

# УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ - ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

### КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

**Предмет:** Извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата магистра фармације Немање Ђоковића

На седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета, одржаној 18.05.2023. године, Одлуком број 1150/2 именовани су чланови Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације, кандидата маг. фарм. Немање Ђоковића, под насловом:

**„Симулације молекулске динамике, дизајн, синтеза и *in vitro* испитивање инхибитора епигенетских протеина као потенцијалних антинеопластика“**

у следећем саставу:

1. Др сц. Славица Ољачић, доцент, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
2. Др сц. Милош Петковић, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
3. Др сц. Татјана Срдић-Рајић, научни саветник, Институт за онкологију и радиологију Србије

Прегледала је приложену дисертацију и подноси Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета следећи извештај.

# Извештај

## 1. Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација маг. фарм. Немање Ђоковића, под називом: „**Симулације молекулске динамике, дизајн, синтеза и *in vitro* испитивање инхибитора епигенетских протеина као потенцијалних антинеопластика**“, написана је на 190 страна са једноструким проредом и организована у 7 целина: Увод (35 страна), Циљеве истраживања (1 страна), Материјали и методе (17 страна), Резултати и дискусија (57 страна), Закључак (3 стране), Литература (24 стране) и Прилози (42 стране). На почетку докторске дисертације приказан је сажетак на српском и енглеском језику и садржај поглавља/потпоглавља, а на крају кратка биографија кандидата и потписане изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације. Дисертација је написана јасним и прегледним стилем и садржи 57 слика/графика и 10 табела. Преглед литературе садржи 358 навода.

- **Увод докторске дисертације** описује проблематику и значај имплементације конформационе динамике протеина у изучавању протеин-лиганд интеракције са аспекта рационалног дизајна нових лекова. У првом делу увода приказани су теоријски принципи симулација молекулске динамике (*MD*) уз критички осврт на недостатке *MD* методе у погледу ограниченог узорковања ретких догађаја. У наставку, представљен је теоријски концепт метадинамичке симулације као методе за побољшано узорковање ретких догађаја. У другом делу увода описан је значај термодинамичких разматрања у рационалном дизајну лекова базираном на познавању *3D*-структуре циљног места, представљени су теоријски концепти молекулског докинга, виртуелног скрининга базираног на познавању *3D*-структуре циљног места (*SBVS*) као и основи разматрања статистичке термодинамике у рачунању слободних енергија везивања. У трећем делу увода дат је преглед рачунарских метода у дизајну лекова заснованог на познавању структуре лиганда – метода испитивања квантитативног односа структуре и активности (*QSAR*) и метода виртуелног скрининга заснованог на познавању структуре лиганда (*LBVS*). Поред тога, дат је и преглед основних фингерпринтова, алгоритама машинског учења као и осврт на значај примене метода машинског учења у имплементацији великих сетова података о структури и активности у савременом открићу лекова. У четвртном делу увода описан је значај епигенетских циљних места у развоју антинеопластика. У овом делу су представљени сиртуин 2 (*SIRT2*) и *WD*-понављајући домен 5 протеин (*WDR5*) као два значајна циљна места за развој нових антинеопластика уз посебан осврт на структуру циљних места и значај разматрања конформационе динамике у дизајну нових инхибитора ова два протеина. У последњем делу увода описан је значај биоинформатике у открићу нових циљних места дејства лекова.
- Основни **циљ докторске дисертације** је био развијање нових протокола за рачунарско дизајнирање инхибитора *SIRT2* и *WDR5* кроз имплементацију информација из великих база података и/или молекулских симулација, као и

експериментална валидација протокола синтезом и *in vitro* биолошким тестирањима нових инхибитора. Додатни циљ истраживања спроведених у оквиру ове докторске дисертације био је и постављање будућих смерница за развој дуалних инхибитора хистон-деацетилаза (укључујући сиртуине) кроз биоинформатичку анализу нових циљних места. У оквиру овог дела дисертације, приказано је 8 специфичних потциљева. Први потциљ се односи на развој протокола биомолекулских симулација за детаљно описивање конформационе динамике *SIRT2* и откриће алтернативних конформационих стања протеина релевантних за откриће нових инхибитора *SIRT2*. Други потциљ се односи на развој и експерименталну валидацију *SBVS* модела заснованог на алтернативним конформационим стањима *SIRT2* са посебним освртом на претрагу неистражених делова хемијског простора *SIRT2* инхибитора. Трећи потциљ подразумева развој и валидацију *in silico* платформе за рационални дизајн нових селективних *SIRT2* инхибитора применом *QSAR* модела формираних помоћу великих сетова података и применом савремених алгоритама машинског учења. Четврти потциљ се односи на синтезу и *in vitro* ензимска и ћелијска испитивања нових *SIRT2* инхибитора дизајнираних на основу резултата проспективног *SBVS* и/или модела квантитативног односа структуре и активности/селективности. Пети потциљ подразумева карактеризацију конформационог понашања *WDR5* у присуству оптофармаколошких пептидомиметских инхибитора, применом метода симулација молекулске динамике, као и постављање протокола за дизајн нових представника применом прорачуна слободне енергије везивања. Шести потциљ говори о квантификацији енергетских промена везаних за процес фотоизомеризације испитиваног пептидомиметског инхибитора *WDR5* применом метадинамичких симулација. Седми потциљ се односи на успостављање модела алостерне комуникације два везивна места у оквиру *WDR5*, док осми потциљ представља откриће нових циљних места за развој дуалних инхибитора хистон-деацетилаза (*HDAC*) кроз развој биоинформатичког протокола за предвиђање синергизама између инхибитора фамилије хистон-деацетилаза (укључујући сиртуине) и познатих биоактивних једињења.

- **Материјал и методе** су приказани кроз детаљне описе рачунарских и експерименталних методологија, као и прегледа коришћених софтверских пакета, лабораторијске опреме и хемикалија. Материјали и методе су организовани у три поглавља. У првом поглављу су приказане методе примењене у рационалном дизајну *SIRT2* инхибитора укључујући методе за развој параметара молекулско-механичких поља силе *SIRT2* инхибитора, протоколи за *MD* симулације и анализу добијених трајекторија, методе употребљене за развој протокола побољшаног узорковања конформационих стања везивног места *SIRT2*, као и методе за постављање и валидацију протокола *SBVS*. У оквиру истог поглавља приказани су критеријуми за одабир једињења у оквиру сетова података употребљених за развој модела квантитативних односа структуре и активности/селективности, као и детаљни протоколи и алгоритми употребљени за формирање и валидацију ових модела и

њихову имплементацију у оквиру *in silico* платформе. У наставку истог поглавља, приказани су материјали и процедуре органских синтеза нових *SIRT2* инхибитора, као и детаљан опис *in vitro* тестирања нових *SIRT2* инхибитора применом *SIRT1*, *SIRT2* и *SIRT6* ензимских есеја. Приказани су протоколи *in vitro* испитивања на хуманој ћелијској линији пореклом из аденокарцинома дојке *MDA-MB-231* и то: протокол за испитивање утицаја новог *SIRT2* инхибитора на вијабилност (*MTT* тест), протокол за испитивање утицаја новог *SIRT2* инхибитора на индукцију апоптозе (цитометријски тест двоколорног бојења коришћењем анексина и *7AAD* боје), протокол за испитивање утицаја новог *SIRT2* инхибитора на промене у ћелијском циклусу (цитометријски тест коришћењем пропидијум јодида) и протокол за испитивање утицаја новог *SIRT2* инхибитора на промене у експресији *E*-кадхерина. У оквиру другог поглавља, приказане су структуре пептидомиметских фотореактивних *WDR5* инхибитора употребљених у истраживању и детаљни протоколи за фрагментни молекулски докинг пептидомиметских инхибитора, протокол симулација молекулске динамике употребљеног за испитивање структуре комплекса *WDR5* и подгрупе линеарних пептидомиметских инхибитора, као и протокол за *MM/PBSA* (eng. *Molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area – MM/PBSA*) прорачуне слободне енергије везивања линеарних пептидомиметских инхибитора. У наставку истог поглавља, приказани су протоколи класичних *MD* симулација, *MD* симулација променевиог дијабатског потенцијала и протокол добро темпериране метадинамичке симулације употребљених за изучавање конформационе динамике интеракције *WDR5* и цикличног пептидомиметског инхибитора. Детаљно су представљени и сви алати употребљени у анализи алостерне комуникације унутар *WDR5*. У трећем поглављу приказане су методе и базе података употребљене за развој биоинформатичког протокола за идентификацију нових циљних места у развоју дуалних инхибитора хистон-деацетилаза. Приказани су материјали и методе за испитивање ефеката комбинација *HDAC* инхибитора са *ROCK1/2* (eng. *Rho-associated protein kinase – ROCK*) inhibitorom (*RKI-1447*), или функционалним антагонистом подтипа 1 рецептора за *S1P* (финголимод) на вијабилност (*MTT* тест) две ћелијске линије пореклом из аденокарцинома панкреаса (*MIA-PaCa-2* и *Panc-1*) применом методе комбинаторијског индекса.

- **Резултати и дискусија** докторске дисертације приказани су прегледно, коришћењем оригиналних графичких и табеларних приказа (38 слика и 10 табела). Резултати су груписани у пет целина. У првој целини приказани су резултати развоја молекулско-механичких поља силе пет познатих инхибитора *SIRT2*, као и резултати класичних *MD* симулација изведених на 7 различитих система (6 различитих *SIRT2*:инхибитор комплекса и 1 *apo SIRT2* систем). Резултати *MD* симулација су детаљно дискутовани у погледу алтернативних конформационих стања *SIRT2*:инхибитор комплекса и промена унутар динамичких мрежа интеракције аминокиселинских остатака *SIRT2*. У оквиру исте целине, представљени су резултати ретроспективног *SBVS* употребљеног за валидацију алтернативних конформационих стања, као и развој новог протокола за побољшано узорковање алтернативних конформационих стања везивног

места *SIRT2* заснованог на добро темперираним метадинамичким симулацијама уз колективне варијабле изведене из анализе независних компоненти кашњења (eng. *Time-lagged independent component analysis – tICA*). Приказани су резултати имплементације алтернативних конформационих стања *SIRT2* са новооткривеним скривеним џепом у протокол *SBVS* као и развој мултиструктуралног *SBVS* модела заснованог на комбинацији конформационих стања из метадинамичких симулација и кристалографски разрешеног *SIRT2*:инхибитор комплекса. У оквиру исте целине, приказани су резултати проспективног *SBVS* скрининга и *in vitro* валидације резултата скрининга применом ензимских есеја (*SIRT1*, *SIRT2* и *SIRT6*). Додатно, приказани су и резултати испитивања антитуморског потенцијала *hit* једињења *ND18* на ћелијској линији пореклом из аденокарцинома дојке (*MDA-MB-231*). У оквиру друге целине, приказани су резултати развоја *in silico* платформе за откриће нових *SIRT2* инхибитора. У оквиру овог поглавља, детаљно су приказани резултати успостављања и валидације модела квантитативног односа структуре и активности/селективности *SIRT2* инхибитора као и приступ селекцији четири најбоља модела и њиховој имплементацији унутар оквира платформе. Детаљно су приказане функционалности платформе у *LBVS* и анализи односа структуре и активности нових инхибитора, као и студија поређења са *SBVS* моделом. У оквиру треће целине приказани су дизајн, синтеза и *in vitro* карактеризација (*SIRT1* и *SIRT2* ензимски есеји) 12 нових *SIRT2* инхибитора. У оквиру четврте целине Резултата и дискусије представљени су резултати молекулског моделовања протеин-лиганд интеракције фотореактивних пептидомиметских инхибитора *WDR5*. Детаљно су приказани резултати развоја протокола за дизајн групе линеарних пептидомиметских инхибитора *WDR5* заснованог на *MM/PBSA* прорачунима слободне енергије и дискутовани су атомистички детаљи протеин-лиганд интеракција комплекса добијених симулацијама. У оквиру исте целине, детаљно су приказани и резултати моделовања структуре комплекса *WDR5* и цикличног пептидомиметског инхибитора са посебним освртом на усаглашеност са доступним експерименталним подацима. Дискутовани су резултати термодинамичких прорачуна изведених из метадинамичких симулација, као и резултати анализа алостерне комуникације два удаљена везивна места на *WDR5*, добијених на основу *MD* симулација. У оквиру пете целине приказани су резултати развоја биоинформатичког протокола за предвиђање синергистичких комбинација инхибитора хистон-деацетилаза и преосталих биоактивних једињења доступних кроз базе података у терапији аденокарцинома панкреаса. У оквиру исте целине, дискутовани су резултати анализе обогаћења у оквиру које су предложена нова циљна места за развој дуалних инхибитора *HDAC* фамилије протеина (укључујући и сиртуине) као нових ефикаснијих антинеопластика у терапији аденокарцинома панкреаса. Додатно, приказани су резултати *in vitro* валидације предвиђених синергизама праћењем цитотоксичних ефеката комбинација биоактивних једињења методом комбинаторијског индекса.

- **Закључак** докторске дисертације је приказан сажето, истицањем иновативности резултата и анализом најважнијих резултата који су у складу са дефинисаним циљевима истраживања.
- У поглављу **Литература** у оквиру докторске дисертације наведено је 358 референци.

## 2. Опис постигнутих резултата

Резултати ове докторске дисертације подељени су у пет поглавља. У поглављу 4.1 приказани су и дискутовани резултати испитивања конформационе динамике *SIRT2* и развоја новог протокола *SBVS* који се ослања на алтернативна конформациона стања *SIRT2* идентификована током симулација. Поглавље је даље подељено на седам целина. У оквиру прве целине поглавља 4.1 приказани су резултати развоја и валидације нових параметара молекулско-механичких поља силе за сет познатих *SIRT2* инхибитора. Узимајући у обзир транслаторни потенцијал параметара молекулско-механичких поља силе, развијени параметри су широко примењиви и доступни су и ван основног контекста истраживања *SIRT2* инхибитора. У оквиру друге целине поглавља 4.1 приказани су резултати испитивања конформационе динамике *SIRT2* применом класичних симулација молекулске динамике. Анализама корена средњег квадратног одступања (eng. *Root Mean Square Deviation – RMSD*) атомских позиција унутар *MD* трајекторија, корена средње квадратне флукуације аминокиселинских остатака (eng. *Root-mean square fluctuation – RMSF*), анализом главних компоненти (eng. *Principal component analysis – PCA*), и визуелизацијом центроида након процедуре кластеровања трајекторија, уочено је постојање алтернативних везивних стања лигананда, као и алтернативних конформационих стања везивног места. Даљом анализом динамичке интеракционе мреже резидуа (eng. *Dynamical residue interaction network – RIN*), идентификовани су остаци аминокиселина од кључног значаја за комуникацију унутар интеракционе мреже *SIRT2* и издвојени су главни комуникациони путеви унутар везивног места *SIRT2* који могу бити модулисани присуством инхибитора. У оквиру треће целине поглавља 4.1 алтернативна конформациона стања везивног места *SIRT2* добијена кроз *MD* симулације валидирана су процедуром ретроспективног *SBVS*. Резултати су указали на значајно побољшање статистичких параметара ретроспективног *SBVS* приликом примене алтернативних конформационих стања добијених из *MD* симулација, у односу на кристалографски разрешене структуре комплекса. Постављена је хипотеза постојања већег броја алтернативних конформационих стања које класичне *MD* симулације нису могле да узоркују у реалном времену трајања симулација. У оквиру четврте целине поглавља 4.1 развијен је протокол за побољшано узорковање алтернативних конформационих стања везивног места *SIRT2* заснован на метадинамичким симулацијама и колективним варијаблама изведених из *tICA* (eng. *Time-Lagged Independent Component Analysis – tICA*) анализе диједарских углова аминокиселинских остатака везивног места. Применом развијеног протокола описана су конформациона стања *SIRT2* значајно другачија и од конформационих стања описаних *MD* симулацијама, као и стања описаних кристалографијом X-зрака доступних у оквиру *PDB* (eng. *Protein Data Bank*) базе

података. Пондерисањем метадинамичких потенцијала на физички интерпретабилне колективне варијабле описан је концептуални оквир механизма протеин-лиганд интеракције кроз комбинацију механизма конформационе селекције и индукованог фитовања. У оквиру пете целине поглавља 4.1 конформациона стања издвојена из метадинамичких симулација су валидирана путем ретроспективног *SBVS*. Иако су се конформациона стања из метадинамичких симулација значајно разликовала од кристалографски разрешених *SIRT2* структура, као и конформационих стања издвојених из класичних *MD* симулација, забележено је велико побољшање у статистичким параметрима ретроспективног *SBVS*. Детаљним увидом у конформациона стања *SIRT2* издвојена из метадинамичких симулација која су показала најбољи учинак у ретроспективном *SBVS* откривено је постојање скривеног везивног џепа унутар везивног места *SIRT2*, смештеног између остатака *ILE-213* и *PHE-190*. Сва конформациона стања *SIRT2* добијена током *MD* и метадинамичких симулација, као и кристалографски разрешена конформациона стања анализирана су аутоматским *LDA* (линеарна дискриминантна анализа) протоколом имплементираним у оквиру ФЛАП програма у циљу добијања мултиструктуралног *SBVS* модела. Аутоматским протоколом одабрана је комбинација 2 скорa и 3 конформациона стања (2 конформациона стања добијена метадинамичком симулацијом и 1 кристалографски разрешена конформација) за формирање финалног *SBVS* модела. Финални (мултиструктурални) *SBVS* модел показао је највеће побољшање у статистичким параметрима ретроспективног *SBVS* чиме је потврђен значај новооткривених алтернативних конформационих стања *SIRT2* у објашњавању активности сета познатих инхибитора. У оквиру шесте целине поглавља 4.1 описана је експериментална валидација мултиструктуралног *SBVS* модела кроз извођење проспективног *SBVS*. Проспективним скринингом *SPECS* базе уочен је значајан потенцијал проширивања хемијског простора познатих *SIRT2* инхибитора применом мултиструктуралног *SBVS* модела што је оправдано анализом пројекција хемијског простора на модел самоорганизујућих мапа. Девет једињења издвојених из претходно неистражених делова хемијског простора *SIRT2* инхибитора је тестирано *in vitro* ензимским есејима за *SIRT1*, *SIRT2* и *SIRT6*. Сва једињења су показала одређени инхибиторни потенцијал и селективност ка *SIRT2*. За два једињења (*ND18* и *ND85*) са највећим процентом *SIRT2* инхибиторне активности при тестираној концентрацији од 200  $\mu\text{M}$  одређена је  $IC_{50}$  вредност (*ND18* ( $IC_{50} = 58,7 \mu\text{M}$ ) и *ND85* ( $IC_{50} = 85,9 \mu\text{M}$ )). У оквиру седме целине поглавља 4.1 испитан је антитуморски потенцијал *hit* једињења *ND18* на ћелијској линији троструко негативног аденокарцинома дојке *MDA-MB-231*. Једињење *ND18* је окарактерисано као нецитотоксично једињење које индукује заустављање ћелија у *G2/M* фази ћелијског циклуса и повећава експресију Е-кадхерина чиме је указано на потенцијал новооткривеног селективног *SIRT2* инхибитора да доведе до процеса мезенхимално-епителијалне транзиције.

У поглављу 4.2 приказани су резултати развоја *in silico* платформе за откриће *SIRT2* инхибитора назване *SIRT2i\_Predictor*. Поглавље 4.2 је подељено на четири целине. У оквиру прве целине поглавља 4.2 приказан је опис сетова података употребљених за успостављање класификационих и регресионих модела односа структуре и активности, односно селективности *SIRT2* инхибитора. Укупно 1797 једињења са познатом инхибиторном активношћу ка *SIRT2* израженом као проценат инхибиције, или  $pIC_{50}$

вредност је подељено у 4 сета података на основу намене модела. У оквиру друге целине поглавља 4.2 приказани су резултати креирања регресионих модела односа структуре и активности, бинарних класификационих модела потентности, као и вишекласних класификационих модела *SIRT1/2*, односно *SIRT2/3* селективности. Сви модели су изграђени применом пет различитих алогоритама машинског учења (*RF* – Алгоритам случајних шума, *SVM* – Алгоритам потпорних вектора, *KNN* – Алгоритам к-најближих суседа, *XGBoost* имплементација алгоритма градијентног појачања, *DNN* – алгоритам дубоких неуронских мрежа) и четири различита молекулска дескриптора/фингерпринта (*MACCS*, *ECFP4*, *ECFP6* и *Mordred* дескриптора). Регресиони модели су развијени према *OECD* смерницама, док је најбољи регресиони модел одабран након процене екстерне моћи предвиђања модела применом сета додатних параметара екстерне валидације. Најбољи модели из група класификационих модела (бинарни и вишекласни модели) су одабрани симулацијом примене модела у реалним условима *LBVS*. Сет за симулирање *LBVS* услова примене модела је креиран применом молекула мамаца и био је сачињен од око 20000 једињења (однос активних:инактивних = 1:40). Као финални модели одабрани су: *XGBoost.ECFP4* регресиони модел, *RF.ECFP4* бинарни класификациони модел, *RF.ECFP4 SIRT1/2* и *DNN*:дескрипторски *SIRT2/3* вишекласни класификациони модели. У оквиру треће целине поглавља 4.2 представљени су резултати развоја *in silico* платформе у оквиру које су имплементирана четири финална модела, као и додатне функционалности за визуелизацију вероватноћа предвиђања, домена примењивости предвиђања и визуелизације доприноса одговарајућих делова структура предвиђеној активности. Графички интерфејс платформе је развијен кроз два основна модула: модул за *LBVS* и модул за детаљну анализу односа структуре и активности. У оквиру четврте целине поглавља 4.2 приказани су резултати студије поређења *SIRT2i\_Predictor*-а са претходно описаним мултиструктуралним *SBVS* моделом. Упркос благој предности *SBVS* модела, демонстриран је потенцијал *SIRT2i\_Predictor*-а у ефикасној претрази хемијског простора *SIRT2* инхибитора. Додатно, кроз ретроспективну анализу резултата *SBVS* скрининга представљеног у оквиру поглавља 4.1, као и проспективним скринингом мале базе доступних једињења применом *SIRT2i\_Predictor*-а и *SBVS* модела, показан је значај *SIRT2i\_Predictor*-а као додатног филтера у скринингу великих база података и као значајног алата у приоритизацији једињења пре *in vitro* скрининга.

У оквиру поглавља 4.3 представљени су резултати синтезе и *in vitro* испитивања нових деривата *SIRT2* инхибитора дизајнираних на основу структуре једињења *ND18*. Синтетисано је 12 нових једињења. Дизајн нових инхибитора је био базиран на предвиђањима мултиструктуралног *SBVS* модела и/или *SIRT2i\_Predictor*-а, уз уважавање синтетске изводљивости у датим условима рада. Синтетисана једињења су окарактерисана *NMR* спектроскопијом ( $^1\text{H}$ *NMR* и  $^{13}\text{C}$ *NMR* експериментима). Шест синтетисаних једињења је при концентрацији од 100  $\mu\text{M}$  показало селективну инхибиторну активност *SIRT2* већу од 50% што их чини обећавајућим молекулима за даља истраживања. Међу синтетисаним једињењима се посебно истиче класа арил-1,2,3-триазола као потпуно нове хемијске групе *SIRT2* инхибитора.

У оквиру поглавља 4.4 представљени су резултати молекулског моделовања протеин-лиганд интеракције потпуно нове групе фотореактивних пептидомиметских инхибитора



*WDR5*. Поглавље 4.4 је даље подељено у две целине. У оквиру прве целине поглавља 4.4 описани су резултати молекулског моделовања подгрупе линеарних пептидомиметских инхибитора *WDR5*. Група од три инхибитора је моделована у *cis* и *trans* стању. Након развоја и валидације протокола фрагментног молекулског докинга пептидомиметских инхибитора *WDR5*, изведене су симулације молекулске динамике и прорачуни слободне енергије применом *MM/PBSA* методе. Корелацијом експериментално одређених *pKi* вредности инхибитора, са добијеним *MM/PBSA* скором ( $R^2 = 0,88$ ) извршена је валидација целокупног протокола за будући дизајн нових представника ове групе инхибитора. Додатно, везивне конформације лиганда су анализирани са аспекта доступних кристалографски разрешених структура и дискутовани су кључни делови структуре лиганда неопходни за активност. У оквиру друге целине поглавља 4.4 описани су резултати молекулског моделовања протеин-лиганд интеракције цикличног пептидомиметског инхибитора *WDR5*. Применом симулација добро темперираних метадинамике и симулација молекулске динамике са дијабатским промењивим потенцијалом моделована је структура *trans* изомера цикличног пептидомиметског инхибитора и симулирани су услови експеримента *in situ* изомеризације. Прорачунима слободне енергије везивања лиганда на основу метадинамичких симулација показан је драстично већи афинитет *cis* изомера у односу на *trans* што није било могуће недвосмислено закључити на основу експерименталних истраживања<sup>1</sup>. Додатно, прорачунима енергетских баријера изомеризације показан је утицај *WDR5* на смањење енергетске баријере у односу на слободан лиганд, што је било у складу са доступним експерименталним подацима<sup>1</sup>. У наставку ове целине, описани су резултати анализе алостерне комуникације унутар *WDR5*. Симулирана су 4 различита система (*WDR5* са и без лиганда, и *WDR5* са и без лиганда у комплексу са пептидом који се везује за додатно везивно место) и применом *SASA* (eng. *Solvent accessible surface area* – *SASA*), *PRS*, анализе укрштених корелационих матрикса, *РИН* анализе и анализом преспајања комуникационих путева, идентификован је сигнални пут алостерне комуникације два везивна места унутар *WDR5* протеина битна за успостављање функционалног мултипротеинског *MLL1* комплекса (eng. *Mixed lineage leukemia protein* – *MLL*), уз описивање утицаја испитиваног лиганда на алостерну комуникацију. Резултати анализе су били поткрепљени експерименталним подацима добијеним анализом измене водоник-деутеријум.

У оквиру поглавља 4.5 представљени су резултати биоинформатичке анализе нових циљних места за развој дуалних инхибитора хистон-деацетилаза као ефикаснијих терапеутика у третману аденокарцинома панкреаса. Ослањајући се на податаке о осетљивости ћелијских линија аденокарцинома панкреаса на хемијске пробе/лекове, развијен је биоинформатички протокол за предвиђање синергистичких комбинација инхибитора хистон-деацетилаза (укључујући сиртуине) и осталих биоактивних молекула. Кроз анализу обогаћења сигналних путева унутар циљних места предвиђених синергистичких комбинација, издвојени су елементи сфинголипидног сигналног пута уз повезане ефекторске путеве, као нова циљна места за развој нових класа дуалних *HDAC* инхибитора. Протокол је валидиран *in vitro* испитивањем цитотоксичних ефеката комбинација доступних *HDAC* инхибитора и *ROCK1/2*

инхибитора (*RKI-1447*), односно функционалног антагонисте подтипа 1 рецептора за *S1P* (финголимод) на *MIA-PaCa-2* и *Panc-1* ћелијским линијама.

### 3. Упоредна анализа резултата дисертације са подацима из литературе

У оквиру поглавља Резултати и дискусија, добијени резултати истраживања су детаљно анализирани и разматрани у контексту доступних литературних података.

У првом делу докторске дисертације образложен је значај примене рачунарских метода у рационалном дизајну нових инхибитора *SIRT2* и *WDR5*. Резултати су подељени у пет сегмената:

#### а) Испитивање конформационе динамике везивног места *SIRT2* и развој протокола за *SBVS*

У оквиру овог сегмента резултата истраживања приказаних у тези, постављени су протоколи за детаљно изучавање конформационе динамике *SIRT2* као и за имплементацију алтернативних конформационих стања *SIRT2* добијених из симулација у *SBVS*. У периоду када је аутор дисертације објавио студију испитивања динамике везивног места *SIRT2*, није постојала слична студија која се бавила развојем протокола симулација за изучавање алтернативних конформационих стања овог протеина, нити имплементацијом алтернативних конформационих стања у *SBVS*<sup>2</sup>. Увидом у базу *PubMed* пронађено је 20 публикација у којима се описују резултати добијени техникама симулација молекулске динамике у испитивању различитих аспеката инхибиције *SIRT2*. У оквиру две публикације пријављени у резултати опсежнијих *MD* симулација<sup>3-5</sup>, два рада су се бавила механизмом регулације ензимске активности<sup>6,7</sup>, док су се преостали радови бавили испитивањем протеин-лиганд интеракције само појединачних хемијских подгрупа инхибитора применом краћих симулација. Ниједан од ових радова није био оријентисан ка детаљном изучавању конформационе динамике *SIRT2*, идентификовању алтернативних конформационих стања везивног места, нити ка имплементацији алтернативних конформационих стања у протоколе *SBVS*.

Развијени протокол побољшаног узорковања приказан у овом сегменту дисертације који се ослања на симулације добро темперираних метадинамике уз примену колективних варијабли изведених из *tICA* анализе развијен је користећи концепт претходно публиковане методологије назване *tICA*-метадинамика<sup>8</sup>. За разлику од публиковане методологије која се бави побољшаним узорковањем спорих конформационих прелаза протеина, протокол дизајниран у оквиру ове дисертације користи сет колективних варијабли специфично дизајнираних за побољшање узорковања динамике циљног места.

Ниједна од до данас публикованих студија није предвидела постојање описаног скривеног џепа у структури везивног места што се сматра главним резултатом овог дела истраживања докторске дисертације. Нови инхибитори издвојени *SBVS* нису до данас пријављени, што је утврђено претрагом *SciFinder* (*CAS SciFinder<sup>®</sup>*) базе података.

Резултати *in vitro* испитивања указали су на могућност реверзије процеса епителијално-мезенхималне транзиције (*EMT*) новооткривеним инхибитором *ND18*, што је у складу са литературним подацима<sup>9,10</sup>.

#### б) Креирање *in silico* платформе за откриће нових *SIRT2* инхибитора

У оквиру овог сегмента резултата истраживања представљених у тези, креиран је и валидиран сет глобалних модела квантитативног односа структуре и активности/селективности *SIRT2* инхибитора. Развијени модели су имплементирани у оквиру јединствене *in silico* платформе за *LBVS* и анализу односа структуре и активности, односно селективности нових *SIRT2* инхибитора. Уводом у *PubMed* базу података утврђено је постојање 7 публикација које се баве *QSAR* моделовањем *SIRT2* инхибитора, али ниједно од доступних истраживања није било орјентисано ка формирању глобалног *QSAR* модела *SIRT2* инхибитора, односно модела формираних на основу великих сетова података, као ни успостављању модела селективности *SIRT2* инхибитора. Највећи број доступних истраживања је био орјентисан ка формирању *QSAR* модела на основу мањих серија структурно сличних деривата *SIRT2* инхибитора. Аутор је кроз увод и дискусију резултата адекватно образложио неопходност формирања и основне предности глобалног *QSAR* модела *SIRT2* инхибитора. Додатно, претрагом литературе није уочено постојање ниједног алата за откриће нових инхибитора *SIRT* фамилије ензима сличног развијеној *in silico* платформи.

#### в) Синтеза нових *SIRT2* инхибитора

У оквиру трећег сегмента резултата истраживања представљених у тези, приказани су синтеза, структурна и ензимска карактеризација 12 нових *SIRT2* инхибитора. Претрагом *ChEMBL*, *SciFinder* (*CAS SciFinder<sup>n</sup>*) и *PubMed* база података није уочено преклапање ни са једним познатим *SIRT2* инхибитором, као ни постојање идентичних структура међу до данас пријављеним фармаколошки активним једињењима.

#### г) Карактеризација пептидомиметских оптофармаколошких инхибитора *WDR5*

У оквиру овог дела резултата истраживања представљених у тези, описано је успостављање протокола симулација потпуно нове класе фотореактивних инхибитора *WDR5*, заснованих на фрагментном молекулском докингу, добро темперираним метадинамичким симулацијама и симулацијама молекулске динамике промењивог потенцијала. Главни изазови у симулацији протеин-лиганд интеракције ове класе једињења су били висока флексибилност лиганда и велика додирна површина интеракције, као и симулација фотоизомеризације азобензенског фрагмента лиганда. Претрагом литературе, осим радова аутора, није пронађена ниједна студија која се бави моделовањем протеин-лиганд интеракције ове изазовне групе лиганда<sup>1,11</sup>. Примена *MD* симулација промењивог потенцијала у изучавању крајњих стања фотоизомеризације азобензена је пријављена у литератури, али никада у контексту моделовања пептидомиметских лиганда<sup>12</sup>. Примена метадинамичких симулација у описивању процеса фотоизомеризације током протеин-лиганд интеракције оптофармаколошких лиганда није разматрана у литератури, осим у случају публикације која чине део дисертације<sup>1</sup>. Претрагом литературе нису пронађени

протоколи рачунарског дизајна изучаване групе пептидомиметских инхибитора. Постојање алостерне комуникације између два везивна места *WDR5* је хипотезирана у литератури, али никада није детаљно испитана<sup>13</sup>. Резултати представљени у оквиру тезе упућују на детаљан механизам комуникације између два места и дају основне смернице у имплементацији молекулско-динамичких разматрања при будућем дизајну ефикаснијих инхибитора *WDR5*.

д) Биоинформатичка анализа нових циљних места за развој ефикаснијих антинеопластика

У оквиру резултата посвећених испитивању синергистичких комбинација *HDAC* инхибитора (укључујући и сиртуинске инхибиторе), представљена су нова потенцијална циљна места за развој дуалних инхибитора *HDAC* као ефикаснијих биоактивних молекула у третману аденокарцинома панкреаса. Претрагом литературе, уочено је постојање једне публикације у којој се користи систематска корелациона анализа за претрагу комбинаторијских опција за свега 5 одабраних *HDAC* инхибитора<sup>14</sup>. У оквиру ове тезе, представљен је приступ који се ослања на систематску корелациону анализу, али уз значајну модификацију уведена кроз развој скор система за рангирање комбинација по вероватноћи синтергистичког потенцијала. Такође, у оквиру ове дисертације извршено је предвиђање синергизма између свих доступних биоактивних једињења са активношћу *HDAC* инхибитора у комбинацији са осталим биоактивним једињењима доступним у коришћеним базама података. Комплетна листа од преко 29000 предвиђених комбинација и скорова је доступна у публикацији аутора тезе<sup>15</sup>. Претрагом литературе и релевантних база података, није уочено постојање сличних резултата. Кроз анализу обогаћења, аутор је анализирао сигналне путеве у оквиру којих се налазе издвојени интеракциони партнери *HDAC* инхибитора на основу чега су по први пут предложени елементи сфинголипидног сигналног пута са својим нисходним ефекторским путевима као потенцијална нова циљна места за развој дуалних *HDAC* инхибитора. Експерименталном валидацијом протокола на *MIA-PaCa-2* и *Panc-1* ћелијским линијама пореклом из аденокарцинома панкреаса, окарактерисан је синтергизам између *HDAC* инхибитора и *ROCK1/2* инхибитора (*RKI-1447*), односно функционалног антагонисте подтипа 1 рецептора за *S1P* (финголимод). Претрагом литературе, није уочено пријављивање синергизма на нивоу ових циљних места.

#### 4. Литература

- (1) Albert, L.; Nagpal, J.; Steinchen, W.; Zhang, L.; Werel, L.; Djokovic, N.; Ruzic, D.; Hoffarth, M.; Xu, J.; Kaspereit, J.; Abendroth, F.; Royant, A.; Bange, G.; Nikolic, K.; Ryu, S.; Dou, Y.; Essen, L.-O.; Vázquez, O. Bistable Photoswitch Allows in Vivo Control of Hematopoiesis. *ACS Cent. Sci.* **2022**, *8* (1), 57–66. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00434>.
- (2) Djokovic, N.; Ruzic, D.; Rahnasto-Rilla, M.; Srdic-Rajic, T.; Lahtela-Kakkonen, M.; Nikolic, K. Expanding the Accessible Chemical Space of SIRT2 Inhibitors through Exploration of Binding Pocket Dynamics. *J. Chem. Inf. Model.* **2022**, *62* (10), 2571–2585. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00241>.
- (3) Singh, M.; Srivastava, M.; Wakode, S. R.; Asthana, S. Elucidation of Structural Determinants Delineates the Residues Playing Key Roles in Differential Dynamics and Selective Inhibition of Sirt1–3. *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61* (3), 1105–1124. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01193>.
- (4) Sakkiah, S.; Arooj, M.; Cao, G. P.; Lee, K. W. Insight the C-Site Pocket Conformational Changes Responsible for Sirtuin 2 Activity Using Molecular Dynamics Simulations. *PLOS ONE* **2013**, *8* (3), e59278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059278>.
- (5) Muvva, C.; Murugan, N. A.; Kumar Choutipalli, V. S.; Subramanian, V. Unraveling the Unbinding Pathways of Products Formed in Catalytic Reactions Involved in SIRT1–3: A Random Acceleration Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59* (10), 4100–4115. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00513>.
- (6) Li, J.; Flick, F.; Verheugd, P.; Carloni, P.; Lüscher, B.; Rossetti, G. Insight into the Mechanism of Intramolecular Inhibition of the Catalytic Activity of Sirtuin 2 (SIRT2). *PLoS One* **2015**, *10* (9), e0139095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139095>.
- (7) Eshun-Wilson, L.; Zhang, R.; Portran, D.; Nachury, M. V.; Toso, D. B.; Löhr, T.; Vendruscolo, M.; Bonomi, M.; Fraser, J. S.; Nogales, E. Effects of  $\alpha$ -Tubulin Acetylation on Microtubule Structure and Stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116* (21), 10366–10371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900441116>.
- (8) M. Sultan, M.; Pande, V. S. TICA-Metadynamics: Accelerating Metadynamics by Using Kinetically Selected Collective Variables. *J. Chem. Theory Comput.* **2017**, *13* (6), 2440–2447. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00182>.
- (9) Zhou, W.; Ni, T. K.; Wronski, A.; Glass, B.; Skibinski, A.; Beck, A.; Kuperwasser, C. The SIRT2 Deacetylase Stabilizes Slug to Control Malignancy of Basal-like Breast Cancer. *Cell Rep* **2016**, *17* (5), 1302–1317. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.006>.
- (10) Chen, J.; Chan, A. W. H.; To, K.-F.; Chen, W.; Zhang, Z.; Ren, J.; Song, C.; Cheung, Y.-S.; Lai, P. B. S.; Cheng, S.-H.; Ng, M. H. L.; Huang, A.; Ko, B. C. B. SIRT2 Overexpression in Hepatocellular Carcinoma Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition by Protein Kinase B/Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin Signaling. *Hepatology* **2013**, *57* (6), 2287–2298. <https://doi.org/10.1002/hep.26278>.
- (11) Albert, L.; Peñalver, A.; Djokovic, N.; Werel, L.; Hoffarth, M.; Ruzic, D.; Xu, J.; Essen, L.-O.; Nikolic, K.; Dou, Y.; Vázquez, O. Modulating Protein–Protein Interactions with Visible-Light-Responsive Peptide Backbone Photoswitches. *ChemBioChem* **2019**, *20* (11), 1417–1429. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800737>.
- (12) Biswas, M.; Burghardt, I. Azobenzene Photoisomerization-Induced Destabilization of B-DNA. *Biophys. J.* **2014**, *107* (4), 932–940. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.044>.
- (13) Cai, W. L.; Chen, J. F.-Y.; Chen, H.; Wingrove, E.; Kurley, S. J.; Chan, L. H.; Zhang, M.; Arnal-Estape, A.; Zhao, M.; Balabaki, A.; Li, W.; Yu, X.; Krop, E. D.; Dou, Y.; Liu, Y.; Jin, J.; Westbrook, T. F.; Nguyen, D. X.; Yan, Q. Human WDR5 Promotes Breast Cancer

Growth and Metastasis via KMT2-Independent Translation Regulation. *eLife* **2022**, *11*, e78163. <https://doi.org/10.7554/eLife.78163>.

- (14) Yang, H.; Sun, B.; Xu, K.; He, Y.; Zhang, T.; Hall, S. R. R.; Tan, S. T.; Schmid, R. A.; Peng, R.-W.; Hu, G.; Yao, F. Pharmaco-Transcriptomic Correlation Analysis Reveals Novel Responsive Signatures to HDAC Inhibitors and Identifies Dasatinib as a Synergistic Interactor in Small-Cell Lung Cancer. *eBioMedicine* **2021**, *69*, 103457. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103457>.
- (15) Djokovic, N.; Djuric, A.; Ruzic, D.; Srdic-Rajic, T.; Nikolic, K. Correlating Basal Gene Expression across Chemical Sensitivity Data to Screen for Novel Synergistic Interactors of HDAC Inhibitors in Pancreatic Carcinoma. *Pharmaceuticals* **2023**, *16* (2), 294. <https://doi.org/10.3390/ph16020294>.

## 5. Objavljeni i saopштени rezultati koji čine deo disertacije

### Spisak radova koji čine deo doktorске disertacije

1. **Djokovic, N.**; Djuric, A.; Ruzic, D.; Srdic-Rajic, T.; Nikolic, K. Correlating Basal Gene Expression across Chemical Sensitivity Data to Screen for Novel Synergistic Interactors of HDAC Inhibitors in Pancreatic Carcinoma. *Pharmaceuticals* 2023, 16 (2), 294. <https://doi.org/10.3390/ph16020294>. (M21, Chemistry, Medicinal (16/63), IF2021=5,215).
2. **Djokovic, N.**; Rahnasto-Rilla, M.; Lougiakis, N.; Lahtela-Kakkonen, M.; Nikolic, K. SIRT2i\_Predictor: A Machine Learning-Based Tool to Facilitate the Discovery of Novel SIRT2 Inhibitors. *Pharmaceuticals* 2023, 16 (1), 127. <https://doi.org/10.3390/ph16010127>. (M21, Chemistry, Medicinal (16/63), IF2021=5,215).
3. **Djokovic, N.**; Ruzic, D.; Rahnasto-Rilla, M.; Srdic-Rajic, T.; Lahtela-Kakkonen, M.; Nikolic, K. Expanding the Accessible Chemical Space of SIRT2 Inhibitors through Exploration of Binding Pocket Dynamics. *J. Chem. Inf. Model.* 2022, 62 (10), 2571–2585. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00241>. (M21, Chemistry, Medicinal (9/63), IF2021=6,162).
4. Albert, L.; Nagpal, J.; Steinchen, W.; Zhang, L.; Werel, L.; **Djokovic, N.**; Ruzic, D.; Hoffarth, M.; Xu, J.; Kaspereit, J.; Abendroth, F.; Royant, A.; Bange, G.; Nikolic, K.; Ryu, S.; Dou, Y.; Essen, L.-O.; Vázquez, O. Bistable Photoswitch Allows in Vivo Control of Hematopoiesis. *ACS Cent. Sci.* 2022, 8 (1), 57–66. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00434>. (deljeno treće autorsvo, M21a, Chemistry, Multidisciplinary (12/180), IF2021=18,728).
5. Albert, L.; Peñalver, A.; **Djokovic, N.**; Werel, L.; Hoffarth, M.; Ruzic, D.; Xu, J.; Essen, L.-O.; Nikolic, K.; Dou, Y.; Vázquez, O. Modulating Protein–Protein Interactions with Visible-Light-Responsive Peptide Backbone Photoswitches. *ChemBioChem* 2019, 20 (11), 1417–1429. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800737>. (M22, Chemistry/Medicinal (30/61) IF2018 = 2.641).

### Spisak usmenih saopšteња M32:

1. **Nemanja Đoković**, Dušan Ružic, Minna Rahnasto-Rilla, Tatjana Srdić-Rajić, Maija Lahtela-Kakkonen, Katarina Nikolić. *NOVEL PROTOCOL FOR ENHANCED SAMPLING OF BINDING POCKET DYNAMICS AND ITS INTEGRATION INTO THE SIRTUIN 2 INHIBITORS VIRTUAL SCREENING CAMPAIGN*. Arhiv za farmaciju, Savez farmaceutskih udruženja Srbije, Arh. farm 2022; 72: S241–S242, Beograd, 12. - 15. Oct, 2022.
2. Ruzic, D., **Djokovic, N.**, Bon C., Petkovic, M., Ellinger B., Gul, S., Santibanez F. J., Lahtela-Kakkonen, M., Halby L., Ganesan, A., Srdic-Rajic T., Arimondo P., Nikolic, K. *Epigenetic drug discovery: Successful examples of Computer-Aided Drug Designing of Histone Deacetylase (HDAC6 and SIRT2) and Histone Methyltransferase (DOT1L) inhibitors*. e-EuCo-CTC 2021, Online conference, EuChemS Division of Computational and Theoretical Chemistry, November 18-19 2021. ABSTRACTS OF PRESENTATIONS, BIOMOLECULAR SYSTEMS, page 35.

3. Ruzic, D., **Djokovic, N.**, Bon C., Petkovic, M., Ellinger B., Gul, S., Santibanez F. J., Lahtela-Kakkonen, M., Halby L., Ganesan, A., Srdic-Rajic T., Arimondo P., Nikolic, K. *Computer-Aided Drug Designing of Histone Deacetylase and Histone Methyltransferase inhibitors*, Journal Club on Drug Design, Institut Pasteur, Paris, France, 26 November 2021.
4. D. Ruzic, **N. Djokovic**, M. Petkovic, D. Agbaba, S. Gul, M. Lahtela-Kakkonen, Ganesan, K. Nikolic. *Computer-Aided Drug Design and Evaluation of Selective HDAC Inhibitors*. 12th EUROPEAN CONFERENCE ON COMPUTATIONAL THEORETICAL CHEMISTRY PERUGIA, 1-5 SEPTEMBER 2019.
5. Ruzic, D., **Djokovic, N.**, Petkovic, M., Agbaba, D., Gul, S., Lahtela-Kakkonen, M., Ganesan, A., and Nikolic, K. *Rational design and evaluation of selective HDAC inhibitors*. EpiChemBio WG1 meeting, Salerno, 4-5 March 2019.
6. **Nemanja Đoković**, Katarina Nikolić, Danica Agbaba, Maija Lahtela-Kakkonen, *Molecular dynamics-based virtual screening of sirtuin 2 inhibitors*. Arhiv za farmaciju, Savez farmaceutskih udruženja Srbije, vol. 68, no. 2, pp. 338 - 339, issn: 0004-1963, Beograd, 10. - 14. Oct, 2018.
7. **N. Đoković**, J. Tyni, K. Nikolić, D. Agbaba, M. Lahtela-Kakkonen, *Exploring Conformational Changes of Sirtuin 2- Molecular Dynamic Approach*. Fifth Conference of Young Chemists of Serbia, pp. 93 - 93, Belgrade, 29. - 30. Sep, 2017.

#### **Списак међународних саопштења штампаних у изводу М34:**

1. Ruzic, D., **Djokovic, N.**, Petkovic, M., Agbaba, D., Gul, S., Lahtela-Kakkonen, M., Ganesan, A., Santibanez, J.F., Srdic-Rajic, T., Nikolic, K. (2021). *RATIONAL DESIGN, SYNTHESIS AND IN VITRO TESTING OF SELECTIVE HDAC6 AND SIRT2 INHIBITORS*. EFMC-ICMS International Symposium on Medicinal Chemistry, Virtual Event, Aug. 29-Sept.2,2021, T021(360).
2. **Nemanja Djokovic**, Minna Rahnasto-Rilla, Maija Lahtela-Kakkonen, Katarina Nikolic. *EXPLORING THE CHEMICAL SPACE OF SIRT2 INHIBITORS THROUGH BIOMOLECULAR SIMULATIONS*. EFMC-ISMIC & EFMC-YMCS, Virtual event, September 9, 2020. p. 112.
3. **N. Djokovic**, K. Nikolic, M. Kahtela-Kakkonen, D. Agbaba. *Identification of potential sirtuin2 inhibitors through molecular dynamics simulations, virtual screening and binding free-energy analysis*. EpiNantes 2018. October 16-17, 2018. Nantes, France.
4. **Djokovic N.**, Nikolic K, Lahtela-Kakkonen M, Agbaba D. *Combined molecular dynamics and virtual screening studies to identify novel Sirtuin 2 inhibitors*. International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC), Ljubljana, Slovenia, 2-6. 2018, P347.
5. K. Nikolic, D. Ruzic, **N. Djokovic**, M. Petkovic, D. Agbaba, M. L. Kakkonen and Ganesan. *Computeraided drug design of selective histone deacetylase Inhibitors*. J Org Inorg Chem 2018, European Congress on Advanced Chemistry July 12-13 2018 Paris, France, Volume: 4 DOI: 10.21767/2472-1123-C2-005.



## 6. Закључак – образложење научног доприноса докторске дисертације

У оквиру докторске дисертације кандидата магистра фармације Немање Ђоковића приказани су резултати истраживања у области развоја и експерименталне валидације нових протокола рационалног дизајна *SIRT2* и *WDR5* инхибитора заснованих на имплементацији информација из великих база података и/или биомолекулских симулација. Истраживања конформационе динамике *SIRT2* довела су до открића алтернативних конформационих стања *SIRT2* чија је релевантност са аспекта рационалног дизајна нових инхибитора потврђена студијама ретроспективне и *in vitro* валидације. Ова, претходно непозната, конформациона стања *SIRT2* поседовала су скривени џеп унутар везивног места *SIRT2* који може представљати нову полазну тачку у даљем развоју *SIRT2* инхибитора. Развојем *SBVS* протокола који се ослања на новооткривена алтернативна конформациона стања *SIRT2*, откривене су потпуно нове структуре селективних инхибитора *SIRT2* у претходно неистраженим деловима хемијског простора. Идентификовано *hit* једињење показало је значајан антитуморски ефект на ћелијској линији пореклом из аденокарцинома дојке што га чини добрим кандидатом за будућа истраживања. У оквиру дисертације развијен је и валидиран потпуно нови протокол за побољшано узорковање алтернативних конформационих стања везивног места који, услед своје универзалности, може бити примењен и на преостала циљна места од интереса. Ослањајући се на све доступне податке о структури и активности/селективности *SIRT2* инхибитора, у оквиру ове дисертације развијени су и до данас најсвеобухватнији модели квантитативног односа структуре и активности/селективности. *In silico* платформа за рационални дизајн нових *SIRT2* инхибитора развијена у оквиру ове дисертације представља јединствени ресурс доступан широј научној заједници са великим потенцијалном ка смањењу трошкова и убрзавању будућег открића нових *SIRT2* инхибитора. Применом успостављених и валидираних модела, дизајнирани су и синтетисани нови селективни инхибитори са значајном инхибиторном активношћу на *SIRT2* међу којима се посебно истиче класа арил-1,2,3-триазола као потпуно нова хемијска група инхибитора.

Истраживањима спроведеним у оквиру ове дисертације дат је значајан допринос разумевању протеин-лиганд интеракције и процеса фотоизомеризације потпуно нове групе фотореактивних пептидомиметских инхибитора *WDR5*. Додатно, по први пут је окарактерисан механизам алостерне комуникације између удаљених везивних места унутар *WDR5* чиме је дат значајан допринос у будућим разматрањима дизајна нових инхибитора. Истраживања спроведена у области постављања биоинформатичког протокола за откривање нових циљних места за развој дуалних *HDAC* инхибитора указала су на велики потенцијал инхибиције сфинголипидног сигналног пута у развоју ефикаснијих терапеутика у третману аденокарцинома панкреаса. Развијени протокол за предвиђање синергистичких комбинација *HDAC* инхибитора (укључујући и сиртуине) показао је велики потенцијал у рационализацији селекције нових циљних места што га чини широко примењивим на друге типове малигнух тумора, или фармаколошке групе лекова.

## 7. Провера оригиналности докторске дисертације

### ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма *iThenticate* којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације: „**Симулације молекулске динамике, дизајн, синтеза и *in vitro* испитивање инхибитора епигенетских протеина као потенцијалних антинеопластика**“, кандидата магистра фармације Немање Ђоковића, констатујем да утврђено подударање текста износи **2 %**.

Овај степен подударности последица је **цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације**, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Датум

6. 6. 2023. године

Ментор

Проф. др. Катарина Николић

---

Катедра за фармацеутску хемију  
Фармацеутски Факултет, Универзитет у Београду

## 8. Предлог комисије за оцену завршене докторске дисертације

На основу изложеног, Комисија закључује да је кандидат магистар фармације Немања Ђоковић успешно реализовао постављене циљеве истраживања и да резултати приказани у овој докторској дисертацији представљају значајан научни допринос у области Фармацеутске-медицинске хемије и структурне анализе.

Резултати докторске дисертације публиковани су у 1 раду у међународном часопису изузетних вредности (M21a), 3 рада у врхунским међународним часописима (M21), 1 раду у истакнутом међународном часопису (M22), 7 усмених саопштења (M32) и 5 саопштења на међународним научним скуповима штампаних у изводу (M34).

Комисија у наведеном саставу позитивно оцењује докторску дисертацију магистра фармације Немање Ђоковића и предлаже Наставно-научном већу Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај о завршеној докторској дисертацији и упути га Већу научних области медицинских наука, ради добијања сагласности за јавну одбрану докторске дисертације под називом:

**„Симулације молекулске динамике, дизајн, синтеза и *in vitro* испитивање инхибитора епигенетских протеина као потенцијалних антинеопластика“.**

### Чланови Комисије

---

Доц. др Славица Ољачић, доцент  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

---

Проф. др Милош Петковић, ванредни професор  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

---

Др Татјана Срдић-Рајић, научни саветник  
Институт за онкологију и радиологију Србије