ove vrste kemijskih veza ne nalazimo kod dva liganda, a to su ligand 39 i 34. Alkilne, pi-alkilne i pi-sigma veze su hidrofobne veze. U njima sudjeluju aromatski prstenovi liganda s aminokiselinama. Interakcije u kojima su uključeni aromatski prsteni su ključne za stvaranje kompleksa protein-ligand te time i vrlo važne u samom otkrivanju novih lijekova (50). Osim leucina 30 i valina 34 pronalazimo alkilne i pi-alkilne veze s valinom 33 te izoleucinom 54 i 22, dok se pi-sigma veza javlja samo kod leucina 30. Pi interakcije su znatno slabije od klasične vodikove veze ali i dalje igraju značajnu ulogu u određivanju i stabilizaciji struktura (50). Kod liganda 41, 32 i 34 dolazi do nepovoljne donor-donor interakcije. Ligand 41 stupa u takvu interakciju s asparginom 23 dok ostala dva stupaju s istom aminokiselinom, serin 19. Zbog pojave sila odbijanja, ovakve nepovoljne veze smanjuju stabilnost kompleksa protein-ligand i time negativno utječu na

djelovanje lijeka (51). Ostale manje zastupljene interakcije su vodikova veza ugljika, privlačni naboj te solni most.

Ligandi koji su podvrgnuti analizi vezivanja zadovoljavaju Lipinski pravilo petice. Ovo pravilo predviđa da je lošija apsorpcija lijeka ako molekula ima više od 5 donora vodikove veze, 10 akceptora vodikove veze, molekularna težina je veća od 500 i izračunata LogP vrijednost je veća od 5. Lipinski pravilo petice je značajno radi predviđanja oralne bioraspoloživosti potencijalnih lijekova (52). Spojevi s većim brojem donora i akceptora vodikovih veza preferiraju raspodjelu u otapalima koji stvaraju snažne vodikove veze kao što je voda te će takvi spojevi teže prolaziti lipofilne stanične membrane, za razliku od spojeva s manjim brojem akceptora i donora. Također veća molekularna masa će potencijalno smanjiti mogućnost apsorpcije. Između ostalog lipofilnost je ključna za apsorpciju, a LogP vrijednost opisuje sposobnost molekule da se raspodijeli između masne i vodene faze (53). Oralna bioraspoloživost je često ograničavajući korak u procesu razvoja novoga lijeka te ju je potrebno utvrditi što ranije. Stoga su važne metode koje omogućuju predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava iz molekularne strukture kao što je i ovo pravilo (52). Iz ovoga proizlazi da modificiranjem prethodno navedenih obilježja možemo modificirati strukture kako bi imale što povoljnija svojstva.

Tijekom razvoja lijekova srčane aritmije predstavljaju jednu od najčešćih nuspojava koje mogu dovesti do neuspjeha terapije, a najčešće je povezana s inhibicijom hERG kanala, naponom reguliranog kalijevog kanala koji igra ključnu ulogu u regulaciji električne aktivnosti srca (54). Ovo nas dovodi do zaključka da je važno ispitivanje kardiotoxicnosti u ranijim fazama razvoja lijekova kako bi se smanjio rizik od kasnijeg neuspjeha, optimizirali resursi i smanjili troškovi te zaštitio pacijent. Također ova ispitivanja mogu uputiti na moguću prilagodbu i optimizaciju kemijske strukture spoja kako bi se smanjila odnosno eliminirala kardiotoxicnost. U ovom ispitivanju srčana toksičnost se procjenjivala na dvadeset najboljih liganda prema afinitetu, a pri tome je uočena kod četiri liganda pod brojevima 9, 11, 24 i 62 te oni nisu korišteni u daljnjim analizama.

Pronalazak novih molekula kao potencijalnih inhibitora BRD2 proteina je korisno za unapređenje liječenja bolesti povezanih s disregulacijom ovoga proteina. Razvoj ovih vrsta lijekova je prvotno važan kao dodatna terapija u liječenju više vrsta raka za prevenciju metastaza i terapijske rezistencije. Ovi lijekovi mogli bi se koristiti i za ostale bolesti u kojima

je naglašena funkcija BRD2 proteina kao što su neurološki poremećaji, upalna stanja, metaboličke bolesti i virusne infekcije (55).

Ovo istraživanje je provedeno isključivo *in silico* metodom te dobiveni rezultati nisu potvrđeni eksperimentalnim postupcima što predstavlja jedno od ograničenja. Nadalje, molekule dobivene prvobitnim probirom ne trebaju ostati izvornih kemijskih struktura nego ih je poželjno dalje modificirati kako bi dobili spojeve što boljih svojstava. Još jedno moguće ograničenje je provođenje samo rigidnog sidrenja, a to znači da prilikom sidrenja ne dolazi do rotacija aminokiselina koje utječu na strukturu proteina i posljedično na vezanje liganda.

6. ZAKLJUČCI

1. Pronašli smo molekule, potencijalne inhibitore ET domene humanog BRD4 proteina, čije rezultate možemo ekstrapolirati na humani BRD2 protein zbog njihovih sličnosti u strukturi. Premda još nisu poznati malomolekularni ligandi za ET domenu BRD2 proteina dobiveni rezultati mogu pomoći u daljnjim istraživanjima potencijalnih inhibitora.
2. Otkrivene molekule potrebno je optimizirati, sintetizirati te eksperimentalno potvrditi *in vitro* i *in vivo* istraživanjima kako bi se potencijalno nastavio razvoj ovih lijekova.
3. Razvoj BRD2 inhibitora bi značajno pridonio poboljšanju postojećih načina liječenja zloćudnih bolesti. Njihovo korištenje u kombiniranoj terapiji s postojećim kemoterapeuticima bi moglo dovesti do bolje kontrole metastaziranja raka i smanjenja mogućnost nastanka terapijske rezistencije.

7. LITERATURA

1. Ferri E, Petosa C, McKenna CE. Bromodomains: Structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochem Pharmacol.* 2016;106:1–18.
2. Umehara T, Nakamura Y, Jang MK, Nakano K, Tanaka A, Ozato K i sur. Structural Basis for Acetylated Histone H4 Recognition by the Human BRD2 Bromodomain. *J Biol Chem.* 2010;285:7610–8.
3. Wang ZQ, Zhang ZC, Wu YY, Pi YN, Lou SH, Liu TB i sur. Bromodomain and extraterminal (BET) proteins: biological functions, diseases, and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8:420.
4. Shen Y, Wei W, Zhou DX. Histone Acetylation Enzymes Coordinate Metabolism and Gene Expression. *Trends Plant Sci.* 2015;20:614–21.
5. Cheung KL, Kim C, Zhou MM. The Functions of BET Proteins in Gene Transcription of Biology and Diseases. *Front Mol Biosci.* 2021;8:728777.
6. Taniguchi Y. The Bromodomain and Extra-Terminal Domain (BET) Family: Functional Anatomy of BET Paralogous Proteins. *Int J Mol Sci.* 2016;17:1849.
7. Hnilicová J, Hozeifi S, Stejskalová E, Dušková E, Poser I, Humpolíčková J, i sur. The C-terminal domain of Brd2 is important for chromatin interaction and regulation of transcription and alternative splicing. Matera AG, editor. *Mol Biol Cell.* 2013;24:3557–68.
8. Suarez-Alvarez B, Rodriguez RM, Ruiz-Ortega M, Lopez-Larrea C. BET Proteins: An Approach to Future Therapies in Transplantation. *Am J Transplant.* 2017;17:2254–62.
9. Cribbs AP, Filippakopoulos P, Philpott M, Wells G, Penn H, Oerum H i sur. Dissecting the Role of BET Bromodomain Proteins BRD2 and BRD4 in Human NK Cell Function. *Front Immunol.* 2021;12:626255.
10. Czerwinska P, Mackiewicz AA. Bromodomain (BrD) Family Members as Regulators of Cancer Stemness—A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci.* 2023;24:995.
11. Braun T, Gardin C. Investigational BET bromodomain protein inhibitors in early stage clinical trials for acute myelogenous leukemia (AML). *Expert Opin Investig Drugs.* 2017;26:803–11.

12. Belkina AC, Blanton WP, Nikolajczyk BS, Denis GV. The double bromodomain protein Brd2 promotes B cell expansion and mitogenesis. *J Leukoc Biol.* 2013;95:451–60.
13. Tian X, Cai J, Ma S, Fang Y, Huang H, Lin T i sur. BRD2 induces drug resistance through activation of the RasGRP1/Ras/ERK signaling pathway in adult T-cell lymphoblastic lymphoma. *Cancer Commun.* 2020;40:245–59.
14. BioRender [Internet]. [citirano 7. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://app.biorender.com/>
15. Vadla R, Miki S, Taylor B, Kawauchi D, Jones BM, Nathwani N i sur. Glioblastoma Mesenchymal Transition and Invasion are Dependent on a NF- κ B/BRD2 Chromatin Complex. *bioRxiv [Preprint]*. 2023. doi: 10.1101/2023.07.03.546613.
16. French CA. Small-Molecule Targeting of BET Proteins in Cancer. *Adv Cancer Res.* 2016;131:21-58.
17. Gilan O, Rioja I, Knezevic K, Bell MJ, Yeung MM, Harker NR i sur. Selective targeting of BD1 and BD2 of the BET proteins in cancer and immunoinflammation. *Science.* 2020;368:387–94.
18. To KKW, Xing E, Larue RC, Li PK. BET Bromodomain Inhibitors: Novel Design Strategies and Therapeutic Applications. *Molecules.* 2023;28:3043.
19. PubChem. PubChem [Internet]. [citirano 9. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
20. Fu L lei, Tian M, Li X, Li J jing, Huang J, Ouyang L i sur. Inhibition of BET bromodomains as a therapeutic strategy for cancer drug discovery. *Oncotarget.* 2015;6:5501–16.
21. Lai J, Liu Z, Zhao Y, Ma C, Huang H. Anticancer Effects of I-BET151, an Inhibitor of Bromodomain and Extra-Terminal Domain Proteins. *Front Oncol.* 2021;11:716830.
22. Debeljak Ž, Bojić M, Rimac H, Medić-Šarić M. Uvod u računalnu kemiju i dizajn lijekova. Zagreb: Medicinska naklada; 2020. 10-23 str.
23. Lavecchia A, Giovanni C. Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. *Curr Med Chem.* 2013;20:2839–60.

24. Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Docking, virtual high throughput screening and *in silico* fragment-based drug design. *J Cell Mol Med.* 2009;13:238–48.
25. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H i sur. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:235–42.
26. Werner MT, Wang H, Hamagami N, Hsu SC, Yano JA, Stonestrom AJ i sur. Comparative structure-function analysis of bromodomain and extraterminal motif (BET) proteins in a gene-complementation system. *J Biol Chem.* 2020;295:1898–914.
27. Chen IP, Ott M. Viral Hijacking of BET Proteins. *Viruses.* 2022;14:2274.
28. Zhang Q, Zeng L, Shen C, Ju Y, Konuma T, Zhao C i sur. Structural Mechanism of Transcriptional Regulator NSD3 Recognition by the ET Domain of BRD4. *Structure.* 2016;24:1201–8.
29. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2024, San Diego: Dassault Systèmes, 2024.
30. Koes DR, Camacho CJ. ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:W409–14.
31. ZINCPharmer [Internet]. [citirano 5. rujna 2024.]. Dostupno na: <http://zincpharmer.csb.pitt.edu/pharmer.html>
32. 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.
33. 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.
34. Case DA, Aktulga HM, Belfon K, Cerutti DS, Cisneros GA, Cruzeiro VWD i sur. AmberTools. *J Chem Inf Model.* 2023;63:6183–91.
35. O’Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminformatics.* 2011;3:33.

36. forlilab/Meeko [Internet]. Forli Lab; 2024 [citirano 5. rujna 2024.]. Dostupno na: <https://github.com/forlilab/Meeko>
37. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S. AutoDock Vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and Python bindings. 2023;
38. 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 Jan;31:455–61.
39. 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.
40. 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.
41. Coutsias EA, Wester MJ. RMSD and Symmetry. *J Comput Chem.* 2019;40:1496–508.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Pred-hERG App [Internet]. [citirano 5. rujna 2024.]. Dostupno na: <http://predherg.labmol.com.br/>

47. Greg Landrum, Paolo Tosco, Brian Kelley, Ricardo Rodriguez, David Cosgrove, Riccardo Vianello, i sur. rdkit/rdkit: 2024_03_3 (Q1 2024) Release. Zenodo; 2024.
48. van Drie JH. Pharmacophore Discovery – Lessons Learned. *Curr Pharm Des.* 2003;9:1649-64.
49. Patil R, Das S, Stanley A, Yadav L, Sudhakar A, Varma AK. Optimized Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding at the Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing. Hannehalli S, editor. *PLoS ONE.* 2010;5:e12029.
50. Meyer EA, Castellano RK, Diederich F. Interactions with Aromatic Rings in Chemical and Biological Recognition. *Angew Chem Int Ed.* 2003;42:1210–50.
51. Dhorajiwala T, Halder S, Samant L. Comparative In Silico Molecular Docking Analysis of L-Threonine-3-Dehydrogenase, a Protein Target Against African Trypanosomiasis Using Selected Phytochemicals. *J Appl Biotechnol Rep.* 2019;6:101–8.
52. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46:3-26.
53. Pollastri MP. Overview on the Rule of Five. *Curr Protoc Pharmacol.* 2010. doi: 10.1002/0471141755.ph0912s49.
54. Garrido A, Lepailleur A, Mignani SM, Dallemagne P, Rochais C. hERG toxicity assessment: Useful guidelines for drug design. *Eur J Med Chem.* 2020;195:112290.
55. Ji Y, Chen W, Wang X. Bromodomain and Extraterminal Domain Protein 2 in Multiple Human Diseases. *J Pharmacol Exp Ther.* 2024;389:277–88.

8. SAŽETAK

Naslov: Razvoj potencijalnih inhibitora humanog BRD2 proteina

Cilj istraživanja: Otkriti nove potencijalne inhibitore humanog BRD2 proteina kako bi se koristili u terapiji liječenja tumora koji su povezani s aktivnošću ovoga proteina.

Metode: U PDB-u, za analizu je odabrana struktura BRD4 u kompleksu s LANA proteinom, pri čemu je LANA protein služio kao spoj uzor. Farmakofori su identificirani u softveru Discovery Studio 2024, dok je probir molekula proveden putem mrežnog servisa ZINCPharmer. Obrada receptora izvršena je u programu Chimera, a liganda u programima Open Babel i Meeko. Molekularno sidrenje provedeno je pomoću programa AutoDock Vina na superračunalu. Sidrenje je validirano mjerenjem RMSD vrijednosti između rezultata dobivenih u programima AutoDock Vina i AutoDock4. Vizualizacija kompleksa ligand-receptor napravljena je u ChimeraX, a analiza vezanja u Discovery Studio 2024. Srčana toksičnost predviđena je korištenjem računalnog alata PRED-hERG 5.0, dok su fizikalno-kemijska svojstva liganda izračunata pomoću RDKit-a. Ligandi su rangirani prema rezultatima sidrenja, fizikalno-kemijskim svojstvima i predviđenoj kardiotoksičnosti.

Rezultati: Prema farmakofornoj mapi izrađenoj na temelju vezivanja LANA proteina za ET domenu BRD4 proteina identificirano je 82 molekule potencijalnih inhibitora. Određen je afinitet vezanja za receptor, fizikalno-kemijske osobine i procijenjena kardiotoksičnost. Na temelju najpovoljnijeg afiniteta i isključenoj kardiotoksičnosti izabrano je 10 najboljih liganda koji su izdvojeni za daljnje analize.

Zaključak: Identificirane su molekule potencijalnih inhibitora ET domene humanog BRD2 proteina. Ove molekule potrebno je optimizirati, sintetizirati te dobivene rezultate eksperimentalno potvrditi kako bi se potencijalno nastavio razvoj ovih lijekova i time unaprijedili terapijski postupci u liječenju raka.

9. SUMMARY

Diploma Thesis Title: Development of Potential Inhibitors of the Human BRD2 Protein

Objectives: To discover new potential inhibitors of the human BRD2 protein for use in tumor therapy associated with the activity of this protein.

Methods: In the PDB, the structure of BRD4 in complex with the LANA protein was selected for analysis, with LANA protein serving as a reference compound. Pharmacophores were identified using Discovery Studio 2024 software, while molecule screening was conducted through the ZINCPharmer web service. The receptor was processed in Chimera, and the ligands in Open Babel and Meeko. Molecular docking was performed using AutoDock Vina on a supercomputer. Docking was validated by measuring the RMSD values between results obtained from AutoDock Vina and AutoDock4. The ligand-receptor complex was visualized in ChimeraX, and binding analysis was conducted in Discovery Studio 2024. Cardiotoxicity was predicted using the PRED-hERG 5.0 computational tool, and the ligand's physicochemical properties were calculated using RDKit. Ligands were ranked based on docking results, physicochemical properties, and predicted cardiotoxicity.

Results: Based on the pharmacophore map created from the binding of the LANA protein to the ET domain of the BRD4 protein, 82 potential inhibitors were identified. The binding affinity for the receptor, physicochemical properties, and potential cardiotoxicity were determined. Ten top ligands were chosen for further research based on their optimal affinity and absence of cardiotoxicity.

Conclusion: The molecules of potential inhibitors of the human BRD2 protein have been identified. These molecules need to be optimized, synthesized, and experimentally validated in order to potentially advance the development of these drugs and improve therapeutic approaches in cancer treatment.

10. ŽIVOTOPIS

