Molekulsko uklapanje potencijalnih inhibitora na protein ABCG2

Radman, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:191282

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Katarina Radman

Molekulsko uklapanje potencijalnih inhibitora na protein ABCG2

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Branimira Bertoše. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvale

Zahvaljujem mom mentoru prof. dr. sc. Branimiru Bertoši na pomoći te brojnim savjetima i sugestijama kojima me vodio kroz izradu ovog diplomskog rada.

Veliko hvala upućujem i svim svojim prijateljima koji su uz mene još od srednjoškolskih dana te svim kolegama koji su mi studiranje učinili ljepšim iskustvom.

Naposlijetku, najveću zahvalu upućujem svojoj braći na velikoj podršci i ljubavi. Hvala vam što ste uvijek tu za mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Molekulsko uklapanje potencijalnih inhibitora na protein ABCG2

KATARINA RADMAN
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Protein ABCG2 je transmembranski protein koji djeluje kao pumpa za izbacivanje raznih endogenih supstrata. Prekomjerna ekspresija proteina ABCG2 u stanicama karcinoma jedan je od glavnih uzroka otpornosti stanica karcinoma na mnoge lijekove. Recentna istraživanja pokazala su potencijal adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera (DAC) kao inhibitora proteina ABCG2. U sklopu ovog diplomskog rada računalno je istraženo vezanje različitih DAC na protein ABCG2 te je njihovo vezanje uspoređeno s vezanjem literaturno poznatih inhibitora i supstrata proteina ABCG2. Vezanje DAC te poznatih inhibitora i supstrata proteina ABCG2 provedeno je metodom molekulskog uklapanja. Napravljena su dva računa molekulskog uklapanja za svaki ligand. Prvi račun obuhvaćao je cijeli protein ABCG2, dok je drugi račun obuhvaćao samo mjesto vezanja supstrata i inhibitora (šupljna 1). Temeljem provedenog računalnog istraživanja vezanja liganada na protein ABCG2 utvrđeno je da DAC-amidi imaju povoljniji afinitet vezanja za šupljinu 1 od poznatih inhibitora proteina ABCG2. Spojevi DAC-amidi se za razliku od poznatih inhibitora i supstrata proteina ABCG2 ne vežu duboko unutar šupljine 1 te ne ostvaruju značajnije interakcije s aminokiselinom koja je literaturno apostrofirana kao važna za vezanje (Phe 439). Budući da se DAC-amidi također vežu za mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD predložena su dva potencijalna načina inhibicije proteina ABCG2.

(47 stranica, 22 slike, 3 tablice, 35 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, PMF – Biološki odsjek, Marulićev trg 20, Zagreb

Ključne riječi: protein ABCG2, krunasti eteri, inhibitori, molekulsko uklapanje

Mentor: prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

prof. dr. sc. Branimir Bertoša

izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 24. lipnja 2021. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

Docking Study of Interactions Between the ABCG2 Protein and Potential Inhibitors

KATARINA RADMAN

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

ABCG2 is a transmembrane protein pump that protects tissue from entrance of unwanted substances. However, ABCG2 affects the pharmacokinetics of commonly used drugs, and its expression correlates with poor treatment outcome of certain cancers. Recent studies have revealed that adamantyl-substituted diaza- (DAC) crown compounds show inhibitory potential towards ABCG2. The aim of this graduate thesis was to study the binding interactions between DAC crown coumpounds and ABCG2. To evaluate the binding potential of DAC crown compounds, a study of binding interactions between known ABCG2 inhibitors and ABCG2 has been made in parallel. The binding interactions were investigated using two molecular docking simulations. In the first simulation ligands were docked onto the whole ABCG2 protein whilst in the second simulation ligands were docked into the substrate binding site (Cavity 1). Results obtained in the scope of this thesis suggest that DAC-amids have lower binding energy than known inhibitors bound in Cavity 1 and that they also bind to the NBD-TMD interface. Binding of DAC-amids in Cavity 1 is shallower and they do not interact with Phe 439, which is literary known to be important for substrate binding. For the reasons stated, two potential ways of ABCG2 inhibition by DAC-amids have been proposed.

(47 pages, 22 figures, 3 tables, 35 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central Biological Library, Faculty of Science – Department od Biology, Marulićev trg 20, Zagreb

Keywords: ABCG2, crown ethers, inhibitors, molecular docking

Supervisor: Dr. sc. Branimir Bertoša, Professor

Reviewers: Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, Associate Professor

Dr. sc. Branimir Bertoša, Professor

Dr. sc. Martina Šeruga Musić, Associate Professor

Thesis accepted: 24th June 2021

Sadržaj:

1. Uvod 1

1.1. Protein ABCG2 1

1.1.1. Struktura proteina ABCG2 1

1.1.2. Supstrati i inhibitori proteina ABCG2 4

1.2. Krunasti eteri 6

1.3. Računalne metode u biofizici i biokemiji 7

1.3.1. Polje sila i optimizacija geometrije molekula 7

1.3.2. Molekulsko uklapanje 9

1.4. Cilj istraživanja 10

2. Materijali i metode 11

2.1. Priprema strukture liganada 11

2.2. Priprema strukture proteina ABCG2 11

2.3. Molekulsko uklapanje 13

2.4. Vizualizacija rezultata molekulskog uklapanja 14

3. Rezultati 14

3.1. Mjesta vezanja liganada unutar proteina ABCG2 14

3.1.1. Mjesta vezanja liganada u modelima proteina ABCG2 koji se nalaze u konformaciji otvorenoj prema unutrašnjosti stanice 15

3.1.2. Mjesta vezanja liganada u modelu proteina ABCG2 koji se nalazi u konformaciji otvorenoj prema izvanstaničnom prostoru 17

3.2. Energije vezanja liganada na protein ABCG2 19

3.3. Energije vezanja liganada u šupljini 1 proteina ABCG2 20

3.3. Vezanje poznatih inhibitora FTC, Ko143, MZ29 i STI te supstrata MIX u šupljinu 1 proteina ABCG2 22

3.4. Vezanje adamantil supstituiranih diaza-krunastih etera na protein ABCG2 28

3.4.1. Stvaranje intramolekulskih vodikovih veza prilikom vezanja adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera za protein ABCG2 28

3.4.2. Vezanje adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera na mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD 30

3.4.3. Vezanje adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera u šupljinu 1 proteina ABCG2 33

4. Rasprava 36
4.1. Mjesta vezanja liganada unutar proteina ABCG2 36
4.2. Energije vezanja liganada na protein ABCG2 37
4.3. Vezanje poznatih inhbiotra FTC, Ko143, MZ29 i STI te supstrata MIX u šupljinu 1 proteina ABCG2 37
4.4. Stvaranje intramolekulskih vodikovih veza prilikom vezanja admantil-supstituiranih diaza-krunastih etera za protein ABCG2 39
4.5. Vezanje adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera na protein ABCG2 39
4.6. Prijedlog strukturnih modifikacija s ciljem dizajna novih spojeva poboljšane aktivnosti 40
5. Zaključak 42
6. Literatura 43
7. Životopis 47

Popis kratica:

DAC – diaza-krunasti eter

ABCG2 – član 2 ATP-vezujuće kazetne super-obitelji G (eng. *ATP-binding cassette super-family G member 2*)

FTC – fumitremorgin C

MIX – mitoksantron

NBD – domena vezanja nukleotida (eng. *nucleotide binding domain*)

STI – imatinib

TMD – transmembranska domena (eng, *transmembrane domain*)

TMH – transmembranska zavojnica (eng. *transmembrane helix*)

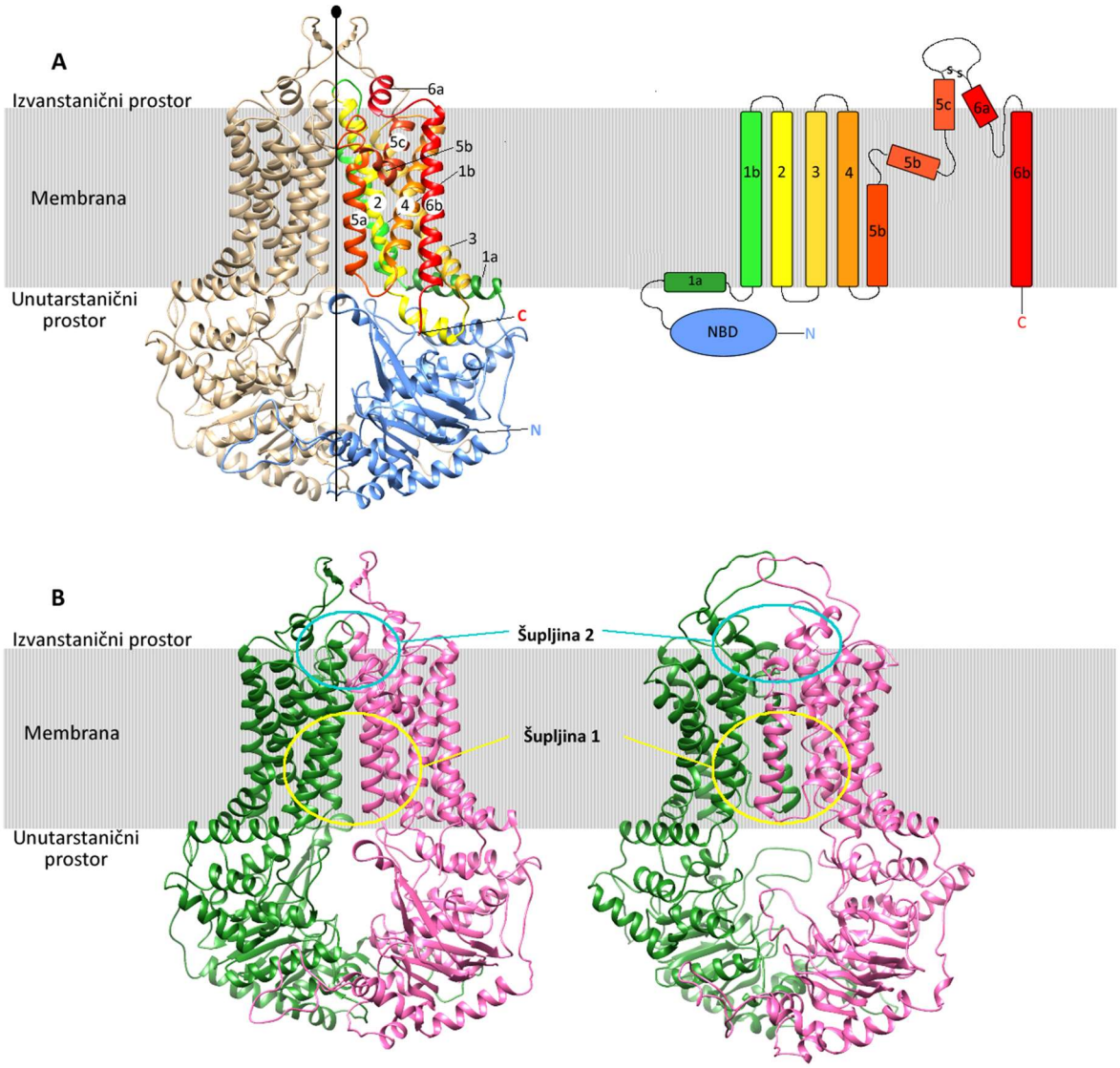
1. Uvod

1.1. Protein ABCG2

Protein ABCG2 je transportni protein koji pripada obitelji ATP-vezujućih kazetnih proteina (eng. *ATP-binding cassette transporters*; ABC). Glavna fiziološka uloga proteina ABCG2 je detoksikacija stanica jetre i bubrega te tkivnih barijera kao što su barijere epitela dojke, placentalne barijere i krvno moždane barijere (Fetsch i sur. 2006). Budući da protein ABCG2 i njemu srodni proteini, ABCB1 (P-glikoprotein, P-gp) i ABCC1 (eng. *Multidrug resistance-associated protein 1,* MRP1), mogu transportirati širok spektar endogenih supstrata van stanice smatraju se jednim od glavnih uzročnika otpornosti na mnoge lijekove (eng. *Multidrug resistance*, MDR). Prekomjerna ekspresija ovih transportera u stanicama karcinoma predstavlja prepreku za uspješno liječenje karcinoma (Robey i sur. 2018). Protein ABCG2 također ima bitnu ulogu u transportu mokraćne kiseline te je disfunkcija ovog proteina povezana s nekolicinom bolesti koje se javljaju zbog povišene razine urata u krvi (povišen tlak, giht, bolest bubrega) (Ishikawa i sur. 2013).

1.1.1. Struktura proteina ABCG2

Monomer proteina ABCG2 sastoji se polipeptidnog lanca koji povezuje jednu transmembransku domenu (eng. *transmembrane domain*; TMD) sa jednom domenom vezanja nukleotida (eng. *nucleotide binding domain*; NBD). Ostali članovi obitelji proteina ABC su monomeri koji sadrže po dvije domene NBD i TMD. Za stvaranje funkcionalnog proteina ABCG2 potrebno je doći do dimerizacije dvaju monomera (slika 1A) (Özvegy i sur. 2001). Domena TMD sastoji se od ukupno 12 transmembranskih α-zavojnica (eng. *transmembrane helix*; TMH) (slika 1A) (Taylor i sur. 2017). Na površini domene TMD nalaze se hidrofobne i nenabijene aminokiseline koje omogućavaju ugradnju domene TMD unutar stanične membrane (Khunweeraphong i sur. 2017). U unutrašnjosti domene TMD nalazi se mjesto vezanja supstrata kojeg čine zavojnice TMH2 i TMH5a' te TMH2' i TMH5a koje se nalaze jedna nasuprot druge (slika 1) (Manolaridis i sur. 2018; Taylor i sur. 2017). Za razliku od domene TMD koju grade hidrofobne aminokiseline, domena NBD građena je od polarnih i nabijenih aminokiselina. Struktura domene NBD sadrži motive koji su očuvani kod većine transportera iz obitelji proteina ABC. Vezujuće mjesto za ATP domene NBD čine A-petlja, motiv Walker A (P-petlja), Q-petlja, motiv Walker B, histidinski prekidač (eng. *histidine switch*; H-petlja), D-petlja i C-signatura motiv (Eckenstaler i Benndorf 2020).

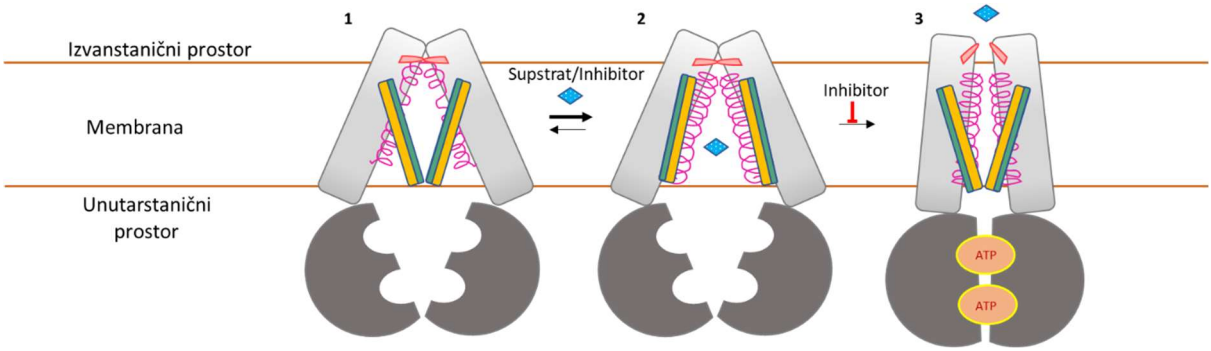


Slika 1. Struktura proteina ABCG2. **A**) Lijevo: Struktura dimera proteina ABCG2 (PDB kod: 6HIJ) prikazana vrpcama s različito obojanim transmembranskim α-zavojnicama i domenom vezanja nukelotida. Središnja os dimera označena je crnom linijom. Desno: Topologija proteina ABCG2 obojana u skladu s prikazom na lijevoj strani. **B**) Lijevo: Struktura proteina ABCG2 u konformaciji okrenutoj prema unutrašnjosti stanice (PDB kod: 6HIJ). Desno: Struktura proteina ABCG2 u konformaciji okrenutoj prema izvanstaničnom prostoru (PDB kod: 6VXF). Monomeri A i B označeni su različitim bojama (ružičasta i zelena). Mjesto vezanja supstrata, odnosno šupljina 1, označeno je žutom elipsom. Šupljina 2 označena je plavom elipsom.

Istraživanja 3D strukture proteina ABCG2 u kompleksu s raznim ligandima pokazala su da se protein ABCG2 može nalaziti u tri konformacije: konformacija otvorena prema unutrašnjosti stanice (eng. *inward-facing*) (Taylor i sur. 2017), konformacija otvorena prema izvanstaničnom prostoru (eng. *outward-facing*) (Manolaridis i sur. 2018) te apo-zatvorena konformacija (Orlando i Liao 2020). Na temelju ovih saznanja predložen je mehanizam kojim

protein ABCG2 veže i transportira supstrate preko stanične membrane (slika 2) (Orlando i Liao 2020).

Protein ABCG2 zauzima konformaciju otvorenu prema unutrašnjosti stanice kada se za njega veže ligand (supstrat ili inhibitor) (Jackson i sur. 2018; Taylor i sur. 2017). U ovoj konformaciji domene NBD su odvojene, a domena TMD formira dvije šupljine (eng. *cavity*) (slika 1B). Šupljina 1 je veća i nalazi se na ulazu u membranu te služi kao domena vezanja supstrata. Unutrašnjost šupljine 1 čine hidrofobni bočni ogranci zavojnica TMH2, TMH2', TMH5a te TMH5a'. Na dnu šupljine 1 nalaze se dva leucina Leu 554 i Leu 554' koji služe kao poklopac koji odvaja šupljinu 1 od šupljine 2. Šupljina 2 nalazi se u vanjskom sloju membrane, manje je hidrofobna od šupljine 1 te pokazuje znatno manji afinitet za vezanje supstrata. U slučaju da je za protein ABCG2 bio vezan supstrat, domene NBD vežu ATP što dovodi do njihove dimerizacije te konformacijske promjene cijelog proteina u konformaciju okrenutoj prema izvanstaničnom prostoru. U konformaciji otvorenoj prema izvanstaničnom prostoru transmembranske zavojnice stvaraju čvrsto zbijen snop zavojnica u blizini citosola. Pozicija zavojnice TMH5a i TMH5a' se pomiče bliže zavojnici TMH1b odnosno TMH1b' što dovodi do zatvaranja šupljine 1 te otvaranja leucinskog poklopca i šupljine 2 (Manolaridis i sur. 2018). Nakon hidrolize ATP-a te otpuštanja supstrata u izvanstanični prostor, protein ABCG2 se nalazi u apo-zatvorenoj konformaciji. U apo-zatvorenoj konformaciji domene NBD su odvojene, a transmembranske zavojnice imaju drugačiji strukturni raspored od konformacije otvorene prema unutrašnjosti stanice. Zavojnice TMH5a i TMH5a' su zaokrenute za 180° te pomaknute bočno prema zavojnicama TMH1a/b i TMH2 nasuprotnog monomera što rezultira zatvaranjem šupljine 1. Nadalje, u apo-zatvorenoj konformaciji zavojnica TMH2 se u jednom dijelu strukture odmota zbog čega se bočni ogranci aminokiselina Phe 439 i Asn 436 orijentiraju u drugom smjeru od orijentacije koju imaju kada se protein ABCG2 nalazi u konformaciji okrenutoj prema unutrašnjosti stanice (Orlando i Liao 2020). Pravilna orijentacija aminokiselina Phe 439 i Asn 436 ima bitnu ulogu u prepoznavanju i vezanju liganada (Manolaridis i sur. 2018).



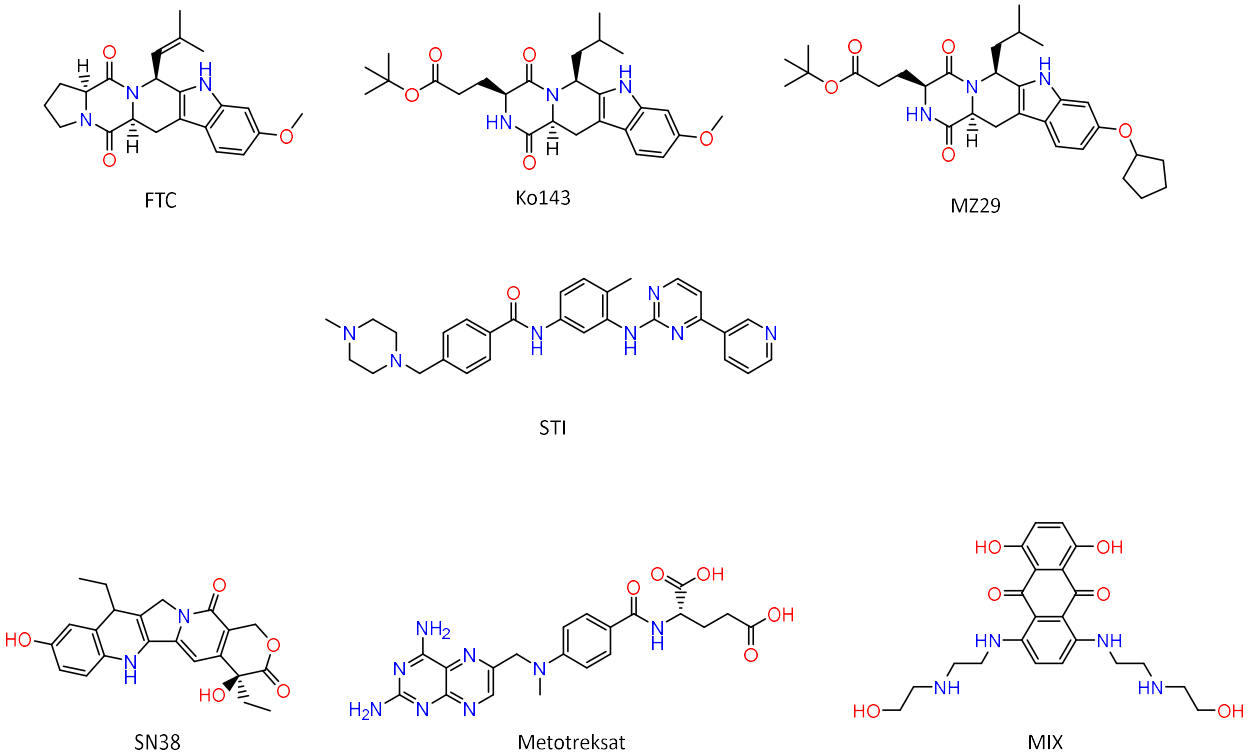
Slika 2. Model vezanja i izbacivanja lijekova (supstrata) putem proteina ABCG2. U odsutnosti liganda protein ABCG2 se nalazi u apo-zatvorenoj konformaciji (1). U ovoj konformaciji domene NBD su odvojene, zavojnice TMH5a i TMH5a' (žuto-plavi štapić) pomaknute su prema središnjoj osi dimera, a zavojnica TMH2 (označena ružičasto) je djelomično odmotana. Vezanje liganda mijenja konformaciju proteina ABCG2 u konformaciju okrenutu prema unutrašnjosti stanice (2). U ovoj konformaciji zavojnica TMH2 u potpunosti poprima spiralni karakter, zavojnice TMH5a i TMH5a' se rotiraju te pomiču bočno od središnje osi dimera. Naknadno vezanje molekula ATP u domenu NBD uzrokuje pomicanje nasuprotnih transmembranskih zavojnica jedne prema drugoj te izbacivanje supstrata kroz leucinski poklopac (označeno crveno) u izvanstanični prostor (3). Hidroliza ATP vraća transporter u prvobitno stanje. Prilagođeno iz Orlando i Liao, 2020.

1.1.2. Supstrati i inhibitori proteina ABCG2

Protein ABCG2 veže velik broj supstrata, ali pokazuje veći afinitet za vezanje plosnatih, policikličkih i amfipatskih spojeva (Wright i sur. 2018). Neki od uobičajenih fizioloških supstrata proteina ABCG2 su glukuronidni i sulfatni konjugati steroida i ksenobiotika. Osim uobičajenih fizioloških supstrata, protein ABCG2 veže razne kemoterapeutike kao što su inhibiotori topoizomeraze (mitoksantron (**MIX**), etoposid, topotekan i SN38), antraciklini (doksorubicin i daunorubicin) te antimetaboliti (metotreksat i 5-fluorouracil). Transport ovih spojeva putem proteina ABCG2 stvara ograničavajući faktor za njihovo zadržavanje u stanicama raka te za uspješnu kemoterapiju (Mo i Zhang 2012).

Znatan broj spojeva pokazao se kao potencijalni inhibitor proteina ABCG2, no njihova uporaba u kemoterapiji nije bila uspješna (Mo i Zhang 2012). Prvi otkriveni selektivni inhibitor proteina ABCG2 je fumitremorgin C (**FTC**), mikotoksin iz vrste *Aspergillus fumigatus* (Fresenius, 1863) (Rabindran i sur. 1998). Budući da je FTC štetan za ljude, u potrazi za novim inhibitorom proteina ABCG2 sintetizirani su tetraciklički analozi **FTC**-a, među kojima se istaknuo spoj **Ko143** i njegov derivat **MZ29** (slika 3). Spojevi **Ko143** i **MZ29** pokazuju veću sposobnost inhibicije proteina ABCG2 te imaju manje toksičan učinak od **FTC**-a (Jackson i sur. 2018). Imatinib (**STI**) je spoj koji se koristi u kemoterapiji kao inhibitor tirozinskih kinaza. Nedavno istraživanje pokazalo je da **STI** također inhibira protein ABCG2 (Orlando i Liao 2020) (slika 3).

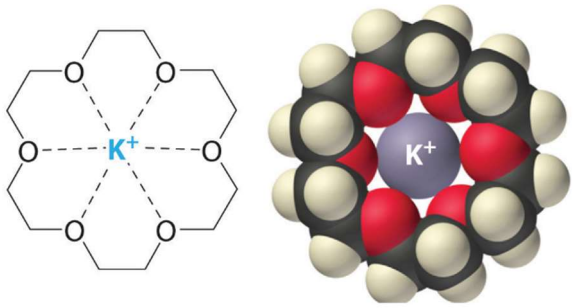
Supstrati i inhibitori proteina ABCG2 vežu se za isto mjesto u šupljini 1 te ostvaruju identične interakcije s aminokiselinama u domeni TMD, ali njihovo vezanje ima potpuno drugačiji učinak na konformaciju i katalitičku aktivnost proteina ABCG2. Vezanje supstrata dovodi do vezanja ATP-a i dimerizacije domene NBD koja zatim postaje katalitički aktivna. Katalitički aktivna domena NBD hidrolizira ATP prilikom čega se oslobađa energija koja potiče promjenu konformacije proteina te prijenosa supstrata u izvanstanični prostor. Vezanje inhibitora, za razliku od vezanja supstrata, blokira dimerizaciju domene NBD zbog čega protein ABCG2 ne može postati katalitički aktivan te ne može promijeniti konformaciju. Budući da je struktura supstrata i inhibitora proteina ABCG2 raznolika (slika 3), potrebno je napraviti daljnje studije kako bi se razotkrile nejasnoće zašto su neki spojevi ponašaju kao inhibitori, a drugi kao supstrati koje protein ABCG2 može transportirati (Orlando i Liao 2020; Toyoda i sur. 2019; Wright i sur. 2018).



Slika 3. Dvodimenzionalni prikaz struktura inhibitora i supstrata proteina ABCG2. Inhibitori: **FTC**, **Ko143**, **MZ29** i **STI**. Supstrati: **SN38**, metotreksat i **MIX**

1.2. Krunasti eteri

Krunasti eteri ili krune su skupina spojeva s neuobičajeno jakom sposobnošću nekovalentnog vezanja kationa. Ime su dobili po svom molekulskom obliku te sposobnosti da „okrunjuju“ metalni kation prilikom kompleksiranja (slika 4) (Pedersen 1967). Osim metalnih kationa, krunasti eteri imaju sposobnost vezanja različitih aniona i neutralnih molekula zbog čega imaju široku primjenu u kemiji i biologiji. Klasični krunasti eteri su makrociklički polieteri koji sadrže između 3 i 20-ak atoma kisika međusobno odvojenih s jednim ili više atoma ugljika. Razne modifikacije krunastih etera, kao što je promjena veličine prstena, vrste supstituenta te tipa atoma donora, poboljšale su njihovu sposobnost kompleksiranja različitih kationa, aniona i neutralnih molekula (Gokel i sur. 2004).



Slika 4. Kompleks 18-kruna-6 i kationa kalija prikazan strukturnom formulom (lijevo) i kalotnim prikazom (desno). Preuzeto i prilagođeno sa: https://chem.libretexts.org/@go/page/19908 (pristupljeno: 5.5.2021.)

Zbog svoje strukture, krunasti eteri mogu transportirati ione preko membrane te djeluju na sličan način kao prirodni ionofori kao što su gramicidin, valinomicin, nonaktin i drugi. Prirodni ionofori mijenjaju protok iona van ili unutar stanice te time narušavaju ionski gradijent stanice što na kraju rezultira osmotskim i fiziološkim stresom. Budući da su mnogi mikroorganizmi veoma osjetljivi na promjenu ionskog gradijenta stanice, krunasti eteri pokazali su se kao izvrsni antibiotici i antiparazitici. Određeni derivati krunastih etera također djeluju citotoksično i na stanice sisavaca, uključujući tumorske stanice (Gokel i sur. 2004; Guberović i sur. 2018; Kralj i sur. 2008).

1.3. Računalne metode u biofizici i biokemiji

Uporaba računalnih metoda neizostavan je korak u svim biokemijskim i biofizičkim istraživanjima današnjice. Kontinuirani rast računalnih resursa omogućava analizu, usporedbu i opis sve složenijih skupova podataka dobivenih iz eksperimenata provedenih na biomolekularnim sustavima. Računalne metode od velike su pomoći pri interpretaciji rezultata eksperimenata, planiranju novih eksperimenata te u razumijevanju bioloških procesa na molekularnoj razini (proučavanje konformacijskih ili kemijskih promjena) (Van Gunsteren i sur. 2006).

S obzirom na izračun potencijalne energije kemijskih sustava, računalne metode možemo podijeliti na kvantno-mehaničke i empirijske metode. Kvantno-mehaničke metode ukupnu potencijalnu energiju sustava računaju rješavanjem Schrödingerove jednadžbe gdje se elektroni eksplicitno uzimaju u obzir. Empirijske metode implicitno uračunavaju elektrone preko energetskog doprinosa koji nastaje zbog elektronske strukture atoma i molekula. Empirijske metode koriste zakone klasične mehanike i temeljene su na polju sila (Cramer 2004).

1.3.1. Polje sila i optimizacija geometrije molekula

Polje sila (eng. *force field*) definirano je skupom parametara i funkcionalom koji korištenjem tih parametara omogućava računanje potencijalne (steričke) energije molekule na temelju njene trenutne konformacije. Formulom (1) prikazan je opći zapis funkcionala energetskih doprinosa potencijalnoj energiji sustava (Jensen 2017a).

$$E_{pot} = E_{istezanje} + E_{savijanje} + E_{torzija} + E_{oop} + E_{elektrostatske} + E_{vdw} + \sum E_{cross} \quad (1)$$

Svaki doprinos u formuli (1), osim posljednjeg, ovisi o samo jednoj vrsti interne koordinate te ima vlastitu funkciju po kojoj se računa. Prvi član funkcionala polja sila (1) predstavlja potencijalnu energiju koja se javlja u molekuli kao posljedica odstupanja veze od ravnotežnih vrijednosti, odnosno odstupanje od duljine veze koja je u danom polju sila definirana kao optimalna. Drugi i treći član u formuli (1) predstavljaju potencijalnu energiju koja se javlja u molekuli kao posljedica promjene valentnih i torzijskih kutova. Četvrti član, E_{OOP} (eng. *out of plane*, OOP), opisuje potencijalnu energiju koja se javlja kod planarnih sustava uslijed odstupanja atoma iz ravnine. Uvođenje ovog doprinosa osigurava planarnost sustava kod kojih

je ona uzrokovana elektronskom strukturom molekule (npr. indolni prsten kod triptofana). Peti i šesti član izraza (1) predstavljaju potencijalnu energiju koja se javlja u molekuli kao posljedica neveznih interakcija (elektrostatske i van der Waalsove). Nevezne interakcije računaju se samo za atome koji su odvojeni tri ili više kovalentnih veza. Zadnji član tzv. „miješani član“ javlja se kao posljedica nemogućnosti neovisnog promatranja različitih doprinosa ukupnoj potencijalnoj energiji (Cramer 2004; Jensen 2017a).

Osim funkcionala, druga bitna sastavnica svakog polja sila su parametri koji predstavljaju konstante za to određeno polje sila i koji omogućuju računanje potencijalne energije sustava korištenjem funkcionala. Parametri sadrže informacije o svim uključenim atomima poput mase, vrijednosti parcijalnog naboja, optimalne duljine veze i kutova te van der Waalsovih radijusa za parove ili skupine atoma za dano polje sila. Vrijednosti parametara dobivene su empirijskim metodama (polja sila prve generacije) i kvantno-mehaničkim izračunima (polja sila druge generacije). Optimalne vrijednosti, odnosno energetski minimumi veza i kuteva između istih atoma u različitim sustavima, podrazumijevaju iste duljine veza i iste veličine kuteva što upućuje da je prenosivost parametara važna stavka svakog polja sila. Polja sila međusobno se razlikuju s obzirom na broj i vrstu atoma za koje sadrže parametre te po izrazu koji se koristi za računanje potencijalne energije sustava (Becker i sur. 2001; Cramer 2004; Van Gunsteren i sur. 2006).

Jedna od ključnih motivacija za generiranje prvih polja sila bio je razvoj energetskog funkcionala koji bi omogućio lakšu optimizaciju geometrije molekula. Ploha potencijalne energije predstavlja prostor s 3N-5 dimenzija, gdje je N broj atoma u sustavu, u kojem je svakom mogućem stanju sustava pripisana potencijalna energija izračunata korištenjem polja sila. Optimizacija geometrije molekule predstavlja proces pronalaska onog rasporeda atoma molekule koji na plohi potencijalne energija zauzima poziciju minimuma (Jensen 2017b).

1.3.2. Molekulsko uklapanje

Molekulsko uklapanje (eng. *docking*) je računalna metoda koja se koristi za predviđanje nekovalentnih interakcija između makromolekula ili između makromolekule (receptora) i male molekule (liganda). Svrha molekulskog uklapanja je odrediti afinitet vezanja dvije molekule te predvidjeti koju konformaciju te molekule zauzimaju prilikom vezanja. Budući da mnogi lijekovi djeluju na način da se vežu za specifične proteine i inhibiraju njihovu funkciju, molekulsko uklapanje je veoma korisna metoda za otkrivanje i dizajniranje potencijalnih novih lijekova (Jensen 2017b).

Program AutoDock Vina (Trott i Olson 2009) jedan je od brojnih programa koji se koriste za računalno istraživanje vezanja receptora i liganada. Programi za molekulsko uklapanje, pa tako i AutoDock Vina, sastoje se od dvije komponente: algoritma za pretraživanje (eng. *search algorithm*) te funkcije za procjenu kvalitete vezanja (eng. *scoring function*). Općeniti zapis funkcionala koji se koristi u programu AutoDock Vina za procjenu kvalitete, odnosno energije vezanja u ovisnosti o konformaciji molekule prikazan je formulom (2) .

$$c = \sum_{i<j} f_{t_i t_j}(r_{ij}) \tag{2}$$

Pri računanju energetskih doprinosa energiji vezanja *(c)*, AutoDock Vina ne uzima u obzir atome koji su udaljeni za tri ili više kovalentne veze. Funkcional (2) kojeg koristi ovaj program svakom atomu *i* dodjeljuje tip atoma t_i te definira simetrični skup funkcija međudjelovanja $f_{t_i t_j}$ interatomske udaljenosti r_{ij}. Vrijednost *c* zapravo predstavlja sumu intermolekularnih i intramolekularnih doprinosa. Za traženje globalnog minimuma, AutoDock Vina koristi algoritam *Iterated Local Search*, a za traženje lokalnog minimuma metodu *Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno* (BFGS). Metoda BFGS je tip kvazi-Newtonove optimizacijske metode. Program AutoDock Vina automatski generira mrežu (eng. *grid*) unutar koje se odvija pretraga, bira tipove atoma i parametre te grupira rezultate nakon proračuna (Trott i Olson 2009). Veličina generirane mreže može se po potrebi mijenjati.

1.4. Cilj istraživanja

Otpornost na mnoge lijekove (eng. *Multidrug resistance*, MDR) jedna je od glavnih kliničkih prepreka za uspješnu kemoterapiju. Stanice raka koje su izvorno osjetljive na jednu vrstu lijeka tijekom liječenja postanu rezistentne na više lijekova protiv raka. Iako kombinacija različitih lijekova može efektivno uzrokovati apoptozu stanica raka, ovaj pristup vrlo često ima štetan utjecaj na cijeli organizam. Uzrok MDR u stanicama raka je izbacivanje kemoterapeutika preko transmembranskih transportera iz obitelji proteina ABC kojoj pripada i protein ABCG2. U zadnja dva desetljeća, od kako je otkriven protein ABCG2, identificirano je nekoliko potentnih inhibitora ovog proteina, no niti jedan od njih nije bio u potpunosti efikasan u kliničkoj uporabi.

Računalne metode u biokemiji i biofizici omogućuju nam uvid u mikroskopsko stanje sustava što nam pomaže pri interpretaciji podataka dobivenih eksperimentalnim biokemijskim metodama koje se koriste za makroskopsku karakterizaciju sustava. Simulacijama molekulskog uklapanja moguće je procijeniti afinitet vezanja dvaju molekula te predvidjeti na koji način te molekule stupaju u interakciju.

Cilj ovog diplomskog rada jest računalno istražiti vezanje različitih adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera na transmembranski protein ABCG2. S ciljem validacije rezultata, provest će se isto istraživanje vezanja poznatih inhibitora i supstrata proteina ABCG2 te usporediti s rezultatima dobivenim za krunaste etere. Rezultati dobiveni proračunima molekulskog uklapanja omogućit će uvid u načine vezanja liganada na protein ABCG2 te interakcije liganada i veznog mjesta u proteinu. Na temelju dobivenih rezultata, pokušat će se predložiti modifikacije istraživanih krunastih etera kako bi se dizajnirali novi potencijalni inhibitori proteina ABCG2.

2. Materijali i metode

2.1. Priprema strukture liganada

Adamantil-supstituirani diaza-krunasti eter-amini 1-4 (**DAC1 - DAC4**) i diaza-krunasti eter-amidi 1-4 (**DAC1-amid** – **DAC4-amid**) čije je vezanje na protein ABCG2 istraživano u ovom diplomskom radu prikazani su na slici 5. Za validaciju rezultata vezanja adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera korišteni su poznati supstrat mitoksantron (**MIX)** te inhibitori: fumitremorgin C (**FTC)**, **MZ29**, **Ko143** i imatinib (**STI)** (slika 3) koji su podvrgnuti istim računalnim postupcima istraživanja vezanja na protein ABCG2.

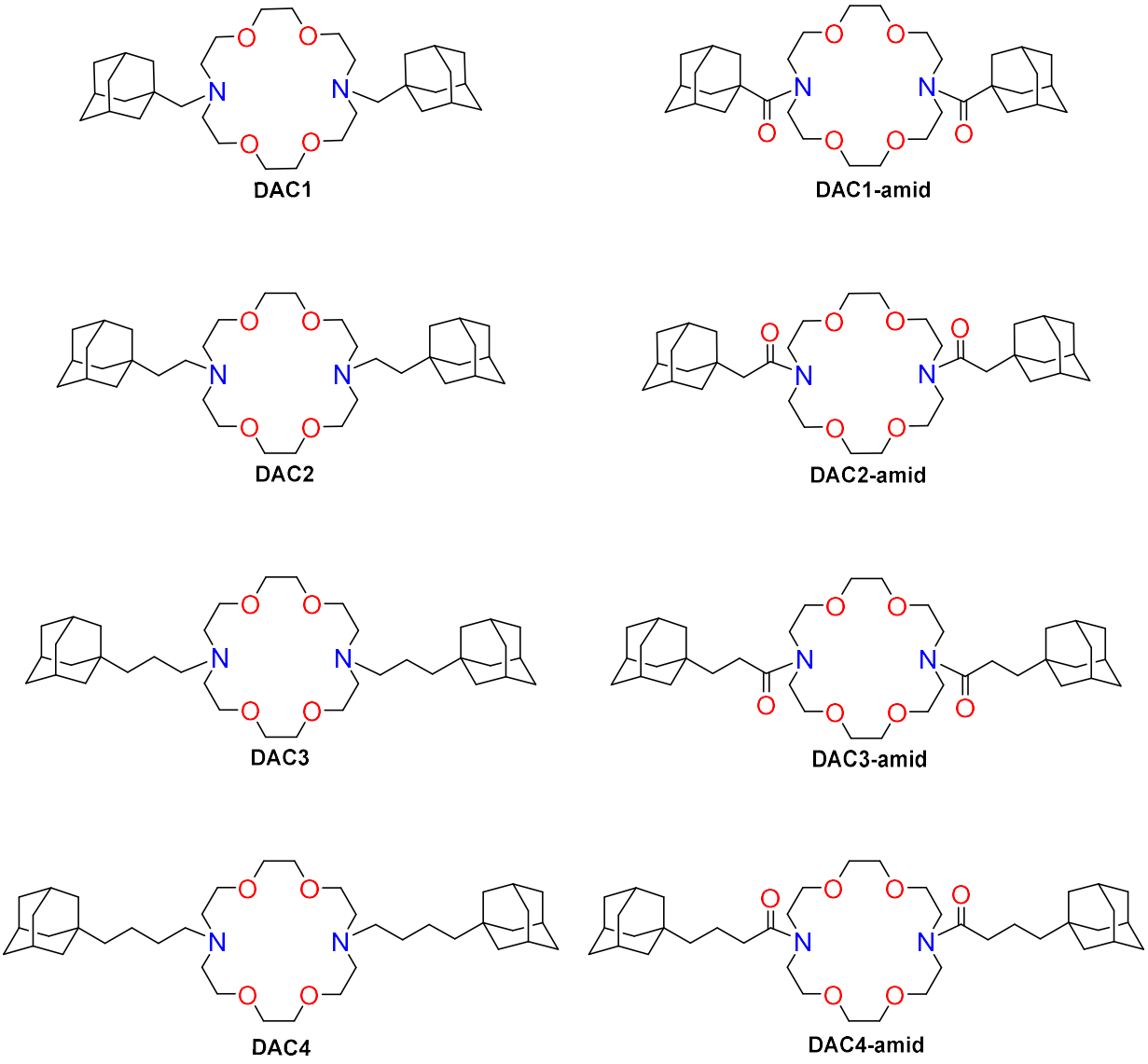
Korištenjem programa Maestro (Schrödinger, LLC, New York, 2021), izrađene su 3D strukture derivata diaza-krunastih spojeva dok su 3D strukture poznatih inhibitora i supstrata preuzete iz mrežno dostupne baze podataka kemijskih molekula PubChem (Kim i sur. 2021) (**MZ29** - CID: 132990900, **FTC** - CID: 403923 , **Ko143** - CID: 10322450; **MIX** - CID: 4212; **STI** - CID: 5291). Protonacija dobivenih struktura liganada napravljena je u programu MolProbity (Williams i sur. 2018).

2.2. Priprema strukture proteina ABCG2

Priprema 3D modela proteina ABCG2 temeljila se na 3D strukturama preuzetim iz mrežno dostupne proteinske baze podataka PDB (Berman i sur. 2000). Dijelovi 3D strukture proteina ABCG2 koji nedostaju u dostupnim strukturama izgrađeni su korištenjem mrežno dostupnog programa za homologno modeliranje strukture proteina SWISS-MODEL (Waterhouse i sur. 2018). Strukture proteina ABCG2 koje su poslužile kao predlošci za dobivanje najkvalitetnijih strukturnih modela prema programu SWISS-MODEL su: (i) struktura s vezanim inhibitorom **MZ29** (PDB kod: 6FFC i 6HIJ), (ii) struktura s vezanim supstratom **MIX** (PDB kod: 6VXI), (iii) struktura s vezanim inhibitorom **STI** (PDB kod: 6VXH) te (iv) APO-struktura (PDB kod: 6VXF). Odabrano je svih pet najboljih strukturnih modela koji su zatim označeni prema predlošcima na kojima su izgrađeni: HIJ, FFC, VXF, VXH i VXI.

U svrhu pripreme strukture proteina ABCG2 za molekulsko uklapanje, iz odabranih modela proteina ABCG2 najprije su uklonjene molekule kolesterola, fosfatidiletanolamina te prisutnih inhibitora ili suptrata. Zatim je provedena protonacija proteina korištenjem četiri različita programa: Chimera (Pettersen i sur. 2004), H++ (Anandakrishnan i sur. 2012), MolProbity (Williams i sur. 2018) i Propka (Søndergaard i sur. 2011). Protonacija je provedena pri pH 7.4 što odgovara pH vrijednosti citoplazme stanica epitela dojke i neurona (Hall 2016).

Svi programi rezultirali su istom protonacijom te su za molekulsko uklapanje odabrane protonirane strukture dobivene programom MolProbity.



Slika 5. Dvodimenzionalni prikaz struktura adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera.

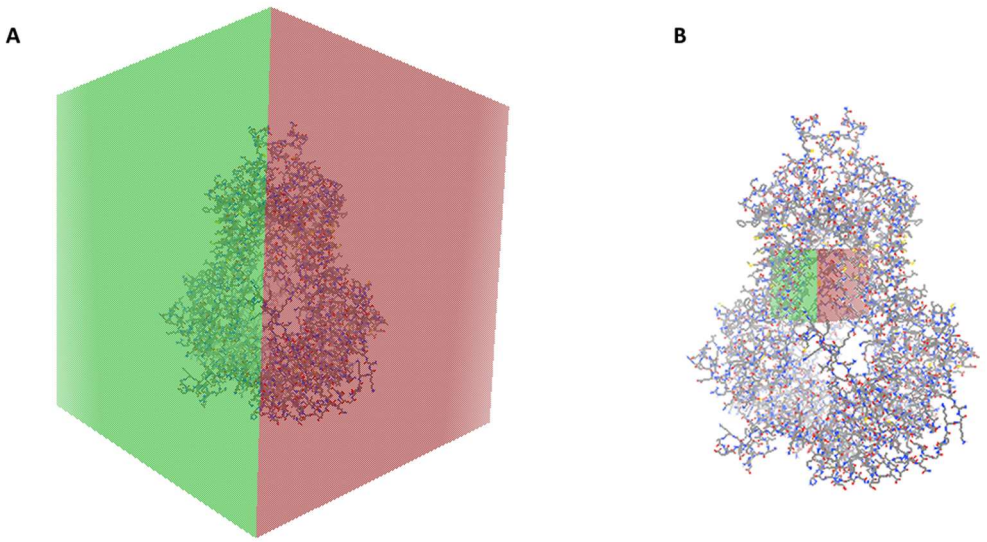
2.3. Molekulsko uklapanje

Napravljena su dva računa molekulskog uklapanja liganada na svim strukturnim modelima proteina ABCG2 pomoću programa AutoDock Vina (Trott i Olson 2009). U prvom izračunu korištena je 3D mreža koja obuhvaća cijeli protein tzv. „slijepo uklapanje“ (eng. *„blind docking“*), dok je u drugom izračunu korištena 3D mreža koja obuhvaća isključivo šupljinu 1 proteina ABCG2. Koordinate središta 3D mreža određene su u programu AutoDock Tools4 (Morris i sur. 2009). Izračuni koji obuhvaćaju isključivo šupljinu 1 služe kao potvrda rezultata molekulskog uklapanja provedenog na cijelom proteinu.

Koordinate središta 3D mreže korištene pretragom koja obuhvaća cijeli protein („Uklapanje 1“) i isključivo šupljinu 1 („Uklapanje 2“) navedene su u tablici 1. Dimenzije 3D mreže postavljene su na 126 Å x 126 Å x 126 Å za pretragu koja obuhvaća cijeli protein te na 22 Å x 22 Å x 22 Å za pretragu koja obuhvaća isključivo šupljinu 1 (slika 6). Svaka pretraga sprema 15 načina vezanja koji su unutar 2 kcal mol^{-1} od energijski najpovoljnijeg pronađenog načina vezanja. Zahtjevnost globalne pretrage (eng. *exhaustiveness*) postavljena je na 32. Uobičajena vrijednost zahtjevnosti globalne pretrage iznosi 8, no zbog razlike u kompleksnosti struktura liganada uzeta je veća vrijednost kako bi se osiguralo pronalaženje energetskog minimuma.

Tablica 1. Koordinate središta 3D mreža.

Receptor	Uklapanje 1			Uklapanje 2		
	x	y	z	x	y	z
FFC	129,7	129,8	137,2	126,3	124,6	124,8
HIJ	129,8	129,9	137,0	126,4	124,6	137,0
VXF	-0,1	0,2	-7,1	7,1	-5,7	-7,0
VXH	108,6	108,8	110,1	115,8	102,8	110,1
VXI	0,1	0,0	-2,4	-3,3	-5,2	-2,4



Slika 6. Položaj i veličina 3D mreže koje obuhvaća cijeli protein (A**)** i isključivo domenu vezanja supstrata (B) prikazane u programu AutoDock Tools4 (Morris i sur. 2009).

2.4. Vizualizacija rezultata molekulskog uklapanja

Vizualizacija strukture proteina ABCG2 s uklopljenim ligandima napravljena je u programima VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (Humphrey i sur. 1996), Chimera (Pettersen i sur. 2004) te Maestro (Schrödinger, LLC, New York, 2021). Aminokiseline koje sudjeluju u interakciji te vrsta interakcije koju ostvaruju s ligandima određena je pomoću mrežno dostupnog programa PLIP (*Protein Ligand Interaction Profiler*) (Salentin i sur. 2015)

3. Rezultati

3.1. Mjesta vezanja liganada unutar proteina ABCG2

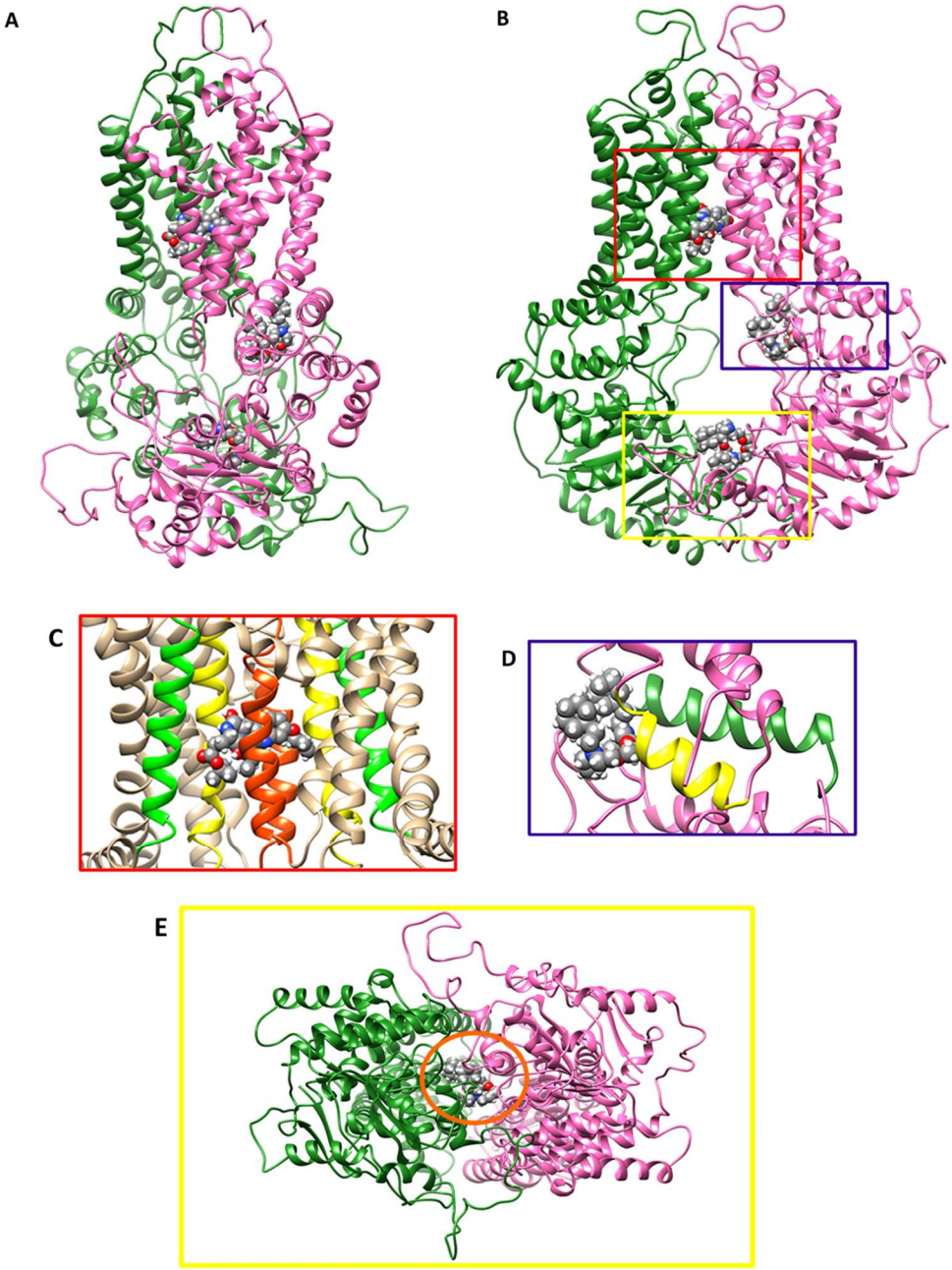
Molekulsko uklapanje poznatih inhibitora **FTC**, **Ko143**, **MZ29** i **STI**, supstrata **MIX** te adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera (DAC), provedeno je na pet modela proteina ABCG2 (HIJ, FFC, VXF, VXH i VXI). Četiri modela proteina ABCG2 (HIJ, FFC, VXH i VXI) koji se nalaze u konformaciji otvorenoj prema unutrašnjosti stanice pokazali su identične rezultate uklapanja. Kao reprezentativni model molekulskog uklapanja proteina ABCG2 odabran je model HIJ koji je pokazao energetski najpovoljnije afinitete vezanja većine liganada na protein ABCG2. Za razliku od prije navedenih modela, model VXF se nalazi u konformaciji otvorenoj prema izvanstaničnom prostoru te su računi molekulskog uklapanja provedeni na ovom modelu dali drugačije rezultate vezanja liganada na protein ABCG2.

3.1.1. Mjesta vezanja liganada u modelima proteina ABCG2 koji se nalaze u konformaciji otvorenoj prema unutrašnjosti stanice

Računi molekulskog uklapanja DAC-amina i DAC-amida te poznatih inhibitora i supstrata na protein ABCG2 pokazali su različita potencijalna mjesta vezanja ovih liganada unutar proteina ABCG2. Načine vezanja derivata krunastih etera možemo grupirati na tri mjesta unutar proteina ABCG2: šupljina 1, mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD te ATP vezno mjesto (slika 7A i 7B). Načini vezanja konformera DAC-amida pozicionirani su unutar šupljine 1 te na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD, dok su konformeri liganda DAC-amina pozicionirani na sva tri mjesta unutar proteina ABCG2. Najveći broj pronađenih načina vezanja DAC-amina i DAC-amida nalazi se na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD, dok se najmanje pronađenih načina vezanja derivata DAC nalazi unutar ATP veznog mjesta. Niti jedan od pronađenih načina vezanja **DAC1** nije pozicioniran unutar šupljine 1. Konformeri inhibitora **FTC**, **Ko143**, **MZ29** i **STI** te supstrata **MIX** smještaju se isključivo u šupljini 1. Jedina iznimka je način vezanja liganda **Ko143** s najvećom energijom vezanja koji je pozicioniran na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD.

Svi ligandi koji se vežu unutar šupljine 1 ostvaruju interakcije s bočnim ograncima zavojnica TMH2 i TMH5a' te TMH2 i TMH5a' (slika 7C). Kod nekih načina vezanja unutar šupljine 1 bočni ogranci zavojnica TMH1b također stvaraju interakcije sa ligandima. Na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD jedan dio liganada ostvaruje interakcije sa C-krajem zavojnice TMH2, zavojnicom TMH1a te s petljama iz domene NBD (slika 7D). Drugi dio konformera koji se vežu na ovo mjesto ostvaruje interakcije s C krajem zavojnice TMH2, sa zavojnicom koju čine rezidue Lys 86-Ala 94 te s β-lancima iz domene NBD. DAC-amini pozicioniraju se u samo središte ATP vezujućeg mjesta u domeni NBD (slika 7E).

Osim načina vezanja koji su pozicionirani unutar proteina ABCG2, simulacijama molekulskog uklapanja koje obuhvaćaju cijeli protein, dobiveni su nespecifični načini vezanja koji se nalaze na površini proteina. Najviše načina vezanja koji se nalaze na površini proteina ABCG2 dobiveni su molekulskih uklapanjem liganada **DAC3**. Ligand **DAC3** ima čak 12 od 15 načina vezanja koji su nespecifični te koji se nalaze na površini proteina ABCG2 u domeni TMD.

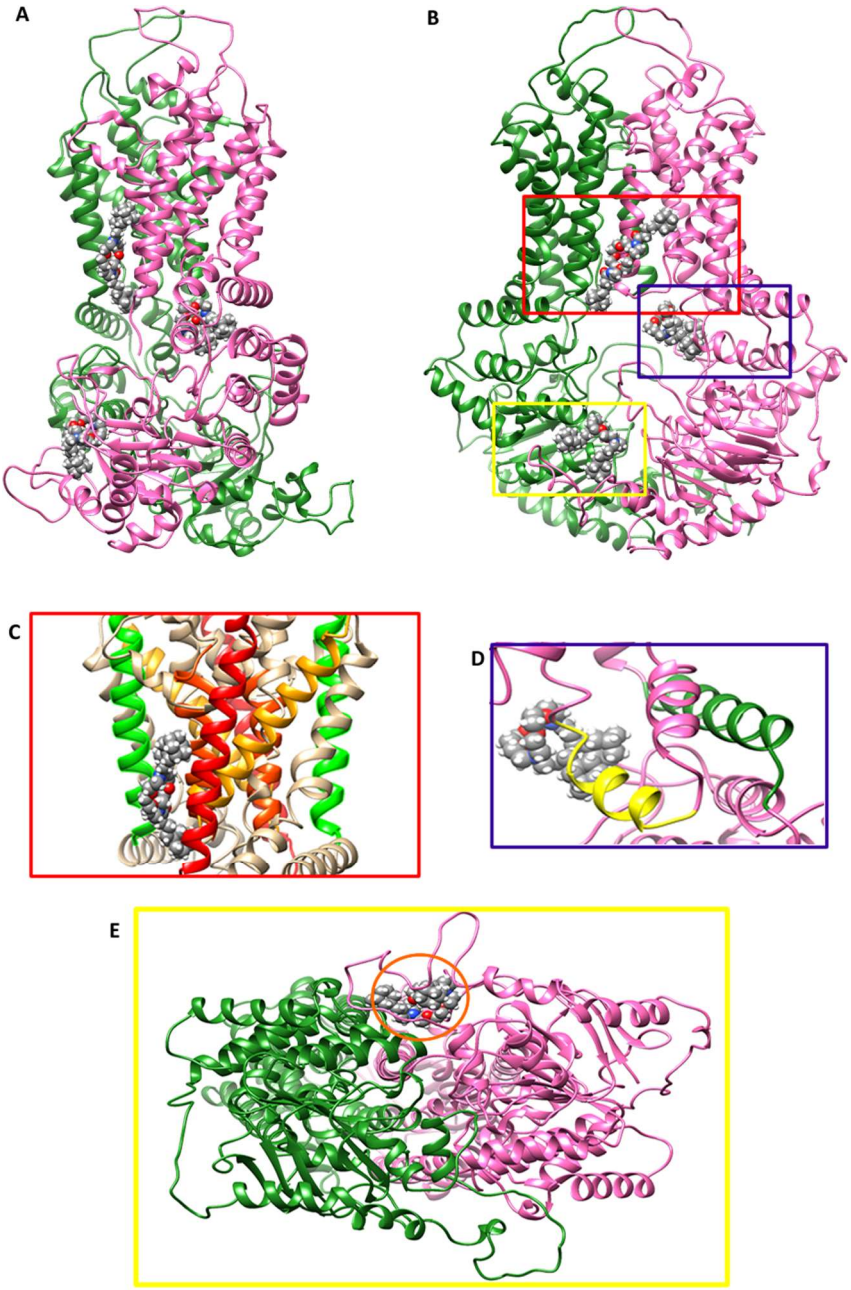


Slika 7. Mjesta vezanja liganada određena računom molekulskog uklapanja koji obuhvaća cijeli protein ABCG2 u konformaciji otvorenoj prema unutarstaničnom prostoru. A) i B) Prikaz proteina ABCG2 s vezanim ligandima. Monomeri proteina ABCG2 označeni su ružičastom i zelenom bojom. Ligandi su prikazani modelom kuglica. Različita mjesta vezanja liganada označena su pravokutnicima: šupljina 1 – crveni pravokutnik, mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD – plavi pravokutnik, ATP vezno mjesto – žuti pravokutnik. C) Približeni prikaz šupljine 1. Zavojnice TMH2/TMH2', TMH5a/TMH5a' te TMH1b/TMH1b' obojane su po topologiji kao na slici 1A. D) Približeni prikaz mjesta prijelaza iz domene NBD u domenu TMD. C-kraj zavojnice TMH2 označen je žuto, a zavojnica TMH1a označena je tamno zeleno kao na slici 1A. E) Pogled na ATP mjesto iz citosola. Ligand se nalazi u centru ATP veznog mjesta (narančasta elipsa).

3.1.2. Mjesta vezanja liganada u modelu proteina ABCG2 koji se nalazi u konformaciji otvorenoj prema izvanstaničnom prostoru

Računi slijepog molekulskog uklapanja provedeni na modelu VXF koji se nalazi u konformaciji otvorenoj prema izvanstaničnom prostoru pokazali su da se načini vezanja svih liganada mogu općenito grupirati na tri mjesta: izvan šupljine 1, na mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD te s vanjske strane domene NBD (slika 8A i 8B). Niti jedan ligand nije pokazao mogućnost vezanja u šupljinu 1.

Ligandi koji se vežu izvan šupljine 1 ostvaruju interakcije s zavojnicama TMH1b, TMH5a te TMH6b (slika 8C). Na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD ligandi ostvaruju interakcije sa C-krajem zavojnica TMH2 te zavojnicama TMH1a, ali i s petljama iz domene NBD (slika 8D). Pozicije vezanja liganda unutar i izvan domene NBD razlikuju se za svaki ligand. Primjer vezanja liganda u ovoj domeni prikazan je na slici 8E.



Slika 8. Mjesta vezanja liganada određena računom molekulskog uklapanja koji obuhvaća cijeli protein ABCG2 u konformaciji otvorenoj prema izvanstaničnom prostoru. A) i B) Prikaz proteina ABCG2 s vezanim ligandima. Monomeri proteina ABCG2 označeni su ružičastom i zelenom bojom. Ligandi su prikazani modelom kuglica. Različita mjesta vezanja liganada označena su pravokutnicima: izvan šupljine 1 – crveni pravokutnik, mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD – plavi pravokutnik, u domeni NBD – žuti pravokutnik. C) Približeni prikaz šupljine 1. Zavojnice, TMH1b/TMH1b', TMH5a/TMH5a' te TMH6b/TMH6b' obojane su po topologiji kao na slici 1A (svijetlo zeleno, narančasto i crveno). D) Približeni prikaz liganda vezanog na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD. D) Približeni prikaz mjesta prijelaza iz domene NBD u domenu TMD. C-kraj zavojnice TMH2 označen je žuto, a zavojnica TMH1a označena je tamno zeleno kao na slici 1A. E) Pogled na ATP mjesto iz citosola. Ligand se nalazi na periferiji ATP veznog mjesta (narančasta elipsa).

3.2. Energije vezanja liganada na protein ABCG2

Simulacije vezanja liganada na cijeli protein ABCG2 s pomoću metode molekulskog uklapanja rezultirali su energijama vezanja prikazanim u tablici 2. Mjesta unutar proteina ABCG2 koja su se pokazala kao najpovoljnija mjesta za vezanje liganada su: šupljina 1 (eng. *Cavity 1*, C1) te mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD. Najmanju energiju vezanja posjeduje kompleks **DAC4-amid** i šupljina 1. Razlika između energetski najpovoljnijeg načina vezanja **DAC3-amida** i najpovoljnijeg načina vezanja **DAC4-amida** u šupljini 1 je svega 0,84 kJ mol^{-1}. Unutar energetskog okvira od 5 kJ mol^{-1} pojavljuju se redom najpovoljniji načini vezanja liganada **STI**, **DAC1-amid**, **MZ29, DAC2-amid** i **FTC**. Najveća energija vezanja u šupljini 1 dobivena je molekulskim uklapanjem liganda **MIX**. Energetski najpovoljnije mjesto vezanja za diaza-krunaste etere s amino bočnim ograncima nalazi se na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD. Najmanju energiju vezanja na toj poziciji posjeduju načini vezanja **DAC2**. Razlika između energetski najpovoljnijeg načina vezanja **DAC4** i najpovoljnijeg načina vezanja **DAC2** iznosi 4,6 kJ mol^{-1}. Načini vezanja liganada **DAC3** i **DAC1** imaju za 6,69 kJ mol^{-1} odnosno 7,11 kJ mol^{-1} veću energiju vezanja za mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD u odnosu na **DAC2**.

Tablica 2. Rezultati molekulskog uklapanja liganada na cijeli protein ABCG2. Ligandi su poredani s obzirom na porast energije vezanja izračunate metodom molekulskog uklapanja. Afinitet vezanja odgovara energiji vezanja konformera s najmanjom energijom vezanja za svaki ligand unutar proteina ABCG2.

Ligand	Mjesto vezanja	Afinitet vezanja (kJ mol^{-1})
DAC4-amid	C1[a]	-42,26
DAC3-amid	C1	-41,42
DAC2	NBD-TMD[b]	-41,42
DAC1-amid	C1	-40,58
STI	C1	-40,58
MZ29	C1	-39,33
DAC2-amid	C1	-38,91
FTC	C1	-38,91
Ko143	C1	-37,66
DAC4	NBD-TMD	-36,82
DAC3	NBD-TMD	-34,73
DAC1	NBD-TMD	-34,31
MIX	C1	-32,64

[a] C1 označava šupljinu 1 (eng. *Cavity 1*).
[b] NBD-TMD označava mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD

3.3. Energije vezanja liganada u šupljini 1 proteina ABCG2

Energije vezanja liganada u šupljini 1 dobivene računima molekulskog uklapanja koji obuhvaćaju samo šupljinu 1 (Uklapanje 2) te cijeli protein ABCG2 (Uklapanje 1) prikazane su u tablici 3. Iz priloženog se vidi da najmanju energiju vezanja tijekom Uklapanja 2 posjeduje kompleks **DAC3-amid** i šupljina 1. Razlika između energetski najpovoljnijeg načina vezanja **STI** i najpovoljnijeg načina vezanja **DAC3-amida** iznosi 0,42 kJ mol^{-1}. Unutar energetskog okvira od 2,5 kJ mol^{-1} pojavljuju se ostali diaza-krunasti eteri s amidnim bočnim ograncima, dok se unutar energetskog okvira od 8 kJ mol^{-1} pojavljuju redom ligandi **MZ29**, **FTC**, diaza-krunasti eteri s amino bočnim ograncima te **Ko143**. Najveća energija vezanja u šupljini 1 tijekom Uklapanja 1 i 2 dobivena je molekulskim uklapanjem liganda **MIX**.

Od ukupno 15 najboljih načina vezanja dobivenih Uklapanjem 1, niti jedan od načina vezanja liganda **DAC1** nije pozicioniran unutar šupljine 1. Ostali ligandi su imali barem jedan način vezanja koji se nalazio unutar šupljine 1. Uklapanjem 2 dobiveno je da je najpovoljniji

način vezanja **DAC1**u šupljini 1 za 0,42 kJ mol^{-1} negativniji/povoljniji od najpovoljnijeg načina vezanja istog liganda u domeni NBD.

Nadalje, računi molekulskog uklapanja liganada koji obuhvaćaju samo šupljinu 1 te cijeli protein ABCG2 pokazuju identične energije vezanja liganada unutar šupljine 1. Razlika u afinitetu vezanja najboljeg načina vezanja liganada **MZ29**, **FTC**, **STI, DAC4** te **DAC1-** i **DAC3-amida** u šupljini 1 iznosi manje od 1 kJ mol^{-1} dok se razlike u afinitetu vezanja za **DAC2-** i **DAC4-amid**, **Ko143** te **DAC3** nalaze unutar energetskog okvira od 3 kJ mol^{-1}. Najveću razliku u afinitetu vezanja za šupljinu 1 imaju ligandi **DAC2** i **MIX** čija razlika u energijama između dva računa molekulskog uklapanja iznosi 4,18 kJ mol^{-1} odnosno 4,23 kJ mol^{-1}.

Tablica 3. Energije vezanja liganada u šupljini 1 dobivene računima molekulskog uklapanja koji obuhvaćaju cijeli protein te računima molekulskog uklapanja koji obuhvaćaju samo šupljinu 1. Ligandi su poredani s obzirom na porast energije vezanja izračunate metodom molekulskog uklapanja koja obuhvaća šupljinu 1 proteina ABCG2. Afinitet vezanja odgovara energetski najpovoljnijem načinu vezanja za svaki ligand u šupljini 1.

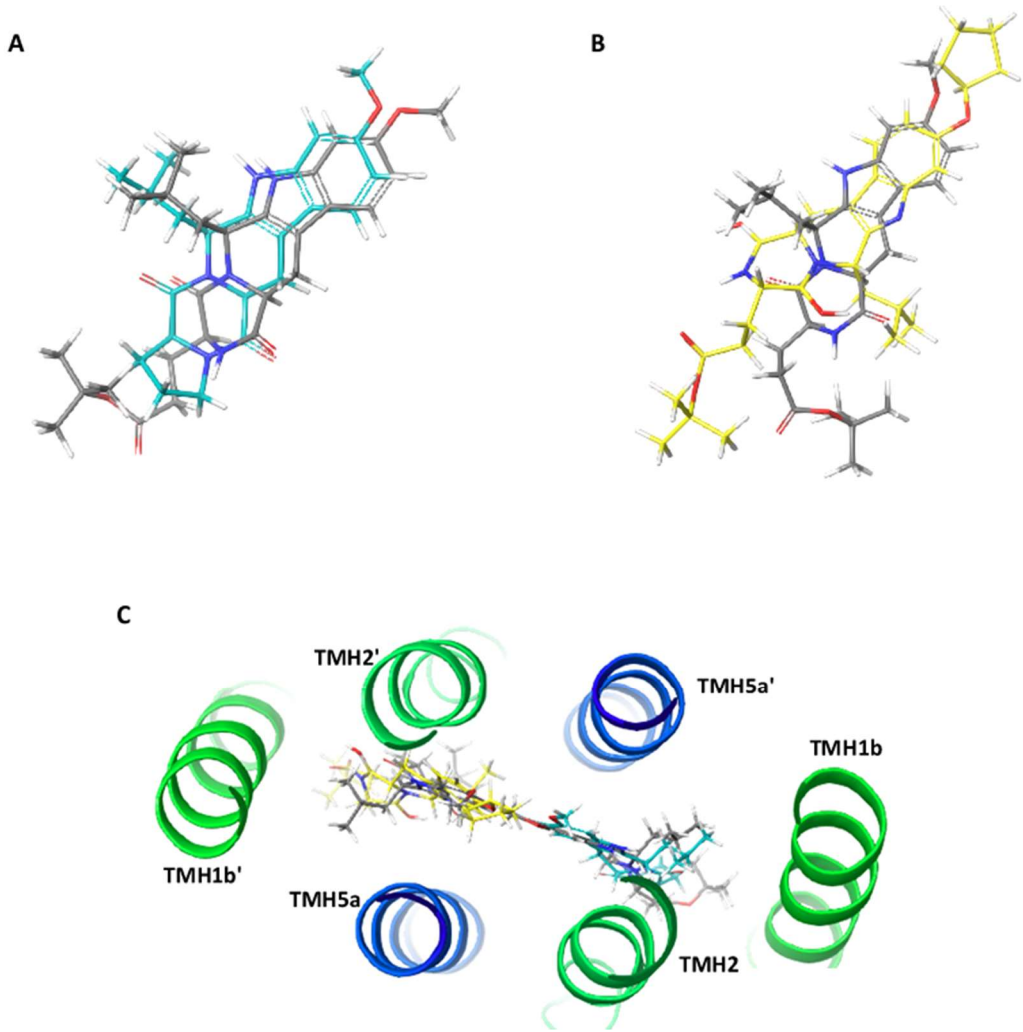
Ligand	Uklapanje 2[a]	Uklapanje 1[b]	Razlika u afinitetu vezanja (kJ mol^{-1})
	Afinitet vezanja (kJ mol^{-1})	Afinitet vezanja (kJ mol^{-1})	
DAC3-amid	-41,84	-41,42	-0,42
STI	-41,42	-40,58	-0,84
DAC1-amid	-40,58	-40,58	0
DAC2-amid	-40,58	-38,91	-1,68
DAC4-amid	-40,17	-42,26	2,1
MZ29	-39,75	-39,33	-0,42
FTC	-38,07	-38,91	0,84
DAC2	-36,82	-41,00	4,18
DAC4	-36,82	-36,40	-0,42
DAC3	-36,82	-33,47	-2,94
Ko143	-35,56	-37,66	2,1
DAC1	-33,89	X[c]	X
MIX	-28,03	-32,64	4,23

[a] Uklapanje 2 označava rezultat molekulskog uklapanja liganada u šupljinu 1 proteina ABCG2.
[b] Uklapanje 1 označava rezultata molekulskog uklapanja liganada na cijeli protein ABCG2.
[c] X – označava da se niti jedan rezultat molekulskog uklapanja liganda na cijeli protein nije pojavio u šupljini 1.

3.3. Vezanje poznatih inhibitora FTC, Ko143, MZ29 i STI te supstrata MIX u šupljinu 1 proteina ABCG2

Računi molekulskog uklapanja pokazali su da se strukturno slični ligandi **FTC**, **Ko143** te **MZ29** identično vežu unutar šupljine 1. Najpovoljniji načini vezanja liganda **FTC** i **Ko143** se skoro u potpunosti preklapaju (slika 9A). Heteropentaciklički dio strukture ova dva liganda je rigidan te ne postoje veće razlike u konformaciji molekula između različitih načina vezanja. Za razliku od liganada **FTC** i **Ko143** , heteropentaciklički dio strukture liganda **MZ29** se nalazi u savijenoj konformaciji (slika 9B) u kojoj dolazi do stvaranja intramolekulske vodikove vezu između kisika karboksilatne skupine propanoata i dušika pirazinskog prstena. Načini vezanja liganada **FTC**, **Ko143**, te **MZ29** pozicionirani su u dva simetrična i strukturno identična mjesta

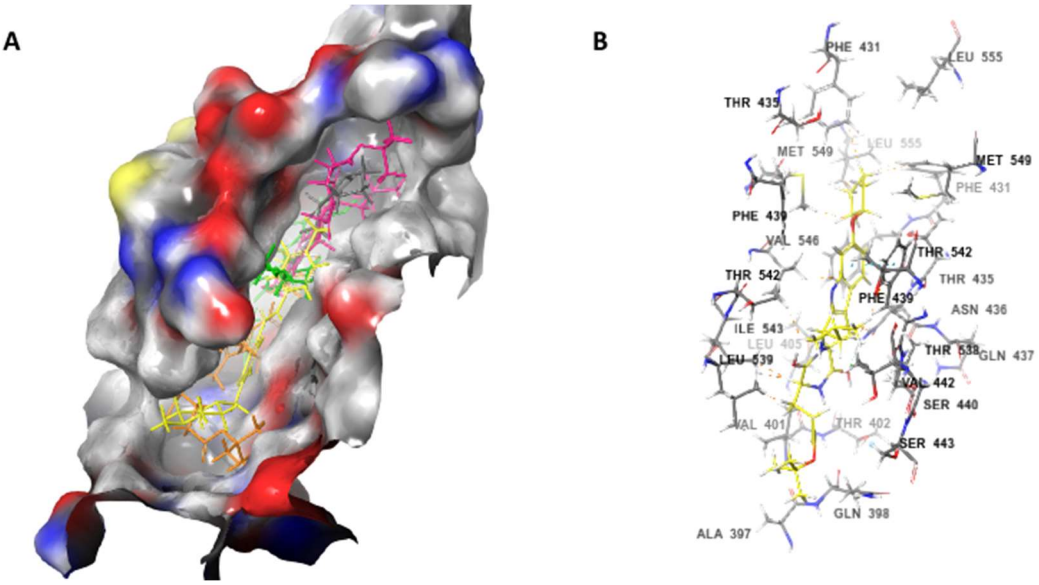
unutar šupljine 1 kojeg formiraju zavojnice TMH2 i TMH5a različitih monomera te zavojnica TMH1b (slika 9C).



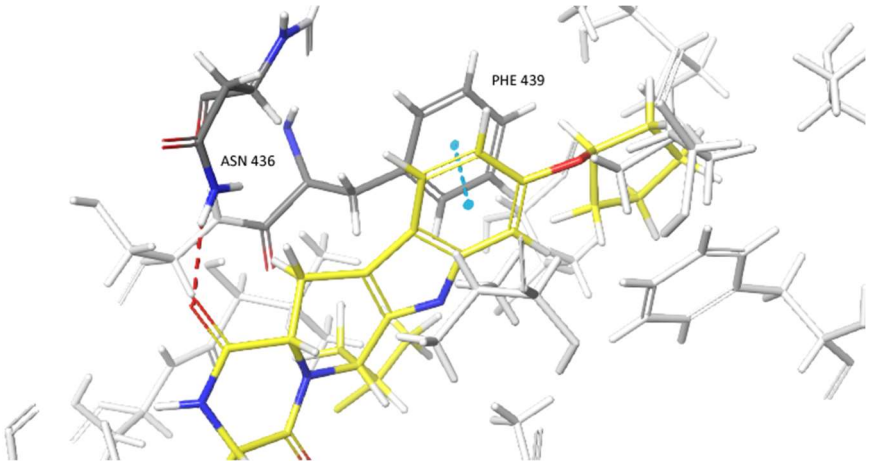
Slika 9. Vezanje liganada **FTC**, **Ko143** te **MZ29** u šupljini 1 proteina ABCG2: A) Preklopljene strukture najboljeg načina vezanja liganda **FTC** (plavo) i liganda **Ko143** (sivo) u šupljini 1. B) Preklopljene strukture najboljeg načina vezanja liganda **MZ29** (žuto) te drugog najboljeg načina vezanja liganda **Ko143** s istim afinitetom vezanja koji se nalazi na suprotnoj strani šupljine 1 u odnosu na prvi način vezanja. C) Smještaj liganada **FTC**, **Ko143** te **MZ29** u unutrašnjosti transmembranske domene koju čine transmembranske zavojnice TMH2/TMH2', TMH5a/TMH5a' te TMH1b/TMH1b'.

Prilikom vezanja u hidrofobnu šupljinu 1 konformeri heterocikličkih spojeva **FTC**, **Ko143** te **MZ29** ostvaruju interakcije s aminokiselinama prikazanim na slici 10. Aminokiseline s kojima svi ligandi ostvaruju najveći broj interakcija su: Thr 435, Asn 436, Phe 439, Thr 542, Val 546 i Met 549. Kod najpovoljnijeg načina vezanja spojevi **FTC**, **Ko143** te **MZ29** tvore π-π interakcije naslagivanja s Phe 439. Na dnu šupljine 1 (najudaljeniji dio od citoplazmatskog dijela stanične membrane), hidrofobne aminokiseline Phe 431, Phe 432, Met 549 i Leu 555 interagiraju s O-ciklopentenilnom grupom konformera **MZ29** dok tertbutilni bočni ogranci

konformera **FTC**, **Ko143** ne sežu toliko duboko u šupljinu 1. Uz π-π interakcije naslagivanja, najpovoljniji način uklapanja **MZ29** tvori i vodikovu vezu u kojoj je dušik karboksiamino skupine Asn 436 donor, a kisik keto skupine pirazinskog prstena liganda **MZ29** akceptor vodikove veze (slika 11). Konformer liganda **MZ29** koji ima 0,84 kJ mol^{-1} veću energiju vezanja za šupljinu 1 ne stvara π-π interakcije naslagivanja i vodikove veze. Također, dio načina vezanja liganada **FTC** i **Ko143** koji su unutar energetskog okvira od 1 kJ mol^{-1} od njima najpovoljnijeg načina vezanja ne ostvaruju π-π interakcije naslagivanja s Phe 439 već su za protein ABCG2 vezani isključivo hidrofobnim interakcijama.



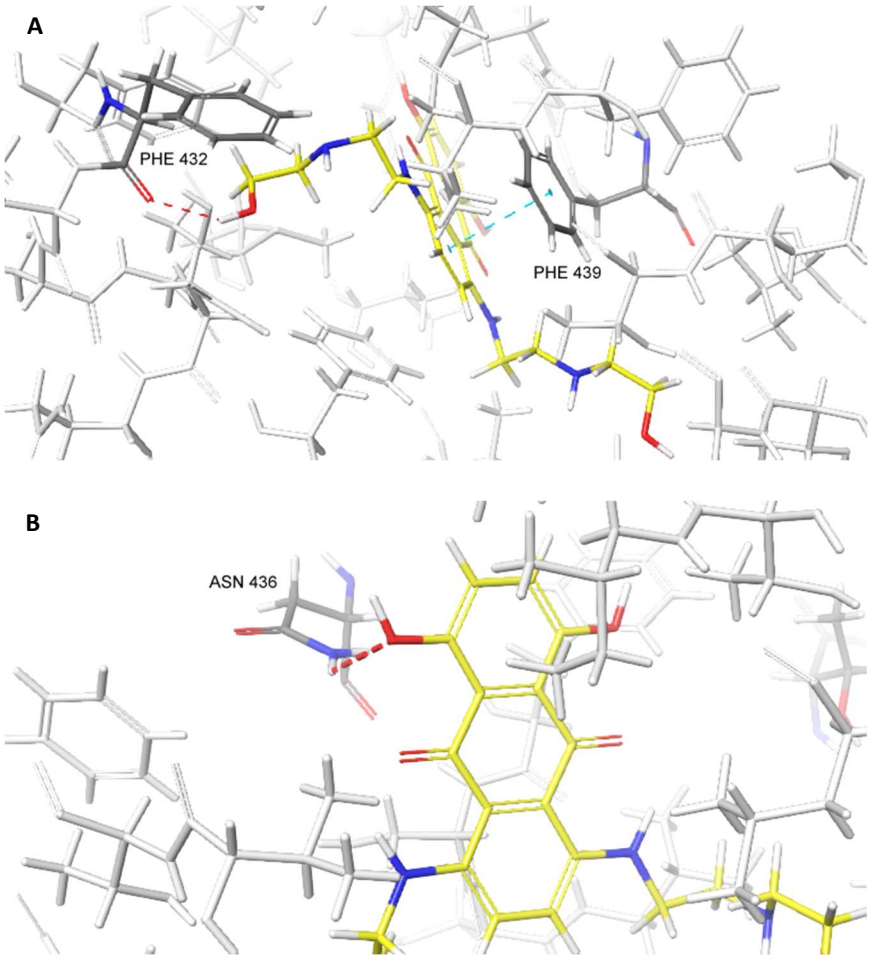
Slika 10. Vezanje liganada unutar šupljine 1 proteina ABCG2: A**)** Pogled na vezno mjesto unutar šupljine 1 iz domene NBD. Raspodjela naboja unutar veznog mjesta u šupljini 1 dobivena pomoću programa Maestro (Schrödinger, LLC, New York, 2021) (crveno – negativan naboj, bijelo – neutralan naboj, plavo pozitivnan naboj). Ligandi: **FTC** – sivo, **Ko143** – ružičasto, **MZ29** – narančasto, **STI** – žuto, **MIX** – zeleno. B**)** Aminokiseline koje čine vezno mjesto unutar šupljine 1. Žutom bojom označen je ligand **MZ29**.



Slika 11. Nekovalentne interakcije liganda **MZ29** sa šupljinom 1. π-π interakcije naslagivanja između liganda **MZ29** (žuto) i bočnog ogranaka aminokiseline Phe 439 (sivo) označene su plavom isprekidanom linijom. Vodikova veza koju tvore kisik keto-skupine pirazinskog prstena liganda **MZ29** te dušik aminokiseline Asn 436 (sivo) označena je crvenom isprekidanom linijom. Aminokiseline unutar šupljine 1 označene su bijelom bojom

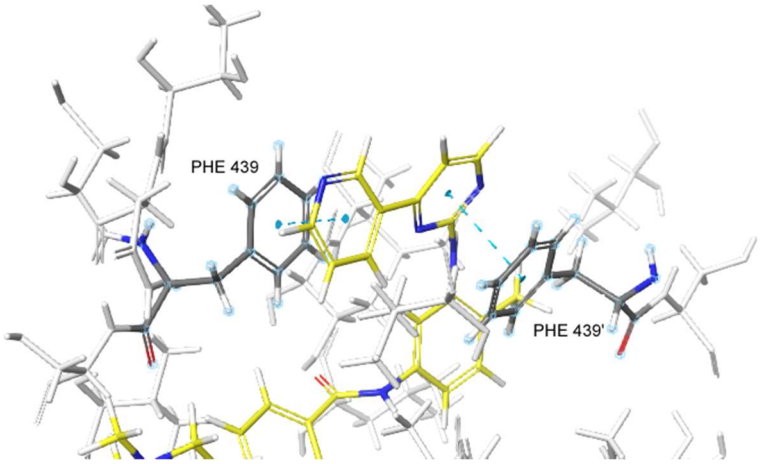
Ligand **MIX** je dihidroksiantrakvinon i ima vrlo rigidnu strukturu te se njegovi konformeri dobiveni molekulskim uklapanjem razlikuju samo u položaju bočnih ogranaka. Računi molekulskog uklapanja koji obuhvaćaju cijeli protein ukazuju na to da se ligand **MIX** veže na identičnu poziciju kao i ligandi **FTC**, **Ko143** te **MZ29**. Konformer liganda **MIX** s najmanjom energijom vezanja ostvaruje π-π interakcije naslagivanja s Phe 439, a hidrokslina skupina 6-hidroksi-1,4-diazaheksilnog bočnog ogranka konformera liganda **MIX** seže duboko u šupljinu 1 te tvori vodikovu vezu s kisikom α-karboksilne skupine Phe 432 (slika 12A). Pri neznatno višim energijama konformer liganda **MIX** stvara sa svakim Phe 439 po jednu π-π interakciju naslagivanja, odnosno tvori ukupno dvije π-π interakcije naslagivanja. Vodikova veza s Phe 432 nije prisutna u ovim načinima vezanja.

Molekulsko uklapanje liganda **MIX** koje obuhvaća samo šupljinu 1 rezultiralo je načinima vezanja koji su pozicionirani bliže domeni NBD te koji imaju veću energiju vezanja od načina vezanja dobivenih računima molekulskog uklapanja koji obuhvaćaju cijeli protein ABCG2 (Tablica 3). Energetski najpovoljniji način vezanja dobiven molekulskim uklapanjem liganda **MIX** unutar šupljine 1 je onaj u kojoj kisik hidroksilne skupine dihidroksiantrakvinonskog dijela strukture liganda **MIX** tvori vodikovu vezu s dušikom α-amino skupine Asn 436 (slika 12B).



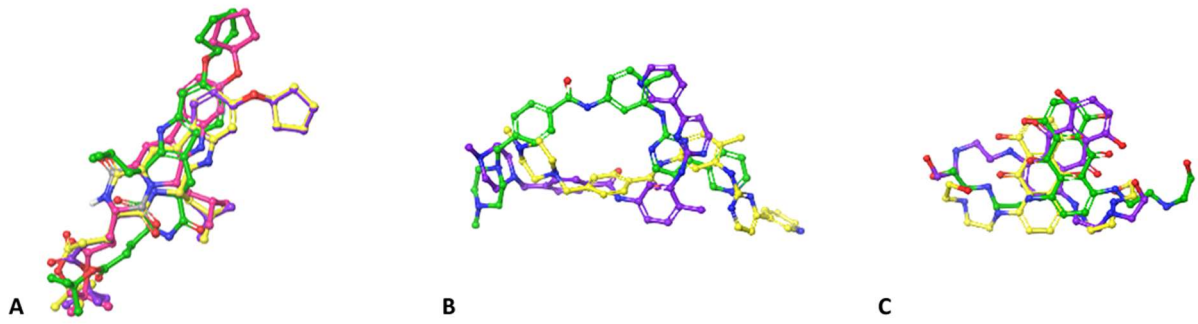
Slika 12. Rezultati molekulskog uklapanja liganda **MIX**: A) Najpovoljniji način vezanja dobiven molekulskim uklapanjem koje obuhvaća cijeli protein. π-π interakcije naslagivanja liganda **MIX** (žuto) i bočnog ogranaka aminokiseline Phe 439 (sivo) označene su plavom isprekidanom linijom. Vodikova veza koju tvore kisik hidroksilne skupine liganda **MIX** te kisik aminokiseline Phe 432 (sivo) označena je crvenom isprekidanom linijom. B) Najpovoljniji način vezanja dobiven molekulskim uklapanjem koje obuhvaća samo šupljinu 1. Vodikova veza koju tvore kisik hidroksilne skupine liganda **MIX** te kisik aminokiseline Asn 436 (sivo) označena je crvenom isprekidanom linijom. Aminokiseline unutar šupljine 1 označene su bijelom bojom

Rezultati molekulskog uklapanja liganda **STI** ukazuju da se konformeri liganda **STI** najviše razlikuje u poziciji piridin-primidin bočnog ogranka koji je za benzamid vezan amino vezom te u poziciji metilpiperazina koje je vezan za metilnu skupinu fenilalanina. Međusobni položaj benzamida i fenilne skupine je rigidan. U odnosu na druge spojeve, ligand STI se proteže preko skoro cijele širine šupljine 1 i ne seže duboko u šupljinu 1. Energetski najpovoljniji konformeri liganda **STI** ostvaruju sa svakim Phe 439 po jednu π-π interakciju naslagivanja tj. ukupno tvore dvije π-π interakcije naslagivanja (slika 13).



Slika 13. Nekovalentne interakcije liganda **STI** sa šupljinom 1. π-π interakcije naslagivanja između liganda **STI** (žuto) i bočnih ogranaka aminokiselina Phe 439 (sivo) označene su plavom isprekidanom linijom. Aminokiseline unutar šupljine 1 označene su bijelom bojom.

Prije simulacija molekulskog uklapanja liganada na protein ABCG2 iz strukture modela proteina uklonjeni su vezani ligandi **MZ29**, **STI** i **MIX**. Pozicije liganada **MZ29**, **STI** i **MIX** dobivene molekulskim uklapanjem odgovaraju pozicijama u kojima se ovi ligandi nalaze u izvornim proteinskim strukturama preuzetim iz PDB baze podataka (slika 14)

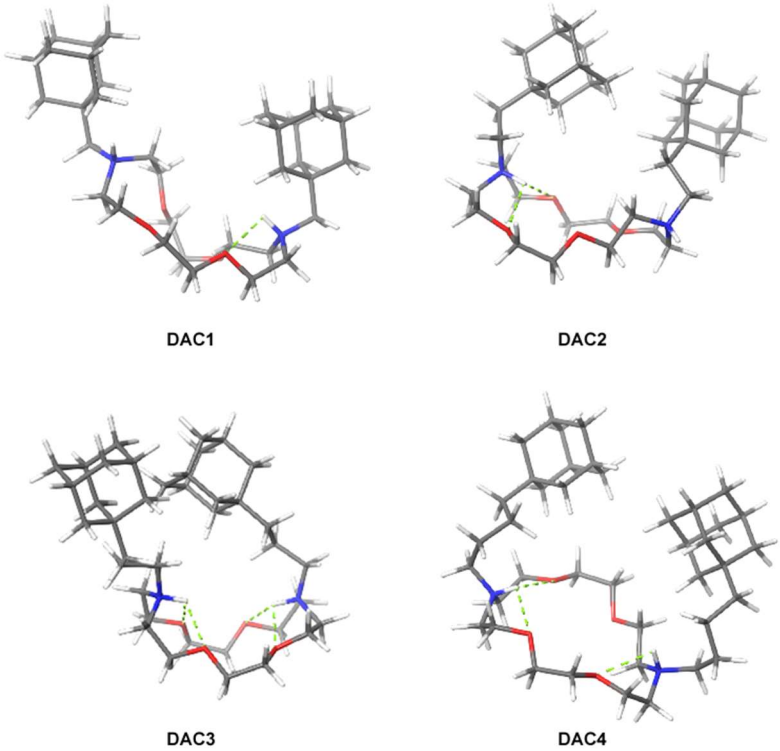


Slika 14. Preklopljene strukture najboljih načina vezanja inhibitora **MZ29** i **STI** te supstrata **MIX** dobivenih računima molekulskog uklapanja na protein ABCG2. **A)** Ligand **MZ29** u modelu HIJ, **B)** Ligand **STI** u modelu VXH te **C)** ligand **MIX** u modelu VXI. Zelenom bojom označena je ligand dobiven krio-elektronskom mikroskopijom (eng. *Cryo-electron microscopy*, krio-EM). Ljubičastom bojom označen je energetski najpovoljniji način vezanja liganda dobiven računima molekulskog uklapanja koji obuhvaćaju cijeli protein ABCG2. Žutom bojom označen je energetski najpovoljniji način vezanja liganda dobiven računima molekulskog uklapanja koji obuhvaćaju šupljinu 1 proteina ABCG2. Ružičastom bojom pod **A)** označen je treći najbolji način vezanja liganda **MZ29** koji ima najsličniji položaj i konformaciju molekule kao i ligand **MZ29** iz krio-EM strukture .

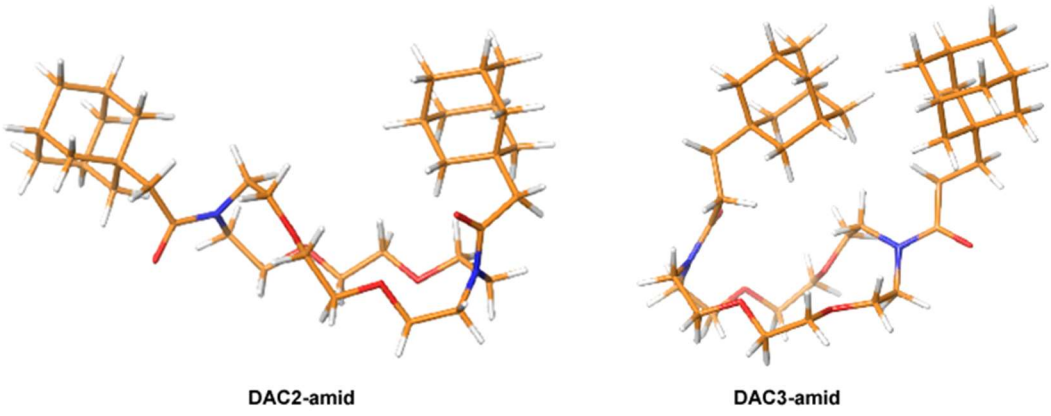
3.4. Vezanje adamantil supstituiranih diaza-krunastih etera na protein ABCG2

3.4.1. Stvaranje intramolekulskih vodikovih veza prilikom vezanja adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera za protein ABCG2

Molekulsko uklapanje adamntil-supstituiranih diaza-krunastih eter-amina (DAC-amina), **DAC1-DAC4**, na protein ABCG2 upućuje na to da navedeni ligandi prilikom vezanja u šupljinu 1 te na mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD tvore intramolekulske vodikove veze. Svi pronađeni konformeri **DAC1**-**DAC4** ostvaruju vodikove veze gdje je dušik donor, a kisik akceptor vodikove veze (slika 15). Spojevi DAC-amini se razlikuju u broju intramolekulskih vodikovih veza koje se ostvaruju između atoma dušika i kisika. Jedan atom dušika tvori vodikove veze s minimalno jednim susjednim atomom kisika. Spoj **DAC1** ostvaruje jednu, **DAC2** dvije, **DAC3** četiri, a **DAC4** tri vodikove veze. Za razliku od DAC-amina, adamantil-supstituirani diaza-krunasti eter-amidi (DAC-amidi) ne tvore intramolekulske vodikove veze. Posljedica stvaranja intramolekulskih vodikovih veza je da DAC-amini zauzimaju zatvorenije konformacije u kojoj se adamantilne grupe bočnih ogranaka nalaze međusobno u neposrednoj blizini. Konformeri **DAC1-** i **DAC3-amida** također zauzimaju zatvorenije konformacije u kojima su im bočni ogranci savijeni jedan prema drugome dok pronađeni konformeri **DAC2-** i **DAC4-amida** zauzimaju otvorenije konformacije u kojima su bočni ogranci ispruženi te odmaknuti jedan od drugog (slika 16).



Slika 15. Konformeri DAC dobiveni molekulskim uklapanjem na protein ABCG2 s istaknutim intramolekulskim vodikovim vezama označenim isprekidanom linijom. **DAC1** ostvaruje jednu, **DAC2** dvije, **DAC3** četiri, a **DAC4** tri vodikove veze.

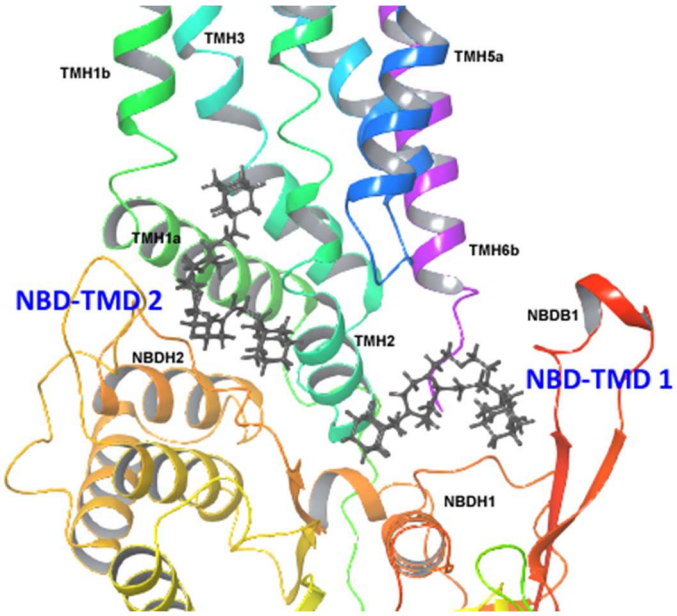


Slika 16. Konformeri DAC-amida dobiveni računima molekulskog uklapanja na protein ABCG2.

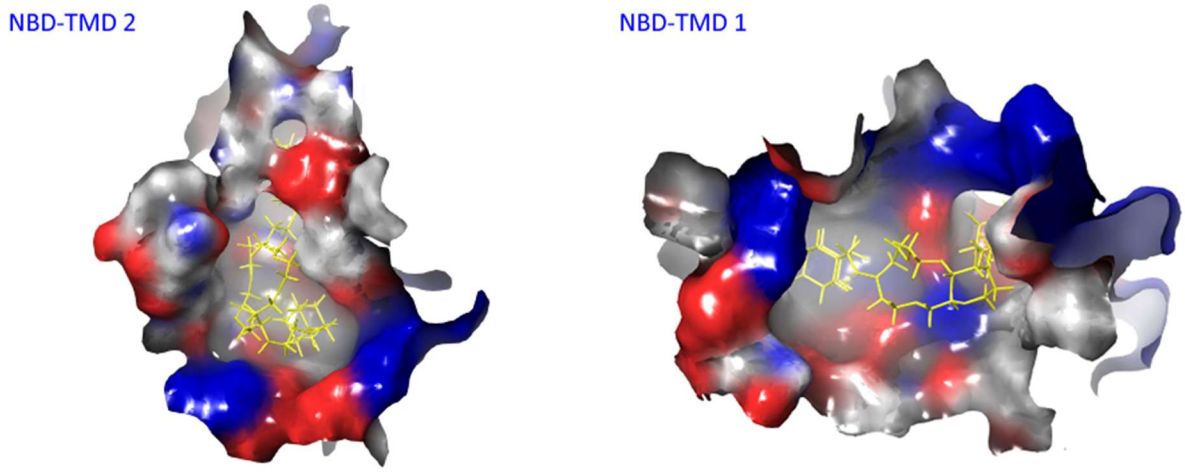
3.4.2. Vezanje adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera na mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD

Simulacije molekulskog uklapanja DAC-amina DAC-amida na cijeli protein ABCG2 pokazale su da je najveći broj pronađenih načina vezanja pozicioniran na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD. Vezanje liganada na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD pokazuje raznolike pozicije vezanja za svaki ligand zbog čega su kao reprezentativni načini vezanja liganada na ovom dijelu proteina ABCG2 odabrane one pozicije koje su imale energetski najpovoljniji afinitet vezanja te koje su se ujedno pojavile više od tri puta prilikom pretrage. Na temelju toga ligande derivata diaza-krunastih etera možemo grupirati u dvije najzastupljenije pozicije.

Na prvoj poziciji unutar mjesta prijelaza iz domene NBD u domenu TMD (u daljnjem tekstu: NBD-TMD 1) pronađeno je da se vežu energetski najpovoljniji načini vezanja liganada **DAC1**, **DAC3** i **DAC2-amid** (slika 17). Ovo vezno mjesto čini C-kraj zavojnice TMH2, C-terminalni kraj proteina ABCG2 koji je dio zavojnice TMH6b te zavojnica i β lanci iz domene NBD. Za razliku od šupljine 1 koja je pretežito hidrofobna (slika 10), vezno mjesto unutar pozicije NBD-TMD 1 većim dijelom formiraju nabijene aminokiseline (slika 18). Adamantilne skupine bočnih ogranaka konformera liganada **DAC1**, **DAC3** i **DAC2-amid** smještene su u dijelu veznog mjesta unutar pozicije NBD-TMD 1 u kojem se nalaze hidrofobne aminokiseline. Hidrofobne interakcije između adamantilnih skupina i bočnih ogranaka aminokiselina: Val 46, Leu 48, Ser 100, Tyr 654, Tyr 123, Val 125, Ile 456, His 457, Ile 460 stabiliziraju vezanje liganada unutar pozicije NBD-TMD 1.



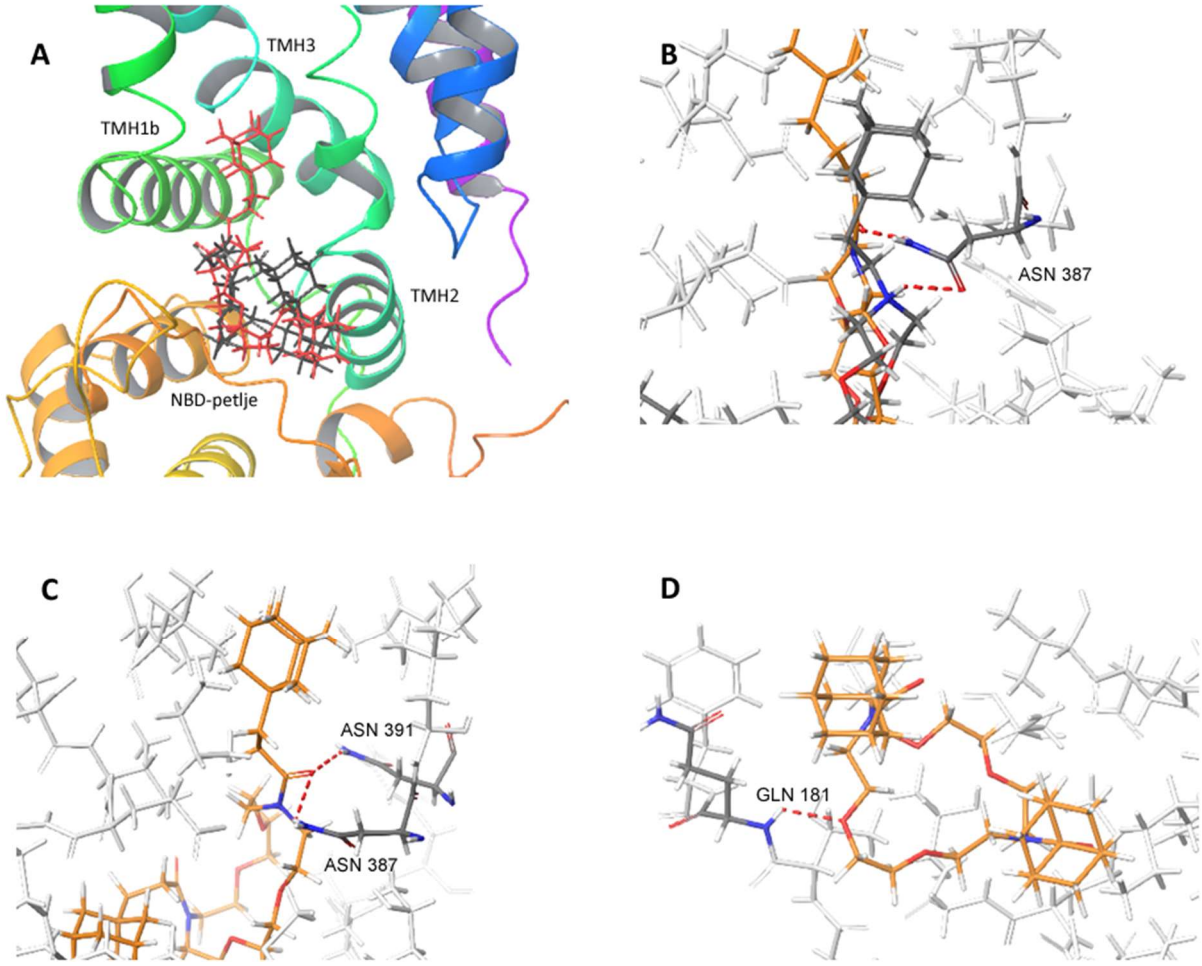
Slika 17. Pozicije vezanja konformera DAC-amina i DAC-amida na prelazu iz domene NBD u domenu TMD dobivene računima molekulskog uklapanja na cijeli protein ABCG2. Sivom bojom označeni su načini vezanja liganada DAC. NBD-TMD 1 označava poziciju vezanja konformera **DAC1**, **DAC3** i **DAC2-amid**, dok NBD-TMD 2 označava poziciju vezanja konformera **DAC2**, **DAC4**, **DAC1-amid**, **DAC3-amid** te **DAC4-amid**.TMH – zavojnica transmembranske domene, NBDH – zavojnica domene NBD, NBDB – β lanci iz domene NBD.



Slika 18. Raspodjela naboja unutar veznih mjesta na prelazu iz domene NBD u domenu TMD dobivena pomoću programa Maestro (Schrödinger, LLC, New York, 2021) (crveno – negativan naboj, bijelo – neutralan naboj, plavo pozitivan naboj). Žutom bojom označeni su vezani ligandi adamantil-supstituirani diaza-krunasti eteri dobiveni računima molekulskog uklapanja liganada na cijeli protein ABCG2.

Računi molekulskog uklapanja pokazali su da se na drugoj poziciji unutar mjesta prijelaza iz domene NBD u domenu TMD (u daljnjem tekstu: NBD-TMD 2) vežu derivati krunastih etera: **DAC2**, **DAC4**, **DAC1-amid**, **DAC3-amid** te **DAC4-amid** (slika 17). Ovo vezno mjesto čine zavojnica TMH1a, C-kraj zavojnice TMH2, zavojnica TMH3, te petlje i zavojnica iz domene NBD (NBDH2). U odnosu na vezno mjesto pozicije NBD-TMD 1, unutrašnjost veznog mjesta pozicije NBD-TMD 2 je većim dijelom hidrofobna (slika 18). Adamantilni bočni ogranci nalaze se u hidrofobnim dijelovima strukture veznog mjesta na poziciji NBD-TMD 2. Konformeri **DAC2**, **DAC4**, **DAC3-amid** te **DAC4-amid** pozicioniraju se tako da im jedan bočni ogranak prodire u samu hidrofobnu unutrašnjost domene TMD do Ala 444 zavojnice TMH2 te Ile 396 zavojnice TMH1b. Drugi bočni ogranak konformera **DAC2**, **DAC4** i **DAC3-amida** pozicionira se u neposrednu okolinu C-terminalnog kraja zavojnice TMH2 dok se drugi bočni ogranak konformera liganda **DAC4-amida** orijentira prema petljama iz domene NBD. Adamantilna grupa jednog bočnog ogranka konformera liganda **DAC1-amid** također zauzima poziciju u neposrednoj okolini C-terminalnog kraja zavojnice TMH2 dok je adamantilna grupa drugog bočnog ogranka okružena petljama domene NBD (slika 19A).

Svi pronađeni konformeri **DAC2, DAC1-amida, DAC3-amida** te **DAC4-amida** koji se vežu unutar NBD-TMD 2 tvore vodikovu vezu s aminokiselinama veznog mjesta. Ligandi **DAC2**, **DAC3-amid** i **DAC4-amid** tvore vodikovu vezu s dušikom Asn 387. Kisik karboksiamidne skupine Asn 387 je akceptor vodikove veze dok je je dušik iz prstena **DAC2** donor. Kod konformera liganda **DAC4-amid**, dušik karboksiamidne skupine Asn 387 je donor vodikove veze, a kisik amidne skupine bočnog ogranka **DAC4-amida** akceptor vodikove veze (slika 19B). DAC 3-amid stvara dvije vodikove veze. Kisik amidne skupine konformera liganda **DAC3-amida** tvori vodikovu vezu s dušikom karboksiamidne skupine dva asparagina, Asn 387 i Asn 391 (slika 19C). Energetski najpovoljniji konformeri liganda **DAC1-amid** stvaraju vodikovu vezu s Gln 181. Dušik α-amino skupine Gln 181 je donor vodikove veze dok je kisik prstena **DAC1-amida** akceptor (slika 19D). Konformeri liganda **DAC4** ne tvore vodikove veze na mjestu vezanja NBD-TMD 2.

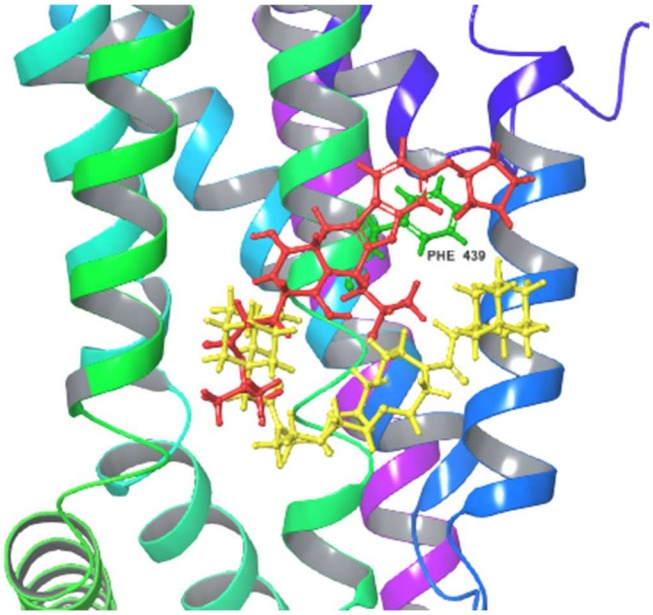


Slika 19. Energetski najpovoljniji načini vezanja konformera **DAC2**, **DAC4**, **DAC1-amid**, **DAC3-amid** te **DAC4-amid** na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD dobiveni simulacijama molekulskog uklapanja na protein ABCG2: A) Položaj **DAC4-amida** (crveno) i **DAC1-amida** (crno) unutar mjestu vezanja NBD-TMD 2. B) Vodikove veze između **DAC2** (sivo) i **DAC4-amida** (narančasto) s Asn 387. C) Vodikova veza između **DAC3-amida** (narančasto) i dva asparagina Asn 387 i Asn 391. D) Vodikova veza između **DAC1-amida** (narančasto) i Gln 181. Aminokiseline veznog mjesta unutar mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD prikazani su bijelom bojom.

3.4.3. Vezanje adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera u šupljinu 1 proteina ABCG2

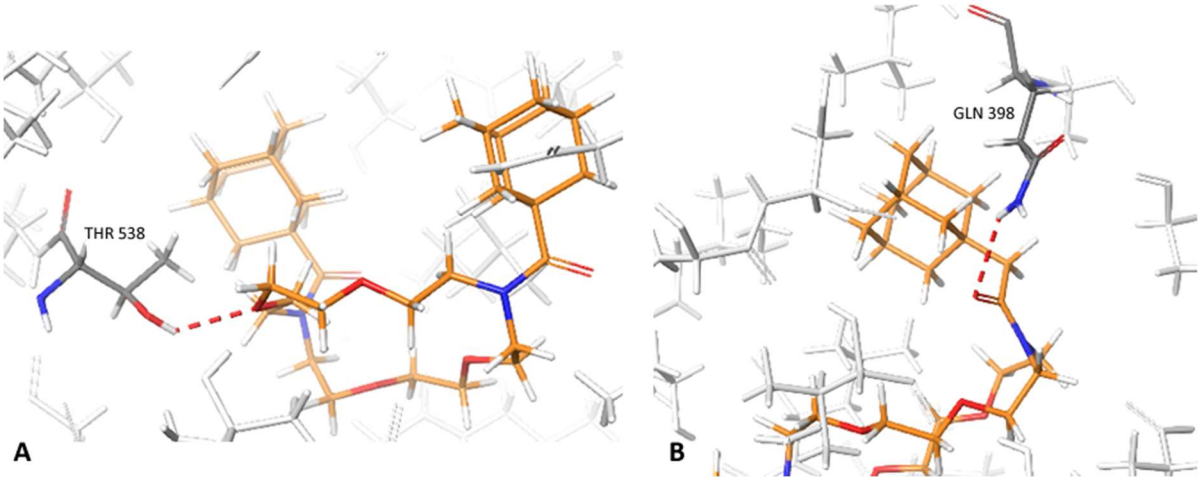
Simulacije molekulskog uklapanja derivata diaza-krunastih etera (DAC) na protein ABCG2 ukazuju da se prilikom vezanja u hidrofobnu šupljinu 1 svi derivati DAC pozicioniraju bliže domeni NBD u odnosu na poznate ligande proteina ABCG2 (slika 20). Inhibitori **FTC**, **Ko143**, **MZ29** i **STI** te supstrat **MIX** pozicioniraju se unutar šupljine 1 tako da im konformeri dopiru minimalno do Phe 439 koji se nalazi u vanjskom sloju stanične membrane dok se većina pronađenih načina vezanja konformera derivata DAC nalazi u relativnoj blizini Phe 439.

Derivati DAC ostvaruju isključivo hidrofobne interakcije s bočnim ogrankom Phe 439. Također, u odnosu na poznate ligande proteina ABCG2, svi derivati DAC, osim **DAC4-amida**, pozicioniraju se u središtu šupljine 1. Konformeri **DAC4-amida** se ne nalaze isključivo u središnjem dijelu šupljine 1 već zbog svoje strukture i veličine zauzimaju veći dio prostora unutar šupljine 1. Iz tog razloga vezanje **DAC4-amida** je slično vezanju inhibitora **STI**.



Slika 20. Razlike u poziciji vezanja inhibitora **MZ29** (crveno) te **DAC4-amida** (žuto) unutar šupljine 1.

Adamantilne skupine bočnih ogranaka DAC-amina i DAC-amida pozicioniraju se na ista mjesta unutar šupljine 1. Aminokiseline s kojima adamantilne skupine svih derivata DAC stupaju u interakciju su: Gln 398, Val 401, Ser 440, Val 442, Thr 532, Thr 538, Leu, 539, Thr 542, Ile 543 i Val 546. Kod najpovoljnijih načina vezanja **DAC4-amida**, jedna adamantilna skupina stupa u interakciju s Phe 182 i Glu 393 koje se nalaze na većoj udaljenosti od središta šupljine 1. Osim hidrofobnih interakcija, energetski najpovoljniji konformeri četiri derivata DAC tvore i vodikove veze. **DAC1**, **DAC3** te **DAC1-amid** tvore vodikovu vezu s Thr 538 (slika 21A). Donor vodikove veze je hidroksilna skupina Thr 538, a akceptor kisik iz prstena krunastog etera **DAC1**, **DAC3** ili **DAC1-amid**. Jedini derivat DAC koji tvori vodikovu vezu s Gln 398 je **DAC2-amid**. Dušik karboksiamidne skupine Gln 398 je donor, a kisik amidne skupina bočnog ogranka **DAC2-amida** je akceptor vodikove veze (slika 21B).



Slika 21. Energetski najpovoljniji načini vezanja **DAC1-amida** i **DAC2-amida** dobiveni simulacijama molekulskog uklapanja na protein ABCG2: A) **DAC1-amid** (narančasto) tvori vodikovu vezu s Thr 538 (sivo). Hidroksilna skupina Thr 538 je donor vodikove veze, a kisik prstena **DAC1-amida** je akceptor vodikove veze. B) **DAC2-amid** (narančasto) tvori vodikovu vezu s Gln 398 (sivo). Dušik karboksiamidne skupine Gln 398 je donor vodikove veze, a kisik amidne skupine bočnog ogranka **DAC2-amida** je akceptor vodikove veze. Vodikova veza označena je crvenom isprekidanom linijom, a aminokiseline veznog mjesta unutar šupljine 1 prikazani su bijelom bojom.

4. Rasprava

4.1. Mjesta vezanja liganada unutar proteina ABCG2

Istraživanje vezanja adamantil supstituiranih diaza-krunastih etera na protein ABCG2 provedeno je korištenjem simulacija molekulskog uklapanja liganada na pet modela proteina ABCG2. Za validaciju rezultata vezanja adamantil-supstituiranih diaza-kruna etera napravljeni su dodatni računi molekulskog uklapanja s poznatim inhibitorima: **FTC**, **Ko143**, **MZ29** i **STI** te poznatim supstratom **MIX**. Četiri od pet korištenih modela proteina ABCG2 zauzima konformaciju okrenutu prema unutarstaničnom prostoru odnosno prema citosolu. Jedan od modela proteina koji se nalazi u konformaciji okrenutoj prema unutarstaničnom prostoru dobiven je krio-elektronskom mikroskopijom (krio-EM) s vezanim supstratom **MIX** dok su drugi modeli dobiveni krio-EM s vezanim inhibitorom **MZ29** ili **STI**. Rezultati molekulskog uklapanja provedeni na sva četiri modela bili su identični što ukazuje na to da se konformacija aminokiselina unutar veznih mjesta na proteinu ABCG2 ne razlikuje značajno između struktura proteina s vezanim inhibitorom i supstratom.

Najveći broj pronađenih načina vezanja konformera DAC-amina i DAC-amida nalazi se na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD, dok se većina pronađenih načina vezanja poznatih inhibitora i supstrata nalazi u hidrofobnoj šupljini 1. Recentna istraživanja na mutantima proteina ABCG2 pokazala su da zavojnica TMH1a te C- kraj zavojnice TMH2 koji se nalaze na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD imaju funkcionalno jako bitnu ulogu. Zavojnica TMH1a, C-kraj zavojnice TMH2 te okolne petlje iz domene NBD čine tzv. transmisijsko sučelje koje sudjeluju u prepoznavanju te usmjeravanju supstrata unutar šupljine 1 koja čini domenu vezanja supstrata (Orlando i Liao 2020).

Zadnji korišteni model proteina ABCG2 predstavlja apo-oblik proteina ABCG2 koji zauzima konformaciju okrenutu prema izvanstaničnom prostoru. Budući da su u ovoj konformaciji zavojnice TMH5a pomaknute prema zavojnicama TMH1b, šupljina 1 je zatvorena i onemogućeno je vezanje supstrata. Ova činjenica potvrđena je simulacijama molekulskog uklapanja u kojima niti jedan dobiveni način vezanja liganada na modelu apo-proteina ABCG2 nije bio pozicioniran unutar šupljine 1. Većina načina vezanja nalazila se na vanjskoj strani domene TMD ili domene NBD. Vanjska strana domene TMD se u realnim sustavima nalazi unutar stanične membrane zbog čega nije moguće vezanje liganada za taj dio proteina.

4.2. Energije vezanja liganada na protein ABCG2

Energetski najpovoljniji načini vezanja DAC-amida i poznatih liganada proteina ABCG2 pronađeni su unutar šupljine 1, dok su najpovoljniji načini vezanja DAC-amina pronađeni na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD (tablica 3). Rezultati molekulskog uklapanja koji obuhvaćaju samo šupljinu 1 proteina ABCG2 pokazuju da je afinitet vezanja DAC-amida povoljniji nego afinitet vezanja inhibitora **MZ29**, **FTC** i **Ko143**, DAC-amina i liganda **MIX** (tablica 3). Afinitet vezanja poznatog supstrata **MIX** imao je najveću energiju vezanja tijekom oba računa molekulskog uklapanja.

Istraživanja su pokazala da DAC-amidi za razliku od DAC-amina imaju sposobnost inhibicije proteina ABCG2 te da je najpotentniji inhibitor među DAC-amidima **DAC2-amid**, nakon kojeg slijede redom **DAC3-amid**, **DAC1-amid** te **DAC4-amid** (Guberović i sur. 2018). Dobivene vrijednosti energije vezanja potvrđuju činjenicu da DAC-amidi imaju veći afinitet za protein ABCG2 od DAC-amina, ali se istovremeno te vrijednosti energije ne slažu s realnom snagom inhibicije pojedinih DAC-amida. Energije dobivene molekulskim uklapanjem ukazuju da **DAC3-** i **DAC1-amid** imaju veći afinitet vezanja za protein ABCG2 te bi shodno tome trebali biti bolji inhibitori od **DAC2-amida**, ali i već poznatih snažnih inhibitora **MZ29**, **FTC** i **Ko143**. Međutim, u živim stanicama i organizmima afinitet vezanja nije jedini kriterij za efikasnost nekog lijeka i neispravno je očekivati da bi svi DAC-amidi bili bolji inhibitori. Ostali faktori kao što su mehanizam ulaska lijeka u stanicu te toksičnost za živi organizam također igraju važnu ulogu u tome hoće li neki spoj biti efikasan lijek.

4.3. Vezanje poznatih inhbiotra FTC, Ko143, MZ29 i STI te supstrata MIX u šupljinu 1 proteina ABCG2

Kako bi se dobio uvid u načine na koje se različiti poznati ligandi vežu unutar šupljine 1 provedene su simulacije uklapanja s inhibitorima **FTC**, **Ko143**, **MZ29** i **STI** te supstratom **MIX** proteina ABCG2. Prilikom vezanja u šupljinu 1 svi ligandi stupaju u interakciju s aminokiselinama zavojnica TMH5a i TMH2. Najpovoljniji načini vezanja svih poznatih liganada tvore π-π interakcije naslagivanja s Phe 439.

Spojevi **Ko143** i **MZ29** su derivati spoja **FTC** koji se razlikuju u supstituentima na poziciji C-3 i C-9. Heteropentaciklički dio strukture konformera liganada **FTC** i **Ko143** unutar šupljine 1 je više planaran u odnosu na heteropentaciklički dio strukture konformera liganda **MZ29** koji se nalaze u savijenoj konformaciji. Razlog tomu je što ligand **MZ29** tvori

intramolekulsku vodikovu vezu između kisika karboksilatne skupine propanoata i dušika pirazinskog prstena koja stabilizira savijeno konformacijsko stanje. Rezultati molekulskog uklapanja ukazuju da ligand **MZ29** ima povoljniji afinitet vezanja za protein ABCG2 u odnosu na njegove strukturne analoge što je u korelaciji s eksperimentalnim podacima koji pokazuju da **MZ29** ima značajnije veću sposobnost inhibicije proteina ABCG2 (Jackson i sur. 2018). Mogući razlog tomu je što osim π-π interakcije naslagivanja s Phe 439, konformeri liganda **MZ29** jedini tvore vodikovu vezu s Asn 436 koji ima bitnu ulogu u prepoznavanju i transportu supstrata unutar šupljine 1 (Manolaridis i sur. 2018).

Spoj mitoksantron (**MIX**) je lijek koji se koristi u kemoterapiji te je jedan od mnogih supstrata koje protein ABCG2 izbacuje van stanice. Osnovu strukture liganda **MIX** čini antracen koji je planaran i veoma rigidan zbog čega se konformeri liganda **MIX** razlikuju samo u položaju 6-hidroksi-1,4-diazaheksilnih bočnih ogranaka. Računi molekulskog uklapanja koji obuhvaćaju cijeli protein ABCG2 i samo šupljinu 1 pokazali su različite rezultate načina vezanja liganda **MIX**. S jedne strane, molekulskim uklapanjem koje obuhvaća cijeli protein pronađeni su načini vezanja konformera liganda **MIX** koji se vežu na identičnu poziciju kao i heterociklički spojevi **FTC**, **Ko13** i **MZ29**. Ovi konformeri liganda **MIX** uz π-π interakcije naslagivanja s Phe 439 tvore i vodikovu vezu s Phe 432. S druge strane, molekulskim uklapanjem koje obuhvaća samo šupljinu 1 dobiveno je da se konformeri liganda **MIX** pozicioniraju bliže domeni NBD. Na ovoj poziciji konformeri liganda **MIX** ne tvore π-π interakcije naslagivanja s Phe 439, ali tvore vodikovu vezu s Asn 436. Budući da je **MIX** supstrat proteina ABCG2, moguće je da molekule **MIX** stvaraju kratkotrajne interakcije na obje pozicije unutar šupljine 1 tijekom katalitičkog ciklusa transporta. Razlike u pozicijama tijekom računa molekulskog uklapanja mogu biti rezultat ograničenosti kretanja liganda u drugom računu molekulskog uklapanja u kojem je korištena manja mreža za pretraživanje načina vezanja.

Imatinib (**STI**) je spoj koji se također primjenuje u kemoterapiji kao jaki inhibitor tirozinskih kinaza. Nedavno je otkriveno da **STI**, osim što inhibira tirozinske kinaze, onemogućava prijenos drugih kemoterapeutika preko proteina ABCG2. **STI** je benzamid dobven kondenzacijom karboksi skupine 4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-benzojeve kiseline s primarnom aromatskom amino skupinom 4-metil-N(3)-[4-(piridin-3-il)pirimidin-2-il]benzen-1,3-diamina. Zbog svoje veličine, ali i konformacije koju zauzima unutar šupljine 1, ligand **STI**, se za razliku od ostalih spojeva proteže cijelom širinom šupljine 1 i stupa u interakciju s više bočnih ogranaka aminokiselina. Ovakav položaj liganda **STI** unutar šupljine 1 mogao bi

objasniti zašto su računi molekulskog uklapanja pokazali da je afinitet vezanja liganda **STI** energetski povoljniji od ostalih poznatih liganada.

4.4. Stvaranje intramolekulskih vodikovih veza prilikom vezanja admantil-supstituiranih diaza-krunastih etera za protein ABCG2

Simulacije vezanja adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera (DAC) na protein ABCG2 pokazale su da svi konformeri liganada DAC-amina ostvaruju intramolekulske vodikove veze. Za razliku od njih, DAC-amidi ne tvore intramolekulske vodikove veze jer dušik amidne veze ne može biti donor vodikove veze. Posljedica stvaranja intramolekulskih vodikovih veza je da DAC-amini zauzimaju zatvorenije konformacije u kojoj se adamantilne grupe bočnih ogranaka nalaze međusobno u neposrednoj blizini. Položaj bočnih ogranaka DAC-amida ovisi prvenstveno o amidnoj vezi koja ima karakter parcijalne dvostruke veze što joj onemogućuje slobodnu rotaciju. Broj atoma ugljika u bočnim ograncima DAC-amida također utječe na međusobni položaj bočnih ogranaka. Iz tog razloga ligandi **DAC2-** i **DAC4-amidi** zauzimaju otvoreniju konformaciju u kojoj su adamantilne skupine bočnih ogranaka odmaknute jedna od druge, dok **DAC1-** i **DAC3-amidi** zauzimaju konformaciju koja je zatvorenija i sličnija DAC-aminima.

4.5. Vezanje adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera na protein ABCG2

Najveći broj načina vezanja DAC-amina i DAC-amida pronađen je na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD. Unatoč tome što je mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD pretežito hidrofilno, struktura DAC-amina i DAC-amida omogućava da se hidrofobne adamantilne skupine pozicioniraju u hidrofobno okružje unutar mjesta prijelaza iz domene NBD u domenu TMD. Budući da mjesto prijelaza iz domene NBD u domenu TMD odnosno transmisijsko sučelje sudjeluje u selekciji supstrata te prijenosu supstrata u domenu TMD, prepoznavanje ove funkcionalne domene kao potencijalnog mjesta vezanja liganada nije bilo neočekivano. Na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD konformeri **DAC3-amida** i **DAC4-amida** tvore vodikovu vezu s Asn 387 dok konformeri **DAC1-amida** tvore vodikovu vezu s Gln 181. Aminokiselin Asn 387 je dio zavojnice TMH1a i ima značajnu ulogu za funkcioniranje transmisijskog sučelja.

Nadalje, načini vezanja DAC-amina i DAC-amida koji su pozicionirani unutar šupljine 1 većinom stupaju u interakciju s identičnim aminokiselinama kao i poznati inhibitori i supstrat. Najveća razlika u vezanju derivata DAC unutar šupljine 1 u odnosu na ostale istražene ligande

jest što se derivati DAC nalaze puno pliće unutar šupljine 1 (bliže domeni NBD) te ne ostvaruju značajnije interakcije s bočnim ogrankom Phe 439. Većina interakcija između konformera derivata DAC je hidrofobne prirode, no četiri derivata DAC tvore i vodikove veze unutar šupljine 1. Spojevi **DAC1**, **DAC3** i **DAC1-amid** tvore vodikove veze s Thr 538. Budući da su eksperimenti pokazali kako **DAC1** i **DAC3** nisu ni supstrati ni inhibitori proteina ABCG2 u realnom sustavu interakcija između **DAC1** ili **DAC3** s Thr 538 ne bi bila moguća. Spoj **DAC2-amid** također tvori vodikovu vezu unutar šupljine 1 s Gln 398 koji je dio zavojnice TMH1b. Simulacije molekulskog uklapanja liganada koje obuhvaćaju cijeli protein ABCG2 pokazale su da najpovoljniju energiju vezanja ima konformer liganda **DAC4-amid** koji se poput liganda **STI** proteže skoro cijelom širinom šupljine 1.

DAC-amidi pokazuju međusobno identične afinitete i načine vezanja unutar šupljine 1 i na prijelaza iz domene NBD u domenu TMD, ali je njihov način vezanja unutar šupljine 1 različit od načina vezanja poznatih inhibitora. Iz tog razloga iako su eksperimenti pokazali sposobnost DAC-amida kao potencijalnih inhibiotra proteina ABCG2, analiza računa molekulskog uklapanja nije dostatna da bi se nedvojbeno predložio koji je točno mehanizam kojim DAC-amidi inhibiraju aktivnost proteina ABCG2. Dva su izgledna načina na koja DAC-amidi inhibiraju protein ABCG2: 1) DAC-amidi vežu se za transmisijsko sučelje čime sprječavaju katalitičku aktivnost proteina ABCG2 te unos supstrata u šupljinu 1 i 2) Transmisijsko sučelje prepoznaje DAC-amide kao supstrate i unosi ih u šupljinu 1, a vezanje DAC-amida unutar šupljine 1 onemogućava katalitičku aktivnost proteina ABCG2.

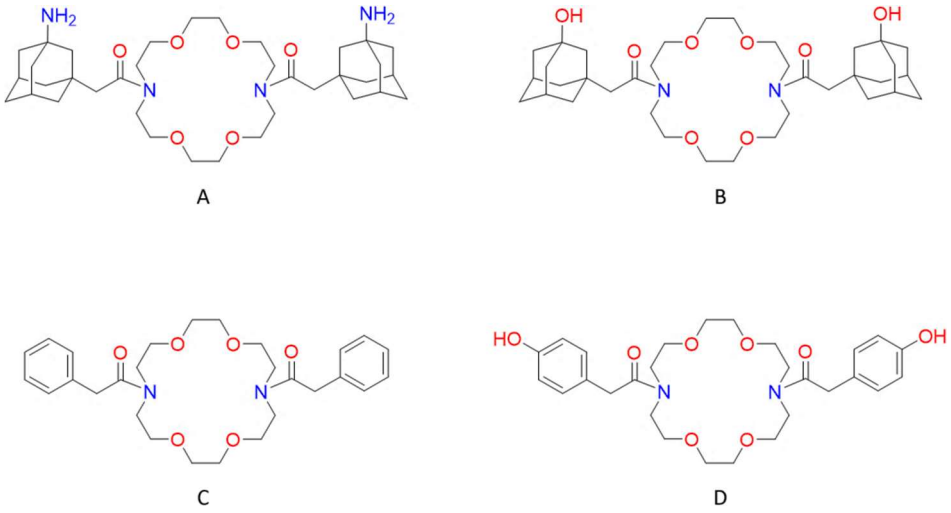
4.6. Prijedlog strukturnih modifikacija s ciljem dizajna novih spojeva poboljšane aktivnosti

Recentna istraživanja admantil-supstituiranih diaza-krunastih etera (DAC) pokazala su da spojevi DAC-amidi imaju potencijal inhibicije proteina ABCG2. Kao najpotentniji inhibitor među istraženim DAC-amidima pokazao se **DAC2-amid**, nakon kojeg slijede redom **DAC3-amid**, **DAC1-amid** te **DAC4-amid**. Simulacije molekulskog uklapanja, provedene u sklopu ovog diplomskog rada, su također potvrdile da DAC-amidi imaju povoljniji afintet vezanja na protein ABCG2 od DAC-amina, ali i od poznatih inhibitora **MZ29**, **Ko143** te **FTC**.

Unatoč tome što su DAC-amidi pokazali mogućnost inhibicije proteina ABCG2, slaba topljivost ovih spojeva značajno utječe na njihovu potencijalnu efikasnost u kliničkoj uporabi. Glavni uzrok slabe topljivosti je hidrofobna admantilna skupina bočnog ogranka. Dodatak amino ili hidroksilne skupine na adamantilnu skupinu (slika 22A i 22B) mogao bi poboljšati

topljivost spojeva DAC-amida te bi istovremeno mogao poboljšati selektivnost vezanja spojeva unutar šupljine 1 ili transmisijskog sučelja.

Literaturno poznati inhibitori **FTC**, **MZ29**, **Ko143** te **STI** pozicioniraju se duboko unutar šupljine 1 te tvore π-π interakcije naslagivanja s Phe 439 dok su konformeri DAC-amida pozicionirani pliće unutar šupljine 1 te ne ostvaruju značajnije interakcije s Phe 439. Zamjena hidrofobne adamantilne skupine s aromatskom skupinom (slika 22C) mogla bi rezultirati stvaranjem stabilizirajućih π-π interakcija naslagivanja s Phe 439 te tako poboljšati afinitet vezanja diaza-krunastih etera unutar šupljine 1. I za kraj, dodatak hidroksilne skupine na aromatsku skupinu (slika 22D) mogao bi potencijalno osigurati bolju topljivost ovih derivata diaza-krunastih etera što bi također poboljšalo njihov inhibitorni učinak.



Slika 22. Prijedlog novih derivata diaza-krunastih etera za buduća istraživanja vezanja liganada na protein ABCG2

5. Zaključak

Istraživanje vezanja adamantil-supstituiranih diaza-krunastih etera (DAC) na protein ABCG2 pokazalo je da se najveći broj načina vezanja DAC-amina i DAC-amida pozicionira na mjestu prijelaza iz domene NBD u domenu TMD u tzv. transmisijsko sučelje. Najpovoljniji načini vezanja DAC-amina pozicionirani su u transmisijskom sučelju dok se najpovoljniji načini vezanja DAC-amida nalaze unutar šupljine 1. Za razliku od spojeva DAC, rezultati molekulskog uklapanja poznatih inhibitora **FTC**, **Ko143**, **MZ29** i **STI** te supstrata **MIX** ukazuju da se svi pronađeni načini vezanja ovih liganada nalaze unutar šupljine 1. Iz dobivenih energije vezanja možemo zaključiti da najmanji afinitet vezanja za protein ABCG2 imaju DAC-amini te supstrat **MIX** dok najveći afinitet vezanja za protein ABCG2 imaju spojevi **DAC3-** i **DAC1-amid**. Spojevi **DAC3-** i **DAC1-amid** bi shodno tome trebali biti bolji inhibitori od **DAC2-** i **DAC4-amida**, ali i već poznatih snažnih inhibitora **MZ29**, **FTC** i **Ko143**. Međutim, energija vezanja dobivena simulacijama molekulskog uklapanja nije jedini kriterij za efikasnost inhibitora u realnom sustavu.

Unutar šupljine 1 svi poznati ligandi proteina ABCG2 stvaraju π-π interakcije naslagivanja s Phe 439. Osim π-π interakcija naslagivanja, ligandi **MZ29** i **MIX** unutar šupljine 1 tvore i vodikove veze s Asn 436. Konformeri DAC-amida i DAC-amina koji se nalaze unutar šupljine 1 većinom stupaju u interakciju s identičnim aminokiselinama kao i poznati ligandi proteina ABCG2. Glavna razlika u vezanju spojeva DAC unutar šupljine 1, u odnosu na druge istražene ligande proteina ABCG2, jest što se spojevi DAC vežu pliće unutar šupljine 1 (bliže domeni NBD) te ne ostvaruju značajne interakcije s Phe 439 niti s Asn 436. Većina interakcija između konformera spojeva DAC unutar šupljine 1 je hidrofobne prirode.

Budući da se DAC-amidi drugačije vežu unutar šupljine 1 te pokazuju međusobno identične afinitete za vezanje unutar šupljine 1 i transmisijskog sučelja, analiza rezultata molekulskog uklapanja nije dostatna da bi se pouzdano moglo reći na koji način DAC-amidi stupaju u interakciju s proteinom ABCG2. Stoga je potrebno napraviti dodatne eksperimente kako bi se ustvrdio mehanizam kojim DAC-amidi inhibiraju aktivnost proteina ABCG2.

6. Literatura

Anandakrishnan R., Aguilar B., Onufriev A. V. (2012): H++ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. Nucleic Acids Res. **40**: W537-541.

Becker O.M., MacKerell Jr A.D., Roux B., Masakatsu W. (2001): Computational Methods. Comput. Biochem. Biophys. 1–169.

Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. (2000): The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res. **28**: 235–242.

Cramer C.J. (2004): Molecular mechanics. Essentials Comput. Chem. 17–67.

Eckenstaler R., Benndorf R.A. (2020): 3D structure of the transporter ABCG2—What's new? Br. J. Pharmacol. **177**: 1485–1496.

Fetsch P.A., Abati A., Litman T., Morisaki K., Honjo Y., Mittal K., Bates S.E. (2006): Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. Cancer Lett. **235**: 84–92.

Gokel G.W., Leevy W.M., Weber M.E. (2004): Crown ethers: Sensors for ions and molecular scaffolds for materials and biological models. Chem. Rev. **104**: 2723–2750.

Guberović I., Marjanović M., Mioč M., Ester K., Martin-Kleiner I., Šumanovac Ramljak T., Mlinarić-Majerski K., Kralj M. (2018): Crown ethers reverse P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells. Sci. Rep. **8**: 1–14.

Gunsteren W.F. Van, Bakowies D., Baron R., Chandrasekhar I., Christen M., Daura X., Gee P., Geerke D.P., Glättli A., Hünenberger P.H., Kastenholz M.A., Oostenbrink C., Schenk M., Trzesniak D., Vegt N.F.A. Van Der, Yu H.B. (2006): Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives. Angew. Chemie - Int. Ed. **45**: 4064–4092.

Hall J.E. (2016): Transport of Oxygen and Carbon Dioxide in Blood and Tissue Fluids. Guyt. Hall Textb. Med. Physiol. 521–537.

Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996): VMD: Visual molecular dynamics. J. Mol. Graph. **14**: 33–38.

Ishikawa T., Aw W., Kaneko K. (2013): Metabolic interactions of Purine derivatives with human ABC transporter ABCG2: Genetic testing to assess gout risk. Pharmaceuticals **6**:

1347–1360.

Jackson S.M., Manolaridis I., Kowal J., Zechner M., Taylor N.M.I., Bause M., Bauer S., Bartholomaeus R., Bernhardt G., Koenig B., Buschauer A., Stahlberg H., Altmann K.H., Locher K.P. (2018): Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2. Nat. Struct. Mol. Biol. **25**: 333–340.

Jensen F. (2017a): Force Field Methods. Introd. to Comput. Chem. 20–82.

Jensen F. (2017b): Optimization Techniques. Introd. to Comput. Chem. 404–444.

Khunweeraphong N., Stockner T., Kuchler K. (2017): The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion. Sci. Rep. **7**: 1–15.

Kim S., Chen J., Cheng T., Gindulyte A., He J., He S., Li Q., Shoemaker B.A., Thiessen P.A., Yu B., Zaslavsky L., Zhang J., Bolton E.E. (2021): PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces. Nucleic Acids Res. **49**: D1388–D1395.

Kralj M., Tušek-Božić L., Frkanec L. (2008): Biomedical Potentials of Crown Ethers: Prospective Antitumor Agents. ChemMedChem **3**: 1478–1492.

Manolaridis I., Jackson S.M., Taylor N.M.I., Kowal J., Stahlberg H., Locher K.P. (2018): Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states. Nature **563**: 426–430.

Mo W., Zhang J.T. (2012): Human ABCG2: Structure, function, and its role in multidrug resistance. Int. J. Biochem. Mol. Biol. **3**: 1–27.

Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. (2009): AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J. Comput. Chem. **30**: 2785–2791.

Orlando B.J., Liao M. (2020): ABCG2 transports anticancer drugs via a closed-to-open switch. Nat. Commun. **11**: 1–11.

Özvegy C., Litman T., Szakács G., Nagy Z., Bates S., Váradi A., Sarkadi B. (2001): Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. **285**: 111–117.

Pedersen C.J. (1967): Cyclic Polyethers and Their Complexes with Metal Salts. J. Am. Chem. Soc. **89**: 7017–7036.

Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. (2004): UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. J. Comput. Chem. **25**: 1605–1612.

Rabindran S.K., He H., Singh M., Brown E., Collins K.I., Annable T., Greenberger L.M. (1998): Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. Cancer Res. **58**: 5850–5858.

Robey R.W., Pluchino K.M., Hall M.D., Fojo A.T., Bates S.E., Gottesman M.M. (2018): Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. Nat. Rev. Cancer **18**: 452–464.

Salentin S., Schreiber S., Haupt V.J., Adasme M.F., Schroeder M. (2015): PLIP: Fully automated protein-ligand interaction profiler. Nucleic Acids Res. **43**: W443–W447.

Schrödinger Release 2021-1 Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.

Søndergaard C.R., Olsson M.H.M., Rostkowski M., Jensen J.H. (2011): Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of p K a values. J. Chem. Theory Comput. **7**: 2284–2295.

Taylor N.M.I., Manolaridis I., Jackson S.M., Kowal J., Stahlberg H., Locher K.P. (2017): Structure of the human multidrug transporter ABCG2. Nature **546**: 504–509.

Toyoda Y., Takada T., Suzuki H. (2019): Inhibitors of human ABCG2: From technical background to recent updates with clinical implications. Front. Pharmacol. **10**: 208.

Trott O., Olson A.J. (2009): AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J. Comput. Chem. **31**: 455–461.

Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., Beer T.A.P. De, Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. (2018): SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic Acids Res. **46**: W296–W303.

Williams C.J., Headd J.J., Moriarty N.W., Prisant M.G., Videau L.L., Deis L.N., Verma V., Keedy D.A., Hintze B.J., Chen V.B., Jain S., Lewis S.M., Arendall W.B., Snoeyink J., Adams P.D., Lovell S.C., Richardson J.S., Richardson D.C. (2018): MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. Protein Sci. **27**: 293–

315.

Wright J., Muench S.P., Goldman A., Baker A. (2018): Substrate polyspecificity and conformational relevance in ABC transporters: New insights from structural studies. Biochem. Soc. Trans. **46**: 1475–1484.

7. Životopis

Rođena sam 23.07.1997. godine u Rijeci, gdje sam završila osnovnu školu i Prirodoslovno-matematičku Gimnaziju Andrije Mohorovičića Rijeka. Preddiplomski studij molekularne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2016.godine. Zvanje prvostupnika molekularne biologije stekla sam 2019. godine nakon čega upisujem Diplomski studij molekularne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme diplomskog studija bila sam na stručnom usavršavanju na Institutu za Biofiziku Sveučilišta Johannes Kepler Linz. Članica sam planinarske sekcije Kluba Studenata Elektrotehnike (KSET) te u slobodno vrijeme planinarim.