

VILNIAUS UNIVERSITETAS GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Emilija Skrodenytė

Kryptingas dCTP ir citidino deaminazių specifinio aktyvumo keitimas

Magistro baigiamasis darbas

Biochemijos studijų programa

Darbo vadovas Dr. Nina Urbelienė

Darbas atliktas GMC Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje



Turinys

Sa	ntrump	DS	4
Įv	adas		5
1.	Literatū	ros apžvalga	7
	1.1. Ba	ltymų inžinerijos metodai	7
	1.1.1.	Kryptingoji evoliucija	7
	1.1.2.	Racionalusis modeliavimas	7
	1.1.3.	Pusiau racionalusis modeliavimas	
	1.1.4.	Baltymų inžinerija sukurtų baltymų pavyzdžiai	9
	1.1.5.	Inžinerinės citidino deaminazės	9
	1.2. Fe	rmentų aktyvumo įvairovė	11
	1.2.1.	Fermentų daugialypio aktyvumo skirstymas	11
	1.2.2.	Daugialypis sąlygų aktyvumas	12
	1.2.3.	Daugialypis substratinis aktyvumas	12
	1.2.4.	Daugialypis katalizinis aktyvumas	13
	1.2.5.	Daugialypio aktyvumo priežastys	14
	1.3. dC	TP deaminazė	15
	1.3.1.	dCTP deaminazės struktūra ir veikimo mechanizmas	15
	1.3.2.	dCTP deaminazės reikšmė	16
	1.4. Cit	idino deaminazės	17
	1.4.1.	Citidino deaminazių klasifikacija	17
	1.4.2.	Homodimerinės ir homotetramerinės CDA	18
	1.4.3.	APOBEC/AID šeimos deaminazės	20
	1.5. Da	ugialypės CDA reakcijos	21
	1.5.1.	CDA_F14 struktūra ir metagenominių CDA racionalusis dizainas	22
	1.6. Nu	kleozidų analogai	22
	1.6.1.	Ribozės žiedo modifikacijos	23
	1.6.2.	Nukleozidų analogų sintezė	24
2.	Medžiag	gos ir metodai	26
	2.1. Me	džiagos	26
	2.1.1.	Pradmenys	26
	2.1.2.	Substratai	26
	2.1.3.	Kamienai	27
	2.1.4.	Terpės	27
	2.1.5.	Vektoriai	28
	2.2. Me	todai	28
	2.2.1.	Kompetentinių ląstelių paruošimas elektroporacijai	28
	2.2.2.	Kompetentinių ląstelių paruošimas cheminei transformacijai	28
	2.2.3.	PGR metodas tikslinio geno amplifikacijai	28
	2.2.4.	DNR elektroforezė	29
	2.2.5.	Tikslinio DNR fragmento gryninimas iš agarozės gelio	29
	2.2.6.	Tikslinio DNR fragmento gryninimas iš PGR mišinio	29
	2.2.7.	Tikslinio geno ligavimas į pLATE vektorių	29
	2.2.8.	Elektroporacija	29
	2.2.9.	Cheminė transformacija	30
	2.2.10). Plazmidžių gryninimas	30

2.2.11. Baltymų raiška ir gryninimas	
2.2.12. Baltymų molekulinės masės nustatymas SDS-PAGE	
2.2.13. Bradfordo testas baltymų koncentracijos nustatymui	31
2.2.14. Plonasluoksnė chromatografija aktyvumo su substratais įvertinimui	31
2.2.15. HPLC-MS metodas aktyvumo su substratais įvertinimui	31
2.2.16. Fermentinio aktyvumo matavimas	31
2.2.17. Taikiniui specifinės ir atsitiktinės mutagenezės pradmenų kūrimas	32
2.2.18. Taikiniui specifinės ir atsitiktinės mutagenezės	32
2.2.19. Linijinių DNR fragmentų ligavimas	32
3. Rezultatai ir jų aptarimas	34
3.1. CDA_F14 mutantų substratinio specifiškumo rezultatai	
3.1.1. 2'-OH grupę koordinuojančių aminorūgščių mutacijos	35
3.1.2. 3'-OH grupę koordinuojančių aminorūgščių mutacijos	36
3.1.3. 5'-OH grupę koordinuojančių aminorūgščių mutacijos	37
3.1.4. Substratinio specifiškumo analizei naudotų substratų apžvalga	39
3.1.5. CDA_F14 mutantų substratinis specifiškumas	40
3.1.6. 5'-levulinil- <i>N</i> ⁴ -benzoil-2'-deoksicitidino atpažinimas fermento aktyviajame	e centre
41	40
3.2. dUTP deaminazes substratinio specifiskumo rezultatai	42
3.2.1. Dcd_wt ir mutantinių baltymų gryninimas	42
3.2.2. Dcd_wt ir mutantinių baltymų aktyvumo nustatymas	42
3.2.3. Dcd_wt substratinis specifiskumas	43
Išvados	44
Santrauka	45
Literatūros sąrašas	47
Priedai	53

Santrumpos

- GMC Gyvybės mokslų centras
- VU Vilniaus universitetas
- CDA citidino deaminazė
- Dcd dCTP deaminazė
- dCTP deoksicitidino trifosfatas
- AraC citarabinas
- AML ūminė mieloidinė leukemija
- ProA-γ-glutamilfosfato reduktazė
- ArgC N-acetil-γ-glutamilfosfato reduktazė
- PLP piridoksalio fosfatas
- dTTP deoksitimidino trifosfatas
- dUMP deoksiuridino monofosfatas
- dTMP deoksitimidino monofosfatas
- UDP uridino difosfatas
- dUDP deoksiuridino difosfatas
- dUTP deoksiuridino trifosfatas
- FDA JAV maisto ir vaistų administracija

Įvadas

Gausėjančios žmonijos gretos spartina įvairių pramonės šakų procesus, reikalauja didesnės ir greitesnės produkcijos. Dauguma industrijoje naudojamų metodų yra cheminiai, tad nenuostabu, jog dėl intensyvaus jų taikymo kyla grėsmė gamtai – didėja taršos lygis, eikvojami natūralūs gamtiniai šaltiniai. Šie padariniai skatina ieškoti aplinkai draugiškesnių sprendimų ir vienas iš tokių yra biologinių katalizatorių – fermentų – pritaikymas maisto, vaistų, detergentų bei kitų, kasdienybėje svarbių junginių sintezėje. Vis dėlto, natyvių fermentų naudojimas industrijoje yra apribotas, kadangi dažnai pramoniniai procesai vykdomi organiniuose tirpikliuose, aukštose temperatūrose, rūgštinėse ar šarminėse sąlygose, o tai nėra natūrali aplinka fermento veikimui. Šiuolaikiniai baltymų inžinerijos metodai leidžia sukonstruoti mutantinius fermentus su pagerintu kataliziniu efektyvumu, geresniu termostabilumu, platesniu substratiniu specifiškumu bei kitomis naudingomis savybėmis, kurių dėka biokatalizatoriai yra labiau tinkami pramoninei sintezei (Kapoor ir kt., 2017).

Nukleozidų/nukleotidų analogai plačiausiai naudojami molekulinėse terapijose (Abdullah Al Awadh, 2022), vakcinų kūrime (Ho ir kt., 2024), genetinio kodo praplėtime (Feldman & Romesberg, 2018). Sintetinių nukleozidų/nukleotidų įvairovei padidinti identifikuota ir sintezėje pritaikyta nemaža dalis fermentų. Tarp jų potencialo turi ir citidino deaminazės (CDA) – hidrolazių klasės fermentai. Tipinės citidino deaminazės katalizuoja citidino ar 2'-deoksicitidino deamininimą atitinkamai iki uridino ar 2'-deoksiuridino. Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje atrinktos prokariotinės tetramerinės CDA, gebančios įvairius N^4 -acil, N^4 - $/O^4$ - $/S^4$ -alkil, and N^4 - $/O^4$ - $/S^4$ -arilpirimidino darinius paversti į uridino analogus. Ankstesnių tyrimų rezultatai parodė, jog pastarosios CDA sunkiau hidrolizuoja substratus su pakaitais 2', 3' ar 5' ribozės pozicijose, o kai kurie iš tokių junginių gali būti potencialiais vaistais prieš vėžį, virusines ar grybelines ligas.

Vienas iš atlikto tyrimo objektų yra CDA_F14 fermentas, kuris dėl savo didelės substrato surišimo kišenės pasižymi plačiu substratiniu specifiškumu. Iki šiol daugiausiai duomenų surinkta apie substratų, turinčių pakaitus N4 pozicijoje ar nukleobazės žiede, hidrolizę. Tad šio darbo metu pasirinkta analizuoti aminorūgštis, sąveikaujančias su ribozės žiedu ir pritaikant baltymų racionalųjį dizainą, identifikuoti mutacijas, turinčias įtakos substratinio specifiškumo pasikeitimui.

Kitas tyrimo objektas – *E.coli* dCTP deaminazė (Dcd) – pasirinktas tikintis išsiaiškinti, ar laukinio tipo fermentas bei sukonstruoti mutantai gali deamininti modifikuotus nukleotidus, kadangi iki šiol mokslinėje literatūroje yra mažai duomenų apie Dcd substratinį specifiškumą.

Darbo tikslas:

Nustatyti tikslingai parinktų aminorūgščių įtaką citidino deaminazės CDA_F14 specifiškumui nukleozidų dariniams su įvairiais pakaitais ribozės žiede ir *E.coli* wt dCTP deaminazės specifiškumui modifikuotiems nukleotidams.

Darbo uždaviniai:

- 1. Remiantis CDA_F14 3D struktūra parinkti tikslines mutagenezės vietas, siekiant praplėsti fermento daugialypiškumą ir įvertinti mutacijų įtaką fermentiniam aktyvumui;
- Atlikti pasirinktų aminorūgščių mutagenezę CDA_F14 gene ir išgryninti mutantinius fermentus;
- 3. Įvertinti CDA_F14 mutantų katalizines savybes bei specifinius aktyvumus;
- 4. Atlikti pasirinktų pagal 3D struktūrą aminorūgščių mutagenezę *E.coli* wt dCTP deaminazės gene ir išgryninti mutantinius fermentus;
- 5. Įvertinti *E.coli* wt dCTP deaminazės ir mutantų katalizines savybes bei specifinius aktyvumus.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Baltymų inžinerijos metodai

Baltymų ar baltyminės kilmės medžiagų – fermentų – inžinerija išskiriama kaip nauja genetinės inžinerijos disciplina (Wang ir kt., 2023). Ne vieną dešimtį skaičiuojanti mokslo šaka leidžia keisti fermentų savybes ir atrasti efektyvesnius jų variantus. Naudojantis baltymų inžinerija jau pavyko sukurti fermentus su pagerintu kataliziniu aktyvumu, pakitusiu substratiniu specifiškumu, stereose-lektyvumu ar gebėjimu veikti organiniuose tirpikliuose, aukštose temperatūrose bei ypač rūgštinėse ar bazinėse terpėse (Lutz & Iamurri, 2018). Išskiriami trys pagrindiniai metodai, kuriuos taikant ieš-koma patobulintų biologinių katalizatorių – kryptingoji evoliucija, racionalusis modeliavimas (angl. rational design) ir pusiau racionalusis modeliavimas (angl. semi-rational design). Be šių technikų dar naudojamas molekuline dinamika ir homologija paremtas modeliavimas, rūšiavimas tėkmės citometrija ar de novo fermentų sintezė (Kapoor ir kt., 2017).

1.1.1. Kryptingoji evoliucija

Kryptingosios evoliucijos tikslas – simuliuoti Darvino aprašytą evoliucijos procesą *in vitro*. 2018 – aisiais metais Nobelio premiją pelniusio metodo privalumas tas, jog kuriant mutantus nėra būtina žinoti fermento sekos, struktūros išsidėstymo ar katalizinio centro veikimo mechanizmo (Xiong ir kt., 2021). Išskiriami du pagrindiniai kryptingosios evoliucijos žingsniai. Pirmasis - atsitiktinių mutantinių fermentų bibliotekos generavimas, pasitelkiant klaidingajį PGR (angl. error-prone PCR) ir homologinės rekombinacijos metodus. Antrasis – selektyvi atranka iš didžiulio kiekio mutantų, kuri dažniausiai atliekama naudojant aukšto našumo skaitmeninį vaizdavimą ant kietos fazės, filamentinius fagus ar ląstelių rūšiavimą fluorescencijos pagalba. Pagrindinis kryptingosios evoliucijos trūkumas susijęs būtent su selektyvios atrankos metodais, kadangi dažniausiai reikia išanalizuoti milžiniškas mutantų bibliotekas, o tai išeikvoja nemažas laiko sąnaudas. Tad stengiamas ieškoti būdų, kaip procesus automatizuoti ir greičiau išnagrinėti statistiškai reikšmingas modifikacijas (Kapoor ir kt., 2017). Kryptingosios evoliucijos taikiniai šiuo metu yra ne tik baltymai ir fermentai, tačiau ir metaboliniai keliai, genomai (Cobb ir kt., 2013).

1.1.2. Racionalusis modeliavimas

Kitam baltymų inžinerijos būdui – racionaliajam modeliavimui – jau reikalinga informacija apie fermento aminorūgščių seką, trimatę struktūrą ir atliekamą funkciją. Dar 9-ajame dešimtmetyje išvystyta technika remiasi taikiniui specifine mutageneze (Lutz & Iamurri, 2018). Visų pirma, sukuriamas grafinis ir matematinis fermento erdvinės struktūros modelis ir vertinamos aminorūgščių pozicijos bei kokias funkcijas jos atlieka. Analizės rezultatai parodo, kurias aminorūgštis į kokias keisti, norint išgauti pageidaujamą fermento savybę. Tuomet sukuriami pradmenys su norima įvesti mutacija, vykdomas PGR ir mutantiniai fermentai išgryninami, kad būtų patikrinama, ar pavyko įgyvendinti norimą tikslą (Kapoor ir kt., 2017). Jeigu siekiamos savybės išgauti nepavyko, analizė ir eksperimentai kartojami, kas gali užimti laiko. Taip pat, nors algoritmai, kurių pagalba konstruojami baltymų modeliai yra labai patobulėję, dažnu atveju jiems trūksta tikslumo. Dirbtinio intelekto sukurtas struktūras galima lyginti su išgautomis rentgeno struktūrinės analizės ar krio-elektroninės mikroskopijos metu, tačiau jas nustatyti pavyksta ne visiems baltymams. Tai rodo, kad racionalusis modeliavimas gali būti taikomas tik daliai baltyminės kilmės medžiagų (Dinmukhamed ir kt., 2021).

1.1.3. Pusiau racionalusis modeliavimas

Kaip jau minėta, kryptingosios evoliucijos pagrindinė problema yra milžiniškos mutantų bibliotekos, kurių patikrai reikia daug laiko resursų, o racionalusis modeliavimas reikalauja ypač tikslios fermento struktūros, ką gauti kai kuriais atvejais irgi gali būti sudėtinga. Abiejų šių metodikų kombinacija leido sukurti pusiau racionalųjį modeliavimą (Dinmukhamed ir kt., 2021). Jo metu pasirenkamas konservatyvus fermento sekos regionas, kaip, pavyzdžiui, aktyvusis centras ar substrato surišimo vieta, ir soties mutagenezės pagalba įvedamos visos galimos aminorūgštys toje pozicijoje. Tokiu būdu generuojamos mažesnės ir tikslesnės mutantų bibliotekos, jų atrankai vykdyti reikia mažiau laiko (Kapoor ir kt., 2017; Xiong ir kt., 2021). Šiomis dienomis pusiau racionalusis modeliavimas vykdomas remiantis arba fermento seka, arba struktūra. Pirmuoju atveju siekiama nustatyti svarbiausias konservatyviąsias liekanas naudojant homologinių baltymų daugybinius sekų palyginius. Antruoju atveju atliekamas molekulinis dokinimas su substratu taip atrandant "karštuosius taškus" – radikalines grupes, atsakingas už sąveikas tarp fermento ir substrato ar kofaktoriaus (Xiong ir kt., 2021). 1 pav. galima matyti glaustą baltymų inžinerijos metodų palyginimų schemą.



1 pav. Baltymų inžinerijos metodų palyginimas Parengta pagal Pongsupasa ir kt., 2022

1.1.4. Baltymų inžinerija sukurtų baltymų pavyzdžiai

Dėl didelių reakcijos greičių ir produktų kiekių, būdingo specifiškumo bei veikimo švelniomis aplinkos sąlygomis, biologinės kilmės katalizatoriai užima svarbią vietą įvairiose pramonės srityse. Nepaisant visų privalumų ir augančio susidomėjimo, kur pritaikyti konkretų fermentą, dažnai laukinio tipo fermentai neturi visų reikalingų savybių, kad industrinis procesas vyktų tinkamai. Baltymų inžinerijos strategijų proveržis suteikė galimybes ieškoti sprendimų šiai problemai, leisdamas tobulinti biologinius katalizatorius (Victorino Da Silva Amatto ir kt., 2022).

Ksilanazės plačiai naudojamos gyvulių pašaro ir maisto priedų gamyboje. Mokslininkai pakeitė 1,4-β-ksilanazės iš T. reesei organizmo 2-osios ir 28-osios pozicijos treoninus į cisteinus. Šios mutacijos padidino fermento termostabilumą – nuo 20 s iki 20 min 65 °C temperatūroje ir nuo 10 s iki 6 min 70 °C temperatūroje (Fenel ir kt., 2004). Maisto pramonėje išbandomos inžinerinės transglutaminazės, β-amilazės, kurioms taip pat reikalingas stabilumas aukštose temperatūrose. Taikant kryptingąją evoliuciją pavyko išgauti aktyvią β-amilazės formą 70 °C temperatūroje (Zhou ir kt., 2015). Mutantiniai fermentai paklausūs ir farmacijos srityje – vaisto nuo II tipo diabeto sitagliptino sintezėje panaudota R-selektyvi transaminazė, atrinkta po kryptingosios evoliucijos, gebėjo asimetriškai amininti prositagliptino ketona iki sitagliptino siekiant 99,95 % enantiomerini grynuma (Savile ir kt., 2010). Racionaliojo modeliavimo metu gauta monoamino oksidazė, reikalinga vaisto nuo hepatito C bocepreviro sintezei, padidino proceso išeigą 150 % (Li ir kt., 2012). Biologinės taršos mažinimo kontekste pasižymėjo cianido hidratazės ir cianido dihidratazės, naudojamos industrinių vandenų valyme nuo užteršimo cianidais. Pastarieji randami ypač šarminiame pH (>11), kuris riboja laukinio tipo fermentų veikimą. Klaidingojo PGR ir aukšto našumo atrankos metodais išskirti du mutantai -C5 (Q86R, E96G, D254E) ir H7 (E35K, 322R, E327G) – galintys hidrolizuoti cianidą terpėje esant aukštai pH vertei (Crum ir kt., 2016). Be minėtų pramonės šakų, inžineriniai fermentai pritaikomi ir biodyzelino, detergentų, dažų gamyboje (Victorino Da Silva Amatto ir kt., 2022).

1.1.5. Inžinerinės citidino deaminazės

Vienas iš inžinerinės citidino deaminazės (CDA) pavyzdžių, deamininančios pavienius nukleozidus, yra 2022 metais paskelbtas Burke et. al tyrimas, kurio metu sukurta modifikuota citidino deaminazė, skirta vaisto nuo COVID-19 – molnupiraviro - sintezei. Įprastai šio vaisto kūrimas susideda iš 10 cheminių reakcijų, o produkto galutinė išeiga dažnu atveju siekia mažiau nei 10 %. N-hidroksi grupės prijungimas kelia daugiausiai keblumų molnupiraviro sintezėje, kadangi šiam etapui reikia aukštos temperatūros, blokavimo/deblokavimo žingsnių (Ahlqvist ir kt., 2021). Mokslininkus sudomino jau seniau pastebėtas *E.coli* CDA gebėjimas deamininti N^4 -hidroksicitidiną iki uridino (Trimble & Maley, 1971). Nors aptiktas aktyvumas ir nebuvo didelis, tačiau tai leido daryti išvadą, kad pakeitus atitinkamas sąlygas galėtų vykti atvirkštinė reakcija. Pusiau racionaliojo modeliavimo pagalba identifikuotos septynių, aplink fermento aktyvųjį centrą išsidėsčiusių, aminorūgščių mutacijos, leidusios sukurti inžinerinę CDA, kuri gali citidiną paversti N^4 -hidroksicitidinu terpėje esant net nedideliam kiekiui NH₂OH. Šis atradimas palengvina molnupiraviro sintezę - reakcijos optimizacijos rezultatai parodė, jog N^4 -hidroksicitidinas iš citidino gaunamas per kiek mažiau nei 3 val. panaudojant 0,001 mol išgryninto mutantinio fermento, o reakcijos išeiga ir produkto grynumas siekia atitinkamai 85 % ir 98 % (2 pav.) (Burke ir kt., 2022).



2 pav. *N*-hidroksicitidino sintezė iš citidino, pasitelkiant inžinerinę CDA. Parengta pagal Burke ir kt., 2022

Citarabinas (AraC) yra citidino nukleozido analogas, taikomas gydant ūminę mieloidinę leukemiją (AML) ir žmogaus CDA (hCDA) substratas. Ląstelių mėginiai iš AML pacientų parodė ryšį tarp hCDA koncentracijos kraujyje ir AraC veiksmingumo – tiriamieji, kuriems pastebėta didelė hCDA raiška, yra atsparūs gydymui šiuo vaistu. Savo ruožtu kaulų čiulpų ląstelėse aptiktas nedidelis hCDA aktyvumas nulemia AraC hematopoetinį toksiškumą, galintį sukelti gyvybei pavojingą mielosupresiją (Nygaard & Sundström, 1987). Kad būtų išvengiama atsparumo gydymui, dažnai AraC paskiriamas kartu su hCDA slopikliais, tokiais kaip zebularinas, tetrahidrouridinas, diazepinono ribozidas (Lalibert□ ir kt., 1992). Tandeminė hematopoetinių kamieninių ląstelių transplantacija ir kombinuotoji zebularino ir AraC chemoterapija turėtų užtikrinti vėžinių audinių žūtį, tačiau dažnu atveju pasireiškia citotoksiškumu dėl per didelės AraC koncentracijos (Lachmann ir kt., 2013). Pasitelkę kryptingąją evoliuciją ir pritaikę kelis jos raundus, mokslininkai sukūrė mutantinius, zebularinui atsparius, bet aktyvius prieš AraC hCDA variantus, su 8-15 aminorūgščių pakeitimais atvirame skaitymo rėmelyje. Šių unikalių inžinerinių hCDA sukūrimas ir jų panaudojimas kartu su genetiškai modifikuotų hematopoetinių kamieninių ląstelių transplantacija yra naujas būdas išvengti agresyvių padarinių sveikatai gydant AML (Ruan ir kt., 2016).

Kiek kitokių inžinerinių CDA pavydžių galima sutikti kalbant apie APOBEC šeimos deaminazes (plačiau apie jas – 1.4.3. skyriuje). Daugumą genetinių ligų sukelia atsitiktiniai vieno nukleotido polimorfizmai. Dabartinės genomo redagavimo technologijos įveda dvigubus trūkius taikinio DNR grandinėje, o dažniausias lastelės atsakas i šias pažaidas yra atsitiktinės delecijos ar insercijos dėl nehomologinio galų sujungimo (Yang ir kt., 2016). Tad nors mokslininkams ir pavyko atrasti būdų, kaip padidinti homologinės rekombinacijos našumą prieš nehomologinių galų sujungimą, vis dėlto, šios strategijos dar nėra pakankamai veiksmingos norint ištaisyti taškines mutacijas (Ran ir kt., 2013). Susidomėjimą sukėlė APOBEC šeimos fermentų vykdomas citozino deamininimas DNR grandinėje iki uracilo, kuris, jeigu prieš replikacija nėra sutvarkomas reparacijos mašinerijos, replikacijos metu laikomas timinu ir įvyksta bazių porų konversija iš C:G į T:A [21]. Dėl šios priežasties, APOBEC deaminazės turi potencialo būti genomo modifikavimo įrankiais jų efektyvumą išbandant konstruojant liejinius su redaguojančiomis nukleazėmis (Yang ir kt., 2016). Vienas pirmųjų tokių įrankių sukurtas prie pelės APOBEC1 prijungus katalitiškai neaktyvų Cas9 baltymą ir uracilo glikozilazės slopiklį, kad būtų išvengta bazių ekscizijos reparacijos. Rezultatai parodė, jog šis įrankis ištaiso nuo 15 % iki 75 % taikiniu, kuriuose yra citozinas su mažesne nei 1 % inserciju ar deleciju tikimybe (Komor ir kt., 2016). Kitai mokslininku grupei pavyko patobulinti šią sistemą, įvedus tris taškines mutacijas APOBEC1 gene - W90Y, R126E ir R132E. Trigubas mutantas išlaikė aktyvumą, tačiau redaguojamo regiono, dar kitaip vadinamo lango, ilgis sumažėjo nuo 5 nt iki 1-2 nt, kas leidžia pasiekti didesnį tikslumą (Kim ir kt., 2017). APOBEC šeimos deaminazės gali būti suliejamos ir su cinko pirštais ar TALE transkripcijos faktoriais, o tokie konstruktai gali būti panaudojami tiek eukariotuose, tiek prokariotuose - redagavimo efektyvumas E.coli ląstelėse siekė 13 %, žmogaus ląstelėse - 2,5 % panaudojus minėtas sistemas (Yang ir kt., 2016).

1.2. Fermentų aktyvumo įvairovė

Fermentai domina tyrėjus nuo pačių pirmųjų atradimo dienų – išskirtinė baltyminės kilmės medžiagų grupė spartina bene visas gyvajame pasaulyje vykstančias chemines reakcijas. Nors įprastai fermentai laikomi kaip ypač specifiški substratui ir reakcijai, dauguma jų per paskutiniuosius du dešimtmečius pradeda keisti pastarąją sampratą (Gupta, 2016). Pasirodo, kad gamtoje jie gali būti saviti keletui ar net keliasdešimčiai nekanoninių substratų ir katalizuoti nebūdingus virsmus (Copley, 2017). Lietuvių kalboje dar nėra įvesta tinkama sąvoka šiai savybei įvardinti, tačiau tolimesniuose skyreliuose ji bus vadinama fermentų daugialypiu aktyvumu, remiantis anglų kalbos atitikmeniu "enzyme promiscuity" (Hult & Berglund, 2007).

1.2.1. Fermentų daugialypio aktyvumo skirstymas

Mokslinėje literatūroje jau galima rasti nemažai straipsnių, pristatančių ir apibendrinančių, kas tai yra fermentų daugialypis aktyvumas. Ganėtinai naujos enzimologijos mokslo srities pavyzdžių galima sutikti dar XX amžiaus pradžioje, kuomet netipiniai aktyvumai pastebėti tiriant maltazę, kiaulės kasos lipazę ir piruvato dekarboksilazę (Hult & Berglund, 2007). Šis fenomenas dažniausiai apibūdinamas kaip fermento gebėjimas vykdyti funkciją, kurios jis neturėtų atlikti, tačiau tuo pačiu tai laikoma ir pranašiu evoliuciniu požymiu, leidžiančiu atsirasti naujiems biologiniams katalizatoriams. Nors dažnai toks antrinis fermento aktyvumas yra mažiau efektyvus nei pirminis, pastebima, kad netipinių reakcijų katalizinių efektyvumo konstantų vertės (k_{cat}/K_M) gali siekti 10⁵ M⁻¹ s⁻¹, o greičiai ((k_{cat}/K_M)/ k_2) net 10¹⁸, kas yra palyginama su įprastai vykstančių reakcijų konstantomis (Babtie ir kt., 2010). Reikia pabrėžti, kad fermentų daugialypis aktyvumas gali būti ne tik natūralus, bet ir praplėstas dirbtinai, taikant įvairius baltymų inžinerijos metodus.

Fermentų daugialypis aktyvumas klasifikuojamas į tris pagrindines grupes – sąlygų, substratinį ir katalizinį. Pirmai grupei priskiriami fermentai, gebantys katalizuoti reakcijas esant nenatūralioms sąlygoms, kaip, pavyzdžiui, bevandenei aplinkai, ekstremalioms temperatūroms ar pH. Daugialypiu substratiniu aktyvumu pasižymi biologiniai katalizatoriai, galintys tą patį cheminį virsmą vykdyti su įvairiais substratais – tai būdinga plataus substratinio specifiškumo fermentams. Trečios grupės fermentų aktyvieji centrai gali greitinti visiškai skirtingas reakcijas, su tarpusavyje nepanašiomis pereinamosiomis būsenomis. Mišrus katalizinis aktyvumas dar gali būti atsitiktinis, kuomet šalutinę reakciją atlieka laukinio tipo fermentas, arba sukeltas, kai naujas aktyvumas atsiranda dėl įvestos vienos ar kelių mutacijų baltymo gene (Hult & Berglund, 2007).

1.2.2. Daugialypis sąlygų aktyvumas

Fermento aktyvumas, keičiant įprastas sąlygas, tikrintas dar 1930 metais, kai panaudojus kiaulės kepenų ir kasos lipazes bandyta organiniuose tirpikliuose atskirti chiralinius alkoholius ir esterius (Hult & Berglund, 2007). Tarp šių dienų pavydžių galima sutikti sausos formos fermentų imobilizavimą ant kietų paviršių bioreaktoriuose, leidžiant dujinės fazės substratą. Tokiose sistemose galima operatyviai reguliuoti termodinaminį aktyvumą, o tai įgalina efektyvią komercinę esterių sintezę pasitelkus lipazes (Lamare ir kt., 2004). Pastarieji fermentai nėra vieninteliai, galintys toleruoti pasikeitusią aplinką – tai galima pasiekti ir mutuojant natyvaus fermento struktūrą. XX amžiaus paskutiniajame dešimtmetyje analizuota serino proteazė subtilizinas E, įprastai veikianti tik vandeninėje aplinkoje. Pritaikius tris kryptingosios evoliucijos ciklus įvyko dešimties aminorūgščių pasikeitimai, kurie nulėmė 256 kartus didesnį subtilizino E aktyvumą organiniame tirpiklyje DMF už laukinio tipo fermento aktyvumą. Susidariusios naujos sąveikos gali pasitarnauti kaip šablonas ieškant potencialių mutacijos vietų kitiems fermentams, kurių modifikacijos leistų juos geriau panaudoti pramonės srityje (Chen & Arnold, 1993).

1.2.3. Daugialypis substratinis aktyvumas

Šiuo metu vyrauja dvi nuomonės apie daugialypio substratinio aktyvumo sąvokos pritaikymą atitinkamam fermentui. Vieni linkę fermentui priskirti daugialypio substratinio aktyvumo savybę, jeigu vykdoma reakcija yra fiziologiškai nereikšminga – tarkime, egzistuoja kitas fermentas, gebantis efektyviau tą patį substratą paversti produktu. Pavyzdžiui, *E.coli* γ-glutamilfosfato reduktazė (ProA)

gali katalizuoti N-acetilglutamilfosfato redukcija, nors organizmas ir turi šiai reakcijai specializuota fermentą – N-acetil-gama-glutamilfosfato reduktazę (ArgC). ProA vykdoma redukcija lėtesnė, be to, pastarasis fermentas negali kompensuoti ArgC praradimo (Copley, 2017). Vis dėlto daugelis, kaip jau minėta, daugialypį substratinį aktyvumą priskiria fermentams, kurie turi plačius modifikuojamų substratų spektrus. Tai dažniausiai būdinga detoksikacijos procesuose dalyvaujantiems fermentams, kaip glutationo-S-transferazei ar citochromui P450, kurie privalo sugebėti apsaugoti organizmą nuo nenuspėjamų toksinų. Plataus specifiškumo esterazės, amidazės ar fosfatazės naudingos ir mikroorganizmams, kuomet hidrolizuojant gamtoje sutinkamas medžiagas galima išgauti augimui būtino amoniako ar fosfatų (Copley, 2015). Substratinio specifiškumo keitimas yra populiarus fermentų aktyvumo tyrimų taikinys. Įprastai lipazės, kurios hidrolizuoja didelę įvairovę esterių, nėra enantioselektyvios, o tai neleidžia atskirti raceminių rūgščių mišinių. Pasitelkus atsitiktinę mutagenezę mokslininkams pavyko išgauti lipazę, kuri tapo 51 kartą specifiškesnė S-enantiomerui (Hult & Berglund, 2007). Drosophila melanogaster deoksiribonukleozido kinazė taip pat žinoma dėl savo plataus substratinio specifiškumo - ji gali fosforilinti visus keturis deoksiribonukleozidus. Struktūrinis palyginimas su žmogaus deoksiguanozino kinaze leido identifikuoti aminorūgščių liekanas, atsakingas už specifiškumą. Įvestos mutacijos tose pozicijose sukūrė deoksiribonukleozido kinazę, savitą tik purinams (Jestin & Vichier-Guerre, 2005).

1.2.4. Daugialypis katalizinis aktyvumas

Daugialypis katalizinis aktyvumas apibūdina fermentus, katalizuojančius chemiškai skirtingus virsmus. Pastarieji gali skirtis pagal dalyvaujančią funkcinę grupę, t. y. reakcijos metu susidariusio ar nutrūkusio ryšio tipą, ir/arba skirtis pagal katalizinį mechanizmą arba ryšio susidarymo ir nutrūkimo kelią. Dauguma atvejų stebimi abu požymiai. Klasikinis tokio fermento pavyzdys – mielių piruvato karboksilazė, kuri gali ne tik dekarboksilinti piruvatą, bet ir dėka liazės aktyvumo sujungti acetal-dehidą ir benzaldehidą, o susidaręs (R)-fenilacetilkarbinolis yra efedrino sintezės prekursorius. Ši kondensacija apima papildomą etapą – C-C ryšio susidarymą, kuris natūralioje reakcijoje nevyksta (Bornscheuer & Kazlauskas, 2004). Daugialypiu kataliziniu aktyvumu pasižymi ir chimotripsinas. Jis hidrolizuoja amidus, esterius, tiolių esterius, rūgščių chloridus bei anhidridus ir aktyviajame centre dar vykdo amidazės ir fosfotriesterazės reakcijas. Savo ruožtu receptorinė baltymų tirozino fosfatazė, kuri skaido fosfomonoesterinius ryšius, gali, nors ir nedideliu kataliziniu efektyvumu, hidrolizuoti glikozidinius ryšius (Kreis & Munkert, 2019). Daugialypis katalizinis aktyvumas gali atsirasti ir laukinio tipo fermentuose įvedus vieną ar keletą mutacijų. Riebiųjų rūgščių desaturazės sekoje atlikus keturių aminorūgščių pakeitimus gauta enantioselektyvi hidroksilazė (Broun ir kt., 1998). Kitai moks-lininkų komandai pavyko *Geobacillus stearothermophilus* nuo PLP-priklausomą racemazę paversti į

aldolazę, kuomet 265 pozicijos tirozinas pakeistas į alaniną. Lyginant su laukinio tipo fermentu, mutacija 3×10^3 kartų sumažino racemazinį aktyvumą ir 2×10^5 kartų padidino retroaldolinį aktyvumą su D-fenilserinu (Seebeck & Hilvert, 2003). Akivaizdu, kad tiek atsitiktinis, tiek sukeltas daugialypis katalizinis aktyvumas, suteikia puikias galimybes kurti ir vystyti stabilius fermentus su naujomis katalizinėmis funkcijomis, kas leistų praplėsti fermentų pritaikymą šių dienų pramonėje (Hult & Berglund, 2007).

1.2.5. Daugialypio aktyvumo priežastys

Vienas iš pagrindinių klausimų, kurį kelia daugialypio aktyvumo apraiškos gamtoje, yra, kaip tas pats aktyvusis centras ir ta pati katalizinė mašinerija gali būti specifiški natyviam substratui, bet taip pat katalizuoti ir tarpusavyje visiškai nesusijusias reakcijas. Vis dėlto, mokslininkams pavyko išskirti keletą esminių tokio reiškinio priežasčių. Visų pirma, nepaisant to, jog rentgeno spindulių kristalografijos metu gaunami struktūrų vaizdai daro įspūdį, jog fermentai yra ypač fiksuoti erdvėje, realioje aplinkoje aktyvieji centrai ir baltyminiai karkasai yra nepaprastai judrūs. Substrato surišimo kilpų mobilumas dažniausiai nulemia aktyviojo centro konformacinius skirtumus tarp natyvios ir nebūdingos reakcijų, kas įgalina daugialypio aktyvumo atsiradimą. Įtakos šiam reiškiniui turi ir sudaromas nevienodas vandenilinių ryšių tinklas. D-2-keto-3-deoksiglukonato aldolazė panašiu greičiu gali vykdyti reakciją tiek su D-2-keto-3-deoksiglukonatu, tiek su D-2-keto-3-deoksigalaktonatu. Mechanizmas su abiem substratais yra panašus – Šifo bazės susidarymas, po to sekanti hidratacija ir skilimas, tačiau skiriasi D-2-keto-3-deoksiglukonato aldolazės aktyviojo centro aminorūgščių sukuriami ryšiai su 5' ir 6' hidroksilo grupėmis (Khersonsky & Tawfik, s.a.). Skirtis gali ne tik vandeniliniai ryšiai, bet ir tai, kurios aminorūgštys dalyvauja katalizės procese. Serumo paraoksonazė PON1, dar žinoma kaip žinduolių laktonazė, gali elgtis ir kaip esterazė, ir kaip fosfotriesterazė. Nustatyta, jog laktonų ir esterių hidrolizę vykdo His115-His134 diada, o fosfotriesterazinį aktyvumą nulemia nukleofilinė Asp269 ataka. Candida antarctica lipazės B (CAL-B) natyvus aktyvumas – lipidų hidrolizė – katalizuojamas Ser105-His224-Asp187 katalitinės triados, tačiau fermento sudaromas oksianijoninis plyšys gali pasitarnauti ir vykdant Michaelio prijungimą ar aldolines kondensacijas. Šiose reakcijose Ser105 jau neatlieka jokio vaidmens ir rūgšties-bazės pernaša atliekama per His224-Asp187 sąjungą. Daugialypio aktyvumo atsiradimą taip pat gali nulemti kofaktorių keitimas. Farnezilo difosfato sintazė, pagrindinis izoprenoidu biosintezės fermentas, generuoja farnezilo difosfatą terpėje esant Mg²⁺ jonams, tačiau pakeitus juos į Co²⁺ sintetinamas geranilo difosfatas (Gupta, 2016). Kai kuriems hidrolaziu klasės fermentams pridėjus vario jonu atsirado oksidazinis aktyvumas, o karboninės anhidrazės aktyviajame centre esantį Zn²⁺ pakeitus į Mn²⁺ fermentas pradėjo vykdyti stireno epoksidaciją. Manoma, kad reikšmės netipinių reakcijų eigai turi ir vandens molekulių formuojami vandenilinių ryšių tilteliai tarp substrato ir aktyviojo centro. Nors pavyzdžių apie pastarajį veikimą nėra daug,

tačiau vandens efektą gerai iliustruoja *Bacillus subtilis* esterazė, galinti hidrolizuoti ne tik esterius, bet ir amidus. Molekulinės dinamikos rezultatai parodė, jog fermentas amidus hidrolizuoja susidarant vandenilinių ryšių tinklui, kuris nėra būdingas esterių hidrolizės metu (Khersonsky & Tawfik, s.a.).

1.3. dCTP deaminazė

Vienas iš dTTP sintezės kelių yra timidilato sintazės vykdoma dUMP redukcija iki dTMP. Ląstelėje dUMP kiekis gali būti užtikrinamas dviem būdais. Pirmuoju atveju, ribonukleotido reduktazė redukuoja UDP iki dUDP, kuris vėliau fosforilinamas iki dUTP ir hidrolizuojamas iki dUMP. Vis dėlto, didžioji dalis pastarojo substrato gaunama deamininant deoksicitidino nukleotidus (Johansson ir kt., 2007). Gram-teigiamose bakterijose ir eukariotuose randama nuo cinko jono priklausanti dCMP deaminazė deaminina dCMP iki dUMP. Gram-neigiamose bakterijose, tarp jų ir *E.coli*, dUMP gaunamas per dvi stadijas – iš pradžių veikiant dCTP deaminazei dCTP virsta dUTP, o šį dUTPazė hidrolizuoja iki dUMP ir pirofosfato. *E.coli* dCTP deaminazė (Dcd; EC 3.5.4.13) yra homotrimerinės struktūros fermentas, priklausantis hidrolazių klasei. Šio fermento vykdomai deamininimo reakcijai nereikalingas metalo jonas, nors daugumos kitų deaminazių katalizei būtinas Zn²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ ar kitas kofaktorius (Johansson ir kt., 2005). Neseniai archėjoje *Methanocaldococcus jannaschii* identifikuota bifunkcinė Dcd, kurios polipeptidas koduoja ir Dcd, ir dUTPazės aktyvumus (Thymark ir kt., 2008a).

1.3.1. dCTP deaminazės struktūra ir veikimo mechanizmas

Dcd subvienetą sudaro 193 aminorūgštys, kurio molekulinė masė apie 21,2 kDa. Struktūrinės analizės rezultatai parodė, jog tikrasis fermento substratas yra dCTP-Mg²⁺, kur magnio jonai, kaip manoma, reikalingi fosfatų stabilizacijai. Vienas subvienetas formuojamas iš keturiolikos β -gijų, trijų α -spiralių ir keturių 3¹⁰ spiralių, o susijungiant trims subvienetams gaunamas kompaktiškas trimerinis baltymas. Monofunkcinės ir bifunkcinės Dcd yra struktūriškai panašios į trimerines dUTPazes ir priklauso tai pačiai superšeimai (Johansson ir kt., 2007).

Magnio jonas oktaedriškai koordinuojamas nukleotido α , β ir γ -fosfatų bei trijų vandens molekulių. Teigiamas Mg²⁺ krūvis neutralizuoja neigiamai įkrautas fosfatines grupes, o tai leidžia fermento C-galo klostei uždengti dCTP-Mg²⁺, taip įgalinant pilną aktyviojo centro susidarymą. Nukleotido prisijungimo vieta yra tarp dviejų subvienetų, tad homotrimeras formuoja tris aktyviuosius centrus. Ryšius su fosfatinėmis grupėmis dar sudaro Arg126 ir Ser111 (α -fosfatu), Ser112 ir Arg110 (β fosfatu), Lys178 ir Tyr171 (γ -fosfatu). Su substrato nukleobaze sąveikauja Gln182, Arg115, Val136, o vandenilinius ryšius su deoksiribozės 3'-OH grupe sudaro Asp128. dCTP atskyrimui nuo CTP svarbus Trp131, kurio didelė hidrofobinė šoninė grupė nepalieka vietos CTP 2'-OH grupei (Johansson ir kt., 2005). Laukinio tipo Dcd kompleksas su dUTP ir neaktyvaus mutantinio baltymo su Glu138Ala mutacija kompleksas su dUTP ir dCTP atskleidė, kad aktyviajame centre randama dinamiška 120125 pozicijų aminorūgščių kilpa. Iki šiol sukonstruoti fermentai su His121Ala ir Val122Gly mutacijomis, kurios nors inaktyvavo fermentą, tačiau parodė įvairius konformacijų bei atstumų pasikeitimus ir leido patvirtinti 120-125 aminorūgščių kilpos mobilumą. Tyrimo metu nebuvo nagrinėtas mutantinių fermentų likutinis aktyvumas su modifikuotais nukleotidais, o detalesnė pastarųjų aminorūgščių analizė leistų įvertinti, ar įmanoma keisti Dcd substratinį specifiškumą (Johansson ir kt., 2007).

Dcd katalizės metu dCTP pirimidino žiedą aktyviajame centre palaiko sudaromi vandeniliniai ryšiai su Val136 ir Gln182. Glu138 iš vandens molekulės H₂O(5) atplėšia protoną taip susiformuojant hidroksido jonui, kuris tuomet atakuoja 4-oje pozicijoje esančią anglį pirimidino žiede. Susidaro tetraedrinis reakcijos tarpininkas, o atakuojamos vietos aminogrupė prisijungia protoną iš vandens molekulės H₂O(251) ir atskyla amoniakas. Jis patenka į hidrofobinę kišenę, apsuptą Leu107, Ile127 ir Leu158 šoninių grupių. Šios aminorūgštys randamos priešingoje pirimidino žiedo pusėje atakuojančios H₂O(5) molekulės atžvilgiu (3 pav.) (Johansson ir kt., 2005; Thymark ir kt., 2008b).



3 pav. E.coli dCTP deaminazės katalizės mechanizmas (Thymark ir kt., 2008a)

1.3.2. dCTP deaminazės reikšmė

Jau minėta, kad gamtoje Dcd atsakinga už nukleotidų balanso ląstelėje palaikymą – ji yra viena iš esminių dalyvių dTTP sintezės kelyje. Deoksinukleotidų trifosfatų (dNTP) pusiausvyrą svarbu palaikyti norint užtikrinti replikacijos tikslumą, o sutrikęs santykis gali privesti prie padidėjusio mutacijų dažnio. Pastebėta, kad Dcd geno išveiklinimas lemia dCTP kaupimąsi bei dTTP kiekio sumažėjimą *E.coli* ląstelėse, dėl ko jos tampa jautrios išoriškai teikiamiems citozinui, adenozinui bei guanozinui (Kang ir kt., 2014). Be to, nustatyta, jog nukleotidų trifosfatų disbalansas ląstelėje slopina ribonukleotido reduktazės aktyvumą ir taip sutrikdomi abu dTTP sintezės keliai (Hofer ir kt., 2012). Dcd neturintys mutantai taip pat pasižymi padidėjusiu jautrumu antibiotikui vankomicinui – glikopeptidui, kuris įprastai negali prasiskverbti pro Gram-neigiamų bakterijų išorinę membraną. dTTP pridėjimas sugražina atsparumą šiam antibiotikui, tad įdomu, kas sąlygoja tokį aktyvumą. Viena iš teorijų teigia, jog dCTP koncentracijos padidėjimas sukelia nepataisomus chromosomų pažeidimus, kurie veikdami sinergistiškai, padeda patekti vankomicinui į ląstelę (Kang ir kt., 2014). Vankomicinas yra bakteriocidinis antibiotikas, kuris, kaip manoma, sukuria hidroksilo radikalus ir bakterija sunaikinama dėl padarytos žalos jos DNR (Kohanski ir kt., 2007). Kita teorija susieja dCTP perteklių su metaboliniu disbalansu, galintį turėti įtakos išorinės membranos struktūros pokyčiams. Pastebėta, jog Dcd neturinčių mutantų fenotipas panašus į mutantų su išveiklintu SurA genu. SurA yra svarbus šaperonas, be kurio tinkamai nesusidarytų β-statinės struktūros baltymai išorinėje membranoje (Kang ir kt., 2014). Dcd aktyvumas svarbus ir bakterijų apsaugos nuo bakteriofagų susidaryme. Ilgą laiką restrikcijos modifikacijos ir CRISPR-Cas sistemos laikytos svarbiausiomis apsauginėmis priemonėmis prieš bakteriofagų sukeltas infekcijas. Vis dėlto, per pastaruosius metus paaiškėjo aibė kitų būdų, kuriais bakterijos užtikrina savo imuniteto veiksnumą. Vienas iš jų yra Dcd suaktyvėjimas įvykus infekcijai. Išanalizavus keleto E.coli kamienų ląstelių ekstraktus po T7 fago infekcijos skysčių chromatografijos ir masių spektrofotomerijos pagalba, pastebėtas beveik visiškas dCTP nebuvimas ir žymus dUMP kiekio padidėjimas. dCTP trūkumas sutrikdo fago replikacijos procesą, dėl ko jis nebegali tinkamai pasidauginti ir infekuoti kitų ląstelių (Tal ir kt., 2022).

1.4. Citidino deaminazės

CDA (EC 3.5.4.5), dar žinomos kaip citidino aminohidrolazės, atsakingos už citidino ar 2[•]deoksicitidino pavertimą atitinkamai į uridiną ar 2[•]-deoksiuridiną. Šis fermentas priklauso citidino ir deoksicitidilato deaminazių šeimai, kurių veikimui reikalingas cinko jonas (Frances & Cordelier, 2020). Svarbiausia beveik visuose organizmuose randama fermento funkcija yra jo dalyvavimas pirimidinų kiekio ląstelėje atstatyme, kadangi *de novo* pirimidino nukleotidų sintezė yra energetiškai nenaudinga (Liu ir kt., 2019). Citidino deamininimas iki uridino ne tik prisideda prie nukleotidų balanso palaikymo DNR bei RNR sintezei, tačiau būtinas ir pirimidinų katabolizmui, kurio metu formuojamas β-alaninas (Frances & Cordelier, 2020).

1.4.1. Citidino deaminazių klasifikacija

Viena iš citidino deaminazių šeimų veikia pavienius nukleozidus, t.y., neįsiterpusius į DNR ar RNR grandinę. Ji dar gali būti išskirstyta struktūriškai į homodimerines (*E. coli, A. thaliana, K. pneu-moniae*) ir homotetramerines (*B. subtilis, H. sapiens, M. musculus*) CDA. Homodimerinių CDA monomero dydis yra apie 32 kDa, homotetramerinių CDA – apie 15 kDa, kas abejais atvejais sudaro 60-64 kDa dydžio baltymą (Moro-Bulnes ir kt., 2019). *E. coli* ir *B. subtilis* CDA palyginimas atskleidė esminį skirtumą tarp homodimerinių ir homotetramerinių CDA. 3D *E.coli* CDA struktūros modelis su pereinamosios būsenos analogu parodė, jog cinko joną koordinuoja His102, Cys129 ir Cys132, tuo tarpu *B.subtilis* cinko joną palaiko trys cisteino liekanos – Cys53, Cys86 ir Cys89 – kas įprastai

nėra būdinga hidroliziniams fermentams (Carlow ir kt., 1999). APOBEC/AID citidino deaminazių šeima – kita CDA superšeimos grupė, randama stuburiniuose gyvūnuose, o jų substratas – citidinas, esantis vgDNR ar RNR struktūroje. Imunoglobulinų brendime ar apsisaugojime nuo virusų dalyvaujantys fermentai savo struktūroje taip pat turi cinko joną, kuris dažniausiai sudaro ryšius su histidinu ir dviem cisteinais (Conticello, 2008).

1.4.2. Homodimerinės ir homotetramerinės CDA

E.coli CDA subvienetą sudaro trys domenai – nežinomos funkcijos N-galinis domenas, katalizinis domenas, kuriame prisijungęs cinko jonas ir C-galinis domenas, tretine struktūra primenantis katalizinį domeną. Toks dviejų domenų panašumas rodo galimą homodimerinių CDA evoliuciją iš homotetramerinių CDA dėl genų duplikacijos. Fermente randami du aktyvieji centrai, kadangi Cgalinis domenas neturi cinką koordinuojančių liekanų (Johansson ir kt., 2002). Aktyviajame centre išskiriamos trys aminorūgščių grupės – sąveikaujančios su pirimidino žiedu, riboze ir amoniaku. Aromatinių aminorūgščių Phe71, Tyr126 ir Phe165 liekanos sudaro stekingo ryšius su pirimidino žiedu 90° kampu, kas, manoma, turi įtakos ir baltymo stabilizavimui. Amoniako išsiskyrimui reikalingas Glu104, perduodantis protoną amino grupei bei Pro128, kuris apriboja amoniako išskyrimo erdvę ir palaiko tinkamą orientaciją aminorūgščių, sudarančių vandenilinius ryšius su pereinamosios būsenos tarpininko C4 atomo amino grupe. Ribozės žiedo 3'-OH grupę koordinuoja Asn89 ir Glu91, tačiau kas galėtų sąveikauti su 2'-OH ir 5'-OH grupėmis informacijos nėra (Carlow ir kt., 1999). Kita detaliau išnagrinėta homodimerinė CDA priklauso Klebsiella pneumoniae bakterijai. E.coli ir K. pneumoniae CDA struktūrų superimpozicija parodė didelį fermentų tarpusavio panašumą – nustatyta 0,8 Å RMSD vertė. Atlikus sekų palyginimą paaiškėjo, jog Glu104 ir cinką koordinuojantys His102, Cys129 ir Cys132 yra konservatyviosios aminorūgštys. Vis dėlto, skiriasi aminorūgštys, dalyvaujančios dimero formavimesi (Liu ir kt., 2019). Homodimerinių CDA deamininimo procese svarbūs jau minėtas Glu104, vandens molekulė ir cinko jonas (4 pav.). Dėl pastarųjų dviejų komponentų sąveikos įvyksta heterolitinė H₂O disociacija ir atskilusį protoną prisijungia Glu104 (E-A žingsniai). Ant cinko atomo susiformaves hidroksilo anijonas atakuoja citidino C4 atoma, o protonas nuo Glu104 pernešamas ant N3 atomo. Taip susidaro tetraedrinis reakcijos tarpininkas (B žingsnis), o protonas nuo hidroksilo anijono migruoja ant C4 atomo amino grupės – išsiskiria amoniakas ir uridinas (C-D žingsniai) (Matsubara ir kt., 2006). Šis reakcijos mechanizmas būdingas tiek homotetramerinėms, tiek APO-BEC/AID šeimos deaminazėms.



4 pav. Citidino deaminazės katalizuojamos reakcijos ciklas (Matsubara ir kt., 2006)

Homotetramerinės CDA yra plačiau paplitusios tarp skirtingų rūšių. Keturi B. subtilis CDA subvienetai struktūriškai panašūs į E.coli CDA katalizinius domenus. Su cinku sąveikaujančių trijų cisteinų sukuriamą neigiamą krūvį neutralizuoja a spiralių dipolių teigiami galai ir teigiamą krūvį turintis Arg56, sudarantis ryšius su Cys53 ir Cys89. Sąveika su slopikliu tetrahidrouridinu parodė, kurių aminorūgščių šoninės grupės dalyvauja ryšių su substratu sudaryme – tai Phe24 (E.coli Phe71), Val26, Asn42 (E. coli Asn89), Glu44 (E. coli Glu91), Phe125 ir Tyr48. Pastarosios aminorūgšties pagrindinės grandinės NH grupė sudaro vandenilinius ryšius su ribozės 5'-OH grupe. Kitose homotetramerinėse CDA šia pozicija užima fenilalaninas, o homodimerinėse CDA šis tirozinas išvis neaptinkamas. Su 3'-OH grupe sąveikauja Asn42 ir Glu44, o 2'-OH grupei aiškūs partneriai nėra identifikuoti. Katalizės procese kaip protono donoras/akceptorius veikia konservatyvusis Glu55 (E.coli Glu104) (Carlow ir kt., 1999; Johansson ir kt., 2002). Pirmoje žmogaus chromosomoje lokalizuotas hCDA genas, kurio raiška didžiausia kaulų čiulpuose, kepenyse, baltuosiuose kraujo kūneliuose. Kiekvienas iš keturių baltymo monomerų taip pat koordinuoja cinko joną, padedant Cys65, Cys99 ir Cys102, o substrato surišime dalyvauja Ala66, sąveikaujantis su pirimidino žiedo O2 atomu, Asn54 ir Glu56 – su ribozės 2'-OH grupe, ir Tyr60 – su ribozės 5'-OH grupe. Phe137 sukuria uridino išskyrimo kišenę, tuo tarpu konservatyviajam Glu67 atitenka esminis vaidmuo katalizės mechanizme (Costanzi ir kt., 2003). hCDA turi didelę fiziologinę reikšmę žmogaus organizmui. Istoriškai, ilgą laika CDA baltymo trūkumas sietas su Bloom sindromu – reta autosomine liga, sukeliančia genetinius sutrikimus, o pacientai, turintys šį sindromą, linkę į didesnę tikimybę susirgti vėžiu. Svarbus funkcinis hCDA aspektas yra gebėjimas deamininti sintetinius ar natūralius citidino analogus, taikomus vėžio gydyme. Jau nuo XX amžiaus septintojo dešimtmečio CDA koncentracijos stebėjimas yra reikšmingas žymuo analizuojant navikų chemorezistentiškumą (Frances & Cordelier, 2020). Kol kas plačiausiai naudojami tokių vaistų pavyzdžiai būtų gemcitabinas, azacitidinas, decitabinas, citarabinas – įvykus deamininimui jie paverčiami į neaktyvius metabolitus. Vis dėlto, preparato kapecitabino atveju stebimas atvirkščias efektas, kadangi jo veikimui reikia, kad jį hidrolizuotų CDA ir jis, sekančių virsmų pagalba, taptų 5-fluorouracilu (Serdjebi ir kt., 2015). Skirtinguose vėžiniuose navikuose esančios CDA koncentracijos labai varijuoja, tad į tai labai svarbu atsižvelgti norint parinkti tinkamiausią gydymą, o CDA koncentracijos stebėjimas galėtų tapti viena iš personalizuotos medicinos sričių (Mameri ir kt., 2017).

1.4.3. APOBEC/AID šeimos deaminazės

Pirmas identifikuotas ir charakterizuotas APOBEC/AID šeimos atstovas yra apolipoproteiną B modifikuojantis kompleksas 1 – APOBEC1 baltymas. Laikui bėgant nustatyta dar dešimt šiai šeimai priklausančių narių, o bendrinė visų baltymų struktūra primena kitų nuo cinko jono priklausomų deaminazių struktūrą. Pagal selektyvumą substratui APOBEC/AID fermentai dar skirstomi į "bendruosius specialistus" (angl. generalists), kurie deaminina DNR ir RNR citidinus, ir "specialistus" (angl. specialists), kurie deaminina tik į DNR įsiterpusį citidiną "Bendriesiems specialistams" priskiriami APOBEC1, APOBEC3A ir APOBEC3G fermentai, kurių vykdomai katalizei svarbios aromatinės aminorūgštys. Pastebėta, jog APOBEC3A Tyr130 pakeitimas į alaniną panaikino deaminazinį aktyvumą, o seku palyginys parodė, jog APOBEC1 toje pačioje pozicijoje turi fenilalaniną, o APOBEC3G - taip pat tiroziną. Už substrato atpažinimą atsakingas U formos substrato prisijungimo griovelis, sudarytas iš keturių kilpų, supančių aktyvų į centrą. APOBEC1 baltymo prisijungimo griovelyje labai svarbi Trp121 aminorūgštis, kadangi variantas su Trp121Ala mutacija prarado gebėjimą atpažinti RNR, tačiau išlaikė aktyvumą su DNR. Molekulinio dokinimo rezultatai atskleidė Trp121 sąveiką su ribozės 2'-OH grupe, o tai ir nulemia "bendrųjų specialistų" nespecifiškumą. "Specialistams" priklausančios AID deaminazės substrato atpažinimo griovys šakotos formos, tačiau konkrečios aminorūgštys, atsakingos už savitumą tik DNR, dar nėra nustatytos. Įdomu tai, jog nors AID baltymas ir nedeaminina RNR, tačiau gali šią molekulę prisijungti. APOBEC2 yra kitas "specialistų" grupės fermentas, evoliucijos eigoje praradęs deaminazės aktyvumą ir galintis tik prisijungti DNR. Kol kas mokslinėje literatūroje trūksta duomenų apie prisijungimo griovelio konformaciją ir už sąveikas atsakingas aminorūgštis (Pecori ir kt., 2022).

APOBEC/AID deaminazių atliekamų funkcijų spektras labai platus. AID didžiausia raiška aptinkama aktyvintose B ląstelėse, kur katalizuojamas imunoglobulinų genų deamininimas, taip padidinant antikūnų įvairovę organizme. APOBEC1 randamas žmogaus plonajame žarnyne ir kepenyse. Jis atsakingas už baltymo apolipoproteino B (ApoB) iRNR redagavimą – 6666 pozicijos citidino deamininimas nulemia glutamino kodono pasikeitimą į STOP kodoną ir susidaro trumpesnis ApoB48 baltymas, įeinantis į chilomikronų sudėtį. Širdies ir skeleto raumenyse aptinkamas APOBEC2. Nors, kaip jau minėta, šis fermentas neatlieka deamininimo, tačiau gyvūnų modeliams su išveiklintu APO-BEC2 genu pasireiškė miopatija, taip pat pastebėtas APOBEC2 kaip transkripcijos represoriaus vaidmuo. Septyni APOBEC3 subšeimos baltymai atsakingi už virusų ir mobilių genomo elementų restrikciją – deaminintos virusų nukleorūgščių grandinės nukreipiamos degradacijai. Kai kurie šios subšeimos baltymai skatina navikų heterogeniškumą, sukeldami taškines mutacijas, DNR trūkius ir chromosominį nestabilumą. Mažiausiai duomenų šiuo metu turima apie APOBEC4 fermentą – jis identifikuotas žinduolių sėklidėse, tačiau dar neturi priskirtos konkrečios fiziologinės prasmės (Conticello, 2008; Pecori ir kt., 2022).

1.5. Daugialypės CDA reakcijos

Nustatyta, kad beveik 10 % visų fermentų, esančių bakterijose ar archėjose, būdingos daugialypės reakcijos (Singla & Bhardwaj, 2020). Nors jau minėta, jog CDA substratas yra ne tik citidinas, bet ir 2'-deoksicitidinas bei įvairūs nukleozidu analogai naudojami vėžio gydyme, vis dėlto, tai ne vieninteliai CDA hidrolizuojami junginiai. Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje (VU, GMC), pasitelkiant uridino auksotrofinius kamienus, identifikuotos metagenominės CDA, gebančios deamininti iki uridino ar jo darinių įvairius N^4 -acil-, N^4 - $/O^4$ - $/S^4$ -alkil- ir N^4 - $/O^4$ - $/S^4$ -arilcitidino nukleozidus (Urbelienė ir kt., 2023). Iki šio atradimo nebuvo žinoma, jog CDA galėtų deamininti substratus su tokiais dideliais pakaitais, o vienintelis panašaus aktyvumo pavyzdys - dar 1971 metais aprašvtas E.coli CDA N⁴-metilcitidino deamininimas (Cohen & Wolfenden, 1971). Atrinktas 41 CDA fermentas, kurių daugialypio substratinio aktyvumo analizė atskleidė, kad dauguma atvejų 2'-deoksicitidino dariniai buvo hidrolizuojami šiek tiek greičiau nei analogiški ribonukleozidai. Ribozės modifikacijas toleravo tik keletas fermentų, tačiau substratus su pakaitais bazės žiedo C5 pozicijoje hidrolizavo beveik visos metagenominės CDA nepaisant to, ar prie N4 atomo buvo prijungtas pakaitas ar ne. Nei viena iš analizuotų CDA nekatalizavo citozino ar jo analogu deamininimo. N4 pozicijos pakaito tipas leido išskirstyti fermentus į dvi grupes – pirmoji grupė naudojo substratus, kuriuose prie N4, O4 ar S4 atomo buvo prijungta tik metilo grupė, o antroji galėjo deamininti ir su prijungtomis ilgomis alifatinėmis ar aromatinėmis grupėmis. Pastarajai grupei priklausančio CDA F14 fermento specifinio aktyvumo rezultatai parodė, jog substratai, turintys N4 pozicijoje pakaitą yra verčiami į uridino analogą lėčiau nei neturintys. Be to, pastebėtas specifinio aktyvumo mažėjimas didėjant prie N4 atomo prijungtai grupei (Urbelienė ir kt., 2023).

1.5.1. CDA_F14 struktūra ir metagenominių CDA racionalusis dizainas

Plačiausiu substratiniu specifiškumu pasižymintis CDA_F14 – homotetramerinis fermentas, turintis deaminazėms būdingą α/β/α domeną. Molekulinis dokinimas su N^4 -benzoil-2'-deoksicitidinu leido identifikuoti su substratu sąveikaujančias bei katalizei reikalingas aminorūgštis. Su ribozės 3'-OH grupe vandenilinius ryšius sudaro Asn42 ir Glu44, o su 5'-OH – Ala46 ir Tyr48. 2'-OH grupės pozicionavimui įtakos galimai turi Asn52 ir Gly54, o pastarasis dar koordinuoja ir heterociklinės bazės žiedo C2 atomą. Molekulinės dinamikos simuliacijos parodė, jog ribozės žiedo prisijungimui gali būti svarbus ir Thr51. Konservatyvusis Glu55 atsakingas už katalizės procesą, o visose CDA randamas Phe126 būtinas aktyviojo centro susidarymui. Reakcijai reikalingą cinko joną palaiko Cy53, Cys88 ir Cys91, o Arg56 sudaro vandenilinius ryšius su minėtais cisteinais. Substrato surišimo kišenės dydžiui įtakos turi β₃α₃ kilpos aminorūgštys (79-88 a.r.) bei Val26, Ile77, Leu107, Leu131.

 $\beta_{3\alpha_{3}}$ kilpa pasižymi judrumu, o 81-oje ir 85-oje pozicijose esantys glicinai neužima daug vietos, dėl ko CDA F14 gali hidrolizuoti platų spektrą įvairių substratų. Abiejų aminorūgščių pakeitimai į leucinus drastiškai sumažino katalizinio efektyvumo konstantas su N⁴-benzoil-2'-deoksicitidinu, o tai irodo pastaruju glicinų svarbą CDA F14 aktyvumui. Kilpos įtaka substratiniam specifiškumui vertinta kitoms metagenominėms CDA – CDA Lsp Ala82Ile mutantas nebegalėjo deamininti substratų su dideliais acil- ar aril- pakaitais prie N4 atomo, tačiau CDA Tar Ile85Ala mutantas pradėjo hidrolizuoti tokius junginius kaip 5-fluoro- N^4 -(4-morfolinil)-2'-deoksicitidinas ir N^4 -[(1H-indol-6-il)metil]-2'deoksicitidinas. C-galo aminorūgščių pakeitimai taip pat nulėmė CDA F14 selektyvumo pokyčius. CDA F14 Phe126Ala, CDA F14 Phe126Trp mutantai ir mutantas su 127-130 aminorūgščių delecija po ilgos inkubacijos pradėjo deamininti CMP. Savo ruožtu CDA F14 Thr51Gly mutantas irgi parodė nedidelį aktyvumą su CMP, tačiau nebehidrolizavo tokių substratų kaip 2',3'-dideoksicitidinas, N^4 -benzoil-2'-deoksicitidinas, S^4 -benziluridinas, N^4 -(4-morfolinil)-2'-deoksicitidinas ir kapecitabinas (Urbelienė ir kt., 2023). Tad CDA F14 racionaliojo dizaino tyrimai ateityje leis identifikuoti dar didesni skaičiu galimu "karštuju tašku" mutacijoms atlikti, kurios turėtu itakos fermento substratiniam specifiškumui. Daugialypių reakcijų spektro praplėtimas atvertų naujus terapinius kelius, ieškant potencialių priešvėžinių/priešvirusinių vaistų.

1.6. Nukleozidų analogai

2019-aisiais metais FDA patvirtinus remdesivirą kaip vaistą prieš COVID-19 infekciją, nukleozidų analogai iš naujo įgavo dėmesį medicinos srityje. Dėl savo gebėjimo būti fermentų slopikliais ar DNR grandinės terminatoriais, jie pasižymi efektyviomis priešvirusinėmis ir priešvėžinėmis savybėmis (Lin ir kt., 2021). Šiuo metu užregistruota kiek daugiau nei 30 nukleozidų/nukleotidų analogų, kurie yra tinkami gydant virusų, parazitų, grybų sukeltas infekcijas, taip pat vėžį, o dar didesnis jų skaičius yra klinikinių tyrimų stadijoje. Vis dėlto, dažnėjantys susirgimų atvejai ir šalutinių požymių tikimybės skatina konstruoti ir sintetinti vis daugiau nukleozidų analogų. Potencialiomis nukleozidų modifikacijų vietomis dažniausiai tampa ribozės/deoksiribozės žiedas, aromatinė heterociklinė bazė ar fosfatinės grupės, kiek rečiau gali būti keičiamos ir glikozidinio ryšio pozicijos. Vienuose iš ankstyviausių nukleozidų analogų pavyzdžių, struktūriniai pakeitimai prasidėjo būtent nuo cukraus dalies pokyčių (Seley-Radtke & Yates, 2018). Šiomis dienomis yra taikomasi į 2[°], 3[°], 5[°], kiek rečiau 4[°] ir 1[°] pozicijų modifikacijas, keičiamas cukraus žiedo dydis, deguonies atomas (Yates & Seley-Radtke, 2019; Seley-Radtke & Yates, 2018).

1.6.1. Ribozės žiedo modifikacijos

Arabinozės nukleozidų analogai laikomi pirmaisiais antimetabolitais, pasižyminčiais terapinėmis savybėmis. Juose 2'-OH grupė yra invertuota, anaiptol nei ribozės žiede. Septintajame ir aštuntajame dešimtmečiuose susidomėta fluoro įtaka. Pastebėta, jog dėl savo didelio elektroneigiamumo, jis keičia cukraus konformaciją, o tai yra vienas iš esminių faktorių, paveikiančių, kokie fermentai atpažins ir metabolizuos tokį substratą (Seley-Radtke & Yates, 2018). Kai kurių nukleozidų analogų atveju, fluoro prijungimas sumažino citotoksiškmą (Lin ir kt., 2021), be to padidino glikozidinio ryšio stabilumą (Seley-Radtke & Yates, 2018). 2' pozicijoje bandoma prijungti ir metilo, ciano bei etinilo grupes. Nors 2'-metil dariniams reikalingi išsamesni tyrimai ieškant būdų padidinti jų efektyvumą, savo ruožtu 2'-ciano analogai, kaip ir fluoro, tinkami gydant kietuosius navikus (Lin ir kt., 2021), o modifikacija etinilo pakaitu padidino priešvirusines savybes (Yates & Seley-Radtke, 2019).

Prie 3' pozicijos taip pat gali būti prikabinamos fluoro, metilo grupės, o taip pat sutinkamas ir azido pakaitas. Pastarasis yra linijinės struktūros, kas nulemia mažą elektroneigiamumą ir nedidelius sterinius trikdžius, o tai stabilizuoja nukleozido struktūrą ir paverčia jį ne taip lengvai atpažįstamu virusams (Lin ir kt., 2021). 3' pozicijų modifikacijos įprastai kombinuojamos kartu su 2' pozicijos modifikacijomis – susintetintas nemažas skaičius nukleozidų analogų, kuriuose prie cukraus 3' anglies atomo prijungiamas pakaitas, o nuo 2' anglies atomo pašalinama hidroksilo grupė. Didžiulio dėmesio atradus susilaukė junginys 2', 3' – dideoksicitidinas, tačiau dėl vėliau identifikuotų šalutinių poveikių jis jau nebėra naudojamas gydyti virusinius ar vėžinius susirgimus. Nepaisant to, pastarojo junginio potencialas skatina ieškoti daugiau panašaus tipo darinių, kaip, pavyzdžiui, tarp 2' ir 3' pozicijų įvesti dvigubą ryšį (Seley-Radtke & Yates, 2018).

Daugumos nukleozidų analogų aktyvios formos ląstelėje yra fosforilintos 5° pozicijoje, o monofosfatų susidarymas yra greitį limituojantis procesas. Tiesioginis fosfatų prijungimas prie kuriamo nukleozido analogo leistų išvengti pastarojo apribojimo, tačiau nukleozidų monofosfatai yra fosfatazių taikiniai. Dėl šios priežasties, dauguma vykdomų 5° pozicijos modifikacijų yra orientuotos į fosforilinimo procesą pačioje ląstelėje ir labiau veikia junginio biologinį įsisavinimą ir efektyvumą. Vis dėlto, 5' padėties variacijos gali paversti nukleozidų analogus nebetinkamus fosforilinimui ir atverti naują kelią jų aktyvumo pasireiškimui, veikiant purinų ar pirimidinų nukleozidų fosforilazėms. Vienas iš tokio junginio pavyzdžių – 5'-deoksi-5-fluorouridinas, kurį žmogaus uridino fosforilazė paverčia 5-fluorouracilu, pasižyminčiu plačiu aktyvumu gydant žarnyno vėžį, leukemiją, melanomas. Prie 5'-OH ar vietoj 5'-OH grupės taip pat gali būti prijungiamos ir įvairios fosforamidatinės grupės su fenilu, ureido pakaitai, riebiųjų rūgščių liekanos, terpenai (Lin ir kt., 2021).

Kaip jau minėta, gali būti modifikuojamos ir 1[°] bei 4[°]padėtys, bandoma keisti furanozės žiedo deguonį į sierą, seleną, azotą, o pentozę - į ciklobutaną ar epoksidą. Nepaisant jau ir taip esančios didelės nukleozidų analogų įvairovės, gausėjanti žmonių populiacija ir dažnėjantys susirgimų atvejai skatins ir toliau plėsti pastarųjų junginių gausą.

1.6.2. Nukleozidų analogų sintezė

Nuo nukleozidų analogų atsiradimo 6-ajame dešimtmetyje iki pat šių dienų, nuosekliai tobulinami seni arba ieškomi nauji sintezės būdai. Tai stengiamasi pasiekti taikant tiek cheminius, tiek biokatalizinius metodus (Cosgrove & Miller, 2022). Pagrindiniai du keliai, naudojami susintetinti nukleozidų analogus chemiškai, yra divergentinis ir konvergentinis. Divergentiniame metode paimamas natūralus nukleozidas ir modifikuojamas norimoje vietoje. Svarbus šios technikos privalumas yra reikiamos stereochemijos išlaikymas, kadangi glikozidinis ryšys, prieš įvedant modifikacijas, jau yra fiksuotas erdvėje. Vis dėlto, keblumų sukelia hidroksilinių grupių buvimas – jos yra tarpusavyje panašaus cheminio aktyvumo, kas reikalauja divergentiniame metode naudoti blokuojančias/deblokuojančias grupes. Savo ruožtu konvergentiniame metode heterociklinė bazė glikozilinimo reakcijos metu sujungiama su atitinkamu modifikuotu cukrumi. Nors toks būdas leidžia išgauti didesnę nukleozidu analogu įvairove, tačiau, kitaip nei divergentiniame metode, čia gali atsirasti nepageidaujamos konformacijos glikozidinis ryšys. Plačiausiai naudojama Silil-Hilberto-Džonsono reakcija, kurios metu silanintos heterociklinės bazės sujungiamos su acilintomis pentozės liekanomis, naudojant Friedelio-Krafto katalizatorius aukštose temperatūrose. Kita taikoma sintezės būda aprašė Fišeris ir Helferichas - šiuo atveju purinai sudaro ryšį su acetobromogliukoze, katalizuojant sidabro ar gyvsidabrio druskoms (Liang ir kt., 2017; Shelton ir kt., 2016). Nepaisant šių išvystytų technologijų, reikia atrasti aplinkai draugiškesnes strategijas, kurios nereikalautų daug laiko ar brangių bei kenksmingų reagentų. Problemai spręsti pasitelkiami fermentai – purinų ir pirimidinų fosforilazės yra dažniausiai nukleozidų sintezei pritaikomi biokatalizatoriai. Kaip alternatyva fosforilazių naudojimui, gali būti pasitelkiamos 2'-deoksiriboziltransferazės. Svarbu pabrėžti, kad abi fermentų grupės toleruoja modifikacijas 2' pozicijoje. 2024-aisiais metais atliktas tyrimas parodė, jog Lactobacillus leichmannii 2'deoksiriboziltransferazė gali katalizuoti transglikozilinimo reakciją su įvairiomis nenatūraliomis nukleobazėmis. Vis dėlto, pastebėtos didesnės išeigos su purinų, bet ne pirimidinų analogais (Salihovic

ir kt., 2025). Be minėtų fermentų sukonstruoti sintezės keliai, kuriuose sutinkamos ribokinazės, fosfopentomutazės, deoksiribozės 5-fosfato aldolazės, galaktozės oksidazės, peroksidazės (Cosgrove & Miller, 2022). Ateityje tikimasi, jog tobulėjantys baltymų inžinerijos metodai ir bioinformatiniai įrankiai padės atrasti dar didesnį skaičių efektyvesnių biokatalizatorių nukleozidų analogų sintezei.

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

2.1.1. Pradmenys

Mutacija Tiesioginis pradmuo $(5 \rightarrow 3^{\circ})$ Atvirkštinis pradmuo (5'→3') H121A (Dcd) gatggtggccgtcaccgcgcaccgc gtgacggccaccatcagccccagac H121G (Dcd) gatggtgggcgtcaccgcgcaccgc gtgacgcccaccatcagccccagac L107A (Dcd) ggctgggcggacgggcgttcctcac ccgtccgcccagcccaccagatcgg N42A (CDA F14) ggcgcagctatcgaaaatgcttcttac ttcgatagctgcgcctaaaaacgtcgt E44A (CDA F14) aatatcgcaaatgcttcttacggagcg agcatttgcgatatttgcgcctaaaaa Y48NNN (CDA F14) caaatatcgaaaatgcttctnnnggagcga cattttcgatatttgcgcctaaaaacgtcg N52I (CDA F14) gcgaccatttgcggtgaaagaagtgcc accgcaaatggtcgctccgtaagaagc G54A (CDA F14) aattgcgctgaaagaagtgccattttc tctttcagcgcaattggtcgctccgta N52I/G54A (CDA F14) gcgaccatttgcgctgaaagaagtgcc tctttcagcgcaaatggtcgctccgta

1 lentelė. Eksperimentų metu naudotų pradmenų sekos.

2.1.2. Substratai

2 lentelė. Substratinio specifiškumo analizei naudotų substratų sąrašas.

Substratas	Gamintojas
2',3'- dideoksicitidinas	Carbosynth (JK)
2'5'- dideoksicitidinas	
2'-O-metilcitidinas	
3'-azido-N ⁴ -benzoil-2',3'-dideoksicitidinas	
3'-amino-2'3'-dideoksicitidinas	
2'-deoksicitidinas	Jena Bioscience (Vokietija)
5'-levulinil-N ⁴ -benzoil-2'-deoksicitidinas	
3'-levulinil-N ⁴ -benzoil-2'-deoksicitidinas	
3'-acetil-N ⁴ -benzoil-2'-deoksicitidinas	
N^4 -benzoil-2'-deoksicitidinas	
3'-azido-2',3'-ddCTP	
5-metil-dCTP	
2'-fluoro-dCTP	
5-propargilamino-dCTP	
5-hidroksimetil-dCTP	

Substratas	Gamintojas
Citidinas	Sigma-Aldrich (Vokietija)
Kapecitabinas	
СМР	
N^4 -benzoil-2'-O-metilcitidinas	BLDpharm (Indija)
N ⁴ -acetil-2 [•] -O-metilcitidinas	
N^4 -2'-O-dimetilcitidinas	
N^4 -benzoil-2'-deoksi-2',2'-difluorocitidinas	Biosynth (Šveicarija)
N ⁴ -acetil-2'-deoksi-2'-fluorocitidinas	
3'5'-di-O-benzoil-2',2'-difluorocitidinas	
N^4 -3'-O-dibenzoil-2'-deoksicitidinas	
$3^{,}5^{,}-di-O-acetil-O^{4}-benzil-5-fluoro-2^{,}-deoksicitidinas$	Susintetinti MMB skyriuje
3',5'-di-O-acetil-O ⁴ -propargil-5-fluoro-2'-deoksicitidinas	
$3^{,}5^{-}$ -di-O-acetil- O^{4} -n-butil-5-fluoro-2'-deoksicitidinas	

2.1.3. Kamienai

Escherichia coli HMS174: F-*recA1 hsdR*(rK12- mK12+) (DE3) (Rif R) (Novagen); mutantas HMS174*ΔpyrΔcdd* sukonstruotas MMB skyriuje.

Escherichia coli DH10B:- $mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80dlacZ\DeltaM15 \Delta lacX74 endA1 recA1 deoR \Delta(ara, leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL <math>\lambda$ - (ThermoFisher Scientific); mutantas DH10B $\Delta pyrFEC$ sukonstruotas MMB skyriuje.

2.1.4. Terpės

Luria – Bertami (LB) terpė – distiliuotame vandenyje ištirpinama 0,5% peptono, 0,5% NaCl, 0,3% mielių ekstrakto, pH 7,2-7,3. Autoklavuojama 30 min., 121 °C, 1 atm slėgyje.

SOB terpė – distiliuotame vandenyje ištirpinama 2% triptono, 0,5% mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 MgSO₄. Autoklavuojama 30 min, 121 °C, 1 atm slėgyje.

SOC terpė – prieš naudojimą į norimą SOB terpės kiekį įpilama 10 mM MgCl₂ ir 20 mM gliukozės.

M9 selektyvi agarizuota mineralinė terpė – distiliuotame vandenyje ištirpinama 1 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂ ir 15 g/L agaro. Autoklavuojama 30 min., 121 °C, 1 atm slėgyje. Atskirai ruošiamas 5X druskų mišinys - 33,9 g/L Na₂HPO₄, 15 g/L KH₂PO₄, 5 g/L NH₄Cl, 2,5 g/L NaCl - ir pilamas į terpę prieš naudojimą kaip ir 0,2 % (w/v) gliukozės, 0,2 % kazamino rūgščių, 1 mM IPTG ir 0,02 mg/ml uridino ar jo analogo.

2.1.5. Vektoriai

pLATE31 – raiškos vektorius (ThermoFisher Scientific);
pLATE52 – raiškos vektorius (ThermoFisher Scientific).

2.2. Metodai

2.2.1. Kompetentinių ląstelių paruošimas elektroporacijai

Pasirinktas *E.coli* kamienas augintas 25 mL LB terpės 37 °C su aeracija, kol optinis tankis ties 600 nm pasiekė 0,6-0,7. Ląstelės nucentrifuguotos 4000×g 4 °C 10 min., supernatantas nupiltas ir ląstelės resuspenduotos 25 mL atšaldyto 10% glicerolio tirpalo. Vėl centrifiguota 4000×g 4 °C 10 min., nupiltas supernatantas. Plovimas 10% glicerolio tirpalu kartotas mažiausiai tris kartus. Nucentrifugavus paskutinį kartą ląstelės resuspenduotos 1 ml 10 % glicerolio tirpalo ir išpilstytos po 95 μ L. Šiuo būdu paruoštos kompetentinės ląstelės gali būti transformuotos iš karto arba laikomos -80 °C šaldiklyje iki naudojimo.

2.2.2. Kompetentinių ląstelių paruošimas cheminei transformacijai

Pasirinktas *E.coli* kamienas augintas 25 mL LB terpės 37 °C su aeracija, kol optinis tankis ties 600 nm pasiekė 0,6-0,7. Ląstelės nucentrifuguotos 4000×g 4 °C 10 min., supernatantas nupiltas ir ląstelės resuspenduotos 25 mL atšaldyto 0,1 M CaCl₂ tirpalo. Vėl centrifiguota 4000×g 4 °C 10 min., nupiltas supernatantas. Plovimas 0,1 M CaCl₂ tirpalu kartotas mažiausiai tris kartus. Nucentrifugavus paskutinį kartą ląstelės resuspenduotos 1 ml 0,1 M CaCl₂ tirpalo su 15 % glicerolio ir išpilstytos po 95 μ L. Šiuo būdu paruoštos kompetentinės ląstelės gali būti transformuotos iš karto arba laikomos - 80 °C šaldiklyje iki naudojimo.

2.2.3. PGR metodas tikslinio geno amplifikacijai

Pasirinktas 25 µL vienos reakcijos tūris, kurios komponentai ir kiekiai pateikti 3-oje lentelėje. PGR reakcijos žingsnių temperatūros ir laikai pateikti 4-oje lentelėje.

Komponentas	Kiekis
"2X Phusion TM Plus Master Mix" (ThermoFisher Scientific)	12,5 μL
Tiesioginis ir atvirkštinis pradmenys	Po 0,1-0,5 μM
Plazmidinė DNR	30-100 ng
DMSO (ThermoFisher Scientific)	0,75 μL
H ₂ O	Iki 25 μL

3 lentelė. PGR reakcijos mišinys

Žingsnis	Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija	98 °C	30 s	1
Pakartotinė denatūracija	98 °C	10 s	
Pradmenų prilydymas	60 °C	20 s	25
Ilginimas	72 °C	20 s/kb	
Galų ilginimas	72 °C	3 min	1

4 lentelė. PGR reakcijos sąlygos

2.2.4. DNR elektroforezė

DNR elektroforezei naudotas 1 % agarozinis gelis su TAE (Tris-acetatas-EDTA) buferiu. Elektroforeze vykdyta esant 120 V įtampai ir į šulinėlius užnešant apie 0,1-0,5 µg DNR. Po elektroforezes gelis dažytas 0,05 % etidžio bromido tirpale apie 5 min. Fragmentų dydžiams įvertinti naudotas DNR molekulinės masės standartas "GeneRuler 1 kb DNA Ladder" (ThermoFisher Scientific), o gelio rezultatai analizuoti apšvietus UV spinduliais transiliuminatoriuje.

2.2.5. Tikslinio DNR fragmento gryninimas iš agarozės gelio

Iš agarozės gelių DNR fragmentai išgryninti naudojantis "GeneJET Gel Extraction Kit" (ThermoFisher Scientific) rinkiniu pagal nurodytą instrukciją. Su mažo tūrio spektrofotometru nustatyta išgrynintos DNR koncentracija.

2.2.6. Tikslinio DNR fragmento gryninimas iš PGR mišinio

Iš PGR mišinio DNR fragmentai išgryninti naudojantis "GeneJET PCR Purification KIT" (ThermoFisher Scientific) rinkiniu pagal nurodytą instrukciją. Su mažo tūrio spektrofotometru nustatyta išgrynintos DNR koncentracija.

2.2.7. Tikslinio geno ligavimas į pLATE vektorių

Tikslinis DNR fragmentas, amplifikuotas PGR metu, įklonuotas į pLATE31/pLATE52 vektorių naudojantis "aLICator LIC Cloning and Expression Kit 3" (ThermoFisher Scientific) rinkiniu pagal nurodytą instrukciją. Gautas ligatas toliau naudotas transformacijai į pasirinktą *E.coli* kamieną.

2.2.8. Elektroporacija

95 μL elektrokompetentinių ląstelių sumaišyta su 1 μL plazmidinės DNR arba 2 μL ligato ir inkubuota ant ledo kelias minutes. Viskas perpilta į tam skirtą atšaldytą kiuvetę ir elektroporatoriuje (Electroporator 2510 Eppendorf) atlikta elektroporacija esant 1800 mV/cm įtampos srovei, o impulso trukmė 4-5,8 ms. Po elektroporacijos ląstelės nedelsiant užpiltos 900 μL SOC terpės ir gaivintos 37 °C 30 min. Praėjus gaivinimo laikui ląstelės nucentrifuguotos, resuspenduotos 100-200 μL supernatanto ir išsėtos ant agarizuotos LB terpės.

2.2.9. Cheminė transformacija

95 μL cheminei transformacijai paruoštų kompetentinių ląstelių sumaišyta su 1 μL plazmidinės DNR arba 2 μL ligato ir inkubuota ant ledo 30 min. Praėjus inkubacijos laikui ląstelės perkeltos į 42 °C termostatą 45 s. Po karščio šoko nedelsiant užpilta 900 μL SOC terpės ir gaivinta 37 °C 30 min. Po inkubacijos ląstelės nucentrifuguotos, resuspenduotos 100-200 μL supernatanto ir išsėtos ant agarizuotos LB terpės su antibiotiku.

2.2.10. Plazmidžių gryninimas

Atrinktos kolonijos persėtos į 5 mL skystos LB terpės ir augintos per naktį su aeracija 37 °C. Ląstelės nucentrifuguotos ir plazmidinė DNR išskirta naudojantis "ZymoPURE II Plasmid Miniprep Kit" (Zymo Research) pagal nurodytą instrukciją. Sekoskaitai mėginiai išsiųsti į "Azenta" (Vokietija), kaip pradmenį naudojant T7 promoterį, kurio seka: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'.

2.2.11. Baltymų raiška ir gryninimas

Atrinktos ląstelės augintos LB terpėje, kol optinis tankis OD600 pasiekė 0,6-0,8, tuomet baltymų raiška indukuota įpylus 0,25 mM IPTG ir auginimas perkeltas į 30 °C temperatūrą 18-24h. Po indukcijos ląstelės nucentrifuguotos 4000×g 4 °C 10 min. ir resuspenduotos kalio fosfatiniame buferyje (50 mM, pH 7,5). Ląstelės sulizuotos ultragarsu – ciklo laikas 5 min., iš kurių 3 s vyksta ardymas, 5 s vėsinimas esant 30 % jėgai (Branson Digital Sonifier SFX 250 (Emerson)). Lizatas nucentrifuguotas 10000×g 4 °C 10 min. ir likęs supernatantas naudotas baltymų gryninimui.

Visi darbe gryninti baltymai turėjo 6xHis-Tag žymę. Gryninimas vykdytas naudojant "AktaPurifier" (GE Healthcare) chromatografijos sistemą ir nikelio chelatinę kolonėlę "HiTrap™ Chelating HP" (GE Healthcare). Pirmojo gryninimo etapo metu užneštas mėginys ir prie sorbento neprisijungę baltymai nuplauti kalio fosfatiniu buferiu (50 mM, pH 7,5). Antrojo etapo metu prie sorbento prisijungęs tikslinis baltymas iš kolonėlės eliuuotas kalio fosfatiniu buferiu (50 mM, pH 7,5) su 0,5 M imidazolo. Po gryninimo apjungtos baltymo frakcijos dializuotos kalio fosfatiniame buferyje (50 mM, pH 7,5) 4 °C, 18-24h.

2.2.12. Baltymų molekulinės masės nustatymas SDS-PAGE

Baltymų mėginiai po dializės sumaišyti su pavyzdžio dažu, turinčiu 5 % 2-merkaptoetanolio ir 2 % natrio dodecilsulfato ir kaitinti verdančio vandens vonioje 7 min. Naudotas SDS-poliakrilamido gelis su 4,5 % koncentruojamuoju ir 14 % skiriamuoju geliais. Elektroforezę sudarė du etapai – 20 min. esant 64 V galiai ir 20 mA srovės stipriui bei 40 min. esant 200 V galiai ir 22 mA srovės stipriui. Po elektroforezės gelis nudažytas su "Coomassie Brilliant Blue G-250" (ThermoFisher Scientific) dažu ir nublukintas šiltame vandenyje.

2.2.13. Bradfordo testas baltymų koncentracijos nustatymui

Kalibracinės kreivės sudarymui naudoti "PierceTM Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit" (ThermoFisher Scientific) rinkinio 0,125 mg/mL, 0,250 mg/mL ir 0,500 mg/mL jaučio serumo albumino etaloniniai tirpalai. Ant 4 µL kiekvieno tirpalo užpilta 200 µL Bradfordo reagento ir matuota optinė sugertis ties 595 nm. Baltymo koncentracija nustatyta analogiškai matuojant optinę sugertį tikslinio baltymo mėginiui.

2.2.14. Plonasluoksnė chromatografija aktyvumo su substratais įvertinimui

20 μL reakcijos mišinį sudarė 2 μL fermento (CDA_F14 mutantų atveju 0,498 – 1,948 mg/ml), 4 mM atitinkamo substrato ir likusi dalis kalio fosfatinio buferio (50 mM, pH 7,5). Kontrolinius bandinius sudarė reakcijos mišiniai be fermento. Mėginiai inkubuoti 1 val. 37 °C ir rezultatų analizei ant "TLC Silica gel 60" (Merck Millipore) plokštelės perkelta po 0,7 μL kiekvieno mėginio. Mobiliąją fazę sudarė chloroformo:metanolio tirpalas santykiu 5:1. Reakcijos produktai vertinti apšvietus plokštelę 254 nm ultravioletine šviesa. Po analizės mėginiai palikti inkubuotis kambario temperatūroje per naktį ir reakcijos produktai dar papildomai vertinti po paros.

2.2.15. HPLC-MS metodas aktyvumo su substratais įvertinimui

HPLC-MS analizei atlikti į reakcijų mišinius įpilta acetonitrilo (50% galutinio tūrio) tuomet mėginiai centrifuguoti 13800×g 10 min. HPLC-MS aparatūrą sudarė aukšto slėgio skysčių chromatografas (CBM-20A, Shimadzu) ir masių spektrofotometras ((LCMS-2020, Schimadzu). Atskyrimas vykdytas esant 40 °C temperatūrai bei naudojant chromatografinę 150×3 mm kolonėlę YMC-Pack Pro ir mobiliąją fazę, sudarytą iš skruzdžių rūgšties ir acetonitrilo. Gauti rezultatai pateikti teigiamos ir neigiamos jonizacijos režimuose ir analizuoti LabSolutions LC/MS programinės įrangos pagalba.

2.2.16. Fermentinio aktyvumo matavimas

Mutantinių baltymų aktyvumas tirtas spektrofotometriškai, matuojant absorbijos sumažėjimą 290 nm bangos ilgyje, stebint 2'-deoksicitidiną ($\Delta \varepsilon = 1600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) arba 310 nm, stebint N^4 -benzoil-2'-deoksicitidiną ($\Delta \varepsilon = 11000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Naudotos tokios 2'-deoksicitidino koncentracijos – 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,25 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,8 mM ir 1 mM, o N^4 -benzoil-2'-deoksicitidino – 0,0125 mM, 0,025 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,075 mM, 0,1 mM, 0,15 mM ir 0,3 mM. Minėtų koncentracijų substratų tirpalai ruošti kalio fosfatiniame buferyje (50 mM, pH 7,5). Kiuvetėje sumai-šyta 3-12 µL (CDA_F14 mutantų atveju 0,0330 – 0,1706 mg/mL) fermento bei 588-597 µL atitin-kamo substrato ir absorbcijos mažėjimas registruotas 30 s – 1 min., atsižvelgiant į reakcijos greitį. Matavimai su kiekviena koncentracija pakartoti po 3 kartus. Kinetinės konstantos nustatytos GraphPad Prism 10 programine įranga, pritaikius Michaelis-Menten lygtį.

2.2.17. Taikiniui specifinės ir atsitiktinės mutagenezės pradmenų kūrimas

"Benchling" internetinėje platformoje sukurti ~30 nt. ilgio pradmenys su ~10 nt. persidengimu. 46-oje pozicijoje vietoje alanino ir 48-oje pozicijoje vietoje tirozino CDA_F14 atveju norint įvesti atsitiktinę aminorūgštį, sukurti pradmenys su NNN kodonu pastarojoje pozicijoje, kuris apima visus 64 kodonus. Taikiniui specifinės mutagenezės atveju, pasirinktoje pozicijoje įvestas pageidaujamos aminorūgšties kodonas. Gavus susintetinus pradmenis, jie fosforilinti pagal 2.2.18. punkte pateiktą metodiką.

2.2.18. Taikiniui specifinės ir atsitiktinės mutagenezės

Prieš atliekant mutagenezės PGR, paruošti pradmenų fosforilinimo mišiniai, kurių sudėtis pateikta 5-oje lentelėje. Reakcijos mišinys inkubuotas 37 °C 30 min., o po fosforilinimo reakcijos T4 polinukleotidkinazė inaktyvuota palaikius reakcijos mišinį 75 °C 10 min. Fosforilinti pradmenys naudoti PGR reakcijoje, kaip nurodyta 2.2.3. punkte. Po PGR mėginai inkubuoti su 1 µL DpnI (Thermo-Fisher Scientific) restrikcijos endonukleaze, kad būtų pašalinta matricinė plazmidė. Inkubacijos temperatūra ir laikas – 37 °C 15 min. Pageidaujamo dydžio padauginta plazmidė gali būti išgryninta iš agarozės gelio pagal 2.2.5. metodiką arba iš PGR mišinio pagal 2.2.6. metodiką. Atsižvelgiant į transformacijos efektyvumą ir sekoskaitos rezultatus, išgryninta plazmidė gali būti papildomai suliguota, kaip nurodyta 2.2.19. punkte.

Komponentas	Kiekis, µL
T4 polinukleotidkinazė (ThermoFisher Scientific), 10 U/ μ L	1
Pradmuo, 100 µM	1,25
ATP, 10 mM	2,5
"10X reaction buffer A for T4 polynucleotide kinase" (Ther- moFisher Scientific) buferis	0,75
H ₂ O	17,75

5 lentelė. Pradmenų fosforilinimo reakcijos mišinys

2.2.19. Linijinių DNR fragmentų ligavimas

Taikiniui specifinės ir atsitiktinės mutagenezių metu gautos padaugintos plazmidės liguotos 18-24 h, 4 °C. Reakcijos mišinio komponentai pateikti 6-oje lentelėje. Po ligavimo, plazmidinė DNR gali būti iš karto naudojama transformacijai arba saugoma -20 °C.

6 lentelė. Ligavimo reakcijos mišinys

Komponentas	Kiekis
"10X T4 DNA Ligase Buffer" (ThermoFisher Scientific)	1 µL
T4 DNR ligazė (ThermoFisher Scientific), 5 U/µL	0,5 μL
PEG 4000	1 µL
DNR	10 ng
H ₂ O	Iki 10 µL

3. Rezultatai ir jų aptarimas

Šio tyrimo objektai yra pirimidinų metaboliniai fermentai – *E.coli* dCTP deaminazė Dcd ir metagenominė citidino deaminazė CDA_F14. Pirmoje rezultatų aptarimo dalyje pateikiami duomenys, susiję su CDA F14, antroje – su dCTP deaminaze.

3.1. CDA_F14 mutantų substratinio specifiškumo rezultatai

MMB skyriuje atrasta prokariotinė deaminazė CDA_F14 (PDB 7ZOB) pasižymi plačiu daugialypiu substratiniu aktyvumu. Atliktų tyrimų dėka padaryta prielaida, kad tai lemia didelė substrato surišimo kišenė. CDA_F14 yra homotetrameras, 132 aminorūgščių baltymas, kurio aktyviajame centre esantis cinko jonas yra koordinuojamas trijų cisteinų. Iki šiol daugiausiai tyrimų atlikta norint išsiaiškinti, kokios aktyviojo centro aminorūgštys yra svarbios koordinuojant substratus, turinčius įvairius pakaitus heterociklinės bazės N4 padėtyje. Tad susidomėjimą kelia aminorūgštys, dalyvaujančios ribozės žiedo koordinavime, kadangi kai kurie substratai su modifikuota riboze/deoksiriboze pasižymi vaistinėmis savybėmis.

Molekulinio dokinimo ir kristalo struktūros analizės rezultatai parodė, jog substrato surišime ir koordinavime dalyvauja Ala46 ir Tyr48, sudarantys vandenilinius ryšius su ribozės 5'-OH grupe, Asn42 ir Glu44 sudarantys vandenilinius ryšius su ribozės 3'-OH grupe bei Asn52 ir Gly54, kurie nesudaro tiesioginių ryšių su ribozės žiedu, bet galimai turi įtakos substrato surišimui, kai pakaitai yra 2' pozicijoje (5 pav.).



5 pav. CDA_F14 aktyviojo centro 3D schematinis vaizdas su prisijungusiu *N*⁴-benzoil-2'-deoksicitidinu. Su riboze sąveikaujančios aminorūgštys paryškintos (Urbelienė ir kt., 2023)

Taigi, šio darbo metu, pasitelkiant racionalųjį dizainą, buvo siekta įvertinti, kokį efektą katalizuojamai reakcijai turi atitinkamų aminorūgščių, atsakingų už substrato koordinavimą aktyviajame centre, mutacijos, kai įvairūs pakaitai yra ribozės žiede. Taip pat tikėtasi, jog gauti rezultatai padės įvertinti ne tik CDA_F14 substratų spektrą, bet ir plačiąja prasme leis prognozuoti galimus kitų citidino deaminazių deamininamus darinius bei bus naudingi kuriant naujus priešvėžinius/priešvirusinius preparatus.

3.1.1. 2'-OH grupę koordinuojančių aminorūgščių mutacijos

Kaip jau buvo minėta 1.4.2. skyriuje, hCDA sąveikai su 2'-OH grupe svarbūs Asn54 ir Gly56. Diffdock internetinio įrankio pagalba į CDA_F14 aktyvųjį centrą įstačius citidiną taip pat matoma, jog arčiausiai 2'OH grupės yra Asn52 ir Gly54 (6 pav.). Potencialią pastarųjų aminorūgščių įtaką parodė ir CDA_F14 daugybinis sekų palyginys su kitomis metagenominėmis CDA (Urbelienė ir kt., 2023). Iki šiol buvo patikrinta tik vieno, 2' pozicijoje pakaitą turinčio substrato hidrolizė – 2'-Ometilcitidino. Pastebėta, jog šį substratą deamininantys fermentai 52-oje pozicijoje dažniau turi asparaginą, leuciną arba izoleuciną, o 54-oje – alaniną. Savo ruožtu 2'-O-metilcitidino nehidrolizuoja deaminazės, kurių 52-oje pozicijoje sutinkamas valinas, o 54-oje – alaninas arba glicinas. Atsižvelgus į šią informaciją, nuspręsta sukonstruoti tris mutantinius fermentus:

- 1. 52-osios pozicijos asparaginą pakeisti į izoleuciną F14_N52I mutantas;
- 2. 54-osios pozicijos gliciną pakeisti į alaniną F14_G54A mutantas;
- 3. Įvykdyti abi mutacijas viename gene F14_N52I/G54A mutantas.



6 pav. Į CDA_F14 aktyvųjį centrą įstatytas citidinas ir galimai su 2'-OH grupe sąveikaujančios aminorūgštys – N52 ir G54. Paveikslėlis ruoštas Pymol programa (Schrödinger, LLC, 2015), struktūros gautos naudojantis AlphaFold2 (Jumper ir kt., 2021)

Atlikus taikiniui specifinę mutagenezę (2.2.18. skyrius), pagausinta linijinė plazmidė išgryninta tiesiai iš PGR mišinio (2.2.6. skyrius) ir transformuota į *E.coli* DH10B $\Delta pyrFEC$ kamieną (2.2.8. ir 2.2.9. skyriai). Atlikus sekoskaitos analizę ir įvertinus, jog mutacijos įvykdytos teisingai, išgrynintomis plazmidėmis (2.2.10. skyrius) buvo transformuotos *E.coli* HMS174 $\Delta pyr\Delta cdd$ raiškos kamieno

kompetentinės ląstelės. Tuomet išgryninti baltymai (2.2.11. skyrius) ir nustatytos jų koncentracijos (2.2.13. skyrius): F14_N52I – 7,78 mg/mL (išeiga – 23,34 mg baltymo iš 200 mL LB terpės), F14_G54A – 6,57 mg/mL (išeiga – 19,71 mg baltymo iš 200 mL LB terpės), F14_N52I/G54A – 4,49 mg/mL (išeiga – 13,47 mg baltymo iš 200 mL LB terpės). Nustatyti kinetiniai parametrai (2.2.16. skyrius) pateikti 7-oje lentelėje.

2 -ucoksicitiumas								
Fermentas	<i>К</i> м, М	V _{max} , M/min	kcat, 1/s	$k_{\rm cat}/K_{\rm M}, 1/{\rm M}\times{\rm s}$				
F14_wt	$(1,2\pm0,3)\times10^{-4}$	$(3,1\pm0,2)\times10^{-4}$	$(0,33\pm0,01)\times10^{1}$	$(3,1\pm0,4)\times10^4$				
F14_N52I	$(1,7\pm0,7)\times10^{-3}$	$(2,9\pm0,9)\times10^{-3}$	$(7,3\pm2,4)\times10^{1}$	$(4,2\pm1,1)\times10^4$				
F14_G54A	(5,2±0,1)×10 ⁻⁴	$(6,8\pm0,1)\times10^{-4} \qquad (1,9\pm0,02)\times10^{1}$		$(3,8\pm0,04)\times10^4$				
F14_N52I/G54A	(3,3±0,0004)×10 ⁻⁴	$(4,7\pm0,01)\times10^{-4} (1,0\pm0,003)\times10^{1}$		$(3,1\pm0,005)\times10^4$				
	N^4 -be	enzoil-2'-deoksicitid	inas					
F14_wt	(9,8±2,6)×10 ⁻⁵	$(2,4\pm0,2) \times 10^{-5}$	$(1,3\pm0,1)\times10^{-1}$	$(1,3\pm0,1)\times10^3$				
F14_N52I	(1,9±0,1)×10 ⁻⁴	$(2,2\pm0,1) \times 10^{-4}$	$(0,3\pm0,02)\times10^{1}$	$(1,4\pm0,1)\times10^4$				
F14_G54A	$(3,1\pm0,2)\times10^{-4}$	$(2,2\pm0,1) \times 10^{-4}$	$(0,3\pm0,02)\times10^{1}$	$(1,0\pm0,1)\times10^4$				
F14_N52I/G54A	$(4,2\pm0,9)\times10^{-4}$	$(2,0\pm0,4) \times 10^{-4}$	$(0,4\pm0,1) \times 10^1$	$(1,0\pm0,3)\times10^4$				

7 lentelė. F14_wt, F14_N52I, F14_G54A ir F14_N52I/G54A kinetinių konstantų palyginimas.

Iš 7 lentelės duomenų galima matyti, jog su 2'-deoksictidinu N52I mutacija padidina $K_{\rm M}$ vertę 14 kartų, G54A – 4 kartus, o dviguba N52I/G54A mutacija – 3 kartus. Katalizinio efektyvumo konstantų k_{cat}/K_M atveju, asparagino pakeitimas į izoleuciną padidino minėtą konstantą apie 1,5 karto, tačiau G54A ir N52I/G54A mutacijos neturėjo žymaus efekto. Kuomet kaip substratas naudotas N^4 benzoil-2'-deoksicitidinas, N52I ir G54A mutacijos padidino $K_{\rm M}$ konstantą 2 kartus, o N52I/G54A – 4 kartus. Savo ruožtu visos trys mutacijos pagerino $k_{\rm cat}/K_{\rm M}$ konstantą - N52I pakeitimas padidino ją 11 kartų, G54A ir N52I/G54A padidino 8 kartus. Tai rodo, kad pastarieji mutantiniai fermentai yra labiau specifiški N^4 -benzoil-2'-deoksicitidinui nei laukinio tipo fermentas. Priežastis, kodėl taip įvyksta, galėtų būti ta, jog minėtas substratas yra surišamas arčiau katalizinio centro, dėl ko greičiau gali įvykti deamininimo reakcija.

3.1.2. 3'-OH grupę koordinuojančių aminorūgščių mutacijos

Su 3'-OH grupe sąveikaujančius 42-osios pozicijos asparaginą ir 44-osios pozicijos glutamatą nuspręsta pakeisti į alaninus ir sukonstruoti viengubus F14_N42A ir F14_E44A mutantus. Darbų eiliškumas vykdytas kaip nurodyta 3.1.1. skyriuje. Gautos baltymų koncentracijos: F14_N42A – 8,36 mg/mL (išeiga – 20,9 mg baltymo iš 200 mL LB terpės), F14_E44A – 7,36 mg/mL (išeiga – 18,4 mg baltymo iš 200 mL LB terpės). 8-oje lentelėje apskaičiuotos kinetinių konstantų vertės.

2'-deoksicitidinas							
FermentasKM, MVmax, M/minkcat, 1/skcat/KM, 1/M×s							
F14_wt	F14_wt $(1,2 \pm 0,3) \times 10^{-4}$ $(3,1 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ $(0,3 \pm 0,01) \times 10^{1}$ $(3,1 \pm 0,4) \times 10^{4}$						
F14_N42A $(2,9 \pm 0,6) \times 10^{-3}$ $(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ $(6,3 \pm 0,8) \times 10^{-1}$ $(2,2 \pm 0,3) \times 10^{-1}$							
F14_E44A		Likutin	is aktyvumas				
N ⁴ -benzoil-2'-deoksicitidinas							
F14_wt	F14_wt $(9,8 \pm 2,6) \times 10^{-5}$ $(2,4 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ $(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-1}$ $(1,3 \pm 0,1) \times 10^{3}$						
F14_N42A	F14_N42A Likutinis aktyvumas						
F14_E44A Likutinis aktyvumas							

8 lentelė. F14_wt, F14_N42A ir F14_E44A kinetinių konstantų palyginimas.

Kinetinių parametrų matavimai parodė, jog 42-osios pozicijos asparagino mutacija į alaniną 24 kartus padidino $K_{\rm M}$ vertę su 2'-deoksicitidinu ir 140 kartų sumažino $k_{\rm cat}/K_{\rm M}$ konstantą. Dėl per mažų absorbcijos verčių nepavyko įvertinti verčių F14_N42A mutantui su N^4 -benzoil-2'-deoksicitidinu ir F14_E44A mutantui su abiem substratais. Gauti rezultatai patvirtina N42 ir E44 svarbą koordinuojant substratus. Šie rezultatai rodo perspektyvą analizuojant šių aminorūgščių liekanų įtaką substratų surišimui keičiant jas kitomis polinėmis aminorūgštimis, taip tikintis fermento specifiškumo kitimo įvairiems modifikuotiems nukleozidams ar net nukleotidams.

3.1.3. 5'-OH grupę koordinuojančių aminorūgščių mutacijos

Ankstesnių tyrimų metu jau analizuoti A46 ir Y48 pokyčiai į glicinus (Skrodenytė, 2023), tad šiuo atveju nuspręsta atlikti atsitiktinę mutagenezę šiose pozicijose. Įvykdžius atsitiktinę mutagenezę ir išgryninus suminę plazmidę iš PGR mišinio, vykdyta papildoma ligavimo reakcija (2.2.19. skyrius) ir ligavimo mišinys cheminės transformacijos būdu transformuotas į *E.coli* DH10B Δ pyrFEC kamieną. Aktyvūs klonai atrinkti ant selektyvios M9 minimalios agaro terpės su N^4 -benzoil-2^c-deoksicitidinu. Sekoskaitos rezultatai parodė, jog 46-osios pozicijos aktyvūs mutantai gauti su alaninu ar glicinu, o 48-osios pozicijos – su fenilalaninu arba triptofanu. Atsižvelgiant į šiuos duomenis, pasirinkta toliau patikrinti F14_Y48F ir F14_Y48W mutantų aktyvumus. Išgrynintų baltymų koncentracijos: F14_Y48F – 17,54 mg/mL (išeiga – 52,62 mg baltymo iš 200 mL LB terpės), F14_Y48W – 16,11 mg/mL (išeiga – 48,33 mg baltymo iš 200 mL LB terpės). 9-oje lentelėje palygintos mutantinių baltymų kinetinės konstantos.

2°-aeoksicitiainas								
Fermentas	<i>К</i> м, М	V _{max} , M/min	kcat, 1/s	kcat/KM, 1/M×s				
F14_wt $(1,2 \pm 0,3) \times 10^{-4}$ $(3,1 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ $(0,33 \pm 0,01) \times 10^{-1}$ $(3,1 \pm 0,4) \times 10^{4}$								
F14_Y48F	$(2,7\pm0,5)\times10^{-3}$	$(2,8\pm0,5)\times10^{-3}$	$(3,1\pm 0,6) \times 10^{1}$	$(1,1\pm 0,3) imes 10^4$				
F14_Y48W	$(6,1\pm0,2)\times10^{-4}$	$(8,8\pm0,2)\times10^{-4}$	$(1,1\pm0,02)\times10^{1}$	$(1,7\pm0,03)\times10^4$				
		N ⁴ -benzoil-2'-deok	sicitidinas					
F14_wt	F14_wt $(9,8 \pm 2,6) \times 10^{-5}$ $(2,4 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ $(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-1}$ $(1,3 \pm 0,1) \times 10^{3}$							
F14_Y48F	$(2,9\pm1,5)\times10^{-4}$	$(1,2\pm0,6)\times10^{-4}$	$(0,1\pm 0,06) \times 10^1$	$(4,6\pm 0,2) \times 10^3$				
F14_Y48W $(8,7 \pm 1,1) \times 10^{-4}$ $(7,7 \pm 2,1) \times 10^{-5}$ $(4,6 \pm 1,2) \times 10^{-1}$ $(5,3 \pm 2,6) \times 10^{2}$								

9 lentelė. F14_wt, F14_Y48F ir F14_Y48W kinetinių konstantų palyginimas.

Tirozino pasikeitimas į fenilalaniną 23 kartus padidino $K_{\rm M}$ ir 3 kartus sumažino $k_{\rm cat}/K_{\rm M}$ reikšmes su 2'-deoksicitidinu. Triptofano atsiradimas padidino $K_{\rm M}$ vertę 5 kartus bei taip pat 2 kartus sumažino katalizinio efektyvumo konstantą su tuo pačiu substratu. Kuomet kaip substratas naudotas N^4 -benzoil-2'-deoksicitidinas, F14_Y48F mutantui apskaičiuota 3 kartus mažesnė $K_{\rm M}$ vertė lyginant su laukinio tipo fermentu bei 4 kartus didesnė $k_{\rm cat}/K_{\rm M}$ konstanta. Y48W mutacija su pastaruoju substratu 9 kartus padidino Michaelio konstantą, tačiau ir 2,5 karto sumažino katalizinio efektyvumo konstantą.



7 pav. Struktūrinis F14_wt (žalias), F14_Y48F (geltonas) ir F14_Y48W (rožinis) palyginys. Paveikslėlis ruoštas Pymol programa (Schrödinger, LLC, 2015), struktūros gautos naudojantis AlphaFold2 (Jumper ir kt., 2021)

F14_wt, F14_Y48F ir F14_Y48W struktūrinio palyginio modelis atskleidžia substrato surišimo kišenės dydžio pasikeitimus bei atsižvelgiant į aminorūgščių dydį ir išsidėstymą leidžia įvertinti, kodėl buvo gauti būtent tokie kinetiniai parametrai (7 pav.). Visų pirma, nors abi mutacijos pablogino $K_{\rm M}$ vertes, lyginant su F14_wt, vis dėlto fenilalanino įvedimas į 48-ąją poziciją padidino $k_{\rm cat}/K_{\rm M}$ konstantą su N^4 -benzoil-2'-deoksiciditinu. Kaip galima matyti iš 7 pav., fenilalaninas pasisuka kitu kampu nei tirozinas, iš ko peršasi išvada, jog Y48F mutacijos atveju, surišimo centre geriau išlaikomas substratas ir efektyviau nukreipiamas į katalizės centrą.

3.1.4. Substratinio specifiškumo analizei naudotų substratų apžvalga

Po kinetinių parametrų nustatymo, analizuoti visų septynių mutantinių baltymų aktyvumai su atitinkamais substratais pagal 2.2.14. ir 2.2.15. metodikas. Iš viso patikrintas aktyvumas su 20 substratų, kurie turėjo modifikacijas ribozės, heterociklinės bazės žieduose arba abiejose vietose. 1 priede pateiktos nagrinėtų darinių struktūros su pavadinimais. 10-oje lentelėje galima matyti, kuriuos junginius deaminina mutantiniai baltymai.

10 lentelė. CDA_F14_wt ir mutantinių baltymų aktyvumai su substratais, turinčiais įvairias modifikacijas ribozės žiede. 1 – F14_N42A, 2 – F14_E44A, 3 – F14_Y48F, 4 – F14_Y48W, 5 – F14_N52I, 6 – F14_G54A, 7 – F14_N52I/G54A; žalia spalva – deaminina pilnai, geltona spalva – deaminina dalinai, pilka spalva – aktyvumas neaptiktas.

Substratas	wt	1	2	3	4	5	6	7
2 [•] -deoksicitidinas (1)								
2°,3°-dideoksicitidinas (2)								
2',5'-dideoksicitidinas (3)								
2'-O-metilcitidinas (4)								
N^4 -benzoil-2'-O-metilcitidinas (5)								
N^4 -acetil-2'-O-metilcitidinas (6)								
N^4 -2'-O-dimetilcitidinas (7)								
N^4 -acetil-2'-deoksi-2'-fluorocitidinas (8)								
N^4 -benzoil-2'-deoksi-2'2'-difluorocitidinas (9)								
3'-amino 2',3'-dideoksicitidinas (10)								
3'-levulinil- N^4 -benzoil-2'-deoksicitidinas (11)								
3'-acetil- N^4 -benzoil- 2'-deoksicitidinas (12)								
3'-azido- N^4 -benzoil-2',3'-dideoksicitidinas (13)								
N^4 -3'-O-dibenzoil-2'-deoksicitidinas (14)								
3',5'-di-O-benzoil-2'-deoksi-2',2'-difluorocitidinas (15)								
3',5'-di-O-acetil- O^4 -benzil-5-fluoro-2'-deoksicitidinas (16)								
3',5'-di-O-acetil- O^4 -propargil-5-fluoro-2'-deoksicitidinas (17)								

Substratas	wt	1	2	3	4	5	6	7
$3^{\circ},5^{\circ}$ -di-O-acetil- O^{4} -n-butil-5-fluoro-2'-deoksicitidinas (18)								
5'-levulinil- N^4 -benzoil-2'-deoksicitidinas (19)								
Kapecitabinas (20)								

Lentelėje substratai išskirstyti į tris didesnes grupes – į pirmąją grupę patenka junginiai, modifikuoti 2'-OH ir/arba N^4 pozicijose ((1) – (9) substratai), į antrąją – modifikuoti 2'-OH, 3'-OH ir/arba N^4 pozicijose ((10) – (14) substratai), o į trečiąją – modifikuoti 2'-OH, 3'-OH, 5'-OH ir/arba N^4 pozicijose ((15) – (20) substratai). Paskutiniajai grupei priskiriamas kapecitabinas, arba kitaip 5'-deoksi-5-fluoro- N^4 -pentiloksikarbonilcitidinas, yra jau chemoterapijoje pritaikomas antimetabolitas, parduodamas Xeloda[®] vardu. CDA_F14 hidrolizuoja šį vaistą iki aktyvios jo formos – 5'-deoksi-5fluorouridino. 3'-azido-2',3'-dideoksicitidino deamininimo produktas 3'-azido-2',3'-dideoksiuridinas, žinomas kaip zidovudinas, naudojamas gydyti ŽIV. Dalies kitų, 10 lentelėje pateiktų substratų, produktai kol kas dar yra tik klinikinių tyrimų stadijose. Substrato (2) produktas 2',3'-dideoksiuridinas pasižymi priešvirusinėmis ir priešvėžinėmis savybėmis, lygiai taip pat kaip ir 2'-O-metiluridinas (substratų (4), (5), (6), (7) produktas), 3',5'-di-O-benzoil-2'-deoksi-2',2'-difluorouridinas (substrato (15) produktas) ar 3'-O-benzoil-2'-deoksiuridinas (substrato (14) produktas). Substratas (9) yra vaisto gemcitabino analogas, o kaip minėta 1.4.2. skyriuje, gemcitabino deamininimas iki 2'-deoksi-2',2'-difluorouridino paverčia jį neaktyviu.

3.1.5. CDA_F14 mutantų substratinis specifiškumas

Sukonstruoti mutantiniai baltymai buvo aktyviausi su junginiais iš pirmosios substratų grupės – hidrolizė aptikta su 8 iš 9 substratų. 2' pozicijos mutantai F14_N52I, F14_E44A, F14_N52I/G54A ir 48-osios pozicijos tirozino mutantas F14_Y48F deaminino daugiausiai šios grupės citidino darinių. F14_Y48W mutantas prasčiau nei F14_Y48F hidrolizavo 2',3'-dideoksicitidiną bei nebuvo aktyvus su N^4 -benzoil-2'-deoksi-2',2'-difluorocitidinu, nors fenilalanino mutantas gebėjo tai padaryti. Priežastis, kodėl galėjo taip nutikti, galimai slypi tarp skirtingų triptofano, fenilalanino ir tirozino įgyjamų konformacijų baltyme (7 pav.). Triptofanas sukuria kiek mažesnę substrato prisijungimo kišenę lyginant su tuo, kai toje pačioje pozicijoje yra fenilalaninas ar tirozinas, todėl citidino darinys, turintis du fluoro pakaitus, prijungtus ribozės žiede, tokio mutanto nėra deamininamas, kadangi mažesnė substrato surišimo kišenė apsunkina substrato nukreipimą į katalizės centrą.

Po ilgesnės inkubacijos F14_E44A mutantas parodė aktyvumą su 4 iš 8 pirmosios grupės substratų, nors kinetinių konstantų išmatuoti ir nepavyko (8 lentelė). Kiek daugiau – 5 iš 8 substratų – deaminino F14_N42A baltymas, be to, jis pilnai hidrolizavo N^4 -acetil-2'-deoksi-2'-fluorocitidiną, ko negalėjo padaryti F14_E44A, F14_Y48F ir F14_Y48W deaminazės. Pastebėtas dėsningumas su 2'- O-metilcitidino dariniais, turinčiais pakaitus N^4 pozicijoje – didėjant pakaitui pasunkėja tokio substrato atpažinimas. Tad nei laukinio tipo fermentas bei nei vienas iš mutantų nedeaminino N^4 -benzoil-2'-O-metilcitidino, nors 2' ir 5' ribozės pozicijų mutantai hidrolizavo N^4 -acetil-2'-O-metilcitidiną ir N^4 -2'-O-dimetilcitidiną.

Apžvelgiant antrosios grupės substratų atpažinimą, laukinio tipo fermentas deaminino tik vieną junginį - 3'-amino-2',3'-dideoksicitidiną. Likę šios grupės dariniai nebuvo deamininami, o ir sukonstruoti mutantiniai baltymai nerodė aktyvumo su (10) – (14) substratais. Iš trečiosios grupės substratų aktyvumas aptiktas su kapecitabinu – jį deaminino laukinio tipo fermentas, taip pat F14_Y48F, F14_Y48W, F14_N52I, F14_G54A ir F14_N52I/G54A mutantai. Pastarieji penki baltymai gebėjo deamininti 5'-levulinil- N^4 -benzoil-2'-deoksicitidiną, kas prieš tai nebuvo būdinga tiek F14_wt fermentui, tiek kitoms 23 su šiuo substratu tikrintoms metagenominėms citidino deaminazėms (Urbelienė ir kt., 2023).

3.1.6. 5'-levulinil-N⁴-benzoil-2'-deoksicitidino atpažinimas fermento aktyviajame centre

Aptikus, kad keli iš sukonstruotų mutantinių baltymų geba hidrolizuoti (19) substratą, nuspręsta patikrinti galimas šio aktyvumo priežastis. Atliktas molekulinis dokinimas su internetinio įrankio Diffdock (Ketata ir kt., 2023) pagalba – į fermentų aktyviuosius centrus su cinko atomu įstatytas (19) substratas. Gavus modelius pasirinkta paanalizuoti trijų tipų atstumus juose – atstumą tarp Zn^{2+} atomo ir N4 pozicijos substrate, tuomet tarp Zn^{2+} atomo ir katalizei reikalingo Glu55 bei tarp Glu55 ir N4 pozicijos. 11-oje lentelėje pateikta, kaip vienas nuo kito yra nutolę pastarieji objektai. F14_N52I modelio pavyzdį galima pamatyti 2 priede.

11 lentelė. F14_wt ir sukonstruotų mutantinių baltymų atstumai tarp atitinkamų atomų, kuomet aktyviajame centre koordinuojamas 5'-levulinil-N⁴-benzoil-2'-deoksicitidinas; * - stulpelyje "Tarp Zn²⁺ ir Glu55, Å", pirmas skaičius yra atstumas tarp Zn²⁺ ir COOH grupės karbonilinio deguonies atomo, o skaičius skliaustuose – atstumas tarp Zn²⁺ ir COOH grupės hidroksilo liekanos.

Baltymas	Tarp Zn ²⁺ ir	Tarp Zn ²⁺ ir	Tarp Glu55 ir
-	N4 atomo, Å	Glu55, Å*	N4 atomo, Å
F14_wt	5,3	3,6 (4,3)	5,1 (5,3)
F14_N52I	5,7	3,4 (4,3)	7,0 (7,1)
F14_G54A	5,3	4,1 (4,1)	6,3 (6,3)
F14_N52I/G54A	5,5	3,5 (4,4)	4,3 (4,7)
F14_Y48F	5,4	4,1 (4,2)	4,9 (5,2)
F14_Y48W	6,4	3,5 (4,3)	7,8 (7,8)

Panagrinėjus 11-os lentelės duomenis galima pastebėti, jog nuotolis tarp cinko ir N4 atomo nepasikeitė arba padidėjo, lyginant su laukinio tipo fermentu. Savo ruožtu cinko atomas ir Glu55 karbonilinės grupės deguonis F14_N52I fermente atsirado per 0,2 Å arčiau, o F14_N52I/G54A ir F14_Y48W fermentuose - per 0,1 Å arčiau. F14_Y48F mutantas pasižymėjo pailgėjusiu atstumu tarp pastarųjų dviejų objektų, tačiau jo struktūroje 0,2 Å sumažėjo atstumas tarp Glu55 karbonilinės grupės deguonies ir N4 atomo. Tokie dėsningumai rodo galimą (**19**) substrato pozicionavimą arčiau katalizinio centro, lengvesnį atpažinimą, kas ir nulemia naujai atsirandantį specifiškumą lyginant su F14_wt. Vis dėlto, F14_G54A mutanto atveju atstumai tarp cinko ir Glu55 bei tarp Glu55 ir N4 atomo kaip tik pailgėjo, dėl ko sunku pasakyti, kodėl šis baltymas taip pat pradėjo deamininti (**19**) junginį. Planuojami molekulinės dinamikos tyrimai ateityje galėtų padėti sukurti tikslesnius modelius, atskleidžiančius detalesnę informaciją.

3.2. dCTP deaminazės substratinio specifiškumo rezultatai

Iki šiol mokslinėje literatūroje nėra daug duomenų apie *E.coli* dCTP deaminazės (Dcd) substratinį specifiškumą modifikuotiems nukleotidams. Kol kas žinoma tik tiek, kad Dcd nedeaminina dCDP, dCMP, deoksicitidino, CTP, CDP, CMP, citidino bei citozino (Beck ir kt., 1975). Dcd specifiškumo tyrimai svarbūs dėl kelių dalykų. Visų pirma, tai padėtų išsiaiškinti, ar Dcd galėtų dalyvauti natūralaus ar nenatūralaus deoksinukleotido katabolizme ir atstatyme. Be to, leistų įvertinti, ar fermentas turi potencialo metabolizuoti deoksinukleotidus, kurie turi priešvėžinių ar priešvirusinių savybių. Tad atsižvelgiant į mokslinėse publikacijose jau aprašytas mutacijas (1.3.1. skyrius), nuspręsta atlikti 107-oje pozicijoje esančio leucino pakeitimą į alaniną (Dcd_L107A) ir 121-oje pozicijoje esančio histidino pakeitimus į gliciną (Dcd_H121G) arba alaniną (Dcd_H121A), tikintis, jog šios mutacijos turės įtakos fermento substratiniam specifiškumui.

3.2.1. Dcd_wt ir mutantinių baltymų gryninimas

Po tikslinio geno taikiniui specifinės mutagenezės (2.2.18. skyrius), išgryninti Dcd_wt ir trys mutantiniai baltymai – Dcd_L107A, Dcd_H121G ir Dcd_H121A – pagal 2.2.11. metodiką su keletu pakeitimų. Baltymų raiška indukuota įpylus 0,5 mM IPTG ir po indukcijos ląstelės augintos 30 °C temperatūroje 3 val. Ląstelių ardymui naudotas kalio fosfatinis buferis pH 7,2, o baltymų gryninimo metu prie sorbento neprisijungę baltymai nuplauti kalio fosfatiniu buferiu pH 7,2 su 0,1 M NaCl bei eliucijai naudotas tokios pat sudėties buferis su 0,3 M imidazolo. Baltymai dializuoti 50 mM HEPES buferyje pH 6,8 su 2 mM DTT. Gautos tokios baltymų koncentracijos: Dcd_wt – 0,534 mg/mL (išeiga – 1,60 mg baltymo iš 50 mL LB terpės), Dcd_H121A - 0,213 mg/mL (išeiga – 0,43 mg baltymo iš 50 mL LB terpės), Dcd_L107A – 0,852 mg/mL (išeiga – 2,56 mg baltymo iš 50 mL LB terpės).

3.2.2. Dcd_wt ir mutantinių baltymų aktyvumo nustatymas

Fermentinis aktyvumas matuotas pagal 2.2.16. metodiką ir atsižvelgiant į mokslines publikacijas (Johansson ir kt., 2005; Thymark ir kt., 2008b) naudotas 50 mM HEPES buferis pH 6,8 su 2 mM DTT ir 2 mM MgCl₂. 291 nm bangos ilgyje matuota dCTP sunaudojimo sugertis, esant tokioms

substrato koncentracijoms – 0,1 mM, 0,15 mM, 0,2 mM, 0,25 mM, 0,3 mM, 0,35 mM, 0,4 mM, 0,5 mM ($\Delta\epsilon = 1340 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Vieninteliam Dcd_wt baltymui pavyko išmatuoti aktyvumą ir apskaičiuoti kinetines konstantas, mutantiniai baltymai buvo neaktyvūs. 12-oje lentelėje pateiktos gautos Dcd_wt konstantų vertės.

Konstanta	Vertė
K _M , mM	$(2,0\pm0,4) imes 10^{-1}$
V _{max} , mM/min	$(3,0\pm0,3) imes10^{-2}$
kcat, 1/s	$(0,27\pm0,03) imes10^{1}$
k _{cat} /K _M , 1/M×s	$(1,4\pm 0,2) imes 10^4$

12 lentelė. Dcd wt kinetinių konstantų vertės.

Kadangi mokslinėje literatūroje nėra daug informacijos apie šio fermento K_M , V_{max} , k_{cat} ir k_{cat}/K_M vertes, šiuo metu gautus duomenis galima palyginti tik su *B.subtilis* dCTP deaminazės K_M verte – 0,05-0,36 mM (Chang ir kt., 2021) bei su vieno iš tyrimų metu nustatyta *E. coli* k_{cat} reikšme – 1,24 ± 0,09 s⁻¹ (Thymark ir kt., 2008b).

3.2.3. Dcd_wt substratinis specifiškumas

Visų pirma nuspręsta patikrinti, ar išgryninti mutantiniai baltymai nerodo hidrolizinio aktyvumo po ilgesnės inkubacijos. Ruošti 50 μL reakcijos mišiniai, kuriuose 5 mM sudarė dCTP, 5 μL fermento, 5 mM MgCl₂ ir likusi dalis 50 mM kalio fosfatinio buferio pH 7,5 su 1 mM DTT. Iš pradžių mėginiai inkubuoti 2 val. 37 °C temperatūroje, tuomet apie 18 val. kambario temperatūroje. Reakcijų produktai analizuoti pagal 2.2.15. metodiką, kaip tirpiklį naudojant amonio karbonatą. Rezultatai parodė, jog tik laukinio tipo fermentas deaminino dCTP. Tai leidžia daryti išvadą, jog buvo identifikuotos dvi substrato surišimui svarbios aminorūgštys – Leu107 ir His121.

Sekantis žingsnis buvo nustatyti, ar Dcd_wt ir mutantiniai baltymai gali deamininti keletą atrinktų modifikuotų dCTP nukleozidų. Pasirinkta substratinį specifiškumą vertinti su šiais substratais: 3'-azido-2'3'-ddCTP, 5-metil-dCTP, 2'-fluoro-dCTP, 5-propargilamino-dCTP ir 5-hidroksimetildCTP (substratų struktūros pateiktos 3 priede). Reakcijų mišiniai ruošti kaip ir dCTP atveju, tačiau aktyvumas su minėtais substratais nebuvo aptiktas. Tad bent jau iš pirminių duomenų galima teigti, jog *E.coli wt* dCTP deaminazė yra specifiškas dCTP fermentas, vis dėlto, šiam rezultatui patvirtinti ateityje reikėtų atlikti išsamesnį tyrimą nusitaikant į kitų aminorūgščių liekanų keitimą.

Išvados

- 1. CDA_F14 aktyvumą ir specifiškumą veikiančios aminorūgščių liekanos keičia substratų surišimo kišenės konfigūraciją, tokiu būdu keisdamos substrato atpažinimą.
- N42 ir E44 pakeitimai į alaninus sumažina katalizinį aktyvumą ir hidrolizuojamų substratų skaičių, Y48 aminorūgšties pakeitimai į fenilalaniną ar triptofaną padidina K_M vertes, o Y48F mutacija padidina katalizinio efektyvumo konstantą su N⁴-benzoil-2[•]-deoksicitidinu; N52I, G54A ir N52I/G54A mutacijos padidina ne tik K_M vertes, bet ir katalizinio efekty-vumo konstantą su N⁴-benzoil-2[•]-deoksicitidinu.
- 3. CDA_F14 daugialypiškumui svarbios aminorūgštys yra Y48, N52 ir G54, jų mutacijos keičia substratinį specifiškumą nukleozidams su pakaitais 5'-OH ir N4 pozicijose.
- 4. dCTP deaminazės (Ddc) L107A, H121A H121G mutacijos pilnai inaktyvuoja fermentą.
- 5. Laukinio tipo Ddc_wt ir jos mutantai L107A, H121A H121G nekatalizuoja C5, 2' ir 3' pozicijose modifikuotų nukleotidų deamininimo.

VILNIAUS UNIVERSITETAS GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Emilija Skrodenytė

Magistro baigiamasis darbas

Kryptingas dCTP ir citidino deaminazių specifinio aktyvumo keitimas

SANTRAUKA

Šio darbo metu nagrinėti du hidrolazių klasių fermentai – metagenominė citidino deaminazė CDA F14, atrasta MMB skyriuje, bei E.coli dCTP deaminazė Dcd. Pritaikius racionalųjį dizainą – atsitiktinę ir tikslinę mutagenezes – abiejų fermentų atveju analizuota, kokį poveikį atitinkamų aminorūgščių mutacijos turi tiek kataliziniam, tiek substratiniam aktyvumui. CDA F14 analizės metu keistos N42, E44, Y48, N52 ir G54 aminorūgštys, kadangi jos visos sąveikauja su substrato ribozės žiedu, o tyrimo metu domino substratai su pakaitais ribozės žiede, nes kai kurie iš jų gali būti potencialiais priešvėžiniais/priešvirusiniais vaistais. Rezultatai parodė, jog N42 ir E44, kurios turi įtakos ribozės 3'-OH grupei, yra fermento aktyvumui būtinos aminorūgštys – jų pakeitimai į alaninus ženkliai sumažino katalizinių konstantų vertes bei deamininamų substratų skaičių. Su 5'-OH grupe sąveikaujančio Y48 atsitiktinės mutacijos į fenilalaniną ar triptofaną pablogino $K_{\rm M}$ vertes su 2'-deoksicitidinu ir N⁴-benzoil-2'-deoksicitidinu. Vis dėlto, Y48F mutantas pasižymėjo padidėjusia katalizinio efektyvumo konstanta su N⁴-benzoil-2'-deoksicitidinu. N52 ir G54 aminorūgštys, kaip manoma, sudaro ryšius su 2'-OH grupe, kurių mutacijos – N52I, G54A ir dviguba mutacija N52I/G54A - taip pat padidino katalizinio efektyvumo konstantą su pastaruoju substratu. Visų septynių mutantinių baltymų substratinio specifiškumo apžvalga parodė, jog geriausiai deamininami substratai su pakaitais 2'-OH pozicijoje, o prasčiausiai - su pakaitais 3'-OH pozicijoje. Vieno substrato atžvilgiu – 5'-levulinil-N⁴-benzoil-2'-deoksicitidino – pastebėtas pasikeitęs substratinis specifiškumas. Laukinio tipo fermentas nehidrolizavo šio junginio, tuo tarpu Y48F, Y48W, N52I, G54A ir N52I/G54A mutantai pradėjo deamininti 5'-levulinil-N⁴-benzoil-2'-deoksicitidiną. Dcd tyrimo metu, atsižvelgiant į mokslinėje literatūroje rastą informaciją, sukonstruoti trys mutantai – L107A, H121A ir H121G – tikintis, jog šios mutacijos turės įtakos Dcd aktyvumui. Vis dėlto, pakeitimai pilnai inaktyvavo fermentą, o tai rodo, jog abi aminorūgštys yra reikalingos Dcd veikimui. Kadangi iki šiol nebuvo publikacijų, apie laukinio tipo Dcd aktyvumą su modifikuotais nukleotidais, šio darbo metu patikrintas ir Dcd veikimas pastarųjų substratų atžvilgiu. Rezultatai parodė, jog Dcd nedeaminino dCTP su pakaitais ribozės ar heterociklinės bazės žieduose. Ateityje planuojama išsamesnė Dcd analizė su įvairesniais substratais leistų patikimiau patvirtinti, ar Dcd yra specifiškas tik dCTP.

VILNIUS UNIVERSITY LIFE SCIENCES CENTER

Emilija Skrodenytė

Master's thesis

Directed Modification of the Specific Activity of dCTP Deaminase and Cytidine Deaminases

ABSTRACT

Two classes of hydrolase enzymes, the metagenomic cytidine deaminase CDA F14, discovered in the MMB compartment, and the *E.coli* dCTP deaminase Dcd, have been investigated in the course of this work. By applying a rational design - random and targeted mutagenesis - to both enzymes, the effect of mutations in the corresponding amino acids on both catalytic and substrate activity was analysed. In the CDA F14 analysis, amino acids N42, E44, Y48, N52 and G54 were changed as they all interact with the ribose ring of the substrate, while the study was interested in substrates with substituents in the ribose ring as some of them may be potential anticancer/antiviral agents. The results showed that N42 and E44, which affect the 3'-OH group of the ribose, are essential amino acids for the enzyme activity, and that their substitution by alanines significantly reduced the values of the catalytic constants as well as the number of substrates that they can deaminate. Random mutations of Y48 interacting with the 5'-OH group to phenylalanine or tryptophan impaired $K_{\rm M}$ values with 2'deoxycytidine and N^4 -benzoyl-2'-deoxycytidine. However, the Y48F mutant showed an increased catalytic efficiency constant with N^4 -benzoyl-2'-deoxycytidine. The amino acids N52 and G54 are thought to form bonds with the 2'-OH group, and mutations in N52I, G54A and the double mutation N52I/G54A also resulted in an increased catalytic efficiency constant with the latter substrate. A review of the substrate specificity of all seven mutant proteins showed that substrates with substituents at the 2'-OH position were the most tolerated, whereas substituents with substituents at the 3'-OH position were the least hydrolysed. For one substrate, 5'-levulinyl-N⁴-benzoyl-2'-deoxycytidine, a change in substrate specificity was observed. The wild-type enzyme did not hydrolyse this compound, whereas the Y48F, Y48W, N52I, G54A and N52I/G54A mutants started to deaminate 5'-levulinil-N⁴benzoyl-2'-deoxycytidine. Three mutants, L107A, H121A and H121G, were constructed in the Dcd assay in the light of the information available in the scientific literature, with the expectation that these mutations would have an effect on the activity of Dcd. However, the changes fully inactivated the enzyme, indicating that both amino acids are required for Dcd to function. Since no publications have been published on the activity of wild-type Dcd with modified nucleotides, the present work also tested the activity of Dcd on the latter substrates. The results showed that Dcd did not deaminate dCTPs with substituents on ribose or heterocyclic base rings. Future plans for a more detailed analysis of Dcd on a wider range of substrates would allow a more reliable confirmation that Dcd is specific only for dCTP.

Literatūros sąrašas

- Abdullah Al Awadh, A. (2022). Nucleotide and nucleoside-based drugs: Past, present, and future. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(12), 103481. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103481
- Ahlqvist, G. P., McGeough, C. P., Senanayake, C., Armstrong, J. D., Yadaw, A., Roy, S., Ahmad, S., Snead, D. R., & Jamison, T. F. (2021). Progress Toward a Large-Scale Synthesis of Molnupiravir (MK-4482, EIDD-2801) from Cytidine. ACS Omega, 6(15), 10396–10402. https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00772
- Babtie, A., Tokuriki, N., & Hollfelder, F. (2010). What makes an enzyme promiscuous? *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(2), 200–207. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.028

Bacteria deplete.pdf. (s.a.).

Beck, C. F., Eisenhardt, A. R., & Neuhard, J. (1975). Deoxycytidine triphosphate deaminase of Salmonella typhimurium. Purification and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 250(2), 609–616. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41940-6

Betts1994. (s.a.).

- Bornscheuer, U. T., & Kazlauskas, R. J. (2004). Catalytic Promiscuity in Biocatalysis: Using Old Enzymes to Form New Bonds and Follow New Pathways. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(45), 6032–6040. https://doi.org/10.1002/anie.200460416
- Broun, P., Shanklin, J., Whittle, E., & Somerville, C. (1998). Catalytic Plasticity of Fatty Acid Modification Enzymes Underlying Chemical Diversity of Plant Lipids. *Science*, 282(5392), 1315– 1317. https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1315
- Burke, A. J., Birmingham, W. R., Zhuo, Y., Thorpe, T. W., Zucoloto Da Costa, B., Crawshaw, R., Rowles, I., Finnigan, J. D., Young, C., Holgate, G. M., Muldowney, M. P., Charnock, S. J., Lovelock, S. L., Turner, N. J., & Green, A. P. (2022). An Engineered Cytidine Deaminase for Biocatalytic Production of a Key Intermediate of the Covid-19 Antiviral Molnupiravir. *Journal of the American Chemical Society*, 144(9), 3761–3765. https://doi.org/10.1021/jacs.1c11048
- Carlow, D. C., Carter, C. W., Mejlhede, N., Neuhard, J., & Wolfenden, R. (1999). Cytidine Deaminases from *B. subtilis* and *E. coli*: Compensating Effects of Changing Zinc Coordination and Quaternary Structure. *Biochemistry*, 38(38), 12258–12265. https://doi.org/10.1021/bi990819t
- Chang, A., Jeske, L., Ulbrich, S., Hofmann, J., Koblitz, J., Schomburg, I., Neumann-Schaal, M., Jahn, D., & Schomburg, D. (2021). BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: New developments and updates. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D498–D508. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1025
- Chen, K., & Arnold, F. H. (1993). Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: Sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Procee*dings of the National Academy of Sciences, 90(12), 5618–5622. https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5618
- Cobb, R. E., Chao, R., & Zhao, H. (2013). Directed evolution: Past, present, and future. *AIChE Journal*, 59(5), 1432–1440. https://doi.org/10.1002/aic.13995
- Cohen, R. M., & Wolfenden, R. (1971). The Equilibrium of Hydrolytic Deamination of Cytidine and N4-Methylcytidine. *Journal of Biological Chemistry*, 246(24), 7566–7568. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45813-4

- Conticello, S. G. (2008). The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biology*, 9(6), 229. https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-6-229
- Copley, S. D. (2015). An evolutionary biochemist's perspective on promiscuity. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(2), 72–78. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.12.004
- Copley, S. D. (2017). Shining a light on enzyme promiscuity. *Current Opinion in Structural Biology*, 47, 167–175. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.11.001
- Cosgrove, S. C., & Miller, G. J. (2022). Advances in biocatalytic and chemoenzymatic synthesis of nucleoside analogues. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 17(4), 355–364. https://doi.org/10.1080/17460441.2022.2039620
- Costanzi, S., Vincenzetti, S., Vita, A., Lambertucci, C., Taffi, S., Volpini, R., Vittori, S., & Cristalli, G. (2003). Human Cytidine Deaminase: Understanding the Catalytic Mechanism. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 22(5–8), 1539–1543. https://doi.org/10.1081/NCN-120023029
- Crum, M. A., Sewell, B. T., & Benedik, M. J. (2016). Bacillus pumilus Cyanide Dihydratase Mutants with Higher Catalytic Activity. *Frontiers in Microbiology*, 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01264
- Dinmukhamed, T., Huang, Z., Liu, Y., Lv, X., Li, J., Du, G., & Liu, L. (2021). Current advances in design and engineering strategies of industrial enzymes. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, *I*(1), 15–23. https://doi.org/10.1007/s43393-020-00005-9
- Feldman, A. W., & Romesberg, F. E. (2018). Expansion of the Genetic Alphabet: A Chemist's Approach to Synthetic Biology. Accounts of Chemical Research, 51(2), 394–403. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00403
- Fenel, F., Leisola, M., Jänis, J., & Turunen, O. (2004). A de novo designed N-terminal disulphide bridge stabilizes the Trichoderma reesei endo-1,4-β-xylanase II. *Journal of Biotechnology*, 108(2), 137–143. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.11.002
- Frances, A., & Cordelier, P. (2020). The Emerging Role of Cytidine Deaminase in Human Diseases: A New Opportunity for Therapy? *Molecular Therapy*, 28(2), 357–366. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.11.026
- Gupta, R. D. (2016). Recent advances in enzyme promiscuity. *Sustainable Chemical Processes*, 4(1), 2. https://doi.org/10.1186/s40508-016-0046-9
- Ho, L. L. Y., Schiess, G. H. A., Miranda, P., Weber, G., & Astakhova, K. (2024). Pseudouridine and N 1-methylpseudouridine as potent nucleotide analogues for RNA therapy and vaccine development. RSC Chemical Biology, 5(5), 418–425. https://doi.org/10.1039/D4CB00022F
- Hofer, A., Crona, M., Logan, D. T., & Sjöberg, B.-M. (2012). DNA building blocks: Keeping control of manufacture. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 47(1), 50–63. https://doi.org/10.3109/10409238.2011.630372
- Hult, K., & Berglund, P. (2007). Enzyme promiscuity: Mechanism and applications. *Trends in Biotechnology*, 25(5), 231–238. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.03.002
- Yang, L., Briggs, A. W., Chew, W. L., Mali, P., Guell, M., Aach, J., Goodman, D. B., Cox, D., Kan, Y., Lesha, E., Soundararajan, V., Zhang, F., & Church, G. (2016). Engineering and optimising deaminase fusions for genome editing. *Nature Communications*, 7(1), 13330. https://doi.org/10.1038/ncomms13330
- Yates, M. K., & Seley-Radtke, K. L. (2019). The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Research*, 162, 5–21. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.11.016

- Jestin, J.-L., & Vichier-Guerre, S. (2005). How to broaden enzyme substrate specificity: Strategies, implications and applications. *Research in Microbiology*, *156*(10), 961–966. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.09.004
- Johansson, E., Fanø, M., Bynck, J. H., Neuhard, J., Larsen, S., Sigurskjold, B. W., Christensen, U., & Willemoës, M. (2005). Structures of dCTP Deaminase from Escherichia coli with Bound Substrate and Product. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 3051–3059. https://doi.org/10.1074/jbc.M409534200
- Johansson, E., Mejlhede, N., Neuhard, J., & Larsen, S. (2002). Crystal Structure of the Tetrameric Cytidine Deaminase from *Bacillus subtilis* at 2.0 Å Resolution'. *Biochemistry*, 41(8), 2563–2570. https://doi.org/10.1021/bi011849a
- Johansson, E., Thymark, M., Bynck, J. H., Fanø, M., Larsen, S., & Willemoës, M. (2007). Regulation of dCTP deaminase from *Escherichia coli* by nonallosteric dTTP binding to an inactive form of the enzyme. *The FEBS Journal*, 274(16), 4188–4198. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05945.x
- 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, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2
- Kang, T. M., Yuan, J., Zhou, A., Beppler, C., & Miller, J. H. (2014). Deoxycytidine Deaminase-Deficient Escherichia coli Strains Display Acute Sensitivity to Cytidine, Adenosine, and Guanosine and Increased Sensitivity to a Range of Antibiotics, Including Vancomycin. *Journal of Bacteriology*, 196(11), 1950–1957. https://doi.org/10.1128/JB.01383-13
- Kapoor, S., Rafiq, A., & Sharma, S. (2017). Protein engineering and its applications in food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(11), 2321–2329. https://doi.org/10.1080/10408398.2014.1000481
- Ketata, M. A., Laue, C., Mammadov, R., Stark, H., Wu, M., Corso, G., Marquet, C., Barzilay, R., & Jaakkola, T. S. (2023). *DIFFDOCK-PP: RIGID PROTEIN-PROTEIN DOCKING WITH DI-FFUSION MODELS*.
- Khersonsky, O., & Tawfik, D. S. (s.a.). 8.03 Enzyme Promiscuity Evolutionary and Mechanistic Aspects.
- Kim, Y. B., Komor, A. C., Levy, J. M., Packer, M. S., Zhao, K. T., & Liu, D. R. (2017). Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nature Biotechnology*, 35(4), 371–376. https://doi.org/10.1038/nbt.3803
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*, 130(5), 797–810. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603), 420–424. https://doi.org/10.1038/nature17946
- Kreis, W., & Munkert, J. (2019). Exploiting enzyme promiscuity to shape plant specialized metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 70(5), 1435–1445. https://doi.org/10.1093/jxb/erz025
- Lachmann, N., Brennig, S., Phaltane, R., Flasshove, M., Dilloo, D., & Moritz, T. (2013). Myeloprotection by Cytidine Deaminase Gene Transfer in Antileukemic Therapy. *Neoplasia*, 15(3), 239–248. https://doi.org/10.1593/neo.121954

- Lalibert□, J., Marquez, V. E., & Momparler, R. L. (1992). Potent inhibitors for the deamination of cytosine arabinoside and 5-aza-2?-deoxycytidine by human cytidine deaminase. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 30(1), 7–11. https://doi.org/10.1007/BF00686478
- Lamare, S., Legoy, M.-D., & Graber, M. (2004). Solid/gas bioreactors: Powerful tools for fundamental research and efficient technology for industrial applications. *Green Chemistry*, 6(9), 445. https://doi.org/10.1039/b405869k
- Li, T., Liang, J., Ambrogelly, A., Brennan, T., Gloor, G., Huisman, G., Lalonde, J., Lekhal, A., Mijts, B., Muley, S., Newman, L., Tobin, M., Wong, G., Zaks, A., & Zhang, X. (2012). Efficient, Chemoenzymatic Process for Manufacture of the Boceprevir Bicyclic [3.1.0]Proline Intermediate Based on Amine Oxidase-Catalyzed Desymmetrization. *Journal of the American Chemical Society*, 134(14), 6467–6472. https://doi.org/10.1021/ja3010495
- Liang, C., Ju, W., Ding, S., Sun, H., & Mao, G. (2017). Effective Synthesis of Nucleosides Utilizing O-Acetyl-Glycosyl Chlorides as Glycosyl Donors in the Absence of Catalyst: Mechanism Revision and Application to Silyl-Hilbert-Johnson Reaction. *Molecules*, 22(1), 84. https://doi.org/10.3390/molecules22010084
- Lin, X., Liang, C., Zou, L., Yin, Y., Wang, J., Chen, D., & Lan, W. (2021). Advance of structural modification of nucleosides scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 214, 113233. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113233
- Liu, W., Shang, F., Chen, Y., Lan, J., Wang, L., Chen, J., Gao, P., Ha, N.-C., Quan, C., Nam, K. H., & Xu, Y. (2019). Biochemical and structural analysis of the Klebsiella pneumoniae cytidine deaminase CDA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 519(2), 280–286. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.167
- Lutz, S., & Iamurri, S. M. (2018). Protein Engineering: Past, Present, and Future. U. T. Bornscheuer & M. Höhne (Sud.), *Protein Engineering* (T. 1685, p. 1–12). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7366-8 1
- Mameri, H., Bièche, I., Meseure, D., Marangoni, E., Buhagiar-Labarchède, G., Nicolas, A., Vacher, S., Onclercq-Delic, R., Rajapakse, V., Varma, S., Reinhold, W. C., Pommier, Y., & Amor-Guéret, M. (2017). Cytidine Deaminase Deficiency Reveals New Therapeutic Opportunities against Cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(8), 2116–2126. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0626
- Matsubara, T., Ishikura, M., & Aida, M. (2006). A Quantum Chemical Study of the Catalysis for Cytidine Deaminase: Contribution of the Extra Water Molecule. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 46(3), 1276–1285. https://doi.org/10.1021/ci050479k
- Moro-Bulnes, A., Castillo-Acosta, V. M., Valente, M., Carrero-Lérida, J., Pérez-Moreno, G., Ruiz-Pérez, L. M., & González-Pacanowska, D. (2019). Contribution of Cytidine Deaminase to Thymidylate Biosynthesis in Trypanosoma brucei: Intracellular Localization and Properties of the Enzyme. *mSphere*, 4(4), e00374-19. https://doi.org/10.1128/mSphere.00374-19
- Nygaard, P., & Sundström, C. (1987). Low cytidine deaminase levels in human hematopoietic cell lines. *Leukemia Research*, *11*(8), 681–685. https://doi.org/10.1016/0145-2126(87)90002-6
- Pecori, R., Di Giorgio, S., Paulo Lorenzo, J., & Nina Papavasiliou, F. (2022). Functions and consequences of AID/APOBEC-mediated DNA and RNA deamination. *Nature Reviews Genetics*, 23(8), 505–518. https://doi.org/10.1038/s41576-022-00459-8
- Pongsupasa, V., Anuwan, P., Maenpuen, S., & Wongnate, T. (2022). Rational-Design Engineering to Improve Enzyme Thermostability. F. Magnani, C. Marabelli, & F. Paradisi (Sud.), *Enzyme Engineering: Methods and Protocols* (p. 159–178). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1826-4 9

- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143
- Ruan, H., Qiu, S., Beard, B. C., & Black, M. E. (2016). Creation of zebularine-resistant human cytidine deaminase mutants to enhance the chemoprotection of hematopoietic stem cells. *Protein Engineering Design and Selection*, gzw012. https://doi.org/10.1093/protein/gzw012
- Salihovic, A., Ascham, A., Rosenqvist, P. S., Taladriz-Sender, A., Hoskisson, P. A., Hodgson, D. R.
 W., Grogan, G., & Burley, G. A. (2025). Biocatalytic synthesis of ribonucleoside analogues using nucleoside transglycosylase-2. *Chemical Science*, 16(3), 1302–1307. https://doi.org/10.1039/D4SC07521H
- Savile, C. K., Janey, J. M., Mundorff, E. C., Moore, J. C., Tam, S., Jarvis, W. R., Colbeck, J. C., Krebber, A., Fleitz, F. J., Brands, J., Devine, P. N., Huisman, G. W., & Hughes, G. J. (2010). Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science*, 329(5989), 305–309. https://doi.org/10.1126/science.1188934
- Schrödinger, LLC. (2015). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.
- Seebeck, F. P., & Hilvert, D. (2003). Conversion of a PLP-Dependent Racemase into an Aldolase by a Single Active Site Mutation. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(34), 10158–10159. https://doi.org/10.1021/ja036707d
- Seley-Radtke, K. L., & Yates, M. K. (2018). The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Research*, 154, 66–86. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.004
- Serdjebi, C., Milano, G., & Ciccolini, J. (2015). Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 11(5), 665–672. https://doi.org/10.1517/17425255.2015.985648
- Shelton, J., Lu, X., Hollenbaugh, J. A., Cho, J. H., Amblard, F., & Schinazi, R. F. (2016). Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs. *Chemical Reviews*, 116(23), 14379–14455. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00209
- Singla, P., & Bhardwaj, R. D. (2020). Enzyme promiscuity A light on the "darker" side of enzyme specificity. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(2), 81–92. https://doi.org/10.1080/10242422.2019.1696779
- Skrodenytė, E. (2023). VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS CHEMIJOS INSTITUTAS.
- Thymark, M., Johansson, E., Larsen, S., & Willemoës, M. (2008a). Mutational analysis of the nucleotide binding site of Escherichia coli dCTP deaminase. *Archives of Biochemistry and Biophy*sics, 470(1), 20–26. https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.10.013
- Thymark, M., Johansson, E., Larsen, S., & Willemoës, M. (2008b). Mutational analysis of the nucleotide binding site of Escherichia coli dCTP deaminase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 470(1), 20–26. https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.10.013
- Trimble, R. B., & Maley, F. (1971). Metabolism of 4- N -Hydroxy-Cytidine in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 108(1), 145–153. https://doi.org/10.1128/jb.108.1.145-153.1971
- Urbelienė, N., Tiškus, M., Tamulaitienė, G., Gasparavičiūtė, R., Lapinskaitė, R., Jauniškis, V., Sūdžius, J., Meškienė, R., Tauraitė, D., Skrodenytė, E., Urbelis, G., Vaitekūnas, J., & Meškys, R. (2023). Cytidine deaminases catalyze the conversion of N (S, O)⁴ -substituted pyrimidine nucleosides. *Science Advances*, 9(5), eade4361. https://doi.org/10.1126/sciadv.ade4361

- Victorino Da Silva Amatto, I., Gonsales Da Rosa-Garzon, N., Antônio De Oliveira Simões, F., Santiago, F., Pereira Da Silva Leite, N., Raspante Martins, J., & Cabral, H. (2022). Enzyme engineering and its industrial applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(2), 389– 409. https://doi.org/10.1002/bab.2117
- Wang, Y.-H., Zhang, R.-R., Yin, Y., Tan, G.-F., Wang, G.-L., Liu, H., Zhuang, J., Zhang, J., Zhuang, F.-Y., & Xiong, A.-S. (2023). Advances in engineering the production of the natural red pigment lycopene: A systematic review from a biotechnology perspective. *Journal of Advanced Research*, 46, 31–47. https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.06.010
- Xiong, W., Liu, B., Shen, Y., Jing, K., & Savage, T. R. (2021). Protein engineering design from directed evolution to de novo synthesis. *Biochemical Engineering Journal*, 174, 108096. https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108096
- Zhou, C., Xue, Y., & Ma, Y. (2015). Evaluation and directed evolution for thermostability improvement of a GH 13 thermostable α-glucosidase from Thermus thermophilus TC11. BMC Biotechnology, 15(1), 97. https://doi.org/10.1186/s12896-015-0197-x

Priedai





2 priedas. 5'-levulinil-*N*⁴-benzoil-2'-deoksicitidinas F14_wt aktyviajame centre (A) ir F14_N52I aktyviajame centre (B).



3 priedas. Dcd_wt substratinio specifiškumo įvertinimui skirti substratai.