

Molekulsko modeliranje enzima laktat dehidrogenaze-B i njegovih liganda kao kandidata za antikancerogene terapije

Sajda, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:577325>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Tamara Sajda

**MOLEKULSKO MODELIRANJE
ENZIMA LAKTAT DEHIDROGENAZE-B
I NJEGOVIH LIGANDA KAO
KANDIDATA ZA ANTIKANCEROGENE
TERAPIJE**

Završni rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Tamara Sajda

**MOLEKULSKO MODELIRANJE
ENZIMA LAKTAT DEHIDROGENAZE-B
I NJEGOVIH LIGANDA KAO
KANDIDATA ZA ANTIKANCEROGENE
TERAPIJE**

Završni rad

Osijek, 2024.

Rad je ostvaren u: Medicinskom fakultetu Osijek

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Hrvoje Brkić

Rad ima 31 list, 5 tablica i 8 slika.

PREDGOVOR RADU

Prije svega, želim se iskreno zahvaliti izv. prof. dr. sc. Hrvoju Brkiću na mentorstvu ovog istraživanja i izrade završnog rada. Zahvaljujem se na posvećenom vremenu, beskrajnom strpljenju, korisnim konzultacijama te vrijednim savjetima. Bez dobrog mentora, nema dobrog rada.

Također želim izraziti zahvalnost svojim dragim kolegama i prijateljima koji su mi uljepšali ove godine studiranja i učinili ih zabavnijima i lakšima. Hvala na svim uspomenama, kojih će biti još i više.

Ponajviše hvala mojoj obitelji i rodbini koji su me neprekidno podržavali tijekom cijelog mog školovanja, uvijek ukazivali veliku vjeru u mene, bili mi podrška i neizmjerena motivacija. Sve što imam i ono što jesam, dugujem vama.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Enzimi | 1 |
| 1.1.1. Kinetika enzimskih reakcija | 2 |
| 1.2. Laktat dehidrogenaza | 2 |
| 1.2.1. Struktura laktat dehidrogenaze | 3 |
| 1.3. Inhibicija enzima | 4 |
| 1.3.1. Inhibitori LDH - tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046 | 5 |
| 1.4. Uloga inhibicije LDH u antikancerogenim terapijama | 6 |
| 1.5. Računalne metode | 7 |
| 2. CILJ | 8 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 9 |
| 3.1. Ustroj studije | 9 |
| 3.2. Materijali | 9 |
| 3.3. Metode | 9 |
| 3.3.1. Priprema molekula enzima i liganada | 9 |
| 3.3.2. Metoda uklapanja | 10 |
| 3.3.3. Vizualizacija molekula | 11 |
| 3.4. Statističke metode | 11 |
| 4. REZULTATI | 13 |
| 4.1. Rezultati dobiveni programom LeDock | 13 |
| 4.2. Rezultati vizualizirani programom VMD | 13 |
| 5. RASPRAVA | 24 |
| 6. ZAKLJUČAK | 26 |
| 7. SAŽETAK | 27 |
| 8. SUMMARY | 28 |
| 9. LITERATURA | 29 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| 10. ŽIVOTOPIS..... | 31 |
|---------------------------|-----------|

POPIS KRATICA

Å – angstrom (10^{-10} m), mjerna jedinica za duljinu

Ala – aminokiselina alanin (također oznaka A)

Arg – aminokiselina arginin (također oznaka R)

Asn – aminokiselina asparagin (također oznaka N)

Asp - aminokiselina asparaginska kiselina (također oznaka D)

ATP - adenzin trifosfat (*engl. adenosine triphosphate*)

CPK – metoda bojenja po Cooreyu, Paulingu i Koltunu (*engl. Corey–Pauling–Koltun*)

EGFR - receptor humanog epidermalnog čimbenika rasta (*engl. epidermal growth factor receptor*)

Gln – aminokiselina glutamin (također oznaka Q)

Gly – aminokiselina glicin (također oznaka G)

HGFR - receptor faktora rasta hepatocita (*engl. hepatocyte growth factor receptor*)

His – aminokiselina histidin (također oznaka H)

IFCC - Međunarodna federacija kliničke kemije i laboratorijske medicine (*engl. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*)

IUB – Međunarodna unija za biokemiju (*engl. International Union of Biochemistry*)

LDH - laktat dehidrogenaza (*engl. lactate dehydrogenase*)

Lys – aminokiselina lizin (također oznaka K)

NAD⁺ - nikotinamid adenin dinukleotid (*engl. nicotinamide adenine dinucleotide*)

PDB - Proteinska baza podataka (*engl. Protein Data Bank*)

RMSD - srednje kvadratno odstupanje (*engl. Root Mean Square Deviation*)

SDF - datoteka prostornih podataka (*engl. Spatial Data File*)

Ser – aminokiselina serin (također oznaka S)

Thr – aminokiselina treonin (također oznaka T)

Tyr – aminokiselina tirozin (također oznaka Y)

Val - aminokiselina valin (također oznaka V)

VMD – računalni program za vizualiziranje molekula (*engl. Visual Molecular Dynamics*)

1. UVOD

1.1. Enzimi

Enzimi su male molekule proteina, uz iznimku katalitičkih molekula ribonukleinske kiseline ili ribozima, čija je glavna uloga u omogućavanju provedbe kemijskih reakcija unutar stanica zbog čega se nazivaju biološkim katalizatorima. Svojim djelovanjem ubrzavaju procese kemijskih reakcija, prilikom čega sami ostaju nepromijenjeni (1). Takva je aktivnost bitna za održavanje ravnoteže sustava kod procesa kao što su unos, skladištenje te iskorištavanje energije, stvaranje molekula i njihovih spojeva, izgradnja nukleinskih kiselina te staničnih elemenata i ostalih sastavnica organizma nužnih za provedbu svakodnevnih životnih funkcija (1, 2). Enzime karakterizira velika specifičnost prema vlastitom supstratu, odnosno molekuli na koju djeluju, što se također naziva i modelom „ključ-brava“, vezujući se u aktivnom mjestu građenom od specifičnih aminokiselina u obliku utora ili džepa. Upravo zbog te specifičnosti istovremeno se može odvijati širok spektar kemijskih procesa neovisno jedan o drugome, a aktivnost enzima može se izraziti kao količina pretvorenog supstrata (1, 2). Takav model objasnio je Emil Fischer, dok je shvaćanje vezanje supstrata i enzima upotpunio Daniel Koshland modelom „izazvanog pristajanja“ u kojemu objašnjava da prilikom približavanja i vezanja na enzim, supstrati izazivaju konformacijske promjene. Njihovim se vezanjem tvori kompleks enzim-supstrat koji se nakon toga može raspasti na određeni produkt ili više njih (1, 2).

Naziv enzima najčešće opisuje vrstu kemijske reakcije koju on katalizira, a službene nazive i klasifikaciju enzima uvela je 1964. godine Međunarodna unija biokemičara (*engl. International Union of Biochemists, IUB*). Svakom enzimu dodijeljen je jedinstveni naziv i klasifikacijski broj. Enzimi su podijeljeni u sedam skupina: 1. oksidoreduktaze (kataliziraju oksidacije i redukcije), 2. transferaze (kataliziraju prijenos kemijskih skupina), 3. hidrolaze (kataliziraju hidrolitičko kidanje veza), 4. liaze (kataliziraju kidanje veza eliminacijom atoma, uz stvaranje dvostruke veze), 5. izomeraze (kataliziraju strukturne ili geometrijske konformacije unutar molekula), 6. ligaze (kataliziraju spajanje dviju molekula u sprezi s hidrolizom ATP) i 7. translokaze (kataliziraju prijenos molekula ili iona preko ili unutar membrana) (1, 3). Klasifikacijski broj svakog enzima sastoji se od četiri znamenke odvojene točkama, prilikom čega prva znamenka označuje rod, druga znamenka razred, treća znamenka podrazred, a četvrta znamenka predstavlja individualni broj svakog enzima u njegovu podrazredu (2).

1.1.1. Kinetika enzimskih reakcija

Jedna od glavnih uloga enzima je ubrzavanje provođenja kemijskih reakcija, što se događa pri određenim uvjetima. Područje biokemije koje proučava brzinu enzimski kataliziranih reakcija te čimbenika koje utječu na iste naziva se enzimski kinetika (4). Neki od tih čimbenika su temperatura, pH, koncentracija supstrata, utjecaj prisutnosti koenzima, inhibitora i aktivatora te koncentracija i ionska jakost pufera (2).

Kemijska reakcija koja je u ravnoteži sastoji se od supstrata na koje će se vezati enzim i s njim tvoriti nove kemijske elemente, nazvane produktima. Kada se radi o povratnoj reakciji, produkti reakcije napisane u jednome smjeru u jednadžbi također su i supstrati povratne reakcije (4). Enzimski reakcije su dinamične, što znači da ne dolazi do njihovog zastoja, već su produkti jedne reakcije najčešće supstrati u nekoj drugoj reakciji (5). Ovakvu teoriju su zastupali Leonor Michaelis i Maud Leonora Menten. Michaelis-Mentenova jednadžba prikazuje matematički odnos koncentracije supstrata [S] i početne brzine reakcije v_1 . K_m je oznaka za Michaelisovu konstantu, što je koncentracija supstrata pri kojoj je v_1 ekvivalentna polovici maksimalne brzine ($v_{max}/2$) postignute kod određene koncentracije enzima (4).

$$v_1 = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

1.2. Laktat dehidrogenaza

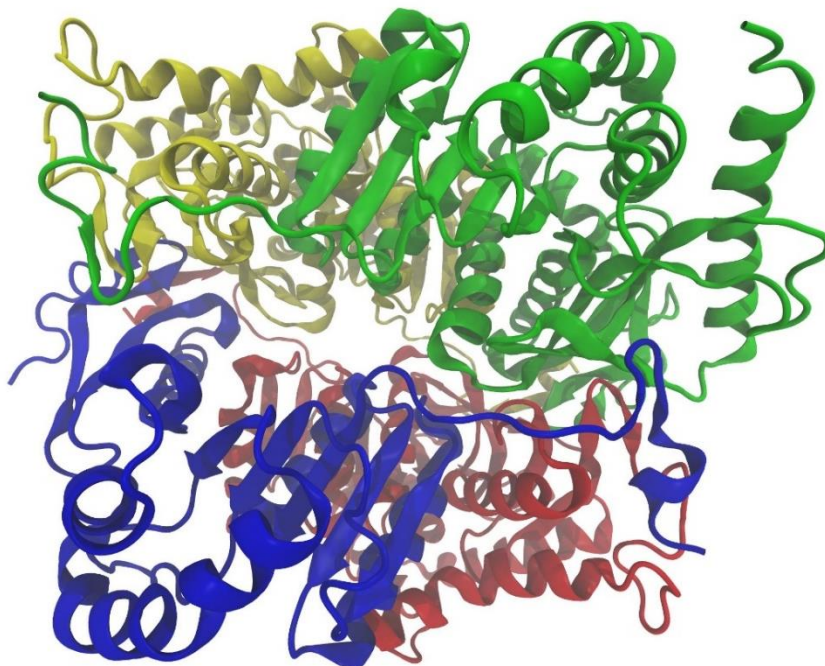
Laktat dehidrogenaza (*engl. lactate dehydrogenase*, LDH) enzim je čija je aktivnost potrebna u zadnjem koraku anaerobne razgradnje glukoze, odnosno procesu glikolize, stvarajući laktat iz piruvata uz pomoć kofaktora nikotinamid adenin dinukleotid (*engl. nicotinamide adenine dinucleotide*, NAD⁺) (7, 8). Reakcija je vrlo bitna za stvaranje molekule adenozin trifosfat (*engl. adenosine triphosphate*, ATP) kao glavne molekule za skladištenje energije unutar organizma koja stanicama omogućava obavljanje redovnih životnih funkcija (10). Reakcija je reverzibilna te se događa pri optimalnom pH od 7,2 do 9,8, a primarno se odvija u citoplazmi stanica (2). Ovaj enzim omogućuje i prevladavanje privremenog manjka kisika u obliku akumuliranog laktata, koji kasnije može ponovnom oksidacijom prijeći u piruvat (8).

Koncentracija LDH u serumu zdrave osobe održava se u rasponu od 200 do 400 U/L, dok se unutar organa nalazi u puno većim koncentracijama, od 9×10^6 do 25×10^6 U/kg (8). Upravo zbog toga, njegova koncentracija u serumu raste čak i kod manjih oštećenja organa jer dolazi do njegovog izlaska iz organa u cirkulaciju, korelirajući sa stupnjem oštećenja. Do njegovog

pojačanog izlučivanja iz organa dolazi kod različitih patoloških stanja te time može pridonijeti postavljanju dijagnoze, praćenju tijeka bolesti, praćenju stupnja oštećenja te progresa terapije i liječenja. Sukladno tome, enzim laktat dehidrogenaza dijagnostički je bitan pokazatelj infarkta miokarda, hemolitičke i perniciozne anemije, nekih leukemija, ciroze jetre, hepatitisa, mišićnih bolesti te velikog broja oštećenja i bolesti ostalih organa u kojima se nalazi (8). Visoke razine LDH u serumu su u korelaciji s prisutnošću metastaza, histološkim gradusom tumora te lošijom prognozom bolesnika kojemu je dijagnosticiran karcinom (9). Sve veći značaj pronalazi se u primjeni ovog enzima kao tumorskog markera te potencijalnog rješenja u unaprjeđenju antikancerogenih terapija (7).

1.2.1. Struktura laktat dehidrogenaze

Molekula laktat dehidrogenaze građena je od četiri polipeptidne jedinice, što je vidljivo na slici 1., čija kombinacija formira određeni izoenzimski oblik ovog enzima. Svaki je monomer građen od dvije podjedinice LDH-A i LDH-B koje se također mogu označiti slovima M (*engl. muscle*, mišić) i H (*engl. heart*, srce), čije oznake govore o njihovoj lokalizaciji (2). Podjedinice omogućavaju reverzibilno provođenje reakcije, tako što LDH-A ima veći afinitet za piruvat te oksidacijom NADH u NAD^+ dovodi do njegove pretvorbe u laktat, dok LDH-B djeluje u suprotnome smjeru, stvarajući piruvat iz laktata (7). Različitim omjerom monomera, mogu se formirati 5 različitih izoenzima koji se označavaju brojevima od 1 do 5. LD-1 izoenzim građen je od 4 identična H monomera te je najzastupljeniji u srcu i eritrocitima, dok je LD-5 izoenzim građen od 4 identična M monomera, prevladavajući u poprečnoprugastim mišićima i jetri. Ostali su izoenzimi kombinacija H i M podjedinica, prilikom čega je LD-2 građen od 3 H i 1 M podjedinice unutar retikuloendotelnog sustava, LD-3 izoenzim od 2H i 2M podjedinice s lokalizacijom u plućima te izoenzim LD-4, građen od 1 H i 3M podjedinice, nalazi se u bubregu, gušterači i posteljici (10). Svaka od podjedinica građena je još od dvije domene koje imaju ključne uloge u funkciji ovog enzima pa tako N-terminalna domena pospješuje vezanje supstrata, a C-terminalna domena omogućuje vezanje koenzima. Aktivno mjesto LDH-B tvore aminokiselinski ostaci His193, Arg106, Arg169 i Lys102 (7).



Slika 1. Prikaz strukture enzima LDH-B koji se sastoji od 4 lanca. Lanac A označen je plavom bojom, lanac B crvenom bojom, lanac C zelenom bojom te lanac D žutom bojom. Sliku izradila autorica.

1.3. Inhibicija enzima

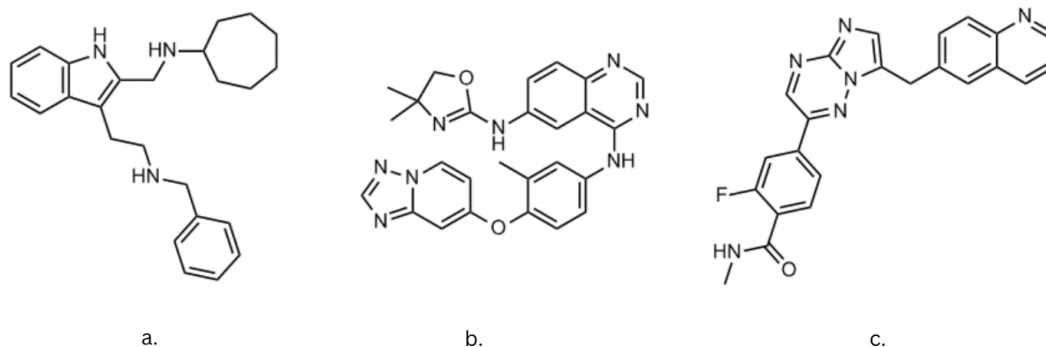
Inhibicija enzima označuje smanjenje djelovanja nekog enzima, njegove koncentracije te usporavanje ili onemogućavanje kemijskih procesa u kojima taj enzim sudjeluje zbog čega se inhibicija smatra kontrolnim mehanizmom (6). Inhibitori su strukturno slični supstratima zbog čega je njihovo vezanje za enzim moguće. Jačina i stabilnost vezanja inhibitora za enzim ovisi o silama koje prevladavaju između njih, kao primjerice Van der Waalsove sile i vodikove veze (4). Proces inhibicije enzima može biti reverzibilan i ireverzibilan (2). Ireverzibilna inhibicija, također nazvana i 'samoubilačka inhibicija', djeluje na enzim tako što dovodi do stvaranja stabilnog reaktivnog intermedijera i trajnih kemijskih modifikacija te tako onemogućava djelovanje samog enzima i njegovo vezanje za specifični supstrat. Reverzibilna inhibicija djeluje na kinetiku provođenja katalizirane reakcije te se može podijeliti na kompetitivnu, nekompetitivnu i akompetitivnu, ovisno o mjestu vezanja samog inhibitora na enzim (2). Kod kompetitivne inhibicije, inhibitor ima afinitet vezanja za aktivno mjesto enzima pa se prilikom

vezanja natječe sa supstratom, dok se kod nekompetitivne inhibicije inhibitor veže za neko drugo mjesto u blizini aktivnog centra te ne interferira sa vezanjem supstrata. Akompetitivni inhibitor može se vezati tek nakon što se stvori kompleks enzim-supstrat te na taj način onemogućuje stvaranje produkata (2). Inhibicija djeluje na mogućnost, ali i na brzinu provođenja kemijske reakcije, što se objašnjava ranije spomenutom Michaelis-Menteninom jednačicom. Niža vrijednost K_m odgovara većem afinitetu za supstrat. U kompetitivnoj inhibiciji, zbog vezanja inhibitora na aktivno mjesto enzima, dolazi do smanjenog afiniteta za supstrat, čime je vrijednost K_m povišena, dok v_{max} ostaje nepromijenjen. U nekompetitivnoj inhibiciji aktivno mjesto ostaje slobodno i nakon vezanja inhibitora, čime se ne mijenja afinitet enzima za supstrat pa tako K_m ostaje konstantan, ali zbog nemogućnosti stvaranja produkta, v_{max} će biti snižen (6). Kod akompetitivne inhibicije, doći će i do smanjenja K_m i v_{max} jer se vezanjem inhibitora ne može stvarati produkt, čime se smanjuje i koncentracija supstrata zbog održavanja ravnoteže unutar sustava.

1.3.1. Inhibitori LDH - tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046

Inhibiranjem enzima LDH može se djelovati na kemijsku reakciju koju on katalizira te samim time interferirati u stvaranju molekule ATP-a koja je potrebna stanicama kao izvor energije. Ako stanica nema dovoljnu opskrbu energijom, dolazi do gubitka njezine funkcije, a posljedično i propadanja. Upravo je to željeni ishod djelovanja inhibitora LDH na tumorske stanice (7). Kompjuterski potpomognutim istraživanjima na komercijalno dostupnim spojevima identificirano je nekoliko molekula koje bi mogle služiti kao potencijalni inhibitori za enzim LDH-B te biti primjenjivani u antikancerogenim terapijama (7). Ovaj rad će se fokusirati na tri takva inhibitora, što su tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046, čije su strukture prikazane na slici 2. AXKO-0046, derivat indola, najbolje je opisani inhibitor LDH-B koji djeluje putem nekompetitivne inhibicije. Alosterično mjesto za koje se veže nalazi se na mjestu spajanja dva monomera, oko 20 Å udaljeno od aktivnog mjesta (12). Za aminokiseline enzima LDH može se vezati zahvaljujući funkcionalnim skupinama unutar svoje strukture, što su NH skupinu indola, benzilamina i cikloheptilaminska skupina (12). Tukatinib (*engl. tucatinib*) i kapmatinib (*engl. capmatinib*) su oralno bioraspoloživi lijekovi za liječenje određenih vrsta raka koji također inhibiraju molekulu LDH nekompetitivnom inhibicijom (7). Tukatinib djeluje kao inhibitor receptora humanog epidermalnog čimbenika rasta (*engl. epidermal growth factor receptor*, EGFR) i na taj način može imati utjecaj na metastaziranje raka dojke, dok je

kapmatinib inhibitor receptora faktora rasta hepatocita (*engl. hepatocyte growth factor receptor*, HGFR) pa može djelovati u liječenju karcinoma pluća nemalih stanica (7).



Slika 2. a) Molekularna struktura inhibitora AXKO-0046. b) Molekularna struktura inhibitora tukatinib. c) Molekularna struktura inhibitora kapmatinib. Sliku izradila autorica web alatom Canva.

1.4. Uloga inhibicije LDH u antikancerogenim terapijama

Karcinom, također poznat pod nazivima neoplazma, maligni tumor ili rak, predstavlja veliku skupinu bolesti koje mogu započeti u gotovo svakom organu ili tkivu tijela te preživljavaju u različitim uvjetima mikrookoliša. Tumorske stanice karakterizira nekontrolirani rast, proliferacija i metastaziranje, što zahtjeva značajniju količinu dostupne energije za korištenje, pri čemu stanice koriste enzim LDH za povećanje svog aerobnog metabolizma (10). Laktat je spoj koji nastankom iz glikolize pospješuje malignu progresiju tumorskih stanica tako što snižava vrijednosti pH, omogućuje migraciju tumorskih stanica te nadomješta količine NAD^+ potrebne za glikolizu. Visoke koncentracije laktata karakteristične su za metastatske tumore (11). Karcinom je drugi vodeći uzrok smrti u svijetu te nema poznatog lijeka pa se ishod bolesti temelji na redovnim pregledima, ranom otkrivanju, kemoterapijama te skrbi preživjelih.

Enzim laktat dehidrogenaza smatra se obećavajućom metom za antikancerogene terapije. U dosadašnjim znanstvenim istraživanjima, dokazano je da stanice tumora u usporedbi s normalnim zdravim stanicama imaju veću vrijednost K_m i za laktat i za NAD^+ pa tako visoke koncentracije laktata imaju blagi inhibicijski učinak na LDH i enzim može tolerirati veće koncentracije laktata. Također, dokazano je da je količina laktata veća u metastatskim tumorima nego što je to kod nemetastatskih (7). LDH-B katalizira stvaranje piruvata te omogućava stanicama tumora da generiraju energiju i biosintetske prekursore. Na taj način LDH-B pridonosi metastaziranju i preživljavanju tumorskih stanica pa se zato može koristiti kao

biomarker, mjereći njegovu aktivnost i koncentraciju, s primarnim uspjehom u dijagnostici karcinoma dojke i pluća. Sukladno tome, smatra se kako bi se inhibicijom molekule LDH-B moglo utjecati na progresiju karcinoma, tako što bi se time inhibirao rast, razvoj te samo preživljavanje njegovih stanica (7). Stoga je vrlo bitno istraživanje i otkrivanje potencijalnih inhibitora, kao što su tucatinib, kapmatinib i AXKO-0046 koji će biti opisani i analizirani u ovome radu.

Medicinska ili klinička biokemija je grana biokemije čiji je fokus na proučavanju kemijskog sastava organizma te tijekom fizioloških i patoloških procesa čime pridonosi postavljanju dijagnoze, praćenju učinka terapije te tijekom i prognoze bolesti (2). Enzimska aktivnost najčešće se mjeri praćenjem koncentracije produkta koji taj enzim stvara s određenim supstratom, čime se može odrediti i aktivnost enzima te brzina enzimske reakcije. Reakcije se moraju provoditi u optimalnim uvjetima enzima (2). Povećane koncentracije nekog enzima u serumu mogu se očekivati kada dolazi do njegovog isticanja iz stanica u kojima se inače nalazi, što je karakteristično za procese kao što su pojačana sinteza enzima, upalna i patološka stanja, a ponajviše kod nekroze stanica kada dolazi do njihove potpune razgradnje (2).

1.5. Računalne metode

Primjena računalnih metoda započela je u drugoj polovici prošlog stoljeća te bilježi neprestani razvoj, korelirajući sa stupnjem razvoja i dostupnosti samih računala (13). One obuhvaćaju molekulsko modeliranje kojim je omogućeno proučavanje i dobivanje informacija o molekulama, molekulskim sustavima, svojstvima enzima i utjecajima supstrata te liganda, brzini kemijskih reakcija i srodnim svojstvima (13). Molekularna biologija je u kombinaciji s računarskim znanostima i informacijskim tehnologijama omogućila stvaranje nove grane znanosti, nazvane bioinformatika, čime se povećala efikasnost u organizaciji, obradi i uporabi informacija o kemijskim spojevima (14). Same računalne metode mijenjale se su kroz povijest, prateći razvoj pojedinih računalnih komponenti, kao što su povećanje memorijskog prostora, razvoj grafičkih procesorskih jedinica, povećanje računalnih resursa, razvoj novih algoritama, obrade i interpretacije informacija te uspoređivanja istih, kao i sama međusobna povezanost i suradnja bioinformatičara i drugih znanstvenika na globalnoj razini. Primjenom takve visoke tehnologije, danas je moguće proučavati različite procese i ponašanja molekula, što pridonosi kvalitetnijoj analizi i potencijalnom razvoju novih lijekova proučavanjem vezanje inhibitora s ciljnim molekulama koristeći in silico metode i na taj način ubrzati i olakšati napredovanje u znanosti.

2. CILJ

Ciljevi ovog istraživanja su:

- metodama molekuskog modeliranja ispitati i prikazati inhibiciju enzima laktat dehidrogenaze
- ispitati energetske najpovoljnije položaje određenih liganda u enzimu
- ispitati vezanje različitih liganda (tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046) s navedenim enzimom

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je napravljeno kao in silico studija. In silico studije uključuju baze podataka, kvantitativne odnose strukture i aktivnosti, farmakofore, modele homologije i druge pristupe molekularnom modeliranju, strojno učenje, rudarenje podataka, alate za mrežnu analizu i alate za analizu podataka koji koriste računalo (15).

3.2. Materijali

Podaci o enzimu laktat dehidrogenaza (LDH) preuzeti su iz Proteinske baze podataka (*engl. Protein Data Bank*, PDB; <https://www.rcsb.org/>). Struktura enzima dostupna je u bazi podataka pod kodom 1T2F i napravljena je u rezoluciji 3.00 Å. Strukture inhibitora tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046 preuzete su iz PubChem baze (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Svi podaci o enzimu i inhibitorima su javno dostupni u navedenim bazama podataka. Za predikciju energijski najpovoljnijeg položaja inhibitora korišten je softverski paket LeDock koji omogućuje precizno modeliranje molekularnih interakcija (17, 18).

3.3. Metode

3.3.1. Priprema molekula enzima i liganada

Trodimenzionalna struktura enzima laktat dehidrogenaze preuzeta je iz baze podataka PDB (PDB_id 1T2F). Budući da broj aminokiselina u enzimu premašuje kapacitet koji softver LeDock može obraditi za molekularno uklapanje, odlučeno je da se uklone C i D lanci enzima kako bi se omogućila učinkovita simulacija. Strukture inhibitora tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046 preuzete iz baze PubChem i konvertirane u mol2 format korištenjem softvera Open Babel (19, 20). Izvršeno je uklapanje (*eng. docking*) kao metoda za predviđanje najpovoljnijeg položaja dvije molekule kada se međusobno vežu u stabilan kompleks. Ova metoda uključuje računalne simulacije koje procjenjuju slobodnu energiju vezanja kao pribrojenu funkciju različitih komponenti koje doprinose jačini vezanja molekula.

3.3.2. Metoda uklapanja

Metoda uklapanja je računalna metoda koja omogućuje prepoznavanje najpovoljnije međusobne orijentacije dvije molekule prilikom njihovog vezanja u stabilan kompleks. Ova tehnika primjenu je pronašla u promatranju interakcija određenog supstrata i njegovih inhibitora, što je od velike važnosti u razvoju novih terapijskih strategija (13). Slobodna energija vezanja, kod računanja energije vezanja, određuje se kao pribrojena funkcija različitih doprinosa koje utječu na jačinu vezanja. Ti doprinosi uključuju specifične ligand-protein interakcije, konformacijske promjene u ligandu i proteinu te gubitak translacijske i rotacijske entropije (13). Metoda uklapanja je široko primijenjena metoda zbog svoje sposobnosti da u relativno kratkom vremenskom periodu može dati vrlo pouzdane rezultate.

Uklapanje enzima LDH s inhibitorima tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046 napravljeno je putem softverskog paketa LeDock za predikciju najpovoljnijih položaja molekula. U okviru istraživanja analizirane su tri energetske najpovoljnije orijentacije svakog inhibitora u odnosu na enzim LDH-B . Kao preduvjet za uspješno uklapanje, inhibitore je bilo potrebno pomoću Softvera Open Babel pretvoriti iz formata SDF (*engl. Spatial Data File*) u format mol2, koji je kompatibilan s LeDock-om. Prilikom uklapanja u LeDock-u, bilo je potrebno unijeti točne koordinate aminokiselinskih ostataka enzima za koje se vežu inhibitori u alosteričkom mjestu enzima. Ove koordinate navedene su u Tablici 1. Na temelju ovih podataka, LeDock je omogućio preciznu simulaciju vezanja inhibitora, pružajući uvid u najpovoljnije orijentacije i energetske karakteristike svakog kompleksa.

Tablica 1.: Položaj veznih mjesta enzima LDH i liganda tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046

| Tukatinib | | Kapmatinib | | AXKO-0046 | |
|------------------------|----------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------|
| Aminokiselinski | Položaj | Aminokiselinski | Položaj | Aminokiselinski | Položaj |
| ostatak | | ostatak | | ostatak | |
| Val | 28 | Gly | 29 | Gly | 29 |
| Asp | 52 | Gln | 30 | Gln | 30 |
| Val | 53 | Asp | 52 | Gly | 97 |
| Ala | 96 | Val | 53 | Val | 98 |
| Gly | 97 | Thr | 95 | Arg | 99 |
| Val | 116 | Ala | 96 | Gln | 101 |
| Phe | 119 | Gly | 97 | Ser | 137 |
| Ile | 120 | Arg | 99 | | |

3.3.3. Vizualizacija molekula

VMD (*engl. Visual Molecular Dynamics*) je napredni računalni program koji omogućava modeliranje, vizualizaciju i analizu složenih bioloških sustava (21). Ovaj softver nudi širok spektar opcija vizualizacije molekula, koristeći različite boje i metode crtanja kako bi se istaknule željene komponente. Program može prikazati većinu formata u kojima se zapisuju molekulske koordinate, što ga čini izuzetno fleksibilnim i prilagodljivim za različite potrebe korisnika. Sve strukture u ovom istraživanju vizualizirane su korištenjem softvera VMD. Prilikom vizualizacije dobivenih rezultata, enzim LDH-B vizualiziran je metodama crtanja SURF i NewCartoon te metodom bojanja Secondary Structure. Inhibitori su prikazani metodom crtanja Name i metodom bojanja CPK (*engl. Corey–Pauling–Koltun*), koja koristi atomske boje kako bi se istaknule različite vrste atoma molekule. Na taj je način bilo moguće analizirati alosteričko mjesto vezanja liganda na enzim LDH-B, kao i interakcije između pojedinih atoma inhibitora i aminokiselinskih ostataka enzima. Duljina veze između atoma mjerena je u angstromima, pri čemu je manja duljina veze bila ekvivalentna većoj jačini vezanja.

3.4. Statističke metode

Za statističku obradu podataka korištene su *in silico* metode, koje uključuju računalne simulacije i modeliranje. Ove metode često koriste empirijske metode i računalne algoritme za predviđanje interakcije između molekula. Statističke pogreške procjenjuju se usporedbom

rezultata predviđenih afiniteta vezanja s eksperimentalno procijenjenim afinitetima vezanja. Odstupanja su dana kao srednje kvadratno odstupanje (*engl. Root Mean Square Deviation, RMSD*) između dvaju rezultata. Algoritam za uklapanje koristi konvergencijski kriterij za usporedbu izračunatih konformacija liganada. Ovaj kriterij uključuje donju granicu za izračun promjena vrijednosti scoring funkcije, broj iteracija i druge relevantne parametre. Na taj način osigurava se visoka preciznost i pouzdanost rezultata simulacija.

4. REZULTATI

Kako bi se predvidjela energetska najoptimalnija orijentacija i položaj vezanja enzima LDH-B i inhibitora tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046, koristila se metoda uklapanja. Ova metoda uklapanja je izvedena korištenjem javno dostupnog alata LeDock (17, 18). Rezultati su dobiveni za nekoliko različitih konformacija, od kojih su u okviru ovog istraživanja analizirane i vizualizirane tri najpovoljnije konformacije za svaki inhibitor. U programu VMD prvobitno je vizualiziran položaj vezanja svake konformacije na njihovim afinitetnim mjestima na enzimu, te su uspoređene njihove orijentacije. Nakon toga je provedena temeljita ručna analiza interakcija između aminokiselinskih ostataka enzima i atoma inhibitora, čija je granična udaljenost manja od 3.5 Å.

4.1. Rezultati dobiveni programom LeDock

Tablica 2. prikazuje rezultate energija dobivene za tri najpovoljnije konformacije svakog liganda. Konformacije su označene kao klasteri te su analizirane prilikom vezanja za enzim LDH-B. Najniži ostvareni rezultat energije vezanja odgovara najpovoljnijem položaju vezanja liganda za enzim.

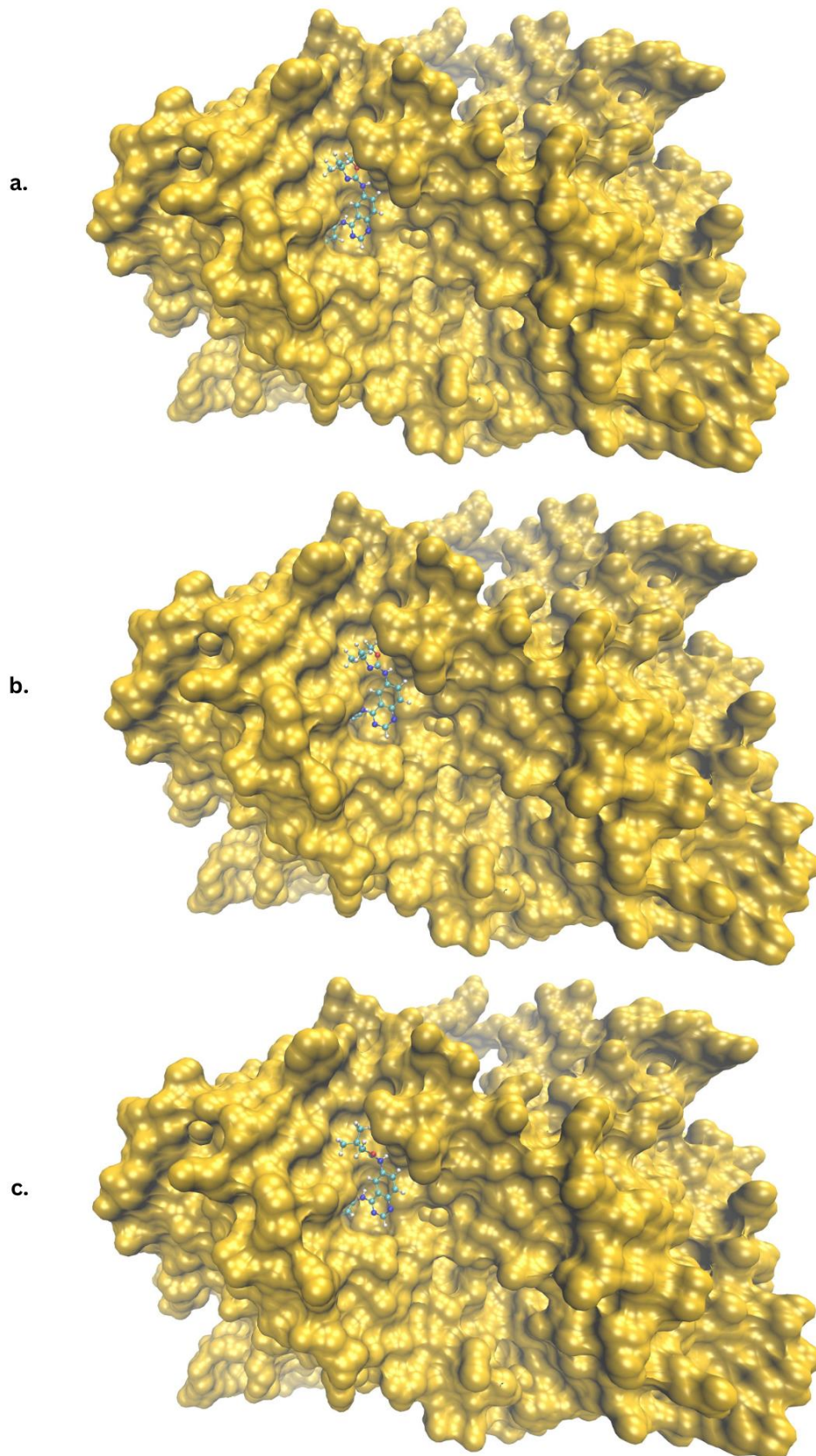
Tablica 2. Prikaz energije pojedinih klastera za svaki ligand.

| Klaster | Energija (kcal/mol) | | |
|---------|---------------------|------------|-----------|
| | Tukatinib | Kapmatinib | AXKO-0046 |
| 1 | -6,54 | -6,25 | -6,3 |
| 2 | -6,48 | -6,04 | -5,9 |
| 3 | -6,47 | -5,82 | -5,8 |

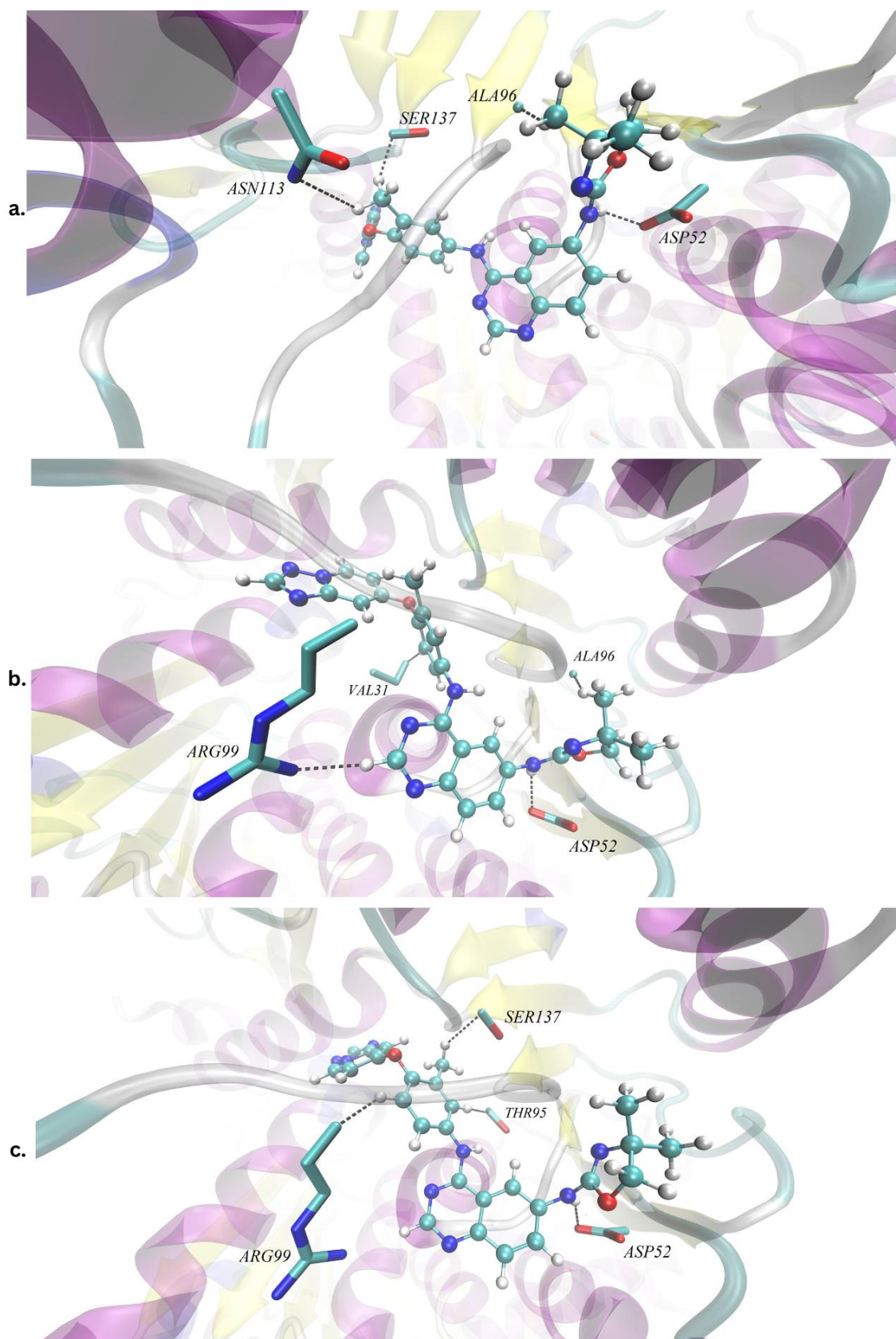
4.2. Rezultati vizualizirani programom VMD

Na slikama 3., 5. i 7. vizualizirani su položaji liganda u sve tri analizirane konformacije u odnosu na alosteričko mjesto enzima na koji su vezani, dok slike 4., 6. i 8. prikazuju specifične interakcije između inhibitora i najbližih aminokiselinskih ostataka enzima. U tablicama 3. – 5.

navedeni su podaci za deset najbližih aminokiselinskih ostataka koji ostvaruju interakciju sa inhibitorom. Duljina veze ovih interakcija je izražena u angstromima, pri čemu je uzeta u obzir granična udaljenost od 3.5 Å. Važno je napomenuti da kraća duljina veze između dviju molekula korelira s većom jačinom njihovog vezanja, što je od ključne važnosti za razumijevanje afiniteta inhibitora prema ciljanim mjestima na enzimu.



Slika 3. Prikaz alosteričkog veznog mjesta enzima LDH-B za inhibitor tukatinib u prvoj (a.), drugoj (b.) i trećoj (c.) energetski najpovoljnijoj konformaciji. Sliku izradila autorica.

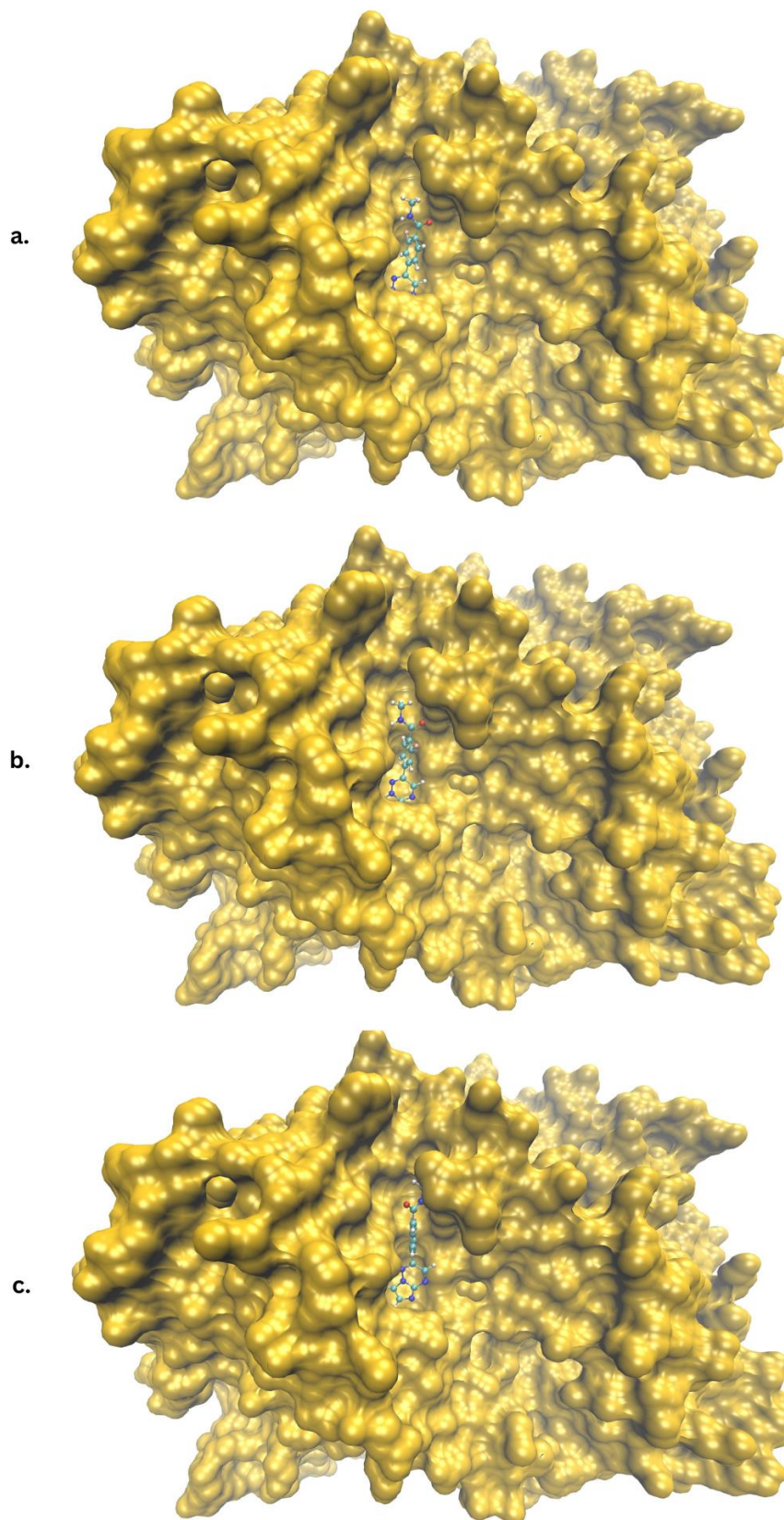


Slika 4. Prikaz najkraćih interakcija između najbližih aminokiselinskih ostataka enzima te inhibitora tukatinib u prvoj (a.), drugoj (b.) i trećoj (c.) energetski najpovoljnijoj konformaciji Sliku izradila autorica.

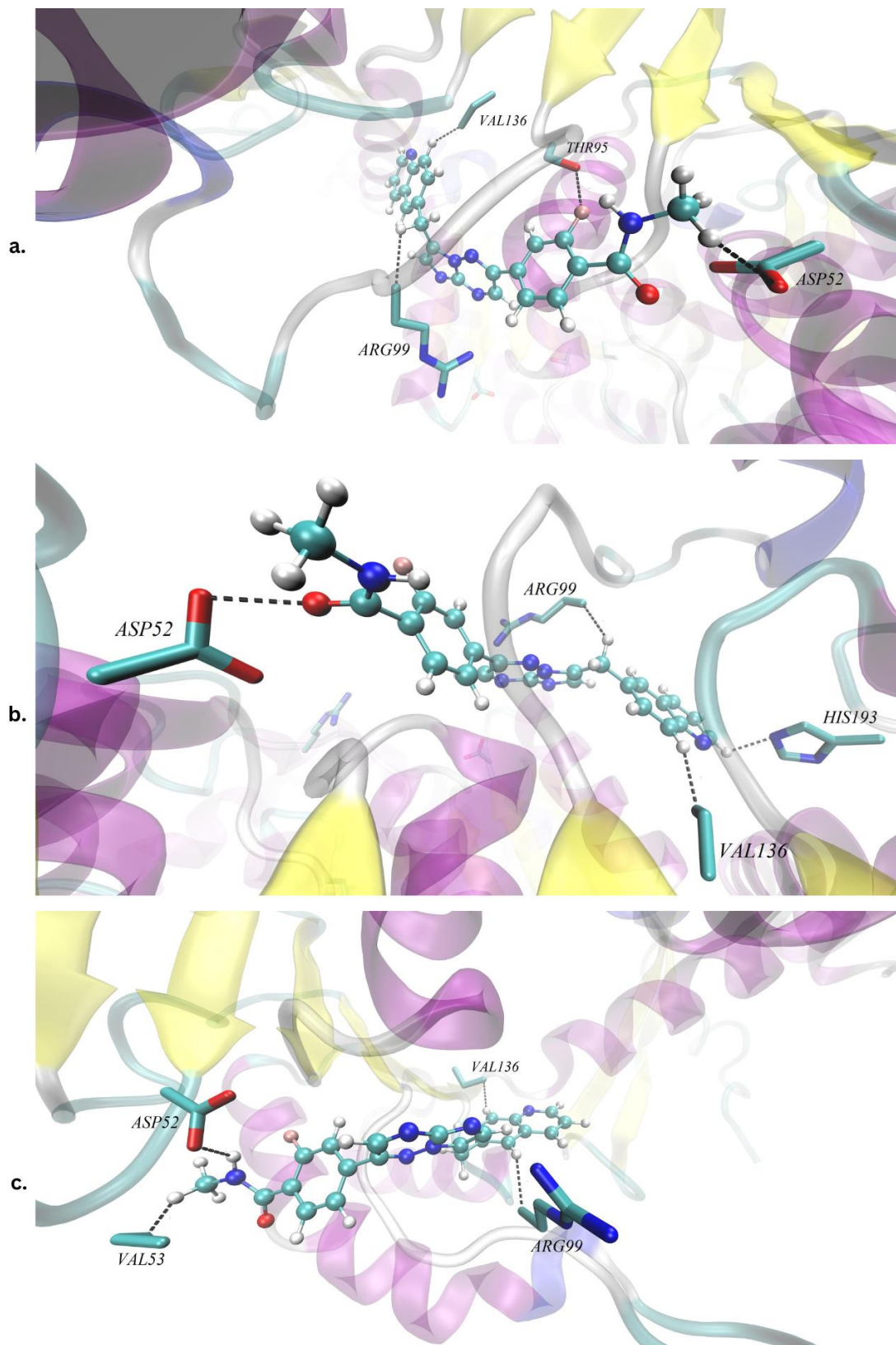
Tablica 3. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora tukatinib

| Klaster 1 | | Klaster 2 | | Klaster 3 | |
|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| Aminokiselinski ostatak | Duljina veze (Å) | Aminokiselinski ostatak | Duljina veze (Å) | Aminokiselinski ostatak | Duljina veze (Å) |
| ALA96:CB | 1,39 | ALA96:CB | 1,72 | ASP52:OD2 | 1,95 |
| ASP52:OD2 | 1,92 | ASP52:OD2 | 2,14 | ARG99:CB | 2,24 |
| SER137:CB | 2,18 | VAL31:CG1 | 2,30 | ASP52:CG | 2,34 |
| ASN113:ND2 | 2,96 | ARG99:NH1 | 2,39 | THR95:CB | 2,54 |
| SER137:OG | 3,05 | VAL31:CB | 2,53 | SER137:CB | 2,54 |
| ASN138:ND2 | 3,12 | VAL53:CG2 | 2,66 | ALA96:CB | 2,55 |
| VAL31:CB | 3,18 | VAL116:CG1 | 2,72 | ARG99:NH1 | 2,6 |
| VAL116:CG1 | 3,21 | ASP52:CG | 2,74 | VAL53:CG2 | 2,7 |
| GLN100:NE2 | 3,30 | ARG99:CB | 3,20 | SER137:OG | 2,83 |
| ASN138:CG | 3,32 | ASN138:CB | 3,26 | VAL116:CG1 | 2,84 |

Tablica 3. prikazuje 10 najbližih aminokiselinskih ostataka koji su ostvarili interakcije s tri energetske najpovoljnije konformacije, odnosno klastera. Slika 3. prikazuje orijentaciju svakog klastera u odnosu na alosteričko mjesto enzima za ligand tukatinib, dok su na slici 4. vidljivi aminokiselinski ostaci koji su ostvarili najkraće duljine vezanja liganda i enzima. Klaster 1 inhibitora tukatinib ostvario je ukupno 10 interakcija manjih od 3.5 Å, klaster 2 ostvario je 11 takvih interakcija, dok je klaster 3 ostvario 12 interakcija. Iz navedene tablice i slika, možemo vidjeti kako su klasteri 1 i 2 ostvarili najkraću interakciju s aminokiselinskim ostatkom alanina na poziciji 96, dok je klaster 3 ostvario najkraću interakciju na poziciji 52 aminokiselinskog ostatka asparaginske kiseline.



Slika 5. Prikaz alosteričkog mjesta enzima LDH-B u koji se vezano inhibitor kapmatinib u prvoj (a.), drugoj (b.) i trećoj (c.) energetski najpovoljnijoj konformaciji. Sliku izradila autorica.

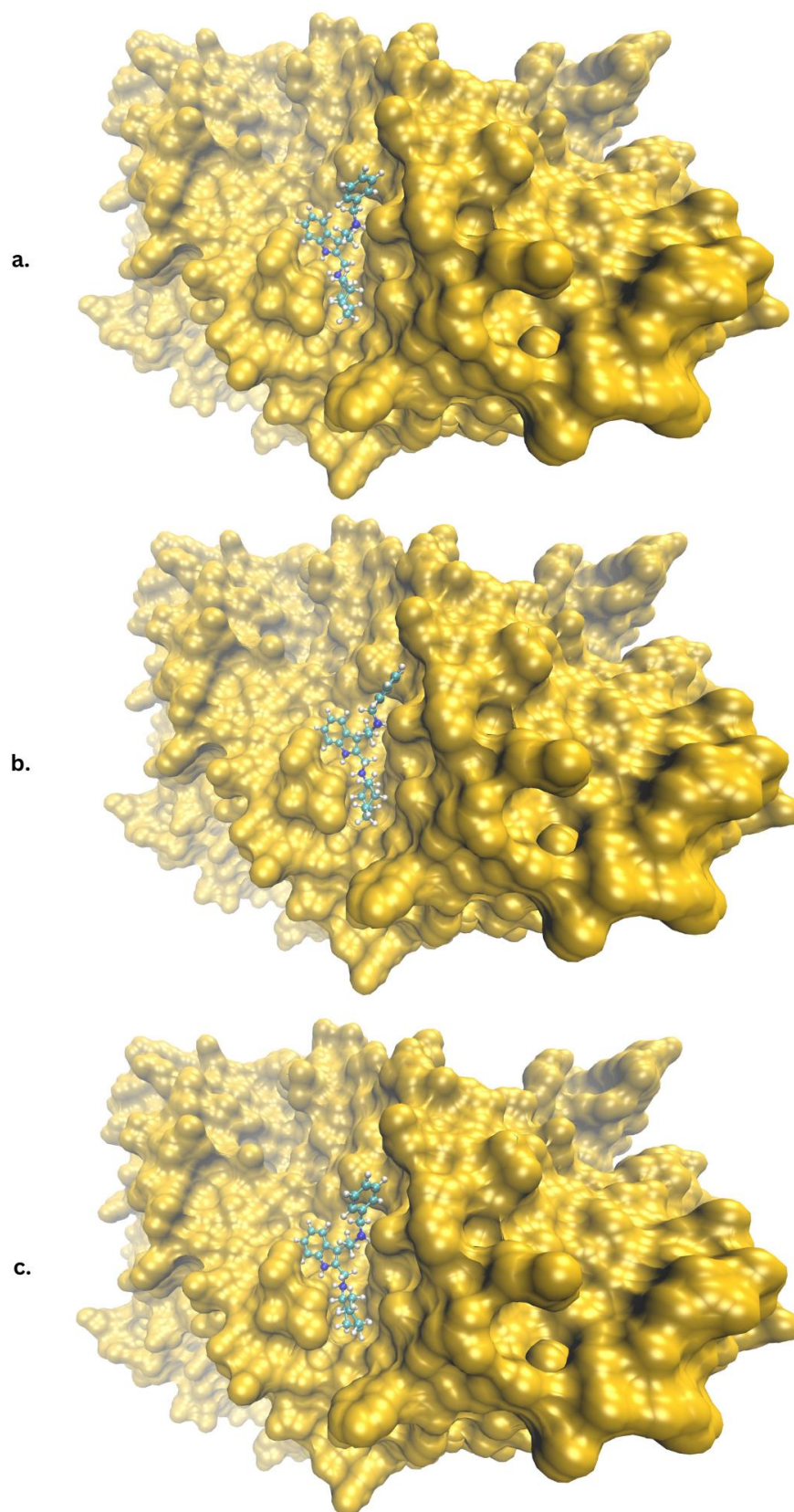


Slika 6. Prikaz najkraćih interakcija između najbližih aminokiselinskih ostataka enzima te inhibitora kapmatinib u prvoj (a.), drugoj (b.) i trećoj (c.) energetski najpovoljnijoj konformaciji. Sliku izradila autorica.

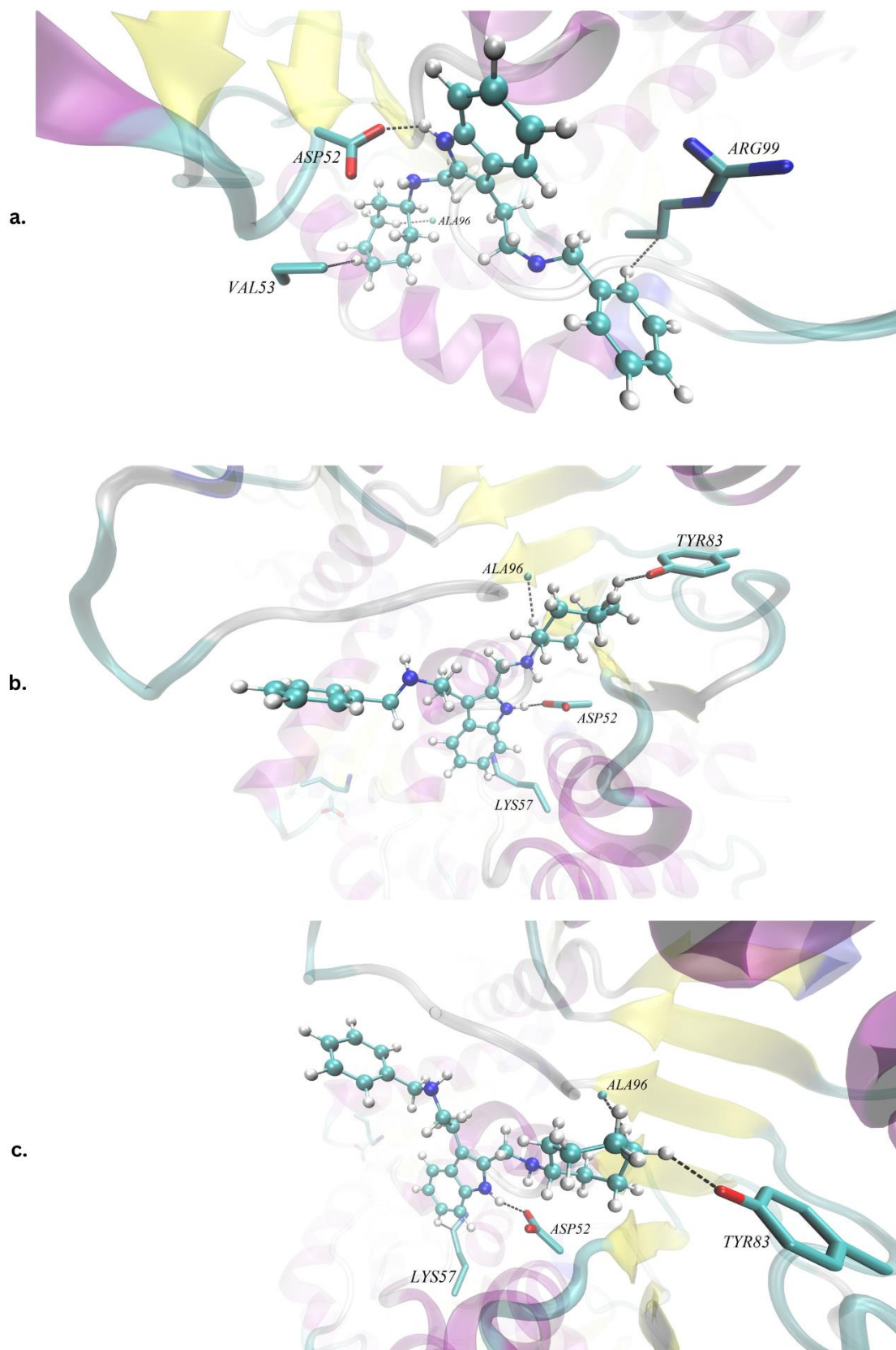
Tablica 4. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora kapmatinib

| Klaster 1 | | Klaster 2 | | Klaster 3 | |
|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| Aminokiselinski ostatak | Duljina veze (Å) | Aminokiselinski ostatak | Duljina veze (Å) | Aminokiselinski ostatak | Duljina veze (Å) |
| VAL136:CG1 | 2,36 | HIS193:NE2 | 2,2 | VAL53:CG1 | 1,92 |
| ASP52:OD1 | 2,63 | ASP52:OD1 | 2,24 | ASP52:OD1 | 1,96 |
| THR95:OG1 | 2,81 | VAL136:CG1 | 2,46 | VAL53:CG2 | 2,12 |
| ARG99:CB | 2,85 | ASP52:OD2 | 2,48 | VAL136:CG1 | 2,69 |
| VAL136:CB | 3,04 | ARG99:CB | 2,59 | ARG99:CB | 2,74 |
| ALA96:CB | 3,09 | ASP52:CG | 2,67 | VAL31:CG2 | 2,99 |
| ASP52:CG | 3,30 | ALA96:CB | 2,88 | ASP52:CB | 3,12 |
| ARG99:NH1 | 3,33 | GLN100:NE2 | 2,89 | ASP52:OD2 | 3,2 |
| ALA96:CB | 3,38 | THR95:OG1 | 3,04 | ASP52:CG | 3,45 |
| GLN30:CG | 3,42 | ALA96:CB | 3,39 | | |

Tablica 4. prikazuje 10 najbližih aminokiselinskih ostataka za klaster 1 i 2 te 9 najbližih aminokiselinskih ostataka za klaster 3 liganda kapmatinib, koji su ostvarili interakcije s enzimom manje od 3.5 Å. Na slici 5. vidljiva je orijentacija svakog klastera u odnosu na alosteričko mjesto enzima za ligand kapmatinib. Slika 6. prikazuje najkraće interakcije vezanja između enzima LDH-B i liganda kapmatinib u tri energetske najpovoljnije konformacije. Klaster 1 inhibitora kapmatinib ostvario je ukupno 10 interakcija manjih od 3.5 Å, klaster 2 ostvario je 12 interakcija ispod određene duljine, a klaster 3 je ostvario 9 takvih interakcija. Navedene slike i tablica brojčano i vizualno prikazuju da je najkraća ostvarena duljina klastera 1 u položaju 136 s aminokiselinskim ostatkom valina, klastera 2 s aminokiselinom histidin u položaju 193 te je najkraća interakcija klastera 3 aminokiselinski ostatak valina u položaju 53.



Slika 7. Prikaz alosteričkog mjesta enzima LDH-B u koji se vezano inhibitor AXKO-0046 u prvoj (a.), drugoj (b.) i trećoj (c.) energetski najpovoljnijoj konformaciji. Sliku izradila autorica.



Slika 8. Prikaz najkraćih interakcija između najbližih aminokiselinskih ostataka enzima te inhibitora AXKO-0046 u prvoj (a.), drugoj (b.) i trećoj (c.) energetski najpovoljnijoj konformaciji. Sliku izradila autorica.

Tablica 5. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora AXKO-0046

| Klaster 1 | | Klaster 2 | | Klaster 3 | |
|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| Aminokiselinski ostatak | Duljina veze (Å) | Aminokiselinski ostatak | Duljina veze (Å) | Aminokiselinski ostatak | Duljina veze (Å) |
| ASP52:OD2 | 1,82 | ASP52:OD2 | 1,81 | ASP52:OD2 | 1,98 |
| ASP52:OD1 | 2,08 | ASP52:OD1 | 2,23 | ASP52:OD1 | 2,04 |
| ALA96:CB | 2,3 | ASP52:CG | 2,36 | LYS57:CE | 2,24 |
| ASP52:CG | 2,42 | LYS57:CE | 2,42 | ASP52:CG | 2,34 |
| ARG99:CG | 2,54 | LYS57:CG | 2,43 | TYR83:OH | 2,41 |
| VAL53:CG2 | 2,55 | ALA96:CB | 2,44 | ALA96:CB | 2,44 |
| TYR83:OH | 2,68 | TYR83:OH | 2,53 | ARG99:CG | 2,49 |
| LYS57:CE | 2,8 | ARG99:CG | 2,65 | VAL116:CG1 | 2,63 |
| ARG99:CB | 2,92 | VAL53:CG1 | 2,71 | VAL53:CG2 | 2,73 |
| VAL26:CG1 | 2,99 | ARG99:CG | 2,71 | ARG99:CB | 2,91 |

Iz tablice 5. možemo vidjeti 10 najbližih aminokiselinskih ostataka koji su ostvarili interakcije s 3 različite energetske konformacije liganda AXKO-0046 po prethodno navedenim kriterijima. Slika 7. prikazuje mjesto vezanja inhibitora s enzimom LDH-B u svakoj od proučavanih konformacija, dok slika 8. prezentira aminokiselinske ostatke koji su ostvarili najkraće interakcije vezanja za ligand. Prvi klaster inhibitora AXKO-0046 ostvario je ukupno 11 interakcija manjih od 3.5 Å, dok je klaster 2 ostvario čak 23 takve interakcije te je klaster 3 ostvario 19 željenih interakcija. Analizom navedenih slika i tablice možemo vidjeti kako je najkraća ostvarena interakcija enzima LDH-B i svih navedenih klastera s aminokiselinskim ostatkom asparaginske kiseline na poziciji 52.

5. RASPRAVA

Predmet istraživanja ovog završnog rada bilo je molekulsko modeliranje inhibicije enzima laktat dehidrogenaze-B korištenjem kemijskih spojeva tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046 kao inhibitora. Njihovim je djelovanjem moguća manipulacija aktivnosti enzima, što bi se moglo koristiti kao potencijalno rješenje u antikancerogenim terapijama. Cilj ovog istraživanja bio je primjenom metoda molekuskog modeliranja ispitati i prikazati inhibiciju enzima laktat dehidrogenaze-B, ispitati energetske najpovoljnije položaje određenih liganda unutar enzima te ispitati vezanje različitih liganda (tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046) s navedenim enzimom. Za metodu molekuskog uklapanja korišten je server LeDock, a dobiveni rezultati su vizualizirani pomoću softvera VMD, gdje je provedena i ručna analiza interakcija između liganda i enzima. Rezultati uklapanja ukazali su na nekompetitivnu inhibiciju navedenim ligandima, što znači da je njihovo mjesto vezanja bilo je različito od aktivnog mjesta enzima, što je u skladu s dosadašnjim eksperimentalnim podacima. Aminokiselinski ostaci koji tvore vezna mjesta za inhibitore navedeni su u tablici 1. Uz rezultate dobivene korištenjem servera LeDock bilo je moguće proučiti najbolje orijentacije inhibitora u odnosu na enzim te njihove energije vezanja, prilikom čega je najniža vrijednost energije vezanja prikazivala najpovoljniji položaj vezanja. Ovi rezultati pružaju potencijalni doprinos razvoju učinkovitijih antikancerogenih terapija kroz ciljanu inhibiciju enzima laktat dehidrogenaze-B.

Istraživanje koje su proveli Vlasiou i suradnici, uz korištenje naprednih metoda promatranja molekuskog uklapanja i molekulske dinamike, donosi uvide u učinkovitost različitih liganda u inhibiciji aktivnosti enzima LDH-B. Prema rezultatima njihovog istraživanja, ligand tukatinib smanjuje aktivnost enzima za približno 43 %, dok ligand kapmatinib smanjuje aktivnost za 31 %, a ligand AXKO-0046 pokazuje najvišu inhibiciju, smanjujući aktivnost enzima za čak 75 %. Nadalje, u istraživanju je dokazano kako su određeni aminokiselinski ostaci ključni za optimalno vezanje inhibitora. Za ligand tukatinib, najpovoljniji aminokiselinski ostaci su Asp52, Val53, Ala96 i Val116. S druge strane, za ligand kapmatinib, ključni aminokiselinski ostaci su Gln30, Asp52, Val53, Thr95, Ala96 i Arg99. Kod liganda AXKO-0046, jedan od najpovoljnijih položaja za vezanje je s aminokiselinskim ostatkom Arg99 (7), što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja.

Primjena navedenih i srodnih računalnih metoda u modernom istraživanju sve se više primjenjuje u procesu otkrivanja lijekova i terapija jer omogućuje predviđanje specifičnih

učinaka pojedinih komponenti, odnosno liganda, na ciljne molekule u organizmu. Na taj bi se način moglo djelovati na precizno reguliranje smanjenja ili povećanja aktivnosti određenih bioloških komponenata, ovisno o željenom terapijskom ishodu. Posebno područje interesa u ovom kontekstu predstavljaju antikancerogene terapije, gdje ove metode mogu značajno doprinijeti razvoju učinkovitijih i ciljanih tretmana protiv karcinoma i metastaziranja njegovih stanica te personaliziranije opcije liječenja.

Mogućnost vezanja liganda na enzim označuje mogućnost manipulacije djelovanja tog enzima, a samim time i kemijske reakcije koju on katalizira. Kod antikancerogenih terapija, razvojem tvari koja bi inhibirala s enzimom LDH-B bilo bi moguće obustaviti proliferaciju i metastaziranje kancerogenih stanica. Na taj način, djelovanje malignih stanica na organizam moglo bi biti ograničeno, minimalizirano ili u potpunosti onemogućeno. Ovaj pristup također bi mogao i povećati osjetljivost stanica raka na druge oblike terapije, kao što su kemoterapija i radioterapija. Precizno pozicioniranje takvih inhibicijskih tvari povećava mogućnost uspješne primjene lijekova u antikancerogenim terapijama te ubrzavanje procesa liječenja, čineći ga efikasnijim nego što bi to inače bio slučaj. Višestruka znanstvena istraživanja ukazuju na važnu ulogu laktata, u čijem stvaranju ili pretvorbi u piruvat sudjeluje enzim LDH, u modulaciji stanične smrti, angiogenezi, suzbijanju imunoloških antikancerogenih odgovora te pojačanoj signalizaciji kalcija. Također, nekoliko studija, uključujući znanstveno istraživanje koje su proveli Khajah i suradnici, već potvrđuju da smanjena aktivnost LDH i niže razine laktata koreliraju sa smanjenom stopom proliferacije stanica raka, posebice raka dojke (16).

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- računalnim metodama uklapanja dobiveni su energijski najpovoljniji položaji inhibitora tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046
- najpovoljniji položaj inhibitora tukatinib je u veznim mjestima koordiniranim aminokiselinskim ostatcima Ala96 i Asp52, inhibitora kapmatinib u veznim mjestima Arg99 i Asp52, a inhibitora AXKO-0046 u veznim mjestima Arg99 i Asp52
- ligand tukatinib ostvario je 10 interakcija manjih od 3.5 Å u prvoj konformaciji, 11 interakcija u drugoj konformaciji te 12 interakcija u trećoj konformaciji, ligand kapmatinib u prvoj konformaciji ostvaruje 10 takvih interakcija, 12 u drugoj konformaciji te 9 u trećoj konformaciji, dok ligand AXKO-0046 ostvaruje najveći broj interakcija određene duljine pa tako u prvoj konformaciji ostvaruje 11 interakcija, u drugoj konformaciji 23, a u trećoj konformaciji 19 interakcija manjih od 3.5 Å

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Metodama molekuskog modeliranja ispitati i prikazati inhibiciju enzima laktat dehidrogenaze, ispitati energetske najpovoljnije položaje određenih liganda u enzimu te ispitati vezanje različitih liganda (tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046) s navedenim enzimom.

Nacrt studije: Istraživanje je napravljeno kao *in silico* studija – izgradnja računalnog modela enzima i inhibitora

Materijali i metode: Podaci o enzimu LDH-B preuzeti su baze PDB, a podaci o inhibitorima tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046 preuzeti su iz baze PubChem. Za predikciju energijski najpovoljnijeg položaja korišten je server LeDock. Sve strukture vizualizirane su korištenjem softvera VMD.

Rezultati: Rezultati dobiveni korištenjem servera LeDock prikazuju energetske najpovoljnije konformacije inhibitora prilikom vezanja za aminokiselinske ostatke enzima. Ti rezultati su vizualizirani softverom VMD gdje je provedena ručna analiza interakcija inhibitora i enzima, mjereći njihovu udaljenost u angstromima.

Zaključak: Računalnim metodama uklapanja dobiveni su energijski najpovoljniji položaji inhibitora tukatinib, kapmatinib i AXKO-0046. Najpovoljniji položaj inhibitora tukatinib je u veznim mjestima Ala96 i Asp52, najpovoljniji položaj inhibitora kapmatinib je u veznim mjestima Arg99 i Asp52, a najpovoljniji položaj inhibitora AXKO-0046 je u veznim mjestima Arg99 i Asp52.

Ključne riječi: antikancerogene terapije, AXKO-0046, kapmatinib, laktat dehidrogenaza, tukatinib

8. SUMMARY

Molecular modeling of the lactate dehydrogenase-B enzyme and its ligands as candidates for anticancer therapies

Objectives: Using molecular modeling methods to examine and show the inhibition of the lactate dehydrogenase enzyme, to examine the most energy - efficient positions of certain ligands in the enzyme, and to examine the binding of different ligands (tucatinib, capmatinib and AXKO-0046) with enzyme.

Study design: The research was done as an in silico study - building a computer model of enzymes and inhibitors.

Materials and methods: Data on the enzyme LDH-B were taken from the PDB database, and data on the inhibitors tucatinib, capmatinib and AXKO-0046 were taken from the PubChem database. The LeDock server is used to predict the most energy - efficient position. All structures were visualized using VMD software.

Results: The results obtained using the LeDock server show the most energy - efficient conformations of the inhibitor when binding to amino acid residues of the enzyme. These results were visualized with the VMD software, where a manual analysis of inhibitor-enzyme interactions was performed, measuring their distance in angstroms.

Conclusion: The most energy - efficient positions of the inhibitors tucatinib, capmatinib and AXKO-0046 were obtained by molecular docking methods. The most energy - efficient position of the inhibitor tucatinib is in the binding sites Ala96 and Asp52, the most energy - efficient position of the inhibitor capmatinib is in the binding sites Arg99 and Asp52 and the most energy - efficient position of the inhibitor AXKO-0046 is in the binding sites Arg99 and Asp52.

Keywords: anticancer therapies, AXKO-0046, capmatinib, lactate dehydrogenase, tucatinib

9. LITERATURA

1. Kennelly PJ, Rodwell VW. Enzimi: mehanizam djelovanja. U: Lovrić J, Sertić J (ur.). Harperova ilustrirana biokemija. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 51-61.
2. Štraus B, Petrik J. Enzimi. U: Čvorišćec D, Čepelak I (ur.). Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 245-312.
3. Singh SP, Ashok P., Reeta RS., Larroche C., Li Z. Biomass, biofuels, biochemicals: advances in enzyme catalysis and technologies. Amsterdam: Elsevier; 2020.
4. Kennelly PJ, Rodwell VW. Enzimi: kinetika. U: Lovrić J, Sertić J (ur.). Harperova ilustrirana biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 62-74.
5. Kennelly PJ, Rodwell VW. Enzimi: regulacija enzimske aktivnosti. U: Lovrić J, Sertić J (ur.). Harperova ilustrirana biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 75-83.
6. Pathak K, Gogoi U, Das A, Saikia R. Enzyme Inhibition. New Delhi, India: AkiNik Publications; 2020.
7. Vlasiou M., Nicolaidou V., Papanephytous C. Targeting Lactate Dehydrogenase-B as a Strategy to Fight Cancer: Identification of Potential Inhibitors by In Silico Analysis and In Vitro Screening. Nicosia, Cipar: Pharmaceutics; 2023., 15, 2411.
8. Khan AA, Rahmani AH, Allemailem K, Alhumaydhi FA, Gowder S. The Biochemical and Clinical Perspectives of Lactate Dehydrogenase: An Enzyme of Active Metabolism. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets. 2019.; 20. 10.2174/1871530320666191230141110.
9. Fujibuchi T., Imai H., Kidani T., Morino T., Miura H. Serum lactate dehydrogenase levels predict the prognosis of patients with soft tissue sarcoma. Molecular and Clinical Oncology. 2022.
10. Farhana A, Lappin SL. Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. [Internet]. PubMed. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. [pristupljeno 11.05.2024.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557536/>
11. Feng Y, Xiong Y, Qiao T, Li X, Jia L, Han Y. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. Cancer Med; 2018. 6;7(12):6124-6136.

12. Shibata S., Sogabe S., Miwa M., Fujimoto T., Takakura N. i sur. Identification of the first highly selective inhibitor of human lactate dehydrogenase B. *Sci Rep* 11, 21353; 2021.
13. Brkić H. Proučavanje o željezu ovisnih dioksigenaza računalnim metodama. Doktorska disertacija. Prirodoslovno matematički Fakultet, Fizički odsjek, Zagreb. 2014.
14. Kušević K. Računalna metoda za određivanje proteinskih interakcija. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Fakultet elektrotehnike i računarstva. 2013.
15. Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology*. 2007; 152, 9–20; doi:10.1038/sj.bjp.0707305.
16. Khajah M. A., Khushaish S., Luqmani Y. A. The effect of lactate dehydrogenase inhibitors on proliferation, motility and invasion of breast cancer cells in vitro highlights a new role for lactate. *Molecular Medicine Reports*. 2023; 22;29(1).
17. Liu N., Xu Z. Using LeDock as a docking tool for computational drug design. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019. 23;218:012143.
18. LeDock, version 1.0 <https://apolo-docs.readthedocs.io/en/latest/software/applications/leDock/index.html> [pristupljeno 19.03.2024.].
19. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminf.* 2011; 3, 33. doi:10.1186/1758-2946-3-33.
20. The Open Babel Package, version 2.4.1 <http://openbabel.org> [pristupljeno 19.03.2024.].
21. Humphrey, William; Dalke, Andrew; Schulten, Klaus. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1996;14 (1): 33–38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5. PMID 8744570.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Tamara Sajda

Datum i mjesto rođenja:

12. studenog 2002., Našice

Adresa:

Ulica Petra Preradovića 38, 31500 Našice

Broj mobitela:

091/977-9922

Obrazovanje:

2017. – 2021. Srednja škola Isidora Kršnjavoga Našice, opća gimnazija

2021. – 2024. Sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku