

Bakterijske i virusne makrodomene - struktura, funkcija i terapijski potencijal

Hloušek-Kasun, Andrea

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:629915>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Andrea Hloušek-Kasun

**Bakterijske i virusne makrodomene – struktura,
funkcija i terapijski potencijal**

DOKTORSKI RAD

Mentori:
dr. sc. Andreja Mikoč
prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Zagreb, 2023.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Andrea Hloušek-Kasun

**Bacterial and viral macrodomains – structure,
function and therapeutic potential**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:
dr. sc. Andreja Mikoč
prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Zagreb, 2023.

Ovaj doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković pod dvojnim mentorstvom dr. sc. Andreje Mikoč i prof. dr. sc. Branimira Bertoše u sklopu Sveučilišnog doktorskog studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Računi su izvedeni na računalnom serveru Isabella Sveučilišnog računskog centra Sveučilišta u Zagrebu (SRCE).

Zahvale

Prije svega hvala mentorima koji su od početka vjerovali u moj potencijal te mi omogućili da rastem u znanstvenom smislu.

Posebno hvala...

...dragoj mentorici dr. sc. Andreji Mikoč na pruženoj slobodi u istraživačkom radu, brojnim savjetima, riječima podrške i vremenu kojeg ste uložili u moj rast kao znanstvenice i osobe.

...dragom mentoru dr. sc. Branimiru Bertoši koji uvijek spremno nalazi vremena za sva moja pitanja i konstruktivnu diskusiju. Hvala na mnogobrojnim savjetima i pomoći koji su mi uvelike olakšali cijeli proces izrade ove doktorske disertacije.

Od srca hvala dragim LMG-ovcima...

...na odličnoj radnoj atmosferi i podršci!

Many thanks to Ahel's lab in Oxford, especially to Marion, Johannes and Ivan Ahel. Thank you for all the advice, help, and experimental data you shared with me!

Veliko hvala najboljim kolegama (a sad već i prijateljima) iz sobe 120 – Ela, Silvestar, Goran, Marko, Kristina i Antea – hvala za druženja, podršku, motivaciju i nezaboravne trenutke u i izvan ureda. Učinili ste izradu ovog doktorata nezaboravnim iskustvom!

Veliko hvala Petri, najboljoj kolegici koja je prerasla u neprocjenjivu prijateljicu. Hvala na bezbroj savjeta i milijun podrške! Naša druženja i diskusije (znanstvene i neznanstvene prirode) su mi uljepšale svaki dan na poslu.

Iz sveg srca zahvaljujem Ivanu koji mi je ogromna podrška i koji je samnom proživljavao i sretne i teške trenutke prilikom izrade ove disertacije. Hvala ti na ogromnom razumijevanju, ljubavi i prijateljstvu. Kad sam s tobom, mogu sve!

I na kraju se posebno zahvaljujem mami i tati, mojim velikim uzorima, koji su mi odmalena usađivali ljubav prema učenju, kritičkom razmišljanju i prirodi. Hvala vam na ogromnoj podršci, brizi, razumijevanju i pomoći pri savladavanju životnih prepreka...

Vi ste moj veliki oslonac i bez vas ne bi bila tu gdje jesam...

Sadržaj

SAŽETAK	xi
ABSTRACT.....	xiii
§ 1. Uvod.....	1
§ 2. Literaturni pregled	5
2.1. ADP-ribozilacija.....	5
2.2. ADP-ribozilacija kao posttranslacijska modifikacija proteina.....	7
2.3. ADP-ribozilacija nukleinskih kiselina	9
2.4. ADP-ribozilacija malih molekula.....	11
2.5. ADP-ribozil-hidrolaze	13
2.5.1. Makrodomenski proteini.....	14
2.6. ADP-ribozilacija u bakterijama.....	16
2.6.1. <i>Streptomyces coelicolor</i> kao modelni organizam za izučavanje procesa ADP-ribozilacije u bakterija	17
2.6.2. Glavne karakteristike bakterija roda <i>Streptomyces</i>	17
2.6.3. Makrodomenski protein SCO6735 iz <i>S. coelicolor</i>	18
2.7. Virusni proteini koji sudjeluju u procesu ADP-ribozilacije.....	20
2.7.1. Virus SARS-CoV-2	20
2.7.2. Makrodomena virusa SARS-CoV-2 (Mac1)	22
2.8 Teorijska osnovica računalnih metoda.....	24
2.8.1 Molekulska dinamika	24
2.8.2. Molekulsko uklapanje.....	27
2.8.3. Virtualno pretraživanje	29
§ 3. Eksperimentalni dio	33

3.1 Materijali	33
3.2 Metode.....	36
3.2.1 Metode rada s bakterijama.....	36
3.2.2 Metode rada s DNA.....	38
3.2.3 Metode rada s proteinima	42
3.2.4 Računalne metode.....	51
§ 4. Rezultati	59
Rezultati istraživanja na makrodomenskom proteinu SCO6735 iz bakterije <i>S. coelicolor</i>	59
4.1. Usporedba SCO6735 s homolognim proteinima TARG1 i DarG.....	59
4.2. Testiranje aktivnosti SCO6735 na proteinskim i DNA supstratima	63
4.3. Molekulsko uklapanje ADPr i pripadnog supstrata u aktivno mjesto proteina SCO6735. 67	
4.4. Strukturna i dinamička svojstva proteina SCO6735 u kompleksu s pripadnim supstratom i ADPr.....	70
4.5. Usporedba elektrostatske površine proteina SCO6735 i njegovih homologa DarG i TARG1	71
4.6. Određivanje uloge pojedinih aminokiselina proteina SCO6735 u vezanju supstrata i enzimskoj katalizi.....	73
4.7. Testiranje aktivnosti mutanata proteina SCO6735 na DNA i na proteinskim supstratima 79	
4.8. Testiranje inhibicije toksina DarT interakcijom s proteinom SCO6735.....	84
4.9. Aktivnost proteina SCO6735 <i>in vivo</i> u stanicama bakterije <i>S. coelicolor</i>	85
Rezultati istraživanja na makrodomeni (Mac1) virusa SARS-CoV-2	89
4.10. Određivanje uloga pojedinih aminokiselina u vezanju supstrata na temelju rezultata simulacija MD.....	89
4.11. Odabir i postavljanje receptorske rešetke makrodomene Mac1 koja će se koristiti za virtualno pretraživanje metodom molekulskog uklapanja	91
4.12. Rezultati virtualnog pretraživanja baze malih molekula.....	93

4.13. Mjerenje afiniteta vezanja spojeva metodom ITC	96
§ 5. Rasprava.....	101
5.1. SCO6735 je pravi ortolog ljudskog proteina TARG1.....	101
5.2. Strukturna obilježja makrodomenskih proteina ALC1-potporodice ukazuju na specijalizaciju prema DNA supstratima.....	102
5.3. Potencijalni katalitički mehanizam karakterističan za potporodicu makrodomenskih proteina ALC1.....	104
5.4. Protein SCO6735 ima ulogu u zaštiti od genotoksičnog stresa.....	108
5.5. Simulacija makrodomene Mac1 u kompleksu s Glu-ADPr ukazuju na pretpostavljeni katalitički mehanizam potpomognut supstratom.....	109
5.6. Terapeutski potencijal odabranih spojeva u liječenju bolesti uzrokovane virusom SARS-CoV-2.....	111
§ 6. Zaključci	115
§ 7. Popis oznaka, kratica i simbola.....	117
§ 8. Literaturni izvori	119
§ 9. Dodatak	127
§ 10. Životopis	xiii



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

BAKTERIJSKE I VIRUSNE MAKRODOMENE – STRUKTURA, FUNKCIJA I TERAPEUTSKI POTENCIJAL

Andrea Hloušek-Kasun
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

ADP-ribozilacija je kovalentna modifikacija koja kontrolira brojne važne stanične procese od bakterija do čovjeka. ADP-ribozilacijski sustav čine ADP-ribozil-transferaze koje prenose ADP-ribozu na ciljnu (makro)molekulu i ADP-ribozil-hidrolaze koje osiguravaju reverzibilnost procesa. Glavni predstavnici ADP-ribozil-hidrolaza su makrodomenski proteini zastupljeni u sve tri domene života uključujući i viruse. U ovom doktorskom radu istraživana su dva makrodomenska proteina, SCO6735 iz bakterije *Streptomyces coelicolor* i Mac1 iz virusa SARS-CoV-2. Pokazano je da SCO6735 uklanja ADP-ribozilaciju s jednolančane DNA modificirane na timinu. Na temelju računalnih i eksperimentalnih rezultata predložen je novi katalitički mehanizam hidrolize ADP-riboze s DNA karakterističan za skupinu proteina sličnih SCO6735. Makrodomena Mac1 inhibira imunološki odgovor domaćina čime potiče virusnu replikaciju. Stoga ima terapijski potencijal za liječenje bolesti uzrokovane virusom SARS-CoV-2. U tu svrhu provedena je virtualna pretraga baze malih molekula koja je rezultirala testiranjem 27 spojeva metodom izotermalne titracijske kalorimetrije. Izmjereni afiniteti vezanja potvrdili su dobro vezanje nekoliko spojeva, uključujući FDA-odobrene lijekove Dasatinib i Metotreksat.

(134 + xv stranica, 34 slike, 1 tablica, 96 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: ADP-ribozilacija/ makrodomenski proteini/ protein SCO6735, makrodomena Mac1, *Streptomyces coelicolor*, virus SARS-CoV-2

Mentori: dr. sc. Andreja Mikoč
dr. sc. Branimir Bertoša, prof.

Rad prihvaćen: 1. ožujka 2023.

Ocjenitelji: dr. sc. Marko Močibob, doc, Prirodoslovno-matematički fakultet
dr. sc. Sanja Tomić, znanstvena savjetnica, IRB, nasl. red. prof. Sveučilište u Rijeci
dr. sc. Branka Salopek Sondi, znanstvena savjetnica, IRB



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

BACTERIAL AND VIRAL MACRODOMAINS – STRUCTURE, FUNCTION AND THERAPEUTIC POTENTIAL

Andrea Hloušek-Kasun
Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

ADP-ribosylation is a covalent modification that controls essential cellular processes, conserved from bacteria to humans. The ADP-ribosylation system consists of ADP-ribosyl transferases that catalyse the transfer of ADP-ribose to a target (macro)molecule, while ADP-ribosyl hydrolases ensure reversibility. Macrodomain proteins are ADP-ribosyl hydrolases present in all three domains of life and viruses. In this dissertation, two macrodomain proteins were investigated: SCO6735 from *Streptomyces coelicolor* and Mac1 encoded by the virus SARS-CoV-2. SCO6735 was experimentally shown to act antagonistically to a bacterial toxin known to impair replication by ADP-ribosylation of thymidines in single-stranded DNA. Furthermore, a novel catalytic mechanism of DNA-(ADP-ribose) hydrolysis characteristic of the subgroup of SCO6735-related proteins was proposed. The Mac1 macrodomain is a good therapeutic target, because it inhibits the host immune response, thus allowing virus replication. In search of potential inhibitors, a virtual screening of a compound library was performed. The screening resulted in testing of 27 molecules with the isothermal titration calorimetry. Determined binding affinities suggested good binding of several molecules, including the FDA-approved drugs Dasatinib and Methotrexate.

(134 + xv pages, 34 figures, 1 table, 96 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: ADP-ribosylation/ macrodomain proteins/ 6735 protein/ Mac1 macrodomain/
Streptomyces coelicolor, SARS-CoV-2 virus

Supervisors: dr. sc. Andreja Mikoč
dr. sc. Branimir Bertoša, prof.

Thesis accepted: March 1st, 2023.

Reviewers: dr. sc. Marko Močibob, Asst. Prof., Faculty of Science
dr. sc. Sanja Tomić, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute
dr. sc. Branka Salopek Sondi, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute

§ 1. Uvod

Povijesno se ADP-ribozilacija kategorizirala samo kao posttranslacijska modifikacija proteina, ali su novija istraživanja pokazala da i nukleinske kiseline te male molekule poput antibiotika mogu biti supstrati ADP-ribozilijskog sustava. Ova kovalentna modifikacija, prisutna u svim domenama života i u virusima, podrazumijeva prijenos ADP-riboze (ADPr) s redoks kofaktora β -nikotinamid adenin dinukleotida (NAD^+) na ciljnu (makro)molekulu. Sustav se sastoji od ADP-ribozil-transferaza (ART) koje kataliziraju prijenos ADPr na nukleofilni kisikov, dušikov ili sumporov atom pri čemu nastaje *O*-, *N*- ili *S*-glikozidna veza između riboze i modificiranih aminokiselina, nukleinskih kiselina ili malih molekula. Većina ART može prenijeti samo jednu ADPr na ciljnu (makro)molekulu (mono-ADP-ribozilacija), dok nekoliko predstavnika obitelji poli-ADPr polimeraza (PARP) može sintetizirati duge lance poli-ADPr (PAR) (poli-ADP-ribozilacija)¹. Reverzibilnost sustava omogućuju ADP-ribozil-hidrolaze (ARH). Ovisno o tipu kemijske veze između (makro)molekule i ADPr potrebni su različiti enzimi koji je mogu hidrolizirati, a koji se svrstavaju u dvije evolucijski i strukturno različite ARH porodice - makrodomenske proteine i ARH u užem smislu².

U porodicu makrodomenskih proteina se svrstavaju PAR-glikohidrolaze (PARG), proteini nalik MakroD i proteini nalik TARG1 (terminalnoj-ADPr-glikohidrolazi 1). Makrodomenski proteini obnašaju raznolike stanične uloge u svim domenama života uključujući viruse, a činjenica da njihov broj korelira s kompleksnošću organizma naglašava njihovu važnost u kontroli različitih staničnih procesa. Karakterizira ih očuvana globularna makrodomena "sendvič" $\alpha/\beta/\alpha$ strukture izgrađena od centralnog cijela koji sadrži 6 β -lanaca izvana omeđenih s 5 α -uzvojnica².

ADP-ribozilacija kod eukariota sudjeluje u regulaciji niza staničnih procesa poput: DNA popravka, strukturiranja kromatina, transkripcije, prekrajanja tRNA, diferencijacije, staničnog odgovora na razmotane proteine itd.³. Iako manje istražen nego kod eukariota, sustav ADP-ribozilacije u prokariota također pokazuje veliku raznolikost, a može sudjelovati u inaktivaciji antibiotika, metabolizmu fiksacije dušika, odgovoru na stanični stres, kontroli diferencijacije i sporulacije itd.⁴.

Proteini uključeni u ADP-ribozilaciju su nejednoliko rasprostranjeni među bakterijama, pri čemu su ARH zastupljenije od ART. Zbog relativno velikog broja proteina potencijalno uključenih u proces ADP-ribozilacije, vrste roda *Streptomyces* se smatraju odličnim modelnim organizmima za izučavanje ovog procesa kod bakterija⁴. Streptomiceti su Gram-pozitivne bakterije poznate po svom kompleksnom životnom ciklusu koji uključuje morfološku diferencijaciju i proizvodnju sekundarnih metabolita uključujući antibiotike. Primijećeno je da se u bakterijama *S. coelicolor* i *S. griseus* ADP-ribozilacija mijenja s morfološkom diferencijacijom te da je povezana s promjenama u metaboličkim potrebama i uključena u regulaciju proizvodnje antibiotika⁵⁻⁸.

Makrodomenski protein SCO6735 iz bakterije *S. coelicolor* posjeduje visoko očuvanu makrodomensku strukturu s dubokim utorom koji predstavlja aktivno mjesto. Usporedba s 3D strukturom homolognog ljudskog proteina TARG1 otkriva da katalitička dijada Lys84 i Asp125 iz ovog proteina nije očuvana u SCO6735, već je zamijenjena glutaminom i alaninom, što ukazuje na jedinstveni katalitički mehanizam⁷. *In vitro* eksperimenti su pokazali da SCO6735 može ukloniti ADPr sa supstrata mono-ADP-riboziliranog na glutamatu ili aspartatu. Pretpostavlja se da je SCO6735 uključen u odgovor na oštećenja DNA budući da je njegova ekspresija pod kontrolom RecA-neovisnog promotora koji se inducira uslijed oštećenja⁷.

Makrodomene su kodirane genomima nekoliko porodica RNA virusa poput *Coronaviridae*, *Togaviridae* i *Hepeviridae*, gdje postoje zasebno ili kao dio multidomenskog proteina⁹. Većina virusnih makrodomena su homolozi proteina MacroD². Nedavna istraživanja pokazuju da virusne makrodomene sprječavaju urođeni imunološki odgovor domaćina⁹. Naime, kao odgovor na infekciju koronavirusom dolazi do porasta ekspresije ljudskih antivirusnih proteina PARP (PARP 9, 12 i 14) koji induciraju urođeni imunološki odgovor te tako sprječavaju umnažanje virusa. Kako bi onemogućili imunološki odgovor, virusi koriste makrodomene koje poništavaju ADP-ribozilaciju antivirusnih PARP omogućujući tako virusnu replikaciju¹⁰. U betakoronavirusa SARS-CoV-2 (uzročnika pandemije COVID-19) makrodomena Mac1 je dio nestrukturiranog proteina 3 (nsp3) velikog 200 kDa¹¹. Njen terapijski potencijal je doveo do relativno brzog rješavanja kristalnih struktura u različitim kompleksima^{10,12-15} što je omogućilo bolje razumijevanje aktivnog mjesta i interakcija bitnih za vezanje ADP-riboze, fragmenata molekula i potencijalnih inhibitora. Trenutno su predložena dva katalitička mehanizma kojima virusna makrodomena Mac1 uklanja ADPr s modificiranih glutamata; jedan uključuje mehanizam

potpomognut supstratom koji je karakterističan i za homologni ljudski protein MacroD2, dok drugi uključuje nukleofilni napad molekule vode aktivirane bočnim ogrankom His249¹⁴.

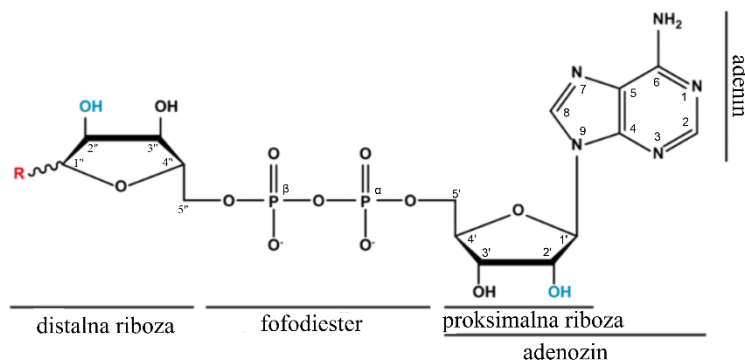
U svrhu bolje biokemijske karakterizacije makrodomenskog proteina SCO6735 iz bakterije *S. coelicolor*, korištena je kombinacija računalnih i eksperimentalnih biokemijskih metoda. Budući da je riješena samo kristalna struktura proteina SCO6735 u apo-formi, za izgradnju kompleksa s ADPr i pripadnim supstratom provedeno je molekulsko uklapanje (eng. docking). Dobiveni kompleksi podvrgnuti su simulacijama molekulske dinamike, čiji su rezultati pružili bolji uvid u interakcije koje aminokiseline aktivnog mjesta ostvaruju sa supstratom i produktom, te omogućili bolje razumijevanje katalitičkog mehanizma. S ciljem validacije računalnih rezultata o važnosti pojedinih bočnih ogranaka aminokiselina, osmišljeni su mutanti proteina za koje se pretpostavlja da smanjuju interakcije sa supstratom ne narušavajući pritom nativnu strukturu proteina. Aktivnost mutiranih proteina provjerena je *in vitro* pri čemu je praćena njihova sposobnost uklanjanja ADPr s modificiranog supstrata. Nadalje, uklanjanje SCO6735 gena u bakteriji *S. coelicolor*, te praćenje utjecaja delecije na rast i diferencijaciju bakterija, pružilo je uvid u fiziološku ulogu proteina SCO6735.

Karakterizacija makrodomene Mac1 virusa SARS-CoV-2 usmjerena je na pronalazak male molekule koja će smanjiti/inhibirati aktivnost ove makrodomene te tako omogućiti dizajniranje lijeka za bolest koju uzrokuje SARS-CoV-2, ali potencijalno i drugi koronavirusi. Budući da zbog brze enzimske katalize nije moguće riješiti kristalnu strukturu makrodomene Mac1 u kompleksu s modificiranim glutamatom (Glu-ADPr), u okviru ove doktorske disertacije provedeno je molekulsko uklapanje i simulacija molekulske dinamike dobivenog kompleksa Mac1:Glu-ADPr. Analiza navedenih simulacija dala je uvid u interakcije koje se ostvaruju sa supstratom te doprinos pojedinih aminokiselina u enzimskoj katalizi. S ciljem pronalaska potencijalnih inhibitora virusne makrodomene Mac1 provedeno je virtualno pretraživanje baze malih molekula metodom molekuskog uklapanja, a prilikom pretrage naglasak je stavljen na odmah dostupne molekule. Za spojeve koji su pokazali najbolje rezultate molekuskog uklapanja (eng. docking score) i koji s aktivnim mjestom ostvaruju slične ili iste interakcije kao i ADPr, afinitet vezanja određen je metodom izotermalne titracijske kalorimetrije (ITC).

§ 2. Literaturni pregled

2.1. ADP-ribozilacija

Povijesno se ADP-ribozilacija kategorizirala samo kao posttranslacijska modifikacija proteina, ali su novija istraživanja pokazala da i nukleinske kiseline te male molekule poput antibiotika mogu biti supstrati ADP-ribozilacijskog sustava. Ova kovalentna modifikacija, prisutna u svim domenama života i u virusima, podrazumijeva prijenos ADP-riboze (ADPr) (slika 1) s redoks kofaktora β -nikotinamid adenin dinukleotida (NAD^+) na ciljnu (makro)molekulu pri čemu se oslobađa nikotinamid (NAM) (slika 2).



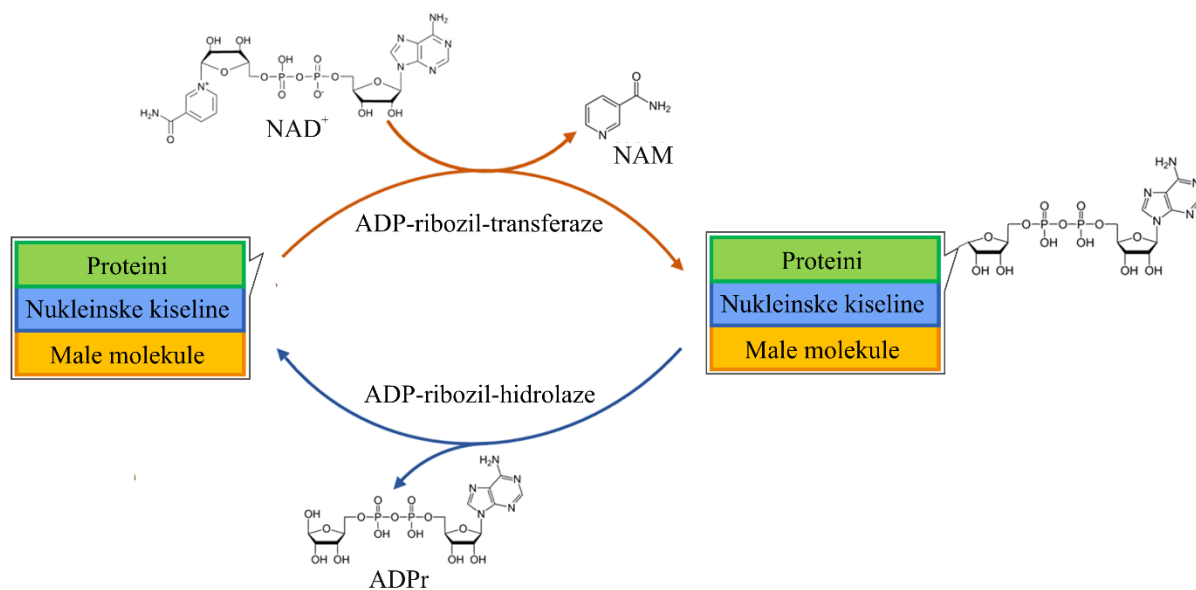
Slika 1. Kemijska struktura ADPr, uključujući oznake atoma i podstrukture korištene u daljnjem tekstu.

Sustav je reverzibilan i sastoji se od: ADP-ribozil-transferaza (ART) koje kataliziraju prijenos ADPr na nukleofilni kisikov, dušikov ili sumporov atom pri čemu nastaje *O*-, *N*- ili *S*-glikozidna veza između riboze i modificiranih (makro)molekula, te ADP-ribozil-hidrolaza (ARH) koje tu modifikaciju uklanjaju (slika 2). Većina ART može prenijeti samo jednu ADPr na ciljnu (makro)molekulu, dok nekoliko predstavnika obitelji poli-ADPr polimeraza (PARP) može sintetizirati duge lance poli-ADP-riboze (PAR) u kojima se pojedini ADPr međusobno

povezuju preko riboze *O*-glikozidnom vezom¹⁶. Skraćeno se prijenos jedne ADPr naziva mono-ADP-ribozilacija, a više povezanih jedinica ADPr poli-ADP-ribozilacija.

Dodavanjem ADPr na proteine ili nukleinske kiseline reguliraju se različiti stanični procesi. Primjerice, ADP-ribozilacijom proteina mijenja se njihova aktivnost, lokalizacija i/ili stabilnost, dok modifikacija nukleinskih kiselina primarno služi kao signal za aktivaciju i regulaciju staničnog odgovora na oštećenja DNA. Reverzibilnost ovog sustava osigurava brzu adaptaciju na stanične potrebe u različitim uvjetima.

U kontekstu ADP-ribozilacije malih molekula najčešće se misli na ireverzibilnu modifikaciju antibiotika koja dovodi do njihove inaktivacije³.



Slika 2. Shematski prikaz ADP-ribozilacijskog sustava.

Pokazano je da ADP-ribozilacija kod eukariota sudjeluje u regulaciji niza staničnih procesa poput: popravka DNA, dinamike telomera i starenja, transkripcije, diferencijacije, staničnog odgovora na razmotane proteine, replikacije, prekranja molekula tRNA, imunološkog odgovora itd.¹⁷.

Iako manje istražen nego kod eukariota, sustav ADP-ribozilacije u prokariota također pokazuje veliku raznolikost. Pokazano je da igra važnu ulogu u regulaciji metabolizma fiksacije dušika, odgovoru na oksidativni stres, kontroli sporulacije, proizvodnji antibiotika itd. Također, poznato je i da bakterije ovaj sustav često koriste kao toksine, u svrhu obrambenog mehanizma¹⁸.

2.2. ADP-ribozilacija kao posttranslacijska modifikacija proteina

ADP-ribozilacija je prvi put otkrivena 1960-ih godina u dva neovisna istraživanja. Chambon i suradnici prvi su zabilježili prisutnost do tada neopisanog biopolimera u ekstraktu stanica jetre, za kojeg su kasnije ustvrdili da je sastavljen od jedinica ADPr^{19,20}. Nekoliko godina kasnije, Collier i suradnici su testirali učinak toksina difterije na HeLa stanice i otkrili njegovu ovisnost o prisutnosti kofaktora NAD⁺²¹. Uskoro je opisan cijeli mehanizam njegovog djelovanja u kojem se ADPr iz kofaktora NAD⁺ prenosi na eukariotski elongacijski faktor 2 (eEF2), čime dolazi do inhibicije sinteze proteina i stanične smrti²².

Sljedeći je otkriven mehanizam toksičnosti bakterije *Vibrio cholerae* 1990-tih godina. Pokazano je da toksin kolere ADP-ribozilira točno određeni arginin u regulatornoj podjedinici G-proteina i time dovodi do nekontrolirane proizvodnje cikličkog adenozin monofosfata (cAMP). Djelovanjem protein-kinaze ovisne o cAMP otvaraju se Na⁺ pumpe čime dolazi do velikog influksa vode i Na⁺ iona u lumen crijeva. Javlja se dijareja i simptomi karakteristični za koleru²³.

I danas se prema prvo otkrivenim sudionicima ADP-ribozilacijskog sustava, na temelju glavnih strukturnih i funkcionalnih karakteristika, sve novootkrivene ART nastoji svrstati u dvije skupine – ART nalik toksinu difterije (skupina DTX) i ART nalik toksinu kolere (skupina CTX). ART koje se ne mogu svrstati u ove dvije skupine nazivaju se divergentnima¹⁶.

Unatoč razlikama u primarnoj strukturi, većina ART posjeduje isti organizacijski uzorak: N-terminalni dio koji sadrži visoko očuvani His (skupina DTX) ili Arg (skupina CTX) odgovoran za vezanje NAD⁺, očuvanu srž proteina sastavljenu od šest beta ploča, pri čemu nakon svake ploče obično slijedi nizvodni helikalni element i C-terminalni dio bogat negativno nabijenim aminokiselinama, među kojima je i očuvani Glu nužan za cijepanje NAD⁺¹⁶. Vezno mjesto za kofaktor NAD⁺ obično je utisnuto u srž proteina¹.

Većina ART ima tri ključna katalitička bočna ogranka: skupinu DTX karakterizira katalitički motiv H-Y-E, dok je za skupinu CTX karakterističan motiv R-S-E (slika 3). Divergentne ART najčešće posjeduju motiv H-H-φ, pri čemu φ označava hidrofobni bočni ogranak¹⁶. Karakteristični motiv je postao glavni kriterij za svrstavanje ART u pojedine skupine, iako kod nekih (posebice divergentnih), aminokiseline koje čine navedeni motiv nisu nužno i katalitičke^{1,16}.

Glavni predstavnici skupine DTX proteina su: toksini blisko srodni toksinu difterije, poli-ADP-riboza-polimeraze (PARP) i ART koje inaktiviraju antibiotike, specifične za bakterije. Toksini blisko srodni toksinu difterije su sporadično rasprostranjeni u genomima patogenih bakterija i imaju široki spektar proteinskih supstrata. Njihova toksičnost proizlazi iz ADP-ribosilacije proteina domaćina koji su uključeni u važne stanične procese, čime dolazi do njihove inaktivacije, a posljedično i do stanične smrti¹⁷. PARP čine najveću podskupinu enzima koja u višim organizmima provodi modifikaciju proteina i nukleinskih kiselina. Primarno modificiraju proteine na bočnim ograncima Glu, Asp ili Ser, a mogu modificirati i Cys, Lys i Arg. Neki članovi ove podskupine mogu sintetizirati lance poli-ADP-riboze (PAR), a do sada se ta sposobnost sa sigurnošću pripisuje samo ljudskim proteinima PARP1, PARP2 i tankirazi²⁴. Mogu se pronaći u skoro svim eukariotima (isključujući kvasce) i u nekim bakterijskim vrstama. Proteini ove podskupine su do sada uglavnom proučavani u kontekstu odgovora na oštećenja DNA i regulaciju kromatina, no novija istraživanja ukazuju na njihovu uključenost u brojne druge stanične procese poput: imunološkog odgovora, regulacije mitoze, staničnog odgovora na razmotane proteine itd.¹⁷.

Članovi skupine CTX su nešto slabije istraženi. Obično su to enzimi koji se usidruju u staničnu membranu i/ili se izlučuju u među-stanični prostor, gdje modificiraju ciljne proteine koji mogu biti topivi ili vezani na staničnu membranu. Članovi ove skupine najčešće prenose ADPr na bočne ogranke Arg, Lys, Cys, Asp i Asn^{16,17}.

Jedan od najzanimljivijih predstavnika divergentnih ART je RNA-fosfotransferaza Tpt1/Kpta¹⁶ koja je detaljnije opisana u poglavlju 2.3.

<u>DTX skupina</u>	
DTX	1 ⁵ MENFSSYHGTKPGYVDSI --- 47 ^Y DDDWKGFYSTDNKYDAAG --- 144 ^G SSSVSEYINWEQAKA S
HaPARP	28 ⁵ SN ^T QLLEHGTAGQNVRI --- 316 ^G RMFGHGYFANKATKSTN --- 390 ^K LQYDEFIVYQSAQQT R
CdPARP	31 ⁵ GNVVNLEHSSRNANLVGI --- 351 ^G QMFNGGYTASKCTKSAL --- 423 ^Y LKNTFIVYNTNQIR R
BpPARP	37 ⁵ KGTKLLEHSSRTENWISI --- 407 ^G KAFGGGYFALSADKSFSG --- 486 ^S FVRDEIVFYHESAMT R
MaPARP	28 ⁹ KHSRELHGTAGNVLSI --- 325 ^G RMFGDGYFSDQSTKSLN --- 412 ^G VMNNEMVWRDQIK T
MsArr	1 ² HESGAYLEHGTAKELKVG --- 41 ^A GRIMNHYYITQTLDAAVW --- 79 ^G AIEDIPNVTDKKLPGNP
SCO2860	5 ^L DEGPFHGTKADLRVGD --- 34 ^P EILMNHYYFTALRDGAGL --- 119 ^W RERLDAVRELEGRAEITN
<u>CTX skupina</u>	
CTX	4 ⁵ ANDDKLYRADSRPEDEIK --- 98 ^V RHDDGYVSTISLRS AHL --- 152 ^H PEDECEVSALGGIPYSQI
Scabin	7 ⁵ TTCGTLYRSDSRGPAVVF --- 114 ^V NQPSFYVSTTYDHDLYKT --- 160 ^W ADQVEVAFPGGIRTEFV
LsMTX	9 ⁰ DNEHRIERWDRRPPNDIF --- 134 ^T NSPSIFVSTTRARYNNLG --- 192 ^F PNEDIITFPGGIRPEFI
Alt	47 ¹ PKGITLYRSGRMLPSIY --- 495 ^V FYFRNEVSTSLYPNIFGT --- 571 ^P SNEVEVILPRGLMVKN
ModA	6 ⁵ PNDKPLRGGVPAETKQVL --- 101 ^K NIALHAGSGLEYNTQVIF --- 160 ^V SDPECEVMIPAQSVFRIA
SpTre1	34 ⁹ AYNGETYPG-TTLEAHL --- 373 ^T VSDGGFSTSAKTPFDGD --- 410 ^Y KNEAEVLYPPNTRFEVI
RrDraT	18 ⁴ ESALLLYRGVNDFTQHQM --- 211 ^V VRMNNLSEFSDRGVADC --- 256 ^L KGEGEYLVIGDYLVKA
LpSdeA	7 ⁵ KPPTRLRGLNLSEEF TK --- 81 ² KMSGRTNASTTEIKLVKE --- 85 ⁷ EGTSEFSVYLPEDVALV
<u>divergentne ART</u>	
CtTpt1	94 ^C PEVLYHSTARFVKSI --- 117 ^Q PQRQYHLSADVETLQ --- 163 ^L GNDKVVADAIPSKYIR
SCO3953	92 ^T PPPYLYHSTVARHLEAI --- 115 ^R PMNRHDVHLSPDRETR --- 160 ^V SANGVWVQHVPYSRYLR
PaAcrIF11	1 ^M SMELHSSYEI SEIR --- 21 ^V FGFLFGAHEKETALHGE --- 110 ^S VEMIEHGTWLCCLPGC
SsParT	1 ^M TTSFWRIATDARTYEA --- 3 ^N EVGVATVYASSRALACL --- 125 ^V PEETNLINPAHPDAKG
TaDarT	155 ^E KKQAEFLVKDFFWELV

Slika 3. Poravnanje proteinskih sekvenci ART predstavnika iz bakterija i virusa. Poravnanje uključuje djelomične sekvence toksina difterije (DTX) i kolere (CTX). U skupini DTX poravnate su sekvence: PARP proteina iz *Herpetosiphon aurantiacus* (HaPARP), *Clostridioides difficile* CD160 (CdPARP), *Butyrivibrio proteoclasticus* (BpPARP) i *Mycobacteroides abscessus* (MaPARP); rifampin ADPr-ribozil-transferaza (Arr) iz *Mycobacterium smegmatis* (MsArr) i *Streptomyces coelicolor* (SCO2860). U skupini CTX poravnate su sekvence: proteina Scabin iz *Streptomyces scabiei*, toksina koji ubija komarce iz *Lysinibacillus sphaericus* (LsMTX), proteini Alt i ModA iz bakteriofaga T4, Tre1 iz *Serratia proteamaculans* (SpTre1), DraT iz *Rhodospirillum rubrum* (RrDraT) i SdeA iz *Legionella pneumophila* (LpSdeA). Divergentne ART čine: proteini Tpt1 iz *Clostridium thermocellum* (CtTpt1) i *S. coelicolor* (SCO3953), AcrIF11 iz *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (PaAcrIF11), ParT iz *Sphingobium* sp. (SsParT) i DarT iz *Thermus aquaticus* (TaDarT). Preuzeto i prilagođeno iz¹⁶.

2.3. ADP-ribozilacija nukleinskih kiselina

Iako se ADP-ribozilacija u početku definirala kao posttranslacijska modifikacija proteina, novija istraživanja ukazuju na iznimno važnu ulogu ADP-ribozilacije nukleinskih kiselina u staničnom odgovoru na oštećenja DNA i stresne uvjete. Prema dosadašnjim istraživanjima, ADP-ribozilacija

nukleinskih kiselina podrazumijeva dodavanje ADPr na baze DNA, fosforilirane krajeve DNA ili fosforilirane krajeve RNA²⁵.

ADP-ribozilacija DNA je prvi put opisana na primjeru pierisin ART nazvane po leptiru kupusaru (*Pieris rapae*) iz kojeg je izolirana. Pierisin modificira 2'-deoksigvanzine u dvolančanoj DNA, te tako uvodi oštećenja koja dovode do apoptoze stanice²⁶. Kasnije otkriveni pierisini -2, -3 i -4 te njihovi ortolozi iz bakterija i školjki su pokazali aktivnost na istim supstratima *in vitro*. U ljudskim stanicama ne postoji ortolog pierisina, ali je poznato da njegova egzogena ekspresija u stanicama raka izaziva apoptozu, što dodatno potvrđuje njegovu toksičnost te otkriva potencijalnu korist u antitumorskoj terapiji²⁵.

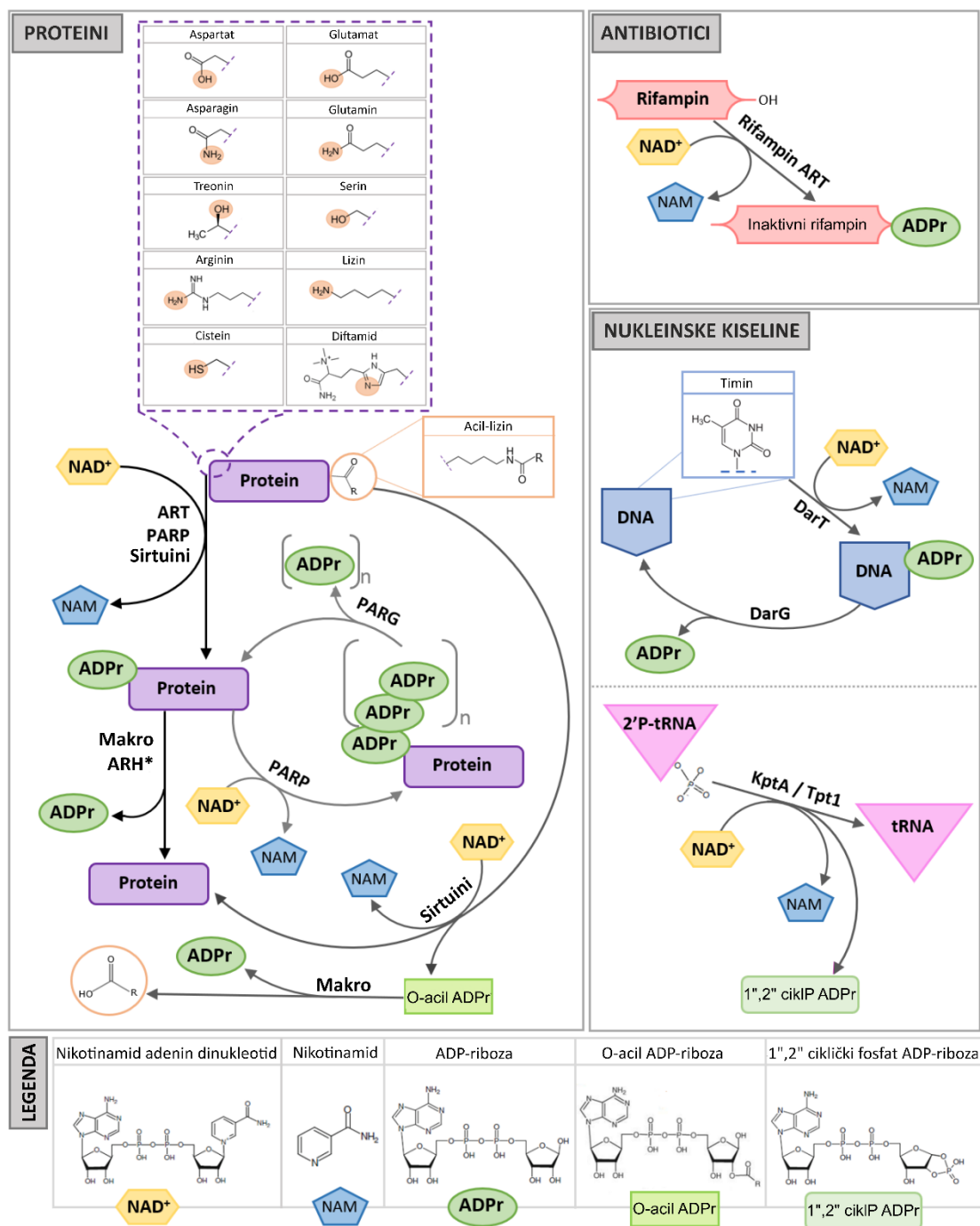
Do sad je najbolje istražen reverzibilni toksin-antitoksin sustav iz bakterije *Thermus aquaticus*. Sastavljen je od DNA ADP-ribozil transferaze (DarT) koja prepoznaje i modificira timin u određenom slijedu nukleotida na jednolančanoj DNA (ssDNA), i DNA ADP-ribozil glikohidrolaze (DarG) koja tu modifikaciju uklanja. Oba homologa ovog toksin-antitoksin para pronađena su u brojnim bakterijskim vrstama među kojima su: ekstremofil *Thermus aquaticus*, te patogeni *Klebsiela pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* i enteropatogena *E. coli* (EPEC)²⁷. Iako nukleotidni slijed koji toksin prepoznaje varira među pojedinim bakterijskim vrstama, može se generalno definirati kao slijed sastavljen od 4 nukleotida u kojem se prepoznaje i modificira timin na trećoj poziciji. Primjerice, DarT iz *Thermus aquaticus* i EPEC pokazuju preferenciju prema TNTC i TTT/TCT slijedu (pri čemu se podcrtani timini ADP-riboziliraju)²⁸. Takva modifikacija timina iznimno je toksična, a čak u nekim slučajevima i letalna za stanicu koja ne posjeduje antitoksin. Pretpostavlja se da su meta toksina DarT jednolančane molekule DNA nastale tijekom replikacije, te da je uzrok letalnosti zaustavljanje replikacijske viljuške^{25,27}.

Modifikacija RNA zabilježena je na primjeru fosfotransferaze Tpt1 prvi put izolirane iz gljiva, koja je odgovorna za sazrijevanje molekula tRNA. Naime, kako bi se dovršilo sazrijevanje tRNA, 2'-fosfotransferaza (Tpt1) uklanja 2'-fosfat zaostao nakon prekrajanja, prebacujući ga na NAD⁺. Time nastaje zrela tRNA i ADP-riboza 1''-2'' ciklički fosfat²⁹ (slika 4). Iako se specifična ligaza koja provodi 5'-ligacijski put i dovodi do stvaranja 2'-fosfat na mjestu prekrajanja pojavljuje samo u gljiva, homolozi proteina Tpt1 koji ga uklanjaju široko su rasprostranjeni u arhejama, bakterijama i eukariotima³⁰. Budući da kao produkt reakcije nastaje ADP-riboza 1''-2'' ciklički fosfat, protein Tpt1 se može svrstati i u skupinu enzima čijim djelovanjem kao nusprodukt nastaje ADP-ribozilirana mala molekula, a koji su pobliže opisani u sljedećem poglavlju.

2.4. ADP-ribozilacija malih molekula

Do danas je poznato nekoliko skupina enzima čijim djelovanjem kao nusprodukti reakcije nastaju ADP-ribozilirane male molekule. Među njima valja istaknuti sirtuine koji kataliziraju reakciju deacetilacije lizinskih bočnih ogranaka proteina (najčešće histona). Reakcija se odvija u više koraka te ovisi o kofaktoru NAD^+ , a kao produkti nastaju NAM, deacetilirani lizin i *O*-Acetil-ADPr (OAADPr) koji kasnije u stanici djeluje kao signalna molekula. Makrodomenski proteini poput MacroD1, Macro D2, TARG1 kao i ARH3 prepoznaju ovaj metabolit NAD^+ te ga hidroliziraju do ADPr i acetata (slika 4)²⁸.

Male molekule modificira i rifampin ADPr-ribozil-transferaza (Arr), koja prijenosom ADPr na hidroksilnu skupinu na C23 atomu rifampina dovodi do njegove inaktivacije³¹. Arr se mogu pronaći u genomu velikog broja Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija¹⁶, među kojima je i oportunistički patogen *Mycobacterium smegmatis* (Arr-ms)³¹. Iako Arr-ms ne pokazuje sličnost s proteinskom sekvencom niti jedne, do sad poznate ART, riješena 3D struktura je pokazala očuvanu srž proteina. S obzirom da u kristalnoj struktura kompleksa Arr-ms:rifampin nisu primijećene neke specifične interakcije između enzima i antibiotika (poput vodikovih veza i ionskih mostova), te da Arr-ms može modificirati široki spektar molekula sličnih rifampinu, nije isključena mogućnost da ovaj enzim može modificirati više tipova različitih malih molekula u stanici³¹.



Slika 4. Shematski prikaz glavnih sudionika ADP-ribozilacijskog sustava.

*ARH** predstavljaju ARH u užem smislu.

2.5. ADP-ribozil-hidrolaze

ADP-ribozilacija regulira različite stanične procese mijenjajući aktivnost, lokalizaciju i/ili stabilnost ciljnih proteina i nukleinskih kiselina koji se modificiraju. ADP-ribozil-hidrolaze osiguravaju reverzibilnost spomenutog sustava te brzu adaptaciju stanice na nove stanične uvjete efikasnim uklanjanjem ADPr u zadanom vremenu.

Ovisno o tipu ciljne (makro)molekule i vrsti kemijske veze s ADPr potrebni su različiti enzimi koji je mogu hidrolizirati, a koji se svrstavaju u dvije evolucijski i strukturno različite porodice proteina: makrodomenski proteini i ADP-ribozil-hidrolaze u užem smislu².

Makrodomenski proteini „čitaju“ i „brišu“ ADPr s modificiranih proteina i nukleinskih kiselina, a evolucijski se mogu podijeliti na barem šest filogenetskih razreda koji se strukturno i funkcionalno povezuju u tri glavne skupine. Prvu skupinu čine proteini nalik ljudskim proteinima MacroD i Macro2 (MacroD skupina), drugu skupinu proteini nalik ljudskim ALC1 (eng. Amplified in Liver Cancer 1) i TARG1 (terminalna ADPr glikohidrolaza 1) (ALC1/TARG1 skupina), a treću proteini nalik ljudskom proteinu PARG (poli(ADPr) glikohidrolaza)². Proteini nalik MacroD i TARG1/ALC1 hidroliziraju *O*-glikozidnu estersku vezu između ADPr i Asp ili Glu te između acilne skupine i ADPr (OAADPr) koji nastaje kao produkt NAD^+ ovisne reakcije koju provode sirtuini. Također, neki enzimi ove skupine hidroliziraju *N*-glikozidnu vezu ili fosfodietersku vezu između ADPr i modificiranih nukleinskih kiselina^{2,32}. PARG proteini mogu cijepati samo *O*-glikozidnu riboza-riboza vezu unutar PAR lanaca, ali ne mogu ukloniti posljednju ADPr koja povezuje PAR lanace s proteinima ili DNA (slika 4)¹.

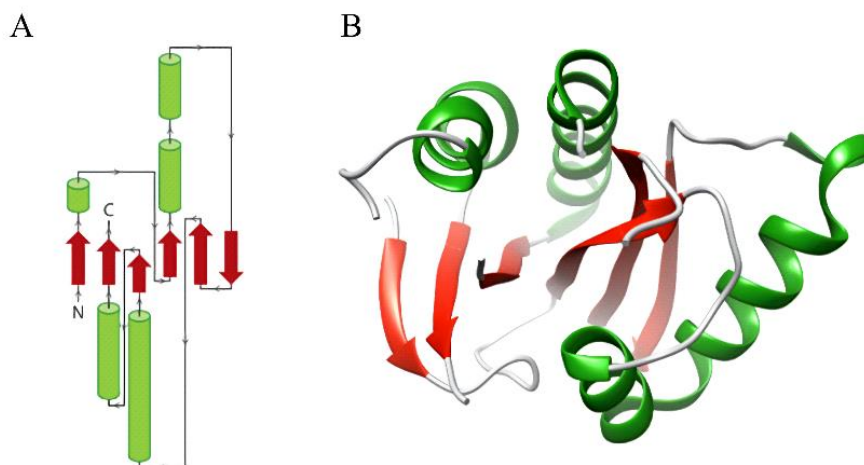
ARH u užem smislu u eukariota uklanjanju ADPr s modificiranih Arg i Ser te hidroliziraju *O*-glikozidnu riboza-riboza vezu unutar PAR lanca, te se često s PARG regrutiraju na mjesto oštećenja DNA i tako obnašaju važnu ulogu u mehanizmima popravka DNA^{33 - 34}. U ljudi su detektirana tri homologa koja se svrstavaju u ARH u užem smislu: ARH1, ARH2 i ARH3 pri čemu je pokazano da su samo ARH1 i 3 katalitički aktivni. Prema dosadašnjim saznanjima ARH1 specifično uklanja ADPr s argininskih bočnih ogranaka, i tako igra važnu ulogu u obrani od bakterijskih infekcija uzrokovanim djelovanjem enterotoksina koji posjeduju ADPr-tranferaznu aktivnost poput kolera toksina. ARH3 posjeduje puno širi spektar supstrata među kojima su: OOADPr, modificirani serinski bočni ogranci te PAR lanci. ARH3 se često regrutira na mjesto oštećenja DNA te je pokazano da uz PARG proteine igra važnu ulogu u odgovoru stanice na

genotoksični stres². Homolozi ARH se mogu pronaći i bakterijama koje fiksiraju dušik, a najbolje je opisan protein DraG pronađen u bakterijama roda *Azospirillum brasilense* i *Rhodospirillum rubrum* u kojima regulira metabolizam fiksacije dušika^{16,35}.

2.5.1. Makrodomenski proteini

Makrodomenski proteini su stara i raznolika obitelj koja igra glavnu ulogu u prepoznavanju, interpretaciji i obrtaju ADP-ribozilacijskog signalnog puta. Važno je naglasiti da makrodomene prepoznaju i vežu ADPr direktno, u formi metaboličkih derivata NAD^+ ili pak u obliku kovalentne modifikacije vezane na proteine ili nukleinske kiseline³⁶.

Makrodomene (Pfam: PF1661) su evolucijski očuvani strukturni moduli koji se sastoje od 130 - 190 aminokiselina, a mogu se pronaći zasebno ili kao dio višedomenskih proteina³⁷. Obnašaju raznolike stanične uloge u svim domenama života uključujući i viruse, a činjenica da njihov broj korelira s kompleksnošću organizma naglašava njihovu važnost u kontroli različitih staničnih procesa¹. Makrodomene imaju globularnu $\alpha/\beta/\alpha$ “sendvič” strukturu koja se uglavnom sastoji od centralnog dijela sastavljenog od β -ploča koje su izvana omeđene s pet α -uzvojnica (slika 5). Aktivno mjesto nalazi se u dubokom utoru utisnutom u srž proteina, a najčešće je omeđeno trima fleksibilnim petljama koje sudjeluju u vezanju supstrata te u enzimskoj katalizi³⁶.



Slika 5. Struktura makrodomena. Topološki prikaz strukture makrodomene (A). Prikaz karakteristične trodimenzionalna strukture makrodomenskog proteina na primjeru proteina SCO6735 iz bakterije *S. coelicolor* (B).

Proteini nalik PARG su makrodomenski proteini od velike važnosti, budući da jedino oni mogu degradirati lance poli-ADP-riboze. Evolucijski se dijele na mikrobijalne koji se još nazivaju i DUF2263 te kanonske koji se primarno mogu naći u višim eukariotima. Mikrobijalni proteini nalik PARG se odlikuju jednostavnijom strukturom sličnom klasičnim makrodomenama, dok kanonski često imaju dodatne strukturne elemente i domene čija uloga (osim stabilizacijske) još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Do sada je poznato da mikrobijalne PARG mogu djelovati samo kao egzo-glikozilaze, tj. uklanjati samo rubne jedinice ADPr, dok većina kanonskih djeluju kao egzo- i endo-glikozilaze².

Proteini iz MakroD skupine su široko rasprostranjeni u svim organizmima i virusima. U ljudi se mogu pronaći dva proteina: MacroD1 i Macro2 po kojima je cijela skupina dobila ime, a koji posjeduju dvije iznimno strukturno slične katalitičke domene. Oba enzima djeluju na modificiranim proteinima, nukleinskim kiselinama i OAADPr. Proteini ove skupine često su kodirani genomima +ssRNA virusa poput *Hepeviridae*, *Togaviridae* i *Coronaviridae* (uključujući i virus SARS-CoV-2, detaljno objašnjeno u poglavlju 2.7.2). Iako je pokazano da MakroD virusni proteini pokazuju hidrolitičku aktivnost prema ADP-riboziliranim proteinima, njihovi fiziološki supstrati još uvijek nisu sasvim poznati. Smatraju se bitnima za virusnu replikaciju zbog njihove mogućnosti poništavanja djelovanja antivirusnih PARP proteina koji čine imunološki odgovor domaćina².

Protein TARG1 (još poznat i kao OARD1 i C6orf130) je do sada jedini poznati katalitički aktivan član TARG1/ALC1 skupine proteina u carstvu *Animalia*. Pokazano je da interagira s proteinom PARP1 te posjeduje hidrolitičku aktivnost prema: *O*-acil-ADPr esterima, ADPr-fosfoesterima na krajevima nukleinskih kiselina, ADP-riboziliranim proteinima te ADP-riboziliranim timinima u ssDNA^{2,38}. TARG1 djeluje u jezgri, točnije, premješta se između jezgri i nukleoplazme ovisno o PAR signalima. U jezgri se lokalizira kod transkripcijski aktivnih mjesta, gdje se veže na ribosome i proteine uključene u procesuiranje rRNA. Primjećeno je da se u odgovoru na oštećenja DNA premješta u nukleoplazmu, gdje vjerojatno doprinosi otklanjanju proteinske ADP-ribozilacije³⁹. Iako se izostanak funkcionalnog proteina TARG1 u ljudi povezuje s neurodegenerativnim bolestima, njegova fiziološka uloga još uvijek nije u potpunosti razjašnjena⁴⁰. Proteini nalik TARG1/ALC1 su rasprostranjeni i u bakterijama, a predstavnik iz bakterije *S. coelicolor* (protein SCO6735) bit će detaljnije opisan u poglavlju 2.6.3.

2.6. ADP-ribozilacija u bakterijama

Proteini uključeni u proces ADP-ribozilacije su nejednoliko rasprostranjeni među bakterijama, a primjećeno je da su ARH u bakterijskim genomima zastupljenije od ART. Neke bakterijske vrste imaju samo nekoliko ART ili ARH homologa ili specijaliziran reverzibilni sustav, dok neke bakterije, poput vrsta iz roda *Streptomyces*, posjeduju cijeli niz ART/ARH proteina koji omogućavaju opsežno korištenje ADP-ribozilacijskog sustava⁴.

S obzirom na dostupne filogenetske podatke smatra se da se ADP-ribozilacija u bakterija razvila kao odgovor na stresne uvjete nakon čega su je „preuzeli“ eukarioti od zadnjeg zajedničkog pretka. Također, postoje indikacije lateralnog prijenosa gena u oba smjera između bakterijskih i eukariotskih organizama. Vjerojatni razlog konstantne evolucije i izmjene gena je selektivni pritisak između patogenih bakterija, virusa i imunološkog odgovora domaćina koji se međusobno bore upravo koristeći proteine koji čine ADP-ribozilacijski sustav kao glavno oružje¹⁶.

Jedan od zanimljivih aspekata ADP-ribozilacije koji se pojavljuju u bakterija su reverzibilni ADP-ribozilacijski sastavi. Oni uključuju ART i ARH koje rade u paru tj. međusobno se neutraliziraju i dolaze u istom operonu. Do sad je najbolje opisan par DraT/DraG koji reverzibilno modificira enzim dinitrogenazu-reduktazu i time regulira fiksaciju dušika u bakterija roda *Ayospirillum* i *Rhodospirillum*^{16,35,41}.

Reverzibilni toksin/antitoksin (TA) sustav DarT/DarG koji specifično modificira jednolančanu DNA²⁷ (mehanizam djelovanja detaljnije opisan u poglavlju 2.3) prisutan je u nekoliko patogenih bakterija poput enteropatogene *E. coli* (EPEC), *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas mendocina*¹⁶. Još uvijek nije u potpunosti razjašnjena uloga ovog TA sustava, a jedan od modela pretpostavlja da bi mogao imati ulogu u indukciji dormantnog stanja u stresnim uvjetima poput prisutnosti antibiotika. Aktiviranjem transferaze DarT i ADP-ribozilacijom jednolančane DNA zaustavlja se replikacija i stanica ulazi u dormantno stanje. Prestankom nepovoljnih uvjeta inducira se aktivnost hidrolaze DarG, koja uklanjanjem ADPr s jednolančane DNA omogućuje nastavak replikacije i vraćanje stanice u stanje normalne aktivnosti. Drugi model pretpostavlja ulogu u obrani od bakteriofaga, pri čemu specifična modifikacija jednolančane DNA omogućuje razlikovanje strane i domaćinske molekule DNA²⁵.

2.6.1. *Streptomyces coelicolor* kao modelni organizam za izučavanje procesa ADP-ribozilacije u bakterija

Zbog relativno velikog broja proteina uključenih u proces ADP-ribozilacije, vrste roda *Streptomyces* se smatraju odličnim modelnim organizmima za izučavanje navedenog procesa kod bakterija⁴. Primijećeno je da se u bakterijama *S. coelicolor* i *S. griseus* ADP-ribozilacija mijenja s morfološkom diferencijacijom, da je povezana s promjenama u metaboličkim potrebama i uključena u regulaciju proizvodnje antibiotika^{5,7,8}.

2.6.2. Glavne karakteristike bakterija roda *Streptomyces*

Streptomiceti su filamentozne Gram-pozitivne bakterije iz reda *Actinomycetales*, porodice *Streptomycetaceae*. Žive u tlu, a karakterizira ih kompleksan razvojni ciklus koji uključuje morfološku diferencijaciju i fenomen programirane stanične smrti (eng. Programmed Cell Death, PCD) koji posjeduje određenu homologiju s eukariotskom apoptozom⁴². Njihov životni ciklus uključuje nekoliko diferenciranih tipova stanica. Iz spora se na krutom mediju u povoljnim uvjetima razvija razgranati supstratni (vegetativni) micelij. Nakon prestanka rasta na čvrstoj podlozi, razvija se zračni micelij koji koristi hranjive tvari osigurane razgradnjom vegetativnog micelija. U uvjetima nedostatka nutrijenata dolazi do pregrađivanja zračnih hifa i formiranja spora koje se rasprše i osiguravaju potomstvo. U supstratnom i zračnom miceliju kromosom je prisutan u mnogo kopija dok je u sporama prisutan u samo jednoj kopiji⁵.

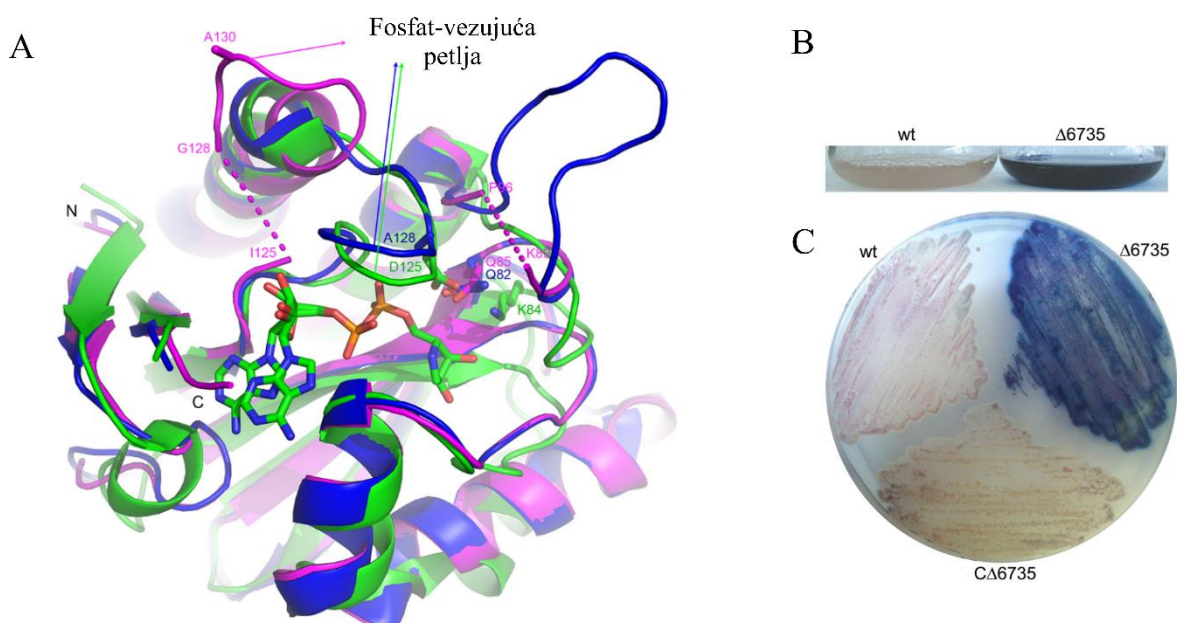
Morfološka diferencijacija uparena je s proizvodnjom sekundarnih metabolita poput antibiotika, antimikotika te brojnih drugih biološki aktivnih „malih molekula“ koje se svrstavaju u „prirodne produkte“. Primjerice, supstratne hife proizvode plavi antibiotik aktinorodin, crveni undecilprodigeosin i žuti koelomicin⁴³. Bakterije roda *Streptomyces* odgovorne su za produkciju brojnih medicinskih, farmakoloških i biotehnoških spojeva te čak preko 80 % prirodnih antibiotika^{5,44}. Vrlo visoki udio GC parova u linearnoj genomskoj DNA (70 – 74 %), prisutnost velikih linearnih plazmida i aktinovirusa, te visoki stupanj genetičke nestabilnosti, još su neka obilježja koja ovu skupinu bakterija čine izuzetno zanimljivom i intenzivno istraživanom⁴⁴.

2.6.3. Makrodomenski protein SCO6735 iz *S. coelicolor*

Makrodomenski protein SCO6735 iz bakterije *S. coelicolor* posjeduje visoko očuvanu makrodomensku strukturu s dubokim utorom koji predstavlja aktivno mjesto omeđeno s tri fleksibilne petlje (slika 6A). Njegovo strukturno poravnanje programom *PDBeFold* daje veliki broj strukturnih homologa među kojima se ističe ljudski protein TARG1 (PDB: 4J5R; *Z score* 9,4; RMSD 2,04 Å)⁷. Usporedba njihovih 3D struktura otkriva da katalitička dijada Lys84 i Asp125 iz proteina TARG1⁴⁰ nije očuvana u proteinu SCO6735, već je zamijenjena s Gln i Ala (Gln85 i Ala130) što ukazuje na jedinstveni katalitički mehanizam (slika 6A). Eksperimenti *in vitro* su pokazali da SCO6735, kao i TARG1 može ukloniti ADPr sa supstrata mono-ADP-riboziliranog na Glu^{7,40}.

Pretpostavlja se da je protein SCO6735 uključen u odgovor na oštećenja DNA budući da je njegova ekspresija pod kontrolom RecA-neovisnog promotora koji se inducira uslijed oštećenja DNA. Unatoč tome, eksperimentalno je pokazano da SCO6735 nije nužan za popravak DNA oštećenja nastalih djelovanjem MMS i UV-zračenja⁷.

Uklanjanje gena koji kodira protein SCO6735 dovodi do pojave tzv. „plavog“ fenotipa (slika 6B i C) uslijed povećane proizvodnje antibiotika aktinorodina, što ukazuje na moguću ulogu u regulaciji metabolizma antibiotika⁷.



Slika 6. Usporedba riješene kristalne strukture proteina SCO6735 iz bakterije *S. coelicolor* (PDB: 5M3E, ružičasto) s 3D strukturama homolognih proteina TARG1 iz čovjeka (PDB: 4J5R, zeleno) i Bt1257 iz bakterije *Bacillus thetaiotaomicron* (PDB: 2FG1, plavo) (A). „Plavi“ fenotip bakterije *S. coelicolor* u tekućem (B) i krutom (C) mediju koji se javlja uslijed uklanjanja gena koji kodira za protein SCO6735. Preuzeto i prilagođeno iz⁷.

2.7. Virusni proteini koji sudjeluju u procesu ADP-ribozilacije

Prvi put je primijećeno da pojedini virusi kodiraju za proteine koji sudjeluju u procesu ADP-ribozilacije na primjeru bakteriofaga T4, koji kodira za čak tri ART: Alt, ModA i ModB. Njihova je uloga mono-ADP-ribozilacija proteina domaćina, poput α -podjedinice RNA polimeraze¹.

Nedavno je otkriven novi tip transferaze koju kodira genom bakteriofaga AcrIF11, a čija je uloga inaktivacija bakterijskog CRISPR-Cas imunološkog sustava. Navedena transferaza ADP-ribozilira bočni ogranak Asn250 Cas8f podjedinice, unutar Csy kompleksa. Time se u potpunosti onemogućuje vezanje dvolančane molekule DNA te inaktivira CRISPR sustav⁴⁵.

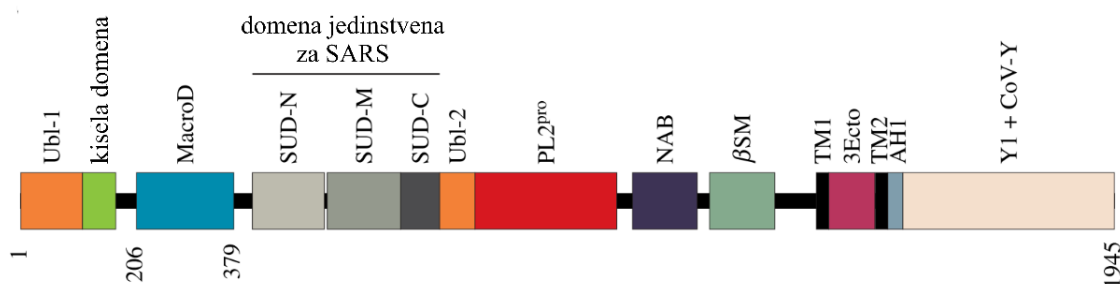
Neki virusi kodiraju za ARH. Kao što je spomenuto u poglavlju 2.5.1, nekoliko porodica RNA virusa poput *Coronaviridae*, *Togaviridae* i *Hepeviridae*, kodiraju za makrodomene koje mogu postojati zasebno ili kao dio multidomenskog proteina⁹. Većina virusnih makrodomena su homolozi ljudskog proteina MacroD⁴⁶. Virusne makrodomene imaju mogućnost suprotstavljanja ADP-ribozilacijskom sustavu domaćina koji u slučaju infekcija stvara antivirusni okoliš aktivacijom imunološkog odgovora. Ova činjenica stavlja virusne makrodomene u fokus istraživanja obećavajućih terapijskih meta. No, njihova spomenuta homologija s ljudskim makrodomenskim proteinima otvara pitanja unakrsne-aktivnosti potencijalnih lijekova te, posljedično, negativnog učinka na domaćina.

2.7.1. Virus SARS-CoV-2

Posljednjih nekoliko desetljeća koronavirusi (CoVs) su se pokazali kao opasni patogeni od velike veterinarske i medicinske važnosti. Odgovorni su za trenutnu COVID-19 pandemiju, kao i za dvije nedavne epidemije: teški akutni respiratorni sindrom (Severe Acute Respiratory Sndrome, SARS) i Bliskoistočni respiratorni sindrom (Middle Eastern Respiratory Sndrome, MERS)¹⁰.

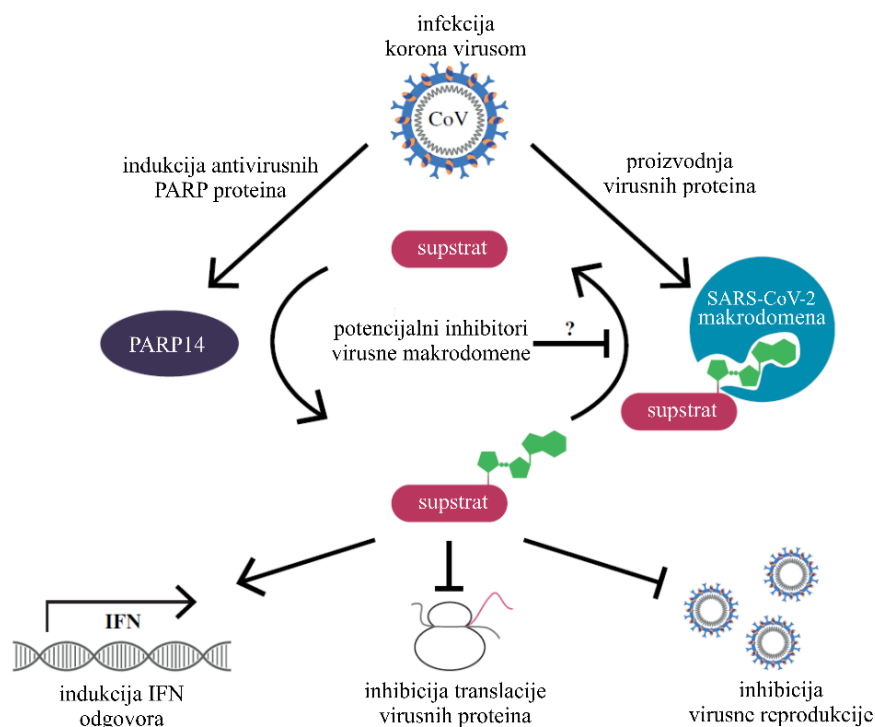
Genom virusa SARS-CoV-2 kodiran je jednolančanom molekulom +RNA koja sadrži ~30000 nukleotida. Kodira za četiri strukturna proteina koja oblažu nukleinsku kiselinu i čine njegovu ovojnica te za ukupno 16 nestrukturnih proteina (nsp) (slika 7). Nsp su odgovorni za

različite stanične funkcije poput: uspostave infekcije, invazije imunološkog sustava, samoreplikacije itd.⁴⁷.



Slika 7. Shematski prikaz arhitekture domena nsp3 virusa SARS-CoV-2. Makrodomena (od 206 do 379 aminokiseline) je označena plavom bojom. Preuzeto i prilagođeno iz¹⁰.

Sposobnost koronavirusa da uspostavi infekciju i uzrokuje bolest ovisi o njegovoj mogućnosti da onemogućava prvu liniju obrane domaćina – urođeni imunološki odgovor¹⁰. Centralni dio urođenog imunološkog odgovora je interferonski (IFN) odgovor koji je pokretač antivirusnog stanja. On podrazumijeva ekspresiju IFN-stimuliranih gena koji kodiraju proteine odgovorne za cijeli niz procesa, među kojima su: ograničavanje pristupa domaćinskim faktorima, prepoznavanje i razgradnja virusne RNA te usporavanje translacije proteina. Među glavnim akterima antivirusnog odgovora su i neke PARP, skupnog imena antivirusne PARP. U slučaju infekcije virusom SARS-CoV-2, ADP-ribozilacija domaćina je posredovana proteinom PARP9 i njegovim interakcijskim partnerom DTX3L⁴⁸. Kako bi se onemogućio imunološki odgovor domaćina, virusne makrodome otklanjaju ADP-ribozilaciju koju provode antivirusne PARP te tako potiču virusnu replikaciju (slika 8)¹⁰. Pokazano je da uvođenjem mutacije koja smanjuje aktivnost SARS-CoV makrodome dolazi do snažnog IFN odgovora i produkcije pro-upalnih citokina u stanicama zaraženog miša tijekom ranih faza infekcije⁴⁹ što potvrđuje njen veliki terapijski potencijal.



Slika 8. Shematski prikaz djelovanja makrodomene virusa SARS-CoV-2. Infekcija koronavirusom dovodi do nakupljanja ljudskih antivirusnih proteina, primarno proteina PARP14, te produkcije proteina kodiranih virusnim genomom među kojima je makrodomena SARS-CoV-2. PARP14 ADP-ribosilira ciljne proteine domaćina kako bi se aktivirao interferonski imunološki odgovor te spriječila replikacija virusa. Hidrolitička aktivnost virusne makrodomene dovodi do uklanjanja ADPr s ciljnih proteina domaćina čime usporava imunološki odgovor i potiče proizvodnju virusnih čestica. S druge strane, razvoj inhibitora makrodomene virusa SARS-CoV-2, osiguralo bi normalno djelovanje imunološkog interferenskog odgovora i spriječilo replikaciju virusa . Preuzeto i prilagođeno iz¹⁰.

2.7.2. Makrodomena virusa SARS-CoV-2 (Mac1)

Makrodomena virusa SARS-CoV-2 (Mac1) je dio multidomenskog nestrukturnog proteina 3 (nsp3) velikog 200 kDa koji je očuvan u svih koronavirusa¹¹. Mac1 ima klasičnu makrodomensku $\alpha/\beta/\alpha$ „sendvič“ strukturu, a ADPr veže pomoću razvijene mreže vodikovih veza u dobro

definiranom utoru koji čini vezno mjesto⁵⁰. Njen terapijski potencijal je doveo do relativno brzog rješavanja trodimenzionalne strukture u apo-formi te u kompleksima s ADPr, AMP te ADP-HPD i ADP-HPM - inhibitorima srodnog PARG enzima¹⁰. U svrhu istraživanja aktivnog mjesta i pronalaska malih molekula koje bi se vezale bolje od pripadnog supstrata provedena je i pretraga fragmenata koja je rezultirala s 214 kristalnih struktura makrodomene Mac1 s raznim fragmentima malih molekula¹⁵. Navedena analiza može uvelike pomoći prilikom dizajna specifičnih inhibitora.

Iako su interakcije koje omogućuju vezanje ADPr dobro istražene još uvijek nije poznat katalitički mehanizam kojim makrodomena Mac1 djeluje. Bazirano na strukturnoj homologiji s ljudskim makrodomenskim proteinom MacroD2 predložen je katalitički mehanizam potpomognut supstratom¹⁰. S druge strane, kristalne strukture Mac1 u apo-formi i u kompleksu s ADPr pri različitim temperaturama i pH vrijednostima riješene neutronsom difrakcijom predlažu drugi mogući mehanizam. On pretpostavlja djelovanje His45 kao generalne baze koja aktivira molekulu vode za nukleofilni napad na C1 anomerni ugljikov atom u distalnoj ribози¹⁴.

2.8 Teorijska osnovica računalnih metoda

2.8.1 Molekulska dinamika

Molekulska dinamika (MD) je računalna metoda koja simulira gibanje atoma u sustavu, kako bi se opisalo njegovo ponašanje na sub-molekulskoj razini pri zadanoj temperaturi i u zadanom vremenskom intervalu. Metoda podrazumijeva postojanje poznate 3D strukture makromolekula, koje mogu biti određene metodom kristalografije, nuklearne magnetske rezonance (NMR) ili homolognim modeliranjem.

2.8.1.1. Polje sila

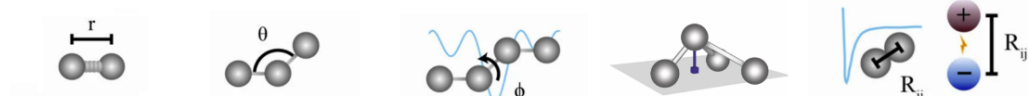
Prilikom priprema sustava za simulaciju svakom se atomu dodjeljuje tip atoma koji sadrži informaciju o atomskom broju, formalnom naboju te vrstama kemijskih veza u koje je uključen navedeni atom. Parametri kojima se opisuje odnos atoma koji su u nekoj kovalentnoj ili nekovalentnoj interakciji (poput torzijskih kutova, duljine veze itd.) mogu se dobiti eksperimentalno (polja sila prve generacije) i kvantno–mehaničkim računima (polja sila druge generacije). Pridruživanje parametara atomima u makromolekuli naziva se parametrizacijom, a omogućava računanje potencijalne energije molekule ovisno o njezinoj konformaciji.

Spomenuti parametri i funkcija kojom je definirana ukupna potencijalna energija sustava koji se simulira (izraz 1 i 2) čine polje sila.

Ukupna potencijalna energija (E_{uk}) može se izračunati kao zbroj energijskih doprinosa veznih i neveznih interakcija između atoma u sustavu (izraz 1). Energija veznih interakcija računa se kao zbroj potencijalnih energija koje se javljaju uslijed: istežanja veza (E_{veze}), promjene valentnog kuta (E_{kut}), promjene torzijskog kuta (E_{torz}) te odstupanja iz ravnine atoma koji čine planarne sustave (E_{oop}). Doprinosi koji čine neveznu energiju sustava su: elektrostatske interakcije (E_{el}), Van der Waalsove interakcije (E_{vdw}) te mješoviti članovi (E_{mix}) (izraz 2, slika 9). Mješovite članove ne sadrže sva polja sila. Oni se najčešće koriste zbog nemogućnosti neovisnog promatranja različitih doprinosa ukupnoj potencijalnoj energiji sustava.

$$E_{uk} = E_{vezne} + E_{nevezne} \quad (1)$$

$$E_{uk} = E_{veze} + E_{kutovi} + E_{torz} + E_{oop} + E_{el} + E_{vdw} + \sum E_{mix} \quad (2)$$

$$E_{uk} = \underbrace{\sum_{veze} \frac{k_s}{2} (l - l_{eq})^2 + \sum_{kutovi} \frac{k_b}{2} (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{torz} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{oop} \frac{1}{2} k_\xi \xi^2}_{E_{vezne}} + \underbrace{\sum_{i>j} \left[\frac{A}{R_{ij}^{12}} - \frac{C}{R_{ij}^6} + \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon r_{12}} \right]}_{E_{nevezne}}$$


Slika 9. Jednadžbe koje se koriste za opisivanje veznih i neveznih sila koje upravljaju gibanjem atoma u simuliranom sustavu. Preuzeto i prilagođeno iz⁵¹.

Metoda molekulske dinamike tretira atome kao kugle u prostoru koje su međusobno povezane oprugama. Stoga se gibanje atoma u molekuli te doprinosi pojedinih veznih energija opisuju klasičnom mehanikom, korištenjem aproksimacije harmoničkog oscilatora (slika 9).

2.8.1.1. Simulacija molekulske dinamike

Na početku simulacije svakom se atomu sustava na položaju definiranom koordinatama (x,y,z) pridružuju početna brzina prema Maxwell–Boltzmannovoj raspodjeli za danu temperaturu pri kojoj se vrši simulacija (izraz 3). Uslijed gibanja atomi napuštaju svoje početne položaje što dovodi do promjene konformacije molekule, odnosno do promjene položaja sustava na plohi potencijalne energije. Deriviranjem izraza za potencijalnu energiju i korištenjem drugog Newtonovog zakona, dobiva se skup Newtonovih jednadžbi gibanja (izraz 4). Sila F , povezana je s izrazom za ukupnu potencijalnu energiju (E_{uk}) preko izraza 5, čime se u konačnici dobiva izraz 6, čijim se rješavanjem dolazi do vremenske zavisnosti položaja atoma u sustavu, odnosno do trajektorije (izraz 6).

$$P(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_b T}} e^{-\frac{m_i v_i^2}{2k_b T}} \quad (3)$$

$$m_i a_i = m_i \frac{\partial^2 r}{\partial t^2} = F_i \quad (4)$$

$$F_i = -\nabla E_{uk} \quad (5)$$

$$m_i \frac{\partial^2 r}{\partial t^2} = -\nabla E_{uk} \quad (6)$$

Pri čemu je k_b Boltzmanova konstanta, m_i masa atoma, v_i brzina atoma, a T temperatura.

Kako je sila koja djeluje na jedan atom u molekuli ovisna o položaju tog atoma, ali i položaju svih ostalih atoma s kojima je u interakciji, skup Newtonovih jednadžbi gibanja za atome u molekuli nema analitičko rješenje te je potrebno primijeniti numeričke metode rješavanja. Algoritmi koji se najčešće koriste za numeričko rješavanje i dobivanje trajektorije su *Verletov* algoritam i *leap-frog* algoritam, te njihove inačice poput *Beemanovog* algoritma ili *velocity Verlet* algoritma. Sve numeričke metode koriste aproksimaciju da je sila koja djeluje na atom konstantna tijekom odabranog vremenskog koraka.

U većini slučajeva eksperimentalni uvjeti podrazumijevaju konstantan tlak i temperaturu, te se u svrhu što boljeg oponašanja tih uvjeta, simulacijama nastoji generirati izobarno-izotermni (NPT) ansambl. Kanonski (NVT) ansambl najčešće se generira prilikom dovođenja sustava na temperaturu pri kojoj se želi simulirati. U tom slučaju volumen se održava konstantnim dok se temperatura postepeno mijenja do željene vrijednosti. Nakon toga temperatura se određeni vremenski interval održava konstantnom kako bi se postigla odgovarajuća gustoća sustava. Budući da se temperatura može prikazati kao funkcija raspodjele kinetičke energije (E_k) po česticama u sustavu (izraz 7), najjednostavniji pristup regulaciji temperature tijekom molekulske dinamike je modifikacijom brzine čestica.

$$E_k = \frac{3}{2} N k_B T = \sum_{i=1}^N \frac{m_i v_i^2}{2} \quad (7)$$

Za regulaciju temperature u sustavu koriste se termostati, koji se ovisno o pristupu dijele na: termostate s jakim i slabim sprežanjem, te stohastičke termostate. Berendsenov termostat je najčešće korišten termostat sa slabim sprežanjem. Njime se simulira uranjanje sustava u kupelj

konstantne temperature, dok se intenzitet interakcije sustava i kupelji regulira konstantom sprezanja. Najpoznatiji stohastički termostat je Langevinov, koji se zasniva na interakciji fiktivnih čestica s promatranim sustavom, odnosno izmjeni kinetičke energije kroz sudare.

Održavanje konstantnog tlaka sustava vrši se skaliranjem udaljenosti među česticama i njihovih brzina. Berendsenov barostat je konceptualno najjednostavniji, a radi na principu sprezanja sustava s vanjskim tlakom pri čemu je reguliran konstantom sprezanja.

Utjecaj otapala na strukturu i dinamiku bioloških makromolekula vrlo je izražen i ne smije se zanemariti tijekom računalnih simulacija. Dva su glavna načina tretiranja otapala tijekom simulacija: implicitni i eksplicitni. Implicitni modeli tretiraju otapalo kao kontinuum određene dielektrične konstante dok eksplicitni podrazumijevaju simulaciju makromolekule „uronjenu“ u kutiju ispunjenu modelima molekula vode. Ovisno o tome koliko model koji se koristi za opis molekula vode vjerodostojno simulira njena stvarna svojstva, raste računalna zahtjevnost simulacija. Primjerice, često korišteni TIP3P model molekule vode prikazan je kao kruto tijelo koje posjeduje dipolni moment, i nema mogućnost vibracije veza i savijanja valentnog kuta, već samo mogućnost translacije i rotacije.

Prilikom korištenja eksplicitnih modela otapala javlja se problem rubnih uvjeta, odnosno, na rubovima simulacijske kutije dolazi do gubitka molekula vode. Kako bi se to izbjeglo najčešće se primjenjuju periodični rubni uvjeti (eng. Periodic Boundary Conditions, PBC). Njihovom primjenom se središnja simulacijska kutija replicira u prostoru u sve tri dimenzije, te je tako sa svih strana okružena svojim replikama. Svaka molekula koja tijekom simulacije izađe s jedne strane središnje kutije u susjednu repliku, s druge strane će u nju ući iz odgovarajuće replike, čime se osigurava zatvorenost sustava i rješava problem rubnih uvjeta.

2.8.2. Molekulsko uklapanje

Metoda molekulskog uklapanja (eng. docking) omogućava računalno istraživanje nekovalentnog vezanja liganda za makromolekulu. Često se koristi u farmaceutskim istraživanjima novih potencijalnih inhibitora proteina u slučaju kad je poznat ligand i njegovo vezno mjesto ili u svrhu predikcije vezanja liganda na protein kad ne postoji kristalna struktura kompleksa. Također, može

se koristiti i za otkrivanje veznog mjesta molekula na strukturi proteina i tada se ta metoda naziva „slijepim“ molekulskim uklapanjem (eng. blind docking).

Sve metode uklapanja zahtijevaju funkciju bodovanja koja će omogućiti rangiranje predviđenih načina vezanja pojedinih liganada. Funkcije bodovanja dijele se na: empirijske, bazirane na polju sila, i *knowledge based* tj. bazirane na eksperimentalnim podacima⁵². Funkcije bodovanja bazirane na polju sila računaju interakcijsku energiju između proteina i liganda, kao i konformacijsku energiju liganda. Interakcijska energija se obično računa kao zbroj energetskih doprinosa disperznih i Van der Waalsovih interakcija, vodikovih veza, Coulombove interakcija te entalpije desolvatacije. Empirijske metode koriste funkcional polja sila kako bi se predvidjele protein-ligand interakcije ovisne o kutu i udaljenosti, poput vodikovih veza. Napolarni utjecaj otapala modelira se na temelju hidrofobnih kontakata. Parametri pojedinih doprinosa energiji najčešće se računaju korištenjem regresijske metode tako da se ugađaju poznatim eksperimentalnim podacima. Funkcije bazirane na eksperimentalnim podacima izvode se iz statističke analize velikog broja protein – ligand kompleksa čiji su parametri ili načini vezanja poznati⁵³. Funkcije bodovanja su najčešće dizajnirane kako bi se omogućilo efikasno pretraživanje velike baze molekula, te nisu dovoljno precizne u predikciji afiniteta vezanja liganda za sve proteinske sustave. Najčešće su razvijene i dizajnirane za neki određeni sustav, te je zato najbolje primijeniti nekoliko metoda uklapanja kako bi se u konačnici dobila što točnija predikcija vezanja nekog liganda.

S obzirom na metodu pretraživanja koju koriste, metode uklapanja dijelimo na stohastične i sistematične. Ukratko, sistematične metode pretraživanja su determinističke i uzorkuju prethodno definirani prostor pretraživanja, dok stohastičke metode iterativno uvode nasumične promjene u varijable stanja dok se ne postigne kriterij prethodno definiran od strane korisnika. Metode pretraživanja još se mogu dijeliti i na lokalne i globalne, ovisno o tome imaju li tendenciju pronalaska konformacije u najbližem lokalnom minimumu ili globalnom minimumu u definiranom prostoru pretraživanja. Novije, hibridne metode uklapanja koje rade globalno-lokalnu pretragu su se pokazale iznimno uspješnima i efikasnima u pretraživanju energetskih minimuma, čak bolje nego samo globalne metode. Najpoznatiji programi za pretraživanje lokalnih minimuma su *AutoDock* i *Glide*, globalnih *Monte Carlo*, a najčešće korišten hibridni globalno-lokalni program je *Lamarckian*⁵².

Priprema sustava za račun molekuskog uklapanja započinje pripremom strukture makromolekule i liganda, pri čemu je najvažnije provesti protonaciju makromolekule i liganda te generiranje raspodjele naboja i mogućih konfiguracija liganda.

Poznato je da proteini mogu mijenjati konformaciju u veznom i ne-veznom stanju, pri čemu promjena u veznom stanju ovisi o ligandu. Većina metoda uklapanja ne dozvoljava fleksibilnost makromolekule (s ciljem pojednostavljenja računa), stoga postoji nekoliko pristupa kojima se može doskočiti navedenom problemu. Jedan od pristupa je prethodno izvođenje simulacija molekulske dinamike u svrhu dobivanja različitih konformacija, odnosno „isječaka iz trajektorije“ proteina u apo-formi, u koje će se kasnije uklopiti ligand od interesa. Ovaj postupak razvijen u McCammon grupi⁵⁴ nastoji imitirati inducirano pristajanje liganda u aktivno mjesto proteina, a omogućio je razvoj novih inhibitora HIV intergraze⁵⁵. Drugi pristup podrazumijeva korištenje molekulske dinamike nakon računa uklapanja kako bi se optimizirale ostvarene interakcije, dobio bolji uvid u njihovu stabilnost te proučio navedeni sustav kad je okružen molekulama vode. Jedno od rješenja je i fleksibilna metoda uklapanja, koja dozvoljava definiranje bočnih ogranaka aminokiselina kojima će se omogućiti rotacija veza u svrhu uspostave optimalnih interakcija s ligandom. Time se omogućuje prilagođavanje veznog mjesta ligandu te optimalno vezanje. Negativna strana takvog računa je značajnija zahtjevnost i potencijalno generiranje nereálnih i energetski nepovoljnih konformacija receptora, tj. proteina.

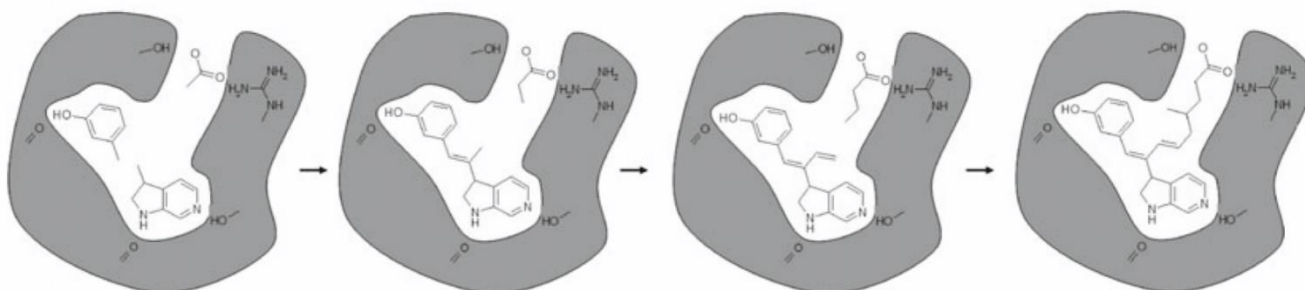
2.8.3. Virtualno pretraživanje

Virtualno pretraživanje je set računalnih metoda kojima se evaluiraju velike baze malih molekula. Mogu biti bazirane na metodi uklapanja molekule od interesa u 3D strukturu proteina (eng. structural-based) ili na strukturi i obliku liganda za kojeg je poznato da se veže u makromolekule od interesa (eng. ligand-based)⁵³.

2.8.3.1. Virtualno pretraživanje bazirano na 3D strukturi proteina

Zbog efikasnosti računa, ova se metoda intenzivno koristi u svrhu virtualnog pretraživanja velikih baza malih molekula. Račun uklapanja jednog liganda obično traje nekoliko minuta, ako se izvodi na jednoj procesorskoj jezgri računala, što u konačnici omogućava relativno brzu pretragu od 10 000 do 100 000 spojeva ukoliko se račun izvodi na snažnijem računalu ili računalnom klasteru.

Jedan of programa koji se koristi u svrhu pretraživanja baziranog na 3D strukturi makromolekule je program *Glide*⁵⁶ koji je dio programskog paketa *Schrodinger*. *Glide* koristi empirijsku metodu bodovanja i sistematično pretraživanje pomoću *place-and-join* algoritma shematski prikazanog na slici 10. Ukratko, algoritam cijepa ligande na nekoliko zasebnih fragmenata koji se zatim zasebno uklapaju. Poveznica između fragmenata se dodaje na kraju, a ligandi koji imaju nisku energiju konformacije se zadržavaju⁵³.



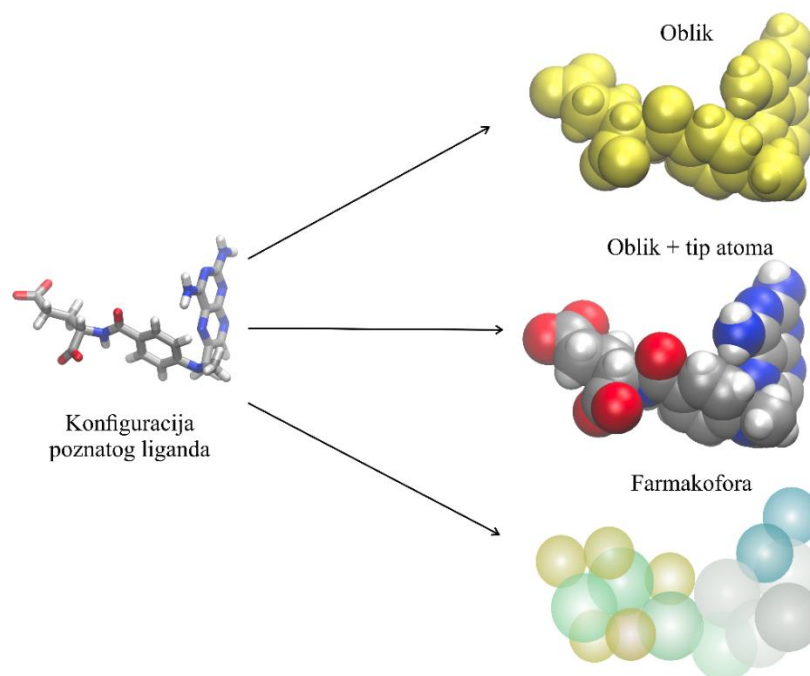
Slika 10. Shematski prikaz *place-and-join* sistematični algoritam pretraživanja kojeg koristi program *Glide*⁵⁶. Preuzeto i prilagođeno iz⁵³.

2.8.3.2. Virtualno pretraživanje bazirano na obliku liganda

Pretraživanje na temelju sličnosti oblika malih molekula (eng. shape screening) koristi se u slučaju kad već postoji poznati ligand. Zasniva se na ideji da receptor prepoznaje oblik i elektrostatska svojstva svog nativnog liganda, te da će isto tako prepoznati i vezati drugi ligand koji ima sličan oblik i elektrostatska svojstva. Koncept se sastoji od generiranja sfera koje predstavljaju oblik poznatog liganda, a sve druge strukture se evaluiraju bazirano na tome koliko se dobro njihove sfere preklapaju s onima poznatog liganda.

Najjednostavniji tip ovakve pretrage radi se samo na temelju volumena kojeg atomi (sfere) liganda zauzimaju u prostoru (eng. atom based). Kompleksniji pristup uključuje i usporedbu tipova atoma liganda (eng. atom based and atom typing), dok je najpreciznija metoda pretraživanja na temelju farmakofora (eng. pharmacophore) (slika 11). Farmakofor je opis kemijskih karakteristika i ključnih reakcijskih centara koji su nužni za molekulsko prepoznavanje liganda od strane bioloških makromolekula. Postupak pretraživanja na temelju farmakofora je računalno najzahtjevniji, ali daje i najbolje rezultate.

Budući da se algoritam navedenog pretraživanja gotovo u potpunosti temelji na linearnoj algebri, može se jednostavno skalirati, a računi se mogu izvoditi paralelno na procesorima ili grafičkim karticama što značajno skraćuje računalno vrijeme i omogućava analizu velike količine podataka. Ova je metoda puno brža od virtualnog pretraživanja baze malih molekula uklapanjem i omogućava analizu puno veće baze podataka, stoga se često koristi kao jedna od metoda redukcije početnog skupa molekula, nakon koje slijedi virtualno pretraživanje uklapanjem. Nedostatak ove metode je nemogućnost pronalaska liganada koji se dobro vežu u aktivno mjesto, ali nisu oblikom slični poznatim ligandima. Upravo je iz tog razloga najbolje kombinirati obje metode, tako se dobiva veći i raznovrsniji skup liganada čije će se vezanje kasnije testirati *in vitro* metodama.



Slika 11. Shematski prikaz tipova virtualnog pretraživanja baziranog na obliku liganda (eng. shape screening). Pretraživanje može biti bazirano samo na obliku poznatog liganda, na obliku i

tipovima atoma ili na temelju farmakofora - skupa opisa kemijskih karakteristika i ključnih reakcijskih centara koji osiguravaju prepoznavanje liganda od strane makromolekule.

§ 3. Eksperimentalni dio

3.1 Materijali

3.1.1 Standardne kemikalije

Trikloroctena kiselina (Gram-mol), glicin (Sigma), tris baza (Sigma-Aldrich), tween 20 (Sigma-Aldrich), apsolutni etanol (Gram-mol), etanol 96 % (Gram-mol), kalcijev klorid dihidrat (Kemika), natrijev dodecil sulfat (Sigma-Aldrich), natrijev dihidrogenfosfat monohidrat (Merck), dinatrijev hidrogenfosfat bezvodni (Kemika), magnezijev klorid heksahidrat (Kemika), agaroz (Sigma-Aldrich), bakto agar (BD), *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin, TEMED (Sigma-Aldrich), akrilamid:bisakrilamid umreženja 29:1 (Sigma-Aldrich), metanol (Kemika), octena kiselina 96 % (Gram-mol), glicerol redestilirani (Kemika), β -merkaptotanol (Merck), izopropil- β -tiogalaktozid, IPTG (Sigma-Aldrich), ditiotreitol, DTT (Sigma-Aldrich), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonskakiselina, Hepes (USB Corporation), glukoza (Sigma), kvašičev ekstrakt (Fisher Scientific), magnezijev klorid heksahidrat (Kemika), imidazol (Sigma-Aldrich), fetalni goveđi serum (eng. fetal bovine serum FBS, Capricorn Scientific).

3.1.2 Boje

Bromfenol-plavo (Serva), briljantno modriilo Coomassie R-250 (Merck), etidijev bromid (Boehringer Mannheim), 6 \times Gel Loading Dye, Purple (Thermo Fisher Scientific), SYBRTM Gold (Invitrogen), 1 \times Bradfordov reagens (Biorad).

3.1.3 Markeri

1 kb DNA Ladder, Purple (NEB), Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad).

3.1.4 Komercijalni enzimi

Lizozim (Sigma-Aldrich), Premix ExTaq (Takara), Q5 High-Fidelity DNA-polimeraza te prikladni puferi Q5 i Q5 High GC Enhancer (NEB), ElectroLigase (NEB), restrikcijske endonukleaze s pripadajućim puferima (Thermo Fisher Scientific), EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (Takara).

3.1.5 Antibiotici

Ampicilin (Sigma-Aldrich), kloramfenikol (Sigma-Aldrich), kanamicin sulfat (Sigma-Aldrich).

3.1.6 Komercijalni kompleti

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) za izolaciju plazmidne DNA, QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) za izolaciju DNA iz agaroznih gelova.

3.1.7 Hranjive podloge i mediji za uzgoj bakterija *E. coli* i *S. coelicolor*

Za pripremu hranjivih podloga za uzgoj bakterija *E. coli* korišteni su sljedeći proizvodi: LB Broth (Luria-Bertani, BD) i TB (Terrific Broth, Fisher Scientific). Za uzgoj bakterija *E. coli* korištene su tekuće i krute hranjive podloge.

Bakterije *S. coelicolor* uzgajane su u tekućoj CRM (eng. Complete Regeneration Medium)⁵⁷ i na krutoj soja manitol (SM) hranjivoj podlozi⁵⁸.

3.1.8 Bakterijski sojevi i plazmidi

Korišteni sojevi bakterije *E. coli*

One Shot® TOP10 Electrocomp™ - (genotip: *hsd^R, mcrA, lacZΔM15, endA1, recA1*) (Invitrogen). Komercijalno dostupni soj koji se rutinski koristi u svrhu kloniranja zbog velike efikasnosti transformacije i stabilnog umnažanja velikog broja kopija plazmidne DNA.

BL21 (DE3) - (genotip: *F⁻ ompT gal (λ DE3) [dcm] hsdS (rB⁻ mB⁻)*) (Novagen). Soj je korišten za prekomjernu ekspresiju gena ukloniranih u vektore iz serije pET. Sadrži gen za T7 RNA-polimerazu integriran u bakterijski kromosom pod kontrolom inducibilnog promotora lacUV5 koji se inducira dodatkom IPTG-a. Soj je deficijentan za proteaze Lon i OmpT što osigurava stabilnost proizvedenog proteina.

BL21 CodonPlus-RP (DE3) - (genotip: *F⁻ ompT hsdS (rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Camr]*) (Agilent Technologies). Soj koji se također koristi za prekomjernu ekspresiju gena ukloniranih u ekspresijski vektor koji sadrži T7promotor. Za razliku od BL21 (DE3) ovaj je soj optimiziran za ekspresiju gena bogatih GC parovima baza, koji su karakteristični za bakterije

roda *Streptomyces*. Gen za tRNA koje prepoznaju argU (AGA, AGG) i proL (CCC) nalaze se na dodatnom plazmidu koji nosi rezistenciju na kloramfenikol.

Korišteni sojevi bakterije *S. coelicolor*

S. coelicolor M145 – izvedenica divljeg tipa soja A3(2) kojem nedostaju plazmidi SCP1 i SCP2⁵⁹.

*S. coelicolor*Δ6735 – *S. coelicolor* M145 soj kojem je deletiran gen za protein SCO6735⁷.

Korišteni bakterijski plazmidi

pET28b – plazmid iz serije vektora pET, rutinski se koristi za prekomjernu ekspresiju gena pod kontrolom inducibilnog promotora T7 RNA-polimeraze (T7lac). Omogućava proizvodnju rekombinantnih proteina s histidinskim privjeskom na N- ili C-kraju. Plazmid je niskog broja kopija i nosi gen za rezistenciju na kanamicin.

pDEST – destinacijski vektor koji se koristi u „Gateway“ metodi kloniranja, a pogodan je za ekspresiju u bakterijskim stanicama *E. coli* te u stanicama insekata, kvasca i sisavaca. Koristi se za proizvodnju rekombinantnih proteina, obilježenih na N- ili C- kraju, pod kontrolom inducibilnog promotora T7.

pBAD33 - vektor niskog broja kopija. Ekspresija rekombinantnih proteina je pod kontrolom arabinoznog promotora koji se inducira dodatkom arabinoze. Vektor je pogodan je za ekspresiju toksičnih rekombinantnih proteina u bakteriji *E. coli*, budući da se bazalna ekspresija može svesti na minimum dodatkom glukoze koja na arabinozni promotor djeluje kao represor.

3.1.9 Ostali materijali

TALON Co²⁺-NTA agarozna (Qiagen/Takara), Centrikoni Amicon® Ultra centrifugal filters (Milipore), 0,22 μm celuloza acetat filteri, inhibitori proteaza Complete (Roche), voda koja ne sadrži nukleaze (eng. Nuclease Free Water, NFW, Invitrogen).

3.2 Metode

3.2.1 Metode rada s bakterijama

3.2.1.1 Uzgoj bakterije *E. coli* na tekućoj i krutoj podlozi

Za uzgoj bakterijskih kultura korištene su tekuće i krute hranjive podloge. Korištena su dva tipa tekućeg hranjivog medija: LB i TB. Tekući hranjivi medij LB pripremljen je otapanjem 25 g suhe LB smjese u 1 L destilirane vode, dok je TB pripremljen otapanjem 47,6 g suhe TB smjese i 4 mL glicerola u 1 L destilirane vode. Njihova sterilizacija postignuta je autoklaviranjem 20 minuta pri 120 °C i 1,5 atm. U svrhu selekcije bakterijskih stanica ovisno o primljenom plazmidu korištena su tri antibiotika: kanamicin (Kan), ampicilin (Amp) i kloramfenikol (Cam). U sterilnoj tekućoj hranjivoj podlozi Kan se razrjeđuje do konačne koncentracije od 35 µg mL⁻¹, Amp do 100 µg mL⁻¹, a Cam do 25 µg mL⁻¹. Stock otopine antibiotika Kan i Amp, koncentracije 35 mg mL⁻¹ odnosno 100 mg mL⁻¹, priređuje se otapanjem u mili Q vodi i sterilizacijom kroz filter veličine pora 0,22 µm. Obzirom da Cam nije topiv u vodi on se do stock koncentracije od 25 mg mL⁻¹ otapa u 70 % etanolu. Ovako priređene otopine čuvaju se na -20 °C.

Kruta hranjiva podloga LB pripremljena je otapanjem 10 g LB praha i 7 g agara u 1 L destilirane vode, nakon čega je podvrgnuta sterilizaciji autoklaviranjem 20 minuta pri 120 °C i 1,5 atm. Sterilizirana podloga hladi se do ~50 °C kada se dodaju željeni antibiotici do preporučene konačne koncentracije. Smjesa se zatim izljeva u Petrijeve zdjelice koje se nakon skrutnjavanja podloge spremaju u frižider na 4 °C do upotrebe.

Nasađivanje bakterija na krutu hranjivu podlogu postiže se razmazivanjem glicerolske kulture ili prethodno transformiranih bakterijskih stanica sterilnim štapićem po krutoj hranjivoj podlozi. Tako nasađene bakterijske stanice uzgajaju se preko noći na 37 °C.

Nasađivanje bakterija u tekuću hranjivu podlogu postiže se prebacivanjem pojedinačne kolonije sterilnim plastičnim nastavkom s krute LB podloge u tekući LB medij, ili razrjeđivanjem tekuće bakterijske kulture. Uzgajanje se potom provodi na 37 °C uz miješanje pri 220 rpm na rotacijskoj platformi, a duljina inkubacije ovisi o svrsi uzgoja bakterija.

3.2.1.2 Uzgoj bakterije *S. coelicolor* na tekućoj i krutoj podlozi

Kao kruta podloga korištena je podloga SM pogodna za sporulaciju bakterija *S. coelicolor*. Navedena podloga pripravljena je otapanjem 20 g sojinog brašna, 20 g agara i 20 g manitola u 1 L vodovodne vode. Sterilizacija podloge postiže se autoklaviranjem 20 minuta pri 120 °C i 1,5 atm. Autoklaviranje se ponavlja dva puta, između čega je smjesu potrebno dobro promiješati. Sterilizirana podloga se hladi do ~50 °C, a zatim izljeva u Petrijeve zdjelice koje se nakon skrtnjavanja podloge spremaju u frižider na 4 °C do upotrebe.

Za uzgoj u tekućoj kulturi korišten je bogati hranjivi medij CRM sastava: 10 g L⁻¹ glukoze, 103 g L⁻¹ MgCl₂ × 6H₂O, 15 g L⁻¹ *tryptic soy broth* i 5 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta. Sterilizacija medija provodi se autoklaviranjem 20 minuta pri 120 °C i 1,5 atm.

3.2.1.3 Transformacija bakterije *E. coli*

Korištene su dvije metode transformacije bakterija plazmidnom DNA: elektrotransformacija (elektroporacija) i kemijska transformacija.

Elektroporacija je metoda unosa strane molekule DNA u bakterijske stanice koja se zasniva na kratkotrajnom povećanju propusnosti bakterijske stanične stijenke uslijed izlaganja bakterija električnom pulsu. Elektrotransformacija stanica je napravljena s 50 µL elektrokompetentnih stanica *E. coli* soj TOP 10. U stanice je dodano 1 µL ligacijske smjese koja je zatim prebačena u ohlađenu sterilnu kivetu za elektroporaciju (Gene Pulser Cuvette za *E. coli*) s razmakom elektroda od 0,2 cm. Elektroporacija je napravljena na uređaju Eppendorf Electroporator 2510 uz napon od ~ 2500 V u trajanju od 5 milisekundi. Odmah zatim u kivetu je dodan 1 mL tekućeg LB medija te je cijeli sadržaj prebačen u sterilnu epruvetu. Dobivena suspenzija je potom inkubirana u termobloku 45 do 60 minuta na 37 °C uz miješanje pri 300 rpm. Nakon inkubacije je 300 do 500 µL suspenzije stanica nasađeno na krutu LB podlogu uz odgovarajući antibiotik.

Kemijska transformacija je proces unošenja strane DNA u bakterijske stanice posredovan s CaCl₂ i temperaturnim šokom pri povišenoj temperaturi od 37 ili 42 °C. Temperaturnim šokom se stvaraju pore na membranama bakterijskih stanica. Kalcijevi ioni neutraliziraju naboj na membrani time smanjujući elektrostatsko odbijanje između negativno nabijene molekule DNA i membrane olakšavajući ulazak strane molekule DNA u bakterijsku stanicu. Transformacija temperaturnim šokom je provedena s 50 µL kemijski kompetentnih stanica *E. coli* BL21-

CodonPlus. U stanice je dodano 1,5 μL izolirane plazmidne DNA koncentracije $\sim 60 \text{ ng}/\mu\text{L}$ te 25 μL pufera za transformaciju sastava: 1 mol dm^{-3} Tris-Cl (pH =7.5), 1 mol dm^{-3} MgCl_2 i 2 mol dm^{-3} CaCl_2 , nakon čega su stanice inkubirane na ledu 30 minuta. Nakon inkubacije, stanice su izložene temperaturnom šoku na 37 °C u trajanju od 2 minute, a potom prebačene na sobnu temperaturu 10 minuta. Oporavak stanica postignut je dodavanjem 1 mL LB medija (prethodno zagrijanog na 37 °C) te inkubiranjem dobivene suspenzije u termobloku 45 do 60 minuta na 37 °C uz miješanje pri 300 rmp. Nakon inkubacije, bakterijske stanice su nasađene na krutu LB hranjivu podlogu koja sadrži odgovarajući antibiotik u svrhu selekcije samo onih bakterijskih stanica koje su primile plazmid.

3.2.2 Metode rada s DNA

3.2.2.1 Izolacija plazmidne DNA

Za izolaciju manje količine plazmidne DNA korišten je komercijalni komplet QIAprep Spin Miniprep Kit, a izolacija je provedena prema uputama proizvođača. Komercijalni komplet se temelji na klasičnoj metodi alkalne lize. Iz staničnog lizata se uklanjaju genomska DNA, proteini i dijelovi stanične membrane, dok se plazmidna DNA veže i dodatno pročišćava na priloženoj kolonici.

3.2.2.2 Agarozna gel-elektroforeza

Elektroforeza nukleinskih kiselina najčešće se provodi na gelu agaroze. Agarozna je linearni polimer s velikim porama koje omogućuju prolazak i razdvajanje velikih molekula nukleinskih kiselina. Detekcija se u ovom slučaju najčešće vrši bojanjem fluorescentnom bojom – etidijevim bromidom (EtBr). EtBr se interkalira između baza u molekuli DNA pri čemu dolazi do povećanja intenziteta fluorescencije pod UV svjetlom pri valnoj duljini od $\lambda = 302 \text{ nm}$.

U ovom doktorskom radu metoda je korištena u svrhu provjere izoliranog plazmidnog vektora, detekcije PCR-prudukata ili provjere reakcije provedene restrikcijskim enzimima. Agarozni gelovi s 1 % (w/v) agaroze pripremljeni su otapanjem 1 g agaroze u 100 mL pufera TAE (40 mmol dm^{-3} Tris, 1 mmol dm^{-3} EDTA - titriran octenom kiselinom do pH = 8,0 i 0,5 mg dm^{-3}

EtBr) i grijanjem u mikrovalnoj pećnici nekoliko minuta. Prije nanošenja na gel uzorci su pomiješani s bojom za nanošenje DNA uzoraka Gel Loading Dye Purple u omjeru 1:6. Postupak elektroforeze proveden je u elektroforetskom puferu TAE pri 60 V u trajanju 30 - 40 min. Uz uzorke je na gel nanesen komercijalno dostupni marker 1 kb DNA Ladder Purple radi procjene veličine razdvojenih fragmenata. Uzorci su vizualizirani pomoću EtBr koji je prisutan u gelu, a analizirani su i snimani pod UV svjetlom transiluminatora (Syngene G:BOX) povezanog s računalom.

3.2.2.3 Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Koncentracije izoliranih nukleinskih kiselina određene su spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na uređaju DeNovix DS-11 pri valnoj duljini od 260 nm. Uz iznos koncentracije uzorka, uređaj daje i podatke o čistoći uzorka, stoga je važno uzeti u obzir i dobiveni omjer 260/280 (apsorbancija izmjerena pri valnoj duljini od 260 nm podijeljena s apsorbancijom izmjerenoj pri 280 nm) koji direktno govori o čistoći uzorka DNA i RNA s obzirom na zaostale proteine, te omjer 260/230 koji služi kao sekundarna mjera provjere čistoće nukleinskih kiselina u odnosu na zaostali fenol. Vrijednost $260/280 = 1,8$ za DNA je općenito prihvaćena kao čista DNA, a $260/280 = 2,0$ za RNA kao čist uzorak RNA. Očekivana vrijednost omjera 260/230 za čiste nukleinske kiseline kreće se u omjeru 2,0 – 2,2.

3.2.2.4 Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR) je metoda pomoću koje se može specifično umnožiti točno određeni segment DNA *in vitro*. Reakcija se temelji na cikličkom ponavljanju triju koraka: (1) denaturacije kalupa, pri čemu dolazi do razdvajanja komplementarno sparenih lanaca dvolančane DNA pri visokoj temperaturi (oko 95 - 98 °C), (2) sparivanja početnica s komplementarnim sljedovima jednolančanih kalupa DNA (temperatura obično oko 45 - 70 °C), te (3) produljenja lanca DNA kataliziranog termostabilnom DNA-polimerazom (temperatura obično oko 70 °C). U svakom se ciklusu broj kopija gena udvostručava, te se nakon n broja ciklusa u reakcijskoj smjesi nalazi 2^n kopija gena od interesa.

3.2.2.5 Lančana reakcija polimeraze na bakterijskim kolonijama

Lančana reakcija polimeraze provođena je na transformiranim bakterijskim kolonijama *E. coli* soja TOP10, u svrhu provjere ugrađivanja DNA fragmenta, koji kodira za željeni mutant proteina SCO6735, u pET28 plazmidni vektor.

Reakcijska PCR smjesa sadržavala je: 12,5 μL $2 \times$ EmeraldAmp master premix, 1 μL T7 i T7-t PCR početnica početne koncentracije 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, 10 μL vode koja ne sadrži nukleaze, a kao kalup je korištena genomna DNA iz transformirane bakterijske kolonije prebačene u reakcijsku smjesu vrhom sterilnog nastavka za pipetu. Reakcija je provođena u uređaju za PCR (Thermal Cycler, Eppendorf) kroz 30 ciklusa denaturacije, sparivanja početnica i produljenja. PCR produkti su analizirani elektroforezom na 1 % agaroznom gelu.

Bakterijske kolonije koje sadrže plazmide od interesa uzgojene su preko noći u 5 mL LB medija uz dodatak odgovarajućeg antibiotika. Iz prekonoćne kulture izolirana je plazmidna DNA pomoću kompleta QIAprep Spin Miniprep Kit. Ispravnost izoliranih plazmida provjerena je sekvenciranjem.

3.2.2.6 Lančana reakcija polimeraze u svrhu umnažanja željenog gena

Za umnažanje željenog gena iz bakterije *S. coelicolor* korištena je prethodno izolirana bakterijska genomna DNA. Genomska DNA bakterija roda *Streptomyces* bogata je GC parovima baza stoga je u svrhu što uspješnije PCR reakcije potrebno dodatno pospješiti njenu denaturaciju. U tu svrhu produljuje se vrijeme faze denaturacije te se koristi komercijalno dostupan pufer optimiziran za takvu vrstu DNA. Korištena je Q5 High-Fidelity DNA-polimeraza, prikladni puferi Q5 i Q5 High GC Enhancer, a reakcijska smjesa je pripremljena prema uputama proizvođača.

Termociklički uvjeti za rutinsko umnažanje gena iz bakterije *S. celicolor* prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Termociklički uvjeti za rutinsko umnažanje gena iz bakterije *S. celicolor*.

Korak	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	98 °C	2 minute
30 ciklusa	98 °C	10 sekundi
	50 – 72 °C *	10 - 30 sekundi
	72 °C	20 - 30 sekunda/kb
Konačno produljenje	72 °C	2 minute
Hlađenje sustava	4-10 °C	

* Temperatura ovisi o sastavu baza u dizajniranoj početnici.

3.2.2.7 Mjesno-specifična mutacija PCR metodom preklapanja asimetričnih krajeva

Mjesno-specifična mutacija proteina SCO6735 napravljena je PCR metodom preklapanja asimetričnih krajeva čiji su protokol detaljno opisali Xiao i Pei, 2011 godine⁶⁰.

Ukratko, za ovu metodu potrebno je dizajnirati dvije početnice (uzvodnu i nizvodnu) koje sadrže točkastu mutaciju gena, a koje s obje strane izmijenjenog/ih nukleotida sadrže 15 - 20 nukleotida komplementarnih s genom u kojeg se uvodi mutacija. Dobivanje fragmenta s točkastom mutacijom provodi se u dva koraka. U prvom koraku dobivaju se asimetrični stršeći krajevi lijevo i desno od mjesta uvođenja mutacije. Nizvodna mutirajuća početnica stavlja se u PCR-smjesu s terminalnom početnicom iz vektora (T7-t), a uzvodna mutirajuća s nizvodnom početnicom iz vektora (T7). U drugom koraku miješaju se produkti prvog koraka te se provodi konačno produljenje, uzvodno i nizvodno od mjesta komplementarnog spajanja produkata PCR1 i PCR2 reakcije. Korišten je sastav smjesa i termociklički parametri opisani u objavljenom protokolu⁶⁰.

Dobiveni produkti PCR3 reakcije analizirani su na agaroznom gelu prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2.2. Produkt koji odgovara veličini gena od interesa izrezan je iz agaroznog gela i pročišćen pomoću komercijalno dostupnog kompleta QIAquick Gel Extraction Kit prema uputama proizvođača.

Nakon toga provedena je razgradnja plazmida pET28 i mutiranog gena restrikcijским enzimima *NdeI* i *BamHI*. Reakcija cijepanja inkubirana je 45 minuta pri 37 °C, a oba restrikcijска enzima dodana su u isto vrijeme u volumenu od 1 µL. Produkti razgradnje analizirani su na

agaroznom gelu. Odgovarajuće pruge su izrezane i ponovno pročišćena pomoću komercijalno dostupnog kompleta QIAquick Gel Extraction Kit prema uputama proizvođača.

Za ligaciju razgrađenog gena i plazmida korištena je elektroligaza. Reakcijska smjesa napravljena je u ukupnom volumenu od 11 μ L prema uputama proizvođača s odgovarajućim komercijalno dostupnim puferom, te je inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi. Omjer količine razgrađenog vektora i inserta bio je 1:3. Reakcija je nakon inkubacije prekinuta zagrijavanjem na 65 °C, 15 minuta.

Bakterijske stanice TOP10 su zatim transformirane ligacijskom smjesom metodom elektroporacije opisane u poglavlju 3.2.1.2, te nasađene na krutu bakterijsku podlogu s antibiotikom Kan. Prisutnost plazmida koji sadrži gen ubačen u regiju višestrukih restriksijskih mjesta (eng. Multiple Cloning Site, MCS) provjerena je metodom PCR (opisano u poglavlju 3.2.2.4) na nekoliko bakterijskih kolonija. Pozitivi su zatim uzgojeni u tekućem mediju LB (u prisutnosti antibiotika Kan) u svrhu umnažanja i izolacije ciljnog plazmida. Prisutnost željene mutacije provjerena je sekvenciranjem. U slučaju dvostrukog mutanata, mutacije su uvedene jedna po jedna, tj. plazmid koji nosi gen s prvom mutacijom, korišten je kao kalup za uvođenje sljedeće mutacije.

3.2.3 Metode rada s proteinima

3.2.3.1 Prekomjerna ekspresija rekombinantnih proteina

Nakon provjere plazmida pET28 koji nosi gen za protein SCO6735 i njegovih mutanata sekvenciranjem napravljena je transformacija bakterijskih stanica BL21-CodonPlus metodom kemijske transformacije (opisano u poglavlju 3.2.1.2). Transformirane bakterijske stanice su potom nasađene na LB – ploče koje sadrže antibiotike Kan i Cam.

Plazmid pDEST koji nosi gen za virusnu makrodomenu Mac1 dobiven je od suradnika sa Sveučilišta u Oxfordu. Nakon sekvenciranja njime su transformirane bakterijske stanice BL21(DE3) metodom kemijske transformacije. Transformirane bakterijske stanice su nasađene na LB – ploče koje sadrže antibiotik Amp.

Za pročišćavanje proteina u preparativnim količinama, prvo je pripremljeno po 20 mL predkulture (prekonočne kulture) prebacivanjem jedne bakterijske kolonije vrhom sterilnog nastavka u tekući LB medij koji sadrži odgovarajući antibiotik.

U slučaju proteina SCO6735 i njegovih mutanata prekonočne bakterijske kulture su drugi dan razrijeđene u 1 L medija TB s antibioticima Kan i Cam te inkubirane pri 37°C i 250 rpm. Rast bakterijskih kultura praćen je spektrofotometrijski. Kad je optička gustoća mjerena pri valnoj duljini od 600 nm (OD_{600}) dosegla vrijednost 0,8 inducirana je prekomjerna ekspresija proteina dodatkom IPTG do konačne koncentracije od 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Bakterijske kulture su zatim inkubirane preko noći pri 16 °C i protresanje od 200 rpm. Uzgoj bakterijskih stanica koje nose gen za virusnu makrodomenu Mac1 proveden je u 6 L medija LB u prisutnosti antibiotika Amp. Pri OD_{600} vrijednosti od 0,8 prekomjerna ekspresija proteina je potaknuta dodatkom IPTG do konačne koncentracije od 800 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Bakterijske kulture su zatim inkubirane 2,5 sati pri 30 °C i 250 rpm.

Nakon prekomjerne ekspresije proteina, bakterijske kulture su istaložene centrifugiranjem 40 minuta pri $5000 \times g$ i temperaturi od 4 °C. U slučaju korištenja bogatog medija TB talog bakterijskih stanica je prije smrzavanja na -20 °C ispran resuspendiranjem u puferu sastava 25 mmol dm^{-3} Tris-HCl, pH = 7,5 i 500 mmol dm^{-3} NaCl nakon čega su bakterijske stanice ponovno oborene centrifugiranjem.

3.2.3.2. Priprema uzorka proteinskog ekstrakta za izolaciju prekomjerno eksprimiranog proteina metodom afinitetne kromatografije

Talog bakterijskih stanica prvo je resuspendiran u puferu A sastava 25 mmol dm^{-3} Tris-HCl, pH = 7,5, 500 mmol dm^{-3} NaCl i 10 mmol dm^{-3} imidazol. Za razbijanje bakterijskih stanica i oslobađanje proteina SCO6735 i njegovih mutanata u otopinu korištena je metoda sonikacije. Prethodno sonikaciji, bakterijskoj suspenziji dodani su inhibitori proteaza i lizozim do konačne koncentracije od 1 mg mL^{-1} te je suspenzija inkubirana oko 10 minuta na ledu. Stanice su razorene sonikacijom u dva obroka pri čemu jedan obrok podrazumijeva puls od 3 sekunde, s 3 sekunde pauze u ukupnom trajanju od 3 minute. Cijelo vrijeme suspenzija stanica inkubirana je na ledu kako bi se spriječilo zagrijavanje uzorka. Razaranje bakterijskih stanica koje nose gen za virusnu makrodomenu Mac1 napravljeno je pomoću visokotlačnog homogenizatora Avestin Emulsiflex C3. Prije homogenizacije dodani su samo inhibitori proteaza prema uputama proizvođača.

Nakon razbijanja bakterijskih stanica lizat je odmah podvrgnut centrifugiranju 1 sat pri 12000 rpm na 4 °C. Dobiveni supernatant (proteinski ekstrakt) prvo je profiltriran protiskivanjem kroz sterilni filter pora 0,22 µm te podvrgnut pročišćavanju na TALON agarozu (opisano u sljedećem poglavlju).

3.2.3.3. Afinitetna kromatografija na TALON agarozu

Afinitetna kromatografija je metoda izdvajanja proteina od ostatka proteinskog ekstrakta utemeljena na njegovoj reverzibilnoj interakciji sa specifičnim ligandom imobiliziranim na čestice kromatografskog punila. Kao punilo za kolone korištena je Co²⁺-NTA (TALON) agaroz koja se sastoji od Sepharoze CL-6B na koju je vezan Co²⁺-NTA. Reverzibilne interakcije između polihistidinskog privjeska na rekombinantnom proteinu i metalnog liganda Co²⁺ vezanog na NTA-agarozu omogućuju njegovo zadržavanje na kromatografskoj koloni. Elucija željenog proteina postiže se ispiranjem puferom visoke koncentracije imidazola, budući da kompetitivnim vezanjem imidazola na ione Co²⁺ dolazi do otpuštanja vezanog proteina.

Za ispiranje kolone i eluciju korišteni su puferi A, B, C i D istog temeljnog sastava (25 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH = 7,5, 500 mmol dm⁻³ NaCl), ali različite koncentracije imidazola (10, 20, 40 i 200 mmol dm⁻³). Nakon propuštanja proteinskog ekstrakta kroz kolonu vrši se obilno ispiranje kolone puferom A čime se postiže uklanjanje nespecifično vezanih proteina. Elucija uzorka najčešće se postiže u drugom i trećem koraku dodavanjem pufera B i C, dok se u posljednjem ispiranju puferom D omogućuje uklanjanje jače vezanih proteina s histidinskim privjeskom.

3.2.3.4 Diskontinuirana denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza u prisustvu natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE)

Za razdvajanje proteina korištena je metoda diskontinuirane SDS-poliakrilamidne elektroforeze (SDS-PAGE), u kojoj se proteinskim uzorcima dodaje detergent natrij-dodecilsulfat (SDS), koji osigurava da se razlika u pokretljivosti temelji samo na veličini proteina tj. njihovoj molekularnoj masi. Ovom metodom postiže se maksimalno razdvajanje proteinske smjese, a podrazumijeva pripremu gela koji se sastoji od donjeg dijela - gela za razdvajanje i gornjeg dijela - gela za sabijanje, izlivenog između dviju staklenih ploča. Gel za sabijanje ima veće pore i pripremljen je

u puferu nižeg pH i ionske jakosti što osigurava brže gibanje proteina i njihovo sabijanje na ulazu u gel za razdvajanje. Gel za razdvajanje ima manje pore i nižu ionsku jakost što omogućuje bolje razdvajanje proteina na temelju njihove veličine.

Sastav korištenog gela za razdvajanje je: 12 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1), $0,375 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH = 8,8, 0,1% (w/v) SDS, $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ APS, 0,05 % (w/v) TEMED. Gel za sabijanje sastoji se od 4 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1), $0,125 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH = 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ APS, 0,05 % (w/v) TEMED. Za izlivanje SDS-poliakrilamidnih gelova i elektroforezu uzoraka korištena je aparatura za elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra (Biorad).

Proteinski uzorci su pripremljeni dodavanjem $4 \times$ SDS pufera za nanošenje na gel sastava: $62,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH = 6,8, $12,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ β -merkaptoetanol, 6,25 % (v/v) glicerol, 1,25 % (w/v) SDS, 0,002 % (w/v) bromfenolno plavilo, nakon čega su zagrijani 5 min na $95 \text{ }^\circ\text{C}$ s ciljem potpune denaturacije.

Postupak elektroforeze proveden je na sobnoj temperaturi u SDS puferu sastava: $14,4 \text{ g dm}^{-3}$ glicin, $3,03 \text{ g dm}^{-3}$ Tris pH = 8,3, 0,1 % (w/v) SDS, u trajanju od 15 minuta pri 120 V s ciljem sabijanja uzoraka, a zatim 45 min pri 180 V s ciljem razdvajanja proteina. Uzorci su vizualizirani bojanjem gela u otopini boje CBB R-250 koja se u kiseloj sredini elektrostatskim interakcijama veže za aminoskupine proteina. Korištena je otopina boje sastava: $2,5 \text{ g dm}^{-3}$ CBB R-250, 10 % (v/v) octena kiselina, 45 % (v/v) etanol. Gel je bojan inkubiranjem 15 min u otopini boje na rotacijskoj platformi. Višak boje uklonjen je inkubiranjem gela u puferu za odbojavanje sastava: 25 % (v/v) metanol i 7 % (v/v) octene kiselina, u trajanju od 20 min.

3.2.3.5 Gel-filtracijska kromatografija

Neki mutirani proteini SCO6735 nakon pročišćavanja metodom afinitetne kromatografije nisu bili zadovoljavajuće čiste. Stoga su za daljnju analizu metodom cirkularnog dikroizma dodatno pročišćeni metodom gel-filtracijske kromatografije.

Gel-filtracija je poseban tip razdjelne kromatografije kod koje se odjeljivanje temelji na različitoj veličini makromolekula. Stupac kolone napunjen je česticama inertne tvari koja sadrže pore. Propuštanjem uzorka koji sadrži makromolekule različitih dimenzija, dolazi do zadržavanja onih koje su manje od dimenzija pora gela jer u njih ulaze. Molekule veće od pora prolazit će kroz prostor između čestica te ih materijal u stupcu neće usporiti.

Nakon afinitetne kromatografije izolirani mutirani protein H24Y SCO6735 je ukoncentriran i preveden u gel-filtracijski pufer sastava: 50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer, pH= 7,4 , 50 mmol dm⁻³ NaCl te 2,5 % (w/w) glicerol. Dobiveni uzorak je prije nanošenja na sustav za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti Äkta Purifier 10 (GE Healthcare) centrifugiran 15 minuta pri 5000 × g i 4 °C kako bi se izbjeglo nanošenje krutih nečistoća i proteinskih agregata koje bi mogle dovesti do oštećenja kolone. Gel-filtracijska kromatografija se provodila na koloni Superdex 200 Increase 100/30 GL (GE Healthcare).

Silazak uzorka s kolone praćen je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 280 nm, a volumen sakupljenih frakcija iznosio je 0,5 mL. Čistoća frakcija je dodatno provjerena na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti SDS-a. Prema dobivenom kromatogramu i rezultatima SDS-PAG elektroforeze odabrane su frakcije za koje se očekuje da sadrže najveću količinu čistog mutiranog proteina H24Y SCO6735. Odabrane frakcije su sjedinjene i ukoncentrirane postupkom ultracentrifugiranja opisanom u sljedećem poglavlju.

3.2.3.6 Ukoncentriravanje proteina i izmjena pufera ultrafiltracijom

Dobiveni pročišćeni uzorci proteina SCO6735 i virusne makrodomene Mac1 su nakon afinitetne i gel-filtracijske kromatografije ukoncentrirani za daljnju biokemijsku analizu. Pri tome je korištena metoda ultrafiltracije koja se zasniva na filtraciji proteinskog uzorka kroz membranu koja sadrži pore određene veličine. Pod utjecajem centrifugalne sile membrana propušta sve čestice manje od dimenzije pora, dok veće čestice zaostaju na njenoj površini.

Ultrafiltracija je provedena centrifugiranjem pri 5000 × g i 4 °C, a korišteni su centrikoni Amicon® Ultra centrifugal filters s porama kroz koje prolaze čestice manje od 10 kDa.

Prilikom ukoncentriravanja protein je odmah preveden u pufer za pohranjivanje proteina ili u pufer za analizu metodom cirkularnog dikroizma. Prevođenje u drugi pufer je omogućeno postepenim dodavanjem malog volumena novog pufera kako se volumen uzorka tijekom ultracentrifugiranja smanjivao.

3.2.3.7 Određivanje koncentracije proteina

Metoda po Bradfordu

Prisutnost proteina u proteinskim frakcijama prilikom pročišćavanja te njegova koncentracija u ukoncentriranom uzorku određivana je metodom po Bradfordu koja se zasniva na vezanju boje Coomassie Brilliant Blue G-250 na proteine. Slobodna boja postoji u više ionskih oblika, a anionski oblik (plavi) veže se na bazične aminokiselinske bočne ogranke lizina, arginina i histidina te mu je maksimum apsorpcije pri valnoj duljini od 595 nm. Koncentracija proteina određuje se prema unaprijed pripremljenom baždarnom pravcu nekog standarda. Baždarni pravac pripremljen je mjerenjem apsorpcije serije uzoraka koji sadrže rastuće i poznate koncentracije proteina BSA. U grafičkom se prikazu se na x-osi prikazuje masa, a na y-osi apsorpcija uzorka BSA pri 595 nm. Prema dobivenoj jednadžbi pravca moguće je unošenjem vrijednosti apsorpcije uzorka pri $\lambda = 595$ nm odrediti masu proteina u uzorku. Korišten je $1 \times$ Bradfordov reagens. Prilikom mjerenja mase proteina, u kivetu je pomiješano 1 mL reagensa i jedan do nekoliko mikrolitara uzorka proteina. Na temelju baždarne krivulje i jednadžbe pravca izmjerene vrijednosti apsorpcije uzoraka su preračunate u koncentracije.

Mjerenje koncentracije proteina na spektrofotometru

Koncentracija proteina mjerena je na spektrofotometru DeNovix DS-11 pri valnoj duljini od 280 nm. Za mjerenje koncentracije potrebno je nanijeti 1 μ L uzorka na postolje instrumenta te u program instrumenta unijeti teoretski izračunat molarni ekstinkcijski koeficijent i molekulsku masu istraživanih proteina. Kao slijepa proba za nuliranje instrumenta koristi se pufer u kojem se protein nalazi. Rezultati mjerenja su apsorpcijski spektar i koncentracija uzorka proteina izražena u mg mL^{-1} . Koncentracija je izračunata pomoću Beer-Lambertovog zakona prema kojem je apsorpcija uzorka jednaka umnošku molarnog ekstinkcijskog koeficijenta (ϵ), duljine puta koji svjetlost prelazi (l) i koncentracije uzorka ($A = \epsilon \times l \times c$). Molarni ekstinkcijski koeficijent divljeg tipa i mutanata makrodomenskog proteina SCO6735 i virusne makrodomena SARS-CoV-2 izračunata je pomoću mrežno dostupnog programa *ProtParam (Expasy)*⁶¹.

Prilikom mjerenja koncentracije uzorka proteina važno je u obzir uzeti i dobiveni omjer 260/280 (apsorbancija izmjerena pri valnoj duljini od 260 nm podijeljena s apsorbancijom izmjerenoj pri 280 nm) koji govori o prisutnosti nukleinskih kiselina u proteinskom uzorku. Kontaminacija proteina nukleinskim kiselinama treba biti minimalna jer može interferirati sa aktivnosti proteina koji ih vežu. Ako je iznos omjera manji od 0,6 proteinski uzorak se smatra dovoljno čistim.

3.2.3.8 Provjera očuvanosti trodimenzionalne strukture metodom cirkularnog dikroizma

Cirkularni dikroizam (CD) korišten je u svrhu usporedbe trodimenzionalnih struktura između divljeg tipa i mutanata proteina SCO6735. CD spektri snimljeni su na spektropolarimetru J-715, koristeći kvarcnu „sendvič“ kivetu optičkog puta 0,2 mm. Spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 190 do 260 nm pri temperaturi od 30 °C (budući da je to optimalna temperatura za rast bakterija iz roda *Streptomyces*). Parametri snimanja su bili: razlučivanje 0,2, širina puta zrake 1,0 nm, vrijeme mjerenja u jednoj točki 1 s, brzina snimanja 50 nm min⁻¹, a konačan spektar je bio rezultat usrednjavanja 3 spektra. Prije snimanja CD spektara svi uzorci su prebačeni u 50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 7,4, 100 mmol dm⁻³ (NH₄)SO₄ te razrijeđeni do koncentracije između 0,25 i 0,4 mg mL⁻¹. Analiza dobivenih CD spektara provedena je u programu Origin 7.5.

3.2.3.9 Test aktivnosti proteina elektroforezom u prisustvu ureje

Test hidrolitičke aktivnosti uklanjanja ADPr s modificiranog timina proteinom SCO6735 i njegovim mutantima napravljen je na oligonukletidnim lancima prethodno ADP-riboziliranim toksinom DarT iz bakterije *Thermus aquaticus* (TaDarT). ADP-ribozilacija oligonukleotida toksinom DarT provodila se u puferu sastava: 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH = 8 i 50 mmol dm⁻³ NaCl, pri temperaturi od 30 °C u trajanju od 30 – 45 minuta. Pri tome je koncentracija oligonukleotida iznosila 1 μmol dm⁻³, toksina TaqDarT 0,3 μmol dm⁻³, a NAD⁺ 3 mmol dm⁻³. Reakcija je zaustavljena denaturacijom proteina kuhanjem pri 95 °C u trajanju od 5 minuta, nakon čega je ohlađena na ledu. Dobiveni produkti reakcije potom su analizirani na poliakrilamidnom gelu u prisustvu ureje. Testovi aktivnosti provedeni su na dva slijeda DNA oligonukleotida: oligonukleotid kojeg modificira toksin TaDarT punog slijeda GAGCTGTACAAGTCAGATCTCGAGCTC, skraćenog imena ON-dT; te poliT-G

oligonukleotid kojeg modificira ART SCO5461 iz bakterije *S. coelicolor*, punog slijeda: TTTTTTTTGTTTTTTTTTT. Korišteni oligonukleotidi sintetizirani su u tvrtci Metabion.

Testiranje sposobnosti uklanjanja ADPr s modificiranih oligonukleotida proteinom SCO6735 i njegovim mutantima, te homolognim proteinima TARG1 iz čovjeka (HsTARG1) i TaDarG i njihovim katalitičkim mutantima provedeno je dodavanjem enzima u prethodno pripremljenu reakcijsku smjesu u koncentraciji $0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (ili više, ovisno o aspektu enzimske katalize koji se želi pratiti). Reakcija je inkubirana 30 minuta na 30°C , nakon čega je zaustavljena dodavanjem boje za nanošenje uzorka na gel sastava: 90 % (w/v) formamid, 0,5 % (w/v) EDTA, 0,1 % (w/v) ksilencijanol i 0,1 % (w/v) bromfenol i denaturacijom pri 95°C u trajanju od 5 minuta.

Reakcijski produkti su analizirani na gelu u prisutnosti ureje sastava: 19:1 (15 % w/v) akrilamid:bisakrilamid, 6 mol dm^{-3} ureja, 90 mmol dm^{-3} Tris-HCl, 90 mmol dm^{-3} borna kiselina, 2 mmol dm^{-3} EDTA, $\text{pH} = 8,0$. Polimerizacija gela potaknuta je dodatkom $0,86 \text{ mg mL}^{-1}$ amonijevog peroksodisulfata (APS) i 0,05 % (w/v) *N, N, N', N'*-tetrametiletilendiamina (TEMED).

Nakon polimerizacije gela i prije nanošenja uzorka, jažice su zbog nataložene ureje isprane elektroforetskim puferom $1 \times \text{TBE}$ (90 mmol dm^{-3} Tris, 90 mmol dm^{-3} borna kiselina, 2 mmol dm^{-3} EDTA, $\text{pH} = 8,0$). Potom je provedena pred-elektroforeza u trajanju od 30 min pri 200 V s ciljem uklanjanja nepoželjnih iona koji nastaju kao nusprodukt polimerizacije gela, a koji povećavaju električnu provodljivost i samim time dovode do prekomjernog zagrijavanje gela. Elektroforeza uzoraka provedena je 90 minuta pri 200 V.

Vizualizaciju oligonukleotida omogućila je inkubacija gela u boji *SYBR™ Gold* (Invitrogen) prethodno razrijeđenoj 1:10000 u $1 \times \text{TBE}$ puferu u trajanju od 10 minuta. Gel je potom snimljen pod UV svjetlom transiluminatora (Syngene G:BOX) povezanog s računalom.

3.2.3.10. Određivanje parametara vezanja potencijalnih inhibitora u aktivno mjesto makrodomene Mac1 virusa SARS-CoV-2 metodom izotermalne titracijske kalorimetrije

Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC) je kalorimetrijska metoda kod koje se direktno mjeri promjena entalpije prilikom svakog dodatka alikvota titransa (u ovom slučaju potencijalnog inhibitora) u otopinu titranda (virusnu makrodomenu Mac1), u određenim vremenskim razmacima. Na temelju izmjerene promjene u toplini dobiva se uvid u nekovalentne interakcije, odgovorne za prepoznavanje i vezanje pojedinog spoja.

Pomoću odabranog modela vezanja u programu Origin 7.5 dobivaju se eksperimentalni podaci promjene entalpije (ΔH), konstanta disocijacije (K_a) te stehiometrijski omjer vezanja (N) iz kojih se prema jednadžbi 8 računa slobodna Gibbsova energija (ΔG) i promjena u entropiji (ΔS). Dobiveni parametri u konačnici daju cjelovitu sliku o afinitetu i doprinosu pojedinih interakcija koje osiguravaju vezanje liganda.

$$\Delta G^o = \Delta H^o - T\Delta S^o = -R * T \ln K_a \quad (8)$$

Pri čemu je $R = 8.31446 \text{ J/K}\cdot\text{mol}$ (plinska konstanta), T temperatura u Kelvinima, a K_a konstanta asocijacije dobivena direktno iz eksperimentalnih mjerenja, recipročna vrijednosti konstante disocijacije (K_d).

Mjerenja su provedena na uređaju VP-ITC MicroCal. Prilikom mjerenja koncentracija liganda je iznosila $300 \mu\text{mol dm}^{-3}$, a virusne makrodomene Mac1 $30 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Mjerenja su provedena pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Prije mjerenja proteini su prebačeni u pufer sastava: 25 mmol dm^{-3} Tris-Cl pH = 7,5, 50 mmol dm^{-3} NaCl, 1 mmol dm^{-3} DTT, 1 mmol dm^{-3} EDTA, 10 % (v/v) glicerol. Isti pufer korišten je za razrjeđivanje uzorka proteina do konačne koncentracije, te za otapanje spojeva. Ovisno o topivosti pojedinih spojeva variran je volumni udio DMSO u navedenom puferu, sukladno, isti udio DMSO dodan je prilikom pripreme proteinskog uzoraka. Time je osigurano da promjena u toplini prilikom mjerenja nije posljedica miješanja dviju različitih otopina. Izračun eksperimentalnih podataka napravljen je prema modelu „one site“ u programu Origin 7.5.

3.2.4 Računalne metode

3.2.4.1 Kompletiranje strukture proteina

Strukture bioloških makromolekula dobivene kristalografijom najčešće nemaju koordinate vodikovih atoma, a ponekad nedostaju i koordinate pojedinih aminokiselinskih ostataka ili čak čitavih strukturnih elemenata poput omče ili zavojnice. Stoga je prvi korak pripreme sustava za simulaciju molekulske dinamike kompletiranje strukture, što uključuje protoniranje makromolekule i izgradnju strukturnih dijelova koji nedostaju.

Kristalna struktura proteina SCO6735 (PDB: 5E3B) ne sadrži koordinate svih aminokiselina u trima fleksibilnim petljama koje okružuju aktivno mjesto, stoga je kompletirana upotrebom mrežno dostupnog programa *SWISS-MODEL*⁶².

Zadržane su kristalne vode na udaljenosti manjoj od 3 Å od rubnih dijelova strukture. Protoni su dodani pomoću mrežno dostupnog programa *MolProbity*⁶³, koji ima mogućnost rotacije aminokiselinskih bočnihogranaka s ciljem uspostave optimalnije mreže vodikovih veza. U ovom slučaju promijenjena je orijentacija aminokiseline His55, dok su sve ostale aminokiseline zadržale svoju inicijalnu orijentaciju koju imaju u kristalnoj strukturi.

Za molekulsko uklapanje supstrata Glu-ADPr u aktivno mjesto SARS-CoV-2 makrodomene Mac1 korištena je njegova kristalna struktura u kompleksu s ADPr (PDB: 6W02). Zadržane su kristalne vode na udaljenosti manjoj od 3 Å od rubnih dijelova strukture. Protoni su dodani pomoću mrežno dostupnog programa *MolProbity*⁶³.

Za virtualnu pretragu baze malih molekula i simulacije molekulske dinamike korištena je kristalna struktura virusne makrodomene Mac1 u kompleksu s ligandom ADP-HPD (PDB: 6Z6I). Struktura je kompletirana i protonirana pomoću programa *Protein Preparation Wizard*⁶⁴ koji je dio programskog paketa *Schrodinger*.

3.2.4.2 Izrada pripadnog i nepripadnog supstrata za račune molekuskog uklapanja i molekulske dinamike

Pripadni (dT-ADPr), nepripadni (dG-ADPr) supstrat i produkt (ADPr) proteina SCO6735, te pripadni supstrat (Glu-ADPr) virusne makrodomene Mac1 su izgrađeni u programu *Maestro* pomoću opcije *2D sketcher*. Njihova protonacija i priprema izvedena je pomoću potprograma

Ligprep. Maestro i *Ligprep* su oboje dio programskog paketa Schrodinger. Potprogram *Ligprep* generira nekoliko konfiguracijskih stanja svakog liganda, a među njima je odabrana ona koja odgovara produktivnoj konfiguraciji.

3.2.4.3 Molekulsko uklapanje

Priprema sustava za račun molekuskog uklapanja i analiza rezultata provedena je u programskom paketu *AutoDock*⁶⁵, točnije, korišteno je grafičko sučelje potprograma *AutoDock Tools* (ADT), dok je za račun molekuskog uklapanja korišten program *AutoDock Vina*^{66,67}. Programi *AutoDock* i *AutoDock Vina* svoje izračune temelje na semi-empirijskom polju sila parametriziranom na temelju velikog broja poznatih protein-inhibitor kompleksa čije su konstante inhibicije (K_i) poznate (Huey et al., 2007; Morris et al., 2007).

Za račune molekuskog uklapanje u protein SCO6735 korištene su sljedeće dimenzije rešetke za uklapanje: za pripadni supstrat $24 \times 28 \times 26 \text{ \AA}^3$, za nepripadni $24 \times 38 \times 24 \text{ \AA}^3$, a za ADPr $24 \times 26 \times 30 \text{ \AA}^3$. Razmak između čvorova rešetki iznosio je 1 Å. Centar rešetke je, u odnosu na koordinatni sustav ulazne PDB strukture, smješten na koordinatama (x,y,z): (8,693, 4,842, -5,221) za pripadni, (7,522, 3,945, -2,955) za nepripadni supstrat i (8,712, 3,28, -7,675) za ADPr.

Za uklapanje supstrata Glu-ADPr u aktivno mjesto Mac1 korištene se sljedeće dimenzije rešetke za uklapanje: $28 \times 22 \times 28 \text{ \AA}^3$. Razmak između čvorova rešetki također je iznosio 1 Å. Centar rešetke je, u odnosu na koordinatni sustav ulazne PDB strukture, smješten na koordinatama (x,y,z): (10,642, 5,062, 21,61).

U svim slučajevima je zahtjevnost globalne pretrage (eng. exhaustiveness) iznosila 32, maksimalan broj načina vezanja svakog liganda koji se ispisuju 10, a maksimalna dozvoljena razlika u energiji između najboljeg i najgore predviđenog načina vezanja (eng. energy range) iznosila je 4 kcal mol^{-1} .

3.2.4.4 Parametrizacija sustava za račun molekulske dinamike

Protein SCO6735 i virusna makrodomena Mac1 su parametrizirani u polju sila ff14SB, dok su ligandi parametrizirani pomoću *AMBER16*⁷⁰ potprograma *xleap* u ff14SB.redq polju sila. Atomi u ligandima su parametrizirani usporedbom s nukleotidima (A, T i G), aminokiselinama i

modificiranim šećerima koji sadrže iste tipove atoma, a čiji su parametri pohranjeni u bazi koju čita jedan od potprograma *xleap*.

Korišteni su periodični rubni uvjeti pri čemu je simulacijska kutija imala oblik kvadra, a ispunjena je molekulama vode TIP3P modela. Veličina pravokutne prizme određena je tako da njena granica bude udaljena najmanje 10 Å od bilo kojeg atoma proteina. Neutralizacija sustava postignuta je dodavanjem odgovarajućeg broja natrijevih ili kloridnih iona.

3.2.4.5 Geometrijska optimizacija (minimizacija energije) sustava

Prije simulacija molekulske dinamike provodi se jedan ili više ciklusa računa minimizacije energije tj. optimizacije geometrije sustava. Time se nastoje ukloniti izrazito nepovoljne interakcije koje nastaju zbog premalih ili prevelikih udaljenosti između atoma ili nepovoljnih kutova. Minimizacija omogućuje optimizaciju duljina kovalentnih veza, valentnih kutova i sl., odnosno dovodi do relaksacije sustava u jedan od lokalnih minimuma bliskih početnoj strukturi na plohi potencijalne energije.

U ovom slučaju je minimizacija svih sustava provedena u četiri ciklusa: u prvom (1.) ciklusu optimiziraju se samo koordinate molekula otapala, dok su promjene koordinata atoma makromolekule i liganda otežane primjenom harmonijskog potencijala sa konstantom sile od $100 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$, u drugom (2.) ciklusu isti je harmonijski potencijal primijenjen na položaje svih atoma makromolekule i liganda, osim na položaje atoma vodika kako bi se postigla njihova relaksacija; u (3.) trećem ciklusu se harmonijski potencijal od $100 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ primjenjuje samo na položaje atoma proteinske okosnice; dok se u (4.) ciklusu ne primjenjuje nikakva sila na atome sustava. Svaki se ciklus sastoji od 1000 koraka algoritma najstrmijeg spusta, te 4000 koraka algoritma konjugiranih gradijenata.

3.2.4.6 Molekulska dinamika

U okviru ovog doktorskog rada svaki je sustav nakon minimizacije prvo podvrgnut zagrijavanju i ekvibraciji tj. simulaciji uravnoteženja, nakon čega je uslijedila produkcijska faza simulacije molekulske dinamike (MD).

Cilj simulacija uravnoteženja (ekvibracije) je uravnoteženje potencijalne energije sustava, temperature, gustoće otapala, itd. Prvo je provedena NVT (N, V, T = konst.; tzv. kanonski

ansambl) ekvilibracija u trajanju od 300 ps tijekom koje su položaji atoma proteina i liganda bili fiksirani primjenom harmonijskog potencijala sa konstantom sile $32 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$, dok je kretanje molekula otapala bilo slobodno. Volumen simulacijske kutije je pritom konstantan, a temperatura se povisuje od 0 K do konačne temperature na kojoj se sustav želi simulirati. U slučaju simulacija sustava s proteinom SCO6735 konačna temperatura je iznosila 303 K dok je kod sustava s virusnom makrodomenom Mac1 konačna temperatura 310 K.

Nakon toga je provedena NPT (N, p, T = konst.; tzv. Izotermno-izobarni ansambl) ekvilibracije u trajanju od 200 ps, koja se provodi pri temperaturi postignutoj u NVT ekvilibraciji i tlaku od 101 300 Pa. U ovom slučaju ne primjenjuje se nikakvo ograničenje na koordinate atoma u sustavu.

Nakon uravnoteženja sustava, slijedi produkcijska faza simulacija koja također generira NPT tj. izotermno-izobarni ansambl. U okviru ovog doktorskog rada svaki je sustav simuliran 200 ns, pri konstantnom srednjem tlaku od 101 300 Pa i konstantnoj srednjoj temperaturi. Sustavi s proteinom SCO6735 i virusnom makrodomenom Mac1 simulirani su pri istim temperaturama kao i tijekom simulacije uravnoteženja gustoće sustava.

Vremenski korak ekvilibracije i produkcijske faze je 1 fs, a strukture su uzorkovane svaku piko-sekundu. Za simulacije molekulske dinamike korišten je programski paket *AMBER16*⁷¹.

3.2.4.7 Analiza rezultata simulacija molekulske dinamike

Za određivanje svih geometrijskih parametara te analizu vodikovih veza korišten je *cpptraj* modul⁷⁰ programskog paketa *AMBER16*⁷¹. U svrhu analize simulacija korišteni su sljedeći geometrijski parametri: korijen srednjeg kvadrata odstupanja proteina od referentnog (početnog) položaja (jednadžba 9) (eng. Root Mean Square Deviation, RMSD) i korijen srednjeg kvadrata fluktuacija pojedinih bočnih ogranaka aminokiselina tijekom simulacije (jednadžba 10) (eng. Root Mean Square Fluctuation, RMSF). Prilikom računanja RMSF i RMSD vrijednosti u obzir su uzeti samo atomi okosnice proteina kako bi se izbjegle velike varijacije u vrijednostima koje su posljedica nasumičnog gibanja bočnih ogranaka.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (r_{i,A} - r_{i,B})^2}{N}} \quad (9)$$

$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum_t^T (x_i(t_j) - \bar{x}_i)^2}{T}} \quad (10)$$

Za računanje vodikovih veza korištena je opcija *hbond* iz modula *cpptraj*, koja računa ostvarene vodikove veze tijekom cijele trajektorije, pri čemu se u obzir uzima udaljenost i kut između atoma donora i akceptora. Navedena opcija u izlaznoj datoteci ispisuje: atome koje sudjeluju u vodikovoj vezi, broj struktura tijekom trajektorije u kojima se navedena veza pojavljuje, te prosječnu udaljenost i prosječan kut između atoma donora i akceptora.

Za prikaz i uređivanje grafova korišten je program *xmgrace*. Vizualizacija trajektorija i analiza struktura provedena je u programima *VMD*⁷² i *UCSF Chimera*⁷². Izračun udaljenosti između atoma tijekom simulacija molekulske dinamike također je proveden u vizualizacijskom programu *VMD*.

3.2.4.8 Virtualno pretraživanje baze malih molekula

Priprema sustava za virtualno pretraživanje

U vrijeme izvođenja računa bilo je poznato nekoliko kristalnih struktura virusne makrodomene Mac1 u apo-formi (PDB: 6WEY, 6VXS, 6WEN); kompleksu s ligandima ADPr (PDB: 6W02, 6Z5T, 6WOJ, 6YWL), AMP (PDB: 6W6Y), MES (PDB: 6WCF, 6YWM), HEPES (PDB: 6YWK) i inhibitorima srodnog proteina PARG ADP-HPD i ADP-HPM (PDB: 6Z6I i 6Z72). U svrhu pripreme najbolje rešetke za uklapanje (eng. grid box) koja će se koristiti za virtualnu pretragu baze malih molekula pohranjeno je i pripremljeno, pomoću Schrodinger potprograma *Protein Preparation Wizard*⁶⁴, nekoliko kristalnih struktura proteina Mac1 u kompleksu s ligandima. Rešetke za uklapanje pripremljene su pomoću potprograma *Receptor Grid Generator*. Ispravnost pripremljenih rešetki za uklapanje testirana je računom ponovnog uklapanja. To je postupak u kojem se ko-kristalizirani ligandi ponovno uklapaju u aktivno mjesto enzima, nakon čega se dobiveni načini vezanja i ostvarene interakcije uspoređuju s njihovom kristalnom strukturom. Time se utvrđuje jesu li parametri rešetke za uklapanje pravilno postavljeni te ih se nastoji optimizirati uvođenjem pojedinih ograničenja (npr. uključivanjem molekula vode bitnih za vezanje liganda prilikom definiranja rešetke) s ciljem što bolje reprodukcije interakcija ostvarenih

u poznatim kristalnim strukturama. U konačnici su najbolji rezultati dobiveni korištenjem rešetke generirane na temelju kristalne strukture kompleksa Mac1:ADP-HPD (PDB: 6Z6I) prilikom čije pripreme nisu uključena nikakva ograničenja. Prije računa ponovnog uklapanja, konfiguracije ko-kristaliziranih liganda su generirane potprogramom *Ligprep*.

Priprema baze malih molekula

Za virtualno pretraživanje malih molekula korišteno je nekoliko mrežno dostupnih baza podataka otvorenog pristupa: ZINC⁷³, DrugBank^{74,75}. Pri čemu su u obzir uzeti samo oni spojevi koji su već komercijalno dostupni.

Strukture spojeva u pohranjenim bibliotekama su prvo pripremljene pomoću potprograma *Ligprep* koji koristi program *Epik*⁷⁶ za stvaranje različitih tautomera, konformacija i protonacijskih stanja liganda (pri pH = 7,0 ± 2,0). Prilikom pripreme odabrana je opcija kojom se zadržava prethodno specificirana kiralnost, dok se ostali kiralni centri mogu varirati. Za parametrizaciju malih molekula korišteno je polje sila OPLS3e.

Prilikom virtualnog pretraživanja korištena je metoda standardne preciznosti uklapanja (eng. standard precision), te su za svaki ligand prikazana do tri načina vezanja koja imaju najbolji iznos bodova vrednovanja molekulskog uklapanja (eng. docking score). Nakon virtualnog pretraživanja ligandi su poredani po iznosu vrijednosti bodova vrednovanja. Budući da su bodovi vrednovanja za poznate ligande u računu ponovnog uklapanja bili u rasponu od -11,7 do -9,5 kcal mol⁻¹, analizirani su samo oni ligandi čiji su bodovi vrednovanja bili niži od ~ -8,0 cal mol⁻¹. Uz bodove vrednovanja, kriterij za odabir spoja koji će ući u daljnju fazu analize su bile i ostvarene interakcije. U programu *Maestro*, analizirane su interakcije uspostavljene prilikom vezanja liganda te su potom uspoređivane s onima u kompleksu Mac1:ADPr.

Nakon virtualnog pretraživanja odabrano je 200 spojeva na kojima je provedeno još jedno molekulsko uklapanje s fleksibilnim bočnim ograncima unutar aktivnog mjesta programom *Autodock Vina*^{66,67}. Fleksibilnost je dozvoljena bočnim ograncima: Phe360, Ile335 i Phe336, dok su ostali bočni ogranci bili rigidni. U tu svrhu korištene su dimenzije rešetke 30 × 30 × 30 Å³, dok je razmak između čvorova rešetke iznosio 1 Å. Centar rešetke je, u odnosu na koordinatni sustav ulazne PDB strukture, smješten na koordinatama (x,y,z) = (28,321, 22,014, -47,713). Zahtjevnost globalne pretrage iznosila je 32, maksimalan broj načina vezanja svakog liganda koji se ispisuju

10, a maksimalna dozvoljena razlika u energiji između najbolje i najgore predviđenog načina vezanja 4 kcal mol⁻¹.

Spojevi koji su pokazali najbolje načine vezanja u oba načina molekuskog uklapanja naručeni su i podvrgnuti *in vitro* eksperimentima.

Pretraživanje na temelju oblika liganda

Pretraživanje na temelju oblika korišteno je u slučaju kad je prilikom ITC mjerenja primijećeno dobro vezanje nekog od prethodno naručenih spojeva. Tada bi pretraga baze malih molekula bila provedena na temelju strukture i svojstava tog spoja.

Korišten je način pretraživanja volumena kojeg u prostoru zauzima poznati ligand koji se naziva tipizirani farmakofor (eng. typed pharmacophore). Broj konformera po svakom ligandu koji se uspoređuje iznosio je 50. Spojevi su zatim poredani po vrijednosti sličnosti (eng. shape similarity), a oni čija je strukturna sličnost bila viša od 0,5 ponovno su uklopljeni u aktivno mjesto virusne makrodomene Mac1 programom *Glide*⁵⁶, metodom standardne preciznosti. Sljedeći korak je bio fleksibilno uklapanje programom *Autodock Vina* (detaljnije opisano u prethodnom poglavlju). Spojevi koji bi pokazali najbolje vezanje u oba slučaja su potom naručeni i dalje testirani *in vitro* metodom ITC.

3.3.4.9 Filogenetska analiza

S ciljem analize zastupljenosti pojedinih strukturnih elemenata i ključnih katalitičkih aminokiselina među makrodomenskim proteinima provedena je opsežna filogenetska analiza.

Aminokiselinske sekvence makrodomenskih proteina navedenih u tablici D1 su poravnate algoritmom *MUSCLE*⁷⁷. Filogenetsko stablo konstruirano je prema metodi najveće vjerojatnosti (engl. maximum likelihood) pomoću programskog paketa *MEGA*⁷⁸ korištenjem modela *Goldman*⁷⁹. Statistička podrška za grananja unutar filogenetskog stabla određena je na temelju 1000 replikacija (*bootstrap* ponavljanja). Filogenetsko stablo je prikazano u skali, pri čemu su duljine grana mjerene prema broju supstitucija po mjestu. Brojevi prikazani na mjestima grananja su *bootstrap* vrijednosti pri čemu su prikazane samo vrijedosti više od 50 %.

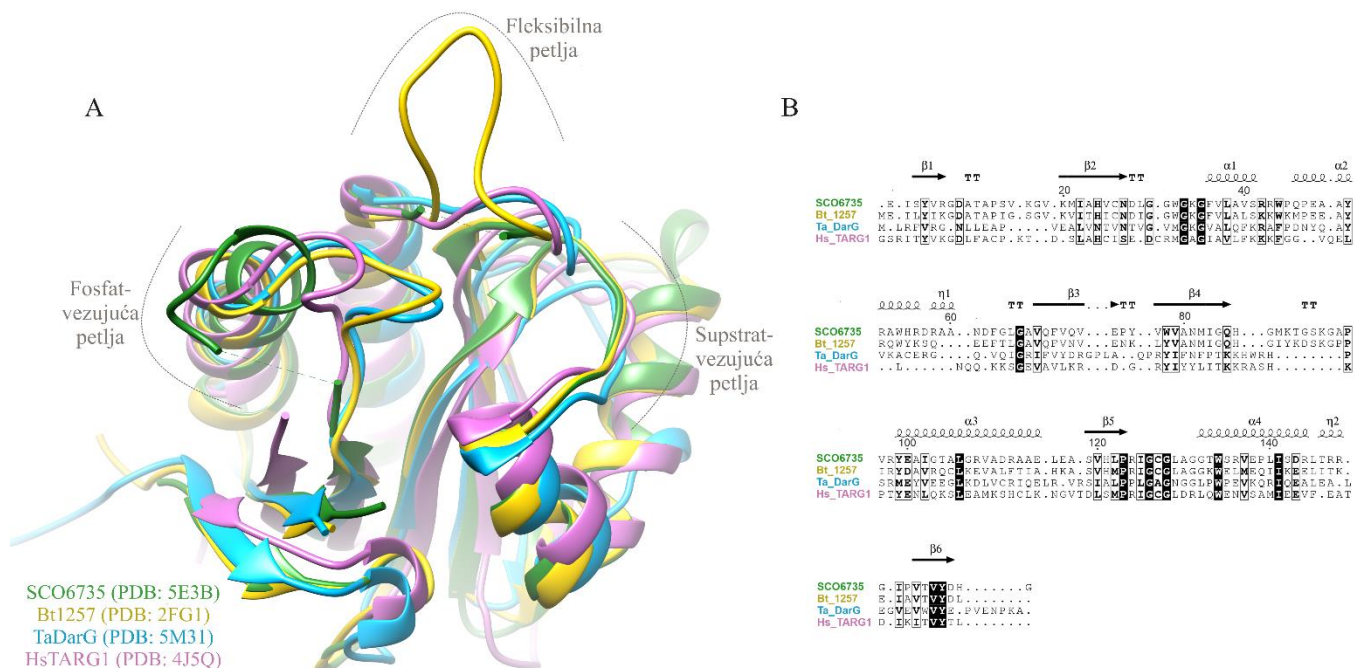
§ 4. Rezultati

Rezultati istraživanja na makrodomenskom proteinu SCO6735 iz bakterije *S. coelicolor*

4.1. Usporedba SCO6735 s homolognim proteinima TARG1 i DarG

Pretraživanje mrežno dostupnim servisom za usporedbu proteina *Dali*⁸⁰ otkrilo je nekoliko strukturnih homologa proteina SCO6735 među kojima najveću sličnost pokazuju: protein BT1257 iz bakterije *Bacillus thetaiotaomicron* (PDB: 2FG1; *Z-score* 25,5; RMSD 0,9 Å), protein DarG iz *T. aquaticus* (TaDarG, PDB: 5M31; *Z-score* 17,1; RMSD 2,3 Å) te ljudski protein TARG1 (HsTARG1, PDB: 4J5Q; *Z-score* 16,4; RMSD 2,2 Å). Iako protein BT1257 pokazuje najveću strukturnu sličnost sa SCO6735, budući da još uvijek nije biokemijski i funkcionalno okarakteriziran, u daljnjim je usporedbama fokus stavljen na preostala dva dobro istražena homologna proteina. Poravnanje primarnih sekvenci te kristalnih struktura apoproteina SCO6735 (PDB: 5E3B), TaDarG i HsTARG1 potvrdilo je visoki stupanj očuvanosti sekundarnih struktura te otkrilo potencijalno aktivno mjesto utisnuto između tri petlje. Primijećeno je da SCO6735 ne posjeduje očuvani katalitički Lys koji se smatra ključnim za enzimsku aktivnost proteina HsTARG1 i TaDarG^{27,40}, već se na tom mjestu nalazi Gln85 što, unatoč velikoj strukturnoj sličnosti između proteina, ukazuje na drugačiji mehanizam enzimske katalize. S obzirom na molekulsko-dinamička svojstva triju petlji koje okružuju aktivno mjesto (opisanih na primjeru proteina SCO6735 u poglavlju 4.4) nazvane su: supstrat-vezujuća, fleksibilna i fosfat-vezujuća petlja (slika 12). Za razliku od Bt1257, HsTARG1 i TaDarG kojima fosfat-vezujuća petlja zatvara aktivno mjesto, u riješenoj kristalnoj strukturi apoproteina SCO6735 ona je jako udaljena od aktivnog mjesta (slika 12A). Također, vidljiva je i očita razlika u duljini fleksibilne petlje između četiri uspoređene kristalne strukture, kod SCO6735 i Bt1257 ona je za pet aminokiselina dulja od fleksibilnih petlji u TaDarG i HsTARG1 (slika 12A i B).

Kao što je spomenuto u uvodu u poglavlju 2.5.1, makrodomenski proteini se dijele u pet potporodica, pri čemu se SCO6735, Bt1257, HsTARG1 i TaDarG klasteriraju u podgrupu nazvanu proteini nalik TARG1/ALC1.

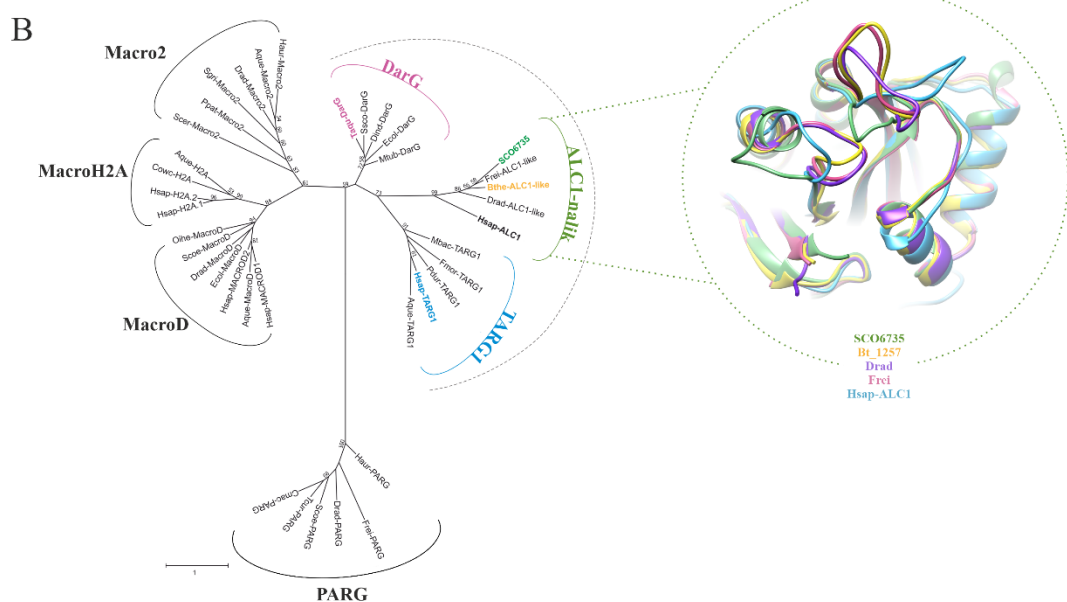
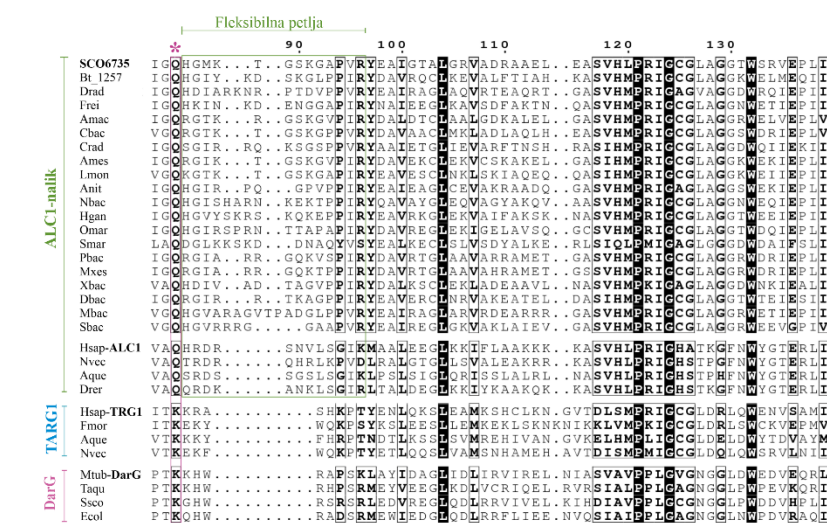
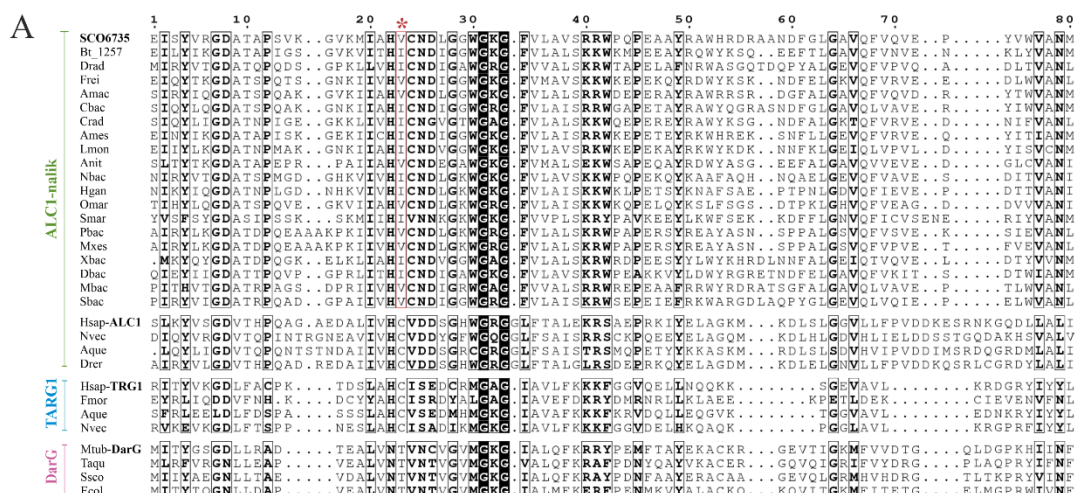


Slika 12. Usporedba primarne i tercijarne strukture proteina SCO6735 s njegovim homolozima.

Preklopljene tercijarne strukture proteina SCO6735 (zeleno), Bt1257 (žuto), HsTARG (ružičasto) i TaDarG (plavo) (A). Poravnate aminokiselinske sekvence proteina SCO6735, Bt1257, HsTARG1 i TaDarG (B). Sekundarne strukture proteina naznačene su iznad sekvenci.

Filogenetska analiza provedena u okviru ovog doktorskog rada pokazuje da se SCO6735, Bt1257, HsTARG1 i TaDarG s obzirom na razlike u primarnom slijedu dalje dijele u tri zasebne potporodice koje se na filogenetskom stablu jasno odvajaju jedna od druge. Pri čemu se SCO6735 i Bt1257 svrstavaju u istu potporodice s ljudskim proteinom ALC1. U svrhu bolje analize karakteristika potporodice ALC1 napravljeno je opsežnije poravnanje proteinskih sekvenci homologa iz različitih organizama (slika 13A). Članove ove potporodice karakterizira dugačka fleksibilna petlja, i Gln umjesto Lys koji je ključan za katalitičku aktivnost proteina TaDarG i HsTARG1. Očuvanost dugačke fleksibilne petlje dodatno je potvrđena predviđanjem 3D strukture nekoliko drugih proteina potporodice ALC1 mrežno dostupnim programom *AlphaFold*⁸¹ te njihovim preklapanjem (slika 13B). Osim razlike u duljini, vidljiva je i razlika u zastupljenosti pojedinih tipova aminokiselina između potporodica ALC1, DarG i TARG1. Prema poravnatim sekvencama vidljivo je da duge fleksibilne petlje u proteinima potporodice ALC1 obično imaju

puno više pozitivno nabijenih i aromatskih aminokiselina. Primjerice, SCO6735 u fleksibilnoj petlji ima dva Lys (Lys89 i Lys93) koji nemaju svoje ekvivalente u homolozima TaDarG i HsTARG1.



Slika 13. Filogenetska analiza proteina makrodomenske porodice. Poravnate sekvence proteina unutar potporodica ALC1, DarG i TARG1 (A). Zelenim kvadratom su označene aminokiseline koje u potporodici ALC1 čine dugu fleksibilnu petlju, a koja nije karakteristična za članove potporodica DarG i TARG1. Gln koji se smatra bitnim za enzimsku katalizu označen je ružičastom zvjezdicom. Val ili Ile očuvan u proteinima sličnim SCO6735 označen je crvenom zvjezdicom. Filogenetsko stablo makrodomenske porodice (B). Puna imena svih vrsta čiji su proteini predstavljeni u filogenetskom stablu navedena su u tablici D1 u dodatku. Preklopljene strukture proteina koji čine potporodicu ALC1 prikazane su u krugu. Strukture su predviđene mrežno dostupnim programom *AlphaFold*⁸¹.

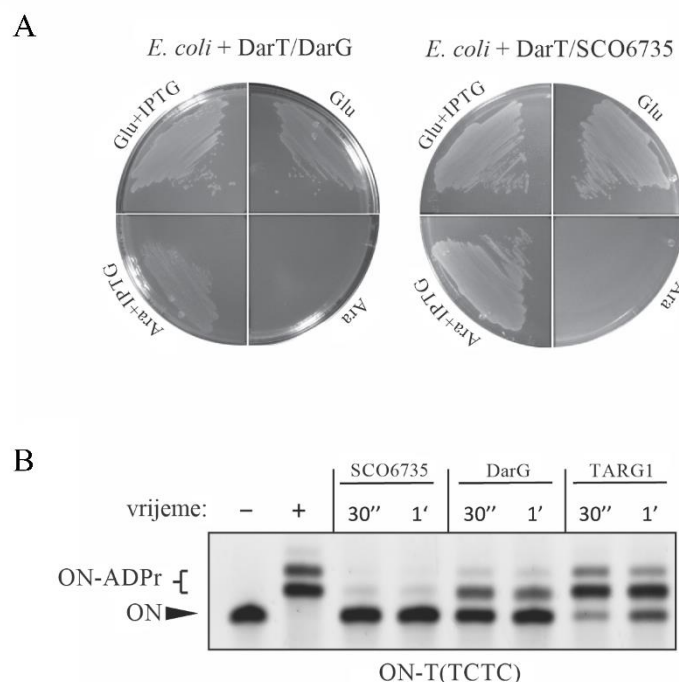
4.2. Testiranje aktivnosti SCO6735 na proteinskim i DNA supstratima

Kako bi se provjerilo ima li protein SCO6735 i funkcionalnu sličnost s proteinima HsTARG1 i TaDarG, istraženo je može li revertirati toksični učinak proteina TaDarT u bakterijskoj stanici i *in vitro*. Kako je detaljno opisano u poglavlju 2.3, toksičan učinak ART DarT iz bakterije *T. aquaticus* proizlazi iz ADP-ribozilacije ssDNA na drugom timinu u nukleotidnim sljedovima TNTC, TTT ili TCT²⁷, što u konačnici dovodi do zastoja u replikaciji i nemogućnosti dijeljenja bakterijske stanice.

Za eksperiment „spašavanja“ bakterijske stanice od toksičnog učinka ART TaDarT korišten je otprije uspostavljeni sustav u bakteriji *E. coli*²⁷, u kojem se gen za TaDarT nalazi na plazmidu pBAD33, dok je gen za SCO6735 ili TaDarG na dodatnom plazmidu pET28. Mijenjanjem supresora/induktora pojedinih gena na plazmidima praćena je mogućnost otklanjanja ADP-ribozilacije sa ssDNA. Kao što je vidljivo na slici 14A, kada se u *E. coli* dodatkom arabinoze (Ara) inducira samo ekspresija toksina TaDarT dolazi do potpunog zastoja u rastu bakterijskih stanica. Ukoliko se uz TaDarT inducira ekspresija TaDarG dodatkom IPTG-a bakterijske stanice mogu rasti. Isti je učinak „spašavanja“ bakterijskih stanica primijećen i kada se istovremeno inducira ekspresija toksina TaDarT i proteina SCO6735, čime je pokazano da SCO6735 može uspješno ukloniti ADP-ribozilaciju s timina, a time i toksični učinak toksina TaDarT.

U svrhu usporedbe efikasnosti enzimске katalize proteina SCO6735, TaDarG i HsTARG1 *in vitro* napravljen je test njihove aktivnosti na oligonukleotidu prethodno ADP-riboziliranom

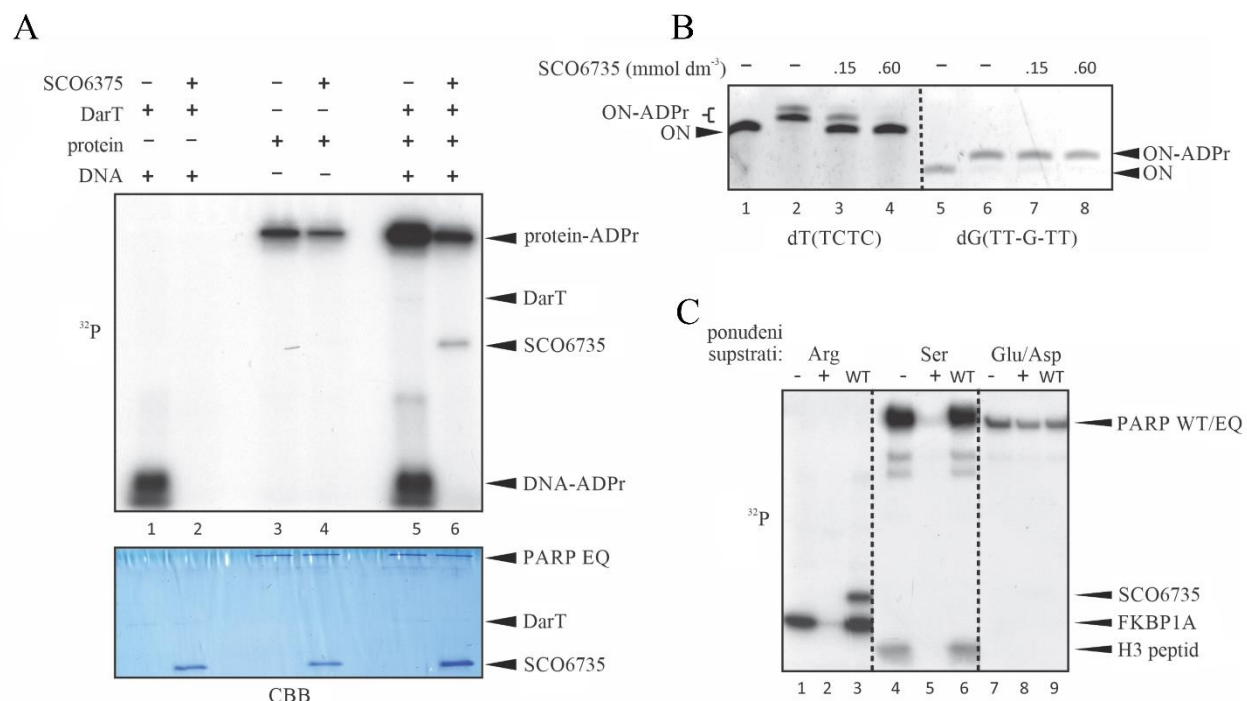
toksinom TaDarT (ADPr-ON). Pri tome su korištene iste koncentracije sve tri hidrolaze, reakcije su inkubirane u kratkim vremenskim intervalima različite duljine, kako bi se što bolje detektirala razlika u njihovoj efikasnosti. S ciljem detekcije razlike u brzini reakcije „jednog obrtaja enzima“ omjer enzima i supstrata iznosio je 1:1. Razlika je primijećena zaustavljanjem reakcija nakon 30 sekundi i nakon 1 minute. U tom je vremenskom intervalu samo protein SCO6735 gotovo u potpunosti uspio ukloniti svu ADP-ribozu s ssDNA (slika 14B). Sljedeći po brzini enzimske katalize je TaDarG, koji je nakon 1 minute uklonio modifikaciju s više od 60 % supstrata, dok se HsTARG1 pokazao najsporijim.



Slika 14. SCO6735 uspješno uklanjanje ADP-ribozilaciju s timina i poništava učinak toksina TaDarT. Eksperiment "spašavanja" bakterije *E. coli* od učinka toksina TaDarT (A). Gen za toksin TaDarT nalazi se na plazmidu pBAD33, dok plazmid pET28 nosi gen za antitoksin TaDarG ili protein SCO6735. U ploče su dodane glukoza/arabinoza za supresiju/indukciju ekspresije toksina, dok IPTG omogućuje ekspresiju s pET28 vektora. Test efikasnosti proteina SCO6735, TaDarG i HsTARG1 na oligonukleotidu TCTC prethodno modificiranom toksinom TaDarT(B). Koncentracija svih proteina je $0,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$, a reakcije su inkubirane 30 sekundi i 1 minutu. Produkti reakcije su analizirani na poliakrilamidnom urea gelu te vizualizirani bojanjem SYBR™ Gold.

S obzirom da je otprije poznato da SCO6735 može djelovati i na proteinima modificiranim na Asp/Glu bočnim ograncima⁷, napravljen je kompeticijski eksperiment kako bi se utvrdilo postoji li preferencija prema jednom od njegovih supstrata. Kao proteinski supstrat korišten je mutirani protein PARP E988Q koji se auto-mono-ADP-ribozilira na Asp/Glu bočnim ograncima. Svi eksperimenti prethodne ADP-ribozilacije proteinskih supstrata napravljeni su u prisustvu radioaktivno obilježenog kofaktora NAD⁺, te je sukladno tome hidrolitičko djelovanje proteina SCO6735 praćeno autoradiografski. U eksperimentu su supstrati (istih koncentracija) dodani u zasebnim, te u istoj reakcijskoj smjesi. U svim reakcijskim smjesama je omjer koncentracija protein : ukupan supstrat iznosio 1 : 1. Kao što je vidljivo na slici 15A, linija 2, SCO6735 je u potpunosti uklonio svu ADPr s ADPr-ON, dok u istom vremenskom intervalu nije uspio ukloniti svu modifikaciju s proteinskog supstrata (linija 4). U kompeticijskom eksperimentu je također primijećeno njegovo preferentno djelovanje na supstratu ADPr-ON s kojeg je u potpunosti uklonio svu ADPr, dok je na proteinskom supstratu još uvijek vidljiv radioaktivni signal (slika 15A, linija 6).

Kako bi se provjerilo djeluje li SCO6735 specifično na ADP-ribozilirane timine u DNA i proteine modificirane na Glu/Asp bočnim ograncima, istražena je njegova aktivnost i na drugim supstratima. Budući da bakterija *S. coelicolor* kodira za toksin SCO5461 koji se vjerojatno izlučuje iz bakterijske stanice i modificira N² amino grupe gvanina^{82,83}, testirano je može li SCO6735 ukloniti navedenu modifikaciju. No, kao što je vidljivo na slici 15B, protein SCO6735 čak ni nakon sat vremena inkubacije nije pokazao djelovanje na ADP-riboziliranim gvaninskim supstratima. U svrhu testiranja aktivnosti na proteinskim supstratima, korišteni su proteini modificirani na bočnim ograncima Ser i Arg: H3 peptid i protein PARP1 koji se modificiraju na Ser, te protein FKBP1A koji se modificira na Arg pomoću transferaze ARTC2.2. Kao pozitivna kontrola korišteni su ljudski makrodomenski proteini za koje je poznato da uklanjaju ADPr sa Ser (HsARH3), odnosno Arg (HsARH1). Kao što je vidljivo na slici 15C do smanjenja autoradiografskog signala došlo je jedino prilikom dodavanja proteina SCO6735 u smjesu koja sadrži proteine modificirane na Asp i Glu bočnim ograncima.

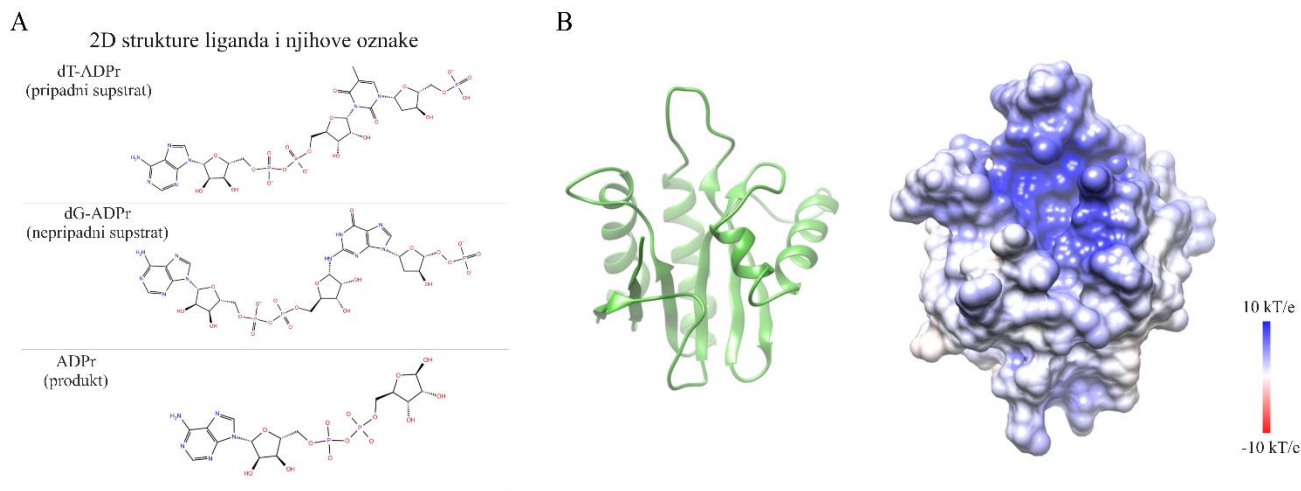


Slika 15. Testiranje aktivnosti proteina SCO6735 na različitim proteinskim i DNA supstratima. Rezultati kompetencijskog eksperimenta u kojem je testirana preferencije prema proteinskom ili DNA supstratu (A). U eksperimentu su korišteni radioaktivno obilježeni supstrati, a produkti reakcije su razdvojeni na SDS-PAGE gelu i potom detektirani autoradiografski. Na donjoj slici prikazan je isti gel, pri čemu su proteinski uzorci obojani CBB bojom u svrhu kontrole količine proteina i pravilnog nanošenja uzorka. Testiranje djelovanja proteina SCO6735 na modificiranim timinima i gvaninima (B). Produkti reakcijske smjese su razdvojeni na poliakrilamidnom urea gelu i vizualizirani pomoću SYBR™ Gold boje. Testiranje aktivnosti SCO6735 na proteinima kojima su ADP-ribozilirani bočni ogranci Ser ili Arg (C). Produkti reakcije su razdvojeni na SDS-PAGE gelu, te vizualizirani autoradiografski.

4.3. Molekulsko uklapanje ADPr i pripadnog supstrata u aktivno mjesto proteina SCO6735

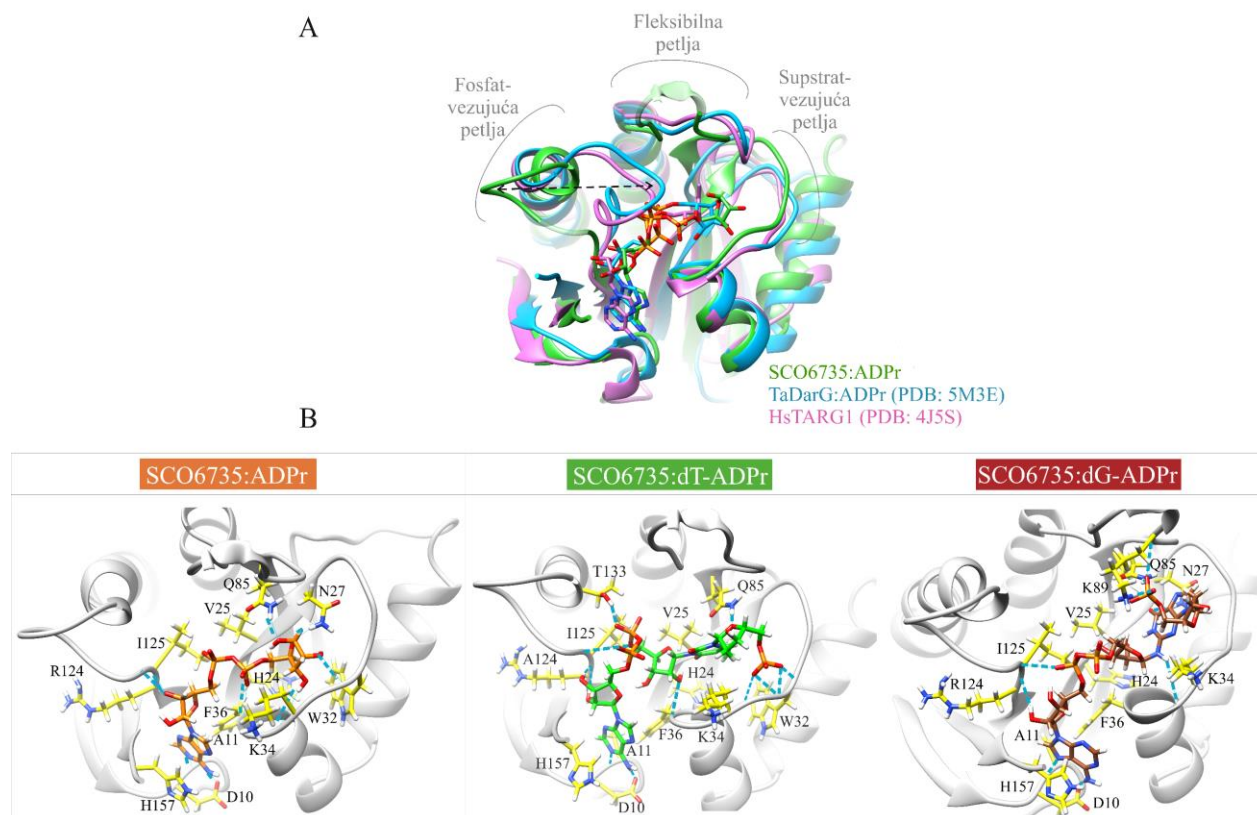
Budući da je pokazano da protein SCO6735 ima veću aktivnost na DNA nego proteinskom supstratu, daljnja su istraživanja bazirana na DNA modificiranoj na timinu (dT-ADPr) kao pripadnom supstratu ovog proteina.

Do sada nije riješena kristalna struktura proteina SCO6735 u kompleksu sa ADPr ili analogom supstrata. Stoga su, kako bi se dobio bolji uvid u aminokiseline koje sudjeluju u vezanju supstrata i enzimskoj katalizi, njegovi kompleksi izgrađeni računalnom metodom molekulskog uklapanja. Također, napravljen je i kompleks s nepripadnim supstratom dG-ADPr u svrhu razjašnjavanja diskriminacije ADP-riboziliranog timina od ADP-riboziliranog gvanina na molekulskoj razini. Atom dušika koji se ADP-ribozilira u gvaninu određen je spektrometrijom masa⁸³, dok je modificirani atom u timinu određen metodom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i kristalografski⁸⁴. Kao što je već spomenuto u poglavlju 3.2.4.2, ligandi su izgrađeni u *Maestro* potprogramu *2D sketcher*, a kako bi se što bolje oponašao dio ssDNA prilikom izgradnje pripadnog i nepripadnog supstrata, na baze T i G je dodana još jedna riboza i fosfatna skupina koje pridonose hidrofilnosti i elektronegativnosti (slika 16A). Za račun uklapanja korištena je struktura apoproteina SCO6735 u kojoj su aminokiseline koje nedostaju u fosfat-vezujućoj i fleksibilnoj-petlji izgrađene pomoću mrežno dostupnog programa *SWISS-MODEL*⁶². Kompletirana struktura apoproteina je potom podvrgnuta minimizaciji energije, ekvilibraciji i simulaciji MD. A upravo je konformacija dobivena nakon simulacije od 1 ns prikazana na slici 16B korištena za račun uklapanja. U ovoj konformaciji sve tri petlje su odmaknute od aktivnog mjesta i čine elektropozitivni utor dostupnim za smještanje izgrađenih liganada.



Slika 16. Strukture proteina SCO6735 i liganda korištenih za račun molekuskog uklapanja. Dvodimenzionalne strukture ADPr, pripadnog (dT-ADPr) i nepripadnog (dG-ADPr) supstrata (A) koji su uklopljeni u aktivno mjesto proteina SCO6735. Konformacija proteina SCO6735 nakon četiri ciklusa geometrijske optimizacije i 1 ns simulacije (B), a koja je korištena za izgradnju kompleksa. S desne strane je prikazana elektrostatska površina proteina SCO6735 izračunata mrežno dostupnim programom *APBS*⁸⁵.

Bodovi vrednovanja (eng. *docking score*) molekuskog uklapanja za produkt (ADPr), pripadni supstrat (dT-ADPr) i nepripadni supstrat (dG-ADPr) su redom iznosili: $-8,3 \text{ kcal mol}^{-1}$, $-8,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ i $-8,8 \text{ kcal mol}^{-1}$. Prikazani načini vezanja liganda (slika 17B) nisu bili najbolje rangirani, ali su u najboljem slaganju s pozicioniranjem ADPr u kristalnim strukturama homolognih proteina TaDarG i HsTARG1 kako je prikazano na slici 17A. Kao što je vidljivo na slici 17B, nakon molekuskog uklapanja i 4 ciklusa minimizacije svi ligandi imaju neke zajedničke interakcije, poput vodikove veze između hidroksilne skupine proksimalne riboze i okosnice Arg124. Također, u svim je kompleksima adeninski prsten stabiliziran vodikovim vezama s bočnim ogrankom Asp10 i okosnicom Ala11, te π - π interakcijama naslagivanja (eng. π - π stacking) s His157 i Phe36.



Slka 17. Kompleksi proteina SCO6735 s ADPr, pripadnim (dT-ADPr) i nepripadnim (dG-ADPr) supstratima dobiveni molekulskim uklapanjem. Preklopljene kristalne strukture proteina TaDarG (PDB: 5M3E, plavo) i HsTARG1 (PDB: 4J5S, ružičasto) u kompleksu s ADPr s kompleksom SCO6735:ADPr dobivenim metodom molekulskog uklapanja (zeleno)(A). Interakcije koje se ostvaruju unutar aktivnog mjesta proteina SCO6735 nakon molekulskog uklapanja ADPr, pripadnog (dT-ADPr) i nepripadnog (dG-ADPr) supstrata te nakon 4 ciklusa geometrijske optimizacije (B). Prikazane su aminokiseline do udaljenosti od 3 Å od liganada.

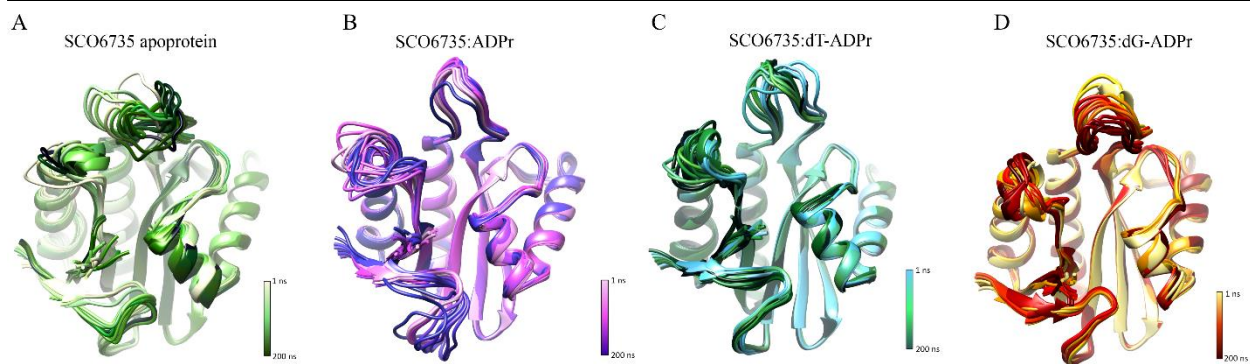
Vodikove veze su prikazane plavim isprekidanim linijama.

Difosfat je u slučaju pripadnog i nepripadnog supstrata stabiliziran vodikovim vezama s okosnicom Ile125, dok ga u slučaju ADPr stabilizira okosnica Phe36. Sva tri kompleksa se razlikuju u vezanju distalne riboze. Kod kompleksa s pripadnim supstratom i produktom distalna riboza ostvaruje vodikovu vezu s Gln85, ali preko različitih atoma. Dok kod kompleksa s nepripadnim supstratom nema vodikovih veza koje se ostvaruju između aktivnog mjesta proteina i distalne riboze.

4.4. Strukturna i dinamička svojstva proteina SCO6735 u kompleksu s pripadnim supstratom i ADPr

Kako je istaknuto u poglavlju 4.1, jedna od glavnih razlika u konformaciji aktivnog mjesta između kristalnih struktura apoproteina SCO6735, TaDarG i HsTARG1 je pozicija fosfat-vezujuće petlje, koja u slučaju TaDarG1 i HsTARG1 zatvara aktivno mjesto, dok je u SCO6735 udaljena ~ 15 Å od aktivnog mjesta⁷. U svrhu provjere dinamičkih svojstva proteina SCO6735 provedene su simulacije MD apoproteina i njegovih kompleksa s dT-ADPr, dG-ADPr i ADPr dobivenih molekulskim uklapanjem.

Prosječne strukture proteina SCO6735 u različitim kompleksima izračunate svakih 10 ns tijekom 200 ns simulacije MD prikazane su na slici 18. Zanimljivo je da niti jedan od liganada nije doveo do potpunog zatvaranje fosfat-vezujuće petlje. Analiza fluktuacija (RMSF) bočnih ograna unutar fosfat-vezujuće petlje u svim sustavima je pokazala najveću fluktuaciju aminokiselina: Gly131, Ala130 i Leu129. Najviša prosječna fluktuacija navedenih triju aminokiselina primijećena je kod apoproteina ($\text{RMSF}_{\text{avg}} = 4,2$ Å), što je u skladu s preklopljenim prosječnim strukturama prikazanim na slici 18, na kojima je vidljivo pomicanje fosfat-vezujuće petlje prema i od aktivnog mjesta. Prosječna fluktuacija triju aminokiselina kod pripadnog supstrata je iznosila 3,4 Å, a tako visoka vrijednost proizlazi iz njene fluktuacije prema aktivnom mjestu, čime dolazi do djelomičnog zatvaranja aktivnog mjesta. U slučaju kompleksa s ADPr, zabilježena je nešto manja fluktuacija te petlja ostaje udaljena od aktivnog mjesta ($\text{RMSF}_{\text{avg}} = 3,1$ Å). Najmanja fluktuacija fosfat-vezujuće petlje primijećena je kod kompleksa s nepripadnim supstratom pri čemu prosječna vrijednost fluktuacije spomenutih triju aminokiselina iznosi 2,5 Å.



Slika 18. Prosječne strukture proteina SCO6735 u apo-formi te kompleksima s ADPr, pripadnim (dT-ADPr) i nepripadnim (dG-ADPr) tijekom 200 ns simulacija MD. Preklopljene prosječne strukture apoproteina SCO6735 (A), te kompleksa s ADPr (B), dT-ADPr (C) i dG-ADPr (D).

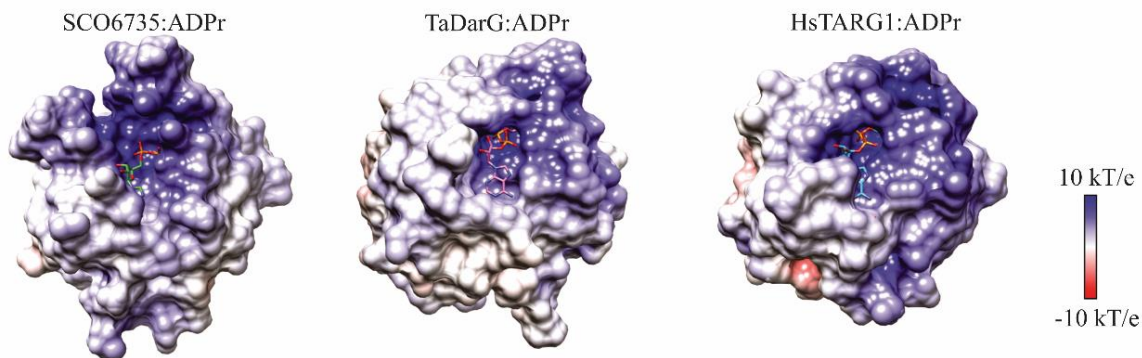
Strukture su generirane svakih 20 ns. S ciljem što jednostavnijeg prikaza izostavljene su prosječne strukture liganada. Sukladno prikazanim legendama svjetlijim bojama su prikazane rane faze, a tamnijim bojama kasnije faze simulacije.

4.5. Usporedba elektrostatske površine proteina SCO6735 i njegovih homologa DarG i TARG1

Analizom elektrostatske površine triju homologa (SCO6735, TaDarG i HsTARG1) pokušao se pronaći uzrok veće procesivnosti proteina SCO6735 na ssDNA supstratu. Izračun elektrostatske površine proveden je pomoću mrežno dostupnog programa *APBS* (eng. *The Adaptive Poisson-Boltzman Solver*)⁸⁵.

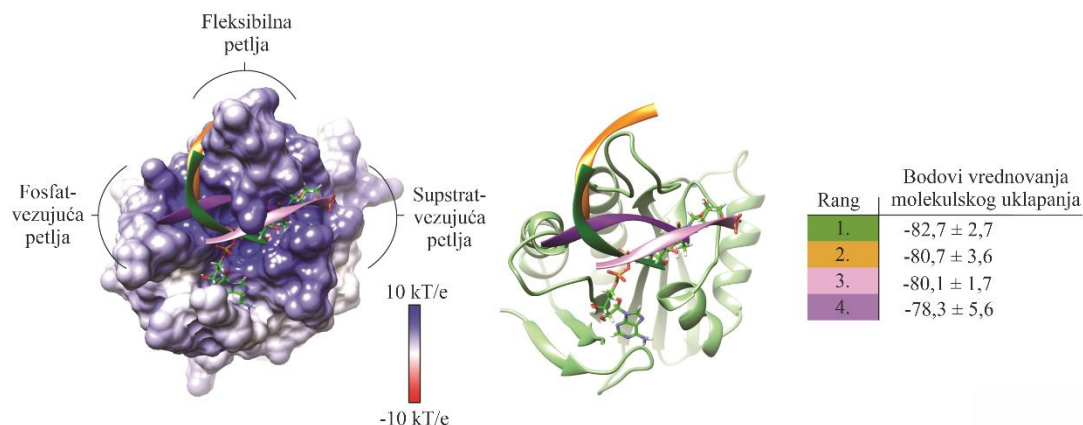
Za analizu su korištene kristalne strukture proteina HsTARG1 (PDB: 4J5S) i TaDarG (PDB: 5M3E) te konformacija proteina SCO6735 u kompleksu s ADPr dobivena nakon 150 ns simulacije. Kao što je vidljivo na slici 19, odmicanjem fosfat-vezujuće petlje iz aktivnog mjesta proteina SCO6735 otkriva se elektropozitivan kanal između petlji idealan za smještanje negativno nabijene molekule ssDNA. Povećana elektropozitivnost proizlazi i iz dulje fleksibilne petlje koja sadrži dva dodatna lizina koji nemaju svoje ekvivalente u strukturama HsTARG1 i TaDarG, kao što se može vidjeti nakon poravnjanja sekvenci (slika 12A).

HsTARG1 i TaDarG također pokazuju elektropozitivne utore namijenjene vezanju ADPr, ali ne sadrže jasno definirani kanal (veće elektropozitivne površine) kao protein SCO6735 (slika 19).



Slika 19. Usporedba elektrostatske površine proteina SCO6735, HsTARG1 (PDB: 4J5S) i TaDarG (PDB: 5M3E) u kompleksu s ADPr izračunate mrežno dostupnim programom *APBS*⁸⁵. Sukladno prikazanoj legendi, tamno plavom bojom su naznačeni najelektropozitivniji, a crvenom najelektronegativniji dijelovi strukture.

Pomoću mrežno dostupnog programa *HADDOCK*⁸⁶ napravljeno je predviđanje vezanja molekule DNA u strukturu proteina SCO6735. Pri tome je korištena jednolančana molekula DNA izdvojena iz kristalne strukture kompleksa TaDarT:ssDNA (PDB: 7ON0) te konformacija proteina SCO6735 dobivena nakon 100 ns simulacije MD u kompleksu s pripadnim supstratom dT-ADPr. Na slici 20 su prikazana četiri najbolje rangirana načina vezanja ssDNA, te je radi ilustrativnosti prikazano i pozicioniranje pripadnog supstrata dT-ADPr. Prva dva najbolje rangirana načina vezanja DNA obojana su zeleno (bodovi rangiranja: $-82,7 \pm 2,7$) i narančasto (bodovi rangiranja $-80,7 \pm 3,6$), te pokazuju ulazak jednolančane DNA sa lijeve strane utora koju čine fosfat-vezujuća i fleksibilna petlja. Prema priloženoj tablici je vidljivo da se sva četiri načina vezanja jako malo razlikuju u iznosu bodova vrednovanja molekulskog uklapanja. Glavne vrijednosti se nalaze unutar standardne pogreške, što ukazuje da su svi načini vezanja gotovo podjednako mogući. Stoga je vrlo vjerojatno da bi molekula DNA mogla ući s obje strane kanala kojeg tvore tri petlje.



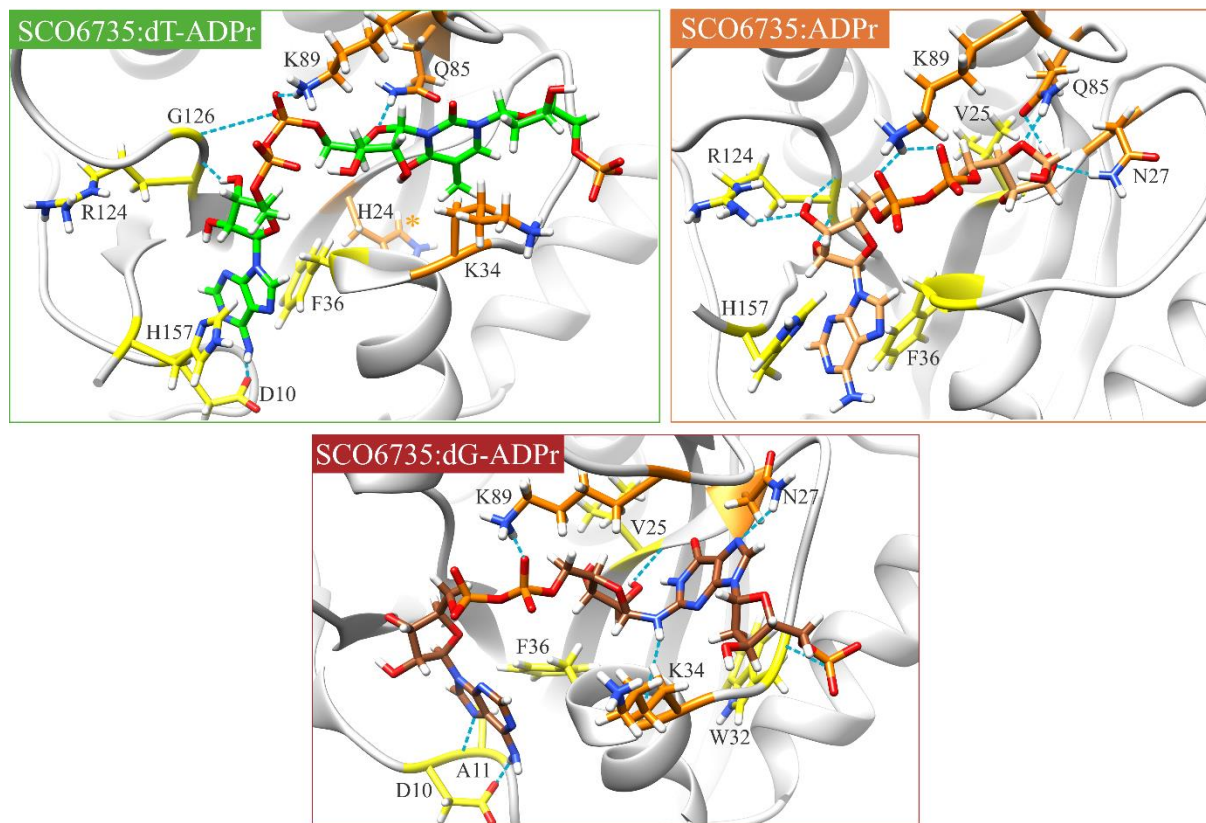
Slika 20. Molekulsko uklapanje molekule ssDNA programom *HADDOCK*⁸⁶ u otvoreno aktivno mjesto proteina SCO6735. Konformacija proteina je dobivena nakon 150 ns simulacije. Četiri najbolja rezultata uklapanja su prikazana u priloženoj tablici. Boja ssDNA odgovora boji rangiranih klastera. Njihovi su bodovi vrednovanja (eng. haddock score) i pripadajuće standardne devijacije naznačeni u desnom stupcu tablice. Elektrostatska površina proteina SCO6735 je izračunata programom *APBS*⁸⁵. Sukladno prikazanoj legendi, tamno plavom bojom su naznačeni najelektropozitivniji, a crvenom najelektronegativniji dijelovi strukture.

4.6. Određivanje uloge pojedinih aminokiselina proteina SCO6735 u vezanju supstrata i enzimskoj katalizi

Aktivno mjesto proteina SCO6735 ne sadrži aminokiseline koje imaju očiti katalitički potencijal, stoga je istražen doprinos nekoliko aminokiselina u vezanju supstrata i u enzimskoj katalizi. Simulacije MD otkrile su interakcije bitne za vezanje supstrata i produkta. Čvrsto vezanje adeninskog prstena π - π interakcijama naslagivanja s Phe36 i His157 koji se nalaze s gornje i donje strane baze te vodikovom vezom s bočnim ogrankom Asp10, primijećeno je već i nakon molekuskog uklapanja i geometrijske optimizacije kompleksa, a održalo se i tijekom simulacija MD. U vezanju proksimalne riboze uključena je fosfat-vezujuća petlja točnije, Arg124 koji preko karbonilnog kisika okosnice ostvaruje stabilnu vodikovu vezu s hidroksilnom skupinom. Difosfat je stabiliziran vodikovom vezom s Lys89 (52 % trajektorije kod pripadnog i 30 % trajektorije kod produkta), dok je kod pripadnog supstrata u vezanje još uključen i Gly126 (slika 21).

U slučaju neprikladnog supstrata Arg124 ne ostvaruje vodikovu vezu sa difosfatom, što dovodi do drugačijeg ponašanja i fluktuacije fosfat-vezujuće petlje, što se najbolje može vidjeti na preklapljenim prosječnim strukturama na slici 18. Izostanak ovih vodikovih veza ujedno dovodi i do odmicanja His155 i Phe36 te veće fleksibilnosti adeninskog prstena. Kisikov atom unutar prstena distalne riboze pripadnog supstrata ostvaruje stabilnu vodikovu vezu s Gln85, a ta je interakcija prisutna tijekom 62 % simulacijskog vremena, dok u slučaju neprikladnog supstrata distalna ribeza ostvaruje stabilnu vodikovu vezu s okosnicom Val25 (slike 21 i 22).

Zanimljivo je da timin pripadnog supstrata ne ostvaruje nikakvu stabilnu interakciju s veznim mjestom. S druge strane, primijećeno je da gvanin neprikladnog supstrata ostvaruje prilično stabilnu interakciju s Asn27 prisutnu tijekom 26 % simulacijskog vremena (slika 21).



Slika 21. Glavne interakcije koje protein SCO6735 ostvaruje s ADPr te pripadnim (dT-ADPr) i neprikladnim (dG-ADPr) supstratom tijekom 200 ns simulacija. Interakcije koje se ostvaruju u kompleksu s dT-ADPr prikazane su u zelenom, s ADPr u narančastom i dG-ADPr u crvenom kvadratu. Označene interakcije detektirane su u više od 20 % simulacijskog vremena. Aminokiseline čiji su doprinos katalizi i vezanju liganda istraženi mjesno-specifičnom

mutagenezom su označene narančastom bojom. His24 ne ostvaruje direktnu vodikovu vezu s pripadnim supstratom te je stoga označen zvjezdicom. Vodikove veze označene su plavim isprekidanim linijama.

Primijećeno je da Gln85 koji se nalazi na ekvivalentnoj poziciji katalitičkih lizina u TaDarG i HsTARG1 ostvaruje različite interakcije s ligandima u sva tri sustava, te ovisno o interakcijama sa susjednim aminokiselinama prelazi u različite rotamere tijekom simulacija. Primjerice, kao što je već spomenuto, kod pripadnog supstrata Gln85 stabilizira distalnu ribozu stvarajući vodikovu vezu preko amino skupine bočnog ogranka. Njegovo „zaključavanje“ u tom rotameru ostvareno je pomoću stabilne vodikove veze sa susjednim Asn27 kojeg dalje dodatno stabilizira vodikova veza s Leu29 (slika 22A). Kao što je grafički prikazano na slici 22A, u početku simulacije navedene vodikove veze još nisu uspostavljene i udaljenost između atoma koji ih ostvaruju fluktuiraju preko 3,5 Å. Nakon 20 ns simulacije udaljenosti između triju aminokiselina se ustaljuju na oko 2,5 Å te su njihovi bočni ogranci usmjereni na način koji omogućuje ostvarivanje stabilnih vodikovih veza sve do kraja simulacije.

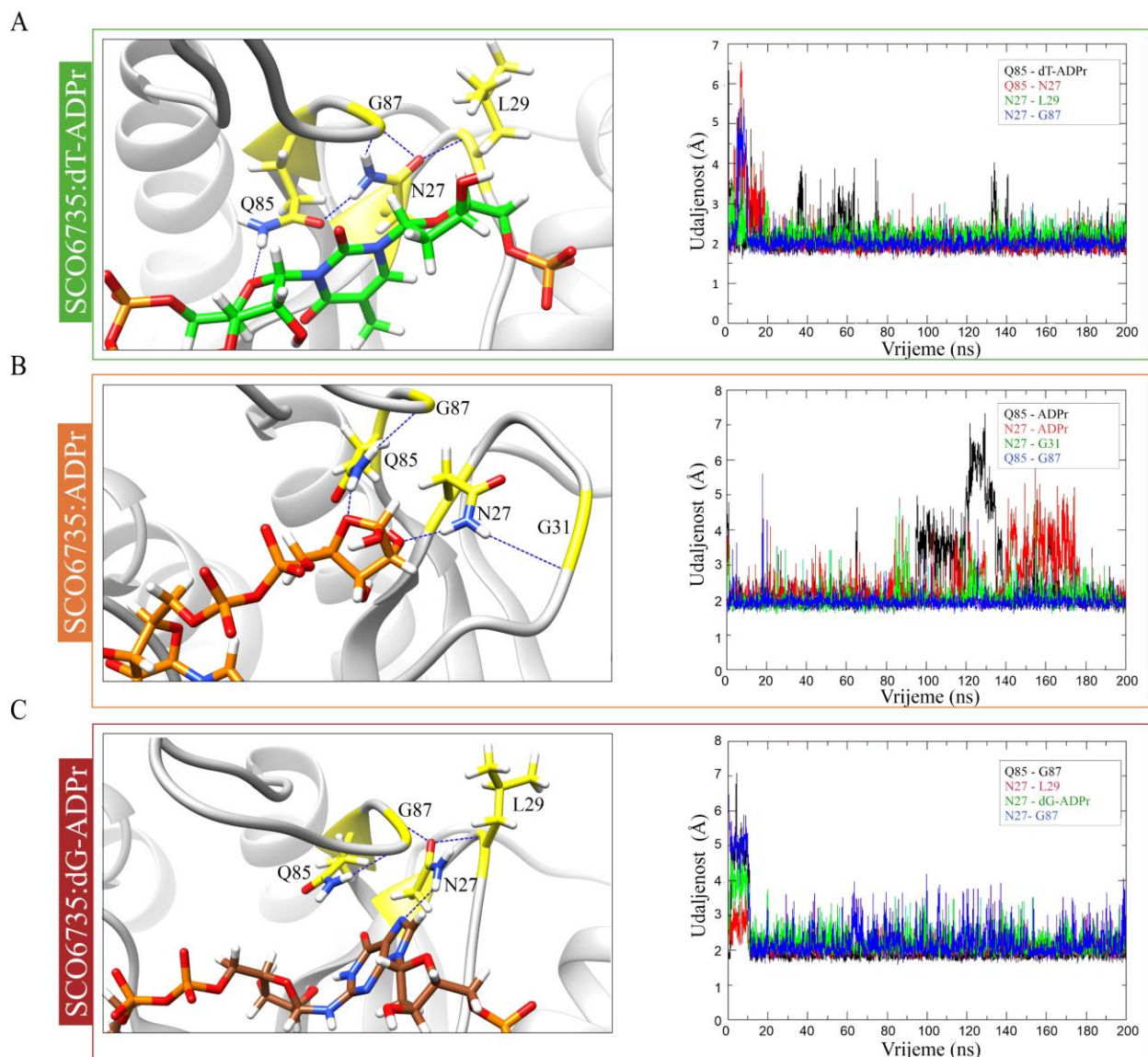
U kompleksu s ADPr, Gln85 je zauzeo drugi rotamer, koji mu osigurava povremenu vodikovu vezu s distalnom ribozom (slika 22B). Kao što je vidljivo na grafu na slici 22B, udaljenost između Gln85 i distalne riboze se povećava preko 4 Å u intervalu od 100 – 145 ns simulacije, nakon čega se ponovno približavaju na udaljenost koja omogućuje uspostavu vodikove veze. U ovom slučaju Gln85 ostvaruje stabilnu interakciju s Gly87 tijekom svih 200 ns simulacije, dok Asn27 ostvaruje relativno stabilnu interakciju s hidroksilnom skupinom distalne riboze (slika 22B).

Kod vezanja nepripadnog supstrata, Gln85 je pozicioniran više izvan aktivnog mjesta i ne ostvaruje nikakvu interakciju s distalnom ribozom, ali nakon 10 ns simulacije ostvaruje interakciju s Gly87 koja je stabilna do kraja simulacije. Asn27 ostvaruje vodikovu vezu s gvaninskim prstenom nakon 10 ns i ta interakcija ostaje stabilna do kraja simulacije MD (slika 22C).

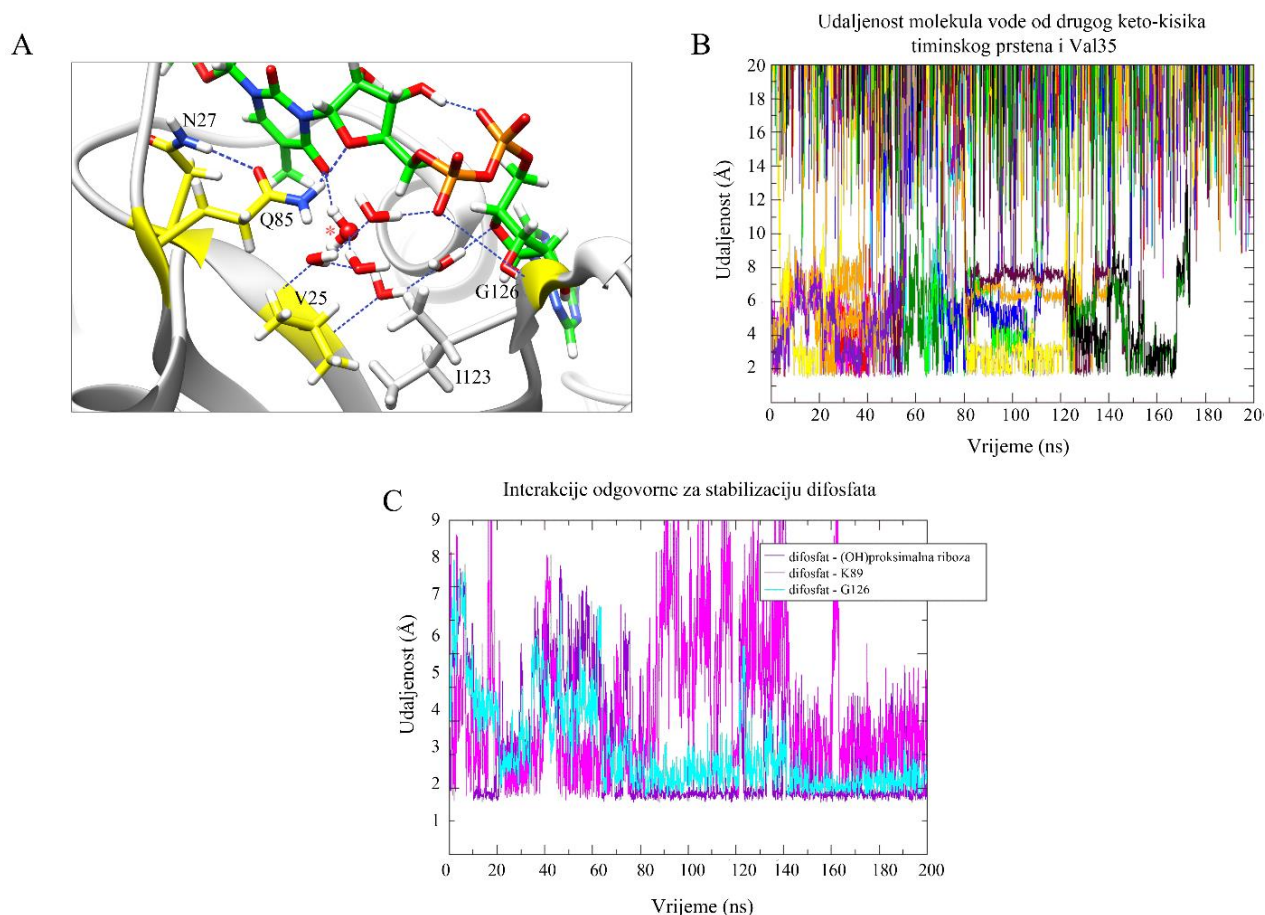
Izostanak aminokiseline koja bi mogla sudjelovati u kiselobaznoj katalizi upućuje da bi reakcija mogla biti započeta aktiviranom molekulom vode. Imajući to na umu provedena je detaljna analiza molekula vode unutar aktivnog mjesta tijekom cijele simulacije kompleksa s pripadnim supstratom. Kako je prikazano na slici 23A, uočena je molekule vode (označena crvenom zvjezdicom) koja se ugniježđuje između drugog keto-kisikovog atoma u timinskom

prstenu supstrata te okosnice Val35. Na priloženom grafu (slika 23B) prikazana je udaljenost svih molekula vode koje se tijekom 200 ns simulacije izmjenjuju na navedenoj poziciji. Vidljivo je da svaka od tih molekula vode dolazi na udaljenost od oko 2 Å od keto-kisika i Val35 što je dovoljno za uspostavu vodikove veze.

Ugniježđena molekula vode ujedno je dio razvijene mreže molekula vode, koje su pomoću vodikovih veza pravilno pozicionirane unutar aktivnog mjesta između difosfata pripadnog supstrata i Gln85 (slika 23A). Ova mreža ovisi o preciznom pozicioniranju difosfata koji je osiguran intramolekulskom vodikovom vezom s proksimalnom ribozom (prisutno u 60 % simulacijskog vremena) te vodikovim vezama s Lys89 (51 % simulacijskog vremena) i Gly126 (20 % simulacijskog vremena). Udaljenosti između atoma difosfata i atoma s kojima ostvaruje vodikove veze prikazane su na grafu slike 23 pod C.



Slika 22. Glavne interakcije koje Gln85 ostvaruje sa susjednim aminokiselinama i ligandima u aktivnom mjestu proteina SCO6735 tijekom 200 ns simulacije. Interakcije u kompleksu s pripadnim supstratom (dT-ADPr) (A), s produktom (ADPr) (B) i s nepripadnim supstratom (dG-ADPr) (C). Udaljenosti između atoma koji ostvaruju označene vodikove veze prikazane su na pripadajućem grafu s desne strane. Vodikove veze su označene plavim isprekidanim linijama.



Slika 23. Interakcije odgovorne za pravilno pozicioniranje razvijene mreže molekula vode unutar aktivnog mjesta proteina SCO6735 u kompleksu s pripadnim supstratom (dT-ADPr). Mreža molekula vode pravilno pozicioniranih unutar aktivnog mjesta između Gln85 i difosfata pripadnog supstrata (A). Molekula vode koja je ugniježđena između drugog keto-kisikovog atoma u timinskom prstenu supstrata te okosnice Val35 i koja bi mogla započeti enzimsku katalizu je označena crvenom zvjezdicom. Grafički prikaz udaljenosti molekula vode koje se tijekom 200 ns simulacije izmjenjuju i ugnježđuju između drugog keto-kisikovog atoma timina i okosnice Val35 (B). Grafički prikaz udaljenosti između atoma difosfata i proksimalne riboze, Lys89, i Gly126 s kojima ostvaruje stabilnu vodikovu vezu tijekom 200 ns simulacije (C).

4.7. Testiranje aktivnosti mutanata proteina SCO6735 na DNA i na proteinskim supstratima

Kako bi se i eksperimentalno potvrdila važnost aminokiselina koje sudjeluju u vezanju supstrata i katalizi, napravljena je mjesno-specifična mutageneza kojom su određene aminokiseline zamijenjene aminokiselinama sličnih kemijskih svojstava. Cilj svake uvedene mutacije bio je dokidanje važne interakcije ostvarene sa supstratom tijekom MD simulacija. Mutanti proteina su prekomjerno eksprimirani i pročišćeni metodom afinitetne kromatografije. Prinos i čistoća uzoraka gotovo svih mutiranih proteina usporedivi su s uzorkom divljeg tipa i prikazani na slici D1 u dodatku. Značajna razlika primijećena je prilikom pročišćavanja mutanta H24Y, čiji su čistoća i prinos znatno narušeni u odnosu na divlji tip.

Očuvanost trodimenzionalne strukture mutiranih proteina provjerena je metodom cirkularnog dikroizma (CD), pri čemu je praćen signal u rasponu od 160 do 290 nm kako bi se dobila informacija o zastupljenosti pojedinih sekundarnih struktura. Dobiveni spektri preklapljeni su sa spektrom divljeg tipa proteina (slika 24C). Budući da CD analiza sekundarne strukture proteina zahtijeva visoku čistoću uzoraka (>90 %), uzorak mutiranog proteina H24Y dobiven afinitetnom kromatografijom dodatno je pročišćen gel-filtracijskom kromatografijom kako je prikazano na slici D2 u dodatku. Hidrolitička aktivnost divljeg tipa i mutanata proteina SCO6735 testirana je na DNA oligonuklotidima prethodno ADP-riboziliranima toksinom DarT iz bakterije *T. aquaticus*.

Budući da je Gln85 pokazao zanimljiva svojstva tijekom simulacije MD te se nalazi na ekvivalentnoj poziciji kao katalitički lizini u TaDarG i HsTARG1 (slika 12B) napravljena su njegova dva mutanta, Q85A i Q85E. Mutacijom u Ala su se nastojale ukloniti sve vodikove veze sa supstratom i susjednim aminokiselinama, dok je mutacija u Glu trebala provjeriti postoji li nekakav doprinos pozitivnog naboja amino skupine Gln85 u katalizi. Oba mutanta Gln85 dovela su do značajne promjene u aktivnosti enzima – Q85A je doveo do potpunog gubitka aktivnosti, dok je Q85E gotovo u potpunosti izgubio aktivnost (slika 24A, linije 9 i 10). Kao što je vidljivo na slici 24C (tamno plava i smeđa linija) CD spektri oba mutanta se dobro preklapaju sa spektrom divljeg tipa proteina, što ukazuje da navedene mutacije nisu dovele do značajnih promjena u zastupljenosti sekundarnih struktura proteina.

Kako bi se bolje istražila uloga Asn27 s kojim Gln85 ostvaruje stabilnu vodikovu vezu, ova je aminokiselina zamijenjena serinom. Cilj ove mutacije je onemogućiti Asn27 da istovremeno ostvaruje stabilne vodikove veze sa susjednim Leu29 i Gln85 (kako je prikazano na slici 22A), što bi posljedično, trebalo osigurati i veću fleksibilnost Gln85. Kao što je vidljivo na slici 24A, linija 5, navedena mutacija je dovela do značajnog gubitka aktivnosti, dok je trodimenzionalna struktura proteina ostala očuvana (slika 24C, ružičasta linija).

U objavljenom radu iz 2016. godine je pokazano da je Gly128 očuvan u svim SCO6735 homolozima ⁷ te je stoga napravljena njegova mutacija u Glu. Pokazano je da ta mutacija dovodi do značajnog gubitka aktivnosti na proteinskom supstratu, a u okviru ovog doktorskog rada istražena je njegova aktivnost na oligo DNA supstratu. I u ovom slučaju primijećeno je smanjenje enzimske aktivnosti, i to za ~70% u odnosu na divlji tip proteina (slika 24A, linija 11).

Kako je već rečeno, aktivno mjesto proteina SCO6735 u direktnoj blizini reakcijskog centra ne posjeduje niti jednu aminokiselinu koja ima očiti katalitički potencijal. No, tijekom simulacija je primijećeno je da His24, koji ima katalitički potencijal, povremeno ostvaruje vodom-posredovanu vodikovu vezu sa supstratom. Navedeni histidin utisnut je duboko u aktivno mjesto proteina te ostvaruje stabilne vodikove veze i π - π interakcije sa susjednim Tyr51 i Trp32. Iako His24 ima važnu ulogu u stabilizaciji srži proteina, istražena je njegova potencijalna uloga u enzimskoj katalizi. Zamijenjen je aminokiselinom Tyr čime su se nastojale sačuvati π - π interakcije unutar srži proteina, a ukloniti mogućnost stvaranja vodom-posredovane vodikove veze sa supstratom. Navedena mutacija dovela je do potpunog gubitka aktivnosti enzima (slika 24A, linija 4). No, usporedba CD spektra mutanta sa spektrom divljeg tipa (slika 24C, crvena linija) pokazala je značajno narušavanje trodimenzionalne strukture mutiranog proteina.

S obzirom da je za enzimsku aktivnost HsTARG1 i TaDarG najbitniji Lys (Lys80, odnosno Lys84) koji je u SCO6735 zamijenjen s Gln85, istražen je utjecaj mutacije dvaju drugih Lys koji se nalaze na fleksibilnoj (Lys89) i supstrat-vezujućoj petlji (Lys34) (slika 21). Analiza simulacija MD pokazala je da navedeni Lys često fluktuiraju prema i od aktivnog mjesta, pri čemu Lys89 ostvaruje stabilnu interakciju s difosfatom u slučaju pripadnog supstrata (52 % simulacijskog vremena), dok Lys34 uglavnom ulazi u interakciju s terminalnim fosfatom (8 % simulacijskog vremena). Zamjena niti jednog od navedenih lizina glutamatom nije dovela do potpunog gubitka aktivnosti. Mutacija K89E umanjila je aktivnost enzima, za ~ 45 % dok je mutacija K34E dovela do nešto značajnijeg gubitka enzimske aktivnosti za ~ 85 % (slika 24A, linije 6 i 7). S druge strane,

dvostruki mutant K34/89E doveo je do potpunog gubitka aktivnosti enzima (slika 24A, linija 8). Analiza CD spektara potvrdila je očuvanost trodimenzionalne strukture navedenih mutanta (slika 24C, svijetlo plava i zelena linija).

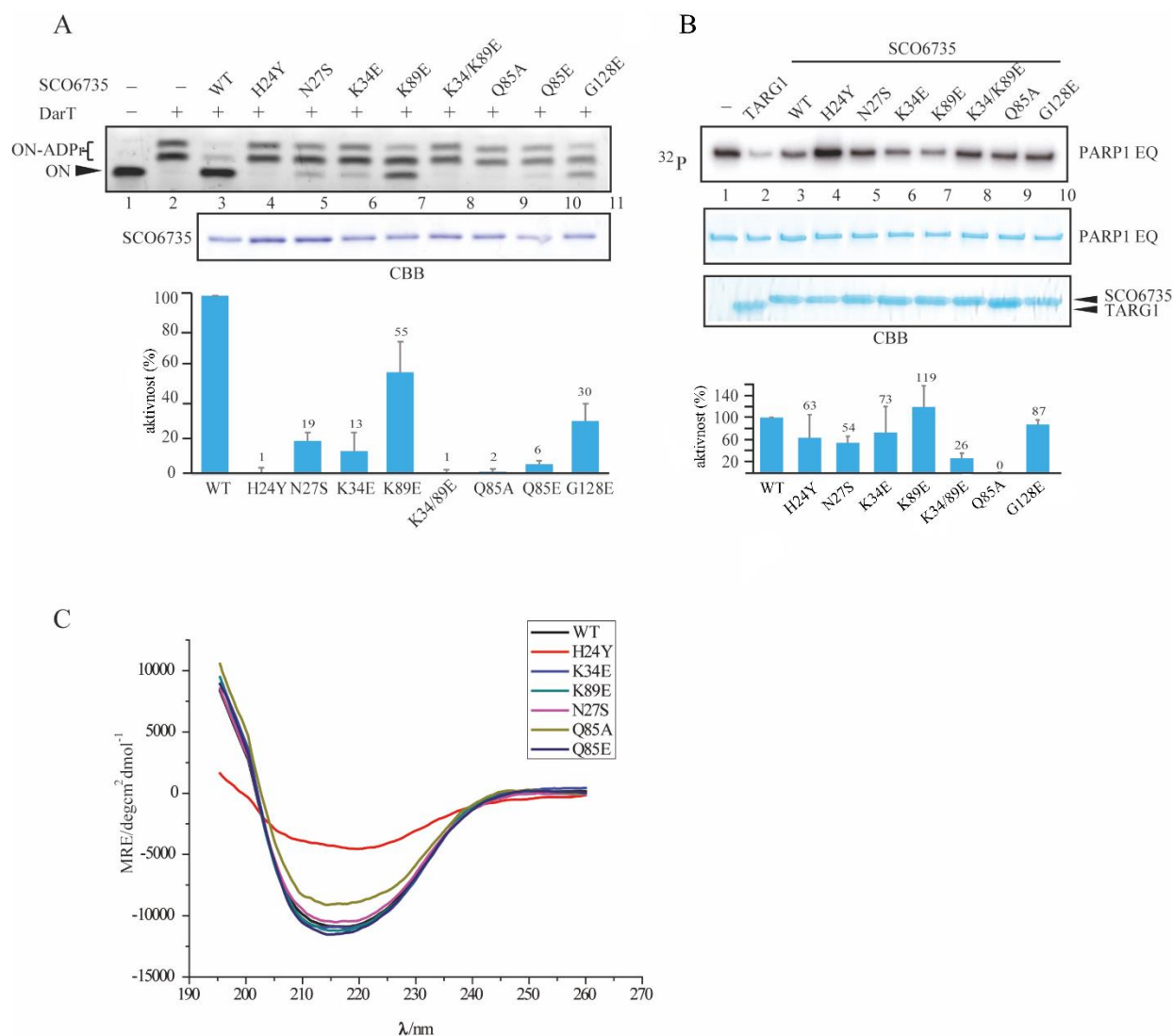
Provjereno je i imaju li uvedene mutacije isti utjecaj na enzimsku reakciju uklanjanja ADPr s proteinskog supstrata. U tu svrhu je kao supstrat korišten [³²P]ADPr-PARP E988Q mutirani protein, koji se automodificira na Glu. Rezultati prikazani na slici 24B pokazuju da je, kao i u slučaju s DNA supstratom, najveći gubitak aktivnosti zabilježen kod mutanta Q85A. Mutacija Asn26 u Ser, smanjila je aktivnost na proteinskom supstratu za pola u odnosu na divlji tip, dok mutacija visoko očuvanog Gly128 ima puno manji učinak na enzimsku aktivnost na proteinskom supstratu – naime, u ovom se slučaju aktivnost proteina smanjila samo za 13 %. Najveći obrat može se primijetiti u utjecaju pojedinačne zamjene Lys34 i Lys89 glutamatom na enzimsku aktivnost. U slučaju proteinskog supstrata mutacija Lys89 je čak dovela do povećanja enzimske aktivnosti u odnosu na divlji tip, dok je u slučaju mutacije Lys34 aktivnost pala samo za 27 % (slika 24B).

Kako bi se smanjene aktivnosti mutanta objasnile i na molekularnoj razini provedena je simulacija mutanata N27S, K34/89E, Q85A i G128E. U izradi njihovih kompleksa s pripadnim supstratom korištena je početna struktura SCO6735:dT-ADPr kompleksa kojem su navedene mutacije uvedene u programu *Maestro*. Rezultati simulacija pokazuju najveću promjenu u pozicioniranju supstrata kod mutanata Q85A i K34/89E (slika 25A) koji su i eksperimentalno pokazali potpuni gubitak enzimske aktivnosti. Na slici 25B prikazan je RMSD graf dobiven uspoređivanjem konformacija supstrata tijekom simulacije u kompleksu s mutiranim proteinom, sa stabilnom konformacijom u kompleksu s divljim tipom SCO6735. Vrijednosti RMSD za supstrat u aktivnom mjestu mutanta K34/89E pokazuju da mu je konformacija promijenjena čak za 3 Å (roza linija), dok je u kompleksu s Q85A primijećena značajna nestabilnost supstrata koja pred kraj simulacije (pri ~ 160 ns) rezultira strukturom koja se razlikuje čak za 4,5 Å od one u aktivnom mjestu divljeg tipa (žuta linija) proteina.

Kod mutanta N27S glavne podstrukture supstrata su gotovo jednako orijentirane kao i u kompleksu s divljim tipom (slika 25A). Glavna razlika primjećuje se u pozicioniranju distalne riboze koja u ovom slučaju preko hidroksilne skupine ostvaruje vodikovu vezu s Gln85 u 50 % trajektorije, dok Gln85 ostvaruje stabilnu vodikovu vezu sa Ser27 (70 % trajektorije). Budući da

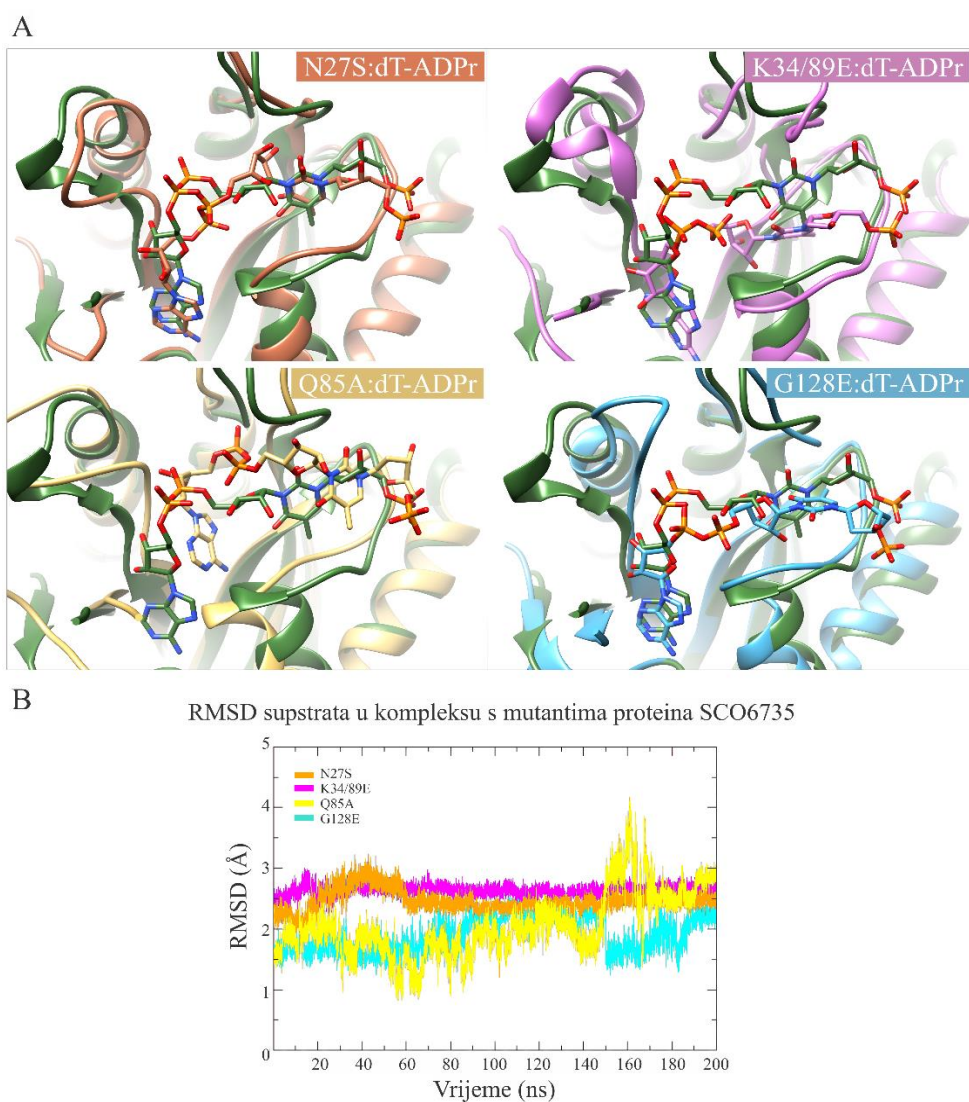
Ser ne može u isto vrijeme ostvariti vodikovu vezu sa Gln85 i okosnicom susjednog Leu29, puno je fleksibilniji od zamijenjenog Asn, čime dolazi i do očekivane veće fleksibilnosti Gln85.

Mutacija G128E smanjuje broj vodikovih veza koje difosfat ostvaruje s fosfat-vezujućom petljom, čime dolazi do njegove dispoziције. Samim time mijenja se pozicioniranje distalne riboze i timina, koji su potpuno drugačije orijentirani nego u kompleksu supstrata s divljim tipom SCO6735 (slika 25 A).



Slika 24. Test aktivnosti mutiranih proteina SCO6735 na ssDNA (ADPr-ON) i proteinskom supstratu. Test aktivnosti mutanata proteina SCO6735 na ADPr-ON (A). DNA oligonukleotidi su prethodno modificirani djelovanjem toksina TaDarT. Produkti reakcije analizirani su elektroforezom na poliakrilamidnom urea gelu te vizualizirani bojom SYBR™ Gold. Ispod je

prikazana analiza 30 μL svakog mutanta proteina SCO6735 na poliakrilamidnom gelu s ciljem usporedbe količine pojedinog mutanta u pripremljenim uzorcima. Testiranje aktivnosti mutanata proteina SCO6735 na $[^{32}\text{P}]\text{ADPr}$ -PARP E988Q mutiranom proteinu, koji se automodificira na bočnim ograncima Glu u prisutnosti radioaktivno obilježenog kofaktora $[^{32}\text{P}]\text{NAD}$ (B). Produkti reakcije vizualizirani su na poliakrilamidnom-gelu autoradiografski. Ispod se nalazi isti poliakrilamidni gel obojan CBB. Koncentracija svih mutanata proteina SCO6735 iznosila je $0,1 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Postotak aktivnosti pojedinih mutanta izračunat je pomoću programa ImageJ mjerenjem intenziteta piksela. Analiza očuvanosti trodimenzionalne strukture mutanata proteina SCO6735 metodom cirkularnog dikroizma (C).



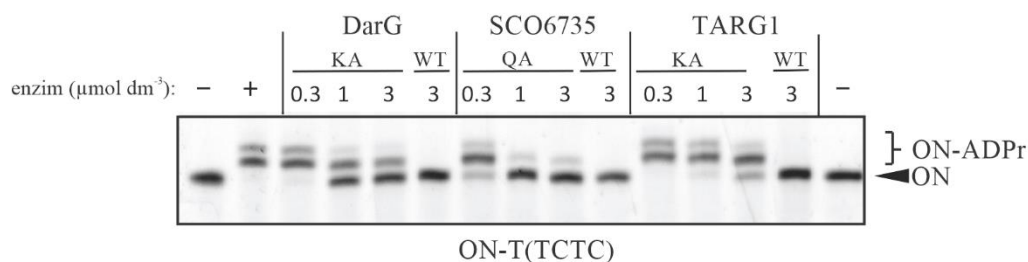
Slika 25. Pozicioniranje pripadnog supstrata (dT-ADPr) u aktivnom mjestu mutanata proteina SCO6735. Preklopljena konformacija supstrata dT-ADPr u kompleksu s divljim tipom proteina

SCO6735 (zeleno) i u kompleksu s mutantima: N27S (narančasto), K34/89E (ružičasto), Q85A (žuto) i G128E (plavo), nakon 200 ns simulacije (A). RMSD atoma pripadnog supstrata u aktivnom mjestu mutiranih proteina (B). Kao referentna struktura supstrata uzeta je njegova stabilna konformacija uspostavljena nakon 100 ns simulacije u kompleksu s divljim tipom proteina SCO6735.

4.8. Testiranje inhibicije toksina DarT interakcijom s proteinom SCO6735

Poznato je da uz skidanje ADP-ribozilacije s timina, DarG može smanjiti djelovanje proteina DarT kontaktnom inhibicijom²⁷ te da je samo C-terminalna domena proteina DarG dovoljna da neutralizira toksično djelovanje DarT *in vivo*⁸⁷. Stoga je provjereno smanjuje li se aktivnost toksina TaDarT i prilikom same interakcije s proteinima SCO6735 i HsTARG1. Prilikom testiranja kontaktne inhibicije korišteni su njihovi katalitički mutanti kako bi detektirano smanjenje ADP-ribozilacije uistinu bilo produkt kontaktne inhibicije, a ne enzimskog uklanjanja ADPr s oligonukleotida.

U reakcijsku smjesu koja već sadrži TaDarT su u isto vrijeme dodani katalitički mutanti hidrolaza SCO6735, TaDarG i HsTARG1 te oligonukleotidi u suvišku. Reakcije su inkubirane jedan sat pri 30 °C, a reakcijski produkti su potom analizirani na poliakrilamidnom urea gelu (slika 26). Kao negativna kontrola poslužio je samo oligonukleotid, dok je pozitivna kontrola bio oligonukleotid modificiran toksinom TaDarT bez dodanih hidrolaza. Dobiveni rezultati pokazuju da sve tri hidrolaze kontaktnom inhibicijom smanjuju aktivnost toksina TaDarT. No, najveća inhibicija primijećena je dodatkom proteina SCO6735. Naime, SCO6735 može djelomično inhibirati aktivnost TaDarT i kad se u reakcijskoj smjesi nalaze u omjeru 1:1. U slučaju kad je proteina SCO6735 tri puta više od TaDarT postiže se skoro potpuna inhibicija toksina (slika 26, linije 7 - 10). HsTARG1 je pokazao najmanju inhibiciju interakcijom. Čak i u slučaju kad je koncentracija proteina HsTARG1 10 puta viša od koncentracije TaDarT nije zabilježena značajnija inhibicija aktivnosti toksina (slika 26, linije 11 - 14).



Slika 26. Usporedba inhibicije aktivnosti toksina TaDarT interakcijom s proteinima TaDarG, SCO6735 i HsTARG1. Korištene su tri različite koncentracije katalitičkih mutanata hidrolaza: 0,3, 1 i 3 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, dok je koncentracija divljeg tipa proteina (koji je služio kao kontrola) iznosila 3 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Koncentracija dodanog oligonukleotida je iznosila 0,5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Reakcija je inkubirana 60 minuta pri 30 °C, a dobiveni produkti su razdvojeni na poliakrilamidnom urea gelu te vizualizirani pomoću SYBR™ Gold boje.

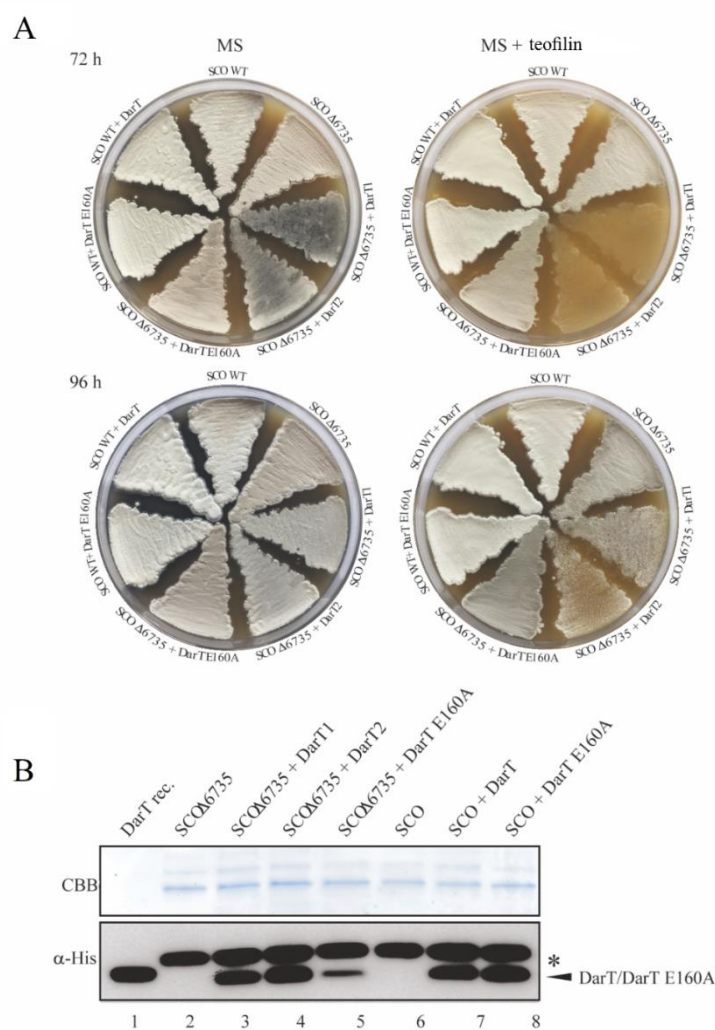
4.9. Aktivnost proteina SCO6735 *in vivo* u stanicama bakterije *S. coelicolor*

U svrhu testiranja fiziološke uloge proteina SCO6735 u bakteriji *S. coelicolor* priređen je soj u kojemu je gen koji kodira za ovaj protein uklonjen (nazvan SCO Δ 6735). Uz njega su još priređeni divlji soj i SCO Δ 6735 sojevi koji sadrže gen za TaDarT ili inaktivni TaDarT mutant E160A pod *riboswitch* kontrolom koja se regulira dodavanjem teofilina. Rast navedenih sojeva praćen je na krutoj MS podlozi 96 sati te u tekućoj CRM podlozi 110 sati.

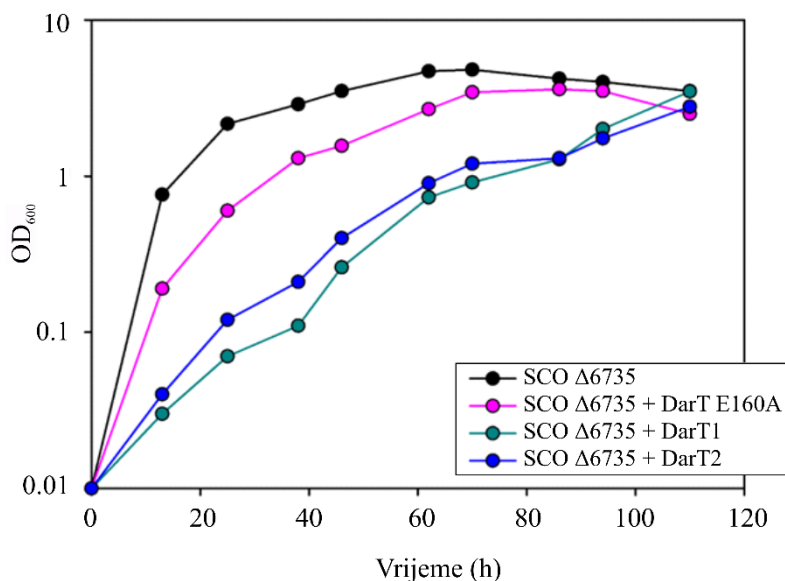
Uzgojem na krutoj podlozi SCO Δ 6735 sojevi koji nose gen za TaDarT pokazuju usporeni rast nakon 72 sata u odnosu na ostale sojeve koji ne sadrže TaDarT i tek nakon 96 sati počinju sporulirati (slika 27A, desno). Plavo obojenje podloge ispod soja SCO Δ 6735 koji nosi gen za TaDarT ukazuje da, i bez indukcije teofilinom, dolazi do bazalne ekspresije toksina što predstavlja stresne uvjete i dovodi do proizvodnje antibiotika aktinorodina. Učinak usporavanja rasta nije primijećen u divljem soju (koji sadrži SCO6735), niti u sojevima koji su eksprimirali mutirani toksin TaDarT E160A.

Kako bi se potvrdila prisutnost rekombinantnog proteina TaDarT ili njegovog mutanta E160A iz tekuće kulture bakterija *S. coelicolor* je nakon 24 sati indukcije teofilinom izoliran ukupni proteinski ekstrakt, koji je zatim pročišćen na TALON agarozu. Time su izdvojeni samo proteini obilježeni histidinskim privjeskom. Dobiveni uzorci su zatim analizirani Western blot analizom, a kao što je vidljivo na slici 27B, svaka bakterijska kultura koja je nosila gen za TaDarT ili njegov mutant ga je i ekspimirala.

Rast sojeva SCO Δ 6735 i SCO Δ 6735 koji sadrži gen za TaDarT ili njegov katalitički mutant E160A praćen je i u tekućoj kulturi (slika 28). U svrhu provjere reproducibilnosti istovremeno su uzgajane dvije zasebne kolonije soja SCO Δ 6735 koje nose gen za toksin TaDarT. Kao i na krutoj podlozi, primijećen je sporiji rast sojeva koji ekspimiraju katalitički aktivni TaDarT (plava i zelena linija). Kod soja SCO Δ 6735 TaDarT E160A također je vidljiv nešto sporiji rast (ružičasta linija), ali njegova krivulja rasta prati skoro isti trend primijećen i kod SCO Δ 6735 koji ne nosi gen za TaDarT (crna linija). Zanimljivo je da i u ovom slučaju nakon približno 100 sati rasta sojevi SCO Δ 6735 koji nose gen za TaDarT dosežu optičku gustoću primijećenu kod sojeva koji toksin ne ekspimiraju. Nešto sporiji rast soja SCO Δ 6735 TaDarT E160A u odnosu na divlji soj pokazuje da ovaj mutant nije potpuno neaktivan.



Slika 27. Učinak uklanjanja gena SCO6735 i ekspresije toksina TaDarT na rast bakterije *S. coelicolor*. Divlji tip *S. coelicolor* te SCO Δ 6735 soj koji sadrži gene za TaDarT i TaDarT inaktivni mutant E160A uzgajani su na MS podlozi sa ili bez dodatka 4 mmol dm⁻³ teofilina koji inducira ekspresiju toksina (A). Njihov rast je praćen 96 sati. Western blot analiza ukupnih staničnih proteina *S. coelicolor* obogaćenih proteinima koji nose histidinski privjesak (B). Identični uzorci su nanoseni paralelno na dva SDS-PAGE gela. Jedan je gel obojan CBB bojom u svrhu kontrole, dok je drugi analiziran metodom Western blot pri čemu su korištena anti-His antitijela. Zvezdicom je označen pozadinski signal prisutan u svim uzorcima.



Slika 28. Krivulje rasta sojeva bakterije *S. coelicolor* kojima je uklonjen gen za protein SCO6735, a sadrže gen za toksin TaDarT ili njegov katalitički mutant E160A. Sojevi su uzgajani 110 sati u tekućem CRM mediju uz dodatak 4 mmol dm^{-3} teofilina čime je inducirana ekspresija toksina TaDarT ili njegovog katalitičkog mutanta. Alikvoti tekuće kulture su uzimani u vremenskim intervalima naznačenima na grafu te im je izmjerena optička gustoća pri 600 nm. Paralelno je napravljen uzgoj dva neovisna soja koji sadrže gen za toksin TaDarT (SCO Δ 6735 DarT1 / T2).

Rezultati istraživanja na makrodomeni (Mac1) virusa SARS-CoV-2

4.10. Određivanje uloga pojedinih aminokiselina u vezanju supstrata na temelju rezultata simulacija MD

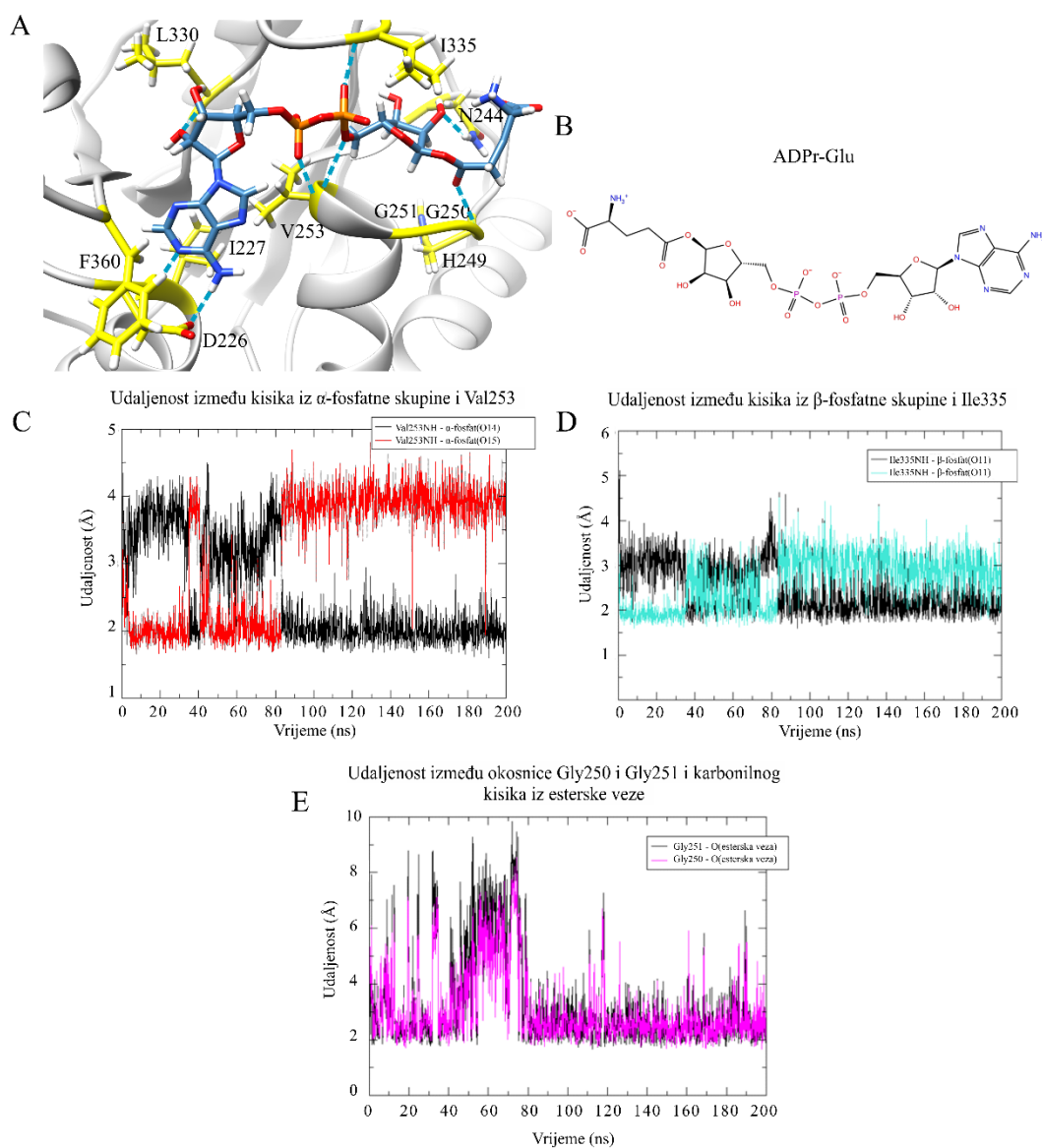
Do sada je riješen veliki broj kristalnih struktura virusne SARS-CoV-2 makrodome Mac1 u različitim kompleksima: s ADPr^{10,12,13,88}, potencijalnim inhibitorima¹⁰ te s različitim fragmenatima malih molekula¹⁵. Sve je to omogućilo bolje razumijevanja aktivnog mjesta te interakcija bitnih za vezanje produkta (ADPr). Kristalne strukture su također istaknule važnost molekula vode u pravilnom vezanju ADPr^{13,14}.

Kako bi se bolje proučile interakcije koje se ostvaruju sa supstratom te aminokiseline koje bi potencijalno mogle sudjelovati u enzimskoj katalizi, provedene su simulacije MD virusne makrodome u kompleksu s ADPr vezanom na Glu (Glu-ADPr). Supstrat je izgrađen *in silico*, a njegova 2D struktura prikazana je na slici 29B. Za račun uklapanja Glu-ADPr korištena je kristalna struktura virusne makrodome Mac1 riješene u kompleksu s ADPr (PDB: 6W02). Nakon računa uklapanja supstrata, u aktivnom mjestu su zadržane molekule vode koje su se pokazale važnima za pozicioniranje ADPr¹³. Bodovi vrednovanja molekulskog uklapanja za supstrat Glu-ADPr iznosili su $-7,8 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Kao i u slučaju s proteinom SCO6735, provedene su i simulacije molekulske dinamike kompleksa s ADPr, kao i samog proteina (apoproteina), kako bi se lakše mogla odrediti važnost pojedinih interakcija primijećenih prilikom analize simulacija. Budući da su prilikom analize simulacije Mac1:ADPr kompleksa primijećene gotovo sve interakcije opisane u dosad objavljenim publikacijama, tijekom analize je naglasak stavljen na interakcije koje se ostvaruju s pripadnim supstratom (Glu-ADPr), pošto kristalna struktura takvog kompleksa ne može biti riješena.

Analiza trajektorije Mac1:Glu-ADPr kompleksa je pokazala da najstabilnije interakcije s aktivnim mjestom tijekom 200 ns simulacije ostvaruje difosfat. Čak u 80 % simulacijskog vremena atomi kisika β -fosfatne skupine ostvaruju vodikovu vezu s Ile335, dok u 75 % simulacijskog vremena atomi kisika α -fosfatne skupine ostvaruju stabilnu vodikovu vezu s okosnicom Val253 (slika 29A, C i D). Sljedeće najstabilnije vodikove veze su s Gly251 i Gly250 koji preko proteinske okosnice ostvaruju vodikovu vezu s karbonilnim kisikom iz esterske veze između ADPr i

modificiranog Glu (slika 29A i E). Adeninski prsten stabiliziran je π - π interakcijama naslagivanja s Phe360 te vodikovim vezama s okosnicom Phe360 i Asp226 (slika 29A). Proteinska okosnica Leu330 ostvaruje prilično stabilnu vodikovu vezu s proksimalnom ribozom u 18 % trajektorije, dok Asn244 stabilizira distalnu ribozu ostvarujući vodikovu vezu s hidroksilnom skupinom tijekom 15 % simulacijskog vremena (slika 29A).



Slika 29. Glavne interakcije između supstrata Glu-ADPr i aktivnog mjesta makrodomene Mac1 virusa SARS-CoV-2 koje se ostvaruju tijekom 200 ns simulacije kompleksa. Aminokiseline aktivnog mjesta makrodomene Mac1 koje ostvaruju vodikove veze s Glu-ADPr (A). Prikazane su interakcije koje se ostvaruju u više od 20 % simulacijskog vremena. Vodikove veze prikazane

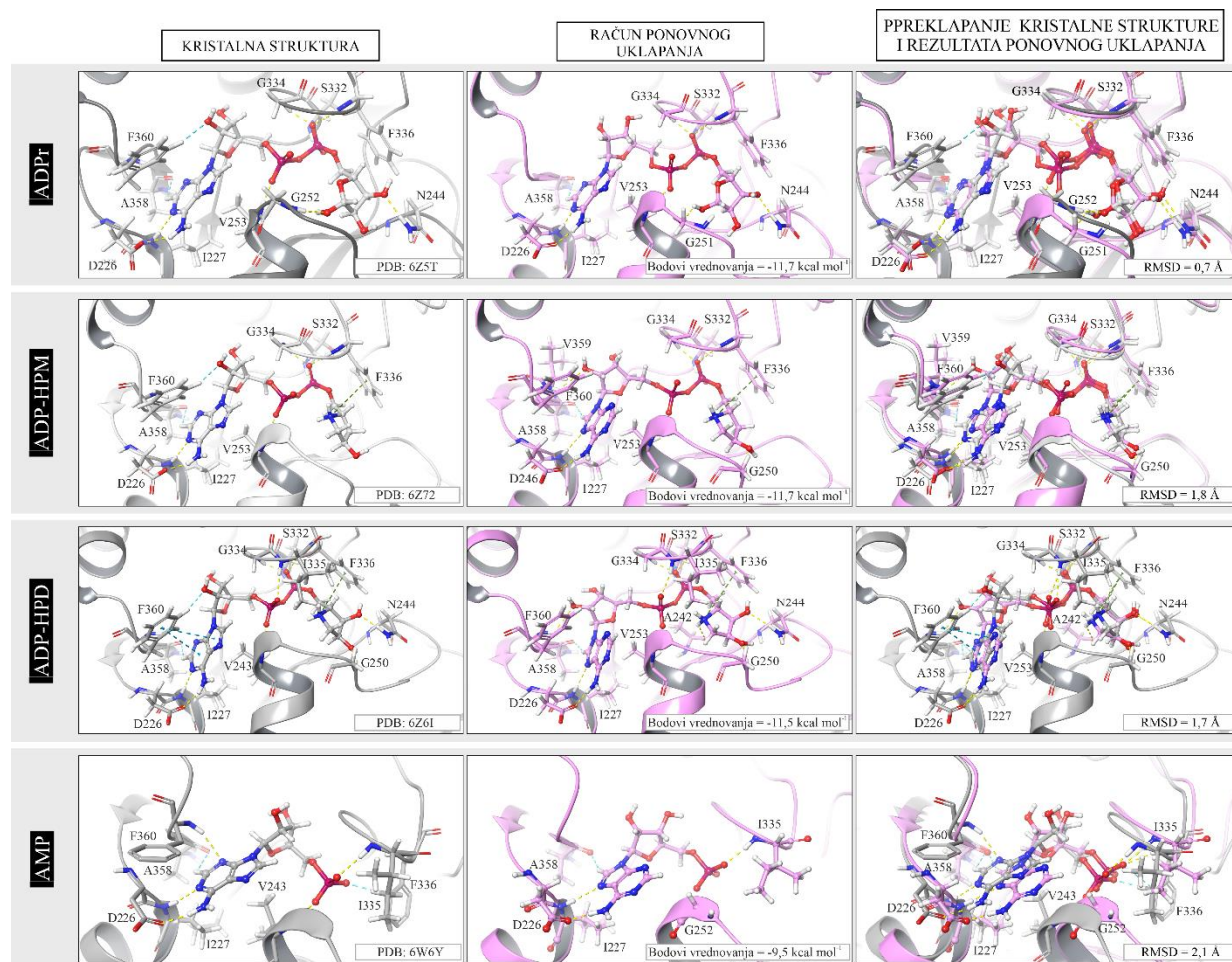
su plavim isprekidanim linijama. 2D struktura supstrata Glu-ADPr (B). Grafički prikaz udaljenosti između kisika α -fosfatne skupine supstrata i okosnice Val253 mjerene tijekom 200 ns simulacije (C), kisika β -fosfatne skupine supstrata i okosnice Ile335 (D) te Gly250 i Gly251 i karbonilnog kisika iz esterske veze (E).

4.11. Odabir i postavljanje receptorske rešetke makrodomene Mac1 koja će se koristiti za virtualno pretraživanje metodom molekuskog uklapanja

Prije samog virtualnog pretraživanja baze malih molekula metodom molekuskog uklapanja važno je odabrati odgovarajuću kristalnu strukturu proteina, točnije konformaciju njegovog aktivnog mjesta te ispravno postaviti parametre rešetke, kako bi molekulsko uklapanje bilo što uspješnije. U tu svrhu napravljen je račun ponovnog molekuskog uklapanja. Pri tome je korišteno nekoliko do tada riješenih kristalnih struktura virusne makrodomene Mac1 u kompleksu s produktom (PDB: 6W02), AMP (PDB: 6W6Y) i dva inhibitora srodnog proteina PARG - ADP-HPD i ADP-HPM (PDB: 6Z6I i 6Z72). Sve četiri kristalne strukture proteina pripremljene su potprogramom *ProteinPreparation Wizard*, dok su ligandi pripremljeni potprogramom *Ligprep*. Prilikom pripreme rešetke za uklapanje korištena su različita ograničenja u vidu definiranja nekih interakcije koje se moraju ostvariti, uključivanja molekula vode u aktivno mjesto ili definiranja volumena aktivnog mjesta koje se mora popuniti ili izbjeći prilikom vezanja liganda. Ponovnim uklapanjem ADPr, AMP i ADP-HPD i ADP-HPM najbolji rezultati su dobiveni korištenjem rešetke generirane na temelju kristalne strukture kompleksa Mac1:ADP-HPD (PDB: 6Z6I) prilikom čije pripreme nisu uključena nikakva ograničenja (slika 30) (rezultati uklapanja u ostale kristalne rešetke nisu prikazani). Ova rešetka najbolje je reproducirala konformaciju liganada i interakcije primijećene u kristalnoj strukturi s makrodomenom Mac1. Na slici 30 prikazane su interakcije koje ligandi ostvaruju s Mac1 u kristalnoj strukturi (prvi stupac) nakon računa ponovnog molekuskog uklapanja (drugi stupac) te njihov prijeklop zajedno s izračunatim RMSD vrijednostima (treći stupac). Izračunate RMSD vrijednosti su iznosile: 0,7 Å za ADPr, 1,7 Å za ADP-HPD, 1,8 Å za ADP-HPM i 2,1 Å za AMP. Kao što je vidljivo na slici 30, prema bodovima molekuskog uklapanja ($-11,7 \text{ kcal mol}^{-1}$), RMSD vrijednosti i ostvarenim interakcijama najuspješnije je bilo

ponovno uklapanje ADPr. Ostvarene su gotovo sve interakcije primijećene u kristalnoj strukturi, osim vodikove veze između proksimalne riboze i Phe360. Najveće razlike u usporedbi s kristalnom strukturom primijećene su prilikom pozicioniranja AMP. Njegovo je uklapanje rezultiralo najlošijim bodovima vrednovanja ($-9,5 \text{ kcal mol}^{-1}$). Iako su ostale interakcije sa susjednim aminokiselinama prilično dobro očuvane, viši iznos RMSD vrijednosti dobiven prilikom usporedbe s kristalnom strukturom proizlazi iz drugačije orijentacije adenina. Konformacija liganda ADP-HPD i ADP-HPM bila je odlično reproducirana, kao i njihove interakcije s Mac1 primijećene u kristalnoj strukturi.

Budući da je najviši iznos bodova vrednovanja molekuskog uklapanja iznosio $-9,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ (izračunat prilikom uklapanja AMP-a) odlučeno je da će prilikom analiziranja uklapanja ostalih liganda gornja granica biti $\sim -7,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ te da ligandi s višim iznosom bodova vrednovanja neće biti uzeti u obzir za daljnju analizu.



Slika 30. Usporedba kristalnih struktura makrodomene Mac1 virusa SARS-CoV-2 u kompleksu s ADPr (PDB: 6Z5T), ADP-HPM (PDB: 6Z72), ADP-HPD (PDB: 6Z6I) i AMP (PDB: 6W6Y) s rezultatima njihovog ponovnog molekuskog uklapanja. Vodikove veze su prikazane žutom bojom, dok su π - π interakcije naslagivanja i ionski mostovi prikazani plavim isprekidanim linijama.

4.12. Rezultati virtualnog pretraživanja baze malih molekula

Ligandi korišteni za virtualno pretraživanje baze malih molekula su pohranjeni s mrežno dostupnih biblioteka: ZINC⁷³, Drugbank^{74,75}. Pri tome su u obzir uzeti samo oni spojevi koji su komercijalno dostupni. Kako bi se pronašli spojevi koji se što bolje mogu vezati u aktivno mjesto virusne makrodomene Mac1 korištena su dva pristupa:

(1) Pretraživanje na temelju sličnosti molekula s poznatim ligandima, pri čemu je korištena opcija usporedbe farmakofora u programu *Maestro*. Kao što je detaljnije opisano u poglavlju 2.8.3 farmakofor predstavlja opis kemijskih karakteristika i ključnih reakcijskih centara koji su nužni za molekulsko prepoznavanje liganda od strane bioloških makromolekula. Navedena metoda pretrage uspoređuje sve pohranjene spojeve sa referentnima, te ih rangira po sličnosti, a korištena je u dva slučaja. Prvi put je korištena prije pretraživanja molekulskim uklapanjem, pri čemu je pretraga napravljena na temelju farmakofora ADPr te liganda ADP-HPD i ADP-HPM koji su se relativno dobro vezali u aktivno mjesto, iako nisu pokazali značajnu inhibiciju aktivnosti makrodomene Mac1. Na ovaj način su „filtrirani“ spojevi koji strukturno i kemijski nalikuju ligandima koji se vežu u aktivno mjesto Mac1 te je znatno smanjen broj liganada koji će kasnije ući u račun molekulskog uklapanja programom *Glide*. Kao granična vrijednost odabrana je mjera sličnosti viša od 0,5.

Drugi slučaj u kojem je korištena ova metoda je nakon mjerenja afiniteta vezanja spojeva metodom ITC. Naime, kada bi se izmjerilo dobro vezanje nekih od naručenih spojeva, oni bi poslužili kao referentne strukture za ponovno pretraživanje baze malih molekula. Kao granična vrijednost i u ovom slučaju je odabrana sličnost veća od 0,5. Spojevi koji su bili u skladu s navedenim kriterijem dalje su istraženi metodom molekulskog uklapanja. Ovim postupkom je pronađeno 5 novih spojeva sličnih Dasatinibu koji je pokazao dobro vezanje prilikom ITC mjerenja.

(2) Drugi tip virtualnog pretraživanja uključivao je metodu molekulskog uklapanja programom *Glide*. Pretraživanje je u svrhu provjere napravljeno dva puta. Prvi put nakon pretraživanja na temelju farmakofora, pri čemu su korišteni samo oni spojevi čija je sličnost u strukturi i kemijskim obilježjima s poznatim ligandima bila više od 0,5. Pri tome je korištena *Standard Precision* metoda molekulskog uklapanja. Iako je pretraživanje na temelju oblika, nakon čega slijedi molekulsko uklapanje puno brže od uklapanja svih malih molekula unutar neke baze, onemogućava pronalazak liganda koji nisu oblikom slični poznatim ligandima, a dobro se vežu u aktivno mjesto. Kako bi se dobio raznovrsniji skup liganda te napravila svojevrsna provjera provedeno je još jedno pretraživanje uklapanjem svih molekula u pohranjenim bazama podataka.

Prilikom analize rezultata virtualnog pretraživanja molekulskim uklapanjem i odabiranja spojeva koji će ući u sljedeći krug istraživanja korišteni su sljedeći kriteriji: bodovi vrednovanja niži od ~ -7.5 kcal mol⁻¹ te usporedba interakcija ostvarenih u aktivnom mjestu virusne makrodomene Mac1 s interakcijama koje su detektirane u kristalnoj strukturi s ADPr.

Dobivena je lista od 250 spojeva. Budući da testiranje svih 250 spojeva nije bilo izvedivo u okviru projekta i ovog doktorskog rada bilo je potrebno primijeniti još jedan kriterij kojim će se smanjiti broj inicijalnih spojeva koji će se testirati metodom ITC. U tu svrhu korišten je još jedan krug molekulskog uklapanja pomoću programa *AutodockVina*⁶⁷, koji koristi drugačiji algoritam i način vrednovanja molekulskog uklapanja od programa *Glide*. U ovom slučaju je korištena opcija fleksibilnog molekulskog uklapanja, tijekom kojeg su bile dozvoljene rotacije bočnih ogranaka Phe360, Ile335 i Phe336. Dozvoljena rotacija dvaju Phe trebala je pomoći prilikom ostvarivanja π - π interakcija naslagivanja spojeva koji imaju prstenaste strukture i time doprinijeti njihovom boljem smještanju unutar aktivnog mjesta. Rotacija Ile335 trebala je omogućiti bolje smještanje nešto većih spojeva budući da je navedeni bočni ogranak u kristalnoj strukturi djelomično zatvarao aktivno mjesto makrodomene Mac1. Ovime je odabrano 27 spojeva koji su imali najniže bodove vrednovanja i pokazali najbolji način vezanja u oba programa za molekulsko uklapanje. Predviđeni načini vezanja svih 27 spojeva prikazani su u dodatku (slika D4), dok su na slici 32 prikazani samo predviđeni načini vezanja spojeva koji su pokazali dobro vezanje u aktivno mjesto Mac1 prilikom ITC mjerenja.

Kao što je vidljivo na slici 32, uklapanje Dasatiniba programom *Glide* nije djelovalo obećavajuće. No, budući da je druga istraživačka grupa predvidjela njegovo vezanje⁸⁹, Dasatinib je također naručen te je njegovo vezanje izmjereno pomoću ITC.

ITC mjerenja pokazala su relativno dobro vezanje Dasatiniba, stoga je ponovno provedeno pretraživanje baze molekula na temelju farmakofora, pri čemu je Dasatinib poslužio kao referentna struktura. Nakon pretraživanja na temelju farmakofora spojevi sa sličnosti iznad 0,5 su ponovno testirani metodom molekulskog uklapanja. Ovo pretraživanje je rezultiralo s pet novih spojeva (Dasatinib karboksilni etil ester (Dasatinib KEE), Aurora inhibitor II, AZD 3988, PD180970 i PD166326) čije je vezanje u/na makrodomenu Mac1 također izmjereno pomoću metode ITC.

4.13. Mjerenje afiniteta vezanja spojeva metodom ITC

Rezultati ITC mjerenja omogućavaju provjeru rezultata računalnih metoda vezanih uz nekovalentne interakcije odgovorne za prepoznavanje i vezanje liganda u aktivno mjesto proteina. Dobivanjem ovih informacija omogućuje se daljnje usavršavanje i dizajniranje novih spojeva koji bi mogli ostvariti čvršće interakcije s aktivnim mjestom proteina.

Prije ITC mjerenja makrodomena Mac1 je prekomjerno eksprimirana i pročišćena metodom afinitetne kromatografije, a prinos i čistoća analizirani su metodom SDS-PAGE. Dobiveni rezultati prikazani na slici D3 u dodatku.

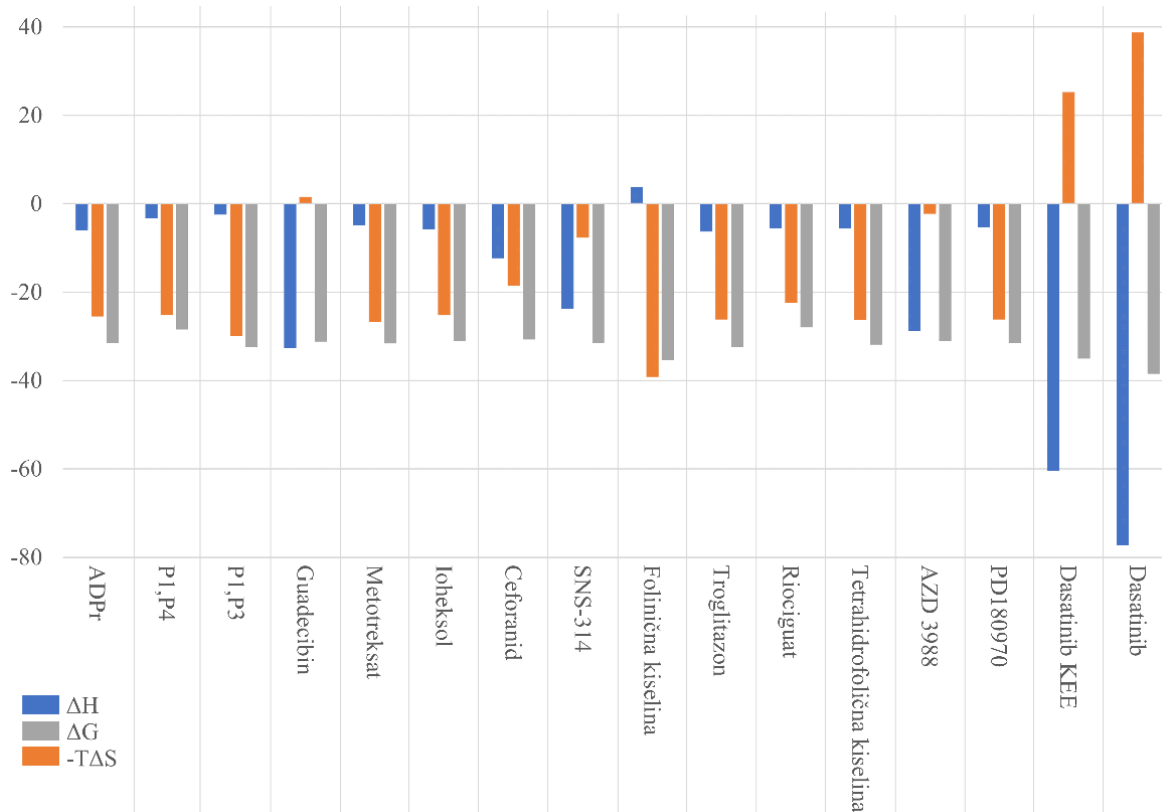
U svrhu optimizacije ITC metode, testiranje vezanja ADPr i nekoliko naručenih spojeva je provedeno pri više različitih koncentracija, pri čemu je koncentracija proteina uvijek bila za 10 puta manja od spojeva. U prvim je mjerenjima koncentracija proteina iznosila 10, a spojeva 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Pri navedenoj koncentraciji je jedino bilo moguće dobro izmjeriti vezanje ADPr, dok slabije vezanje nekih spojeva nije bilo moguće detektirati ni pri koncentraciji od 200 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (rezultati nisu prikazani). U konačnici je utvrđeno da je optimalna koncentracija spojeva 300 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, a proteina 30 $\mu\text{mol dm}^{-3}$.

Veliki problem prilikom mjerenja predstavljala je loša topivost spojeva u puferu. Naime, neki od testiranih spojeva topivi su isključivo u DMSO. Budući da previsoka koncentracija DMSO može oštetiti hidratacijsku ljusku proteina nužnu za njegovo pravilno smatanje i samim time narušiti njegovu aktivnost ⁹⁰, za manje topive spojeve je prije samog mjerenja istražena topivost pri različitim koncentracijama DMSO. Ovisno o rezultatima ispitivanja u svako je razrjeđenje pojedinih spojeva i proteina dodana minimalna moguća ista koncentracija DMSO kako primijećena promjena u toplini ne bi bila posljedica razlike u otopinama titransa i proteina.

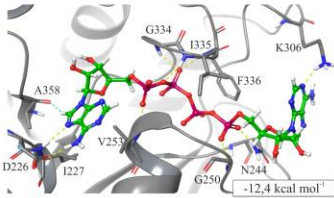
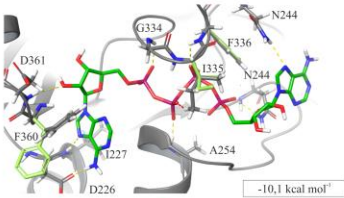
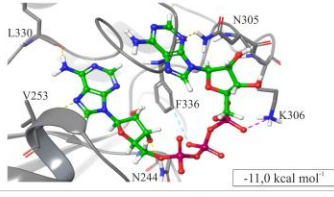
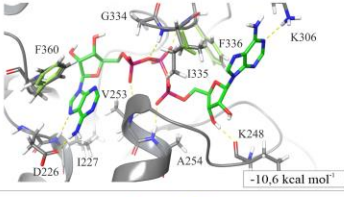
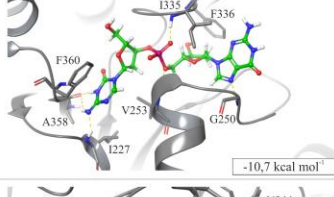
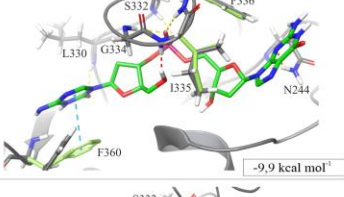
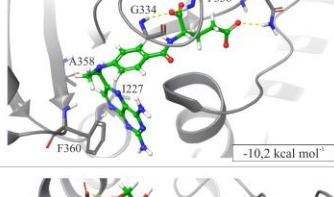
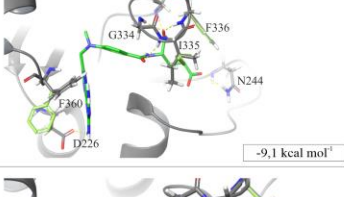
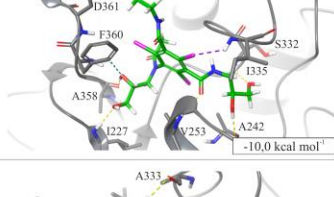
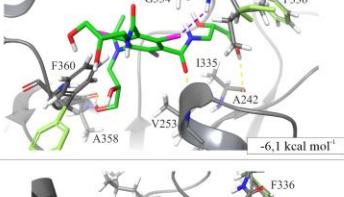
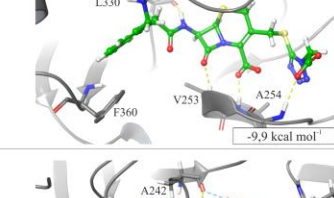
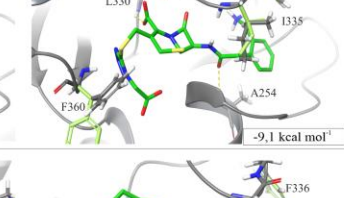
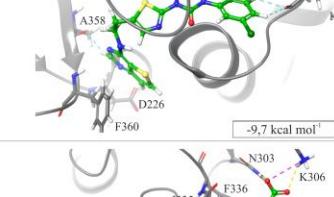
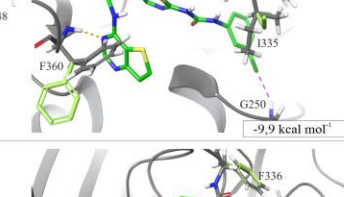
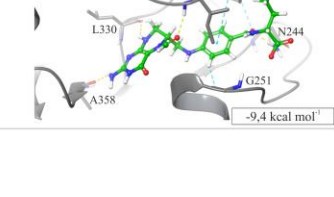
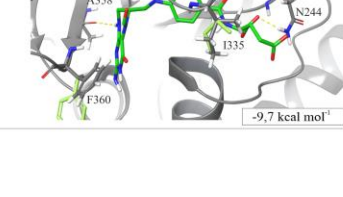
Pri navedenim uvjetima primijećeno je vezanje petnaest spojeva, dok je vezanje ostalih spojeva bilo izrazito slabo ili pak nemjerljivo zbog njihove loše topivosti. Konstanta disocijacije za ADPr iznosila je $\sim 3 \mu\text{mol dm}^{-3}$, što je u skladu s već poznatim rezultatima ⁹¹. Spojevi koji su pokazali konstantu vezanja sličnu kao i ADPr su: AZD 3988, Ceforanid, Troglitazon, Guadecibin, Iohexsol, Metotreksat, P1,P3-Di(adenozin-5') trifosfat, PD180970, SNS-314 i Tetrahidrofolična kiselina (slika 32). Većina ovih spojeva (osim AZD 3988, SNS-314 i Guadecibina) pokazuje slične doprinose entalpije i entropije kao ADPr (slika 31) što ukazuje na sličan način vezanja, tj. da se prilikom vezanja u aktivno mjesto ostvaruju slični tipovi interakcija. S druge strane, AZD 3988 i

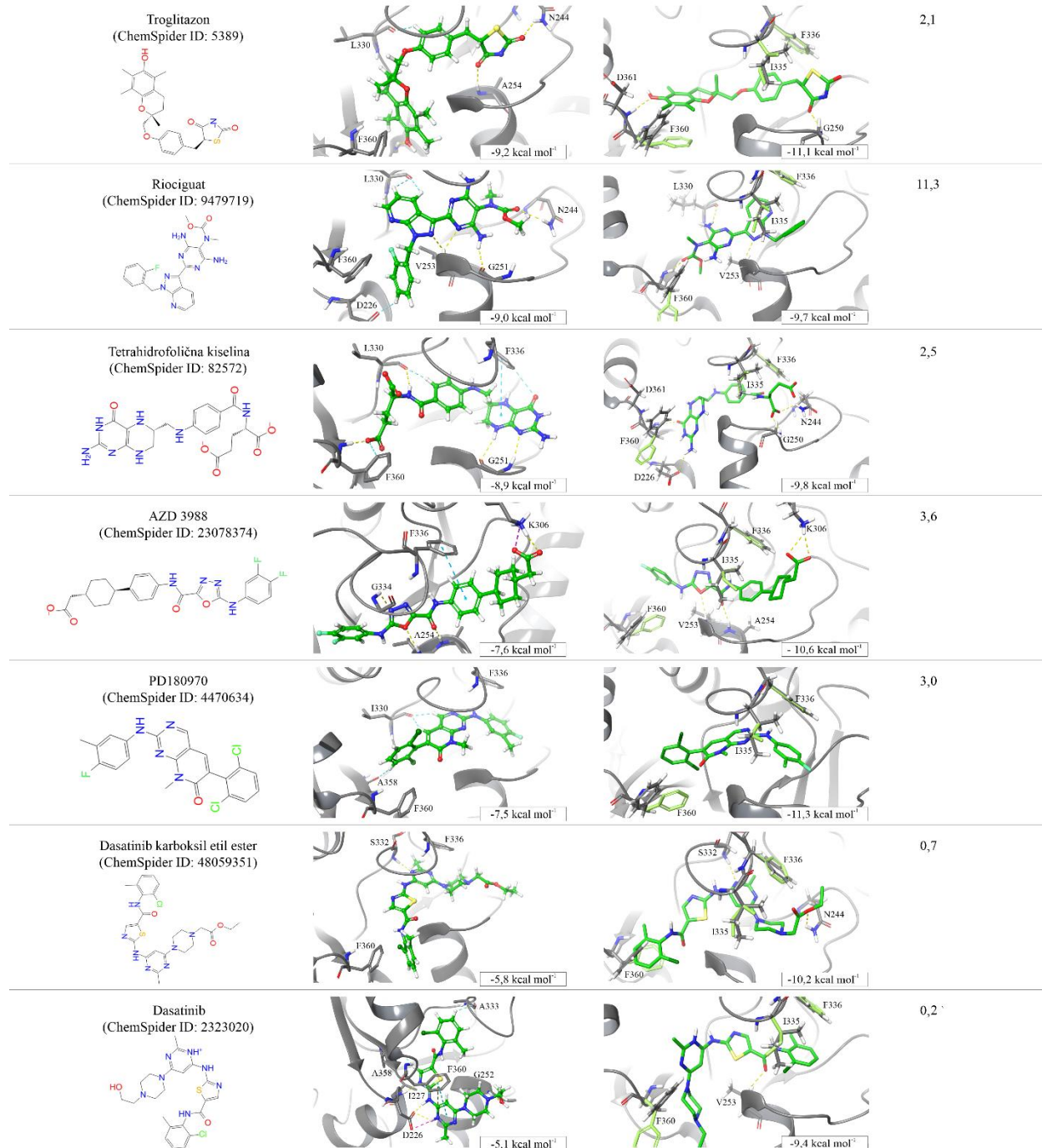
Guadecibin pokazuju nisku, tj. nepovoljnu entropijsku promjenu koja ukazuje da je većina interakcija s aktivnim mjestom ostvarena preko π - π interakcija naslagivanja i vodikovih veza, bez doprinosa hidrofobnih interakcija.

Zanimljivo je da su Dasatinib, Dasatinib KEE i folinična kiselina pokazali čak 10 puta veći afinitet vezanja nego ADPr. Njihove K_d vrijednosti su redom iznosile: 0,2, 0,7 i 0,66 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Usporedba doprinosa Gibbsvoj slobodnoj energiji vezanja spojeva prikazanih na slici 31, pokazuje da Dasatinib i njegov analog Dasatinib KEE za razliku od ADPr, prilikom vezanja imaju negativniju ΔH vrijednost te izraženu nepovoljnu entropijsku promjenu. U konačnici je entalpijsko-entropijska kompenzacija dovela do negativne ΔG vrijednosti i niže konstante disocijacije nego što je to primijećeno prilikom vezanja ADPr. S druge strane folinična kiselina ima malu pozitivnu ΔH vrijednost što ukazuje na to da je njeno vezanje vođeno entropijom te se vrlo vjerojatno zasniva samo na uklanjanju čvrsto vezanih molekula vode koje izlaskom iz aktivnog mjesta povećavaju entropiju sustava.



Slika 31. Energetski profili (entalpijski i entropijski doprinos) vezanja spojeva u aktivno mjesto makrodomene Mac1 virusa SARS-CoV-2, izmjereni pomoću ITC. Plavom bojom je prikazan entalpijski, a narančastom entropijski doprinos. Sivom bojom prikazana je promjena u slobodnoj Gibbsovoj energiji vezanja.

Ime spoja	Predvideni način vezanja (Glide)	Predvideni način vezanja (AutoDock Vina)	K_d ($\mu\text{mol dm}^{-3}$)
ADPr	-11,7	-9,7	2,9
P1,P4-Di(adenozine-5') tetrafosfat (ChemSpider ID: 49071856)	 -12,4 kcal mol ⁻¹	 -10,1 kcal mol ⁻¹	10,1
P1,P3-Di(adenozine-5') trifosfat (ChemSpider ID: 17346551)	 -11,0 kcal mol ⁻¹	 -10,6 kcal mol ⁻¹	2,1
Guadecicin (ChemSpider ID: 32697566)	 -10,7 kcal mol ⁻¹	 -9,9 kcal mol ⁻¹	3,5
Metotreksat (ChemSpider ID: 112728)	 -10,2 kcal mol ⁻¹	 -9,1 kcal mol ⁻¹	2,8
Iohexsol (ChemSpider ID: 3599)	 -10,0 kcal mol ⁻¹	 -6,1 kcal mol ⁻¹	3,7
Ceforanid (ChemSpider ID: 39656)	 -9,9 kcal mol ⁻¹	 -9,1 kcal mol ⁻¹	4,1
SNS-314 (ChemSpider ID: 23335848)	 -9,7 kcal mol ⁻¹	 -9,9 kcal mol ⁻¹	3,1
Folična kiselina (ChemSpider ID: 17340915)	 -9,4 kcal mol ⁻¹	 -9,7 kcal mol ⁻¹	0,7



Slika 32. Spojevi koji su pokazali najveći afinitet vezanja u aktivno mjesto makrodomene Mac1 virusa SARS-CoV-2. U drugom stupcu prikazani su najbolje rangirani načini vezanja dobiveni programom *Glide*, dok su u trećem stupcu prikazani rezultati fleksibilnog uklapanja programom *AutoDock Vina*. U posljednjem stupcu prikazani su afiniteti vezanja izmjereni metodom ITC.

§ 5. Rasprava

Iako se ADP-ribozilacija u prošlosti smatrala samo posttranslacijskom modifikacijom proteina, novija istraživanja pokazuju da se vjerojatno, prvotno evolucijski pojavila kao modifikacija nukleinskih kiselina. U okviru ovog doktorskog rada proučavana su dva makrodomenska proteina – protein SCO6735 iz bakterije *S. coelicolor* te makrodomena (Mac1) virusa SARS-CoV-2. Za makrodomenski protein SCO6735 je otprije poznato da može ukloniti ADP-ribozilaciju s proteina, dok je u okviru ovog doktorskog rada pokazano da puno uspješnije uklanja ADPr s modificirane ssDNA. Djelovanje makrodomene Mac1 je uglavnom istraživano u okviru njezinog uklanjanja modifikacije s proteina, dok je isto tako poznato da može uspješno ukloniti i modifikaciju s nukleinskih kiselina. U ovom doktorskog radu istraživan je terapijski potencijal navedene virusne makrodomene s ciljem pronalaska male molekule koja može inhibirati njezinu aktivnost ili koja bi se daljnjom modifikacijom mogla optimizirati za bolje inhibitorno djelovanje te u konačnici omogućiti dizajniranje lijeka protiv koronavirusa.

5.1. SCO6735 je pravi ortolog ljudskog proteina TARG1

Do sada je reverzibilna ADP-ribozilacija nukleinskih kiselina najbolje opisana na primjeru sustava TA - DarT/DarG. Navedeni sustav je pronađen u genomu velikog broja bakterijskih vrsta, a pokazano je da, ukoliko izostaje ekspresija antitoksina DarG, DarT ima letalni učinak u bakterijama u *E. coli* i *M. tuberculosis*, naglašavajući da akumulacija takvog tipa DNA oštećenja, bez odgovarajućih enzima za popravak, inducira staničnu smrt^{27,92}. Zanimljivo je da i ljudske stanice posjeduju obranu od toksina DarT. Naime, eksperimenti „spašavanja“ su pokazali da ljudski protein TARG1 može uspješno poništiti učinak DarT toksina u stanicama, dok njegov katalitički mutant K84A to nije u stanju učiniti³⁸. U prijašnjim radovima je pokazano da makrodomenski protein SCO6735 i ljudski protein TARG1 imaju jako sličnu strukturu (PDB: 2LGR; *Z-score* 16,4; RMSD 2,2 Å) te oba djeluju na proteine koji su ADP-ribozilirani na Glu ili Asp bočnim ograncima^{7,40}. Uz TARG1, SCO6735 pokazuje i visoku sličnost s antitoksinom DarG iz bakterije *T. aquaticus* (PDB: 5M3E; *Z-score* 17,1; RMSD 2,3 Å).

S obzirom na strukturnu sličnost proteina SCO6735 s makrodomenama koje revertiraju genotoksičan učinak proteina DarT, istraženo je posjeduje li i on istu aktivnost. Uistinu, pokazano je da SCO6735 uspješno uklanja ADPr s modificiranih oligonukleotida *in vitro*, te da jednako tako njegova koekspresija s TaDarT uspješno spašava bakteriju *E. coli* od letalnog učinka toksina. Paralelna usporedba njegove aktivnosti s proteinima HsTARG1 i TaDarG na modificiranim oligonukleotidima je pokazala njegovu veću efikasnost u reakciji jednog obrtaja enzima.

Prethodni radovi su pokazali da DarG uz poništavanje transferazne aktivnosti toksina DarT, njegovu efikasnost smanjuje i kontaktom inhibicijom pomoću C-terminalne domene^{27,87}. Isto je svojstvo istraženo i za proteine SCO6735 i HsTARG1. U tu su svrhu korišteni njihovi katalitički mutanti (SCO6735 Q89A i HsTARG1 K84A), a efikasnost inhibicije je direktno uspoređena s TaDarG, točnije njegovim katalitičkim mutantom K80A. Utvrđeno je da je najviša inhibicija postignuta dodatkom SCO6735, a najmanja s HsTARG1. Detaljni mehanizam interakcije proteina SCO6735 s TaDarT nije utvrđen.

Iako se dugo smatralo da se TARG1, SCO6735 i DarG svrstavaju u istu makrodomensku potporodicu proteina, opsežna filogenetska analiza provedena u ovom doktorskom radu pokazuje da se SCO6735, Bt1257, HsTARG1 i TaDarG s obzirom na razlike u primarnom slijedu dalje dijele u tri zasebne potporodice koje se jasno odvajaju na filogenetskom stablu. Pri čemu se SCO6735 i Bt1257 svrstavaju u istu potporodicu s ljudskim proteinom ALC1, dok TARG1 i DarG čine dvije zasebne potporodice.

5.2. Strukturna obilježja makrodomenskih proteina ALC1-potporodice ukazuju na specijalizaciju prema DNA supstratima

Preklapanje kristalnih struktura SCO6735 s HsTARG1 i TaDarG otkrilo je očuvano aktivno mjesto utisnuto u srž proteina i okruženo trima fleksibilnim petljama. Petlje koje okružuju vezno mjesto te sudjeluju u vezanju supstrata karakteristične su za sve makrodomenske proteine, pri čemu se distalna riboza i difosfat ADPr najčešće smještaju između dvije petlje, dok treća nosi aminokiseline važne za aktivnost proteina³⁶. U svrhu lakšeg raspoznavanja u SCO6735 su petlje koje vežu distalnu ribozu i difosfat nazvane fleksibilna i fosfat-vezujuća petlja, dok je treća

nazvana supstrat-vezujućom petljom (slika 12). Za razliku od većine ostalih makrodomenskih proteina supstrat-vezujuća petlja proteina SCO6735 ne nosi aminokiseline ključne za katalizu.

Najveća razlika između uspoređenih kristalnih struktura SCO6735, HsTARG1 i TaDarG je u pozicioniranju fosfat-vezujuće petlje. Do sad je pokazano da ona u apo-formi i kompleksu proteina TARG1 i DarG s ADPr zatvara aktivno mjesto⁴⁰, dok je u kristalnoj strukturi apoproteina SCO6735 udaljena ~15 Å od utora aktivnog mjesta⁷. Budući da zbog fleksibilnosti njena pozicija nije mogla biti u potpunosti određena kristalografski, u okviru ovog doktorskog rada je izgrađena pomoću mrežno dostupnog programa *SWISS-MODEL*⁶², a njena dinamička svojstva i interakcije sa supstratom praćene su pomoću simulacija MD. Analiza simulacija je pokazala da jedino u slučaju kompleksa s pripadnim supstratom poprima nešto zatvoreniju konformaciju, dok je u ostalim kompleksima, posebice s produktom, značajno odmaknuta od aktivnog mjesta (slika 18).

Primijećeno je da u svim simuliranim sustavima fleksibilna petlja stalno flukturira prema i od aktivnog mjesta proteina SCO6735, a dokaz njene fleksibilnosti je i činjenica da njena pozicija nije mogla biti precizno određena prilikom rješavanja kristalne strukture⁷. Strukturno poravnanje sekvenci proteina SCO6735 s HsTARG1 i TaDarG pokazalo je da je njihova fleksibilna petlja kraća za pet aminokiselina. Ekstenzivnije poravnanje većeg broja sekvenci makrodomenskih proteina te filogenetska analiza svrstali su protein SCO6735 u istu potporodicu s ljudskim proteinom ALC1, a poravnate sekvence te predviđene trodimenzionalne strukture programom *AlphaFold* pokazali su da je duga fleksibilna petlja strukturni motiv karakteristične za ALC1-potporodicu. Za razliku od ekvivalentne petlje u proteinima iz potporodica DarG i TARG1, fleksibilna petlja ALC1-potporodice obično posjeduje 4 - 5 aminokiselina više te veću zastupljenost pozitivno nabijenih i aromatskih aminokiselina, što u konačnici pridonosi boljem vezanju molekule DNA.

Usporedba elektrostatske površine i izgleda veznog mjesta za DNA proteina SCO6735, HsTARG1 i TaDarG otkrila je elektropozitivan kanal koji se kod SCO6735 optimiziranim za čvrsto vezanje ssDNA. Navedena opažanja slažu se s eksperimentalnim rezultatima koji pokazuju veću procesivnost proteina SCO6735 na ADP-riboziliranoj ssDNA u odnosu na HsTARG1 i TaDarG *in vitro*. Pretpostavljeno je da veća procesivnost proizlazi iz elektropozitivnijeg veznog mjesta i fleksibilne petlje koja može „zaklapati“ DNA u aktivnom mjestu. Takav je način vezanja ssDNA predviđen mrežno dostupnim programom *HADDOCK*⁸⁶ za predviđanje DNA-protein i protein-protein kompleksa (slika 20). Naime, najbolje rangirani rezultati pokazuju da negativno

nabijena molekula ssDNA najvjerojatnije može ući s obje strane elektropozitivnog kanala kojeg čine supstrat-vezujuća, fosfat-vezujuća i fleksibilna petlja te tako smjestiti ADPr unutar aktivnog mjesta. Takvo „klizanje“ modificirane ssDNA povećava procesivnost proteina i omogućuje brzo i efikasno uklanjanje ADPr s timina.

Činjenica da je mutant K89E pokazao bolju aktivnost na proteinskom supstratu nego što je to pokazao divlji tip proteina SCO6735, također potvrđuje ideju da je specijalizacija aktivnog mjesta proteina SCO6735 išla u smjeru povećanja aktivnosti na DNA supstratu.

5.3. Potencijalni katalitički mehanizam karakterističan za potporodicu makrodomenskih proteina ALC1

Usporedba aminokiselina u aktivnom mjestu proteina SCO6735 s homologima HsTARG1 i TaDarG je ukazala na izostanak aminokiselina koje su bitne za enzimsku aktivnost proteina HsTARG1 (Lys84 i Asp125) i TaDarG (Lys80). Budući da se na ekvivalentnoj poziciji katalitičkih Lys nalazi Gln85, koji u ovim uvjetima ne može primiti ili donirati proton, jasno je da SCO6735 posjeduje katalitički mehanizam drugačiji od svojih homologa. Uklapanje pripadnog supstrata u aktivno mjesto te simulacija MD dobivenog kompleksa omogućila je određivanje potencijalnih uloga pojedinih aminokiselina, u vezanju supstrata te enzimskoj katalizi. Predviđene uloge su eksperimentalno provjerene testiranjem aktivnosti mutanata na modificiranim ssDNA oligonukleotidima. Ukupno je napravljeno sedam jednostrukih mutanata proteina SCO6735: H24Y, N27S, K34E, K89E, Q85A, Q85E i jedan dvostruki mutant K34/89E.

Analiza simulacija molekulske dinamike istaknula je važnost Lys34 i Lys89 u stabilizaciji negativnog naboja ssDNA, što je i eksperimentalno potvrđeno. Naime, pojedinačna mutacija navedenih Lys u Glu dovela je do djelomičnog, ali ne i potpunog gubitka enzimске aktivnosti. Potpuni gubitak aktivnosti zamijećen je samo u slučaju dvostruke mutacije K34/89E. Također, simulacija MD dvostrukog mutanta s pripadnim supstratom dovela je do značajnog narušavanja pozicioniranja supstrata, što ukazuje na veliku važnost Lys34 i Lys89 u stabilizaciji negativnog naboja koji proizlazi iz fosfatnih skupina ADP-ribozilirane ssDNA.

Mutacija His24, jedinog bočnog ogranka s očitim katalitičkim potencijalom, u Tyr dovela je do značajnog smanjenja aktivnosti proteina. No, budući da su rezultati CD mjerenja pokazali narušavanje trodimenzionalne strukture H24Y mutanta, smanjenje aktivnosti nije gledano kao posljedica gubitka katalitičke aktivnosti, već gubitka trodimenzionalne strukture proteina. S obzirom na izostanak značajnijih direktnih interakcija s pripadnim supstratom tijekom simulacija MD, pretpostavljeno je da je uloga His24 strukturna te da je odgovoran za stabilizaciju srži proteina.

Najveći gubitak aktivnosti primijećen je mutiranjem Gln85, koji se nalazi na ekvivalentnoj poziciji katalitičkih Lys u HsTARG1 i TaDarG. Njegova zamjena s Ala dovela je do potpunog gubitka aktivnosti na ssDNA i proteinskom supstratu. S obzirom na njegove stabilne interakcije s distalnom ribozom pripadnog supstrata tijekom cijele simulacije, te nemogućnosti primanja/doniranja protona pretpostavljeno je da je njegova uloga najvjerojatnije pravilno pozicioniranje i stabilizacija supstrata i reakcijskog intermedijera. Tome u prilog idu i rezultati simulacije navedenog mutanta u kompleksu s pripadnim supstratom, koji su pokazali potpunu dispoziciju supstrata u aktivnom mjestu (slika 25).

Važnost Gln85 i njegovog pravilnog pozicioniranja unutar aktivnog mjesta potvrđena je i uvođenjem mutacije N27S koje je dovela do značajnog gubitka aktivnosti na ssDNA supstratu. Naime, tijekom simulacija MD je primijećeno da je Asn27 odgovoran za „zaključavanje“ Gln85 u pravilni rotamer koji zatim omogućuje vezanje supstrata. Pretpostavka da bi zamjena Asn27 u Ser trebala povećati fleksibilnost Gln85, potvrđena je i simuliranjem mutiranog proteina s pripadnim supstratom. Budući da Ser nije mogao u isto vrijeme ostvariti vodikovu vezu s Gln85 i okosnicom susjednog Leu29, nije mogao dovoljno fiksirati poziciju Gln85, što onemogućuje postizanje produktivnog vezanja supstrata.

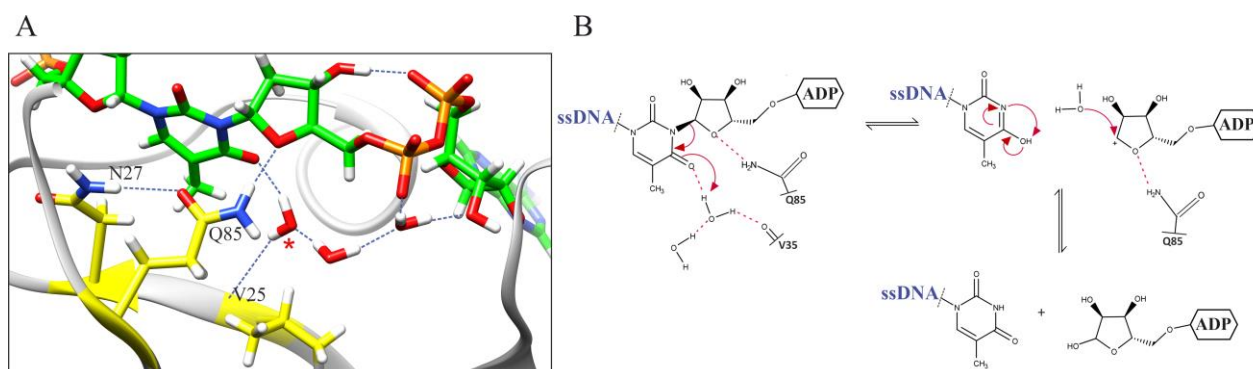
U prethodno objavljenim rezultatima⁷, napravljena je mutacija Gly128 koji je visoko očuvan među homolozima proteina SCO6735. Navedeni Gly zamijenjen je s Glu, što je dovelo do značajnog opadanja aktivnosti na proteinskom supstratu. U ovom doktorskom radu aktivnost mutanta G128E je testirana i na ssDNA supstratu, pri čemu je primijećeno smanjenje aktivnosti za čak 70 %. Prema rezultatima simulacije pretpostavljeno je da je pad u aktivnosti posljedica repulzivnih interakcija s difosfatom supstrata.

Aktivnost navedenih mutiranih proteina testirana je i na proteinskom supstratu. Kao i u slučaju sa ssDNA supstratom, najveći gubitak aktivnosti zabilježen je kod mutanta Q85A, što ukazuje da i u slučaju proteinskog supstrata Gln85 ima vjerojatno istu ulogu – pravilno pozicioniranje i stabilizaciju supstrata i reakcijskog intermedijera. Najveća razlika u aktivnosti između proteinskih i ssDNA supstrata primijećena je kod mutanta H24Y. Naime, unatoč narušenoj 3D strukturi navedeni mutant proteina SCO6735 je pokazao smanjenje aktivnosti za 40 % na proteinskom supstratu. Što se vjerojatno može objasniti njegovim djelomičnim strukturiranjem, prilikom interakcije s proteinskim supstratom.

Prethodna istraživanja djelovanja ljudskog proteina TARG1 na ADP-riboziliranom proteinskom supstratu dovela su do pretpostavke katalitičkog mehanizma koji uključuje Lys84 i Asp125⁴⁰. Enzimska kataliza započinje deprotonacijom Lys84 uz pomoć Asp125, čime se omogućuje nukleofilni napad Lys84 na anomerni ugljikov atom distalne riboze i otpuštanja de-ADP-riboziliranog Asp/Glu bočnog ogranka. Nakon toga dolazi do formiranja *Schiffove* baze podložne nukleofilnom napadu molekule vode. Ovime nastaje ADPr otvorenog prstena i regenerirani Lys84². Za razliku od HsTARG1, TaDarG ne posjeduje Lys/Asp dijadu, već samo katalitički važan Lys80, a njegov katalitički mehanizam do danas ostaje nerazjašnjen^{2,27}. SCO6735 za razliku od svojih homologa ne posjeduje katalitički Lys, već se na tom mjestu nalazi Gln85 čija mutacija u Ala dovodi do potpunog gubitka enzimske aktivnosti. Također, u njegovoj se blizini ne nalazi niti jedna aminokiselina koja bi mogla sudjelovati u direktnom primanju/davanju protona. Budući da sam Gln85 ne može sudjelovati u kiselo-baznoj katalizi, preostaje mogućnost iniciranja enzimske katalize pomoću aktivirane molekule vode. Uistinu, analizom aktivnog mjesta u kompleksu s pripadnim supstratom tijekom 200 ns simulacije otkrivena je molekula vode ugniježđena između drugog keto-kisikovog atoma u timinskom prstenu supstrata, te okosnice Val35 (prikazano na slici 23A). Primijećeno je da se tijekom 200 ns simulacije na ovoj poziciji uvijek izmjenjuju molekule vode pozicionirane na način da mogu ostvarivati vodikovu vezu s okosnicom Val35 i pripadnim supstratom (slika 23B). Na temelju toga i rezultata mjesno-specifične mutageneze predložen je katalitički mehanizam u kojem Val35 preko kisika u proteinskoj okosnici pozicionira molekulu vode i usmjerava ju prema karbonilnom kisiku timina. Katalitička voda djeluje kao proton-donor čime nastaje nepovoljni tautomer timina kao reakcijski intermedijer. Unutarmolekulskom raspodjelom elektrona nastaje nepoželjna forma timina usmjeravajući reakciju prema pucanju veze s ADPr. Kao posljedica pucanja veze nastaje nestabilni

oksokarbenijev ion u distalnoj ribози, a budući da je on iznimno reaktivan vjerojatno odmah reagira s molekulom vode u blizini čime nastaje slobodna ADPr kao reakcijski produkt. Gln85 vjerojatno tijekom cijele katalize stabilizira supstrat ostvarujući stabilnu vodikovu vezu s distalnom ribozom (slika 33). Razvijena vodikova mreža između molekula vode unutar aktivnog mjesta pomaže pri aktivaciji i pozicioniranju katalitičke molekule vode, Val35 i Gln85 (slika 23A). Filogenetska analiza je pokazala očuvanost navedenih ključnih aminokiselina Val/Ile i Gln unutar potporodice ALC1 (slika 13A).

Ovakva diferencijacija aktivnog mjesta i relokacija katalitičkih aminokiselina na drugu stranu aktivnog mjesta (u odnosu makrodomenske proteine potporodice TARG1 i DarG) indicira moguću adaptaciju na dvostruku ulogu proteina koja uključuje de-modifikaciju DNA i proteinskih supstrata, pri čemu je veći naglasak stavljen na povećanje procesivnosti prema DNA supstratu.



Slika 33. Predloženi katalitički mehanizam za protein SCO6735. Aminokiseline i molekula vode koje se smatraju ključnima za pravilno pozicioniranje pripadnog supstrata i enzimsku katalizu (A). Molekula vode koja se smatra važnom za enzimsku katalizu naznačena je crvenom zvjezdicom. Shematski prikaz predloženog reakcijskog mehanizma (B). Val35 preko kisika u proteinskoj okosnici pozicionira molekulu vode i usmjerava ju prema karbonilnom kisiku timina. Katalitička voda djeluje kao proton-donor čime nastaje nepovoljni tautomer timina kao reakcijski intermedijer. Unutarmolekulskom raspodjelom elektrona nastaje nepoželjna forma timina i dolazi do pucanja veze s ADPr. Nastali oksokarbenijev ion u distalnoj ribози odmah reagira s molekulom vode u blizini nakon čega nastaje slobodna ADPr kao reakcijski produkt. Gln85 stabilizira supstrat i intermedijer ostvarujući stabilnu vodikovu vezu s distalnom ribozom.

5.4. Protein SCO6735 ima ulogu u zaštiti od genotoksičnog stresa

Kako je već spomenuto, za bakteriju *E. coli* ekspresija toksina DarT bez ko-ekspresije odgovarajućih enzima za popravak (poput antitoksina DarG ili proteina SCO6735) ima letalan učinak. Primijećeno je da je toksičan učinak DarT puno manji na sojeve *S. coelicolor* kojima je gen za SCO6735 uklonjen. Naime, kao što je prikazano u rezultatima (slika 27A), soj SCO Δ 6735 s eksprimiranim toksinom TaDarT uspjeva rastom sustići sojeve SCO Δ 6735 koji nemaju eksprimirani toksin i one kojima SCO6735 nije deletiran ili eksprimiraju katalitički mutant TaDarT E160A. Isti je efekt uočen na krutoj podlozi i u tekućoj kulturi (slika 28), prema kojoj su napravljene krivulje rasta. Za rezistenciju bakterije *S. coelicolor* na učinak toksina DarT može biti više razloga. Primjerice, DNA bakterija roda *Streptomyces* bogata je GC parovima baza (čak oko 72 %) te tako općenito posjeduje manji broj timina koji se mogu modificirati toksinom DarT. Nadalje, poznato je da antitoksin DarG interagira s proteinima RecA, RecB i RecF koji sudjeluju u mehanizmu popravka DNA; pri čemu je dokazano da je RecF, u slučaju izostanka antitoksina DarG, također sposoban popraviti ADPr-dT-DNA lezije homolognom rekombinacijom⁸⁷. Ono što je isto važno naglasiti je da bakterije roda *Streptomyces* u stadiju prije formiranja spora imaju veliki broj kromosoma koji još nisu pregrađeni u zasebne stanice⁴⁴, a koji lako mogu poslužiti za popravak homolognom rekombinacijom. Uz to, ova bakterijska vrsta ima sporije vrijeme dijeljenja od bakterije *E. coli*⁴⁴, što ostavlja puno više vremena za popravak DNA lezija homolognom rekombinacijom. Sve ovo pruža mogućnost popravka ADP-riboziliranih timina nekim drugim mehanizmima koji ne ovise samo o proteinu SCO6735.

Homolog toksina DarT nije pronađen u bakteriji *S. coelicolor*, ali budući da se homoloji proteina DarT mogu pronaći u više od tisuću različitih bakterijskih vrsta, moguće je da protein SCO6735 služi kao direktna zaštita od kompeticijskih bakterija koje kodiraju za toksin DarT, a koji se može izlučiti iz bakterijskih stanica. Primjer takvog tipa toksina je ART SCO5461, koja modificira DNA na gvaninu, te se vrlo vjerojatno izlučuje iz bakterijskih stanica služeći za borbu protiv ostalih bakterija u okolini⁸³. BLAST pretraživanje na genomima bakterija roda *Streptomyces* pokazalo je da neke od njih kodiraju za cijeli DarT/DarG TA sustav, a neki od njih uz to nose i dodatan gen za homolog proteina SCO6735, dok neki, kao *S. coelicolor*, kodiraju samo za SCO6735 (rezultati nisu prikazani). Iako je eksperimentalno pokazano da je SCO6735 funkcionalni homolog proteina DarG, činjenica da neki sojevi istovremeno kodiraju za DarT/DarG

i SCO6735 ukazuje na njegovu dodatnu fiziološku ulogu, koja nije samo revertiranje toksičnog učinka DarT.

Budući da je ekspresija proteina SCO6735 pod kontrolom RecA-neovisnog promotora koji se inducira uslijed DNA oštećenja, pretpostavlja se da je SCO6735 primarno uključen u odgovor na DNA oštećenja. Na njegovo potencijalno sudjelovanje u drugim fiziološkim procesima ukazuje činjenica da njegova inaktivacija u bakteriji *S. coelicolor* predstavlja stres za bakterijsku stanicu, budući da dovodi do povećane proizvodnja antibiotika aktinorodina i pojave tzv. „plavog“ fenotipa⁷.

Homolozi proteina SCO6735 su široko rasprostranjeni i visoko očuvani u Aktinobakterijama, a mogu se naći i u nekoliko drugih bakterijskih porodica poput: *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus/Thermus*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* (slika 13A). Zanimljivo je da je homolog proteina SCO6735 pronađen čak i u žarnjaka *Nematostella vectensis*, u kojem se eksprimira kao dio fuzijskog proteina koji još sadrži i domenu iz porodice β -laktamaza. Proteini iz porodice β -laktamaza odgovorni su rastvaranje β -laktamskog prstena i time pružaju zaštitu od istoimenih tipova antibiotika.

5.5. Simulacija makrodomene Mac1 u kompleksu s Glu-ADPr ukazuju na pretpostavljeni katalitički mehanizam potpomognut supstratom

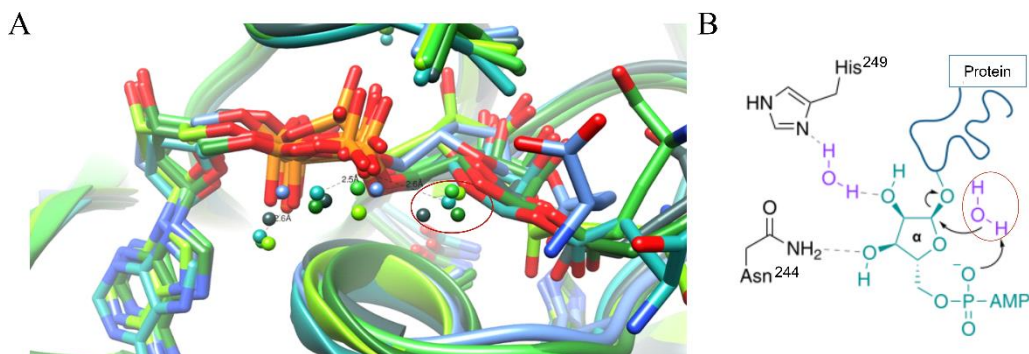
Do sada su riješene brojne kristalne strukture makrodomene Mac1 u različitim kompleksima^{10,12,13,15} koje su omogućile bolje razumijevanja aktivnog mjesta te interakcija bitnih za vezanje ADPr, različitih fragmenata i potencijalnih inhibitora. Nedavno su pomoću neutronskih i X-zraka riješene kristalne strukture makrodomene Mac1 u kompleksu s ADPr u različitim kristalnim formama te pri različitim temperaturama i pH-vrijednostima. Budući da se neutronsom kristalografijom može odrediti pozicija atoma vodika (iako pri nešto slabijoj rezoluciji $\sim 2,5$ Å) ova je metoda omogućila određivanje orijentacija molekula vode koje pomoću vodikovih veza sudjeluju u vezanju ADPr te protonacijskih stanja ključnih katalitičkih bočnih ogranaka. Sve je ovo dovelo do pretpostavke dvaju mogućih katalitičkih mehanizama. Jedan uključuje već prethodno predložen mehanizam katalize potpomognut supstratom koji je karakterističan i za

homologni ljudski protein MacroD2¹⁰, dok drugi uključuje nukleofilni napad molekule vode aktivirane His249 bočnim ogrankom na C1 anomerni ugljikov atom. Drugi mehanizam je moguć u slučaju ako se distalna riboza nalazi u β -konfiguraciji¹⁴.

Kako bi se bolje proučile interakcije koje se ostvaruju sa supstratom te aminokiseline koje bi potencijalno mogle sudjelovati u enzimskoj katalizi u ovom doktorskom radu provedena je simulacija MD virusne makrodomene u kompleksu s ADPr vezanoj na Glu (Glu-ADPr). Kao što je vidljivo na slici 29 pod B, za pripremu kompleksa korišten je supstrat u kojem distalna riboza ima α -konfiguraciju, što je u skladu s pretpostavkom da je upravo to produktivnija konformacija u većine ARH (Voorneveld et al., 2018).

Sukladno pretpostavci Correy i suradnika, u slučaju α -konfiguracije, najbolji rezultati molekuskog uklapanja pretpostavljaju orijentaciju supstrata u kojem modificirani Glu izlazi iz utora aktivnog mjesta između Ile335 te Gly250 i Gly251¹⁴. Ova orijentacija supstrata ostala je očuvana tijekom 200 ns simulacije MD, pri čemu su Gly250 i Gly251 sudjelovali u stabilizaciji supstrata ostvarujući stabilnu vodikovu vezu s karbonilnim kisikom esterske veze koja ADPr povezuje s Glu (slika 29E). Smatra se da je precizno pozicioniranje distalne riboze ključno za mehanizam potpomognut supstratom, a preklopljene strukture supstrata tijekom 200 ns simulacije prikazane na slici 34, pokazuju jako malu promjenu u njenom pozicioniranju. Tijekom 200 ns simulacije MD primijećeno je i pažljivo pozicioniranje difosfata stabilnim vodikovim vezama s okosnicom Val253 i Ile335, u blizini anomernog ugljikovog atoma C1 (slika 29A, C i D). Na slici 34 je također vidljivo da se tijekom simulacija molekule vode pozicioniraju na istim mjestima oko difosfata, a posebno je zanimljiva molekula vode (u krugu) koja se tijekom simulacija konstantno pozicionira u blizini reakcijskog centra. Sve navedene činjenice ukazuju da bi se mehanizam posredovan supstratom doista mogao koristiti u slučaju ako se distalna riboza nalazi u α -konfiguraciji (slika 34B).

Nadalje, eksperimentalno je pokazano da se zamjenom Gly251 valinom u potpunosti gubi enzimska aktivnost makrodomene Mac1, što je najvjerojatnije posljedica pozicioniranja razgranatog valinskog bočnog ogranka između difosfata i reakcijskog centra čime se onemogućava pravilno pozicioniranje nukleofilne molekule vode¹⁰.



Slika 34. Preklopljene strukture supstrata Glu-ADPr i molekula vode oko difosfata u aktivnom mjestu makrodomene Mac1 virusa SARS-CoV-2. Strukture su dobivene nakon 50, 100, 150 i 200 ns simulacije MD (A). Shematski prikaz predloženog mehanizma enzimske katalize (B). U slučaju kada se distalna riboza nalazi u α -konfiguraciji predložen je mehanizam potpomognut supstratom - molekula vode aktivirana kisikom iz β -fosfatne skupine nukleofilno napada anomerni ugljikov C1 atom distalne riboze (preuzeto i prilagođeno iz¹⁴).

5.6. Terapeutski potencijal odabranih spojeva u liječenju bolesti uzrokovane virusom SARS-CoV-2

Brzo širenje pandemije COVID-19 istaknulo je potrebu za razvojem brze i efikasne strategije za razvoj novih anti-virusnih lijekova. Iako je fragment-analiza puno produktivniji način za dizajn novih lijekova na temelju detaljne strukturne analize aktivnog mjesta, metoda pretraživanja baze već postojećih lijekova i spojeva u različitim fazama farmaceutskog istraživanja otvara mogućnost brzog pronalaska lijeka prenamjenom ili specifičnom modifikacijom u svrhu dobivanja boljih inhibitorskih svojstava. U ovom doktorskom radu prikazan je dio istraživanja u kojem se pretraživanjem baze poznatih malih molekula nastojao pronaći potencijalni inhibitor makrodomene virusa SARS-CoV-2. U tu svrhu je baza malih molekula virtualno pretražena dvjema metodama: metodom pretraživanja na temelju sličnosti farmakofora te molekulskim uklapanjem. Time je od ~2 milijuna malih molekula dobiveno njih 250 koje su ušle u sljedeću fazu istraživanja. U vrijeme pisanja dokorskog rada naručeno je i ispitano 32 spoja. Za njih 15 su

metodom ITC izmjerene iznimno dobre K_d vrijednosti koje su mjera uspješnosti vezanja u/na virusnu makrodomenu Mac1.

Virtualno pretraživanje molekulskim uklapanjem programom *Glade* nije rezultiralo bodovima vrednovanja za Dasatinib koji su niži od postavljene granične vrijednosti od $-7,5 \text{ kcal mol}^{-1}$, već su iznosili $-5,8 \text{ kcal mol}^{-1}$, no, budući da je istraživanje druge grupe pokazalo njegovo vezanje molekulskim uklapanjem i metodom AMP-Glo⁸⁹, spoj je naručen te je afinitet njegovog vezanja izmjeren metodom ITC. Zanimljivo je da je, suprotno rezultatima uklapanja programom *Glade*, fleksibilno molekulsko uklapanje Dasatiniba programom *AutodockVina* pokazalo njegovo jako dobro vezanje te su bodovi vrednovanja iznosili $-9,4 \text{ kcal mol}^{-1}$, što je za samo $0,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ više od bodova vrednovanja molekulskog uklapanja za ADPr (provedeno pomoću istog programa) (slika 32). Ovakve razlike u rezultatima računa molekulskog uklapanja ističu prednosti upotrebe dvaju ili više programa koji koriste različite algoritme prilikom pretraživanja i izračunavanja bodova vrednovanja.

Rezultati ITC mjerenja pokazali su dobro vezanje Dasatiniba, pri čemu je K_d iznosila $0,18 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, što je za red veličine manje od K_d izmjerene za ADPr. Analiza komponenata Gibbsovih slobodnih energija vezanja Dasatiniba i ADPr pokazala je značajnu razliku. Naime, Dasatinib ima puno negativniju vrijednost entalpije i izraženo nepovoljnu promjenu entropije što može biti posljedica nedostatka poželjnih hidrofobnih interakcija prilikom vezanja u aktivno mjesto, konformacijske promjene uslijed vezanja koja dovodi do rigidnije strukture proteina ili pak može ukazivati da se spojevi vežu negdje drugdje na strukturi proteina. U konačnici je entalpijsko-entropijska kompenzacija dovela do negativne ΔG vrijednosti i niže konstante vezanja Dasatiniba nego što je to primijećeno prilikom vezanja ADPr.

S obzirom na dobro vezanje Dasatiniba napravljeno je pretraživanje na temelju oblika i kemijskih svojstava (farmakofora) kako bi se pronašli spojevi slični Dasatinibu, a koji bi se mogli bolje vezati. Navedena pretraga rezultirala je s naručivanjem pet novih spojeva (Dasatinib KEE, Aurora inhibitor II, AZD 3988, PD180970 i PD166326), od kojih je najbolje vezanje pokazao Dasatinib KEE čija je K_d vrijednost iznosila $0,72 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$. PD166326 i Aurora inhibitor II nisu pokazali vezanje u danim uvjetima, dok je kod AZD 3988 i PD180970 izmjeren afinitet vezanja sličan ADPr (slika 32). Poput Dasatiniba, vezanje Dasatinib KEE karakterizira izrazito niska entalpija vezanja i nepovoljna entropijska promjena (slika 31). Do sad još nisu provedena/objavljena istraživanja u kojima je ispitano antivirano djelovanje Dasatiniba *in vivo*.

Metotreksat je pokazao gotovo jednak afinitet ($K_d = 2,8 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i iznose komponenata Gibbsovih slobodnih energija vezanja kao i ADPr. To je FDA odobren lijek koji se inače koristi u antitumorskoj terapiji te kao imunosupresor, a poznato je da inhibira djelovanje dihidrofolat reduktaze i još nekih enzima uključenih u sintezi nukleotida. Nedavna istraživanja su pokazala da Metotreksat inhibira replikaciju virusa SARS-CoV-2 u Vero 6 stanicama u terapijskoj koncentraciji od $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ^{93,94} te da ujedno pojačava antivirusnu efikasnost Remdesivira⁹³. Smatra se da je antivirusno djelovanje Metotreksata višestruko i proizlazi iz njegove inhibicije sinteze purina i enzima metilen-tetrahidrofolat-reduktaze (MTHFR), koji je odgovoran za regeneraciju metionina iz homocisteina. Metionin je RNA virusima nužan za sintezu 5'-kape RNA molekule⁹³. Još uvijek nije poznato interagira li Metotreksat ujedno i s nekim virusnim proteinima, poput makrodomene Mac1. Korištenje Metotreksata u antivirusne svrhe još uvijek nije učestalo zbog velikog broja nuspojava koje se javljaju uslijed primanja viših doza lijeka. No, smatra se da bi njegova kombinacija (u maloj količini) s drugim antivirusnim lijekovima poput Remdesivira mogla postati dio rutinskih antivirusnih terapija^{93,95}.

Folinična kiselina i njezin derivat tetrahidrofolična kiselina su također pokazali vrlo visok afinitet vezanja $K_d = 0,7 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i $2,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Energetski profil vezanja tetrahidrofolične kiseline nalikuje ADPr, dok je kod folinične kiseline primijećena pozitivna vrijednost entalpije (slika 31) što ukazuje na vezanje vođeno entropijom koje se vrlo vjerojatno zasniva samo na uklanjanju čvrsto vezanih molekula vode koje izlaskom iz aktivnog mjesta povećavaju entropiju sustava. Virtualno pretraživanje još jedne istraživačke grupe predložilo je foliničnu i tetrahidrofoliničnu kiselinu u sprječavanju SARS-CoV-2 infekcije, no, oni su predvidjeli njihovo vezanje na protein šiljka, čime bi se spriječila interakcija s ljudskim receptorom ACE2⁹⁶.

Kako bi se navedeni spojevi mogli modificirati u svrhu boljeg vezanja u aktivno mjesto bilo bi idealno riješiti kristalne strukture njihovih kompleksa s virusnom makrodomenom Mac1. ITC mjerenje daju uvid u doprinose entalpije i entropije te afinitet vezanja pojedinih liganda, ali ne mogu dati točan uvid tipove ostvarenih interakcija, kao ni u pozicioniranje i orijentaciju supstrata u aktivnom mjestu. Metoda molekuskog uklapanja može dati predviđanje njihovog vezanja u aktivno mjesto, no ona nisu uvijek odraz stvarnog načina vezanja. Glavni nedostatak najčešće korištenih metoda uklapanja je činjenica da se prilikom računa ne uzima u obzir fleksibilnost cijelog aktivnog mjesta ili molekule vode koje interagiraju s aktivnim mjestom i koje su ponekad nužne za vezanje nekih spojeva.

§ 6. Zaključci

- Protein SCO6735 iz bakterije *S. coelicolor* je strukturni homolog ljudskog proteina TARG1 i antitoksina DarG iz toksin/antitoksin sustava DarT/DarG bakterije *T. aquaticus*.
- Protein SCO6735 djeluje antagonistički prema toksinu DarT; svojom hidrolitičkom aktivnošću može ukloniti ADP-ribozu kojom ovaj toksin modificira timine u ssDNA, a može ga inhibirati i direktnim vezanjem.
- Eksperimentalni rezultati te analiza elektrostatskog potencijala i katalitički važnih aminokiselina unutar aktivnog mjesta upućuju na dvostruku ulogu proteina SCO6735 koja uključuje de-modifikaciju DNA i proteinskih supstrata, pri čemu je procesivnost značajno povećana prema DNA supstratu.
- Filogenetska analiza makrodomenskih proteina svrstava SCO6735 u potporodicu ALC1 koju karakterizira dulja fleksibilna petlja s većim udjelom pozitivno nabijenih aminokiselina i glutaminom na poziciji ekvivalentnoj katalitičkim lizinima u HsTARG1 i TaDarG.
- Na temelju analize simulacija i rezultata mjesno-specifične mutageneze predložen je katalitički mehanizam proteina SCO6735. Ključne aminokiseline, Val35 koji pozicionira katalitičku molekulu vode i Gln85 koji stabilizira supstrat i reakcijski intermedijer, očuvane su unutar potporodice ALC1.
- SCO6735 štiti bakterije *E. coli* i *S. coelicolor* od negativnog učinka toksina DarT. Ovi rezultati pokazuju da SCO6735 ima ulogu čuvara genoma i služi kao direktna zaštita od kompeticijskih bakterija koje kodiraju za DarT ili slične toksine.
- Simulacije makrodomene Mac1 virusa SARS-CoV-2 u kompleksu sa supstratom Glu-ADPr ukazuju na mehanizam katalize potpomognut supstratom u slučaju kad se distalna riboza nalazi u α -konfiguraciji.
- Virtualna pretraga malih molekula započela je s bazom koja sadrži više od dva milijuna spojeva. U konačnici je njih 27 podvrgnuto testiranju metodom ITC.

- ITC mjerenja su pokazala dobro vezanje FDA-odobrenog lijeka Dasatiniba i njegovog analoga Dasatinib KEE u virusnu makrodomenu Mac1, iako energetska profil ukazuje na vezanje drugačije od ADPr. Potencijalni učinak ovih lijekova u sprječavanju SARS-CoV-2 infekcije još uvijek nije zabilježen *in vivo*.
- Metotreksat je pokazao gotovo jednak afinitet i energetska profil vezanja kao i ADPr. Poznato je da Metotreksat inhibira sintezu purina i enzima metilen-tetrahidrofolat-reduktaze (MTHFR) što za posljedicu ima inhibiciju replikacije virusa SARS-CoV-2. Nije poznato interagira li Metotreksat i s nekim virusnim proteinima, poput makrodomene Mac1.
- Folinična kiselina i njezin derivat tetrahidrofolična kiselina su također pokazali vrlo visok afinitet vezanja u virusnu makrodomenu Mac1. Njihov potencijalni antivirusni učinak još uvijek nije zabilježen *in vivo*.
- Izmjereni afiniteti vezanja FDA-odobrenih spojeva pružaju vrijednu informaciju za nastavak istraživanja u kojem se njihova struktura može kemijski modificirati s ciljem boljeg vezanja u aktivno mjesto virusne makrodomene Mac1.

§ 7. Popis oznaka, kratica i simbola

Popis kratica:

ADPr	ADP-riboza
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
NAM	nikotinamid
ssDNA	jednolančana molekula DNA
ssRNA	jednolančana molekula RNA
ART	ADP-ribozil-transferaze
ARH	ADP-ribozil-hidrolaze
PAR	poli-ADP-riboza
PARP	poli-ADPr polimeraza
PARG	PAR-glikohidrolaza
TARG1	terminalna-ADPr-glikohidrolaza 1
ADPr-ON	ADP-ribozilirani oligonukleotid
nsp3	nestrukturalni protein 3
Mac1	makrodomena 1 iz SARS-CoV-2
CD	cirkularni dikroizam
ITC	izotermalna titracijska kalorimetrija
MD	molekulska dinamika
Amp	ampicilin
Kan	kanamicin
Cam	kloramfenikol

Popis aminokiselina:

Ala (A)	alanin
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	aspartat
Arg (R)	Arginin
Cys (C)	Cistein
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutamat
Gly (G)	Glicin
His (H)	Histidin
Ile (I)	Izoleucin
Leu (L)	Leucin

Lys (K)	Lizin
Met (M)	Metionin
Phe (F)	Fenilalanin
Pro (P)	Prolin
Ser (S)	Serin
Thr (T)	Treonin
Trp (W)	Triptofan
Tyr (Y)	Tirozin
Val (V)	Valin

§ 8. Literaturni izvori

1. Aravind, L., Zhang, D., de Souza, R. F., Anand, S. & Iyer, L. M. The Natural History of ADP-Ribosyltransferases and the ADP-Ribosylation System. in *Computational and Structural Biotechnology Journal* vol. 19 3–32 (2014).
2. Rack, J. G. M., Palazzo, L. & Ahel, I. (ADP-ribosyl)hydrolases: Structure, function, and biology. *Genes Dev.* **34**, 263–284 (2020).
3. Cohen, M. S. & Chang, P. Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 236–243 (2018).
4. Palazzo, L., Mikoč, A. & Ahel, I. ADP-ribosylation: new facets of an ancient modification. *FEBS J.* **284**, 2932–2946 (2017).
5. Penyige, A. *et al.* Analysis and identification of ADP-ribosylated proteins of *Streptomyces coelicolor* m145. *J. Microbiol.* **47**, 549–556 (2009).
6. Sziráč, K. *et al.* Disruption of SCO5461 gene coding for a mono-ADP-ribosyltransferase enzyme produces a conditional pleiotropic phenotype affecting morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J. Microbiol.* **50**, 409–418 (2012).
7. Lalić, J. *et al.* Disruption of macrodomain protein SCO6735 increases antibiotic production in *streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* **291**, 23175–23187 (2016).
8. Shima, J., Penyige, A. & Ochi, K. Changes in patterns of ADP-ribosylated proteins during differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its developmental mutants. *J. Bacteriol.* **178**, 3785–3790 (1996).
9. Alhammad, Y. M. O. & Fehr, A. R. The viral macrodomain counters host antiviral ADP-ribosylation. *Viruses* **12**, 1–12 (2020).
10. Matthias Rack, J. G. *et al.* Viral macrodomains: A structural and evolutionary assessment of the pharmacological potential. *Open Biol.* **10**, (2020).
11. Lei, J., Kusov, Y. & Hilgenfeld, R. Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Res.* **149**, 58–74 (2018).
12. Alhammad, Y. M. O. *et al.* The SARS-CoV-2 Conserved Macrodomain Is a Mono-ADP-Ribosylhydrolase. *J. Virol.* **95**, 1–20 (2021).

13. Michalska, K. *et al.* Crystal structures of SARS-CoV-2 ADP-ribose phosphatase: From the apo form to ligand complexes. *IUCrJ* **7**, 814–824 (2020).
14. Correy, G. J. *et al.* The mechanisms of catalysis and ligand binding for the SARS-CoV-2 NSP3 macrodomain from neutron and x-ray diffraction at room temperature. *Sci. Adv.* **8**, (2022).
15. Schuller, M. *et al.* Fragment Binding to the Nsp3 Macrodomain of SARS-CoV-2 Identified Through Crystallographic Screening and Computational Docking. *bioRxiv* 1–44 (2020).
16. Mikolčević, P., Hloušek-Kasun, A., Ahel, I. & Mikoč, A. ADP-ribosylation systems in bacteria and viruses. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **19**, 2366–2383 (2021).
17. Crawford, K., Bonfiglio, J. J., Mikoč, A. & Matic, I. Specificity of reversible ADP-ribosylation and regulation of cellular processes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **0**, 1–19 (2017).
18. Palazzo, L., Mikoč, A. & Ahel, I. ADP-ribosylation: new facets of an ancient modification. *FEBS J.* **284**, 2932–2946 (2017).
19. Chambon, P., Weill, J. D. & Mandel, P. Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**, 39–43 (1963).
20. Chambon, P., Weill, J. D., Doly, J., Strosser, M. T. & Mandel, P. On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 638–643 (1966).
21. Collier, R. J. & Pappenheimer, A. M. Studies on the mode of action of diphtheria toxin. *J. Exp. Med.* **120**, 1019–1039 (1964).
22. Honjo, T., Nishizuka, Y. & Hayaishi, O. Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **243**, 3553–3555 (1968).
23. Zhang, R. G. *et al.* The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. *J. Mol. Biol.* **251**, 563–573 (1995).
24. Vyas, S. *et al.* Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity Europe PMC Funders Group. *Nat. Commun.* **4426**, 1–29 (2014).
25. Gros Lambert, J., Prokhorova, E. & Ahel, I. ADP-ribosylation of DNA and RNA. *DNA Repair (Amst)*. **105**, (2021).

26. Takamura-Enya, T. *et al.* Mono(ADP-ribosyl)ation of 2'-deoxyguanosine residue in DNA by an apoptosis-inducing protein pierisin-1 from cabbage butterfly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12414–12419 (2001).
27. Jankevicius, G., Ariza, A., Ahel, M. & Ahel, I. The Toxin-Antitoxin System DarTG Catalyzes Reversible ADP-Ribosylation of DNA. *Mol. Cell* **64**, 1109–1116 (2016).
28. Schuller, M. & Ahel, I. Beyond protein modification: the rise of non-canonical ADP-ribosylation. **2**, 463–477 (2022).
29. Yoshihisa, T. Handling tRNA introns, archaeal way and eukaryotic way. *Front. Genet.* **5**, 1–16 (2014).
30. Spinelli, S. L., Malik, H. S., Consaul, S. A. & Phizicky, E. M. A functional homolog of a yeast tRNA splicing enzyme is conserved in higher eukaryotes and in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14136–14141 (1998).
31. Baysarowich, J. *et al.* Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: Structure and diversity of Arr. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 4886–4891 (2008).
32. Tromans-Coia, C. *et al.* TARG1 protects against toxic DNA ADP-ribosylation. *Nucleic Acids Res.* **49**, 10477–10492 (2021).
33. Min, W. K., Cortes, U., Herceg, Z., Tong, W. M. & Wang, Z. Q. Deletion of the nuclear isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) reveals its function in DNA repair, genomic stability and tumorigenesis. *Carcinogenesis* **31**, 2058–2065 (2010).
34. Palazzo, L. *et al.* Serine is the major residue for ADP-ribosylation upon DNA damage. *Elife* **7**, 1–12 (2018).
35. Teixeira, P. F., Wang, H. & Nordlund, S. Nitrogenase switch-off and regulation of ammonium assimilation in response to light deprivation in *Rhodospirillum rubrum* are influenced by the nitrogen source used during growth. *J. Bacteriol.* **192**, 1463–1466 (2010).
36. Rack, J. G. M., Perina, D. & Ahel, I. Macrodomains: Structure, Function, Evolution, and Catalytic Activities. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 431–454 (2016).
37. Till, S. & Ladurner, A. G. Sensing NAD metabolites through macro domains. *Front. Biosci.* **14**, 3246–3258 (2009).
38. Tromans-Coia, C. *et al.* TARG1 protects against toxic DNA ADP-ribosylation. *Nucleic Acids Res.* **49**, 10477–10492 (2021).
39. Bütepage, M. *et al.* Nucleolar-nucleoplasmic shuttling of TARG1 and its control by DNA

- damage-induced poly-ADP-ribosylation and by nucleolar transcription. *Sci. Rep.* **8**, 1–17 (2018).
40. Sharifi, R. *et al.* Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. *EMBO J.* **32**, 1225–1237 (2013).
 41. Huergo, L. F. *et al.* Effects of over-expression of the regulatory enzymes DraT and DraG on the ammonium-dependent post-translational regulation of nitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense*. *Arch. Microbiol.* **183**, 209–217 (2005).
 42. Yagüe, P., Lopez-Garcia, M. T., Rioseras, B., Sanchez, J. & Manteca, A. New insights on the development of *Streptomyces* and their relationships with secondary metabolite production. *Curr. trends Microbiol.* **8**, 65–73 (2012).
 43. Nodwell, J. R. Microbe profile: *Streptomyces coelicolor*: A burlesque of pigments and phenotypes. *Microbiol. (United Kingdom)* **165**, 953–955 (2019).
 44. Barka, E. A. *et al.* Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 1–43 (2016).
 45. Niu, Y. *et al.* A Type I-F Anti-CRISPR Protein Inhibits the CRISPR-Cas Surveillance Complex by ADP-Ribosylation. *Mol. Cell* **80**, 512-524.e5 (2020).
 46. Rack, J. G. M. *et al.* (ADP-ribosyl)hydrolases: Structural Basis for Differential Substrate Recognition and Inhibition. *Cell Chem. Biol.* **25**, 1533-1546.e12 (2018).
 47. Wang, M. Y. *et al.* SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 1–17 (2020).
 48. Russo, L. C. *et al.* The SARS-CoV-2 Nsp3 macrodomain reverses PARP9/DTX3L-dependent ADP-ribosylation induced by interferon signaling. *J. Biol. Chem.* **297**, 101041 (2021).
 49. Fehr, A. R. *et al.* The conserved coronavirus macrodomain promotes virulence and suppresses the innate immune response during severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *MBio* **7**, 1–12 (2016).
 50. Alhammad, Y. M. O. *et al.* The SARS-CoV-2 Conserved Macrodomain Is a Mono-ADP-Ribosylhydrolase. *J. Virol.* **95**, (2021).
 51. Durrant, J. D. & McCammon, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol.* **9**, 71 (2011).
 52. Morris, G. M. & Lim-Wilby, M. Molecular Docking. in *Encyclopedic Reference of*

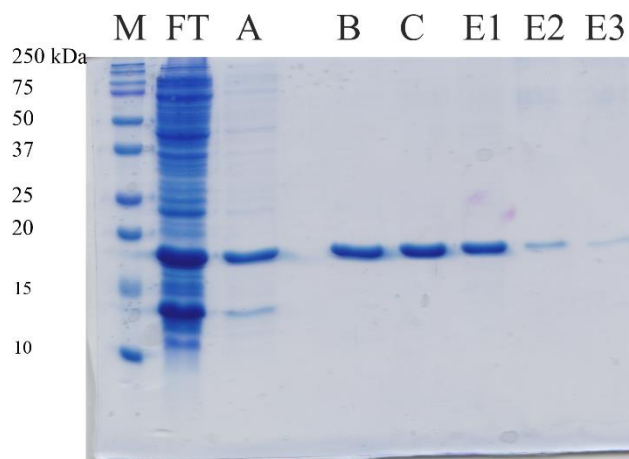
- Genomics and Proteomics in Molecular Medicine* vol. 443 365–382 (2008).
53. Lill, M. Virtual screening in drug design. *Methods Mol. Biol.* **993**, 1–12 (2013).
 54. Lin, J. H., Perryman, A. L., Schames, J. R. & McCammon, J. A. Computational drug design accommodating receptor flexibility: The relaxed complex scheme. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5632–5633 (2002).
 55. Schames, J. R. *et al.* Discovery of a Novel Binding Trench in HIV Integrase. *J. Med. Chem.* 1879–1881 (2004).
 56. Halgren, T. A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. *J. Med. Chem.* **47**, 1750–1759 (2004).
 57. Pigac, J. & Schrepf, H. A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other streptomycetes by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 352–356 (1995).
 58. Hobbs, G., Frazer, C. M., Gardner, D. C. J., Cullum, J. A. & Oliver, S. G. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 272–277 (1989).
 59. Kieser, D.T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. & Hopwood, D. A. *Practical Streptomyces Genetics*. (Norwich: John Innes Foundation, 2000).
 60. Xiao, Y.-H. & Pei, Y. Asymmetric Overlap Extension PCR Method for Site-Directed Mutagenesis. in vol. 687 277–282 (Humana Press, 2011).
 61. Gasteiger, E. *et al.* The Proteomics Protocols Handbook. *Proteomics Protoc. Handb.* 571–608 (2005).
 62. Waterhouse, A. *et al.* SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* **46**, W296–W303 (2018).
 63. Chen, V. B. *et al.* MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21 (2010).
 64. Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. & Sherman, W. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **27**, 221–234 (2013).
 65. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
 66. Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F. & Forli, S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J. Chem. Inf. Model.* **61**,

- 3891–3898 (2021).
67. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **32**, NA-NA (2009).
 68. Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J. & Goodsell, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.* **28**, 1145–1152 (2007).
 69. Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility.
 70. Roe, D. R. & Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 3084–3095 (2013).
 71. Case, D. A. *et al.* Amber 2016. *Univ. California, San Fr.* 191–727 (2016).
 72. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
 73. Irwin, J. J. & Shoichet, B. K. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* **45**, 177–182 (2005).
 74. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: A knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.* **36**, 901–906 (2008).
 75. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1074–D1082 (2018).
 76. Greenwood, J. R., Calkins, D., Sullivan, A. P. & Shelley, J. C. Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **24**, 591–604 (2010).
 77. Edgar, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797 (2004).
 78. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–1549 (2018).
 79. Whelan, S. & Goldman, N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 691–699 (2001).
 80. Holm, L. Dali server : structural unification of protein families. **50**, 210–215 (2022).
 81. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**,

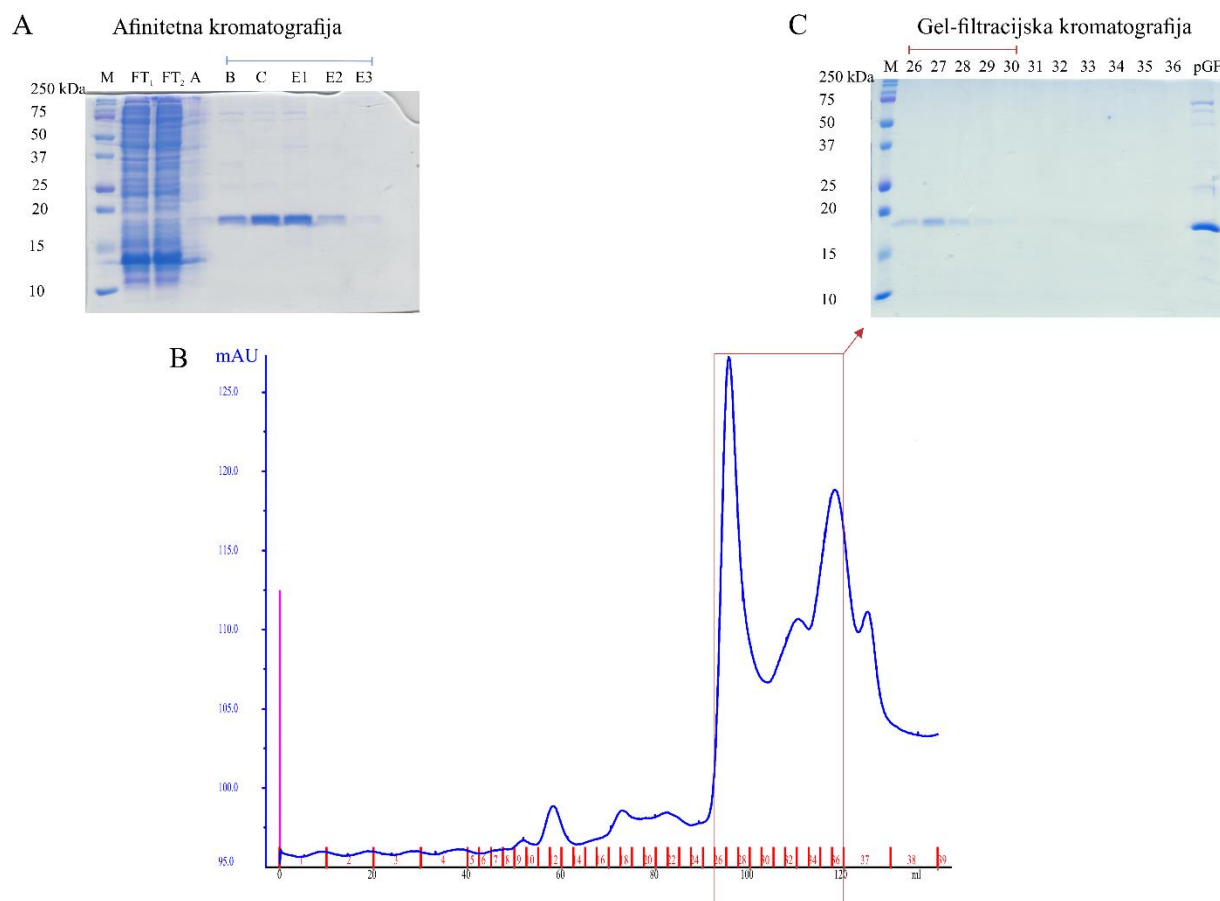
- 583–589 (2021).
82. Yoshida, T. & Tsuge, H. Substrate N2 atom recognition mechanism in pierisin family DNA-targeting, guanine-specific ADP-ribosyltransferase ScARP. *J. Biol. Chem.* **293**, 13768–13774 (2018).
 83. Nakano, T. *et al.* ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*. *Toxicon* **63**, 55–63 (2013).
 84. Schuller, M. *et al.* Molecular basis for DarT ADP-ribosylation of a DNA base. *Nature* **596**, 597–602 (2021).
 85. Jurrus, E. *et al.* Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci.* **27**, 112–128 (2018).
 86. Van Zundert, G. C. P. *et al.* The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J. Mol. Biol.* **428**, 720–725 (2016).
 87. Lawarée, E. *et al.* DNA ADP-Ribosylation Stalls Replication and Is Reversed by RecF-Mediated Homologous Recombination and Nucleotide Excision Repair. *Cell Rep.* **30**, 1373-1384.e4 (2020).
 88. Ni, X. *et al.* Structural Insights into Plasticity and Discovery of Remdesivir Metabolite GS-441524 Binding in SARS-CoV-2 Macrodomein. *ACS Med. Chem. Lett.* **12**, 603–609 (2021).
 89. Dasovich, M. *et al.* High-Throughput Activity Assay for Screening Inhibitors of the SARS-CoV-2 Mac1 Macrodomein. *ACS Chem. Biol.* (2021) doi:10.1021/acscchembio.1c00721.
 90. Giugliarelli, A., Paolantoni, M., Morresi, A. & Sassi, P. Denaturation and preservation of globular proteins: The role of DMSO. *J. Phys. Chem. B* **116**, 13361–13367 (2012).
 91. Frick, D. N., Viridi, R. S., Vuksanovic, N., Dahal, N. & Silvaggi, N. R. Molecular Basis for ADP-Ribose Binding to the Mac1 Domein of SARS-CoV-2 nsp3. *Biochemistry* **59**, 2608–2615 (2020).
 92. Zaveri, A. *et al.* Depletion of the DarG antitoxin in *Mycobacterium tuberculosis* triggers the DNA-damage response and leads to cell death. *Mol. Microbiol.* **114**, 641–652 (2020).
 93. Stegmann, K. M. *et al.* The folate antagonist methotrexate diminishes replication of the coronavirus SARS-CoV-2 and enhances the antiviral efficacy of remdesivir in cell culture models. *Virus Res.* **302**, 198469 (2021).
 94. Caruso, A. *et al.* Methotrexate inhibits SARS-CoV-2 virus replication “in vitro”. *J. Med.*

-
- Viol.* **93**, 1780–1785 (2021).
95. Kokić, G. *et al.* Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. *Nat. Commun.* **12**, 1–7 (2021).
96. Kumar, V., Kancharla, S. & Jena, M. K. In silico virtual screening-based study of nutraceuticals predicts the therapeutic potentials of folic acid and its derivatives against COVID-19. *VirusDisease* **32**, 29–37 (2021).

§ 9. Dodatak



Slika D1. Pročišćavanje dvostrukog mutanta K34/89E proteina SCO6735 afinitetnom kromatografijom. Ispiranja i eluati analizirani su SDS-PAG elektroforezom. Za daljnju biokemijsku analizu spojena su i ukoncentrirana ispiranja B i C te eluat 1 (E1). Budući da su divlji tip proteina i ostali ispitivani mutanti (osim mutanta H24Y) imali sličnu čistoću i prinos, nisu prikazani njihovi SDS-PAGE gelovi.

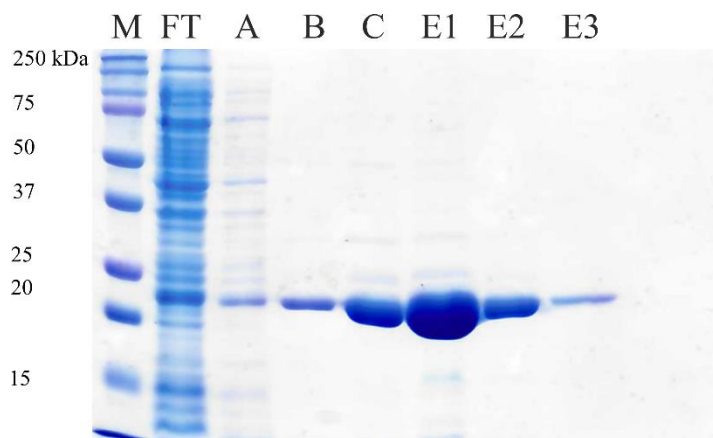


Slika D2. Pročišćavanje mutiranog proteina SCO6735 H24Y metodom afinitetne i gel-filtracijske kromatografije. Nakon afinitetne kromatografije uzorci su analizirani SDS-PAG elektroforezom (A). Spojena su ispiranja B i C te tri elucije označene plavom linijom. Uzorak je potom ukoncentriran i dodatno pročišćen gel-filtracijskom kromatografijom. Kromatogram je prikazan pod (B). Uzorci u volumenima 26 – 36 mL (označeni crvenim kvadratom) analizirani su na SDS-PAGE gelu prikazanom pod (C). Uzorak prije počišćivanja gel filtracijskom kromatografijom nanesen je u jažicu označenu pGF. Za daljnju analizu spojeni su i ukoncentrirani samo uzorci u volumenima 26 – 30 mL.

Tablica D1. Puna imena vrsta organizama čiji su makrodomenski proteini odabrani za filogenetsku analizu čiji su rezultati prikazani na slici 13.

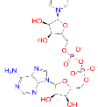
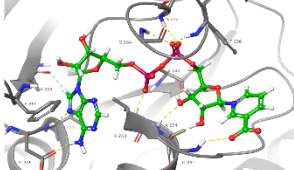
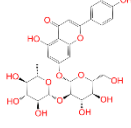
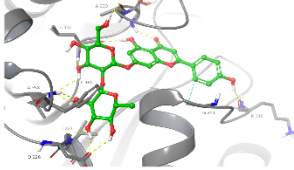
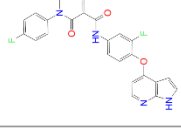
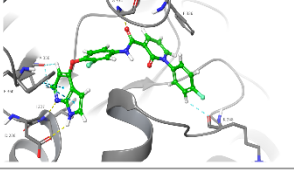
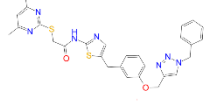
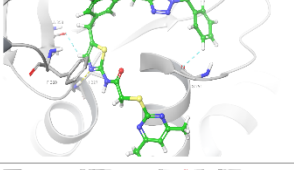
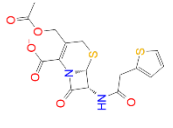
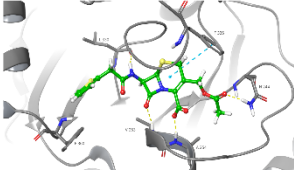
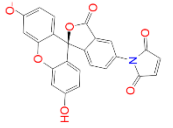
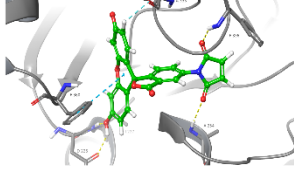
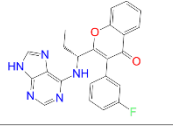
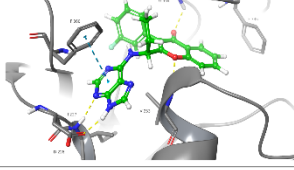
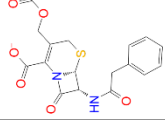
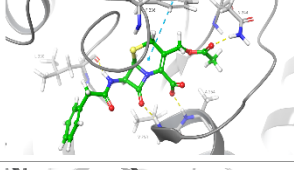
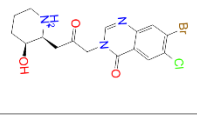
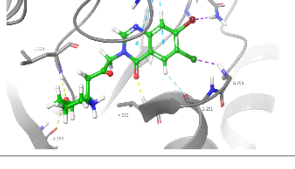
Makrodomenski protein/Vrsta	NCBI kod
ALC1-nalik	
<i>Homo sapiens</i> ALC1	AAO49505
<i>Streptomyces coelicolor</i> SCO6735	CAB40685
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	KAB4474009
<i>Deinococcus radiotolerans</i>	WP_189068660
<i>Flavobacterium reichenbachii</i>	WP_035681448
TARG1	
<i>Homo sapiens</i> TARG1	NP_001316613
<i>Amphimedon queenslandica</i>	XP_019851965
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	AVQ19530
<i>Magnetococcales bacterium</i>	MBA42542
<i>Paenibacillus durus</i>	WP_042208697
DarG	
<i>Escherichia coli</i>	CAS08640
<i>Deinococcus indicus</i>	WP_088249216
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	WP_193692490
<i>Streptomyces scopuliridis</i>	WP_030355665
<i>Thermus aquaticus</i>	WP_003046167
Macro2	
<i>Amphimedon queenslandica</i>	XP_003388308
<i>Physcomitrium patens</i>	XP_024388278
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AJS61953
<i>Deinococcus radiotolerans</i>	WP_189069767
<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>	ABX02660

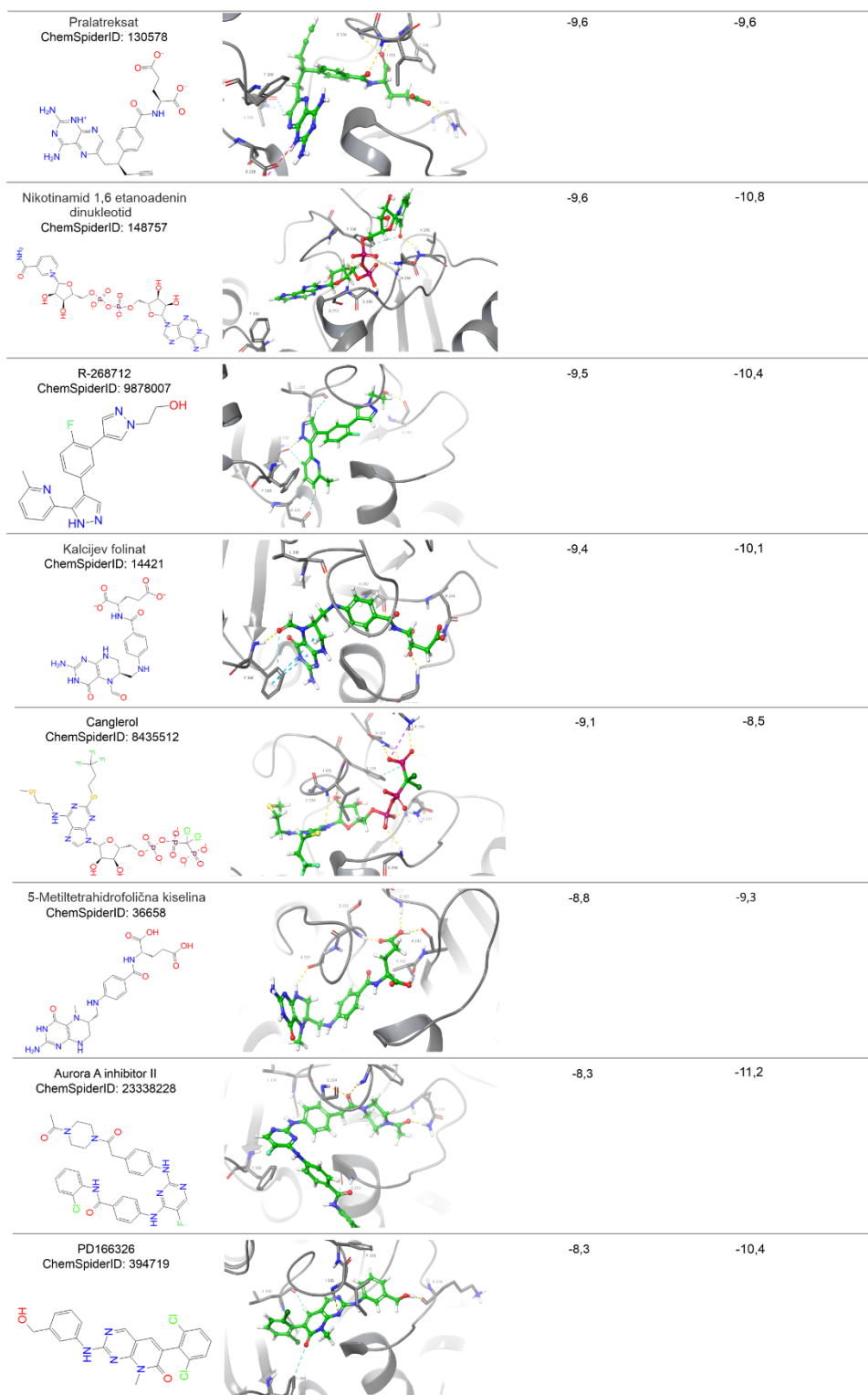
<i>Streptomyces griseus</i>	WP_030758248
MacroD	
<i>Homo sapiens</i> MACROD1	AAH03188
<i>Homo sapiens</i> MACROD2	A1Z1Q3
<i>Amphimedon queenslandica</i>	XP_019851841
<i>Escherichia coli</i> YmdB	CAD6017033
<i>Deinococcus radiodurans</i>	WP_010888916
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	WP_011066681
<i>Streptomyces coelicolor</i> SCO6450	CAA22759
MacroH2A	
<i>Homo sapiens</i> H2A.1	NP_613258
<i>Homo sapiens</i> H2A.2	NP_061119
<i>Amphimedon queenslandica</i>	XP_003389250
<i>Capsaspora owczarzaki</i>	XP_004347529
PARG	
<i>Corallocooccus macrosporus</i>	013938184
<i>Deinococcus radiodurans</i>	AAF12648
<i>Flavobacterium reichenbachii</i>	WP_035681451
<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>	ABX04261
<i>Streptomyces coelicolor</i> SCO0909	CAB62700
<i>Thermomonospora curvata</i>	ACY97295



Slika D3. Pročišćavanje makrodomene Mac1 virusa SARS-CoV-2 afinitetnom kromatografijom.

Ispiranja i eluati analizirani su SDS-PAG elektroforezom. Za daljnju biokemijsku analizu spojena su i ukoncentrirana ispiranja B i C te eluati 1, 2 i 3.

Ime spoja	Način vezanja	Bodovi vrednovanja molekuskog uklapanja (kcal mol ⁻¹)	
		Glide	AutoDock Vina
Deamido NAD (NAAD) ChemSpider ID: 145043 		-12,4	-10,4
Rhoifolin ChemSpider ID: 4445347 		-11,8	-11,1
BMS-2 ChemSpider ID: 19889726 		-10,5	-12,5
Sirt2-IN-1 ChemSpider ID: 59052127 		-10,4	-10,7
Cefalotin ChemSpider ID: 5801 		-10,4	-8,6
5-Maleimido-fluorescein ChemSpider ID: 108857 		-10,3	-13,9
Tenalisib R enantiomer ChemSpider ID: 67896571 		-10,2	-11,2
Cefaloram ChemSpider ID: 15183737 		-10,2	-9,5
Halofuginone ChemSpider ID: 9766102 		-9,9	-9,7



Slika D4. Predviđeni načini vezanja spojeva koji nisu pokazali dobar afinitet vezanja tijekom ITC mjerenja u zadanim uvjetima. Prikazani su načini vezanja dobiveni programom *Glide* opcijom *Standard Precision*. Desno su prikazani bodovi molekuskog vrednovanja dobiveni

programom *Glide* i *AutoDock Vina*. U programu *AutoDock Vina* je korištena opcija fleksibilnog molekuskog uklapanja, tijekom kojeg su bile dozvoljene rotacije bočnih ogranaka Phe360, Ile335 i Phe336.

§ 10. Životopis

Rođena sam u Karlovcu 20. 9. 1993. godine gdje sam 2012. godine završila Prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Iste sam godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala Preddiplomski studij molekularne biologije. Prvostupničku diplomu sam stekla 2015. godine izradom završnog rada: “Uloga tioredoksina u adaptaciji stanice na oksidativni stres”, pod vodstvom prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj te sam iste godine upisala Diplomski studij molekularne biologije. U srpnju 2017. godine sam primila Rektorovu nagradu u kategoriji individualnog znanstvenog i umjetničkog rada za rad pod naslovom: “Najmanji analog tRNA Leu koji se može uspješno aminoacilirati leucil-tRNA-sintetazom”, izrađen pod vodstvom doc. dr. sc. Morane Dulić. Diplomirala sam 2018. godine s radom “Elongacijski faktor Tu kao potencijalni marker mistranslacijskog stresa u bakteriji *Escherichia coli*” pod mentorstvom prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj. Od srpnja iste godine do danas sam zaposlena kao asistent u Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković. Članica sam Hrvatskog biofizičkog društva.

ZNANSTVENO USAVRŠAVANJE

2022. godine - kratki studijski boravak u Dunn School of Pathology, University of Oxford, u laboratoriju prof. dr. sc. Ivana Ahela (mjesec dana)

2020. godine – završen tečaj „Introduction to Molecular Modeling in Drug Discovery“ u sklopu online tečajeva tvrtke Schrodinger

ZNANSTVENE PUBLIKACIJE

1. Zhu, Kang; Suskiewicz, Marcin J.; Hloušek-Kasun, Andrea; Meudal, Hervé; Mikoč, Andreja; Aucagne, Vincent; Ahel, Dragana; Ahel, Ivan
DELTEX E3 ligases ubiquitylate ADP-ribosyl modification on protein substrates. // Science advances, 8 (2022), 40; 4253, 17 doi:10.1126/sciadv.add4253 (međunarodna

recenzija, članak, znanstveni)

2. Hloušek-Kasun, Andrea; Mikolčević, Petra; Matthias Rack, Johannes Gregor; Tromans-Coia, Callum; Schuller, Marion; Jankevicius, Gytis; Matković, Marija; Bertoša, Branimir; Ahel, Ivan; Mikoč, Andreja
Streptomyces coelicolor macrodomain hydrolase SCO6735 cleaves thymidine-linked ADP-ribosylation of DNA. // Computational and structural biotechnology journal, 20 (2022), 4337-4350 doi:10.1016/j.csbj.2022.08.002 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
3. Beljan, Silvestar; Dominko, Kristina; Talajić, Antea; Hloušek-Kasun, Andrea; Škrobot Vidaček, Nikolina; Herak Bosnar, Maja; Vlahoviček, Kristian; Četković, Helena
Structure and function of cancer-related developmentally regulated GTP-binding protein 1 (DRG1) is conserved between sponges and humans. // Scientific Reports, 12 (2022), 11379, 20 doi:10.1038/s41598-022-15242-2 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
4. Mikolčević, Petra; Hloušek-Kasun, Andrea; Ahel, Ivan; Mikoč, Andreja
ADP-ribosylation systems in bacteria and viruses. // Computational and Structural Biotechnology Journa, 19 (2021), 2366-2383 doi:10.1016/j.csbj.2021.04.023 (međunarodna recenzija, pregledni rad, znanstveni)
5. Sviben, Dora; Bertoša, Branimir; Hloušek- Kasun, Andrea; Forčić, Dubravko; Halassy, Beata; Brgles, Marija
Investigation of the thermal shift assay and its power to predict protein and virus stabilizing conditions. // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 161 (2018), 73-82 doi:10.1016/j.jpba.2018.08.017 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

SUDJELOVANJA NA KONGRESIMA

Sažeci u zbornicima

Hloušek-Kasun, Andrea; Mikolčević, Petra; Tromans-Coia, Callum; Jankevicius, Gytis; Matković, Marija; Bertoša, Branimir; Ahel, Ivan; Mikoč, Andreja
Macrodomain hydrolase SCO6735 from Streptomyces coelicolor reverses genotoxic stress induced by T-linked DNA ADP-ribosylation. // FEBS Advances Lectures Course PARP2021:PARP Research on the family of poly(ADP-ribose) polymerases : Book of abstracts Barcelona, 2021. str. 60-60 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Mikolčević, Petra; Hloušek-Kasun Andrea; Andreja Mikoč
Bacterial PARP/PARG enzymes – filogenetic and structural comparisson. // PARP2021 Barcelona, 2021. str. 23-23 (poster, sažetak, znanstveni)

Mikolčević, Petra; Hloušek-Kasun, Andrea; Deeksha Munnur, Edward Bartlett, Ilsa T. Kirby, Johannes Rack, Michael S. Cohen, Ivan Ahel; Mikoč, Andreja RNA – a novel substrate of bacterial ADP-ribosyltransferases. // PARP2019 / Bai, Peter ; Corda, Daniela ; Curtin, Nicola ; Yelamos, José (ur.). Budimpešta, 2019. str. 30-30 (poster, sažetak, znanstveni)

Hloušek-Kasun, Andrea; Mikolčević, Petra; Sabljčić, Igor; Bertoša, Branimir; Ahel, Ivan; Mikoč, Andreja The structure of ADP-ribosyltransferase SCO3734 from bacterium *Streptomyces coelicolor*. // Hot Topics in Contemporary Crystallography 4 / Sabljčić, Igor (ur.). Zagreb, 2019. 14, 1 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

Hloušek-Kasun, Andrea; Mikolčević, Petra; Jankevicius, Gytis; Tromans-Coia, Callum; Sabljčić, Igor; Bertoša, Branimir; Ahel, Ivan; Mikoč, Andreja Macrodomein protein from *Streptomyces coelicolor* - SCO6735 reverses T-linked DNA ADP-ribosylation. // PARP 2019 / Curtin, Nikola ; Corda, Daniela ; Yelamos, Jose ; Bai, Peter (ur.). Budimpešta, 2019. 28, 1 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Mikolčević, Petra; Hloušek-Kasun, Andrea; Mikoč, Andreja Ins and Outs of ADP-ribosylation in *Streptomyces coelicolor*. // 3rd International Conference on PTMs in Bacteria 2018 Abstract Book / Macek, Boris ; Forchhammer, Karl ; Mijakovic, Ivan ; Grangeasse, Christophe ; Weber-Ban, Eilika ; Hardouin, Julie (ur.). Tuebingen, 2018. str. 10-10 (predavanje, sažetak, znanstveni)

Hloušek-Kasun, Andrea; Bertoša, Branimir; Sviben, Dora; Forčić, Dubravko; Halassy, Beata; Brgles, Marija Ovalbumin thermal stability dependence on pH. // The 14 th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics ABC of Physics of Life: Book of abstracts Split, Hrvatska, 2018. str. 83-83 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)