

# Računalna i eksperimentalna karakterizacija esteraze iz *Rhodopseudomonas Palustris* za razgradnju polimljične kiseline

---

Mendeš, Davor

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:217:245970>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Davor Mendeš

**Računalna i eksperimentalna karakterizacija  
esteraze iz *Rhodopseudomonas palustris* za  
razgradnju polimljične kiseline**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistra kemije

Zagreb, 2024.



Ovaj diplomski rad izrađen je na 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**

*Mentorima izv. prof. dr. sc. Aleksandri Maršavelski i doc. dr. sc. Marku Močibobu. Hvala vam na strpljenju i svemu što ste me naučili.*

*Svim djelatnicima ZBK, posebice hvala Mariji Pranjić na pomoći i strpljenju te razgovorima prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.*

*Na kraju, hvala kolegici Evi na svim zabavnim trenucima i onim između, u labosu i van njega.*

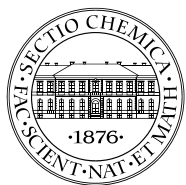


# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
2.1. Polimliječna kiselina i hidrolaze koje je razgrađuju.....	2
2.2. Molekularna mehanika.....	8
2.3. Molekularna dinamika .....	11
2.4. Gibbsova slobodna energija vezanja .....	14
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>16</b>
3.1. Materijali .....	16
3.2. Metode rada s bakterijama .....	17
3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama.....	18
3.4. Metode rada s proteinima .....	23
3.5. Računalne metode.....	27
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>32</b>
4.1. Testiranje uvjeta ekspresije hidrolaze RPA1511 .....	32
4.2. Konstrukcija mutirane inačice hidrolaze RPA1511 .....	36
4.3. Pročišćavanje RPA1511 i njene mutirane inačice.....	39
4.4. Testovi hidrolitičke aktivnosti enzima RPA1511 i njene mutirane inačice na uklopljenoj suspenciji polimliječne kiseline u agarozu .....	40
4.5. Turbidimetrijski testovi aktivnosti RPA1511 i mutirane inačice RPA1511_R243K.....	42
4.6. Računalne simulacije molekularne dinamike.....	44
<b>§ 5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>55</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA .....</b>	<b>57</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>58</b>
<b>§ 8. DODATAK .....</b>	<b>XV</b>
8.1. Analiza sekundarnih struktura simuliranih sustava regije 143–183 algoritmom DSSP .....	xv
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>XX</b>







Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

Računalna i eksperimentalna karakterizacija esteraze iz *Rhodopseudomonas palustris* za razgradnju polimljične kiseline

Davor Menduš

U sklopu diplomskog rada okarakterizirana je  $\alpha/\beta$  hidrolaza RPA1511 iz bakterije *Rhodopseudomonas palustris* s hidrolitičkom aktivnosti prema polimljičnoj kiselini. Konstruirana je mutirana inačica Arg243Lys, a konstrukcija mutanta motivirana je prethodnim *in silico* istraživanjem. Hidrolaze su heterologno eksprimirane u bakteriji *Escherichia coli*, potom su eksprimirani proteini pročišćeni afinitetnom kromatografijom. Aktivnost hidrolize hidrolaza polimljične kiseline ispitana je na suspenziji polimljične kiseline uklopljene u agarozu te pomoću turbidimetrijskog testa. Dinamika RPA1511 i njene mutirane inačice ispitana je pomoću simulacija molekularne dinamike, te je procijenjena entalpija vezanja modelnog supstrata dekamera mljične kiseline. Nadalje, istražen je pojedinačni doprinos aminokiselina entalpije vezanja dekamera mljične kiseline.

(61 stranica, 38 slika, 5 tablica, 61 literaturni navod, 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:  $\alpha/\beta$  hidrolaze, enzimaska razgradnja bioplastike, polimljična kiselina, simulacijske molekularne dinamike, testovi hidrolitičke aktivnosti.

Mentori: Izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski  
Doc. dr. sc. Marko Močibob

Ocjenitelji:

1. Izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
  2. Doc. dr. sc. Marko Močibob
  3. Izv. prof. dr. sc. Ivan Kodrin
  4. Prof. dr. sc. Tomica Hrenar
- Zamjena: Izv. prof. dr. sc. Đani Škalamera

Datum diplomskog ispita: 23.2.2024





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

Computational and experimental characterization of esterase from *Rhodopseudomonas palustris* for the degradation of polylactic acid

Davor Menduš

In this work, an  $\alpha/\beta$  hydrolase RPA1511 from *Rhodopseudomonas palustris* with activity towards polylactic acid was characterized experimentally and computationally by means of turbidimetric assays and molecular dynamics simulations. Motivated by *in silico* studies performed on RPA1511, a mutant Arg243Lys with potentially higher hydrolytic activity towards polylactic acid was also characterized. Both hydrolases were expressed heterologously in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography. Their hydrolytic activity towards polylactic acid was assessed on polyester suspension solidified with agarose and by turbidimetric suspension assay. On the other hand, their dynamical properties were studied *in silico* utilizing molecular dynamics simulations modelled with the decamer of lactic acid. The binding enthalpy was calculated with the use of an *end-point* method. To assess the importance of amino acid residues involved in binding decameric lactic acid, the per-residue enthalpy decomposition was calculated.

(61 pages, 38 figures, 5 tables, 61 references, original in Croatian)

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

Keywords:  $\alpha/\beta$  hydrolases, biodegradation, molecular dynamics simulations, polylactic acid, turbidimetric assays,

Supervisors: Dr. Aleksandra Maršavelski, Associate Professor  
Dr. Marko Močibob, Assistant professor

Reviewers:

1. Dr. Aleksandra Maršavelski, Associate Professor
2. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
3. Dr. Ivan Kodrin, Associate Professor
4. Dr. Tomica Hrenar, Full Professor

Substitute: Dr. Đani Škalamera, Associate Professor

Date of exam: 23.2.2024



## § 1. UVOD

Od sinteze prvog sintetskog polimera bakelita 1907. godine,<sup>1</sup> uporaba i proizvodnja plastike porasla je eksponencijalno.<sup>2</sup> Svojstva plastike i njena jeftina proizvodnja čini je pogodnim materijalom za gotovo sve svrhe današnjice. Svojstva sintetske plastike proizlaze iz kemijske strukture koja čine većinu sintetskih plastika izuzetno otpornim na razgradnju u okolišu,<sup>3</sup> dok porastom prekomjerne upotrebe sintetske plastike i nepravilnim zbrinjavanjem otpadne plastike dolazi do gomilanja plastike u okolišu.

Jedan od glavnih izazova današnjice je ekološki prihvatljiva razgradnja sintetske plastike. Iako postoje procesi razgradnje, oni najčešće podrazumijevaju uvjete vrlo visokog tlaka i temperature te kaustične tvari koje na kraju završavaju u okolišu. Kako bi se izbjegao problem daljnjeg zagađivanja okoliša, pribjegava se korištenju blažih uvjeta razgradnje koji uključuje enzimsku razgradnju plastike. U slučaju enzimske razgradnje plastike, koriste se enzimi koji su kompatibilni s blažim uvjetima razgradnje (niže temperature i tlakovi, otopine pufera koje ne štete okolišu). Jedan od problema vezanih uz enzimsku razgradnju jest njihova sporost, odnosno nedovoljno brza razgradnja plastike kao i specifičnost enzima prema određenom polimeru.<sup>4</sup> Stoga se enzimi genetičkim inženjerstvom unapređuju u smjeru optimizacije specifičnosti, ubrzanja razgradnje plastike, topivosti u organskim otapalima, i povećanoj stabilnosti pri višim temperaturama.<sup>5</sup>

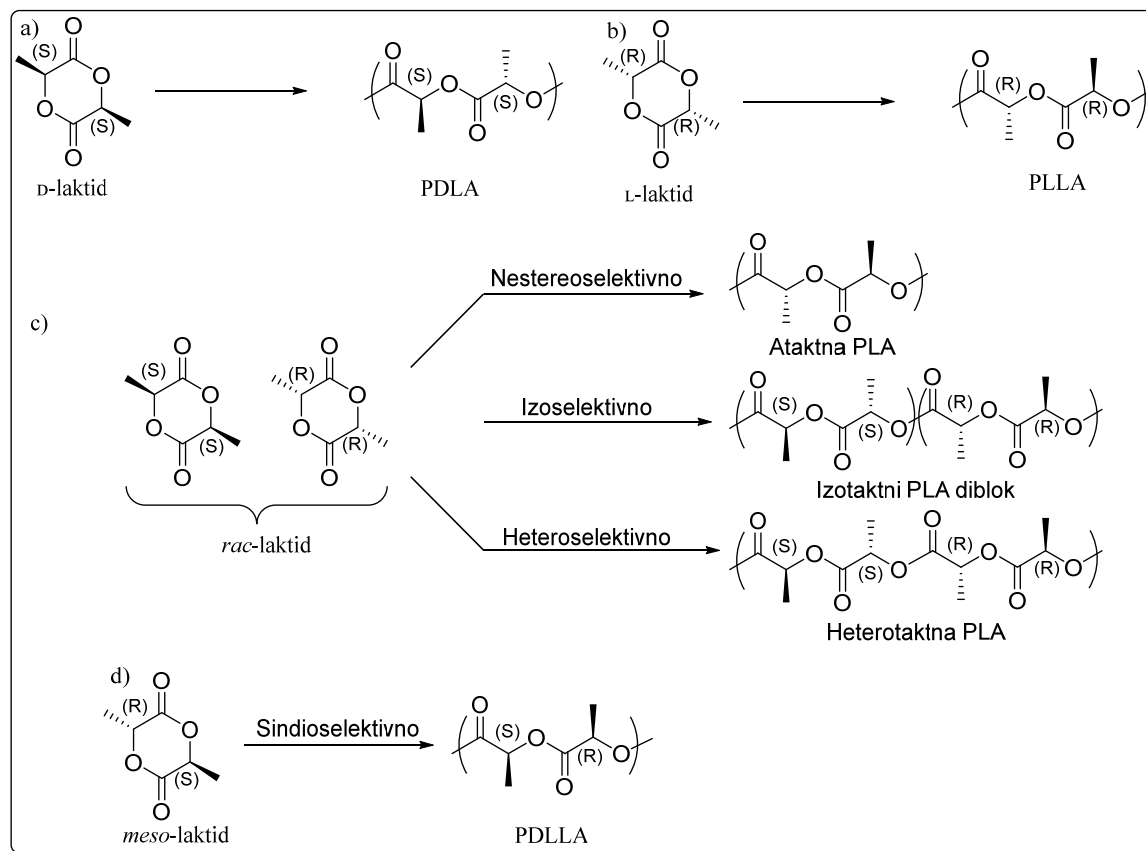
Cilj ovog diplomskog rada je testirati aktivnost  $\alpha/\beta$  hidrolaze RPA1511 iz bakterije *Rhodopseudomonas palustris* prema polimljičnoj kiselini. U tu svrhu, testirani su uvjeti heterologne ekspresije RPA1511 u bakteriji *Escherichia coli* te pročišćen je dobiveni enzim afinitetnom kromatografijom. Na temelju prethodno izvedenih kvantno–mehaničkih simulacija reakcije hidrolaze dimera mliječne kiseline koju katalizira RPA1511 iz literature<sup>6</sup> te poravnavanjem više aminokiselinskih sljedova iz NCBI baze podataka, konstruiran je mutant R234K s potencijalno većom hidrolitičkom aktivnosti prema polimljičnoj kiselini. Nadalje, simulacijama molekularne dinamike ispitana je dinamika RPA1511 i njene mutirane inačice. Naposljetku, provedeni su izračuni slobodne Gibbsove energije vezanja dekamera mliječne kiseline u svrhu utvrđivanja afiniteta vezanja polimljične kiseline za enzim, te izračunani su pojedinačni doprinosi aminokiselina pri vezanju dekamera mliječne kiseline.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Polimliječna kiselina i hidrolaze koje je razgrađuju

Polimliječna kiselina (engl. *polylactic acid*, PLA) je poliester mliječne kiseline (2-hidroksipropanska kiselina). Polimliječnu kiselinu prvi je sintetizirao Théophile-Jules Pelouze 1845. godine polikondenzacijskom reakcijom,<sup>7</sup> dok je Wallace Hume Carothers sintetizirao polimliječnu kiselinu metodom polimerizacije otvaranja prstena (engl. *Ring-opening polymerisation*, ROP),<sup>8</sup> koja se i dan danas koristi u proizvodnji na industrijskoj skali.<sup>9</sup> Mliječna kiselina ima jedan asimetričan ugljikov atom, stoga postoje dva stereoizomera mliječne kiseline, L-mliječna kiselina (*S*-apsolutne konfiguracije) i D-mliječna kiselina (*R*-apsolutne konfiguracije). L-mliječna kiselina nastaje fermentacijom glukoze ili drugih heksoza kod bakterija, a izvor tih šećera je najčešće šećerna repa, krumpir ili kukuruzni škrob. Stoga, 90% L-mliječne kiseline proizvedeno je bakterijskom fermentacijom. S druge strane, kemijska sinteza mliječne kiseline rezultira racemičnom smjesom mliječne kiseline (jednak omjer D- i L-stereoizomera u otopini).

Ciklizacijom mliječne kiseline dobiva se laktid (3,6-dimetil-1,4-dioksan-2,5-dion). Laktid, ovisno o kiralnosti mliječne kiseline, postoji u obliku tri stereoizomera: L-laktid, D-laktid i *meso*-laktid. Smjesa L-laktida i D-laktida u jednakom omjeru naziva se *rac*-laktid. ROP-metodom može nastati: polimliječna kiselina D-konfiguracije (PDLA), polimliječna kiselina L-konfiguracije (PLLA) te polimliječna kiselina *meso* konfiguracije (PDLLA) (Slika 1a, b i d). Bitno je spomenuti da kontrolom stereoselektivnosti u ROP-metodi laktid može rezultirati polimliječnom kiselinom različitih taktosti i rasporeda kiralnih centara u makromolekuli.<sup>10</sup> Polimer mliječne kiseline može biti (Slika 1c i d): izotaktni (raspored metilne skupine na istoj strani polimernog lanca), ataktni (bez definiranog rasporeda metilne skupine unutar polimernog lanca), sindiotaktni (naizmjenični raspored metilnih skupina unutar polimernog lanca).



**Slika 1** Sinteza polimljične kiseline i njene mikrostrukture. a) i b) Sinteza homopolimerne PLA, c) Načini dobivanja različitih mikrostrukture PLA ROP-metodom (engl. *ring opening polymerization*) uz pomoć stereoselektivnog katalizatora (ovisi o postupku i željenom produktu) i d) sindioselektivna sinteza PDLA.

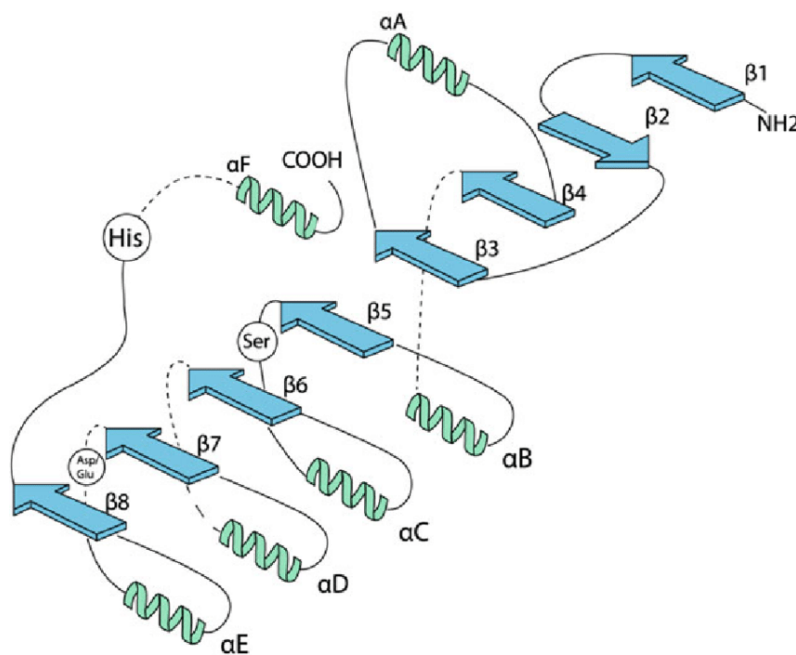
Ovisno o mikrostrukтури polimljične kiseline, ona ima različita fizikalna svojstva. Osnovna fizikalna svojstva polimljične kiseline, i ujedno njeni nedostaci kao materijal, su: lomljivost, neelastičnost i niska termalna stabilnost. PLLA i PDLA su polukristalni polimeri, temperature mekšanja oko 170 °C pri čemu je temperatura razgradnje oko 200 °C.<sup>11,12</sup> Atnakna PLA je lomljiva i amorfna, s temperaturom mekšanja 150 °C.

Polimljična kiselina može se razgraditi hidrolitički, enzimski, oksidativno, fotokemijski i uslijed djelovanja mikroorganizama. Brzina razgradnje ovisi o više faktora: temperatura, udio određenog stereoizomera mliječne kiseline u PLA, pH, vlažnost, te veličini i obliku materijala.<sup>13</sup> U hidrolitičkoj razgradnji prilikom izlaganja vlazi dolazi do cijepanja esterskih veza pri čemu se smanjuje molarna masa polimera i do oslobađanja topivih oligomera. Topivi oligomeri mliječne kiseline dovode do sniženja pH, što zauzvrat ima autokatalitički efekt. Za hidrolitičku



razgradnju potrebne su veće temperature (oko 85 °C) što čini ovu metodu energetski zahtjevnom, pa se pribjegava korištenju enzima.

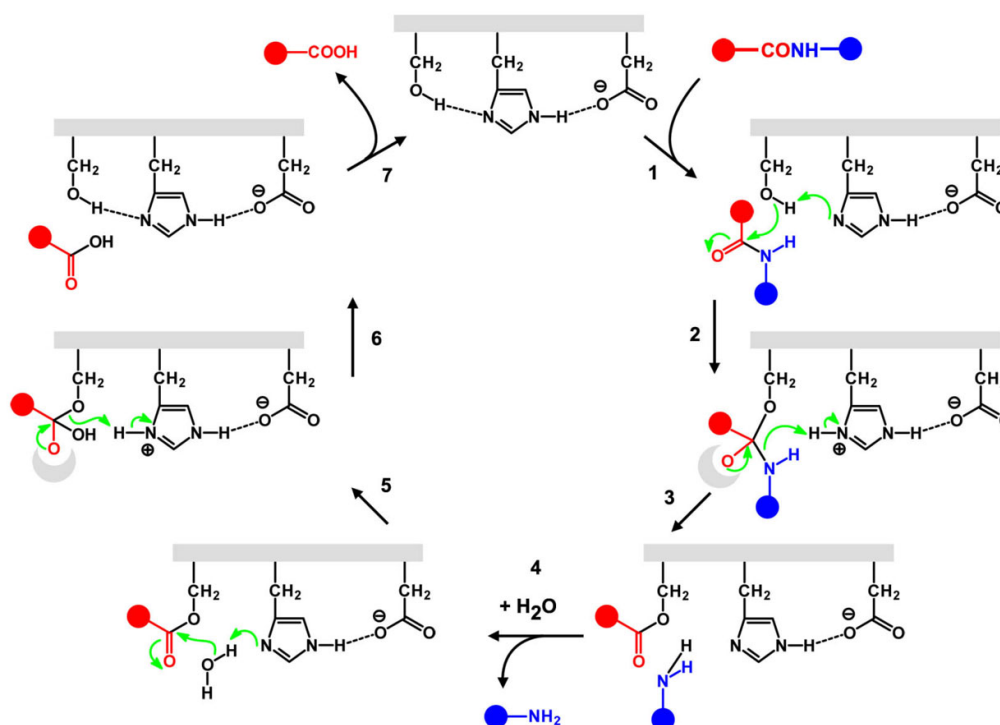
Enzimi koji mogu razgraditi polimljičnu kiselinu pripadaju  $\alpha/\beta$  hidrolazama, superobitelj proteina koji sadrže očuvani strukturni motiv prikazan na slici 2 (engl. *fold*). Motiv se sastoji od 8  $\beta$ -ploča (1–8) povezanih sa 6  $\alpha$ -zavojnica (A–F). Karakteristika  $\alpha/\beta$  hidrolaza jest tzv. nukleofilni pregib, tj.  $\gamma$  okret koji na vrhu sadrži nukleofil.<sup>14,15</sup> Nukleofilni pregib zahtjeva zabranjene Ramachandranove  $\phi$  i  $\psi$  torzijske kutove te male bočne ogranke. Navedene zahtjeve ispunjava glicin, a nalazi se dva položaja prije i nakon nukleofila (Nu +2, Nu -2). Bočni ogranak na položaju Nu+3 mora biti mal kako bi se izbjegle steričke smetnje sa  $\beta$ -pločom 4. Navedene karakteristike su iznimno očuvane i omogućuju identifikaciju položaja nukleofila. Pored  $\gamma$  okreta, oksianionska šupljina jest još jedna važna karakteristika  $\alpha/\beta$  hidrolaza. Oksianionska šupljina stabilizira negativno nabijeni tetraedarski međuprodukt vodikovim vezama. Donori vodikove veze su N–H od aminokiselina: 1 – aminokiselina odmah nakon nukleofila, i 2 – uobičajeno aminokiselina između  $\alpha$ -zavojnice A i  $\beta$ -ploče 3.



**Slika 2** Kanonska struktura  $\alpha/\beta$  hidrolaza koji se sastoji od 8  $\beta$ -ploča naznačenih  $\beta$ 1–8 te 6  $\alpha$ -zavojnica označenih  $\alpha$ A–F. Katalitički lakat nalazi se između  $\beta$ 5 ploče i  $\alpha$ C zavojnice na vrhu kojeg je serin. Naznačeni su Asp/Glu između  $\beta$ -ploče 7 i  $\alpha$ -zavojnice E te His između  $\beta$ -ploče 8 i  $\alpha$ -zavojnice F. Preuzeto iz ref. 16.

Sve  $\alpha/\beta$  hidrolaze sadrže katalitičku trijadu, najčešće je ona Ser-His-Asp/Glu. Mehanizam djelovanja hidrolaza prikazan je na slici 3. te je ukratko opisan ovdje: vezanjem supstrata dolazi

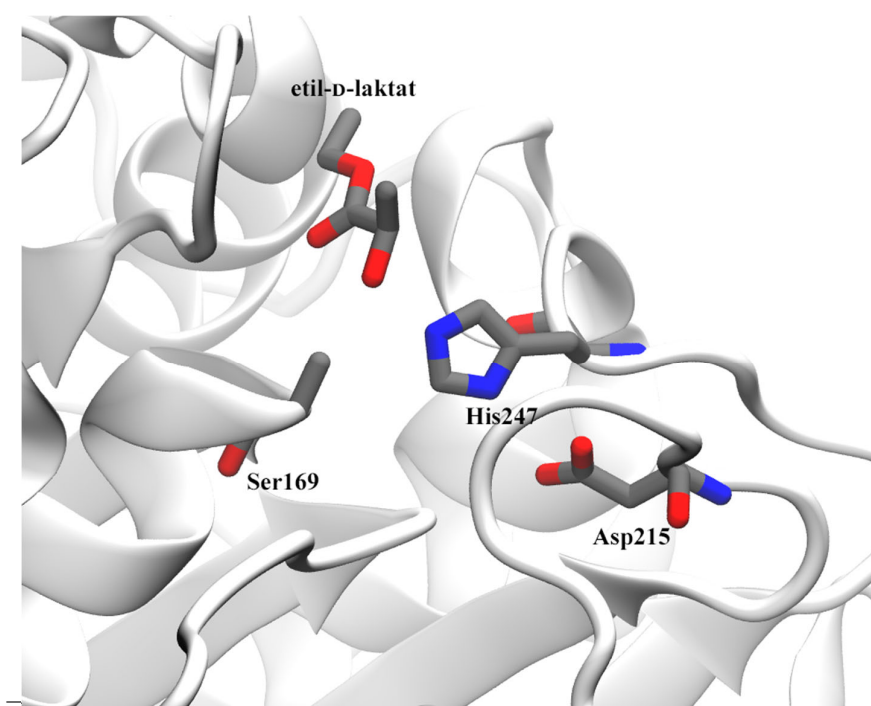
do deprotonacije kisikova atoma serina histidinom te nukleofilnim napadom na karbonilni ugljikov atom supstrata. Nastaje nestabilni tetraedarski međuprodukt kojeg stabiliziraju vodikove veze oksianionske šupljine, ubrzo dolazi do raspada tetraedarskog međuprodukta koji deprotonira histidin te dolazi do izlaska R-NH<sub>2</sub> skupine iz katalitičkog ciklusa. Raspad enzim-acil kompleksa odvija se ulaskom molekule vode u aktivno mjesto te deprotoniranja molekule vode histidinom. OH<sup>-</sup> zatim napada karbonilni C atom acil–enzima kompleksa rezultirajući negativno nabijenim tetraedarskim međuproduktom. Raspad tetraedarskog međuprodukta odvija se deprotonacijom histidina pri čemu dolazi do izlaska R-COOH skupine iz aktivnog mjesta enzima i protonacijom kisikovog atoma serina, što naposljetku rezultira regeneriranom enzimom. Navedeni mehanizam opisuje hidrolizu polipeptidnog lanca, no mehanizam hidrolize poliestera odvija se analognim načinom, pri čemu prvotno dolazi do izlaska R-OH skupine, potom R-COOH skupine poliestera.



**Slika 3** Mehanizam serinskih hidrolaza prilikom hidrolize amidne veze. Način djelovanja prema poliesterima je analogan, pri čemu dolazi do hidrolize R-COOR' poliestera. Stoga, u 4. koraku dolazi do izlaska R'-OH skupine, a u 7. koraku R-COOH skupine. Preuzeto iz ref. 17..

Hidrolaze sa zabilježenom aktivnosti razgradnje polimljične kiselinu su: lipaze, esteraze, proteaze i kutinaze. Williams D. F. 1981 godine prvi je opisao hidrolazu s hidrolitičkom

aktivnosti prema polimljičnoj kiselini, serinsku proteazu proteinazu K iz gljivice *Tritirachium album*.<sup>18</sup> Proteinaza K može hidrolizirati PLLA, ali ne i PDLA što ukazuje na enantioselektivnost enzima. Proteaze hidroliziraju proteine čiji su sastavni dijelovi L-aminokiseline, time preferiraju razgradnju PLLA. S druge strane, lipaze preferentno hidroliziraju PDLA u odnosu na PLLA, no i dalje mogu hidrolizirati PLLA, što ukazuje na fleksibilniju enantioselektivnost lipaza.<sup>19</sup> Esteraze i kutinaze pokazuju također fleksibilnu enantioselektivnost prilikom hidrolize PLA, primjerice kutinaza Est119 iz bakterije *Thermobifida alba* soja AHK119 bolje hidrolizira PDLA nego PLLA, a kokristalizacijskim istraživanjima Est119 pronašli su etil-D-laktat (etilni ester D-mliječne kiseline) u aktivnom mjestu kutinaze (Slika 4).<sup>20</sup> Izraženiju enantioselektivnost posjeduje PCLE (engl. *Paraphoma-related fungus cutinase-like enzyme*) koja razgrađuje PDLA, dok PDLLA ne razgrađuje.



**Slika 4** Aktivno mjesto Est119 kutinaze iz bakterije *Thermobifida alba* soja AHK119 (PDB: 6AID). Katalitička trijada sastoji se od Ser169-His247-Asp215. Vodikovi atomi nisu prikazani radi jasnoće prikaza.

Izuzev stereokemije, bitnu ulogu igra i kristalnost polimljične kiseline. Pronađeno je da proteinaza K preferira amorfnu regiju polimljične kiseline, dok znatno teže hidrolizira kristalne regije polimljične kiseline.<sup>11,19</sup> Polimljična kiselina svoju kristalnost dobiva tijekom proizvodnje, a sama kristalnost PLA određuje površinu dostupnu enzimu za razgradnju lanaca PLA. U polimljičnoj kiselini razlikuju se tri određene regije prema kristalnosti: kristalna

regija, ograničena amorfnu regija unutar sferolita (sferne kristalne regije unutar polimera), te slobodna amorfnu regija.<sup>11</sup> Razgradnja PLA enzimskim putem odvija se u ograničenoj amorfnu regiji i u slobodnoj amorfnu regiji, dok je kristalna regija manje podložna hidrolizi zbog krutog pakiranja lanaca PLA.

Li i McCarthy<sup>11</sup> istražili su kako kristalnost utječe na raspad PLLA filmova pod utjecajem proteinaze K, te su pokazali da je stopa raspada filma konstantna (približno  $2,0 \mu\text{g mm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) do 32% kristalnosti PLA filma, nakon čega stopa raspada filma se smanjuje. Kada kristalnost PLLA filma dosegne 50%, stopa raspada se gotovo zaustavlja ( $0,3 \mu\text{g mm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ). Slično tome, McDonald i sur.<sup>21</sup> pokazali su da povećanjem  $X_c$  (udio kristalnosti PLA) dolazi do smanjenja aktivnosti proteinaze K. Efekt je vidljiv pri 10%  $X_c$  gdje dolazi do 38% smanjenja aktivnosti, a pri 50 %  $X_c$  dolazi do potpune inhibicije aktivnosti proteinaze K. Navedeni rezultati opisani su samo za proteinazu K, dok utjecaj kristalnosti nije istražen za druge hidrolaze, ili ako su opisani, usporedba između razgradnje je ograničena zbog različitih svojstava korištene PLA koja varira od proizvođača do proizvođača.

U bazi podataka PAZy<sup>22</sup> (engl. *Plastics Active enZymes*) deponirane su hidrolaze s aktivnostima prema različitim plastikama, poput poliuretana, polietilen tetraftalata i drugih. U bazi podataka zabilježeno je 38 hidrolaza koje razgrađuju PLA, a samo njih 5 ima riješenu kristalnu strukturu. Kristalna struktura olakšava planiranje eksperimenata genetskog inženjeringa, pa na taj način su Hajighasemi i sur.<sup>23</sup> proveli pretražnu alanin mutagenezu na enzimu RPA1511 u kojoj se pojedina aminokiselina mutira u alanin i iz toga se procjenjuje utjecaj određene aminokiseline na aktivnost enzima. Pronađeno je nekoliko aminokiseline koje su ključne za hidrolizu PLA, ali ne za hidrolizu topivog monoestera  $\alpha$ -naftil-propionata. Tako je uočeno da mutacija Leu203Val ne uzrokuje porast brzine hidrolize  $\alpha$ -naftil-propionata, ali dovodi do dvostruko veće brzine hidrolize PLA. Navedeno opažanje sugerira da prilikom vezanja PLA na RPA1511, Leu203 svojim bočnim ogrankom uzrokuje steričke smetnje. Na sličan način su Cannon i Reynolds<sup>24</sup> uz pomoć racionalnog dizajna pripremili trostruki mutant suptizilina iz bakterije *Bacillus subtilis* koji ima 830 puta veću aktivnost od divljeg tipa suptizilina, izraženo povećanje u aktivnost postigli su povećavanjem PLA vezujućeg džepa suptizilina i uvođenjem aminokiseline s hidrofobnim bočnim ograncima u mjestu PLA vezujućeg džepa.

## 2.2. Molekularna mehanika

Molekularna mehanika opisuje atome kao čvrste kugle, a veze između njih kao opruge. Za pravilan opis atoma i interakcija među njima koristi se tzv. polje sila (engl. *force field*), funkcija koja na temelju koordinata promatranog sustava, bolje rečeno geometrije, procjenjuje potencijalnu energiju sustava.<sup>25</sup> Polje sila opisano je skupom eksperimentalno, ili računalno dobivenih parametara. Jednadžbu polja sila dijelimo na vezne interakcije i nevezne interakcije:

$$E_{\text{ukupno}} = \sum E_{\text{vezne}} + \sum E_{\text{nevezne}}. \quad (1)$$

Vezne interakcije uključuju istezanje kemijskih veza, savijanje kutova između 3 kovalentno vezana atoma i torzijske kutove, zapisane u jednadžbi:

$$E_{\text{vezne}} = \sum_{\text{veze}} \frac{k}{2} (l - l_0)^2 + \sum_{\text{kutovi}} \frac{k}{2} (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torzije}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) + \sum_{\substack{\text{torzije} \\ \text{izvan ravnine}}} k_{\text{oop}} (1 - \cos 2\omega_{\text{oop}}), \quad (2)$$

prvi član jednadžbe (2) je suma svih veznih parova atoma i opisuje istezanje veza, gdje je  $l$  duljina veze, a  $k$  je konstanta sile te  $l_0$  referentna vrijednost udaljenosti za dan atomski par. Drugi član opisuje sumu doprinosa istezanja kutova, analogno istezanju veza,  $\theta$  jest kut definiran trima atomima A-B-C,  $k$  je konstanta sile te  $\theta_0$  referentna vrijednost kuta tri dana atoma. Torzijski kut definiran je četirima atomima vezani na sljedeći način: atom A vezan je atomom B, atom B vezan je za atom C koji je potom vezan za atom D. Torzijski kut definira se kao kut između dvije ravnine definirane atomima A-B-C te B-C-D. Torzijski je kut opisan periodičnom funkcijom zbog rotacije između atoma B-C. Treći član jednadžbe (2) opisuje doprinos svih torzijskih kutova u sustavu, gdje je  $\omega$  torzijski kut,  $V_n$  je energetska barijera torzije,  $\gamma$  je faza i  $n$  je periodičnost. Vrijednost 1 dodana je zbog periodičnosti kada je vrijednost kosinusa jednaka nuli. Naposljetku, četvrti član opisuje tzv. *nepravilne* torzijske kutove, odnosno torzije izvan ravnine gdje je  $k_{\text{oop}}$  konstanta sile,  $\omega_{\text{oop}}$  je torzijski kut izvan ravnine. Nepravilni torzijski kutovi također uključuju četiri atoma A-B-C-D, no u ovom slučaju ravninu definiraju atomi C-B-D, a kut između atoma A i definirane ravnine C-B-D je nepravilni torzijski kut. Pomoću nepravilnih torzija moguće je pravilno modelirati primjerice planarnost aromatskih sustava čiji se atomi nalaze na istoj ravnini.

Nevezne interakcije opisuju interakcije između atoma koji su udaljeni barem tri kovalentne veze unutar molekule. Stoga u polje sila treba uključiti ispravan opis interakcija između

nabijenih vrsta (ionizabilne skupine bočnih ogranaka aminokiselina) i nenabijenih vrsta. Time jednadžba za nevezne interakcije glasi:

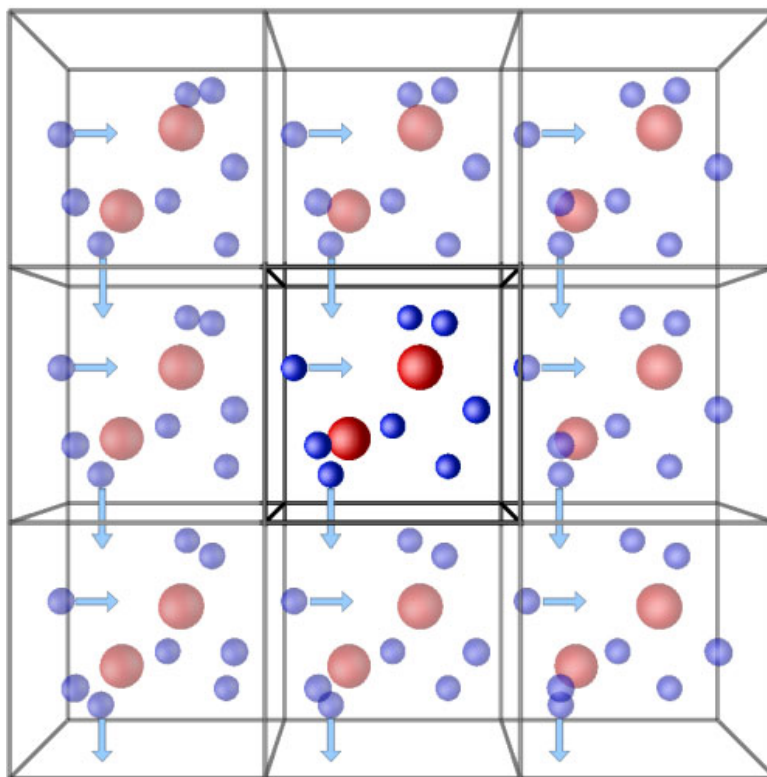
$$E_{\text{nevezne}} = \sum_{\substack{\text{nevezani} \\ \text{parovi } ij}} \left( \varepsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{\text{min},ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{\text{min},ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\varepsilon_0 r_{ij}} \right). \quad (3)$$

Prvi član u jednadžbi (3) naziva se Lennard-Jonesov (LJ) potencijal ili 12–6 potencijal, pomoću njega modeliraju se privlačne disperzijske interakcije te odbijanje između čestica prema Paulijevom načelu. Parametar  $\varepsilon_{ij}$  ovisi o paru atoma  $ij$  te određuje energijski minimum LJ potencijala, zajedno s članom  $R_{\text{min},ij}$  koji ovisi o paru atoma  $ij$ . Drugi član jednadžbe (3) je elektrostatski potencijal opisan Coulombovim zakonom, gdje su  $q_i$  i  $q_j$  efektivni naboji na atomima,  $\varepsilon_0$  opisuje relativnu permitivnost otapala, a  $r_{ij}$  je udaljenost između atoma  $ij$ . Efektivni naboji nisu naboji na atomima nego su parcijalni naboji s necjelobrojnim vrijednostima odabrani prema raspodjeli naboja na cijeloj molekuli. Zbroj svih parcijalnih naboja molekule jest, naravno, jednak formalnom naboju molekule. U slučaju iona, efektivni naboj iona jednak je formalnom naboju (npr. kation natrija,  $\text{Na}^+$  jednak je +1). Iz jednadžbe za nevezne interakcije vidljivo je da nema člana koji opisuje vodikove veze koje su ključne za opis bioloških sustava. Vodikove veze, u simulacijama molekularne dinamike, modelirane su kombinacijom LJ člana i Coulombovog člana. Usprkos tome, duljina vodikove veze i kut vodikove veze dobro se reproduciraju molekularno–dinamičkim simulacijama. U nekim slučajevima, zabilježeno je odstupanje kutova u usporedbi s modeliranim vodikovim vezama kvantno–mehaničkim računima.<sup>26</sup>

Navedeni parametri dobiveni su eksperimentalno i iz kvantno–mehaničkih izračuna. Parametri dobiveni eksperimentalni potiču iz: vibracijskih spektara, struktura dobivenih rendgenskom difrakcijom ili spektroskopijom nuklearne magnetne rezonancije, slobodne energije solvatacije, entalpija isparavanja. Parametri dobiveni kvantno–mehaničkim izračunima potiču iz: energija optimiziranih geometrijskih struktura, energija konformacije i energija visine barijere, elektrostatskih potencijala, energija dimerizacije i vibracijskih spektara.

### 2.2.1. Periodični rubni uvjeti

S obzirom da se biološke molekule pri fiziološkim uvjetima nalaze otopljeni u vodenom mediju, ključno je simulirati i njihov utjecaj poput vodikovih veza između biološke makromolekule i vode. Postoji nekoliko načina opisa modela otapala, u ovom slučaju vode, prilikom izvođenja simulacija molekularne dinamike: u vakuumu, uz implicitni model vode, te uz eksplicitni model vode. Prve simulacije bioloških makromolekula simulirane su u vakuumu ili uz korištenje implicitnog otapala, koji vodu opisuje kao kontinuirano otapalo. Kako bi se pravilno opisale interakcije između biološke makromolekule i otapala, uveden je eksplicitni model vode. Prilikom korištenja eksplicitnog opisa modela vode, postoje dvije metode: model kapi te korištenje rubnih uvjeta. Glavni nedostatak molekule kapi u kontekstu molekularno-dinamičkih simulacija jesu rubni uvjeti zbog kojeg dolazi do isparavanja molekula vode tijekom simulacije. Kako bi se problem isparavanja vode izbjegao, koriste se periodični rubni uvjeti. Translacijom simulacijske jedinične ćelije u svim smjerovima izbjegavaju se konačni rubni uvjeti te se uvodi periodičnost. Prelaskom čestice iz ćelije u sliku, identična čestica vraća se nazad u ćeliju (Slika 5).



Slika 5 Prikaz periodičnih rubnih uvjeta. Slika preuzeta iz ref. 27.

Postoji više dostupnih jediničnih ćelija prilikom korištenja periodičnih rubnih uvjeta. Prirodan odabir je kubična ćelija, no njen nedostatak je neefikasno iskorišten prostor koji je popunjen molekulama otapala, što zauzvrat povećava vrijeme potrebno za provedbu simulacije. Efikasnija jedinična ćelija je krnji oktaedar koji je najbliži obliku sfere i prikladan je za simuliranje globularnih proteina (proteini sfernog oblika). Rompski dodekaedar je 71% volumena kubične stoga je potrebno, kao i za krnji oktaedar, manje vremena za provedbu simulacije.

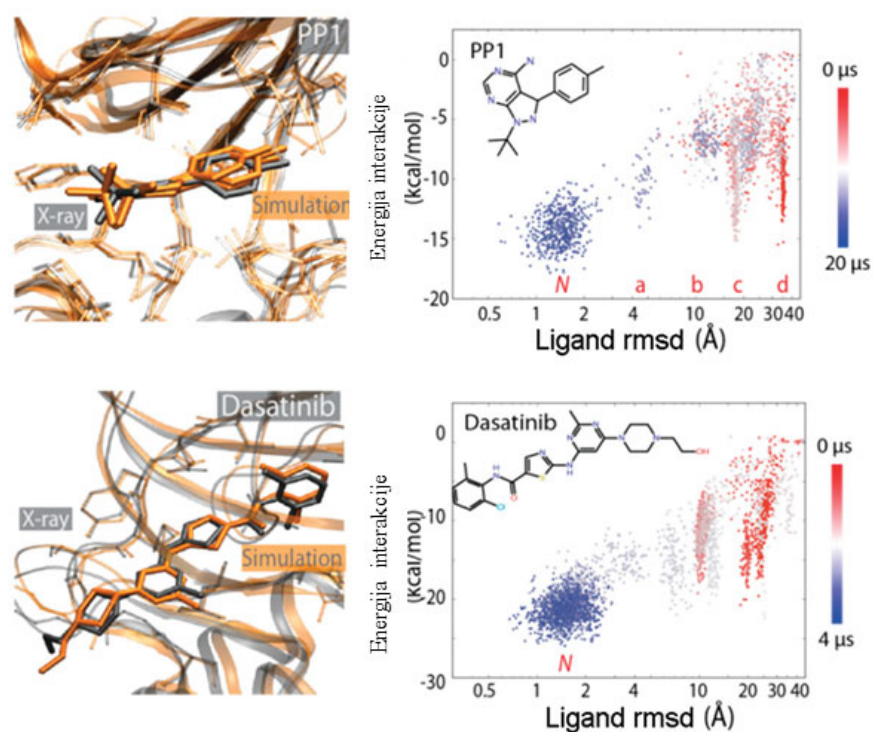
### 2.3. Molekularna dinamika

Simulacija molekularne dinamike je računalna metoda koja omogućava praćenje promjene položaja atoma u ovisnosti o vremenu u svrhu proučavanja dinamičkih i termodinamičkih svojstava (bio)makromolekula. Simulacije molekularne dinamike neizostavan su dio istraživanja bioloških makromolekula (proteini, nukleinske kiseline, ugljikohidrati i masti). Omogućuju promatranje događaja koji su eksperimentalno izazovni za mjeriti poput: pH-ovisne konformacijske promjene enzima,<sup>28</sup> alosteričke promjene proteina uslijed vezanja liganda,<sup>29</sup> smatanje proteina,<sup>30</sup> prevrtanje nukleotidne baze u DNA.<sup>31</sup>

Molekularna dinamika zasniva se na uzorkovanju struktura koje se nalaze na plohi potencijalne energije (PPE). Na PPE razlikujemo stacionarne točke: lokalne minimume te jedan globalni minimum, te sedlaste točke koja nije lokalni ekstrem PPE. Struktura koja se nalazi na sedlastoj točki prijelazna je struktura.

Ako se simulacija odvija beskonačno dugo, onda će se pretražiti cijela ploha potencijalne energije, što je premisa ergotske hipoteze. U realnosti, beskonačno duga simulacija nije moguća. Unatoč tome, dovoljno dugim simulacijama moguće je pretražiti PPE u dovoljnoj mjeri za pravilan opis vezanja liganda (primjerice lijeka) za enzim. Primjerice, 2011 godine Shan i sur.<sup>32</sup> proveli su simulacije vezanja lijekova dasatiniba i PP1 na Src-kinazu trajanja 20  $\mu$ s na atomskoj razini. Simulacije su napravili bez primjene dodatnog potencijala, te su uspjeli reproducirati nativni način vezanja lijekova dobiven rendgenskom difrakcijom kokristala enzima i lijeka (Slika 6).





**Slika 6** Ovisnost energije interakcije liganda s enzimom o RMSD (engl. *root mean square deviation*) vrijednosti liganda (desno) u vremenu prikazuje pretragu plohe potencijalne energije te pronalazak optimalnog načina vezanja za katalitičku domenu Src-kinaze. Superpozicija struktura lijeka dobivenih molekularno–dinamičkim simulacijama i strukturom dobivenom rendgenskom difrakcijom u aktivnom mjestu enzima (lijevo).

Preuzeto iz ref. 32.

Osim što je uspješno reproduciran način vezanja pronađen u kristalnoj strukturi, opisan je i mehanizam vezanja, a sve to je omogućeno iscrpnom pretragom plohe potencijalne energije.

Opisom atoma i veza molekularnom mehanikom, te korištenjem 2. Newtonovog zakona, moguće je simulirati promjenu položaja atoma u vremenu. Potencijal je dan u obliku polja sila jednadžbom (1), a primjenom gradijenta na potencijal dolazimo do relacije sile i potencijala prema jednadžbi:

$$\mathbf{F}_i = -\nabla E, \quad (4)$$

Raspisom sile prema 2. Newtonovom zakonu:

$$\mathbf{F}_i = m_i \mathbf{a}_i = m_i \frac{\partial \mathbf{p}_i}{\partial t} = m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2}, \quad (5)$$

gdje je  $\mathbf{a}_i$  vektor akceleracije čestice  $i$ ,  $m_i$  masa čestice  $i$ ,  $\mathbf{p}_i$  vektor količine gibanja čestice  $i$ ,  $\mathbf{r}_i$  vektor položaja čestice  $i$ , te  $t$  vrijeme. Uvrštavanjem jednadžbe (5) u jednadžbu (4) dolazimo do parcijalne diferencijalne jednadžbe:

$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} = -\nabla E, \quad (6)$$

rješavanjem parcijalne diferencijalne jednačbe (6) dobivamo niz struktura generiranih ovisno o vremenu koju nazivamo trajektorijom. Parcijalna diferencijalna jednačba nije analitički rješiva stoga se numerički integrira po malim vremenskim koracima  $\Delta t$ . Vremenski korak mora biti manji od najbržeg događaja promatranog sustava, koji je u biološkim sustavima vibracija C-H veze. Frekvencija vibracije C-H veze iznosi  $10^{-14}$  s, stoga se koristi vremenski korak  $\Delta t = 1$  fs. Potreba za korištenjem malih vremenskih koraka ogleda se u tome da ako bi se koristio prevelik vremenski korak, gibnjem atoma došlo bi do prebliskih kontakta koji bi rezultirali prevelikim silama, koji bi potom izazvali preveliko odbijanje atoma. Korištenjem algoritama koji uvode ograničenje na duljinu C-H veze moguće je povećati vremenski korak na 2 fs poput algoritma SHAKE<sup>33</sup> i LINCS<sup>34</sup> dok preraspodjelom masa atoma vodika u molekuli može povećati vremenski korak na 4 fs.<sup>35</sup>

Atomima je početkom simulacije potrebno dodijeliti početnu brzinu. Svakom se atomu pridodaje početna brzina sukladno Maxwell-Boltzmannovoj raspodjeli:

$$P(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi kT}} \exp\left(-\frac{m_i v_i^2}{2kT}\right), \quad (7)$$

Gdje je  $m_i$  masa čestice,  $k$  je Boltzmannov faktor,  $T$  je temperatura, a  $v$  brzina čestice.

Nakon što je svim atomima pridodana početna brzina rješava se parcijalna diferencijalna jednačba (6) numeričkim integriranjem. Numeričko integriranje odvija se prema jednom od mnogih algoritama, najčešće upotrebljavani su Verletov algoritam<sup>36</sup> i tzv. *leap-frog* algoritam.<sup>37</sup> Numerička integracija Verletovim algoritmom prikazana je jednačbom:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) + \mathbf{a}_i(t)\Delta t^2, \quad (8)$$

gdje je  $\mathbf{r}_i$  vektor položaja čestice  $i$ ,  $\mathbf{a}_i$  vektor akceleracije čestice  $i$ ,  $t$  trenutni vremenski korak, a  $\Delta t$  vremenski korak. Akceleracija se računa preko potencijala polja sila, što je ujedno i računalno najzahtjevniji dio numeričke integracije.

## 2.4. Gibbsova energija vezanja

Procjena Gibbsove energije vezanja jedan je od najbitnijih izračuna korištenih u simulacijama molekularne mehanike. Od najvećeg značaja je farmaceutskoj industriji jer omogućuje procjenjivanje Gibbsove energije vezanja potencijalnih lijekova u odnosu na eksperimentalno određivanje koje je vremenski i financijski vrlo zahtjevno. Energija vezanja u kontekstu dizajna lijekova opisuje jačinu vezanja lijeka za protein, te cilj je pronaći molekulu koja će se što jače vezati za protein. Najčešća metoda korištena za izračun je molekularno dokiranje (engl. *docking*), metoda koja na temelju bodovne funkcije određuje konformaciju molekule najniže energije. Molekularno dokiranje, iako je vrlo brza i efikasna metoda, pati od niske osjetljivosti te nije u mogućnosti pouzdano razlikovati molekule sličnih strukturnih elemenata (primjerice ako se razlikuju u metilnoj skupini). Metode koje su najpouzdanije, no računalno daleko najzahtjevnije su alkemijske metode. Alkemijske metode koriste niz nefizičkih međustanja tj. alkemijska stanja te na temelju njih procjenjuju energiju vezanja. Dvije često korištene tehnike alkemijske metode su slobodna energija pertubacije (engl. *free energy perturbation*, FEP) i termodinamička integracija (engl. *thermodynamic integration*, TI). Naposljetku, metode koje se nalaze u sredini spektra pouzdanosti i efikasnosti su takozvane *end-point* metode slobodne energije. Najčešće korištene *end-point* metode su MM/PBSA (engl. *Molecular Mechanics / Poisson Boltzmann Surface Area*) i MM/GBSA (engl. *Molecular Mechanics / Generalized Born Surface Area*).<sup>38</sup> Njihov naziv proizlazi iz korištenja završnih stanja sustava, stoga su manje zahtjevne od alkemijskih metoda, no pouzdanije od metoda molekularnog dokiranja. U metodama MM/PB(GB)SA postoje dva protokola izvedbe: protokol temeljen na tri trajektorije (3A-MM/PB(GB)SA), te protokol temeljen na jednoj trajektoriji (1A-MM/PB(GB)SA). U protokolu 3A-MM/PB(GB)SA uzimaju se trajektorije od receptora bez liganda, trajektorije samog liganda te trajektorije kompleksa protein:ligand. Dok 1A-MM/PB(GB)SA koristi samo jednu trajektoriju kompleksa.<sup>39</sup> Jednadžba za izračun Gibbsove energije glasi:

$$\Delta_{\text{vezanja}}G = G_{\text{kompleks}} - G_{\text{receptor}} - G_{\text{ligand}}, \quad (9)$$

Gibbsova energija vezanja može se raspisati prema doprinosima interakcija:

$$\Delta_{\text{vezanja}}G = \Delta H - T\Delta S = \Delta E_{MM} + \Delta_{\text{sol}}G - T\Delta S, \quad (10)$$

gdje je  $\Delta E_{MM}$  promjena energije sustava dobivena molekularnom mehanikom u plinskoj fazi,  $\Delta_{\text{sol}}G$  slobodna energija solvatacije i  $T\Delta S$  promjena konformacije uslijed vezanja liganda.  $\Delta E_{MM}$  član se dalje može raspisati prema jednadžbi:

$$\Delta E_{MM} = \Delta_{\text{int}}E + \Delta_{\text{ele}}E + \Delta_{\text{vdW}}E. \quad (11)$$

Izraz  $\Delta E_{MM}$  uključuje: promjene energije veza, kutova i torzijskih kutova ( $\Delta_{\text{int}}E$ ), promjene elektrostatske energije ( $\Delta_{\text{ele}}E$ ) i promjene van der Waalsove energije ( $\Delta_{\text{vdW}}E$ ).

Nadalje, energija solvatacije je zbroj doprinosa elektrostatske energije solvatacije  $\Delta_{\text{PB/GB}}G$  (polarni doprinos) i nepolarnog doprinosa  $\Delta_{\text{SAG}}$  između otopljene tvari i implicitnog otapala. Polarni doprinos se računa rješavanjem Posson-Boltzmannove jednadžbe ili preko kanonske GB jednadžbe. Napolarni doprinos računa se preko površine dostupne otapalu (engl. *Solvent Accessible Surface Area*, SASA) te računa se jednadžbom  $\Delta_{\text{SAG}} = \gamma\text{SASA} + b$ . Naposljetku, entropijski dio  $-T\Delta S$  računa se analizom normalnih modova gdje se računa translacijski, vibracijski i rotacijski doprinos entropiji. Izračun entropije računalno je najzahtjevniji dio izračuna Gibbsove energije vezanja, te često se izostavlja izračun entropije kada se gledaju isključivo relativne promjene Gibbsove energije ( $\Delta\Delta G$ ).

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Standardne kemikalije

Agar (*Liofilchem*), agarozna (*Sigma*), akrilamid/bisakrilamid (*Sigma*), amonijev peroksidisulfat (APS) (*Sigma*), ampicilin (*Sigma*), kanamicin (*Sigma*), L-arabinoza (*Sigma*), ditiotreititol (*Sigma*), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) (*Sigma*), glicerol (*Kemika*), imidazol (*Sigma*), izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*CarlRoth*), kalijev klorid (*Kemika*), Luria-Bertani agar (LB agar) (*Liofilchem*), tripton (*Liofilchem*), kvašćev ekstrat (*Biolife*), natrijev klorid (*GramMol*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*CarlRoth*), N,N,N,N'-tetrametiletildiamin (TEMED) (*Sigma*), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Chemsolute*), klorovodična kiselina (*Kemika*), tetraciklin (*Sigma*), glicin (*Sigma*), kloranfenikol (*Sigma*), amorfna poli(D, L)mlječna kiselina brojčanog prosjeka molarne mase  $M_n = 10\ 000$  (*Sigma-Aldrich*), octena kiselina (*LabExpert*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Sigma*),  $\beta$ -merkaptotanol (*Sigma*), urea (*GramMol*), kalijev klorid (*Kemika*), N-(2-hidroksietil)-piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*Fischer Bioreagents*), diklormetan (*Kemika*)

#### 3.1.2. Plazmidi

**pET15TV-L** – plazmid iz serije pET vektora, sadrži gen za rezistenciju na ampicilin *amp<sup>r</sup>*.

**pET28b** – plazmid iz serije pET vektora. Gotovo istih značajki kao pET15TV-L plazmid pri čemu pET28b sadrži gen za rezistenciju na kanamicin *kan<sup>r</sup>* i višestruko mjesto za kloniranje (engl. multiple cloning site, MCS)

#### 3.1.3. Markeri veličina proteina i DNA

Marker veličina za poliakrilamidnu gel-elektroforezu Precision Plus Protein Standards Unstained (*BioRad*), marker veličina za agaroznu gel-elektroforezu 1 kb DNA Ladder (*NEB*)

#### 3.1.4. Boje za detekciju makromolekula nakon elektroforeze

Coomasie Brilliant Blue R-250 (*Merck*), GelRed (*Sigma*)

## 3.2. Metode rada s bakterijama

### 3.2.1. Rad u sterilnim uvjetima

Rad s bakterijama podrazumijeva sterilne uvjete. Radna površina i oprema dezinficira se 70%-tnim etanolom te radi se uz otvoreni plamen. Sve kemikalije su autoklavirane pri 121°C ili sterilizirane filtriranjem kroz membranu od celuloza-acetata veličine pora 0,22 µm..

### 3.2.2. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom

Elektroporacija jest jedna od metoda transformacije bakterijskih stanica. Temelji se na remećenju stabilnosti fosfolipidnog dvosloja uslijed primjene električnih pulseva što omogućava unos biomakromolekula, u ovom slučaju plazmida, u bakterijsku stanicu. Za provedbu elektroporacije korišten je uređaj MicroPulser (*BioRad*). Kako je cijeli proces osjetljiv na temperaturu, stalak za elektrokivete i same elektrokivete su ohlađene na -20 °C. U 40 µL elektrokompetentnih bakterijskih stanica dodano je 100 ng plazmida, promiješano pipetiranjem te prebačeno u elektrokivetu. Elektrokiveta postavlja se na pripadni držač, stavi u uređaj te primjeni se električni puls trajanja 4-6 ms napona 2,5 kV. Tim procesom proveden je unos DNA u stanicu elektroporacijom, potom dodaje se 1000 µL LB medija. Stanice se prebace u polipropilensku mikroeprijetu te se inkubiraju sat vremena na 37 °C uz povremeno miješanje. Plazmidi sadrže gen za rezistenciju za dani anitibiotik, transformirane stanice nanose se na LB agar ploče s odgovarajućim antibiotikom i inkubiraju se pri 37 °C preko noći.

### 3.2.3. Priprema elektrokompetentnih bakterijskih stanica

Elektrokompetentne stanice su stanice sposobne za unos DNA elektroporacijom. Uspješnost elektroporacije ovisi o uvjetima suspenzije stanica stoga je potrebna optimalna priprema bakterijskih stanica. Pripremi se prekonoćna kultura bakterijskog soja BL21(DE3) u 5 mL LB medija bez dodatka medija. Sutradan se inokulira 40 mL LB medija bez dodatka antibiotika nakon čega se bakterije uzgajaju na tresilici pri 37 °C uz 250 okretaja po minuti (engl. rotations per minute, rpm) do optičke gustoće  $OD_{600} \sim 0,4 - 0,6$ . Stanice se prebace u kivete za centrifugiranje te obore se pri 7000 x g na 4 °C. Supernatant se odlije, a stanice se resuspendiraju u 10 mL hladne redestilirane vode nakon čega se centrifugiraju pri 7000 x g na 4 °C. Proces se ponovi još jedan put nakon čega se dobivaju elektrokompetentne stanice.

#### 3.2.4. Priprema glicerolskih kultura za dugotrajnu pohranu bakterijskih stanica

Za dugotrajnu pohranu bakterijskih kultura sa željenim plazmidom koriste se glicerolske bakterijske kulture. Pripremi se prekonocna bakterijska kultura s odgovarajućim plazmidom nakon čega se 1 mL prekonocne kulture pomiješa sa 200 µL glicerola volumnog udjela 70% pri čemu je konačni volumni udio glicerola iznosi 10–15%. Glicerolske bakterijske kulture pohranjuju se na -80 °C.

#### 3.2.5. Praćenje rasta bakterijskih stanica u tekućem mediju

Rast bakterijskih stanica u tekućem mediju prati se turbidimetrijski pri valnoj duljini  $\lambda = 600$  nm, odnosno prati se optička gustoća (engl. *optical density*, OD). Pri danoj valnoj duljini dolazi do elastičnog raspršenja zračenja o bakterijske stanice te količina raspršenog i apsorbiranog zračenja proporcionalna je količini bakterijskih stanica u tekućem mediju. Tekući medij ne apsorbira značajno zračenje pri valnoj duljini od 600 nm. Osim toga, zračenje pri toj valnoj duljini nije štetno za bakterijske stanice.

Mjerenje turbiditeta je napravljeno u spektrofotometru Evolution 60S (*Thermo Scientific*). Uređaj se prvo anulira otopinom bez analita, u ovom slučaju otopina LB medija. Nakon čega se mjeri OD<sub>600</sub> uzorka sa stanicama bakterija.

### 3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama

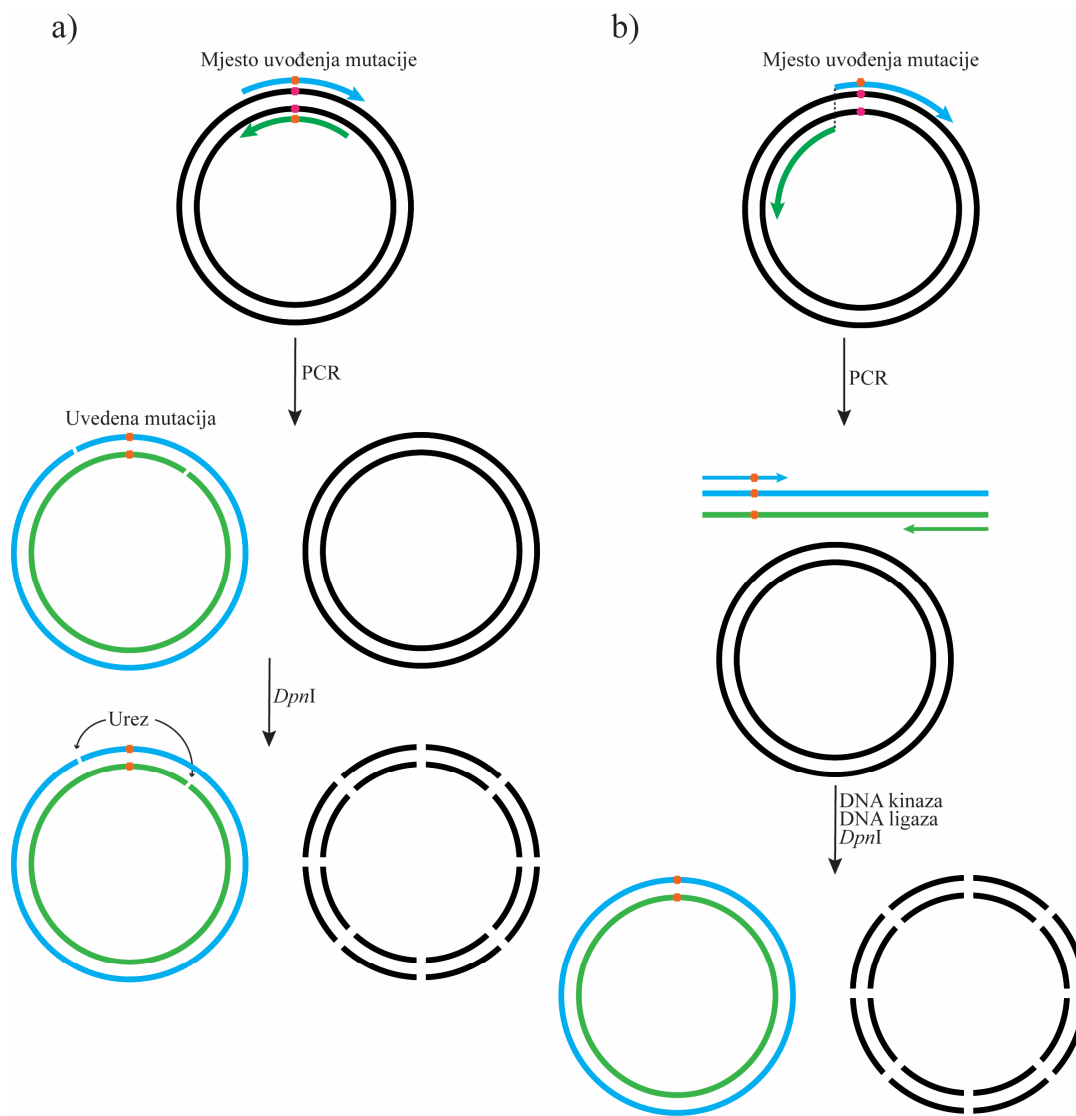
#### 3.3.1. Izolacija plazmidne DNA

Plazmidna DNA izolirana je pomoću komercijalnog kompleta QIAprep Spin Miniprep (*QIAGEN*) prema uputama proizvođača. Ukratko, uzgojena je bakterijska kultura na 37 °C uz dodatak prikladnog antibiotika. Stanice su oborene pri 16 000 x g pri sobnoj temperaturi, zatim su razbijene alkalnom lizom uz natrijevu lužinu i SDS pri čemu su denaturirani proteini i DNA. Dobivena suspenzija se neutralizira dodatkom gvanidinijeva hidroklorida i kalijeva acetata pri čemu dolazi do renaturacija plazmidne DNA, i taloženja kompleksa proteina, SDS-a i genomske DNA. Suspenzija se centrifugira pri 16 000 x g, talog se odbacuje a supernatant se prenosi na kolone. Kolona sadrži membranu od silika-gela koja veže DNA pri visokoj koncentraciji kaotropne tvari. Kolone se ispiru puferom niske ionske jakosti pri čemu dolazi do elucije pročišćene i izolirane plazmidne DNA. Čistoća izolirane plazmidne DNA provjerava se agaroznom gel-elektroforezom.

### 3.3.2. Kružna mutageneza

Kružna mutageneza je metoda kojom se uvode mutacije na ciljanom mjestu u nukleotidnom slijedu plazmidne DNA. Princip rada ciljane mutageneze sličan je lančanoj reakciji polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), te temelji se na korištenju mutagene početnice (početnica koja je komplementarna svojom dužinom plazmidnoj DNA, izuzev mjesta uvođenja mutacije). Za provedbu ciljane mutageneze potrebno je imati: plazmidnu DNA, mutagene početnice, deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP) te vjernu DNA polimerazu. Kružna mutageneza može se izvesti na više načina, te ovisi o komercijalnom kompletu. Primjerice, Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (*NEB*), korišten u sklopu ovog diplomskog rada, koristi inverzni PCR koji umnaža DNA sa ciljanom mutacijom eksponencijalno (Slika 7b), dok QuickChange II (*Agilent*) umnaža DNA sa ciljanom mutacijom PCR-om linearno (Slika 7a). Nakon umnažanja kružne DNA, neovisno o metodi, potrebno je razgraditi kalupnu plazmidnu DNA. Tu ulogu izvršava *DpnI*, enzim koji razgrađuje (hemi)metiliranu DNA. (Hemi)metilacija DNA ključna je za normalan rad stanice, pri čemu je kalupna plazmidna DNA metilirana. Nadalje, na mjestima sljepljivanja početnica, na 5' kraju početnice nakon PCR-a, nastaju urezi. Urezi su mjesta diskontinuiteta fosfodieterske veze u dvolančanoj DNA koji se popravljaju *in vivo*.





**Slika 7** Shema kružne mutageneze, narančasto označeno je mjesto uvođenja mutacije. Različite metode kružne mutageneze: **a)** QuickChange II koristi komplementarne početnice koje rezultiraju linearnom umnažanju DNA s ciljanim slijedom, izuzev toga nakon PCR-a se reakcijska smjesa razgradi enzimom *DpnI* s dok **b)** koristi inverzni PCR koji rezultira eksponencijalnim umnažanjem DNA s ciljanim slijedom, međutim produkt je linearan te zahtjeva prvotno fosforiliranje 5' kraja DNA s ciljanim slijedom DNA-kinazom, cirkularizacijom linearne DNA. DNA-ligazom te razgradnju kalupne *DpnI*. Sheme su preteuze i prilagođene iz priručnika za provedbu QuickChange II i Q5 Site Directed Mutagenesis.

Za kružnu mutagenezu korišten je komercijalni komplet Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (*NEB*) prema uputama proizvođača. Početnice korištene u mutagenezi navedene su u tablici 1. koje su dizajnirane pomoću alata NEBaseChanger dostupnog na web-stranici proizvođača.

Daljnje optimiranje početnica izvedeno je uz pomoć alata OligoEvaluator kako bi se izbjeglo stvaranje sekundarnih struktura početnica i dimera početnica. Prilikom dizajna početnica potencijalni problem je visoki udio GC u početnicama, što rezultira visokom temperaturom sljepljivanja (engl. *annealing*), stvaranja sekundarnih struktura i dimera početnica. Jedan od načina rješavanja problema visokog GC udjela u početnicama je uvođenjem tihih mutacija (označene plavom bojom u Tablici 1), odnosno mutacije koje ne dovode do promjene aminokiselinskog slijeda proteina.

**Tablica 1.** Značajke početnica korištenih u ciljanoj mutagenizi. Podvlatkom je označeno mjesto za uvođenje mutacije, a plavom bojom naznačene su tihe mutacije. Oznake For i Rev odnose se na engleske nazive *forward primer* (nizvoda početnica) i *reverse primer* (uzvodna početnica).

Naziv početnice	$T_m / ^\circ\text{C}$	GC / %	Nukleotidni slijed 5' → 3'
Izvorni slijed	-	-	gctggtggcgccgagggggaccg <del>cg</del> ctatccccgc
RPA1511_R243K_For	72	57	gTgacaaagctatccccccatcg
RPA1511_R243K_Rev	72	76	cTtcggccgccaccagc

Za provedbu željene mutacije RPA1511\_R243K konačne reakcijske smjese korišteno je: nizvodna početnica,  $0,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ; uzvodna početnica,  $0,5 \mu \mu\text{mol dm}^{-3}$ ; kalupna DNA, 1 ng; Q5 pufer, 1x; deoksiribonukleozid trifosfati,  $200 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ; Q5 DNA polimeraza,  $0,02 \text{ U cm}^{-3}$ . Kružna mutageniza provedena je u uređaju Thermal Cycler T100<sup>TM</sup> (BioRad), a korišteni temperaturni program prikazan je u tablici 2. Uspješnost reakcije kružne mutagenize provjerena je na agaroznoj gel-elektroforezi.

**Tablica 2** Temperaturni program korišten za provedbu kružne mutagenize.

Korak	Temperatura / $^\circ\text{C}$	Trajanje / s	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	20 s	1
Denaturacija	98	10 s	
Sparivanje početnica	69	20 s	20
Produljenje	72	240 s	
Završno produljenje	72	300 s	1

### 3.3.3. Agarozna gel-elektroforeza

Elektroforeza na agaroznom gelu je analitička elektroforetska metoda u kojoj se nukleinske kiseline odvajaju na temelju veličine. Nukleinske kiseline su polianioni pa se u električnom polju kreću ka pozitivnoj elektrodi anodi. Agarozni gel djeluje kao molekulsko sito te odvaja

nukleinske kiseline prema masi i stupnju superzavijenosti. Nukleinske kiseline niske mase i visoke superzavijenosti kretat će se brže u električnom polju od nukleinskih kiselina visoke mase i niske superzavijenosti.

Za pripravu agaroznog gela korištena je agarozna otopljena u puferu TAE (Tris,  $c = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; octena kiselina,  $c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; EDTA,  $c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  titrirano do  $\text{pH} = 8$ ) masenog udjela 1%. Zatim se zagrijava do potpunog otapanja agaroze, a nakon hlađenja otopina se izljava u ladice sa češljicama. Otopina se pusti da očvrstne i dobiveni gel se prenese u kadicu za elektroforezu napunjenom puferom TAE tako da su jažice orijentirane prema negativnoj elektrodi, katodi.

Uzorcima se dodaje 1/10 pufera za nanošenje gela s *GelRed*-om (ksilencijanil-fluorofosfat,  $\gamma = 2,5 \text{ g dm}^{-3}$ ; bromfenol-plavo,  $\gamma = 2,5 \text{ g dm}^{-3}$ ; EDTA,  $c = 0,07 \text{ mol dm}^{-3}$ ; glicerol,  $\varphi = 30\%$ ; 1 % komercijalnog koncentrata boje *GelRed*). Ksilencijanil-fluorofosfat i bromfenol-plavo omogućavaju praćenje elektroforeze te upućuju kada zaustaviti elektroforezu, a glicerol omogućava lakše nanošenje uzoraka u jažice, povećavajući gustoću otopine. *GelRed* je interkalirajuća boja koja čini kompleks s nukleinskim kiselinama, a taj kompleks ima svojstvo fluorescencije ( $\lambda_{\text{ex}} \approx 300$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 590$ ). Agarozna gel-elektroforeza provodi se na sobnoj temperaturi i pri 120 V pomoću uređaja za horizontalnu elektroforezu EPS 600 (*Pharmacia Biotech*). Marker veličina korišten u ovoj elektroforezi je 1 kb DNA Ladder (*NEB*), a dobiveni gelovi su snimljeni pomoću kamere ChemiDoc Imaging System (*BioRad*).

#### 3.3.4. Spektrometrijsko mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina

Za mjerenje koncentracije nukleinskih kiselina korišten je jednosnopni spektrometar NanoDrop One (*ThermoFischer Scientific*). Prvo je potrebno nulirati spektrometar puferom u kojem su pohranjene nukleinske kiseline, nakon toga se mjeri koncentracija uzorka. Važni parametri za čistoću nukleinskih kiselina su omjeri apsorbanacija  $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{260}/A_{230}$ . Za čiste nukleinske kiseline za omjer  $A_{260}/A_{280}$  iznosi oko 1,8; dok omjer  $A_{260}/A_{230}$  iznosi 1,8-2,0.<sup>40</sup>

### 3.4. Metode rada s proteinima

#### 3.4.1. Prekomjerna ekspresija fuzijskih proteina

Za prekomjernu ekspresiju fuzijskih proteina korištena je bakterija *E. coli* soja BL21(DE3) transformirana plazmidom koji sadrži kodirajući slijed fuzijskog proteina. Najprije se inokulira 5 mL LB medija s odgovarajućim antibiotikom te pusti preko noći pri 37 °C i 250 rpm. Prekonoćnu se kulturu razrijedi u omjeru 1:100 u LB mediju s odgovarajućim antibiotikom te uzgajaju na tresilici pri 30 °C i 200 rpm. Nakon što optička gustoća dosegne 0,4–0,8, bakterijske kulture se ohlade 30 min pri 15 °C nakon čega se inducira prekomjerna ekspresija dodatkom IPTG-a, konačne koncentracije  $c = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , preko noći. Sutradan stanice se obore centrifugiranjem 15 minuta pri 4 °C i 7000 x g te supernatant se odbaci.

#### 3.4.2. Priprema proteinskih ekstrakata

Ovisno o početnom volumenu bakterijske kulture, proteinski ekstrakti pripremljeni su ili pomoću *BugBustera* (Merck) ili sonikacijom. Prilikom korištenja *BugBustera*, dodaje se 1/20 početnog volumena taloga stanica nakon čega se dodaje 10 µL rLysosome™ po gramu taloga stanica. Liza *BugBusterom* omogućena je enzimom T4 lizozima koji razgrađuje staničnu stijenu, dok neionski detergentski narušavaju lipidni svosloj i solubiliziraju staničnu membranu pri čemu dolazi do oslobađanja prekomjerno eksprimiranog proteina. *BugBuster* u svojoj formulaciji sadrži *Benzonazu*, optimiranu endonukleazu koja razgrađuje sve vrste DNA (jednolančanu DNA, dvolančanu DNA, linearnu i kružnu DNA) i ribonukleinskih kiselina (engl. *ribonucleic acid*, RNA) do oligonukleotida duljine 2–5 parova baza. Priprema proteinskih ekstrakata pomoću *BugBustera* osigurava blaže uvjete lize stanica, no dolazi uz nedostatak nemogućnosti promjene puferkog sastava *BugBustera* koji može izazvati taloženje proteina.

Priprema proteinskih ekstrakata sonikacijom započinje resuspendiranjem taloga bakterijskih stanica u 800 µL (probna ekspresija) ili 10 mL (veliki uzgoj) pufera A sastava: Tris,  $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; NaCl,  $c = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; glicerol,  $\varphi = 10 \%$ ; imidazol,  $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Sonikacija je obavljena u 8 koraka u ledu pri čemu jedan korak se sastoji od 30 sekundi soniciranja i 30 sekundi hlađenja.

Nakon lize stanica, alikvotira se volumen 5 µL za analizu, a smjesa ostataka stanica i proteinskog ekstrakta centrifugira se 20 min pri 4 °C i 20 000 x g. Supernatant se odvoji od taloga te talog se sačuva za daljnju analizu.

### 3.4.3. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu

Prekomjerno eksprimirani rekombinantni protein na N-kraju sadrži šest uzastopnih histidina His<sub>6</sub>. Punilo je agarozu na koju je kovalentno vezana nitrilotriocetna kiselina, a pri pH > 7 ona je deprotonirana i tvori četiri koordinacijske veze s Ni<sup>2+</sup> kationom. Histidini iz polihistidinskog privjeska rekombinantnog proteina mogu zauzeti preostala dva koordinacijska mjesta što omogućava specifično vezanje proteina s histidinskim privjeskom. Ispiranje specifično vezanih proteina postiže se dodatkom visoke koncentracije imidazola koji se natječe za koordinacijsko mjesto.

Kolona se napuni sa 3 mL suspenzije Ni-NTA agaroze, a kako bi se koristila potrebna je ekvilibracija. Kolona se ispire sa 3 volumena kolone (engl. *Column Volume*, CV) pufera A sastava: sastava: Tris,  $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; NaCl,  $c = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; glicerol,  $\varphi = 10 \%$ ; **imidazol**,  $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; pH = 8. Nakon ekvilibracije nanosi se proteinski ekstrakt pri čemu se prikuplja nevezana frakcija, odnosno proteini koji ne sadrže afinitetni privjesak. Kako bi se uklonio ostatak proteina koji se vežu nespecifičnim interakcijama za kolonu, kolona se ispire s 5 CV puferom B sastava: Tris,  $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; NaCl,  $c = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; glicerol,  $\varphi = 10 \%$ ; **imidazol**,  $c = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; pH = 8. Elucija je obavljena s 2 CV puferom C sastava: Tris,  $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; NaCl,  $c = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; glicerol,  $\varphi = 10 \%$ ; **imidazol**,  $c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; pH = 8. Uspješnost pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu provjerena je denaturirajućom poliakrilamidnom gel-elektroforezom uz dodatak natrijeva dodecilsulfata.

### 3.4.4. Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak natrijeva dodecilsulfata

Denaturirajuća poliakrilamidna gel-elektroforeza uz dodatak natrijeva dodecilsulfata (engl. *Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) je elektroforetska metoda kojom se proteini odjeljuju na temelju njihove mase. Natrijev dodecilsulfat je anionski detergent koji u prisutnosti topline i reducirajuće tvari se veže na protein čineći ga negativno nabijenim. Količina vezanog natrijeva dodecilsulfata proporcionalna je molekulskoj masi proteina i neovisna je o aminokiselinskom slijedu danog proteina. U prisutnosti električnog polja, kompleks natrijeva dodecilsulfata i proteina kreće se kroz poliakrilamidni gel, koji djeluje kao molekulsko sito, pri čemu dolazi do odvajanja proteina na temelju njihove mase.

U diskontinuiranoj SDS-PAGE koriste se dva gela: gel za sabijanje i gel za razdvajanje. Navedeni gelovi razlikuju se prema količini poliakrilamida u smjesi gdje gel za sabijanje ima manji udio poliakrilamida i sastavu pufera. Gel za sabijanje omogućava da svi proteini kreću s iste pozicije prilikom dolaska na gel za razdvajanje te sprječava širenje pruga uslijed difuzije. Sastav gela za sabijanje je 4%-tni akrilamid/biskrilamid i pufer za sabijanje: Tris,  $c = 0,125$ , titrano s HCl do  $\text{pH} = 6,8$   $\text{mol dm}^{-3}$ ; SDS,  $w (w/v) = 0,1\%$ . Gel za razdvajanje sadrži 10%-tni akrilamid/bisakrilamid i pufer za razdvajanje: Tris,  $c = 0,375$   $\text{mol dm}^{-3}$ , titrirano s HCl do  $\text{pH} = 8,8$ ; SDS,  $w (w/v) = 0,1\%$ . Naposljetku, gelovima se dodaje  $N,N,N',N'$ -tetrametilendiamin (TEMED) konačnog volumnog udjela 0,05 % i amonijev persulfat (APS) konačne masene koncentracije  $0,7 \mu\text{g cm}^{-3}$  kako bi se potakla polimerizacija gelova. APS započinje polimerizaciju akrilamida, a TEPES je katalizator.

Gelovi su pripremljeni u aparaturi za elektroforezu Mini-Protean Tetra (*BioRad*). Elektrolitna otopina koja je korištena za provedbu elektroforeze sastava je: glicin,  $\gamma = 14,4$   $\text{g dm}^{-3}$ ; Tris,  $\gamma = 3,03$   $\text{g dm}^{-3}$ ; SDS,  $\gamma = 1$   $\text{g dm}^{-3}$ . Priprema uzoraka proteina za nanošenje na gel uključuje dodatak pufera za nanošenje sastava: Tris,  $c = 0,25$   $\text{mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 6,8$ ; SDS  $\gamma = 1,25$   $\text{g dm}^{-3}$ ;  $\beta$ -merkaptotanol,  $c = 12,5$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ; glicerol,  $\varphi = 6,25$  %; bromfenol plavo,  $\gamma = 0,02$   $\text{mg cm}^{-3}$ . Uzorci se proteina zatim denaturiraju u termobloku pri  $90^\circ\text{C}$  na 5 minuta, a na gel se nanosi  $10 \mu\text{L}$  uzorka. U jednu od jažica nanosi se marker proteina poznatih molekulskih masa *Precision Plus Protein™ Unstained*. Elektroforeza provodi se na sobnoj temperaturi primjenom napona od 120 V na 15 min, zatim 180 V sljedećih 45 min, odnosno do dolaska plave pruge bromfenol plavog do kraja gela. Nakon elektroforeze, gelovi se boje u otopini *Coomassie Brilliant Blue R-250* (*Coomassie Brilliant Blue R-250*,  $\gamma = 2,5$   $\text{g dm}^{-3}$ ; etanol,  $\varphi = 45$  %; octena kiselina,  $\varphi = 10$  %) 20 minuta, a nespecifično vezana za gel boja uklanja se u kipućoj destiliranoj vodi.

#### 3.4.5. Ugušćivanje proteina ultrafiltracijom

Frakcije dobivene afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu ugušćuju se pomoću centrikona Amicon Ultra Centrifugal filter (*Milipore*). Centrikon ima pore kroz koje mogu proći proteini manji od 10 kDa. Proteini se koncentriraju uz pufer za skladištenje sastava: Hepes,  $c = 20$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,5$ ; EDTA,  $c = 5$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ; KCl,  $c = 100$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ; ditiotritol,  $c = 2$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ; glicerol,  $\varphi = 20$  %. Uzorci proteina su koncentrirani pri  $6400 \times g$  i  $4^\circ\text{C}$ , potom su pohranjeni na  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 3.4.6. Mjerenje koncentracije proteina spektrofotometrijom

Koncentracija proteina određuje se spektrofotometrijski na uređaju NanoDrop One (*ThermoFischer Scientific*). Prvo se spektrofotometar anulira otopinom u kojoj je protein otopljen, nakon čega se u spektrofotometar unose podaci o molarnom apsorpcijskom faktoru i njegovoj molarnoj masi (parametri dobiveni pomoću alata *Expasy ProtParam*). Koncentracija se mjeri pri valnoj duljini  $\lambda = 280$  nm pri kojoj dolazi do apsorpcije zračenja bočnog ogranka triptofana. Uređaj mjeri omjer apsorbancija pri 260 nm i 280 nm, a za čiste proteine on iznosi oko 0,6.<sup>40</sup>

#### 3.4.7. Test hidrolitičke aktivnosti enzima prema suspenziji polimljične kiseline uklopljene u agarozu

Za utvrđivanje hidrolitičke aktivnosti enzima prema polimljičnoj kiselini korištena je uklopljena suspenzija polimljične kiseline u agarozu. Pripremljena je prema već opisanom protokolu u literaturi.<sup>41</sup> Odvažuje se polimljična kiselina tako da joj je konačni maseni udio u agarozu 0,2 %, te da maseni udio agaroze iznosi 0,8 %. Polimljična kiselina otopi se u diklormetanu tako da je za 1 g polimljične kiseline potrebno 10 mL diklormetana, te se pomiješa Tris do konačne množinske koncentracije  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Dobivena emulzija se sonicira 60 sekundi, a zatim slijedi isparavanje diklormetana na vodenoj kupelji 20 min. Nakon otparavanja, pomiješa se emulzificirana polimljična kiselina s agarozom i izliju se ploče. Jažice se izbuše pomoću sterilnog nastavka za mikropipetu, a u jažicu se nanosi željena masa proteina u 20  $\mu\text{L}$  uzorka.

#### 3.4.8. Turbidimetrijsko mjerenje hidrolitičke aktivnosti enzima u suspenziji polimljične kiseline

U svrhu kvatificiranja aktivnosti hidrolitičke aktivnosti enzima prema polimljičnoj kiselini, korištena je turbidimetrija. Turbidimetrija opisana je u potpoglavlju 3.2.5, a priprema suspenzije polimljične kiseline opisana je u potpoglavlju 3.4.7. U svakoj jažici nalazi se pufer Tris konačne množinske koncentracije  $60 \text{ mmol dm}^{-3}$ , te polimljična kiselina tako da joj je konačni  $\text{OD}_{600}$  približan 1,0. Raspon masa enzima korištenih u mjerenju je od 50  $\mu\text{g}$  do 150  $\mu\text{g}$ . Turbidimetrijsko mjerenje izvedeno je pomoću čitača mikrotitarskih ploča SpectraMax iD3 (*Molecular Devices*).

### 3.5. Računalne metode

#### 3.5.1. Priprema strukture proteina RPA1511

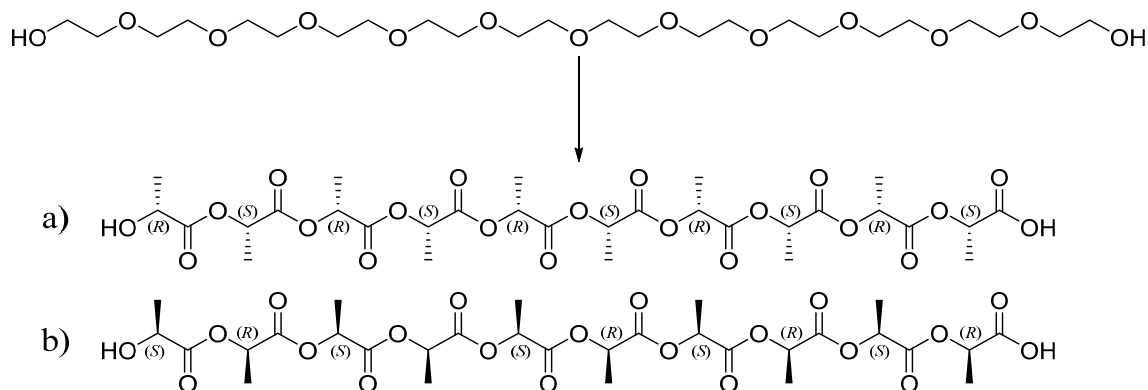
Iz proteinske baze podataka (engl. Protein Database, PDB) preuzeta je 3D struktura  $\alpha/\beta$  hidrolaze iz bakterije *Rhodopseudomonas palustris* RPA1511 s pristupnim kodom 4PSU. U kristalnoj strukturi nedostaju aminokiseline s N-kraja i C-kraja, a najbitnije nedostaju aminokiseline 84–86, a kako bi se provele simulacije molekularne dinamike, proteinska struktura mora biti cjelovita. Zbog toga je podvrgnuta homolognom modeliranju pomoću alata SWISS-MODEL<sup>42</sup> (*Expasy*). Najkvalitetnija struktura dobivena je korištenjem strukture RPA1511 kao predložak.

Struktura dobivena homolognim modeliranjem je protonirana pomoću alata MolProbity,<sup>43</sup> H++,<sup>44</sup> PROPKA 3,<sup>45</sup> dok su histidini u strukturi vizualno provjereni kako bi se u konačnici odabrala kemijski smisljena protonacija histidina. Protonacija proteina je provedena pri pH = 7,0. U strukturi je prisutan dodekaetilen-glikol (12P) koji je uklonjen, a 12P je dalje služio kao predložak za konstrukciju dekamera mliječne kiseline tj. modelnog liganda.

#### 3.5.2. Priprema strukture supstrata dekamera mliječne kiseline

S obzirom da u literaturi nema riješene kristalne strukture RPA1511 s analogom polimliječne kiseline, potrebno je konstruirati ligand za simulacije molekularne dinamike. Iz kristalne strukture  $\alpha/\beta$  hidrolaze RPA1511 iz bakterije *R. Palustris* (PDB: 4PSU) preuzete su koordinate dodekaetilen-glikola (12P) koji se nalazio u procjepu u kojem je locirano aktivno mjesto. Koordinate 12P učitane su u programu *Chem3D* te dodane su metilne skupine i karbonilne skupine (Slika 8). Stereokemija dekamera mliječne kiseline provjerena je programom *UCSF Chimera*.<sup>46</sup> Napravljena su dva *meso*-dekamera mliječne kiseline tako da jedan dekamer započinje s podjedinicom D-mliječne kiseline, a druga započinje s L-mliječnom kiselinom gledano od alkoholnog kraja. Dobiveni konstrukti korišteni su za molekularno dokiranje.





**Slika 8** Konstrukcija liganda korištenog u simulacijama molekularne dinamike. Lanac dodekaetilen-glikola preuzet je iz kristalne strukture  $\alpha/\beta$  hidrolaze RPA1511 iz bakterije *R. Palustris* (PDB: 4PSU). a) Dekamer mliječne kiseline relativne konfiguracije DL (gledano od alkoholnog kraja) te b) dekamer mliječne kiseline relativne konfiguracije LD (gledano od alkoholnog kraja). Ispod svakog asimetričnog C-atoma naznačena je i njegova apsolutna konfiguracija.

### 3.5.3. Molekularno dokiranje

Molekularno dokiranje napravljeno s dekamerom mliječne kiseline prikazanim na slici 8. pomoću programa AutoDock Vina.<sup>47</sup> Dimenzije kutije korištene za dokiranje su  $50 \text{ \AA}^3$ , a kutija je centrirana na koordinatama  $x = 19,83 \text{ \AA}$ ,  $y = 7,97 \text{ \AA}$ ,  $z = 89,85 \text{ \AA}$ . Kriterij odabira poze liganda je da sterički ne ometa OH skupinu Ser114 koji je nukelofil te da konformacija okosnice dekamera mliječne kiseline bude što bliža 12P koji se nalazio u kristalnoj strukturi RPA1511.

### 3.5.4. Simulacije molekularne dinamike

Sustavi za simulacije molekularne dinamike (MD) pripremljeni su pomoću programskog paketa AmberTools22. Parametri za ligand nisu dostupni u sklopu korištenih polja sila te ih je potrebno generirati, za to je korišten *antechamber* prema uputama priručnika Amber22. Metoda korištena za generiranje parcijalnih atomskih naboja na ligandu je AM1-BCC<sup>48</sup>, a parametri su generirani pomoću programa *parmchk2*. Polje sila korišteno za ligand je GAFF<sup>49</sup> (general Amber Force Field), za protein je korišteno polje sila ff19SB.<sup>50</sup> U simulacijama MD, korišten je eksplicitni model vode OPC koji je strogo preporučen uz polje sila ff19SB. Uz OPC model vode korišteni su parametri za ione 12-6 koji su razvili Li, Merz i suradnici.<sup>51</sup> Korišteni su periodični rubni uvjeti te za tretiranje dalekosežnih elektrostatskih interakcija korištena je metoda PME<sup>52</sup> (engl. *particle mesh Ewald*, PME) uz domet udaljenosti (engl. *cut-off*) nevezanih interakcija  $9 \text{ \AA}$ . Protein je potom otopljen u OPC modelu vode u centru krnjeg oktaedra tako da voda seže  $10 \text{ \AA}$

od površine proteina. Unutar krnjeg oktaedra su nasumično stavljene kloridni anioni kako bi se održala neutralnost sustava.

Sustavi su relaksirani uz četiri minimizacije zbog uklanjanja kontakata koji su posljedica pakiranja atoma proteina u kristalu, te zbog protonacije strukture proteina i liganda. U prvom krugu minimizacije korišten je harmonički vibracijski potencijal od  $100 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  te je primijenjen na kompleks kako bi se relaksirali kontakti između molekula vode, u drugom krugu minimizacije korišten je harmonički vibracijski potencijal od  $100 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  ali primijenjen na proteinsku okosnicu kako bi se relaksirali kontakti između aminokiselinskih ograna. U posljednja dva kruga minimizacije, harmonički vibracijski potencijal je smanjen na  $50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ , potom na  $25 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ .

Relaksirani sustav je podvrgnut termičkoj ekvilibraciji u *NVT* ansamblu, odnosno sustav je zagrijavan od 0 K do 300 K u 500 000 koraka. Na proteinsku okosnicu je primijenjen harmonički vibracijski potencijal od  $25 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ . Korišten je Langevinov termostat uz frekvenciju kolizija  $2 \text{ ps}^{-1}$ . Primijenjen je algoritam SHAKE<sup>33</sup> koji omogućuje veći vremenski korak od 1 fs, u ovom slučaju korišten je vremenski korak od 2 fs. Nakon zagrijavanja, sustav je ekvilibriran u *NPT* ansamblu narednih 500 000 koraka uz Berendsenov barostat<sup>53</sup> pri 300 K i tlaku 101 325 Pa, a harmonički vibracijski potencijal koji je bio prisutan na proteinskoj okosnici je uklonjen.

Ekvilibracije sustava i produkcijska faza MD simulacija provedene su na grafičkom procesoru uz pmemd.CUDA MD Amber20 na računalnom klasteru *Isabella*. Produkcijska faza MD simulacija provedena je u *NPT* ansamblu pri 300 K uz konstantan tlak 101 325 Pa. Tijekom produkcijske faze simulacije generirano je 150 000 struktura koje odgovaraju trajanju simulacije 300 ns.

### 3.5.5. Analize trajektorija MD simulacija

Za analizu trajektorija produkcijske faze MD simulacija korišten je *cpptraj*<sup>54</sup> unutar programskog paketa Amber20, a za vizualizaciju trajektorija VMD<sup>55</sup> (Visual Molecular Dynamics). Protein u trajektorijama MD simulacija nije centriran stoga je potrebno centrirati kompleks u krnjem oktaedru prije samih analiza.

Za analizu stabilnosti proteina tijekom simulacije najčešće se koristi RMSD (engl. *root mean square deviation*). RMSD je mjera udaljenosti atoma (najčešće atoma proteinske

okosnice) u odnosu na referentnu strukturu (najčešće struktura nakon ekvibracije, kristalna struktura ili uprosječna struktura produkcijske faze). RMSD se računa prema izrazu:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}, \quad (13)$$

gdje je  $N$  ukupni broj struktura u trajektoriji, a  $\delta_i$  razlika udaljenosti atoma dane strukture u odnosu na referentnu strukturu. RMSD je informativan alat za promatranje dinamike cijele proteinske strukture, dijelova proteina ili pojedinih atoma.

U sklopu promatranja prosječne strukture proteina koristan je RMSF (engl. *root mean square fluctuation*) koji mjeri promjenu u udaljenosti za pojedine atome, aminokiselinske ogranke ili dijelove proteina u odnosu na referentnu strukturu tijekom cijele simulacije. RMSF za odabrane atome računa se prema izrazu:

$$\text{RMSF}_i = \sqrt{\langle (x_i - \langle x_i \rangle)^2 \rangle}, \quad (14a)$$

$$B_i = \frac{8\pi}{3} \text{RMSF}_i^2 \quad (14b)$$

gdje je  $x_i$  položaj atoma  $i$ ,  $\langle x_i \rangle$  je prosječni položaj atoma cijele trajektorije. Moguće je povezati RMSF sa temperaturnim faktorom, tj. s B-faktorom (u jednadžbi označen  $B_i$ ) koji označava fluktuaciju položaja atoma zbog termalnih efekata prilikom difrakcije rendgenskog zračenja.

Kako bi se pratile konformacijske promjene tijekom simulacije, napravljena je i analiza sekundarnih struktura pomoću algoritma DSSP<sup>56</sup> (engl. *Define Secondary Structure of Proteins*). DSSP-algoritam zasniva se na računanju vodikovih veza unutar okosnice proteina na temelju elektrostatskih interakcija. Algoritam zadaje parcijalni naboj karbonilnom kisiku -0,42  $e$  te amidnom vodikom +0,20  $e$ , dok za karbonilni ugljik i amidni dušik vrijednosti su obrnute. Vodikova veza ostvarena je ako je vrijednost  $E$  manja od -0,50 kcal mol<sup>-1</sup> u jednadžbi:

$$E = 0,084 \left( \frac{1}{r_{ON}} + \frac{1}{r_{CH}} - \frac{1}{r_{OH}} - \frac{1}{r_{CN}} \right) 332 \text{ kcal/mol}, \quad (15)$$

gdje je  $r_{AB}$  udaljenost između atoma A i B, od ugljika (C) i kisika (O) iz C=O skupine te dušika (N) i vodika (H) iz N-H skupine. Na temelju toga dodjeljuje se osam sekundarnih struktura: 3<sub>10</sub> zavojnica,  $\alpha$  i  $\pi$  zavojnice, dvije  $\beta$ -ploče, okreti i varijabilne regije poput petlji.

### 3.5.6. Izračun entalpije vezanja liganda i dekompozicija doprinosa entalpije vezanja aminokiselinskih ogranaka

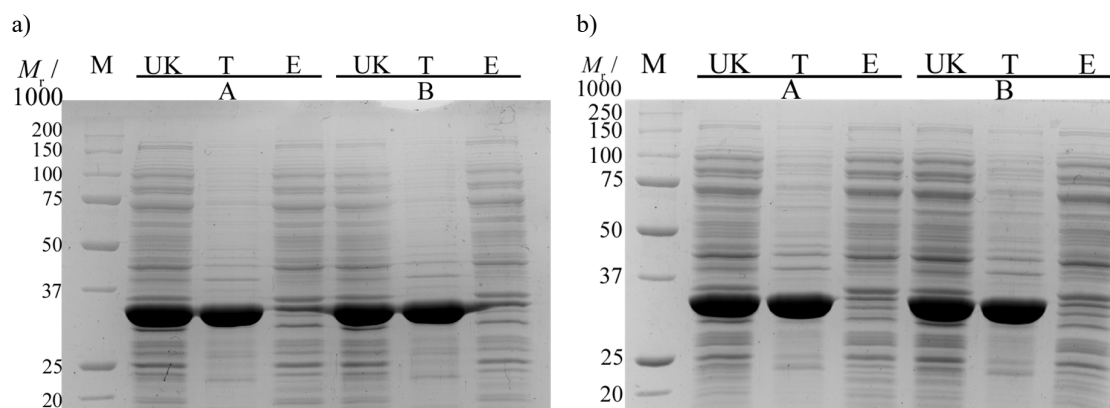
Izračun slobodne energije vezanja liganda i dekompozicije doprinosa aminokiselinskih ogranaka napravljen je pomoću MMPBSA.py unutar programskog paketa Amber20. Trajektorijima je analiziran RMSD proteinske okosnice u odnosu na referentnu strukturu dobivenom nakon ekvibracije. Dijelovi trajektorija koji ne pokazuju značajne fluktuacije RMSD vrijednosti odabrani su za analizu MMPBSA.py programom

Za izračun je korišten MM/GBSA prema uputama priručnika Amber20. Ukratko, odabrana je općenita Bornova (engl. *Generalized Born*, GB) metoda uz efektivne Bornove radijuse *mbondi2* koji su opisali A. Onufriev i sur.<sup>57</sup> uz  $igb = 5$  i koncentraciju soli  $0,150 \text{ mol dm}^{-3}$ . U svim analizama je korišteno 40 struktura od 150 000 struktura, odnosno svaka 3750 struktura produkcijske faze.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Testiranje uvjeta ekspresije hidrolaze RPA1511

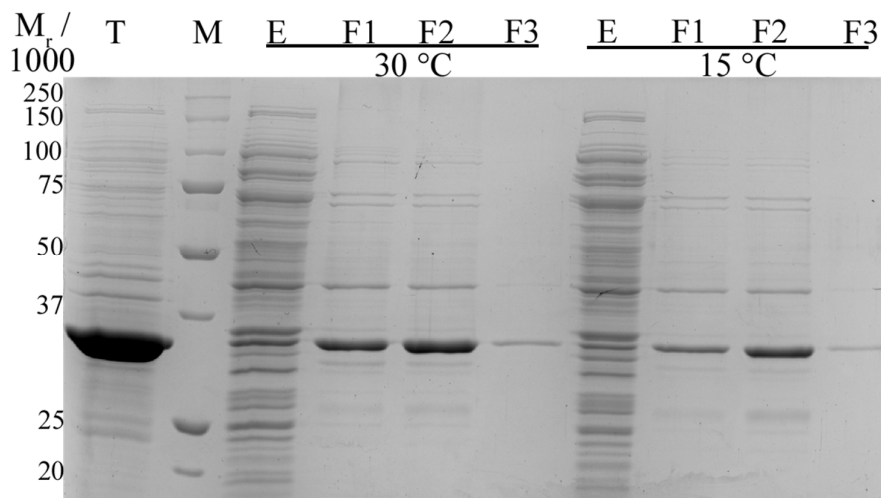
Kako bi se utvrdili optimalni uvjeti ekspresije proteina RPA1511, protein je eksprimiran u *E. coli* soja BL21(DE3) (detaljnije opisano u 3.4.1) u manjim volumenima od 40 mL pri različitim temperaturama. RPA1511 eksprimiran je pri 30 °C uz trajanje indukcije 3 h ili pri 15 °C preko noći, proteinski ekstrakti pripremljeni su lizom *BugBusterom* prema protokolu opisanom u potpoglavlju 3.4.2. Rezultati su prikazani SDS–PAGE elektroforezom (Slika 9).



**Slika 9** SDS–PAGE analiza prekomjerne ekspresije RPA1511 u dvije biološke replike pri različitim temperaturnim uvjetima: a) prekomjerna ekspresija pri 30 °C uz trajanje indukcije 3 h, b) prekomjerna ekspresija pri 15 °C preko noći. SDS–PAGE elektroforeza provedena je na 10 %-tnom poliakrilamidnom gelu pri sobnoj temperaturi. Oznake na gelovima: M – marker proteina poznatih molekulskih masa s naznačenim masama (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (*BioRad*)); UK – ukupne stanice, tj. smjesa staničnog ekstrakta i ostatka stanica dobivenih lizom *BugBusterom*; T – talog ostatka stanica; E – stanični ekstrakt; A i B – biološke replike.

Iz prikazanoga vidljivo je da RPA1511 pri danim uvjetima tvori inkluzijska tijela – netopivi agregati dobiveni asocijacijom hidrofobnih regija prekomjerno eksprimiranog proteina zbog nepravilnog smatanja. Pojava inkluzijskih tijela nerijetka je pojava prilikom heterologne ekspresije u *E. coli*, koja se pripisuje neadekvatnim staničnim uvjetima u kojima se heterologno ekspimirani protein nalazi. S obzirom da je količina nanesenog proteina prevelika kao što je vidljivo na slici 9a) u liniji T biološke replike B zbog čega se ne može pouzdano utvrditi dolazi li do nastajanja veće količine topivog rekombinantnog proteina, provedeno je pročišćavanje na

Ni-NTA agarozni prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.3. Rezultati pročišćavanja prikazani su na slici 10.



**Slika 10** SDS-PAGE analiza pročišćavanja afinitenom kromatografijom na Ni-NTA agarozni prekomjerno eksprimiranog proteina RPA1511 iz bakterije *E. coli* soja BL21(DE3) pri temperaturama indukcije ekspresije od 30°C i 15 °C. SDS-PAGE elektroforeza provedena je na 10 %-tnom poliakrilamidnom gelu i pri sobnoj temperaturi. Oznake na gelu: T – talog ostatka stanica; M – marker proteina poznatih molekulskih masa s naznačenim masama (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (*Bio-Rad*); E – stanični ekstrakt; F 1–3 – eluirane frakcije.

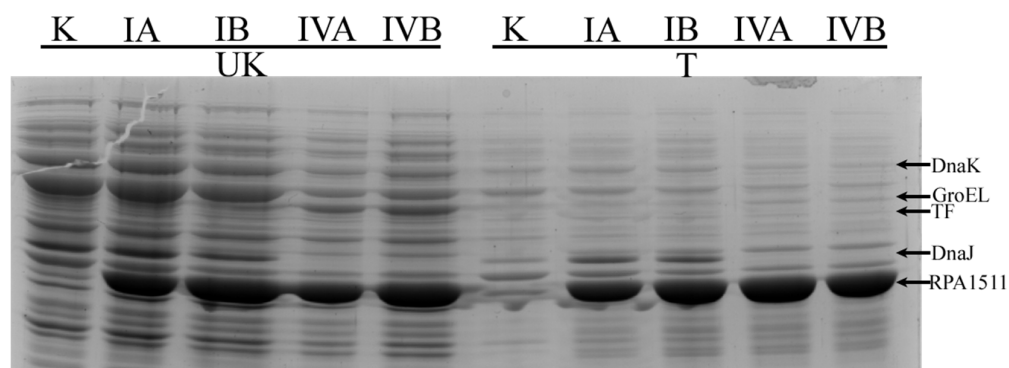
Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da nema znatne razlike između provođenja prekomjerne ekspresije pri 30 °C i pri 15 °C.

Osim temperature, jedan od bitnih utjecaja na topivost proteina je pufer u kojem se protein nalazi. Iako su uvjeti lize *BugBustera* uglavnom blaži od ostalih metoda razbijanja stanica (primjerice sonikacije), nedostatak *BugBustera* je što nije poznat točan sastav pufera. Kako bi se utvrdio utjecaj pufera, ponovljen je postupak prekomjerne ekspresije pri 30 °C popraćen razbijanjem stanica sonikacijom u puferu A čiji je sastav opisan u poglavlju 3.4.2, nakon čega su proteinski ekstrakti nanoseni na Ni-NTA kolone i pročišćeni na prethodno opisani način. Nije primijećena razlika u količini topivog prekomjerno eksprimiranog proteina.

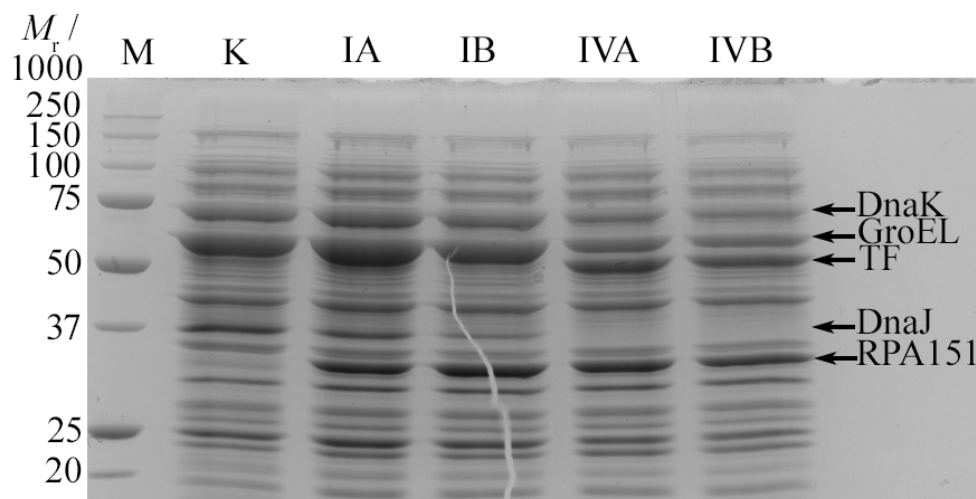
Naposljetku, RPA1511 eksprimirana je uz šaperone – proteini koji sudjeluju u smatanju proteina. Prvotno su stanice koje sadrže plazmid za ekspresiju RPA1511 kontrtransformirane odgovarajućim plazmidom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2, nakon toga su se eksprimirale dodatkom odgovarajućeg induktora. Induktor za prekomjernu ekspresiju

RPA1511 je IPTG, dok za prekomjernu ekspresiju šaperona DnaK, DnaJ i GrpE u plazmidu pG-KJE8 je L-arabinoza, a tetraciklin za ekspresiju šaperona GroEL/GroES i TF (engl. *trigger factor*). Stanice su potom obrađene kako je opisano u 3.4.2. Rezultati su prikazani na slici 11.

a)



b)



**Slika 11** SDS-PAGE analiza koekspresije RPA1511 u bakteriji *E. coli* soja BL21(DE3) uz šaperone. SDS-PAGE elektroforeza je napravljena na 10 %-nom poliakrilamidnom gelu na sobnoj temperaturi. Oznake na gelu: K – kontrola, bez ekspresije RPA1511, A i B su biološke replike. I označava koekspresiju šaperona DnaK, DnaJ, grpE i GroEL/GroES, dok IV označava koekspresiju uz šaperone GroEL/GroES i TF (engl. *trigger factor*); a) UK – ukupne stanice tj. stanični ekstrakt i ostatak stanica nakon lize *BugBusterom*; T – talog ostatka stanica b) Stanični ekstrakt. Između ekspresija sa skupom šaperona I i IV nema razlike. M – marker proteina poznatih molekularskih masa s naznačenim masama (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (*BioRad*), njegova uloga je orijentacijska kako bi se pronašla pruga koja odgovara RPA1511.

Analogno prethodno dobivenim rezultatima ekspresije pri različitim temperaturama i puferkim uvjetima, većina prekomjerno enzima RPA1511 zaostaje u ostatku stanica, odnosno dolazi do stvaranja inkluzijskih tijela (Slika 11a). Nadalje, ne uočava se razlika prekomjerne ekspresije RPA1511 sa šaperonima DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL, GroES ili GroEL, GroES i TF što se očituje prugama istog intenziteta (Slika 11b, strelicom naznačen RPA1511).

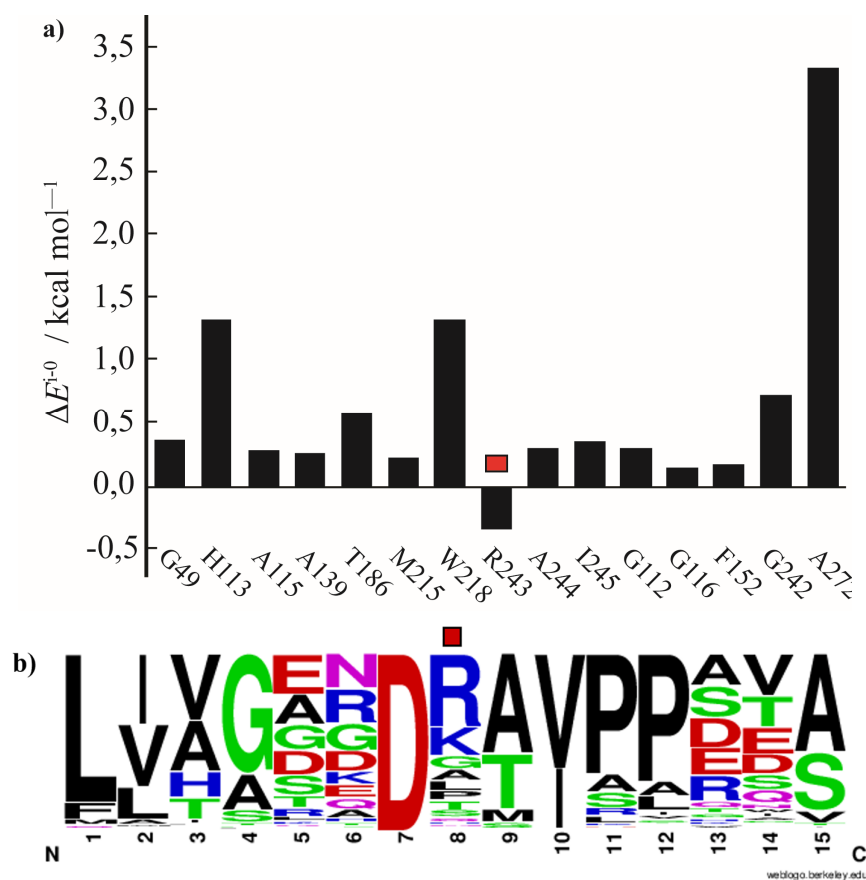
Svrha pokušaja optimizacije uvjeta ekspresija bila je povećanje iskorištenja prekomjerne ekspresije RPA1511 jer navedeni uvjeti daju nedovoljnu količinu proteina za testove aktivnosti hidrolize koje je potrebno izvesti.

Prema navedenim saznanjima, temperatura indukcije prekomjerne indukcije (30 °C i 15 °C), utjecaj puferskog sastava (liza stanica *BugBusterom* ili sonikacijom), te Naposljetku koekspresija sa šaperonima nemaju utjecaj na povećanje topljivosti prekomjerne ekspresije RPA1511. Na temelju toga da se zaključiti da stanični uvjeti *E. coli* nisu pogodni za heterolognu ekspresiju proteina RPA1511.



## 4.2. Konstrukcija mutirane inačice hidrolaze RPA1511

Motivacija iza uvođenja mutacije R243K hidrolaze RPA1511 potaknuta je kvantno–mehaničkim izračunima enzima RPA1511 u reakciji s dimernom, trimernom te tetramernom mliječnom kiselinom (Slika 12a).<sup>6</sup> Autori sugeriraju negativni katalitički efekt aminokiseline Arg243. U svrhu odabira konkretne mutacije, provedeno je sravnavanje proteinskih sljedova iz baze podataka NCBI pri čemu je dobiven WebLogo (Slika 12b). Zamijećena je učestalost pojave lizina na položaju 243. Nadalje, korištenjem servera *MutCompute*, server koji pomoću neuralne mreže predlaže mutaciju na temelju kristalne strukture proteina, također je predložena mutacija Arg243Lys.<sup>5</sup> Kako bi se validirali literaturni podaci dobiveni kvantno–mehaničkim izračunima, te konstruirao mutant sa potencijalno većom katalitičkom aktivnosti, provedena je kružna mutageneza prema postupku opisanom u 3.3.2.



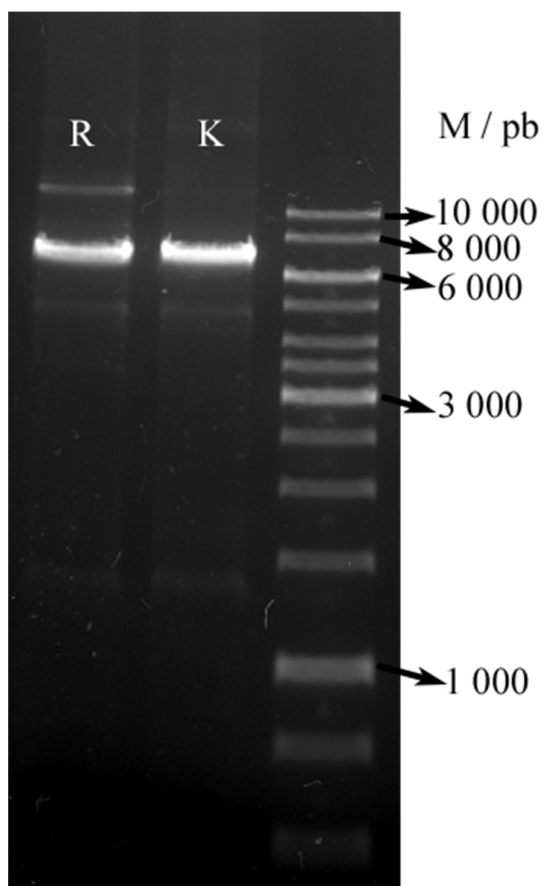
**Slika 12** a) Elektrostatski utjecaj pojedine aminokiseline prilikom hidrolize dimera mliječne kiseline hidrolazom RPA1511, dobiveno kvantno–mehaničkim izračunima, preuzeto i preuređeno iz ref. 6. b) WebLogo dobiven poravnavanjem više aminokiselinskih sljedova iz NCBI baze podataka. Crveni kvadratić odgovara predloženim aminokiselinama koje se mogu naći na poziciji R234 u b).

Nakon izvedene ciljane mutageneze, pročišćena je reakcijska smjesa (**R**) koja sadrži sve komponentne potrebne za cirkularizaciju DNA. U kontrolnoj (**K**) reakcijskoj smjesi koja je provjerila uspješnost cirkularizacije DNA, izostavljeni su enzimi DNA-kinaza i DNA-ligaza. DNA-kinaza fosforilira 5' kraj DNA, nakon čega DNA-ligaza provodi reakciju ligacije između fosforiliranog 5' kraja DNA i pripadnog alkoholnog 3' kraja DNA.

Izostavljanjem DNA-ligaze i DNA-kinaze ne dolazi do cirkularizacije umnožene DNA, što se provjerava agaroznom gel-elektrofozom. Poznato je da agaroznom gel-elektroforezom možemo razlikovati kružnu DNA od linearne DNA temeljem njihove različite pokretljivosti u agaroznom gelu prilikom primjene električnog polja. Prema slici 13 u liniji **R** iznad intenzivne pruge pri 8 000 parova baza vidljiva je pruga slabog intenziteta koja odgovara cirkulariziranoj DNA. S druge strane, u liniji **K** prethodno navedena pruga nije vidljiva što ukazuje da u kontroli nije došlo do cirkularizacije DNA.

Nadalje, kako bi dodatno provjerila uspješnost cirkularizacije DNA, elektroporirane su stanice *E. coli* s DNA iz pročišćenih reakcijskih smjesa **R** i **K**. U oba slučaja, umnožena DNA PCR-om u **R** i **K** sadrži gen za rezistenciju na antibiotik, no samo stanice sa uspješno cirkulariziranom DNA mogu rasti na agaroznoj ploči s antibiotikom. Što uistinu je bio slučaj, na ploči gdje je uspješno provedena fosforilacija i ligacija zamijećene su kolonije *E. coli*, dok u kontrolnoj reakciji nije bila niti jedna kolonija *E. coli*. (Rezultati nisu prikazani)

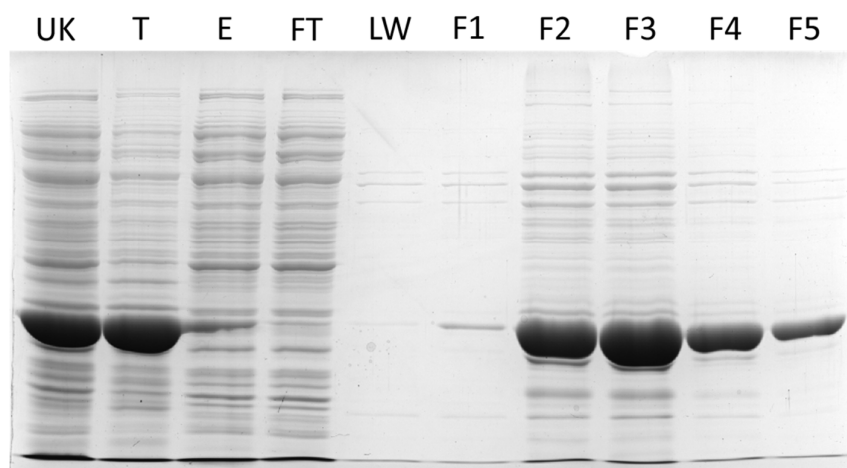
Navedene kontrole ispituju uspješnost reakcije fosforilacije i ligacije, no ne provjerava uspješnost uvođenja mutacije u plazmidnu DNA. Stoga, pripremljena je prekonocna kultura stanica s uspješno provedenom reakcijom fosforilacijom i ligacijom. Izolirana je DNA kako je opisano u potpoglavlju 3.3.1, te je plazmidna DNA poslana na sekvenciranje. Analizom sekvenciranja potvrđena je prisutnost mutacije u ciljanom slijedu plazmidne DNA.



**Slika 13** Analiza pročišćenih PCR produkata nakon fosforilacije i ligacije DNA-kinazom i DNA-ligazom. Pruga iznad 10 000 parova baza odgovara plazmidu s uspješnom reakcijom ligacije (linija **R**), za razliku od kontrole u kojoj je ta pruga odsutna (linija **K**). Agarozna-gel elektroforeza napravljena je na 1 %-tnom agaroznom gelu pri 25 °C. Oznake na gelu: R – reakcija fosforilacije i ligacije DNA kinazom i DNA ligazom; K – kontrola, bez dodatka DNA-kinaze i DNA-ligaze; M – marker molekulskih masa (1 kb DNA Ladder (*NEB*)).

### 4.3. Pročišćavanje RPA1511 i njene mutirane inačice

Veliki uzgoj enzima RPA1511 i mutirane inačice RPA1511\_R243K napravljen je iz 800 mL LB medija. Ekspresija je inducirana pri 15°C i ostavljena preko noći, nakon čega su stanice centrifugirane i razbijene soniciranjem u puferu A. Dobiveni ekstrakt nanesen je na Ni-NTA kolonu te enzim je pročišćen prema prethodno opisanom postupku 3.4.3. Analiza pročišćavanja napravljena je uz pomoć SDS-PAGE kromatografije, a frakcije koje su imale najdeblje pruge, linije F2–F4, na gelu su iskorištene za ugušćivanje (Slika 14)



**Slika 14** SDS-PAGE analiza pročišćavanja velikog uzgoja RPA1511 iz bakterije *E. coli* soja BL21(DE3) pri temperaturi indukcije ekspresije 15 °C. SDS-PAGE elektroforeza provedena je na 10 %-tnom poliakrilamidnom gelu i pri sobnoj temperaturi. Oznake na gelu: UK – ukupne stanice tj. stanični ekstrakt i ostaci stanica nakon sonicacije, T – ostaci stanica, E – stanični ekstrakt, FT – nevezana frakcija, LW – zadnje ispiranje prije elucije, F1–5 eluirane frakcije.

Ugušćivanje je napravljeno kako je opisano u potpoglavlju 3.4.5. Koncentracija enzima izmjerena je spektrofotometrom NanoDrop One (*ThermoFischer Scientific*) pri valnoj duljini  $\lambda = 280$  nm, ekstinkcijskom molarnom faktoru  $\epsilon = 40\,450 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ , i relativnoj molekularnoj masi  $M_r = 34\,410$ . Iz 800 mL hranjivog medija dobiveno je približno 1,2 mg enzima divljeg tipa, dok je dobiveno približno 1,1 mg enzima mutirane inačice. Ove količine su iznimno male, a razlog tome jest stvaranje inkluzijskih tijela, pri čemu nastaje vrlo malo topivog proteina prilikom prekomjerne ekspresije. Za usporedbu, prekomjerna ekspresija topivih proteina kojima je optimiran postupak prekomjerne ekspresije moguće je dobiti 17–34 mg prekomjerno ekspimiranog proteina iz 50 mL hranjivog medija.<sup>58</sup>

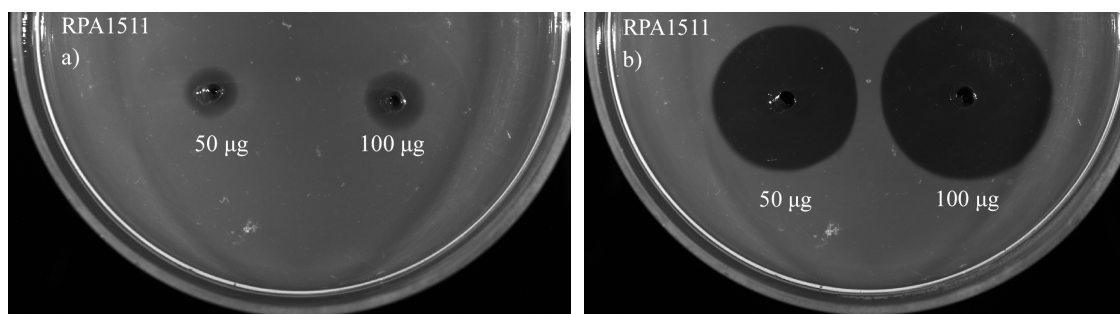
Dobivene količine enzima nedovoljne su za daljnja biokemijska mjerenja poput izotermalne titracijske kalorimetrije koje zahtijevaju daleko veće mase za pouzdana mjerenja. Osim što je dobivena mala količina enzima, enzimi su neočišćeni što je vidljivo prema pojavi mnoštva pruga eluirane frakcije F2 (Slika 14). Iako se radi o onečišćenim, nečistoće u ovom slučaju nisu presudne za mjerenje aktivnosti hidrolize PLA kiseline jer ostali enzimi ne posjeduju katalitičku aktivnost prema PLA. S druge strane, za provedbu biokemijskih i biofizičkih testova koji su osjetljivi na čistoću proteina, potrebno je provesti daljnja pročišćavanja poput isključne kromatografije prema veličini. Proteini koji su adekvatno pročišćeni mogu se koristiti za kokristalizacijske testove, mjerenja cirkularnog dikroizma i slično.

Enzimi su pohranjeni u puferu za pohranu sastava: EDTA  $c = 5 \text{ mol dm}^{-3}$ , KCl  $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ , Hepes  $c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ , DTT  $c = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$  i glicerol  $\varphi = 20 \%$ .

#### 4.4. Testovi hidrolitičke aktivnosti enzima RPA1511 i njene mutirane inačice na uklopljenoj suspenziji polimljične kiseline u agarozu

U vidu procjene hidrolitičke aktivnosti RPA1511 i njene mutirane inačice, provedeni su testovi na uklopljenoj suspenziji polimljične kiseline u agarozu. Postupak pripreme agaroznih ploča opisan je u potpoglavlju 3.4.7.

U agaroznoj suspenziji napravljene su jažice promjera nastavka za pipetu od 1 mL (približno 3 mm), a u svaku jažicu je dodano od 50 do 100  $\mu\text{g}$  enzima. Ploče su inkubirane pri 30 °C nekoliko dana (Slika 15).

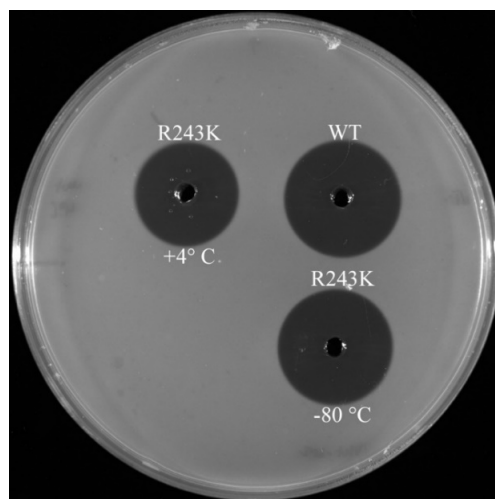


**Slika 15** Test aktivnosti hidrolize uklopljene suspenzije polimljične kiseline u agaroznom gelu. **a)** je agarozna ploča nakon 1 dana inkubiranja pri 30 °C, dok je **b)** agarozna ploča nakon 6 dana inkubiranja pri 30 °C.

Vidljivo da je hidroliza polimljične kiseline spora, te je potrebno nekoliko dana kako bi došlo do hidrolize  $\sim 1 \text{ cm}$  od jažice. Ovo je u skladu s literaturnim podacima<sup>59</sup> koji su ukazuju na

sporoš hidrolize enzimima. Primjerice, proteinaza K, referentna hidrolaza prilikom mjerenja aktivnosti prema PLA, ima maksimalnu brzinu reakcije  $0,03 \text{ mg min}^{-1}$  prema PLLA mjerenu u uvjetima ustaljenog stanja. Još jedan od razloga zašto je proces hidrolize spor je vrijeme potrebno za difuziju enzima u uklopljenu suspenziju polimljične kiseline u agarozu.

Na agaroznoj suspenziji PLA provjeren je utjecaj smrzavanja enzima u svrhe dugotrajne pohrane pri  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . To je provedeno tako da je mala količina enzima zamrznuta na  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ , zatim odmrznuto potom je odmrznuta otopina stavljena u jažicu (Slika 14, R243K pri  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Pomoću ovog utvrđuje se dolazi li do smanjenja hidrolitičke aktivnosti nakon zamrzavanja. Motivacija iza ovog je jer neki enzimi (poput alkohol-dehidrogenaze iz gljivice *Saccharomyces cerevisiae*) gube aktivnost nakon skladištenja pri  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Izuzev testa aktivnosti prilikom zamrzavanja na  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ , testirana je hidrolitička aktivnost RPA1511 i mutirane inačice prema uklopljenoj suspenziji PLA u agaru. Usporedbom promjera prozirnosti (Slika 16) između RPA1511 i mutirane inačice, vidljivo je da nema velike razlike u njihovim promjerima. To opažanje upućuje da nema razlike u brzini razgradnje polimljične kiseline u ovom testu. No kako se radi o kvalitativnom testu, nije moguće u potpunosti otpisati mogućnost da mutirana inačica posjeduje veću brzinu hidrolize prema polimljičnoj kiselinu.



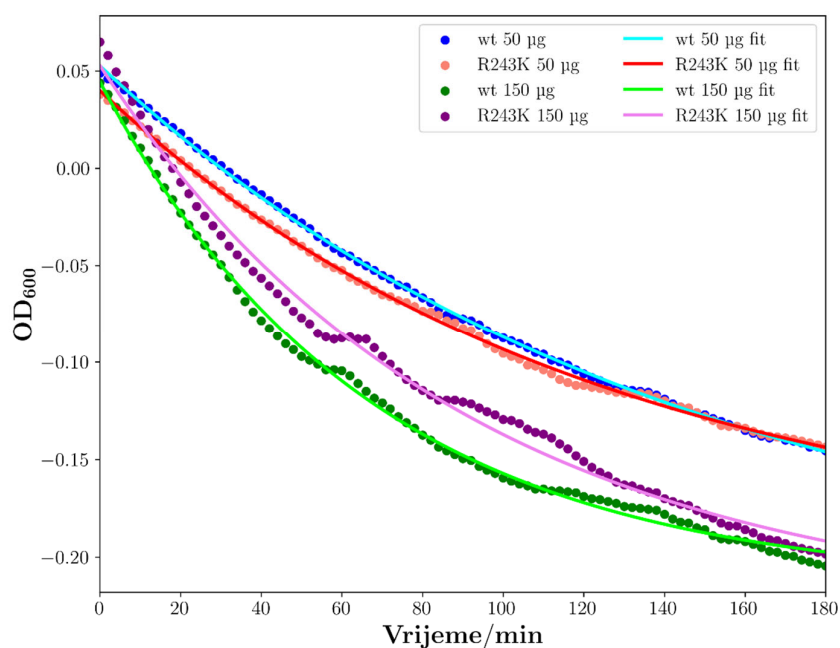
**Slika 16** Test aktivnosti hidrolize enzima RPA1511 i mutirane inačice R243K na uklopljenoj suspenziji polimljične kiseline u agaroznom gelu. Uspoređena je aktivnost mutirane inačice pri pohrani na  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Oznaka WT označava divlji tip enzima RPA1511 (engl. *wild type*)

#### 4.5. Turbidimetrijski testovi aktivnosti RPA1511 i mutirane inačice RPA1511\_R243K

Testovi hidrolitičke aktivnosti enzima na uklopljenoj suspenziji polimljične kiseline u agarozu nedostatni su zbog limitirajućeg faktora difuzije enzima u agarozu, i vremena potrebnog (nekoliko dana) za hidrolizu. Kako bi se pratila hidroliza na kraćoj vremenskoj skali, provedeno je turbidimetrijsko praćenje hidrolize suspendirane polimljične kiseline u otopini. Izuzev kraćeg vremena potrebnog za hidrolizu, ovom metodom može se kvantificirati aktivnost enzima RPA1511 i njene mutirane inačice RPA1511\_R243K.

U svaku jažicu dodana je suspenzija polimljične kiseline tako da joj je konačni  $OD_{600}$  približno jednak vrijednosti 1,0. U dvije jažice stavljena je samo suspenzija PLA s puferom Tris konačne koncentracije  $60 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Korišteno je 50 i 150  $\mu\text{g}$  enzima divljeg tipa i mutirane inačice R243K. Mjeren je  $OD_{600}$  i slijepe probe, suspenzija polimljične kiseline u puferu. Prilikom obrade rezultata, oduzeta je slijepa proba od mjerenja (Slika 17). Funkcija korištena za interpolaciju je  $a\exp(-bx) + c$ .



Slika 17 Turbidimetrijsko mjerenje aktivnosti enzima RPA1511 (označen wt) i njene mutirane inačice RPA1511\_R243K (označen R243K). Funkcija korištena za interpolaciju je  $a\exp(-bx)+c$  koja je prikazana punom linijom, dok točke označuju mjerenja.

Hidrolitička aktivnosti divljeg tipa RPA1511 i mutirane inačice RPA1511\_R243K gotovo su iste što se očituje sličnim interpolacijskim faktorima  $b$  naznačeni u tablici 3. Kako bi validirali dobivene faktore, eksperiment je ponovljen u triplikatu, no nažalost interpolacijski faktori se razlikuju podosta između mjerenja što je posljedica nereproducibilnost ovog testa aktivnosti. Jedan od razloga može biti u samoj pripremi suspenzije PLA čija kvaliteta ovisi o sonikaciji otopljene PLA u diklormetanu i puferu, uparavanju diklormetana te stabilnosti PLA tijekom duljeg vremenskog perioda (nekoliko dana). Osim toga, s obzirom da se mjeri OD<sub>600</sub>, a čestice polimljične kiseline postaju sve manje i manje, nije poznato dolazi li do agregiranja nastalih oligomera u otopini, te nije poznato što se događa prilikom raspršenja svjetlosti pri  $\lambda = 600$  nm. Zbog toga, bilo bi poželjno izmjeriti indeks polidisperznosti statičkim raspršenjem svjetlosti prije i nakon turbidimetrijskog mjerenja kako bi se utvrdila raspodjela veličine čestica te detaljnije istražilo do kakvih točno promjena čestica polimljične kiseline dolazi uslijed hidrolize.

Iako nema razlike u brzini hidrolize između RPA1511 i mutirane inačice RPA1511\_R243K (OD<sub>600</sub> vrijednosti pri 180 min na slici 17), rezultati impliciraju drugi zanimljiv zaključak, odnosno da linearnim povećanjem koncentracije enzima ne dolazi do linearnog povećanja brzine hidrolize polimljične kiseline. To opažanje implicira da brzina hidrolize ovisi o dostupnoj površini supstrata na kojeg se enzim može vezati. Bilo bi poželjno opisati afinitet enzima RPA1511 i njene mutirane inačice prema polimljičnoj kiselini, što se u trenutnom stadiju istraživanja pokazuje izazovno. Jedan od načina koji bi mogao procijeniti afinitet vezanja polimljične kiseline je konstrukcija oligomera te mjeriti afinitet katalitički neaktivnog enzima prema oligomeru.

U tablici 3. navedeni su interpolacijski faktori dobiveni na temelju eksperimentalnog mjerenja optičke gustoće. Faktor  $a$  označava amplitudu te  $b$  može se poistovjetiti sa brzinom razgradnje kinetike prvog reda, dok faktor  $c$  je horizontalna asimptota pri beskonačnom vremenu. Faktor  $c$  najmanjeg je fizikalnog značenja, dok faktor  $b$  daje uvid u brzinu razgradnje PLA hidrolazama RPA1511 i njene mutirane inačice. Prema tome, dobiveni faktori  $b$  su vrlo niski (red veličine  $10^{-3}$ ) što ukazuje na sporost hidrolize PLA.



**Tablica 3** Izračunani faktori dobiveni interpolacijom podataka turbidimetrijskog mjerenja razgradnje polimljične kiseline RPA1511 i njenom mutiranom inačicom RPA1511\_R243K na eksponencijalnu funkciju  $a\exp(-bx) + c$ .

	<b>a</b>	<b>b / min<sup>-1</sup></b>	<b>- c</b>
wt 50 µg	0,277	$6,98 \cdot 10^{-3}$	0,225
wt 150 µg	0,259	$15,0 \cdot 10^{-3}$	0,214
R243K 50 µg	0,238	$8,21 \cdot 10^{-3}$	0,197
R243K 150 µg	0,282	$11,1 \cdot 10^{-3}$	0,229

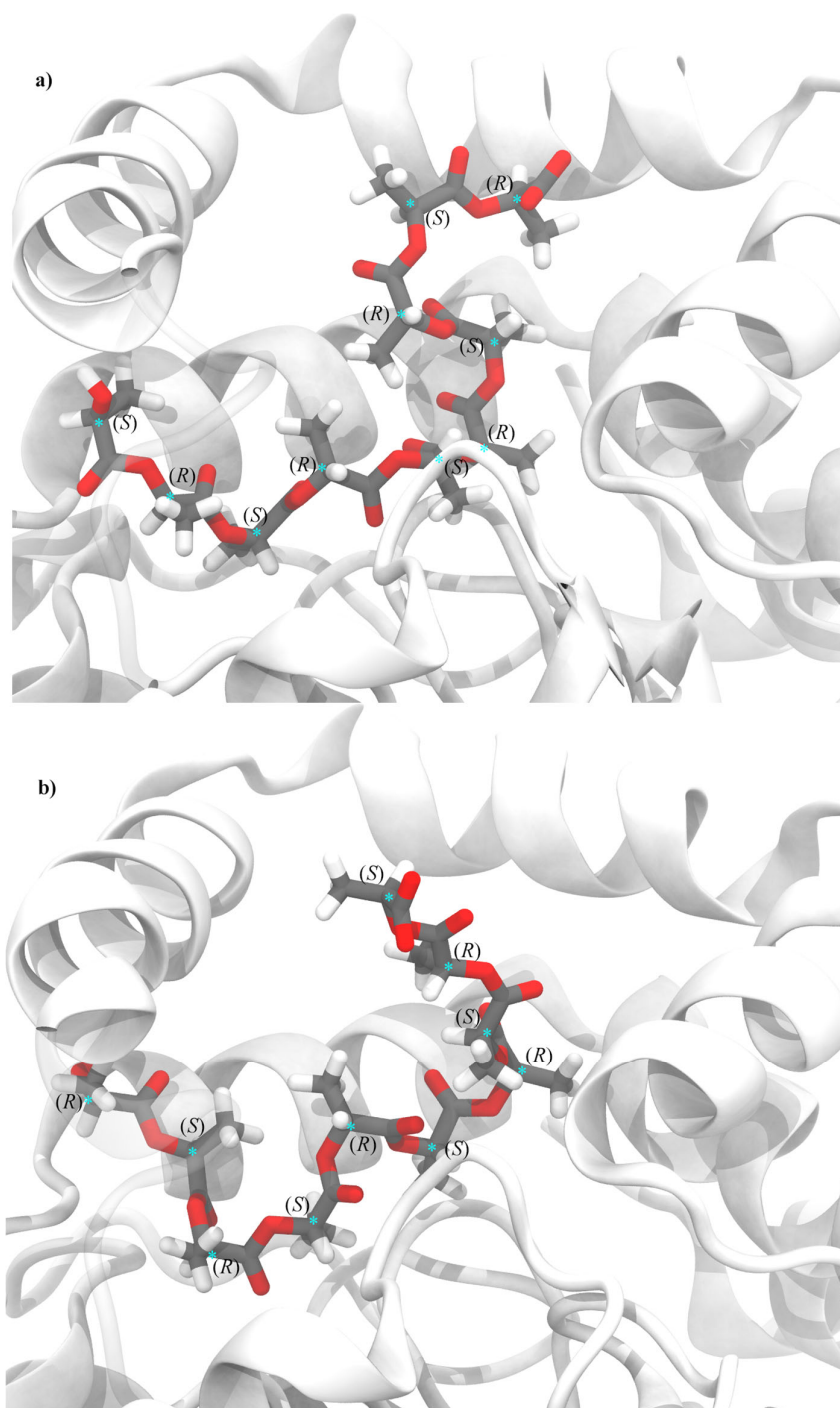
#### 4.6. Računalne simulacije molekularne dinamike

Početna struktura uzeta za pripremu sustava je preuzeta iz PDB baze podataka (*engl.* Protein Data Bank, PDB) s pristupnim kodom 4PSU. U procjepu proteina nalazio se koprecipitant polietilenglikol čije su koordinate preuzete i modificirane u dekamer mliječne kiseline odgovarajućih stereoizomera. Napravljeni su dekameri mliječne kiseline (LDLA)<sub>10</sub>, (DLLA)<sub>10</sub> (dalje u tekstu PLA LD i PLA DL tim slijedom) koji su zatim uklopljeni u kristalnu strukturu 4PSU (Slika 18). U slučaju apo sustava, izbrisane su koordinate koprecipitanta PEG-a, a koordinate proteina sačuvane. Naposljetku, dobiveno je pet sustava koji su simulirani molekularnom dinamikom:

- Apo sustav,
- WT + (DLLA)<sub>10</sub> = PLA DL,
- WT + (LDLA)<sub>10</sub> = PLA LD,
- Mut + (DLLA)<sub>10</sub> = R243K PLA DL,
- Mut + (LDLA)<sub>10</sub> = R243K PLA LD.

Svaki sustav je simuliran u triplikatu, sveukupnog trajanja simulacija 4,5 ms. U pravilu je bolje simulirati više replika nego imati jednu dugu simulaciju jer ponekad sustav može upasti u lokalni minimum iz kojeg ne može izaći, te na temelju tih simulacija moguće je doći do pogrešnih zaključaka.<sup>60</sup>

Prilikom analiza sustava korišten je izračun RMSD-a kojim dolazimo do informacije o stabilnosti te potencijalnih konformacijskih promjena samog sustava tijekom trajektorije simulacije. RMSD uzima koordinate atoma proteinske okosnice (C, C<sub>α</sub>, N) svake strukture tijekom trajektorije u odnosu na koordinate referentne strukture, u ovom slučaju referentna struktura je struktura nakon ekvibracije. Dodatno, izračunan je RMSD atoma dekamera mliječne kiseline izuzev vodikovih atoma (Tablica 4).



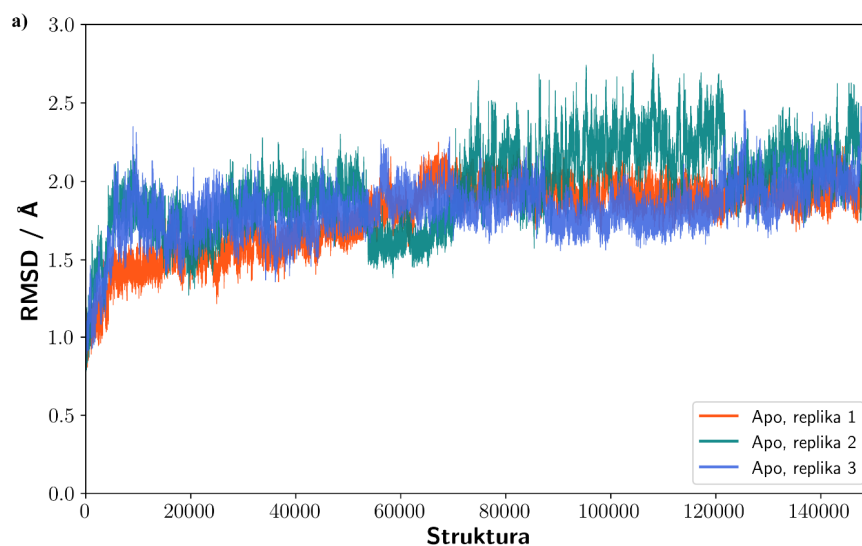
**Slika 18** Strukture dobivene nakon ekvibracije sustava prilikom vezanja dekamera mliječne kiseline hidrolaze RPA1511. **a)** PLA LD sustav s vezanim dekamerom mliječne kiseline LD konfiguracije. **b)** PLA DL sustav s vezanim dekamerom mliječne kiseline DL konfiguracije. Zvezdice plave boje označavaju asimetrično supstituiran ugljikov atom pored kojeg je napisana apsolutna konfiguracija.

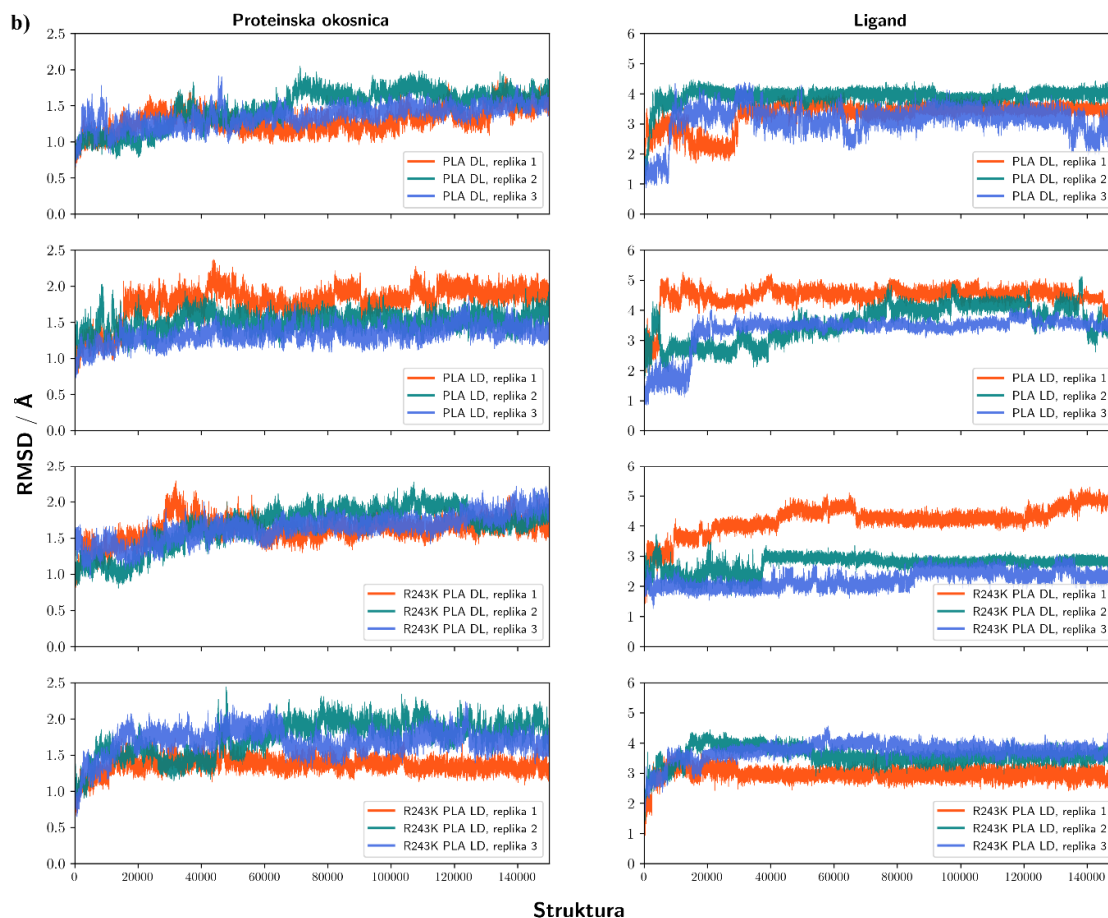
**Tablica 4** RMSD vrijednosti proteinske okosnice (atomi C, CA, N) u odnosu na ekvilibriranu strukturu za simulirane sustave i njihove standardne pogreške srednje vrijednosti (engl. *standard error of mean*, SE).

Sustavi	RMSD $\pm$ SE <sup>1</sup> / Å
Apo	1,85 $\pm$ 0,04
PLA DL	1,37 $\pm$ 0,04
PLA LD	1,5 $\pm$ 0,1
R243K PLA DL	1,64 $\pm$ 0,09
R243K PLA LD	1,6 $\pm$ 0,1

<sup>1</sup> SE je računan prema jednadžbi  $SE = STD / \sqrt{N}$ , gdje je STD standardna devijacija uzorka, a N je veličina uzorka, N = 3. Broj uzoraka nije dovoljno velik kako bi rezultati bili statistički značajni.

Sustavi su stabilni što se očituje iz malih SE vrijednosti što je slušaj za apo, PLA DL i R243K PLA DL sustave. Apo sustav ima najveću prosječnu RMSD vrijednost što je očekivano s obzirom da nema vezanog liganda što rezultira većom konformacijskom slobodom proteina, a samim time poprima veće RMSD vrijednosti. Prikazom RMSD za cijelu trajektoriju (Slika 19a) vidljivo je da RMSD apo sustava fluktuiraju, no to se objašnjava termalnim fluktuacijama. U drugu ruku, sustavi s dekamerom mliječne kiseline imaju nešto niže RMSD vrijednosti, gdje PLA DL sustav ima najnižu RMSD vrijednost proteinske okosnice ( $1,37 \pm 0,04$ ) Å. U sustavu PLA DL, ovisno o danoj replici, dekamer mliječne kiseline pokazuje različite fluktuacije RMSD vrijednosti (Slika 19b, prvi redak, drugi stupac), a najveće promjene vidljive su u replici 1 i 3.



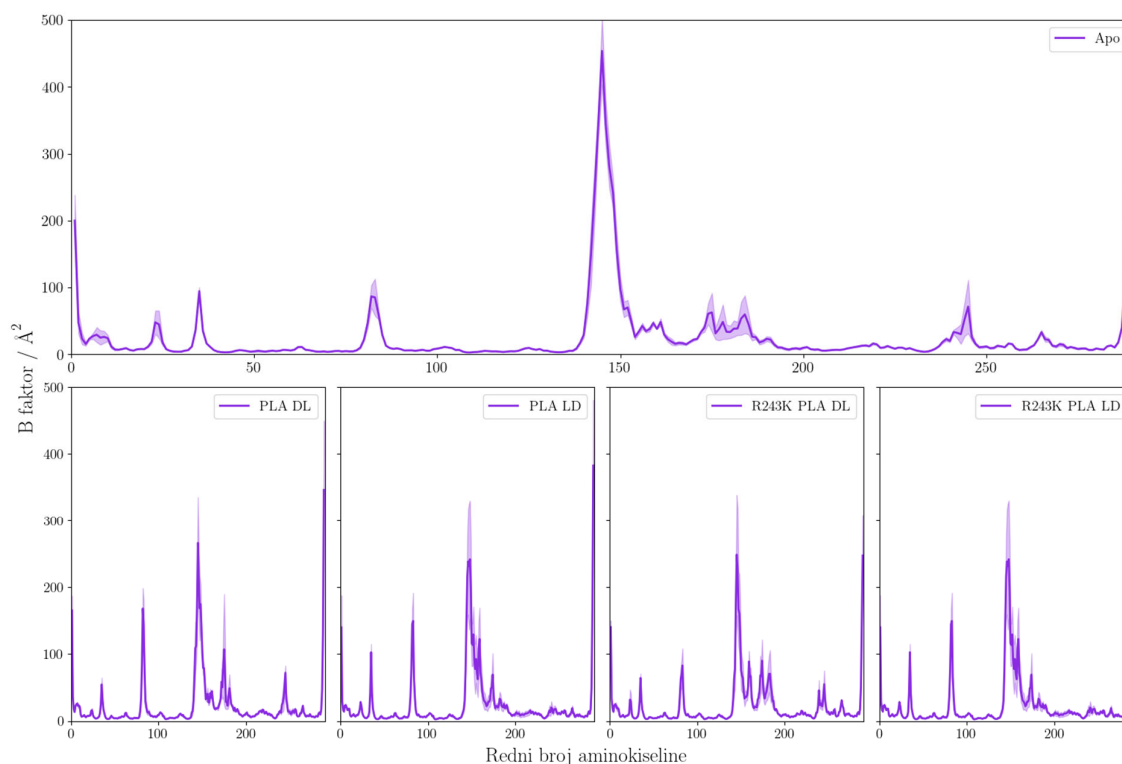


**Slika 19** RMSD analiza. **a)** Apo sustav, pri čemu je RMSD izračunat odnosu na ekvilibriranu strukturu, RMSD proteinske okosnice računat prema C, CA, N atomima. **b)** RMSD računat u odnosu na ekvilibriranu strukturu. RMSD analiza proteinske okosnice i uklopljenog dekamera mliječne kiseline. RMSD proteinske okosnice: C, CA, N; ligand: svi atomi izuzev vodika.

RMSD liganda je veći od RMSD proteinske okosnice što je očekivano obzirom da ima daleko veću konformacijsku slobodu smješten u procjepu proteina nego što ima okosnica proteina. RMSD liganda varira od sustava do sustava, a u samim sustavima, varira od replike do replike. Primjerice u sustavu R243K PLA LD, RMSD vrijednosti liganda kreću se 3–4 Å za cijelu trajektoriju za sve replike, dok u sustavu PLA LD, RMSD vrijednosti kreću se od 1,5 do 5 Å u početku simulacije, no završavaju oko 3,5 Å krajem simulacije.

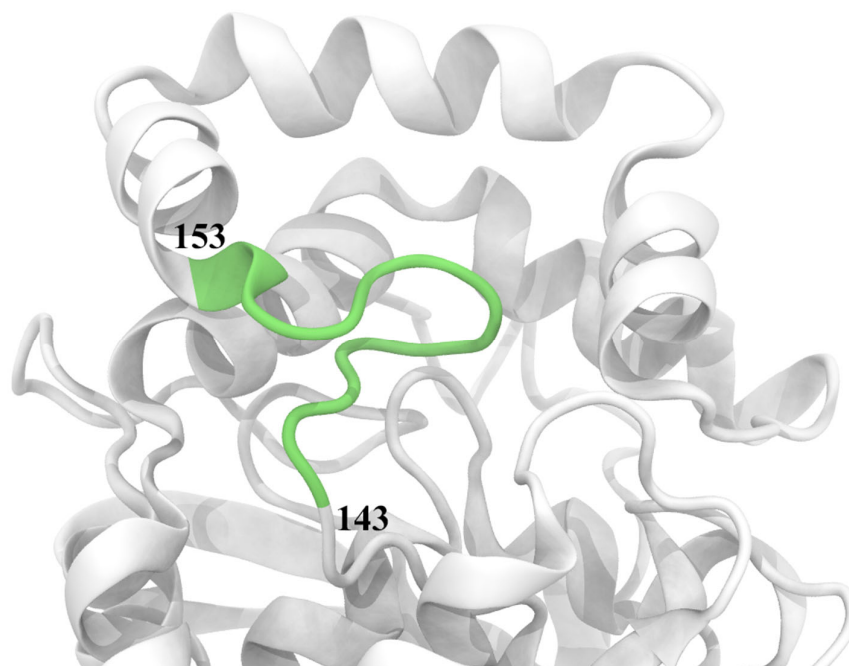
Izuzev RMSD analize, kako bi se vidjele fluktuacije aminokiselinskih ogranka tijekom cijele simulacije, napravljen je izračun B–faktora (Slika 20). Ova analiza uzima koordinate svakog atoma, izuzev vodika, bočnog ogranka i uprosječuje ju u odnosu na referentnu strukturu

tijekom cijele trajektorije. Referentna struktura u analizi B-faktora je prosječna struktura tijekom cijele simulacije dobivena uprosječivanjem koordinata proteinske okosnice C, CA, N.



**Slika 20** Analiza B-faktora u odnosu na prosječnu strukturu za dan sustav. Tamno ljubičasto otisnuto je prosječna vrijednost na temelju 3 replike, dok ljubičasto osjenčano je standardna prosječna vrijednost računana prema jednadžbi  $SE = \text{STD} / \sqrt{N}$ , gdje je STD standardna devijacija, N broj uzoraka ( $N = 3$ ). Broj uzoraka nije dovoljno velik kako bi rezultati bili statistički značajni.

Najfleksibilnija regija proteina, gledano prema vrijednostima B-faktora, u promatranim sustavima je od aminokiseline 143 do 153 (Tablica 5) koja odgovara petlji prikazanoj na slici 21.



**Slika 21** Zadnja struktura apo sustava, replike 1, regija s najvećim B-faktorima naznačena je zelenom bojom te predstavlja aminokiseline od 143 do 153 rednog broja.

U promatranim sustavima najveće vrijednosti B-faktora imaju amino-kiseline Gly146, Gly147 i Ala149 koje se nalaze u neuređenoj petlji, a dobiveni B-faktori za navedene aminokiseline u skladu su s kristalografski određenim B-faktorima (Tablica 5).

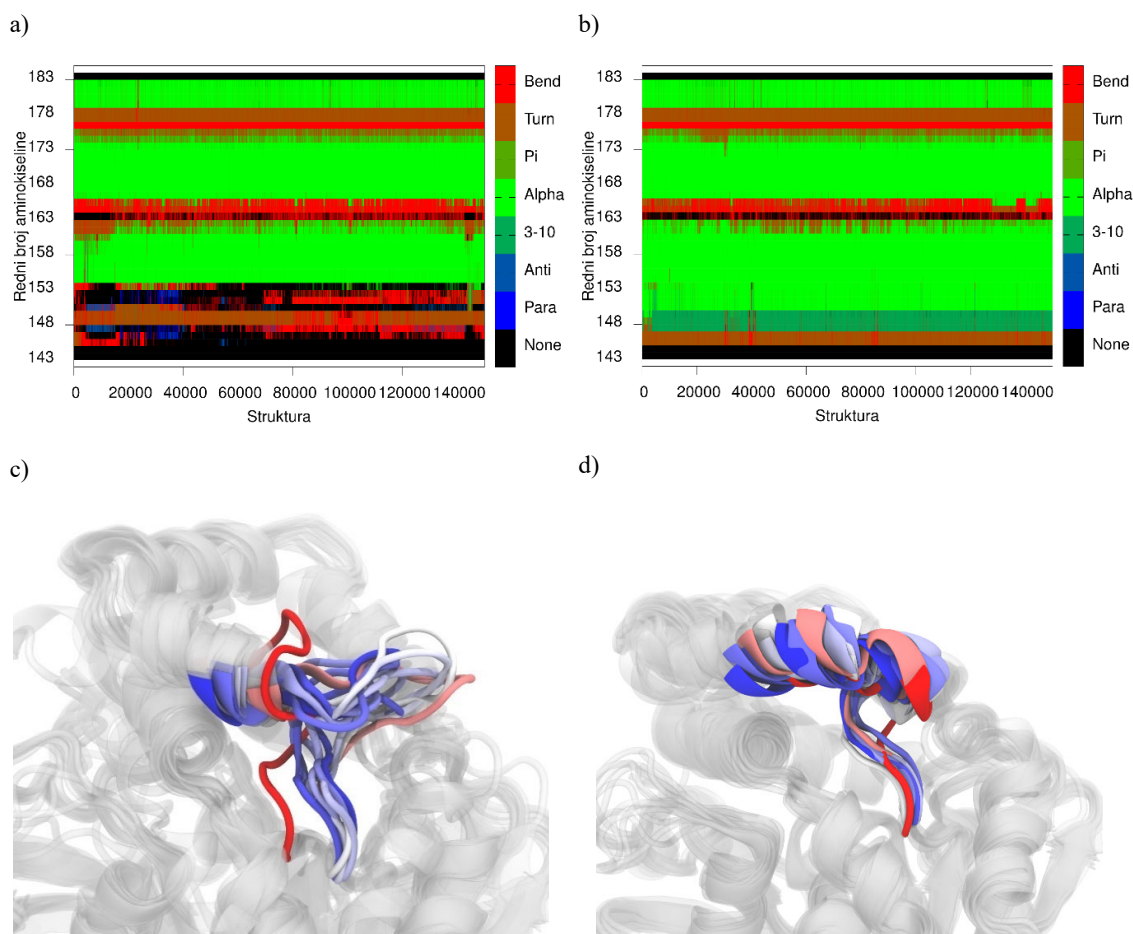
**Tablica 5** Prosječne i standardne prosječne pogreške B-faktora dobivene MD simulacijama za promatrane sustave u usporedbi s kristalografski dobivenim B-faktorima. Kristalografski dobiveni B-faktori izračunani su pomoću WHAT IF servera. <sup>61</sup>

Redni broj aminokiseline	Apo <sup>1</sup>	PLA DL <sup>1</sup>	PLA LD <sup>1</sup>	B-faktori / Å <sup>2</sup>		Kristalografski
				Mut PLA DL <sup>1</sup>	Mut PLA LD <sup>1</sup>	
146	149 ± 46	108 ± 39	30 ± 6	62 ± 22	30 ± 6	94,41
147	245 ± 40	112 ± 23	74 ± 6	77 ± 29	74 ± 6	105,44
148	347 ± 25	171 ± 51	150 ± 12	176 ± 47	150 ± 12	120,57
149	453 ± 50	265 ± 69	215 ± 61	248 ± 90	215 ± 61	128,06
150	345 ± 34	210 ± 47	238 ± 79	227 ± 93	238 ± 79	115,11
151	280 ± 32	168 ± 47	231 ± 94	166 ± 55	231 ± 94	107,39
152	241 ± 22	174 ± 30	241 ± 88	160 ± 58	241 ± 88	100,25
153	156 ± 27	141 ± 8	197 ± 72	128 ± 50	197 ± 72	109,53

<sup>1</sup> Prosječna standardna pogreška izračunana je prema jednadžbi  $SE = STD / \sqrt{N}$ , STD je standardna devijacija, a N broj uzoraka, N = 3. Broj uzoraka nije dovoljno velik kako bi rezultati bili statistički značajni.

Usporedbom računalno i kristalografski dobivenih B-faktora uočava se razlika u njihovim apsolutnim vrijednostima, no relativno gledano aminokiselina 149 ima najveći B-faktor u svakom sustavu. Razlog zašto su računalno dobiveni B-faktori veći može biti zbog bolje otopljenog enzima u odnosu na kristalnu strukturu i zbog veće konformacijske slobode koju enzim ima u otopini. Osim navedenog, aminokiseline 143–183 izložene su otapalu koji je još jedan faktor koji doprinosi njihovoj visokoj fleksibilnosti.

Daljnjom analizom aminokiselina s najvećim B-faktorima, napravljena je analiza sekundarne strukture algoritmom DSSP za aminokiseline rednog broja 143-183. Analizom sekundarnih struktura, vidljivo je da regija 143–154 u apo sustavu uglavnom neuređena, odnosno prevladavaju okreti (engl. *turn*), petlje (engl. *coil*) ili neuređene strukture. Nakon vezanja dekamera mliječne kiseline, regijom 143-153 prevladavaju  $\alpha$  zavojnice i  $3_{10}$  zavojnice. Promjena neuređene strukture apo sustava u uređenu strukturu sustava s ligandom moguće je prikazati i vizualno pomoću programa VMD<sup>55</sup> (engl. *Visual Molecular Dynamics*) (Slika 22). Rezultati su konzistentni za sve sustave u kojem dolazi do vezanja dekamera mliječne kiseline (Slike D3–14). Jedan od načina provjeravanja navedenih računalnih rezultata je pomoću cirkularnog dikroizma, spektroskopska metoda koja se koristi za izučavanje sekundarnih struktura proteina, gdje bi se konstruirao hidrolitički neaktivan mutant (npr. Ser114Ala) te inkubirao sa dekamerom mliječne kiseline potom bi se usporedili spektri cirkularnog dikroizma apo mutanta te mutanta s vezanim dekamerom mliječne kiseline. U trenutnom stadiju istraživanja nije poznato koju implikaciju nosi razlika u sekundarnim strukturama između apo sustava i vezanih sustava.

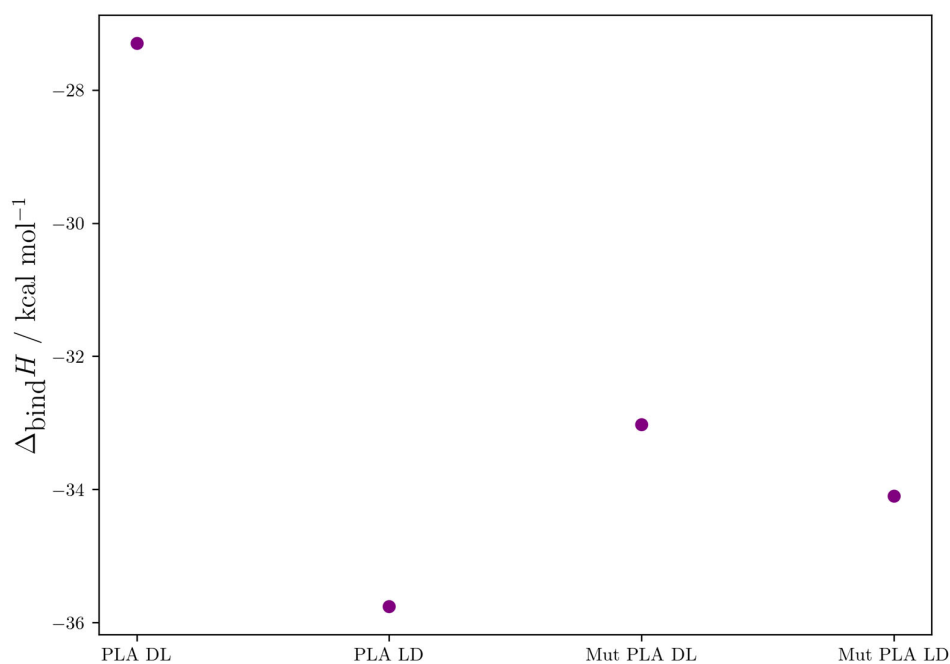


**Slika 22** Analiza sekundarnih struktura DSSP algoritmom za **a)** apo sustav, replika 1 **b)** PLA DL sustav, replika 1 za aminokiseline rednog broja 143–183. Vizualizacija struktura generiranih tijekom simulacije za **c)** apo sustav, replika 1; **d)** PLA DL sustav, replika 1 za aminokiseline rednog broja 143–153 gdje **crvena/bijela/plava** označuju tijekom vremena trajektorije. Apo sustav **a)** ima daleko manju uređenu sekundarnu strukturu, vidljivo prema petljama u **c)**, nego sustav u kojem je vezana PLA DL **b)**, vidljivo prema dužoj  $\alpha$ -zavojnici **d)**.

Kako bi se procijenila entalpija vezanja dekamera mliječne kiseline za protein RPA1511 korištena je metoda MM/GBSA, dok je entropijski doprinos zanemaren. Zanemarivanje entropijskog doprinosa dozvoljeno je zbog poništavanja konformacijske entropije u slučaju relativnih Gibbsovih energija vezanja. Dodatno, dolazi do znatne devijacije rezultata entropijskog doprinosa. Također, napravljen je račun doprinosa entalpiji vezanja pojedinačnih aminokiselina u proteinu RPA1511 (Slika 23). U slučaju entalpije vezanja ( $\Delta_{\text{bind}}H$ ) nema velike razlike između mutiranog proteina (R243K) i proteina divljeg tipa, izuzev stršeće vrijednosti za sustav PLA DL. Metoda MM/GBSA iznimno je osjetljiva na početni položaj liganda, drugim



riječima osjetljiva je na izbor početnog položaja dokiranog liganda u protein. Izuzev toga, metoda MM/GBSA notorna je po svojoj nepreciznosti. U slučaju sustava PLA DL i R243K PLA DL, ta pogreška je nešto manja u odnosu na PLA LD i R243K PLA LD. Jedan od mogućih objašnjenja toga jeste uzorkovanje konformacija liganda i proteina. Prilikom izvođenja metode, iz simulacije trajanja 300 ns, strukture su uzete svakih 7,5 ns, a kako bi uzorkovanje bilo što kvalitetnije, potrebno je uzorkovati što veći konformacijski prostor. Alternativno, za smanjenje standardne pogreške srednje vrijednosti, bilo bi dobro izvesti barem 15 nezavisnih replika manjeg trajanja za svaki sustav. Na temelju ovih rezultata, da se zaključiti da između mutirane varijante proteina i proteina divljeg tipa nema bitne razlike u vezanju dekamera mliječne kiseline jer su dobivene srednje vrijednosti za PLA DL, Mut PLA DL i Mut PLA LD unutar nekoliko jedinica  $\text{kcal mol}^{-1}$ .



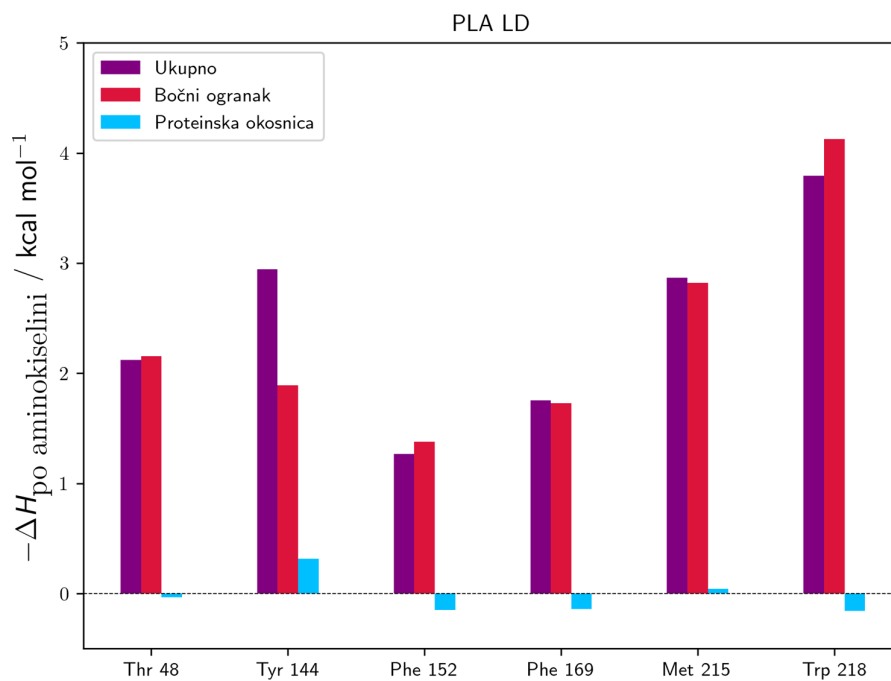
**Slika 23** Prosječna entalpije vezanja dekamera  $(\text{LA})_{10}$  za četiri različita sustava. Prosjek temeljen na tri replike.

Sustavi koji imaju manju pogrešku srednje vrijednosti su dalje proučavani u kontekstu pojedinačnog entalpijskog doprinosa aminokiseline. Prema literaturnim podacima, aminokiseline čijom mutacijom dolazi do smanjenja ili retencije hidrolitičke aktivnosti prema polimernoj mliječnoj kiselinu su: Tyr144 i Phe169; a aminokiseline koje su ključne za hidrolitičku aktivnost su: Met215 i Trp218. Rezultati dobiveni dekompozicijom entalpijskog doprinosa vezanja dekamera mliječne kiseline u slaganju su s navedenim eksperimentalnim

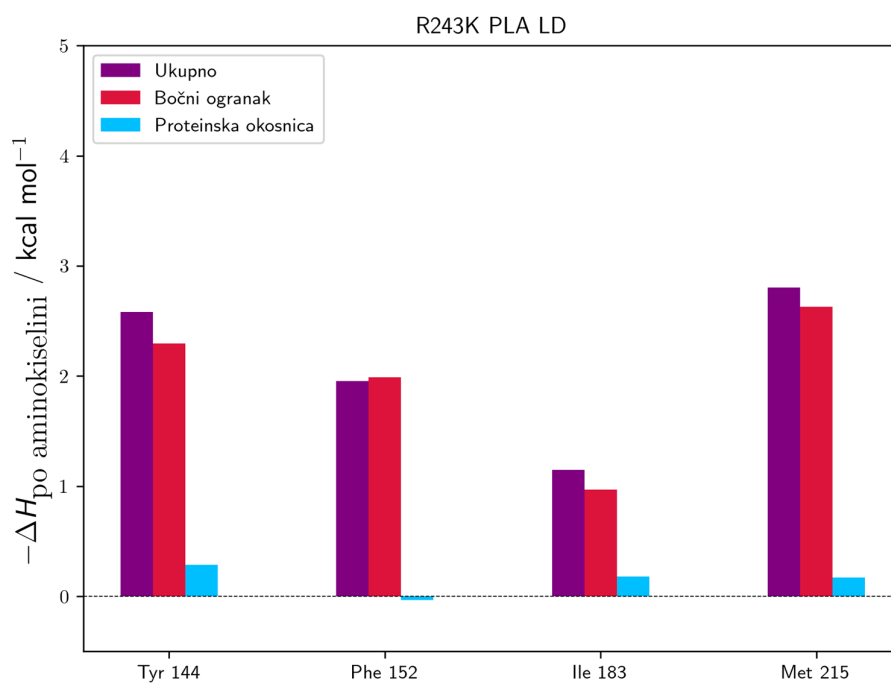
podacima. Navedene aminokiseline su aminokiseline s hidrofobnim bočnim ogrankom što je vidljivo prema njihovim doprinosima (Slika 24a i b), dok proteinska okosnica ne igra veliku ulogu u vezanju dekamera. Osim navedenih aminokiselina, bitno je spomenuti aminokiselinu Thr48 koja sudjeluje i u vezanju dekamera (vidljivo prema doprinosu bočnog ogranka), dok N-H dio proteinske okosnice sudjeluje u samom mehanizmu hidrolize gdje stvara oksianionsku šupljinu.

Neočekivano opažanje jest kako u računima MM/GBSA Arg243, niti Arg243Lys se nema velik doprinos u vezanju dekamera, dok prema literaturnim podacima, mutacijom Arg243Ala dolazi do smanjenja aktivnosti prema polimernoj mliječnoj kiselini. Uzimajući rezultate Wang i sur.<sup>6</sup> koji su izveli QM/MM račune nad RPA1511 u reakciji s mliječnom kiselinom varirajuće duljine, dekompoziciju pojedinačnih doprinosa aminokiselina vezanja (LA)<sub>10</sub>, eksperimentalne rezultate Hajjighasemi i sur.<sup>23</sup> te eksperimentalne rezultate dobivene u ovom diplomskom radu, Arg243 ne sudjeluje u vezanju polimerne mliječne kiseline nego u hidrolizi polimerne mliječne kiseline. Stoga, bilo bi poželjno napraviti daljnje kvantno–mehaničke proračune elektrostatskog doprinosa Arg243 pri čemu bi se mutirao u neku aminokiselinu s hidrofobnim bočnim ogrankom.

a)



b)



Slika 24 Dekompozicija doprinosa entalpiji vezanja pojedinih aminokiselina za sustave a) RPA1511 + PLA LD i b) RPA1511\_R243K + PLA LD.

## § 5. ZAKLJUČAK

- Uspješno je eksprimirana  $\alpha/\beta$  hidrolaza RPA1511 iz bakterije *Rhodopseudomonas palustris* i njena mutirana inačica RPA1511\_R243K. Ispitani su uvjeti ekspresije te je pronađeno da heterologna ekspresija u domaćinu *Escherichia coli* nije pogodna zbog stvaranja netopivih agregata hidrolaze RPA1511.
- Testovi hidrolitičke aktivnosti RPA1511 prema suspenziji polimljične kiseline u agaru su pozitivni, te je pokazano da nema razlike u hidrolitičkoj aktivnosti između enzima divljeg tipa i njene mutirane inačice.
- Kvantitativni testovi hidrolitičke aktivnosti turbidimetrijskim mjerenjima prema suspendiranoj polimljičnoj kiseline ukazuju da linearnim povećanjem koncentracije enzima ne rezultira linearnom povećanju brzine razgradnje polimljične kiseline, drugim riječima, povećanjem koncentracije enzima dolazi do zasićenja površine polimljične kiseline. Nadalje, turbidimetrijskim mjerenjima pokazalo se da nema razlike u hidrolitičkoj aktivnosti između enzima RPA1511 i mutirane inačice RPA1511\_R243K. Naposljetku, zbog tehničke naravi ovog testa, nije bilo moguće reproducirati interpolacijske faktore.
- Molekularnom dinamikom na atomskoj razini simulirano je pet sustava koji se očituju stabilnošću tijekom simulacije. Analizom B-faktora uspoređene su vrijednosti iz molekularno-dinamičkih simulacija te iz kristalne strukture pri čemu je pokazana njihova sličnost u vrijednostima.
- Sekundarne strukture regije 143–153 ovisne su o prisutnosti vezanog dekamera mliječne kiseline, što je pokazano analizom sekundarnih struktura DSSP algoritmom. U odsutnosti dekamera mliječne kiseline u regiji 143–153 prevladava sekundarna struktura petlje, dok vezanjem dekamera mliječne kiseline navedenom regijom prevladavaju sekundarne strukture  $\alpha$ -zavojnice i  $3_{10}$  zavojnice.
- Potvrđena je važnost aminokiselina Met215 i Trp218 s obzirom na njihov visok doprinos entalpiji vezanja dekamera mliječne kiseline, što je u skladu s literaturnim podacima koji nalažu da su navedene aminokiseline ključne za hidrolizu polimljične kiseline.

- 
- Pronađene su dvije nove aminokiseline Phe152 i Ile183 koji ima potencijalnu važnost za vezanje polimljične kiseline. Njihova relevantnost može se ispitati eksperimentalno uz pomoć ciljane mutageneze gdje bi se pripremili mutanti Phe152Ala te Ile183Ala .

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Kratice standardnih aminokiselina

Aminokiselina	Troslovna kratica	Jednoslovna kratica
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cistein	Cys	C
Fenilalanin	Phe	F
Glicin	Gly	G
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Histidin	His	H
Izoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lizin	Lys	K
Metionin	Met	M
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Tirozin	Tyr	Y
Triptofan	Trp	W
Valin	Val	V

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. United States, US942699A, 1909.
2. R. Geyer, J. R. Jambeck i K. L. Law, *Science Advances*, 2017, **3**, e1700782.
3. Y. Zheng, E. K. Yanful i A. S. Bassi, *Critical Reviews in Biotechnology*, 2005, **25**, 243–250.
4. R. Wei, C. Song, D. Gräsing, T. Schneider, P. Bielytskyi, D. Böttcher, J. Matysik, U. T. Bornscheuer i W. Zimmermann, *Nat Commun*, 2019, **10**, 5581.
5. H. Lu, D. J. Diaz, N. J. Czarnecki, C. Zhu, W. Kim, R. Shroff, D. J. Acosta, B. R. Alexander, H. O. Cole, Y. Zhang, N. A. Lynd, A. D. Ellington i H. S. Alper, *Nature*, 2022, **604**, 662–667.
6. X. Wang, J. Chen, X. Tang, J. Wang, L. Zhu, W. Zhang, H. Wang, Y. Li i Q. Zhang, *Chemosphere*, 2019, **231**, 126–133.
7. J. Pelouze, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1845, **53**, 112–124.
8. W. H. Carothers i J. W. Hill, *J. Am. Chem. Soc.*, 1932, **54**, 1559–1566.
9. R. Mehta, V. Kumar, H. Bhunia i S. N. Upadhyay, *Journal of Macromolecular Science, Part C*, 2005, **45**, 325–349.
10. R. J. Young i P. A. Lovell, u *Introduction to Polymers, Third Edition*, Routledge, Boca Raton, 3rd edition., 2011, str. 147.
11. S. Li i S. McCarthy, *Macromolecules*, 1999, **32**, 4454–4456.
12. M. J. Stanford i A. P. Dove, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 486–494.
13. K. I. Park i M. Xanthos, *Polymer Degradation and Stability*, 2009, **94**, 834–844.
14. 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 i A. Goldman, *Protein Engineering, Design and Selection*, 1992, **5**, 197–211.
15. P. D. Carr i D. L. Ollis, *Protein Pept Lett*, 2009, **16**, 1137–1148.
16. L. Casas-Godoy, F. Gasteazoro, S. Duquesne, F. Bordes, A. Marty i G. Sandoval, u *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*, Springer, New York, NY, 2018, str. 3–38.
17. R. Wiczorek, K. Adamala, T. Gasperi, F. Polticelli i P. Stano, *Life*, 2017, **7**, 19.
18. D. F. Williams, *Engineering in Medicine*, 1981, **10**, 5–7.
19. M. S. Reeve, S. P. McCarthy, M. J. Downey i R. A. Gross, *Macromolecules*, 1994, **27**, 825–831.
20. K. Kitadokoro, M. Kakara, S. Matsui, R. Osokoshi, U. Thumarat, F. Kawai i S. Kamitani, *The FEBS Journal*, 2019, **286**, 2087–2098.
21. R. T. MacDonald, S. P. McCarthy i R. A. Gross, *Macromolecules*, 1996, **29**, 7356–7361.
22. J. Chow, P. Perez-Garcia, R. Dierkes i W. R. Streit, *Microbial Biotechnology*, 2023, **16**, 195–217.
23. 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 i A. F. Yakunin, *Biomacromolecules*, 2016, **17**, 2027–2039.
24. J. A. Cannon i T. B. Reynolds, *Biomacromolecules*, 2023, **24**, 1141–1154.
25. C. J. Cramer, u *Essentials of computational chemistry: theories and models*, Wiley, Chichester, 2. ed., 2014, str. 17–30.

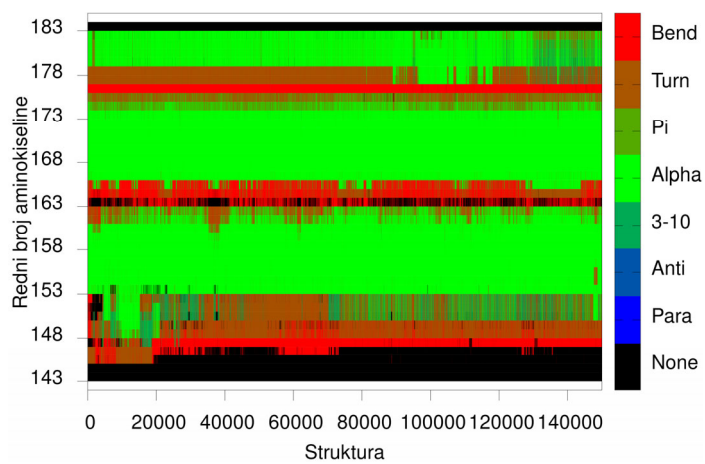
26. O. Guvench i A. D. MacKerell, u *Molecular Modeling of Proteins*, Humana Press, Totowa, NJ, 2008, str. 63–88.
27. S. Le Roux, Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc.
28. J. A. Henderson i J. Shen, *J. Chem. Inf. Model.*, 2022, **62**, 150–158.
29. J. Ma, P. B. Sigler, Z. Xu i M. Karplus, *Journal of Molecular Biology*, 2000, **302**, 303–313.
30. D. Satoh, K. Shimizu, S. Nakamura i T. Terada, *FEBS Letters*, 2006, **580**, 3422–3426.
31. B. Bouvier i H. Grubmüller, *Biophysical Journal*, 2007, **93**, 770–786.
32. Y. Shan, E. T. Kim, M. P. Eastwood, R. O. Dror, M. A. Seeliger i D. E. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 9181–9183.
33. V. Kräutler, W. F. van Gunsteren i P. H. Hünenberger, *Journal of Computational Chemistry*, 2001, **22**, 501–508.
34. B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen i J. G. E. M. Fraaije, *Journal of Computational Chemistry*, 1997, **18**, 1463–1472.
35. K. A. Feenstra, B. Hess i H. J. C. Berendsen, *Journal of Computational Chemistry*, 1999, **20**, 786–798.
36. L. Verlet, *Phys. Rev.*, 1967, **159**, 98–103.
37. R. W. Hockney, S. P. Goel i J. W. Eastwood, *Journal of Computational Physics*, 1974, **14**, 148–158.
38. E. Wang, H. Sun, J. Wang, Z. Wang, H. Liu, J. Z. H. Zhang i T. Hou, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 9478–9508.
39. S. Genheden i U. Ryde, *Proteins*, 2012, **80**, 1326–1342.
40. A. Jones, Purity Ratios | Nucleic Acid Ratios | Technical Note 130, <https://www.denovix.com/tn-130-purity-ratios-explained/>, (pristupljeno 31. siječanj 2024.).
41. T. Teeraphatpornchai, T. Nakajima-Kambe, Y. Shigeno-Akutsu, M. Nakayama, N. Nomura, T. Nakahara i H. Uchiyama, *Biotechnol Lett*, 2003, **25**, 23–28.
42. 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 i T. Schwede, *Nucleic Acids Research*, 2018, **46**, W296–W303.
43. C. J. Williams, J. J. Headd, N. W. Moriarty, M. G. Prisant, L. L. Videau, L. N. Deis, V. Verma, D. A. Keedy, B. J. Hintze, V. B. Chen, S. Jain, S. M. Lewis, W. B. Arendall III, J. Snoeyink, P. D. Adams, S. C. Lovell, J. S. Richardson i D. C. Richardson, *Protein Science*, 2018, **27**, 293–315.
44. R. Anandkrishnan, B. Aguilar i A. V. Onufriev, *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**, W537–W541.
45. M. H. M. Olsson, C. R. Søndergaard, M. Rostkowski i J. H. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.*, 2011, **7**, 525–537.
46. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng i T. E. Ferrin, *J Comput Chem*, 2004, **25**, 1605–1612.
47. O. Trott i A. J. Olson, *J Comput Chem*, 2010, **31**, 455–461.
48. A. Jakalian, D. B. Jack i C. I. Bayly, *J Comput Chem*, 2002, **23**, 1623–1641.
49. J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman i D. A. Case, *J Comput Chem*, 2004, **25**, 1157–1174.
50. C. Tian, K. Kasavajhala, K. A. A. Belfon, L. Raguette, H. Huang, A. N. Miguez, J. Bickel, Y. Wang, J. Pincay, Q. Wu i C. Simmerling, *J. Chem. Theory Comput.*, 2020, **16**, 528–552.
51. Z. Li, L. F. Song, P. Li i K. M. Merz, *J Chem Theory Comput*, 2020, **16**, 4429–4442.



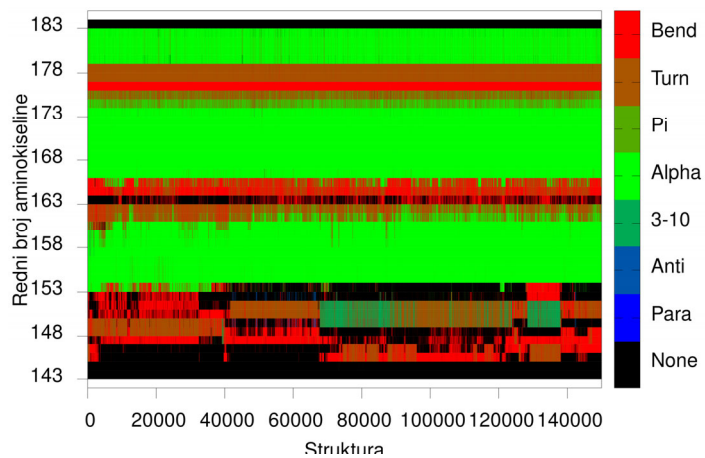
52. T. Darden, L. Perera, L. Li i L. Pedersen, *Structure*, 1999, **7**, R55-60.
53. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola i J. R. Haak, *The Journal of Chemical Physics*, 1984, **81**, 3684–3690.
54. D. R. Roe i T. E. I. Cheatham, *J. Chem. Theory Comput.*, 2013, **9**, 3084–3095.
55. W. Humphrey, A. Dalke i K. Schulten, *J. Mol. Graphics Modell.*, 1996, **14**, 33.
56. W. Kabsch i C. Sander, *Biopolymers*, 1983, **22**, 2577–2637.
57. A. Onufriev, D. Bashford i D. A. Case, *Proteins*, 2004, **55**, 383–394.
58. A. Sivashanmugam, V. Murray, C. Cui, Y. Zhang, J. Wang i Q. Li, *Protein Sci*, 2009, **18**, 936–948.
59. F. Kawai, K. Nakadai, E. Nishioka, H. Nakajima, H. Ohara, K. Masaki i H. Iefuji, *Polymer Degradation and Stability*, 2011, **96**, 1342–1348.
60. B. Knapp, L. Ospina i C. M. Deane, *J. Chem. Theory Comput.*, 2018, **14**, 6127–6138.
61. Average B factors, <https://swift.cmbi.umcn.nl/servers/html/listavb.html>, (pristupljeno 01. veljača 2024.).

## § 8. DODATAK

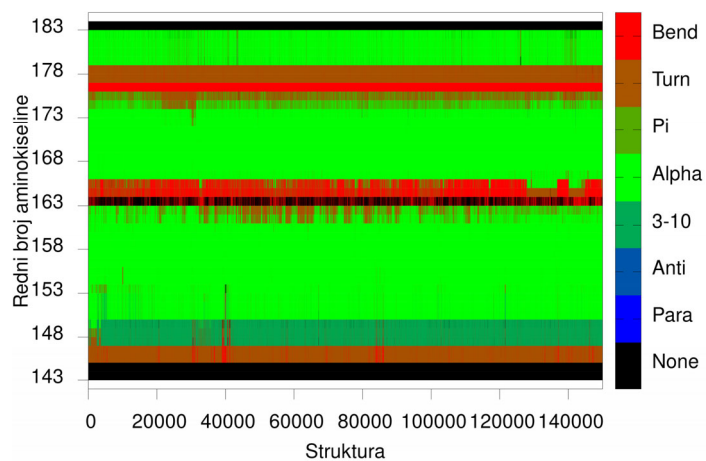
### 8.1. Analiza sekundarnih struktura simuliranih sustava regije 143–183 algoritmom DSSP



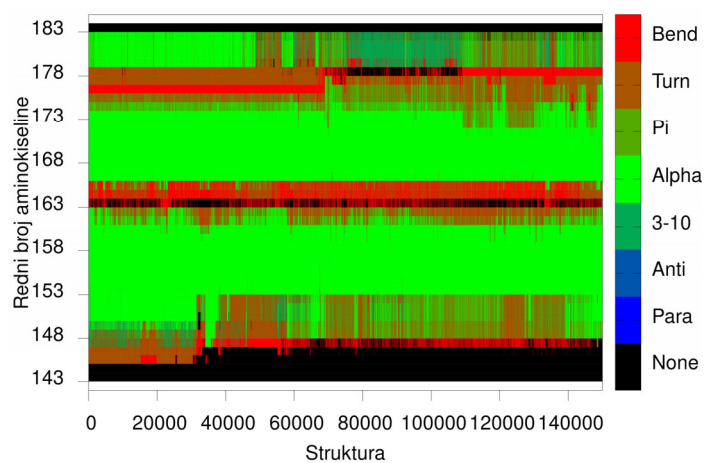
Slika D1 Apo, replika 2



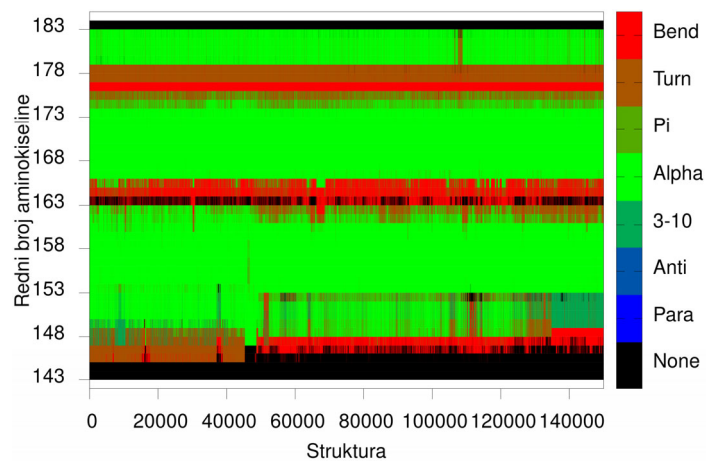
Slika D2 Apo, replika 3



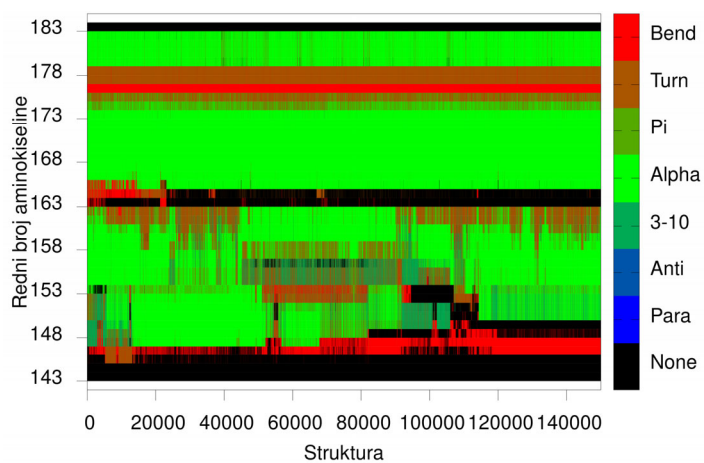
Slika D3 PLA DL, replika 1



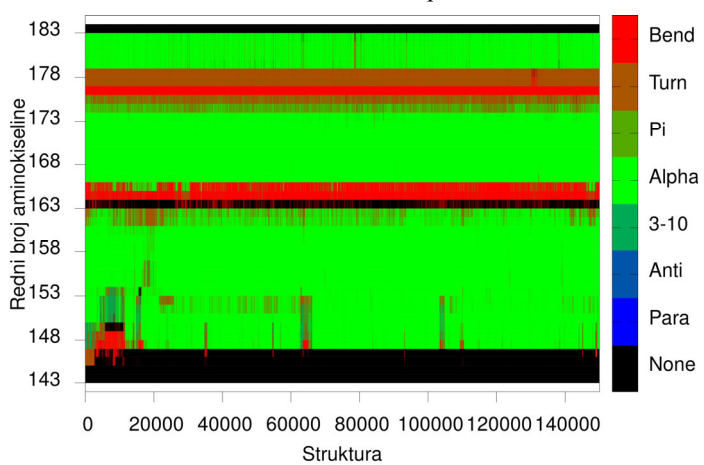
Slika D4 PLA DL, replika 2



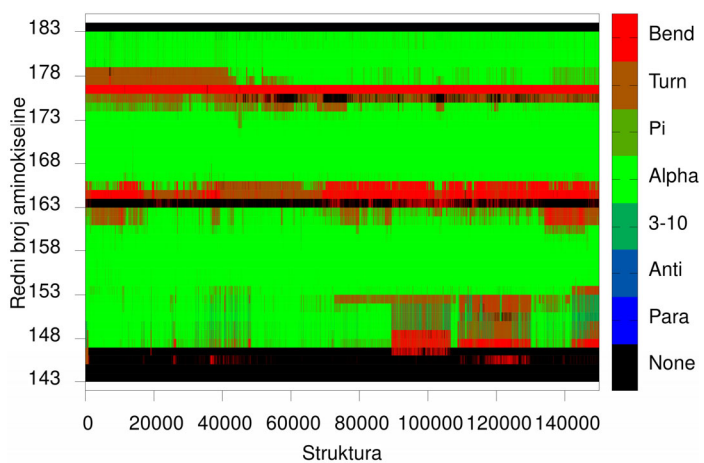
Slika D5 PLA DL, replika 3



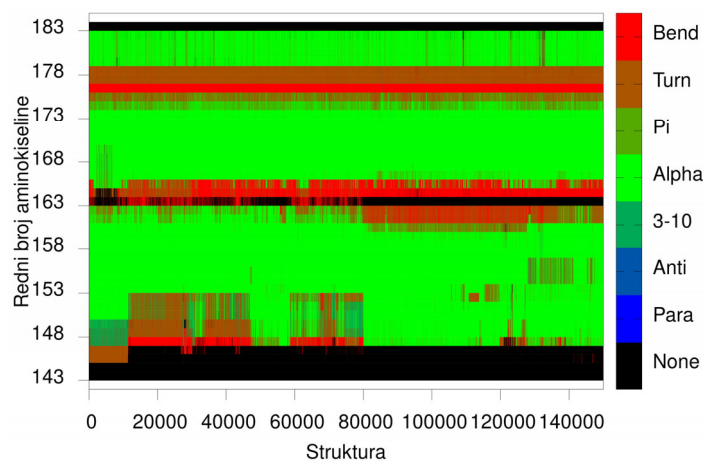
Slika D6 PLA LD, replika 1



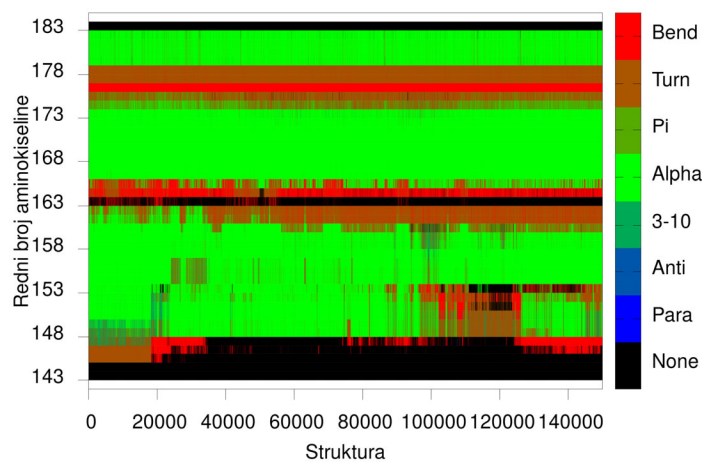
Slika D7 PLA LD, replika 2



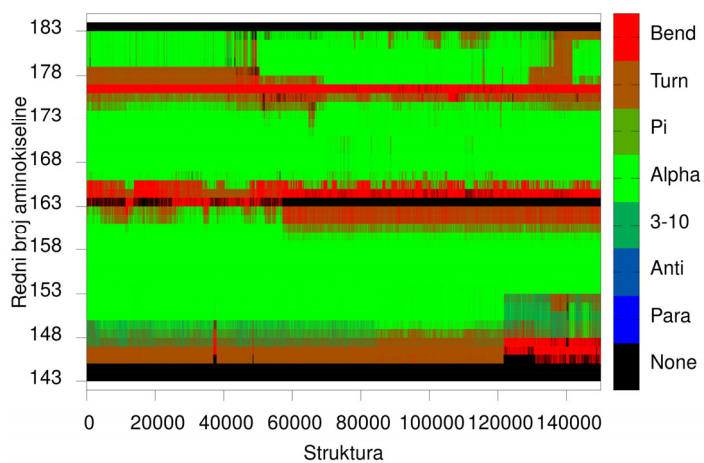
Slika D8 PLA LD, replika 3



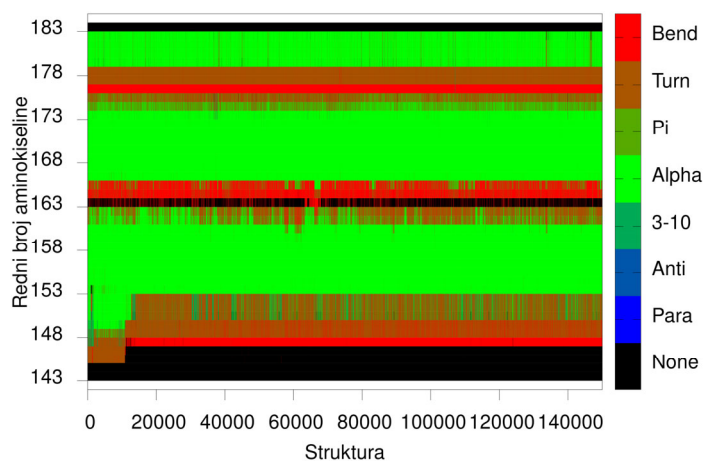
Slika D9 PLA DL R243K, replika 1



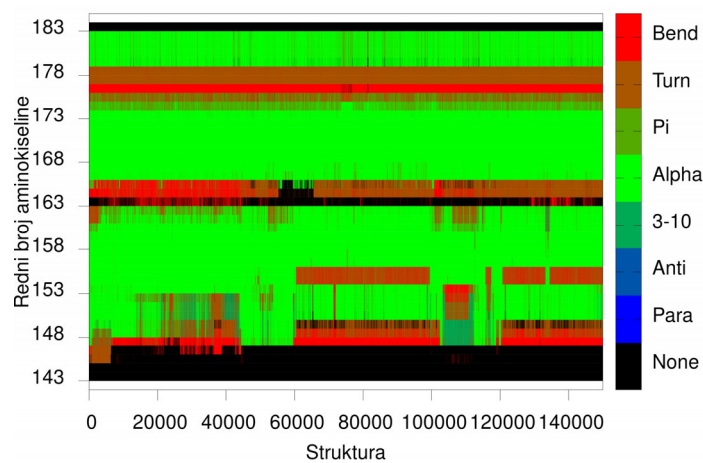
Slika D10 PLA DL R243K, replika 2



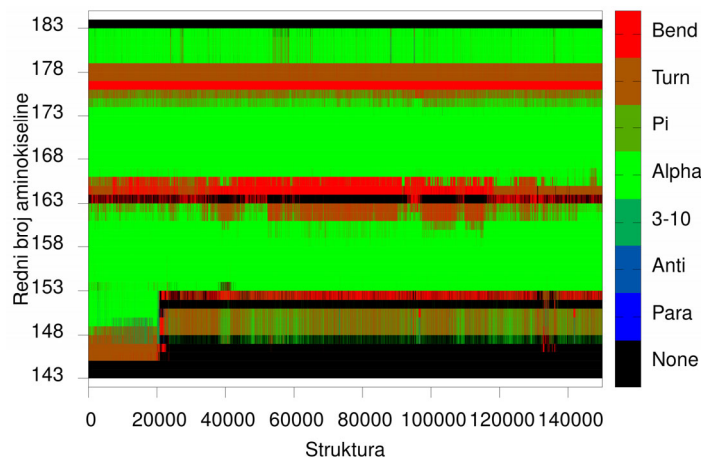
Slika D11 PLA DL R243K, replika 3



Slika D12 PLA LD R243K, replika 1



Slika D13 PLA LD R243K, replika 2



Slika D14 PLA LD R243K, replika 3



## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Davor Mendeš

Datum rođenja: 24. veljače 1999

Mjesto rođenja: Vinkovci

### Obrazovanje

2006–2014	Osnovna škola Ivana Kozarca, Županja
2014–2018	Prirodoslovno-grafička škola – smjer kemijski tehničar Rijeka
2018–2021	Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
2021–2024	Diplomski studij kemije; istraživački, grane biokemija i fizikalna kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Marija Cvetnić, Davor Mendeš, Nikola Bregović, Vladislav Tomišić, *Thermodynamics of several ion-pairings in acetonitrile, Solutions in Chemistry* 8–11 Studeni (2022), Sveti Martin na Muri, Hrvatska.