

Primjena metagenomskih esteraza za okolišno prihvatljivu razgradnju polimljične kiseline

Josić, Eva

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:597947>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Eva Josić

**PRIMJENA METAGENOMSKIH ESTERAZA
ZA OKOLIŠNO PRIHVATLJIVU
RAZGRADNJU POLIMLIJEČNE KISELINE**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Aleksandre Maršavelski i doc. dr. sc. Marka Močiboba.

Zahvale

Hvala mojim mentorima, izv. prof. dr. sc. Aleksandri Maršavelski i doc. dr. sc. Marku Močibobu. Prije svega na trudu, strpljenju i spremnosti na pomoć kada god je zatrebala. Hvala na prilici za dodatni angažman. Hvala za svo preneseno znanje, za razumijevanje i uvidavnost. Hvala zaposlenicima Zavoda za biokemiju, za društvo i savjete. Hvala i Davoru za sate strpljive pomoći za ekranom, i naravno, za nezaboravna iskustva smijeha s pauzama za prepirke u zajedničkim trenucima u labosu.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Polimeri koji grade plastiku	4
2.1.1. Biorazgradivi i enzimski razgradivi polimeri	5
2.1.2. Polimljična kiselina (PLA, engl. polylactid acid)	6
2.2. Proteini koji razgrađuju plastiku	8
2.2.1. Hidrolaze polimera	9
2.2.2. Depolimeraze PLA	12
2.3. Strukturno inženjerstvo depolimeraza	12
2.3.1. Mutagenaza	13
2.3.2. Računalno istraživanje dinamike strukture proteina	14
2.4. Metagenomika	18
2.4.1. Novotkrivena metagenomska hidrolaza: MGS0156.....	19
2.4.2. Identifikacija novog metagenomskog slijeda s potencijalnom poliesteražnom aktivnošću.....	20
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. Materijali	21
3.1.1. Kemikalije	21
3.1.2. Mediji i hranjive podloge za uzgoj bakterijske kulture	21
3.1.3. Sojevi <i>Escherichie coli</i>	21
3.1.4. Plazmidi, nukleinske kiseline i nukleotidi	21
3.1.5. Proteini.....	21
3.1.6. Boje, markeri i materijali za elektroforetske metode	22
3.1.7. Ostali materijali	22
3.2. Metode rada s bakterijama	22
3.2.1. Transformacija elektrokompetentih stanica <i>E. coli</i> elektroporacijom.....	22
3.2.2. Uzgoj bakterijske kulture na LB-ploči	22
3.2.3. Uzgoj prekonoćne bakterijske predkulture	22
3.2.4. Inokulacija glavne kulture i indukcija prekomjerne ekspresije proteina od interesa	22
3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama.....	23
3.3.1. Izolacija plazmidne DNA	23

3.3.2. Uvođenje točkaste mutacije lančanom reakcijom polimeraze	24
3.3.3. Pročišćavanje produkta lančane reakcije polimeraze i ligacija	26
3.3.4. Agarozna gel-elektroforeza	27
3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije nukleinskih kiselina	27
3.4. Metode rada s proteinima	27
3.4.1. Liza induciranih stanica iz probnih ekspresija reagensom BugBuster	27
3.4.2. Sonikacija induciranih stanica iz velikog uzgoja	28
3.4.3. Afnitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu	28
3.4.4. Diskontinuirana poliakrilamidna elektroforeza s dodatkom natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE)	29
3.4.5. Ukoncentriravanje frakcija i izmjena pufera ultrafiltracijom	30
3.4.6. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina	30
3.4.7. Semikvantitativni test hidrolitičke aktivnosti enzima prema PLA metodom difuzije enzima u agaroznom gelu sa suspenzijom polimljične kiseline	31
3.4.8. Turbidimetrijsko praćenje kinetike enzimske razgradnje polimljične kiseline u suspenziji	31
3.5. Simulacije molekulske dinamike	32
3.5.1. Priprema sustava	32
3.5.2. Parametrizacija	33
3.5.3. Simulacije molekulske dinamike	34
3.6. Analize simulacija molekulske dinamike	35
3.6.1. Korijen srednjeg kvadrata odstupanja (RMSD, eng. root mean square deviaton)	35
3.6.2. Korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (RMSF eng. root mean square fluctuation)	36
3.6.3. Analiza sekundarnih struktura	36
3.6.4. MM-GBSA račun entalpijskog i entropijskog doprinosa Gibbsovoj energiji vezanja i dekompozicija entalpijskog doprinosa po aminokiselinskim ostatcima	37
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	39
4.1.1. Ciljana mutageneza MGS0156	39
4.1.2. Probne ekspresije i optimizacija uvjeta ekspresije enzima MGS0156, MGS0156_H231Y i MGY iz <i>E. coli</i>	41
4.1.4. Aktivnost enzima MGS0156, MGS0156_H231Y i MGY prema polimljičnoj kiselini u agaroznom gelu	46
4.1.5. Praćenje kinetike hidrolize enzima MGS0156, MGS0156_H231Y i MGY u suspenziji polimljične kiseline	50
4.1.6. Analize simulacija molekulske dinamike MGS0156 i MGY	53
4.1.7. Slobodna Gibbsova energija vezanja i dekompozicija po aminokiselinskim ostatcima	65
§ 5. ZAKLJUČAK	69
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)	71
§ 7. LITERATURNI IZVORI	74

§ 8. ŽIVOTOPIS LXXX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PRIMJENA METAGENOMSKIH ESTERAZA ZA OKOLIŠNO PRIHVATLJIVU RAZGRADNJU POLIMLIJEČNE KISELINE

Eva Josić

Polimljična kiselina (PLA) je biorazgradiv polimer čija su termička i mehanička obilježja slična masovno korištenoj plastici problematičnoj za zbrinjavanje. Biorazgradivosti i fizikalna svojstva čine PLA kandidatom za proizvodnju plastike koja se može razgraditi na okolišno prihvatljiv način. Enzimi koji razgrađuju PLA, za prihvatljivu okolišnu i industrijsku razgradnju, spadaju u skupinu α/β -hidrolaza. Trenutno je identificiran mali broj hidrolaza s aktivnošću prema PLA, a jednu od najvećih posjeduje nedavno otkriveni enzim MGS0156. U ovom diplomskom radu proizvedeni su MGS0156, njegov mutant i novi, do sada neokarakterizirani homolog, pronađen pretragom metagenomskih baza podataka. Hidrolitička aktivnost enzima prema PLA provjerena je u agaroznom gelu i slobodnoj suspenziji. Ovdje je prvi put pokazana aktivnost novog metagenomskog enzima prema PLA, koja se pokazala značajno većom od većine aktivnosti zabilježenih u literaturi. Računalnim metodama utvrđeno je da oba enzima imaju mobilni poklopac, identificirane su aminokiseline veznog mjesta s najvećim doprinosom vezanju supstrata i potencijalne mete za mutacije.

(79 stranica, 41 slika, 7 tablica, 87 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: depolimeraza plastike, difuzijski test enzimske aktivnosti, kružna mutageneza, polimljična kiselina, simulacija molekulske dinamike, slobodna energija vezanja, test enzimske aktivnosti u suspenziji

Mentor: izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski i doc. dr. sc. Marko Močibob
Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
 2. prof. dr. sc. Tajana Begović
 3. doc. dr. sc. Ivana Kekez
- Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 21. veljače 2024.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

APPLICATION OF METAGENOMIC ESTERASES FOR ENVIRONMENTALLY FRIENDLY DEGRADATION OF POLYLACTIC ACID

Eva Josić

Poly(lactic acid) (PLA) is a biodegradable polymer with thermal and mechanical properties like those of widely used plastics with problematic disposal. Its biodegradability and physical properties make PLA a candidate for environmentally friendly plastic production. PLA-degrading enzymes used for environmentally friendly and industrial degradation, belong to the α/β -hydrolase group. A small number of PLA-hydrolases is identified, with one of the greatest activities belonging to a recently discovered MGS0156. Here, MGS0156, its mutant and a new, previously uncharacterized homologue discovered in metagenomic databases were produced. The hydrolytic activity towards PLA was tested in an agarose gel and a suspension. The hydrolytic activity of the new metagenomic enzyme was demonstrated for the first time and was found to be significantly higher than most activities documented in the literature. Using computational methods, it was found that both enzymes contain a mobile lid, binding site amino acids with the largest contribution to substrate binding were identified as well as potential mutation targets.

(79 pages, 41 figures, 7 tables, 87 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: circular mutagenesis, diffusion assay for enzymatic activity, enzyme activity in suspension assay, free energy of binding, molecular dynamics simulation, plastic depolymerase, polylactic acid

Mentor: Dr. Aleksandra Maršavelski, Associate Professor and Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
Reviewers:

1. Dr. Aleksandra Maršavelski, Associate Professor
 2. Dr. Tajana Begović, Professor
 3. Dr. Ivana Kekez, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Date of exam: February 21st, 2024

§ 1. UVOD

Proizvodnja i potrošnja plastike je u stalnom porastu. Vodeći problem je zagađenje okoliša uslijed neadekvatnog zbrinjavanja plastičnog otpada i nemogućnosti njegovog recikliranja. Upravljanje plastičnim otpadom svodi se na spaljivanje i recikliranje. Recikliranje je manje zastupljeno, a za njim je potreba najveća.¹ U idealnom slučaju, pri pravilnom razvrstavanju i recikliranju ili prenamjeni plastičnog otpada, postigla bi se kružna i održiva ekonomija plastike. U posljednjih nekoliko godina, velika važnost daje se biokatalizi kao mogućem i obećavajućem načinu razgradnje polimerne plastike na ponovno iskoristive monomere i oligomere.²

Zapaženi su potpuno novi fenomeni u okolišu, a izravna su posljedica prekomjerne proizvodnje plastike koja se ne zbrinjava adekvatno. Već od 2013. godine postoje zapažanja o stijenama od plastike na Havajima i u Velikoj Britaniji, a nedavno su slične tvorevine uočene na zabačenom otoku Trinidad nedaleko od Brazilske obale.^{3,4} Potonje otkriće izazvalo je veliku zabrinutost zato što Trinidad predstavlja jedan od rijetkih ekosustava s minimalnim ljudskim utjecajem, a pritom je i stanište za razmnožavanje ugroženih vrsta. Te plastične tvorbe pronađene su 2019. kao materijal koji pluta oceanom, ali i vezane na obalne stijene.⁵ Nadalje, u Kini je otkrivena nova plastična tvorevina, plastični polietilenski filmovi niske gustoće kovalentno vezani na stijene.⁶ Štetni (a možda i nepovratni) ljudski utjecaj rezultirao je novim geološkim formacijama, što je novost 21. stoljeća, a posljedica je nezbrinjavanja plastičnog otpada.

Razgradnja potrošne plastike (koja najvećim dijelom spada u kategoriju termoplastike, koju čine reciklabilni materijali) uglavnom se svodi na spaljivanje ili recikliranje s ciljem ponovne primjene u proizvodnji plastičnih ili drugih proizvoda. Metode koje se danas koriste slabo su selektivne i zahtijevaju veliku potrošnju energije.¹ Tehnologije recikliranja uglavnom se zasnivaju na taljenju, pri čemu se gube mehanički poželjna svojstva reciklirane plastike (poput tvrdoće materijala) u odnosu na novoproduzenu plastiku.⁷ Alternativni način je selektivna (bio)katalitička i (termo)kemijska razgradnja polimera na manje produkte poput monomera ili oligomera, ili pak jednostavnijih produkata poput vodika i manjih molekula korištenih za proizvodnju raznih materijala, na primjer hidrolitička i pirolitička razgradnja. Perspektivno rješenje je ono koje u obzir uzima i proizvodnju, i razgradnju plastike kako bi se osigurala kontrolirana i održiva potrošnja i recikliranje plastike odnosno potaknulo kružno

gospodarstvo. Ulaganje u pametniju sintezu polimerne plastike važno je radi dizajna novih polimera s poželjnim svojstvima, dakle polimera koji su predviđeni za recikliranje (poželjno i biorazgradivi), kako bi se smanjila proizvodnja nerazgradive plastike iz fosilnih goriva.²

Enzimska razgradnja polimera, specifično termoplastičnih, u posljednjih desetak godina intenzivno je proučavana. Trenutno je naglasak na istraživanju razgradnje polimera s kovalentnim vezama koje lako biološki hidroliziraju, poput esterskih i amidnih veza. Enzimska razgradnja polimera preduvjet je biorazgradivosti jer obje podrazumijevaju blage uvjete, poput temperature i atmosferskog tlaka. Za primjenu enzimskih katalizatora već je poznato da ima niz prednosti pred kemijskim katalizatorima, kao što su: visok obrtni broj, blaži uvjeti reakcije, visoka selektivnost, zahtijevaju manju potrošnju energije i proizvode manje otpada, a uz to su takvi katalizatori biorazgradivi. Enzimi koji razgrađuju plastične polimere nađeni su u prirodi na svim razinama ekosustava, kao što su ljudska slina, razni uzorci zemlje i antarktički led.⁸⁻¹⁰ Primjeri takvih enzima su: serinske hidrolaze (kutinaze i lipaze) i oksidaze (lakaze i peroksidaze). Istraživanje ovih enzima svodi se na strukturno proteinsko inženjerstvo s ciljem optimizacije katalitičke aktivnosti prema polimerima od interesa, što uključuje optimizaciju specifičnosti, brzine katalize i temperaturne stabilnosti enzima.

Polimljična kiselina (engl. *polylactic acid*, PLA) primjer je biopolimera koji predstavlja perspektivni materijal u kružnoj proizvodnji i razgradnji plastike. Kao takav prvi je po zastupljenosti od biorazgradivih materijala u proizvodnji plastičnih predmeta.¹¹ PLA spada u skupinu termoplastike i alifatski je polimer koji je biorazgradiv na industrijskoj skali. Termoplastični polimeri su oni koji mekšaju zagrijavanjem i ponovno stvrđnu hlađenjem, a pritom zadržavaju mehanička i fizikalno-kemijska svojstva. Zbog toga ih se može više puta termički tretirati, mehanički oblikovati i koristiti. Dobiva se iz prirodnih izvora kao što su kukuruzni škrob i krumpir, a industrijski najčešće sintezom iz laktida, dimera mliječne kiseline. Vrlo često je korišten u proizvodnji prehrambene ambalaže, u medicini u medicinskoj opremi (kao što su implantati) zato što je biokompatibilan. Navedena obilježja i široka primjenjivost¹² čine ga idealnim materijalom za razgradnju pomoću enzima.

Svrha ovog diplomskog rada je istražiti mogućnost pronalaska neokarakteriziranog hidrolitičkog enzima s potencijalnom aktivnošću prema PLA koristeći se prethodno okarakteriziranom poliesterautom MGS0156 kao polazištem u analizi metagenomskih baza podataka. U ovom diplomskom radu proučena je aktivnost već okarakterizirane poliesteraze MGS0156 prema polimljičnoj kiselini kao supstratu.¹³ Poliesteraza MGS0156 pokazala je

visoku aktivnost prema nizu supstrata, te kriptičnu aktivnost prema PLA. Kriptična aktivnost enzima značajna je u slučaju serinskih hidrolaza koje, ovisno o vrsti supstrata ili strukturnoj modifikaciji enzima, mogu pokazivati esteraznu, amidaznu ili proteaznu aktivnost.¹⁴ Cilj ovog rada je identificirati novu poliesterazu iz metagenomskih baza podataka temeljem sličnosti u aminokiselinskom slijedu s MGS0156, te istu heterologno eksprimirati u bakteriji *Escherichia coli* i ispitati aktivnost prema PLA. Osim navedenog, cilj rada je eksperimentalno kvalitativno i kvantitativno istražiti aktivnost esteraze MGS0156 prema PLA, te računalnim simulacijama i analizama utvrditi pojedini doprinos bočnih ogranaka i polipeptidne okosnice veznog mjesta enzima u vezanju oligomera mliječne kiseline različitog enantiomernog sastava. Također, iz literature je poznat bočni ogranak čija bi promjena prema teorijskim računima QM/MM (engl. *quantum mechanics/molecular mechanics*, hibridna metoda koja se koristi za proučavanje kemijskih reakcija u većim sustavima poput proteina)¹⁵ mogla dovesti do veće hidrolitičke aktivnosti te će se u ovom radu to eksperimentalno provjeriti uvođenjem točkaste mutacije.

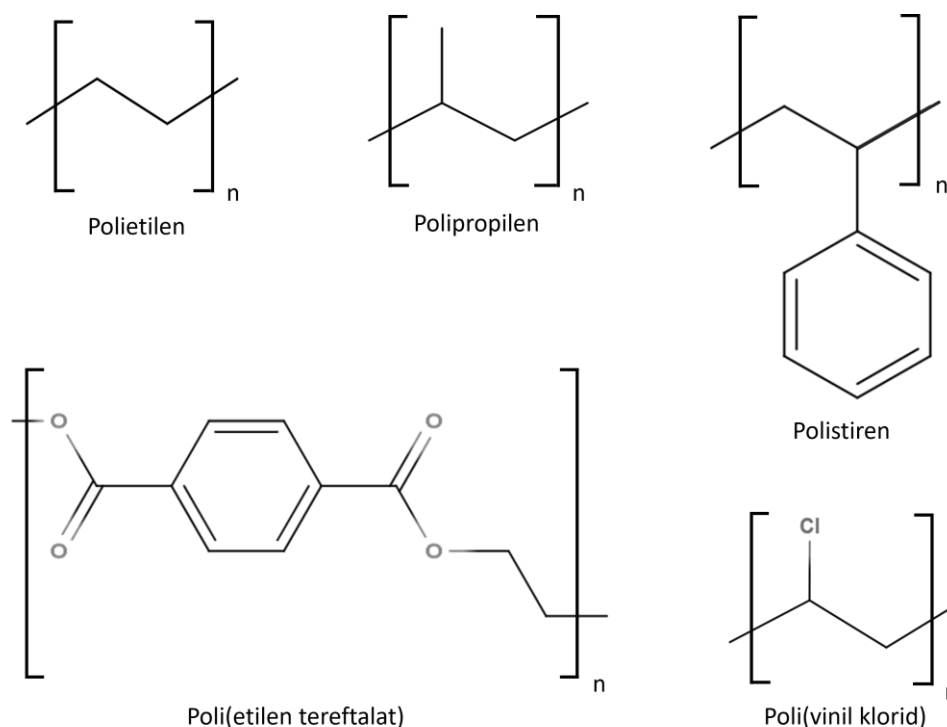
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Polimeri koji grade plastiku

Prema IUPAC-u (engl. *International Union for Pure and Applied Chemistry*, skraćeno IUPAC), polimeri su molekule velike relativne molekulske mase čija je struktura izvedena, konceptualno ili doslovno, iz više podjedinica molekula manje relativne molekulske mase.¹⁶ Neki polimeri se javljaju u prirodi, dok se mnogi sintetiziraju isključivo u laboratorijskim ili industrijskim uvjetima uz pomoć katalizatora i inicijatora. Mogu se klasificirati po raznim kriterijima, a jedna od uobičajenih generalnih podjela je na temelju kemijskog sastava i fizikalnih svojstava na neutralne polimere, polielektrolite i blok-kopolimere.

Plastični polimeri spadaju u skupinu sintetskih polimera koji imaju fizikalna svojstva poput otpornosti na toplinu, čvrstoću, plastičnost kao i mnoga druga. Nadalje, plastični polimeri dijele se prema mehaničkim i termičkim svojstvima na termoplastiku, elastomere i duromere. Elastomeri su iznimno elastični polimeri koji grade gume i strogo se ne smatraju plastikom. Termoplastični polimeri su oni s niskim talištem, zbog čega su poželjniji za recikliranje. S druge strane, duromerna plastika je mehanički, termički i kemijski izuzetno stabilna zbog čega i u ekstremnim uvjetima zadržavaju čvrstoću i oblik što je čini problematičnom za recikliranje. Termoplastika u svojoj građi sadrži neumrežene lance polimera, dok duromerna plastika ima kovalentna umreženja između lanaca.¹⁷

Okolišno prihvatljivi, odnosno polimeri pogodni za recikliranje, su polimeri iz skupine termoplastike u koju spadaju poli(etilen-tereftalat) (PET), polietilen visoke gustoće (HDPE) i niske gustoće (LDPE), poli(vinil klorid) (PVC), polipropilen (PP), polistiren (PS), polikarbonati (PC), poliuretan (PU), poliakril (PA), polimljična kiselina (PLA) i poli(metilmetakrilat) (PMMA). Najveća je potrošnja PP, HDPE i LDPE, PVC i PET materijala čija struktura je prikazana na slici 1.¹⁸



Slika 1. Strukturne formule najčešće korištenih polimera u proizvodnji termoplastike.

Mogućnost recikliranja polimera PET intenzivno je proučavana zbog njegove velike potrošnje u posljednjih nekoliko godina. Uz to, novija istraživanja pokazuju da može biti i biorazgradiv.¹⁹ S druge strane, PLA je i biorazgradiva i kompostabilna, s nešto slabijim mehaničkim svojstvima nego primjerice PET, ali perspektivom za široku primjenu i lakšu okolišnu i industrijsku razgradnju u odnosu na najkorištenije plastične polimere (PE, PP, PVC, PS, PET). Zbog navedenih prednosti raste interes industrije i akademije za optimizaciju enzimske aktivnosti za razgradnju plastičnih materijala.^{11,20}

2.1.1. Biorazgradivi i enzimski razgradivi polimeri

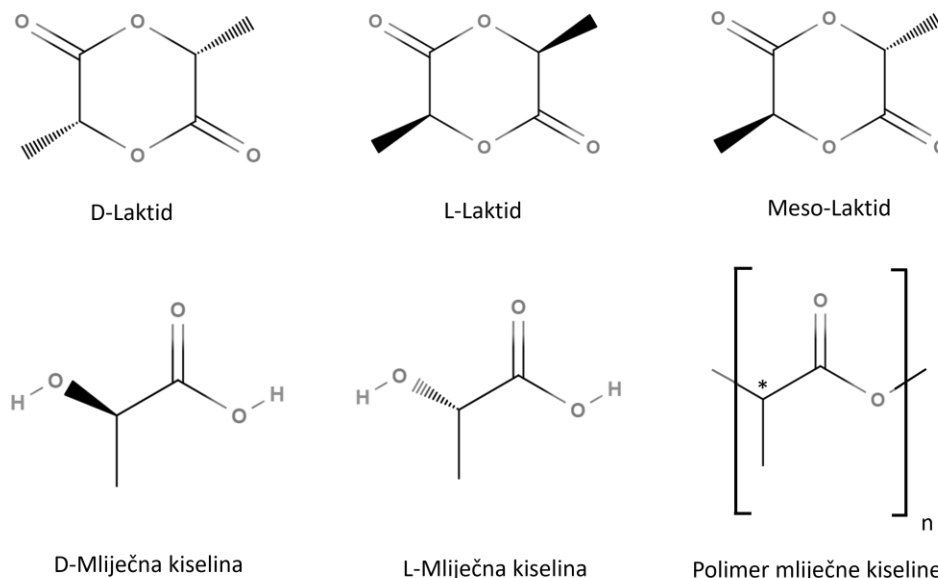
Prema IUPAC-u biorazgradivost je definirana kao „degradacija uzrokovana enzimatskim procesom koji je posljedica aktivnosti stanica“ uz bilješku da je definicija „modificirana za isključivanje abiotičkih enzimatskih procesa“.²¹ Primjeri biorazgradivih polimera su poliglikolna kiselina (PGA), polimliječna kiselina (PLA), poli(hidroksialkanoati) (PHA), polikaprolakton (PCL), poli(butilen sukcinat) (PBS) i polivinilni alkohol (PVA). Za polimere PA, PE, PET, PLA, PBS, i PU pokazano je da su enzimski razgradivi, ali uglavnom je ta razgradnja vrlo spora.²²⁻²⁴ PET i PLA su kao što je i spomenuto najzanimljiviji za enzimsku razgradnju, stoga se i najviše proučava njihova razgradnja. Najbolje je proučena razgradnja PET-a, a u manjoj mjeri razgradnja PLA.

2.1.2. Polimljična kiselina (PLA, engl. polylactid acid)

Polimljična kiselina je termoplastični alifatski poliestar, biorazgradiv u uvjetima industrijske razgradnje. PLA je biopolimer koji se dobiva iz prirodnih izvora poput kukuruznog škroba, krumpira, riže, pšenice i šećerne trske. Monomer polimljične kiseline u prirodi proizvode bakterije mliječnog vrenja u visokom prinosu. PLA ima usporediva mehanička i termička svojstva kao često korišteni polimeri poput polipropilena i poli(etilen tereftalata), međutim oni nisu biorazgradivi.²⁵ Veliku prednost ima zbog kompostabilnosti što olakšava zbrinjavanje otpada PLA plastike. Najčešće se koristi u proizvodnji plastičnih pakiranja za hranu, poljoprivrednih tlo pokrivača (koji su tradicionalno proizvedeni iz polipropilena i/ili polietilena), u farmaceutici i medicini u sastavu kopolimera u sustavima za dostavu hidrofobnih lijekova (zbog svoje biokompatibilnosti). Također, moguće ju je 3D printati pa tako predstavlja i idealnog kandidata za izradu implantata u regenerativnoj i dentalnoj medicini.²⁶

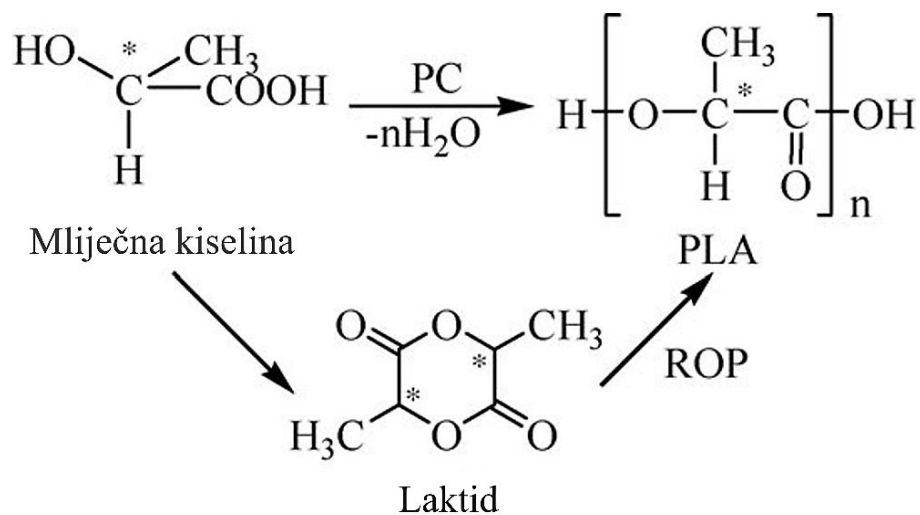
PLA ima svoja ograničenja poput veće lomljivosti, slabije elastičnosti, niže termičke stabilnosti i manje kristaliničnosti u usporedbi s tradicionalno korištenom termoplastikom (PET, PE, PP).²⁷ Navedena svojstva mogu se poboljšati raznim primjesama primjerice dodatkom drugih biopolimera ili polimera za povećanje plastičnosti.²⁵

Polimer polimljične kiseline građen je od monomera, mliječne kiseline, odnosno 2-hidroksipropionske kiseline. Monomer ima kiralni (asimetrični) ugljikov atom, zbog čega monomeri pa tako i polimeri imaju stereoizomere (slika 2). Industrijskom proizvodnjom iz biljnih ugljikohidrata bakterijskom fermentacijom uglavnom se dobiva L-forma, a petrokemijska proizvodnja daje racemičnu smjesu. Komercijalno korištena PLA obično nije homo- L- ili homo-D-polimer (PLLA; PDLA) zbog visokog tališta izotaktičnih polimernih krutina. Tijekom oblikovanja proizvoda homo-PLLA ili homo-PDLA došlo bi do raspada zato što je temperatura taljenja materijala viša od temperature raspada. U proizvodnji se koriste polimeri koji u lancu imaju mali udio D-, odnosno L- forme što snižava talište ispod temperatura raspada.²⁸



Slika 2. Strukturne formule monomera, cikličkog dimera (laktida) i polimera mliječne kiseline. Zvezdica predstavlja kiralni ugljikov atom.

Najčešća metoda sinteze polimljične kiseline u industrijskoj proizvodnji je iz laktida s platinom kao katalizatorom kroz polimerizaciju uz otvaranje prstena (engl. *ring-opening polymerization*, ROP) kao što je prikazano na slici 3.²⁹



Slika 3. Sinteza polimera mliječne kiseline iz laktida polimerizacijom uz otvaranje prstena (engl. *ring-opening polymerization*, skraćeno ROP) i mliječne kiseline polikondenzacijom (engl. *polycondensation*, skraćeno PC), preuzeto i prilagođeno iz izvora Negi et al.³⁰

Selekcijom odgovarajućih katalizatora i stereoizomera moguće je stereokemijski kontrolirati polimerizaciju u ROP-u.³¹ Produkti polimerizacije prema stereokemiji su ataktični, sindiotaktični ili izotaktični. Izotaktični produkti imaju sve bočne lance s iste strane polimernog lanca, sindiotaktični pravilno alternirajuće bočne lance s obzirom na polimerni lanac, a ataktični su oni s nasumičnim razmještajem bočnih skupina u polimernom lancu. Izotaktični produkti, PLLA ili PDLA, imaju T_m oko 170 °C i polukristalinični su, kao i sindiotaktički koji imaju T_m oko 150 °C, dok je ataktična PLA amorfna i lomljiva.³²

Razgradnja *in vivo* (na 37 °C) traje više desetljeća dok industrijska (na 60 °C i 50 % relativne vlažnosti atmosfere) traje 180 dana.³³ Razlog spore razgradnje PLA *in vivo* je njena hidrofobnost i visoka kristaliničnost. Poboljšanje razgradnje moguće je dodatkom primjesa kao kopolimera D,L-LA, no u najboljem slučaju recikliranje će biti najuspješnije optimiziraju li se uvjeti za kućno kompostiranje PLA materijala.³⁴ PLA i produkti okolišne razgradnje PLA nisu toksični, i njihova bioakumulacija nema štetni utjecaj na mikrobnu populaciju u tlu, vodene ekosustave ili na globalno zdravlje.³⁵

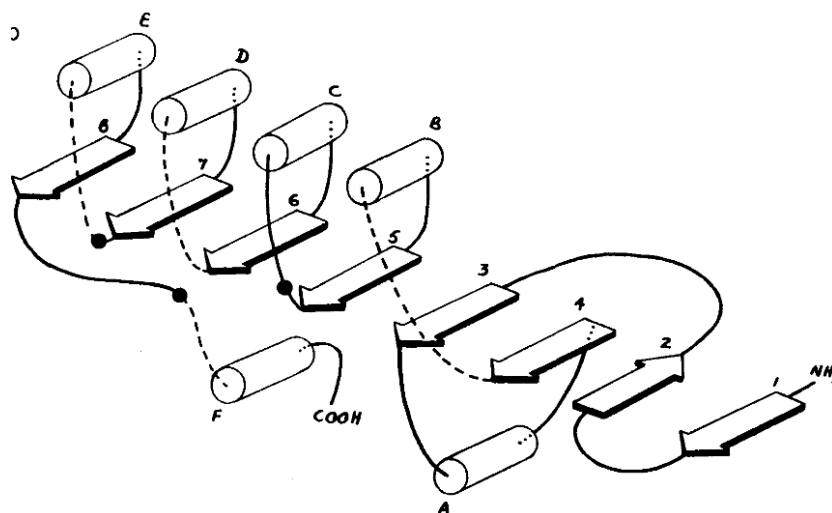
2.2. Proteini koji razgrađuju plastiku

Enzimska razgradnja polimera je novo područje istraživanja te se zasad svodi na polimere s lako hidrolizabilnim vezama kao što su esterske i amidne, dakle na razgradnju polimera poput PET, PLA, a sve češće i PU te PA. Produkti enzimske razgradnje plastičnih polimera su monomeri i/ili oligomeri. Postoji rastući interes u industriji za ovakvim enzimima, međutim upotreba enzima za depolimerizaciju zahtijeva optimizaciju termičke stabilnosti enzima, katalitičke aktivnosti, ekspresije, specifičnosti prema supstratu od interesa kao i niza drugih obilježja. Primjeri enzima koji razgrađuju polimere su serinske hidrolaze (kutinaze, lipaze) i oksidaze (lakaze i peroksidaze). Za razliku od termoplastike, enzimska razgradnja duromera i elastomera je vrlo slabo istražena zbog ograničene enzimske razgradnje kemijskih veza prisutnih u takvim polimerima.

Enzimi s depolimeraznom aktivnošću prema plastici otkriveni su u prirodi u raznim nišama ekosustava. Otkriveni su u uzorcima zemlje iz raznih dijelova svijeta, u genomima raznih vrsta gljiva, u antarktičkom ledu.^{36,37} Najčešće proučavani enzimi spadaju u lipaze, kutinaze i esteraze, makar novootkriveni enzimi imaju obilježja koja su karakteristična za svaku od navedenih skupina tako da se takva klasifikacija postepeno odbacuje.³⁸

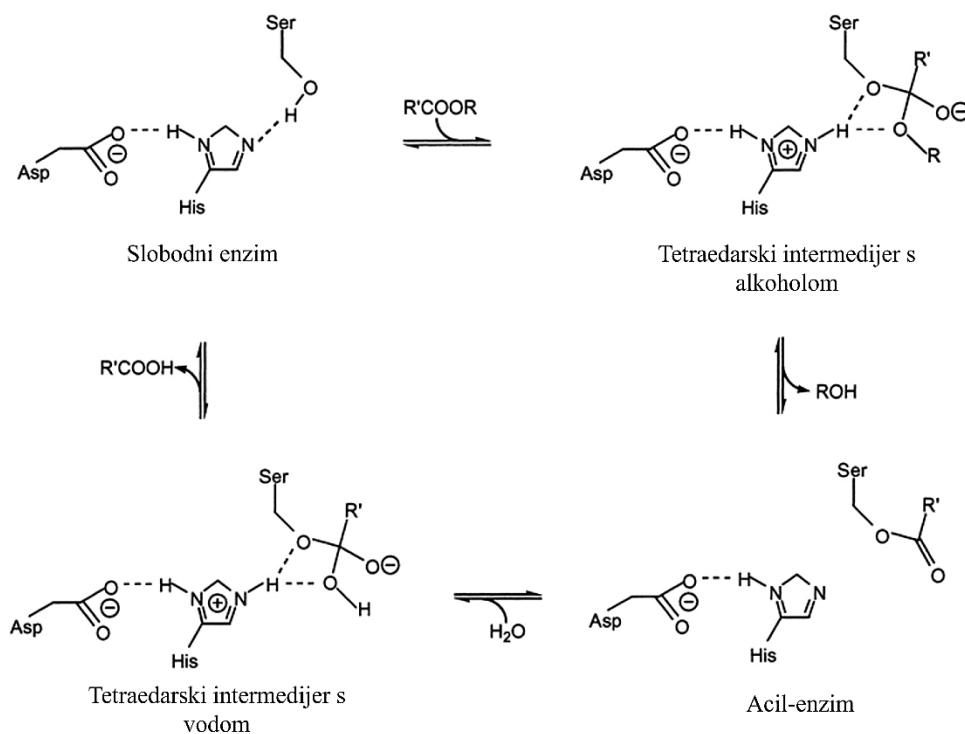
2.2.1. Hidrolaze polimera

U posljednjih 50 godina otkrivene su stotine enzima s depolimeraznim djelovanjem prema sintetskim plastičnim polimerima. Interes i istraživanje rastu i sa sve većom primjenom računalnih metoda u biokemiji npr. kroz rudarenje podataka (engl. *data mining*) iz metagenomskih baza podataka.³⁹ Najčešće su to globularni proteini, većina dosad okarakteriziranih spadaju u α/β -hidrolaze (serinske hidrolaze), koji mogu biti ekstracelularne ili transmembranske hidrolaze s transmembranskom domenom. Shema njihove strukture prikazana je na slici 4, a mehanizam serinskih hidrolaza prikazan je na slici 5.



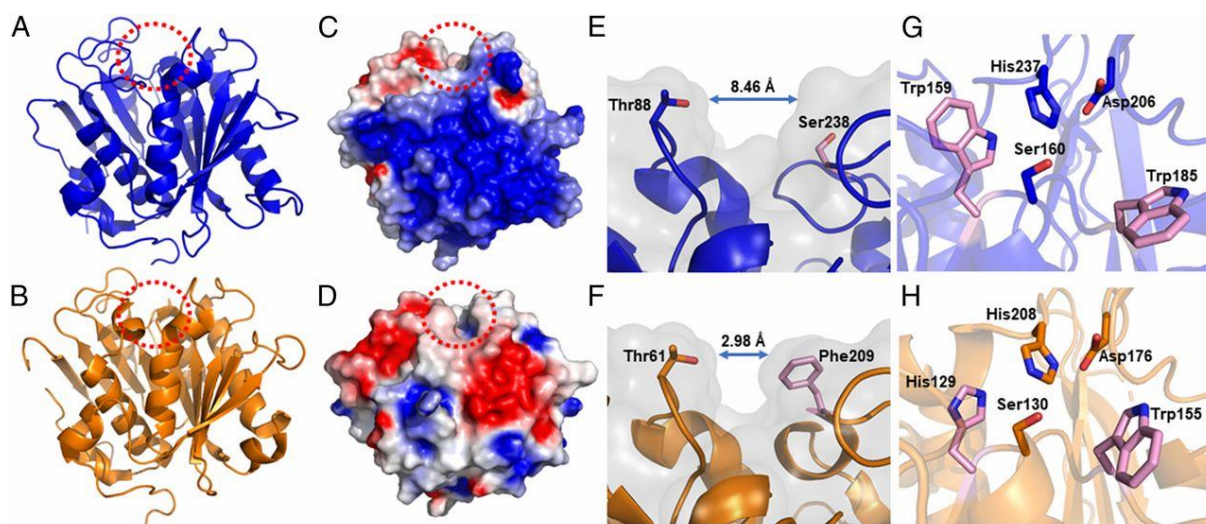
Slika 4. Shematski prikaz α/β -hidrolaznog motiva. Strjelice predstavljaju segmente koji čine β -ploče (1-6), a valjci segmente koji čine α -zavojnice (A-F). Preuzeto iz izvora Goldman et al.⁴⁰

Kod nekih je vezno mjesto i katalitička trijada bliže površini, ali često imaju vezno mjesto locirano u procjepu koje može imati dinamički „poklopac“.



Slika 5. Mehaniizam hidrolize ili transesterifikacije serinskih hidrolaza. U prvom koraku nastaje tetraedarski intermedijer: histidin deprotonira serin koji nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom. Elektronski par se spušta s alkoholnog kisika i zbog čega izlazi ROH skupina. Međuprodukt je acil enzim, u čije aktivno mjesto se smješta molekula vode i ponovno nastaje tetraedarski intermedijer. Molekulu vode deprotonira histidin, a OH skupina nukleofilno napada karbonilni ugljikov atom acilne skupine. Produkt zatim napušta vezno mjesto enzima. Preuzeto i prilagođeno iz izvora Raza et al.⁴¹

Neki od primjera enzima opisanih u literaturi su sljedeći: enzim PET-aza iz bakterije *Ideonella sakaiensis* okarakterizirali su Austin i suradnici 2018. godine i utvrdili da joj se povećava aktivnost prema poluaromatskim supstratima (poput PET) kada se uvedu mutacije po uzoru na kutinaze. PET-aza iz *I. sakaiensis* je serinska hidrolaza sa katalitičkim serinom koji je dio katalitičke trijade serin, aspartat i histidin, a čini evolucijski očuvani motiv (nukleofilni lakat) strukture (glicin-X1-serin-X2-glicin). Zanimljivo je da su na X1 položaju kod kutinaza i lipaza obično histidin ili fenilalanin, ali kod PET-aze iz *I. sakaiensis* na toj poziciji nalazi se triptofan (slika 6). Mutacijom triptofana na X1 poziciji u histidin, katalitički histidin preuzima ulogu stabilizacije aromatskih skupina supstrata π -interakcijama dok histidin na položaju X1 preuzima ulogu deprotonacije katalitičkog serina.⁴²



Slika 6. A) PETaza iz *I. sakaiensis*, B) kutinaza iz *T. fusca*. Obojene površine dostupne otapalu prema distribuciji elektrostatskog potencijala za C) PETazu iz *I. sakaiensis* i D) kutinazu iz *T. fusca*. Crveno je područje negativnog potencijala, plavo pozitivnog. E) Vezna pukotina PETaze koja je na slikama A) i C) označena crvenom isprekidanom linijom. F) Vezna pukotina kutinaze koja je na slikama B) i D) označena crvenom isprekidanom linijom. G) Aktivno mjesto PETaze i H) aktivno mjesto kutinaze. Po uzoru na His129 iz kutinaze, Trp159 u PETazi mutiran je u His (W159H), čime je opažena zanimljiva kompenzacija histidina 159 u ulozi katalitički aktivnog His237 koji pritom stabilizira supstrat. Druga značajna mutacija bila je zamjena serina u fenilalanin, S238F, na ulazu u vezno mjesto. Mutacija S238F uvodi nove π -interakcije i hidrofobne interakcije, dok mutacija W159H dopušta supstratu da sjeda dublje u aktivno mjesto jer ga histidin sterički manje ometa od triptofana. Uvođenje ovih mutacija povećalo je katalitičku aktivnost prema PETu. Preuzeto iz izvora Austin et al.⁴²

Još jedan zanimljiv primjer su istraživanja kutinaza Cut_1 i Cut_2 iz *Thermobifida cellulositica* Ribitsch i suradnika iz 2013., 2017. i 2022. Kutinaze (također serinske hidrolaze) Cut_1 i Cut_2 razlikuju se u slijedu aminokiselina na samo 18 pozicija, ali u specifičnosti prema supstratima i efikasnosti njihove razgradnje razlikuju se značajno. Najmanje sličnosti u strukturi imaju oko veznog mjesta. U istraživanju iz 2013. pokazano je da uvođenje mutacija u Cut_2 po uzoru na Cut_1 s ciljem povećanja aktivnosti razgradnje PET-a povećava aktivnost Cut_2 prema solubilnim supstratima, ali smanjuje prema PET-u. Također, uvođenjem niza mutacija na površini pokazano je da se promjenom nabijenih aminokiselina u neutralne (ili povećanjem hidrofobnosti općenito) postiže veća stabilizacija polimernog supstrata. Navedena opažanja pokazuju koliko su dramatične razlike u aktivnosti i specifičnosti pri samo malim promjenama u strukturi. U istraživanju iz 2017. ustanovljeno je da obje kutinaze pokazuju povećanu depolimeraznu aktivnost prema PLLA uvođenjem mutacija koje povećavaju hidrofobnost površine. Nadalje, 2022. pokazali su da Cut_1 ima veću aktivnost prema alifatskim supstratima, dok Cut_2 ima veću prema PET-u na temperaturama blizu njegovog staklišta.⁴³⁻⁴⁵

2.2.2. Depolimeraze PLA

Proteinaza K iz *Tritirachium album* prvi je enzim za koji je pokazano da posjeduje depolimeraznu aktivnost prema polimljičnoj kiselini, preferentno prema PLLA (sličnost u strukturi L-alaninu). Danas je aktivnost proteinaze K prema PLLA dobro istražena pa tako i primijenjena u inženjerstvu bioplastičnih biorazgradivih materijala. Opisani su i filmovi građeni od PLLA s imobiliziranom proteinazom K u strukturi. Enzim proteinaza K zadržava aktivnost i nakon proizvodnje filmova na 200 °C te razgrađuje PLLA film u uvjetima temperature 37 °C u 50 mM Tris-HCl puferu (pH 8,5) s gubitkom mase filma od 78 % nakon 96 sati. Ovakve spoznaje daju perspektivu industrijskoj proizvodnji samorazgradivih PLA materijala.⁴⁶

Enzimi s PLA-depolimeraznom aktivnošću pronađeni su kod sisavaca, u biljkama, ali većinom kod bakterija i gljiva. Unatoč njihovoj rasprostranjenosti u živom svijetu, mali broj PLA-depolimeraza je okarakteriziran (nekoliko desetaka), ali poznato je da sve pripadaju skupini serinskih hidrolaza. Zajedničko im je posjedovanje signalnog slijeda za ekstracelularni medij u kojem se nalazi supstrat. Trenutno postoji niz baza podataka (*The Plastics Microbial Biodegradation Database* (PMBD), *Plastic Degradation Database* (PlasticDB)), koje povlače podatke iz baza podataka NCBI-ja (*National Center for Biotechnology Information*) i UniProt-a (*The Universal Protein Resource*) s pohranjenim vrstama koje su pokazale aktivnost prema PLA i s pohranjenim depolimerazama PLA od kojih nisu svima utvrđeni sljedovi, ali je pokazana aktivnost prema PLA. Neki od njih su esteraze (preferiraju hidrolizu masnih kiselina s kraćim lancima), kutinaze, lipaze (kod lipaza poklopac prekriva vezno mjesto, a kao i kutinaze preferentno hidroliziraju masne kiseline s duljim lancima) i proteaze.

Klasifikacija prema Kawai i suradnicima vrši se na dva tipa enzima koji razgrađuju PLA tip I, proteaze, i tip II, kutinaze, esteraze i lipaze. Enzimi tipa II dalje se dijele na više esteraznih obitelji s velikom filogenetskom raznolikošću. Novootkriveni enzimi prema svojem slijedu spadaju čak u potpuno nove esterazne obitelji.^{13,47}

2.3. Strukturno inženjerstvo depolimeraza

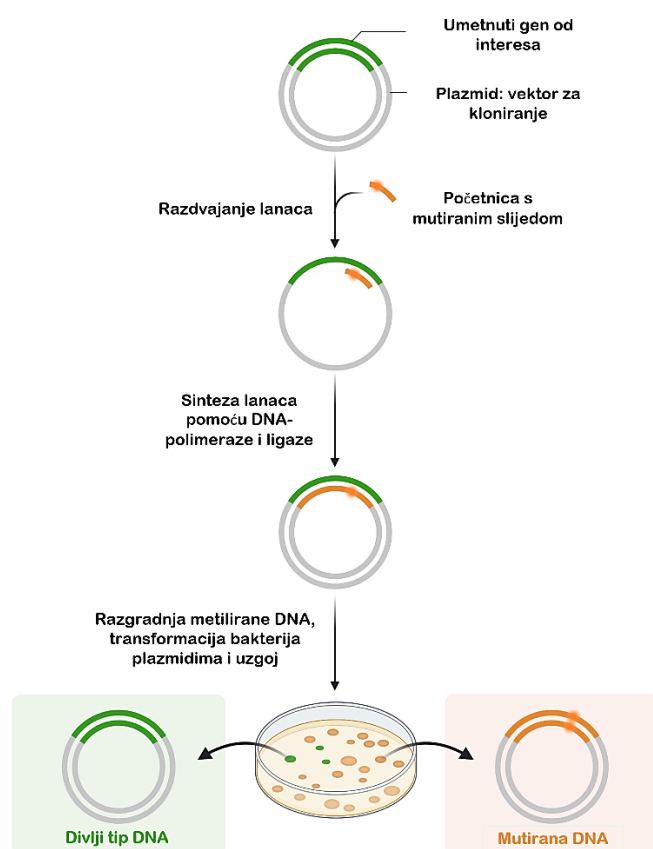
Prilikom optimizacije aktivnosti putem promjene proteinske strukture uzima se u obzir niz strukturnih obilježja proteina: efekt naboja površine (polarnosti/hidrofobnosti), volumen veznog mjesta, prisustvo poklopca iznad veznog mjesta i termostabilnost. Promjene tih svojstava imaju utjecaj na: specifičnost prema supstratima (adsorpcija/afinitet vezanja), mehanizam katalize (endo/egzo), inhibiciju ili aktivaciju i efekt stereokemije supstrata na depolimerizaciju. Standardna eksperimentalna metoda za istraživanje utjecaja aminokiselina na

stabilnost i aktivnost proteina je mutageneza, a računalne metode kao što su simulacije molekulske dinamike koriste se komplementarno eksperimentima jer daju uvid u interakcije liganda s proteinom na atomskoj i molekulskoj razini.

2.3.1. Mutageneza

Mutacije u slijedu deoksiribonukleinske kiseline (DNA) događaju se spontano kao pogreške DNA-polimeraze, te pod vanjskim fizikalnim (visokofrekventno zračenje) ili kemijskim utjecajem (interkalatori koji ometaju replikaciju DNA). Promjena može biti točkasta mutacija, insercija ili delecija.⁴⁸

Kontrolirano i ciljano uvođenje promjena u slijed DNA može se postići korištenjem niza metoda mutageneze. Svim metodama ciljane točkaste mutageneze zajedničko je da reakcijska smjesa mora sadržavati kalup DNA, DNA-polimerazu visoke vjernosti, njoj odgovarajući reakcijski pufer sa četiri potrebna deoksinukleozid-trifosfata u dovoljno velikim koncentracijama i početnice koje sadrže željenu mutaciju. Razlika između ovih metoda i standardne reakcije lančane polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) je što početnice za mutageni PCR nose željenu mutaciju dok početnice u standardnom PCR-u potpuno odgovaraju slijedu kalupa (slika 7).⁴⁹

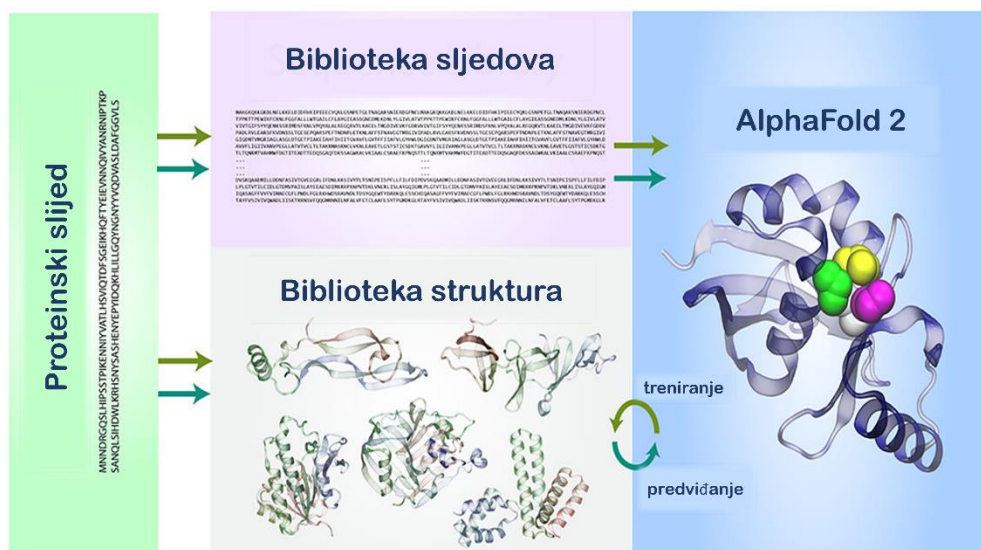


Slika 7. Početnice koje nose mutaciju (kratki narančasti segment) prijanjaju na lanac metiliranog plazmida (kalup, sive boje) koji nosi gen od interesa (zeleni segment). Tijekom reakcije lančane polimeraze (PCR) DNA-polimeraza gradi novi lanac DNA (sivi s narančastim segmentom). DNA-ligaza povezuje nukleotide na položajima ureza, a metilirana DNA (originalni kalup) je razgrađena djelovanjem restrikcijskog enzima. Pročišćenim PCR produktima zatim se transformiraju bakterijske stanice. Prilagođeno iz „Site-directed Mutagenesis“, *BioRender.com* (2022).⁵⁰

Istraživanje utjecaja aminokiseline na afinitet vezanja liganda, aktivnost enzima ili njegovu stabilnost provodi se promjenom aminokiseline od interesa, najčešće u alanin. Ovakva mutacija promatra se kao uklanjanje funkcijske skupine aminokiseline od interesa, a razlika u afinitetu vezanja liganda ili stabilnosti mutanta u odnosu na divlji tip enzima smatra se doprinosom te aminokiseline.⁴⁸ S druge strane, razlog za uvođenje mutacije može biti i ispitivanje efekta pojedinih aminokiselina na visokoočuvanim položajima prema uzoru na slične proteine, primjerice kao što je to u radu Austin et al.,⁴² ili pak po uzoru na položaj koji je potpuno varijabilan između sličnih proteina.⁴³

2.3.2. Računalno istraživanje dinamike strukture proteina

Teorijske računalne metode danas su neophodne u istraživanju dinamike, strukture i svojstava biokemijskih sustava, u teorijskim istraživanjima ili kao komplementarni alat eksperimentalnim istraživanjima. Trodimenzionalne strukture sustava kao što su membrane, proteini, cijeli organeli ili neke kombinacije navedenih, a sadrže tisuće atoma, gotovo je nemoguće predvidjeti ukoliko one nisu eksperimentalno određene što može biti problematično jer su ulazni podaci za ove metode upravo trodimenzionalne strukture sustava. Suvremene metode omogućuju modeliranje nepoznate strukture proteina na temelju riješene strukture homolognih proteina (homologno modeliranje),⁵¹ i s druge strane najnovije računalne metode koriste strojno učenje za predviđanje strukture na temelju velikog broja podataka aminokiselinskih sljedova proteina i njihovih riješenih trodimenzionalnih struktura sa izrazito velikom sigurnošću (AlphaFold2, slika 8).⁵²



Slika 8. AlphaFold 2 funkcioniira na način da aminokiselinski slijed od interesa koristi za pretraživanje više baza podataka proteinskih sljedova i konstruira višestruka poravnanja nizova. Prema poravnanjima odabire sljedove (segmente) visoke sličnosti i konstruira prijedlog strukture proteina od interesa prema vjerojatnim interakcijama. Zatim iterativno poboljšava reprezentacije MSA i predložene interakcije u strukturi s boljim modelom nakon svakog koraka, sve do finalnog modela koji je obično određen brojem iteracija.⁵³

Istraživanje dinamike strukture sustava moguće je provesti na više razina teorije (složenosti). Najvišom razinom teorije koriste se kvantno-mehaničke metode (QM, engl. *quantum mechanics*) zbog čega zahtijevaju najviše računalnih resursa i vremenski su najdugotrajnije, no jedine su kojima se može proučavati kemijska reakcija jer eksplicitno modeliraju elektrone unutar i između atoma. S druge strane, empirijske metode poput molekulske mehanike (MM, engl. *molecular mechanics*) i molekulske dinamike (MD, engl. *molecular dynamics*) koriste pojednostavljene modele koristeći se eksperimentalno određenim podacima za modeliranje sustava, sa efektom elektrona implicitno uračunatim kroz korištenje empirijskih parametara. Ovakve metode su najčešće korištene kod istraživanja proteinske dinamike jer uštede računalno vrijeme zadržavajući zadovoljavajuću točnost što je od izuzetne važnosti kod tako velikih sustava. Treći tip metoda čine semiempirijske, koje koriste i eksperimentalno određene i teorijski izračunate parametre za modeliranje sustava od interesa.⁵⁴

Prilikom istraživanja funkcije proteina potrebno je poznavati njegovu trodimenzionalnu strukturu. Eksperimentom se može odrediti specifična struktura proteina nastala kristalizacijom iz određenih uvjeta, međutim ona ne opisuje dobro sve konformacije koju makromolekula poprima, primjerice u otopini. Drugim riječima, strukturu proteina u otopini bolje opisuje ansambl njegovih konformacija, pri čemu svaka molekula proteina zauzima nešto drugačiju

konformaciju. Eksperimentalno je nemoguće uzorkovati svojstva svakog proteina iz populacije, već samo uprosječeno ponašanje proteina preko cijele populacije. Da bi se detaljno proučilo ponašanje proteina u interakciji s ligandom ili drugom biomakromolekulom, potrebno je poznavati proteinski sustav na mikroskopskoj razini, a to omogućuju računalne metode. Molekulska dinamika kao primjer empirijske metode simulira vremensku evoluciju gibanja atoma proteina sa izlaznim podacima koji su konformacije (3D strukture) proteina. Na pretpostavci da se uz dovoljno dugo vrijeme simulacije može uzorkovati cijeli konformacijski prostor strukture proteina, i da on odgovara raspodjeli konformacija u sustavu s velikim brojem istovrsnih molekula, temelji se „ergodska hipoteza“.⁵⁵ Prema „ergodskoj hipotezi“ svojstva dobivena praćenjem jedne molekule tijekom dovoljno dugog razdoblja odgovaraju raspodjeli u sustavu s velikim brojem istovrsnih molekula. Skup generiranih struktura simulacijom molekulske dinamike nazva se ansamblom struktura, a analizom ansambla se dobivaju termodinamička svojstva sustava: entropija, entalpija, pa tako i Gibbsova energija vezanja u slučaju simulacija interakcija proteina s ligandima.⁵⁶

Molekulska dinamika koristi se Newtonovim jednadžbama gibanja za generiranje novih položaja atoma koji su modelirani kao kuglice, a veze između njih kao opruge.

$$F_i = m_i a_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = \frac{dp_i}{dt} \quad (1)$$

U jednadžbi 1 promjena količine gibanja atoma i , dp_i , proporcionalna je brzini atoma i s položajem r_i , masom m_i i ubrzanjem a_i u vremenu dt , koja se pridružuje atomu na početku simulacije prema Maxwell-Boltzmannovoj raspodjeli na zadanoj temperaturi T .⁵⁷

$$f(v) = 4\pi \left[\frac{M}{2\pi RT} \right]^{\frac{3}{2}} v^2 \exp\left[\frac{-Mv^2}{2RT} \right] \quad (2)$$

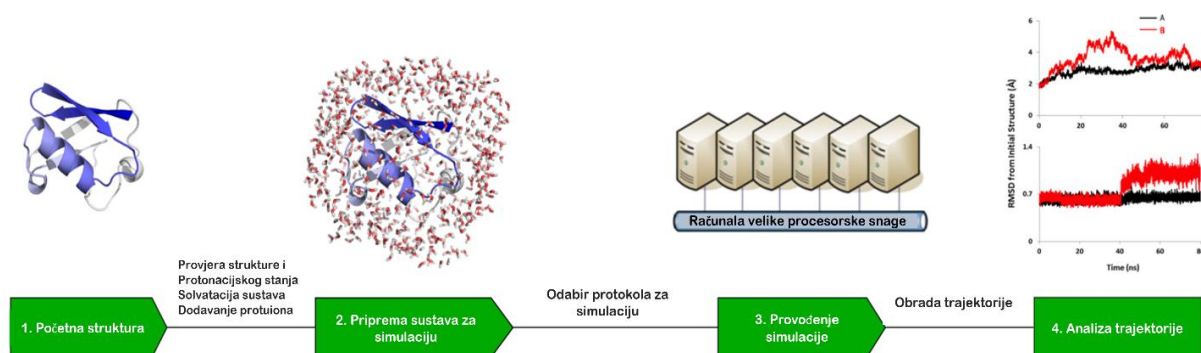
U jednadžbi 2, M je masa atoma, T termodinamička temperatura, v brzina atoma mase M . Da bi se novi položaji mogli odrediti, potrebno je opisati interakcije između atoma za što se molekulska dinamika koristi poljem sila. Polje sila čini funkcional za računanje energije konformacije molekula (jednadžba 3) i skup parametara za opis interakcija među atomima.

$$E_{tot} = E_{stretch} + E_{bend} + E_{tors} + E_{oop} + E_{el} + E_{vdw} + \sum E_{cross} \quad (3)$$

Parametri su konstante i ravnotežne vrijednosti varijabli, najčešće određene eksperimentalno. Ukupnoj energiji konformacije doprinose energija istezanja veza ($E_{stretch}$), energija savijanja valentnih kutova (E_{bend}), energija savijanja torzijskih kuteva (E_{tors}), energija za držanje atoma u ravnini (E_{oop}), elektrostatske energije (E_{el}), energija van der Waalsovih interakcija (E_{vdw}) i

energija miješanih članova ($\sum E_{cross}$). Dio parametara je rezultat kvantno-mehaničkih računa, kao npr. parametri u članovima doprinosa neveznih interakcija.⁵⁷

Na generiranom ansamblu iz simulacije molekulske dinamike provodi se niz računalnih analiza za kvantitativni opis strukturnih promjena proteina. Primjeri takvih analiza su korijen srednjeg kvadrata odstupanja (RMSD, engl. *root mean square deviation*), korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (RMSF engl. *root mean square fluctuation*), računanja udaljenosti između dva atoma ili regija proteina/proteina i liganda od interesa tijekom vremena simulacije, sekundarne strukture, vodikove veze unutar proteina ili između proteina i liganda tijekom simulacije, i dekompozicija doprinosa entalpiji vezanja po aminokiselinским ostatcima. Hodogram od strukture do analiza njene dinamike prikazan je na slici 9.



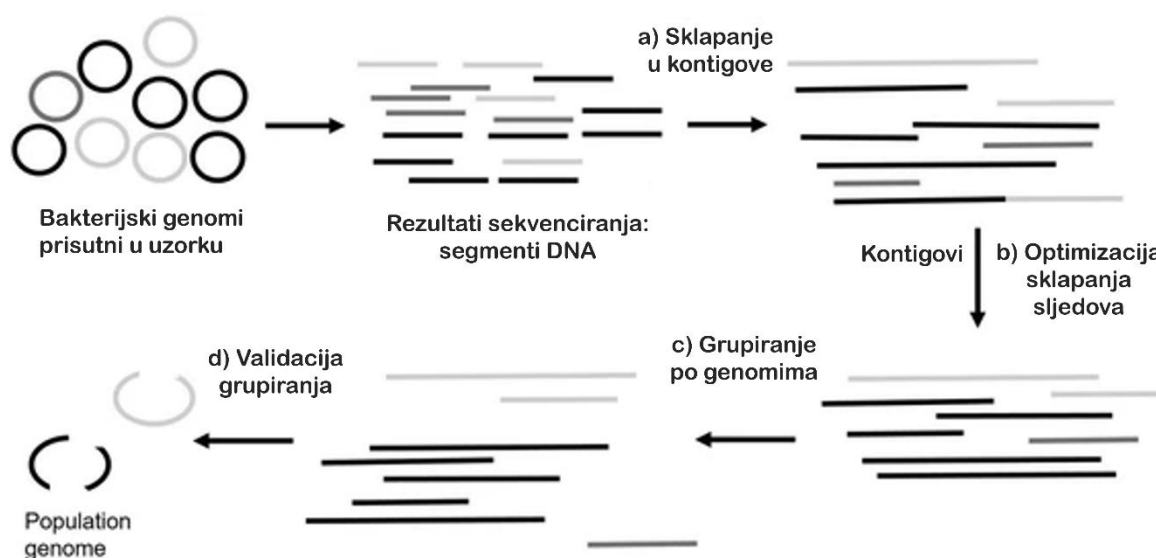
Slika 9. Hodogram računalnog istraživanja dinamike strukture proteina. 1) Početnoj strukturi proteina (rješana i pohranjena u PDB bazi podataka ili modelirana) provjerava se: cjelovitost slijeda, protonacijska stanja, orijentacija rotamera, prisustvo cistinskih mostova itd. 2) Kompletirana struktura se zatim solvatira i u sustav se dodaju protuioni do elektroneutralnosti. Pripremljena struktura se parametrizira (protein, ligandi i otapalo) čemu slijedi 3) minimizacija energije sustava, ekvilibracija i konačno simulacije molekulske dinamike. Rezultat simulacija molekulske dinamike je niz konformacija u vremenu (trajektorija) na kojoj se potom provode razne analize (4).⁵⁸

Primjerice, u istraživanju Austin i suradnika, zamjena histidina na X1 položaju i katalitičkog histidina ispitana je upravo simulacijama molekulske dinamike.⁴² S druge strane, u istraživanju Feng i suradnika iz 2020. istražen je sami mehanizam razgradnje polikaprolaktone serinske hidrolaze, esteraze, MGS0156 QM/MM pristupom, odnosno modelirajući katalitičku trijadu uz još nekoliko aminokiselina iz veznog mjesta i supstrat (dimerni dio u aktivnom mjestu) kvantno-mehanički, a ostatak proteina molekulskom mehanikom. U istraživanju je utvrđeno da se katalitički mehanizam hidrolize sastoji od dva koraka, nukleofilni napad pa cijepanje C-O veze. Potonje je prema njihovim mjerenjima korak koji određuje brzinu reakcije, a izračunata energetska barijera za taj korak se slaže s eksperimentalno određenom.¹⁵

2.4. Metagenomika

Novi enzimi sa specifičnom aktivnošću mogu se pronaći i pretraživanjem metagenomskih baza podataka. Metagenomika je pristup proučavanju strukture i funkcije svih nukleotidnih sljedova organizama u nekom okolišnom uzorku.⁵⁹ Često su to uzorci mikrobioma iz životinja, uzorci zemlje ili vode. Takvi uzorci su bogati mikroorganizmima čiji genomi čine većinu nukleotidnih sljedova iz uzoraka. Mikroorganizmi u uzorcima su najčešće bakterije koje vrlo brzo evoluiraju prilagođavajući se okolišu radi svojih metaboličkih potreba.

Metagenomika uključuje prikupljanje okolišnih uzoraka, izolaciju nukleotidnih sljedova, njihovo sekvenciranje (najčešće shotgun sekvenciranje cijelih genoma ili pretraživanje sljedova prema specifičnom genu, odnosno sekvenciranje regije specifičnog gena) i potom njihovu analizu što je prikazano na slici 10.⁶⁰



Slika 10. Metagenomski pristup: iz okolišnog uzorka izdvaja se genomski materijal koji se potom podvrgne sekvenciranju.

Sekvenciranim fragmentima traže se preklapanja, prema kojima se fragmenti povezuju u duže sljedove zvane „kontig“.

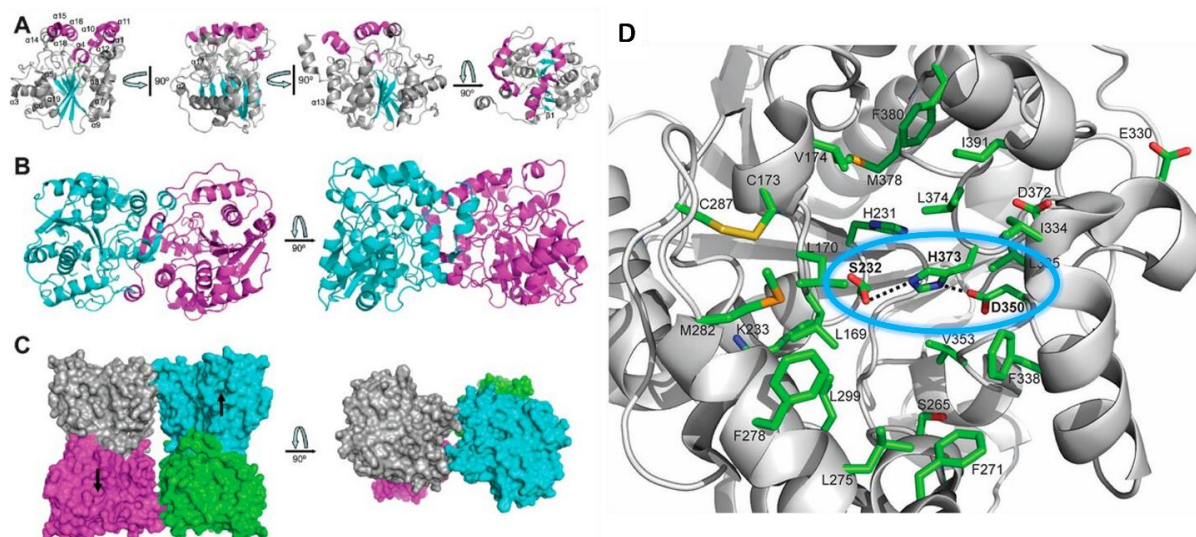
Potom se kontigovi i fragmenti grupiraju i dodjeljuju pojedinom genomu.⁶¹

Ovom metodom moguće je spojiti sekvencirane sljedove u veće cjeline, ponekad i cjelovite genome organizama iz uzorka iz čega se dobivaju informacije o taksonomskoj raznolikosti vrsta u uzorku i funkcionalnoj raznolikosti gena. Svrha metagenomskih sekvenciranja može biti obogaćivanje baza podataka novim sljedovima u potrazi za regijama novih funkcija. Na ovaj način analiziran je i pohranjen niz genoma koji pripadaju vrstama koje nisu dosad uzgojene u kulturi, i često se metaforički opisuje kao "tamna materija" u genomici, budući da prema procjenama samo se 1 % mikroorganizama može uzgajati u obliku bakteriološki čiste kulture, i shodno tome podvrgnuti konvencionalnom sekvenciranju genoma. Baze podataka

metagenomskih sljedova predstavljaju neotkriveno bogatstvo nukleotidnih sljedova s raznim funkcijama, između ostalog i novo specijaliziranim kao prilagodba asimilaciji hranjivih tvari iz okoliša. Takav primjer su sljedovi koji kodiraju za enzime s aktivnošću razgradnje plastike koja je danas novi izvor ugljika antropogenog porijekla iz okoliša za mikroorganizme.⁶²

2.4.1. Novotkrivena metagenomska hidrolaza: MGS0156

Hajighasemi i suradnici detektirali su preko 10 novih poliesteraza pretraživajući metagenomske baze podataka sa sljedovima visoke sličnosti onima koji kodiraju za već poznate poliesteraze, koje su ekspimirali i provjerili njihovu aktivnost prema nekoliko sintetskih polimera. U istraživanju iz 2018. godine pokazali su za jedan od tih enzima da ima jednu od najviših detektiranih poliesteraznih aktivnosti prema nizu polimera, između ostalih i polimilječnoj kiselini. Ova poliesteraza vodi se pod nazivom MGS0156 i pripada mikrobnjoj zajednici uzorka prikupljenog na odlagalištu papirnatog otpada, a spada u potpuno novu, zasebnu obitelj esteraza. Protein je građen od 421 aminokiseline s potencijalnim N-terminalnim signalnim peptidom od 75 aminokiselina. Ima modificirani α/β -hidrolazni nabor sa domenom poklopca, izrazito hidrofobno aktivno mjesto sa katalitičkom serinskom trijadom Ser232-His373-Asp350 u kojoj nukleofil Ser232 ima dvije konformacije. Kromatografski je pokazano da u otopini većinski tvori tetramere (70 %), dijelom oktamere (25 %) i manjim dijelom se nalazi u monomerima (5 %), prikazano na slici 11.¹³



Slika 11. A) Monomer MGS0156 iz 4 perspektive. Rozom bojom su označene α -zavojnice koje čine poklopac iznad veznog mjesta. Plavom bojom je označen β -hidrolazni nabor. B) Dimer MGS0156 iz dvije perspektive. C) Tetramer MGS0156 iz dvije perspektive. Crnim strelicama su označeni položaji veznih mjesta na podjedinicama. D) Uvećani prikaz hidrofobnog veznog mjesta i aktivnog mjesta MGS0156, plavom bojom su zaokružene aminokiseline katalitičke trijade, Ser232, His373 i Asp350.¹³

Nije slična niti jednoj hidrolazi iz UniProtKB/Swiss-Prot, baze podataka proteinskih slijedova koji su ručno anotirani. MGS0156 pokazuje egzo- i endo-hidrolitičku aktivnost prema poli-L,D-mliječnoj kiselini te polikaprolaktonu i solubilnim α -naftil and p-nitrofenil monoesterima. Specifičnost za ovaj metagenomski enzim je da ima poklopac stabiliziran disulfidnim mostovima što je netipično za hidrolaze poliestera tipa esteraza. U istom radu objavljena je riješena kristalna struktura ove mezofilne karboksilesteraze, MGS0156, pri rezoluciji 1,95 Å (PDB identifikator 5d8m).¹³

2.4.2. Identifikacija novog metagenomskog slijeda s potencijalnom poliesteraznom aktivnošću

Aminokiselinski slijed poliesteraze MGS0156 korišten je kao predložak za pretraživanje niza metagenomskih baza podataka proteinskih slijedova, kao što su UniProt, MGnify, Marine Metagenomics portal i UniMES, u potrazi za visoko sličnim ili homolognim slijedovima sa očuvanom katalitičkom trijadom. Pretraga metagenomskih baza podataka za novim esterazama rezultirala je pronalaskom slijeda s 44 % identičnosti i 61 % sličnosti, MGY, u ESM Metagenomic Atlas bazi strukturnih modela slijedova pohranjenih u MGnify bazi podataka, koji je naručen kao sintetski gen i eksprimiran u bakteriji *Escherichia coli*.⁶³

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Agar (*Liofilchem*), agarozna (*Sigma*), akrilamid/bisakrilamid (*Sigma*), ampicilin (*Sigma*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Sigma*), fenol (*Acros Organics*), glicerol (*Kemika*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina (HEPES) (*Fischer Bioreagents*), imidazol (*Sigma*), izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*CarlRoth*), kalijev hidroksid (*Kemika*), kalijev klorid (*Kemika*), kanamicin (*Gibco BRL*), klorovodična kiselina, $w = 36,5 \%$ (*Kemika*), Luria-Bertani agar (LB agar) (*Liofilchem*), magnezijev klorid heksahidrat (*Kemika*), magnezijev sulfat (*Kemika*), β -merkaptoetanol (*Sigma*), *N,N'*-metilenbisakrilamid (*Sigma*), natrijev acetat (*GramMol*), natrijev azid (*Sigma*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*CarlRoth*), natrijev hidroksid (*Kemika*), natrijev klorid (*GramMol*), *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin (TEMED) (*Sigma*), amonijev persulfat (APS) (*Serva*), toluen (T. T. T.) (*GramMol*), tripton (*Liofilchem*), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Chemsolute*), urea (*GramMol*), BugBuster (*Millipore*), etanol, $\varphi = 96 \%$ (*Kefo*), glicerol, redestilirani, $w = 100 \%$ (*Kemika*), standardni puferi, pH = 4,01; 7,00; 9,21 (*Mettler Toledo*, tech.), polimljična kiselina (*Sigma*)

3.1.2. Mediji i hranjive podloge za uzgoj bakterijske kulture

Kruti hranjivi medij Luria-Bertani (LB), sastava: kvašćev ekstrakt ($\gamma = 5 \text{ g/L}$), tripton ($\gamma = 10 \text{ g/L}$), NaCl ($\gamma = 10 \text{ g/L}$), agar ($\gamma = 15 \text{ g/L}$), tekući hranjivi medij Luria-Bertani (LB), sastava: kvašćev ekstrakt ($\gamma = 5 \text{ g/L}$), tripton ($\gamma = 10 \text{ g/L}$), NaCl ($\gamma = 10 \text{ g/L}$).

3.1.3. Sojevi *Escherichie coli*

BL21(DE3), Mach1

3.1.4. Plazmidi, nukleinske kiseline i nukleotidi

Početnice za lančanu reakciju polimeraze - oligonukleotidi (*Macrogen*), dNTP smjesa (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Sigma*), plazmidi s His-privjeskom pod *lac*-promotorom: pET-28b_MGY, p15Tv-L_MGS0156

3.1.5. Proteini

T4-DNA-ligaza (*Takara*), Taq-DNA-polimeraza (*Thermo Scientific*), Q5-DNA-polimeraza (*NEB*; *New England Biolabs*). *DpnI* restrikcijska endonukleaza (*NEB*), T4 polinukleotid-kinaza (*NEB*)

3.1.6. Boje, markeri i materijali za elektroforetske metode

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Merck), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Merck), GelRed (Sigma), marker za agaroznu gel-elektroforezu 1 kb DNA Ladder (NEB), marker za poliakrilamidnu gel-elektroforezu Precision Plus Protein Standards Prestained (Bio-Rad), set za agaroznu elektroforezu (Bio-Rad), odnosno poliakrilamidnu elektroforezu (Bio-Rad).

3.1.7. Ostali materijali

Centrikoni Amicon® Ultra centrifugal filters (Millipore), mikrotitarske pločice BRANDplates®, cellGrade™ (Brand).

3.2. Metode rada s bakterijama

3.2.1. Transformacija elektrokompetentih stanica *E. coli* elektroporacijom

Stanice *E. coli* transformirane su metodom elektroporacije koja koristi kratki električni puls visokog napona za povećavanje propusnosti bakterijske stijenke za plazmide.⁶⁴ Plazmid mase 1-100 ng dodan je u ohlađenu kivetu s 40 µL elektrokompetentnih stanica *E. coli* suspendiranih u destiliranoj vodi s 10 % glicerola. Elektroporacija je izvršena na uređaju MicroPulser Bio-Rad na programu Ec2, s električnim pulsom 2,5 kV/cm u vremenu 5,9 ms. Potom je u istu kivetu dodano 1 mL LB-medija i stanice su resuspendirane te prenesene u epruvetu. Bakterije su puštene na oporavak na 1 sat na 37 °C uz povremeno okretanje i potom nanosene na LB podlogu s ampicilinom ili kanamicinom u dva volumena, 20 i 50 µL. Bakterijske kulture inkubirane su na 37 °C preko noći.

3.2.2. Uzgoj bakterijske kulture na LB-ploči

Bakterijski sojevi nasađeni su na čvrste Luria-Bertani (LB) hranjive podloge i potom inkubirane preko noći na 37 °C, a nakon toga su pohranjene na 4 °C.

3.2.3. Uzgoj prekonoćne bakterijske predkulture

Prekonoćna predkultura pripravljena je u sterilnim uvjetima ubacivanjem sterilnog nastavka za pipetu s uzorkom kolonije uzgojenih kultura *E. coli* transformiranih elektroporacijom u sterilni LB medij s ampicilinom, odnosno kanamicinom koncentracije 50 µg/mL, odnosno 30 µg/mL. Kultura je uzgojena na 37 °C uz miješanje pri 250 rpm u termostatiranoj tresilici preko noći.

3.2.4. Inokulacija glavne kulture i indukcija prekomjerne ekspresije proteina od interesa

Glavna kultura za indukciju ekspresije proteina od interesa pripravljena je u steriliziranom LB mediju s odgovarajućim antibiotikom, na način da je zasićena noćna predkultura u svježi LB medij dodana u volumnom omjeru 1:100. Uzgoj glavne kulture odvijao se u termostatiranoj

tresilici pri 200 rpm i temperaturi 37 °C. Kultura je inkubirana na 37 °C 2,5 do 3 h, odnosno do optičke gustoće suspenzije $OD_{600} = 0,3$ do 0,5. Rast svih glavnih kultura praćen je mjerenjem turbiditeta na spektrofotometru Ultrospec 10 Cell Density Meter (*Amersham Biosciences*). Turbiditet je mjera zamućenja suspenzije koja se računa iz intenziteta upadne svjetlosti na uzorak i intenziteta svjetlosti koja prođe kroz uzorak, pri čemu glavina svjetlosti bude raspršena na uzorku. Nakon utvrđivanja optičke gustoće, kultura je 30 min ohlađena na temperaturi indukcije, 15 °C. Nakon termostatiranja na navedenoj temperaturi, ekspresija proteina inducirana je dodatkom IPTG-a do konačne koncentracije 1 mmol/L te je inducirana kultura inkubirana preko noći na 15 °C u termostatiranoj tresilici pri 200 rpm.

Nakon inkubacije izmjerena je optička gustoća i inducirane stanice su istaložene centrifugiranjem 10 min na 4000 g pri temperaturi 4 °C. Supernatant je odliven i talog je resuspendiran u 10 mL ultračiste vode, a potom je suspenzija centrifugirana 5 min na brzini 6500 g pri 4 °C. Supernatant je odliven, a talog induciranih stanica pohranjen je na –80 °C do korištenja.

3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama

3.3.1. Izolacija plazmidne DNA

Plazmidna DNA izolirana je postupkom alkalne lize, metodom temeljenom na specifičnom vezanju rekombinantnog plazmida u prisustvu kaotropnih soli na stacionarnu fazu sa silicijevim dioksidom. Uspješnost izolacije i čistoća uzorka provjerena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na instrumentu NanoDrop i analizom gela nakon agarozne gel-elektroforeze.

Plazmidna DNA izolirana je pomoću kompleta *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) prema uputama proizvođača, uz korištenje mikrocentrifuge. Izolacija se vrši u nekoliko koraka. U prvom koraku talog bakterijskih stanica resuspendira se u puferu koji sadrži EDTA (pufer P1) koja kompleksira metalne katione bitne za aktivnost DNaze i time sprječava njeno djelovanje na plazmidnu DNA prije same lize. U drugom koraku dodaje se lužnata otopina sa deterdžentom (pufer P2) čime se solubilizira stanična membrana bakterija i (zbog visoke koncentracije OH^- iona) narušavaju se vodikove veze između dušičnih baza u dvolančanoj DNA. Na ovaj način DNA je denaturira dodatkom lužine, a deterdžent (SDS) denaturira većinu proteina čime je olakšan postupak odjeljivanja plazmida iz smjese u kasnijim koracima. Tome slijedi neutralizacija i taloženje SDS-a dodatkom otopine s kalijevim acetatom (pufer N3), tijekom kojeg u precipitatu ostaje genomska DNA i proteini kao i mnoge stanične komponente, dok je u supernatantu otopljena renaturirana plazmidna DNA.

Bakterije su istaložene centrifugiranjem u polipropilenskim mikroeprijetama od 1,5 mL 1 min na 12000 rpm pri sobnoj temperaturi. Talog je potom resuspendiran pipetiranjem u 250 µL otopine P1 s RNazom A radne koncentracije 100 µg/mL. U suspenziju je dodano 250 µL otopine P2 i smjesa je izmiješana okretanjem mikroepriete 6 puta. Odmah zatim dodano je 350 µL otopine N3 u smjesu i sadržaj je promiješan okretanjem mikroepriete 6 puta. Potom je slijedilo centrifugiranje 10 min pri sobnoj temperaturi na 16000 g. Supernatant volumena 800 µL otpipetiran je u mikrokolonu umetnutu u polipropilensku mikroeprietu. Mikrokolona s uzorkom je centrifugirana 60 s na 16000 g, a filtrat je zatim bačen. Mikrokolona je isprana otopinom PB volumena 500 µL, centrifugiranjem 60 s na maksimalnoj brzini. Filtrat je uklonjen. Kolona se potom ispere sa 700 µL pufera PE i centrifugira na 16000 g 60 s. Nevezana frakcija se odlije, a korak centrifugiranja s istim postavkama se ponovi kako bi se uklonio ostatak pufera PE. U čistu mikroeprietu eluirana je plazmidna DNA dodatkom 50 µL pufera EB i centrifugiranjem 60 s na 16000 g.

3.3.2. Uvođenje točkaste mutacije lančanom reakcijom polimeraze

Za uvođenje točkaste mutacije korištena je metoda inverzne reakcije polimeraze (engl. *inverse polymerase chain reaction*).⁶⁵ Inverzna reakcija polimeraze razlikuje se od standardnih u poziciji početnica: standardno dvije početnice omeđuju segment DNA za amplifikaciju, dok u slučaju inverznog PCR-a, početnice na kružnom kalupu kreću oko istog položaja, ali u suprotnom smjeru. Za potrebe uvođenja točkastih mutacija, početnice se ne preklapaju.

Konačna PCR smjesa volumena 25 µL određena je pomoću Q5 DNA-polimeraze (*NEB*), a sastav je dan u tablici 1. Kao kalup korišten je plazmid p15TvL s genom za MGS0156.

Tablica 1. Sastav PCR smjese za uvođenje točkaste mutacije u plazmid p15TvL s genom za MGS0156, inverznim PCR-om pomoću Q5 DNA-polimeraze (*NEB*).

<i>Konstituent</i>	<i>Volumen/μL</i>	<i>Ishodna konc./količina</i>	<i>Konačna konc./količina</i>
Kalup (plazmid B)	2,5	10 ng/μL	1 ng/μL
FP	1,25	10 μmol/L	0,5 μmol/L
RP	1,25	10 μmol/L	0,5 μmol/L
Pufer Q5	5	5X	1X
Q5 DNA-polimeraza	0,25	1 U/μL	0,02 U/μL
dNTP	2,5	2 mmol/L	200 μmol/L
H₂O	12,25	-	-

Za sintezu novih lanaca korištena je Q5 DNA-polimeraza visoke točnosti u odgovarajućem puferu, a temperatura za sljepljivanje početnica na kalup izračunata je pomoću mrežnog alata *NEB Tm Calculator*.⁶⁶ Početnice su konstruirane prema načelu da zadovoljavaju uvjete za dobru PCR smjesu, bez autokomplementarnosti, s malom vjerojatnošću tvorbe sekundarnih struktura, umjerenog udjela GC baza (između 40 i 60 %), itd. Sljedovi početnica dani su u tablici 2.

Tablica 2. Sljedovi početnica korištenih za mutagenezu H231Y enzima MGS0156. Smeđom bojom podebljano slovo T označava nukleotid koji se razlikuje od nukleotida u kodirajućem slijedu, a crna podebljana slova označavaju preostala dva nukleotida iz kodona.

<i>Početnica</i>	<i>Nukleotidni slijed</i>
FP	T ATTCCAAGGGCGCGGTGG
RP	GGTCACGAAGACGATGGTGT C

Lančana reakcija polimeraze provedena je prema programu danom u tablici 3.

Tablica 3. Temperaturni program metode inverzne reakcije polimeraze koja je korištena za uvođenje točkaste mutacije u plazmid p15Tv-L s genom za MGS0156. Temperatura poklopca postavljena je na 105 °C.

<i>Korak</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
Temperatura/°C	98	98	69	72	72	8
Vrijeme	20 s	10 s	20 s	4 min	5 min	∞
	19 ponavljanja koraka 2-4					

Uspješnost PCR-a provjerena je agaroznom gel-elektroforezom.

3.3.3. Pročišćavanje produkta lančane reakcije polimeraze i ligacija

Produkt uvođenja mutacija lančanom reakcijom polimeraze pročišćen je na *QIAquick*-kolonama za pročišćavanje PCR produkata prema protokolu za mikrocentrifugu.

U PCR uzorak doda se pet puta veći volumen pufera PB i promiješa okretanjem mikroeprevete. Promiješani uzorak nanese se na *QIAquick*-kolonu umetnutu u mikroeprevetu za sakupljanje frakcija. Smjesa na koloni se potom centrifugira 60 s na 16000 g na 20 °C. Nevezana frakcija se odlije i kolona se ispere s 700 µL pufera PE i ponovno se centrifugira 60 s na 16000 g pri 20 °C. Filtrat se odlije i kolona u mikroepreveti se ponovno centrifugira pri istim uvjetima i ostatak filtrata se odlije. *QIAquick*-kolona se prebaci u čistu mikroeprevetu i na nju se nanese 40 µL pufera EB na središte membrane kolone i ponovno se centrifugira na 16000 g 60 s pri 20 °C. Eluat je pročišćeni plazmid produkt lančane reakcije polimeraze.

PCR produkt nakon pročišćavanja potrebno je fosforilirati pa cirkularizirati, odnosno krajeve ligirati, uz to i razgraditi metilirani kalup. Za tu svrhu koristi se DNA-ligaza bakteriofaga T4 u reakcijskoj smjesi s *DpnI*, restriksijskom endonukleazom koja prepoznaje samo metilirani slijed, te T4 polinukleotid-kinazom. Pufer za reakcijsku smjesu je reakcijski pufer za T4 DNA-ligazu (tablica 4).

Tablica 4. Sastav reakcijskog pufera za T4 DNA-ligazu.

<i>Konstituent</i>	<i>Koncentracija</i>
Tris-HCl	50 mmol/L
MgCl₂	10 mmol/L
ATP	1 mmol/L
DTT	10 mmol/L
pH 7,5 pri 25 °C	

Smjesa je puštena 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega je provedena inaktivacija enzima na način da je smjesa zagrijana 20 min na 60 °C. Usporedno je pripremljena kontrolna smjesa istog sastava kao i opisana reakcijska, ali bez T4 polinukleotid-kinaze i T4 DNA-ligaze koje su zamijenjene s ultračistom vodom. Ligacijska smjesa dalje je korištena za elektroporaciju *E. coli* pri uzgoju mutanata.

3.3.4. Agarozna gel-elektroforeza

Agarozna gel-elektroforeza je metoda koja se koristi za razdvajanje i analizu fragmenata DNA na temelju njihove molekulske mase. Elektroforetska pokretljivost molekule u električnom polju ovisi o omjeru njene mase i naboja. Vrijednost tog omjera je približno jednaka za nukleinske kiseline, pa je razlika u pokretljivosti fragmenata DNA posljedica razlika u njihovoj veličini (duljini). Detekcija se obično vrši CCD kamerom koja detektira emisiju interkalirajućih boja.

Sadržaj nukleinskih kiselina u uzorku plazmida određen je elektroforezom na agaroznom gelu pri naponu od 120 V kroz 45 min. Agarozni gel pripremljen je otapanjem agaroze do koncentracije 10 g/L u puferu TAE (sastava Tris 40 mmol/L, očetna kiselina 20 mmol/L i EDTA 1 mmol/L). Uzorci za elektroforezu pripremljeni su miješanjem s otopinom za nanošenje (γ (ksilencijanolfosfat) = 2 g/L, γ (bromfenolno plavilo) = 2,5 g/L, c (EDTA) = 0,07 mol/L, pH = 8,0, ϕ (glicerol) = 30 %,) u omjeru 1:10 (otopina za nanošenje:uzorak), dok je boja *GelRed* u konačnom uzorku razrijeđena na 1/1000 koncentracije komercijalne otopine.

3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Koncentracija DNA u uzorku plazmida određena je spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini $\lambda = 260$ nm na instrumentu Nanodrop. UV-VIS spektrofotometrija je širokoprimjenjiva i jeftina metoda određivanja koncentracije otopljenih tvari koje apsorbiraju u UV-VIS dijelu spektra. Mjeri intenzitet upadne svjetlosti i svjetlosti nakon prolaska kroz uzorak. Poznavajući ekstinkcijski koeficijent uzorka i duljinu optičkog puta zrake kroz uzorak, iz izmjerene apsorbancije određuje se koncentracija koristeći Lambert-Beerov zakon. Instrument Nanodrop koristi se za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina i proteina u uzorcima vrlo malih volumena, svega 1-2 μ L. Za određivanje nukleinskih kiselina mjeri se apsorbancija na $\lambda = 260$ nm pri kojoj apsorbiraju purinske i pirimidinske baze. Koncentracija proteina određuje se pri valnoj duljini 280 nm, koja odgovara valnoj duljini maksimuma apsorpcije aromatskih aminokiselinskih ostataka, prvenstveno triptofana.⁶⁷

3.4. Metode rada s proteinima

3.4.1. Liza induciranih stanica iz probnih ekspresija reagensom *BugBuster*

Probne ekspresije proteina od interesa provedene su na manjoj skali u volumenu kulture od 40 mL. Za razaranje stanične stijenke stanica iz manjeg uzgoja korišten je komercijalno dostupan reagens *BugBuster*, otopina za enzimsku lizu stanica u kombinaciji sa zwitterionskim

detergentima. Pohranjene inducirane stanice resuspendirane su u 400 μ L otopine *BugBuster* te je dodana smjesa enzima (*Lysonase*) u volumnom omjeru 1:500, dakle 0,8 μ L. Suspenzija je miješana 20 min na 20 rpm, odnosno do bistrenja. Lizat je centrifugiran na 16000 g, 10 min na 3 °C. Ekstrakt je otpipetiran i pohranjen odvojeno od taloga.

3.4.2. Sonikacija induciranih stanica iz velikog uzgoja

Stanične stijenke stanica iz uzgoja velikog volumena razorene su ultrazvukom, odnosno sonikacijom suspenzije stanica. Talog pohranjenih stanica resuspendiran je u puferu za afinitetnu kromatografiju na Ni-NTA agarozu, puferu A (Tablica 5). Za stanični talog iz ekspresije iz 400 mL kulture dodano je 10 mL pufera A, a za veće uzgoje proporcionalno više. Sonikacija je provedena u šest ciklusa (ili više, ovisno o prinosu i skali većih uzgoja) izlaganja ultrazvuku 30 s uz 30 s pauziranja, a suspenzija je u Falcon epruveti držana na ledu i tijekom same sonikacije. Svrha pauziranja je da se spriječi zagrijavanje suspenzije. Zatim je suspenzija centrifugirana 30 min na 20 000 g pri 4 °C, ekstrakt je korišten u pročišćavanju proteina od interesa afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu, a talog je sačuvan na -80 °C.

3.4.3. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu

Afinitetna kromatografija je metoda pročišćavanja koja se temelji na specifičnosti interakcija ostvarenih između skupina liganda na stacionarnoj fazi i njegovog partnera. Često korištena za pročišćavanje proteina je IMAC (engl. *immobilized metal ion affinity chromatography*). Protein od interesa eksprimira se kao fuzijski sa 5 ili 6 histidinskih ostataka na N- ili C- kraju. Histidin ima visok afinitet vezanja za divalentni ion nikla imobiliziran na koloni, a selektivno se ispiru tek visokom koncentracijom imidazola.⁶⁸

Za pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom prethodno su pripremljeni puferi 0 i 500 (sastavi pufera dani su u tablici 5), a korišteni su za pripremu: pufera za uravnoteženje kolone (pufer A), pufera za ispiranje slabo ili nespecifično vezanih proteina (pufer B) i pufera za eluciju vezanog fuzijskog proteina s His-privjeskom (pufer C), sastavi ovih pufera navedeni su u tablici 6. Kolona je punjena Ni-NTA agarozom, a kromatografija provedena pri 4 °C.

Za pročišćavanje iz ekstrakta dobivenog lizom *BugBusterom* suspenzija Ni-NTA agaroze nanosena je na kolonu u volumenu 500 μ L. Kolona je isprana dva puta s 500 μ L ultračiste vode, a potom uravnotežena dva puta s 1 mL pufera A. Nakon uravnoteženja na kolonu je nanesen proteinski ekstrakt dobiven lizom *BugBuster* reagensom i prikupljena je

nevezana frakcija. Kolona je zatim isprana 4 puta sa 600 μL pufera B. Slijedila je elucija proteina od interesa ispiranjem kolone 5 puta s 300 μL pufera C. Prikupljeno je 5 frakcija.

Tablica 5. Sastav pufera 0 i pufer 500 korištenih za pripremu pufera A, B i C različitih koncentracija imidazola korištenih u Ni-NTA afinitetnoj kromatografiji. pH je namješten titracijom pripremljene otopine s otopinom HCl, $c = 1 \text{ mol/L}$.

	Pufer 0 (pH 8)	Pufer 500 (pH 8)
Tris-HCl	25 mmol/L	25 mmol/L
NaCl	500 mmol/L	500 mmol/L
Glicerol	$\varphi = 10 \%$	$\varphi = 10 \%$
Imidazol	–	500 mmol/L
Otopine su titrirane HCl-om do pH 8,0		

Tablica 6. Koncentracije imidazola u puferima A, B i C koji su pripremljeni miješanjem pufera 0 i 500.

pufer A	pufer B	pufer C
20 mmol/L	40 mmol/L	200 mmol/L

Za pročišćavanje ekstrakta dobivenog sonikacijom, kolona je ispunjena s 1,5 mL suspenzije Ni-NTA agaroze (prema optičkoj gustoći inducirane kulture nakon prekonoćne inkubacije). Kolona je isprana dva puta s 1,5 mL ultračistom vodom, uravnotežena s tri obroka po 3 mL pufera A. Na kolonu je potom nanesen ekstrakt i sačuvana je nevezana frakcija. Kolona je zatim isprana sa 5 volumena od 3 mL pufera B, a protein je eluiran u šest obroka po 1 mL pufera C.

3.4.4. Diskontinuirana poliakrilamidna elektroforeza s dodatkom natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*) je metoda za razdvajanje proteina na temelju njihove elektroforetske pokretljivosti u denaturirajućim uvjetima. Pokretljivost pritom ovisi samo o steričkoj ometenosti po prolasku kroz gel. Daje informacije o molekulskoj masi i prinosu proteina, pri čemu se gubi kvaterna struktura proteina. Ovom metodom moguće je i kvantificirati proteine u uzorku.⁶⁹

Za SDS-PAGE korištena je aparatura Mini-PROTEAN Tetra, proizvođača *Bio-Rad*. Gelovi debljine 0,75 mm napravljeni su s 10 %-tnim udjelom poliakrilamida. Sastav gela za razdvajanje i gela za sabijanje naveden je u tablici 7, kao i sastav elektroforetskog pufera (pH 8,3).

Tablica 7. Sastavi gelova za razdvajanje i sabijanje te elektroforetskog pufera korištenih u SDS-PAGE.

Gel za razdvajanje	Gel za sabijanje	Elektroforetski pufer (pH 8,3)
akrilamid/bisakrilamid (T = 40 %, C = 3,3 %)	akrilamid/bisakrilamid (T = 40 %, C = 3,3 %)	Glicin 14,4 g/L
koncentrirani pufer za razdvajanje (TrisHCl 1,5 mol/L, SDS 4 g/L, pH 8,8)	koncentrirani pufer za sabijanje (TrisHCl 0,5 mol/L, SDS 4 g/L, pH 6,8)	Tris 3,0 g/L
20 % APS	20 % APS	SDS 1,0 g/L
0,05 % (φ) TEMED	0,05 % (φ) TEMED	

Uzorci za SDS-PAGE pripremljeni su pri istoj optičkoj gustoći (0,1) kako bi se rezultati mogli uspoređivati. Uzorci su pripremljeni razrjeđivanjem s ultračistom vodom do 10 μ L i uz dodatak 3,5 μ L koncentriranog pufera za nanošenje uzorka (4X SDS pufer). Sastav SDS pufera je: γ (SDS) = 1,25 mg/mL, c (β -merkaptotanol) = 12,5 mmol/L, c (Tris) = 62,5 mmol/L pH = 6,8, φ (glicerol) = 6,25 %, i γ (bromfenolplavo) = 0,02 mg/mL. Uzorci su zagrijavani na 90 °C 3 min i kratko centrifugirani kako bi se spustio kondenzat. Elektroforeza je provedena uz stalan napon od 120 V u trajanju 15 min i 180 V 35 min. Gelovi su potom inkubirani 20 min na rotacijskoj platformi u otopini *Coomassie Brilliant Blue R-250* (2,5 g/L *Coomassie BB R-250* otopljen u smjesi octene kiseline (φ = 10 %) i etanola (φ = 45 %)). Gelovi su potom stavljeni na 10 min u kipuću vodu kako bi se uklonilo nespecifično vezanje boje.

3.4.5. Ukoncentriravanje frakcija i izmjena pufera ultrafiltracijom

Frakcije s Ni-NTA za koje je SDS-PAGE-om ustanovljeno da su najbogatije proteinom od interesa su spojene i podvrgnute ultrafiltraciji na centrifugalnim filterima Amicon Ultra Centrifugal Filters (*Milipore*) s *cutoff* vrijednosti 30 kDa. Frakcije su isprva ukoncentrirane s ciljem izmjene pufera, a zatim i povećanja koncentracije u konačnoj otopini za skladištenje. Prvo centrifugiranje provedeno je pri 4 °C i 6400 g do smanjenja volumena do 200-300 μ L. Potom je dodano 3 mL pufera za skladištenje, sastava: c (HEPES) = 20 mmol/L, c (KCl) = 100 mmol/L i c (EDTA) = 5 mmol/L. Centrifugiranje po dodatku 3 mL pufera za skladištenje ponovljeno je 3 puta na 6400 g pri 4 °C do volumena 200-300 μ L.

3.4.6. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

Ukoncentriranoj otopini proteina koncentracija je izmjerena spektrofotometrijski na uređaju NanoDrop One (*Thermo Scientific*).⁶⁷ Pri odabiru metode uneseni su molekulska masa i ekstinkcijski koeficijent fuzijskog proteina dobiveni bioinformatičkom analizom prema slijedu

fuzijskog proteina. Korišteni su podaci izračunati alatom *Expasy ProtParam*.⁷⁰ Za anuliranje je upotrijebljen pufer za skladištenje, a apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini $\lambda = 280$ nm.

3.4.7. *Semikvantitativni test hidrolitičke aktivnosti enzima prema PLA metodom difuzije enzima u agaroznom gelu sa suspenzijom polimljične kiseline*

Gelovi su pripremljeni u 0,8 %-tnoj agarozni sa 0,2 % polimljične kiseline.⁷¹ Prilikom pripreme suspenzije PLA primijećeno je da je polimer izrazito hidrofoban zbog čega se ne može direktno resuspendirati u vodenom mediju jer ga voda ne kvasi. Potrebno ga je prvo otopiti u nepolarnom otapalu i iz tekuće faze pripremiti suspenziju u vodi. Gelovi su pripremljeni na način da se prah polimljične kiseline otopi u diklormetanu na sobnoj temperaturi. Zatim se u otopinu doda TrisHCl-a do koncentracije 50 mmol/L i na kraju ultračiste vode do polovice konačnog volumena gela. Smjesa se zatim sonicira 60 s na srednjoj jakosti, a potom se sonicira sekundu na visokoj jakosti. Nastala suspenzija stavlja se na 15 ili više minuta u kipuću vodenu kupelj kako bi u potpunosti ispario diklormetan. Zasebno se pripremi 1,6 %-tna otopina agaroze jednakog volumena volumenu suspenzije. Kada se suspenzija PLA i otopina agaroze ohlade na temperaturu ispod 50 °C, suspenzija se pomiješa s otopinom agaroze na način da se suspenzija PLA prelije u tikvicu s otopinom agaroze. Sadržaj se lagano promiješa i zatim otpipetira u Petrijevu zdjelicu. Zdjelica se ostavi poklopljena na sobnoj temperaturi nekoliko sati dok se gel ne formira i potpuno ohladi.

Agarozni gelovi napravljeni u puferu za pohranu proteina pripremaju se na isti način, osim što se u koraku pripreme suspenzije prije nadopune s ultračistom vodom u otopinu PLA u diklormetanu dodaju HEPES do 20 mmol/L, KCl do 100 mmol/L i EDTA do 5 mmol/L.

Kada se smjesa u potpunosti ohladi i nastane gel, izbuše se sterilni bunari nastavkom za automatsku pipetu i u svaki se nanese do 20 μ L otopine enzima, do konačne mase enzima u bunaru od 50 ili 150 μ g. Gelovi se inkubiraju na 37 °C kroz 3 ili više dana, odnosno do vidljivih zona hidrolize. Gelovi su slikani CCD kamerom.

3.4.8. *Turbidimetrijsko praćenje kinetike enzimske razgradnje polimljične kiseline u suspenziji*

Turbidimetrijsko praćenje kinetike enzimske hidrolize PLA provedeno je na čitaču mikrotitarskih jažica SpectraMax iD3 (*Molecular Devices*). Korištene su mikrotitarske pločice s 96 jažica, dubine 10,65 mm. U jažice je dodavano 250 μ L suspenzije, konačne koncentracije TrisHCl pufera 50 mmol/L (u jednom slučaju) ili HEPES pufera do 20 mmol/L (u drugom slučaju) i ionske jakosti 0,1 mmol/L pomoću KCl, i konačnih masa enzima u rasponu 50 do

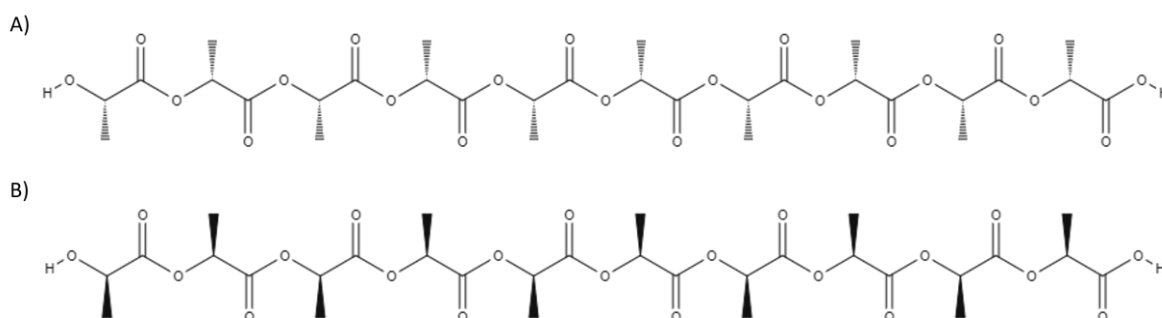
1000 µg po jažici, te $\omega = 0,2\%$ PLA (i u drugom slučaju $0,4\%$ PLA)(suspenzija je pripravljena kao što je opisano u potpoglavlju 3.4.7.). Hidroliza je praćena tijekom 12 sati.

3.5. Simulacije molekulske dinamike

3.5.1. Priprema sustava

Struktura metagenomskog proteina MGS0156 riješena je difrakcijom rendgenskih zraka na monokristalu te je pohranjena u PDB bazi podataka (PDB kod 5D8M). Struktura za parametrizaciju i simulacije molekulske dinamike pripravljena je u nekoliko koraka. Protonacijska stanja histidina procijenjena su pomoću alata *H++*, *MolProbity*, *PDB2PQR* i vizualnom procjenom.⁷²⁻⁷⁴ Osim histidina, provjereno je i protonacijsko stanje katalitičkog aspartata. Nadalje, atomi cisteina koji tvore disulfidni most zamijenjeni su sa CYX umjesto CYS u PDB datoteci kao i selenometionin sa metioninom. Od rotamera iz eksperimentalnih podataka zadržani su oni najdominantniji, a za katalitički serin zadržan je onaj rotamer koji komunicira s katalitičkim histidinom.

Ligand je izgrađen u programu *Chimera*.⁷⁵ Polimliječna kiselina korištena u simulacijama molekulske dinamike kao ligand je oligodekamer. Specifično korištena su dva liganda koji su sindiotaktički PLA enantiomeri poli(L-mliječna kiselina-*alt*-D-mliječna kiselina) (LD -PLA) i poli(D-mliječna kiselina-*alt*-L-mliječna kiselina) (DL-PLA), dalje u tekstu radi jednostavnosti: DL-PLA i LD-PLA. Stereokemija D-PLA kreće s D-karbonilnim atomom na kraju s karboksilnom skupinom, s idućim kiralnim ugljikovim atomom L-kiralnosti. Slučaj je suprotan za LD-PLA (slika 12).



Slika 12. Strukturna formula A) dekamera poli(L-mliječna kiselina-*alt*-D-mliječna kiselina), LD-PLA i B) enantiomera dekamera poli(D-mliječna kiselina-*alt*-L-mliječna kiselina), DL-PLA.

Smještanje liganda PLA u vezno mjesto (engl. *docking*) provedeno je u programu *AutoDock*.⁷⁶ Kompleksi su izgrađeni u programu *ChimeraX*.⁷⁷

MGY je metagenomski proteinski slijed koji nema riješenu 3D strukturu tako da ju je prvo bilo potrebno modelirati, za što je korišten *AlphaFold2*. Potom su određena protonacijska stanja histidina iz strukture pomoću alata *H++*, *MolProbity*, *PDB2PQR* i vizualnom procjenom. Pomoću alata *MolProbity* analizirana je sterika potencijalnih rotamera. Preklapanjem strukture sa strukturom MGS0156 provjerila se potreba za uvođenjem alterantivnog rotamera nekog od ostataka iz katalitičke trijade. Osim toga, uspoređeni su položaji cisteina: oni koji su se preklapali sa disulfidnim cistinskim mostovima u MGS0156 promijenjeni su u PDB dokumentu u cisteine koji tvore disulfidni most (CYS u CYX prema nomenklaturi polja sila iz programskog paketa AMBER).

Za potrebe simulacija mutanata (kompleksa i apo strukture), strukture su pripremljene iz postojećih kompleksa i apo strukture MGS0156. Program *Chimera* korišten je za uvođenje mutacija.

3.5.2. Parametrizacija

Od parametrizacije do analiza trajektorija korišteni su računalni resursi Sveučilišnog računalnog centra (Srce), odnosno računalni sustav *Isabella*. Za parametrizaciju korišten je programski paket AMBER20. Generirani su parametri u polju sila *ff19SB* koji opisuju topologiju sustava, a generirana je i datoteka s početnim koordinatama atoma u sustavu. Sustav je solvatiran i doveden do elektroneutralnosti dodavanjem protuiona.⁷⁸

Za provođenje parametrizacije korišten je program *tleap*. Proteinu su dodijeljeni parametri iz polja sila *leaprc.protein.ff19SB*. Malim molekulama i molekulama vode također se pridodaju parametri i koordinate putem učitavanja polja sila za male molekule, *leaprc.gaff2*, i učitavanjem polja sila za eksplicitni model molekula vode, *leaprc.water.opc*, a ionima su pridodani parametri iz polja sila *frmod.ions1lm_126_hfe_opc*. Dodani su protuioni (Na^+ ili Cl^-) do elektroneutralnosti sustava. Sustavi (i kompleks i apo) su solvatirani koristeći eksplicitni model vode OPC u solvacijskoj kutiji oblika krnjeg oktaedra pri čemu je protein u svakoj točki udaljen barem 10 Å od ruba solvacijske kutije. Za modeliranje solvacijske okoline korišteni su periodički rubni uvjeti. U slučaju kompleksa ovom postupku prethodi parametrizacija liganda, dekameri mliječne kiseline, u potprogramu *antechamber*. Parametrizacija liganda kompletirana je naredbom *parmchk2*.

3.5.3. Simulacije molekulske dinamike

Vremenskom pretraživanju konformacijskog prostora proteina simulacijom molekulske dinamike (MD) prethodili su minimizacija energije sustava i ekvilibracija.

Minimizacija je provedena u četiri koraka. U prvom koraku minimizacija je provedena do maksimalno 2500 koraka: metoda najstrmijeg spusta korištena je u prvih 470 koraka, dok je u ostalim koracima korištena metoda konjugiranog gradijenta. Za izračun energije u obzir su uzete nevezne interakcije s maksimalnim dometom 9 Å. Skup neveznih interakcija uzetih u obzir za račun energije idućeg koraka ažuriran je svakih 15 koraka. Ovdje je primijenjen model periodičkih rubnih uvjeta, uz konstantan volumen, a uz to i „Particle Mesh Edward“ metoda za račun elektrostatskih interakcija. Protein je držan pod harmonijskim potencijalom konstante sile 100 kJ/mol Å. Druga minimizacija provedena je pod istim uvjetima, ali proteinska okosnica je ona pod harmonijskim potencijalom, dok ostali atomi imaju steričku slobodu. U trećoj minimizaciji, maksimalni broj koraka smanjen je na 1500, a okosnica je držana pod potencijalom konstante sile 50 kJ/mol Å. Posljednji krug minimizacije proveden je do maksimalno 5000 koraka, dok je proteinska okosnica držana na potencijalu konstante sile 25 kJ/mol Å.

Nakon minimizacije slijedila je ekvilibracija sustava u dva koraka. U prvom koraku je i ovdje primijenjen model periodičkih rubnih uvjeta, uz konstantan volumen (*NVT* ansambl) s „Particle Mesh Edward“ metodom za račun elektrostatskih interakcija. Za izračun energije u obzir su ponovno uzete nevezne interakcije s maksimalnim dometom 9 Å. Proteinska okosnica držana je na potencijalu konstante sile 25 kJ/mol Å. Od ovog koraka pa nadalje korišten je SHAKE algoritam koji radi uštede računalnog vremena drži veze s vodikovim atomima rigidnima, odnosno stalne duljine, za koje stoga nisu računane sile. Početne brzine atoma računane su iz sila u sustavu, a referentna temperatura na koju je sustav zagrijavan od 0 K iznosila je 300 K. Za izračune brzina u koracima korištena je Langevinova dinamika sa frekvencijom sudara 1,0 ps⁻¹. Trajanje prve simulacije postavljeno je na 1 ns, kao i druge simulacije ekvilibracije. Druga simulacija ekvilibracije za početak je koristila koordinate i brzine atoma iz prve simulacije ekvilibracije. Postavke su bile iste osim što sustav nije bio pod potencijalom, i početna temperatura postavljena je na referentnu, 300 K. Model periodičkih rubnih uvjeta uz izotropno skaliranje položaja primijenjen je uz konstanti tlak u sustavu (*NPT* ansambl).

Simulacija molekulske dinamike provedena je u dva koraka. Prva simulacija provedena je istim uvjetima kao i druga simulacija ekvibracije uz uvođenje kontrole tlaka u sustavu prema Berendsenu, Početne koordinate i brzine atoma preuzete su iz druge simulacije ekvibracije. Ukupno trajanje produktivne simulacije MD iznosilo je 300 ns također uz SHAKE algoritam.

3.6. Analize simulacija molekulske dinamike

Osim vizualnom inspekcijom trajektorija u kemijskim programima za vizualizaciju poput VMD-a, simulacije molekulske dinamike analiziraju se i kvantitativno analitičkim tehnikama poput promjene korijena srednjeg kvadrata udaljenosti (RMSD), promjene korijena srednjeg kvadrata fluktuacija (RMSF), analize sekundarnih struktura, računanja udaljenosti od interesa, radijusa giracije, kao i mnogih drugih.

3.6.1. Korijen srednjeg kvadrata odstupanja (*RMSD*, eng. *root mean square deviaton*)

Korijen srednjeg kvadrata odstupanja (*RMSD*) je mjera prosječne udaljenosti ekvivalentnih atoma dvije strukture (jednadžba 4). Odnosno, kvantitativna usporedba sličnosti dvije strukture istog proteina, najčešće iz dva različita trenutka u vremenu simulacije.

$$RMSD(X, X^{ref}) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |X_i - X_i^{ref}|^2} \quad (4)$$

U jednadžbi 4 n je broj atoma ili aminokiseline, X_i je položaj i -tog atoma u danom koraku, a X_i^{ref} položaj i -tog atoma u referentnoj strukturi

RMSD se može koristiti i za usporedbu struktura različitih proteina. Prije svega daje informaciju o uravnoteženju sustava (velike razlike u *RMSD*-u kroz trajektoriju sugeriraju neuravnotežen sustav koji nije poželjno analizirati), a zatim i o promjeni proteinske strukture tijekom simulacije. Kao referentna struktura (ona u odnosu na koju se računaju *RMSD* vrijednosti tijekom trajektorije) najčešće se uzima kristalna struktura nakon parametrizacije ili struktura nakon ekvibracije. Za račun *RMSD*-a za simulacije MD MGS0156 i MGY kao referentna struktura korištena je ekvilibrirana struktura.

3.6.2. Korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (*RMSF* eng. *root mean square fluctuation*)

Korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (*RMSF*) računa fluktuacije pojedinih atoma, aminokiselina ili cijelih dijelova protein tijekom simulacije MD računajući prosjek fluktuacije preko cijele simulacije, u odnosu na referentnu strukturu (jednadžba 5).

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_{i=1}^t |r_i - r_{ref}|^2} \quad (5)$$

U jednadžbi 5 t je ukupno vrijeme simulacije, r_i je položaj atoma u i -tom trenutku simulacije, a r_{ref} položaj atoma u referentnoj strukturi (prosječnoj strukturi simulacije).

RMSF vrijednost služi za određivanje dinamičnosti dijelova proteina, identificirajući rigidne regije, i one veće fleksibilnosti. Velika vrijednost *RMSF*-a sugerira velike konformacijske promjene, generalno veliku fleksibilnost: primjerice petlje koje su regije velike steričke slobode, ili slobodni C- ili N- kraj lanca proteina. Obično se računa za okosnicu ili C_α atome.

Iz *RMSF* vrijednosti računaju se B-faktori koji se koriste u kristalografiji prema formuli:

$$B_j = \frac{8\pi}{3} RMSF_j \quad (6)$$

U kojoj je B_j B-faktor j -tog atoma, a $RMSF_j$ vrijednost fluktuacije j -tog atoma tijekom simulacije MD.

3.6.3. Analiza sekundarnih struktura

Osim kvantifikacije strukturnih promjena poput *RMSF*-a i *RMSD*-a, računalno je moguće pratiti i promjene sekundarne strukture kroz trajektoriju koristeći metodu DSSP, prema Kabschu i Sandru. DSSP analizira najvjerojatniju dodjelu sekundarnih struktura unutar 3D strukture proteina uzimajući u obzir položaje atoma te izračunavanjem energije vodikove veze između atoma. Na temelju metode DSSP, dodjeljuje se osam vrsta sekundarnih struktura. Zavojnica 3_{10} (u jednom zavoju zavojnice nalaze se 3 aminokiseline, a vodikove veze ostvaruju se između ostataka udaljenih 3 položaja u slijedu), α -zavojnica (u jednom zavoju zavojnice nalaze se 3,6 aminokiselina, a vodikove veze ostvaruju se između ostataka udaljenih 4 položaja u slijedu) i π -zavojnica (po zavoju 4,1 aminokiselina, vodikove veze ostvaruju se između ostataka udaljenih 5 položaja), okret s H-vezom (promjena smjera jednog lanca, vodikova veza ostvaruje se između aminokiselina u lancu udaljenih 3, 4 ili 5 položaja), β -nabrana struktura (paralelna ili antiparalelna, nastaje uslijed ostvarivanja vodikovih veza između C=O skupine

jednog lanca i N-H skupine drugog lanca), β -most (dvije aminokiseline u vodikovoj vezi poput beta nabrane strukture), Ω -omča (zavoj, odnosno omča bez uređene strukture), i posljednja skupina: ostatci koji nisu niti u jednoj od prethodno navedenih.^{48,79}

3.6.4. MM-GBSA račun entalpijskog i entropijskog doprinosa Gibbsovoj energiji vezanja i dekompozicija entalpijskog doprinosa po aminokiselinskim ostacima

Raščlamba (dekompozicija) entalpijskog doprinosa po aminokiselinskom ostatku omogućuje analizu i razumijevanje specifičnih energetske doprinosa pojedine aminokiseline u vezanju promatranog supstrata. Kvantificiranjem pojedinačnih doprinosa može se dobiti uvid u specifičnost vezanja i stabilnosti nastalog kompleksa. Informacije dobivene raščlambom entalpijskog doprinosa po aminokiselinskom ostatku mogu se koristiti za identificiranje ključnih aminokiselina odgovornih vezanje supstrata što pomaže u dizajniranju enzima i enzimskom inženjerstvu te za razumijevanje učinaka mutacija na stabilnost kompleksa. Identificiranje ključnih aminokiselinskih ostataka veznog mjesta enzima koji specifično interagiraju s polimerom pruža uvid u način prepoznavanja i vezanja polimera. Razumijevanje specifičnih aminokiselinskih doprinosa u vezanju može pomoći u optimizaciji enzima za razgradnju poliestera, poboljšanju stabilnosti enzima te optimizaciji procesa razgradnje.

U ovom radu korištena je metoda MM-GBSA (engl. *molecular mechanics generalized Born surface area*) za račun slobodne energije vezanja liganda za protein. Provodi se na krnjim trajektorijama kompleksa, prethodno dobivenim iz simulacija molekulske dinamike. Promjena Gibbsove energije vezanja ovom metodom se računa prema jednadžbi:

$$\Delta G_{vezanje} = \langle G_{PL} - G_P - G_L \rangle_{PL} \quad (7)$$

U jednadžbi 7, vrijednosti Gibbsove energije za cijeli kompleks G_{PL} , enzim G_P i supstrat G_L označene znakovima za očekivanu ili prosječnu vrijednosti dobivene su kao srednja vrijednost na n broju struktura odabrane trajektorije. Gibbsova energija svakog sustava, kompleksa, enzima i supstrata, procjenjuj se prema izrazu:

$$G = E_{MM} + G_{SOLV} - TS \quad (8)$$

U jednadžbi 8 član E_{MM} je zbroj veznih i neveznih doprinosa energiji konformacije molekule prema jednadžbi polja sila (molekulsko-mehanički račun energije). Polarni doprinos iz promjene Gibbsove energije solvatacije u jednadžbi računa se prema generalized Born modelu za implicitno otapalo, a član nepolarnog doprinosa je procijenjen iz linearnog odnosa prema otapalu dostupnoj površini (engl. *solvent-accessible surface area*, SASA), a zajedno daju ukupnu Gibbsovu energiju vezanja G_{solv} . Posljednji član je entropijski, a konformacijska

entropija sustava se procjenjuje analizom normalnih modova na skupu struktura dobivenih iz simulacija MD.^{80,81}

Gibbsova energija vezanja liganda i enzima u otopini računa se kao zbroj Gibbsove energije vezanja supstrata za enzim u vakuumu i razlike Gibbsovih energija solvatacije kompleksa i proteina i liganda (jednadžba 9).

$$\Delta G_{vezanje,otopina} = \Delta G_{vezanje,vakuuum} + \Delta_{solv}G_{PL} - (\Delta_{solv}G_P - \Delta_{solv}G_L) \quad (9)$$

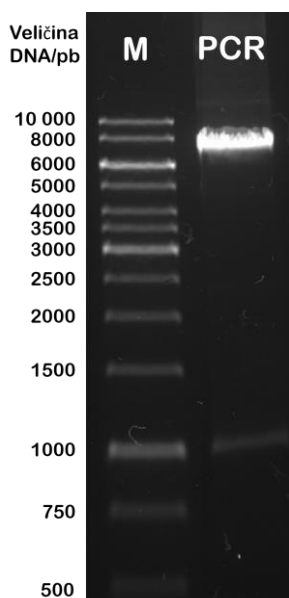
MM-GBSA računi slobodnih energija vezanja provedeni su na skraćenim trajektorijama, na strukturama generiranim od 150 do 300 ns s različitim brojem struktura uzetih za računanje entropije i entalpije. Kriterij za odabir struktura koje su uzete u obzir za procjenu entalpijskog i entropijskog doprinosa bila je RMSD vrijednost proteinske okosnice. Za početnu točku u trajektoriji odabrana je ona struktura nakon koje nije više bilo promjene RMSD vrijednosti (na polovici trajektorije) i završno do posljednje strukture. Kada je riječ o procjeni entalpijskog doprinosa analizirana je svaka 10 struktura. Procjena entropijskog doprinosa Gibbsovoj energiji vezanja provedena je na ukupno 50 struktura (u obzir uzeta svaka 1500. struktura iz druge polovice trajektorije). Pri tome je korištena trajektorija krnjeg kompleksa koji je obuhvaćao aminokiseline unutar 10 Å od liganda kako bi se skratilo računalno vrijeme. Račun entalpije proveden je na većem broju struktura trajektorije, uzimajući u obzir cjelovitu strukturu proteina. Zatim je za entalpijski doprinos vezanju liganda provedena dekompozicija po aminokiselinskim ostacima, odnosno računat je doprinos pojedine aminokiseline ukupnoj entalpiji energiji vezanja liganda i proteina. Ionska jakost u sustavu kod računa entalpije iznosila je 0,15 mol/L, relativna dielektična konstanta enzima i kompleksa 1, a otapala 80. Model korišten za račun polarog doprinosa je „Model II“ prema Onufriev, Bashford i Case.⁸²

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1.1. Ciljana mutageneza MGS0156

S ciljem dobivanja inačice prethodno okarakteriziranog metagenomskog enzima MGS0156 s potencijalno većom aktivnošću prema PLA provedeno je uvođenje mutacije na položaj „X1“ oko katalitičkog serina u visokoočuvanom motivu glicin-X1-serin-X2-glicin prema teorijskim rezultatima QM/MM simulacija aktivnosti enzima MGS0156 prema kaprolaktonu.¹⁵ Feng i suradnici pokazali su da histidin (jednoslovna oznaka H) na „X1“ položaju potencijalno sterički ometa hidrolizu, a prema tome je moguća meta za uvođenje mutacije u optimizaciji aktivnosti prema alifatskim supstratima. Na položaju ovog histina, H231, uvedena je zamjena s drugom visoko očuvanom aminokiselinom na tom položaju u skupini enzima visoke sličnosti s MGS0156, triptofanom (jednoslovna oznaka Y). Mutacija H231Y uvedena je metodom inverzne reakcije lančane polimeraze (detaljnije opisano u potpoglavlju 3.3.2. Materijala i metoda).

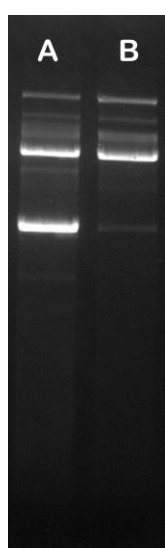
Uspješnost mutageneze provjerena je agaroznom gel-elektroforezom smjese PCR produkta nakon reakcije lančane polimeraze. Rezultat je prikazan na slici 13 gdje je vidljiva jedna intenzivna pruga velike molekulske mase i slabija male molekulske mase.



Slika 13. Agarozna gel-elektroforeza produkta mutageneze. M – marker veličina DNA (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*), PCR – produkt umnažanja lančanom reakcijom polimeraze (smjesa s mutiranim početnicama). Pruga u PCR položajem odgovara očekivanoj veličini plazmida (i mutiranog produkta). Vidljivo je da je u PCR smjesi došlo i do nespecifičnog umnažanja sudeći prema slabo vidljivoj prugi na položaju 1000 pb, ali u vrlo maloj mjeri.

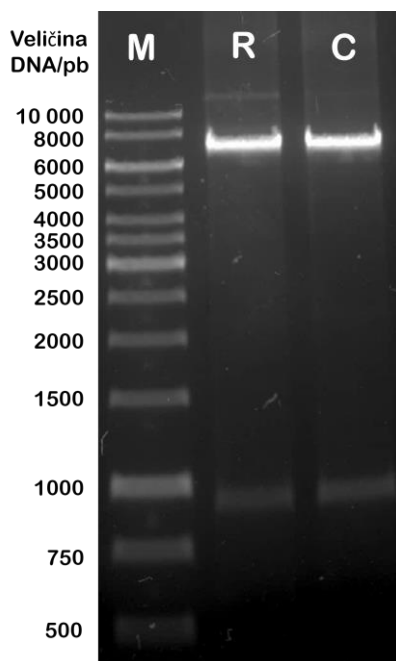
Intenzivna pruga prema tome pripada plazmidima s uspješno uvedenom mutacijom, veličine oko 6,8 kb, dok pruga manjeg intenziteta pripada signalu produkta slabo zastupljenog nespecifičnog umnažanja. Uspješno uvođenje mutacije u slijed gena za enzim MGS0156 potvrđeno je sekvenciranjem, komercijalnom uslugom tvrtke *Macrogen*. Slika regije s točkastom mutacijom nukleotidnog slijeda divljeg tipa i mutanta dana je u dodatku.

Nakon reakcije lančane polimeraze, plazmidni PCR produkti pročišćeni su na *QIAquick* kolonama kao što je opisano u poglavlju 3.3.3. Materijala i metoda. Ishod pročišćavanja je provjeren agaroznom gel-elektroforezom pročišćenih plazmida (2 klona), čiji rezultat je na slici 14.



Slika 14. Agarozna gel-elektroforeza miniprepom pročišćenih plazmida pET15b_MGS0156_H231Y (2 klona: A i B). Vidljivi su signali plazmida različite zavijenosti, kao i signal visokog intenziteta koji vjerojatno odgovara nesparenom nukleotidnom lancu plazmida.

Na gelu je vidljivo više pruga koje vjerojatno odgovaraju plazmidima različite zavijenosti (topoizomerije).⁸³ Intenzivni signal veličine manje od cjelovitog plazmida vjerojatno pripada jednom, nesparenom, nukleotidnom lancu plazmida. U idućem koraku plazmidi su fosforilirani i ligirani te je plazmidni kalup razgrađen djelovanjem *DpnI* endonukleaze. Uspješnost ligacije provjerena je agaroznom gel-elektroforezom (slika 15). Ligacija je manje uspješno provedena, sa vrlo slabim signalom (iznad intenzivnog signala) produkta koji bi mogao odgovarati relaksiranom cirkulariziranom plazmidu.



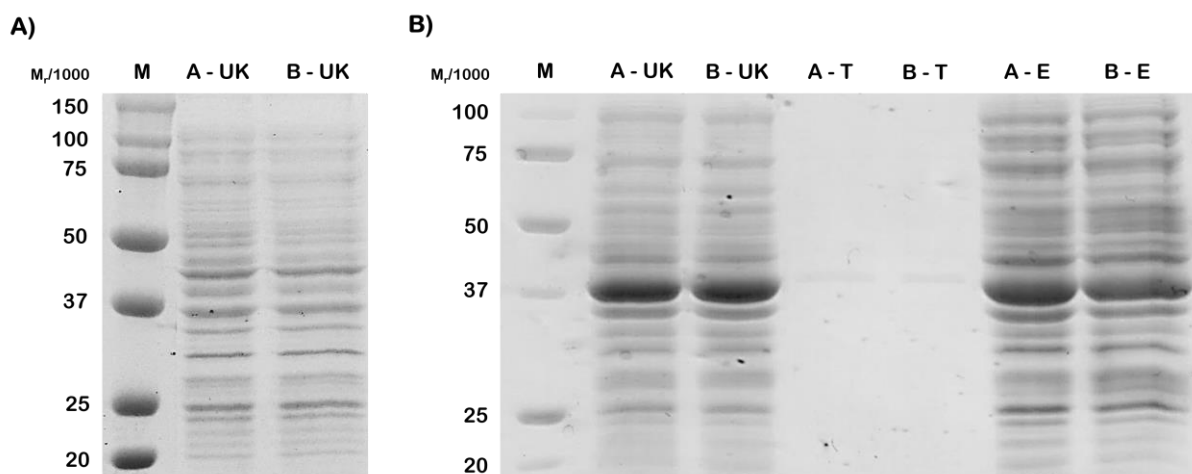
Slika 15. Agarozna gel-elektroforeza mutiranih plazmida pET15b_MGS0156_H231Y nakon ligacije. **M** – marker veličina DNA (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*), **R** – reakcijska smjesa, **C** – kontrola (smjesa poput reakcijske, ali bez T4-polinukleotid kinaze i T4-DNA ligaze koje su zamijenjene s ultračistom vodom). U reakcijskoj smjesi prisutan je slab signal koji bi odgovarao relaksiranom cirkulariziranom plazmidu (isti izostaje u kontrolnoj smjesi).

Ponovno su vidljive pruge koje odgovaraju polinukleotidima manjeg broja baza koji su vjerojatno produkt nespecifičnog umnažanja. Nakon što je uspješnost uvođenja mutacije potvrđena sekvenciranjem, s pročišćenim i ligiranim plazmidima p15Tv-L_MGS0156_H231Y provedena je elektroporacija i prekomjerna ekspresija.

4.1.2. Probne ekspresije i optimizacija uvjeta ekspresije enzima MGS0156, MGS0156_H231Y i MGY iz *E. coli*

Kako bi se ispitala aktivnost enzima MGS0156, MGS0156_H231Y i MGY prema PLA, oni su prekomjerno ekspimirani i pročišćeni kao što je opisano u Materijalima i metodama u poglavljima 3.2. i 3.4. Nakon izolacije proteinskog ekstrakta iz stanica liziranih sonikacijom, proteini od interesa pročišćeni su afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni. Sastav uzoraka lizata, ekstrakta i taloga nakon centrifugiranja, nevezane frakcije s Ni-NTA kolone, frakcije ispiranja i frakcije eluiranja proteina analizirani su metodom SDS-poliakrilamidne elektroforeze (Slike 16 i 17).

Provedene su dvije probne prekomjerne ekspresije enzima MGS0156 pri različitim uvjetima indukcije, pri 30 °C tijekom 3 h (slika 16. A)) i pri 15 °C preko noći (slika 16 B)).



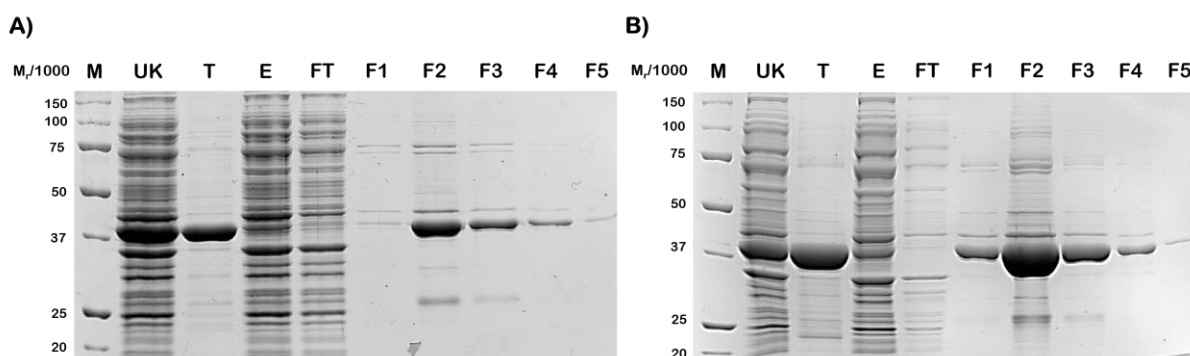
Slika 16. A) Probna ekspresija dva klona (oznaka A i B) MGS0156 pri 30 °C tijekom 3 sata: **M** – marker molekulske mase (*Precision Plus Protein™ Standards Prestained*), **A - UK** – ukupna smjesa soniciranih stanica klona A, **B - UK** – ukupna smjesa soniciranih stanica klona B. **B)** Probna ekspresija dva klona (oznaka A i B) MGS0156 pri 15 °C preko noći: **M** – marker molekulske mase (*Precision Plus Protein™ Standards Prestained*), **A - UK** – ukupna smjesa soniciranih stanica klona A, **B - UK** – ukupna smjesa soniciranih stanica klona B, **A - T** – talog ostatka stanica nakon izdvajanja topljive frakcije klona A, **B - T** – talog ostatka stanica nakon izdvajanja topljive frakcije klona B, **A - E** – proteinski ekstrakt (topljiva frakcija) klona A, **B - E** – proteinski ekstrakt klona B. Uspješnijom se pokazala ekspresija u uvjetima 15 °C preko noći.

Prekomjerna ekspresija nije bila uspješna u slučaju indukcije IPTG-om pri 30 °C, pri čemu je vidljivo na gelu da na očekivanom položaju proteina MGS0156 (teorijska molekulska masa 39,9 kDa) nema podebljane pruge koja bi upućivala na prekomjerno ekspimiran protein (Slika 16 A)). Ponavljanjem uzgoja sa indukcijom na temperaturi od 15 °C, protein MGS0156 je uspješno prekomjerno ekspimiran sa zanemarivim udjelom u netopljivoj frakciji (Slika 16 B)).

Za mutant MGS0156_H231Y s jednom točkastom mutacijom nisu provedene probne ekspresije zbog visoke sličnosti s divljim tipom MGS0156 za kojeg su utvrđeni optimalni uvjeti ekspresije.

Metagenomski otkriven slijed proteina MGY naručen je kao sintetski gen s histidinskim privjeskom kloniran u ekspresijski plazmid pET-28b i prekomjerno proizveden u *E. coli* u različitim uvjetima temperature i vremena indukcije kako bi se provjerili optimalni uvjeti ekspresije. Na slici 17 A) vidljivo je da ekspresija u uvjetima više temperature (30 °C tijekom 3 sata) daje manji prinos od ekspresije pri 15 °C preko noći (slika 17 B)), zbog čega su potonji uvjeti odabrani za ekspresiju na većoj skali. Najdeblja pruga odgovara molekulske mase nešto iznad 37 kDa, što se slaže s teorijskom molekulske mase ovog enzima s His-privjeskom od 39,2 kDa (slika 17 A) i B)). Prilikom prekomjerne ekspresije MGY, ekspimirani protein većim dijelom zaostaje u netopljivim inkluzijskim tijelima koja zaostaju u talogu (T) pri različitim

uvjetima ekspresije. Nastajanje inkluzijskih tijela vidi se prema odsustvu pruge koja odgovara nadekspimiranom proteinu u ekstraktu (E) i prisustvu iste u talogu (slika 17 A) i B)).



Slika 17. A) Probna ekspresija MGY pri 30 °C tijekom 3 sata: **M** – marker molekulskih masa (*Precision Plus Protein™ Standards Prestained*), **UK** – ukupna smjesa soniciranih stanica, **T** – talog ostatka stanica nakon izdvajanja topljive frakcije, **E** – proteinski ekstrakt (topljiva frakcija) klon, **FT** – nevezana frakcija s Ni-NTA kolone, **F1-5** – frakcije dobivene elucijom s kolone. **B)** Probna ekspresija MGY pri 15 °C preko noći: **M** – marker molekulskih masa (*Precision Plus Protein™ Standards Prestained*), **UK** – ukupna smjesa soniciranih stanica, **T** – talog ostatka stanica nakon izdvajanja topljive frakcije, **E** – proteinski ekstrakt (topljiva frakcija) klon, **FT** – nevezana frakcija s Ni-NTA kolone, **F1-5** – frakcije dobivene elucijom s kolone. Uspješnijom se pokazala ekspresija u uvjetima 15 °C preko noći.

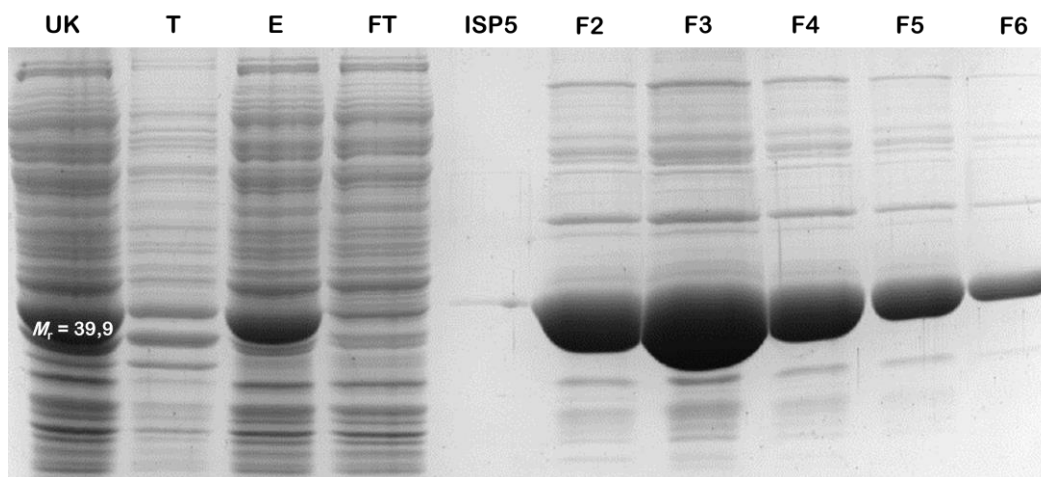
Intenzitet pruge MGY u usporedbi s intenzitetom pruga proteina u ekstraktu djeluje slabije kod ekspresija pri većoj temperaturi (slika 17 A)), dok je intenzitet pruge MGY usporediv sa intenzitetom pruga zastupljenijih proteina u ekstraktu *E. coli* u ekspresiji pri nižoj temperaturi (slika 17 B)). Zbog pojačane ekspresije i potencijalno boljeg prinosa proteina u topljivoj frakciji, preparativna ekspresija je provedena u uvjetima niže temperature preko noći.

4.1.3. Preparativni uzgoj i pročišćavanje enzima MGS0156, MGS0156_H231Y i MGY iz *E. coli*

Nakon optimizacije uvjeta ekspresije provedeni su preparativni uzgoji svakog od enzima na većoj skali.

Na slici 18 je SDS-PAGE gel proteina MGS0156 iz različitih stadija pročišćavanja iz stanica kulture preparativnog uzgoja (iz kulture volumena 400 mL). Uspoređujući sastav ukupnog lizata (na slici ss označeno s UK), ekstrakta (E) i taloga (T), vidljivo je iz debljine pruge (za koju je prethodno pokazano da odgovara molekulskoj masi od oko 39 kDa, slika 16 B), da je protein MGS0156 uspješno prekomjerno ekspimiran i gotovo u cijelosti prisutan u ekstraktu. U nevezanoj frakciji (FT, skraćeno od engl. *flow-through*) izlaze proteini koji se ne vežu na kolonu. Nevezana frakcija s kolone sadržava minimalni udio proteina MGS0156, a iz sastava posljednje frakcije ispiranja (označeno s ISP, koje se provodi s ciljem uklanjanja

nespecifičnih interakcija) vidi se da je ono uspješno izvedeno. Frakcije proteina eluiranog s kolone F2 do F6 sadrže visok udio proteina, koji sudeći prema rezultatima ispiranja ne izlazi značajno tijekom ispiranja kolone puferom B, već tek prilikom elucije s puferom C. Proteinske frakcije s kolone su relativno čiste (F2–F6), sa sastavom koji ukazuje ili na postojanje nespecifičnih interakcija proteina MGS0156 s proteinima *E. coli* ili na onečišćenje produktima proteolitičke razgradnje MGS0156.

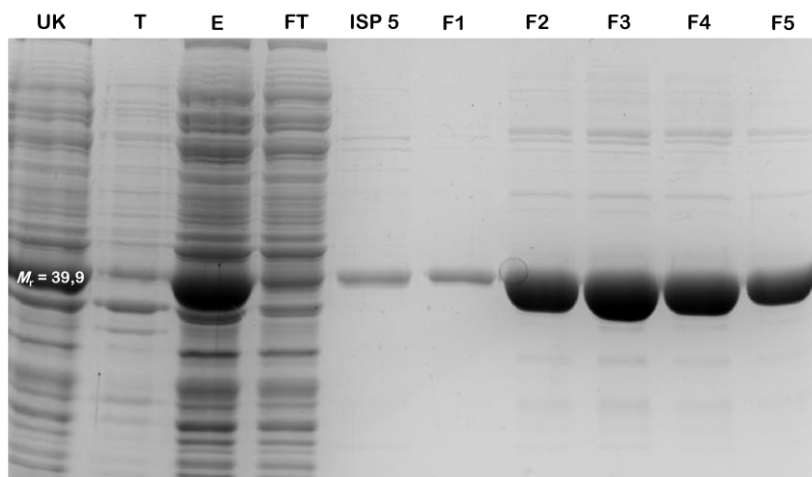


Slika 18. Preparativni uzgoj MGS0156 pri 15 °C preko noći: **UK** – ukupna smjesa soniciranih stanica, **T** – talog ostatka stanica nakon izdvajanja topljive frakcije, **E** – proteinski ekstrakt (topljiva frakcija) klon, **FT** – nevezana frakcija s Ni-NTA kolone, **ISP5** – posljednje ispiranje puferom B na Ni-NTA koloni, **F2-6** – frakcije dobivene elucijom s kolone. Protein MGS0156 proizveden je u visokom prinosu i zastupljen u frakcijama s Ni-NTA kolone.

Proteinske frakcije najbogatije nadeksprimiranim proteinom, F2–F5, spojene su i dalje ukoncentrirane ultrafiltracijom. Ukoncentriravanjem je postignuta koncentracija pročišćenog proteina MGS0156 $c_{\text{(MGS0156)}} = 46,4 \text{ mg/mL}$ u 300 μL pufera, dakle prekomjerna ekspresija u 400 mL LB-medija s inudkcijom IPTG-om provedena je s prinosom $\approx 14 \text{ mg}$ proteina nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni i odsoljavanja te ukoncentriravanja ultrafiltracijom.

Idući korak bio je prekomjerna ekspresija mutanta MGS0156_H231Y (iz kulture volumena 400 mL). Na slici 19 prikazan je SDS-PAGE gel proteina MGS0156_H231Y iz različitih faza njegova pročišćavanja. Vidljivo je da je mutant uspješno prekomjerno eksprimiran prema debljini pruge koja odgovara njegovoj molekularnoj masi (39,9 kDa). Kao i kod MGS0156, nadeksprimirani protein dobro je topljiv i zastupljen u topljivoj frakciji – ekstraktu (E). Nevezana frakcija sadrži malu količinu mutanta (FT), a u frakciji ispiranja (ISP) vidljiva je tanka pruga mase koja odgovara MGS0156_H231Y što znači da je prekomjerno

ekspimirani mutant djelomično ispran iz kolone tijekom ispiranja puferom B. Proteinske frakcije F1 do F5 s Ni-NTA kolone pokazuju visoku zastupljenost proteinom MGS0156_H231Y i imaju isti profil onečišćenja kao frakcije divljeg tipa MGS0156 pročišćenog na koloni Ni-NTA.



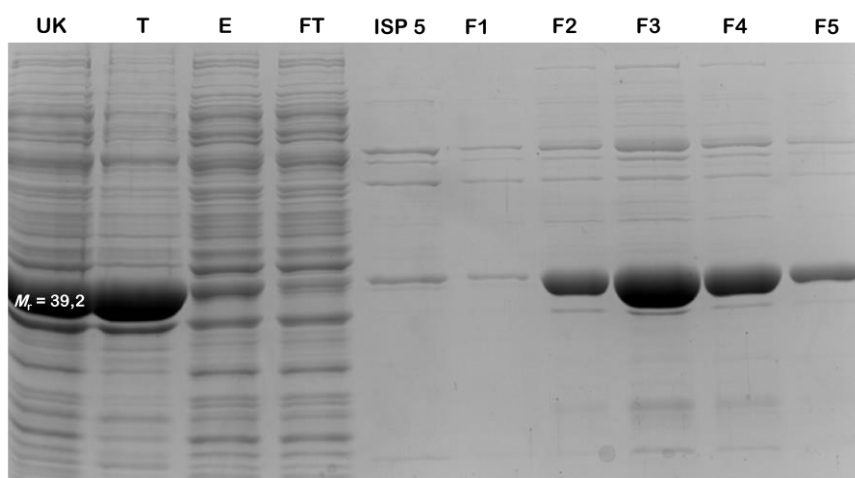
Slika 19. Preparativni uzgoj mutanta MGS0156_H231Y pri 15 °C preko noći: **UK** – ukupna smjesa soniciranih stanica, **T** – talog ostatka stanica nakon izdvajanja topljive frakcije, **E** – proteinski ekstrakt (topljiva frakcija) klon, **FT** – nevezana frakcija s Ni-NTA kolone, **ISP5** – posljednje ispiranje puferom B na Ni-NTA koloni, **F1-5** – frakcije dobivene elucijom s kolone. Mutant MGS0156_H231Y proizveden je u visokom prinosu i zastupljen u frakcijama s Ni-NTA kolone.

Frakcije F2–F5 bogate nadekspimiranim mutantom spojene su i ukoncentrirane ultrafiltracijom pri čemu je konačna koncentracija mutanta ukoncentriranog u puferu za pohranu iznosila $c_{\text{(MGS0156_H231Y)}} = 40,7 \text{ mg/mL}$ u ukupno 240 μL . Prinos nakon pročišćavanja i ukoncentriravanja MGS0156_H231Y iz 400 mL kulture iznosio je $\approx 10 \text{ mg}$ proteina.

Rezultat prekomjerne ekspresije enzima MGY na preparativnoj skali (iz 800 mL medija) u uvjetima temperature 15 °C preko noći provjeren je SDS-poliakrilamidnom elektroforezom čiji je gel prikazan na slici 20. Rezultat na gelu odgovara onome od probne ekspresije pri nižoj temperaturi (slika 17 B)). Većina proteina zaostala je u netopljivoj frakciji u talogu (T). Protein u maloj mjeri izlazi u nevezanoj frakciji (FT) i djelomično se eluira i s proteinima koji ostvaruju nespecifične interakcije s kolonom (ISP).

Proteinske frakcije F1–F5 na gel su nanese u većoj koncentraciji u odnosu na prethodne (MGS0156 i MGS0156_H231Y) zbog predviđenog manjeg prinosa, odnosno manje koncentracije u frakcijama eluiranim s kolone. Unatoč slabijem ukupnom prinosu, pročišćavanje je uspješno provedeno, a profil onečišćenja je isti kao i kod MGS0156 divljeg

tipa i mutanta. Sastav proteinskih frakcija F1-F5 na gelu pokazuju da je MGY najzastupljeniji u F2-F4. Iste su spojene s ciljem odsoljavanja i ukoncentriravanja ultracentrifugiranjem.



Slika 20. Preparativni uzgoj novog metagenomskog enzima MGY pri 15 °C preko noći: **UK** – ukupna smjesa soniciranih stanica, **T** – talog ostatka stanica nakon izdvajanja topljive frakcije, **E** – proteinski ekstrakt (topljiva frakcija) klona, **FT** – nevezana frakcija s Ni-NTA kolone, **ISP5** – posljednje ispiranje puferom B na Ni-NTA koloni, **F1-5** – frakcije dobivene elucijom s kolone. Protein MGY zaostaje u talogu, ima ga vrlo malo u ekstraktu i zato je slabo zastupljen u frakcijama s Ni-NTA kolone.

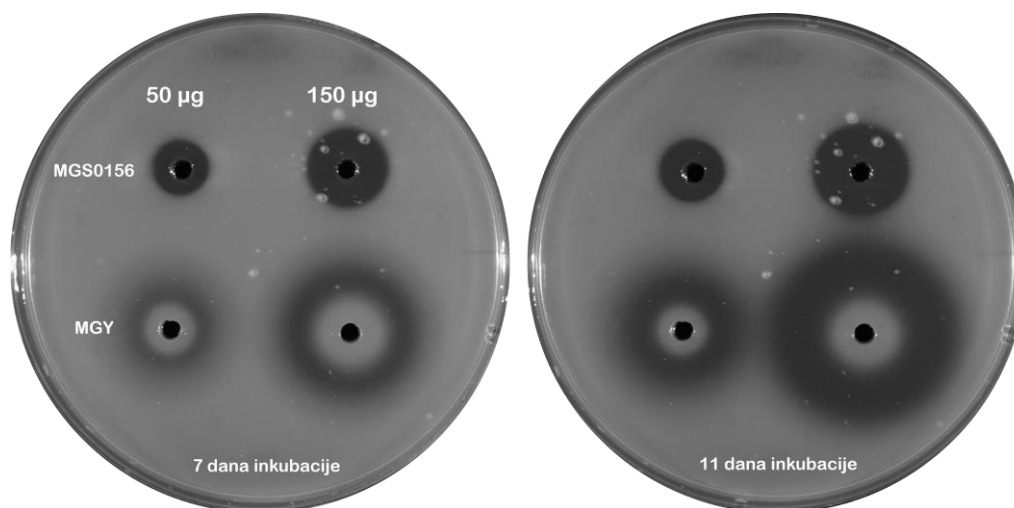
Nakon izmjene pufera C s puferom za pohranu i ukoncentriravanja frakcija 2 do 4 pročišćenog proteina, koncentracija nadeksprimiranog proteina je iznosila $c_{(MGY)} = 9,9$ mg/mL u ukupno 270 μ L, dakle prinos prekomjerne ekspresije nakon pročišćavanja i ukoncentriravanja iz 800 mL kulture iznosio je $\approx 2,5$ mg. Sljedovi svih eksprimiranih proteina prethodno su potvrđeni sekvenciranjem u usluzi tvrtke *Macrogen*.

4.1.4. Aktivnost enzima *MGS0156*, *MGS0156_H231Y* i *MGY* prema polimljičnoj kiselini u agaroznom gelu

Pročišćenim i ukoncentriranim proteinima testirana je aktivnost prema polimljičnoj kiselini u agaroznom gelu kao što je opisano u potpoglavlju 3.4.7. Materijala i metoda.

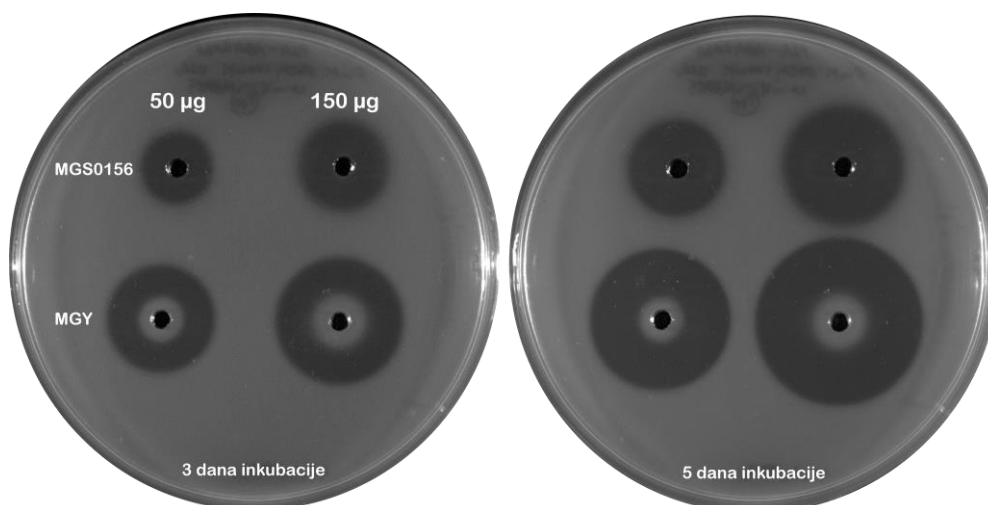
Usporedno je testirana aktivnost dvije različite koncentracije proteina *MGS0156* i *MGY*. Slika 21 prikazuje rezultat ovog difuzijskog testa hidrolitičke aktivnost prema suspenziji PLA učvršćenoj u agaroznom gelu. Hidrolizom PLA u gelu nastaju prozirne regije (na slici tamnosive boje), takozvani „halo-efekt“. Na slici je vidljivo da oba enzima pokazuju hidrolitičku aktivnost prema PLA. Ovdje je prvi put pokazana hidrolitička aktivnost metagenomskog enzima *MGY* prema polimljičnoj kiselini. U oba slučaja „halo-efekt“ većeg promjera je uočen pri većoj koncentraciji enzima. *MGY* unutar zone hidrolize ostavlja pojas nerazgrađene PLA koji odgovara području visoke koncentracije enzima. U tom pojasu

vjerojatno dolazi do inhibicije enzima, ali mehanizam ovoga nije poznat. Uz to, vanjski rubovi hidroliziranog pojasa izgledaju difuzno što može značiti da su uvjeti za aktivnost MGY prema PLA u agaroznom gelu neoptimizirani.



Slika 21. Test enzimске aktivnosti MGS0156 i MGY prema PLA u agaroznom gelu. U bunare su naneseni enzimi u dvije količine, 50 i 150 µg; u gornjem redu MGS0156 i donjem redu MGY. Ploča je inkubirana na 30 °C i slikana nakon 7 dana (slika lijevo) i 11 dana (slika desno) inkubacije. MGY pokazuje visoku aktivnost prema PLA u agaroznom gelu, dok je ista prethodno pokazana za MGS0156.

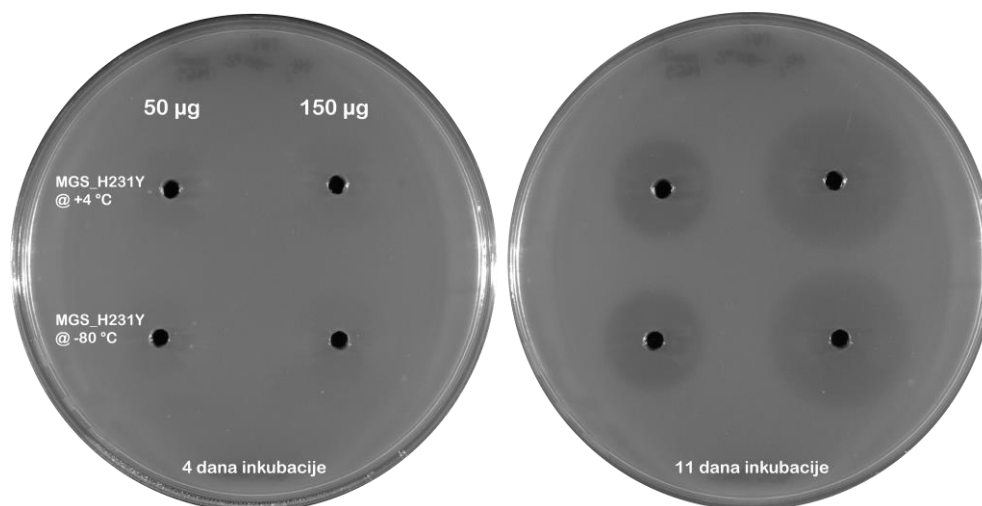
Kako bi se postigla hidrolitička aktivnost MGY već pri početku difuzije kroz gel, u drugom pokušaju PLA-agarozne ploče pripremljene su u sastavu pufera za pohranu s pretpostavkom da će potencijalno optimiziraniji sastav pufera (za pohranu) potpomognuti novootkrivenu aktivnost. Slika 22 prikazuje rezultat ovog testa, pri čemu se vidi da je unutarnji pojas (uz bunar) nehidrolizirane PLA nešto manji te su vanjske granice hidroliziranog pojasa jasnijih rubova, što upućuje na moguću povećanu efikasnost hidrolitičke razgradnje PLA.



Slika 22. Test enzimске aktivnosti enzima MGS0156 i MGY prema PLA u agaroznom gelu pripremljenom u sastavu pufera za pohranu. U bunare su nanoseni enzimi u dvije količine, 50 i 150 µg: u gornjem redu MGS0156 i donjem redu MGY. Ploča je inkubirana na 30 °C i slikana nakon 3 dana (slika lijevo) i 5 dana (slika desno) inkubacije. Zona inhibicije MGY (bijela zona uz bunar) smanjena je koristeći pufer za pohranu u pripremi gela umjesto standardnog protokola za pufer.

Izmjenom pufera za pripremu PLA-agaroznog gela, odnos aktivnosti pri nižoj i višoj koncentraciji enzima je zadržan kod oba enzima. Također, i u novom sastavu MGY zadržava veću aktivnost prema PLA u gelu u odnosu na MGS0156 za koji je pokazano da ima jednu od najvećih zabilježenih aktivnosti prema PLA u literaturi.^{13,84} Dakle, difuznim testom u agaroznom gelu je ovdje prvi put zabilježena aktivnost enzima MGY prema PLA, koja je ujedno među najvećima uspoređujući s rezultatima iz literature. Visoka aktivnost prema ovoj biorazgradivoj plastici čini MGY dobrim kandidatom za optimizaciju stabilnosti (temperaturne, pH) i aktivnosti prema PLA s ciljem primjene u industrijskoj enzimskoj razgradnji polimera mliječne kiseline.

U idućem koraku ispitana je aktivnost mutanta MGS0156_H231Y prema PLA u agarozu. Provjerene su aktivnosti enzima pohranjenih na -80 °C i na +4 °C (slika 23). Pokazano je da mutant MGS0156_H231Y ima samo slabu rezidualnu aktivnost prema PLA u agarozu (slika 23, 11 dana inkubacije) sudeći prema slabo vidljivom „halo-efektu“.



Slika 23. Test enzimске aktivnosti mutanta MGS0156_H231Y prema PLA u agaroznom gelu. Mutant je u bunare nanosen u dvije količine, 50 i 150 µg: u gornjem redu iz uzorka skladištenog na +4 °C i donjem redu iz uzorka skladištenog na -80 °C.

Ploča je inkubirana na 30 °C i slikana nakon 4 dana (slika lijevo) i 11 dana (slika desno) inkubacije. Mutant MGS0156_H231Y je pokazao vrlo slabu aktivnost prema PLA, neovisno o uvjetima pohrane.

Prema podjednakim veličinama „halo-efekta“ između dviju istih koncentracija može se zaključiti da uvjeti pohrane pri ove dvije temperature nemaju efekt na već slabu hidrolaznu

aktivnost mutanta prema PLA u agarozu. Rezidualna aktivnost pokazana je i usporednim testom aktivnosti mutanta i divljeg tipa MGS0156 prema PLA u agaroznom gelu (slika 24), ponovno pri dvije različite koncentracije.



Slika 24. Test enzimske aktivnosti divljeg tipa MGS0156 i mutanta MGS0156_H231Y prema PLA u agaroznom gelu. U bunare su nanoseni enzimi u dvije količine, 50 i 150 µg: u gornjem redu MGS0156 i donjem redu MGS0156_H231Y. Ploča je inkubirana na 30 °C i slikana nakon 4 dana (slika lijevo) i 11 dana (slika desno) inkubacije.

Aktivnost oba enzima veća je pri višoj koncentraciji, a granice hidrolize očekivano pokazuju manji „halo-efekt“ mutanta (manji promjer „halo-efekta“ kod mutanta u odnosu na divlji tip) vjerojatno jer mu je otežana difuzija kroz gel s vrlo slabo hidroliziranom PLA.

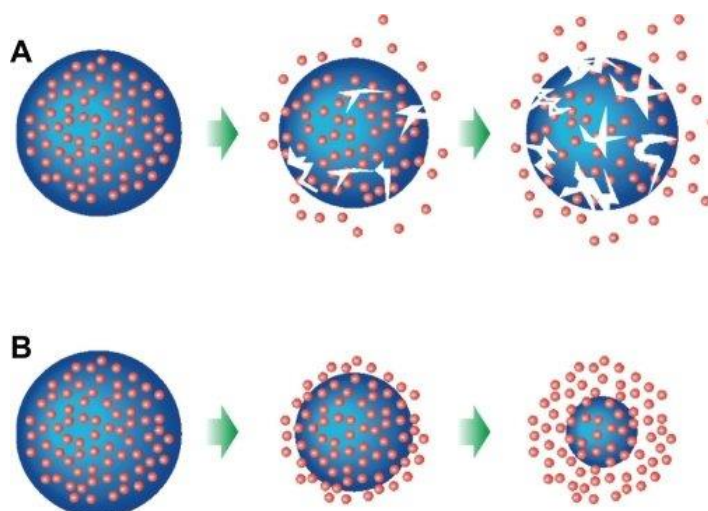
Pokazano je da mutant MGS0156_H231Y ima oslabljenu aktivnost prema PLA u agaroznom gelu u odnosu na divlji tip enzima, međutim aktivnost MGS0156_H231Y prema drugim alifatskim supstratima i aromatskim supstratima još nije ispitana. Teorijska predviđanja Feng i suradnika napravljena za kaprolakton kao supstrat upućuju na povećanu aktivnost enzima, a ovdje je pokazano da je položaj 231 (histidin) presudan za visoku hidrolitičku aktivnost prema PLA.¹⁵

Test hidrolitičke aktivnosti metodom difuzije enzima u agaroznom gelu sa supstratom vrlo je jednostavan i pogodan za kvalitativnu i relativnu kvantifikaciju aktivnosti enzima. Zaključci o relativnoj aktivnosti enzima mogu se donositi usporedbom površine zone hidrolize enzima od interesa u odnosu na kontrolnu. Usporedba zona hidrolize ujedno je i mana ove metode jer zona hidrolize ovisi o nizu parametara: gustoći agaroze, pripremi suspenzije (izrazito hidrofobna PLA može tvoriti veće agregate), debljini ploče i vremenu inkubacije.

4.1.5. Praćenje kinetike hidrolize enzima MGS0156, MGS0156_H231Y i MGY u suspenziji polimljične kiseline

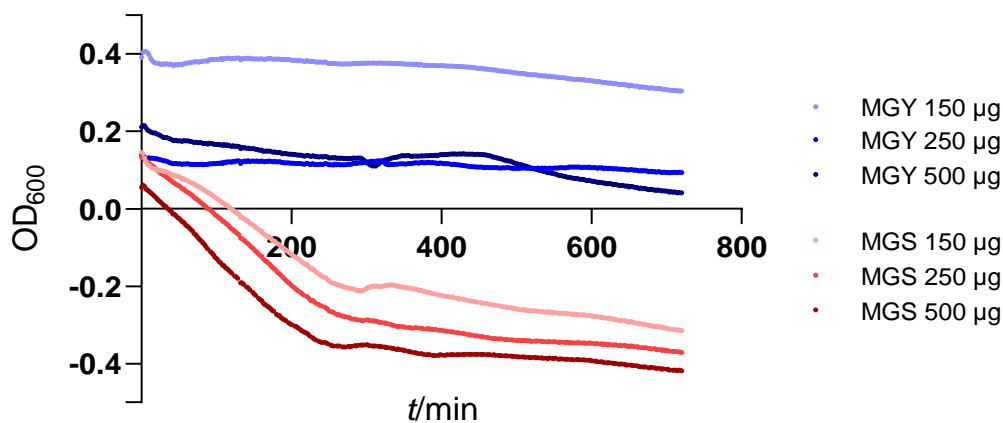
Neki od izazova u istraživanju enzimski katalizirane razgradnje sintetskih polimera su postavljanje testa za kvantitativno mjerenje brzine razgradnje s obzirom na netopljivost polimernog supstrata u vodi, nestandardizirana karakterizacija plastičnih supstrata zbog čega je otežana usporedba rezultata iz znanstvenih radova (duljina i razgranatost lanaca polimera, stupanj kristaliničnosti, morfologija površine, aditivi u plastici, oblik plastičnih čestica (filmovi, kuglice), distribucija veličina polimernih agregata u suspenziji samih polimera, stereokemija). U ovom radu praćena je enzimski aktivnost hidrolize na agregatima polimljične kiseline u suspenzijama različitih elektrolitnih sastava. Turbidimetrijski je praćena hidrolitička aktivnost enzima MGS0156, MGS0156_H231Y i MGY kao što je opisano u potpoglavlju 3.4.8. Materijala i metoda.

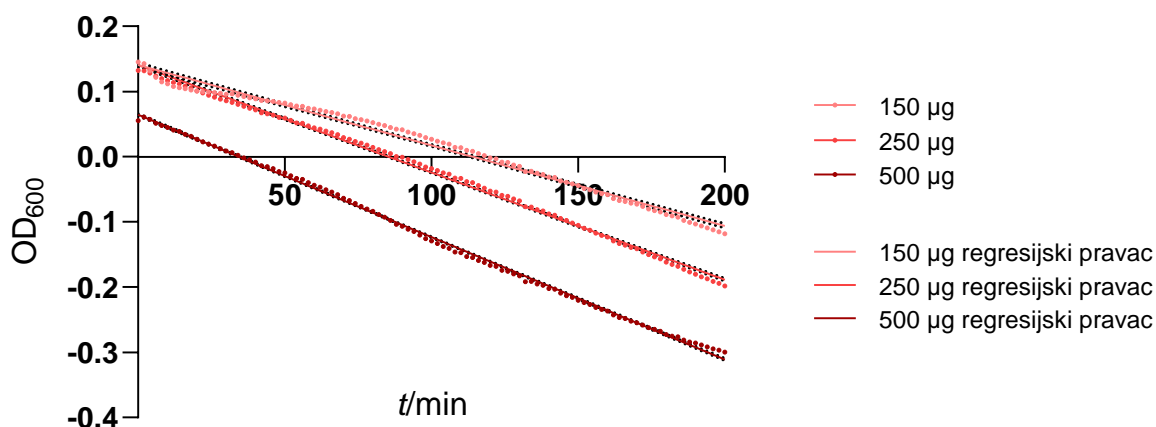
Rezultati dobiveni ovom metodom pokazali su slabiju reproducibilnost za enzim MGY, dok se MGS0156_H231Y pokazao katalitički neaktivnim i u ovom testu. Slabija reproducibilnost za MGY može biti posljedica neoptimalnih uvjeta za katalitičku aktivnost enzima; sastava pufera, koncentracije pojedinih komponenti pufera, temperature sustava, koncentracije supstrata, morfologije supstrata itd. Druga mogućnost je nestabilnost suspenzije koja se može kontrolirati dodavanjem aditiva za stabilnost u sustav, uz uvjet da ne ometaju funkciju proteina. Povećanje stabilnosti može se postići promjenom pH, ionske jakosti i dodavanjem drugih polimera u sustav (polielektroliti koji se adsorbiraju na površinu agregata). Međutim, takva optimizacija pokusa zahtijeva uvođenje novih metoda i period optimizacije što nadilazi opseg ovog diplomskog rada. Treća mogućnost je razlika u površinskom mehanizmu proteinske aktivnosti. Rosato i suradnici u svom radu iz 2022. godine pokazali su da enzimi koji razgrađuju plastiku (na nekoliko lipaza, kutinaza i na proteinazi K) posjeduju dva različita površinska mehanizma razgradnje polimernih supstrata (između ostalih i PLA) glede promjene morfologije površine: polimeri su podložni ili eroziji matrice (engl. *bulk degradation*) pri čemu se hidroliza događa u središtu materijala na koji način se značajno smanjuje molekulska masa krutog supstrata, ili površinskoj eroziji (engl. *surface erosion*) pri čemu se polimerni materijal gubi s površine (slika 25).⁸⁵ Međutim, ovo je pokazano za krute plastične supstrate, ali ne za supstrate u formi agregata. U slučaju da neki od ovih enzima pokazuje mehanizam erozije matrice, do promjene u turbiditetu ne bi nužno došlo unatoč hidrolitičkoj aktivnosti prema PLA. S obzirom na rezultate dobivene za mutant i divlji tip MGS0156, koji se slažu s očekivanjem, izgledno je da je neki od ovih razloga uzrok neponovljivim rezultatima za MGY.



Slika 25. Mehanizmi degradacije polimernih nanočestica. **A** – mehanizam erozije matrice (engl. *bulk degradation*): hidroliza se odvija u unutrašnjosti materijala i **B** – mehanizam površinske erozije (engl. *surface erosion*): hidroliza i gubitak mase materijala odvijaju se na površini krutog supstrata.⁸⁶

Hidrolitička aktivnost enzima MGS056 je uspješnije popraćena. Rezultati jednog od mjerenja prikazani su na slici 26. Na y-osi je turbiditet, a na x-osi vrijeme u minutama. U početnom periodu hidrolize krivulja je nalik pravcu (R^2 oko 0,99) tako da se nagib koristi dalje za usporedbu brzina.





Slika 26. Turbidimetrijsko praćenje kinetike hidrolize PLA u suspenziji sastava: $\omega = 0,4 \%$ PLA, c (HEPES) = 20 mmol/L, uz dodatak KCl do $I_c = 0,1$ mmol/L. Na y-osi dana je optička gustoća (od koje je oduzeta slijepa proba) kao mjera veličine čestica, a na x-osi vrijeme u minutama. Na prvoj slici prikazano je praćenje kinetike hidrolize PLA enzima MGS0156 i MGY u rasponu od tri koncentracije enzima (0,6; 1; 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) tijekom 12 sati. U slučaju enzima MGY ne opaža se promjena koja bi rezultirala smanjenjem čestica, dok je u sustavima s MGS0156 ona vidljiva. Kod MGS0156 opaža se linearni pad turbiditeta suspenzije tijekom prvih tri sata koji je pripisan hidrolizi PLA nakon kojeg dolazi do zasićenja hidrolitičke aktivnosti. Na drugoj slici uvećan je dio linearnog pada turbiditeta i na tom segmentu je provedena linearna regresija. Od manje prema većoj koncentraciji enzima redom su dobiveni nagibi: $-0,0012 \text{ min}^{-1}$, $-0,0016 \text{ min}^{-1}$ i $-0,0019 \text{ min}^{-1}$. Parametri linearne regresije pokazuju da se u ovom intervalu koncentracija brzina hidrolize PLA povećava s porastom koncentracije enzima u sustavu.

Iz nagiba dobivenih linearnom regresijom vidljivo je da je hidroliza najbrža u sustavu najviše koncentracije divljeg tipa enzima MGS0156 (tamnocrveni pravac) i najsporija u sustavu s najnižom koncentracijom od tri za enzim MGS0156 (rozi pravac). Dakle, u ovom intervalu koncentracija povećanjem koncentracije enzima raste brzina nastanka produkta. Na ovaj način pokazano je da MGS0156 ima detektabilnu hidrolitičku aktivnost prema PLA u suspenziji u realnom vremenu pod uvjetima navedenim u slici 26. Enzim MGY ne pokazuje značajnu hidrolizu supstrata PLA u suspenziji. Tek se pri najvećoj koncentraciji opaža mali pad turbiditeta koji vjerojatno potječe od hidrolize PLA. Produkti hidrolitičke razgradnje PLA nisu kvantificirani, već je svrha ovog dijela bila detektirati aktivnost enzima MGS0156, MGS0156_H231Y i MGY u tekućem mediju i istu kvalitativno raspraviti.

Između testa aktivnosti u agaroznom gelu i turbidimetrijskog testa u suspenziji za *screening* je pogodniji test u agaroznom gelu. S druge strane, praćenje kinetike u suspenziji je brže i pogodnije za testiranje različitih uvjeta te je zbog lakše kontrole parametara u sustavu kvantifikacija aktivnosti olakšana. Nedostatak oba testa je heterogenost sustava, odnosno hidrolize u suspenziji koja se ne može opisati jednostavnim modelima enzimske aktivnosti

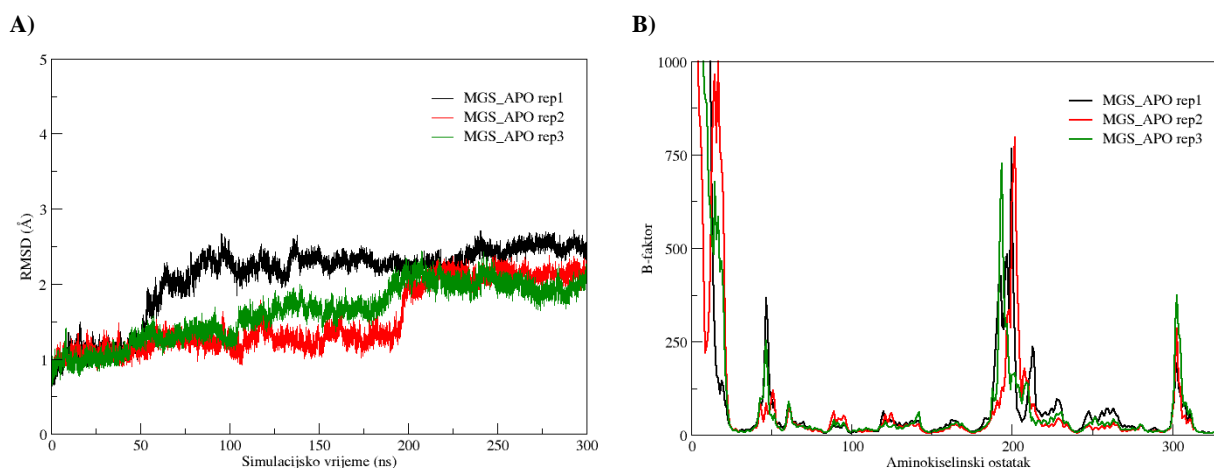
poput Michaelis-Menten kinetičkog modela. Zbog navedenog interpretacija rezultata je velikim dijelom kvalitativna (opisna).

4.1.6. Analize simulacija molekulske dinamike MGS0156 i MGY

Kao što je prethodno opisano u poglavlju 3.6. Materijala i metoda, analize simulacija molekulske dinamike se provode s ciljem kvantifikacije promjena u strukturi i usporedbe struktura unutar triplikata te između apo strukture i njoj pripadajućih kompleksa s ligandima PLA.

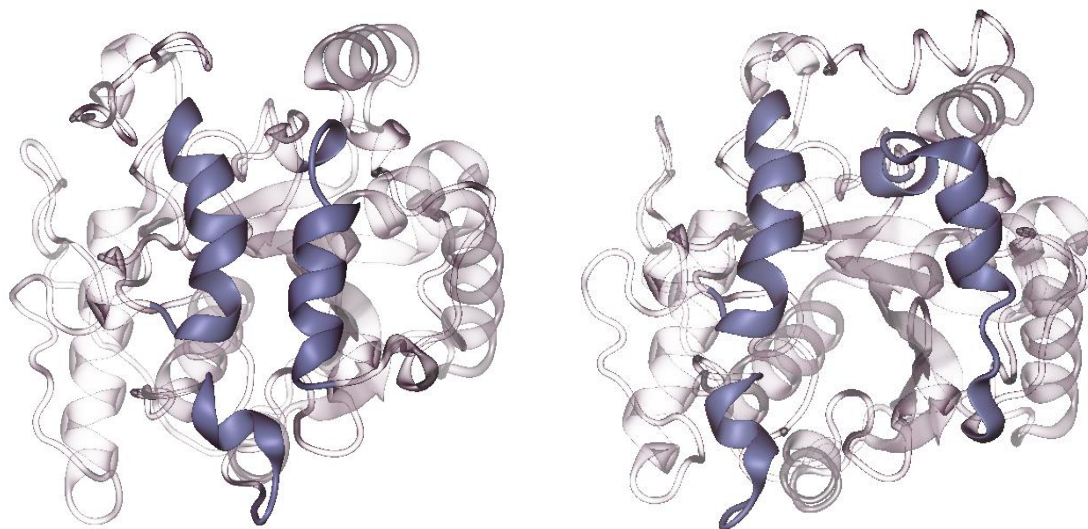
Za enzime MGS0156 i MGY provedene su simulacije apo strukture enzima, kompleksa s DL-PLA i kompleksa s LD-PLA. Apo struktura i kompleksi DL te LD napravljeni su u triplikatima u trajanju od 300 ns. Za kompleks DL puštena je i četvrta simulacija (kod oba enzima) zbog poteškoća u računu entropije i entalpije vezanja liganda. Radi olakšanja vizualizacije rezultata, iz svakog triplikata navedenog u rezultatima izabrana je jedna reprezentativna trajektorija s najstabilnijom RMSD vrijednosti kroz vrijeme S obzirom na rezultat testa aktivnosti mutanta MGS0156_H231Y prema PLA, simulacije molekulske dinamike i njihove analize za mutant i njegove komplekse nisu provedene kako bi se uštedili računalni resursi i ograničio opseg diplomskog rada.

Simulacije molekulske dinamike apo strukture enzima MGS0156 tijekom 300 ns u sva tri ponavljanja pokazale su uravnoteženost sustava (slika 27 A)), međutim sa naglim skokom RMSD-a u jednoj točki simulacije (1. struktura oko 50 ns, 2. i 3. oko 190 ns) koja upućuje na konformacijsku promjenu.



Slika 27. A) RMSD okosnice MGS0156 u apo strukturi, B) B-faktor aminokiselina enzima iz apo strukture MGS0156.

Vizualizacijom trajektorija u VMD-u uočeno je zatvaranje poklopca iznad veznog mjesta u točkama simulacije koje odgovaraju naglom skoku u RMSD vrijednosti (slika 28).

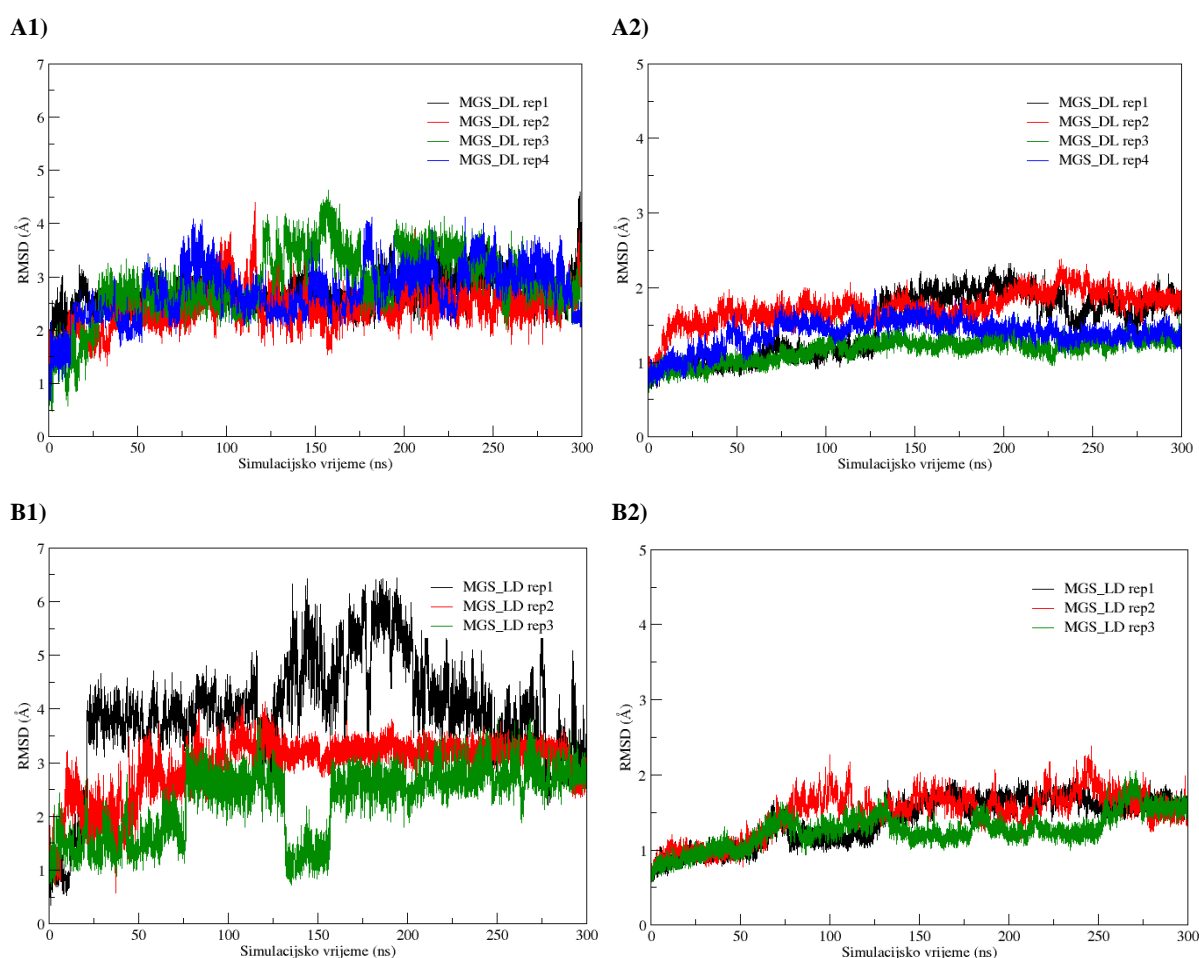


Slika 28. Otvorena i zatvorena konformacija poklopca MGS0156 (perspektiva u smjeru veznog mjesta, prema šupljini). Sivoplavom bojom označene su α -zavojnice poklopca.

Doprinos aminokiselina veznog mjesta (i poklopca) vezanju supstrata LD-PLA i DL-PLA u vezno mjesto enzima MGS0156 i MGY ispitan je u idućem poglavlju, 4.1.7. *Slobodna Gibbsova energija vezanja i dekompozicija po aminokiselinskim ostatcima*. Primjer uloge poklopca u razgradnji plastike istražena je u radu Streit i suradnika iz 2023. godine, u kojem je pokazano da poklopac ima utjecaj na efikasno vezanje supstrata u vezno mjesto enzima, ali da računalno istraživanje ovog fenomena može biti ograničeno zbog polazne strukture enzima koja nema nužno konformaciju s optimalnim položajem poklopca za vezanje supstrata pa tako docking supstrata u rigidnu strukturu sa suboptimalnim položajem poklopca potencijalno ne pokazuje realni afinitet vezanja supstrata, zbog čega je sigurnije zaključke donositi na temelju simulacija molekulske dinamike. Eksperimentalno su pokazali i smanjenu katalitičku efikasnost u odsustvu poklopca na odgovarajućem mutantu.⁸⁷ Navedena saznanja pojašnjavaju ulogu poklopca u enzimima (uglavnom) tipa lipaza koji razgrađuju plastične polimerne supstrate.

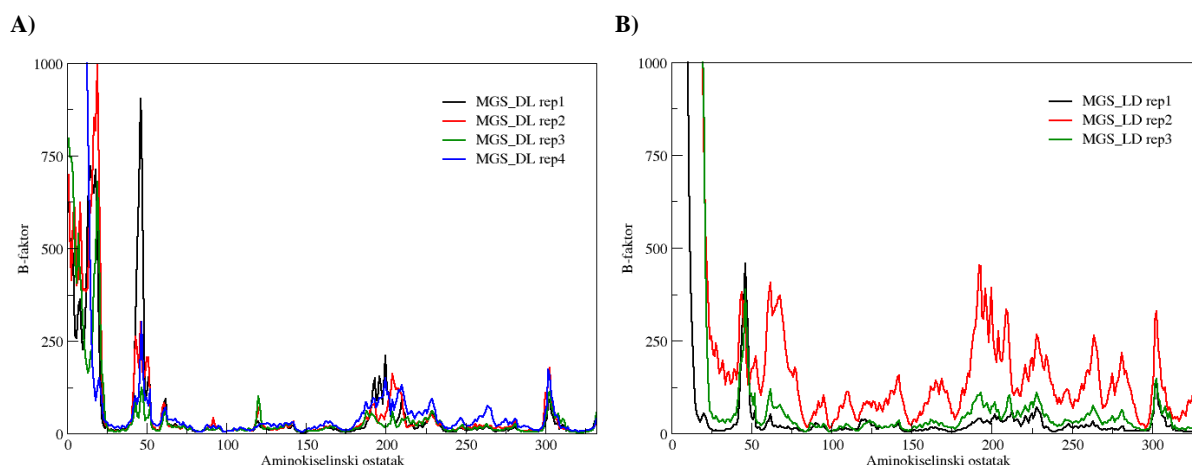
Analize B-faktora okosnice aminokiselina unutar triplikata prikazane su na slici 27 B). Prvih 25 aminokiselina ima vrlo velike fluktuacije u odnosu na prosječnu strukturu zbog velike steričke slobode lanca aminokiselina na N-kraju, tako da su prizori uvećani na skalu aminokiselina iz ostatka strukture s najvećim fluktuacijama. Iz prikaza B) vidljivo je da ostatci oko položaja 50, 200 i 300 imaju najveće fluktuacije. To su regije omći (aminokiseline oko položaja 50 i 300), strukturnih elemenata s također velikom steričkom slobodom, te područje mobilnog poklopca iznad veznog mjesta (oko položaja 200).

Trajektorije kompleksa DL pokazale su se stabilnijima tijekom simulacije u usporedbi s trajektorijama LD kompleksa (slika 29). S druge strane, visoke fluktuacije teških atoma (svih osim vodika) liganda (koji nije vezan kovalentno za enzim) tijekom simulacije su očekivane što je i vidljivo na slici 29 A1) i B1). U slučaju kompleksa nema naglog skoka u RMSD vrijednosti tijekom simulacije što indicira izostanak prethodno spomenute konformacijske promjene koja je pripisana zatvaranju poklopca. Ligand, oligomer polimljične kiseline, vezan je u vezno mjestu enzima i pritom stabiliziran neveznim interakcijama s aminokiselinama veznog mjesta i poklopca, što je komentirano u poglavlju 4.1.7., pri čemu ometa zatvaranje istog.



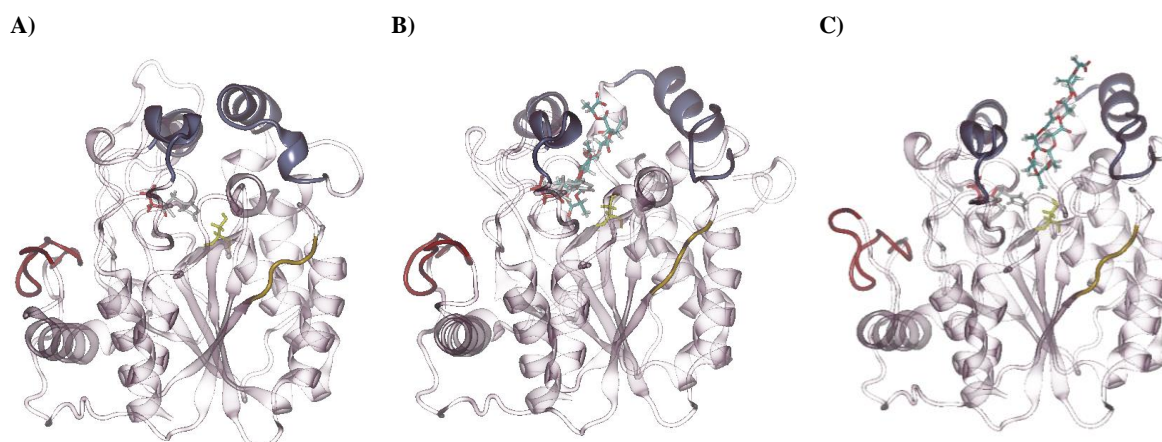
Slika 29. A1) RMSD teških atoma liganda u DL-kompleksu MGS0156, A2) RMSD okosnice enzima u DL-kompleksu MGS0156, B1) RMSD teških atoma liganda u LD-kompleksu MGS0156, B2) RMSD okosnice enzima u LD-kompleksu MGS0156.

Iz prikaza fluktuacija aminokiselina na slici 30 vidljivo je da su fluktuacije aminokiselina mobilnog poklopca u slučaju oba kompleksa manje u usporedbi s onima u apo strukturi.



Slika 30. B-faktor aminokiselinskih ostataka enzima MGS0156 u kompleksu s A) DL-PLA i B) LD-PLA.

Ovaj rezultat također potvrđuje pretpostavku prema RMSD rezultatima, da izostanak zatvaranja poklopca znači stabiliziranje liganda u veznom mjestu aminokiselinama šupljine i aminokiselinama poklopca. Također, valja spomenuti da je generalno manja stabilnost struktura u LD-kompleksu moguća posljedica same slabije stabilizacije liganda kiralnosti LD.

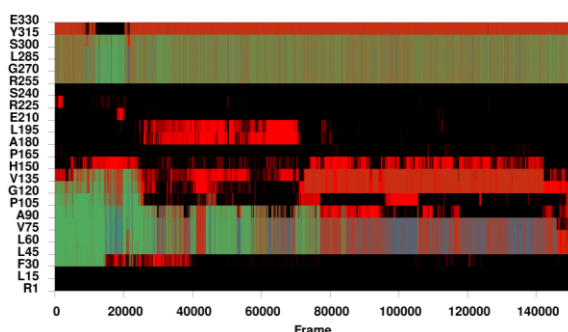


Slika 31. Strukture MGS0156 A) apo B) u kompleksu s DL-PLA i C) u kompleksu s LD-PLA. Istaknute su fluktuabilne regije, supstrat PLA i katalitička trijada (žuto serin, sivo histidin i crveno aspartat). Crvenom bojom je obojana regija oko položaja 45, žutom oko 120, a sivoplavom zavojnice poklopca.

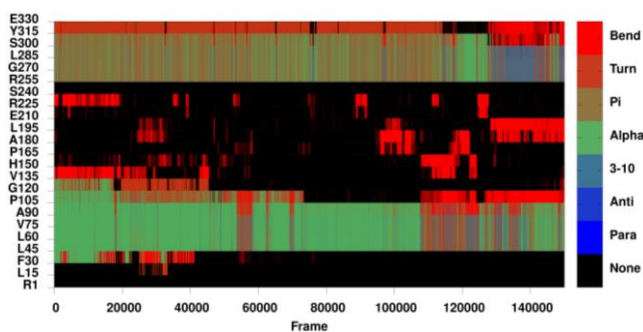
Ligand je u veznom mjestu vezan u savijenoj konformaciji, oblika slova „U“.

Analize sekundarnih struktura provedene su na svakoj trajektoriji apo i kompleksa MGS0156 i prikazane na slici 32. U kompleksu LD u dvije (2. i 3.) od tri replike protein zadržava sekundarne strukture tijekom cijele trajektorije, s najznačajnijim promjenama uglavnom u omčama koje na nekoliko položaja prelaze u kategoriju bez sekundarne strukture. Općenito, aminokiseline u slijedu 185-195 ne strukturiraju se u α -zavojnica koja postoji u

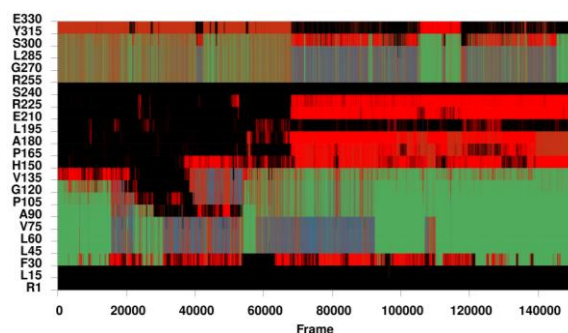
riješenoj kristalnoj strukturi. U DL kompleksima struktura se čini nešto manje stabilna u odnosu na LD, s većim promjenama u sekundarnoj strukturi proteina. Profil sekundarnih struktura je sličan onom u LD kompleksu, no u 2 od 4 trajektorije (1. i 2.), aminokiseline na položajima 255 do 300 napuštaju sekundarnu strukturu zavojnice u manje uređenu (segmenti alfa zavojnica poklopca su 185-195, 255-265 i 300-310). Struktura zavojnica koje čine poklopac relativno je očuvana kroz trajektorije DL za zavojnicu oko položaja 300, međutim za onu oko položaja 190 i 260 (sa suprotne strane pukotine) nije. U trajektorijama apo proteina nešto je veća uređenost strukture u poklopcu kao cjelini. U strukturi proteina DL kompleksa i u apo strukturi zastupljenije su promjene α -zavojnice u 3_{10} , odnosno π -zavojnicu, prema DSSP modelu.



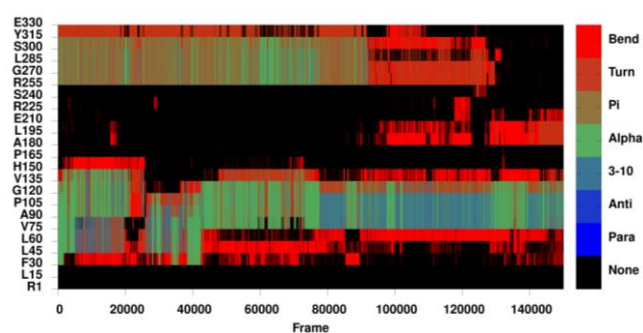
Apo 1



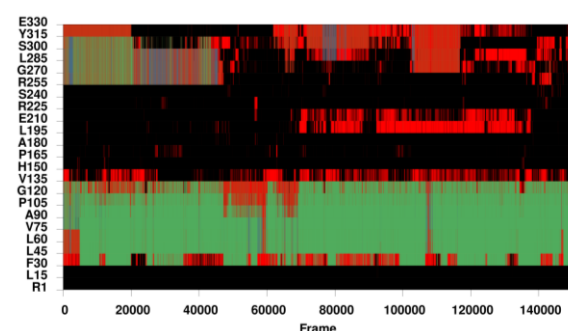
Apo 2



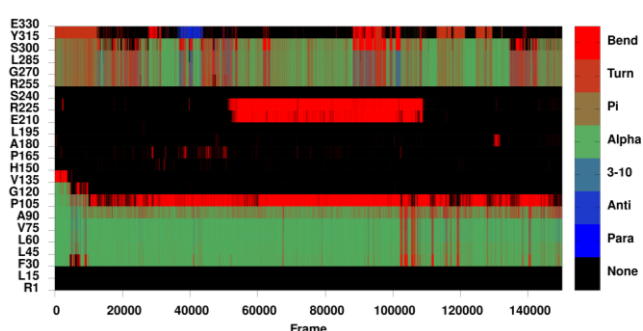
Apo 3



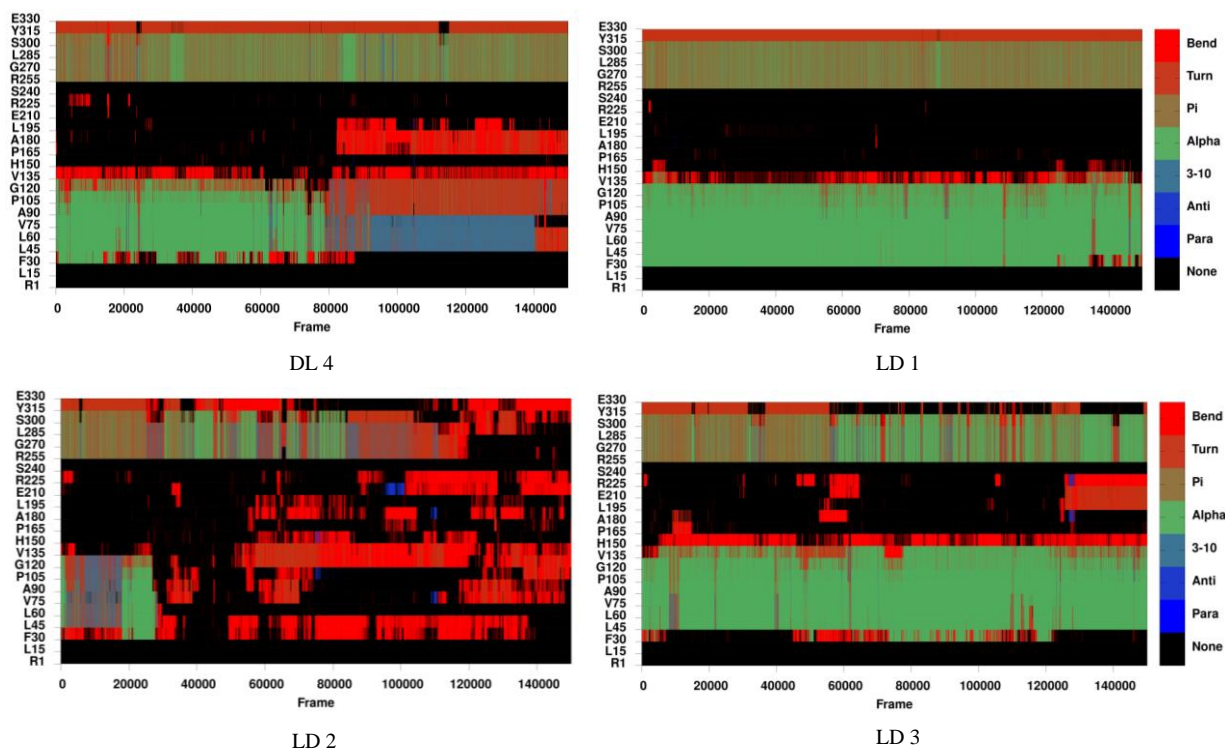
DL 1



DL 2

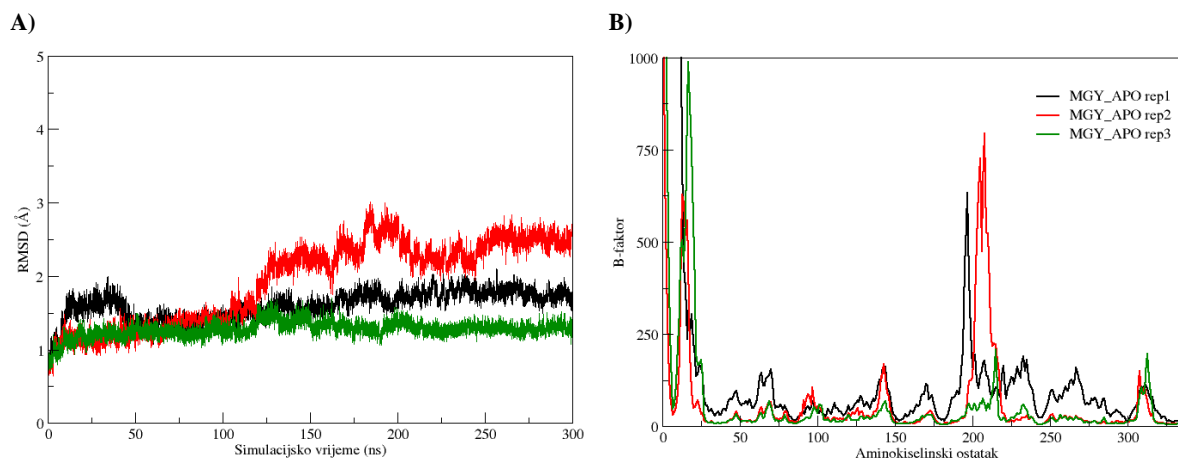


DL 3



Slika 32. Analize sekundarnih struktura enzima MGS0156 u apo (Apo 1-3) obliku i DL- (DL 1-4) te LD- (LD 1-3) kompleksima.

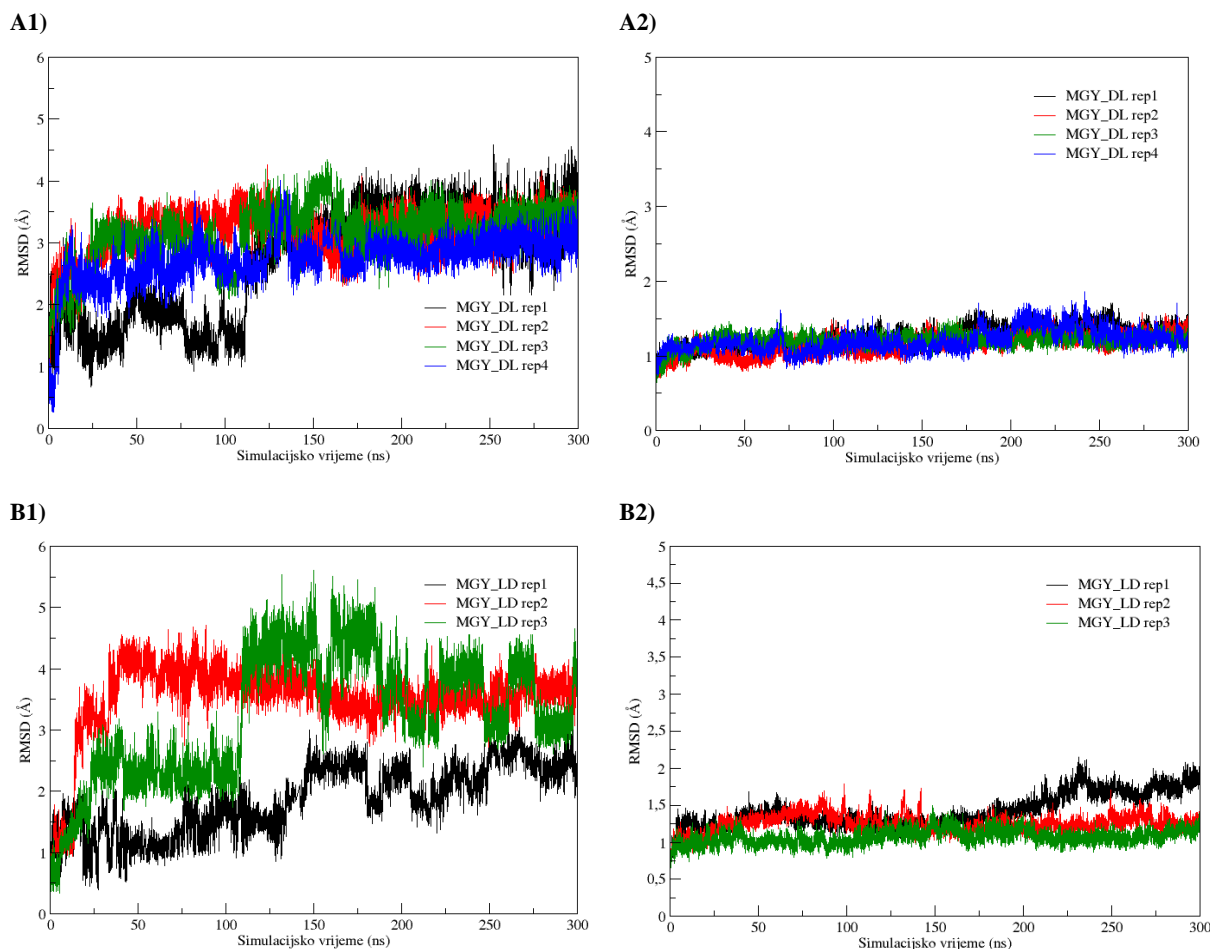
Rezultat analiza RMSD vrijednosti koja je provedena na sve tri replike apo struktura MGY prikazan je na slici 33. Sudeći prema RMSD vrijednostima, najstabilnija se čini struktura enzima tijekom treće simulacije iz triplikata. Međutim, i ovaj enzim ima nekoliko α -zavojnica iznad vezne pukotine koje također mogu činiti poklopac iznad veznog mjesta. Vizualizacijom trajektorija uočeno je da u slučaju druge simulacije dolazi do konformacijske promjene, odnosno djelomičnog zatvaranja poklopca iznad veznog mjesta u vremenskom koraku oko 120 ns. S obzirom na to da struktura ovog enzima nije eksperimentalno određena već samo modelirana, i da je u samo jednoj simulaciji opaženo zatvaranje poklopca, ne može se sa sigurnošću tvrditi da se ono i događa. Zbog toga bi bilo korisno produžiti trajanje svake od simulacija i/ili simulirati nove replike sustava.



Slika 33. A) RMSD okosnice MGY u apo strukturi, B) B-faktor aminokiselina enzima iz apo strukture MGY.

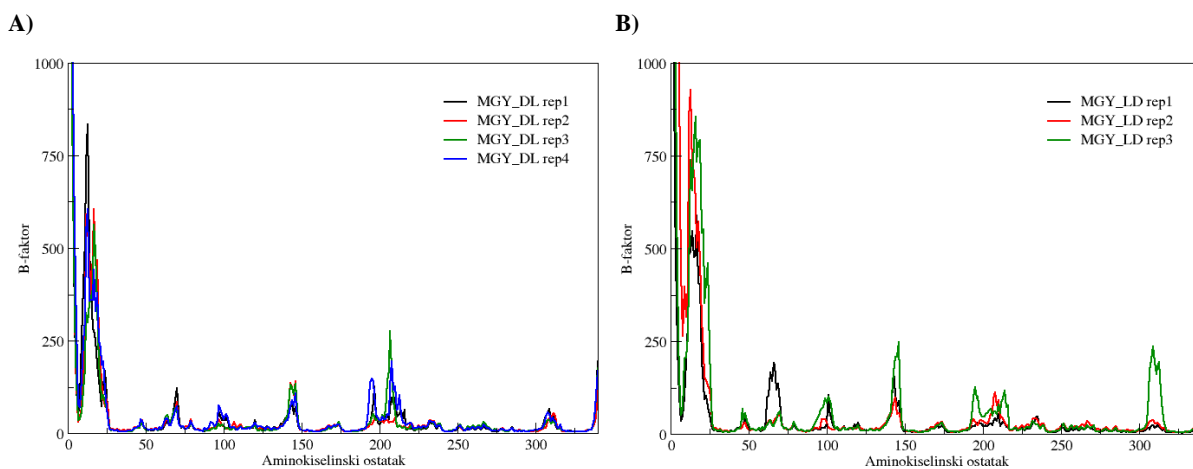
Uspoređujući fluktuacije pojedinih aminokiselina (B-faktor) trajektorije 2 i 3 (trajektorija 1 ima također slični profil fluktuacija, samo sa generalno većim fluktuacijama aminokiselina u strukturi), vidi se da su profili gotovo isti (slika 33 B)), sa razlikom u visini pikova na položajima zavojnica koje omeđuju vezno mjesto i vjerojatno predstavljaju mobilni poklopac. Najviši pik je onaj oko položaja 210, kao što je bio slučaj i kod MGS0156. Visoke su fluktuacije i oko aminokiselina na položajima 70 100, 140 i 310. Regiju oko položaja 100 i 300 čine aminokiseline omči (ili granično α -zavojnica) ispod zavojnica poklopca, koje grade vezno mjesto. Regija oko položaja 140 nalazi se na suprotnoj strani od poklopca u globularnoj strukturi proteina.

U slučaju kompleksa DL- i LD- strukture tijekom simulacija pokazale su se relativno uravnoteženima kao što je vidljivo na slici 34 A2) i B2). Enzim u kompleksu s LD i DL ligandom prikazan je na slici 34. Ponovno su RMSD vrijednosti liganda veće i nestabilnije što je i očekivano za nekovalentno vezanu manju molekulu. U kompleksu s DL- enantiomernim sastavom liganda PLA manje su fluktuacije same strukture proteina, ali i liganda, u odnosu na iste kod LD-PLA. Kao i u slučaju s MGS0156, ovo može biti tehnička posljedica provedbe simulacija molekulske dinamike (prilikom minimizacija i ekvilibracija nisu postignute optimalne interakcije između proteina i liganda, odnosno sam ligand može biti u nepovoljnim konformacijama što je moguće u slučaju loše parametrizacije liganda), ali je isto tako vjerojatno da je posljedica nešto slabije stabilizacije LD- enantiomera u usporedbi s DL-enantiomerom. Niti u slučaju kompleksa enzima MGY vizualizacijom trajektorije nije opažena veća konformacijska promjena, kao niti prema RMSD vrijednostima.



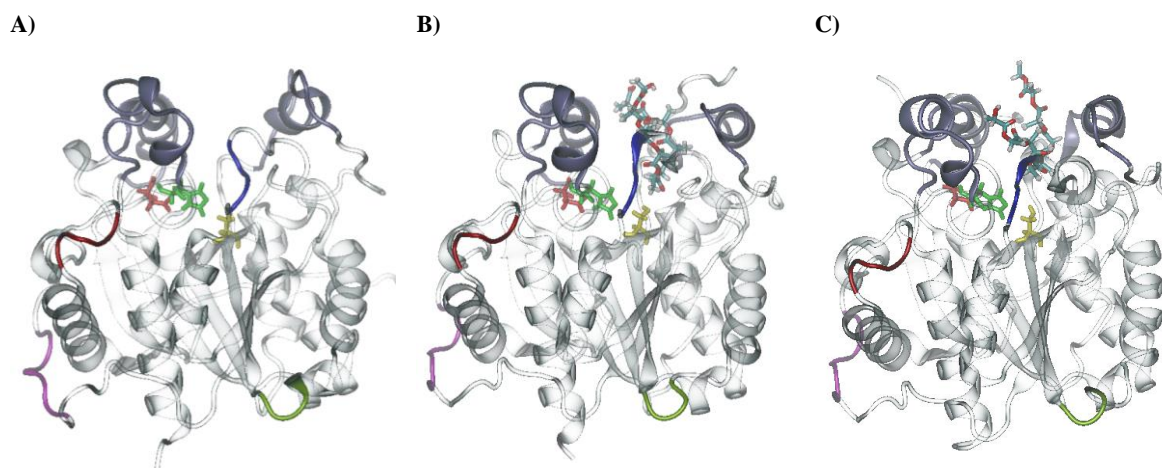
Slika 34. A1) RMSD teških atoma liganda u DL-kompleksu MGY, A2) RMSD okosnice enzima u DL-kompleksu MGY, B1) RMSD teških atoma liganda u LD-kompleksu MGY, B2) RMSD okosnice enzima u LD-kompleksu MGY

Profili B-faktora aminokiselina ne razlikuju se značajno između dva kompleksa, LD- i DL-, niti značajno između struktura unutar triplikata (slika 35).



Slika 35. B-faktor aminokiselinskih ostataka enzima MGY u kompleksu s A) DL-PLA i B) LD-PLA.

Regije najvećih fluktuacija u kompleksu DL- su oko položaja 45 (crveno) , 70 (boja ciklame), 100 (plavo), 145 (žuto), 200 i 310 (sivoplava, poklopac), prikazane na slici 36. U kompleksu LD- to su regije oko položaja 45, 70, 100, 140, 200 i 310. Regija oko položaja 45 globularne strukture proteina je omča između dviju α -zavojnica sa suprotne strane od veznog mjesta. Područje oko položaja 70 je lanac nedefinirane sekundarne strukture nedaleko od regije 40. Položaj 100 nalazi se na kratkoj zavojnici koja tvori vezno mjesto, između zavojnica poklopca. Regija oko položaja 145 je kao i 45, omča između zavojnica sa suprotne strane proteina od veznog mjesta. α -zavojnica koju čine ostaci 200-210 je mobilnija regija poklopca čije pomicanje u apo strukturama predvodi zatvaranje poklopca. Regiju položaja 300-310 čine ostaci veznog mjesta i jedne od α -zavojnica poklopca. Profili fluktuacija dva kompleksa su vrlo slični, sa sličnim amplitudama B-faktora na istim pozicijama. Razlika je vidljiva u fluktuacijama oko položaja 140 i 210, gdje je u LD- kompleksu veća na 140 i manja na 200 u odnosu na DL. Fluktuacije aminokiselina poklopca oba kompleksa (oko položaja 200 i 310) su značajno manje u odnosu na fluktuacije istih aminokiselina u poklopcu apo strukture. Navedeno opažanje sugerira stabilizaciju oba enantiomera primarno tim ostacima. Kod LD- kompleksa B-faktor je niži oko položaja 210 što može značiti da je LD- enantiomerni supstrat stabiliziran primarno tim ostacima zbog čega oni manje fluktuiraju.

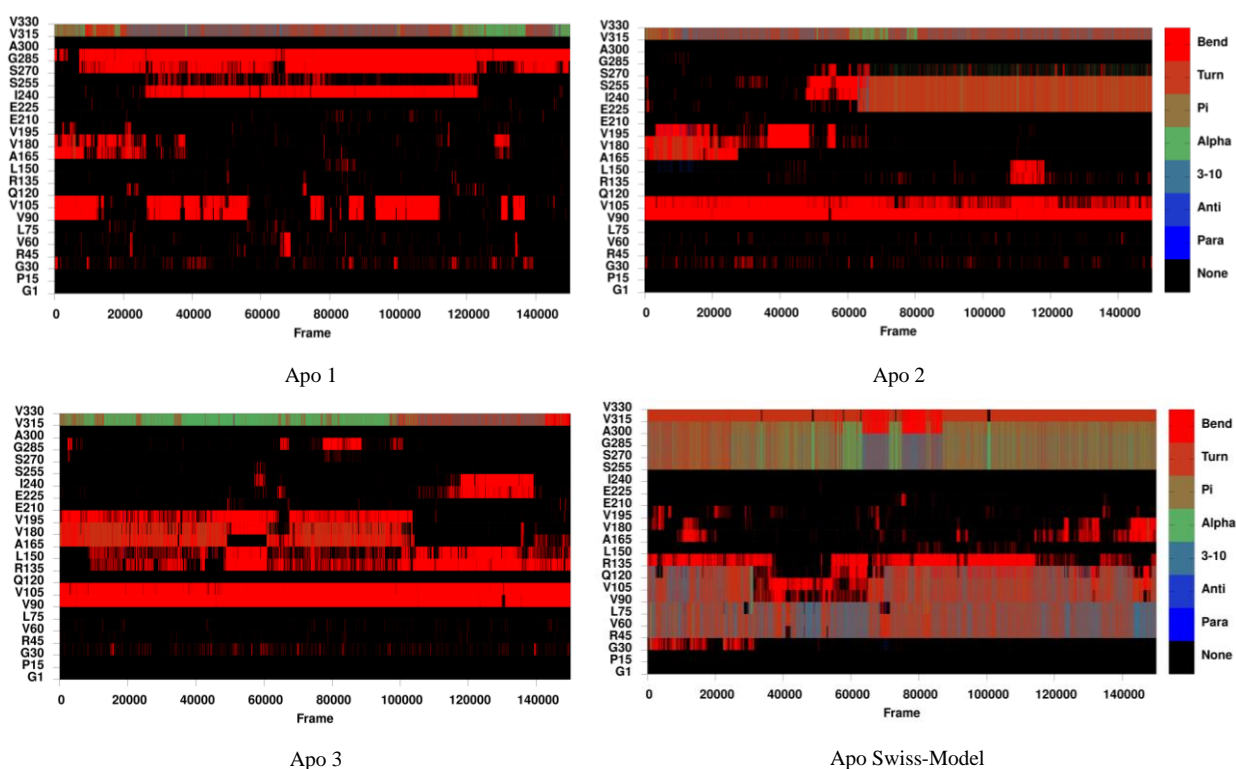


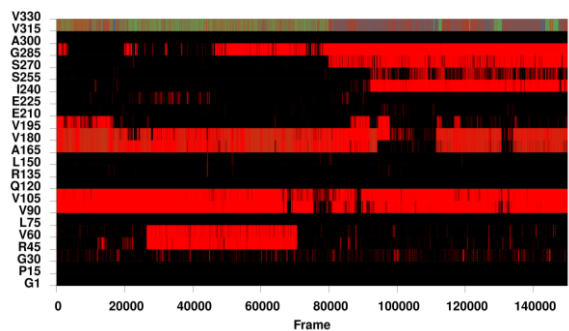
Slika 36. Strukture MGY A) apo B) u kompleksu s DL-PLA i C) u kompleksu s LD-PLA. Istaknute su fluktuabilne regije, supstrat PLA i katalitička trijada (žuto serin, zeleno histidin i crveno aspartat). Regija oko položaja 45 označena je crvenom bojom, regija oko položaja 70 bojom ciklame, oko 100 plavom, oko položaja 145 žutom, a regije oko 200 i 310, koje čine poklopac, sivoplavom.

Na slici 36 vidljivo je da je ligand je vezan u „U“ savijenoj konformaciji u kompleksu s enzimom MGY, kao i u kompleksu s MGS0156. U slučaju enzima MGY, ligand je smješten

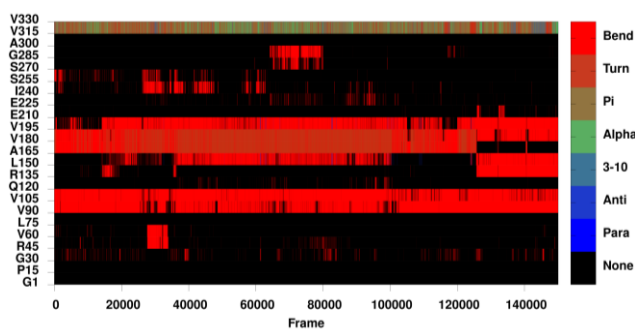
dublje u veznu pukotinu u odnosu na kompleks s enzimom MGS0156. Krajevi lanca oligodekamera su stabilizirani poklopcem iznad pukotine.

Rezultati simulacija MD u kojima je korišten model 3D strukture enzima iz AlphaFold2 dali su trajektorije koje su se vizualizacijom u VMD-u pokazale valjanima (3D struktura s očekivanom sekundarnom strukturom), a sve analize su uspješno provedene izuzev analize sekundarnih struktura. Sudeći samo prema rezultatima samo DSSP analize koristeći AMBER20 programski paket, niti jedna od 10 simulacija nije dala trajektoriju s uređenim strukturama (što kako je i spomenuto nije uočeno tijekom vizualizacije niti analiza). Za apo strukturu i svaki od kompleksa (po jedan s DL-PLA i LD-PLA) ponovljena je priprema sustava i simulacije molekulske dinamike pod istim uvjetima, uz jednu razliku: početna struktura je modelirana homolognim modeliranjem koristeći alat Swiss-Model umjesto AlphaFold2. Swiss-Model je za modeliranje 3D strukture metagenomskog MGY koristio 3D strukturu upravo MGS0156 zbog najveće sličnosti u slijedu. Analize sekundarnih struktura stoga su provedene i na ta tri dodatna sustava. Analize sekundarnih struktura provedene na svakoj od trajektorija apo struktura i kompleksa MGY s PLA i prikazane na slici 37.

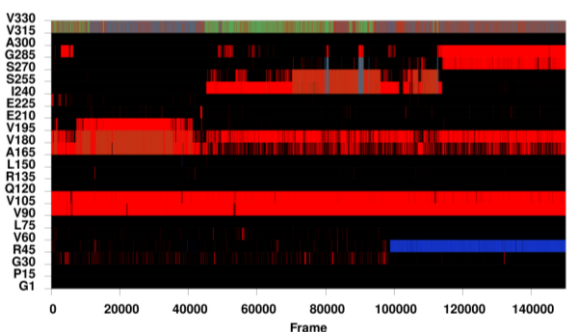




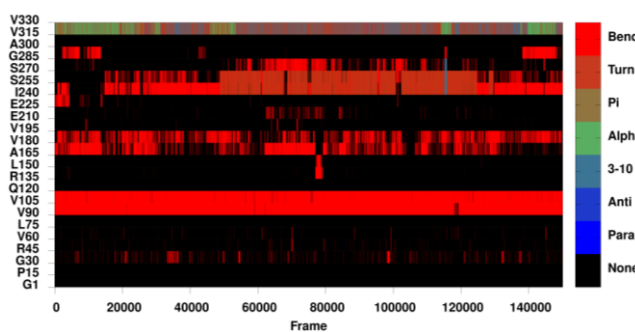
DL 1



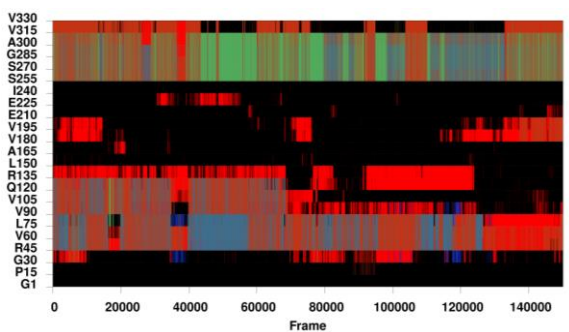
DL 2



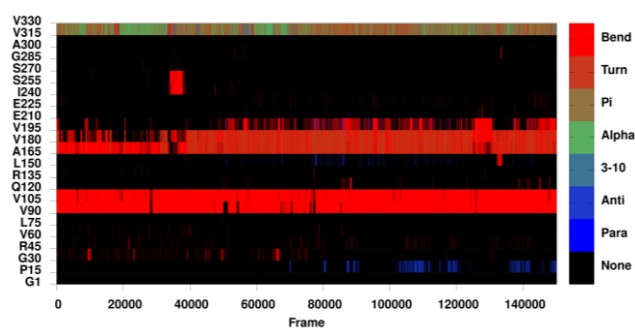
DL 3



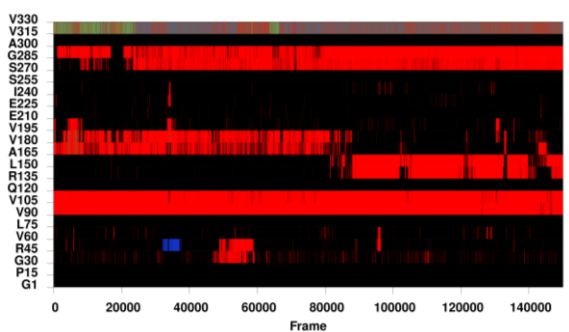
DL 4



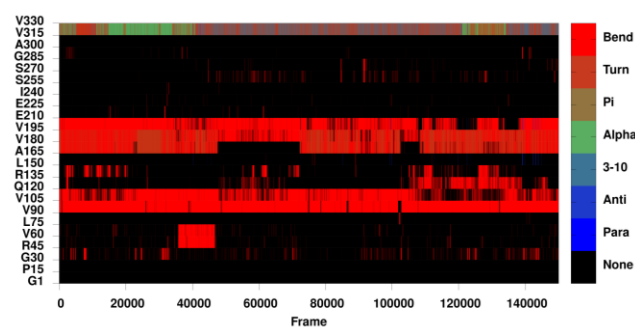
DL Swiss Model



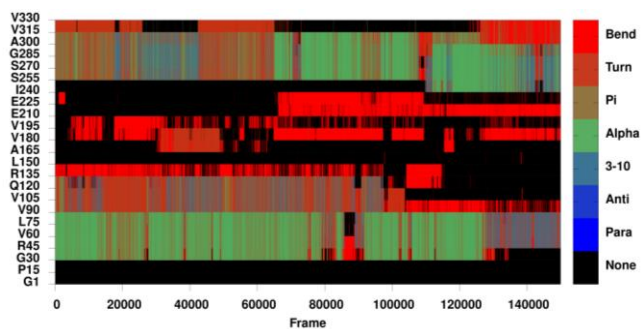
LD 1



LD 2



LD 3



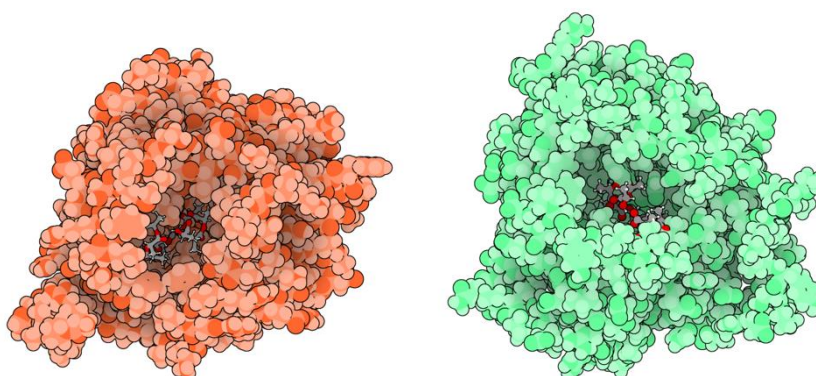
LD Swiss-Model

Slika 37. Analize sekundarnih struktura enzima MGY u apo (**A1-4**) obliku i DL- (**D1-5**) te LD- (**L1-4**) kompleksima.

Struktura kompleksa s LD-PLA pokazuje veću ukupnu uređenost, odnosno zastupljenost sekundarnih struktura, u odnosu na strukturu kompleksa sa supstratom DL-PLA, kao što je uočeno i u slučaju enzima MGS0156. Regije α -zavojnica pretežno su očuvane kod LD-kompleksa tijekom cijele trajektorije za razliku od DL- gdje navedene strukture poprimaju nižu uređenost u formi 3_{10} - i π -zavojnica te okreta. Također, regija poklopca oko položaja 190 zadržava veću uređenost u strukturi enzima u LD-kompleksu. Najuređenija je apo struktura u kojoj su elementi sekundarne strukture očuvani kroz trajektoriju, s tim da je primjerice regija 45-140 uređenija kod LD- kompleksa nego apo strukture (u apo umjesto pretežito α -zavojnica to su 3_{10} - i okreti).

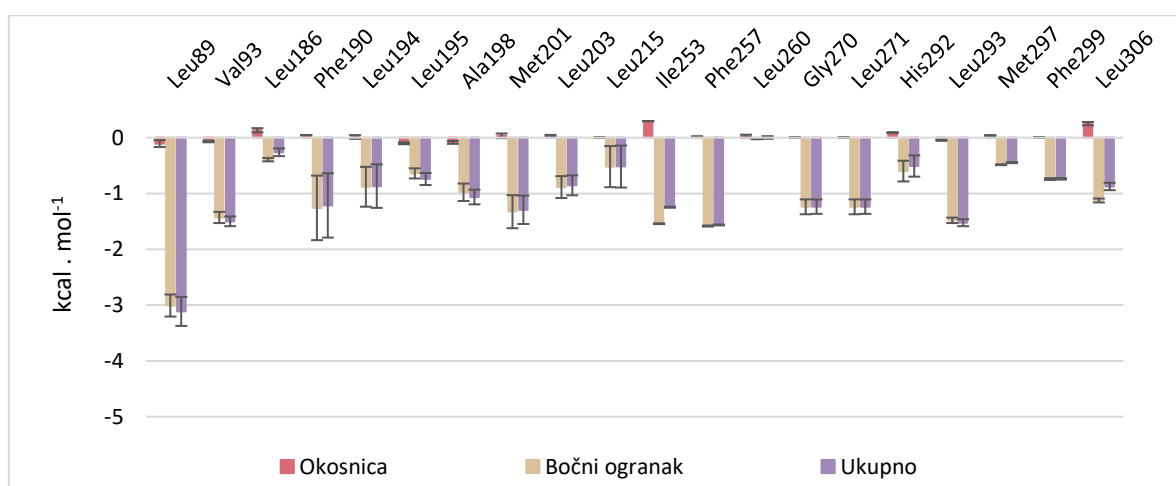
4.1.7. Slobodna Gibbsova energija vezanja i dekompozicija po aminokiselinskim ostacima

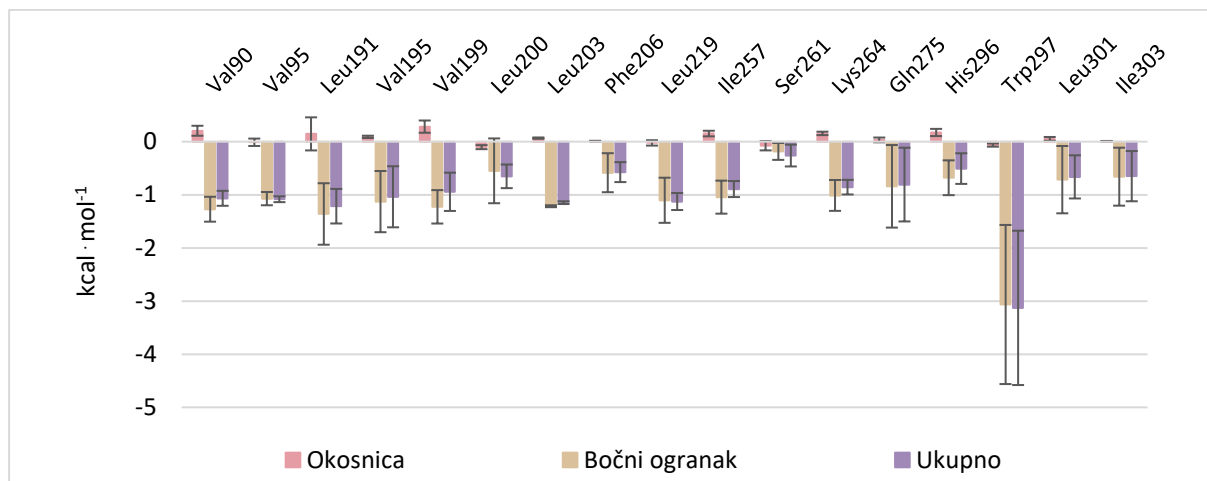
Za analizu svih vrsta nekovalentnih interakcija koje su uspostavljene između veznog mjesta i oligomera polimliječne kiseline (slika 38) te kvantifikaciju doprinosa svake aminokiseline entalpiji vezanja, provedena je raščlamba energije po aminokiselinskom ostatku. U diskusiji je fokus samo na one aminokiseline koje doprinose entalpiji vezanja s najmanje 1,36 kcal/mol, što je ekvivalentno deseterostruko promjeni u K_d vrijednosti, odnosno promjeni jednog reda veličine.



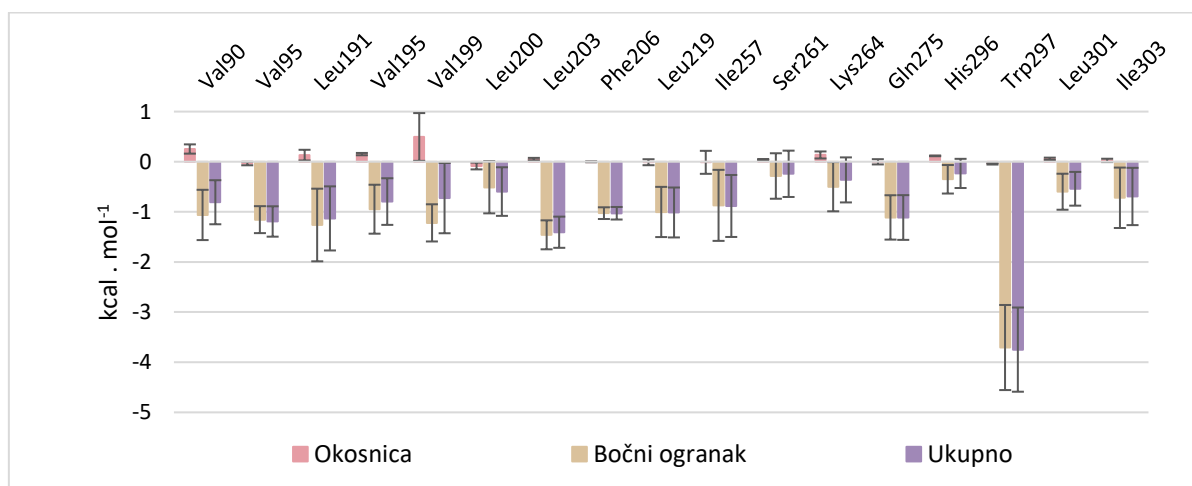
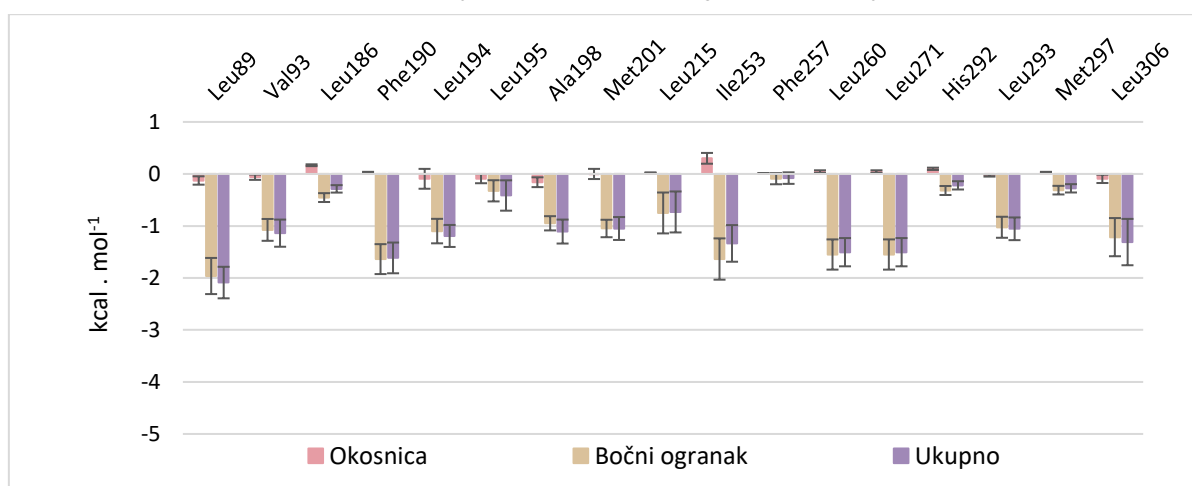
Slika 38. MGS0156 u kompleksu s dekamerom polimliječne kiseline (lijevo), MGY u kompleksu s dekamerom polimliječne kiseline (desno).

Na slikama 39 i 40 prikazani su rezultati dekompozicije entalpijskog doprinosa Gibbsovoj energiji vezanja liganda i proteina po aminokiselinskom ostatku za komplekse redom MGS0156 s DL- dekamerom, MGY s DL- dekamerom, MGS0156 s LD- dekamerom i MGY s LD- dekamerom.





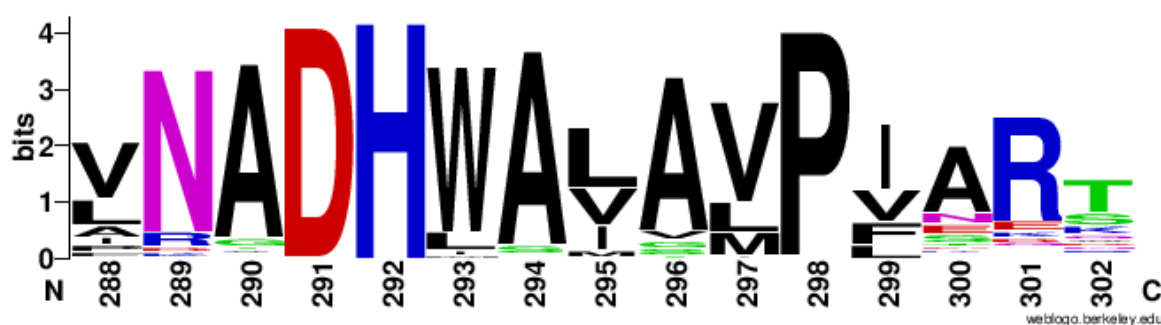
Slika 39. Dekompozicija entalpijskog doprinosa Gibbsovoj energiji vezanja po aminokiselinskom ostatku DL- oligomera PLA u vezno mjesto enzima MGS0156 (gore) i MGY (dolje).



Slika 40. Dekompozicija entalpijskog doprinosa Gibbsovoj energiji vezanja po aminokiselinskom ostatku LD- oligomera PLA u vezno mjesto enzima MGS0156 (gore) i MGY (dolje).

Pojedinačna aminokiselina koja najviše doprinosi ukupnoj entalpiji vezanja oligomera polimljične kiseline kod MGY enzima je Trp297 (njezin doprinos uprosječen preko tri replike iznosi $-3,75$ kcal/mol), međutim na toj poziciji u enzimu MGS0156 nalazi se Leu293 koji za dva reda veličine manje doprinosi entalpiji (doprinos uprosječen preko tri replike iznosi $-1,05$ kcal/mol). S druge strane, Val90 u enzimu MGY za jedan red veličine manje doprinosi entalpiji (doprinos uprosječen preko tri replike iznosi $-0,81$ kcal/mol) u odnosu na Leu89 u enzimu MGS0156 (doprinos uprosječen preko tri replike iznosi $-2,10$ kcal/mol). Zanimljivo je napomenuti da enzim MGY ima Lys264 koji doprinosi entalpiji vezanja $-0,86$ kcal/mol dok se na tom mjestu u enzimu MGS0156 nalazi Leu260 koji uopće ne doprinosi entalpiji vezanja hidrofobnog oligomera polimljične kiseline.

Većina aminokiselina s najvećim doprinosom energiji vezanja liganda nalazi se na poklopcu enzima, dok se ostale nalaze u veznom mjestu. Kod enzima MGS0156 aminokiseline poklopca s najvećim doprinosom vezanju liganda su Leu186, Phe190, Leu194, Leu195, Ala198, Met201, Ile253, Phe257, Leu260 i Leu306, a MGY Leu191, Val195, Val199, Leu200, Leu203, Phe206, Ile257, Ser261 i Lys264. Navedeni rezultat sugerira važnu ulogu poklopca u stabilizaciji i vezanju supstrata u vezno mjesto enzima. Na temelju ove analize identificirani su ostatci koji su potencijalne mete za mutaciju oba enzima u inačice većeg afiniteta vezanja supstrata PLA, kao što je Leu293 u Trp293 ili Leu260 u Lys260 enzima MGS0156 te Val90 u Leu90 enzima MGY. Testiranjem aktivnosti prema aromatskim i drugim alifatskim supstratima i mutiranjem enzima u inačice bez poklopca/s prethodno navedenim promjenama na poklopcu moglo bi se ispitati kakva je uloga poklopca, odnosno pojedinih aminokiselina, u specifičnosti prema supstratu i brzini hidrolize.⁸⁷



Slika 41. Prikaz višestrukog poravnanja sekvenci 113 proteinskih sekvenci. Y-os predstavlja bit score koji označava relativnu konzerviranost aminokiselina na određenom položaju u višestrukome poravnanju sekvenci. Bit score se izračunava na temelju statističke analize sekvenci i predstavlja mjeru koliko su određene aminokiseline česte na određenom položaju u poravnanju u usporedbi s očekivanom slučajnom raspodjelom. Rezultat 4 na y-osi znači 100 % očuvanost. X-os prikazuje položaj aminokiseline u višestrukome poravnanju ove domene. Prikaz je priređen korištenjem servera Weblogo.

Evolutivna analiza pokazuje da je aminokiselina triptofan predominantno zastupljena na analiziranoj poziciji. U zastupljenosti ju zatim prati leucin, izoleucin i metionin.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Uspješno je eksprimirana, pročišćena i okarakterizirana poliesteraza MGS0156 za koju je prethodno pokazano, a ovdje i potvrđeno, da pokazuje aktivnost prema polimljičnoj kiselini u agaroznom gelu difuzijskim testom i pokazuje aktivnost prema PLA u suspenziji turbidimetrijskim testom.
- Uspješno je proizveden mutant MGS0156_H231Y koji je eksprimiran, pročišćen i čija aktivnost prema PLA je provjerena u difuzijskom testu u agarozu i trubidimetrijskim testom, za koji je pokazano da je potpuno izgubio aktivnost prema PLA, a time i da aminokiselina H231 ima presudnu ulogu za aktivnost enzima MGS0156 prema PLA.
- U metagenomskim bazama podataka prema sličnosti s MGS0156 identificiran je slijed s potencijalnom poliesteraznom aktivnošću, MGY, koji je naručen kao sintetski gen, eksprimiran, pročišćen i čija aktivnost prema PLA je ispitana difuzijskim testom u agaroznom gelu i turbidimetrijskim testom.
- U ovom radu prvi put je pokazana poliesterazna aktivnost novoidentificiranog metagenomskog enzima MGY prema PLA u agaroznom gelu, koja je u usporedbi s aktivnošću enzima MGS0156 prema PLA značajno veća. Prema spoznajama iz dosadašnje literature, MGS0156 se ističe kao depolimeraza koja ima jednu od najvećih hidrolitičkih aktivnosti prema PLA.
- Metoda turbidimetrijskog praćenja enzimske hidrolize PLA pokazala se valjanom za praćenje kinetike hidrolize enzima MGS0156 u suspenziji, ali neoptimalnom za praćenje kinetike hidrolize novog enzima MGY. Veća reproducibilnost bi se postigla povećanjem stabilnosti suspenzije PLA i prije svega utvrđivanjem optimalnih uvjeta za aktivnost pojedinog enzima te određivanjem njihovog mehanizma razgradnje polimernih nanočestica.
- Računalnim metodama određeni su aminokiselinski ostatci u enzimima MGS0156 i MGY koji imaju najveći doprinos vezanju hidrofobnog supstrata, oligodekamera PLA, i predložene su nove mete za mutagenezu divljeg tipa proteina MGS0156 i MGY u

inačice većeg afiniteta prema supstratu PLA: MGS0156_L293W, MGS0156_L260K i MGY_V90L.

- Računalne analize kompleksa enzima s DL-PLA i LD-PLA sugeriraju veću stabilnost kompleksa s DL-kiralnim supstratom.
- Također, analize simulacija molekulske dinamike sugeriraju da dinamična domena poklopca ima veliku ulogu pri stabilizaciji supstrata oligodekamera DL-PLA i LD-PLA u enzimima MGS0156 i MGY.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

Ala	Alanin
APS	Amonijev persulfat
Asp	Aspartat
BB	<i>Brilliant Blue</i> iz punog naziva boje engl. <i>Coomassie Brilliant Blue</i>
Cut_1	Kutinaza iz bakterije <i>Thermobifida cellulosilytica</i>
Cut_2	Kutinaza iz bakterije <i>Thermobifida cellulosilytica</i>
CYS	Oznaka za slobodni cistein (AMBER)
CYX	Oznaka za cistein u disulfidnom mostu (AMBER)
dATP	Deoksiadenozin-trifosfat
dCTP	Deoksicitidin-trifosfat
dGTP	Deoksigvanozin-trifosfat
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Deoksiribonukleozid-trifosfat
<i>DpnI</i>	Restriksijska endonukleaza iz <i>Diplococcus pneumoniae</i>
DTT	Ditiotreitol (1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol)
dTTP	Deoksitimidin-trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
FP	Nizvodna početnica, engl. <i>forward primer</i>
GB	Model otapala, engl. <i>Generalized Born</i>
H	Jendoslovna oznaka za histidin
HDPE	Polietilen visoke gustoće
HEPES	<i>N</i> -(2-hidroksietil)piperazin- <i>N'</i> -2-etansulfonska kiselina
His	Histidin
Ile	Izoleucin
IPTG	Izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani hranjivi medij
LDPE	Polietilen niske gustoće

Leu	Leucin
Lys	Lizin
MD	Molekulska dinamika, engl. <i>molecular dynamics</i>
Met	Metionin
MGS	Enzim MGS0156
MGY	Novi metagenomski enzim
MM	Molekulska mehanika, engl. <i>molecular mechanics</i>
MM-GBSA	Metoda za računanje slobodne Gibbsove energije, engl. <i>Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area</i>
MSA	Višestruko poravnavanje sekvenci, engl. <i>multiple sequence alignment</i>
<i>NPT</i>	Izotermno-izobarni ansambl
<i>NVT</i>	Kanonski ansambl
PA	Poliakril
PBS	Poli(butilen sukcinat)
PC	Polikarbonat
PCL	Polikaprolakton
PCR	Lančana reakcija polimerazom, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PET	Poli(etilen-tereftalat)
PGA	Poliglikolna kiselina
PHA	Poli(hidroksialkanoat)
Phe	Fenilalanin
PLA	Polimljična kiselina
PMMA	Poli(metil-metakrilat)
PP	Polipropilen
PS	Polistiren
PU	Poliuretan
PVA	Polivinil alkohol
QM	Kvantna mehanika, engl. <i>quantum mechanics</i>
QM/MM	Kvantna mehanika/molekulska mehanika engl. <i>quantum mechanics/molecular mechanics</i>
<i>RMSD</i>	Korijen srednjeg kvadrata odstupanja, engl. <i>root mean square deviation</i>
<i>RMSF</i>	Korijen srednjeg kvadrata fluktuacija, engl. <i>root mean square fluctuation</i>

ROP	Polimerizacija uz otvaranje prstena, engl. <i>ring-opening polymerization</i>
RP	Uzvodna početnica, engl. <i>reverse primer</i>
SASA	Površina dostupna otapalu, engl. <i>solvent accessible surface area</i>
SDS	Natrijev dodecilsulfat
Ser	Serin
TAE	Pufer koji sadrži tris, octenu kiselinu i EDTA
Taq	Termostabilna DNA-polimeraza iz <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	<i>N, N, N',N'</i> -tetrametiletildiamin
Tris	Tris(hidroksimetil)-aminometan
Trp	Triptofan
Val	Valin
Y	Jednoslovnna oznaka za tirozin

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. A. Vlasopoulos, J. Malinauskaite, A. Żabnieńska-Góra, H. Jouhara, *Energy* **277** (2023) 127576.
2. B. Zhu, D. Wang, N. Wei, *Trends Biotechnol.* **40(1)** (2021) 22-37.
3. P. Corcoran, C. J. Moore, K. Jazvac, *GSA Today* **24(6)** (2014) 4-8.
4. A. Turner, C. Wallerstein, R. Arnold, D. Webb, *Sci. Total Environ.* **694** (2019) 133610.
5. F. Avelar Santos, G. Rebelo Diório, C. Conforti Ferreira Guedes, G. Fernandino, P.C.F. Giannini, R. J. Angulo, M. C. de Souza, M. Aparecida Ferreira César-Oliveira, A. R. dos Santos Oliveira, *Mar. Pollut. Bull.* **182** (2022) 114031.
6. L. Wang, M. S. Bank, J. Rinklebe, D. Hou, *Environ. Sci. Technol.* **57(17)** (2023) 7009–7017.
7. I. A. Ignatyev, W. Thielemans, B. V. Beke, *ChemSusChem* **7(6)** (2014) 1574-1593.
8. B. Eiamthong, P. Meesawat, T. Wongsatit, J. Jitdee, R. Sangsri, M. Patchsung, K. Aphicho, S. Suraritdechachai, N. Huguenin-Dezot, S. Tang, W. Suginta, B. Paosawatyanong, M. M. Babu, J. W. Chin, D. Pakotiprapha, W. Bhanthumnavin, C. Uttamapinant, *Angew. Chem. Int. Ed.* **61(37)** (2022) e202203061.
9. S. Yoshida, K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, H. Yamaji, Y. Maeda, K. Toyohara, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, *Science* **351** (2016) 1196-1199.
10. E. Nikolaivits, G. Taxeidis, C. Gkountela, S. Vouyiouka, V. Maslak, J. Nikodinovic-Runic, E. Topakas, *J. Hazard. Mater.* **434** (2022) 128900.
11. N. F. Zaaba, M. Jaafar, *Polym. Eng. Sci.* **60(9)** (2020) 2061-2075.
12. M.S. Singhvi, S.S. Zinjarde, D.V. Gokhale, *J. Appl. Microbiol.* **127(6)** (2019) 1612–1626.
13. M. Hajighasemi, A. Tchigvintsev, B. Nocek, R. Flick, A. Popovic, T. Hai, A. N. Khusnutdinova, G. Brown, X. Xu, H. Cui, J. Anstett, T. N. Chernikova, T. Brüls, D. Le Paslier, M. M. Yakimov, A. Joachimiak, O. V. Golyshina, A. Savchenko, P. N. Golyshin, E. A. Edwards, A. F. Yakunin, *Environ. Sci. Technol.* **52(21)** (2018) 12388–12401.
14. A. Previero, M. A. Coletti-Previero, L. Galzigna, *Monatsh Chem* **114** (1983) 1059–1069.
15. S. Feng, Y. Yue, J. Chen, J. Zhou, Q. Zhang, *Environ. Sci.: Processes Impacts*, **22** (2020) 2332-2344.

16. A. D. Jenkins, P. Kratochvíl, R. F. T. Stepto, U. W. Suter, *Pure Appl. Chem.* **68(12)** (1996) 2287-2311.
17. F. W. Billmeyer, *Textbook of Polymer Science, 3rd Edition*, John Wiley & Sons, New York 1984, str. 379, 436-450, 518-516.
18. R. Geyer, J. R. Jambeck, K. Lavender Law, *Sci. Adv.* **3(7)** (2017) e170078.
19. A. Carniel, V. de Abreu Waldow, A. Machado de Castro, *Biotechnol. Adv.* **52** (2021) 107811.
20. R.K. Kulkarni, E.G. Moore, A.F. Hegyeli, F. Leonard, *J. Biomed. Mater. Res.* **5** (1971) 169-181.
21. M. Vert, Y. Doi, KH. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, F. Schué, *Pure Appl. Chem.* **84(2)** (2012) 377-410.
22. Sinosh Skariyachan, Amulya A. Patil, Apoorva Shankar, Meghna Manjunath, Nikhil Bachappanavar, S. Kiran, *Polym. Degrad. Stab.* **149** (2018) 52-68.
23. K. Tomita, N. Ikeda, A. Ueno, *Biotechnol. Lett.* **25** (2003) 1743–1746.
24. C. Gamerith, E. Herrero Acero, A. Pellis, A. Ortner, R. Vielnascher, D. Luschnig, B. Zartl, K. Haernvall, S. Zitzenbacher, G. Strohmeier, O. Hoff, G. Steinkellner, K. Gruber, D. Ribitsch, G. M. Guebitz, *Polym. Degrad. Stab.* **132** (2016) 69-77.
25. Z. Oksiuta, M. Jalbrzykowski, J. Mystkowska, E. Romanczuk, T. Osiecki, *Polymers* **12(12)** (2020) 2939.
26. C. Gauss, K. L. Pickering, *Addit. Manuf.* **61** (2023) 103346
27. K. Hamad, M. Kaseem, F. Deri, *J. Polym. Res.* **18** (2011) 1799–1806.
28. F.-D. Kopinke, M. Remmler, K. Mackenzie, M. Möder, O. Wachsen, *Polym. Degrad. Stab.* **53(3)** (1996) 329-342.
29. W. H. Carothers, G. L. Dorough, F. J. van Natta, *J. Am. Chem. Soc.* **54(2)** (1932) 761–777.
30. T. Maharana, B. Mohanty, Y.S. Negi, *Prog. Polym. Sci.* **34(1)** (2009) 99-124.
31. M. J. Stanford, A. P. Dove, *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 486-494.
32. L. E. Chile, P. Mehrkhodavandi, S. G. Hatzikiriakos, *Macromolecules* **49(3)** (2016) 909–919.
33. M. Karamanlioglu, G. D. Robson, *Polym. Degrad. Stab.* **98(10)** (2013) 2063-2071.
34. N. Khalid, M. Aqeel, A. Noman, Z. F. Rizvi, *J. Hazard. Mater.* **445** (2023) 130455.

35. D. da Silva, M. Kaduri, M. Poley, O. Adir, N. Krinsky, J. Shainsky-Roitman, A. Schroeder, *J. Chem. Eng.* **340** (2018) 9-14.
36. M. Srikanth, T.S. R. S. Sandeep, K. Sucharitha, S. Godi, *Bioresour. Bioprocess.* **9** (2022) 42
37. J. Rüthi, M. Cerri, I. Brunner, B. Stierli, M. Sander, B. Frey, *Front. Microbiol.* **14** (2023)
38. I. Kleeberg, K. Welzel, J. VandenHeuvel, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer, *Biomacromolecules* **6(1)** (2005) 262-270.
39. D. W. Kim, J. H. Ahn, C. J. Cha, *J. Microbiol.* **60** (2022) 969–976.
40. D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, J. L. Sussman, K. H. G. Verschueren, A. Goldman, *PEDS* **5(3)** (1992) 197–211.
41. S. Raza, L. Fransson, K. Hult, *Protein Sci.* **10** (2001) 329-338.
42. H. P. Austin, M. D. Allen, B. S. Donohoe, N. A. Rorrer, F. L. Kearns, R. L. Silveira, B. C. Pollard, G. Dominick, R. Duman, K. El Omari, V. Mykhaylyk, A. Wagner, W. E. Michener, A. Amore, M. S. Skaf, M. F. Crowley, A. W. Thorne, C. W. Johnson, H. L. Woodcock, J. E. McGeehan, G. T. Beckham, *PNAS* **115(19)** (2018) 4350-4357.
43. E. Herrero Acero, D. Ribitsch, A. Dellacher, S. Zitzenbacher, A. Marold, G. Steinkellner, K. Gruber, H. Schwab, G. M. Guebitz, *Biotechnol. Bioeng.* **110(10)** (2013) 2581-2590.
44. D. Ribitsch, A. Hromic, S. Zitzenbacher, B. Zartl, C. Gamerith, A. Pellis, A. Jungbauer, A. Łyskowski, G. Steinkellner, K. Gruber, R. Tscheliessnig, E. Herrero Acero, G. M. Guebitz, *Biotechnol. Bioeng.* **114** (2017) 2481-2488.
45. A. Arnling Bååth, V. Novy, L. V. Carneiro, G. M. Guebitz, L. Olsson, P. Westh, D. Ribitsch, *Biotechnol. Bioeng.* **119** (2022) 470–481.
46. Q. Huang, M. Hiyama, T. Kabe, S. Kimura, T. Iwata, *Biomacromolecules* **21(8)** (2020) 3301-3307.
47. F. Kawai, K. Nakadai, E. Nishioka, H. Nakajima, H. Ohara, K. Masaki, H. Iefuji, *Polym. Degrad. Stab.* **96(7)** (2011) 1342-1348.
48. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. F. Freeman and Company, New York, 2002, str. 149-152, 260.
49. K. Mullis, F. Faloon, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **51(1)** (1986) 263-273.

50. <https://www.biorender.com/template/site-directed-mutagenesis> (datum pristupa 14. prosinca 2023.)
51. A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. T. Heer, T. A. P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede, *Nucleic Acids Res.* **46(1)** (2018) 296–303.
52. J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, *et al.* *Nature* **596** (2021) 583–589.
53. J. Skolnick, M. Gao, H. Zhou, S. Singh, *J. Chem. Inf. Model.* **61(10)** (2021) 4827-4831.
54. A. R. Leach, *Molecular modelling: principles and applications*, Pearson education, 2001.
55. B. J. Berne, *Modern Theoretical Chemistry, Band 6: Statistical Mechanics, Part B: Time-Dependent Processes*. Plenum Press, New York, 1977.
56. P. A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. Huo, L. Chong, M. Lee, T. Lee, Y. Duan, W. Wang, O. Donini, P. Cieplak, J. Srinivasan, D. A. Case, T. E. Cheatham, *Acc. Chem. Res.* **33(12)** (2000) 889-897.
57. A. R. Leach, *Molecular Modelling: Principles and Applications, 2nd edition.*, Pearson Education, 2001
58. <https://www.profagen.com/molecular-dynamics-simulation.htm> (datum pristupa 7. studenog 2023.)
59. J. Handelsman, M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy, R. M. Goodman, *Chem Biol.* **5(10)** (1998) 245-249.
60. A. Escobar-Zepeda, A. Vera-Ponce de León, A. Sanchez-Flores, *Front. Genet.* **6** (2015)
61. B. Papudeshi, J. M. Haggerty, M. Doane, M. M. Morris, K. Walsh, D. T. Beattie, D. Pande, P. Zaeri, G. G. Z. Silva, F. Thompson, R. A. Edwards, E. A. Dinsdale, *BMC Genomics* **18** (2017) 915.
62. D. W. Kim, J. H. Ahn, C. J. Cha, *J Microbiol.* **60** (2022) 969–976.
63. <https://esmatlas.com/resources/detail/MGY001816717312> (datum pristupa 7. prosinca 2023.)
64. H. Potter, Transfection by Electroporation. *Current Protocols in Molecular Biology*, **62** (2003) 9.3.1-9.3.6.
65. H. Ochman, A. S. Gerber, D. L. Hartl, *Genetics* **120(3)** (1988) 621–623.
66. <https://tmcaculator.neb.com/> (datum pristupa 22. prosinca 2022.)
67. P. Desjardins, D. Conklin, *J. Vis. Exp.* **45** (2010) e2565.
68. Joshua A. Bornhorst, Joseph J. Falke, *Meth. Enzymol.* **326** (2000) 245-254.

69. U. Laemmli, *Nature* **227** (1970) 680–685.
70. <https://web.expasy.org/protparam/>
71. M. Hajighasemi, B. P. Nocek, A. Tchigvintsev, G. Brown, R. Flick, X. Xu, H. Cui, T. Hai, A. Joachimiak, P. N. Golyshin, A. Savchenko, E. A. Edwards, A. F. Yakunin, *Biomacromolecules* **17(6)** (2016) 2027-2039.
72. J. C. Gordon, J. B. Myers, T. Folta, V. Shoja, L. S. Heath, A. Onufriev, *Nucleic Acids Res.* **33** (2005) 368–371.
73. I. W. Davis, A. Leaver-Fay, V. B. Chen, J. N. Block, G. J. Kapral, X. Wang, L. W. Murray, W. B. Arendall, J. Snoeyink, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Nucleic Acids Res.* **35** (2007) 375–383.
74. E. Jurrus, D. Engel, K. Star, K. Monson, J. Brand, L. E. Felberg, D. H. Brookes, L. Wilson, J. Chen, K. Liles, M. Chun, P. Li, D. W. Gohara, T. Dolinsky, R. Konecny, D. R. Koes, J. E. Nielsen, T. Head-Gordon, W. Geng, R. Krasny, G. W. Wei, M. J. Holst, J. A. McCammon, N. A. Baker, *Protein Sci.* **27(1)** (2018) 112-128.
75. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **25(13)** (2004) 1605-1612.
76. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **16** (2009) 2785-2791.
77. E. C. Meng, T. D. Goddard, E. F. Pettersen, G. S. Couch, Z. J. Pearson, J. H. Morris, T. E. Ferrin. *Protein Sci.* **32(11)** (2023) e4792.
78. D. A. Case, K. Belfon, I. Y. Ben-Shalom, S. R. Brozell, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T. A. Darden, R. E. Duke, G. Giambasu, M. K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S. A. Izmailov, K. Kasavajhala, A. Kovalenko, R. Krasny, T. Kurtzman, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, V. Man, K. M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C. L. Simmerling, N. R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, L. Wilson, R. M. Wolf, X. Wu, Y. Xiong, Y. Xue, D. M. York and P. A. Kollman (2020), AMBER 2020, University of California, San Francisco.
79. W. Kabsch, C. Sander, *Biopolymers* **22** (1983) 2577–2637.
80. S. Genheden, U. Ryde, *Expert. Opin. Drug. Discov.* **10(5)** (2015) 449-461.
81. A. V. Onufriev, D. A. Case, *Annu. Rev. Biophys.* **48(1)** (2019) 275-296.
82. A. Onufriev, D. Bashford, D. A. Case, *Proteins* **55** (2004) 383-394.
83. D. E. Depew, J. C. Wang, *PNAS* **72(11)** (1975) 4275-4279.

84. V. Tournier, S. Duquesne, F. Guillaumot, H. Cramail, D. Taton, A. Marty, I. André, *Chem Rev.* **123(9)** (2023) 5612-5701.
85. A. Rosato, A. Romano, G. Totaro, A. Celli, F. Fava, G. Zanaroli, L. Sisti. *Polymers* **14(9)** (2022) 1850.
86. R. Dinarvand, N. Sepehri, R. Manouchehri, F. Atyabi, *Int J Nanomedicine.* **6** (2011) 877-895.
87. P. Perez-Garcia, J. Chow, E. Costanzi, M. Gurschke, J. Dittrich, R. F. Dierkes, R. Molitor, V. Applegate, G. Feuerriegel, P. Tete, D. Danso, S. Thies, J. Schumacher, C. Pflieger, K.-E. Jaeger, H. Gohlke, S. H. J. Smits, R. A. Schmitz W. R. Streit *Commun Chem* **6** (2023) 193.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Eva Josić

Datum rođenja: 19. svibnja 1999.

Mjesto rođenja: Varaždin

Obrazovanje

2006–2014	II. osnovna škola Varaždin, Varaždin
2014–2018	I. gimnazija Varaždin, Varaždin
2018–2021	Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
2021–2024	Diplomski studij kemije, smjer: Biokemija i fizikalna kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Nagrade i priznanja

2023	Medalja Kemijskog odsjeka za izvrstan uspjeh tijekom studija kemije
------	---

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019	Otvoreni dan kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
------	---

Publikacije

- J. Jukić, T. Juračić, E. Josić, D. Namjesnik, T. Begović, *Adsorption* (2023)