

In silico određivanje inhibitora ART1 enzima kod raka pluća ne-malih stanica metodom molekularnog pristajanja

Krsnik, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:498807>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Antonia Krsnik

***IN SILICO* ODREĐIVANJE
INHIBITORA ART1 ENZIMA KOD
RAKA PLUĆA NE-MALIH
STANICA METODOM
MOLEKULARNOG PRISTAJANJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za bioinformatiku na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Janka Diminića, te uz pomoć prof. dr. sc. Antonia Starčevića.

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Janku Diminiću te prof. dr. sc. Antoniu Starčeviću na pomoći pri izradi diplomskog rada te danim savjetima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za bioinformatiku

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

IN SILICO ODREĐIVANJE INHIBITORA ART1 ENZIMA KOD RAKA PLUĆA NE-MALIH STANICA METODOM MOLEKULARNOG PRISTAJANJA

Antonia Krsnik, univ. bacc.ing. biotechn.
0058215974

Sažetak: Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti potencijalne inhibitore ART1 enzima kod raka pluća ne-malih stanica *in silico* metodom molekularnog pristajanja (engl. *molecular docking*). Katalitička domena ART1 enzima eksperimentirana je na površini tumorskih stanica te posttranslacijskom modifikacijom P2X7 receptora CD8+ T imunoloških stanica koje se nalaze u blizini uzrokuje NAD-induciranu smrt stanice (engl. *NAD-induced cell death, NICD*). Kao potencijalni inhibitori spomenutog ART1 enzima testirani su prirodni spojevi te strukturni analozi sintetskih spojeva koji su se pokazali kao inhibitori iste obitelji enzima u koje spada i ART1 enzim (PARP i MART enzimi). Molekularno pristajanje provedeno je na web poslužitelju SwissDock nakon čega je slijedila validacija rezultata u AutoDock programu. Na temelju rezultata molekularnog pristajanja, u užu izbor potencijalnih inhibitora izabrana su četiri spoja čija su svojstva zatim detaljnije razmotrena.

Ključne riječi: *in silico*, molekularno pristajanje, ART1 enzim, inhibitori, svojstva inhibitora

Rad sadrži: 70 stranica, 29 slika, 10 tablica, 64 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Janko Diminić

Pomoć pri izradi: prof.dr.sc. Antonio Starčević

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Anita Horvatić (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Janko Diminić (mentor)
3. prof. dr. sc. Antonio Starčević (član)
4. izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević (zamjenski član)

Datum obrane: 7. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Bioinformatics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

IN SILICO DETERMINATION OF ART1 ENZYME INHIBITORS IN NON-SMALL CELL LUNG
CANCER USING MOLECULAR DOCKING

Antonia Krsnik, univ. bacc.ing. biotechn.
0058215974

Abstract: The aim of this master's thesis was to determine potential inhibitors of ART1 enzyme in non-small cell lung cancer (NSCLC) *in silico* using molecular docking. The catalytic domain of the ART1 enzyme is expressed on the surface of tumor cells and post-translational modification of the P2X7 receptor of nearby CD8+ T immune cells causes NAD-induced cell death. As potential inhibitors of the aforementioned ART1 enzyme, natural compounds and structural analogues of synthetic compounds were tested, which proved to be inhibitors of the same family of enzymes that include ART1 enzyme (PARP and MART enzymes). Molecular docking was carried out on the SwissDock web server followed by validation of the results in the AutoDock program. Based on the results of molecular docking, four compounds were shortlisted in the selection of potential inhibitors whose properties were then considered in more detail.

Keywords: *in silico*, molecular docking, ART1 enzyme, inhibitors, inhibitor properties

Thesis contains: 70 pages, 29 figures, 10 tables, 64 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Janko Diminić, PhD, Associate professor

Technical support and assistance: Antonio Starčević, PhD, Full professor

Reviewers:

1. Anita Horvatić, PhD, Assistant professor (president)
2. Janko, Diminić, PhD, Associate professor (mentor)
3. Antonio Starčević, PhD, Full professor (member)
4. Igor Stuparević, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: July 7th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. MOLEKULARNO PRISTAJANJE	3
2.1.1. Kruto, kruto-fleksibilno i fleksibilno molekularno pristajanje	4
2.1.2. Algoritmi pretraživanja	5
2.1.3. SwissDock i AutoDock.....	8
2.1.4. QSAR	10
2.2. LIGANDI – INHIBITORI ENZIMA	11
2.2.1. ADME	12
2.3. RAK PLUĆA NE-MALIH STANICA	13
2.3.1. ART1 protein	14
2.3.2. ART1 kod karcinoma pluća ne-malih stanica	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. KORACI U PROVOĐENJU EKSPERIMENTA:	17
3.2. STRUKTURA PROTEINA ART1 I HOMOLOGNI PROTEINI	17
3.2.1. SmartBLAST i MADOKA	19
3.3. ODABIR PRIRODNIH LIGNADA – POTENCIJALNIH INHIBITORA ART1 ENZIMA	19
3.4. PROVEDBA MOLEKULARNOG PRISTAJANJA	20
3.4.1. Slijepa proba.....	22
3.5. MOLEKULARNO PRISTAJANJE U AUTODOCK PROGRAMSKOM PAKETU	22
3.6. MOLEKULARNO PRISTAJANJE SA OSTALIM MART ENZIMIMA	27
3.7. SWISSADME	28
3.8. SWISS TARGET PREDICTION	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. REZULTATI	31
4.1.1. Struktura proteina ART1 i homologni proteini.....	31
4.1.2. Izabrani prirodni ligandi	36
4.1.3. Slijepa proba.....	44
4.1.4. Molekularno pristajanje u SwissDock-u.....	46
4.1.5. Molekularno pristajanje u programskom paketu AutoDock.....	51
4.1.6. Molekularno pristajanje sa ostalim MART enzimima	56
4.1.7. Rezultati SwissADME-a	57
4.1.8. Rezultati sa SwissTargetPrediction.....	59
4.2. RASPRAVA	60

5. ZAKLJUČCI:	63
6. LITERATURA	64

1. UVOD

Razvoj novih lijekova dugotrajan je, skup i izazovan proces koji će u najviše slučajeva biti uspješan ako se tijekom istraživanja identificira ispravan vodeći spoj (engl. *lead compound*). Vodeći spoj karakterizira biološka aktivnost odnosno potencijal da djeluje na ciljanu (engl. *target*) makromolekulu u organizmu i samim time utječe na liječenje određene bolesti (Stanzione i sur., 2021). No s obzirom na veliki broj molekula koje je prethodno potrebno testirati na željenu aktivnost te na temelju čijih se rezultata u konačnici izdvaja vodeća molekula (koja se u kliničkim istraživanjima na kraju možda neće pokazati kao dobar odabir), sam razvoj može trajati godinama a troškovi mogu u nekim slučajevima doseći i preko milijardu dolara. Tufts centar za Učenje o razvoju lijekova, 2016. godine procijenio je da je u prošlom desetljeću trošak za razvoj novog lijeka te za njegov dolazak na tržište porastao za 145 %. S druge strane, broj lijekova koji su se pokazali dovoljno uspješni u kliničkim istraživanjima te su dobili odobrenje od Američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) pao je na svega 12 % (DiMasi i sur., 2016).

Kako bi se ubrzao proces odabira molekula koje potencijalno imaju terapijski značaj te se ujedno smanjio i trošak razvoja novih terapijskih pripravaka, početkom 80-tih godina prošlog stoljeća za razvoj lijekova počinje se primjenjivati molekularno pristajanje (engl. *molecular docking*). Molekularno pristajanje spada u računalno potpomognuti razvoj lijekova te je osnova za otkriće lijekova na temelju strukture ciljane makromolekule. Najčešće se provodi između male molekule odnosno liganda te makromolekule pri čemu je to skoro uvijek protein (Morris i Lim-Wilby, 2008). Ono što je cilj pri tome jest dobiti informacije o tome hoće li se ligand vezati za ciljanu makromolekulu te koje će konformacije pri tome poprimiti (engl. *binding modes*) i kakav je afinitet vezanja odnosno je li to vezanje energetski povoljno (engl. *binding affinity*) (Meng i sur., 2011).

Prognoza pacijenta koji boluju od raka pluća ne-malih stanica je najčešće loša te u velikom broju slučajeva dolazi do smrtnog ishoda. Kod liječenja takve vrste karcinoma uveliko su pomogli inhibitori imunskih kontrolnih točaka (Duma i sur., 2019), no takva imunoterapija ne pokazuje se dovoljno učinkovita prilikom duljeg tretiranja bolesti zbog raznih mehanizama rezistencije tumorskih stanica (Wennerberg i sur., 2022a). Početkom prošle godine, Wennerberg i suradnici otkrili su postojanje ART1 receptora na površini stanica karcinoma ne-malih stanica pluća čija aktivnost djeluje na CD8⁺ T stanice u blizini i dovodi do njihove smrti. Inhibicijom

ART1 receptora, CD8⁺ T stanice bile bi pošteđene njegova djelovanja te bi mogle pravilno reagirati i djelovati citotoksično na stanice karcinoma.

Cilj ovog rada bio je provesti molekularno pristajanje kako bi se izdvojile male molekule prirodnog porijekla koje vezanjem na ART1 receptor eksprimiran na tumorskim stanicama karcinoma pluća ne-malih stanica mogu inhibirati njegovo djelovanje. Pri tome su korištena dva alata za molekularno pristajanje; SwissDock (Grosdidier i sur., 2011a; Grosdidier i sur., 2011b) i AutoDock (Morris i sur., 2009) te Chimera UCSF (Pettersen i sur., 2004) za vizualizaciju dobivenih rezultata. Također korištene su baze podataka PubChem (Kim i sur., 2023), COCONUT:Natural Products Online (Sorokina i sur., 2021) te ZINC AC (Irwin i Shoichet, 2005) kako bi se dobile strukture i podaci o spojevima izabranima kao potencijalni inhibitori te UniProt (The Uniprot Consortium, 2023) i AlphaFold (Varadi i sur., 2022; Jumper i sur., 2021) kako bi se dobili podaci o proteinu ART1.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MOLEKULARNO PRISTAJANJE

Molekularno pristajanje može se definirati kao računalna tehnika koja se koristi u razvoju novih lijekova kako bi se predvidjele interakcije između male molekule (ligand) i ciljane makromolekule (mogu biti proteini, peptidi, DNA; u ovom radu fokus je na proteinima odnosno enzimima i receptorima). Vezanjem liganda na makromolekulu može doći do promjene konformacije makromolekule te time i do promjene njezine biološka funkcije; ako dolazi do povećanja aktivnosti onda je ligand aktivator, ako se aktivnost smanjuje radi se o inhibitoru (Roy i sur., 2015).

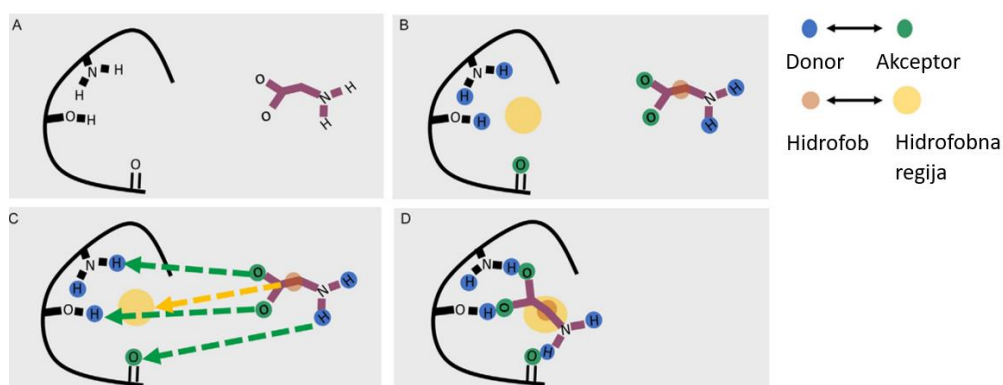
Kod razvoja lijekova na temelju strukture ciljane makromolekule (engl. *structure based drug design, SBDD*) upravo je molekularno pristajanje glavna metoda. SBDD temelji se na poznavanju trodimenzionalne strukture proteina, koja može biti određena eksperimentalno pomoću rendgenske kristalografije ili se može predvidjeti računalnim metodama na temelju poznate aminokiselinske sekvence. Poznavanje strukture proteina na kojeg želimo djelovati osnova je za odabir postojećih ili dizajn novih kemijskih spojeva koji će se vezati u aktivno mjesto enzima i time djelovati na njegovu aktivnost. Dobiveni rezultati molekularnog pristajanja služe dalje kao smjernice za optimizaciju testiranih spojeva kako bi djelovanje na protein bilo što efikasnije a selektivnost čim veća (Ferreira i sur., 2015).

Postoje dva osnovna koraka molekularnog pristajanja; u prvom koraku predviđaju se konformacija, pozicija i orijentacija liganda, pri čemu sva tri navedena faktora čine različite poze koje ligand zauzima unutar aktivnog mjesta enzima, točnije u mjestu vezanja (engl. *binding site*) (Stanzione i sur., 2021). Svaki enzim ima u svojoj strukturi aktivno mjesto koje se može podijeliti na domenu vezanja (engl. *binding site*) u kojoj dolazi do vezanja supstrata te katalitičku domenu (engl. *catalytic site*) u kojoj dolazi do katalitičke reakcije, tj. do kidanja postojećih, a formiranja novih veza unutar molekule (Thornton i Kahraman, 2008). Poželjno je da se mala molekula tijekom molekularnog pristajanja upravo veže u aktivno mjesto enzima jer je ono zaslužno za samu aktivnost enzima na koju se želi djelovati. Drugi korak bazira se na procjeni kvalitete poza koje ligand zauzima pomoću funkcija bodovanja (engl. *scoring functions*) (Stanzione i sur., 2021). Funkcije bodovanja su matematičke metode korištene kako bi se procijenio afinitet vezanja koji se određuje na temelju jačine ne-kovalentnih interakcija između dvije molekule nakon provedbe molekularnog dockinga (engl. *molecular docking*). Postoje tri vrste funkcija bodovanja: 1) temeljene na sili polja (engl. *force-field based*), 2)

temeljene na znanju (engl. *knowledge based*) te 3) empirijske funkcije bodovanja (engl. *empirical based*) (Dias i de Azevedo, 2008)

2.1.1. Kruto, kruto-fleksibilno i fleksibilno molekularno pristajanje

U samom početku molekularnog pristajanja provodilo se kruto pristajanje (engl. *rigid docking*). To znači da se konformacije proteina i liganda nisu mijenjale tijekom samog procesa pristajanja (Zhang i sur., 2022), a postupak je bio slijedeći; ligand i vezno mjesto proteina su predstavljani kao farmakoforne sfere različitih radijusa. Farmakor se definira kao skup steričkih i elektronskih karakteristika koje su potrebne da osiguraju optimalnu supramolekularnu interakciju sa specifičnom biološkom metom kako bi izazvali ili inhibirali njegov odgovor (Proekt i Hemmings, 2019). Nakon toga algoritam pretrage pokušava spariti sfere liganada sa sferama proteina tako da pokušava naći najbolje pristajanje (engl. *fit*) između liganda i veznog mjesta proteina uspoređujući relativne pozicije različitih farmakofornih sfera i sparujući sfere koje odgovaraju zajedno i komplementarne su kako bi se formirala poželjna interakcija. Ligand se nakon toga nalazi unutar veznog mjesta proteina na način da pozicija i orijentacija liganda budu namješteni tako da su atomi liganda postavljeni čim bliže sfernim centrima mjesta vezanja. U slučaju nepogodne orijentacije nastale zbog na primjer steričkih smetnji između liganda i veznog mjesta proteina, ligand se re-orijentira sve dok ne nađe povoljnu orijentaciju. Postupak je prikazan na slici 1. Orijehtacija se nakon toga ocjenjuje na temelju stupnja preklapanja farmakofornih sfera liganda i proteina (Stanzione i sur., 2021).



Slika 1. Kruto molekularno pristajanje (eng. *rigid docking*) (prema Stanzione i sur.,2021)

Slika A prikazuje ligand i protein kojima se želi provesti molekularno pristajanje. Donor-akceptor farmakoforne grupe te hidrofobne farmakoforne grupe prepisuju se ligandu i proteinu (slika B). Algoritam pretraživanja u slijedećem koraku pokušava spariti pogodne grupe na način da sparuje donore sa akceptorima te hidrofoban dio molekule liganda sa hidrofobnom

šupljinom proteina (slika C). Tako nastaje više različitih rješenja pristajanja (slika D). (prema Stanzione i sur., 2021)

Fleksibilno-kruto te fleksibilno pristajanje suvremeniji su pristupi koji se danas najviše koriste prilikom molekularnog pristajanja. Karakteristika fleksibilno-krutog pristajanje jest ta da ligand može poprimiti razne konformacije, odnosno fleksibilan je dok makromolekula zadržava fiksiranu konformaciju prilikom izvedbe pristajanja. Dobiveni rezultati točniji su od onih dobivenih krutim pristajanjem te je danas fleksibilno-kruto pristajanje jedno od najčešćih primijenjenih metoda (Fan i sur., 2019).

Osnova za razvoj fleksibilnog pristajanja potječe od modela vezanja supstrata za enzim nazvanog inducirano pristajanja. Inducirano pristajanje karakterizira promjena konformacije supstrata i aktivnog mjesta enzima sve do onog trenutka kada je supstrat u potpunosti vezan za enzim. Tada obje molekule zauzimaju svoju finalnu konformaciju. Hipotezu induciranog pristajanja predložio je Koshland i njegovi suradnici, 1958 godine. Slična situacija primjenjuje se kod fleksibilnog pristajanja gdje i ligand i makromolekula mogu zauzimati različite konformacije, tj. obje molekule su fleksibilne, a posebice rotirajuće veze i torzijski kutovi. Iako daje najbolje i najtočnije rezultate iziskuje kompliciranije izračune i dugotrajnije je (Fan i sur., 2019).

Ovisno o vrsti spomenutih molekularnih pristajanja koja se provode u namijenjenim programskim paketima, postoje različiti algoritmi pretraživanja kojima se dolazi do rezultata pristajanja.

2.1.2. Algoritmi pretraživanja

Algoritmi pretraživanja dizajnirani su kako bi pronalazili određene informacije pohranjene unutar baza podataka (Sultana i sur., 2017). Neki od najpoznatijih algoritama pretraživanja koji se često povezuju sa programima osmišljenim za molekularno pristajanje su inkrementalna konstrukcija (engl. *incremental construction, IC*), genetički algoritam (engl. *genetic algorithm*), Lamarckian genetički algoritam (engl. *Lamarckian genetic algorithm*), Monte Carlo pristup (engl. *Monte carlo approach*), simulativno prekaljivanje (engl. *simulated annealing, SA*) (Fan i sur., 2019). U programima za molekularno pristajanje koriste se jedan ili više spomenutih algoritama zajedno kako bi se predvidjele konformacije binarnog kompleksa sačinjenog od liganda i proteina (Dias i de Azevedo, 2008).

Inkrementalna konstrukcija je metoda u kojoj se odabrani ligand rascjepa na fragmente te svaki zasebno ulazi u mjesto vezanja receptora pri čemu se stvaraju interakcije sa

aminokiselinskim ostacima. Nakon što su fragmenti našli idealnu poziciju unutar veznog mjesta, oni se spajaju te stvaraju cjelinu, odnosno početnu molekulu liganda. Ova metoda rada primjenjuje se kod fleksibilnog pristajanja s obzirom da omogućuju „krutim“ dijelovima molekula liganada da se prvo pričvrste za vezno mjesto enzima, a potom se povezuju u prvobitnu strukturu zahvaljujući fleksibilnim dijelovima molekule koje čine rotirajuće veze. Opisani algoritam tako omogućuje da se ligand postepeno konstruira u povoljnu poziciju unutar aktivnog mjesta receptora (Dias i de Azevedo, 2008).

Lamarckian genetički algoritam spada u genetičke algoritme koji su dio šire slike a to je evolucijsko programiranje. Algoritmi evolucijskog programiranja rješavaju zadane probleme koristeći računalne metode napravljene po uzoru na evolucijske procese u prirodi; ovisno o tome koliko se dobro snalazi „kromosom“ pojedinca neke vrste u okolini, simuliraju evoluciju vrste na način da prolazi kroz procese selekcije, mutacije i reprodukcije. U tu svrhu koriste se genetski operatori, računalne aproksimacije prirodnih procesa, koji se koriste kako bi simulirali neprekidnost najpoželjnijih karakteristika. Konkretno gledajući određeni problem gdje postoji više različitih rješenja, svako rješenje rangira se na temelju predodređenih parametara te samo najbolje ocijenjeno rješenje ulazi u slijedeću računalnu petlju. Proces se ponavlja sve dok se ne pronađe optimalno rješenje (Dias i de Azevedo, 2008). Kod molekularnog pristajanja, genetički algoritam služi kako bi se našla točna ili približno točna konformacija sa minimalnom globalnom energijom koja predstavlja najstabilniju konformaciju. Nasumično generirana populacija rješenja (u ovom slučaju konformacije liganada) kao i sposobnost opstanka (engl. *fitness*) [u ovom slučaju je to energija vezanja za protein] svakog rješenja su evaluirani te su izabrana najpogodniji rezultati. Slijedi proces selekcije sličan prirodnoj selekciji pri čemu se prednost daje onim konformacijama čije je energija vezanja manja te takav izbor ulazi u slijedeću „generaciju“. U novoj generaciji koristi se genetički operatori kao što su crossing-over i mutacije kod prethodno izabranih rješenja. Pri tome dolazi do rekombinacije genetičkog materijala (konformacije liganada) te dolazi do nastanka novog rješenja. Mutacije podrazumijevaju uvođenje malih promjena u genetički materijal (tj. konformacije liganda). Nove konformacije evaluirane su na temelju sposobnosti opstanka te se proces ponavlja u nekoliko generacija sve dok se ne dobe zadovoljavajući rezultati. Kao input potrebna je približna veličina i lokacija aktivnog mjesta receptora kao i koordinate proteina te konformacija liganda. Genetičkim algoritmom unutar aktivnog mjesta receptora može se smjestiti cijeli ligand ili samo „kruti“ fragmenti liganda.

Lamarckian genetički algoritam primjenjuje se u jednom od najpoznatijih programskih paketa za molekularno pristajanje, a to je AutoDock koji je korišten i za potrebe ovog rada. Traži optimalnu konformaciju liganda koja će se dobro vezati za ciljani makromolekulu. Ono što ovaj algoritam razlikuje od samog genetičkog algoritma jest to što Lamarckian genetički algoritam ima sposobnost učenja; dopušta pojedinim rješenjima (konformacijama liganada) da se prilagode tijekom procesa optimizacije. To znači da individualna rješenja mogu poboljšati svoj fitnes (energiju vezanja) tako da koriste informacije iz okoline (površina proteina) te informacije o interakcijama između liganda i proteina. Ovakav mehanizam učenja postiže se na način da se rješenjima dopušta da modificiraju vlastiti genetički materijal tijekom procesa optimizacije, a nakon toga dobivene karakteristike prosljeđuju dalje na potomke. Postoji nekoliko koraka kod procesa LGA pristajanja; u prvom koraku populacija konformacija liganda je nasumično generirana, slijedi evaluacija fitnesa svake konformacije na temelju izračuna energije vezanja sa ciljanim proteinom. Nakon toga slično kao i kod GA, koriste se genetički operatori kao što su selekcija, crossing-over i mutacija kako bi se generirala nova populacija rješenja (konformacija liganda). Tijekom prethodnog procesa, mehanizam učenja dopušta rješenjima da se adaptiraju i poboljšaju svoj fitnes. Cjelokupni postupak se ponavlja sve dok nisu dobiveni zadovoljavajući rezultati. Iz ovoga se može zaključiti da LGA, zbog dopuštanja rješenjima da se adaptiraju i uče iz okoline, može potencijalno naći više optimalnih konformacija liganada koji se jače i bolje vežu za ciljani protein (OpenAI, 2023).

Kod Monte Carlo pristupa generira se veliki broj nasumično izabranih konformacija liganda te nakon toga ocjenjuje energiju vezanja svake konformacije. Energija vezanja računa se na temelju interakcija koje nastaju između liganda i proteina, a podrazumijevaju van der Waalove interakcije, elektrostatske interakcije te vodikove veze. Ovom metodom želi se istražiti konformacijski prostor molekule liganda koji obuhvaća sve trodimenzionalne konfiguracije ili oblike koje određeni ligand zauzima. Cilj je naći najpovoljniju pozu liganda za vezanja za ciljani protein. Na temelju dobivenih rezultata dobiva se uvid u interakcije koje nastaju na molekularnom nivou te se takva saznanja koriste u daljnjem procesu optimizacije ili dizajnu novih liganda čiji će afinitet vezanja i specifičnost biti veći (OpenAI, 2023).

Simulativno prekaljivanje (engl. *simulated annealing*) računalna je metoda koja se također koristi kod molekularnog pristajanja, a zasniva se na tome da se svaka docking konformacija uvodi u simulaciju gdje postepeno dolazi do smanjenja temperature u pravilnim vremenskim razmacima kroz nekoliko ciklusa simulacije. S obzirom da se konformacije i fleksibilnost liganda i proteina promatraju kroz vremenske intervale u drugačijim

termodinamičkim uvjetima, ova metoda daje točnije rezultate u usporedbi sa Monte Carlo pristupom. Potrebno je duže vrijeme izvođenja za ovu metodu jer zahtjeva ponavljanje ciklusa prekaljivanja za svaki ligand u veznom mjestu receptora. Simulativno prekaljivanje može se koristiti zajedno sa Monte Carlo algoritmom. Pri tome se događaju nasumične izmjene u orijentaciji liganda unutar veznog mjesta receptora kao posljedica promjene temperature u svakom ciklusu simulativnog prekaljivanja. Nakon toga rade se usporedbe energije vezanja trenutnog stanja sa energijom vezanja prethodnog stanja te se izabire ono stanje sa nižom energijom vezanja koje će se usporediti sa sljedećim stanjem (Dias i de Azevedo, 2008).

2.1.3. SwissDock i AutoDock

Postoje pet glavnih koraka u provedbi molekularnog pristajanja : 1) priprema proteina (receptor/enzim), 2) lociranje aktivnog mjesta, odnosno mjesta vezanja, 3) priprema liganda, 4) provedba molekularnog pristajanja u za to predviđenim programima te 5) analiza dobivenih rezultata (Sahoo i Mohapatra, 2020).

Neki od najpoznatijih programskih paketa za provedbu molekularnog pristajanja, a korišteni prilikom izrade ovog rada su AutoDock i SwissDock. Kako bi se provela simulacija molekularnog pristajanja potrebno je provesti dvije metode: prva je korištenje pretražnih algoritama objašnjeni gore u tekstu na temelju kojih se istražuje dostupan konformacijski prostor a nakon toga se energija svake konformacije procijeni na temelju polja sile (Huey i sur., 2007). AutoDock (Morris i sur., 2009) radi na principu semi-empirijskog polja sile slobodne energije (engl. *semi-empirical free energy force field*) kako bi se izračunala energija vezanja između molekule liganda i ciljanog proteina. Ligand i protein u početku nisu vezani te zauzimaju određene konformacije. Potrebno je u prvom koraku evaluirati promjenu intramolekularne energije koja će se dogoditi zasebno kod obje molekule; odnosno odrediti intramolekularnu energiju konformacije liganda/proteina dok nije vezan za protein/ligand te intramolekularnu energiju konformacije liganda/proteina koju će poprimiti nakon vezanja za protein/ligand. Nakon toga određuje se intermolekulska energija potrebna da nastane kompleks protein-ligand (Huey i sur., 2007).

$$\Delta G \text{ (kcal/mol)} = (V_{vezano}^{L-L} - V_{nevezano}^{L-L}) + (V_{vezano}^{P-P} - V_{nevezano}^{P-P}) + (V_{vezano}^{P-L} - V_{nevezano}^{P-L} + \Delta S_{konf.})$$

U jednadžbi L predstavlja ligand, a P protein. Prva zagrada opisuje intramolekularnu energiju vezane i nevezane konformacije liganda, dok druga zagrada opisuje intramolekularnu energiju vezane i nevezane konformacije proteina. U zadnjoj zagradi nalazi se promjena intermolekularne energije između vezanog i nevezanog kompleksa; ako su ligand i protein

dovoljno udaljeni jedan od drugoga kada nisu vezani, ne djeluju međusobno te $V_{nevezano}^{P-L}$ iznosi nula. $\Delta S_{konf.}$ (J/K) označava procjenu gubitka konformacijske entropije nakon vezanja (Huey i sur., 2007). Također određeni empirijski parametri eksperimentalno utvrđeni uzimaju se u obzir tijekom računanja energije vezanja za proučavani kompleks protein-ligand; to su energija vodikovih veza povezana sa nastankom vodikovih veza između liganda i proteina te energija desolvacije kojom se opisuje energija potrebna za uklanjanje vode iz aktivnog mjesta (OpenAI, 2023).

SwissDock (Grosdidier i sur., 2011a) je platforma za provedbu molekularnog pristajanja koja je dostupna na internetu (<http://www.swissdock.ch/>). Koristi EADock DSS algoritam za provedbu pristajanja; na početku generiran je veliki broj načina vezanja (engl. *binding modes*) liganda i proteina; određena je energija vezanja pomoću CHARMM polja sile te su konformacija međusobno rangirane i kao output rezultati dani su klasteri (engl. *clusters*) koji sadržavaju načine vezanja proteina i liganda sa najpovoljnijom energijom vezanja (Grosdidier i sur., 2011a). CHARMM polje sile je matematički model čiji je zadatak opisati interakcije između atoma i molekula u sustavu. Slično kao i kod semi-empirijskog polja sile slobodne energije, ukupna energija nastalog kompleksa protein-ligand ovisi o intramolekulskim i intermolekulskim energijama. Pri tome interakcije povezane sa intramolekularnom energijom podrazumijevaju rastezanje i svijanje kovalentnih veza te rotacija oko jednostruke veze. S druge strane intermolekularna energija povezana je sa interakcijama koje se zbivaju između dvije zasebne molekule te se tu ubrajaju van der Waalsove interakcije, koje uključuju privlačne sile i sile odbijanja do kojih dolazi ako atomi ili grupe atoma dođu relativno blizu, kao i elektrostatke interakcije koje se odnose na sile između nabijenih atoma ili grupe atoma (OpenAI, 2023).

Najvažniji korak u molekularnom pristajanju je analiza dobivenih rezultata. Kvaliteta nastalog kompleksa liganda i proteina evaluira se pomoću matematičkih modela nazvanih funkcije bodovanja (engl. *scoring functions*). One procjenjuju afinitet vezanja liganda za protein, te je cilj izdvojiti one ligande koji imaju najveći afinitet za vezanje na ciljani protein (Dias i de Azevedo, 2008). Bodovnim funkcijama moguće je izračunati slobodnu energiju vezanja na temelju Gibbs-Helmholtz jednadžbe gdje je ΔG (kcal/mol) slobodna energija vezanja, ΔH entalpija (J), T temperatura (K) i ΔS entropija (J/K):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Prilikom analize rezultata molekularnog pristajanja, izabiru se vrijednosti slobodne energije vezanja sa negativnim predznakom što ukazuje da se, termodinamički gledano,

reakcija odvija spontano te da je vezanje liganda za ciljani protein energetski povoljno. U slučaju da slobodna energija vezanja ima pozitivan predznak, može se zaključiti da reakcija između liganda i proteina nije energetski povoljna te do nje neće doći. Također, poželjno je da vrijednosti ΔG budu što negativniji što će značiti da se će se ligand s većim afinitetom, odnosno jače vezati za protein. Vezanje liganda i proteina smatra se jakim ako je ΔG vrijednosti manje od -5 kcal/mol (OpenAI, 2023). Postoje i ostali parametri koji se mogu uzeti u obzir tijekom analize rezultata molekularnog pristajanja kao što je to kod SwissDock-a na primjer veličina klastera, odnosno broj poza koje su grupirane zajedno u klaster zbog svoje sličnosti po načinu i energiji vezanja. Što je veličina klastera veća, odnosno ima veći broj poza koje se slično vežu i imaju sličnu energiju vezanja, to se smatra da je rezultat pouzdaniji te je kompleks liganda i proteina stabilniji (OpenAI, 2023).

Svi dobiveni rezultati molekularnog pristajanja (veličina klastera, vrijednost slobodne energije vezanja te vizualni prikaz interakcija između proteina i liganda) mogu služiti za odabir najpogodnijeg liganda kojemu je daljnjim metodama moguće modificirati strukturu a samim time i aktivnost.

2.1.4. QSAR

Kvantitativni odnosi strukture i reaktivnosti (engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*) primjenjuju matematičke i statističke metode u svrhu pronalaženja empirijskog odnosa između biološke aktivnosti molekula i izračunatih ili u nekim slučajevima eksperimentalno određenih strukturalnih karakteristika spojeva koji se nazivaju molekularni deskriptori (Tropsha, 2007). Molekularni deskriptori mogu uključivati veličinu molekule, njezin volumen, lipofilnost, broj vodikovih veza, oblik te distribuciju elektrona. Odnosno cilj je utvrditi kako su promjene u strukturama većeg broja spojeva povezane sa njihovom aktivnošću (Davis, 2014). Odnos između vrijednosti deskriptora i aktivnosti molekule može biti linearan te u tom slučaju aktivnost može direktno biti predviđena na temelju deskriptora. S druge strane kod ne-linearnog odnosa deskriptori se koriste kako bi se karakterizirale sličnosti između više kemijskih spojeva te to čini osnovu za predviđanje aktivnosti spoja. Razvoju QSAR-a i mogućnosti njegove primjene pridonosao je veliki porast broja baza podataka kao što su ZINC i PubChem koje sadrže detaljne i opširne podatke o kemijskim strukturama te biološkoj aktivnosti raznih poznatih spojeva (Tropsha, 2007).

Razvoj QSAR modela radi se na način da se prvo formira set podataka koji se sastoji od molekula poznatih struktura i njima odgovarajuće biološke aktivnosti. Kada je takav set oblikovan slijedi treniranje modela. Cilj treniranja modela je matematički opisati korelaciju

između strukture kemijskog spoja i njegove aktivnosti. U tom slučaju struktura kemijskog spoja je nezavisna varijabla dok je biološka aktivnost spoja zavisna varijabla, odnosno ovisi o strukturi spoja. Kao rezultat nastaje QSAR model koji je iz „seta za treniranje“ (engl. *training set*) naučio kako struktura spoja utječe na biološku aktivnost. Prije upotrebe QSAR modela na spoju nepoznate aktivnosti, potrebno je prvo provjeriti na test setu (engl. *test set*) hoće li model raditi ispravno. Uzimaju se molekule koje nisu bile dio seta za treniranje, a poznata je njihova biološka aktivnost i imaju sličnu strukturu kao spojevi u setu za treniranje, te se provjera hoće li QSAR model na temelju kemijske strukture znati predvidjeti ispravnu biološku aktivnost. Ako QSAR model u ovom koraku pokaže zadovoljavajuće rezultate, može se dalje koristiti za predviđanje biološke aktivnosti novih, dosada nepoznatih kemijskih spojeva (Tropsha, 2007).

Ova metoda u nekoliko posljednjih godina doprinijela je otkriću novih lijekova. U daljnjem razvoj terapijskih pripravaka cilj je dizajnirati molekule koje će imati optimalnu apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju (ADME), biti što manje toksične, biti što više selektivne prema ciljanim makromolekulama unutar organizma te pokazati visoku bioraspodjelu u predviđenom mjestu djelovanja (Tropsha, 2007).

2.2. LIGANDI – INHIBITORI ENZIMA

Kod većine poznatih bolesti današnjice, glavni uzrok njihove pojave je prekomjerna ekspresija određenih enzima koji kataliziraju nepoželjne reakcije te kao posljedica nastaju ili metaboliti štetni po organizam ili dolazi do nekontroliranog rasta stanica. Kako bi se aktivnost enzima usporila ili zaustavila, otkrivaju se i dizajniraju kemijski spojevi, enzimski inhibitori, koji će djelovati na enzim te ga inhibirati. Kao posljedica inhibicije enzima, ne dolazi do nastajanja štetnih metabolita ili prekomjernog rasta stanica te se bolest drži pod kontrolom. Između 2006 i 2011, na tržištu lijekova pojavila se 1/3 lijekova koji su upravo bili enzimski inhibitori što ukazuje na njihovu važnost kao terapijski pripravci (Silverman i Holladay, 2014).

Inhibitori enzima mogu se podijeliti na dvije skupine; reverzibilni i ireverzibilni. Kod ireverzibilnih inhibitora nastaje stabilan kompleks enzim-inhibitor zbog kovalentnih interakcija koje se stvaraju između inhibitora i aminokiselinskih ostataka aktivnog mjesta enzima. Kao rezultat, enzim je trajno inaktivan ili se vrlo sporo reaktivira. S druge strane, kod reverzibilnih inhibitora, kemijski spoj ne stvara kovalentne veze sa enzimom te može doći do relativno brze disocijacije kompleksa kojeg stvaraju enzim i inhibitor. Kod reverzibilne inhibicije, inhibitor se veže za enzim te ga inhibira ili usporava odvijanje reakcije. Postoje tri tipova reverzibilne

inhibicije a to su; kompetitivna, akompetitivna i nekompetitivna. Kod kompetitivne inhibicije, inhibitor i supstrat slične su strukture te se oba mogu vezati u aktivno mjesto enzima. No s obzirom da se u aktivno mjesto može vezati samo jedan od tih dvaju spojeva, vezat će se onaj čija je koncentracija veća. To znači da kod dovoljno velike koncentracije supstrata neće doći do inhibicije. Akompetitivna inhibicija karakteristična je po tome što dolazi do vezanja inhibitora na postojeći kompleks supstrata i enzima. Nekompetitivna inhibicija slična je akompetitivnoj, zato što se inhibitor može vezati na kompleks supstrat-enzim. Ono u čemu se razlikuje od akompetitivne jest to da se inhibitor veže i na sam enzim (Roskoski, 2007).

Idealan inhibitor bila bi molekula koja bi se specifično vezala samo na enzim od interesa. Na taj način ne bi došlo do nepoželjnih efekata, tj. nuspojava nakon primjene lijeka (Silverman i Holladay, 2014).

2.2.1. ADME

Pri odabiru liganda potrebno je obratiti pažnju na njihova fizičko - kemijska svojstva koja proizlaze iz strukture spoja. Ona utječu na to kakav će lijek ligand biti, odnosno kako će se u tijelu ponašati. Poželjno je da molekula pokazuje visoku biološku aktivnost te nisku toksičnost unutar organizma (Daina i sur., 2017).

Postoje dva vrlo bitna pojmovi u farmakologiji; to su farmakodinamika (engl. *pharmacodynamics*, *PD*) i farmakokinetika (engl. *pharmacokinetics*, *PK*). Prvi pojam opisuje efekt ksenobiotika (lijekovi, nepoznate supstance) na organizam, dok drugi opisuje utjecaj organizma na ksenobiotike to jest kroz koje sve procese prolazi lijek u organizmu te kako se iz organizma izlučuje (Vrbanac i Slauter, 2017).

Prilikom dizajna i razvoja novih lijekova, veliki se fokus stavlja na farmakokinetiku. Kod farmakokinetike proučavaju se četiri različita parametra čije je kratica ADME a označuje apsorpciju (engl. *absorption*), distribuciju (engl. *distribution*), metabolizam (engl. *metabolism*) i ekskreciju (engl. *excretion*) spoja (Wan, 2013). Razmatrajući oralnu konzumaciju lijeka, lijek koji je unesen u obliku tableta ili kapsula ulazi u gastrointestinalni trakt gdje dolazi do raspadanja tableta/kapsula te „slobodne“ molekule lijeka mogu biti apsorbirane kroz stijenkiju želuca, dok se istaložene čestice lijeka izlučuju dalje kroz gastrointestinalni trakt. Molekule lijeka koje su apsorbirane kroz stijenkiju želuca dalje mogu biti razgrađene od strane enzima ili pomoću transportnih proteina prenesene do jetre. U jetri se nalaze razni enzimi koji su zaslužni za metabolizam stranih komponenti. Ako molekule lijeka uspiju izbjeći kemijske modifikacije koje nastaju kao posljedice dviju faza metaboličkih reakcija unutar jetre, ulaze u sistemsku

cirkulaciju. Dio molekula lijeka neće doći do svoje destinacije zbog proteina koji se nalaze u krvi i vežu ih. Određena koncentracija slobodnih molekule biti će dostavljena na mjesto na koje treba djelovati dok će ostala koncentracija biti izlučena pomoću bubrega. Terapeutski učinak lijeka biti će vidljiv samo ako će dovoljna koncentracija molekula doći do ciljanog mjesta djelovanja unutar organa, tkiva ili stanice (Shin i sur., 2017). Na temelju ADME modela procjenjuje se koja doza lijeka je potrebna kako bi imao željen učinak u organizmu te u kojim vremenskim intervalima se mora uzimati (Daina i sur., 2017).

ADME parametre moguće je procijeniti na temelju strukture spoja, odnosno na temelju fizičko-kemijskih svojstava. Neki od tih svojstava su molekulska masa (engl. *molecular weight, MW*), lipofilnost (engl. *lipophilicity, logP*), broj vodikovih donora i akceptora (engl. *hydrogen bond donors and acceptors, HBD, HBA*), broj rotirajućih veza (engl. *rotatable bounds*), polarna površina molekule (engl. *polar surface area, PSA*) i sl. (Egan, 2010). Kod razvoja QSAR modela, upravo se spomenuta svojstva nazivaju deskriptori na temelju kojih se procjenjuje aktivnost nepoznatih molekula (Shin i sur., 2017).

Lipinskovo pravilo pet (engl. *Lipinski rule of five*) jedna je od prvih metoda koja se koristila kako bi se provjerilo ima li molekula željenu farmakološku aktivnost. Prema spomenutim pravilima, da bi molekula bila zadovoljavajuća mora imati $MW < 500$, $\log P > 5$, $HBA > 10$ i $HBD > 5$ (Lipinski i sur., 1997).

Koliko su ADME parametri bitni, govori činjenica da je procjena ADME parametra u fazi otkrića lijeka doprinijela dramatičnom smanjenju neuspjeha vezanih uz farmakokinetička svojstva u kliničkim fazama istraživanja (Daina i sur., 2017).

2.3. RAK PLUĆA NE-MALIH STANICA

Rak pluća jedan je od najagresivnijih i najsmrtonosnijih karcinoma od kojeg svake godine oboli oko 2 milijuna ljudi, a život izgubi 1,76 milijuna pacijenata (Thai i sur., 2021). Stopa preživljenja za oboljele 60 mjeseci nakon dijagnoze raka pluća ne-malih stanica prvog stadija iznosi 68 %, dok za pacijente koji se nalaze u četvrtom stadiju bolesti ona iznosi od 0-10 %. Karcinom pluća najčešće je posljedice pušenja cigareta; procjenjuje se da je pušenje uzrok čak 85 %-90 % dijagnosticiranih slučajeva (Duma i sur., 2019). S obzirom da se najčešće pojavljuje u razvijenim državama, javna zdravstva kontinuirano rade na osvješćivanju javnosti o posljedicama konzumacije duhana te sukladno tome incidencija karcinoma pluća pada, a postotak preživljenja raste (Thai i sur., 2021).

Rak pluća može se podijeliti na karcinom pluća ne-malih stanica (85 % pacijenata) te rak pluća malih stanica (15 % pacijenata). Karcinom pluća ne-malih stanica dodatno se dijeli na adenokarcinom pluća (engl. *adenocarcinoma*), planocelularni karcinom pluća (engl. *squamous cell carcinoma*) i karcinom velikih stanica (engl. *large cell carcinoma*). Karcinom pluća ne-malih stanica najčešće je tek dijagnosticiran u kasnijim stadijima pri čemu se kod većinu pacijenata pojavljuju simptomi kao što su to kašalj, bol u prsima, otežano disanje te krv u iskašljaju (Duma i sur., 2019).

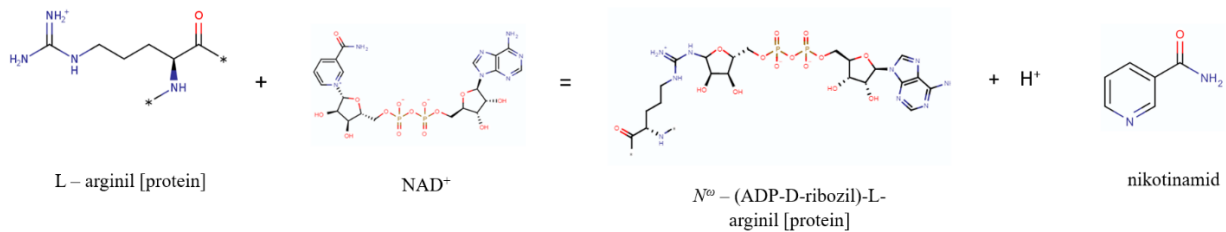
Nekontrolirana proliferacija raka pluća ne-malih stanica najčešće je uzrok mutacija u genima koji kodiraju za proteine kao što su receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor, EGFR*) i receptor vaskularnog endotelijskog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR*) te mutacije u genima kao što su ALK, ROS1 i BRAF (Duma i sur., 2019).

Metode liječenja ovise o tome u kojem stadiju bolesti se pacijent nalazi; ako je to prvi stadij najčešće je to operacija i zračenje, a u kasnijim stadijima nastupa i kemoterapija. U posljednjih nekoliko godina u liječenju karcinoma pluća ne-malih stanica uvedena je i imunoterapija koja se pokazala iznimno djelotvornom u borbi protiv bolesti. Temelji se na inhibiciji imunskih kontrolnih točaka kao što je to npr. PD-1 (engl. *programmed death*) koji se nalazi na T-stanicama imunskog sustava ili PD-L1 koji je eksprimiran na tumorskim stanicama. Kako bi imunosne stanice mogle razlikovati dobre od loših stanica u organizmu te djelovati samo na one koje treba ukloniti, T-stanice na svojoj površini eksprimiraju PD-1 protein koje će se vezati na PD-L1 (engl. *programmed death ligand*) na zdravim stanicama te se na taj način deaktivirati i neće ih napadati. Problem je taj što tumorske stanice prekomjerno ekprimiraju PD-L1 na svojoj površini te dolazi do inaktivacije T-stanica koje se nakon vezanja za ligand deaktiviraju i u konačnici ne uklanjaju tumorske stanice. Iz tog razloga potrebna je inhibicija PD-1 i PD-L1. No iako takva terapija pomaže, tumorske stanice razvijaju daljnje mehanizme rezistencije na koje je potrebno djelovati (Duma i sur., 2019). Jedan od tih je posljedica aktivnog receptora na površini tumorske stanice nazvanog ART1 (Wennerberg i sur., 2022a).

2.3.1. ART1 protein

ART1 spada u grupu mono-ADP riboziltransferaza (engl. *mono(ADP-ribosly) transferase, MART*) koji su podrazred obitelji enzima nazvanih poli-ADP riboziltransferaze (engl. *poly(ADP-ribosly) transferase, PARP*). MART enzimi provode reakciju mono-ADP ribozilacije (engl. *MARylation*), odnosno regulatornu post-translacijsku modifikaciju proteina

kako bi utjecali na njihovu funkciju (Challa i sur., 2021). To je evolucijski konzervirani regulatorni mehanizam koje su koristile patogene bakterije kako bi modificirale proteine stanica domaćina. Danas su MART i PARP enzimi ciljani proteini za razvoj novih antitumorskih lijekova (Wennerberg i sur., 2022b).



Slika 2. Reakcija koju katalizira ART1 protein (*prema* Corda i Di Girolamo, 2003)

Samo jedan gen kodira za protein ADP-riboziltransferazu 1, a naziva se ART1 (HPA, n.d.,a; Uhlén i sur., 2005). Gen ART1 nalazi se na 11 kromosomu, odnosno točna lokacija je 11p15.4 (NCBI, n.d.,a; Sayers i sur., 2022). Ima 6 egzona (NCBI, n.d.,a; Sayers i sur., 2022), a njegovom transkripcijom nastaje 1 transkript (HPA, n.d.,a; Uhlén i sur., 2005).

U zdravom tkivu, ART1 protein eksprimiran je u malim koncentracijama u jeziku te u skeletnim mišićima (EMBL-EBI, n.d.; Madeira i sur., 2022). S druge strane, ART1 protein eksprimiran je u većoj koncentraciji kod raznih oblika karcinoma kao što su karcinom jetre, dojke, prostate (HPA, n.d.,b; Uhlén i sur., 2005) Povećana koncentracija spomenutog proteina kod raka debelog crijeva te glioblastoma povezana je sa lošijom prognozom oboljelih pacijenata (Yang i sur., 2016). Wennerberg i suradnici, 2022. godine uočili su prekomjernu ekspresiju ART1 proteina i kod raka pluća ne-malih stanica te objasnili način na koji ART1 promiče rast tumora.

2.3.2. ART1 kod karcinoma pluća ne-malih stanica

ART1 posjeduje ekstracelularnu katalitičku domenu što direktno ukazuje na to da je jednim djelom usidren u membranu stanice. Zbog takvog svojstva on može modificirati proteine, adicijom jedne ADP riboze, koji se nalaze u istoj mikrookolini te na taj način utjecati na njihovu aktivnost (Wennerberg i sur., 2022a).

ART1 protein, eksprimiran na tumorskim stanicama karcinoma pluća ne-malih stanica, svojim djelovanjem modificira P2X7 receptor CD8⁺ T-stanice. CD8⁺ T-stanice su citotoksične stanice imunskog sustava koje nakon što na temelju različitih antigena prepoznaju stanice patogena ili u ovom slučaju tumorske stanice, pokušavaju ih ubiti (Raskov i sur., 2021).

Koncentracija NAD^+ u ekstracelularnom prostoru niska je i strogo kontrolirana. No kod raznih patoloških stanja kao što su oštećenje tkiva ili razvoj tumora, dolazi do naglog otpuštanja visoke koncentracije NAD^+ iz citosola mrtvih stanica u mikrookoliš te on postaje supstrat za ekstracelularnu domenu ART1 enzima pri čemu će ART1 katalizirati reakciju transfera ADP-riboze na P2X7 receptor CD8^+ T-stanica. Pri tome nastaje kovalentna modifikacija P2X7 receptora i on se aktivira. Kao posljedica aktivacije P2X7 receptora dolazi do formiranja velikih pora, nekontroliranog unosa kalcijevih iona te u konačnici apoptoze CD8^+ T-stanice. Opisani proces naziva se NAD^+ inducirana smrt stanice (engl. *NAD^+ induced cell death, NICD*) (Wennerberg i sur., 2022a).

Na temelju istraživanja rađenog na tumorskim stanicama ne-malih stanica pluća zaključeno je da je gore objašnjeni mehanizam način na koji tumorske stanice mogu uništiti CD8^+ T-stanice te tako zaobići utjecaj imunskog sustava i stvoriti dodatnu rezistenciju. Isto tako pokazano je da se inhibicijom ART1 enzima terapijskim monoklonskim protutijelom smanjio rast i širenje ART1 ekspimirajućih tumora kod miševa te je došlo do infiltracije aktiviranih P2X7R^+ CD8 stanica u tumorsko tkivo (Wennerberg i sur., 2022a).

S obzirom da ima ekstracelularnu domenu, ART1 protein dobra je meta za ciljanu inhibiciju kojom bi se potencijalno povećao utjecaj CD8^+ T-stanica na borbu protiv mutiranih, kancerogenih stanica (Wennerberg i sur., 2022a).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KORACI U PROVOĐENJU EKSPERIMENTA:

U eksperimentalnom djelu provedeno je osam (8) koraka kako bi se došlo do rezultata:

- 1) U prvom koraku provedena je predikcija strukture proteina ART1 homolognim modeliranjem te je uspoređena sa strukturom proteina koja je dostupna na stranici AlphaFold-a (Varadi i sur., 2022; Jumper i sur., 2021); također traženi su potencijalni homologni proteini na temelju poznate aminokiselinske sekvence ART1 proteina pomoću SmartBLAST-a (NCBI, n.d.,b) te na temelju sekundarne strukture proteina ART1 pomoću MADOKA (Deng i sur., 2019)
- 2) Nakon toga u drugom koraku iz dostupnih literaturnih radova izdvojeni su potencijalni inhibitori ART1 proteina prirodnog podrijetla; to su ligandi za koje je pokazano da inhibiraju MART i PARP enzime
- 3) Slijedila je provedba molekularnog pristajanja u SwissDock-u
- 4) Odrađena je i „slijepa proba“ u SwissDock (Grosdidier i sur., 2011a; Grosdidier i sur., 2011b) programu sa dvije nasumično izabrane molekule
- 5) Nadalje provedena je validacija rezultata ponovnom provedbom molekularnog pristajanja pomoću AutoDock programskog paketa (Morris i sur., 2009)
- 6) Provjereno je hoće li se izabrani ligandi vezati na ostale MART enzime
- 7) SwissADME (Daina i sur., 2017) programom provjerena su svojstva izdvojenih liganda
- 8) Korištenjem SwissTargetPrediction (Daina i sur., 2019) provjerava se za koje ostale proteine/enzime u organizmu čovjeka se izabrani ligandi vežu

3.2. STRUKTURA PROTEINA ART1 I HOMOLOGNI PROTEINI

U prigodnim bazama podataka potrebno je pronaći trodimenzionalnu strukturu molekule proteina. Ona može biti eksperimentalno određena pomoću rendgenske kristalografije ili nuklearne magnetske rezonancije te se može preuzeti kao PDB datoteka u Protein Data Bank bazi podataka. No ako 3D struktura proteina nije poznata i dostupna, do 3D strukture moguće je doći pomoću homolognog modeliranja. Homologno ili komparativno modeliranje bazira se na sličnosti odnosno homologiji između sekvence proteina od interesa te sekvence sličnog proteina čija je struktura otprije poznata. Predviđena struktura biti će točnija ako će više od 50 % sekvence ciljanog proteina biti ista sa sekvencom sličnog proteina. Točnost dobivenih rezultata molekularnog pristajanja uvelike ovisi o strukturi proteina, zato je bitno da bude što egzaktnije određena (Roy i sur., 2015).

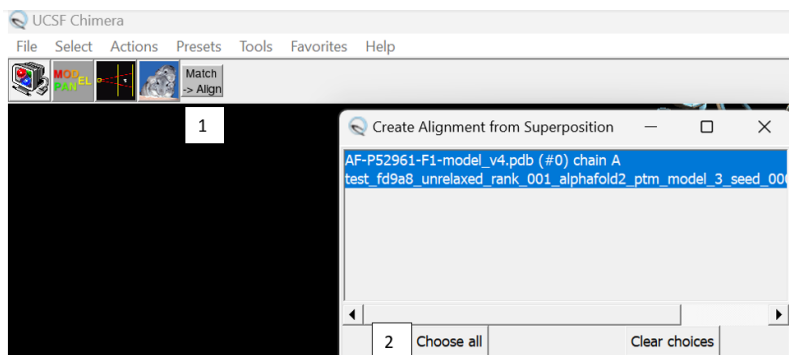
Kako bi se provjerila i utvrdila struktura ART1 proteina koja će biti korištena za molekularno pristajanje, napravljena je predikcija trodimenzionalne strukture pomoću računalnog alata otvorenog koda nazvanog ColabFold (Mirdita i sur., 2022) na temelju poznate aminokiselinske sekvence odnosno homolognim modeliranjem.

Prvi korak bio je pronaći u bazi podataka aminokiselinsku sekvencu za protein ART1. Pri tome se koristila baza podataka UniProt (The Uniprot Consortium, 2023). Aminokiselinsku sekvencu čini 327 aminokiselina a redoslijed aminokiselina je slijedeći:

```
MQMPAMMSLLLVSVGLMEALQAQSHPIRRDLFSQEIQLDMALASFDDQYAGCAA  
MTAALPDLNHTEFQANQVYADSWTLASSQWQERQARWPEWLSPTRPSPPLGFRD  
EHGVALLAYTANSPLHKEFNAAVREAGRSRAHYLHHFSFKTLHFLLTEALQLLGSGQR  
PPRCHQVFRGVHGLRFRPAGPRATVRLGGFASASLKHVAAQQFGEDTFFGIWTCLGA  
PIKGYSFFPGEEVLIPPFETFQVINASRLAQQPARIYLRALGKHSTYNCEYIKDKKCKS  
GPCHLDNSAMGQSPLSAVWSLLLLLWFLVVRAFPDGPGLL.
```

Aminokiselinska sekvenca ART1 proteina iz baze podataka zatim je unesena u predviđeno mjesto u ColabFold programu te je započeto homologno modeliranje. Pokretanjem se prolazi kroz cjevovod (engl. *pipeline*) koji se sastoji od 5 koraka te se nakon toga generirani podaci preuzimaju i slijedi njihova analiza u programu UCSF Chimera (Pettersen i sur., 2004).

PDB datoteka strukture enzima ART1 preuzeta sa AlphaFold stranice (Varadi i sur., 2022; Jumper i sur., 2021) te PDB datoteka strukture enzima ART1 dobivena predikcijom strukture u programu ColabFold (Mirdita i sur., 2022) otvorene su u programu UCSF Chimera kako bi se usporedile njihove strukture. Prikaz na slici 3.



Slika 3. Usporedba struktura ART1 receptora u UCSF Chimera (*vlastita fotografija*)

3.2.1. SmartBLAST i MADOKA

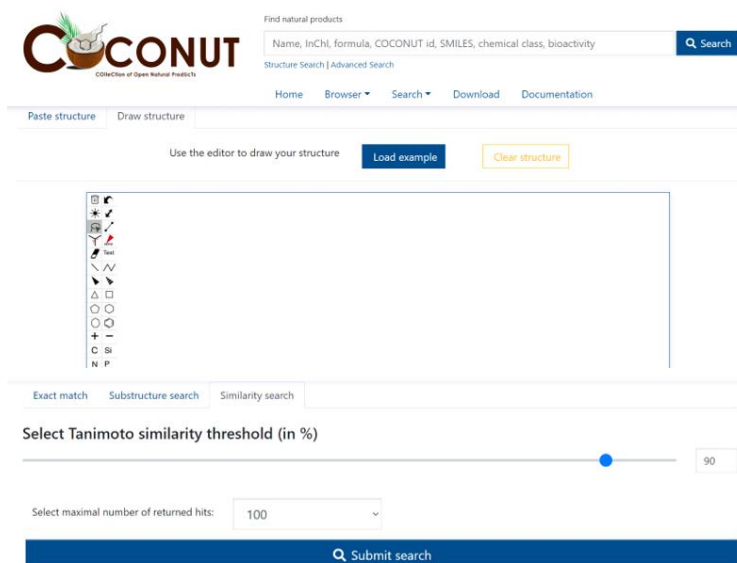
Postoje li homologni proteini istraženo je prvo na temelju aminokiselinske sekvence ART1 proteina pomoću web poslužitelja SmartBLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/?LINK_LOC=BlastHomeLink). Aminokiselinska sekvenca kopirana je u za to predviđeno mjesto te je pokrenut SmartBLAST.

S druge strane, traženje sličnih ili homolognih proteina na osnovi tercijarne strukture provedeno je pomoću MADOKA (<http://madoka.denglab.org/>) web poslužitelja (Deng i sur., 2019). Kako bi se zadatak pokrenuo, na MADOKU je prenijeta PDB datoteka ART1 proteina.

3.3. ODABIR PRIRODNIH LIGNADA – POTENCIJALNIH INHIBITORA ART1 ENZIMA

Slijedeći korak bio je izabrati koje će se molekule koristiti prilikom molekularnog pristajanja te bi mogle biti potencijalni inhibitori enzima ART1. Iz dostupnih istraživačkih radova koji su se bavili inhibicijom PARP i MART enzima (Challa i sur., 2021; Rose i sur., 2020; Qin i sur., 2019; Holechek i sur., 2018; Banasik i sur., 1992) izdvojeni su svi spomenuti spojevi.

S obzirom da je cilj bio pronaći prirodne spojeve, a većina navedenih spojeva u radovima bili su sintetski, pomoću COCONUT: Natural Products Online (Sorokina i sur., 2021) baze podataka koja sadrži samo spojeve zastupljene u prirodi, na temelju sintetskih spojeva pronađeni su slični prirodni spojevi (slika 4).



Slika 4. Sučelje COCONUT: Natural Products Online (Sorokina i sur., 2021) baze podataka (vlastita fotografija)

Kao rezultati izabrani su prirodni spojevi koji su najbližnji ucrtanoj strukturi (imaju najveći postotak sličnosti sa sintetskim spojem) te su imena spojeva i COCONUT ID brojevi uneseni u tablicu koja je prikazana u poglavlju „Rezultati i rasprava“.

3.4. PROVEDBA MOLEKULARNOG PRISTAJANJA

Datoteka liganda koji će se koristiti pri molekularnom pristajanju može se preuzeti sa baza podataka kao što su to ZINC ili PubChem. Ona sadrži informacije o 3D strukturi liganda.

Nakon što je preuzeta PDB datoteka enzima ART1 te su izabrani ligandi koji će se testirati na vezanje za ART1 enzim, slijedi molekularno pristajanje.

Za molekularno pristajanje koristi se web poslužitelj nazvan SwissDock (Grosdidier i sur., 2011a; Grosdidier i sur., 2011b). Kako bi se molekularno pristajanje provelo potrebno je „Odabrati metu“ (engl. *Target selection*) pri čemu se učitava PDB datoteka željenog protein (u ovom slučaju ART1 receptor) te zatim slijedi odabir liganda (engl. *Ligand selection*) upisivanjem COCONUT ID broja, ZINC AC broja i sl. Sučelje SwissDock-a prikazano je na slici 5.

S obzirom da nije bilo mogućnosti ucrtavanja rešetkaste kutije (engl. *grid box*) te koordinate aktivnog mjesta nisu bile poznate, provedeno je slijepo modeliranje (engl. *blind docking*).

Molekularno pristajanja odnosno docking može biti mjesno-specifično (engl. *site specific*) ili može biti slijepo (engl. *blind docking*). Kod slijepog pristajanja, još nazvano globalno ili ne-ciljano (engl. *untargeted*) molekula liganda može se vezati po cijeloj površini proteina, bez poznavanja mjesta vezanja (Stanzione i sur., 2021). S druge strane mjesno-specifično (lokalno, ciljano) pristajanja temelji se na poznavanju aktivnog mjesta enzima, odnosno na poznavanju aminokiselinskih ostataka koji se nalaze u veznom mjestu. Pri tome se za definiranje mjesta u kojem se želi provesti pristajanja koristi rešetkasta kutija (engl. *grid box*) kojom se označi aktivno mjesto proteina te se definiraju x,y i z koordinate centra spomenute kutije kao i njezina dimenzija. Korištenjem rešetkaste kutije fokus je samo na vezno mjesto proteina te se najpogodnije poze ligandada istražuju samo unutar dimenzija kutije (Roy i sur., 2015).

The image shows the SwissDock web interface, which is divided into three main sections:

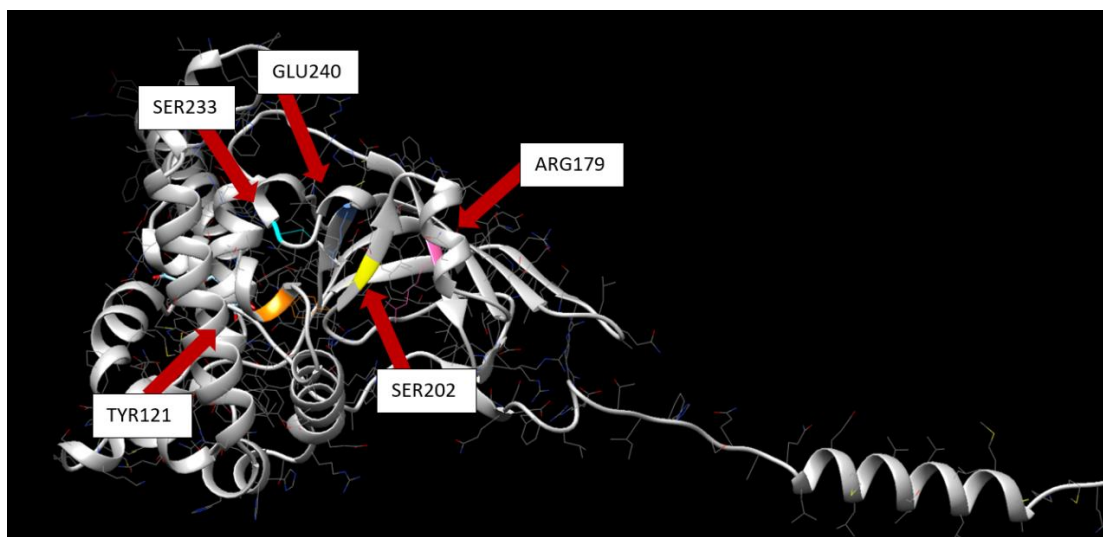
- Target selection:** This section has a header "Target selection" in a grey bar. Below it, there is a text input field for "Search for targets:" followed by a "Search" button. Below the input field, there is a note: "ie. PDB code, protein name, sequence, or URL" and "or upload file (max 5MB)".
- Ligand selection:** This section has a header "Ligand selection" in a grey bar. Below it, there is a text input field for "Search for ligands:" followed by a "Search" button. Below the input field, there is a note: "ie. ZINC AC, ligand name or category (like scaffolds or sidechains), or URL" and "or upload file (max 5MB)".
- Description:** This section has a header "Description" in a grey bar. Below it, there are two text input fields: "Job name (required):" and "E-mail address (optional):". Below the second input field, there is a link "Show extra parameters" and a "Start Docking" button.

Slika 5. SwissDock sučelje (Grosdidier i sur., 2011a; Grosdidier i sur., 2011b) (*vlastita fotografija*)

Rezultati dobiveni molekularnim pristajanjem u SwissDock-u preuzeti su te analizirani u programu UCSF Chimera. UCSF Chimera alat je koji se također koristi prilikom molekularnog pristajanja no najčešće za vizualizaciju rezultata dobivenih nekim drugim programima. Korisnicima omogućuje vizualizaciju interakcija liganda i proteina u kontekstu vodikovih i hidrofobnih interakcija (Pettersen i sur., 2004).

Jedan od bitnijih koraka kod provedbe molekularnog pristajanja je identifikacija aktivnog odnosno veznog mjesta enzima. Ako je struktura proteina određena pomoću rendgenske kristalografije tako da je on u kompleksu sa određenim ligandom, ligand se ukloni te se označi vezno mjesto u koje želimo da nam se dalje vežu novi ligandi. S druge strane ako struktura proteina nije otprije poznata, za prepoznavanje aktivnog mjesta mogu se koristiti programi namijenjeni da ga identificiraju ili se može odrediti na temelju dostupnih literaturnih podataka (Roy i sur., 2015).

Na temelju podataka dostupnih u bazi podataka UniProt o aktivnom mjestu, točnije veznom mjestu proteina ART1 (UniProt, n.d.,a) različitim bojama označeni su aminokiselinski ostaci koje čine aktivno/vezno mjesto enzima u programu UCSF Chimera. Na taj način praćeno je vezanje liganda u aktivno/vezno mjesto enzima iako je provedeno slijepo modeliranje. Slika 6. prikazuje označene aminokiseline u aktivnom/veznom mjestu enzima ART1.

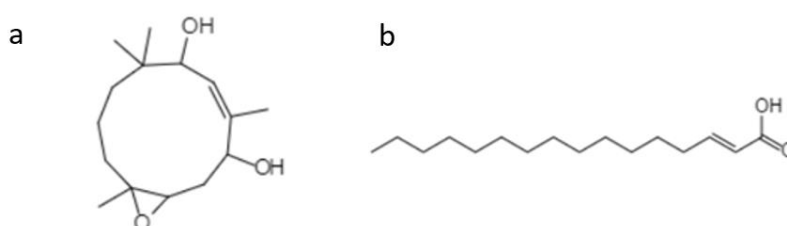


Slika 6. USCF Chimera (Pettersen i sur., 2004). Aminokiseline koje čine aktivno i mjesto vezanja enzima ART1 (TYR121, ARG179, SER202, SER233, GLU240) (*vlastita fotografija*)

3.4.1. Slijepa proba

Sa dva nasumično izabrana spoja u COCONUT: Natural Products Online bazi podataka provedena je „slijepa proba“ kako bi se utvrdilo da se spojevi, koji nisu prvotno izabrani na temelju literaturnih podataka, ne vežu u aktivno mjesto proteina.

Pri tome su nasumično izabrani spoj fekserol (COCONUT ID: CNP0234206) te spoj 2-heksadekanoična kiselina (COCONUT ID: CNP0340973). Slijepa proba provedena je u SwissDock-u prema uputama u poglavlju 3.4. Strukture spojeva prikazane su na slici 7.



Slika 7. Nasumično izabrane molekule za slijepu probu. a) fekserol (IUPAC: 4,7,7,11-tetrametil-12-oksabiciklo[9.1.0]dodek-4-ene-3,6-diol); b) 2-heksadekanoična kiselina (prema IUPAC) (strukture preuzete sa COCONUT: Natural Products Online)

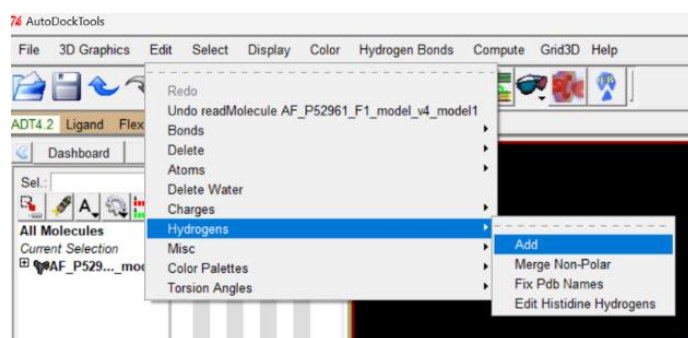
3.5. MOLEKULARNO PRISTAJANJE U AUTODOCK PROGRAMSKOM PAKETU

Slijedeće korak bio je validacija rezultata dobivenih sa SwissDock-a. Odnosno bilo je potrebno pomoću programskog paketa AutoDock (The Scripps Research Institute, 2014), koji također služi za molekularno pristajanje, potvrditi dobivene rezultate. Pri tome su pri korištenju

AutoDock-a korišteni naputci opisani u znanstvenom radu „A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists“ (Lohning i sur., 2017).

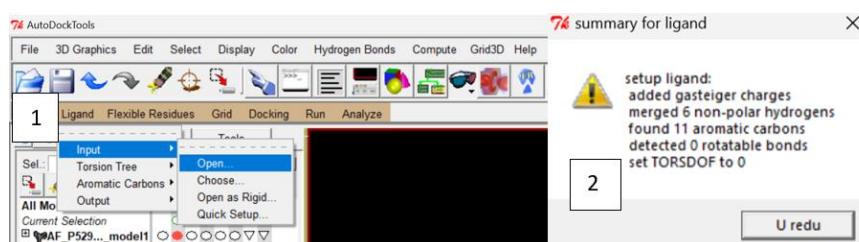
U prvom koraku pripremljene su datoteke proteina i liganada u .pdb obliku. S obzirom da se datoteka za protein ART1 već nalazila u .pdb obliku daljnje modifikacije nisu bile potrebne. S druge strane ligandi su bili preuzeti u SDF obliku sa stranice PubChem (Kim i sur., 2023) te ih je bilo potrebno prevesti u .pdb oblik što je učinjeno sa računalnim alatom nazvanim „OpenBabel“ (O'Boyle i sur., 2011).

Protein ART1 se otvara klikom na tipku „Otvori“ (engl. *Open*) pri čemu se iz otvorenog dijaloškog okvira izabire preuzeta PDB datoteka ART1 enzima. Slijedi priprema makromolekule za molekularno pristajanje. Postupak je prikazan na slici 8.



Slika 8. Priprema ART1 enzima za molekularno pristajanje; dodavanje vodika (*vlastita fotografija*)

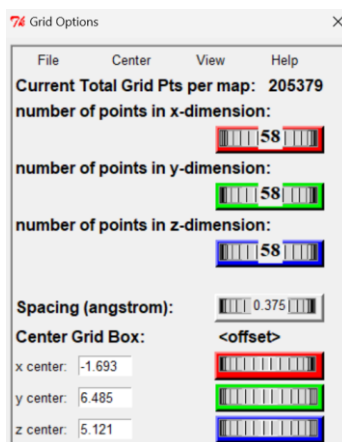
Nakon pripreme enzima ART1 slijedila je priprema liganda za koji se provjerava hoće li se vezati u aktivno mjesto. Postupak pripreme prikazan je na slici 9.



Slika 9. Priprema liganda; odabire se željeni ligand (1) te se prikazuju modifikacije napravljene na ligandu (2) (*vlastita fotografija*)

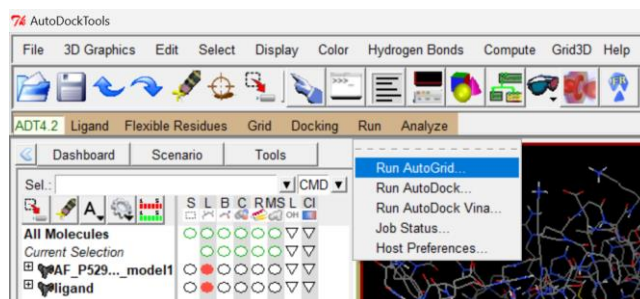
Kako bi se napravilo lokalno, odnosno mjesno specifično pristajanje bilo je potrebno definirati „rešetkastu kutiju“ (engl. *Grid Box*) odnosno postaviti željene koordinate iste. Unutar generirane kutije sa postavljenim koordinatama nalazi se aktivno mjesto enzima te će se u tom

djelu molekule provoditi molekularno pristajanje. Koordinate „rešetkaste kutije“ prikazane su na slici 10.



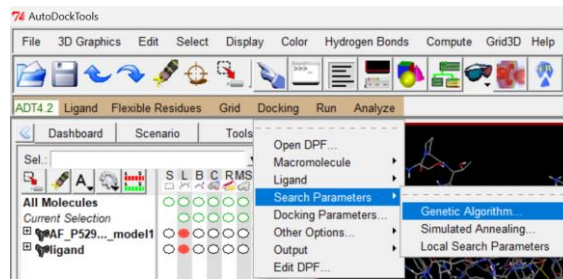
Slika 10. Koordinate rešetkaste kutije (engl. *Grid box*); (vlastita fotografija)

Slijedeći je korak postavljanje setova mapa pri čemu nastaje gpf. datoteka. GPF datoteka (engl. *Grid Parameter File*) se koristi kako bi se generirala, pomoću AutoGrid modula (slika 11), rešetkasta mapa u obliku datoteke .glg. GLG datoteka (engl. *Grid Log File*) sadrži detaljan opis rešetkastih mapa. Rešetkasta mapa trodimenzionalna je matrica koja opisuje energije interakcija izabrane molekule liganda i atoma proteina ART1.



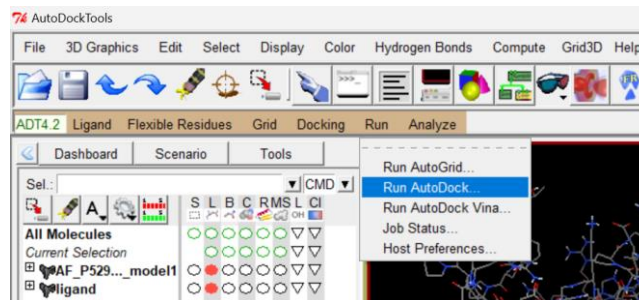
Slika 11. Pokretanje modula „AutoGrid“ kako bi nastala .glg datoteka (vlastita fotografija)

Nakon dobivenih rezultata u obliku GLG datoteke, slijedila je priprema liganda i enzima ART1 za molekularno pristajanje koje se provodi genetičkim algoritmom pretraživanja, točnije primjenom Lamarckovog genetskog algoritma. Postavljanje genetičkog algoritma prikazano je na slici 12; kao izlazna vrijednost nastaje .dpf datoteka.



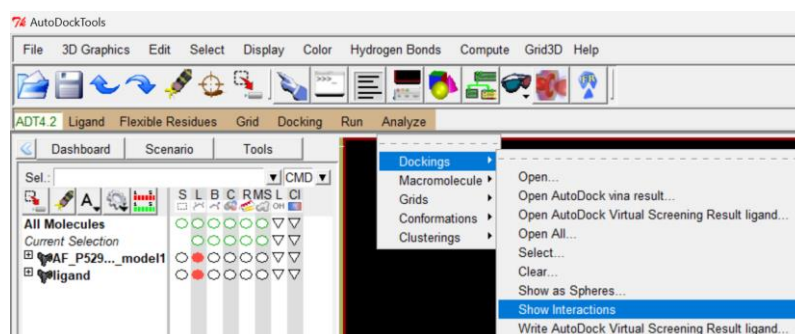
Slika 12. Odabir genetskog algoritma pretraživanja za provedbu molekularnog pristajanja u AutoDock programu; (*vlastita fotografija*)

Nastala .dpf datoteka koristi se dalje za pokretanje molekularnog pristajanja, koje se pokreće pomoću „Pokreni AutoDock“ (engl. *Run AutoDock*), slika 13, pri čemu se otvara dijaloški okvir u kojem se kao ulazna informacija koristi .dpf datoteka a kao izlazna datoteka nastaje .dlg datoteka.

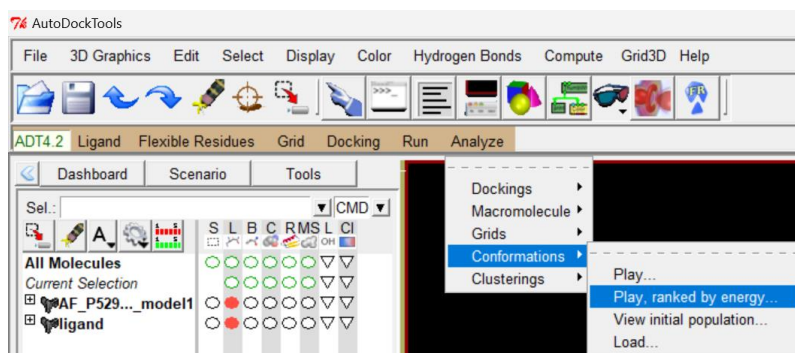


Slika 13. Pokretanje molekularnog pristajanja u AutoDock-u (*vlastita fotografija*)

U zadnjem koraku .dlg datoteka dobivena pokretanjem AutoDock-a odnosno molekularnog pristajanja, otvara se te se analiziraju dobiveni rezultati rangiranjem slobodne energije vezanja te vizualizacijom nastalih interakcija. Postupak je prikazan na slici 14 i 15.



Slika 14. Analiza rezultata dobivenih molekularnim pristajanjem; prikaz interakcija između ART1 receptora i liganda (engl. *Show Interactions*) (*vlastita fotografija*)



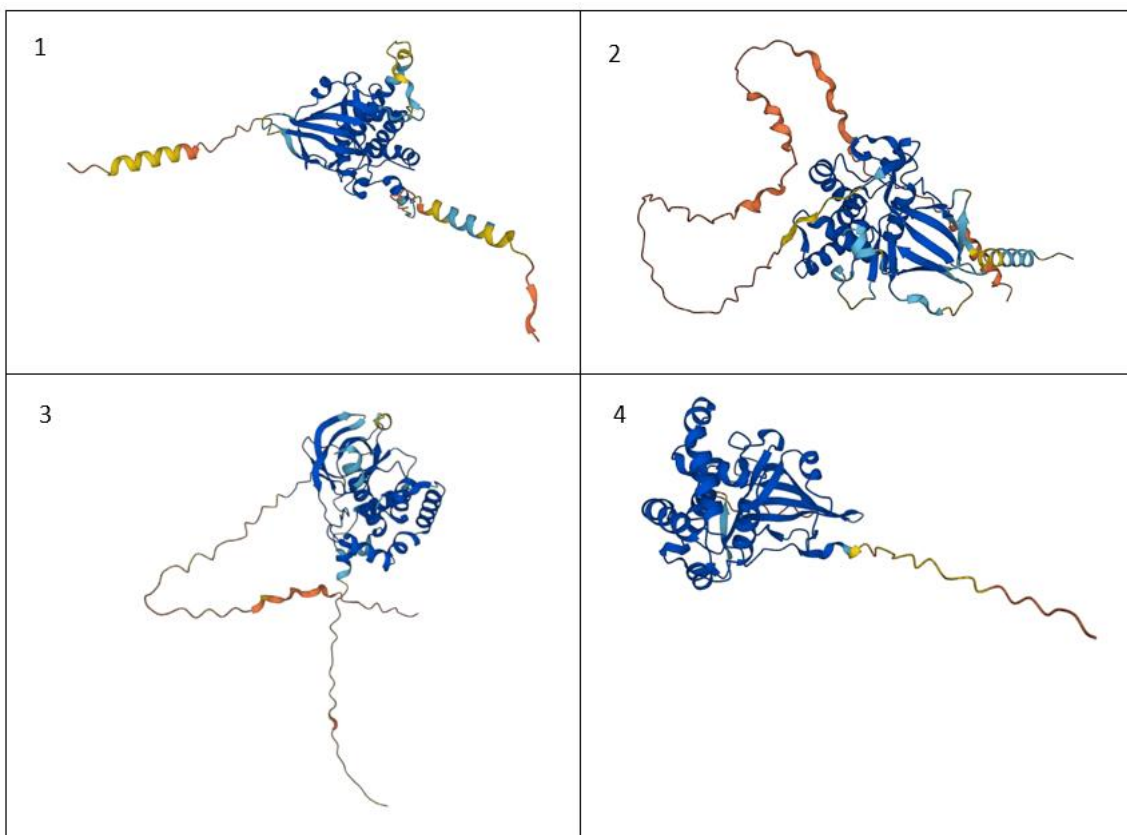
Slika 15. Analiza rezultata dobivenih molekularnim pristajanjem; prikaz konformacija koje ligand zauzima prilikom vezanja za protein te potrebna energija (engl. *Play, ranked by energy*)
(*vlastita fotografija*)

Rezultati dobiveni AutoDock-om uspoređeni su sa rezultatima dobivenim SwissDock-om te su izdvojeni najpogodniji ligandi za inhibiciju ART1 enzima.

3.6. MOLEKULARNO PRISTAJANJE SA OSTALIM MART ENZIMIMA

Nakon što je sužen izbor liganada s obzirom na rezultate molekularnog pristajanja dobivenih sa SwissDock-a i AutoDock-a, provedeno je pristajanje sa izabranim ligandima te tri ostala poznata MART enzima kako bi se provjerilo vezanje i usporedila selektivnost liganada kod MART enzima.

U tu svrhu sa AlphaFold (Varadi i sur., 2022; Jumper i sur., 2021) stranice preuzete su PDB datoteke ART3 (Uniprot, n.d.,b), ART4 (UniProt, n.d.,c) i ART5 (UniProt, n.d.,d) enzima koje su korištene prilikom pristajanja. Pristajanje je provedeno na SwissDock poslužitelju prema uputama u poglavlju 3.4. Strukture svih četiri MART enzima prikazane su na slici 16.

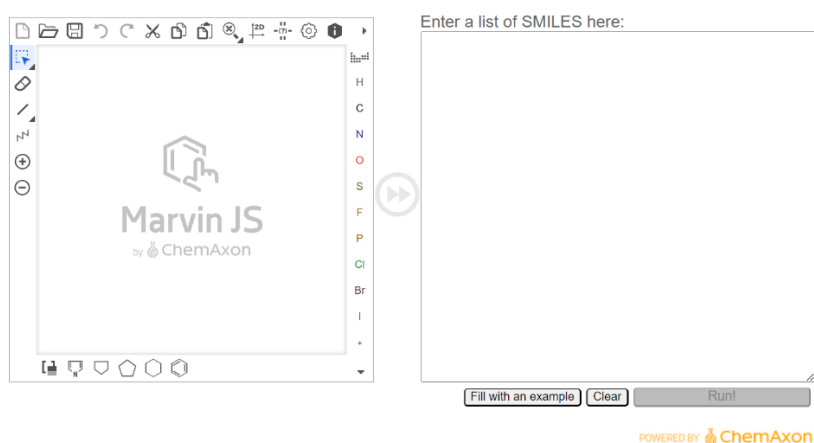


Slika 16. Strukture MART enzima; 1) ART1 (UniProt, n.d.,a), 2) ART3 (UniProt, n.d.,b) , 3) ART4 (UniProt, n.d.,c) 4) ART5 (UniProt, n.d.,d)

3.7. SWISSADME

Kako bi se odredila fizičko-kemijske svojstva, potencijal spoja da bude lijek te ADME parametri liganada koji su se pokazali kao potencijalni inhibitori enzima ART1, korištena je web stranica SwissADME (Daina i sur., 2017).

Koristi se na način da se u nekoj od bazi podataka nađe struktura spoja te u odgovarajuće mjesto na SwissADME stranici ucrtta struktura molekule liganda ili SMILES oblik te se generiraju rezultati. Slika 17. prikazuje sučelje SwissADME.



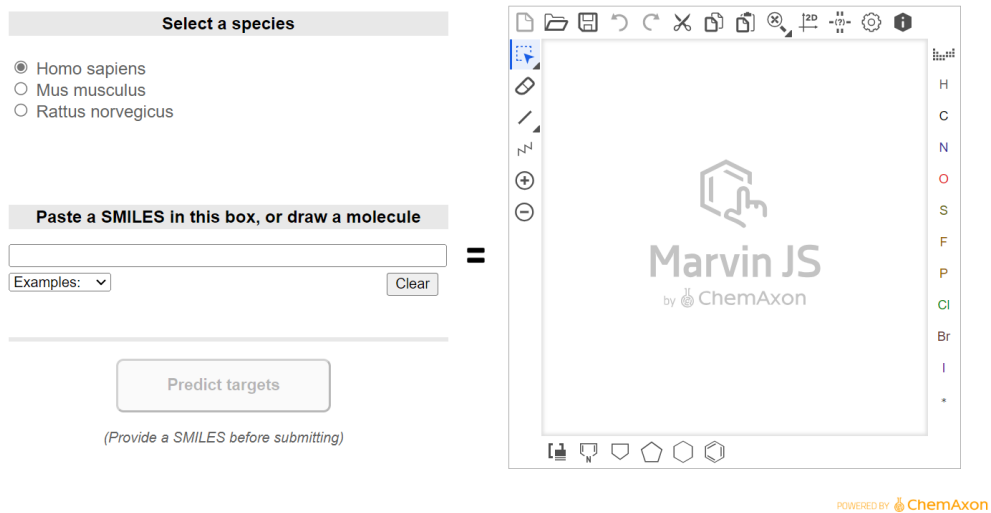
Slika 17. SwissADME sučelje (Daina i sur., 2017) (vlastita fotografija)

3.8. SWISS TARGET PREDICTION

Kako bi se provjerilo na koje makromolekule se mogu izabrani ligandi unutar organizma dodatno vezati, korištena je web stranica Swiss Target Prediction (Daina i sur., 2019).

Potrebno je izabrati organizam u kojem želimo provesti provjeru (u ovom slučaju jest to čovjek, *Homo sapiens*), unijeti SMILES oblik molekule od interesa ili ju nacrtati u za to predviđeno mjesto (za potrebe ovog rada, nacrtane su strukture izabranih liganada). Nakon toga slijedi predikcija mete (engl. *Predict target*).

Sučelje stranice prikazano je na slici 18.



Slika 18. Sučelje stranice Swiss Target Prediction (Daina i sur., 2019) (*vlastita fotografija*)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je pronaći prirodne, male (engl. *small molecules*) molekule, potencijalne inhibitore ART1 enzima koji sudjeluje u mehanizmu rezistencije tumorskih stanica te svojom aktivnošću sprječava uspješno djelovanje imunološkog sustava (točnije CD8⁺ T stanica) u borbi protiv karcinoma pluća ne-malih stanica. Istraživanje je provedeno *in silico* metodom molekularnog pristajanja kako bi se utvrdile i analizirale interakcije između prirodnog spoja i ciljane makromolekule, enzima ART1, sa namjerom razumijevanja na koji način inhibitor i enzim stupaju u interakciju te kakav je njihov afinitet vezanja.

Kako bi se došlo do rezultata istraživanja, korištena je od prije dostupna literatura te računalni paketi kojima se provodi molekularno pristajanje. Pri tom su korištene do sad ustanovljene spoznaje o inhibitornim molekulama PARP i MART enzima u čiju obitelj enzima spada i ciljani ART1 enzima. Poznata znanja korištena su kako bi se pronašle prirodne molekule, slične po kemijskoj strukturi spomenutim inhibitorima te se utvrdila njihova mogućnost stvaranja interakcija sa ART1 enzimom.

Koliko jake interakcije stvaraju inhibitor i ciljane makromolekula te koliko je stabilan kompleks inhibitor-enzim ART1 doznato je iz rezultata molekularnog pristajanja. Molekularno pristajanje provedeno je korištenjem web poslužitelja SwissDock te računalnog paketa AutoDock. SwissDock korišten je prvi te je na temelju usporedbe dobivenih parametara kao što su veličina klastera, vrijednosti Gibbsove slobodne energije vezanja i „pune sposobnosti vezanja“ (engl. *full fitness*) te vizualizacije interakcije inhibitora u aktivnom mjestu enzima, sužen izbor inhibitora sa 35 na njih 13. Nakon toga provedena je validacija rezultata, odnosno sa 13 izabranih inhibitora provedeno je molekularno pristajanje u AutoDock programu. Napravljena je usporedba na temelju dobivenih vrijednosti Gibbsove slobodne energije vezanja (ΔG) kod molekularnog pristajanja u SwissDock-u i AutoDock-u te je broj inhibitora dodatno sužen sa trinaest (13) na sveukupno četiri (4) molekule koje su se pokazale kao najbolji kandidati za inhibiciju enzima ART1. Uz praćenje vrijednosti Gibbsove slobodne energije vezanja, koji je glavni parametar uzet u obzir prilikom izbora potencijalnih inhibitora, također je vizualizirana interakcija male molekule i enzima ART1 kako bi se utvrdile koji točno aminokiselinski ostaci stupaju u interakciju sa inhibitorom.

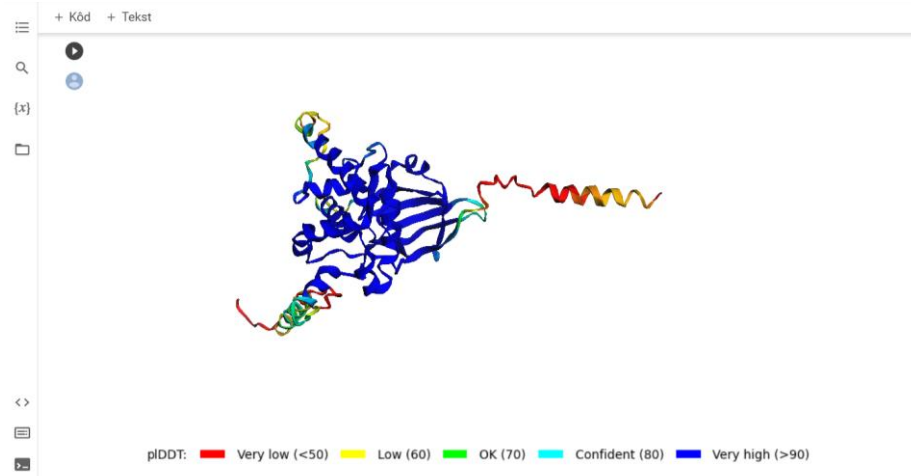
Rezultati dobiveni molekularnim pristajanjem prikazani su u tablicama te slikama koje demonstriraju interakcije malih molekula i enzima ART1.

4.1. REZULTATI

Dobiveni rezultati prikazani su redosljedom kao i opisani postupci u eksperimentalnom djelu pomoću kojih se došlo do istih.

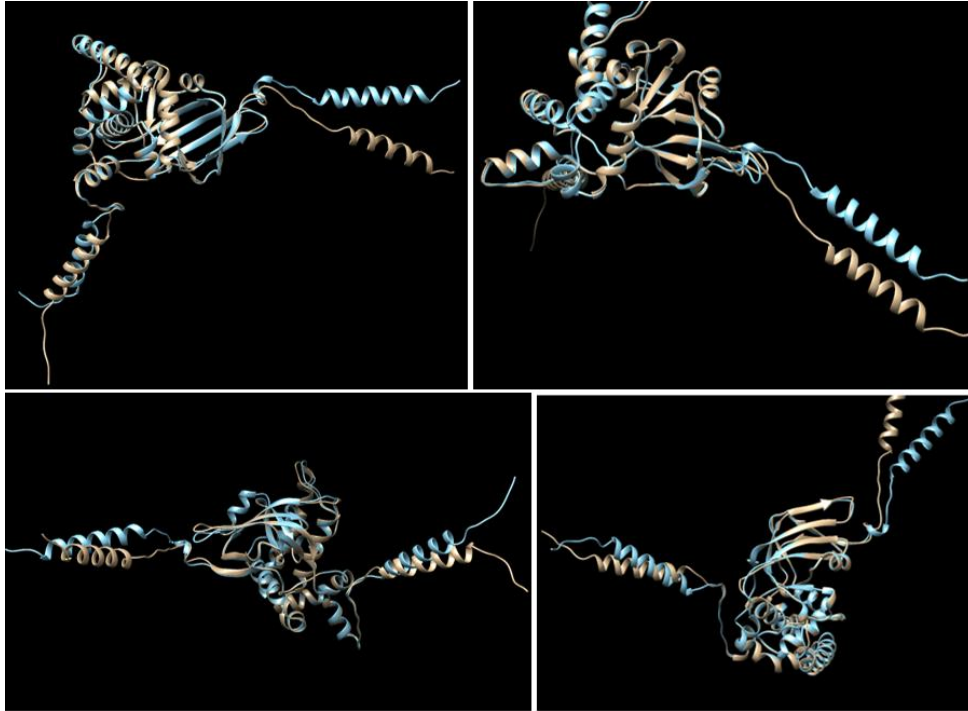
4.1.1. Struktura proteina ART1 i homologni proteini

Koristeći ColabFold, predviđena je trodimenzionalna struktura proteina ART1 te je prikazana na slici 19.



Slika 19. Trodimenzionalna struktura ART1 proteina dobivena homolognim pristajanjem pomoću ColabFold-a (*vlastita fotografija*)

Slijedila je usporedba previđene 3D strukture sa 3D strukturom preuzetom sa AlphaFold stranice u računalnom alatu UCSF Chimera. Rezultat usporedbe prikazan je na slici 20.



Slika 20. Usporedba struktura ART1 proteina u računalnom alatu UCSF Chimera; 3D struktura proteina ART1 enzima preuzeta sa AlphaFold stranice smeđe je boje, dok je 3D struktura ART1 enzima dobivena pomoću ColabFold-a označena plavom bojom (*vlastita fotografija*)

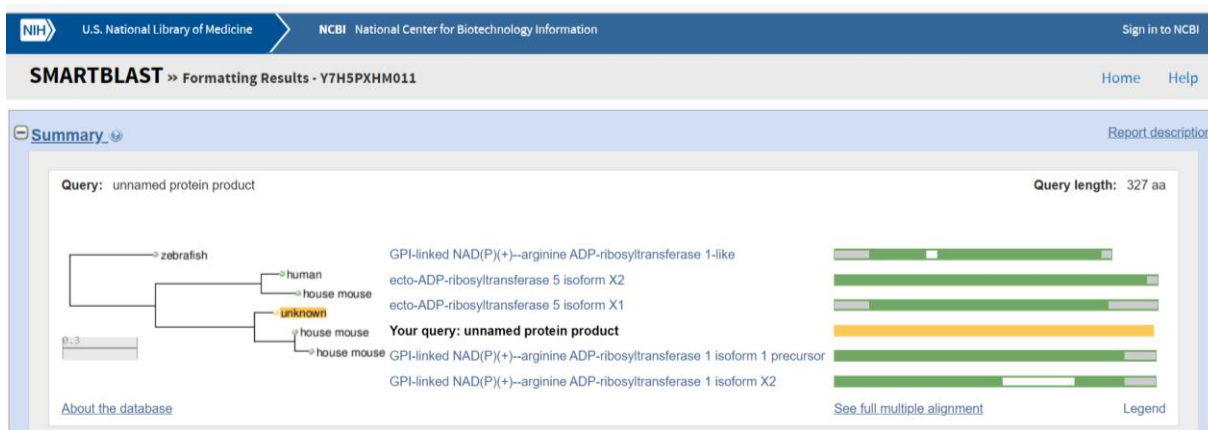
Dodatno su poravnate i aminokiselinske sekvence te je moguće vidjeti gdje se ove dvije strukture razlikuju. Poravnanje dviju aminokiselinskih sekvenci ART1 enzima prikazano je na slici 21.



Slika 21. Poravnane aminokiselinske sekvence ART1 enzima u programu UCSF Chimera; smeđe označeno ime proteina odnosi se na ART1 enzim sa AlphaFold stranice, dok plavo označeno ime sa ColabFold-a (*vlastita fotografija*)

4.1.1.1. Rezultati SmartBLAST-a i MADOKA web poslužitelja

Rezultati SmartBLAST-a prikazani su na slici 22 i 23. Na slici 22 gledajući slijeva na desno nalazi se filogenetičko stablo sa 6 sekvenci pri čemu je upit sekvenca (engl. *query sequence*) obojena u žuto. Također su prikazana imena ostalih sekvenci i grafički prikaz poravnanja višestrukih sekvenci. Upit sekvenca je obojena žuto, dok su ostale obojane zeleno. Delecije kod višestruko poravnanih sekvenci su označene kao bijele praznine, a regije u originalnom BLASTp (poravnanje samo dviju sekvenci) gdje upit sekvenca i druga sekvenca nisu poravnate su prikazane sivom bojom.



Slika 22. Rezultati SmartBLAST-a (vlastita fotografija)

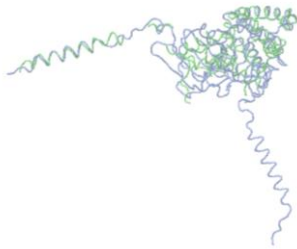
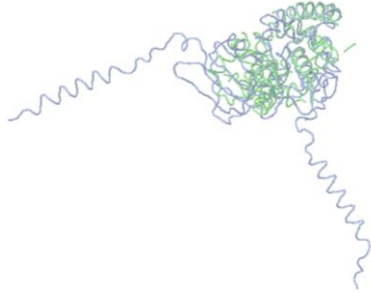
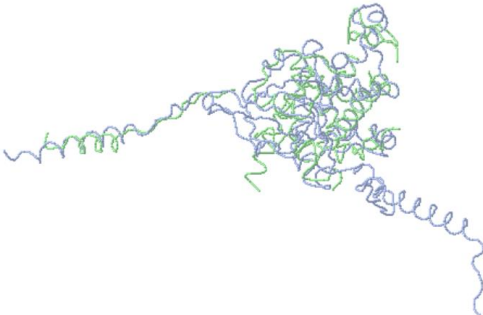
Pri tome je za daljnju analizu uzet samo čovječji enzim ekto-ADP-ribosiltransferaza 5. Poravnanje sekvenci ART1 i ART5 prikazano je na slici 23.

GenPept							
ecto-ADP-ribosyltransferase 5 isoform X2 [Homo sapiens]							
Sequence ID: XP_005252836.1 Length: 307 Number of Matches: 1							
Range 1: 1 to 295 GenPept ▼ Next Match ▲ Previous Match							
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame	
169 bits(429)	3e-49()	Compositional matrix adjust.	126/322(39%)	166/322(51%)	38/322(11%)		
Query 1	MQNPAMMSLLVSVGLMEALQAQSHPI	TRRDLFSQEIQDMALASFDDQYAGCAA	MTAA	60			
Sbjct 1	MALAALM-IALGSLGL-HTWQAQAVPI	-----LPLGLAPDTFDDTVGCAEEM	E	49			
Query 61	LPDLNHTFEQANQVYADSWTLASSQW	QERQARWPEWSLSPTRSPPLGFRDEH	G	120			
Sbjct 50	AAPLLKEEMAHHALLRESWEAAQETW	EDKR-----RGLTLPPGFKAQNGIA	IMV	98			
Query 121	YTANS-PLHKEFNAAVREAGRSRAHYL	HHSFKTLHFLLTEALQLL-GSG--QR	PPRCHQ	176			
Sbjct 99	YTNSNTLYWELNQAVRTGGGSR	ELYMRHFFKALHFYLIRALQLLRGSG	GRG-GEV	157			
Query 177	VFRGVHGLRFRPAGPRATVRLGGFAS	ASLKHVAAQQFGEDTFGGIWTCLG	APIKGY	236			
Sbjct 158	VFRGVGSLRFEPKRLGDSVRLGQFAS	SSLDKAVHRFGNATLSLTTCF	GAPIQAF	217			
Query 237	GEEVLIPPFETFOVINASRLAQGP	ARIYLRALGKHS---YNCEYI---K	DKKCKSGP	289			
Sbjct 218	KEREVLIPPEVFLV---TRFSQDGAQ	SLVTLWSYNTCSHFNCAYLG	KRRGCVS	274			
Query 290	CHLDNSAMGQSPLSAVWSLLL	311					
Sbjct 275	VQLGSGSEGA	SLPP-WKTL	295				

Slika 23. Poravnanje sekvenci ART1 i ART5 u SmartBLAST-u (vlastita fotografija)

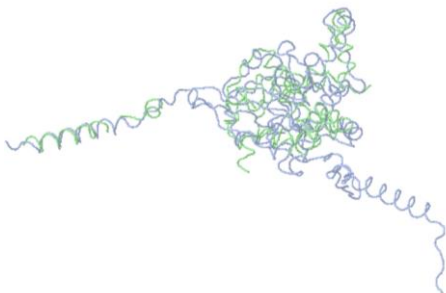
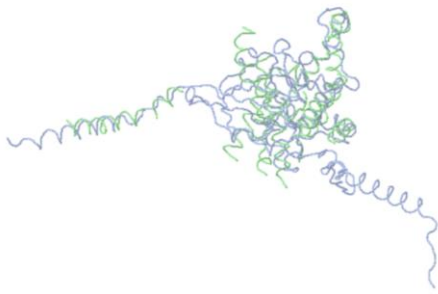
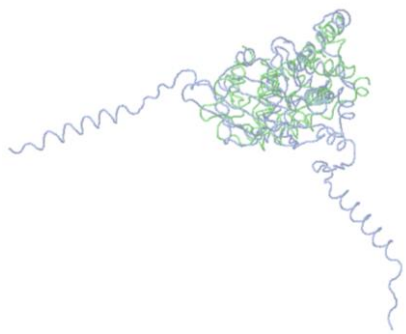
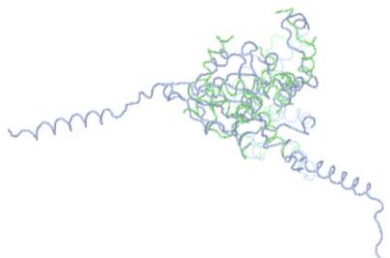
Usporedba 3D strukture enzima ART1 sa 3D strukturama ostalih poznatih proteina u ljudskom organizmu, sa ciljem pronalaska proteina sličnih struktura, napravljena je pomoću MADOKA-e te su rezultati prikazani u tablici ispod.

Tablica 1. Rezultati dobiveni pomoću web poslužitelja MADOKA koji pronalazi 3D proteinske strukture slične strukturi enzima od interesa, ART1; plavom bojom označena je 3D struktura ART1 enzima, a zelenom bojom struktura sličnog proteina

PDB ID	TM-OCJENA*	SLIKA
2XER	0,65035	
2V7D	0,624976	
4IUI	0,620093	

*TM ocjena → mjera sličnosti između dviju proteinskih struktura (< 0,20 → proteini nisu slični; > 0,50 → proteini imaju vrlo sličnu strukturu; =1 → savršena podudaranost struktura)

Tablica 1. Rezultati dobiveni pomoću web poslužitelja MADOKA koji pronalazi 3D proteinske strukture slične strukturi enzima od interesa, ART1; plavom bojom označena je 3D struktura ART1 enzima, a zelenom bojom struktura sličnog proteina - *nastavak*

PDB ID	TM-OCJENA*	SLIKA
3BEJ	0,613135	
5FN5_B	0,603201	
5IAW	0,603068	
4ZJW	0,600316	

*TM ocjena → mjera sličnosti između dviju proteinskih struktura (< 0,20 → proteini nisu slični; > 0,50 → proteini imaju vrlo sličnu strukturu; =1 → savršena podudaranost struktura)

4.1.2. Izabrani prirodni ligandi

Na temelju literaturnih podataka te prijedlogom ChatGPT-a izabrana su 34 prirodna spoja kao potencijalni inhibitori enzima ART1. Imena istraživačkih radova iz kojih su izdvojeni sintetski spojevi, inhibitori PARP i MARP enzima, imena sintetskih spojeva, imena prirodnih spojeva nađenih na temelju strukture sintetskih, postotak sličnosti između sintetskih i prirodnih spojeva te COCONUT ID prirodnih spojeva prikazani su u tablici 2. Kemijske strukture spojeva kao i COCONUT ID nalaze se u tablici 3.

Tablica 2. Izdvojeni spojevi

Istraživački rad	Sintetski spoj (IUPAC)	Prirodni spoj (IUPAC)	COCONUT ID	% sličnosti
Design, synthesis and evaluation of potent and selective inhibitors of mono-(ADP-ribosyl) transferases PARP10 and PARP14 (Holechek i sur., 2018)	4-(4-karbamoilfenoksi)benzamid	4-[(3-metil-2-buten-1-il)oksi]benzamid	CNP0432469	94,17 %
Research Progress on PARP14 as s Drug Target (Qin i sur., 2019)	3-aminobenzamid	5-amino-2-fluorobenzamid	CNP0087987	96,88 %
	prirodni spoj	5 <i>H</i> -fenantridin-6-on	CNP0348039	100 %
	2- {[(3-amino-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-5-il)sulfanil]metil}-8-metilkvinazolin-4(3 <i>H</i>)-on	2-[(4-okso-3,4-dihidrokvinaolin-2-il)sulfanil]- <i>N</i> -fenilacetamid	CNP0114285	86,24 %
	2-metil-3,5,6,7-tetrahidro-4 <i>H</i> -ciklopenta[4,5]tieno[2,3- <i>d</i>]pirimidin-4-on	<i>N</i> -[(oktahidro-1 <i>H</i> -kvinaolin-1-il)metil]-3-{2,5,6-trimetil-4-okso-3 <i>H</i> ,4 <i>H</i> -tieno[2,3- <i>d</i>]pirimidin-3-il}propanamid	CNP0405359	83,52 %

Tablica 2. Izdvojeni spojevi - *nastavak*

Istraživački rad	Sintetski spoj (IUPAC)	Prirodni spoj (IUPAC)	COCONUT ID	% sličnosti
Research Progress on PARP14 as s Drug Target (Qin i sur., 2019)	2-({4-[(1R)-1-(dimetilamino)etil]fenil}amino)-6-fluoro-1,3-benzotiazol4-karboksiamid	N-(1,3-benzotiazol-2-il)-2-(3-metil-2,5-dioksa-2,3,4,5-tetrahidro-1H-1,4-benzodiazepin-1-il)acetamid	CNP0399831	88,66 %
	~{N}'-(3-aminokarbonilfenil)-~{N}-[[1-[(2~)-2-fenilpropil]-1,2,3-triazol-4-il]metil]pentanediamid	6-{[4-(3-aminofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]metil}-N-benzil-1-azabicyklo[2.2.2]oktan-3-karboksamid	CNP0011571	85,12 %
	3-[[4-[4-(4-fluorofenil)piperazin-1-il]-4-oksidaniliden-butanoil]amino]benzamid	2-[3-etil-1-(4-fluorobenzoil)piperidin-4-il]-N-fenilacetamid	CNP0307022	91,34 %
	N-{4-[4-(difenilmetoksi)piperidin-1-il]butil}[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-6-amin	N-[(oktahidro-1H-kvinolizin-1-il)metil]-2-{[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-6-ilsulfanil}acetamid	CNP0405089	76,88 %
	2-{{(1-metilpiperidin-4-il)metil}amino}-5,6,7,8-tetrahidro[1]benzotieno[2,3-d]pirimidin-4(3H)-on	5-metil-N-[(oktahidro-1H-kvinolizin-1-il)metil]-4-okso-3H,4H-tieno[2,3-d]pirimidine-6-karboksamid	CNP0312647	90,66 %
	4-[3-[4-(4-fluorofenil)piperidin-1-il]karbonilfenoksi]benzamid	N-{[4-(4-metoksifenil)oksan-4-il]metil}-4-(2-metilpropoksi)benzamid	CNP0139001	85,9 %
	prirodni spoj	{[5-(6-amino-9H-purin-9-il)-3,4-dihidroksioksolan-2-il]metoksi}({hidroksi}[(3,4,5-trihidroksioksolan-2-il)metoksi]fosforil}oksi)fosfonska kiselina	CNP0219461	100 %

Tablica 2. Izdvojeni spojevi - *nastavak*

Istraživački rad	Sintetski spoj (IUPAC)	Prirodni spoj (IUPAC)	COCONUT ID	% sličnosti
Research Progress on PARP14 as s Drug Target (Qin i sur., 2019)	prirodni spoj	[[{[5-(6-amino-9H-purin-9-il)-3,4-dihidroksioksolan-2-il]metoksi}(hidroksi)fosforil]oksi]fosfonska kiselina	CNP0404212	100 %
Specific Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Synthetase and Mono(ADP-Ribosyl) Transferas (Banasik i sur., 1992)	prirodni spoj	2-metil-3-(3,7,11,15-tetrametilheksadek-2-en-1-il)-1,4-dihidronaftalen-1,4-dion	CNP0273613	100 %
	prirodni spoj	5-hidroksi-6-({2-hidroksi-3-[4-hidroksi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)benzamido]-8-metil-4-okso-4H-kromen-7-il}oksi)-3-metoksi-2,2-dimetiloksan-4-il karbamat	CNP0227973	100 %
	prirodni spoj	ikosanska kiselina	CNP0374238	100 %
	prirodni spoj	oktadekanska kiselina	CNP0396081	100 %
	prirodni spoj	heksadekanska kiselina	CNP0420987	100 %
MARTs and MARYlation in the Cytosol: Biological Functions, Mechanisms of Action, and Therapeutic Potential (Challa i sur., 2021)	prirodni spoj	1,4-dihidronaftalen-1,4-dion	CNP0388462	100 %
	prirodni spoj	7H-furo[3,2-g]kromen-7-on	CNP0328096	100 %
	prirodni spoj	2-fenil-4H-kromen-4-on	CNP0216699	100 %

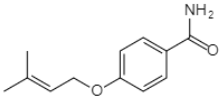
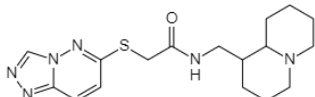
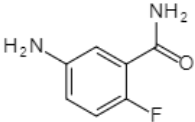
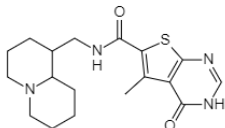
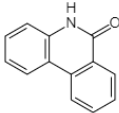
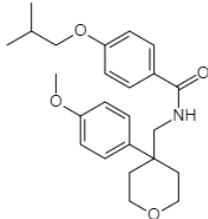
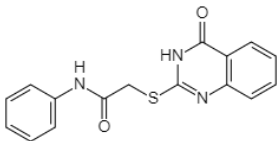
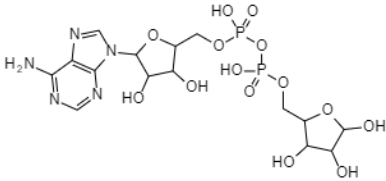
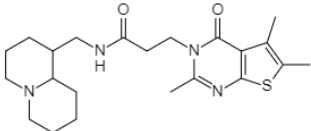
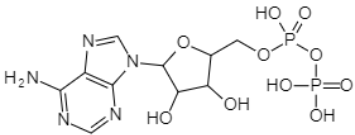
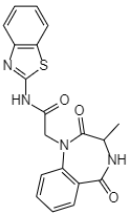
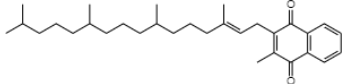
Tablica 2. Izdvojeni spojevi - *nastavak*

Istraživački rad	Sintetski spoj (IUPAC)	Prirodni spoj (IUPAC)	COCONUT ID	% sličnosti
MARTs and MARYlation in the Cytosol: Biological Functions, Mechanisms of Action, and Therapeutic Potential (Challa i sur., 2021)	4-[[[(2 <i>S</i>)-1-[3-oxo-3-[4-[5-(trifluorometil)pirimidin-2-il]piperazin-1-il]propoksi]propan-2-il]amino]-5-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -piridazin-6-on	6,8-dimetil-4-(metilamino)-5 <i>H</i> ,6 <i>H</i> ,7 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -piridazino[3,4- <i>d</i>]pirimidin-5,7-dion	CNP0345129	78,02 %
	4-[[[(2 <i>S</i>)-1-[3-oxo-3-[4-[5-(trifluorometil)pirimidin-2-il]piperazin-1-il]propoksi]propan-2-il]amino]-5-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -piridazin-6-on	1-fenil-2-{3-[4-(2-pirimidinil)-1-piperazinil]propil}-1,2-dihidro-3,6-piridazindion	CNP0463376	68,69 %
	<i>N</i> -[2-(9 <i>H</i> -karbazol-1-il)fenil]acetamid	<i>N</i> -[2-(2-benzil-1 <i>H</i> -indol-3-il)etil]acetamid	CNP0253901	92,75 %
	<i>N</i> -[2-(9 <i>H</i> -karbazol-1-il)fenil]acetamid	1-fenil-9 <i>H</i> -karbazol	CNP0095267	92,48 %
	<i>N</i> -[2-(9 <i>H</i> -karbazol-1-il)fenil]acetamid	<i>N</i> -(2,3-dimetilfenil)-2-[(4-okso-3,4-dihidrokinazolin-2-il)sulfanil]acetamid	CNP0010413	87,31 %
	prirodni spoj	3,4-dihidroizokvinolin-1(2 <i>H</i>)-on	CNP0436374	100 %
PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance (Rose i sur., 2020)	4-[[3-[4-(ciklopropankarbonil)piperazin-1-karbonil]-4-fluorofenil]metil]-2 <i>H</i> -ftalazin-1-one	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -[(oktahidro-1 <i>H</i> -kvinolizin-1-il)metil]-2-(4-okso-3,4-dihidroftalazin-1-il)acetamid	CNP0284002	88,75 %
	6-fluoro-2-[4-(metilaminometil)fenil]-3,10-diazatriciklo[6.4.1.0 ^{4,13}]trideka-1,4,6,8(13)-tetraen-9-on	4-fluoro- <i>N</i> -[2-(2-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)etil]benzamid	CNP0010001	92,45 %

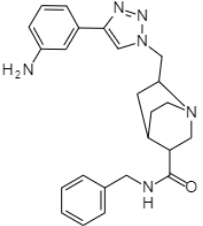
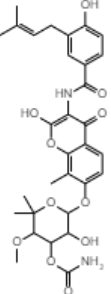
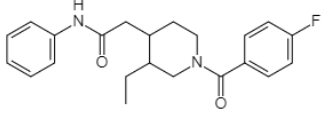
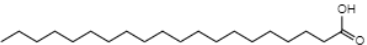
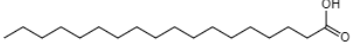
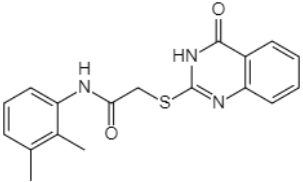
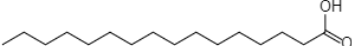
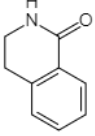
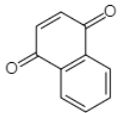
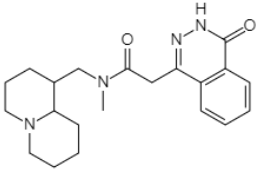
Tablica 2. Izdvojeni spojevi - nastavak

Istraživački rad	Sintetski spoj (IUPAC)	Prirodni spoj (IUPAC)	COCONUT ID	% sličnosti
PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance (Rose i sur., 2020)	2-[4-[(3 <i>S</i>)-piperidin-3- il]fenil]indazol-7- karboksamid	N-[2-(1 <i>H</i> -indol-3- il)etil]-3-(4-okso- 3,4-dihidro-1,2,3- benzotriazin-3- il)propanamid	CNP0324796	86,59 %
	2-[(2 <i>R</i>)-2-metilpirolidin-2- il]-1 <i>H</i> -benzimidazol-4- karboksamid	2-[1-(2- metilpropil)pirolidi n-3-il]-1 <i>H</i> -1,3- benzodiazol-7- karboksamid	CNP0014024	97,09 %
	4-[[4-fluoro-3-[2- (trifluorometil)-6,8-dihidro- 5 <i>H</i> -[1,2,4]triazolo[1,5- a]pirazin-7- karbonil]fenil]metil]-2 <i>H</i> - ftalazin-1-on	2-[5-fenil-7- (trifluorometil)pira zolo[1,5- a]pirimidin-2- karbonil]-1,2,3,4- tetrahidroizokvinoli n	CNP0363768	81,82 %
CHAT GPT	prirodni spoj	1,7-bis(4-hidroksi- 3- metoksifenil)hepta- 1,6-dien-3,5-dion	CNP0337918	100 %
CHAT GPT	prirodni spoj	2-(3,4- dihidroksifenil)- 5,7-dihidroksi-3- [(3,4,5-trihidroksi- 6-metiloksan-2- il)oksi]-4 <i>H</i> - kromen-4-on	CNP0171505	100 %
CHAT GPT	prirodni spoj	5-[2-(4- hidroksifenil)etenil] benzen-1,3-diol	CNP0247661	100 %

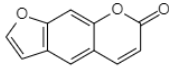
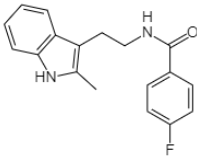
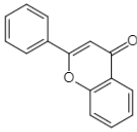
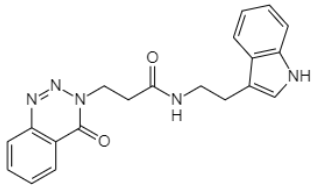
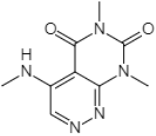
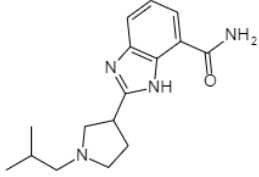
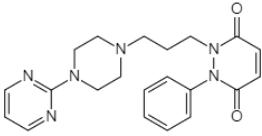
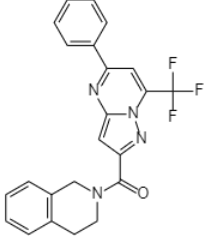
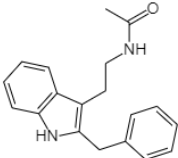
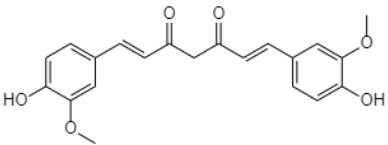
Tablica 3. COCONUT ID i kemijske strukture izabranih prirodnih spojeva (preuzete sa COCONUT: Natural Products Online)

COCONUT ID	Kemijska struktura	COCONUT ID	Kemijska struktura
CNP0432469		CNP0405089	
CNP0087987		CNP0312647	
CNP0348039		CNP0139001	
CNP0114285		CNP0219461	
CNP0405359		CNP0404212	
CNP0399831		CNP0273613	

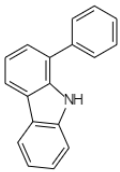
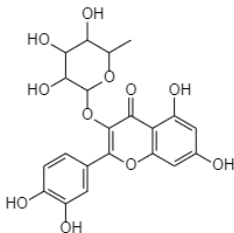
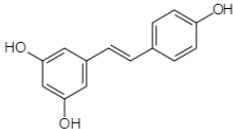
Tablica 3. COCONUT ID i kemijske strukture izabranih prirodnih spojeva (preuzete sa COCONUT: Natural Products Online) - *nastavak*

COCONUT ID	Kemijska struktura	COCONUT ID	Kemijska struktura
CNP0011571		CNP0227973	
CNP0307022		CNP0374238	
CNP0396081		CNP0010413	
CNP0420987		CNP0436374	
CNP0388462		CNP0284002	

Tablica 3. COCONUT ID i kemijske strukture izabranih prirodnih spojeva (preuzete sa COCONUT: Natural Products Online) - *nastavak*

COCONUT ID	Kemijska struktura	COCONUT ID	Kemijska struktura
CNP0328096		CNP0010001	
CNP0216699		CNP0324796	
CNP0345129		CNP0014024	
CNP0463376		CNP0363768	
CNP0253901		CNP0337918	

Tablica 3. COCONUT ID i kemijske strukture izabranih prirodnih spojeva (preuzete sa COCONUT: Natural Products Online) - *nastavak*

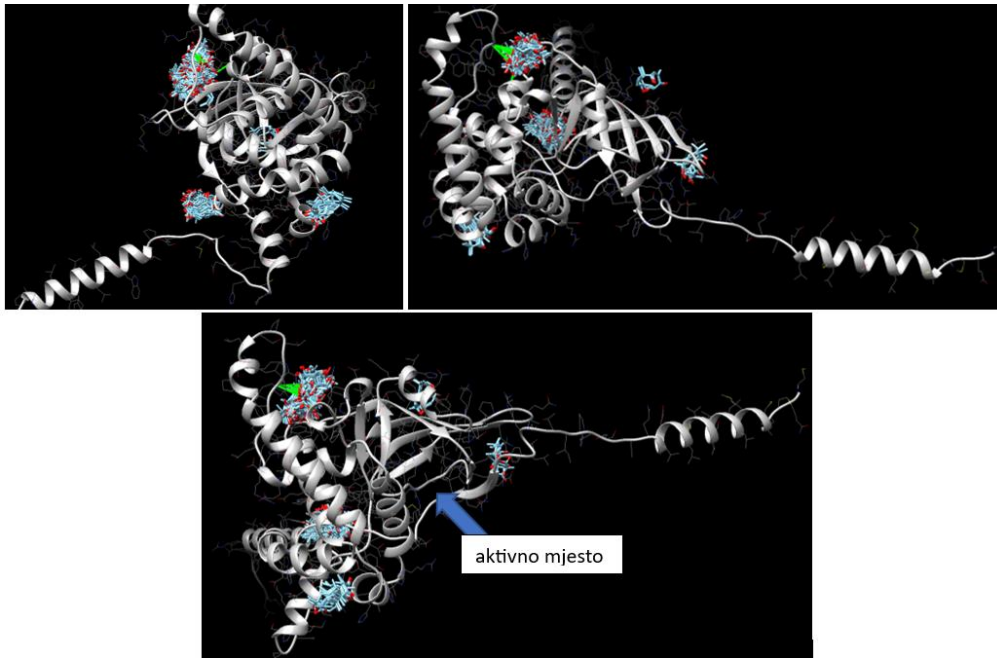
COCONUT ID	Kemijska struktura	COCONUT ID	Kemijska struktura
CNP0095267		CNP0171505	
CNP0247661			

Spojevi navedeni u tablicama 2 i 3 korišteni su prilikom molekularnog pristajanja kako bi se provjerilo stvaranje interakcija sa ART1 enzima koji se želi inhibirati.

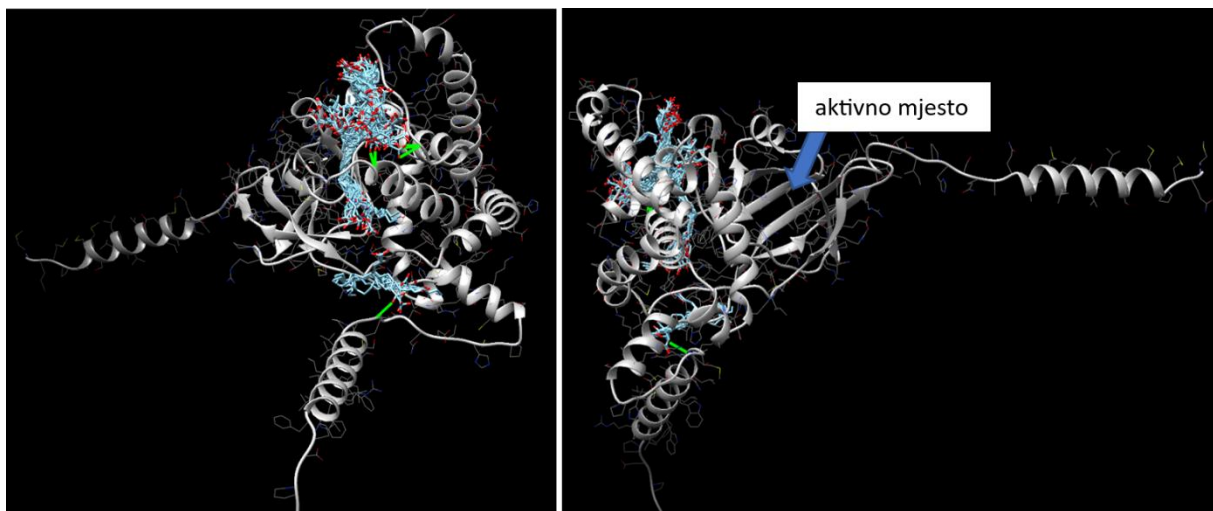
4.1.3. Slijepa proba

Prije samog molekularnog pristajanja napravljena je „slijepa proba“ na način da su nasumično izabrana dva spoja iz COCONUT: Natural Products Online baze podataka. Provedeno je molekularno pristajanje kako bi se utvrdilo da ne dolazi do stvaranja interakcija enzima ART1 sa bilo kojom molekulom u veznom mjestu enzima; odnosno da postoji određena specifičnost. Dobiveni rezultati prikazani su slikama 24 i 25.

Na slikama su prikazane sva mjesta na enzimu sa kojima molekule stvaraju interakcije kao i konformacije koje one prilikom toga zauzimaju. Iz slika je vidljivo da se fekserol i 2-heksadekanoična kiselina ne vežu u aktivno mjesto enzima ART1.



Slika 24. Rezultat molekularnog pristajanja sa nasumično izabranim spojem fekserolom (IUPAC: 4,7,7,11- tetrametil-12-oksabiciklo[9.1.0]dodek-4-ene-3,6-diol) u programu UCSF Chimera (*vlastita fotografija*)



Slika 25. Rezultat molekularnog pristajanja sa nasumično izabranim spojem 2-heksadekanoična kiselina (prema IUPAC) u programu UCSF Chimera (*vlastita fotografija*)

4.1.4. Molekularno pristajanje u SwissDock-u

Nakon provedbe molekularnog pristajanja sa izabranim prirodnim spojevima navedenim u tablici 2, rezultati su preuzeti sa web stranice SwissDock-a te analizirani u UCSF Chimeri.

Pri tom su u tablici 4 izdvojene vrijednosti kao što su slobodna energija vezanja, broj klasteri i veličina klastera te „pune sposobnosti vezanja“ (engl. *full fitness*) samo za one konformacije molekula u kojima se molekule vežu u aktivno mjesto, točnije vezno mjesto, enzima ART1 što je postignuto vizualizacijom interakcija.

Rezultati su sažeti te je važno napomenuti kako su unutar klastera (koji predstavlja skupinu sličnih konformacija koje molekula poprimi stvarajući interakcije sa enzimom ART1) izdvojene one vrijednosti slobodne energije vezanja (ΔG) koje su bile čim više negativnije, a čija je „pune sposobnosti vezanja“ (engl. *full fitness*) bila što bliže 0, odnosno tražene su pozitivnije vrijednosti.

Za daljnju analizu uzeto je 13 prirodnih spojeva koji su imali što negativniju Gibbsovu slobodnu energiju vezanja (ΔG) (upućuje na spontanost reakcije i da je reakcija pogodna za odvijanje), veći broj klastera i veću veličinu klastera (veći broj klastera ukazuje na često stvaranje interakcije između inhibitora i enzima ART1 te je više različitih konformacija koje molekula poprima, a koje imaju sličnu energiju vezanja, smješteno u jedan klaster; što je veličina klastera veća to ukazuje na stabilniju vezu između enzima ART1 i inhibitora) te što pozitivniju vrijednost „pune sposobnosti vezanja“ (opisuje interakcije između liganda i enzima ART1 kao što su van der Waals te elektrostatske interakcije te energiju desolvacije).

Rezultati pristajanja za svih 34 prirodnih liganada prikazani su u tablici 4. Spojevi (njih 13) uzeti za danje istraživanje označeni su žutom bojom.

Tablica 4. Rezultati molekularnog pristajanja u web poslužitelju SwissDock. Znak [/] označuje da ligand ne ulazi u aktivno mjesto enzima

COCONUT ID	Klaster	Veličina klastera	FullFitness (kcal/moL)	ΔG (kcal/moL)
CNP0095267	16	0-7	-1180,7266	-6,723138
	26	0-7	-1179,1875	-6,3247313
	30	0-7	-1178,9067	-6,72568
CNP0114285	2	0-13	-1250,4507	-7,7024384
	3	0-15	-1250,6036	-7,9872737
	14	0-9	-1257,1531	-7,9983764
	15	0-6	-1256,8644	-7,490413
	16	0	-1256,9629	-8,095329
	19	0-7	-1255,7273	-7,969472
	25	0-4	-1246,739	-7,89781
	26	0-7	-1253,2551	-7,631345
	30	0-4	-1250,7283	-7,2002807
	39	0-4	-1244,5037	-6,99838
	43	0	-1241,0198	-5,986068
	46	0	-1238,0854	-7,111845
	47	0	-1232,8674	-5,985975
	CNP0014024	0	0-15	-1262,7932
1		0-7	-1258,4474	-9,173299
3		0-7	-1249,2866	-9,041355
8		0-9	-1249,1316	-8,2043705
33		0-1	-1239,5736	-8,155413
36		0-1	-1243,6292	-7,214959
37		0-1	-1232,7817	-7,4677143
CNP0436374	33	0-4	-1207,4355	-5,9805994
CNP0010001	11	0-7	-1202,3024	-7,2610946
	20	0-7	-1207,1963	-7,5942082
	28	0-7	-1205,155	-7,0453362
CNP0087987	16	0-7	-1233,9473	-6,666003
	0	0-7	-1240,2234	-7,098999
	4	0-7	-1235,814	-6,1709523
	9	0-7	-1223,869	-5,2456565
	13	0-7	-1229,042	-5,839123
	18	0-6	-1231,6876	-6,5272384
	20	0-7	-1233,4646	-6,313435
	26	0-4	-1232,566	-6,4947524
	36	0	-1228,4774	-5,89891

Tablica 4. Rezultati molekularnog pristajanja u web poslužitelju SwissDock. Znak [/] označuje da ligand ne ulazi u aktivno mjesto enzima - *nastavak*

COCONUT ID	Klaster	Veličina klastera	FullFitness (kcal/moL)	ΔG (kcal/moL)
CNP0348039	0	0-10	-1202,537	-6,9957485
	16	0-7	-1196,7981	-6,3577075
	24	0-7	-1195,4949	-6,5715146
	32	0-5	-1193,9133	-6,1694393
CNP0432469	3	0-6	-1218,0145	-7,0109606
	14	0-4	-1210,3857	-6,800111
	28	0-1	-1214,0347	-7,0171695
	34	0	-1213,0653	-7,047587
	42	0-4	-1201,7078	-6,311844
	48	0	-1199,9491	-5,819813
CNP0337918	25	0-7	-1184,8201	-7,3511863
	15	0-7	-1204,6708	-8,002725
	19	0-6	-1196,9391	-8,128664
	28	0-7	-1200,2402	-7,786228
	41	0	-1169,9263	-6,4039
CNP0284002	20	0-7	-1232,81	-8,72136
	1	0-7	-1238,9214	-7,395354
	7	0-7	-1235,7083	-7,541436
	29	0-6	-1228,7347	-8,7148905
	39	0	-1215,3906	-7,057491
CNP0405359	6	0-7	-1291,6451	-9,233473
	0	0-3	-1290,7346	-9,764485
	13	0-4	-1297,3546	-6,032035
	18	0-3	-1292,6187	-6,6858144
	21	0-2	-1291,576	-9,150464
	22	0-7	-1291,31	-6,3027515
	33	0-7	-1298,5288	-9,052091
	39	0	-1287,2997	-6,2345595
	40	0	-1285,7114	-9,08568
CNP0399831	6	0-6	-1180,1597	-7,656442
	22	0-7	-1173,8171	-7,9514728
	38	0	-1166,5367	-7,095836
CNP0011571	17	0-7	-1260,3123	-9,8836775
	12	0-7	-1261,626	-6,7319603
	14	0-4	-1261,2401	-6,7215233
	17	0-7	-1259,945	-9,80470320
	20	0-7	-1250,8203	-6,2686763
	27	0-7	-1259,282	-6,7803483
	32	0-5	-1257,4462	-6,0341883
CNP0307022	2	0-6	-1200,0024	-7,9216204
	11	0-7	-1217,5098	-7,268511
	28	0-7	-1212,8949	-7,525348
	48	0	-1202,5125	-7,207959

Tablica 4. Rezultati molekularnog pristajanja u web poslužitelju SwissDock. Znak [/] označuje da ligand ne ulazi u aktivno mjesto enzima - *nastavak*

COCONUT ID	Klaster	Veličina klastera	FullFitness (kcal/moL)	ΔG (kcal/moL)
CNP0405089	0	0-7	-1267,3234	-9,713544
	9	0-4	-1261,5645	-9,014441
	11	0-10	-1251,7405	-6,702982
	23	0	-1258,582	-7,1494327
	26	0-2	-1257,9272	-6,31725
	51	0-2	-1247,42	-7,678391
CNP0312647	8	0	-1287,697	-7,3692718
	11	0-6	-1285,3788	-7,094859
	18	0-7	-1285,6655	-6,9497294
	36	0-2	-1280,4016	-6,2653775
	37	0-11	-1261,6237	-5,7418785
	39	0	-1279,8062	-6,4517255
	47	0	-1270,9497	-6,570882
CNP0324796	27	0-5	-1208,5627	-7,526905
	10	0	-1223,1304	-7,8274536
	11	0-29	-1209,783	-7,4422054
	35	0-4	-1213,1498	-7,6405416
	37	0	-1215,0713	-7,851567
	39	0-1	-1213,4893	-7,4108324
	44	0	-1210,0978	-6,7727103
	48	0	-1201,6979	-6,451831
	49	0	-1197,2228	-6,9115176
CNP0363768	9	0-15	-1157,5726	-8,168818
	25	0-7	-1152,9016	-7,180757
CNP0345129	1	0-3	-1267,4613	-7,032891
	5	0-7	-1265,5244	-6,7222185
	10	0-7	-1264,2441	-6,8233724
	15	0-7	-1263,8982	-6,831152
	20	0-7	-1262,6049	-6,648398
	32	0-7	-1255,0028	-6,382152
	33	0-7	-1255,0508	-6,695669
	40	0-3	-1249,8596	-5,7239203
CNP0463376	7	0-7	-1185,4763	-8,1944275
	11	0-7	-1171,6455	-7,6776223
	24	0-5	-1181,5112	-7,719248
	34	0-1	-1163,7301	-7,1264176
CNP0396081	/	/	/	/
CNP0374238	29	0-5	-1273,4661	-7,7783017
	46	0	-1270,793	-7,7014604
	49	0	-1264,7925	-7,7053905

Tablica 4. Rezultati molekularnog pristajanja u web poslužitelju SwissDock. Znak [/] označuje da ligand ne ulazi u aktivno mjesto enzima - *nastavak*

COCONUT ID	Klaster	Veličina klastera	FullFitness (kcal/moL)	ΔG (kcal/moL)
CNP0219461	13	0-7	-1332,7334	-10,032517
	12	0-7	-1326,3596	-9,7202215
	17	0-7	-1348,4559	-9,562868
	19	0-15	-1325,5409	-10,94254
	23	0-7	-1346,8228	-8,410454
	26	0-7	-1342,0762	-10,720382
CNP0404212	19	0-3	-1452,3384	-10,644019
	22	0-3	-1451,7797	-9,842455
CNP0216699	0	0-7	-1186,974	-7,0175943
	10	0-6	-1180,3889	-6,33272
	16	0-7	-1182,3975	-6,2544417
	20	0-4	-1183,6023	-6,5551896
	30	0-2	-1180,9927	-6,1997805
	40	0	-1175,7838	-6,289721
CNP0010413	2	0-7	-1234,0907	-7,0927205
	15	0-5	-1232,5989	-7,0342
	19	0-4	-1240,7175	-7,476923
	20	0-7	-1244,9531	-8,337698
	22	0-5	-1250,0615	-7,919514
	25	0-3	-1240,3721	-7,125449
	26	0-7	-1248,7241	-7,096133
	30	0-7	-1247,304	-7,4664826
	33	0-7	-1235,5532	-6,759425
	40	0-1	-1238,8516	-7,0386767
	43	0-1	-1233,7008	-7,0278325
	45	0-2	-1219,2009	-6,723372
	46	0	-1224,8252	-5,995075
47	0-2	-1209,5227	-5,2126527	
CNP0253901	12	0-7	-1208,9459	-7,0294485
	18	0-7	-1216,1892	-7,649203
CNP0139001	2	0-7	-1199,3286	-7,615561
	11	0-7	-1196,2977	-8,347961
	23	0-7	-1192,139	-8,144551
	33	0-3	-1178,424	-7,2803383
CNP0388462	5	0-7	-1191,3274	-6,038572
	0	0-7	-1195,6115	-6,180723
	1	0-7	-1195,3833	-6,056369
	2	0-4	-1191,855	-5,671581
	28	0-7	-1191,979	-5,8503485
	31	0-2	-1191,3054	-5,921678
CNP0227973	3	0-7	-1163,063	-9,946006
	23	0-7	-1152,2604	-8,812897
	29	0-7	-1145,968	-9,958631

Tablica 4. Rezultati molekularnog pristajanja u web poslužitelju SwissDock. Znak [/] označuje da ligand ne ulazi u aktivno mjesto enzima - *nastavak*

COCONUT ID	Klaster	Veličina klastera	FullFitness (kcal/moL)	ΔG (kcal/moL)
CNP0420987	16	0-7	-1280,8115	-9,107049
	24	0-7	-1264,7393	-8,122224
	25	0-7	-1270,0352	-8,051383
CNP0273613	31	0-7	-1201,9325	-7,649712
CNP0328096	6	0-7	-1195,2437	-6,601971
	0	0-7	-1197,2231	-6,8350277
	14	0-7	-1193,907	-6,594058
	22	0-7	-1191,6276	-6,1317167
	23	0-7	-1190,9728	-5,8901844
	31	0-7	-1190,3059	-5,916376
CNP0247661	4	0-1	-1238,4333	-7,2485766
	33	0	-1231,8032	-6,4401965
	42	0-3	-1227,7664	-5,9901767
	43	0	-1227,5875	-6,3925223
CNP0171505	0	0-13	-1204,3337	-8,448663
	1	0-8	-1207,4614	-8,192586
	3	0-5	-1208,3833	-8,22352
	6	0-7	-1199,8894	-7,954692
	15	0-7	-1206,7867	-8,071146
	17	0-7	-1202,9734	-8,27622
	21	0	-1206,4264	-8,268975
	23	0-7	-1203,3223	-7,50939
	24	0-7	-1205,7136	-8,458339
	29	0-7	-1203,7347	-7,3920584
	36	0	-1199,674	-6,436174
	40	0	-1195,8235	-6,5858526
	41	0	-1192,3661	-5,0271883
	42	0	-1190,9022	-5,0525656

4.1.5. Molekularno pristajanje u programskom paketu AutoDock

Slijedeći korak bio je validacija rezultata, odnosno potvrditi kako se veže molekula liganda u aktivno mjesto te koliko iznosi slobodna energija vezanja. Validacija se najčešće radi eksperimentalnim metodama u laboratoriju, biokemijskim testovima ili rendgenskom kristalografijom, te se tako dobivaju najtočniji rezultati. No za potrebe ovog rada, validacija rezultata također je napravljena *in silico* metodom, odnosno korištenjem programskih paketa za molekularno pristajanje nazvanog AutoDock.

Prilikom analize rezultata dobivenih AutoDock programskim paketom, u obzir je gledana Gibbsova slobodna energija vezanja (ΔG) odnosno najmanja vrijednost spomenute energije za testirani spoj te sa kojim aminokiselinskim ostacima enzima ART1 inhibitor stvara interakcije.

Rezultati dobiveni AutoDock-om za 13 spojeva prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Rezultati dobiveni AutoDock-om

AUTODOCK			
Protein	COCONUT ID (Ligand)	Najniža energija vezanja (ΔG)	Aminokiselinski ostaci
ART1	CNP0114285	-9,21	ARG179, HIS128, TYR121, SER202, PHE213, GLY180, ALA210, ALA203, SER204
ART1	CNP0014024	-7,94	ARG179, HIS128, THR122, SER202, PHE213, GLY180, ALA210, PHE235, SER204, GLU238
ART1	CNP0087987	-5,67	ARG179, PHE213, SER202, GLU240, ALA203, GLU238, SER204, GLY180, ALA210
ART1	CNP0405359	-9,61	HIS128, THR122, SER202, ALA210, PHE235, GLU240, SER204, GLU238, PHE213
ART1	CNP0011571	-10,29	ARG179, GLY180, HIS128, PHE213, SER202, GLN212, GLU234, ALA210
ART1	CNP0405089	-9,27	ARG179, GLY180, SER202, TYR121, ALA210, HIS128, THR122, SER204, GLU238, GLU240, PHE235,
ART1	CNP0324796	-9,9	ARG179, GLY180, TYR121, HIS128, THR122, ALA123, PHE235, SER202, PHE213, GLU240, ALA203, SER204, ALA210
ART1	CNP0345129	-6,45	ARG179, GLY180, GLU240, ALA203, PHE213, ALA210, SER204, GLU238, SER202
ART1	CNP0216699	-8,38	ARG179, GLY180, THR122, ALA203, SER202, ALA210, SER204, GLU238, GLU240, PHE213
ART1	CNP0010413	-9,53	ARG179, GLY180, HIS128, THR122, SER202, PHE235, ALA203, SER204, GLU238, PHE213
ART1	CNP0388462	-6,68	ASN132, PHE131, LEU158, TYR121, LEU242, GLY199, PHE200, ALA201
ART1	CNP0328096	-6,59	ARG179, GLY180, SER202, GLU240, ALA203, PHE213, ALA210, SER204, GLU238
ART1	CNP0171505	-8,02	ARG179 (HB), GLY180, HIS128, PHE213, SER202, ALA203, GLU240, GLU238, PHE178, SER204

Kako bi se izbor potencijalnih inhibitora enzima ART1 dodatno suzio, napravljena je usporedba rezultata dobivenih nakon provedbe molekularnog pristajanja u SwissDock-u i AutoDock-u. Pri tome su za izbor pogodnih liganda gledana dva kriterija a to su: najniža

slobodna energija vezanja te da se ligand veže u aktivno mjesto enzima čime će inhibirati njegovu aktivnost. Cilj je bio izdvojiti one ligande čiji rezultati pristajanja u oba programa (SwissDock i AutoDock) pokazuju približno iste vrijednosti Gibbsove slobodne energije vezanja (ΔG). Pri tome je važno imati na umu da SwissDock i AutoDock koriste različite funkcije bodovanja (engl. *scoring functions*) što za posljedicu ima i različite vrijednosti rezultata.

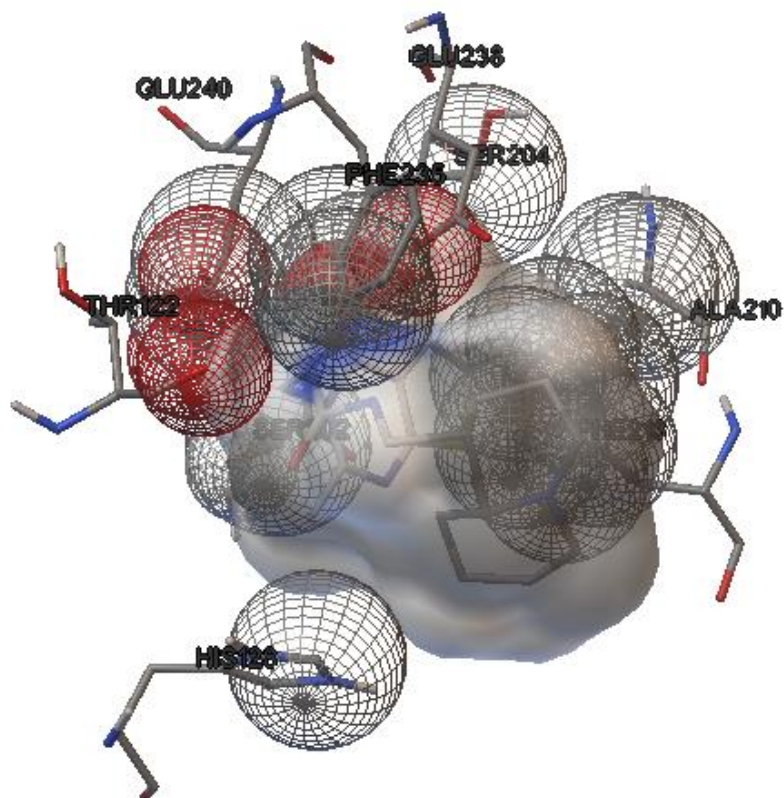
Usporedba najmanjih slobodnih Gibbsovih energija vezanja za 13 inhibitora dobivenih molekularnim pristajanjem u SwissDock-u i AutoDock-u prikazano je u tablici 6.

Tablica 6. Usporedba rezultata dobivenih molekularnim pristajanjem u SwissDock-u i AutoDock-u

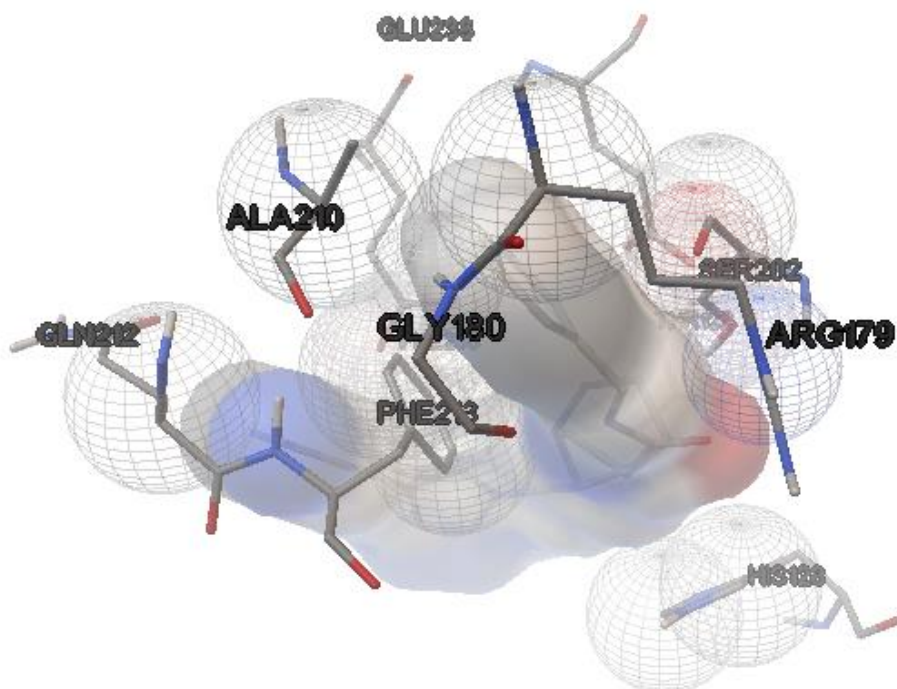
LIGANDI	LOWEST BINDING ENERGY (kcal/mol)	
	AutoDock	SwissDock
CNP0114285	-9,21	-8,095329
CNP0014024	-7,94	-10,041861
CNP0087987	-5,67	-7,098999
CNP0405359	-9,61	-9,764485
CNP0011571	-10,29	-9,8836775
CNP0405089	-9,27	-9,713544
CNP0324796	-9,9	-7,851567
CNP0345129	-6,45	-7,032891
CNP0216699	-8,38	-7,0175943
CNP0010413	-9,53	-7,4664826
CNP0388462	-6,68	-6,180723
CNP0328096	-6,59	-6,6835027
CNP0171505	-8,02	-8,458339

Od navedenih 13 spojeva, četvero njih izabrano je, na temelju usporedbe rezultata, kao ligandi koji u *in silico* metodama pokazuju najbolje vezanje za ciljani enzim ART1 te ga potencijalno mogu inhibirati i djelovati negativno na njegovu aktivnost. To su spojevi CNP0405359, CNP0011571, CNP0405089 i CNP0171505.

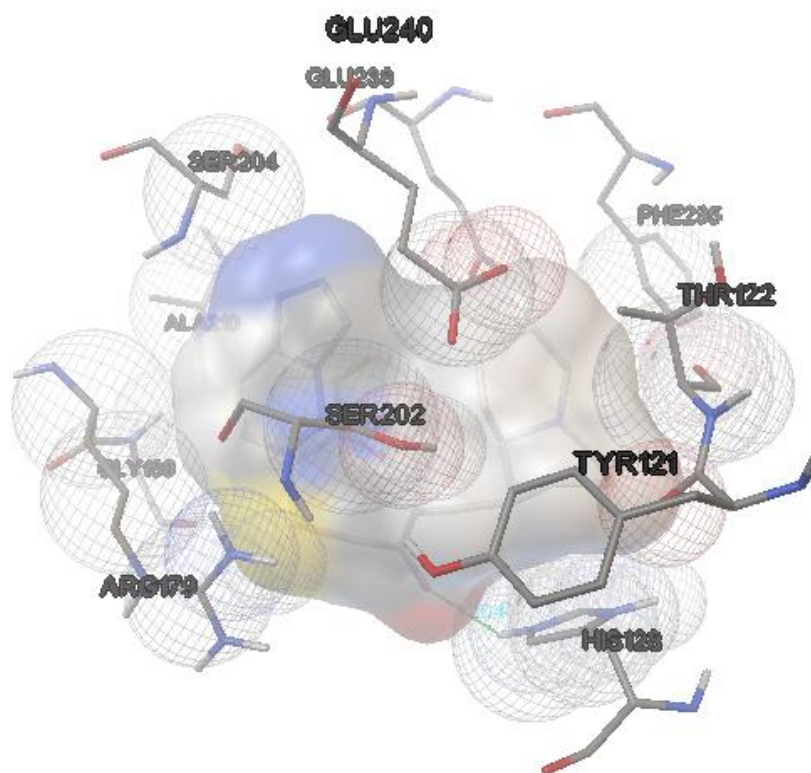
Interakcije koje ova 4 spoja stvaraju sa aminokiselinskim ostacima enzima ART1 prikazane su na slikama 26-29.



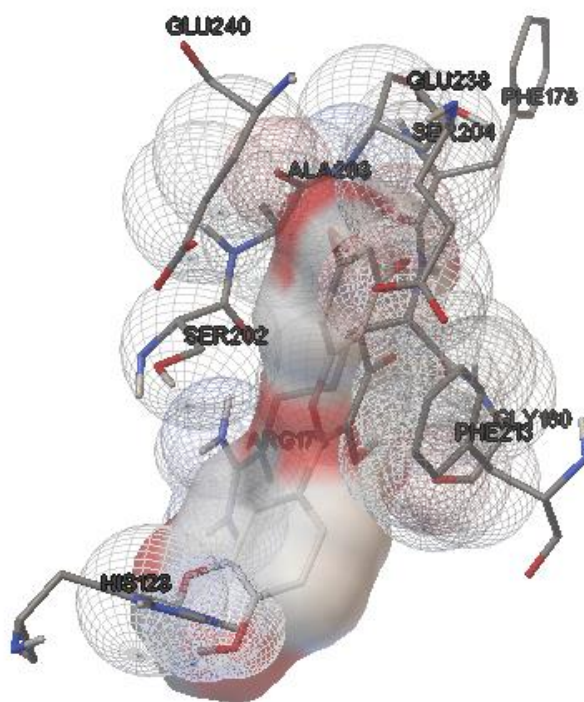
Slika 26. Spoj CNP0405359 (sivi „oblak“) te aminokiselinski ostaci sa kojima on ulazi u interakcije u aktivnom mjestu (*AutoDock; vlastita fotografija*)



Slika 27. Spoj CNP0011571 (sivi „oblak“) te aminokiselinski ostaci sa kojima on ulazi u interakcije u aktivnom mjestu (*AutoDock; vlastita fotografija*)



Slika 28. Spoj CNP0405089 (sivi „oblak“) te aminokiselinski ostaci sa kojima on ulazi u interakcije u aktivnom mjestu (*AutoDock; vlastita fotografija*)



Slika 29. Spoj CNP0171505 (sivi „oblak“) te aminokiselinski ostaci sa kojima on ulazi u interakcije u aktivnom mjestu (*AutoDock; vlastita fotografija*)

4.1.6. Molekularno pristajanje sa ostalim MART enzimima

Provedeno je molekularno pristajanje u SwissDock-u sa 3 ostala poznata MART enzima (ART3, ART4 te ART5) kako bi se provjerilo inhibiraju li 4 izabrana liganda i ove enzime te na taj način provjeravamo selektivnost liganda.

Za ART3 enzim molekularnim pristajanjem pokazano je da niti jedan od 4 inhibitora ne ulazi u aktivno mjesto enzima. Kod ART4 enzima, u aktivno mjesto veže se samo ligand CNP0171505, ali primijećena su samo 3 klastera čije veličine variraju. Također vrijednosti slobodne Gibbsove energije vezanja su pozitivnije, a „FullFitness“ vrijednosti su puno negativnije nego kod ART1. Rezultati za ART4 prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Rezultati molekularnog pristajanja u SwissDock-u za ART4 enzim i ligand CNP0171505

COCONUT ID	Veličina klastera	ΔG (kcal/moL)	FullFitness (kcal/moL)
CNP0171505	0-3	-7,548395	-1532,8445
	0-7	-6,3524113	-1519,4568
	0-10	-7,5955653	-1528,2147

Kod rezultata molekularnog pristajanja za enzim ART5, koji je najsličniji enzimu ART1, sva 4 inhibitora ulaze u aktivno mjesto enzima no manji je broj klastera te njihova veličina, slobodna energija vezanja nešto je pozitivnija, dok su „FullFitness“ vrijednosti uglavnom negativnije. Rezultati pristajanja za ART5 enzim prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Rezultati molekularnog pristajanja u SwissDock-u za ART5 enzim

COCONUT ID	Veličina klastera	ΔG (kcal/moL)	FullFitness (kcal/moL)
CNP0405359	0-7	-7,382425	-1384,9731
CNP0011571	0	-6,474779	-1343,5168
	0-5	-6,6264486	-1328,2535
	0	-6,9205947	-1337,4867
CNP0405089	0-8	-7,1350297	-1342,5242
	0-3	-7,373122	-1337,0445
	0	-7,216246	-1334,019
	0	-6,5213904	-1333,2119
CNP0171505	0-15	-8,001959	-1287,2218
	0-9	-7,12739	-1281,8854
	0-7	-7,203827	-1288,8359
	0-3	-6,5871024	-1273,6827
	0	-7,0213256	-1270,2007
	0	-5,8748384	-1266,7059

4.1.7. Rezultati SwissADME-a

Svojstva za svaki od 4 inhibitora dobivena pomoću SwissADME-a navedena su u tablici 9. Rezultati su sažeti za potrebe ovog rada.

Tablica 9. Rezultati sa SwissADME

	COCONUT ID			
	CNP0405359	CNP0011571	CNP0405089	CNP0171505
Fizikalno-kemijska svojstva⁽¹⁾				
MW (g/mol)	416,58	416,52	360,48	448,38
# HBA	4	4	5	11
# HBD	1	2	1	7
Rotirajuće veze	6	7	6	3
TPSA	95,47	89,07	100,72	190,28
Lipofilnost⁽²⁾				
Koncensus logP _{o/w}	3,22	2,19	1,64	0,16
Topivost u vodi⁽³⁾				
Log S (ESOL)	-3,89	-3,63	-2,97	-3,33
Topivost	5.31e-02 mg/ml ; 1.28e-04 mol/l	9.85e-02 mg/ml ; 2.36e-04 mol/l	3.90e-01 mg/ml ; 1.08e-03 mol/l	2.08e-01 mg/ml ; 4.64e-04 mol/l
Razred	Topivo	Topivo	Topivo	Topivo
Farmakokinetika⁽⁴⁾				
GI apsorpcija	Visoka	Visoka	Visoka	Niska
BBB propusnost	Ne	Ne	Ne	Ne
P-gp supstrat	Da	Da	Da	Ne
CYP2C19 inhibitor	Da	Ne	Ne	Ne
CYP2C9 inhibitor	Ne	Ne	Ne	Ne
CYP2D6 inhibitor	Da	Da	Ne	Ne
CYP3A4 inhibitor	Da	Da	Ne	Ne
Sličnost s drugim lijekovima (engl. druglikness)⁽⁵⁾				
Lipinski	Da; 0 prekršaja	Da; 0 prekršaja	Da; 0 prekršaja	No; 2 prekršaja: HBA>10, HBD>5
Veber	Da	Da	Da	No; 1 prekršaj: TPSA>140
Bioraspoloživost	0,55	0,55	0,55	0,17

Tablica 9. Rezultati sa SwissADME - nastavak

	COCONUT ID			
	CNP0405359	CNP0011571	CNP0405089	CNP0171505
Medicinska kemija⁽⁶⁾				
Brenk	0 upozorenja	1 upozorenje; Anilin	0 upozorenja	1 upozorenje; katekol
Mogućnost sinteze	4,68	5,12	4,08	5,28

*⁽¹⁾ MW = molekularna masa (engl. *molecular weight*); #HBA = broj vodikovih akceptora (engl. *number of H-bond acceptors*); #HBD = broj vodikovih donora (engl. *number of H-bond donors*); TPSA = topološka polarizacijska površina (engl. *topological polar surface area*)

*⁽²⁾ koncenzus $\log P_{o/w}$ = srednja vrijednost $\log P_{o/w}$ vrijednosti dobiveni različitim algoritmima; $\log P_{o/w}$ = mjera za lipofilnost; logaritam koeficijenta podijeljenosti spoja između n-oktanol i vode; poželjno $\rightarrow \log P < 5$, idealno između 1.35-1.8

*⁽³⁾ $\log S$ (ESOL) = logaritam koeficijenta topljivosti spoja u vodi metodom ESOL (određivanje topljivosti u vodi na temelju kemijske strukture); Razred: netopivo < -10 ; slabo topivo < -6 ; srednje topivo < -4 ; topivo < -2 ; jako topivo < 0 ; najbolje topivo > 0

*⁽⁴⁾ Pg-p supstrat = supstrat P-glikoproteina1 (protein koji se nalazi u staničnoj membrani stanice i sve nepoznate tvari izbacuje van stanice); obitelj citokrom P450 (CYP) enzima = kataliziraju reakcije metabolizma farmaceutika i ostalih ksenobiotika; inhibicija ili indukcija aktivnosti CYP enzima dovodi do farmakokinetičkih interakcija dvaju lijekova

*⁽⁵⁾ **Lipinski pravilo:** $MW \leq 500$, $MlogP \leq 4.15$; N ili O ≤ 10 ; NH ili OH ≤ 5 ; **Veberovo pravilo:** rotirajuće veze ≤ 20 , TPSA ≤ 140 ; visoka bioraspodivnost ≥ 0.5

*⁽⁶⁾ Brenk = upozorava na funkcijske grupe unutar organske molekule koje bi mogle izazvati toksičnost; mogućnost sinteze spoja pri čemu vrijednosti mogu biti od 1 (vrlo jednostavna sinteza) do 10 (vrlo komplicirana sinteza)

4.1.8. Rezultati sa SwissTargetPrediction

Kao rezultati SwissTargetPrediction-a navedeni su proteini (enzimi i receptori) koji su potencijalne mete za 4 izdvojena inhibitora, odnosno postoji mogućnost da će se u ljudskom organizmu ti inhibitori vezati za određene proteine. Također brojčanim vrijednostima prikazana je i vjerojatnost vezanja inhibitora za spomenute proteine pri čemu vrijednosti mogu biti od 0-1 (0 – ne dolazi do vezanja, 1 – velika vjerojatnost da će se inhibitor vezati). Dobiveni rezultati generirani su na temelju poznatih rezultata vezanja spojeva koji imaju sličnu strukturu jednom od ovih 4 inhibitora.

S obzirom da bi prikaz potpunih rezultata bio preopširan, izdvojeno je prvih 5 proteina (meta) i vjerojatnosti vezanja za svaki inhibitor. Rezultati su prikazani u tablici 10.

Tablica 10. Rezultati sa stranice SwissTargetPrediction

COCONUT ID	Ime mete („engl. target)	Vjerojatnost
CNP0405359	Adenozin A1 receptor	0,0956634871844
	Adenozin A2a receptor	0,0
	Serotonin 1a (5-HT1a) receptor	0,0
	Serotonin 7 (5-HT7) receptor	0,0
	Histamin H3 receptor	0,0
CNP0011571	Dopamin D2 receptor	0,118883306718
	Dopamin D3 receptor	0,118883306718
	Fosfolipaza D1	0,118883306718
	Fosfolipaza D2	0,118883306718
	Serotonin 3a (5-HT3a) receptor	0,118883306718
CNP0405089	Poli [ADP-riboza] polimeraza-1	0,0972399887602
	Poli [ADP-riboza] polimeraza-2	0,0972399887602
	Histamin H3 receptor	0,0972399887602
	Muskarinik acetilkolin receptor M2	0,0972399887602
	Serotonin 2a (5-HT2a) receptor	0,0972399887602
CNP0171505	NADPH oksidaza 4	1,0
	Vazopresin V2 receptor	1,0
	Aldoza reduktaza	1,0
	Ksantin dehidrogenaza	1,0
	Monoamin oksidaza A	1,0

4.2. RASPRAVA

Na temelju trodimenzionalne strukture enzima ART1 dobivene ColabFold-om te uspoređujući dobivenu strukturu sa strukturom preuzetom na AlphaFold stranici u UCSF Chimera-i, moguće je zaključiti da se 3D strukture gotovo u potpunosti preklapaju. To vrijedi i za područje za koje se smatra da je aktivno mjesto enzima. Primijećena je razlika jedino u početnom i završnom djelu oba proteina gdje se može vidjeti da se lanci ne preklapaju već su odmaknuti jedan od drugoga. No s obzirom da je aminokiselinska sekvenca jednaka te se strukture preklapaju u najvažnijem djelu enzima (aktivno mjesto), ovaj pomak u položaju lanaca kod početnih i završnih dijelova enzima može se zanemariti. Potrebno je imati na umu da struktura enzima ART1 nije dokazana eksperimentalno te se *in silico* metodama struktura može samo predvidjeti.

Kako bi se saznalo postoje li homologni proteini enzimu ART1 proveden je SmartBLAST pri čemu su se tražili homologni proteini na temelju aminokiselinske sekvence te MADOKA pri čemu su se tražili homologni proteini uspoređujući strukture proteina. Rezultati su pokazali da je, na temelju aminokiselinske strukture, u ljudskom organizmu ART5 enzim najbliži ART1 enzimu. S druge strane kod usporedbe struktura proteina, TM – ocjena uglavnom je niska i iznosi oko 0,60 što ukazuje da postoji određena sličnost sa proteina dostupnim u bazama podataka no ona je poprilično niska i spomenuti proteini ne uzimaju se obzir. Homologne proteine potrebno je identificirati kako bi bili sigurni pri odabiru inhibitora enzima ART1 da će on biti specifičan i vezati se samo na ART1.

Za provedbu molekularnog pristajanja izabrana su 34 prirodna spoja koja pokazuju određenu sličnost sa sintetskim spojevima spomenutim u istraživačkim radovima kao inhibitori PARP i MARP enzima. Neki inhibitori su sami po sebi već bili prirodni spojevi dok je ostale trebalo pronaći s obzirom na sličnosti strukture sa sintetskim spojem. Pri tome su odabrani spojevi sa čim višim postotkom sličnosti izvornom spoju.

Slijepom probom, koja je provedena prije samog molekularnog pristajanja, potvrđeno je da se molekule fekserola i 2- heksadekanoične kiseline ne vežu u aktivno mjesto enzima što gledajući širu sliku znači da ne može bilo koja molekula inhibirati enzim ART1 već da postoji određena specifičnost.

Molekularnim pristajanjem u SwissDock-u dobiveni su rezultati koji se sastoje od 4 parametara; slobodne energije vezanja, broj klastera i veličina klastera te „puna sposobnost vezanja“ (engl. *full fitness*). Od 34 polaznih prirodnih spojeva, izbor je sužen na njih 13 koji su

pokazali optimalne vrijednosti gore nabrojanih parametara. Kako bi se dodatno provjerila sposobnost vezanja i inhibicije enzima ART1 sa 13 izabranih spojeva, provedeno je molekularno pristajanje u AutoDock-u. Usporedbom slobodnih energija vezanja generiranih SwissDock-om i AutoDock-om, izabrana su 4 spoja koja su u oba programa za molekularno pristajanje pokazala približno jednake vrijednosti. Također za te ligande vrijedi i da stvaraju interakcije sa aminokiselinskim ostacima koji čine aktivno mjesto enzima. Ti spojevi su CNP0405359, CNP0011571, CNP0405089 i CNP0171505.

Kako bi se utvrdilo vežu li se spojevi su CNP0405359, CNP0011571, CNP0405089 i CNP0171505 na enzime ART3, ART4 i ART5 koji spadaju u istu obitelj enzima sa ART1, provedeno je molekularno pristajanje u SwissDock-u. Na temelju rezultata zaključeno je da odabrani spojevi ne inhibiraju ART3, a u aktivno mjesto enzima ART4 veže se samo spoj CNP0171505. ART5 protein najbliži je proteinu ART1 te je zato došlo do vezanja svih 4 liganada u aktivno mjesto enzima ART1. No vrijednosti parametara dobivenih molekularnim pristajanjem upućuju na to da se inhibitori bolje vežu u aktivno mjesto ART1 enzima. Na taj način provjerena je selektivnost inhibitora kod enzima koji spadaju u istu obitelj enzima kao i ART1.

Da se sazna nešto više o tome na koje ostale proteine (enzimi, receptori) unutar ljudskog organizma odabrani ligandi mogu utjecati, korištena je web stranica SwissTargetPrediction. Za svaki ligand dana je lista proteina koji su njihova potencijalna meta (engl. *target*). Spoj CNP0171505 pokazao je maksimalnu vjerojatnost (=1) vezanja na veliki broj proteina (tu su izdvojena samo 5) što ukazuje na to da ligand nije selektivan već da se može vezati na veliki broj proteina u organizmu. Puno nižu vjerojatnost vezanja pokazuju spojevi CNP0011571 i CNP0405089 (~ 0,10) no ona vrijedi za veći broj proteina. Najmanju vjerojatnost vezanja pokazuje spoj CNP0405359 (~0,095) s tim da se je naveden samo jedan protein na koji bi se potencijalno ovaj ligand mogao vezati. To ukazuje na dobru selektivnost CNP0405359 spoja, odnosno da se ne veže na veliki broj proteina u organizmu.

Između 4 izabrana spoja, moguće je napraviti daljnju analizu liganada uspoređujući rezultate dobivene sa stranice SwissADME kako bi se utvrdilo koliko su oni pogodni da budu potencijalni lijek. Kao najperspektivniji ligandi mogu se izdvojiti CNP0405359 i CNP0405089; oba spoja topiva su u vodi, procjenjuje se da bi im apsorpcija u gastrointestinalnom traktu bila visoka, ne prolaze kroz krvno moždanu barijeru, poštuju pravila po Lipinskom i Veberu, bioraspoloživost im je zadovoljavajuća, ne sadrže funkcijske skupine koje bi mogle biti toksične te se relativno lagano mogu sintetizirati. Ono što daje dodatnu prednost spoju

CNP0405089 jest to što nije inhibitor niti jednog od CYP obitelji enzima što znači da ne utječe na interakcije između ostalih lijekova. Također ima bolju vrijednosti $\log P_{o/w}$ (1,64) što ukazuje na bolju oralnu i intestinalnu apsorpciju. S druge strane spojevi CNP0011571 i CNP0171505 u svojoj strukturi sadrže funkcijske skupine koje su toksične (CNP0011571 sadrži anilin, a CNP0171505 katekol) te su kompliciranije za sintetizirati. Pri tome spoj CNP0171505 ima dosta nisku lipofilnost što se posljedično očitava i u apsorpciji u gastrointestinalnom traktu te ne poštuje pravila Lipinskog i Vebera. Ligand CNP0171505 jedini nije supstrat Pg-p proteinu, dok ostala 3 spoja jesu. No s obzirom da se katalitička domena ART1 enzima nalazi u ekstracelularnom prostoru, nije bitno što ova 3 liganda jesu supstrati Pg-p proteinu jer cilj je da ne ulaze u samo stanicu nego da djeluju van stanice te se vežu za ekstracelularni dio enzima ART1.

5. ZAKLJUČCI:

1. Na osnovu rezultata molekularnog pristajanja u SwissDock-u i AutoDock-u izdvojena su 4 liganda kao najperspektivniji spojevi za inhibiciju ART1 enzima. To su spojevi: **CNP0405359** (N-[(oktahidro-1H-kvinolizin-1-il)metil]-3-{2,5,6-trimetil-4-okso-3H,4H-tieno[2,3-d]pirimidin-3-il}propanamid), **CNP0011571** (6-{[4-(3-aminofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]metil}-N-benzil-1-azabiciklo[2.2.2] oktan-3-karboksamid), **CNP0405089** (N-[(oktahidro-1H-kvinolizin-1-il)metil]-2-{[1,2,4]triazolo[4,3-b]piridazin-6-ilsulfanil}acetamid) i **CNP0171505** (2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3-[(3,4,5-trihidroksi-6-metiloksan-2-il)oksi]-4H-kromen-4-on).
2. Dodatnom analizom svojstava (lipofilnost, topljivost u vodi, farmakokinetika itd.) gore navedenih liganada te analizom vjerojatnošću vezanja za ostale MART enzime kao i enzime u ljudskom organizmu, prednost se daje spojevima CNP0405359 i CNP0405089. S obzirom da imaju sličnu strukturu, pokazuju i slična svojstva.
3. Potrebno je napraviti validaciju rezultata eksperimentalnim metodama u laboratoriju kako bi se navedeni rezultati dobiveni *in silico* metodama mogli potvrditi ili odbaciti.

6. LITERATURA

Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K (1992) Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem* **267**, 1569-1575. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45983-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45983-2)

Challa S, Stokes MS, Kraus WL (2021) MARTs and MARylation in the Cytosol: Biological Functions, Mechanisms of Action, and Therapeutic Potential. *Cells* **3**, 313. <https://doi.org/10.3390/cells10020313>

Corda D, Di Girolamo M (2003) Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *EMBO J* **22**, 1953-1958. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg209>

Daina A, Michielin O, Zoete V (2017) SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* **7**, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

Daina A, Michielin O, Zoete V (2017) SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* **7**, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

Daina A, Michielin O, Zoete V (2019) SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res* **2**, W357-W364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>

Davis AM (2014) Chapter 6: Quantitative Structure–Activity Relationships. U: Davis AM, Ward SE (ured.) *The Handbook of Medicinal Chemistry: Principles and Practice*, Elsevier Ltd, str. 379-392

Deng L, Zhong G, Liu C, *et al.* (2019) MADOKA: an ultra-fast approach for large-scale protein structure similarity searching. *BMC Bioinformatics* **20**, 662. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3235-1>

Dias R, de Azevedo WF Jr (2008) Molecular docking algorithms. *Curr Drug Target* **9**, 1040-7. <https://doi.org/10.2174/138945008786949432>

DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW (2016) Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J Health Econ* **47**, 20-33. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>

Duma N, Santana-Davila R, Molina JR (2019) NoneSmall Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc* **94**, 1623-1640. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>

Egan WJ (2010) Predicting ADME properties in drug discovery. U: Merz K, Ringe JrD, Reynolds C (ured.) Drug Design: Structure- and Ligand-Based Approaches, Cambridge: Cambridge University Press, str. 165-178.

EMBL-EBI (n.d.) Gene and protein summary for ART1; ART1 expression summary. EMBL-EBI - European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute. <https://www.ebi.ac.uk/ebisearch/s4/summary/molecular?tab=expression&term=art1&spine=molecular&classification=9606&tid=nameOrgENSG00000129744>. Pristupljeno 2. svibnja 2023.

Fan J, Fu A, Zhang L (2019) Progress in molecular docking. *Quant Biol* **7**, 83–89. <https://doi.org/10.1007/s40484-019-0172-y>

Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD (2015) Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* **20**, 13384-421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>

Grosdidier A, Zoete V, Michielin O (2011a) SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res* **39**, W270-7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr366>

Grosdidier A, Zoete V, Michielin O (2011b) Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS. *J Comput Chem* **32**, 2149-59. doi: <https://doi.org/10.1002/jcc.21797>

Holechek J, Lease R, Thorsell AG, Karlberg T, McCadden C, Grant R, Keen A, Callahan E, Schüler H, Ferraris D (2018) Design, synthesis and evaluation of potent and selective inhibitors of mono-(ADP-ribosyl)transferases PARP10 and PARP14. *Bioorg Med Chem Lett* **28**, 2050-2054. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.056>

HPA (n.d.,a) ART1 protein expression summary. HPA – Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000129744-ART1> . Pristupljeno 2.svibnja 2023.

HPA (n.d.,b) Expression of ART1 in lung cancer. HPA – Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000129744-ART1/pathology/lung+cancer> . Pristupljeno 2. svibnja 2023.

Huey R, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS (2007) A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. *J Comput Chem* **28**, 1145–1152. <https://doi.org/10.1002/jcc.20634>

Irwin JJ, Shoichet BK (2005) ZINC- a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model* **45**, 177–182. <https://doi.org/10.1021/ci049714>

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, Li Q, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B, Zaslavsky L, Zhang J, Bolton EE (2023) PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Res* **51**, D1373–D1380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>

Koshland DE Jr, Ray WJ Jr, Erwin J (1958) Protein structure and enzyme action. *Fed Proc* **17**, 1145-50. PMID: 13619786.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, **23**, 3-25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)

Lohning AE, Levonis SM, Williams-Noonan B, Schweiker SS (2017) A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. *Curr Top Med Chem* **17**, 2023-2040. <https://doi.org/0.2174/1568026617666170130110827>

Madeira F, Pearce M, Tivey ARN, Basutkar P, Lee J, Edbali O, Madhusoodanan N, Kolesnikov A, Lopez R (2022) **Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022.** *Nucleic Acids Res* **50**, 276-279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>

Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M (2011) Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des* **7**, 146-157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>

Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, *et al.* (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* **19**, 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>

Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **19**, 2785-91. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>

Morris MG, Lim-Wilby M (2008) Molecular docking. *Methods Mol Biol* **443**, 365-382. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19

NCBI (n.d.,a)_ADP-ribosyltransferase 1 [*Homo sapiens* (human)]. NCBI – National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Cmd=DetailsSearch&Term=417>. Pristupljeno 2. svibnja 2023.

NCBI (n.d.,b) SmartBLAST (verzija 2.10.0) NCBI – National Center for Biotechnology Information <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/> Pristupljeno 20. ožujka 2023.

O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR (2011) Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminf* **3**, 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>

OpenAI (2023) ChatGPT <https://chat.openai.com/chat>

Pettersen FF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25(13)**, 1605-12. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

Proekt A, Hemmings HC (2019) 1 - Mechanisms of Drug Action, U: Hemmings HC, Egan TD (ured.) *Pharmacology and Physiology for Anesthesia* (Second Edition), Elsevier, str. 2-19.

Qin W, Wu HJ, Cao LQ, Li HJ, He CX, Zhao D, Xing L, Li PQ, Jin X, Cao HL (2019) Research Progress on PARP14 as a Drug Target. *Front Pharmacol* **10**,172. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00172>

Raskov H, Orhan A, Christensen JP, *et al.* (2021) Cytotoxic CD8⁺ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer* **124**, 359–367. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4>

Robert Roskoski (2007) Modulation of Enzyme Activity. U: Enna SJ, Bylund DB (ured.) *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, str. 1-11.

Rose M, Burgess JT, O'Byrne K, Richard DJ, Bolderson E (2020) PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. *Front Cell Dev Biol* **9**, 564601. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.564601>

Roy K, Kar S, Das RN (2015) Chapter 10: Other Related Techniques. U: Roy K, Kar S, Das RN (ured.) *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*, Academic Press, str. 357-425.

Sahoo JP, Mohapatra U (2020) Molecular Docking. *Agriculture & Food: e-Newsletter* **2**, <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28329.72805>

Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, Connor R, Funk K, Kelly C, Kim S, Madej T, Marchler-Bauer A, Lanczycki C, Lathrop S, Lu Z, Thibaud-Nissen F, Murphy T, Phan L, Skripchenko Y, Tse T, Wang J, Williams R, Trawick BW, Pruitt KD, Sherry ST (2022) Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res* **7**, 20-26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>

Shin HK, Kang YM, No KT (2017) Predicting ADME Properties of Chemicals. U: Leszczynski J, Kaczmarek-Kedziera A, Puzyn TG, Papadopoulos M, Reis HK, Shukla M (ured.) *Handbook of Computational Chemistry*, Springer, Cham, str. 2265-2301.

Silverman RB, Holladay MW (2014) Chapter 5 - Enzyme Inhibition and Inactivation. U: Silverman RB, Holladay MW (ured.) *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 3.izd., Academic Press, str. 207-274.

Sorokina M, Merseburger P, Rajan K, Aziz Yirik M, Steinbeck C (2021) COCONUT online: Collection of Open Natural Products database. *J Cheminform* **13**,2. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00478-9>

Stanzione F, Giangreco I, Cole JC (2021) Use of molecular docking computational tools in drug discovery. U: Witty DR, Cox B (ured.) *Progress in Medicinal Chemistry*, 60 izd., Elsevier B.V., str. 273–343.

Sultana N, Paira S, Chandra S, Alam SKS (2017) A brief study and analysis of different searching algorithms. *2017 Second International Conference on Electrical, Computer and Communication Technologies (ICECCT)*, Coimbatore, str. 1-4. <https://doi.org/10.1109/ICECCT.2017.8117821>

Thai AA, Solomon BJ, Sequist LV, Gainor JF, Heist RS (2021) Lung cancer. *Lancet* **398**, 535-554. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00312-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3)

The Uniprot Consortium (2023) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res* 51, D523-D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>

The Scripps Research Institute (TSRI) (2014) AutoDock 4 (Verzija 4.2.6.) <https://autodocksuite.scripps.edu/autodock4/> Pristupljeno 9. travnja 2023.

Thornton JM, Kahraman A (2008) Methods to Characterize the Structure of Enzyme Binding Sites. U: Schwede T, Peitsch MC (ured.) *Computational Structural Biology*, World Scientific, str. 189-221.

Tropsha A (2007) 4.07 - Predictive Quantitative Structure–Activity Relationship Modeling. U: Taylor JB, Triggle DJ (ured.) *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Elsevier, str. 149-165.

Uhlén M, Björling E, Agaton C, Al-Khalili Szigyarto C, Amini B et.al. (2005) A Human Protein Atlas for Normal and Cancer Tissues Based on Antibody Proteomics. *Mol Cell Proteomics* **4**,1920-1932. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500279-MCP200>

UniProt (n.d.,a) P52961 · NAR1_HUMAN. UniProt-the Universal Protein Knowledgebase. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P52961/entry>. Pristupljeno 2. svibnja 2023.

UniProt (n.d.,b) Q13508 · NAR3_HUMAN. UniProt-the Universal Protein Knowledgebase. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q13508/entry>. Pristupljeno 2. svibnja 2023.

UniProt (n.d.,c) Q93070 · NAR4_HUMAN. UniProt-the Universal Protein Knowledgebase. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q93070/entry>. Pristupljeno 2. svibnja 2023.

UniProt (n.d.,d) Q96L15 · NAR5_HUMAN. UniProt-the Universal Protein Knowledgebase. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q96L15/entry>. Pristupljeno 2. svibnja 2023.

Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A, Židek A, Green T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Green R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt G, Birney E, Hassabis D, Velankar S (2022) AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models, *Nucleic Acids Res* **50**, D439–D444, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>

Vrbanac J, Slauter R (2017) Chapter 3 - ADME in Drug Discovery. U: Faqi AS (ured.) A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development, 2. izd., Academic Press, str. 39-67.

Wan H (2013) What ADME tests should be conducted for preclinical studies?. *ADMET & DMPK*, **1**, 19-28. <https://doi.org/10.5599/admet.1.3.9>

Wennerberg E, Mukherjee S, Sainz RM, Stiles BM (2022) The ART of tumor immune escape, *OncoImmunology* **11**, <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2076310>

Wennerberg E, Mukherjee S, Spada S, Hung C, Agrusa C, Chen C, Valeta-Magara A, Rudqvist NP, Van Nest S, Kamel MK, Nasar A, Narula N, Mittal V, Markowitz G, Zhou XK, Adusumilli PS, Borczuk A, White TE, Khan AG, Balderes P, Lorenz IC, Altorki N, Demaria S, McGraw TE, Stiles BM (2022a) Expression of the mono-ADP-ribosyltransferase ART1 by tumor cells mediates immune resistance in non-small cell lung cancer. *Sci Transl Med* **14**, 636. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abe8195>

Yang L, Xiao M, Li X, Tang Y, Wang YL (2016) Arginine ADP-ribosyltransferase 1 promotes angiogenesis in colorectal cancer via the PI3K/Akt pathway. *Int J Mol Med* **37**, 734-42. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2473>

Zhang B, Li H, Yu K, Jin Z (2022) Molecular docking-based computational platform for high-throughput virtual screening. *CCF Trans High Perform Comput* **4**, 63-74. <https://doi.org/10.1007/s42514-021-00086-5>

n.d. = no date

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja ANTONIA KRSNIK izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis