

Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Leo Bolješić, Krešimir Kos, Ivana Petrić

U potrazi za termostabilnijim enzimima za industrijsku
primjenu: rekonstrukcija drevnih predaka C-tipa
halogenhidrin-dehalogenaze

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je pri Sveučilištu u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu pod vodstvom prof. dr. sc. Zvezdane Findrik Blažević i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./2023.

Ovaj rad financiran je Programom znanstveno-tehnološke suradnje između Republike Hrvatske i Republike Austrije iz projekta „BioFragrance: Enzimsko inženjerstvo i procesno inženjerstvo u sintezi mirisnih spojeva iz obnovljivih izvora“. Dijelovi ovog istraživanja provedeni su u suradnji s Institutom za molekularnu biotehnologiju Tehničkog Sveučilišta u Grazu.

Popis i objašnjenje pokrata i simbola

°C	Celzijev stupanj
1,3-DCP	1,3-diklorpropan-2-ol
3-CPD	(<i>R,S</i>)-3-klorpropan-1,2-diol
ACN	acetonitril, CH ₃ CN
AltAll	strategija rekonstrukcije sekvenci drevnih proteina koja funkcionalno karakterizira protein u “najgorem mogućem stanju”
APS	amonijev persulfat, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
Arg	arginin
ASR	rekonstrukcija drevnih proteina (engl. <i>ancestral sequence resurrection</i>)
BPB	bromfenol plavo (engl. <i>bromophenol blue</i>)
BSA	albumin iz goveđeg seruma (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
<i>c</i>	koncentracija, mol/L
CBB	Coomassie Brilliant Blue G-250
DSF	Diferencijalna pretražna fluorimetrija (engl. <i>differential scanning calorimetry</i>)
E	enzim
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
γ	masena koncentracija, g/L
GDH	glutamat-dehidrogenaza
HHDH	halogenhidrin-dehalogenaza
HheA	A-tip halogenhidrid-dehalogenaze
HheB	B-tip halogenhidrid-dehalogenaze
HheC	C-tip halogenhidrid-dehalogenaze
HheG	G-tip halogenhidrid-dehalogenaze
HisTrap kolona	kolona spremna za upotrebu, prethodno pakirana s prethodno napunjenom Ni Sepharose 6 Fast Flow za preparativno pročišćavanje rekombinantnih proteina označenih histidinom pomoću afinitetne kromatografije s imobiliziranim metalnim ionima (IMAC).
HMG-CoA	β -hidroksi β -metilglutaril-CoA ili 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A
HPLC	tekućinska kromatografija visokog učinka (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
K_m	Michaelis-ova konstanta, mmol/L

KRED	ketoreduktaza
LB	Luria-Bertanoni hranjiva podloga
LUCA	posljednji univerzalni zajednički predak (engl. <i>last universal common ancestor</i>)
<i>M</i>	molarna masa, g/mol
<i>m</i>	masa, g
MBAm	<i>N, N'</i> -metilenbisakrilamid
MetOH	metanol, CH ₃ OH
ML	maksimalna vjerojatnost (engl. <i>maximum likelihood</i>)
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADPH	reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
P	produkt
PNSHH	para-nitro-2-brom-1-feniletanol
PNSO	2-(4-nitrofenil)oksiran
PP	posteriorna vjerojatnost (engl. <i>posterior probability</i>)
ProgNo	broj programa
ProSAR	multivarijantna strategija optimizacije proteina temeljena na odnosima proteinske sekvence i aktivnosti
<i>r</i>	brzina reakcije, mmol/(L min)
RB	pufer za provođenje elektroforeze
RG	gel za razdvajanje
RNA	ribonukleinska kiselina
S	supstrat
SDS	natrijev dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>), NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄
Ser	serin
Ser-Tyr-Arg	aminokiselinska triada serin-tirozin-arginin
SG	gel za koncentriranje
S _N 2	mehanizam reakcije nukleofilne supstitucije
TEMED	tetrametiletildiamin, C ₆ H ₁₆ N ₂
TFA	Trifluorooctena kiselina (engl. <i>trifluoroacetic acid</i>), CF ₃ CO ₂ H
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. <i>thin-layer chromatography</i>)
Tris-SO ₄	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer
Tyr	tirozin

V_{max} maksimalna brzina reakcije, mmol/(L min)

w maseni udio, -

Sadržaj rada

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI PREGLED I CILJEVI RADA	2
2.1. Biokataliza.....	2
2.2. Enzimi	2
2.2.1. Termostabilnost enzima.....	6
2.3. Halogenhidrin-dehalogenaze.....	7
2.3.1. Podjela halogenhidrin-dehalogenaza	8
2.3.2. Primjena halogenhidrin-dehalogenaza	10
2.4. Reakcijsko inženjerstvo i kemijska kinetika	12
2.5. Rekonstrukcija drevnih proteina	13
2.5.1. Strategije rekonstrukcije sekvenci drevnih proteina.....	15
2.6. Hipoteze istraživanja i ciljevi rada	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Rekonstrukcija sekvenci i dobivanje plazmida drevnih proteina.....	18
3.2. Popis korištenih kemikalija	18
3.3. Proizvodnja rekombinantnih proteina u stanicama <i>Escherichia coli</i>	19
3.3.1. Priprema tekućih i krutih hranjivih podloga.....	19
3.3.2. Izolacija pojedinačnih bakterijskih kultura.....	20
3.3.3. Priprema malih prekonoćnih kultura	21
3.3.4. Prekomjerna ekspresija željenih proteina	21
3.3.5. Izolacija rekombinantnih proteina	22
3.3.6. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom	24
3.4. Metode karakterizacije dobivenih rekombinantnih proteina.....	25
3.4.1. Razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil sulfata.....	25
3.4.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu	29
3.4.3. Mjerenje enzimske kinetike u reakciji zatvaranja p-nitro-2-bromo-1-feniletanola (PNSHH)	29
3.4.4. Određivanje termičke stabilnosti proteina.....	32
3.4.5. Određivanje stabilnosti proteina tijekom inkubacije na različitim temperaturama	33
4. REZULTATI I RASPRAVA	35
4.1. Konstrukcija filogenetskog stabla i odabir predaka HHDH.....	35

4.2. Prisutnost proteina u staničnom lizatu	37
4.3. Enzimska kinetika u reakciji zatvaranja <i>para</i> -nitro-2-bromo-1-feniletanola.....	38
4.4. Termička stabilnost proteina	40
4.5. Stabilnost proteina pri inkubaciji na različitim temperaturama	43
5. ZAKLJUČAK	48
6. ZAHVALE.....	50
7. POPIS LITERATURE	51
8. SAŽETAK	66
9. SUMMARY	68
10. ŽIVOTOPISI.....	70

1. UVOD

Evolucija ljudske civilizacije je u sve većoj mjeri sinkronizirana s razvojem znanosti i tehnologije. Međutim, s povećanom ljudskom aktivnošću u svrhu ostvarivanja pojedinih ciljeva, planet Zemlja susrela se s nizom ponekad nepovratnih promjena. Posljednjih se godina tome daje sve više pažnje, te je korištenje principa „zelenog inženjerstva“ postalo više od vizije. Održivi koncepti postali su široko prihvaćeni kao odgovornost čovječanstva i nezaustavljiv globalni trend koji, između ostalog, poziva industriju na korištenje novih principa i strategija [1].

Enzimi mogu pridonijeti održivom razvoju jer služe kao zamjena otrovnim kemikalijama potrebnim za industrijsku proizvodnju klasičnim metodama sintetske organske kemije, te na taj način osiguravaju razvoj ekološki prihvatljivih procesa. Industrijske tehnologije temeljene na enzimima pridonose učinkovitom iskorištavanju sirovina s minimalnom proizvodnjom ili izbjegavanjem nastajanja otpada, te podrazumijevaju smanjenu upotrebu otrovnih tvari. Međutim, glavna prepreka širokoj industrijskoj primjeni enzima je njihova česta nestabilnost u odnosu na relativno zahtjevne procesne uvjete u industriji. Tijekom industrijskih procesa, enzimi su često izloženi okruženju koje se razlikuje od njihovih prirodnih uvjeta, kao što su prisutnost neprirodnih supstrata, često u visokim koncentracijama, nevodeni mediji, ekstremne pH vrijednosti, prisutnost potencijalnih inhibitora enzima itd. Jedan od zahtjevnih reakcijskih uvjeta industrijskih procesa je visoka temperatura procesa koja u mnogim slučajevima uzrokuje destabilizaciju prirodne proteinske strukture te, posljedično, gubitak katalitičke aktivnosti. Općenito govoreći, većina je enzima aktivna u rasponu blagih temperatura (25 – 37 °C), a aktivnost gube pri visokim ili povišenim temperaturama. Kako bi se proširila industrijska primjena enzima u „zelenim“ sintetskim procesima, kontinuirano se traga za termoaktivnim i toplinski stabilnim enzimima [2].

Jedno od potencijalnih rješenja novijeg datuma, za poboljšanje termičke otpornosti širokog spektra enzima, jest rekonstrukcija drevnih oblika enzima kombiniranim bioinformatičkim metodama. Radi okolišnih uvjeta koji su vladali na planeti Zemlji tijekom pretkambrija, pretpostavka je da su tadašnji enzimi bili mnogo termostabilniji od modernih inačica [3]. Upravo tom tematikom bavi se i ovaj znanstveni rad.

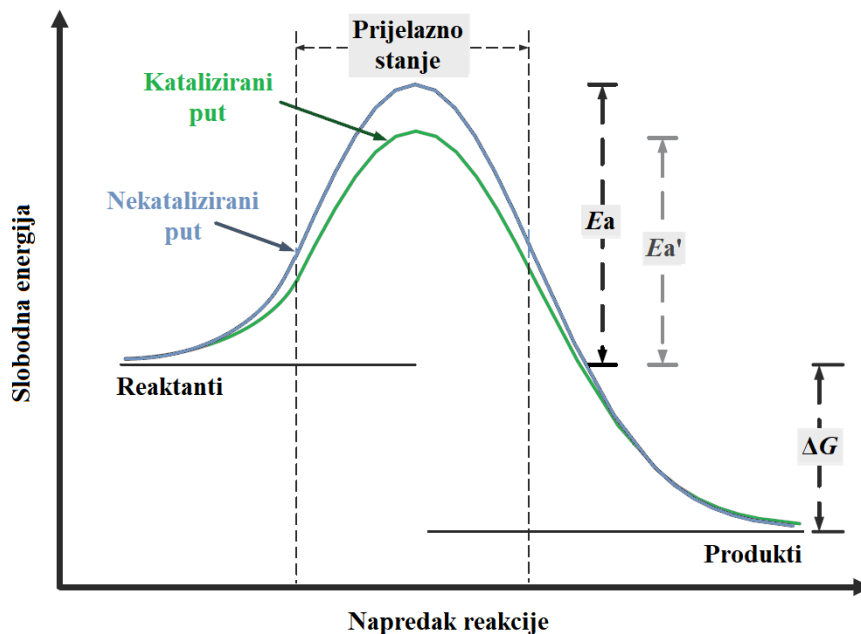
2. TEORIJSKI PREGLED I CILJEVI RADA

2.1. Biokataliza

Pojam biokatalize odnosi se na jednu ili više enzimskih reakcija za sintezu korisnog krajnjeg produkta [4]. Biokataliza uključuje i metaboličku transformaciju određenih polaznih kemikalija, sa svrhom dobivanja novih produkata, te na taj način čini važan aspekt moderne organske sinteze, kako za akademsku zajednicu, tako i za kemijsku i farmaceutsku industriju [4,5]. Iako je dugo smatrana kao obećavajuća „zelena“ tehnologija rezervirana isključivo za znanstvena istraživanja, biokataliza danas zauzima vrlo važan položaj u širokom spektru industrija. Navedeno je u velikoj mjeri posljedica brzog rasta broja dostupnih biokatalitičkih reakcija, zahvaljujući sve većoj dostupnosti naprednih alata za otkriće enzima te metoda proteinskog inženjerstva za optimizaciju samih biokatalizatora. Danas je moguće pronaći niz prilagođenih enzima visoke učinkovitosti i selektivnosti u odgovarajućim bazama podataka i alatima za pretraživanje, čiji je cilj učiniti biokatalizatore dostupnima široj znanstvenoj i industrijskoj zajednici [5].

2.2. Enzimi

Mnoge kemijske reakcije događaju se spontano, dok druge zahtijevaju katalizu za postizanje značajnije brzine. Tvari koje ubrzavaju reakciju nazivaju se katalizatori te djeluju na način da smanjuju energiju aktivacije, čije je savladavanje potrebno da bi se supstrat pretvorio u produkt [6]. Ova se energetska prepreka u termodinamičkom smislu prikazuje kao promjena slobodne energije, kao što je prikazano na slici 2.1.



Slika 2.1. Katalitički mehanizam. E_a i E_a' su energije aktivacije nekatalizirane i katalizirane reakcije. ΔG je promjena slobodne energije reakcije [6]

Za biokemijske reakcije, odnosno kemijske reakcije koje čine metabolizam živih stanica i neophodne su za održavanje života, nerijetko su potrebni enzimi – biološki katalizatori ili biokatalizatori [6,7]. S iznimkom nekoliko klasa katalitičkih ribonukleinskih kiselina (RNK), enzimi su po svojem sastavu i strukturi proteini. Njihova katalitička aktivnost ovisi o cjelovitosti njihove prirodne proteinske konformacije [8]. Enzimi, tj. biokatalizatori, mogu se ekstrahirati iz stanica te zatim koristiti za katalizu širokog spektra komercijalno važnih procesa. Na primjer, imaju važnu ulogu u proizvodnji zaslađivača i modifikaciji antibiotika, proizvodnji prašaka za pranje i različitih proizvoda za čišćenje, te imaju kliničku, forenzičku i ekološku primjenu [7]. Njihova primjena seže još od drevnih zemalja poput Babilona, Grčke, Egipta, Kine i Indije, gdje su pronađeni tekstovi o upotrebi mikroorganizama za proizvodnju hrane i pića [9]. Sam pojam „enzim“ prvi je upotrijebio njemački fiziolog Wilhelm Kühne 1878. godine, kada je opisao sposobnost kvasca da proizvodi alkohol iz šećera, a izveden je iz grčkih riječi ἐν (*en*, „unutar“) i ζύμη (*zume*, „kvasac“). U kasnom 19. i ranom 20. stoljeću postignut je značajan napredak u ekstrakciji, karakterizaciji i komercijalnom iskorištavanju mnogih enzima [7]. U tablici 2.1. prikazane su prekretnice u povijesti enzimskog inženjerstva.

Tablica 2.1. Povijest enzimskog inženjerstva [9]

Godina	Značajan događaj/otkriće
1890.	Predložen „brava i ključ“ model (Fisher)
1893.	Predstavljena definicija pojma „katalizator“ (Ostwald)
1897.	Objašnjeno da enzim može funkcionirati izvan stanice (Buchner)
1926.	Dokazano da je enzim po svojem sastavu i protein (Sumner)
1952.	Izvedena biotransformacija steroida
1958.	Predložen model “induciranog prilagođavanja” (Koshland)
1963.	Identificirana aminokiselinska sekvenca ribonukleaze
1965.	Predložen “alosterički model” enzima (Monod)
1970.	Imobilizirani enzimi korišteni su za proizvodnju visokofruktoznog kukuruznog sirupa
1980.	Zabilježena enzimska sinteza kiralnih spojeva i polimera u organskom otapalu
1990.	Početak korištenja metoda proteinskog inženjerstva, uključujući usmjerenu evoluciju
2000.	Uveden je računalni dizajn enzima
~ 2010.	Enzimi se počinju naširoko koristiti u metaboličkom inženjerstvu

Mnogo je prednosti korištenja enzima, kao što su visoka specifičnost prema supstratima i blagi uvjeti provođenja reakcije u usporedbi s klasičnim sintetskim metodama organske kemije. Međutim, postoje i nedostaci poput visokih troškova njihove izolacije i činjenice da su enzimi često relativno nestabilni [6,10]. U tablici 2.2. sažete su ključne prednosti i nedostaci korištenja biokatalizatora.

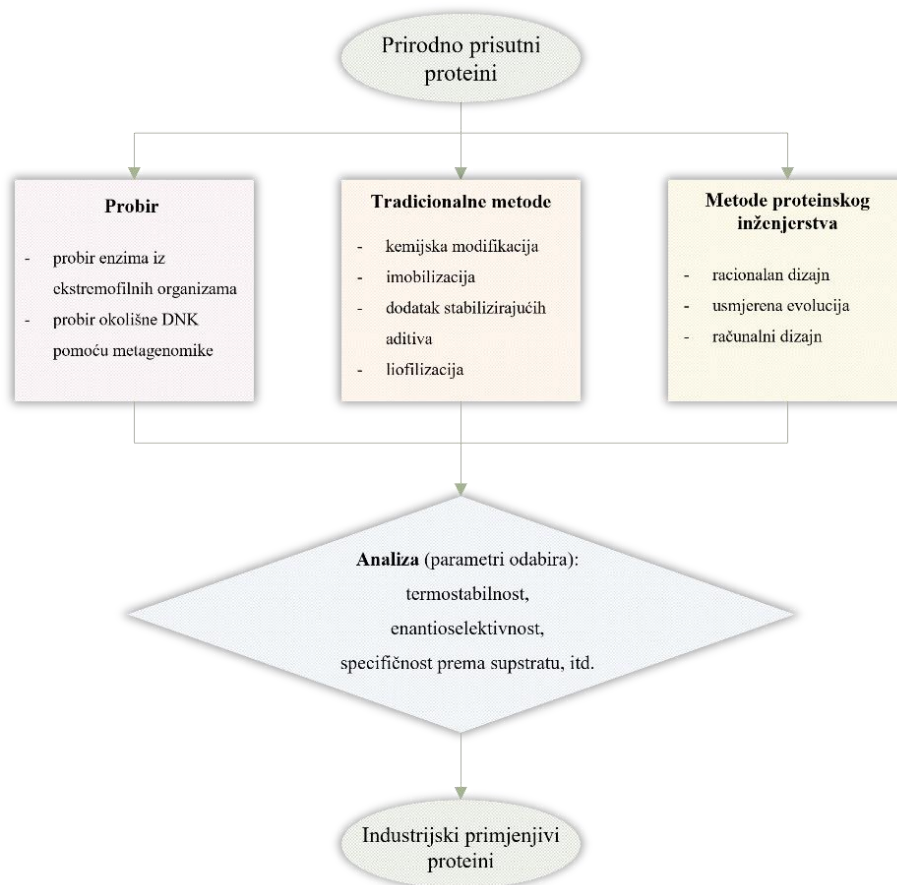
Tablica 2.2. Glavne prednosti i nedostaci biokatalizatora s obzirom na njihovu moguću primjenu u biotransformacijama u laboratorijskim ili industrijskim razmjerima [11]

Prednosti	Nedostaci
Visoka regio- i stereoselektivnost	Nestabilnost u vodenom mediju
Blagi reakcijski uvjeti i time niska potrošnja energije	Ovisnost mnogih enzima o kofaktoru
Niska količina nusprodukta	Deaktivacija u slučaju: - viših temperatura - ekstremnih pH vrijednosti - viših koncentracija soli - prisutnosti (polarnih) organskih otapala
Biorazgradivost	
Mogućnost pripreme u velikim količinama fermentacijom (mikrobni enzimi)	
Mogućnost ponovne upotrebe u procesu (imobilizacija)	
Mogućnost dizajniranja i prilagođavanja specifičnim potrebama, do određene mjere, metodama proteinskog inženjerstva	Inaktivacija u slučaju inhibicija supstratom, produktom, metalnim ionom, otapalom ili drugim potencijalnim inhibitorom prisutnim u reakcijskoj smjesi
Nisu otrovni ako se pravilno primijene	

Kako bi se savladala neka od navedenih ograničenja za industrijsku proizvodnju i komercijalnu primjenu, koriste se metode stabilizacije enzima, koje se općenito mogu podijeliti na:

- probir enzima iz ekstremofilnih organizama i njihovu izolaciju;
- proizvodnju stabilnih enzima u genetski manipuliranim mezofilnim organizmima;
- stabilizaciju nestabilnih enzima metodama poput proteinskog inženjerstva, kemijske modifikacije, imobilizacije i upotrebe aditiva [12].

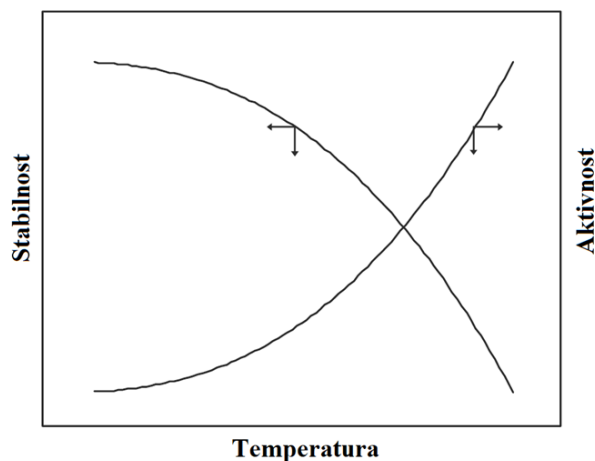
Navedenu podjelu ilustrira slika 2.2.



Slika 2.2. Metode stabilizacije enzima [9]

2.2.1. Termostabilnost enzima

Temperatura je najrelevantnija varijabla u bilo kojem biološkom sustavu, što se posebno odnosi na enzimske procese. Enzimi su labilni složeni proteini te njihova biokatalitička primjena najčešće uključuje neprirodne uvjete, u kojima se njihova izvorna svojstva mogu značajno promijeniti [13]. Povišenjem temperature povećava se brzina molekularnog kretanja, a time i brzina reakcije, no također dolazi i do progresivne inaktivacije enzima uzrokovane denaturacijom prirodne proteinske strukture [7]. Utjecaj temperature na stabilnost i aktivnost enzima shematski je prikazan na slici 2.3.

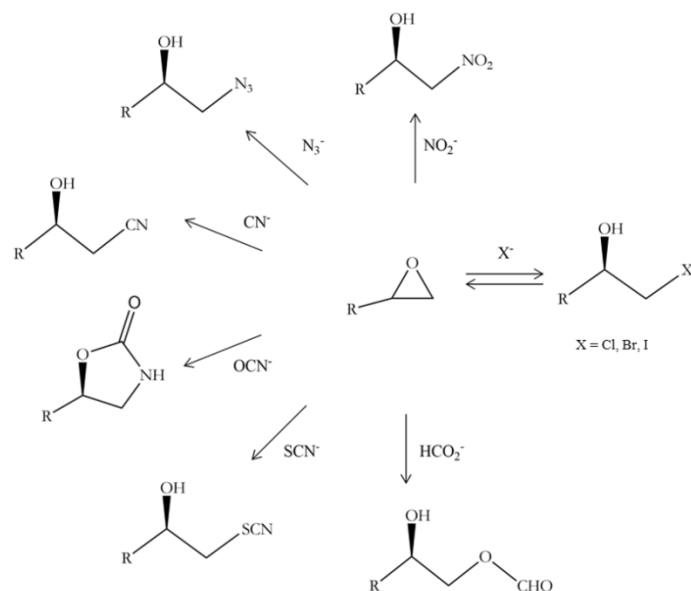


Slika 2.3. Utjecaj temperature na stabilnost i aktivnost enzima [13]

Prednosti primjene visoke temperature prilikom provođenja biokatalitičkih procesa su brojne. Na primjer, osim spomenute povećane brzine reakcije koja posljedično skraćuje trajanje biokatalitičkog procesa, uobičajena su i manja difuzijska ograničenja tj. otpor prijenosu tvari, niža viskoznost reakcijskog medija, te pomak u ravnoteži u slučaju endotermnih reakcija. Također, povišene temperature čine reakcijski medij manje pogodnim za rast i razvoj mikroorganizama, a smanjenje mogućnosti bakterijske kontaminacije od osobite je važnosti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji [12].

2.3. Halogenhidrin-dehalogenaze

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH, E.C. 4.5.1.-), poznate još pod nazivima haloalkohol-dehalogenaze, halohidrin-epoksidaze ili halohidrin hidrogen-halid liaze, pripadaju enzimskoj klasi liaza [14]. Ova skupina enzima katalizira uklanjanje halogenidnog iona i protona iz vicinalnog halohidrina stvarajući epoksidni prsten. Budući da se radi o reverzibilnoj reakciji, provođenjem reakcije u suprotnom smjeru moguće je otvoriti nukleofilni epoksidni prstena s halogenidnim ionima. Glavna sintetska vrijednost ove skupine enzima leži u njihovoj mogućnosti da iskoriste širok spektar neprirodnih nukleofila u reakcijama otvaranja epoksidnog prstena, poput azida, nitrita, cijanida, cijanata, tiocijanata, itd., stvarajući tako važne β -supstituirane alkohole te općenito 1,2-difunkcionalizirane spojeve [14,15,16]. Navedeno rezultira stvaranjem novih ugljik-ugljik, ugljik-dušik, ugljik-sumpor i ugljik-kisik veza, kao što je prikazano na slici 2.4.



Slika 2.4. Katalitički opseg halogenhidrin-dehalogenaza pri dehalogenaciji i otvaranju epoksidnog prstena [14]

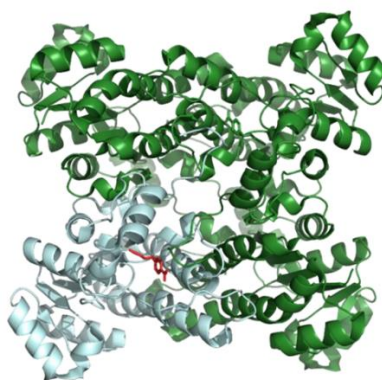
Neki od HHDH enzima pokazuju visoku regio- i enantioselektivnost u katalitičkim procesima, te kao takvi posjeduju veliki potencijal biokatalizatora u sintezi kiralnih epoksida i alkohola [15,17]. Nerijetko se koriste u farmaceutskoj i kemijskoj industriji za sintezu različitih prekursora, o čemu će biti više riječi u poglavlju 2.3.2. Iako su u prirodi i živim stanicama rijetko zastupljeni, imaju važnu ulogu u bioremedijaciji okolišnih sastavnica kroz razgradnju halogeniranih spojeva. Kako molekularna biologija i srodne znanosti napreduju, dostupnost ovih enzima je povećana te ne ovisi samo o izvorima iz prirodno prisutnih organizama. Jedan od načina dobivanja veće količine HHDH jest pomoću ekspresije u rekombinantnim stanicama bakterije *Escherichia coli* [16].

2.3.1. Podjela halogenhidrin-dehalogenaza

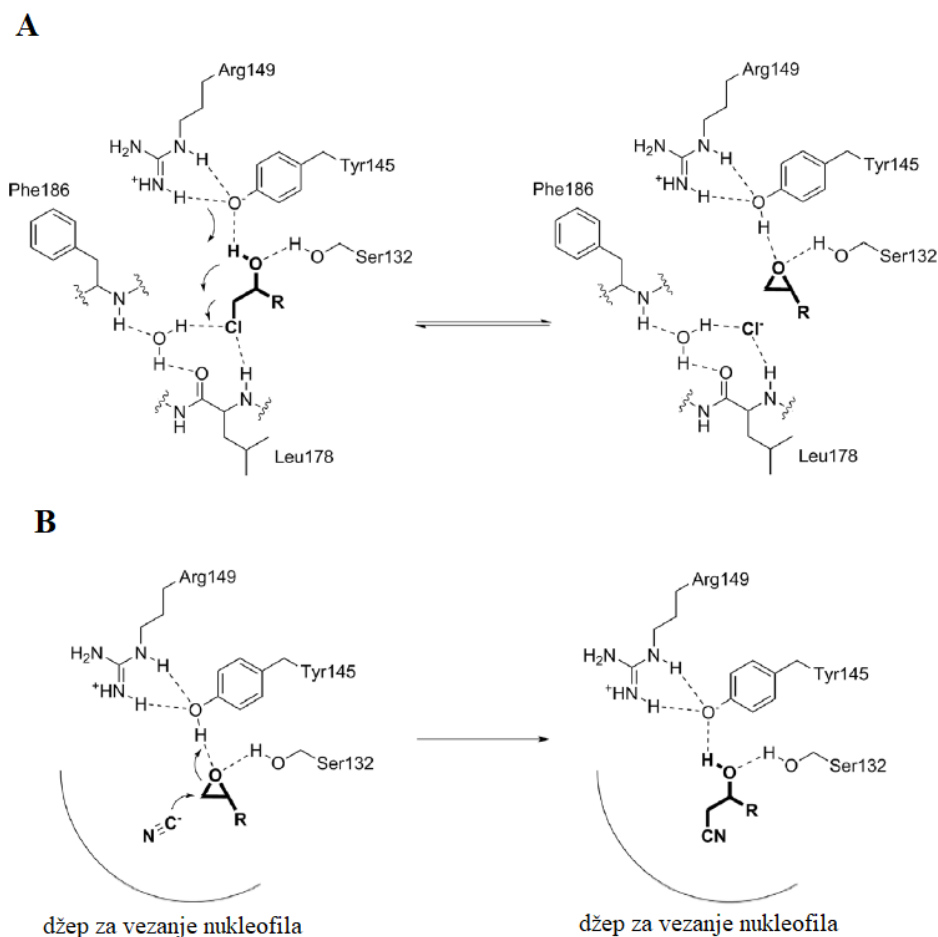
Postoji sedam različitih filogenetskih podtipova HHDH enzima, kojima su pripisana slova A-G [18,19]. Do ranih 2010-ih, svi su poznati predstavnici HHDH bili klasificirani u tri različita, ali povezana podrazreda, opisanih slovima A (HheA), B (HheB) i C (HheC) [16]. Enzimi HheA i HheB prihvaćaju sličan raspon supstrata, dok se HheC, dobiven iz *Agrobacterium radiobacter* AD1, značajno razlikuje. Zbog velikog sintetskog potencijala, ovaj predstavnik HHDH skupine enzima daleko je najviše proučavani član. U odnosu na HheA i HheB enzime, HheC pokazuje visoku β -regioselektivnost i (*R*)-enantioselektivnost u nukleofilnim reakcijama otvaranja prstena te veću enantioselektivnost prema industrijski

zanimljivim, aromatskih supstratima [16,20]. Prema postojećoj literaturi, donedavno se činilo da je HheC jedini divlji tip enzima koji pokazuje iznimno visoku enantioselektivnost, dok su drugi enzimi iz ove skupine smatrani neselektivnima ili umjereno enantioselektivnima. Dostupnost (*S*)-selektivnih enzima je slaba, ali se očekuje da će ovaj nedostatak uskoro biti prevladan tehnikama proteinskog inženjerstva [16].

Od novootkrivenih podrazreda HHDH, kojima su pripisana slova D-G, veliku je pažnju dobio HheG iz *Ilumatobacter coccineus* zbog bitnih razlika u opsegu prihvaćanja supstrata. Za razliku od drugih HHDH, ovaj predstavnik enzima u svoje aktivno mjesto prihvaća sterički zahtjevnije, cikličke epokside [21,22]. Na temelju strukturnih studija i rješavanja kristalnih struktura ovih proteina, otkriveno je da su svi poznati HHDH enzimi homotetrameri u svom aktivnom obliku, odnosno dimeri dimera sastavljeni od identičnih podjedinica molekulske mase od približno 28 000 g/mol (slika 2.5.). Nadalje, HHDH enzimi strukturno su srodni kratkolančanim dehidrogenazama/reduktazama, pri čemu je jedna od glavnih razlika njegova neovisnost o kofaktoru [18]. Umjesto kofaktorskog veznog mjesta, HHDH posjeduju prilično prostran nukleofilni džep koji prihvaća monovalentne nukleofile linearne geometrije. Za sve dosad poznate HHDH enzime karakteristična je katalitička trijada Ser-Tyr-Arg, odgovorna za reverzibilnu reakciju dehalogenacije koja se odvija prema S_N2 mehanizmu nukleofilne supstitucije (slika 2.6.) [23].



Slika 2.5. Tercijarna struktura enzima HheC iz *Agrobacterium radiobacter* AD1 u kompleksu s (*R*)-1-para-nitro-fenil-2-azido-etanolom pri Ser132/Try145/Arg149 katalitičkoj trijadi [24]



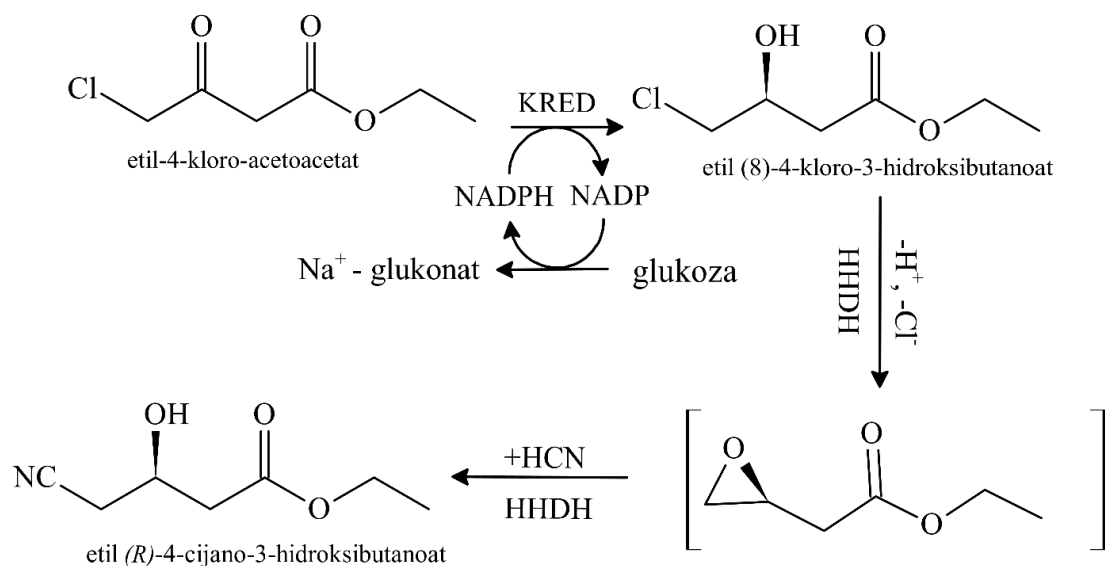
Slika 2.6. Mehanizmi reakcija kataliziranih pomoću HHDH: A. Dehalogenacija B. Otvaranje epoksidnog prstena [14]

2.3.2. Primjena halogenhidrin-dehalogenaza

HHDH enzimi se naširoko koriste u industriji za sintezu kiralnih epiklorhidrina. Epiklorhidrin je važan intermedijer u pripremi sintentske gume, epoksi smole, kemikalija u industriji papira te kao polazni materijal u proizvodnji površinski aktivnih tvari, adheziva, insekticida, poljoprivrednih kemikalija, premaza, ionsko-izmjenjivačkih smola, otapala, plastifikatora i farmaceutika. Osim toga, epiklorhidrin je temeljni gradivni blok bioloških aktivnih spojeva kao što su beta-adrenergički blokator (*S*)-atenolol i derivat aminokiseline (*R*)-karnitin [16].

Najznačajnija industrijska primjena HHDH leži u sintezi etil (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutanoata, čija je kaskadna sinteza prikazana na slici 2.7. Ovaj je spoj važan prekursor pri sintezi bočnog lanca atorvastatina, lijeka za snižavanje kolesterola, odnosno liječenje hiperkolesterolemije [17]. Atorvastatin je kompetitivni inhibitor HMG-CoA reduktaze i kao

takav interferira s korakom koji ograničava brzinu biosinteze kolesterola u jetri, a sastojak je lijeka Lipitor® tvrtke Pfizer [16,17]. Lipitor je ujedno i prvi lijek čija je godišnja prodaja prešla 10 milijardi američkih dolara [15].



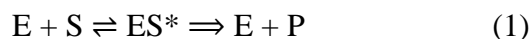
Slika 2.7. Kaskadna sinteza prekursora bočnog lanca statina etil (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutanoata [16]

Još jedna od važnijih primjena HHDH u području farmaceutske industrije je u proizvodnji antiviralnog lijeka (*S*)-cidofovira. Enzim se koristi za dobivanje (*S*)-glicidola, ključnog intermedijera u proizvodnji spomenutog lijeka. (*R,S*)-3-kloropropan-1,2-diol (3-CPD), prekursor ovog intermedijera, dobiva se korištenjem *Alcalignes* sp. DS-S-7G stanica koje eksprimiraju HHDH za kintetičku rezoluciju *rac*-3-kloropropan-1,2-diola pripremljenog iz 1,2:5,6-di-O-izopropiliden-D-manitola [25]. Osim za proizvodnju atorvastatina i (*S*)-cidofovira, HHDH se koristi i za proizvodnju raznih drugih lijekova poput simvastatina, pravastatina i lovastatina [25].

HHDH enzimi ne pronalaze samo široku sintetsku primjenu, već imaju i velik bioremedijacijski potencijal. S obzirom na široku primjenu halogeniranih spojeva u industrijskim procesima, oni neizbježno dopijevaju u okolišne sastavnice gdje prouzrokuju onečišćenje i predstavljaju opasnost. S ciljem smanjenja onečišćenja i s onečišćenjem povezanih rizika, potrebno je koristiti pouzdane i učinkovite metode pročišćavanja. Budući da su HHDH enzimi i prirodno uključeni u procese dehalogenacije opasnih halogeniranih spojeva, u ovom su području znanosti privukli veću pažnju za bioremedijaciju okolišnih sastavnica [17].

2.4. Reakcijsko inženjerstvo i kemijska kinetika

Enzimske reakcije uglavnom se opisuju pomoću Michaelis-Menteničine jednadžbe, koja omogućuje procjenu kinetike kemijske reakcije uz pretpostavku da se koncentracija enzima u samoj reakciji ne mijenja. Enzim reagira sa supstratom pri čemu dolazi do nastajanja kompleksa enzim-supstrat, preko kojeg dalje nastaje produkt. Mehanizam reakcije može se opisati pomoću jednadžbe 1.

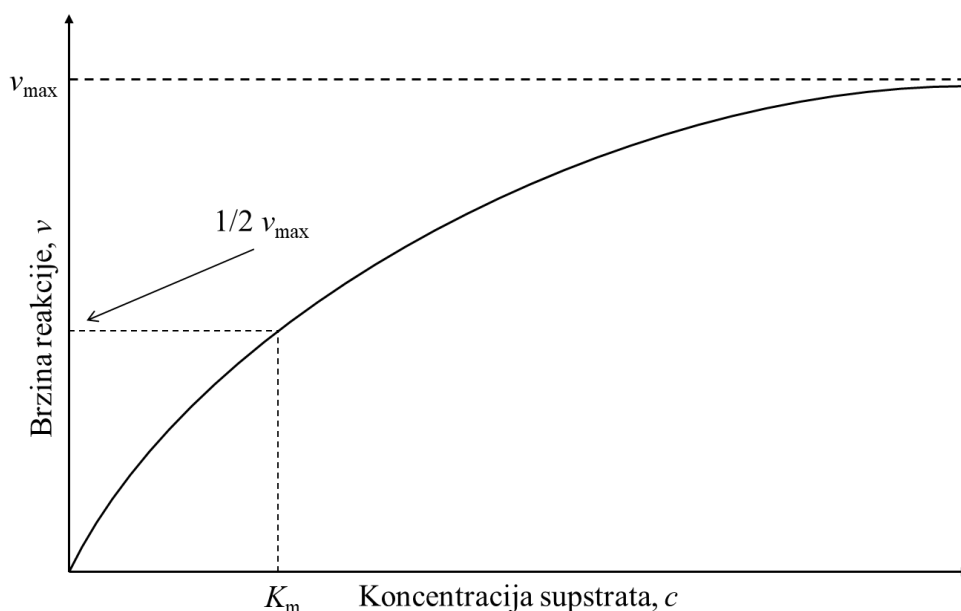


gdje je E enzim, S supstrat, ES* međukompleks enzim-supstrat, a P nastali produkt [26].

Sama Michaelis-Menten jednadžba se može prikazati:

$$r = \frac{V_{max} \cdot c}{K_m + c} \quad (2)$$

gdje je r brzina reakcije, c koncentracija supstrata, V_{max} maksimalna brzina reakcije, a K_m Michaelisova konstanta. Vrijednost V_{max} jednaka je brzini reakcije koja je proporcionalna količini aktivnog enzima, dok je vrijednost K_m konstante jednaka koncentraciji supstrata u trenutku kada brzina reakcije iznosi pola maksimalne vrijednosti. Vrijednost K_m neovisna je o koncentraciji enzima, no mijenja se ovisno o kombinaciji enzima i supstrata [27]. Vrijednost K_m nam govori o afinitetu enzima prema supstratu, te što je ona niža, afinitet je veći. Jedna od važnijih značajki Michaelis-Menteničine kinetike je da sam enzim postaje zasićen kod viših koncentracija supstrata. Zbog navedene značajke brzina reakcije, r , se ne povećava u beskonačnost s povećanjem koncentracije supstrata, već dolazi do određene kritične točke, V_{max} , nakon koje više ne raste [27]. Navedena pojava zorno je prikazana preko Michaelis-Menteničine krivulje na slici 2.8.



Slika 2.8. Michaelis-Menteničina krivulja

Kada se brzina reakcije, r , izjednači s maksimalnom mogućom brzinom reakcije, V_{\max} , sav enzim vezan je za supstrat u obliku enzim-supstrat kompleksa. Kod visokih koncentracija supstrata, brzina reakcije se približava konstantnoj maksimalnoj vrijednosti neovisno o samoj koncentraciji supstrata. U ovom području krivulje, gdje je koncentracija supstrata značajno viša od Michaelisove konstante ($c \gg K_m$), govorimo o području kinetike reakcije nultog reda. S druge strane, u području niskih koncentracija supstrata postoji približno linearna ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata. U ovom području krivulje, gdje je koncentracija supstrata značajno niža od Michaelisove konstante ($c \ll K_m$), govorimo o području kinetike reakcije prvog reda u odnosu na supstrat [27].

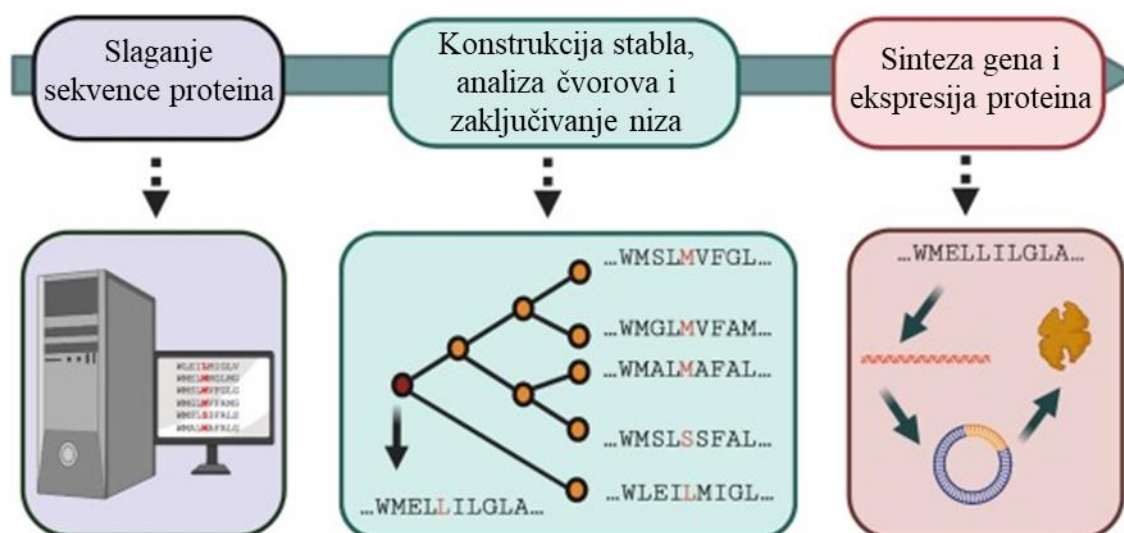
2.5. Rekonstrukcija drevnih proteina

Rekonstrukcija drevnih proteina (engl. *ancestor sequence resurrection* – ASR) je bioinformatička metoda koja uključuje izvođenje pretpostavki o genetskim sekvencama drevnih proteina na temelju sekvenci njihovih modernih potomaka [28]. Samu ideju rekonstrukcije genetskih sekvenci drevnih proteina na temelju usporedbe sekvenci postojećih proteina iznijeli su još davne 1963. godine E. Zuckerkandl i L. Pauling, no tehnologija potrebna za provođenje ASR metode posuđena je iz filogenetskih analiza, a prvi algoritam razvijen je tek osam godina kasnije, 1971. godine [29].

ASR metoda uključuje filogenetsku i statističku analizu koja se koristi jednostavnim modelima za opisivanje evolucije sekvence proteina, a daje najbolje rezultate u kombinaciji s

eksperimentalnim karakterizacijama odgovarajućih istraživanih proteina [28,29]. Takve analize omogućuju proučavanje i rješavanje problema koji se inače mogu smatrati nerješivima, a kao primjer, može se navesti primjena ASR metode za karakterizaciju drevnih proteina koji datiraju iz paleoarhejske ere, kao i za karakterizaciju svojstava različitih staništa. Nadalje, povijesni pristup na kojem se temelji ASR metoda omogućava identifikaciju aminokiselinskih ostataka ključnih za funkciju proteina, što često nije moguće samo usporedbom postojećih proteina [29]. Primjer strategije ASR metode prikazan je na slici 2.9. Uspoređujući strukturu i funkciju modernih i drevnih proteina, ASR metoda omogućava pronalaženje funkcionalno važnih razlika unutar obitelji proteina i može usmjeravati prema dizajnu novih varijanti. Sekvence drevnih proteina rekonstruiraju se proučavanjem i izvlačenjem zaključaka iz filogenetskog odnosa modernih homologa te primjenom statističkog modela supstitucije aminokiselina za izračunavanje sekvenci u unutarnjim čvorovima filogenetskog stabla [30]. Proteini kodirani rekonstruiranim sekvencama drevnih proteina mogu se pripremiti u laboratoriju i podvrgnuti eksperimentalnom ispitivanju. Tako umjetno pripremljeni proteini intenzivno se koriste za istraživanje važnih evolucijskih procesa i različitih hipoteza. Drevni proteini razlikuju se od svojih modernih inačica po sekvencama, a razlike su to veće što su drevni preci udaljeniji od modernih enzima u filogenetskom stablu. Razlike u sekvencama imaju za posljedicu i različita strukturna i funkcionalna svojstva. Drevni proteini bili su prilagođeni unutarstaničnim i izvanstaničnim okruženjima koja su se vrlo vjerojatno razlikovala od okruženja modernih proteina [28]. Velik broj provedenih istraživanja pokazao je značajna poboljšanja ciljanih svojstava kod laboratorijski rekonstruiranih drevnih proteina, koja uključuju poboljšanu termostabilnost ili jedinstvene profile aktivnosti [28,30]. Poboljšanje termostabilnosti proteina bez kompromitiranja aktivnosti ključno je kada se radi o industrijski ili medicinski korisnim proteinima koji moraju zadržati strukturu i aktivnost kroz dulje vrijeme. Nadalje, ASR metoda omogućuje znanstvenicima u području proteinskog inženjerstva da proučavaju i identificiraju sekvence funkcionalno važnih regija zaduženih za ciljne enzimske aktivnosti. Kada se ASR metoda provodi na funkcionalno divergentnim obiteljima proteina, može dati održive pretke proteina koji su multifunkcionalni, prihvaćaju širok spektar supstrata u kataliziranim reakcijama ili posjeduju jedinstvene aktivnosti koje moderni proteini ne posjeduju [30].

Strategija rekonstrukcije drevnih proteina



Slika 2.9. Primjer strategije metode rekonstrukcije drevnih proteina [31]

Ipak, jedan od većih nedostataka ove tehnologije je njezina ovisnost o filogenetskim stablima, što posljedično otežava analizu evolucije proteina za eru prije posljednjeg univerzalnog zajedničkog pretka (engl. *last universal common ancestor* – LUCA). LUCA predstavlja početnu točku filogenetskog stabla svih organizama koji danas žive, a procjena svojstava ovog organizma pomaže razumijevanje čak i ranijih koraka u podrijetlu života [32]. Iz tog razloga eksperimentalna simulacija ove vrlo rane faze evolucije zahtijeva alternativne pristupe, a koji ponovno kombiniraju *in silico* analize i karakterizaciju proteina [29].

Bitno je naglasiti kako će se ASR metoda dodatno usavršavati usporedno s razvojem računala veće računalne snage, koja će omogućavati implementaciju sofisticiranijih modela, a samim time i bolju i precizniju rekonstrukciju drevnih proteina zbog mogućnosti uporabe većeg broja sekvenci postojećih proteina [29].

2.5.1. Strategije rekonstrukcije sekvenci drevnih proteina

Prednosti ASR metode ovise o pouzdanosti izvedenih sekvenci drevnih proteina. Većina ASR metoda rekonstruira sekvence drevnih proteina uz pomoć pristupa maksimalne vjerojatnosti (ML), koji daje najbolju procjenu sekvence proteina [33].

ML-ASR metoda koristi Markovljev model vjerojatnosti procesa evolucije sekvence proteina za izračunavanje vjerojatnosti svakog mogućeg stanja drevnog proteina na svakom pojedinom mjestu u sekvenci za bilo koji interni čvor. Vjerojatnost stanja drevnih

aminokiselina na nekom mjestu definirana je kao vjerojatnost da bi sva stanja na tom mjestu pronađena u današnjim proteinima na vrhovima filogenetskog stabla evoluirala s obzirom na to stanje drevnog pretka, filogeniju i model. Posteriorna vjerojatnost (engl. *posterior probability* – PP) tog stanja može se zatim izraziti kao vjerojatnost navedenog stanja podijeljena sa zbrojem prethodno ponderiranih vjerojatnosti svih 20 mogućih stanja na tom određenom mjestu. Procjena ML vrijednosti stanja predaka je ona s najvećom prethodno ponderiranom vjerojatnošću. ML sekvenca je najbolja točkasta procjena prave sekvence drevnih proteina, ali rijetko omogućuje zaključivanje sa sigurnošću. U gotovo svim stvarnim slučajevima, rekonstruirana ML sekvenca sadržavat će dvosmislene zaključke o mjestima unutar sekvence proteina [33].

Druga strategija, koja je dosada korištena samo u nekoliko slučajeva, uvodi sva uvjerljiva alternativna stanja u jedan protein i zatim funkcionalno karakterizira protein kao protein u „najgorem mogućem slučaju“. Ova strategija naziva se AltAll rekonstrukcija. AltAll sekvenca sadrži više pogrešaka od bilo koje druge prihvatljive metode rekonstrukcije i tipično se mnogo više razlikuje od ML proteina nego što se očekuje od drevnog proteina. Karakterizacija proteina zbog toga predstavlja test funkcionalne otpornosti na nesigurnost sekvence: ako i ML i AltAll dovode do istog zaključka o funkciji drevnih proteina, pretpostavlja se da je točna sekvenca proteina ona koja najvjerojatnije leži između ovih sekvenci, no puno bliže ML sekvenci, a vjerojatno će također dijeliti i pretpostavljenu funkciju. Ovaj pristup se bavi potencijalnim epistatskim interakcijama između mogućih alternativnih stanja [33].

Treća strategija predstavlja korištenje Bayesovog uzorkovanja za konstruiranje skupa sekvenci odabirom stanja aminokiselina iz posteriorne distribucije vjerojatnosti stanja drevnih proteina na svakom mjestu. Ova strategija izračunava posteriornu distribuciju vjerojatnosti stanja sekvence drevnih proteina pripadajućih parametara modela koji su procijenjenih iz podataka maksimalnom vjerojatnošću, tako da predstavlja empirijsku Bayesovu, a ne potpuno Bayesovu metodu. Problem kod ove strategije je moguća proizvodnja nefunkcionalnih proteina: skup svih mogućih sekvenci proteina sadrži mnogo više sekvenci s vrlo niskom vjerojatnošću od sekvenci s visokom vjerojatnošću, a posebice kada je dvosmislenost u rekonstrukciji drevnih proteina visoka. Ukoliko je veća vjerojatnost da će pogreške rekonstrukcije proteina biti funkcionalno štetne nego korisne, može postojati pristranost prema nefunkcionalnim ili slabo funkcionalnim proteinima [33].

AltAll i Bayesov pristup korišteni su samo u manjem broju slučajeva, te stoga nije jasno koliko su općenito robusni funkcionalni zaključci dobiveni upotrebom ASR metoda za istodobno povezivanje više alternativnih stanja [33].

2.6. Hipoteze istraživanja i ciljevi rada

Ciljevi ovog rada rekonstrukcija su sekvenci i dobivanje drevnih proteina te ispitivanje njihovih svojstava, poglavito njihove stabilnosti zbog koje su i izrazito zanimljivi. Želi se ispitati temperaturna stabilnost dobivenih drevnih proteina, ali i njihova specifična aktivnost prema PNSHH supstratu, kao i njihova stabilnost prilikom inkubacije na različitim temperaturama. Ipak, najzanimljivije svojstvo drevnih proteina zasigurno je njihova temperaturna stabilnost.

Drevni proteini koji su rekonstruirani pomoću ASR-a često su temperaturno stabilniji od svojih modernih potomaka. Štoviše, nekoliko istraživanja u kojima je primijenjena ASR metoda rezultiralo je temperaturno stabilnijim varijantama proteina s poboljšanom aktivnošću u usporedbi s modernim analogima, što ih čini posebno korisnima za industrijske primjene [30]. Poboljšana temperaturna stabilnost drevnih proteina mogla bi se pripisati klimatskim uvjetima koji su vladali na Zemlji u vrijeme njihova postojanja. Gaucher i sur. otkrili su jasnu poveznicu između starosti Zemlje i stabilnosti drevnih proteina koji su u tim trenucima postojali na Zemlji, odnosno da su proteini bakterija, koje su živjele na početku prekambrijskog doba, stabilniji od proteina bakterija s kraja prekambrijskog doba. Navedena razlika u temperaturnoj stabilnosti odgovarala je promjenama temperature koje su predložene za prekambrijske oceane na temelju analiza izotopskog sastava prekambrijskog rožnjaka, koje su pokazale progresivno hlađenje oceana, od temperatura oko 70 °C prije 3,5 milijardi godina do 20 °C prije 800 milijuna godina. Ipak, ovisnost temperaturne stabilnosti drevnih proteina i uvjeta na Zemlji u trenutku njihova postojanja još uvijek nije u potpunosti znanstveno dokazana [34]

Visoka stabilnost drevnih proteina vrlo je pogodno svojstvo i s biotehnološkog gledišta, odnosno praktične primjene proteina. Poboljšana stabilnost važna je i jer doprinosi mogućnosti daljnjeg proteinskog inženjeringa, dopuštajući prihvaćanje destabilizirajućih, ali funkcionalno korisnih mutacija. Također, povećana stabilnost može poboljšati i farmakokinetiku proteinskih lijekova [28].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Rekonstrukcija sekvenci i dobivanje plazmida drevnih proteina

Rekonstrukcija predaka proteina provedena je u suradnji sa znanstvenicima na Institutu za molekularnu biotehnologiju Tehničkog Sveučilišta u Grazu (engl. *Institute for molecular biotechnology* – IMBT). Rekonstrukcija je provedena pomoću bioinformatičkog softvera *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 10.02) temeljenog na ML. Prvi korak, koji je prethodio rekonstrukciji stabla, a proveden je kao sastavni dio ovog studentskog istraživanja, bilo je prikupljanje podataka o svim danas poznatim HHDH enzimima. Aminokiselinske sekvence današnjih poznatih HHDH enzima pronađene su u odgovarajućoj bazi podataka (engl. *Protein Data Bank* – PDB). Sljedeći korak bila je izrada filogenetskog stabla na temelju poznatih aminokiselinskih sekvenci. Proces započinje višestrukim poravnavanjem aminokiselinskih sekvenci (engl. *multiple sequence alignment* – MSA). Unošenje više sekvenci u sustav prilikom izrade filogenetskog stabla rezultira detaljnijom rekonstrukcijom predaka. Osim ciljnog enzima i srodnih proteina, tijekom rekonstrukcije predaka potrebno je definirati vanjsku skupinu proteina, koje se uzima u obzir prilikom generiranja stabla, kao i prilikom poravnanja sekvenci. Vanjska skupina trebala bi biti ona skupina enzima koji nisu izravno povezani s ciljnim enzimom, ali su još uvijek bliski, uz homologiju sekvenci veću od 20 %. Prilikom odabira sekvenci koje se koriste za višestruko MSA, preporuča se odabrati sekvence s visokom homologijom i izbjegavati hipotetske proteine, duplikate kao i podjedinice enzima. Konstruirano filogenetsko stablo HHDH proteina prikazano je na slici 3.1. Plazmidi, tj. male kružne molekule deoksiribonukleinske kiseline (DNK) konstruirane su spajanjem okosnice plazmida pet-28a (+) i naručene sekvence koja kodira za dnevne proteine, a plazmidi su metodama elektroporacije uneseni u stanice *E. coli*. Takve stanice ustupljene su našoj istraživačkoj skupini od strane suradnika s IMBT za ekspresiju, pročišćavanje i karakterizaciju drevnih proteina.

3.2. Popis korištenih kemikalija

Prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada, korištene su kemikalije navedene u tablici 3.1. zajedno s pripadajućim proizvođačima.

Tablica 3.1. Popis kemikalija korištenih u radu.

Kemikalija	Pokrata ili simbol	Proizvođač
2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer	Tris-SO ₄	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Acetonitril	ACN	Fisher Scientific, SAD
Akrilamid		Acros Organics, Belgija
Albumin govedeg seruma (engl. <i>bovine serum albumin</i>)	BSA	Honeywell Fluka, SAD
Amonijev persulfat	APS	Fisher Scientific, SAD
Bromfenolpravo (engl. <i>bromophenol blue</i>)	BPB	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Coomassie Brilliant Blue G-250	CBB	Honeywell Fluka, SAD
Glicerol		Gram-mol d.o.o., Hrvatska
Hranjivi agar		Carl Roth, Njemačka
Kanamicin		Carl Roth, Njemačka
Luria-Bertani hranjiva podloga	LB hranjiva podloga	Carl Roth, Njemačka
Metanol	MetOH	Fisher Scientific, SAD
<i>N,N'</i> -metilenbisakrilamid	MBAm	Fisher Scientific, SAD
Natrijev dodecil sulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)	SDS	Carl Roth, Njemačka
Octena kiselina	CH ₃ COOH	Fisher Scientific, SAD
Proteazni inhibitor		Roche, Švicarska
Tetrametiletildiamin	TEMED	TCI Europe N.V., Belgija
β-merkaptetanol		Honeywell Fluka, SAD
SYPRO Orange		Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Trifluoroctena kiselina (engl. <i>trifluoroacetic acid</i>)	TFA	Fisher Scientific, SAD

Komercijalno nedostupne kemikalije *para*-nitro-2-brom-1-feniletanol (PNSHH) i 2-(4-nitrofenil)oksiran (PNSO) sintetizirani su ranije u Laboratorij za stereoselektivnu sintezu i biokatalizu u Zavodu za organsku kemiju i biokemiju pri Institutu Ruđer Bošković.

3.3. Proizvodnja rekombinantnih proteina u stanicama *Escherichia coli*

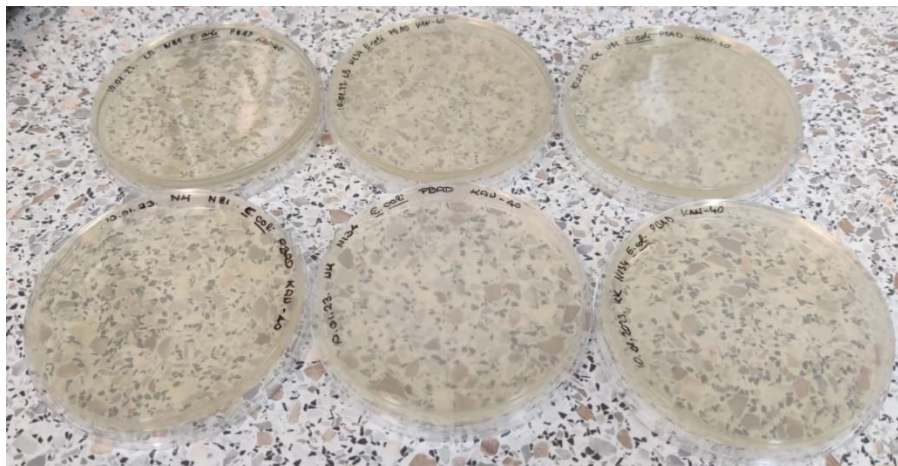
3.3.1. Priprema tekućih i krutih hranjivih podloga

Rekombinantni proteini izoliraju se i pročišćavaju iz genetski modificiranih stanica *E. coli*. Prije nego se krene s pripremom malih prekonoćnih kultura potrebno je pripremiti 250 mL tekuće hranjive podloge Luria-Bertani (LB) koncentracije 20 g/L u Schott boci. 150 mL

tako pripremljene tekuće hranjive podloge prelije se u drugu Schott bocu u koju se potom doda 2,25 g agara kako bi koncentracija agara u hranjivoj podlozi bila 15 g/L. Smjesa se homogenizira na magnetskoj miješalici. Homogena smjesa, kao i ostatak tekuće hranjive podloge zatim se sterilizira vlažnom sterilizacijom u autoklavu pri temperaturi 121 °C i tlaku 1 bar tijekom 20 minuta, a nakon sterilizacije hranjive podloge ostave se na sobnoj temperaturi radi hlađenja, pri čemu je potrebno paziti da ne očvrnu. Kada su se dovoljno ohadile, u hranjive podloge doda se 60 µL otopine kanamicina koncentracije 100 mg/mL (koncentracija kanamicina u hranjivoj podlozi treba biti 40 µg/mL). Budući da stanice *E. coli* koje nose uputu za sintezu HHDH proteina nose i gen za rezistentnost na kanamicin, ovaj antibiotik se dodaje u hranjive podloge kako bi se spriječio rast drugih, neželjenih mikroorganizama. Tako dobivena smjesa potom se razlije u Petrijeve zdjelice i ostavi na sobnoj temperaturi kako bi očvrsnula. Ukoliko se bakterijske kulture ne nacjepljuju isti dan, Petrijeve zdjelice s krutom hranjivom podlogom potrebno je zamotati u aluminijsku foliju i pospremiti u hladnjak do korištenja, pri čemu ih je potrebno postaviti poklopcem okrenutim prema dolje, kako se kondenzat ne bi sakupljao na samoj podlozi već u poklopcu.

3.3.2. Izolacija pojedinačnih bakterijskih kultura

Nakon što hranjiva podloga očvrсне, može se krenuti s nacjepljivanjem bakterijskih kultura. Bakterijske kulture nacjepljuju se u sterilnim uvjetima rada metodom iscrpljivanja. Svaku bakterijsku kulturu potrebno je nacijepiti na po dvije Petrijeve zdjelice, koje se zatim označe i poklopcem prema dolje pohrane na inkubaciju 24 sata pri 37 °C. Označene Petrijeve zdjelice s nacijepljenim rekombinantnim kulturama *E. coli* prikazane su na slici 3.1. Ukoliko su se Petrijeve zdjelice s krutom hranjivom podlogom čuvale u hladnjaku, prije nego se počne s nacjepljivanjem potrebno ih je ostaviti da se zagriju do sobne temperature.



Slika 3.1. Označene Petrijeve zdjelice s nacijepljenim rekombinantnim kulturama *E. coli*

3.3.3. Priprema malih prekonoćnih kultura

Male prekonoćne kulture pripremaju se kako bi se postigla dovoljno velika optička gustoća, koja upućuje na zadovoljavajući rast bakterijskih stanica. U prethodno steriliziranu Erlenmeyer tikvicu od 200 mL dodano je 20 mL tekuće LB hranjive podloge, 8 μ L temeljne otopine kanamicina kako bi mu konačna koncentracija bila 40 μ g/mL te nacijepiti od dvije do pet pojedinačnih kolonija bakterijske kulture izraslih na krutoj hranjivoj podlozi. Na tako pripremljene Erlenmeyerove tikvice zatim se stavlja ubrus i gumica, a aluminijsku foliju potrebno je izbjegavati zbog potrebe za izmjenom plinova između sustava i okoline. Tako nacijepljene kulture ostavljaju se preko noći u termostatoranoj tresilici na inkubaciji pri 37 °C i 250 okr/min.

3.3.4. Prekomjerna ekspresija željenih proteina

Kako bi se mogla provesti prekomjerna ekspresija željenih proteina prvo je potrebno pripremiti autoindukcijski medij. Autoindukcijski medij omogućuje brzu i selektivnu ekspresiju željenih proteina, uz minimalnu potrebu za nadgledanjem rasta bakterijskih stanica [35]. U praškastu hranjivu podlogu doda se 3,2 mL glicerola, a zatim se tako dobivena smjesa otopi u 900 mL ultračiste vode. Homogena smjesa (hranjiva podloga) potom se podijeli u dvije Erlenmeyer tikvice od 2 L s razbijačima vrtloga te sterilizira.

U tako pripremljene sterilizirane Erlenmeyer tikvice s hranjivom podlogom doda se 200 μ L temeljne otopine kanamicina do konačne koncentracije 40 μ g/mL te 10 mL prethodno pripremljene male prekonoćne bakterijske kulture, pokriju se ubrusom i ostave 24 h na inkubaciji pri 25 °C i 200 okr/min. Na slici 3.2. prikazane su Erlenmeyer tikvice po završetku inkubacije.



Slika 3.2. Erlenmeyer tikvice s razbijačima vrtloga nakon inkubacije

Nakon inkubacije, 500 mL smjese s bakterijskim kulturama iz svake Erlenmeyerove tikvice odijeli se u dvanaest Falcon epruveta koje se zatim centrifugiraju 15 minuta pri 5000 okr/min. Odijeljeni nadtalози (ostatak hranjive podloge s bakterijskim metabolitima) se zbrinjavaju sterilizacijom, a talози (bakterijske stanice) spremaju se u zamrzivač pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Talози se ostavljaju u zamrzivaču preko noći, kako bi uslijed zamrzavanja vode koja se nalazi u stanicama došlo do narušavanja samog integriteta stanica, što pomaže kod naknadne izolacije proteina.

3.3.5. Izolacija rekombinantnih proteina

Prije izolacije proteina potrebno je pripremiti 1 L pufera A (50 mmol/L Tris-SO₄ pufer, 500 mmol/L Na₂SO₄, 30 mmol/L imidazol, pH 7,9) te 1 L pufera B (50 mmol/L Tris-SO₄ pufer, 500 mmol/L Na₂SO₄, 500 mmol/L imidazol, pH 7,9). Taloge (bakterijske stanice) koji su pohranjeni pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ potrebno je odlediti i resuspendirati u puferu A. U tako resuspendirane taloge zatim se dodaje 400 μL proteaznog inhibitora na 20 mL pufera. Otopina proteaznog inhibitora dobije se otapanjem tablete proteaznog inhibitora (spoj koji inhibira enzimsku razgradnju proteina) u 2 mL ultračiste vode. Proteazni inhibitor je potreban kako proteaze,

enzimi prirodno prisutni u stanicama *E. coli*, ne bi razgradili ciljane HHDH proteine. Dobivena smjesa resuspendiranih stanica i proteaznog inhibitora zatim se pomiješa u čaši s dvostrukom stijenkom za izmjenu topline te se provede proces stanične lize sonifikacijom, čiji cilj je izolacija rekombinantnih proteina iz bakterijskih stanica. Uvjeti sonifikacije dani su u tablici 3.2., dok je uređaj za sonifikaciju ultrazvuk Bandelin SONOPULS prikazan na slici 3.3.



Slika 3.3. Uređaj za sonifikaciju – ultrazvuk Bandelin SONOPULS

Tablica 3.2. Uvjeti sonifikacije na ultrazvuku Bandelin SONOPULS

Amplituda	62 %
Vrijeme trajanja sonifikacije	3 minute
Ultrazvučni puls	Svakih 10 sekundi

Pri procesu sonifikacije važno je uzorke (resuspendirane bakterijske stanice) držati u hladnim uvjetima, što se može postići uranjanjem čaše s dvostrukom stijenkom u kockice leda. Također, sonifikacija se provodi uz pulsiranje svakih 10 sekundi s pauzama od 10 sekundi, kako se smjesa ne bi pregrijala, što bi posljedično dovelo do neželjene denaturacije proteina. Nakon što je završen proces sonifikacije, suspenzija se prebaci iz čaše za sonificiranje u Eppendorf epruvete od 2 mL koje se centrifugiraju 40 minuta pri 11000 okr/min. Centrifugiranje se provodi kako bi se stanični ostatci odvojili od sirovog enzimskog ekstrakta. Nakon centrifugiranja, nadtaloge je potrebno spojiti u čašu kako bi se homogenizirali, izmjeri

se volumen i profiltrira se kroz filter veličina pora 0,45 μL , a talozi se zbrinjavaju sterilizacijom. Nadtalog predstavlja sirovi enzimski ekstrakt koji se sastoji od ciljanog HHDH enzima, ali i svih drugih proteina proizvedenih u stanicama *E. coli*.

3.3.6. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom

Afinitetna kromatografija vrsta je tekućinske kromatografije u kojoj se biološki agens ili biomimetički ligand koristi za selektivno zadržavanje komplementarnih spojeva. Ona je relativno jednostavna za izvođenje te predstavlja moćan alat za odvajanje bioloških makromolekula, a igra i važnu ulogu u analizi i proučavanju bioloških sustava [36].

Pročišćavanje afinitetnom kromatografijom provedeno je kako bi se HHDH proteini odvojili od ostalih proteina uzgojenih u stanicama *E. coli*. Prije nego se krene s pročišćavanjem HHDH proteina, potrebno je pripremiti tri pufera različitih koncentracija imidazola. Puferi se pripremaju miješanjem pufera A i B prema sljedećem receptu:

- za dobivanje 50 mL pufera A sa 100 mmol/L imidazola potrebno je pomiješati 42,5 mL pufera A i 7,5 mL pufera B u Falcon epruveti od 50 mL,
- za dobivanje 50 mL pufera A sa 200 mmol/L imidazola potrebno je pomiješati 31,9 mL pufera A i 18,1 mL pufera B u Falcon epruveti od 50 mL,
- za dobivanje 50 mL pufera A sa 400 mmol/L imidazola potrebno je pomiješati 10,6 mL pufera A i 39,4 mL pufera B u Falcon epruveti od 50 mL.

Za pročišćavanje proteina koristi se HisTrap kolona kapaciteta 1 mL (slika 3.4.). Prije ekvibracije kolone, odnosno nanošenja uzorka potrebno je isprati kolonu s 10 mL ultračiste vode. Nakon što je kolona isprana može se pristupa se ugađanju uvjeta za separaciju proteina, koja se u ovom slučaju provodi ispiranjem s 5 mL pufera A. Nakon što je svih 5 mL pufera A prošlo kroz kolonu, na kolonu se dva puta nanosi filtrirani stanični lizat (lizat se skuplja na izlazu iz kolone u Falcon epruvetu te se ponovno nanosi na kolonu). Potom se kolona ispiri s 5 mL pufera A, te se može krenuti s eluiranjem proteina puferom A različitih koncentracija imidazola i to navedenim redoslijedom:

- 1) Eluirati s 3 mL pufera A sa 100 mmol/L imidazola
- 2) Eluirati s 5 mL pufera A sa 200 mmol/L imidazola
- 3) Eluirati s 3 mL pufera A sa 500 mmol/L imidazola

Pri svim koncentracijama imidazola skupljaju se volumeni frakcija od 1 mL u zasebne Falcon epruvete. Nakon eluiranja s puferom A, kolonu je potrebno isprati s 10 mL pufera B, kako bi se odstanili svi proteini vezani na kolonu, na način da se 5 frakcija volumena 1 mL skupi u zasebne Falcon epruvete, a ostatak pufera B na izlazu iz kolone u jednu Falcon epruvetu. Korištenu kolonu je moguće koristiti višekratno, no potrebno ju je uvijek nakon upotrebe isprati od eventualno zaostalih proteina.



Slika 3.4. HisTrap kolona za pročišćavanje HHHH proteina afinitetnom kromatografijom

3.4. Metode karakterizacije dobivenih rekombinantnih proteina

3.4.1. Razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil sulfata

Elektroforeza se definira kao migracija nabijenih čestica kroz naponski potencijal, a kod proteina služi za njihovo odvajanje i pročišćavanje na temelju razlika u veličini, naboju ili strukturi [37,38]. Prije nego se može krenuti s elektroforezom potrebno je pripremiti gelove, pufere i uzorak.

Gelovi za elektroforezu pripremaju se u za to posebno izrađenim kalupima, a sastavljaju se kako je prikazano na slici 3.5. Nakon što je sastavljena aparatura, odnosno kalupi za polimerizaciju gelova, može se pristupiti pripremi gelova. Prvo se priprema gel za razdvajanje (*resolving/running gel* – RG) na način da se pomiješaju ultračista voda, pufer i otopina akrilamida te se u tako pripremljenu otopinu dodaju SDS, APS i TEMED prema omjerima danima u tablici 3.3. Otopina se zatim homogenizira i slijedi punjenje kalupa.



Slika 3.5. S lijeve strane prikazan je kalup za gelove sastavljen od neprozirnog i prozirnog stakalca, češljica i razmaknice; s desne strane prikazan je isti kalup fiksiran u postolju za polimerizaciju gelova.

Tablica 3.3. Maseni udjeli pojedinih tvari u otopini potrebnih za pripremu gela za razdvajanje-a (RG) – jedan gel

Tvar	w / %
H ₂ O	33,5
1,5 mol/L Tris pH 8,8	25,0
Akrilamid 30 %	40,0
Natrijev dodecil sulfat (SDS) 10 %	1,00
Amonijev persulfat (APS) 10 %	0,50
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	0,05

Otopinu gela za razdvajanje je nakon pripreme potrebno u što kraćem roku prebaciti u kalupe za polimerizaciju, zbog izrazito kratkog vremena polimerizacije. Nakon što je sve otopina prebačena u kalupe, pri čemu je potrebno paziti da se ne stvaraju mjehurići zraka, gel se ostavi 30-ak minuta kako bi polimerizirao. Nakon što je proces polimerizacije završio, izlije se zaostala voda nakon polimerizacije te se vrh gela posuši papirnatim ubrusom. Potom slijedi priprema drugog sloja gela, tzv. gela za koncentriranje (engl. *stacking gel* – SG), povrh gela za razdvajanje.

Gel za koncentriranje priprema se na isti način kao i gel za razdvajanje, no s nešto drugačijim volumnim udjelima pojedinih komponenti. Maseni udjeli za gel za koncentriranje prikazani su u tablici 3.4.

Tablica 3.4. Maseni udjeli pojedinih tvari u otopini potrebni za pripremu gela za koncentriranje (SG) – jedan gel

Tvar	w / %
H ₂ O	0,602
0,5 mol/L Tris pH 6,8	0,247
Akrilamid 30 %	0,130
Natrijev dodecil sulfat (SDS) 10 %	0,0099
Amonijev persulfat (APS) 10 %	0,0099
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	0,0010

Kao i otopinu za pripremu gela za razdvajanje, otopinu za pripremu gela za koncentriranje također je potrebno, zbog izrazito kratkog vremena polimerizacije, u što kraćem roku nanijeti u kalupe za polimerizaciju. Kada je otopina prebačena u kalupe do ruba urezane ploče, oprezno se umetnu češljici za stvaranje jažica za punjenje uzorka, te se gel ostavi 30-ak minuta kako bi polimerizirao. Nakon polimerizacije, ako se elektroforeza ne provodi isti dan, gel je potrebno prelitati vodom, spremiti u vrećicu i u hladnjak, kako se ne bi posušio.

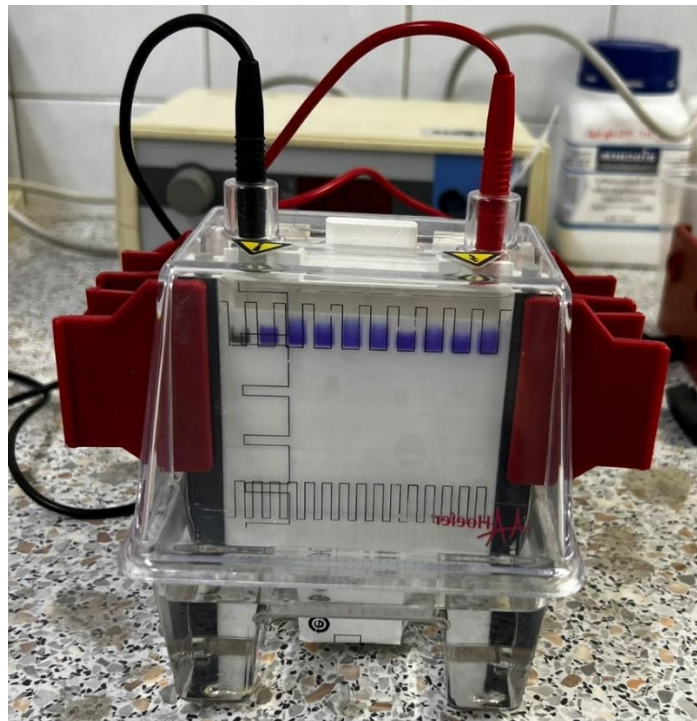
Nakon što su gelovi pripremljeni, priprema se pufer za elektroforezu i pufer za pripremu uzoraka. Pufer za elektroforezu priprema se miješanjem 30,29 g Tris-SO₄ (c = 0,25 mol/L), 144,13 g glicerola i 10 g SDS ($\gamma = 10$ g/L) u 1L ultračiste vode. Pufer za pripremu uzoraka priprema se miješanjem 2,5 mL glicerola, 2 mL 10 % SDS ($\gamma = 10$ g/L), 1,25 mL Tris-SO₄ pufer pH = 6,8 (c = 0,5 mol/L), 0,2 mL 10 % otopine bromfenolplavo ($\gamma = 10$ g/L) te se do 9,5 mL nadopuni ultračistom vodom. Prije upotrebe, temeljnu otopinu pufera za elektroforezu potrebno je razrijediti deset puta.

Prije nego se krene s pripremom uzoraka, 950 μ L pufera za pripremu uzoraka se u digestoru pomiješa s 50 μ L β -merkaptetanola. Zatim se u Eppendorf epruvetama uzorak proteina pomiješa s tako prethodno pripremljenim puferom u omjeru 1:1. Pripremljeni uzorci centrifugiraju se 1 minutu na ručnoj centrifugi, nakon čega se inkubiraju 10 minuta pri 95 °C, tijekom čega se odvija denaturacija uzoraka. Nakon 10 minuta, uzorci se ponovno centrifugiraju 1 minutu, nakon čega su spremni za punjenje jažica gelova.

Zatim se sastavi aparatura za elektroforezu. Na stakleni dio kalupa za gel zalijepi se prozirni papir s uzorkom jažica te se poravna prema samim jažicama u gelu. Isti služi kako bi se jažice lakše uočile tijekom samog nanošenja uzorka. Prostor iznad gela napuni se s puferom za elektroforezu, kao i gornja komora za pufer, pri čemu se puni samo ona komora u kojoj se nalazi gel. Zatim se kreće na punjenje jažica pomoću pomoću injekcijske igle. Jažicu predodređenu za uzorak standarda proteina puni se s 5 μ L otopine, dok se ostale jažice pune s

po 10 μ L uzorka. Nakon što su jažice napunjene s uzorcima, donja komora napuni se s oko 250 mL pufera i jedinica za elektroforezu poklopi se poklopcem. Može se krenuti s provođenjem same elektroforeze.

Jedinica za elektroforezu priključi se na izvor struje te se prvih 10 min provodi pri 100 V, a zatim se napon poveća na 200 V. Elektroforeza se provodi oko 45 min, odnosno dok se crta s uzorcima ne spusti gotovo do dna stakalca i prestane kretati. Slika 3.6. prikazuje sastavljenu aparaturu za elektroforezu s uzorcima nanesenim na gel.



Slika 3.6. Sastavljena aparatura za elektroforezu s uzorcima i standardom nanešenim na gel. Na prvu jažicu nanesen je uzorak standarda, dok su na ostatak nanesen uzorci proteina.

Nakon što je elektroforeza završila, isključi se napajanje struje, jedinica se odspoji i rastavi, te se izvadi i oslobodi gel. Nježno se izvade razdvajači između stakalca te se gel podigne i premjesti u kadicu u kojoj je prethodno pripremljena otopina za bojanje. Otopina za bojanje priprema se miješanjem 50 mL metanola, 7 mL octene kiseline, 43 mL ultračiste vode te u tako dobivenoj tekućoj smjesi otapanjem 0,1 g Coomassie Brilliant Blue boje.

Bojanje gelova provodi se u digestoru na tresilici pri 100 okr/min, a samo bojanje traje oko sat vremena. Nakon što su se gelovi obojali, otopina od bojanja zbrine se u za to predviđen otpad i umjesto nje se u kadice s gelovima ulije 10 %-tna octena kiselina. Tako potopljeni gelovi ostave se na tresilici na istim uvjetima kao i kod bojanja; povremeno se prati otopina

octene kiseline, a ukoliko se zasitila plavom bojom potrebno ju je zamijeniti. Odbojavanje se vrši sve dok na gelu ne postanu vidljive linije proteina.

3.4.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu uključuje izradu baždarnog pravca mjerenjem apsorbancije referentnog proteina BSA različitih poznatih koncentracija te zatim mjerenjem apsorbancije ciljanog proteina nepoznate koncentracije. Prije nego se može započeti s izradom baždarnog pravca potrebno je pripremiti otopinu BSA. Priprema se otopina BSA koncentracije 1 mg/mL, pri čemu je potrebno provjeriti apsorbanciju pripremljene otopine u kvarcnoj kiveti na spektrofotometru pri 280 nm, koja treba iznositi 0,660. Temeljnu otopinu zatim se razrijedi deset puta, kako bi koncentracija BSA iznosila 0,1 mg/mL, nakon čega se 18 plastičnih kiveta napuni ultračistom vodom te se izmjeri i zapiše njihova apsorbancija pri 450 nm i 595 nm. Kivete se isprazne te se u njih redom, u po tri kivete, dodaje 500 µL razrijeđene otopine BSA koncentracija 0 mg/L (dodaje se samo ultračista voda), 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L i 20 mg/L. U kivete se zatim redom s razmakom od 10 sekundi dodaje 500 µL Bradford reagensa, kivete se kratko homogeniziraju na homogenizatoru i ostave na inkubaciji 10 minuta. Po isteku 10 minuta mjeri se apsorbancija pri 450 nm i 595 nm te se iz dobivenih podataka konstruira baždarni pravac. Primjer tako dobivenog baždarnog pravca prikazan je u prilogu 1.

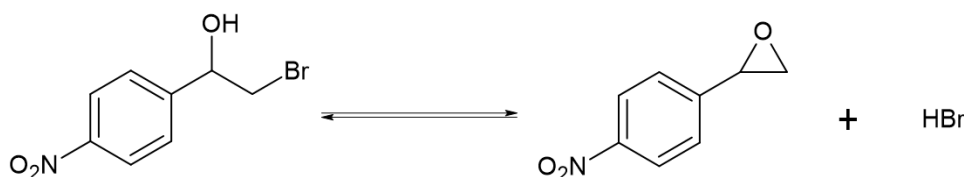
Zatim se mjerenjem apsorbancije proteina nepoznate koncentracije, pomoću dobivenog baždarnog pravca, može odrediti njihova koncentracija. Postupak mjerenja isti je kao i kod izrade baždarnog pravca, no umjesto različitih koncentracija BSA, u po tri kivete se dodaje po 500 µL razrijeđenog proteina, tako da konačna koncentracija upada u područje baždarnog pravca.

3.4.3. Mjerenje enzimске kinetike u reakciji zatvaranja p-nitro-2-bromo-1-feniletanola (PNSHH)

Mjerenje enzimске kinetike podrazumijeva mjerenje brzine nastajanja produkta, odnosno povećanja koncentracije produkta ili smanjenje koncentracije supstrata u reakcijskom sustavu. U ovom radu određivanje kinetike reakcije provedeno je metodom početnih reakcijskih brzina, odnosno uzorkovanja su provedena u prvih 10 % konverzije supstrata pri čemu ne dolazi do izražaja potencijalno prisutna inhibicija produktom ili nusproduktom, kao niti vremenski ovisna deaktivacija enzima.

Prilikom kinetičkih mjerenja, postoje dva načina mjerenja koncentracija – prvi način uključuje mjerenje koncentracije produkta zaustavljanjem reakcije u određenim trenucima, dok drugi način uključuje mjerenje koncentracije nastalog produkta bez zaustavljanja reakcije. U ovom radu enzimska kinetika mjeri se na prvi način, dakle metodom u kojoj se zaustavlja reakcija, pri čemu je potrebno odvajanje produkta od neizreagirano supstrata i njihovo kvantificiranje. Produkt se odvaja nekom od separacijskih metoda koje uključuju kromatografiju, npr. tankoslojnu kromatografiju (engl. *thin-layer chromatography* – TLC) ili tekućinsku kromatografiju visokog učinka (engl. *high-performance liquid chromatography* – HPLC), topljivost i različite postupke raspodjele. Za zaustavljanje reakcije koriste se kemikalije koje denaturiraju enzim, poput jake kiseline, lužine ili deterdženta, toplina ili različiti tretmani ireverzibilnim inhibitorima kao što su ioni teških metala. U nekim slučajevima enzimska aktivnost se može zaustaviti dodatkom sredstva za stvaranje kompleksa kao što je etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid* - EDTA), koja uklanja metalne ione neophodne za aktivnost enzima [39].

Kao supstrat kod mjerenja enzimске aktivnosti koristi se racemična smjesa *p*-nitro-2-bromo-1-feniletanola (PNSHH), pri čemu u prisustvu HHDH enzima dolazi do zatvaranja epoksidnog prstena te nastajanja 2-(4-nitrofenil)oksidirana (PNSO). Navedena reakcija prikazana je na slici 3.7.



Slika 3.7. Reakcija zatvaranja *para*-nitro-2-bromo-1-feniletanola (PNSHH) i nastajanja 2-(4-nitrofenil)oksidirana (PNSO)

Prije nego se može krenuti s PNSHH testom enzimске aktivnosti, potrebno odrediti koncentraciju proteina putem metode po Bradfordu opisane u poglavlju 3.5.2., kako bi se na temelju određene koncentracije mogla pripremiti primjerena razrjeđenja proteina. Nakon što su pripremljena razrjeđenja može se pristupiti samom PNSHH testu. Utjecaj koncentracije PNSHH na specifičnu enzimsku aktivnost ispituje se na način da se provodi niz reakcija, pri čemu se u svakoj reakciji koristi druga koncentracija PNSHH. Različite koncentracije PNSHH pripremaju se iz temeljne otopine PNSHH čija koncentracija iznosi 500 mmol/L. U tablici 3.5. prikazan je sastav reakcijske smjese za provedena mjerenja. Redom se u Eppendorf epruvetu,

koja služi kao reaktor, dodaje Tris-SO₄ pufer, temeljna otopina PNSHH u DMSO, te enzim, nakon čijeg dodatka se pokreće štoperica. Važno je pokrenuti štopericu u točnom trenutku dodatka enzima u reakcijsku smjesu, jer dodatak enzima predstavlja sam početak reakcije.

Tablica 3.5. Sastav reakcijske smjese potrebne za PNSHH test enzimске aktivnosti

V _{reaktor} , μL	c _{PNSHH} , mmol/L	V _{PNSHH} , μL	V _{DMSO} , μL	V _{enzim} , μL	V _{pufer} , μL
500	0,25	0,25	24,75	10	465
500	0,5	0,5	24,5	10	465
500	1	1	24	10	465
500	2	2	23	10	465
500	5	5	20	10	465
500	7,5	7,5	17,5	10	465
500	10	10	15	10	465

Nakon što je dodan enzim u reakcijsku smjesu, reaktor se stavi na tresilicu pri uvjetima 25 °C i 1000 okr/min te se iz reaktora odmah uzme prvi alikvot (uzorak) od 10 μL. Tako uzet uzorak reakcijske smjese doda se u Eppendorf epruvetu s 490 μL acetonitrila (ACN), čija je svrha deaktivacija enzima, odnosno zaustavljanje same reakcije. Zapiše se vrijeme dodatka uzorka u ACN i tako dobivena smjesa se homogenizira na homogenizatoru. Zatim se cijeli sadržaj uz pomoć injekcijske šprice izvuče iz Eppendorf epruvete i filtrira u vialu za HPLC preko Chromafil Xtra H-PTFE-20/13 hidrofilnog filtra, pri čemu se denaturirani enzim odvaja od ostatka reakcijske smjese. Postupak se ponavlja za pet uzoraka po reakcijskoj smjesi, pri čemu bi svi uzorci trebali biti uzeti unutar 5 minuta od početka same reakcije, tj. od trenutka dodatka enzima u reakcijsku smjesu. Na taj način se osigurava da konverzija ne prelazi 10% te da su mjerenja provedena po metodi početnih reakcijskih brzina. Nakon što je završeno uzorkovanje i priprema uzoraka za analizu, može se krenuti na kvantitativnu analizu HPLC metodom. Kromatografska analiza provodi se na Nexera HPLC uređaju (Shimadzu, Japan), prikazanog slikom 3.8. Kao stacionarna faza korištena je kolona Kinetex core-shell C18 kolona (2,6 μm, 100 × 4,6 mm; Phenomenex). Analiza je provedena primjenom gradijentne metode analize. Kao mobilna faza A korišten je 80 % ACN u ultračistoj vodi s 0,1% TFA, dok je mobilna faza B bila ultračista voda s 0,1% TFA. Uvjeti gradijenta bili su sljedeći: 40–30% faza B od 0 do 5 min, 30–40% faza B od 5 do 5,5 min, 40% faza B do 7 min. Korišten je protok od 1,5 mL/min, valna duljina 310 nm, temperatura pećnice 30 °C, a sveukupno trajanje analize bilo je 7 min. Vrijeme zadržavanja PNSHH iznosilo je 3,6 min, a PNSO 3,9 min. Koncentracije PNSHH i PNSO u uzorcima iz reakcijskih smjesa određuju se uz primjenu prethodno pripremljenih baždarnih pravaca. Baždarni pravci pripreme se provođenjem analize istih

volumena poznatih različitih koncentracija PNSHH, odnosno PNSO. Integriraju se površine ispod pikova dobivenih kromatograma te se konstruiraju baždarni pravci. Primjeri dobivenih baždarnih pravaca za PNSHH, odnosno PNSO dani su u prilogima 2 i 3, a prilogom 4 prikazan je primjer kromatograma za PNSHH i PNSO.



Slika 3.8. Nexera HPLC uređaj (Shimadzu, Japan)

Nakon provedenih eksperimentalnih mjerenja, potrebno je procijeniti kinetičke parametre. Pritom se koristi programski paket SCIENTIST, dok se kao model koristi osnovni jednosupstratni Michaelis-Menteničin model. Koristi se metoda nelinearne regresije, a kinetički parametri su procijenjeni primjenom metode najmanjih kvadrata koja se nalazi u programskom paketu.

3.4.4. Određivanje termičke stabilnosti proteina

Termička stabilnost proteina određuje se pomoću termofluor metode, poznate i kao diferencijalna pretražna fluorimetrija (engl. *differential scanning fluorimetry* – DSF) u uređaju 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, SAD). Uređaj je prikazan na slici 3.9. Uzorak pročišćenog enzima određuje se do koncentracija 5, 10 i 15 μM u reakcijskom puferu. Zatim se 45 μL pufera pomiješa s 45 μL boje SYPRO Orange, a svaka koncentracija priprema tri puta. Slijepa proba priprema se kao uzorak pufera i boje. Potom se uzorci u smještaju u uređaj za lančanu reakciju polimeraze (engl. *polymerase chain reaction* – PCR) te se mjerenje

provodi u temperaturnom rasponu od 25 do 95 °C, s koracima od 0,5 °C sa zadržavanjem 30 sekundi. Fluorescencija se očitava na kraju zadržavanja od 1 minute na svakoj temperaturi. Intenzitet fluorescencije u mjerenjima upućuje na doseg denaturacije, budući da se SYPRO Orange boja nespecifično veže za hidrofobne površine. Kako se protein denaturira i njegova struktura se razmata, izložene hidrofobne površine vežu boju na sebe, što rezultira povećanjem fluorescencije. Iz rezultata ovisnosti intenziteta fluorescencije o temperaturi, konstruiraju se termogrami, iz kojih se očitava temperatura taljenja enzima, tzv. T_m vrijednost.



Slika 3.9. Uređaj 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, SAD) za određivanje termičke stabilnosti proteina

3.4.5. Određivanje stabilnosti proteina tijekom inkubacije na različitim temperaturama

Osim određivanja temperature taljenja, koja je pokazatelj strukturne stabilnosti proteina, važan pokazatelj termičke stabilnosti enzima je i njegova katalitička stabilnost pri inkubaciji pri različitim temperaturama. Proteini se postavljaju na inkubaciju pri dvije različite temperature, u ovom slučaju 25 °C i 50 °C, te se kroz pet dana u pravilnim vremenskim intervalima mjeri njihova katalitička aktivnost prema PNSHH. Testovi aktivnosti provode se na isti način kako je to opisano u poglavlju 3.5.3., pri čemu se razlikuje sastav reakcijske smjese (tablica 3.10.).

Prije nego se proteini mogu staviti na inkubaciju potrebno je pripremiti njihova razrjeđenja. U 490 μ L Tris-SO₄ pufera dodaje se 10 μ L proteina, odnosno priprema se razrjeđenje temeljne otopine proteina od 50 puta. Tako pripremljena razrjeđenja proteina stavljaju se na dvije tresilice na inkubaciju pri 25 °C, odnosno 50 °C, pri 1000 okr/min. Odmah po postavljanju inkubacije uzorkuje se prvi alikvot od 20 μ L razrjeđenja enzima, koji se dodaje u reakcijsku smjesu koja je pripremljena prema tablici 3.6., te time započinje test aktivnosti.

Provodi se postupak mjerenja enzimske aktivnosti kako je navedeno u poglavlju 3.5.3. za sva tri enzima pri 25 °C i 50 °C, dva puta dnevno. Tako dobiveni uzorci analiziraju se na HPLC uređaju kako je opisano u poglavlju 3.5.3.

Tablica 3.6. Sastav reakcijske smjese za mjerenje aktivnosti enzima

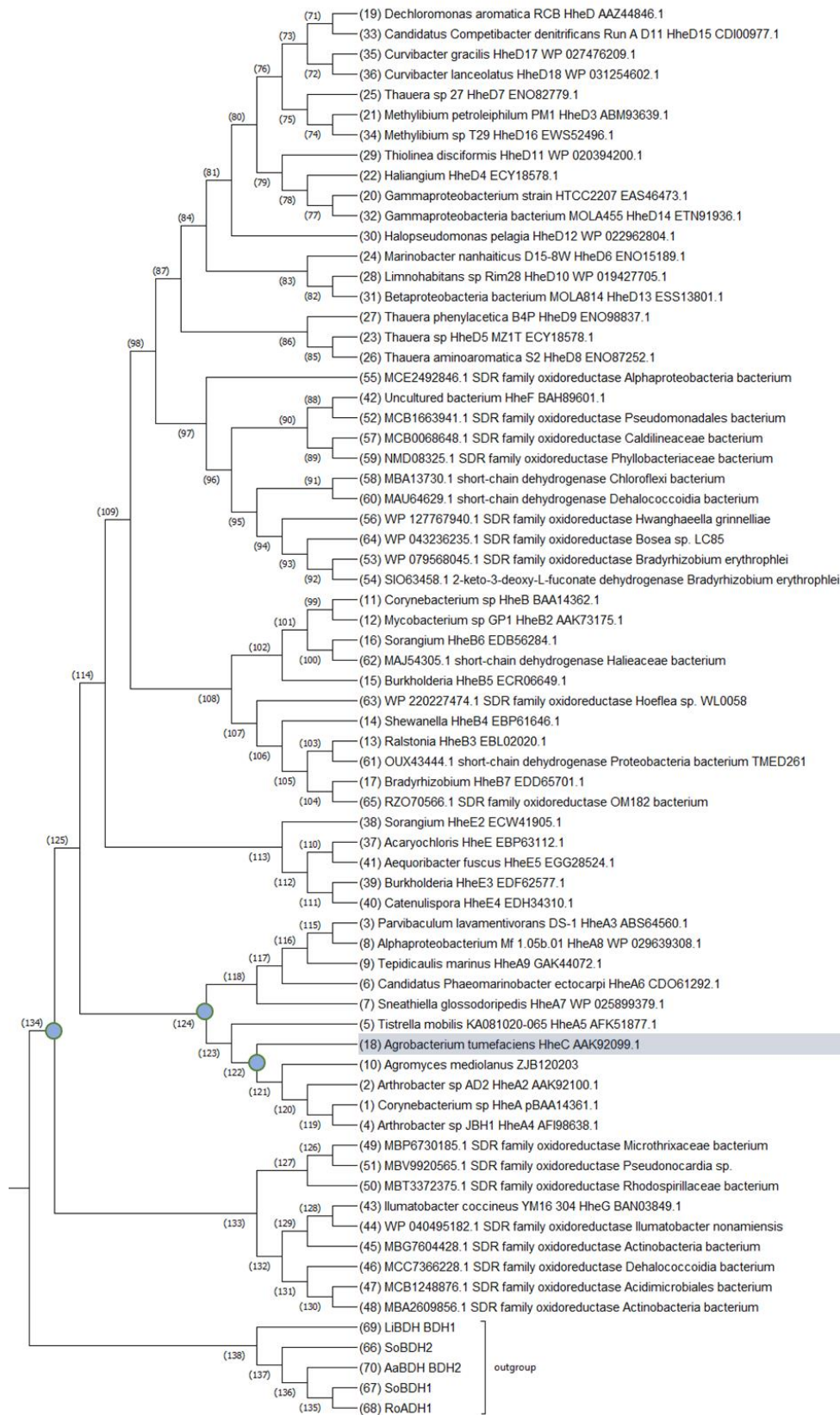
$V_{\text{reaktor}}, \mu\text{L}$	$C_{\text{PNSHH}}, \text{mmol/L}$	$V_{\text{PNSHH}}, \mu\text{L}$	$V_{\text{enzim}}, \mu\text{L}$	$V_{\text{puffer}}, \mu\text{L}$
500	5	25	20	455

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Konstrukcija filogenetskog stabla i odabir predaka HHDH

Prvi korak u ovom istraživanju bilo je prikupljanje podataka o svim danas poznatim HHDH enzimima, te konstruiranje baze podataka koja je sadržavala podatke o tipu enzima (HheA – HheG), organizmu iz kojeg potječe, te aminokiselinskoj sekvenci. Ti podaci, dobiveni u sklopu ovog istraživanja opsežnim pretraživanjem postojećih baza podataka poput PDB, dani su u prilogu 5 ovom radu. Na temelju poznatih sekvenci i prema postupku opisanom u poglavlju 3.1., u suradnji sa znanstvenicima s IMBT je konstruirano filogenetsko stablo HHDH obitelji enzima (slika 4.1.).

Budući da je HheC iz *Agrobacterium radiobacter* (pod drugim nazivom i *A. tumefaciens*) daleko najproučavaniji predstavnik HHDH enzima s izrazito velikim sintetičkim potencijalom, za daljnji su rad odabrana tri pretka ovog enzima, kojima su pripisane oznake N122, N124 i N134. Sintetički protein N122 direktni je predak HheC, dok je N124 zajednički predak HheC enzima i enzima iz A-skupine. Najdalji zajednički predak svih HHDH enzima je N134. Aminokiselinske sekvence odabranih predaka HHDH dani su u tablici 4.1.



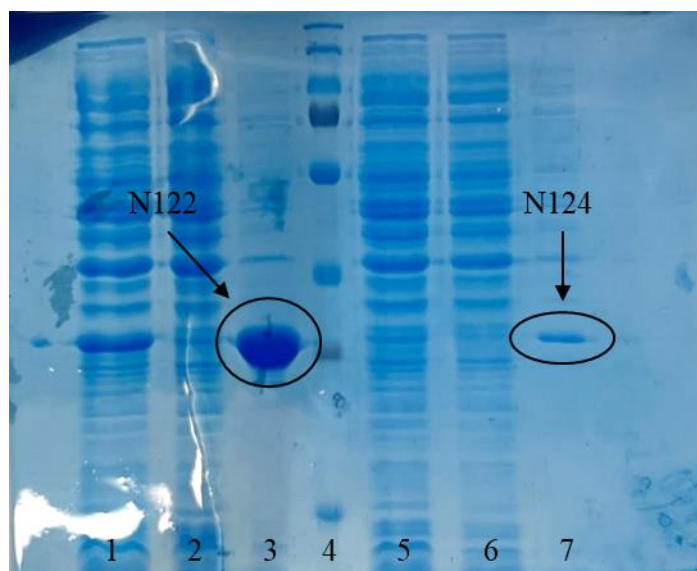
Slika 4.1. Filogenetsko stablo HHDH enzima, uz označene odabrane pretke HheC enzima.

Tablica 4.1. Sekvence odabranih predaka HDDH enzima.

Oznaka proteina	Aminokiselinska sekvenca
N122	MRIALVTNATHFAGPPSVAALAREGYTVVCHDASFTDAAERAAFEAE NPGVTALAEQEPAELIEAVLERAGQLDVLVSNDAYPAIRQPIDETTDE DLREMFEALTVFPFALVRAVAPPHMKARGSGKIIFITSAAPLRPLPNYS MYAAARAATALAKALAKELARHGIQVYAIGPNFLDNPTYFPTPEW MDDPESAARVKKNVPLGRLGRPEEMGELIAFLASDKSDFITGQVFAF AGGYPT
N124	AMTMLNSRIVLVTDATHFVGPPSVTALAREGYQVIAHDASFTDAAER AAFEALNPGVTALSAQDPAELIEAVLERAGQLDVLVSNDAYPAIRAPI DETTDEDLREMFEALVVRPFALARAVAPPHMKARGSGKIIFITSAAPLR GLPNYSMYAAARGAANALAKALAKELARHGIQVNAIAPNFVENPTY FPPELMEDPESAARIRKNIPLGRLGKPEEVGELVAFLASDKSDFITGQV FPFAGGWAT
N134	MMTRLNGKVALVTDAANYVGPAIARVFAREGAEVIAHDADLTDELE RAACEALAPTSDLTTAEDAALVEAALERFGRLDVLVANTGLPAVSA PVTDTTLEDWRTMFDANLVPVFRGVRAVAPQMIERGSGKIIVITSAAP ARGMPNSSAYSAAARGGANALVRAVALELARHGVQVNAIAPNYVENP TYFPPELMEDPEFRARLKRNVPPLGRLGTPEEVAELALFLASDESFRVFT GQVFPFAGGWAT

4.2. Prisutnost proteina u staničnom lizatu

Na slici 4.2. prikazan je primjer SDS-PAGE gela s proteinima. Putem gela elektroforeze može se vidjeti je li prekomjerna ekspresija traženog proteina, odnosno njegovo pročišćavanje bilo uspješno ili ne. U ovom slučaju mogu se na poziciji 3 (N122 protein) i na poziciji 7 (N124 protein) vidjeti zasebne mrlje koje po svom položaju odgovaraju željenim proteinima. Na poziciji 4 mogu se vidjeti mrlje standarda koje govore o čistoći samog proteina, odnosno ako se isti uspoređi sa mrljama na poziciji 3 i 7, a s obzirom da su poznate molarne mase traženih proteina, može se točno vidjeti koja od mrlja odgovara traženom proteinu te kolika je njegova čistoća.



Slika 4.2. Gel s N122 i N124 proteinima nakon provedene elektroforeze, bojanja i odbojavanja

4.3. Enzimska kinetika u reakciji zatvaranja *para*-nitro-2-bromo-1-feniletanola

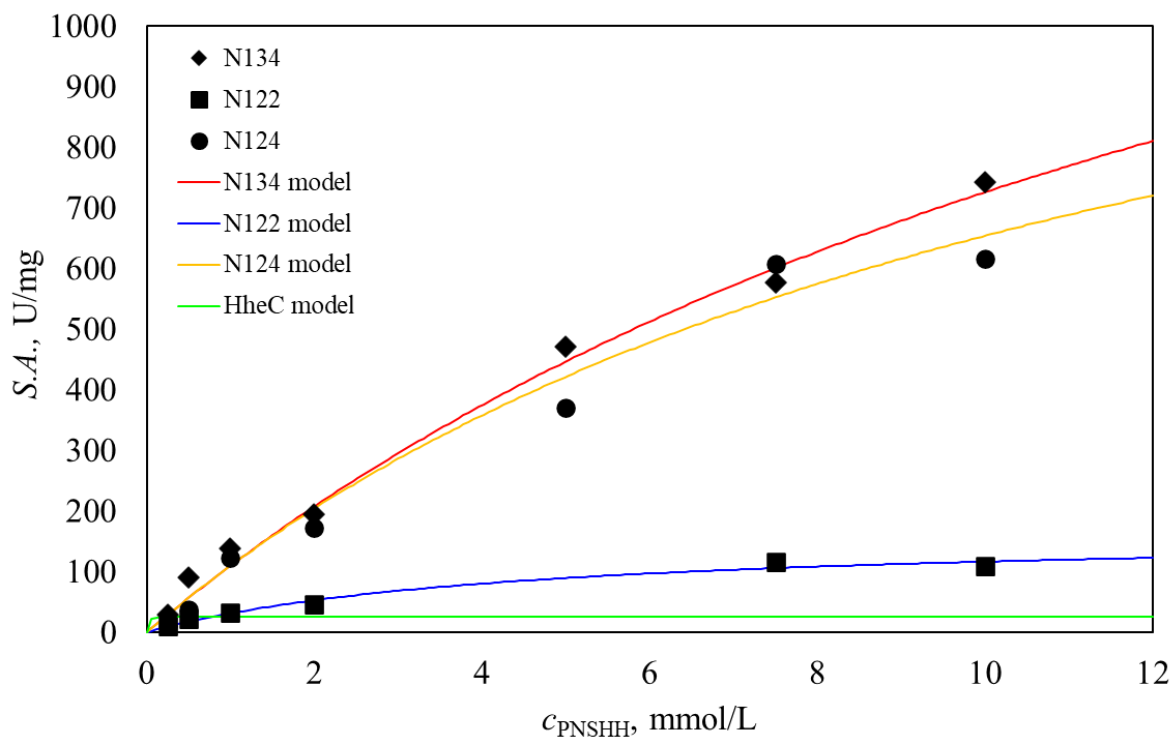
Na slici 4.3. prikazani eksperimentalni podaci dobiveni mjerenjem specifične aktivnosti N122, N124 i N134 proteina pri različitim koncentracijama PNSHH, kao i simulacije Michaelis-Menteničinog kinetičkog modela, za svaki od navedenih proteina. Svaka eksperimentalna točka odgovara jednom eksperimentu provedenom metodom početnih reakcijskih brzina pri određenoj koncentraciji enzima i supstrata. Osim eksperimentalno dobivenih vrijednosti za pretke N122, N124 i N134, na istom grafu je prikazana simulacija ovisnosti specifične aktivnosti divljeg tipa HheC enzima o koncentracijama PSNHH, pri čemu su vrijednosti kinetičkih parametara za ovaj enzim preuzete iz literature [40,41]. Kinetika reakcije zatvaranja PNSHH u PNSO opisana je jednosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom u slučaju sva 4 enzima. Procijenjeni kinetički parametri modela, tj. V_{max} i K_m vrijednosti, prikazani su tablično u tablici 4.1, u kojoj su ujedno dane vrijednosti parametara za divlji tip HheC enzima. Analizom spomenutog grafičkog prikaza na slici 4.1., može se uočiti kako se dobiveni eksperimentalni podaci poklapaju s pretpostavljenim jednosupstratnim Michaelis-Menteničinim modelom. Da pretpostavljeni model dobro opisuje eksperimentalne podatke potvrđuju i vrijednosti standardnih devijacija parametara, dane u tablici 4.1. Nadalje, ako se promatraju V_{max} vrijednosti pojedinih proteina, kao i krivulje specifičnih aktivnosti, može se uočiti kako N124 i N134 protein imaju vrlo visoku aktivnost prema PNSHH supstratu. V_{max} vrijednost N124 proteina veća je 55 puta, a V_{max} vrijednost N134 proteina čak 73 puta od V_{max} vrijednosti divljeg HheC tipa enzima. S druge strane, direktni predak HheC enzima, N122

protein, pokazuje značajno nižu specifičnu aktivnost prema PNSHH supstratu od ostala dva pretka proteina što se može vidjeti iz vrijednosti Michaelisovih konstanti (tablica 4.2.). Usporedbom vrijednosti kinetičkih parametara HheC enzima sa svim njegovim precima, moguće je uočiti da divlji tip HheC ima najnižu vrijednost V_{max} , što upućuje na činjenicu da se pomicanjem po filogenetskom stablu prema novijim proteinima aktivnost prema PNSHH snižavala. Isto tako, kako se aktivnost snižavala, tako je došlo do poboljšanja specifičnosti prema određenom supstratu što je vidljivo iz niže K_m vrijednosti. Ovo je vrlo vrijedan rezultat, jer su preci proteina, N124 i N134, značajno aktivniji prema aromatskom supstratu od samog HheC enzima. Kako je enzimska aktivnost prvo svojstvo koje se uzima u obzir kod odabira potencijalnog enzima za biokatalizu, preci sa superiornom aktivnošću i maksimalnim brzinama reakcija predstavljaju vrijedne kandidate za buduće sintetske namjene.

Tablica 4.2. Dobiveni parametri jednosupstranog Michaelis-Menten modela za N134, N122 i N124 proteine, uz parametre za divlji tip HheC proteina iz literature

	N134	N122	N124	HheC [40,41]
V_{max} , U/mg	$1937,92 \pm 49,09$	$166,42 \pm 6,60$	$1460,14 \pm 59,12$	$26,21 \pm 0,09$
K_m , mmol/dm ³	$16,69 \pm 0,63$	$4,32 \pm 0,41$	$12,33 \pm 0,82$	$0,009 \pm 0,003$

Bolja katalitička aktivnost i svojstva nekog enzima potiču iz strukturnih i konformacijskih promjena na proteinskoj strukturi. Kako bi se moglo dokučiti porijeklo ovakvih izraženih razlika u katalitičkim svojstvima proteina, bilo bi potrebno provesti rješavanje proteinskih kristalnih struktura, bilo klasičnim strukturnim studijama proteina kristalizacijom ili upotrebom naprednih alata za predviđanje struktura poput *Aphafold* softvera. Pomoću kristalnih struktura i metoda molekuskog modeliranja mogao bi se pokušati pronaći uzrok povišenja aktivnosti prema PNSHH s pomicanjem prema starijim precima u filogenetskom stablu. Na primjer, jedna od mogućnosti je promjena konformacije aktivnog mjesta ili njegovo proširenje kod drevnih predaka, koje bi svojom prostranošću moglo olakšati vezanje većim aromatskim molekulama poput PNSHH. Tijekom evolucije, proteini postaju sve specifičniji i prilagođeniji određenoj namjeni, stoga nije nevjerojatno za pretpostaviti da se i aktivno mjesto tijekom evolucije sužavalo i specijaliziralo za primanje specifičnih molekula. Ipak, da bi se ovakva pretpostavka preispitala te kako bi se istražile druge mogućnosti viših katalitičkih aktivnosti predaka proteina, potrebno je provesti dodatna istraživanja, poglavito u vidu provjere struktura navedenih drevnih proteina.



Slika 4.3. Specifična aktivnost N122, N124 i N134 proteina dobivena eksperimentalnim mjerenjima (oznake) i jednosupstratnim Michaelis-Menten modelom (linije), uz HheC model dobiven podacima iz literature [40,41].

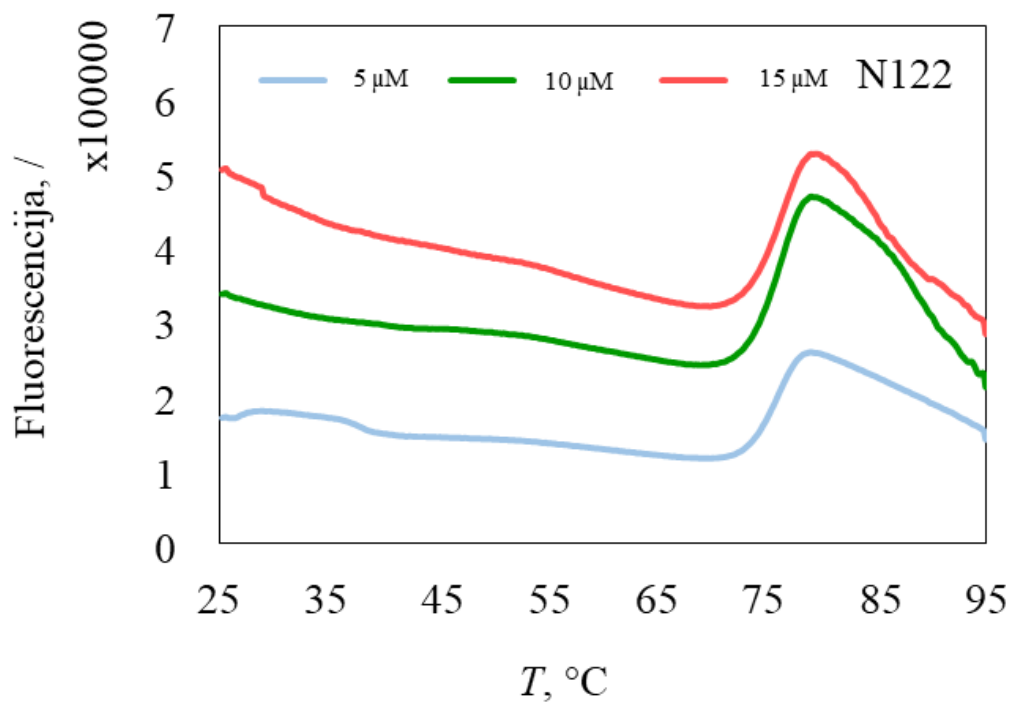
4.4. Termička stabilnost proteina

Uz samu dobru katalitičku aktivnost enzima, jedno od najvažnijih svojstava prilikom odabira potencijalnih biokatalizatora za industrijsku primjenu je i njihova dobra termička stabilnost. Na slici 4.4., 4.5. i 4.6. mogu se vidjeti dobivene ovisnosti intenziteta fluorescencije različitih koncentracija N122, N124, odnosno N134 proteina o temperaturama. S obzirom na to da je za samo povećanje intenziteta fluorescencije zaslužna boja koja se veže na proteini kada se on denaturira, nagli skok intenziteta fluorescencije upućuje na temperaturu pri kojoj dolazi do taljenja proteina i vezanja boje na novoizložena hidrofobna mjesta, koja su pri stabilnoj konformaciji sakrivena u unutrašnjosti proteina. Pri temperaturama prije naglog skoka u fluorescenciji, protein se smatra termički stabilnim.

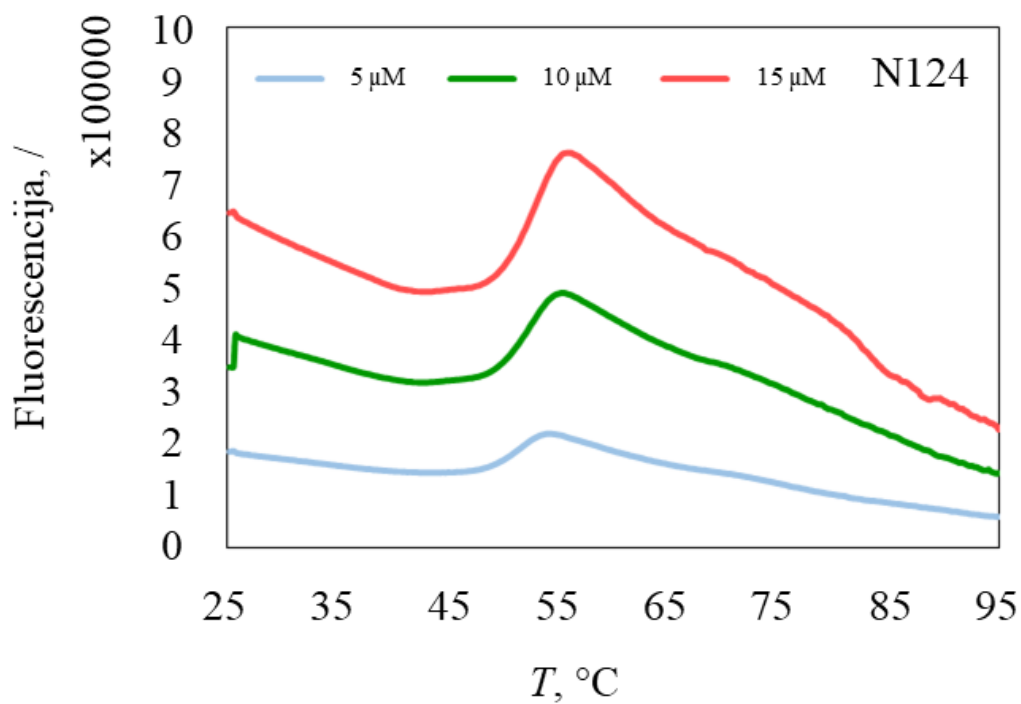
Iz dobivenih ovisnosti fluorescencije o temperaturi, može se uočiti kako je N122 protein temperaturno najstabilniji, jer njegova temperatura taljenja (T_m) odgovara području oko 80 °C. S druge strane, temperature taljenja N124 i N134 proteina niže su i iznose oko 57 °C, odnosno 55 °C. Slično precima N124 i N134, temperatura taljenja divljeg tipa HheC proteina također iznosi 60 °C³⁷, što je vrijednost preuzeta iz literature.

Povećanje temperature taljenja od 20 °C, između HheC enzima i N122 pretka, predstavlja izuzetno veliki skok, a time i veliki potencijal za sintetsku primjenu. Termostabilniji enzimi omogućavaju da se biokatalitičke reakcije provode pri višim temperaturama, što sa sobom nosi brojne prednosti, poput ubrzavanja procesa, smanjenja otpora prijenosu tvari, snižavanja viskoznosti reakcijskog medija, pomaka u ravnoteži u slučaju endotermnih reakcija, te smanjenja mogućnosti od kontaminacije mikroorganizmima. Termostabilni proteini često nisu otporniji samo na povišene temperature, već i robusniji te stabilniji pri širokom rasponu neprirodnih uvjeta, poput visokih koncentracija soli, organskih otapala, supstrata itd.

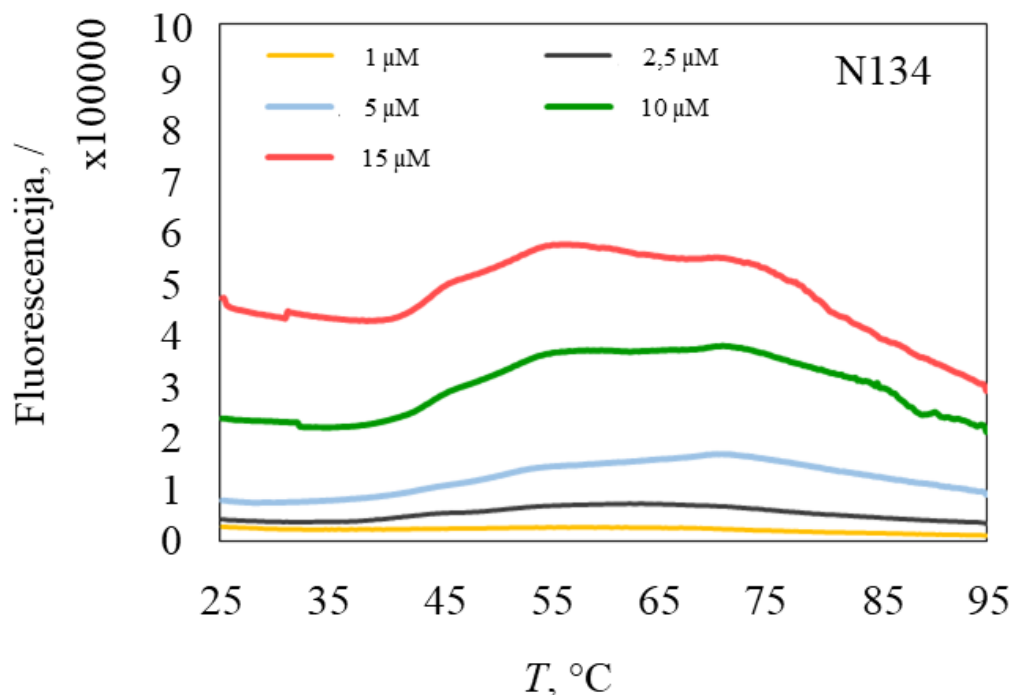
Nadalje, kod analize temperaturene stabilnosti proteina potrebno je promatrati i sam izgled dobivenih pikova. Prema već navedenim slikama može se vidjeti kako su pikovi od N122 i N124 proteina uži i viši, dok je pik od N134 proteina širi i niži. Navedeno ponašanje moglo bi se objasniti time što su sva tri proteina tetrameri – velike molekule sastavljene od 4 povezana monomera. Kod povećanja temperature dolazi do strukturnih promjena na samim proteinima, no takve strukturne promjene ne moraju se odvijati pri istim temperaturama. Tako se npr. kod N122 proteina, kojem odgovara najuži pik termograma, strukturne promjene odvijaju u vrlo uskom temperaturnom rasponu, dok se kod N134 proteina, čiji pik se proteže od oko 40 °C do oko 80 °C, odvija postepeni proces denaturacije (engl. *multistate denaturate process*). Široki pik termograma mogao bi upućivati na činjenicu da se raspadanje tetramera na dimere i zatim monomere, te odmatanje monomerskih jedinica, odvija u širem temperaturnom rasponu. Suprotno tomu, uski pik termograma upućuje da se sve strukturne promjene na proteinu odvijaju slijedno i pri istim temperaturama. Međutim, za saznanje kako se točno tetrameri denaturiraju kod povećanja temperature, odnosno kojim se tijekom odvija temperaturna destabilizacija, potrebno je primijeniti kombinirani računalno-eksperimentalni pristup. Ovdje je također bitno napomenuti kako se ne može sa sigurnošću reći događa li se još nešto sa temperaturno najstabilnijim N122 proteinom pri višim temperaturama, jer se sam pik od N122 proteina nalazi izrazito blizu krajnje granice mjerenja, koja je radi ograničenja mjerenja u vodenim uzorcima iznosila 95 °C.



Slika 4.4. Ovisnost intenziteta fluorescencije boje vezane za N122 protein različitih koncentracija o temperaturi



Slika 4.5. Ovisnost intenziteta fluorescencije boje vezane za N124 protein različitih koncentracija o temperaturi



Slika 4.6. Ovisnost intenziteta fluorescencije boje vezane za N134 protein različitih koncentracija o temperaturi

4.5. Stabilnost proteina pri inkubaciji na različitim temperaturama

Osim termičke stabilnosti, vrlo vrijedan podatak o robusnosti proteina je i stabilnost prilikom inkubacije enzima na različitim temperaturama. Takav podatak govori nam o kinetičkoj stabilnosti enzima pri različitim temperaturama u stanju mirovanja, tj. dok ne sudjeluje u katalitičkoj reakciji. Studije inkubacija pokazale su se u mnogim slučajevima kao dobar indikator o operacijskoj stabilnosti enzima, kao i stabilnosti pri skladištenju [42].

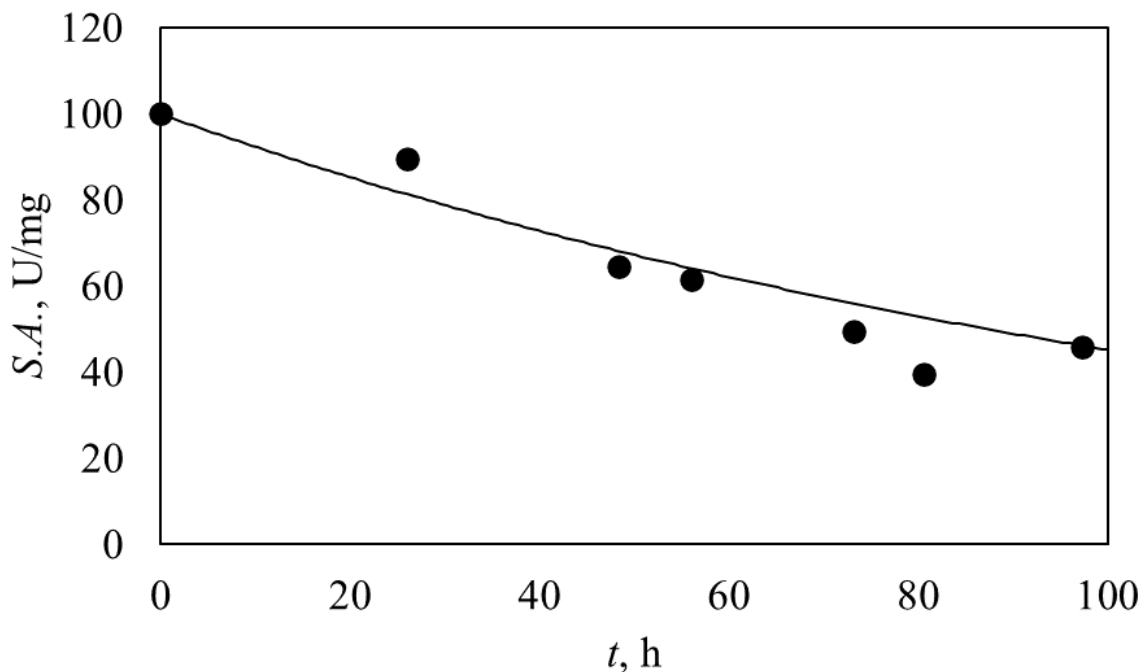
U ovom radu praćena je stabilnost enzima pri inkubaciji na temperaturama 25 i 50 °C. Upravo ove vrijednosti odabrane su na temelju prethodno provedenih istraživanja s HHDH enzimima. Većina biotransformacija s ovom skupinom enzima provodi se pri 25 °C, što je temperatura pri kojoj se reakcije odvijaju zadovoljavajućom brzinom, uz prilično dobru stabilnost enzima. Temperatura od 50 °C je odabrana kao ona pri kojoj se HheC enzim u potpunosti deaktivira s vremenom poluraspada od 0,51 h [43].

Praćenjem aktivnosti enzima u neovisnim mjerenjima tijekom inkubacije konstruirani su profili stabilnosti na temperaturama 25 i 50 °C za sva tri pretka proteina (slike 4.7. - 4.12.). Eksperimentalni podaci dani su simbolima, dok je linijama predstavljen model deaktivacije. Deaktivacija enzima, odnosno pad aktivnosti s vremenom tijekom inkubacije, opisan je

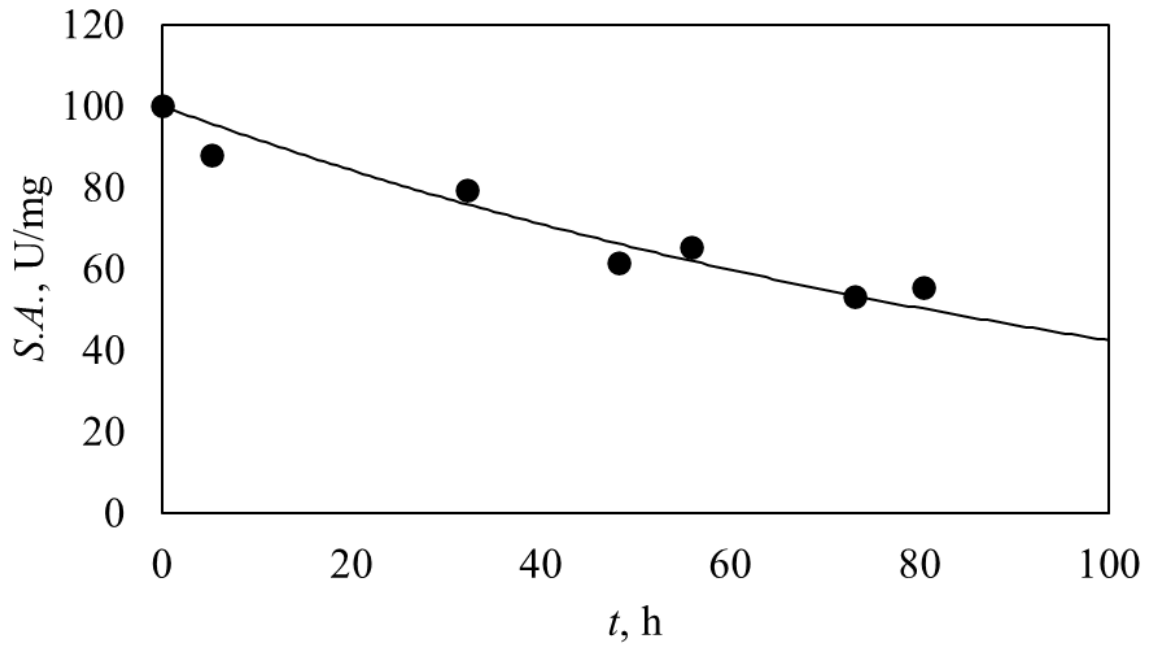
kinetikom prvoga reda, te su na temelju jednadžbe 3. procijenjene vrijednosti deaktivacije enzima (k_d , 1/min).

$$\frac{d\gamma}{dt} = -k_d \cdot \gamma \quad (3)$$

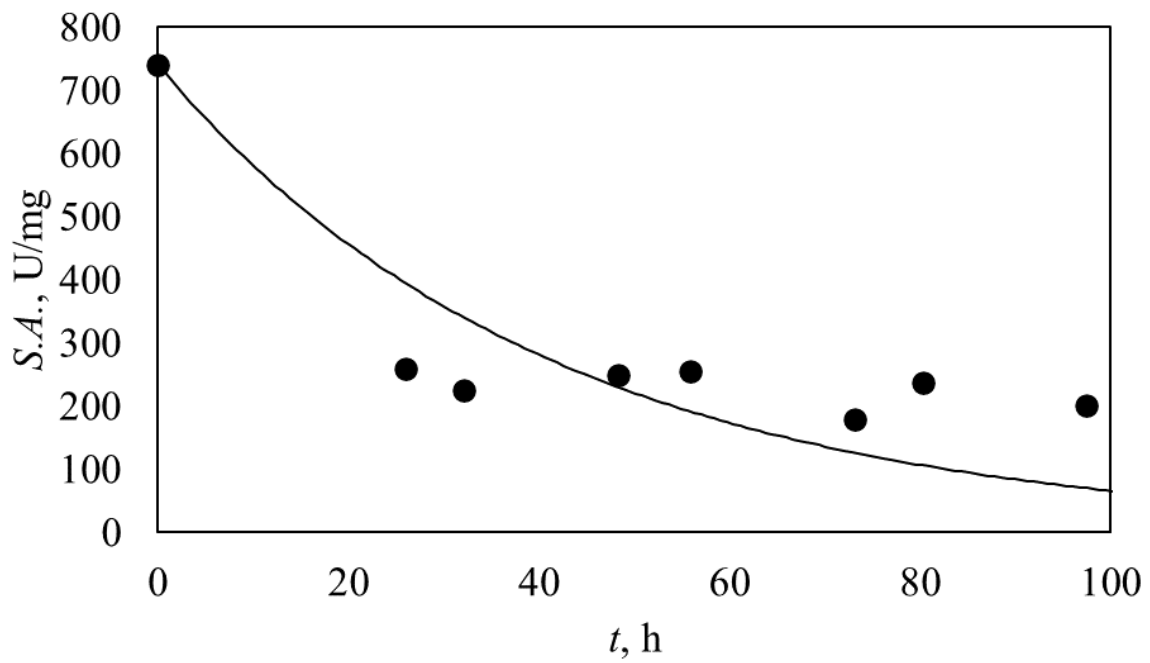
Ako se pogledaju slike 4.7. - 4.12., kao i vrijednosti procijenjenih parametara konstanta deaktivacije pri obje temperature (tablica 4.3.), može se vidjeti kako je enzim N122 pri obje temperature inkubacije najstabilniji, dok se najnestabilnijim pokazao enzim N124 pri 50 °C. Visoka stabilnost kod inkubacije enzima N122 pri obje temperature u skladu je s mjerenjima termičke stabilnosti proteina, gdje je pokazano da je temperatura taljenja proteina oko oko 80 °C. Kod enzima N124 i kod N134 dolazi do značajnijeg pada u specifičnoj aktivnosti enzima tijekom inkubacije, međutim taj pad izraženiji je kod N124 proteina. Ako se uspoređuju stabilnosti istih proteina pri različitim temperaturama inkubacije, može se primijetiti kako je kod sva tri proteina stabilnost proteina nešto niža kod proteina koji su se inkubirali pri 50 °C, u odnosu na proteine koji su inkubirani pri 25 °C.



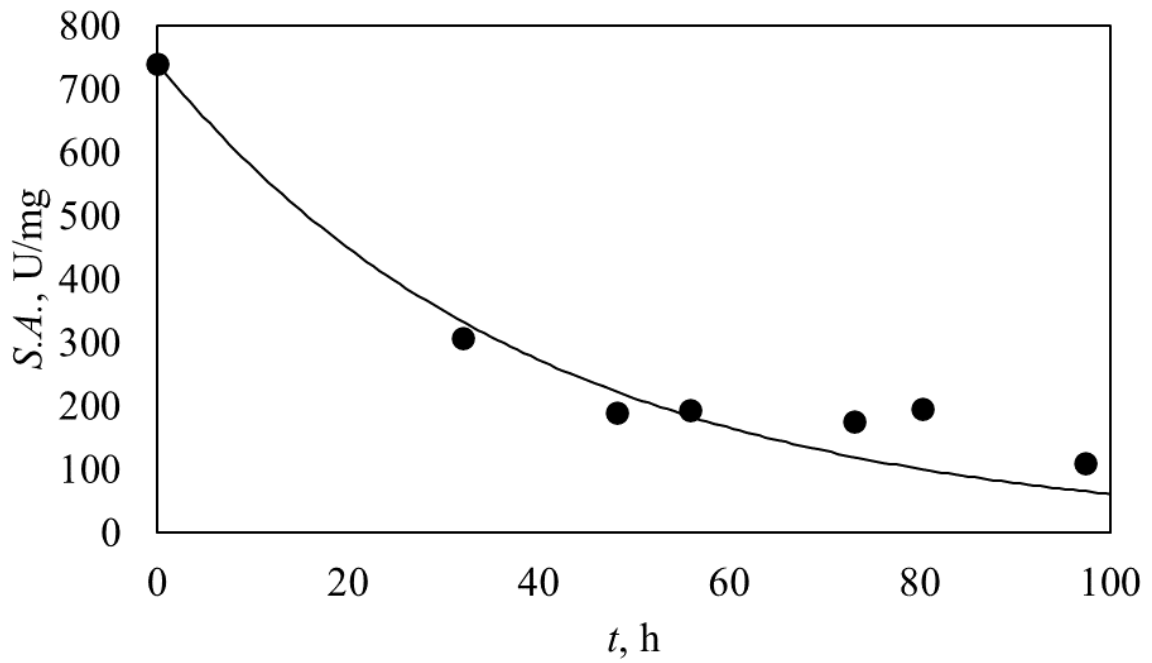
Slika 4.7. Stabilnost enzima N122 tijekom inkubacije pri 25 °C



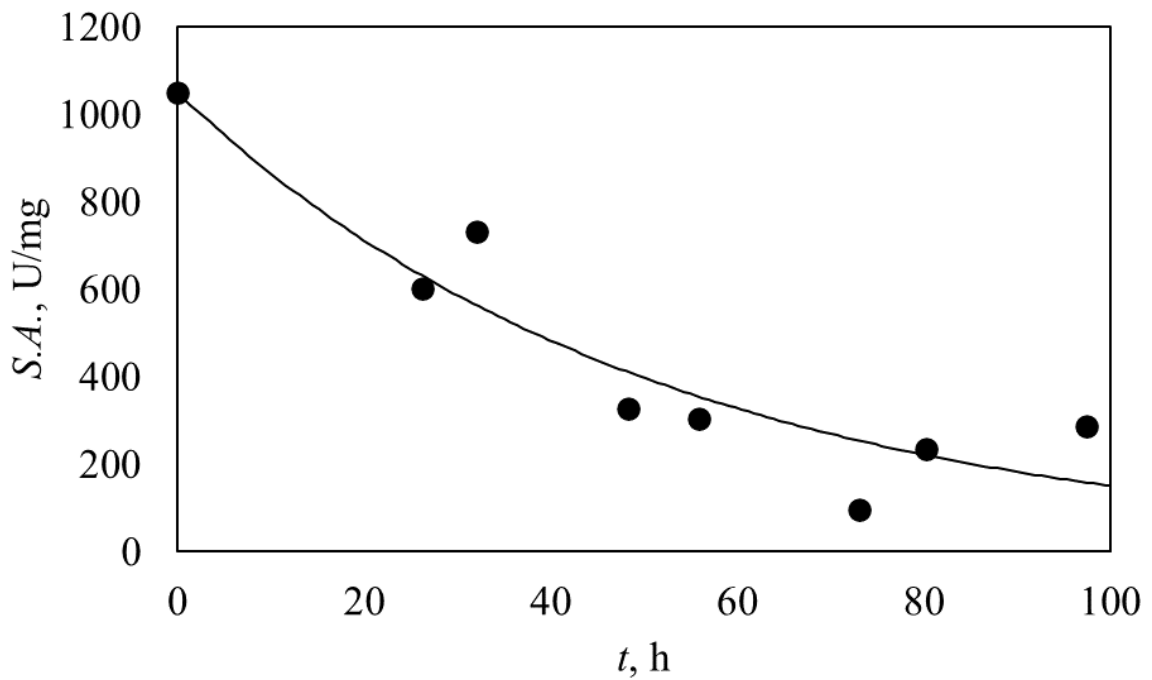
Slika 4.8. Stabilnosti enzima N122 tijekom inkubacije pri 50 °C



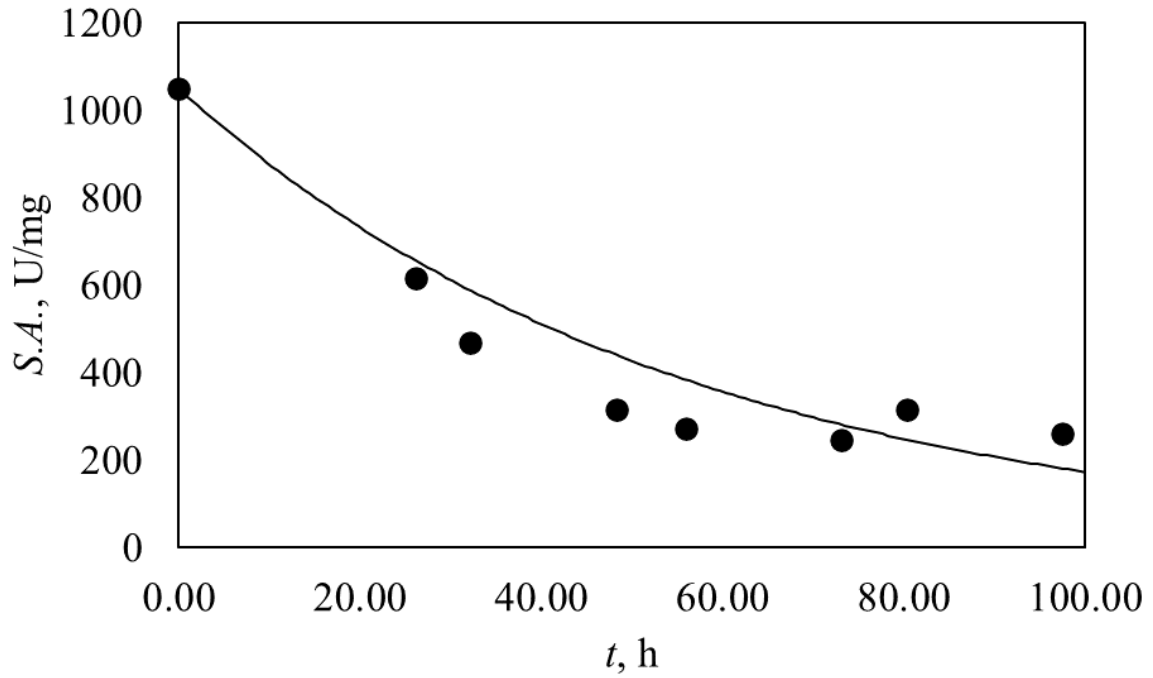
Slika 4.9. Stabilnost enzima N124 tijekom inkubacije pri 25 °C



Slika 4.10. Stabilnost enzima N124 tijekom inkubacije pri 50 °C



Slika 4.11. Stabilnost enzima N134 tijekom inkubacije pri 25 °C



Slika 4.12. Stabilnost enzima N134 tijekom inkubacije pri 25 °C

Tablica 4.3. Procijenjene konstante deaktivacije za pojedini protein pri temperaturama inkubacije od 25 °C i 50 °C

	N122	N124	N134
$k_d^{25^\circ\text{C}}$, 1/min	$0,0081 \pm 0,0010$	$0,0242 \pm 0,0058$	$0,0194 \pm 0,0021$
$k_d^{50^\circ\text{C}}$, 1/min	$0,0079 \pm 0,0007$	$0,0249 \pm 0,0055$	$0,0197 \pm 0,0017$

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bila je rekonstrukcija filogenetskog stabla HHDH enzima te sinteza i karakterizacija predaka C-tipa halogenhidrin-dehalogenaze, kako bi se pronašli termostabilniji enzimi s potencijalom za industrijsku primjenu. U ovom radu uspješno su uzgojeni drevni proteini, preci HheC enzima iz *Agrobacterium radiobacter* AD1. Uzgojen je tip N122, koji je ujedno i direktni predak HheC proteina, zatim N124 kao predak N122 proteina, te konačno N134 protein koji je daleki predak svih enzima iz HHDH skupine. Ovi sintetski proteini generirani su na temelju sekvenci iz filogenetskog stabla, koje objedinjuje vjerojatne pretke modernih proteina.

Po uspješnoj sintezi i pročišćavanju ovih sintetskih proteina, ispitana su njihova svojstva od ključne važnosti za potencijalne katalitičke primjene. Ta svojstva uključuju aktivnost, termostabilnost i stabilnost pri inkubaciji na različitim temperaturama. Za početak je ispitana specifična aktivnost proteina prema PNSHH, aromatskom spoju koji se koristi kao univerzalni supstrat kod ispitivanja aktivnosti HHDH enzima. Potom je ispitana termička stabilnost svih proteina u rasponu temperatura 25 – 95 °C, kao i stabilnost pri inkubaciji pri 25 °C i 50 °C.

N124 protein pokazao je najvišu specifičnu aktivnost prema PNSHH supstratu, dok je N134 protein pokazao nešto nižu specifičnu aktivnost. Od sva 3 pretka, najnižu specifičnu aktivnost prema ovom supstratu pokazao je N122 protein. Usporedbom vrijednosti kinetičkih parametara drevnih predaka HheC enzima i njega samoga, uočljivo je da divlji tip HheC ima najnižu vrijednost V_{max} . Drugim riječima, pomicanjem po filogenetskom stablu od predaka prema novijim proteinima, aktivnost prema aromatskom supstratu PNSHH se snižava. Preci N124 i N134 su značajno aktivniji od samog HheC enzima, što je vrlo vrijedan rezultat za daljnje sintetske primjene ove skupine enzima. Kako bi se dobio odgovor zašto su ovi preci aktivniji prema PNSHH od divljeg tipa HheC, potrebno je provesti dodatna ispitivanja, odnosno istražiti strukture proteina, kao i veličine samih aktivnih mjesta na proteinu.

Zanimljivo je kako se upravo N122 protein pokazao kao temperaturno najstabilniji, s temperaturom taljenja tek pri vrijednosti od oko 80 °C, dok su se N124 i N134 proteini pokazali nešto manje temperaturno stabilnima, sa temperaturama taljenja pri oko 57 °C, odnosno 55 °C. Poboľšanje termostabilnosti N122 proteina u odnosu na divlji tip enzima je značajno, budući da HheC ima T_m vrijednost oko 60 °C. Povećanje T_m vrijednosti od oko 20 °C je vrlo značajno,

jer upućuje na činjenicu da je biokatalizu vjerojatno moguće provoditi pri višim temperaturama, bez narušavanja katalitički aktivne konformacije proteina.

Međutim, ispitivanja termostabilnosti nisu dovoljna za samu procjenu katalitičke stabilnosti pri određenoj temperaturi. Iz tog razloga, provedena su mjerenja stabilnosti svih proteina pri inkubaciji pri temperaturama 25 °C i 50 °C. Kod ispitivanja katalitičke stabilnosti pri inkubaciji, N122 protein pokazao se najstabilnijim pri obje temperature, što je bilo insinuirano iz samih DSF mjerenja. Isto se može primijetiti ako se pogleda i N124 protein, koji se pokazao kao temperaturno najmanje stabilan, a ujedno se pokazao i najmanje stabilan kod inkubacije, s najvišom konstantnom deaktivacije od ova tri proteina.

Usporedbom svi rezultati dobivenih u ovom radu, može se zaključiti kako su stariji drevni proteini N124 i N134 pokazali puno višu specifičnu aktivnost prema PNSHH supstratu, u odnosu na mlađi drevni protein N122, koji je ujedno i direktan potomak HheC tipa proteina. S druge strane, mlađi drevni protein N122 pokazao je bolju temperaturnu stabilnost, kao i bolju stabilnost kod inkubacije pri različitim temperaturama. Svaki od istraživanih predaka proteina pokazuje određeno poboljšanje u odnosu na divlji HheC tip, što ukazuje na važnost ovog istraživanja. Buduća istraživanja trebaju biti usmjerena na ispitivanje katalitičke aktivnosti drevnih predaka prema širem rasponu supstrata, kako u reakcijama zatvaranja, tako i u reakcijama otvaranja epoksidnih prstenova s različitim nukleofilima. Na taj način dodatno će se proširiti i poboljšati njihov potencijal i sintetska vrijednost. Također, buduća ispitivanja trebaju biti usmjerena na kristalizacijske studije i metode molekuskog modeliranja, kako bi se odredila evolucijska poveznica između različitih katalitičkih aktivnosti. Na kraju, buduća istraživanja trebaju biti orijentirana na određivanje operacijskih stabilnosti ovih proteina pri ostalim zahtjevnim uvjetima, kao što je prisutnost organskih otapala i visokih koncentracija supstrata, kako bi se mogao procijeniti njihov potencijal za industrijsku primjenu u usporedbi s HheC enzimom.

6. ZAHVALE

U prvom redu želimo zahvaliti našoj mentorici prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na vodstvu, ustupljenom povjerenju i podršci u radu na ovom vrlo inovativnom i odgovornom projektu. Nadalje, jako veliku zahvalu želimo uputiti Neveni Milčić, mag. ing. oecoing. jer je strpljivo, odgovorno i proaktivno pružala podršku i nesebično u bilo koje doba dana bila dostupna za pitanja, nedoumice, ali i za nove ideje kako bi nešto dobro postalo još bolje. Osim toga, hvala joj na stvorenoj atmosferi radoznalosti, učenja i razvijanja naših vizija jer cijelo iskustvo nije bilo samo istraživanje i rad, već jedno vrlo životno poučno iskustvo.

Hvala asistentima Ivani Čevič, mag. ing. oecoing., Emeriku Leakoviću, mag. appl. chem., Loreni Mateši, mag. ing. cheming., Dini Skenderoviću, mag. ing. oecoing., Mehmetu Mervanu Çakaru, mag. chem i doc. dr. sc. Martini Sudar na susretljivosti i pomoći pri korištenju laboratorijskih uređaja i opreme.

Hvala tehničarki Ivani Bošnjak na vremenu uloženom u pripremu i održavanje materijala i uređaja kako bi nam iskustvo u laboratoriju bilo što efikasnije.

Na kraju, hvala TU Graz i prof. Robertu Kouristu na prilici i povjerenju za suradnju na ovom projektu..

7. POPIS LITERATURE

- [1] Zhang, S., He, Q., Zhou, H., Zhang, X., Lu, X., Tian, Y., Principles and strategies for green process engineering, *GreenChE*, 3(1) (2022) 1-4.
- [2] Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S., Bajaj, B. K., Thermostable Enzymes for Industrial Biotechnology, u: Singh, R. S., Singhania, R. R., Pandey, A., Larroche, C., Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Technology, Elsevier, Amsterdam, 2019., str. 469-495.
- [3] Gumulya, Y., Baek, J.M., Wun, S. J. i sur., Engineering highly functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction, *Nat. Catal.*, 1 (218) 878–888.
- [4] Wackett, L. P., Ellis, L. B. M., Biodegradation Database and Prediction, Microbial, u: Schaechter, M., Encyclopedia of Microbiology (vol. 3), Academic Press, San Diego, 2009., str. 78-87.
- [5] Bell, E. L., Finnigan, W., France, S. P. i sur., Biocatalysis. *Nat. Rev. Methods Primers*, 1 (2021) 46.
- [6] Illanes, A., Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications, Springer Science & Business Media, Dordrecht, 2008., str. 1-4.
- [7] P. K. Robinson, Enzymes: Principles and Biotechnological Applications, *Essays Biochem.*, 15(59) (2015) 1–41.
- [8] Nelson, D. L., Cox, M. M., Hoskins, A. A., Lehninger principles of biochemistry (vol. 8), Macmillan Learning, New York, 2019., str. 178-179.
- [9] Yoo, Y. J., Feng, Y., Kim, Y. H., Yagonia, C. F. J. Fundamentals of Enzyme Engineering, Springer Science & Business Media, Dordrecht, 2017., str. 3-6.
- [10] Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F., Immobilization of Enzymes: A Literature Survey, u: Guisan, J., Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Molecular Biology (vol. 1051), Humana Press, Totowa, 2013., str. 15-31.
- [11] Grunwald, P., Chapter 1: Introduction, u: P. Grunwald, Biocatalysis: Biochemical Fundamentals and Applications (vol. 2), World Scientific Publishing Company, Singapur, 2017., str. 1-9.
- [12] Iyer, P. V., Ananthanarayan, L., Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment, *Process Biochem.*, 43(10) (2008) 1019-1032.
- [13] A. Illanes, Altamirano, C., Wilson, L., Homogeneous Enzyme Kinetics, u: Illanes, A., Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications, Springer Science & Business Media, Berlin, 2008., str. 140-148.

- [14] Schallmeyer, A., Schallmeyer, M., Recent advances on halohydrin dehalogenases—from enzyme identification to novel biocatalytic applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100 (2016) 7827–7839.
- [15] Schallmeyer, M., Floor, R. J., Szymanski, W., Janssen, D. B., 7.8 Hydrolysis and reverse hydrolysis: Halohydrin dehalogenases, u: Carreira, E. M., Yamamoto, H., *Comprehensive Chirality*, Elsevier, Amsterdam, 2012., str. 143–155.
- [16] Findrik Blažević, Z., Milčić, N., Sudar, M., Majerić Elenkov, M., Halohydrin Dehalogenases and Their Potential in Industrial Application – A Viewpoint of Enzyme Reaction Engineering, *Adv. Synth. Catal.*, 363(2) (2020) 388-410.
- [17] You, Z. Y., Liu, Z. Q., Zheng, Y. G., Properties and biotechnological applications of halohydrin dehalogenases: current state and future perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97 (2013) 9–21.
- [18] Bandyopadhyay, S., Chakraborty, S., Bagchi, B., Secondary Structure Sensitivity of Hydrogen Bond Lifetime Dynamics in the Protein Hydration Layer, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 16660–16667.
- [19] Tang, L., Lutje Spelberg, J. H., Fraaije, M. W., Janssen, D. B., Kinetic mechanism and enantioselectivity of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter*, *Biochemistry*, 42 (2003) 5378–5386.
- [20] Kumar, A., Darreh-Shori, T., DMSO: A Mixed-Competitive Inhibitor of Human Acetylcholinesterase, *ACS Chem Neurosci.*, 8(12) (2017) 2618-2625.
- [21] Misuri, L., Cappiello, M., Balestri, F., Moschini, R., Barracco, V., Mura, U., Del-Corso, A., The use of dimethylsulfoxide as a solvent in enzyme inhibition studies: the case of aldose reductase, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 32(1) (2017) 1152-1158.
- [22] Kwak, G.-H., Choi, S. H., Kim, J.-R., Kim, H.-Y., Inhibition of methionine sulfoxide reduction by dimethyl sulfoxide, *BMB Rep.*, 42 (2009) 580–585.
- [23] Wen, L., Lyu, M., Xiao, H., Lan, H., Zuo, Z., Yin, Z., Protein Aggregation and Performance Optimization Based on Microconformational Changes of Aromatic Hydrophobic Regions, *Mol. Pharm.*, 15 (2018) 2257–2267.
- [24] van Hylckama Vlieg, J., Tang, L., Lutje Spelberg, J. H. i sur., Halohydrin Dehalogenases Are Structurally and Mechanistically Related to Short-Chain Dehydrogenases/Reductases, *Bacteriol.*, 183 (2001) 5058–5066.
- [25] Simić, S., Zukić, E., Schmermund, L., Faber, K., Winkler, C.K., Kroutil, W., Shortening Synthetic Routes to Small Molecule Active Pharmaceutical Ingredients Employing Biocatalytic Methods, *Chem. Rev.*, 122 (2022) 1052-1126.

- [26] Yang, R., Rodriguez-Fernandez, M., St. John, P. C., Doyle, F. J., Systems Biology, u: Carson, E., Cobelli, C., Modelling Methodology for Physiology and Medicine (vol. 2), Elsevier, Amsterdam, 2014., str. 159-187.
- [27] Doran, P. M., Homogeneous Reactions, u: Doran, P. M., Bioprocess Engineering Principles (vol. 2), Academic Press, Oxford, 2013., str. 599-703.
- [28] Risso, V. A., Sanchez-Ruiz, J. M., Banu Ozkan, S., Biotechnological and protein-engineering implications of ancestral protein resurrection, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 51 (2018) 106-115.
- [29] Merkl, R., Sterner, R., Ancestral protein reconstruction: techniques and applications, *Biol. Chem.*, 397(1) (2016) 1-21.
- [30] Spence, M. A., Kaczmariski, J. A., Saunders, J. W., Jackson, C. J., Ancestral sequence reconstruction for protein engineers, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 69 (2021) 131-141.
- [31] Dube, N., Khan, S. H., Okafor, D., Ancestral sequence reconstruction for evolutionary characterization of proteins, *Trends Biochem. Sci.*, 47(1) (2022) 98-99.
- [32] Penny, D., Poole, A., The nature of the last universal common ancestor, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9(6) (1999) 672-677.
- [33] Eick, G. N., Bridgham, J. T., Anderson, D. P., Harms, M. J., Thornton, J. W., Robustness of Reconstructed Ancestral Protein Functions to Statistical Uncertainty, *Mol. Biol. Evol.*, 34(2) (2017) 247–261.
- [34] Gouy, M., Chaussidon, M., Ancient bacteria liked it hot, *Nature*, 451 (2008) 635–636.
- [35] Grabski, A., Mehler, M., Drott, D., The Overnight Express Autoinduction System: High-density cell growth and protein expression while you sleep, *Nat. Methods*, 2 (2005) 233–235.
- [36] Hage, D.S., Liquid Chromatography | Affinity Chromatography, u: Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C., Encyclopedia of Analytical Science (vol. 2), Elsevier, 2005., str. 190-197.
- [37] Parkinson, D. R., Analytical Derivatization Techniques, u: Pawliszyn, J., Comprehensive Sampling and Sample Preparation (vol. 2), Academic Press, Oxford, 2012., str. 559-595.
- [38] Isbir, T., Kirac, D., Demircan, B., Dalan, B., Gel Electrophoresis, u: Maloy, S., Hughes, K., Brenner's Encyclopedia of Genetics, Elsevier, 2013., str. 165–167.
- [39] Scopes, R. K., Enzyme Activity and Assays, u: Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, 2002., str. 1-6.
- [40] Milčić, N., Stepanić, V., Crnolatac, I., Findrik Blažević, Z., Brkljača, Z., Majerić Elenkov, M., Inhibitory Effect of DMSO on Halohydrin Dehalogenase: Experimental and

Computational Insights into the Influence of an Organic Co-solvent on the Structural and Catalytic Properties of a Biocatalyst, *Chem. Eur. J.*, 28 (56) (2022) e202201923.

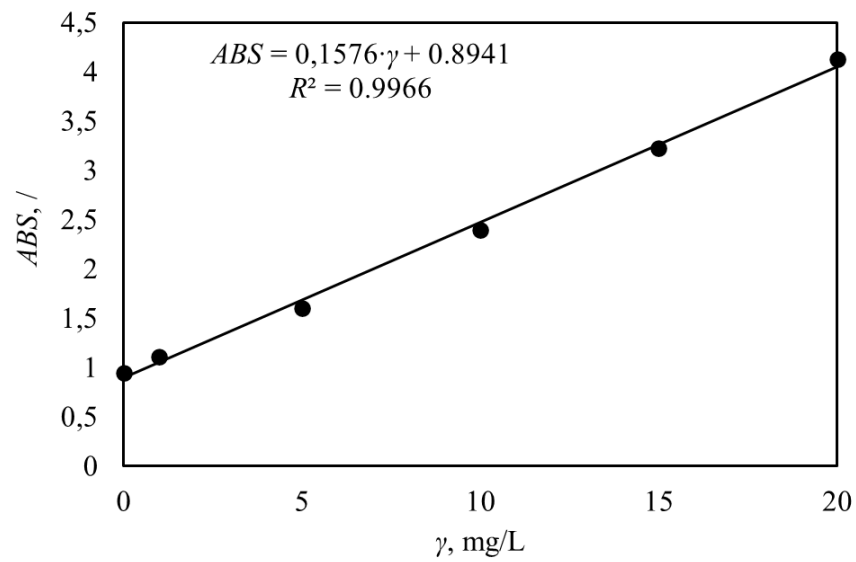
[41] Tang, L., Lutje Spelberg, J. H., Fraaije, M. W., Janssen, D. B., Kinetic Mechanism and Enantioselectivity of Halohydrin Dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter*, *Biochem.*, 42(18) (2003) 5378–5386.

[42] Milčić N., Sudar, M., Dokli, I., Majerić Elenkov, M., Findrik Blažević, Z., Halohydrin dehalogenase-catalysed synthesis of enantiopure fluorinated building blocks: bottlenecks found and explained by applying a reaction engineering approach, *React. Chem. Eng.*, 8 (2023) 673-686.

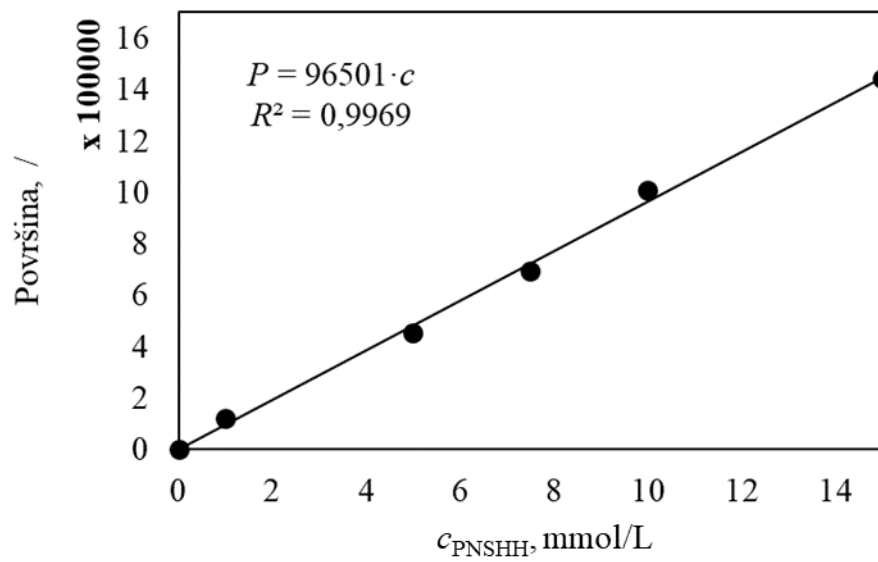
[43] Milčić, N., Švaco, P., Sudar, M., Tang, L., Findrik Blažević, Z., Majerić Elenkov, M., Impact of organic solvents on the catalytic performance of halohydrin dehalogenase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 107 (2023) 2351–2361.

8. PRILOZI

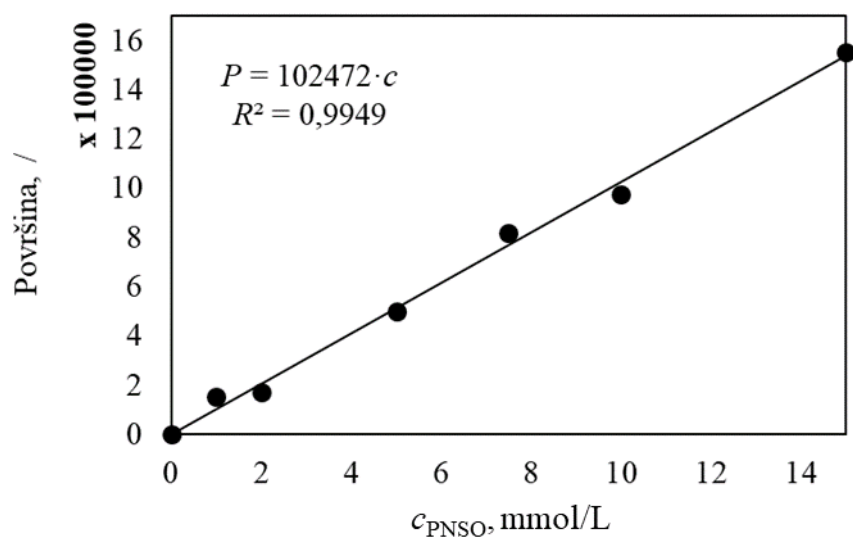
Prilog 1. Baždarni pravac dobiven metodom po Bradfordu



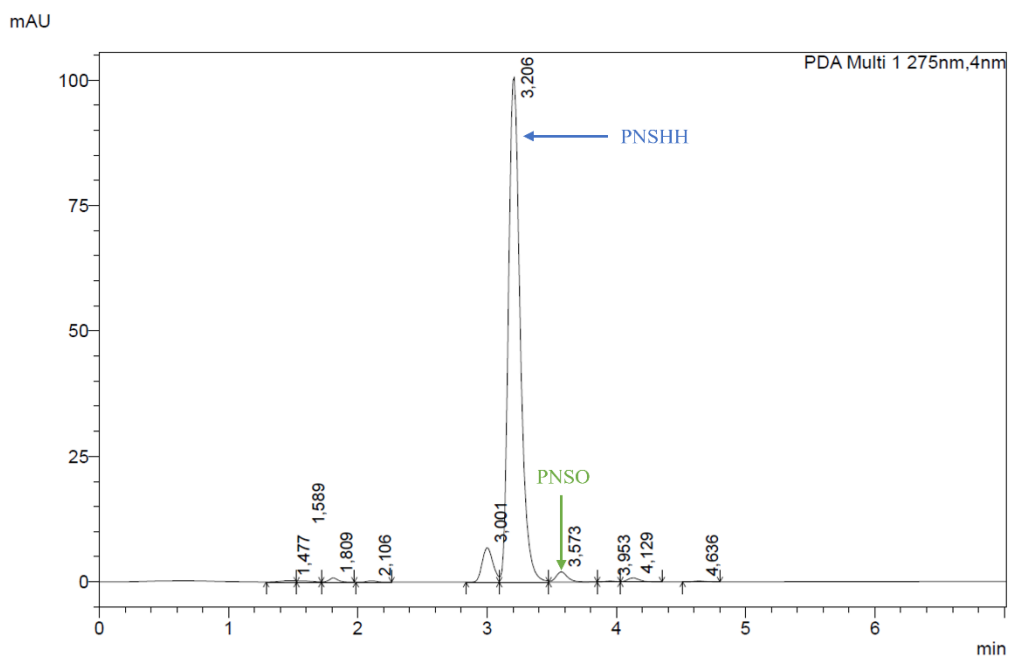
Prilog 2. Baždarni pravac za PNSHH



Prilog 3. Baždarni pravac za PNSO



Prilog 4. Kromatogram za PNSHH i PNSO



Prilog 5. Sekvence enzima iz pripadajućih organizama preuzeto iz PDB.

Enzim	Organizam	Sekvenca
HheA pBAA14361.1	<i>Corynebacterium</i> sp.	MKIALVTHARHFAGPAAVEALTRDGY TVVCHDATFADAAERQRFESENPGTV ALAEQKPERLV DATLQHGEAIDTIVSN DYIPRPMNRLPIEGTSEADIRQVFEALSI FPILLQSAIAPLRAAGGASVIFITSSVG KKPLAYNPLYGPARAATVALVESAAK TLSRDGILLYAIGPNFFNNTYFPTSDW ENNP ELRER VERDVPLGRLGRPDEM G ALITFLASRR AAPIVGQFFAFTGGYLP
HheA2 AAK92100.1	<i>Arthrobacter</i> sp. AD2	MVIALVTHARHFAGPAAVEALTQDGY TVVCHDASFADAAERQRFESENPGTIA LAEQKPERLV DATLQHGEAIDTIVSND YIPRPMNRLPLEGTSEADIRQMFEALSI FPILLQSAIAPLRAAGGASVIFITSSVG KKPLAYNPLYGPARAATVALVESAAK TLSRDGILLYAIGPNFFNNTYFPTSDW ENNP ELRER VDRDVPLGRLGRPDEM G ALITFLASRR AAPIVGQFFAFTGGYLP
HheA3 ABS64560.1	<i>Parvibaculum</i> <i>lavamentivorans</i> DS-1	MARSILITDIAHFVGGPSARALLAEGAR IYGV DASFADAAARA AFETKIPGVKAL SAQDPREAVAAVLEAEGRLDVLINND AWPAMRGPVDEATDKDLHETFEALVF KSFAMTRAAVPQMKKQRAGKILFLSS AAPLNGIPNYSIYAAARGAANSLALTL AKELAPSNIQVNALAFNFIESPDYFPAS LLENPKSRDKILSNIPLGRLGKPEEAAAI VAFLAGPTSDFITGQLIPVAGGWATAR
HheA4 AFI98638.1	<i>Arthrobacter</i> sp. JBH1	MKIALVTHARHFAGPAAVEALTRDGY TVVCHDASFADAAERQRFESENPGTVA LAEQKPERLV DATLQHGEAIDTIVSND YIPRPMNRLPIEGTSEADIRQMFEALSIF PILLQSAIAPLRAAGGASVIFITSSVGK KPLAYNPLYGPARAATVALVESAAKT LSRDGILLYAIGPNFFNNTYFPTSDWE NNP ELRER VERDVPLGRLGRPDEMGA LITFLASRR AAPIVGQFFAFTGGYLP
HheA5 AFK51877.1	<i>Tistrella mobilis</i> KA081020-065	MPVTD TAPRVALVTNATKYAGAPTVA ALASQGWQIIAHDASFTDVAARA AWE ADNQGMTAAEAQDPAGLIAEVRDRM GGLHGIVSNDAYPAIRRIETEAEALR EMLEALTVFPFALASAVTPHLKAQGAG AIVMVT SASPRRPYPGFAMYATARSAS TGLAKALANELAPHGIRVNAVAPNFLY SETYYPRAKWIDDPAGAARVREMVPL GRLGRP EEIGELIAFLLSDKAGFVVGET VGFTGGWP

HheA6 CDO61292.1	<i>Candidatus Phaeomarinobacte r ectocarpi</i>	MTDKRIAILTDATHFVGDIAIATRLSTD GYQVFAVDPAFSDAGKRTAFESLGDG VVALTHTSAGDVIEHVMSEAGHIDLLA SNDAYPAIRAPLTDITSDALRDTLEALV VKPFDFAHVAGHMKARKQGKIVFLT SAAPLNGLPNYAMYCAARGAMNAAV KALAKELGPSNVQVNAIAPNFVANPDY FPPELMADPKAPKILKNIPLGRLGKPE EVAAMVAQLASEDGGFFTQVIAASG GWA
HheA7 WP 025899379.1	<i>Sneathiella glossodoripedis</i>	MLNNKIILVTDATHFLGKPGITALVRD GATVFAQDARFTDKQARDAFEELIPGV TALAEQVPSEVIDVLSKAGQLDVLVN NDAFPAIKAAIDEAELSDFDTLNALLV RGFYAKHASKHMKGRGCGKILFVSS AVPKHGLPNYSMYVAARGGANALAI LAKELGRHGIQVNALAPNFIESPTYFPK ELLENEEAYKKITKPIPLGRLGKPEEAG EYLAFLASDRSDYITGQVLYFAGGWA
HheA8 WP 029639308.1	<i>Alphaproteobacteri um Mf 1.05b.01</i>	MLEEAMSELADTIVLITDLEHFVGRPSA KALLEAGATVYGTDPAFADANMRSAA EAALPGLKTVSGSDPVVAAGRVLEESG RIDVLINNDAYPALRAPLDTAKDEDLE ATYEALVFKPFRVTRAIVPSMKSAGGG KVLFLTSAAPLNGLANYSMYASARGA ANSLMLSLSRELAPRNIQVNAVAPNYV ENPDYFPPELLANEEAMAKILKNIPLKR LGKPEEAAALITFLATPLSGFITGQVIPL AGGWANAR
HheA9 GAK44072.1	<i>Tepidicaulis marinus</i>	MPRTVLITDVTRFIGIPGTKALLEEGYK VFGTDPDFTDDSKRSAYEKACPGATAL LPDSSDNLVKATVEAGGTLVDLINNDA YPAHRASVEEASDELLRKTDFDMLFFKA YAMARAAVPQMKKQSGSKIIFNTSAA PLNGLRNYSVYVSARGAANALARTLA LELAADNIQVNAVAPNFVDNPDYFPPE LMADPKAARILKNIPMGRGLGKPEEAA SLLAYLASEKSSFITGQIPLAGGWASA R
ZJB120203	<i>Agromyces mediolanus</i>	ATGCGCATCGCCCTCGTGACTCATGC ACGGCATTTCAGGCCCGCCGCCG TCGAGGCGCTTACGCGGG ATGGCTATACCGTGGTTTGCCACGAC GCGAGCTTCGCTGATGCAGCTGAACG ACAGCGTTTCGAGTCGGA GAACCCGGGCACCATCGCGCTCGCCG AGCAGAAGCCCGAGCGTCTGGTCGA CGCCACGCTGCAGTACGGG GAAGCGATCGACACGATCGTCTCGAA CGATTACATTCCGCGCCCGATGAATC

		GGCTCCCGATCGAGGGAA CGAGCGAGGCCGACATCCGACAGAT GTTCGAGGCGCTCAGCATCTTCCCGA TCCTGCTCCTGCAGTCGGCCATCGCG CCGCTACGGGCTGCAGGGCGGCGCCTC CGTTATCTTCATCACGTCCTCGGTTGG CAAGAAGCCGCTCGCCTACAACCCTC TCTATGGGCCC GCGCGCGCCGCTACC GTCGCGCTTGTCGAATCGGCAGCGAA GACGCTGTCCCGTGACGGAATCTTGC TCTATGCGATCGGTCCGA ACTTCTTC AACAAACCCGACGTACTTCCCGACGTC GGATTGGGAGAACGACCCCGAGCTC CGGGATCGTGTGCGAGCGGGACGTGCC GCTCGGTGCGCTCGGCCGTCGGGACG AGATGGGTGCGCTGATCACCTTCTC GCTTCGCGTCGTGCAGCGCCCATCGT GGGGCAGTTCTTCGCTTTCACCGGTG GCTATCTGCCCTAA
HheB BAA14362.1	<i>Corynebacterium</i> sp.	MANGRKREMANGRLAGKRVL TNAD AYMGEATVQVFEEEGAEVIADHTDLT KVGAAEEVVERAGHIDVLVANFAVDA HFGVTVLETDEELWQTA YETIVHPLHR ICRAVLPQFYERNKGKIVVYGSAAAMR YQEGALAYSTARFAQRGYVTALGPEA ARHNVNVNFIAQHWTQNKEYFWPERI ATDEFKEDMARRVPLGRLATAREDAL LALFLASDESDFIVGKSIEFDGGWAT
GP1 HheB2 AAK73175.1	<i>Mycobacterium</i> sp.	MANGRKREMANGRLAGKRVL TNAD AYMGEATVQVFEEEGAEVFADHTDLT KVGAAEEVVERAGHIDVLVANFAVDA HFGVTVLETDEELWQTA YETIVHPLHR ICRAVLPQFYERNKGKIVVYGSATAMR CHEGALAYSTARFAQRGYVTALGPEA ARHNVNVNFIAQHWTQNKEYFWPERI ATDEFKEDMARRVPLGRLATAREDAL LALFLASDESDFIVGKSIEFDGGWAT
HheB3 EBL02020.1	<i>Ralstonia</i>	MPGDFMSKRLEGKRVLVTQSNNYMGP ATVELFEKEGAIVTADSSDLTETEKCQ DIVESAGIIDILIANLASENFSGIPTSDLT DEDWNTTFDVMVHPLHKL SRAVIPQM VERQAGKIIVYGSASALKGMRTLAAYS AARAAQVGYVQSLGVELAPHNIQVNLI AQNYVENPIIYPESLRSQEKFNLSLKR QVPLGRLARAEEDAQFALFLASNESDF FVGQAIPFSGGWVQR
HheB4 EBP61646.1	<i>Shewanella</i>	MSGRIEGKRVLVTQAADYMGPPATAEL FTAEGAQVTTDTSDLTQPGRCEALIESC GEIDILVANLASP NFSGIATAELSDDDW QTAFDMMVHPLHRLCRAVLPQMIEK

		KGKIVVFGSAAALKGMKTLATYSAAR AAQVGYVQSLGVEVAPHNVQVNLIAQ NYVENSVYYPPELQQNEGFKKSLRRQ VPLGRLATAKEDALFALFLASEESDF VGQAIPFSGGWTQ
HheB5 ECR06649.1	<i>Burkholderia</i>	MLMGRLDGKRVLVTQADDYM GPVTLEVFAEEGAEVIADNSDLTDPSR AAALIEETGHIDVLVANLAAPANLGVA AADMPDDIWQTMFDVMVHPLHRLTK AVLPQMVERQKGKILVYGSATGVKGM AGITAYSAARHAQVGYVRSTGAEIAGH NIQMNLIAQNFVENPVYFPPQFTETPEF KELKGVPAURLATAREDALFAVFLAS DESDFVVGQAIPFSGGWAQ
HheB6 EDB56284.1	<i>Sorangium</i>	MDSKASLVRAPTANTPKVPLTSTIESRR KVQIMDKRLAGKRVLITQAEDYMGP ITELFAEHGAEIADTRDLTEDGAVESLI KSAGEIDVLIANLAAPAHGLSVTDTD DTTWETAFDVMVHPLHRIFRSVLPAM YERKRGKIVVIGSATGLKALEGVVAYG AARHAQVGYVRAAGIEAARHNVQINLI AQNFVENPAYFPPEFTASNEFKQLLSA HVPLGRLATAREDALFALFLASDESDF FVGQAIPFSGGWAQ
HheB7 EDD65701.1	<i>Bradyrhizobium</i>	MNTRCTSRKPGVLNSNQNSMEKQM GDRLAGKRVLVTQADNYMGPATIELF TEEGAEVLADHSDLTVAGRCSALIKEH GRIDVLVANLASPNTGIPATELADED WHCTFNMMVHPLHQLCQAVVPQMIE RQAGKIVVFGSATALKGMPTVTA YSAARAAQAGYVRSGLGVEIAKHNIQANLIA QNYVENPVYYPPELREKESFQKSLARQ VPLGRLATAREDALFALFLASDESDF VGQSIASFSGGWAQ
HheC AAK92099.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	MSTAIVTNVKHFSGMGSALRLSEAGH TVACHDESFKQKDELEAFAETYPQLKP MSEQEPAELIEAVTSAYGQVDVLSND IFAPEFQPIDKYAVEDYRGAVEALQIRP FALVNAVASQMKKRKSGHIFITSATPF GPWKELSTYTSARAGACTLANALSKEL GEYNIPVFAIGPNYLHSEDSFYPTPEP WKTNPESHVAHVKKVTALQRLGTQKEL GELVAFLASGSCDYLTGQVFWLAGGF PMIERWPGMPE
HheD AAZ44846.1	<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	MSNQSLVGKRVLITQADMFMGPVLCE VFARHGATVIANTDALLAPDAPATVV AQAGQIDALVANLAMPAPTTAATEVS DEEWRDTFAILVDPLARLLRAALPAMI ERRSGKILVMGSASALRGMKRASTYSA ARGAQLAYVQAVGVEVAPHNVQVNAI

		AQNFVDNPTYFPPEVQANPRFQERLKR EVPLGRLVGADEDAEFAAYLCSDSAN CFVGQVFPVCGGWVMR
HTCC2207 EAS46473.1	<i>Gammaproteobacte rium</i> sp.	MNNSQLAGKRILVTQADTFMGPTLCE VFAEMGAEVIADNNLLTDPALPAKIIQ QAGHIDVLVINLAIPAPFTKGELVDDSE WSATFSAVVDPMPLCTAVLPQMIERQ GGKILVMGSASALRGMKRASTYSAAR GAQLSYVKAMGVEMAPQGIQINAIQ NFVDNPTYFPEETKANPKFQERLKR PLGRLVSLREDALFAAYLCSDAADCFV GQVFPVSGGWAV
HheD3 ABM93639.1	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	MTGNPLSLSGRRALITQADAFMGPALC EVFAAHGADVIADTSPLADADAPARV VAAAGVVDLLVLNLAIPAPRTSAVASS DAEWAAVFGALVDPLRLLRAVLPQM IARRAGR VVLMGSAAALRGMKNSSTY SAARGAQLAYVQAVGVEVAPHGVRV NAIAQNFVDNPTYFPPEVQADPRFQER LKREVPLGRLVGAREDAEFAAYLCSEP ADCFVGQVFPVCGGWVPR
HheD4 ECY18578.1	<i>Haliangium</i>	MDRQPGDRRCTEQTCQFFSRGPTMSS NDLKGKRILVTQADTFMGPTLCEVFTE KGAEVIRDNQLLTEPTLPAQLVAAAGS IDVLVINLAIPAPFTKLEKVDNEWESV FSAVVNPMPRLVSAVLPQMIERQSGKI LVMGSASALRGMKRASTYSAARGAQL AYVQAAGVEMAPHNIQINAIQNFVD NPTYFPEETKANPAFQDRKREVPLGR LVSMREDAQFAAYLCSDAADCFVGQV FPVSGGWAQLKNEQHGMIIISFIDSLSAK VIRCH
HheD5 MZ1T ECY18578.1	<i>Thauera</i> sp.	MHANSLSGRRVLVTQADAFMGPALCE AFRAAGAEVVPDQSALLERGAGRAVIE AAGRIDVLVLNLAIPAPSTPVHQVSDG EWETTFAALVHPMREMVAAVLPQMIE RKAGKILLMGSAAALRGMALRSSYAA ARGAQLAYIQAVGVEAAAAGVQVNAI AQNFVENPTYFPPEVQATPAFKDRLKW QVPLGRLVTADEDAFVAYLCSEAN CFVGQVFPVCGGWVNR
HheD6 ENO15189.1	<i>Marinobacter nanhaiticus</i> D15- 8W	MTATHPSQSSRALLQDKRILVTQAEDF MGPALCRTLASHGAEVVEDTLPLMPT GAAIEVIRNAGDVDVLVANLAIAPST QAGEVTEDEWRSVFSALVDPLPRLVK AVLPGMIERGKGGKILVMGSASALRGM KRASTYSAARGAQLAYVQSVGVELAK YNIQVNAIAQNFVDNPTYFPKEVQENP RFQDRKREVPLGRLVSPEEDAEFVAY LCSDAANCFVGQVFPVSGGWAIR

HheD7 ENO82779.1	<i>Thauera</i> sp. 27	MENALAGKRVLITQADAFMGPVLCEV FAEQGAEEVVASADDLAVVDAERVVR AAGHIDVVVANLAIKAPSTAAVEVTD EWRDVFAALVDPLPRLVRAAAPAMVE RRAGKILLMGSASALRGMKRASTYSA ARGAQLAYVQAIGVELAAHNVQVNA VAQNFVDNPTYFPPEVQANPRFQERLA REVPLGRLVSAREDALFAAYLCSPAAD CFVGQVFPVCCGGWVGR
HheD8 ENO87252.1	<i>Thauera</i> <i>aminoaromatica</i> S2	MHAISLSGRRVLVTQADAFMGPALCD AFRAAGAEVVPDRSALLERGAGRAVIE AAGRIDVLVLNLAIPAPSTPVHQS EWETTFAALVHPMREMVAAVLPQMI RKAGKILLMGSAAALRGMALRSSYAA ARGAQLAYIQAVGVEAAAHHGVQVNAI AQNFDNPTYFPPEVQATPAFKDRLKW QVPLGRLVTADEDAFVAYLCSEAN CFVGQVFPVCCGGWVNR
HheD9 ENO98837.1	<i>Thauera</i> <i>phenylacetica</i> B4P	MNGISLVGRRVLVTQAEDFMGPALCA AFAAAGAELIADRSAPRQPGSRAVIES AGHIDALVLNLAIPAPSTPAHQVSDDE WEAFAALVHPMREMVAAVLPQMIE KAGKIVLMGSASALRGMARRSSYAAA RGAQLAYIQAVGVEAAAHHGIQVNAIA QNFVDNPTYFPPEVQATQAFKDRLKW QVPLGRLVTAEDAGFAVAYLCSEAN CFVGQVFPVCCGGWVSR
HheD10 WP 019427705.1	<i>Limnohabitans</i> sp. Rim28	MNMIDLRGQRILVTQAQDFMGPALCQ ELRACGAEVIADDRVLTAPQDAQAMI KEAGPLAALVINLALPAPSTPVTQIDEA EWHQVFEVMVDPLPRLVRAVVPGMK ARGGGKIVVMGSASALRGMKRAASYS AARGAQLAYVQAAGVELAPDNIQLNA VAQNFVDNPTYFPPEVQANPRFQERLK REVPLGRLVKAEDARFVAYLCSDAAS CFVGQVFPMSGGWAVR
HheD11 WP 020394200.1	<i>Thiolinea</i> <i>disciformis</i>	MINLVGKRILVTQANAFMGPALCEVLT EYGADVISED SLIDATAPAQLIAGVGR IDVLVANLALAAPSTVAEQVSDEEWD VFASLVNPLPRLCRAILPAMQARRSGKI LVMGSASALRGMKRASTYSAARGAQL AYVQALGVEVAPFNIQVNAIAQNFVD NPTYFPAEVQTNPRFQERLQREVPLGR LVAAREDTTFAAYLCSDAANCFVGQV FPVAGGWAIAK
HheD12 WP 022962804.1	<i>Halopseudomonas</i> <i>pelagia</i>	MTPADLTGKRILLTQADAFMGPALHN MLSRCGAQVIADTGTLDTREAVDQLV SQSGHIDVLVANLGVPAAPSTAAVQVSD DEWRLMFTHMVDPLQQLTRAILPAMIE RQCGKILLMGSASALRGIKRASSYSAA

		RGAQLAYIRAVGVEVARHNIQVNAIAQ NFVDNPTYFPAEVQANTAFQERLRREV PLGRLVSAEEDAQFAAYLCSDAANCFV GQIFPVC GGWAD
HheD13 ESS13801.1	<i>Betaproteobacteria</i> <i>bacterium</i> MOLA814	MQHLTDKRILVTQADAFMGPALCATL ADHGAHVISDTRVLTLPHDSQALIDSA GPLDVLVINLAMAAPSTPVADIQDDEW RQVFEVMVDPLPRLLRVVPGMKARG GGKVIVMGSAAALRGMKRTASYSAAAR GAQLAFVQAVGVELAPDNIQVNAIAQ NFVDNPTYFPAAVQANPRFQERLKRREV PLGRLVSAQEDTSFVAYLCSDAADCFV GQVFPMSGGWAVR
HheD14 ETN91936.1	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>bacterium</i> MOLA455	MNSAQLAGKRILVTQADTFMGPTLCE VFTEMGAEVIADNNLLIDPSLPAKIIQR AGRIDVLVINLAIPAPFTKGELVDDTEW SATFRAVVDPMPLCTAVLPQMIERQG GKILVMGSASALRGMKRASTYSAAARG AQLAYVKAMGVEMAPQGGIQINAIAQN FVDNPTYFPEETKANPRFQQRLENDVP LGRLVSLREDALFAAYLCSDAADCFVG QVFPVSGGWAV
HheD15 CDI00977.1	<i>Candidatus</i> <i>Competibacter</i> <i>denitrificans</i> Run A D11	MPDTLLSGKRVLITHADLFMGPVLCEV FAKHGATVIASNDPLTGEDTPAALVAE SGPLDALVANLAIAPTTLTTEVTEQE WQETFGALVHPLARLCRAVLPGMIEK RAGKIVVMGSASALRGIKRTSTYSAAAR GAQLAYVQAVGVEVAPYNIQVNAIAQ NFVDNPTYFPADVQANPRFQERLKRREV PLGRLVSAKEDAEEFAAYLCSANCFV GQVFPVC GGWVTR
HheD16 EWS52496.1	<i>Methylibium</i> sp. T29	MTGNPLTSLGRRALITQADAFMGPALC EVFAAHGADVIADTSPLADADAPARV VAAAGVVDLLVLNLAIPAPRTSAVASS DAEWAAVFGALVDPLPRLLRVLPQM IARRAGRVVLMGSAAALRGMKNSSTY SAARGAQLAYVQAVGVEVAPHGVRV NAIAQNFVDNPTYFPPEVQADPRFQER LKREVPLGRLVGAREDAEEFAAYLCS ADCFVGQVFPVC GGWVPR
HheD17 WP 027476209.1	<i>Curvibacter</i> <i>gracilis</i>	MSSQRLAGLRVLITQANEFMGPTLCEV FAEQGAVVLADDGPLTDPQAPARLVA GHGPIDVLVANLAVPAPSTPAHQVSEQ EWRDTFAALVDPLPRLCQAVLPDMMMA RRSGRILVMGSAAALRGMKRTSTYSA ARGAQLAYVQALGVEVASHNIQVNAI AQNLDNPTYFPPEVQADPRFQERLRR EVPLGRLVSAREDAEEFAAYLCSAPAAC FVGQVFPVC GGWVGR

HheD18 WP 031254602.1	<i>Curvibacter lanceolatus</i>	MSSQCLAGLRVLITQANEFMGPTLCEV FAEQGAVVLADDGPLTDPQAPARLVA GHGPIDVLVANLAVPAPSTPAHQVSEQ EWRDTFAALVDPLPRLCQAVLPAMMA RRSGRILVMGSAAALRGMKRSSTYSA ARGAQLAYVQALGVEVASYNIQVNAI AQNLDVNPTYFPPEVQADPRFQERLRR EVPLGRLVSAREDAEFAAYLCSAPAAC FVGQVFPVCGGWVGR
HheE EBP63112.1	<i>Acaryochloris</i>	MKQRTVLVTCVDKYMGRAIVDRLTEL DFRVLTDQTALVEQSQCEELVRSVGEV DILIANLAEPPRSSPVQAIQNEDWTTLF STLVDPLMFLVRAITPQMLDRQSGKIIA VTSAAPLKGLANNASYCAARGAQNAF IKAVGLELARSNIQVNAIAQNYINNNT YYP SRLLDDEKFLDHVRRNVPTNQVGS SEETAELAAYLASEKCNHVMVGQIPLA GGWAT
HheE2 ECW41905.1	<i>Sorangium</i>	MGDRLTGKRVLVTHADRYMGAPVAE RFRAEGAEEVIADTSVPRSAEAGAAIAE AAGAIDVLFANLAWPPTPALVTDTSDE DWHALFDVLVHPLMGLVRAAAKTMK GAGGGRIIGMTSAAPLRGIPRNSAYCA ARGAQNAYLRAAGLELARDGVLVTAI AQNYVENDTYPPGLTEDEQFLARMR GVVPAQRLGQPEETAALALFLATEAGF VPGQVFPLAGGWTTTL
HheE3 EDF62577.1	<i>Burkholderia</i>	MRTILMRLENKRVMVTQSDDYMGP AITSFLSTEGAQVTTREKPVPTGKAFSTW VREMPVYDVVVANLAHDPCSSAVDNI DNEDWQALFETLVHPLMYLVRHFAPK MAERGYGKIIAITSAAPLRGIPGSTAYC AARGAQNAFIRATGLEFAARGVNINAV AQNYVSNPAYFPDDLVASERFQKHLA RNVPIGRVAKDTESAELALFLASNASD FIVGQVVPFSGGWATNT
HheE4 EDH34310.1	<i>Catenulispora</i>	MEWALIGPDSPPAKLRESRFMTRLEH KKVLITQSDDYMGPADLFAAEAARV TARPGLVFPGTQFARYVQGLPDFDVVI ANLAHDPCNGPIETLADESWEKLFDTM VHPLMALVRHFAPRMADQGHGKIIAIT SAAPLKGLPGSAA YCAARGAQNAFIKA VGLEFAAKNVQINAI AQNYVSNPVYYP DELVQSERFQKHLARNVPIRRVARPEE QAEFALFLASNNSDFFVGQIFPFGGW AINA
HheE5 EGG28524.1	<i>Aequoribacter fuscus</i>	MFHAAAKDFMLTKEHIMSQFSGKSVW VTSADRYMGPSIADEFERLGAIVTRDM HVLYDDHYLRETLAEIPDIVIANLAEP RKDALEAIQDDDNLLFDHLVHPLMR

		IVRHVSGPMKARGHGKIVAITSAAPLR GIPFASGYCAARGAQNAFIKAGLELA KFGVQANAIGQNYIENDTYYPPELMQD PRFISNLSSQVPTKKVGRGLETAKLAA YLADPDVEHVVGQIIPLAGGWTT
HheF BAH89601.1	<i>Uncultured bacterium</i>	MVLKEPIMTEQPQKNGYGLSGKRVVIT QAAGFMGPSLVEAFSREGAEVIPDHRD LTHDKAADNLVSEFKEIDILLINLASQR QRIEATEISDQQFLQPFEEMVYPLFRLG RSVLPQMIARRRGKIIVIGSAAPLRPFA NATGYATARGAQLAWVKA VGAEVAQ HNVQVNGIAQIFVENQEYFPPAYLQTD EFKQRIAQVPAGRLGSAEHAALSFL ASDQCNFISGQVVPFAGGWTT
HheG BAN03849.1	<i>Ilumatobacter coccineus</i> YM16 304	MSNAENRPVALITMATGYVGPALART MADRGFDLVLHG TAGDGT MVGVEESF DSQIADLAKRGADVLTISDVDLTTTRTG NQSMIERVLERFGRLDSACLVTGLIVT GKFLDMTDDQWAKVKATNLDMVFHG LQAVLPPMVAAGAGQC VVFTSATGGR PDPMVSIYGGTRAGANGIVRAVGLEHA RHGVQVNAIGTNYMDFPGFLKASRAD GDPERRAMIEAQVPLRRLGTMDLSSV TAGLLDGSNRFQTGQFFDFSGGWGA

8. SAŽETAK

Autori: Leo Bolješić, Ivana Petrić, Krešimir Kos

Naslov rada: U potrazi za termostabilnijim enzimima za industrijsku primjenu: rekonstrukcija drevnih predaka C-tipa halogenhidrin-dehalogenaze

Korištenje novih i održivih principa „zelenog inženjerstva“ posljednjih godina postaje sve snažniji trend u industriji, pri čemu optimizacija enzima za industrijske procese predstavlja nove prilike za njihovu širu primjenu.

Središnji cilj ovog rada bila je rekonstrukcija filogenetskog stabla halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH) te sinteza i karakterizacija predaka C-tipa HHDH, kako bi se pronašli termostabilniji enzimi s potencijalom za industrijsku primjenu. U ovom radu su s tim ciljem uspješno uzgojeni drevni proteini, precizno HheC enzima iz *Agrobacterium radiobacter* AD1: Tipovi N122 (direktni predak HheC), N124 (direktni predak N122, te zajednički predak C- i A-skupina HHDH) i N134 (daljnji predak svih HHDH enzima). Nakon što su navedeni sintetički proteini uspješno sintetizirani i pročišćeni, ispitana su njihova svojstva od ključne važnosti za potencijalnu katalitičku primjenu, što uključuje katalitičku aktivnost, termostabilnost te stabilnost pri inkubaciji pri različitim uvjetima.

Najveću vrijednost specifične aktivnosti prema supstratu *para*-nitro-2-brom-1-feniletanolu (PNSHH) pokazali su precizno N124 ($V_{max}^{N124} = 1460,14$ U/mg; $K_m^{N124} = 12,33$ mmol/L) i N134 ($V_{max}^{N134} = 1937,92$ U/mg; $K_m^{N134} = 16,69$ mmol/L), s obzirom da je njihova vrijednost kinetičkih parametara V_{max} i K_m u odnosu na HheC ($V_{max}^{HheC} = 26,21$ U/mg; $K_m^{HheC} = 0,009$ mmol/L) do nekoliko redova veličina veća. Termički najstabilniji na temelju mjerenja diferencijalnom pretražnom fluorimetrijom (DSF) pokazao se N122, čija je temperatura taljenja (T_m^{N122} oko 80 °C) bila za oko 20 °C veća od HheC (T_m^{HheC} oko 60°C), dok N124 i N134 sa T_m^{N124} oko 55 °C i T_m^{N134} oko 57 °C nisu pokazali povećanje termostabilnosti. Sličan trend pokazala je inkubacija proteina pri 25 i 50 °C, gdje je najveću stabilnost pri obje temperature pokazao N122. Takav trend bio je očekivan na temelju samih DSF mjerenja. Osim što se prethodno pokazao kao temperaturno najmanje stabilnim, N124 se ujedno pokazao i najmanje stabilan kod inkubacije. Svaki od ispitivanih predaka pokazali su određeno poboljšanje u odnosu na divlji HheC tip, što ukazuje na važnost ovog istraživanja za buduće potrebe.

Ključne riječi: HheC, rekonstrukcija filogenetskog stabla, halogenhidrin-dehalogenaza, termostabilnost, specifična aktivnost, *para*-nitro-2-brom-1-feniletanol

9. SUMMARY

Authors: Leo Bolješić, Ivana Petrić, Krešimir Kos

Title of paper: In search of more thermostable enzymes for industrial use: reconstruction of ancient ancestors of C-type halohydrin dehalogenase

The use of new and sustainable „green engineering“ principles has become an increasingly strong trend in the industry, with optimization of enzymes for industrial processes presenting new opportunities for their broader application.

The central objective of this scientific work was the reconstruction of the phylogenetic tree of halohydrin dehalogenases (HHDH), along with the synthesis and characterization of the ancestors of C-type HHDH, in order to find more thermostable enzymes with the potential for industrial application. With this aim, the ancestors of the HheC enzyme from *Agrobacterium radiobacter* AD1 were successfully produced: Types N122 (direct ancestor of HheC), N124 (direct ancestor of N122, and common ancestor of C- i A-group of HHDHs) and N134 (further ancestor of all HHDH enzymes). After they were successfully synthesized and purified, their properties of crucial importance for their potential catalytic application were examined.

The highest value of specific activity towards the *para*-nitro-2-bromo-1-phenylethanol (PNSHH) substrate was shown by ancestors N124 ($V_{max}^{N124} = 1460,14$ U/mg; $K_m^{N124} = 12,33$ mmol/L) and N134 ($V_{max}^{N134} = 1937,92$ U/mg; $K_m^{N134} = 16,69$ mmol/L) through an increased value of kinetic parameters V_{max} and K_m , compared to the HheC enzyme itself na HheC ($V_{max}^{HheC} = 26,21$ U/mg; $K_m^{HheC} = 0,009$ mmol/L). N122 was the most thermally stable based on differential scanning fluorimetry (DSF) measurements, whose melting temperature (T_m about 80 °C) was about 20°C higher than HheC (T_m about 60°C), while N124 and N134 with T_m^{N124} about 50 °C and T_m^{N134} about 57 °C did not show increase in thermostability. A similar trend was shown by incubation at 25 and 50°C, where in both cases the greatest stability at both temperatures was shown by N122, which DSF measurements already implied. N124, in addition to previously being the least thermally stable, also proved to be the least stable during incubation. Each of the examined ancestors showed a certain improvement compared to the wild HheC type, which indicates the importance of this research for future needs.

Keywords: HheC, phylogenetic tree reconstruction, halogenhydrin dehalogenase, thermostability, specific activity, *para*-nitro-2-bromo-1-phenylethanol

10. ŽIVOTOPISI

Leo Bolješić rođen je u Malom Lošinj 16. prosinca 1998. Osnovnoškolsko obrazovanje završava u OŠ Maria Martinolića, a srednjoškolsko u SŠ Ambroza Haračića, smjer opća gimnazija. 2017. godine upisuje studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, a isti završava 2021. godine sa završnim radom na temu "Toksični učinak poli(vinil-klorida) na mikroalgu *Scenedesmus* sp.". Iste godine upisuje diplomski studij Ekoinženjerstvo, gdje je trenutno student na 2. godini. Od 2017. do 2020. bavi se volontiranjem u Studentskoj sekciji Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI). Od 2020. do sada volontira u studentskoj organizaciji BEST (Board of European Students of Technology), unutar koje je trenutno podpredsjednik za ljudske resurse internacionalnog upravnog odbora. Sudjelovalo je na Danima otvorenih vrata Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije 2023. te Festivalu znanosti 2023. s radionicom „Slatke tajne enzima“.

Krešimir Kos rođen je u Sisku 10. srpnja 1996. Osnovnoškolsko obrazovanje završava u OŠ „Braća Ribar“, a srednjoškolsko u Gimnaziji Sisak, opći smjer. 2017. godine upisuje studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, a isti završava 2021. godine sa završnim radom na temu „Novi dušikovi heteroaromati kao potencijalni kemijski senzori za pH i metalne katione“. Iste godine upisuje diplomski studij Ekoinženjerstvo i trenutno je student na 2. godini istoga. U prosincu 2021. sudjeluje sa posterskim izlaganjem na 14. Susretu mladih kemijskih inženjera, a u ožujku 2023. također sa posterskim izlaganjem na 28. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera. Sudjelovalo je na Danima otvorenih vrata Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije 2023. te Festivalu znanosti 2023. s radionicom „Slatke tajne enzima“.

Ivana Petrić rođena je 21. srpnja 1998. u Koprivnici. Osnovnoškolsko obrazovanje završava u OŠ „Đuro Ester“, a srednjoškolsko u Općoj gimnaziji „Fran Galović“, opći smjer. Godine 2008. upisuje školu stranih jezika „Hello English Language Club“ u Koprivnici, u sklopu čega 2016. polaže ispit iz engleskog jezika na C1 razini. Svoje obrazovanje nastavlja 2017. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije upisom na studij Ekoinženjerstvo, koji je završila 2021. godine sa završnim radom na temu „Tretiranje otpadnih voda taloženjem“. Iste godine upisuje diplomski studij Ekoinženjerstvo na kojem je trenutno student na 2. godini. U ožujku 2023. sudjeluje sa posterskim izlaganjem na 28. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera. Sudjelovala je na Danima otvorenih vrata Fakulteta

kemijskog inženjerstva i tehnologije 2023. te Festivalu znanosti 2023. s radionicom „Slatke tajne enzima“.