

# Molekulsko modeliranje inhibicije kreatin kinaze

---

**Briševac, Tea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:318578>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Tea Briševac**

**MOLEKULSKO MODELIRANJE**

**INHIBICIJE KREATIN KINAZE**

**Osijek 2024**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Tea Briševac**

**MOLEKULSKO MODELIRANJE**

**INHIBICIJE KREATIN KINAZE**

**Osijek 2024**

Rad je ostvaren u: Medicinskom fakultetu Osijek

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

Rad ima: 39 listova, 12 slika i 22 tablice

## ZAHVALA

*Veliko hvala mentoru doc. dr. sc. Hrvoju Brkiću na pruženoj prilici za suradnju, potpori, strpljenju, razumijevanju, savjetima i nesebičnoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada.*

*Hvala mojim roditeljima koji su uvijek bili tu za mene i pružali mi podršku kada je to bilo najpotrebnije.*

*Također hvala mojim kolegama i prijateljima što su mi uljepšali i olakšali dane studiranja i što su mi bili podrška.*

## Sadržaj

1	UVOD .....	1
1.1	Enzimi.....	1
1.1.1	Kinetika enzimskih reakcija .....	1
1.1.2	Inhibicija enzima .....	2
1.2	Kreatin kinaza.....	2
1.2.1	Struktura i mehanizam djelovanja CK .....	3
1.2.2	Inhibitori CK .....	4
1.2.3	Tenofovir fosfat.....	4
1.3	Točkaste mutacije .....	5
1.4	Računalne metode.....	5
1.5	Metode uklapanja .....	5
2	CILJ .....	6
3	MATERIJALI I METODE.....	7
3.1	Ustroj studije.....	7
3.2	Materijali .....	7
3.3	Metode .....	7
3.3.1	Pripreme molekula enzima i inhibitora .....	7
3.3.2	Metode uklapanja .....	7
3.3.3	Vizualizacija molekula .....	7
4	REZULTATI.....	9
5	RASPRAVA.....	31
6	ZAKLJUČAK .....	33
7	SAŽETAK.....	34
8	SUMMARY .....	35
9	LITERATURA.....	36
10	ŽIVOTOPIS .....	39

## POPIS KRATICA

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

CK – keratin kinaza

TFV-MP – tenofovir monofosfat

TFV-DP – tenofovir difosfat

Val (V) – aminokiselina valin

Glu (E) – aminokiselina glutaminska kiselina

Arg (R) – aminokiselina arginine

Cys (C) – aminokiselina cistein

Ser (S) - aminokiselina serin

Asp (D) – aminokiselina asparaginska kiselina

Phe (F) – aminokiselina fenilalanin

Thr (T) – aminokiselina treonin

Asn (N) – aminokiselina asparagine

Ile (I) – aminokiselina izoleucin

Pro (P) – aminokiselina prolin

Met (M) – aminokiselina metionin

Gln (Q) – aminokiselina glutamin

Tyr (Y) – aminokiselina tirozin

Asn (N) – aminokiselina asparagine

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

PDB – proteinska baza podataka (*engl. Protein Data Bank*)

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



## 1 UVOD

### 1.1 Enzimi

Enzimi su polimeri koji kataliziraju za život važne kemijske reakcije, a po svojoj strukturi spadaju u proteine. Oni ubrzavaju kemijsku reakciju tako što snižavaju energiju aktivacije pojedine reakcije (1, 2). Tijekom reakcije ostaju nepromijenjeni što im omogućuje ulazak u drugu reakciju po završetku prve. Enzimi kataliziraju reverzibilne reakcije, ali ne utječu na ravnotežni položaj reakcije. Stvaranje kompleksa enzim–supstrat (ES) je prvi korak u enzimskoj katalizi. Supstrat se veže na aktivno mjesto enzima koje je trodimenzionalna udubina omeđena aminokiselinskim (AK) bočnim ograncima iz različitih dijelova lanca. Ono zauzima relativno mali dio enzima. Ovisno o funkciji, može se podijeliti na dva dijela: katalitičko i afinitetno mjesto. Afinitetno mjesto je dio enzima koji služi za vezanje supstrata, a u katalitičkom mjestu supstrat se pretvara u produkt. Supstrati se u aktivno mjesto vežu slabim nekovalentnim molekulskim interakcijama (1, 2). Postoje dva modela vezanja supstrata za enzim: model ključ-brava i model izazvanog pristajanja. U modelu ključ-brava, aktivno mjesto enzima je po obliku komplementarno obliku molekule ili dijela molekule supstrata, dok u modelu izazvanog pristajanja vezanjem molekule supstrata dolazi do promjene konformacije aktivnog mjesta (1, 2).

1964. godine, odbor za enzime Međunarodne unije za biokemiju (*engl. International Union of Biochemistry, IUB*) uspostavio je jednoznačan sustav klasifikacije i nomenklature enzima. Svi enzimi posjeduju jedinstven klasifikacijski broj i naziv (1 – 3). Prvom znamenkom je definiran rod kojem pripada enzim (1. oksidoreduktaze, 2. transferaze, 3. hidrolaze, 4. liaze, 5. izomeraze, 6. ligaze, 7. translokaze), drugom i trećom znamenkom se označava podrazred i razred enzima. Četvrta znamenka predstavlja individualni broj enzima u podrazredu (22, 25).

#### 1.1.1 Kinetika enzimskih reakcija

Mnogim enzimima je za katalitičku aktivnost potrebna prisutnost malih molekula koje se vežu za njihovo aktivno mjesto (kofaktora i koenzima). Kofaktori su ioni metala koji se vežu u aktivno mjesto enzima i omogućavaju enzimsku katalazu (npr.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ). Koenzimi su organske molekule koje se vežu u aktivno mjesto enzima i također omogućuju enzimsku katalizu (npr. Tiamin-pirofosfat, biotin, koenzim A (CoA), piridoksal forfat) (1, 2, 3).

Brzina reakcije ovisi o okolini i uvjetima u kojima se odvija. Na brzinu enzimske reakcije utječu sljedeći čimbenici: koncentracija supstrata, pH, koncentracija i ionska jakost

pufera, temperatura te prisutnost raznih koenzima, aktivatora i inhibitora. Svaki enzim ima određenu pH vrijednost pri kojoj je brzina reakcije najveća. Porast temperature i koncentracije supstrata dovodi do povećanja brzine kemijske reakcije (1, 2, 3).

Brzina ( $v_0$ ) kojom se reakcija odvija u organizmu izražava se kao promjena koncentracije supstrata ( $\Delta[S]$ ) ili produkta ( $\Delta[P]$ ) u jedinici vremena ( $\Delta t$ ). Mjerenje kinetičke aktivnosti enzima provodi se pri početnoj brzini reakcije (nema povratne reakcije pretvorbe produkta u supstrat).

$$v_0 = \frac{-\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t}$$

Michaelis-Mentenov model pretpostavlja da se mjerenje brzine enzimske reakcije provodi pri početnoj brzini enzimske reakcije pri kojoj je koncentracija produkta zanemariva. Jednadžba opisuje povezanost između početne brzine reakcije  $v_0$  i koncentracije supstrata  $[S]$ . Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj je početna brzina reakcije polovica maksimalne brzine ( $V_{max}/2$ ).  $V_m$  označava najveću brzinu reakcije (1, 23).

$$v = \frac{v_m \times [S]}{[S] \times K_m}$$

### 1.1.2 Inhibicija enzima

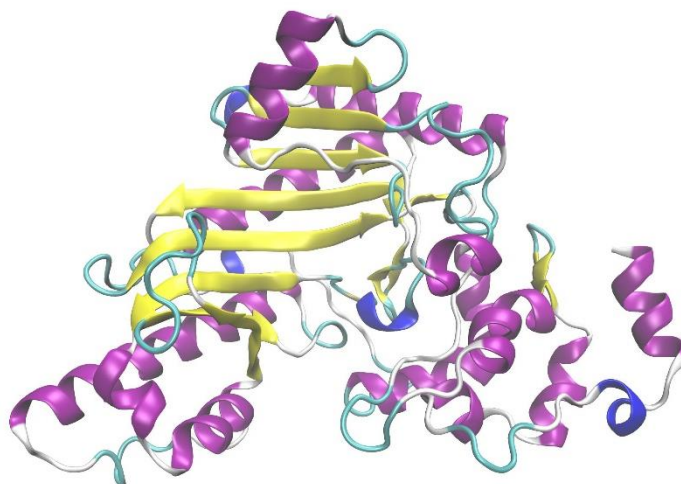
Inhibitori su tvari koje mogu smanjiti ili blokirati enzimsku reakciju. Može biti ireverzibilna i reverzibilna. Reverzibilna inhibicija nastaje djelovanjem na kinetiku reakcije između supstrata i enzima, dok se potpuna inhibicija obično postiže vrlo brzo jer nema kemijske promjene (2, 3, 5). Ireverzibilni inhibitori se čvrsto vežu na enzim i disociraju vrlo sporo. Ireverzibilna inhibicija nastaje trajnim kemijskim modifikacijama, kao na primjer prekidanje ili stvaranje kovalentnih veza s aminokiselinskim ostacima potrebnim za vezanje supstrata, održavanje konformacije enzima ili katalizu (2). Reverzibilni inhibitori disociraju brže od enzima. Dijele se na: kompetitivne (vežu se na aktivno mjesto enzima), nekompetitivne (vežu se na mjesto različito od aktivnog mjesta enzima) i kombinirane inhibitore (4). Inhibicija povratnom spregom je mehanizam kontrole enzimske aktivnosti, gdje konačni produkt biosintetskog puta inhibira prvi enzim u sekvenci reakcija tog puta. (6).

## 1.2 Kreatin kinaza

Kinaze (*eng. Kinase*), poznate kao i fosfotransferaze su enzimi koji fosforiliraju proteine tako što kataliziraju prijenos terminalne fosfatne skupine ATP-a na hidroksilnu skupinu aminokiselinskog ostatka. Kinaze su potrebne za stabilizaciju ovih reakcija jer fosfoanhidridna

veza sadrži puno energije. Također se koriste i u reguliranju složenih procesa u ćeliji i prijenosu signala (8, 9).

Kreatin kinaza (*eng. Creatine kinase*, CK) (slika 1.) je enzim koji katalizira pretvorbu kreatina i koristi ATP za stvaranje fosfokreatina (PCr) i adenzin difosfata (ADP). On je dimer sastavljen od dvije podjedinice: B (moždane) i M (mišićne). Ima 3 izoenzima: CK-MM, CK-MB i CK-BB. CK-BB je karakterističan za tkivo pluća i mozga, CK-MB za miokard, a CK-MM za skeletnu muskulaturu (8, 9). Kod zdravih osoba 100 % cirkulirajuće CK čini CK-MM. CK-MB i CK-BB se javljaju kada dođe do oštećenja tkiva koja su specifičnija za njih. Povišene vrijednosti CK se očekuje nakon tjelovježbe i namjerne ili nenamjerne traume. Referentne vrijednosti CK u serumu iznose < 153 U/l za žene i < 177 U/l za muškarce. CK se u najvećim koncentracijama nalazi u srčanom mišiću, skeletnim mišićima i nešto manjoj koncentraciji u mozgu (8, 9).



Slika 1. Struktura enzima CK bez molekula liganada i vode

### 1.2.1 Struktura i mehanizam djelovanja CK

Svaka podjedinica enzima se sastoji od dva dijela: N-terminalne domene (sposobna za vezanje na ATP i keratin) i C-terminalne domene (odgovorna za interakciju s drugom podjedinicom u heterodimeru). U aktivnom mjestu CK se odvija katalitička reakcija fosforilacije kreatina (8, 9).

CK je enzim koji ima ključnu ulogu u energetsom metabolizmu tijela, posebno u mišićnom i srčanom tkivu. Ona katalizira fosforilaciju kreatina koristeći ATP kao fosforilni

donor. Ovaj proces stvara kreatin fosfat i ADP. Fosforilacija kreatina je reverzibilan proces, prilikom intenzivnih fizičkih aktivnosti, kreatin fosfat može brzo donirati fosfat ADP-u kako bi regenerirao ATP, pružajući brz izvor energije potreban za mišićnu kontrakciju. CK sudjeluje u regulaciji energetske metabolizma mišića, osiguravajući da se energija oslobodi kad je potrebno i skladišti kad je u suvišku (8, 9). Aktivnost CK može varirati ovisno o metaboličkim zahtjevima i koncentraciji ATP-a i kreatina u stanici. Razina CK u krvi može biti povišena kao rezultat oštećenja mišića, poput ozljeda ili bolesti srčanog mišića. CK-MB se posebno koristi kao marker za oštećenje srčanog mišića, kao što je infarkt miokarda (srčani udar) (8, 9).

### **1.2.2 Inhibitori CK**

Inhibitori CK su spojevi ili tvari koje su proučavane zbog svoje sposobnosti da smanje aktivnost kreatin kinaze. Iako postoje neki spojevi koji su pokazali određenu sposobnost inhibicije ove enzimske aktivnosti u istraživanjima, važno je napomenuti da nije svaki inhibitor kreatin kinaze razvijen do stupnja kliničke primjene ili odobren za upotrebu u medicinske svrhe. Neki od poznatih inhibitora kreatin kinaze uključuju: 2,4-Dinitrofenol (DNP), iodoacetamid, kreatin analozi, nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) i Acyl-CoA esteri (8, 9).

Inhibicijom aktivnosti enzima CK dolazi do: smanjene mišićne sposobnosti (inhibicija kreatin kinaze može ograničiti sposobnost mišića da stvaraju kreatin fosfat, što može smanjiti brzinu obnavljanja ATP-a i energetske rezerve potrebne za intenzivne kontrakcije mišića), povećanja umora mišića (nedostatak sposobnosti stvaranja kreatin fosfata može dovesti do bržeg umora mišića tijekom fizičke aktivnosti visokog intenziteta), ograničenja energije (kreatin fosfat je važan za brzo regeneriranje ATP-a u mišićima. Inhibicija kreatin kinaze može smanjiti brzinu ovog procesa, što može ograničiti opskrbu energijom za mišićnu aktivnost) te potencijalnih medicinskih posljedica (povišene razine kreatin kinaze u krvi mogu biti povezane s oštećenjem mišića ili srčanog tkiva) (8, 9).

### **1.2.3 Tenofovir fosfat**

Tenofovir disoproxil fumarat (TDF) i tenofovir alafenamid (TAF) su dva oblika tenofovira, koji su lijekovi široko korišteni u liječenju HIV-a i hepatitisa B. Tenofovir fosfat je aktivni oblik tenofovira koji se stvara nakon unosa TDF ili TAF u tijelo. TDF pripada skupini antiretrovirusnih lijekova. On sprječava umnožavanje HIV-a i virusa hepatitisa B inhibiranjem aktivnosti reverzne transkriptaze, enzima koji je ključan za replikaciju virusne RNA u DNA. TDF može također biti dio preventivnih mjera, posebice u obliku pre-ekspozicijske profilakse (PrEP) kako bi se spriječila infekcija HIV-om kod visokorizičnih skupina (11).

### 1.3 Točkaste mutacije

Točkaste mutacije su mutacije kod kojih dolazi do supstitucije jednog nukleotida s drugim u sekvenci DNA. Mogu imati različiti učinak na organizam, ovisno o tome gdje se nalaze. Mišićni tip CK je važan za aktivaciju tenofovira fosfata (TFV). Zbog važnosti CK u aktivaciji TFV-a genetska varijacija može pridonijeti promjeni u razinama TFV-DP, stoga se u radu testirale prirodne mutacije koje su smanjile fosforilaciju TFV-MP *in vitro* (21, 24).

### 1.4 Računalne metode

Računalne metode istraživanja enzima omogućuju brzo i učinkovito predviđanje strukture i funkcije enzima te njegovu interakciju s drugim molekulama. Njihova primjena započela je sredinom prošlog stoljeća, a razvoj su postigle zahvaljujući napretku računalne tehnologije. Molekularno modeliranje nam pruža informacije o načinu vezanja liganada, dinamičkim svojstvima enzima, utjecaju supstrata, brzini reakcije i strukturnim i fizikalno-kemijskim svojstvima proteina. Računalne metode ubrzavaju osmišljavanje i otkrivanje lijekova s ciljem da se potencijalni inhibitori vežu za odabrane ciljane proteine *in silico* (16).

### 1.5 Metode uklapanja

Uklapanje je tehnika kojom se predviđa optimalni položaj jedne molekule u odnosu na drugu, kako bi se formirao stabilan kompleks kada se te dvije molekule vežu jedna za drugu. Metoda uklapanja ima široku primjenu u predviđanju vezanja supstrata i proteinskih inhibitora. Pri računanju se pretpostavlja da je slobodna energija vezanja ( $\Delta G_{vez}$ ) zbroj različitih komponenti koje utječu na snagu vezanja molekula (16).

$$\Delta G_{vez} = \Delta G_{otap} + \Delta G_{konf} + \Delta G_{int} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{r/t} + \Delta G_{vib}$$

U jednadžbi su prikazani doprinosi slobodnoj energiji. Neki od doprinosa uključuju specifične ligand-protein interakcije ( $\Delta G_{int}$ ), uklanjanje liganda i pojedinih dijelova proteina iz otapala ( $\Delta G_{otap}$ ) ili konformacijske promjene u proteinu i ligandu ( $\Delta G_{konf}$ ), gubitak energije zbog smanjenja rotacijske entropije liganda i proteina ( $\Delta G_{rot}$ ), translacijske i rotacijske entropije liganda ( $\Delta G_{r/t}$ ) te promjena vibracijske entropije ( $\Delta G_{vib}$ ) (16).

## 2 CILJ

Ciljevi istraživanja su:

- Metodama molekuskog modeliranja ispitati potencijalne inhibitore keratin kinaze
- Računski ispitati energijski najpovoljnije položaje inhibitora u enzimu
- Za energijski najpovoljnije položaje izračunati najbliže udaljenosti enzim-inhibitor

### 3 MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao *in silico* studija (izgradnja računalnog modela inhibitora i enzima) (16, 17). *In silico* proučavanja imaju cilj smanjiti potrebu za skupim kliničkim ispitivanjima i laboratorijskim istraživanjima.

#### 3.2 Materijali

Podaci o enzimu CK preuzeti su iz Proteinske baze podataka (*engl. Protein Data Bank*, PDB; <https://www.rcsb.org/>), gdje je struktura enzima dostupna u bazi pod kodom 7tun i izrađena je u rezoluciji 2,93 Å. Struktura inhibitora tenofovir fosfata preuzeta je iz PubChem baze ([www.pubchem.com](http://www.pubchem.com)). Svi podaci o enzimu i inhibitoru su javno dostupni u navedenim bazama. Za predikciju energijski najpovoljnijeg položaja korišten je web-server SwissDock (19, 20).

#### 3.3 Metode

##### 3.3.1 Pripreme molekula enzima i inhibitora

Trodimenzionalna struktura humane CKB je preuzeta iz baze podataka PDB (PDB\_id 7tun) (21). Prije uklapanja (*eng. docking*) uklonjen je B lanac u enzimu i ručno su napravljene sve mutacije (R43Q, T35I, I92H, R130H, H97Y, F169L, R132C, W211R, Y173C, N286I, V280L). Bočni lanci aminokiselinskih ostataka dodani su pomoću modula tleap programskog paketa AmberTools23 (<http://ambermd.org/>). Iz PubChema su preuzete strukture inhibitora ADP i tenofovir fosfata i prebačene u mol2 oblik korištenjem softvera Open Babel (14, 15). Nakon toga se pristupilo uklapanju.

##### 3.3.2 Metode uklapanja

Uklapanje molekula CKB s inhibitorom tenofovir fosfat napravljeno je u serveru SwissDock. Analiza je provedena vizualizacijom svakog pojedinog klastera koji je server previdio, a izdvojene su interakcije kraće od 3 Å za svaki inhibitor. Uz oznaku aminokiselinskog ostatka koji sudjeluje u interakciji dan je i naziv atoma koji u njoj sudjeluje.

##### 3.3.3 Vizualizacija molekula

VMD (inačica 1.9.3., University of Illinois at Urbana–Champaign) računalni je program za vizualizaciju i molekulsko modeliranje (18). Razvijen je u svrhu analize i pregleda rezultata simulacije molekularne dinamike. Program pruža raznolike načine za prikazivanje molekula. Slike u ovom radu napravljene su pomoću VMD računalnog programa. Okosnica proteina prikazana je „new cartoon“ reprezentacijom i obojana prema sekundarnoj strukturi proteina,

materijal „transpaernt“. Supstrat je prikazan CPK modelom, a bočni lanci aminokiselina štapićastom reprezentacijom („licorice“) debljine 0,2.



#### 4 REZULTATI

Metoda uklapanja korištena je kako bi se predvidio najpovoljniji položaj vezanja inhibitora tenofovir fosfata za enzim CK. Korišten je javno dostupan server SwissDock koji metodom klasteriranja izražava najnižu energiju vezanja za pojedino predviđeno vezno mjesto.

U tablici 1 prikazani su rezultati energije dobivenih u SwissDock serveru za 3 različitih položaja vezanja inhibitora tenofovir fosfata za mutaciju F169L.

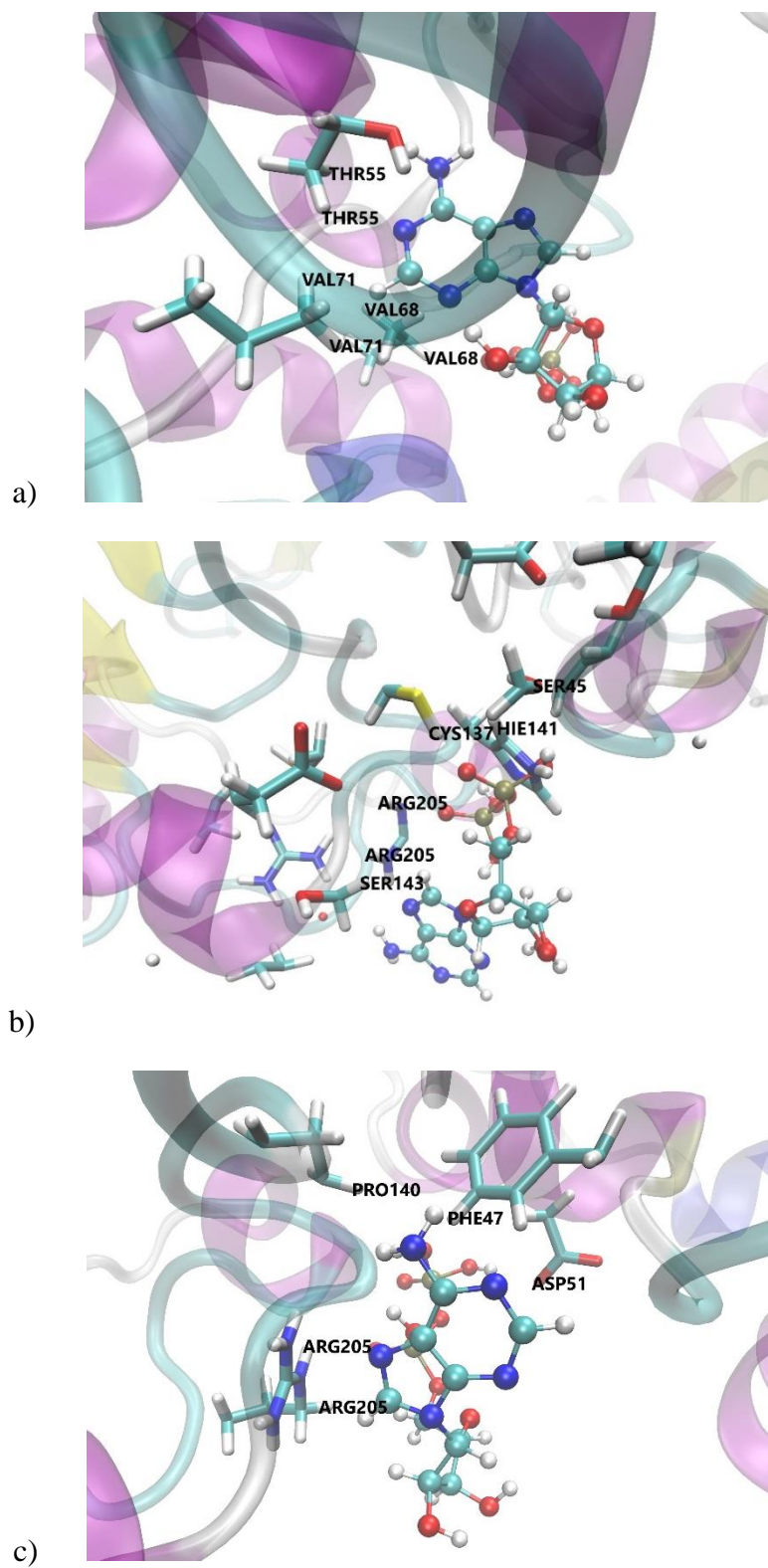
Tablica 1. Prikaz rezultata energije za mutaciju F169L

Klaster	Energija (kcal/mol)
0	-2780,03
1	-2778,84
2	-2778,15

Tablica 2. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	Val68:HB	2,64	Hie141:CD2	1,93	Pro140:HB2	2,63
2	Val68:HG13	2,98	Cys137:HG	2,16	Phe47:HE1	3,00
3	Val71:HG11	2,35	Phe141:HB3	2,99	Phe47:HD1	2,78
4	Val71:HG13	2,38	Ser45:HG	2,66	Asp51:OD1	1,91
5	Thr55:HG21	2,69	Ser143:HB3	2,61	Asp51:HB3	2,56
6	Thr55:HG22	2,89	Arg205:HH11	2,20	Arg205:HH12	3,00
7	Asn59:HB2	2,25	Arg205:HH22	2,85	Arg205:HE	2,74
8	Asn59:HB2	2,75			Arg205:HD3	2,67

U Tablici 2 prikazane su interakcije za tri najvjerojatnija klastera. Tako klasteri 0 i 2 imaju 8 interakcija, između bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka enzima i inhibitora, kraćih od 3 Å. Dok klaster 1 ima 7 interakcija. Klaster 0 lociran je u blizini aminokiselinskog ostatka ASN59, klaster 1 u blizini CIS137, a klaster 2 u blizini ASP51.



Slika 2. Prikaz vezanja inhibitora za mutaciju F169L: a) klaster 0, b) klaster 1 i c) klaster 2

U tablici 3 prikazani su rezultati energije dobivenih u SwissDock serveru za 3 različitih položaja vezanja inhibitora tenofovir fosfata za mutaciju H97Y.

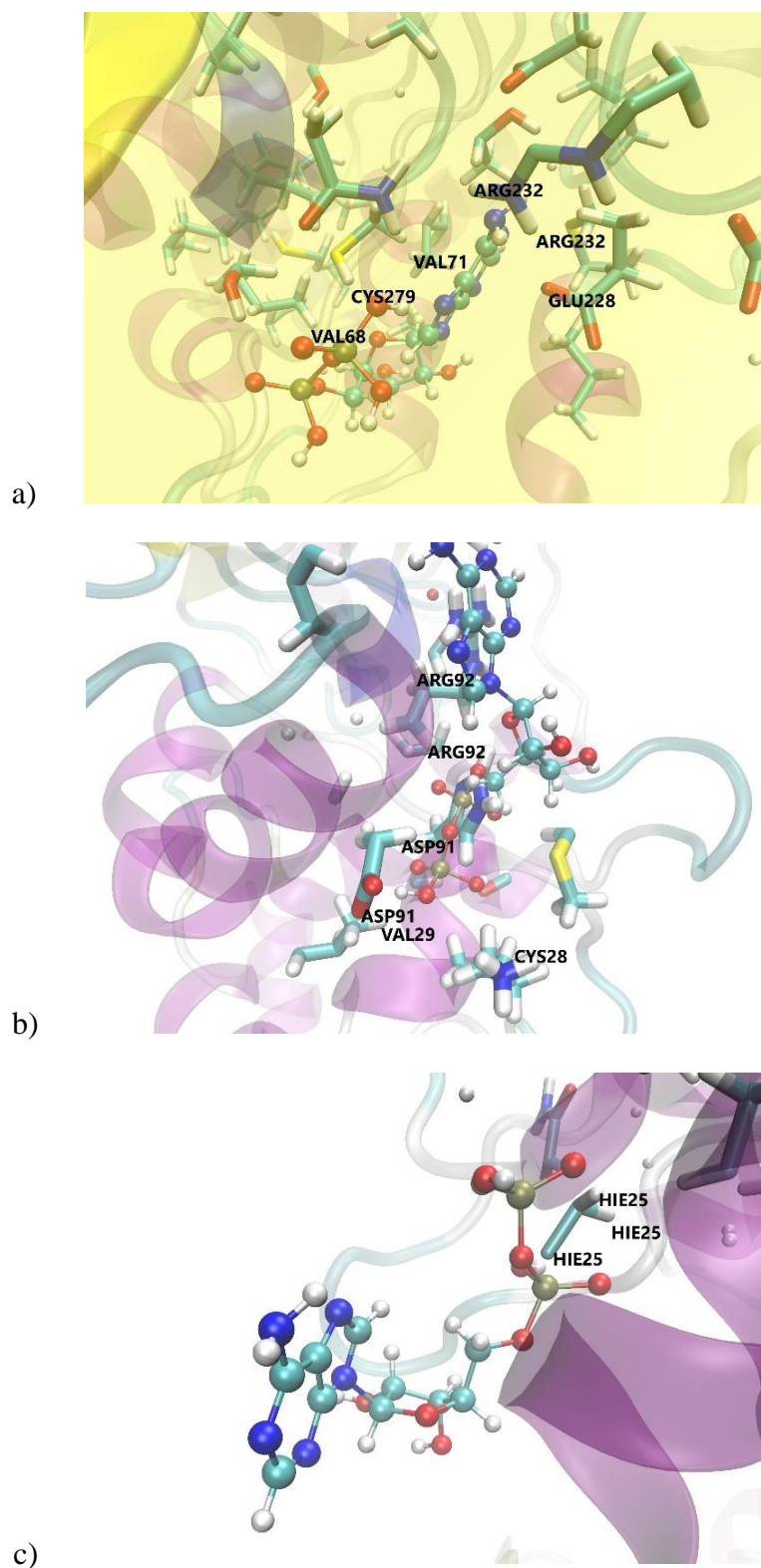
Tablica 3. Prikaz rezultata energije za mutaciju H97Y

Klaster	Energija (kcal/mol)
0	-2773,30
1	-2772,60
2	-2769,52

Tablica 4. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
<b>1</b>	Ser281:HG	2,61	Val29:HG21	2,64	Hie25:HB3	0,95
<b>2</b>	Cys279:HG	2,56	Arg92:HB2	2,53	Hie25:CG	1,74
<b>3</b>	Arg232:HH21	2,75	Cys28:HB2	2,67	Hie25:HB2	1,99
<b>4</b>	Arg232:HH22	2,84	Cys28:HG3	2,76	Hie25:HB2	2,35
<b>5</b>	Glu228:OE1	2,15	Asp91:OD2	2,14	Hie25:CG	2,48
<b>6</b>	Glu228:HB3	2,27	Asp91:HB2	2,43	Hie25:CG	2,49
<b>7</b>	Glu228:HB3	2,53	Asp91:HB3	2,53	Hie25:HB2	2,70
<b>8</b>	Val68:HG13	2,00	Asp336:OD1	2,22	Hie25:CG	2,83
<b>9</b>	Val71:HG12	2,61			Hie25:HB2	2,97
<b>10</b>	Val71:HG13	2,80				

U Tablici 4 prikazane su interakcije za tri najvjerojatnija klastera. Tako klaster 0 ima 10 interakcija, klaster 1 ima 8, a klaster 2 ima 9 interakcija između bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka enzima i inhibitora, kraćih od 3 Å. Klaster 0 lociran je u blizini aminokiselinskog ostatka VAL68, klaster 1 u blizini ASP91, a klaster 2 u blizini Hie25.



Slika 3. Prikaz vezanja inhibitora za mutaciju H97Y: a) klaster 0, b) klaster 1 i c) klaster 2

U tablici 5 prikazani su rezultati energije dobivenih u SwissDock serveru za 3 različitih položaja vezanja inhibitora tenofovir fosfata za mutaciju Y173C.

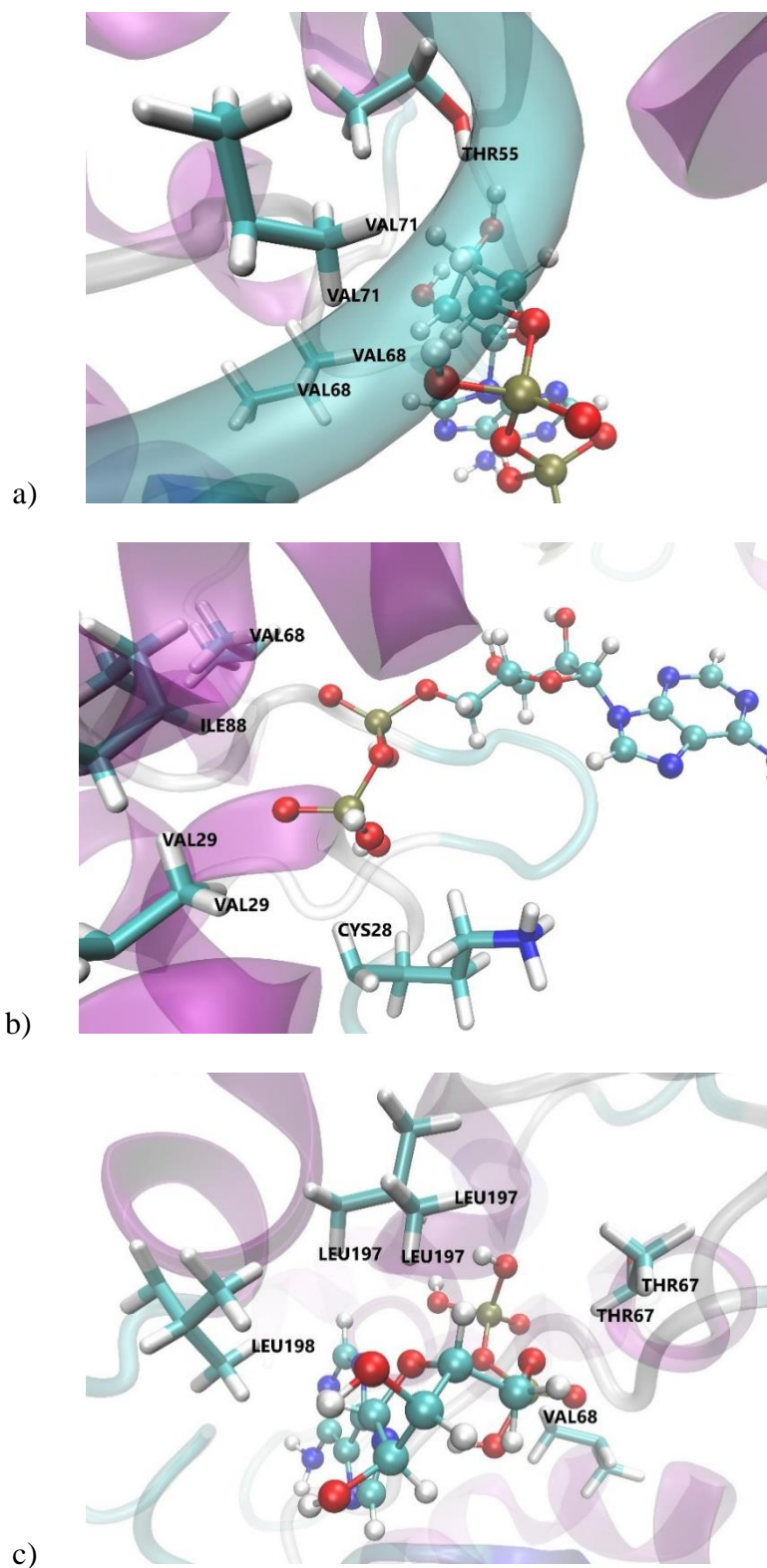
Tablica 5. Prikaz rezultata energije za mutaciju Y173C

Klaster	Energija (kcal/mol)
0	-2793,42
1	-2784,77
2	-2782,51

Tablica 6. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	Thr55:HG22	2,55	Ile88:HB	2,80	Val68:HG13	2,87
2	Val68:HG13	2,02	Cys28:HB2	2,67	Val68:HG13	2,84
3	Val68:HG12	2,89	Cys28:HG3	2,75	Thr55:HG1	1,56
4	Val68:HG13	2,36	Val29:HG21	2,62	Thr55:HG1	2,86
5	Val71:HG11	2,92	Val29:HG23	3,00	Thr67:HB	2,63
6	Val71:HG12	2,30	Val68:HG21	2,84	Thr67:HB	2,56
7	Val71:HG13	2,74	Hie25:HB2	1,96	Leu197:HG	2,00
8	Val71:HG13	2,82	Hie25HB2	2,96	Leu197:HG	2,97
9			Hie25:HB3	1,03	Leu197:HD21	2,39
10					Leu197:HD22	2,13
11					Leu198:HD11	2,81

U Tablici 6 prikazane su interakcije za tri najvjerojatnija klastera. Tako klaster 0 ima 8 interakcija, klaster 1 ima 9, a klaster 2 ima 11 interakcija između bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka enzima i inhibitora, kraćih od 3 Å. Klaster 0 lociran je u blizini aminokiselinskog ostatka VAL68, klaster 1 u blizini HIE25 a klaster 2 u blizini THR55.



Slika 4. Prikaz vezanja inhibitora za mutaciju Y173C: a) klaster 0, b) klaster 1 i c) klaster 2

U tablici 7 prikazani su rezultati energije dobivenih u SwissDock serveru za 3 različitih položaja vezanja inhibitora tenofovir fosfata za mutaciju I92H.

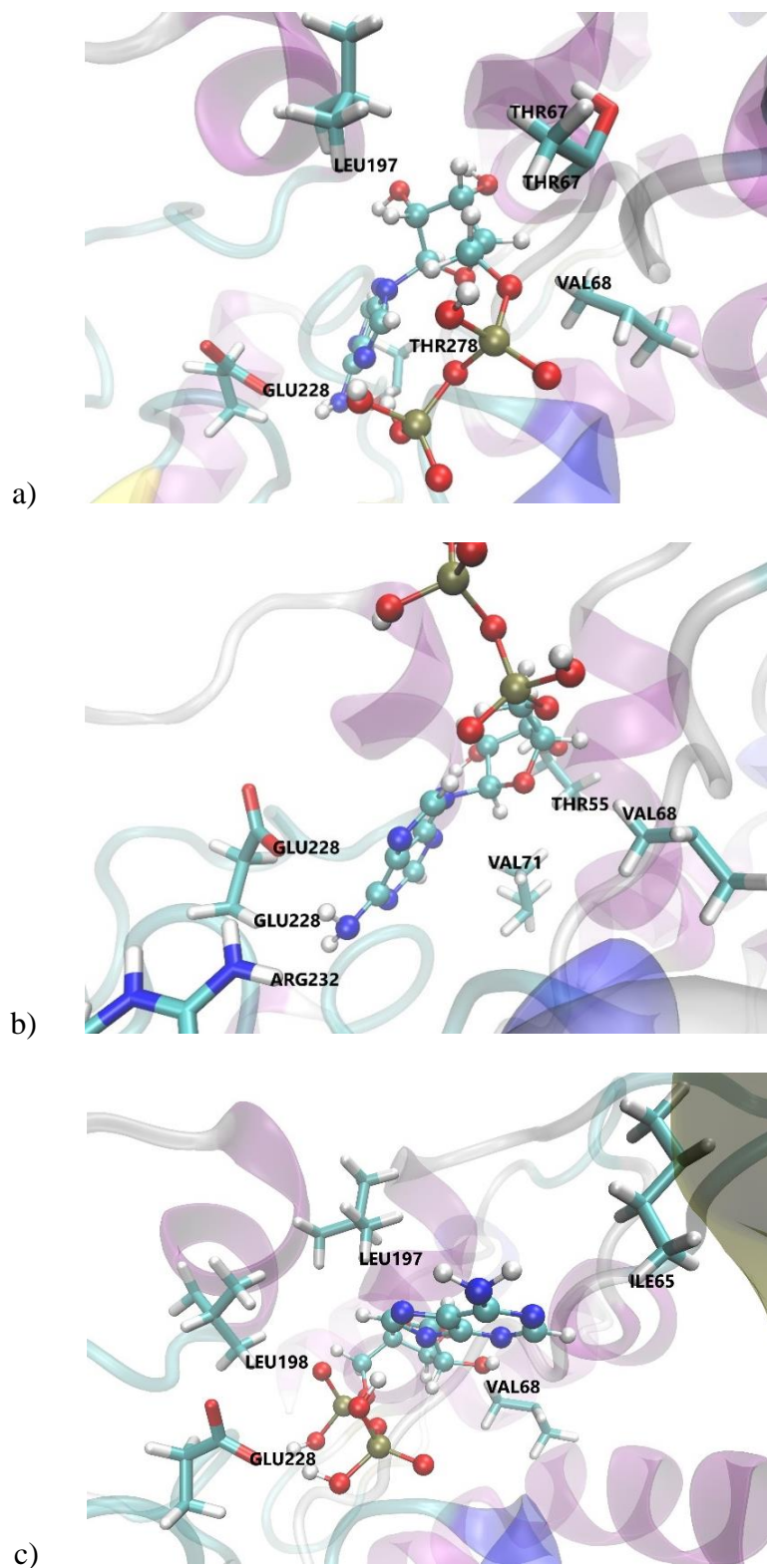
Tablica 7. Prikaz rezultata energije za mutaciju I92H

Klaster	Energija (kcal/mol)
0	-2805,06
1	-2799,51
2	-2799,38

Tablica 8. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	Val68:HG13	2,02	Arg232:HH22	2,71	Ile65:HD12	2,82
2	Leu197:HD21	2,24	Thr55:HG22	2,73	Val68:HG13	2,54
3	Glu228:OE1	2,13	Thr67:HB	2,27	Thr67:HB	2,79
4	Arg232:HH22	2,86	Val68:HG13	2,21	Leu197:HD21	2,35
5	Thr67:HB	2,39	Val71:HG13	2,63	Leu198:HD12	2,71
6	Thr67:HB	2,38	Glu228:OE1	2,28	Glu198:HD11	2,88
7	Thr67:HG23	2,42	Glu228:HB3	2,59	Glu228:OE1	1,85
8	Thr67:HG23	2,86	Glu228:HB3	2,25	Glu228:OE1	1,86
9	Thr278:HB	2,90				
10	Thr278:HG22	2,66				

U Tablici 8 prikazane su interakcije za tri najvjerojatnija klastera. Tako klaster 0 ima 10 interakcija, dok klasteri 1 i 2 imaju 8 interakcija između bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka enzima i inhibitora, kraćih od 3 Å. Klaster 0 lociran je u blizini aminokiselinskog ostatka VAL68, klaster 1 u blizini VAL68, a klaster 2 u blizini GLU228.



Slika 5. Prikaz vezanja inhibitora za mutaciju I92H: a) klaster 0, b) klaster 1 i c) klaster 2



U tablici 9 prikazani su rezultati energije dobivenih u SwissDock serveru za 3 različita položaja vezanja inhibitora tenofovir fosfata za mutaciju N286I.

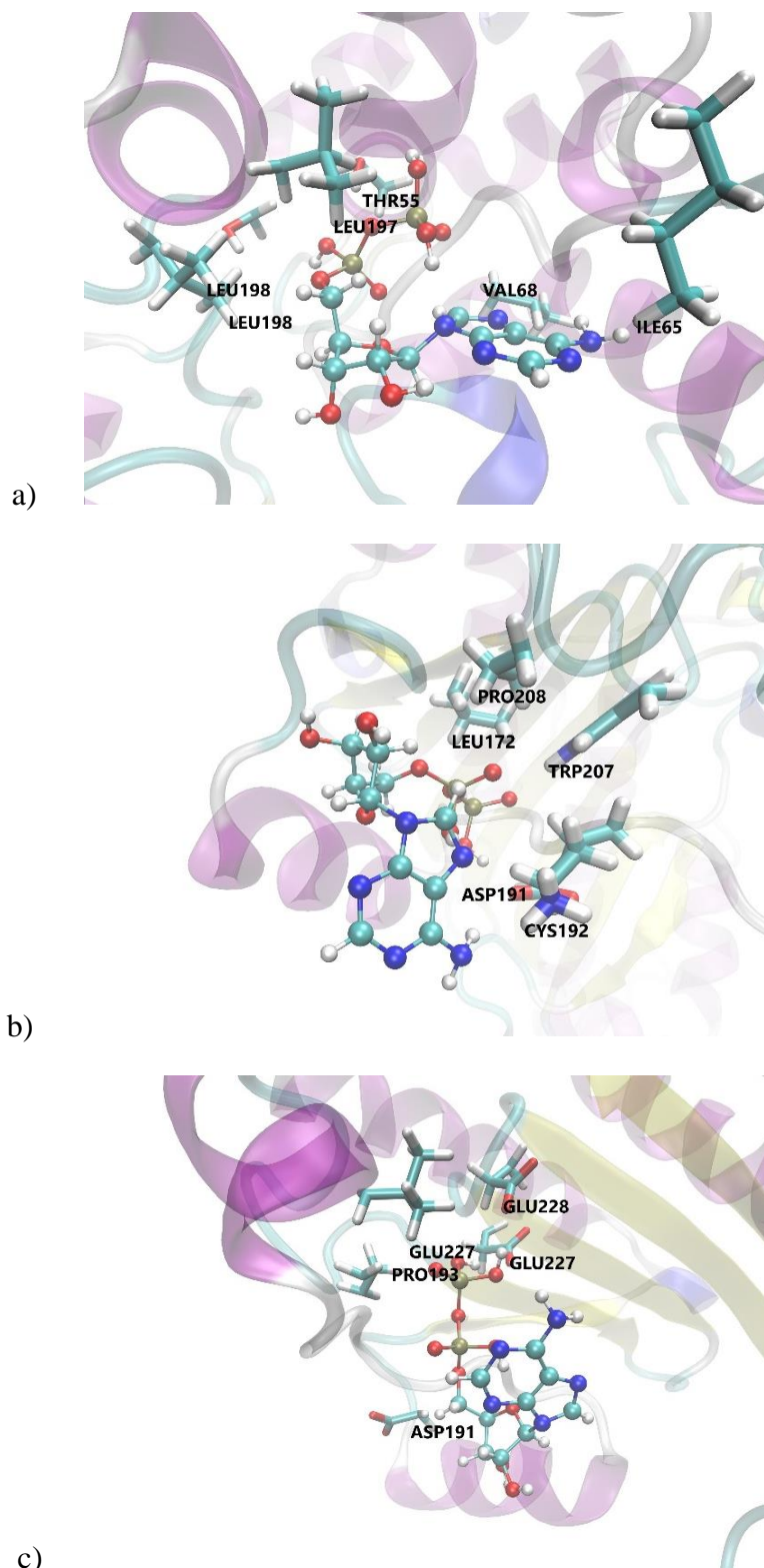
Tablica 9. Prikaz rezultata energije za mutaciju N286I

Klaster	Energija (kcal/mol)
0	-2790,01
1	-2788,62
2	-2781,53

Tablica 10. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	Ile65:HD12	2,90	Trp207:HE1	2,26	Asp191:HB3	2,17
2	Thr55:HG1	2,79	Pro208:HG3	2,78	Pro193:HB3	2,46
3	Asn58:HB2	2,48	Asp191:CG	2,84	Leu198:HG	2,44
4	Ser201:HG	2,99	Asp191:OD1	1,87	Glu227:OE2	1,79
5	Val68:HB	2,83	Cys192:HE2	2,55	Glu227:HG2	2,35
6	Val68:HG13	2,71	Cys192:HE2	2,83	Glu227:HG3	2,96
7	Leu197:HD21	2,33	Leu172:HG	2,78	Glu228:OE2	1,81
8	Leu197:HD21	2,62	Leu172:HD21	2,78	Glu228:HG3	2,73
9	Leu198:HD22	2,58	Leu189:HD22	1,87		

U Tablici 10 prikazane su interakcije za tri najvjerojatnija klastera. Tako klaster 0 i 1 imaju 9 interakcija, dok klaster 2 ima 8 interakcija između bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka enzima i inhibitora, kraćih od 3 Å. Klaster 0 lociran je u blizini aminokiselinskog ostatka LEU197, klaster 1 u blizini ASP191 i LEU189, a klaster 2 u blizini GLU227.



Slika 6. Prikaz vezanja inhibitora za mutaciju N286I: a) klaster 0, b) klaster 1 i c) klaster 2

U tablici 11 prikazani su rezultati energije dobivenih u SwissDock serveru za 3 različitih položaja vezanja inhibitora tenofovir fosfata za mutaciju R43Q.

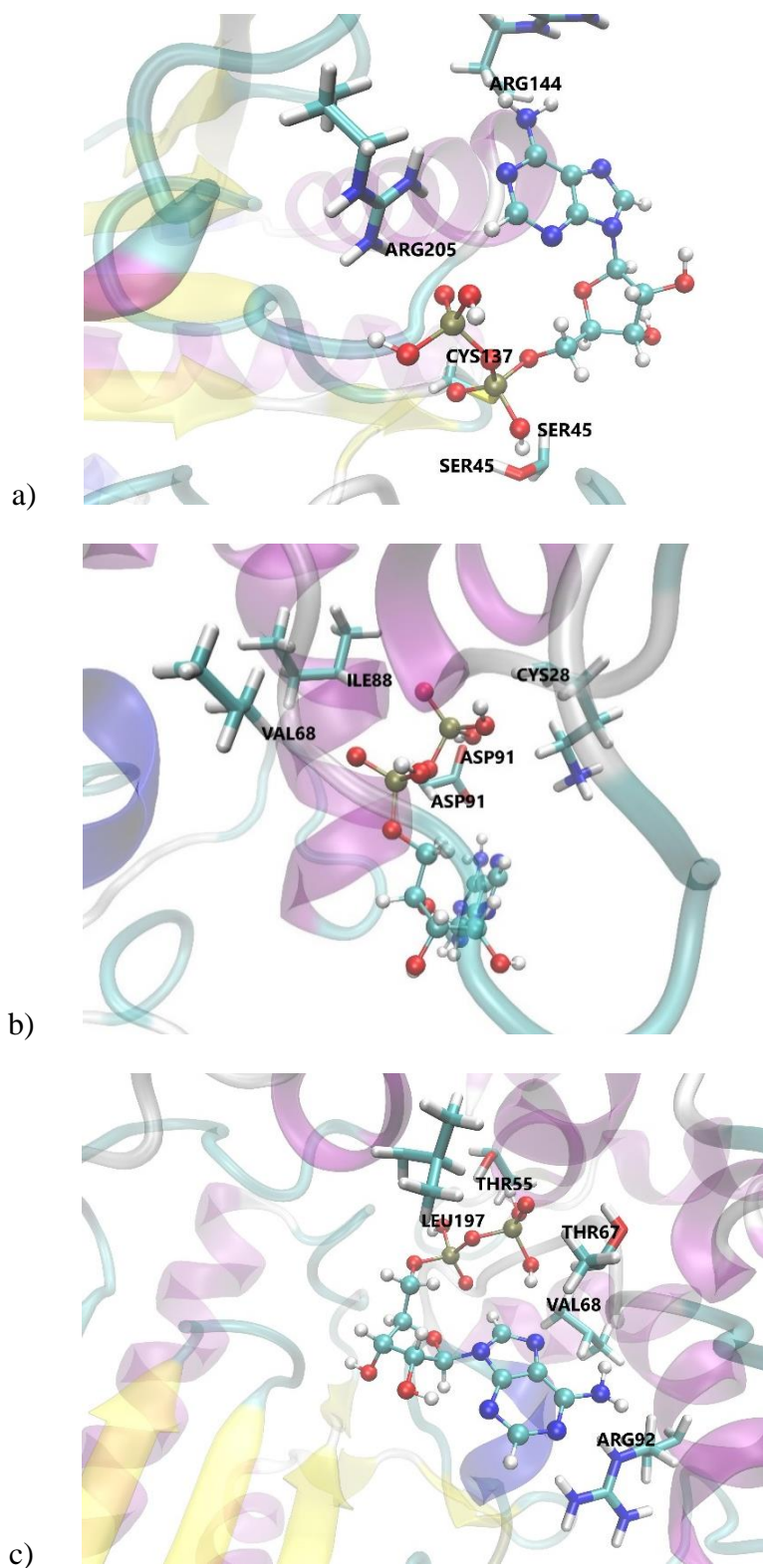
Tablica 11. Prikaz rezultata energije za mutaciju R43Q

Klaster	Energija (kcal/mol)
0	-2783,98
1	-2782,52
2	-2782,48

Tablica 12. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	Hie141:HB2	2,47	Ile88:HB	2,85	Val68:HG13	2,72
2	Hie141:HB3	1,61	Val68:HG21	2,87	Arg92:HE	2,31
3	Cys137:HG	2,79	Cys28:HG3	2,74	Cys279:HG	2,61
4	Cys137:HB3	2,75	Cys28:HG2	2,68	Leu197:HG	2,76
5	Arg144:HG3	2,78	Asp91:HB2	2,44	Leu197:HD2	2,89
6	Arg205:HH22	2,92	Asp91:HB3	2,49	Thr55:HG1	1,59
7	Ser45:OG	1,77	Asp91:OD2	2,11	Thr67:HB	2,01
8	Ser45:HG	2,06	Asp91:OD1	1,85	Thr67:HB	2,95
9	Ser45:HB2	2,88			Thr67:HG1	2,98

U Tablici 12 prikazane su interakcije za tri najvjerojatnija klastera. Tako klaster 0 i 2 imaju 9 interakcija, dok klaster 1 ima 8 interakcija između bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka enzima i inhibitora, kraćih od 3 Å. Klaster 0 lociran je u blizini aminokiselinskog ostatka HIE141, klaster 1 u blizini ASP91, a klaster 2 u blizini THR55.



Slika 7. Prikaz vezanja inhibitora za mutaciju R43Q: a) klaster 0, b) klaster 1 i c) klaster 2

U tablici 13 prikazani su rezultati energije dobivenih u SwissDock serveru za 3 različite položaja vezanja inhibitora tenofovir fosfata za mutaciju R130H.

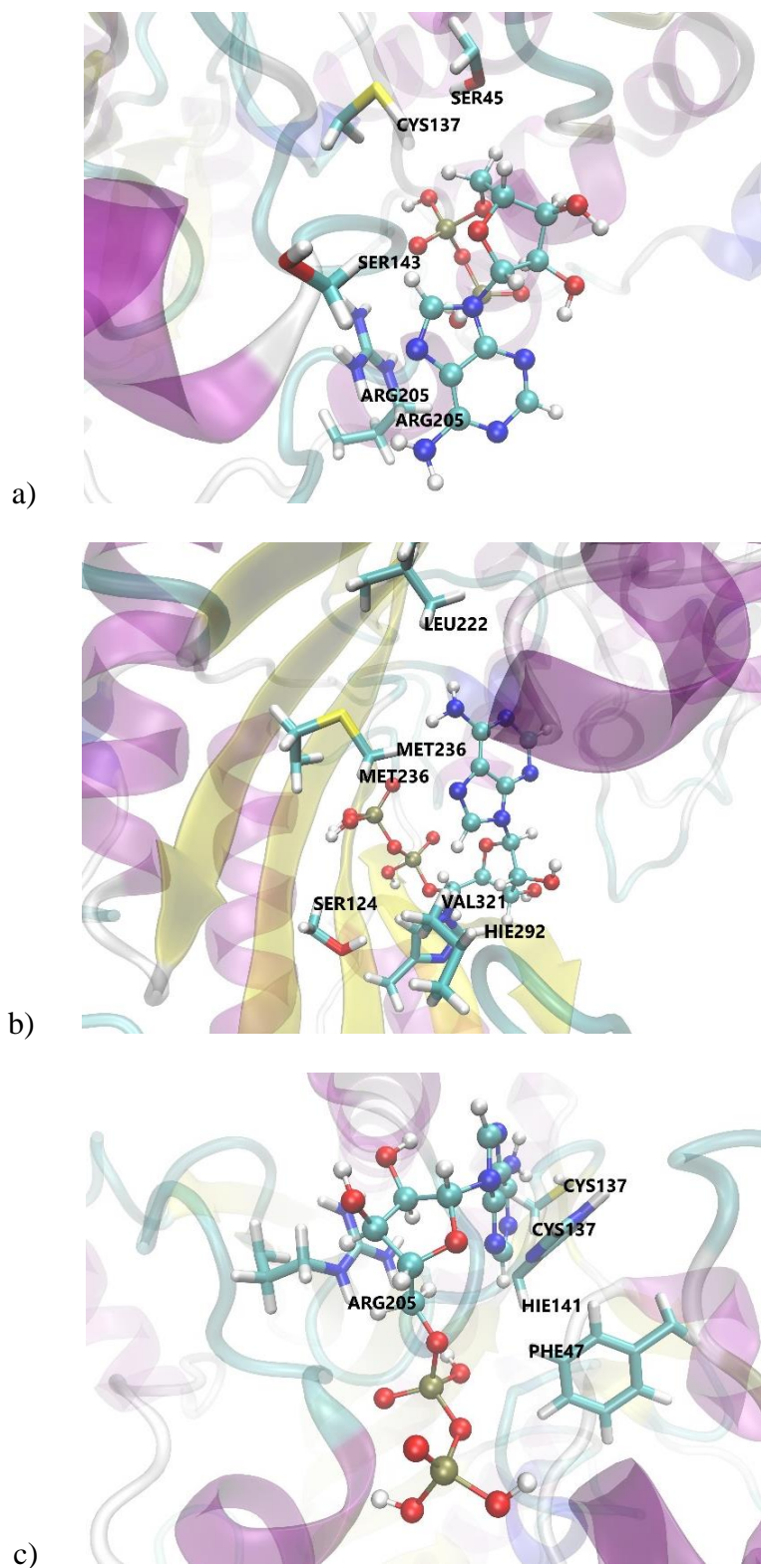
Tablica 13. Prikaz rezultata energije za mutaciju R130H

Klaster	Energija (kcal/mol)
0	-2792,72
1	-2791,11
2	-2778,15

Tablica 14. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	Ser143:HB3	2,69	Val321:HG13	2,23	Phe47:HE1	2,56
2	Ser45:OG	2,63	Hie292:CG	2,48	Hie141:HB2	1,71
3	Cys137:HG	2,14	Ser124:HB2	2,76	Hie141:HB3	2,53
4	Cys137:HG	3,26	Trp224:HH2	2,63	Arg205:HD3	2,74
5	Arg205:HH11	2,83	Met236:HE2	1,87	Arg205:HD3	2,22
6	Arg205:HH22	3,38	Met236:HE1	2,87	Cys137:HG	1,32
7	Arg205:HE	3,08	Leu222:HD21	2,67	Cys137:HB2	2,28
8	Arg205:HH21	3,48	Leu222:HD23	2,96	Cys137:HB3	2,72
9					Cys137:HG	2,54

U Tablici 14 prikazane su interakcije za tri najvjerojatnija klastera. Tako klaster 0 i 1 imaju 8 interakcija, dok klaster 2 ima 8 interakcija između bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka enzima i inhibitora, kraćih od 3,5 Å. Klaster 0 lociran je u blizini aminokiselinskog ostatka CYS137, klaster 1 u blizini MET236, a klaster 2 u blizini CYS137.



Slika 8. Prikaz vezanja inhibitora za mutaciju R130H: a) klaster 0, b) klaster 1 i c) klaster 2

U tablici 15 prikazani su rezultati energije dobivenih u SwissDock serveru za 3 različitih položaja vezanja inhibitora tenofovir fosfata za mutaciju R132C.

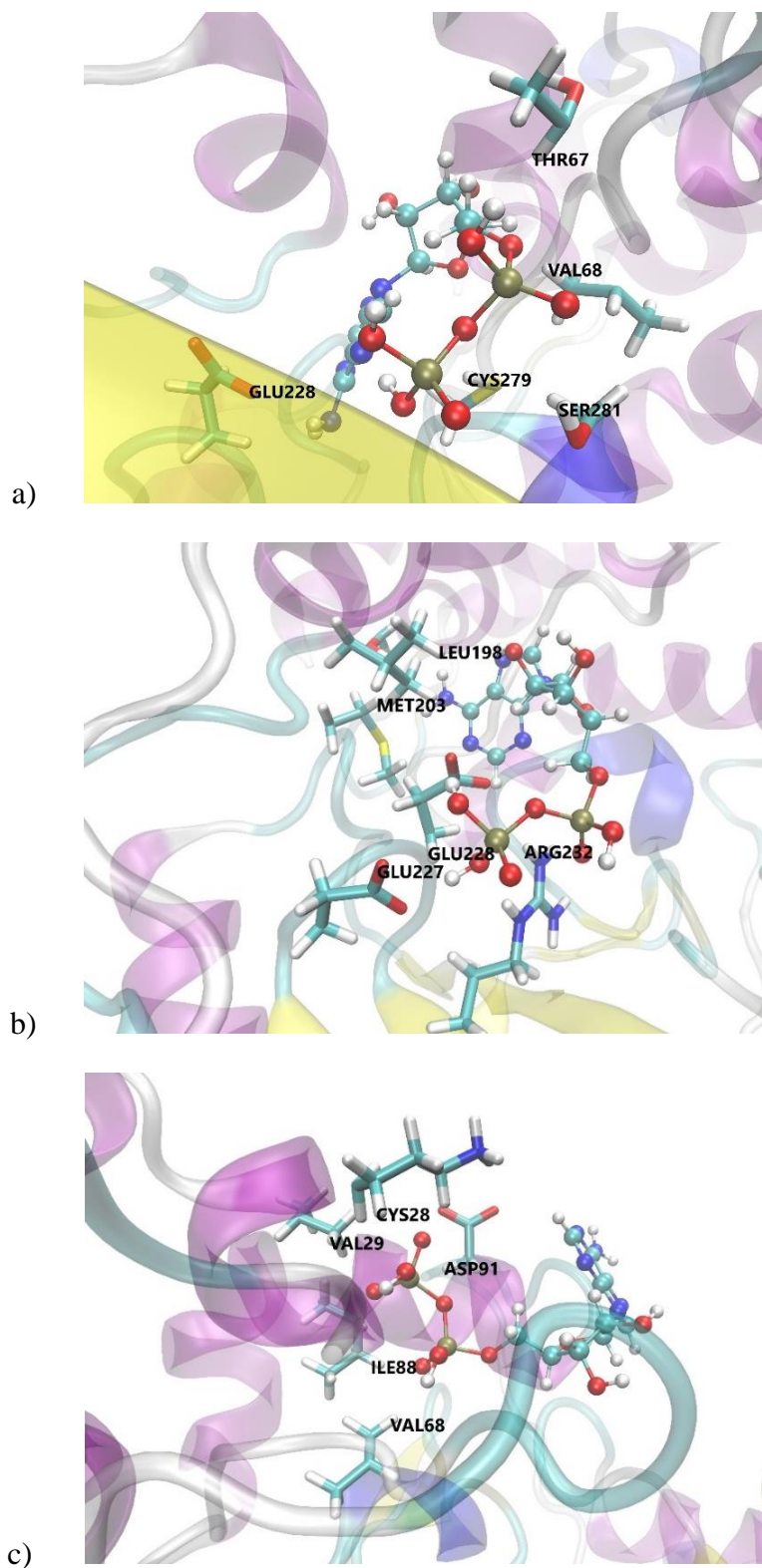
Tablica 15. Prikaz rezultata energije za mutaciju R132C

Klaster	Energija (kcal/mol)
0	-2733,84
1	-2733,72
2	-2730,90

Tablica 16. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	Cys279:HG	2,55	Met203:HG3	2,22	Ile88:HB	2,85
2	Val68:HG13	1,99	Ser201:HG	2,38	Val68:HG21	2,91
3	Ser281:HG	2,72	Arg232:HH21	2,64	Val29:HG21	2,67
4	Ser281:HG	2,44	Leu198:HD11	2,68	Cys28:HB2	2,68
5	Thr67:HB	2,36	Leu198:HD22	2,74	Cys28:HB3	2,74
6	Thr67:HG23	2,33	Glu227:OE1	2,04	Asp91:HB2	2,47
7	Thr228:HB	2,89	Glu228:OE2	1,84	Asp91:OD2	2,11
8	Glu228:HB3	2,29	Glu228:HB3	2,78	Asp91:HB3	2,53
9	Glu228:HB3	2,55				
10	Glu228:OE1	2,18				

U Tablici 16 prikazane su interakcije za tri najvjerojatnija klastera. Tako klaster 0 ima 10 interakcija, dok klasteri 1 i 2 imaju 8 interakcija između bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka enzima i inhibitora, kraćih od 3 Å. Klaster 0 lociran je u blizini aminokiselinskog ostatka VAL68, klaster 1 u blizini GLU228, a klaster 2 u blizini ASP91.



Slika 9. Prikaz vezanja inhibitora za mutaciju R132C: a) klaster 0, b) klaster 1 i c) klaster 2



U tablici 17 prikazani su rezultati energije dobivenih u SwissDock serveru za 3 različita položaja vezanja inhibitora tenofovir fosfata za mutaciju T35I.

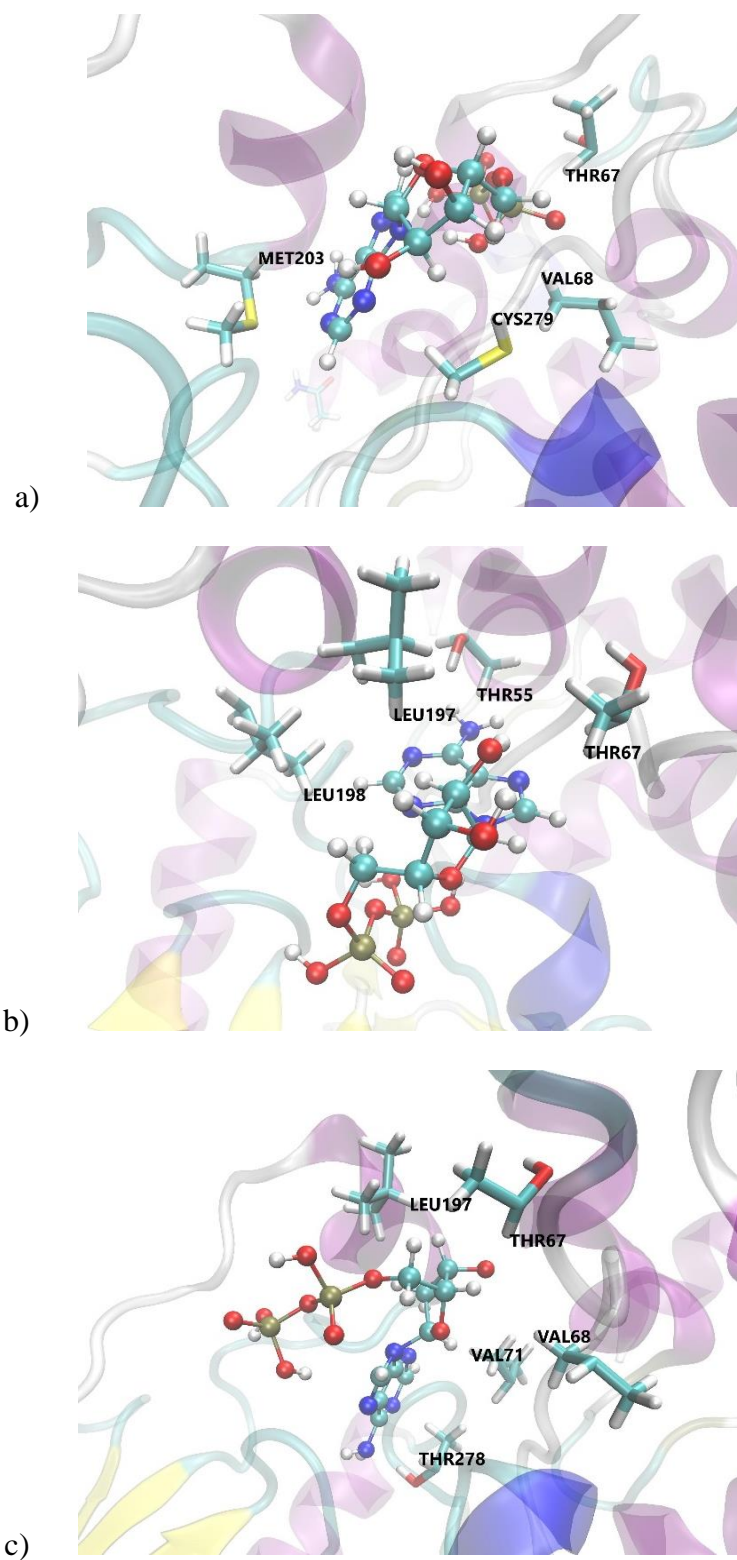
Tablica 17. Prikaz rezultata energije za mutaciju T35I

Klaster	Energija (kcal/mol)
0	-2782,98
1	-2781,74
2	-2781,30

Tablica 18. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	Thr67:HB	2,54	Thr55:HG22	2,91	Val68:HG13	2,86
2	Cys279:HG	2,50	Thr67:HG22	2,37	Val71:HG12	2,73
3	Cys279:HG	2,75	Thr67:HG23	2,37	Leu197:HD21	2,38
4	Met203:HG3	2,42	Thr67:HB	2,81	Leu197:HD22	2,99
5	Met203:HG3	2,73	Leu197:HD21	2,36	Thr67:HB	2,13
6	Val1:HG12	2,98	Leu197:HD22	2,88	Thr67:HG22	2,69
7	Val68:HG13	2,56	Leu197:HD22	2,74	Thr67:HG23	2,19
8	Val68:HG13	2,90	Leu198:HD11	2,96	Thr278:HB	2,76
9			Leu198:HD22	2,58		

U Tablici 18 prikazane su interakcije za tri najvjerojatnija klastera. Tako klaster 0 i 1 imaju 8 interakcija, dok klaster 1 ima 9 interakcija između bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka enzima i inhibitora, kraćih od 3 Å. Klaster 0 lociran je u blizini aminokiselinskog ostatka MET203, klaster 1 u blizini LEU197, a klaster 2 u blizini THR67.



Slika 10. Prikaz vezanja inhibitora za mutaciju T35I: a) klaster 0, b) klaster 1 i c) klaster

U tablici 19 prikazani su rezultati energije dobivenih u SwissDock serveru za 3 različitih položaja vezanja inhibitora tenofovir fosfata za mutaciju W211R.

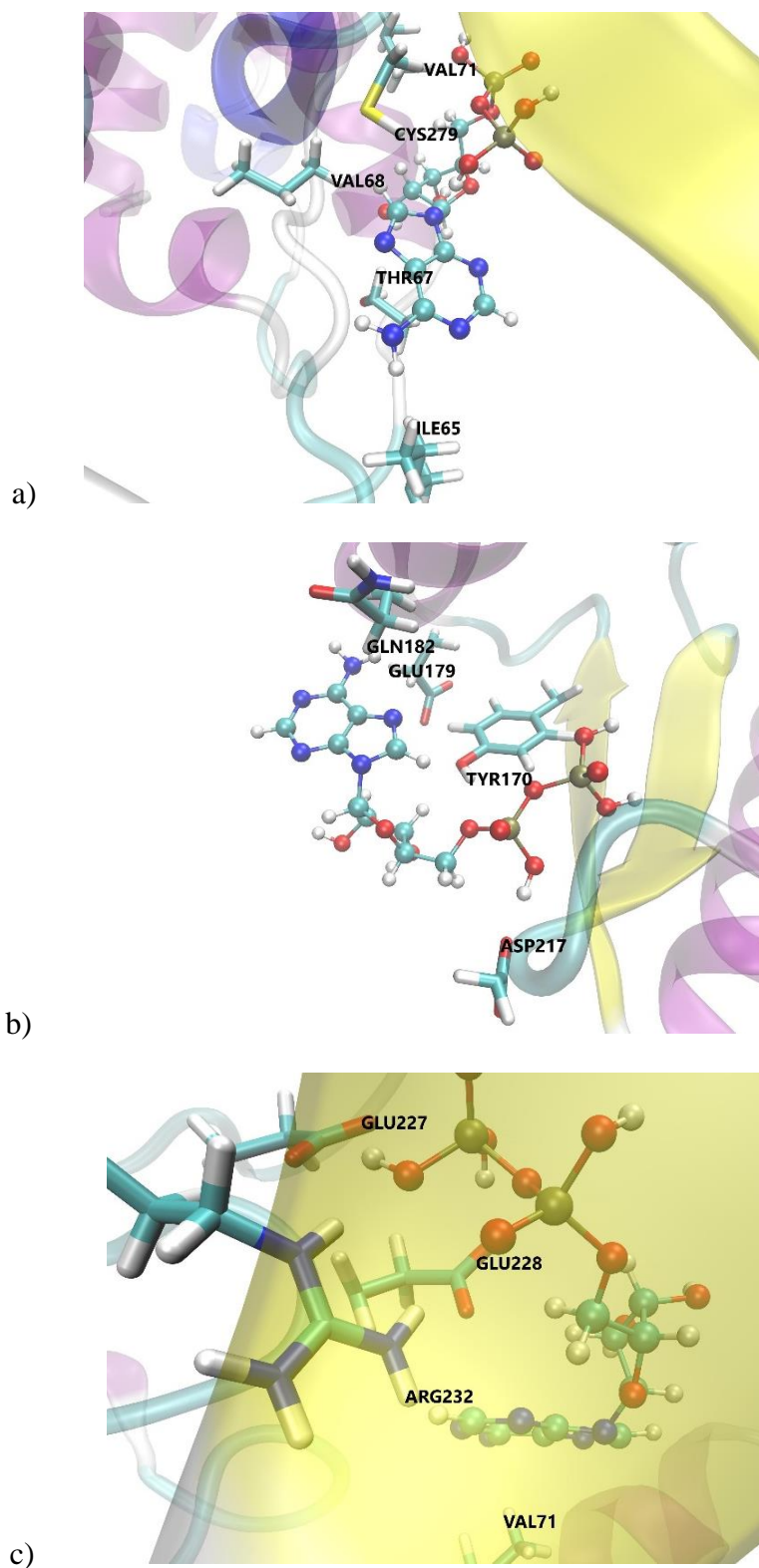
Tablica 19. Prikaz rezultata energije za mutaciju W211R

Klaster	Energija (kcal/mol)
0	-2809,86
1	-2802,83
2	-2801,62

Tablica 20. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	Ile65:HD12	1,79	Asp217:OD1	1,74	Val71:HG12	2,74
2	Cys279:HG	2,81	Glu179:HG2	2,90	Asn282:HD21	2,74
3	Cys279:HG	2,66	Tyr170:OH	2,37	Arg228:HH21	2,62
4	Thr67:HB	2,93	Tyr170:OH	2,75	Arg232:OE1	2,64
5	Thr67:HB	2,35	Tyr170:HH	2,15	Glu227:OE2	2,32
6	Val68:HG13	2,02	Gln182:HB2	2,97	Glu228:OE2	1,85
7	Val68:HG13	2,36	Gln182:HB2	2,61	Glu228:OE1	2,72
8	Val71:HG11	2,92	Gln182:HB3	2,58	Glu228:HB3	2,74
9	Val71HG13	2,74				

U Tablici 20 prikazane su interakcije za tri najvjerojatnija klastera. Tako klaster 1 ima 9 interakcija, dok klasteri 1 i 2 imaju 8 interakcija između bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka enzima i inhibitora, kraćih od 3 Å. Klaster 0 lociran je u blizini aminokiselinskog ostatka ILE65, klaster 1 u blizini ASP217, a klaster 2 u blizini GLU228.



Slika 11. Prikaz vezanja inhibitora za mutaciju W211R: a) klaster 0, b) klaster 1 i c) klaster 2

U tablici 21 prikazani su rezultati energije dobivenih u SwissDock serveru za 3 različita položaja vezanja inhibitora tenofovir fosfata za mutaciju V289L.

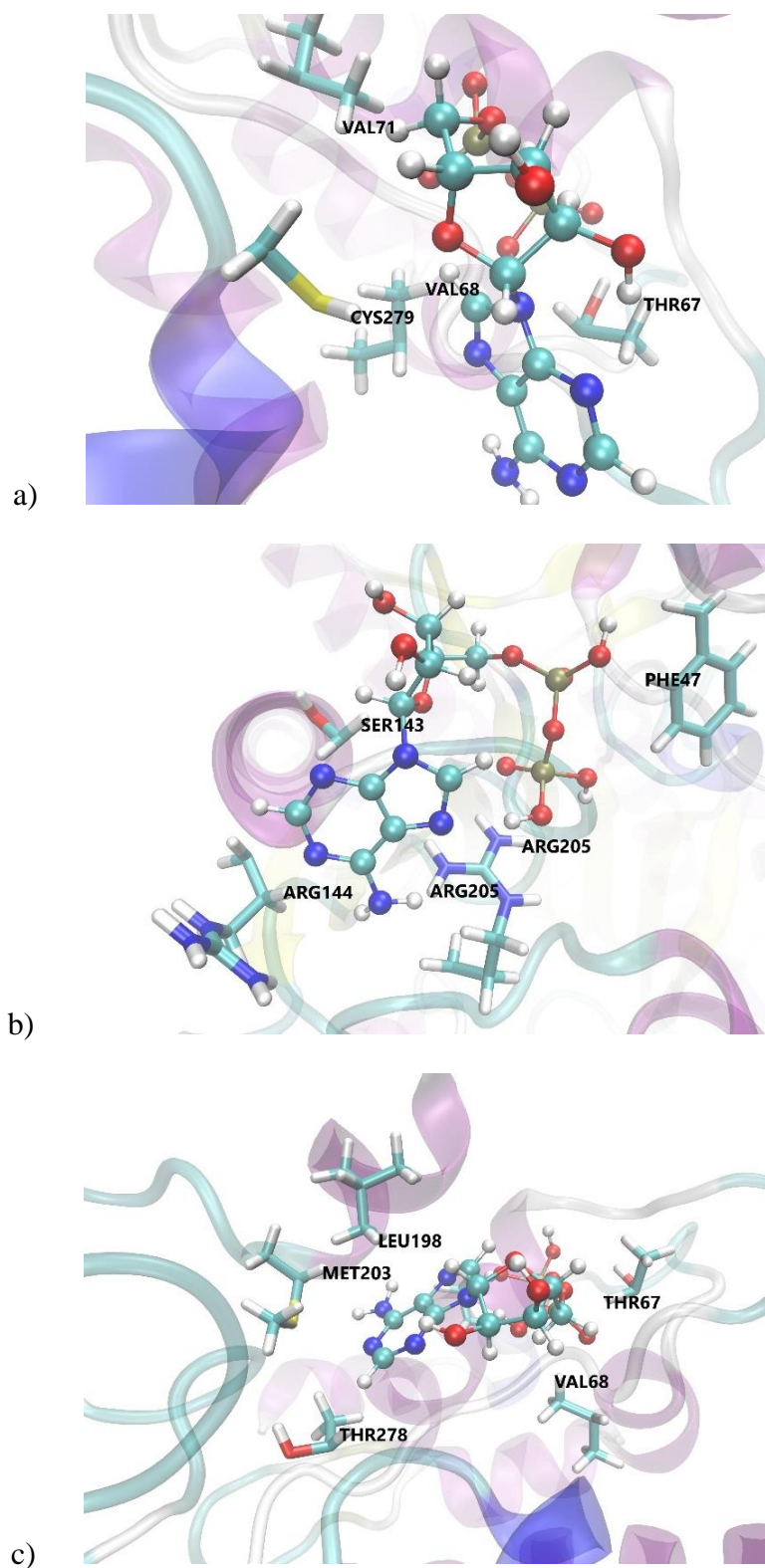
Tablica 21. Prikaz rezultata energije za mutaciju V280L

Klaster	Energija (kcal/mol)
0	-2780,08
1	-2779,68
2	-2778,69

Tablica 22. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	Cys279:HB2	2,77	Phe47:HD1	2,85	Val68:HG13	2,51
2	Thr67:HB	2,04	Ser143:HB2	2,89	Leu198:HD11	2,26
3	Thr67:HG22	2,98	Ser143:HB3	2,77	Ser201:HG	2,37
4	Thr67:HB	2,89	Ser143:HB3	2,96	Met203:HG3	2,23
5	Val68:HG13	2,68	Arg144:HG3	2,89	Met203:HG3	2,78
6	Val68:HG13	2,63	Arg205:HH11	1,91	Thr55:HG1	1,32
7	Val71:HG11	2,82	Arg205:HH11	2,56	Thr67:HB	2,50
8	Val71:HG12	2,95	Arg205:HH22	2,96	Thr278:HB	2,76

U Tablici 22 prikazane su interakcije za tri najvjerojatnija klastera. Tako klasteri 1,2 i 3 imaju 9 interakcija između bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka enzima i inhibitora, kraćih od 3 Å. Klaster 0 lociran je u blizini aminokiselinskog ostatka THR67, klaster 1 u blizini ARG205, a klaster 2 u blizini THR55.



Slika 12. Prikaz vezanja inhibitora za mutaciju V280L: a) klaster 0, b) klaster 1 i c) klaster 2

## 5 RASPRAVA

Predmet istraživanja rada bilo je molekularno modeliranje inhibicije enzima CK pomoću kemijskog spoja tenofovir fosfata kao inhibitora. Cilj istraživanja bio je ispitati energijski najpovoljnije položaje inhibitora u enzimu, korištenjem računalnih metoda uklapanja (dokiranja) ispitati inhibiciju kreatin kinaze te metodama molekulske dinamike pronaći aminokiselinske ostatke koji sudjeluju u vezanju inhibitora. Podaci o enzimu preuzeti su iz PDB baze. Struktura inhibitora preuzeta je iz PubChem baze. Inhibitor je prebačen u mol2 oblik pomoću OpenBabel softvera (14, 15). Za metodu dokiranja korišten je SwissDock server (19, 20). Server je prilikom uklapanja koristio molekulu CK u obliku monomera kao što je navedeno u eksperimentu. Za vizualizaciju korišten je softver VMD (engl. visual molecular dynamics) (18).

U istraživanju provedenom od Mosher i suradnika 2021. godine ispitano je vezanje mutacija koje se prirodno pojavljuju u mišićnoj CK sa inhibitorima ADP i TFV (21). U navedenom je istraživanju pokazano da mutacije R130H, R132C, W211R i N286I vode do značajne redukcije u formiranju ATP-a, a R130H i R132C imaju najnižu aktivnost. Rezultati ovog istraživanja upućuju da je procijenjena energija vezanja najniža za mutaciju W211R što je u skladu sa ranije navedenim istraživanjem. Osim toga mutacije R130H i N286I također imaju niske energije vezanja. Za razliku od istraživanja Moshera i suradnika ovo istraživanje pokazalo je nisku energiju vezanja i za točkaste mutacije Y173C i I92H.

U istom istraživanju predloženo vezno mjesto TFV-a okruženo je aminokiselinskim ostacima Arg130, Arg132, Arg236 i Glu232 (21). Energijski najpovoljniji točkasti mutanti u ovom istraživanju vezali su TFV u okružju aminokiselina Ile65, Val68, Val71 i Ser281. Kako bi se temeljnije ispitala termodinamika ovog veznog mjesta bilo bi potrebno izvesti još niz računalnih simulacija ponajprije energijske optimizacije i simulacije molekulske dinamike kako bi se ispitala formacija vodikovih veza i elektrostatskih interakcija tijekom dinamike proteina.

Ispitivanjem interakcija koje nastaju tijekom reaktivacije CK inhibirane specifičnim inhibitorom, najčešće je korištena računalna metoda molekularnog uklapanja. Metoda predviđa orijentaciju i položaj različitih spojeva u aktivnome mjestu enzima simulacijom različitih sila (električnih sila, vodikove veze ili van der Waalsovih sila). No za pouzdanije rezultate potrebno je provesti još niz računalnih istraživanja kao što je ranije navedeno.

Zanimljivost je da ranije provedeno eksperimentalno istraživanje ukazuje na to da se položaj aminokiseline Trp211 ne nalazi u aktivnom mjestu, ali mutacija njegovog

aminokiselinskog ostatka rezultira u redukciji aktivnosti jednako kao i redukcija aminokiselinskih ostataka aktivnog mjesta (21). Ovim istraživanjem, uz sva ograničenja koje metoda uklapanja ima, identificiran je isti aminokiselinski ostatak važan u redukciji aktivnosti.



## 6 ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Za sve ispitane točkaste mutacije u ovom istraživanju dobivena je negativna energija vezanja za TVF.
- Najnižu energiju vezanja su imale mutacije W211R, Y173C, I92H, R130H i N286I.
- Najpovoljniji energijski položaj nalaze se u blizini aminokiselinskih ostataka Arg130, Arg132, Arg236 i Glu232.

## 7 SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Metodama molekuskog modeliranja ispitati inhibiciju kreatin kinaze, računski ispitati energijski najpovoljnije položaje inhibitora u enzimu i za energijski najpovoljnije položaje izračunati najbliže udaljenosti enzim-inhibitor.

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

**Materijali i metode:** Podaci o enzimu CK preuzeti su iz baze PDB, a podaci o tenofovir fosfatu su preuzeti iz PubChem baze. Za uklapanje je korišten web-server SwissDock. Sve strukture su vizualizirane korištenjem softvera VMD.

**Rezultati:** Za sve ispitane točkaste mutacije u ovom istraživanju dobivena je negativna energija vezanja za TVF. Najnižu energiju vezanja su imale mutacije W211R, Y173C, I92H, R130H i N286I. Najpovoljniji energijski položaj nalaze se u blizini aminokiselinskih ostataka Arg130, Arg132, Arg236 i Glu232.

**Zaključak:** Na temelju provedenog istraživanja možemo zaključiti da je za sve ispitane točkaste mutacije dobivena negativna energija vezanja. Najnižu energiju vezanja su imale mutacije R130H, R132C, W211R i N286I, stoga su najmanje aktivni.

**Ključne riječi:** keratin kinaza, tenofovir fosfat, inhibicija, molekulska uklapanje

## 8 SUMMARY

### **Molecular modelling of creatin kinase**

**Objectives:** Using molecular modeling methods, analyse creatin kinase inhibition by examining the energetically favorable positions of the inhibitor and calculate the nearest enzyme-inhibitor distances for optimal energy efficiency.

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

**Materials and methods:** CK enzyme data were taken from the PDB base and tenofovir phosphate data were taken from the PubChem base. SwissDock server was used for docking. All structures were visualized using VMD software.

**Results:** Negative binding energy to TVF was obtained for all tested point mutations in this study. The lowest binding energy was spotted in mutations W211R, Y173C, I92H, R130H and N286I. The most favorable energy position is located near the amino acid residues Arg130, Arg132, Arg236 and Glu232.

**Conclusion:** Based on the findings of the research, a conclusion can be drawn that in all mutations there was a decrease in activity. The lowest binding energy had the R130H, R132C, W211R and N286I mutations; therefore, they are the least active.

**Keywords:** creatine kinase, tenofovir phosphate, inhibition, molecular docking

**9 LITERATURA**

1. Štraus B, Petrik J. Enzimi. U: Čvorišćec D, Čepelak I (ur.). Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 245-313.
2. Kennelly PJ, Rodwell VW. Enzimi: mehanizam djelovanja. U: Lovrić J, Sertić J (ur.). Harperova ilustrirana biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 51-62.
3. Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* 2015;59:1-41. doi:10.1042/bse0590001.
4. Kennelly PJ, Rodwell VW. Enzimi: kinetika. U: Lovrić J, Sertić J (ur.). Harperova ilustrirana biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 62-75.
5. Ramsay RR, Tipton KF. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules.* 2017;22(7):1192. doi:10.3390/molecules22071192.
6. Kennelly PJ, Rodwell VW. Enzimi: regulacija enzimske aktivnosti. U: Lovrić J, Sertić J (ur.). Harperova ilustrirana biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 75-84.
7. Thurakkal L, Singh S, Roy R, Kar P, Sadhukhan S, Porel M. An in-silico study on selected organosulfur compounds as potential drugs for SARS-CoV-2 infection via binding multiple drug targets. *Chem Phys Lett [Internet].* 2021;763:138193.
8. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto Jr., Lubert Stryer. *Biochemistry.* Macmillan Learning, 2015
9. David L. Nelson, Michael M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry.* W. H. Freeman, 2017
10. Duhovny D, Nussinov R, Wolfson HJ. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. In Gusfield et al., Ed. *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Workshop on Algorithms in Bioinformatics(WABI) Rome, Italy, Lecture Notes in Computer Science.* 2002; 2452, pp. 185-200.
11. Stéphanie Badiou, Corinne Merle De Boever, Nathalie Terrier, Vincent Baillat, Jean-Paul Cristol, Jacques Reynes. Is tenofovir involved in hypophosphatemia and decrease of tubular phosphate reabsorption in HIV-positive adults? Available: 19 September 2005
12. Honorato RV, Koukos PI, Jimenez-Garcia B, Tsaregorodtsev A, Verlati M, Giachetti A, et al. Structural biology in the clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem. *Frontiers Mol. Biosci.,* 2021; 8, fmolb.2021.729513.

13. Van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, et al. The HADDOCK2.2 webserver: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *J. Mol. Biol.*, 2015; 428, 720-725.
14. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminf.* 2011; 3, 33. doi:10.1186/1758-2946-3-33
15. The Open Babel Package, version 2.3.1 <http://openbabel.org> (accessed April 2021)
16. Brkić H. Proučavanje o željezu ovisnih dioksigenaza računalnim metodama. Doktorska disertacija. Prirodoslovno matematički Fakultet, Fizički odsjek, Zagreb. 2014.
17. Thurakkal L, Singh S, Roy R, Kar P, Sadhukhan S, Porel M. An in-silico study on selected organosulfur compounds as potential drugs for SARS-CoV-2 infection via binding multiple drug targets. *Chem Phys Lett [Internet]*. 2021;763:138193.
18. Humphrey, William; Dalke, Andrew; Schulten, Klaus. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1996;14 (1): 33–38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5. PMID 8744570
19. Bugnon M, Röhrig UF, Goullieux M, Perez MAS, Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissDock 2024: major enhancements for small-molecule docking with Attracting Cavities and AutoDock Vina. *Nucleic Acids Res.* **2024**
20. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39 (*Web Server issue*), W270-W277.
21. Eric P. Mosher, Colten D. Eberhard and Namandjé N. Bumpus. Naturally Occurring Mutations to Muscle-Type Creatine Kinase Impact Its Canonical and Pharmacological Activities in a Substrate-Dependent Manner In Vitro. *Molecular Pharmacology* December 2021, 100 (6) 588-596; DOI: <https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000348>
22. McDonald, Andrew G., and Keith F. Tipton. "Enzyme nomenclature and classification: The state of the art." *The FEBS journal* 290.9 (2023): 2214-2231.
23. Schnell, Santiago. "Validity of the Michaelis–Menten equation–steady-state or reactant stationary assumption: that is the question." *The FEBS journal* 281.2 (2014): 464-472.
24. Bruce Alberts. „Molecular Biology of the Cell”. 6<sup>th</sup> edition. New York 2015

25. Singh SP, Ashok P., Reeta RS., Larroche C., Li Z. Biomass, biofuels, biochemicals: advances in enzym catalysis and technologies. Amsterdam: Elsevier, 2020.

## 10 ŽIVOTOPIS

### Ime i prezime:

Tea Briševac

### Datum i mjesto rođenja:

24.12.2000., Sisak

### Adresa:

Frana Kršinića 21, 44000 Sisak

### Broj mobitela:

091/9596593

### Obrazovanje:

2015. – 2020. Srednja škola Viktorovac, medicinska sestra/medicinski tehničar opće njege, Sisak

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