

# Izolacija i pročišćavanje halogenhidrin-dehalogenaze iz stanica genetski modificirane Escherichia coli

---

Mihaljević, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:702999>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Iva Mihaljević

IZOLACIJA I PROČIŠĆAVANJE HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZE IZ  
STANICA GENETSKI MODIFICIRANE *ESCHERICHIA COLI*

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

doc. dr. sc. Martina Sudar

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2020.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na vodstvu pri izradi ovog rada i doktorandici Neveni Milčić na pomoći, usmjeravanju i pristupačnosti za vrijeme eksperimentalnog dijela u laboratoriju.*

## SAŽETAK

U ovom radu provedena je izolacija i pročišćavanje enzima halogenhidrin-dehalogenaze (HheC). Najprije je uzgojena biomasa genetski modificiranih stanica *Escherichia coli* s visokim udjelom HheC. Nakon razbijanja bakterijskih stanica ultrazvukom, odvojeni su proteini od ostatka staničnog materijala centrifugiranjem te je dobiven sirovi enzimski ekstrakt.

Kako bi se utvrdila uspješnost eksperimenta, mjerena je koncentracija proteina metodom po Bradfordu i aktivnost enzima HheC spektrofotometrijskim testom.

Proces izolacije HheC je bitan za biokatalizu jer je otkriveno da ovaj enzim ima sposobnost kataliziranja reakcije otvaranja epoksida s malim "neprirodnim" anionskim nukleofilima, kao što su azid, cijanid, cijanat, tiocijanat, nitrit i formijat. Također, bitna primjena HHDH enzima je u proizvodnji optički čistih C<sub>3</sub> ili C<sub>4</sub> prekursora, na primjer, (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutanoata za sintezu statina.

**Ključne riječi:** halogenhidrin-dehalogenaza, enzim, epoksid, izolacija enzima, statin

## ABSTRACT

In this work, isolation and purification of the enzyme halohydrin dehalogenase (HheC) were carried out. Firstly, biomass of genetically modified *Escherichia coli* cells with a high HheC percentage was grown. After the disruption of bacterial cells by ultrasound, the proteins were separated from the rest of the cellular material by centrifugation and the crude enzyme extract was obtained.

To determine the success of the experiment, the Bradford method for protein quantification and the spectrophotometric assay for HheC enzyme activity were used.

The HheC isolation process is important for biocatalysis because it has been found that this enzyme has the ability to catalyze the epoxide ring-opening reaction with small "unnatural" anionic nucleophiles such as azide, cyanide, cyanate, thiocyanate, nitrite and formate. Also, the essential application of HHDH enzymes is in the production of optically pure C<sub>3</sub> or C<sub>4</sub> precursors, for example, (*R*)-4-cyano-3-hydroxybutanoate for statin synthesis.

**Key words:** halohydrin dehalogenase, enzyme, epoxide, enzyme isolation, statin

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost u okviru projekta "Enzimaska sinteza fluoriranih kiralnih građevnih blokova (EnzyFluor)", IP-2018-01-4493



# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Enzimi.....	2
2.1.1. Podjela enzima.....	3
2.1.2. Prednosti enzima.....	3
2.1.3. Nedostaci enzima.....	4
2.1.4. Mehanizam djelovanja enzima.....	4
2.2. Halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH).....	6
2.3. Rekombinantna DNA i prekomjerna ekspresija proteina.....	8
2.4. Hranjive podloge.....	10
2.5. Liza stanica.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. Aparatura.....	15
3.1.1. Autoklav.....	15
3.1.2. Termostat.....	15
3.1.3. Tresilica.....	16
3.1.4. Centrifuga.....	16
3.1.5. Aparatura za sonifikaciju.....	16
3.1.6. Analitička vaga.....	17
3.1.7. Homogenizator.....	18
3.1.8. pH metar.....	18
3.1.9. Spektrofotometar.....	18
3.2. Uzgoj bakterija i izolacija enzima.....	19
3.2.1. Uzgoj bakterijskih stanica <i>E. coli</i> s prekomjernom ekspresijom enzima HheC.....	19
3.2.2. Priprema male i velike prekonocne kulture.....	21
3.2.3. Centrifugiranje.....	22
3.2.4. Izolacija enzima.....	22
3.3. Analitičke metode.....	23
3.3.1. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	23
3.3.2. Mjerenje aktivnosti enzima HHDH–spektrofotometrijskim PNSHH testom.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	25

4.1. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	25
4.2. Mjerenje aktivnosti enzima HHDH – spektrofotometrijskim PNSHH testom.....	26
5. ZAKLJUČAK.....	28
6. POPIS SIMBOLA.....	29
7. LITERATURA.....	31
8. PRILOZI.....	34
8.1. Korišteni sirovi enzimski ekstrakti.....	34
8.2. Korištene kemikalije.....	34
8.3. Baždarni pravac.....	35



## 1. UVOD

Biološki katalizatori su produkti žive stanice. Drastično ubrzavaju biokemijske procese. Enzimski katalizirane reakcije su od  $10^6$  do  $10^{12}$  puta brže od nekataliziranih i barem tisuću puta brže od reakcija kataliziranih kemijskim katalizatorima. [1]

Enzimi su korišteni mnogo prije nego što su njihova svojstva bila poznata. Podaci o nekim probavnim enzimima (npr. pepsinu) zabilježeni su već u tridesetim godinama devetnaestog stoljeća. Primjena enzima u industriji započinje krajem devetnaestog stoljeća, kada je Takamine (1894.) patentirao enzimski postupak: dijestazu iz plijesni, nazvanu Takadijestaza, odnosno amilazu, enzim koji sudjeluje u razgradnji škroba. Enzimi iz životinjskih organa imali su važnu ulogu početkom 20. stoljeća, kada je Röhm (1908.) razvio prvi normalizirani pankreatin, smjesu lipaze, amilaze i proteaze u omjeru 5 : 4 : 3, kao sredstvo za štavljenje u proizvodnji kože, a kasnije uveo upotrebu takvog enzima za formulacije deterdženata. [2]

Primjena enzima procvjetala je nakon Drugog svjetskog rata, s razvojem industrijske mikrobiologije i biokemijskog inženjerstva. Prvi potpuno enzimski industrijski proces razvijen je sredinom 60-ih godina prošlog stoljeća, za pretvaranje škroba u glukozni sirup. Uključivao je hidrolizu škroba bakterijskom  $\alpha$ -amilazom i saharifikaciju gljivičnom glukoamilazom. [2]

Danas se upotrebljavaju kao lijekovi, ulaze u sastav deterdženata, mnogi su potrebni u medicinskoj dijagnostici. Enzimi se također upotrebljavaju u proizvodnji antibiotika te u prehrambenoj i kemijskoj industriji, jer svojom prirodnom selektivnošću usmjeravaju reakcije na način koji se ne može postići klasičnim kemijskim postupcima. Danas se velike količine različitih enzima proizvode pomoću genetski modificiranih mikroorganizama. [1]

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Enzimi

Mnoge kemijske reakcije odvijaju se spontano, dok je za druge potrebna prisutnost katalizatora kako bi se odvijale značajnom brzinom. Katalizatori su molekule koje smanjuju energiju aktivacije reakcije, energetska barijeru koju je potrebno savladati da bi se jedna tvar kemijski pretvorila u drugu. Termodinamički, ta energetska barijera se može izraziti u smislu promjene slobodne energije. Katalizator se tijekom reakcije ne mijenja, no upotreba mu je ograničena zbog limitirane stabilnosti, odnosno vremena u kojem zadržava svoju aktivnu strukturu. [2]

Enzimi su katalizatori u biološkim sustavima. Gotovo svi poznati enzimi su proteini, organizirani u četiri strukturalna nivoa. Primarna struktura je slijed aminokiselina povezanih peptidnom vezom u polipeptidne lance. Sekundarnu strukturu čine savijeni polipeptidni lanci u pravilne strukture poput  $\alpha$ -uzvojnice,  $\beta$ -lista, okreta i petlji. Stabilizirane su vodikovim vezama koje se formiraju između bliskih aminokiselinskih ostataka u polipeptidnom lancu. Daljnjim interakcijama udaljenijih aminokiselinskih ostataka dolazi do stvaranja tercijarne strukture, koja definira funkcionalnu i trodimenzionalnu strukturu polipeptidnog lanca. Prema tercijarnoj strukturi, proteini mogu biti vlaknasti ili globularni. Vlaknaste proteine karakterizira izdužena, nitasta struktura, dok su globularni proteini puno zbijenije strukture i sferičnog oblika. Tercijarna struktura je stabilizirana vodikovim vezama, Van der Waalsovima, elektrostatskim i hidrofobnim interakcijama i disulfidnim mostovima. Zbog hidrofobnih interakcija, kod proteina topljivih u vodi, hidrofobne aminokiseline nalaze se u njenoj unutrašnjosti, kako ne bi bile u kontaktu s vodom, a hidrofilne aminokiseline su na površini proteina. Jedine kovalentne veze koje sudjeluju u stabilizaciji proteina su disulfidni mostovi, nastaju između cisteina, blagom oksidacijom pri čemu se formira veza između atoma sumpora na bočnim ograncima aminokiselina. Proteini koji su građeni od više polipeptidnih lanaca tvore kvartarnu strukturu u kojoj je svaki polipeptidni lanac zasebna podjedinica, povezana s drugim podjedinicama nekovalentnim interakcijama. Proteini mogu imati različit broj i tip podjedinica, na primjer protein s dvije jednake podjedinice naziva se homodimer, a protein s četiri podjedinice, od kojih je barem jedna različita, heterotetramer. Kvartarna struktura odnosi se na prostorni raspored podjedinica i prirodu njihovih interakcija. [3]

### 2.1.1. Podjela enzima

Prema Međunarodnom savezu za biokemiju i molekularnu biologiju (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) enzimi se dijele u šest skupina, prema tipu reakcija koje kataliziraju: [2]

1. **Oksidoreduktaze** - kataliziraju oksidacijsko/redukcijske reakcije koje uključuju prijenos elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma. Postoje dvadeset dvije podskupine, od kojih su za industriju najznačajnije dehidrogenaze koje oksidiraju supstrat prijenosom vodikova atoma na koenzim ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{FAD}^+$ ,  $\text{FMN}$ ) koji djeluje kao akceptor.
2. **Transferaze** - kataliziraju prijenos funkcionalne skupine s donora na akceptor. Postoji devet podskupina, razlikuju se prema kemijskoj prirodi skupine koja se prenosi. Imaju bitnu ulogu u staničnom metabolizmu.
3. **Hidrolaze** - kataliziraju reakciju hidrolize. Postoji dvanaest podskupina. Imaju važnu ulogu u kataboličkim procesima jer opskrbljuju stanicu hranjivim tvarima. Većina enzima iz ove skupine je od tehnološke važnosti.
4. **Liaze** - kataliziraju reakcije nehidrolitičkog i neoksidacijskog cijepanja kemijskih veza. Dije se u sedam podskupina, ovisno o tipu veze: C-C, C-O, C-N, C-S, C-X, P-O itd. Osim što kataliziraju cijepanja gore navedenih veza, liaze se proučavaju za asimetrične sinteze optički aktivnih organskih spojeva.
5. **Izomeraze** - kataliziraju reakcije pretvorbe supstrata u izomer, tvar s jednakim brojem i vrstama atoma. Postoji šest podskupina izomeraza, ovisno o tipu izomera koji nastaje reakcijom. Vrlo malo izomeraza se tehnološki iskorištava.
6. **Ligaze** - kataliziraju reakciju stvaranja kovalentne veze između dvije molekule. Postoji šest podskupina ligaza, ovisno o tipu veze koja nastaje. Unatoč velikoj metaboličkoj važnosti ovih enzima, nema značajne upotrebe u tehnološkom smislu. [2]

### 2.1.2. Prednosti enzima

Najveća prednost enzima je njihova nenadmašna selektivnost; kemoselektivnost, enantioselektivnost i regioselektivnost u odnosu na kemijske katalizatore. Također, bitna karakteristika je aktivnost enzima u blagim uvjetima, pri sobnoj temperaturi i umjerenom pH vodenih otopina. Biokatalizatori su sposobni katalizirati sve širi spektar reakcija, zbog čega raste njihova zastupljenost u industriji. [4]

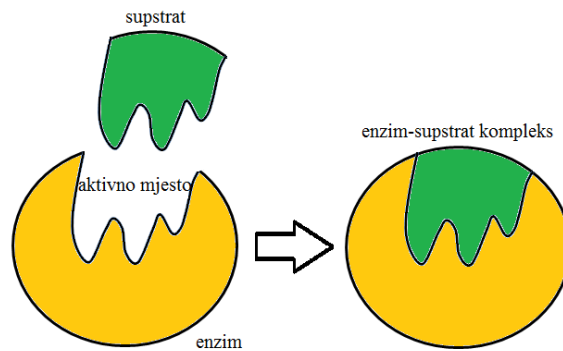
### 2.1.3. Nedostaci enzima

Biokatalizatori često nisu dovoljno stabilni u radnim medijima, deaktiviraju se pri uvjetima različitih temperatura i pH vrijednosti, te pod utjecajem fizičke sile. Istovremeno, postoji premalo biokatalizatora za željene reakcije koji s raspoloživim supstratima mogu dati ciljani produkt. Iako se očekuje efikasan daljnji napredak, i dalje su svojstva velikog broja biokatalizatora nedovoljno proučena u odnosu na kemijske katalizatore. Nadalje, problem je nedostupnost biokatalizatora za komercijalnu prodaju, što usporava razvoj biokatalize u industriji. Ciklusi za razvoj novih i poboljšanje svojstava postojećih biokatalizatora su predugi. Optimiziranje nekih vodećih procesa biokatalize danas, trajalo je između 10 i 20 godina. Jedan od razloga za takve vremenske rokove je još uvijek nepotpuna baza znanja o biotehnologiji i biokatalizi. S poboljšanom bazom znanja kao rezultatom intenzivnih istraživanja, vrijeme razvoja će se zasigurno skratiti. Skraćivanje vremena razvojnog ciklusa za biokatalitičke procese trebalo bi, stoga, biti tema aktivnog istraživanja u budućnosti. [4]

### 2.1.4. Mehanizam djelovanja enzima

Važne prekretnice u racionalizaciji enzimске katalize bili su „ključ-brava“ model (Fischer, 1894.), Paulingov postulat (1944.) i model izazvanog pristajanja (Koshland, 1958.). [4] Djelovanje enzima usko je povezano s njihovom selektivnosti. Mehanizam započinje tvorbom kompleksa enzima sa supstratom. U tom kompleksu enzim je vezan za supstrat Van der Waalsovima i elektrostatskim privlačenjem, vodikovom vezom ili rjeđe, kovalentnom vezom. Kompleksiranje mora biti brzo i reverzibilno, tako da se produkt odvaja od enzima odmah nakon reakcije i oslobađa enzim za daljnje katalitičko djelovanje. Kompleks nastaje na aktivnom mjestu enzima. To je dio enzima koji pobuđuje određenu reakciju. Aktivno mjesto mora imati strukturu komplementarnu strukturi supstrata kako bi bilo pogodno za vezanje i katalizu. Specifičnost odnosa enzim-supstrat opisuje se kao mehanizam „ključ-brava“ enzimске katalize (slika 2.1.). [5]

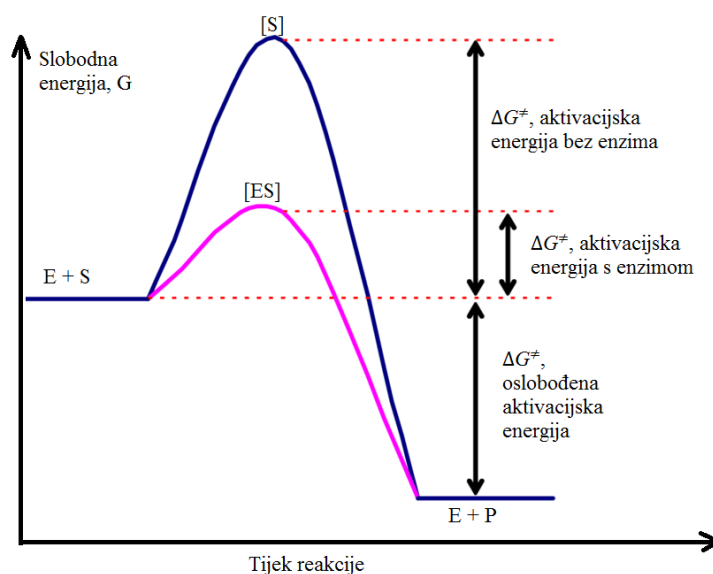
Za razliku od Fishera koji je u svojoj hipotezi „ključ-brava“ pretpostavio da su i ključ (supstrat) i brava (enzim) kruti, Koshland je predložio ideju o modelu izazvanog pristajanja. Prema Koshlandovom modelu, enzim fleksibilno prihvati supstrat u aktivno mjesto i prilagodi mu se formiranjem specifičnih interakcija. [4]



**Slika 2.1.** Mehanizam “ključ-brava” [6]

Prema Haldane-ovim istraživanjima iz 1965., kataliza reakcije događa se samo ako je katalizator u aktivnom centru komplementaran sa supstratom u prijelaznom stanju tijekom reakcije. Daljnjim nadogradnjama ovog koncepta; reakcija se ubrzava ako katalizator stabilizira prijelazno stanje, odnosno kompleks enzim-supstrat. Suprotno tome, stabilizacija osnovnog stanja dovodi do usporavanja reakcije. Ovaj koncept stabilizacije prijelaznog stanja, koji je prvo formulirao Haldane, kasnije je proširio Linus Pauling u vremenu 1946. - 1948.

U enzimskoj reakciji, slobodni enzim E i slobodni supstrat S su u svom osnovnom stanju. Iz osnovnog stanja enzim i supstrat se reverzibilno kombiniraju u kompleks enzim-supstrat [ES], koji zatim prelazi u osnovno stanje slobodnog enzima E i slobodnog produkta P. Značajno je sniženje energije u reakciji s enzimom ( $\Delta G^\ddagger$ , aktivacijska energija s enzimom) u odnosu na reakciju provedenu bez enzima ( $\Delta G^\ddagger$ , aktivacijska energija bez enzima) zbog stabilizacijskog djelovanja enzima. Sniženje energije aktivacije povećava brzinu reakcije. [4]



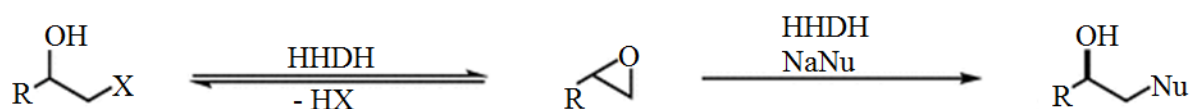
**Slika 2.2.** Djelovanje enzima kao katalizatora [7]

## 2.2. Halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH)

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) su enzimi koji kataliziraju stvaranje i pretvorbu epoksida, kao i obratnu reakciju otvaranja epoksidnog prstena. Nalaze se u bakterijama koje razgrađuju vicinalne haloalkohole ili metaboliziraju halogenirane alkohole kao intermedijere na putu razgradnje drugih halogeniranih spojeva.

U strukturnom smislu to su tetrameri koji na osnovu slijeda aminokiselina i strukturnih sličnosti pripadaju kratkolančkanim dehidrogenazama/reduktazama (short-chain dehydrogenase/reductase, SDR). Analizom slijeda sekvenci identificirano je sedam srodnih, ali različitih skupina HHDH; enzimi klase A, B, C, D, E, F i G. [8]

Iako su HHDH i njihove reverzibilne reakcije dehalogeniranja otkrivene već 1968. godine, sposobnost enzima da katalizira reakciju otvaranja prstena epoksida s različitim nukleofilima demonstrirana je tek 90-ih godina prošlog stoljeća, nakon čega su uslijedile intenzivnije studije. Enzimski katalizirane reakcije otvaranja prstena predstavljaju atraktivnu alternativu reakcijama kataliziranih metalima. Moguće ih je provoditi pri atmosferskom tlaku i sobnoj temperaturi, u pH-neutralnom vodenom mediju. Drugo atraktivno svojstvo je visoka regioselektivnost, enantioselektivnost i diastereoselektivnost zabilježena u reakcijama kataliziranim enzimom HHDH. Međutim, ova velika selektivnost može se također smatrati ograničenjem, jer obično dopušta pristup samo jednom stereoizomeru željenog produkta. HHDH mogu prihvatiti niz neprirodnih anionskih nukleofila, uključujući azid, cijanid, nitrit, cijanat, tiocijanat i formijat. [8] HHDH kataliziraju dehalogenaciju halohidrina do epoksida (lijevo) i otvaranje prstena epoksida s različitim nukleofilima do  $\beta$ -supstituiranih alkohola (desno) (slika 2.3.). [9]



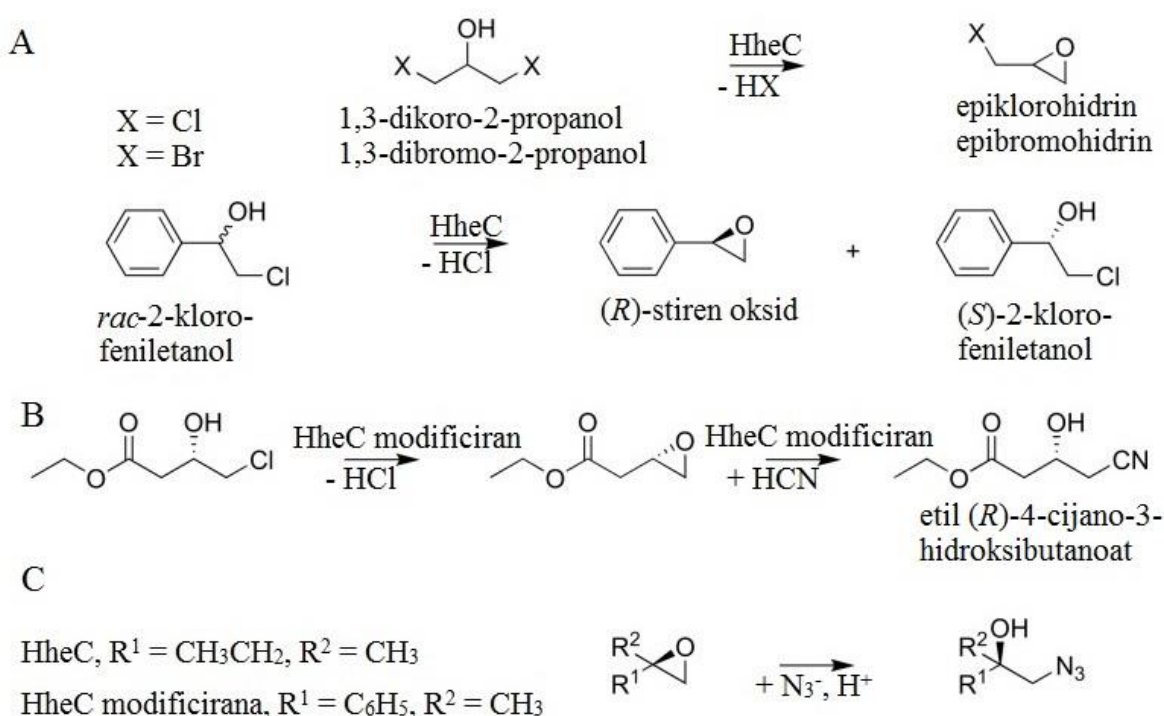
X = Cl, Br, I; Nu = N<sub>3</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, OCN, SCN, HCO<sub>2</sub>

**Slika 2.3.** Reakcija otvaranja i zatvaranja prstena katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom [8]

Reakcije otvaranja epoksida su vrlo korisne i predstavljaju izvrsnu metodu pripreve enantiomerno čistih 1,2-azidoalkohola; 1,2-cijanoalkohola; 1,2-nitroalkohola te 2-oksazolidinonona. Dostupnost ovakvih produkata putem enzimske katalize od velikog je

značaja za kemijsku i farmaceutsku industriju. Ciljana sinteza aktivnog enantiomera može poboljšati ekonomičnost industrijskih procesa jer se koristi manja količina skupih polaznih materijala, a s druge strane se smanjuje količina otpadnih produkata kemijske sinteze. [10]

Osim što se koriste za proizvodnju enantio-čistih haloalkohola i epoksida, HHDH se mogu primijeniti i u formiranju novih kemijskih veza (C-C, C-N, C-O). Bitna primjena HHDH enzima je u proizvodnji optički čistih C<sub>3</sub> ili C<sub>4</sub> prekursora, na primjer, (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutanoata za sintezu statina. Također, koriste se za proizvodnju kiralnih tercijarnih alkohola, za koje je konvencionalna organska sinteza prilično zahtjevna. Primjeri navedenih reakcija prikazani su na slici 2.4. [11]



**Slika 2.4.** Primjeri reakcija kataliziranih HHDH enzimima; reakcije sinteze optički čistih haloalkohola i epoksida (A), sinteza prekursora statina (B) i sinteza tercijarnih alkohola (C) [11]

Etil (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutanoat važan je intermedijer za sintezu atorvastatina (Lipitor). [12] Atorvastatin pripada skupini statina, lijekova koji se koriste za snižavanje LDL kolesterola u krvi, te za prevenciju kardiovaskularnih bolesti (hipolipidemijski). [13] To je heterogena skupina lijekova koji se razlikuju po načinu na koji su dobiveni, strukturno-fizikalno-kemijskim svojstvima i djelovanju. [14] Statini reverzibilno inhibiraju djelovanje 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktaze, enzima koji određuje brzinu

metaboličkog puta biosinteze kolesterola. [15] Kompetitivnim inhibiranjem HMG-CoA-reduktaze, statini u jetri ometaju stvaranje kolesterola, čime se smanjuje koncentracija ukupnog i LDL kolesterola. [16] Lovastatin je prvi statin koji je dobio odobrenje za primjenu kod ljudi. [14] Uz lovastatin, statini dobiveni prirodnim postupkom, kao produkti gljiva su simvastatin i pravastatin, dok su atorvastatin, fluvastatin i rosuvastatin dobiveni sintetskim putem. [17]

Iako do sada poznate HHDH već imaju mnoge zanimljive primjene, od velikog je interesa povećati broj funkcionalno raznolikih HHDH enzima. Zbog toga se ulažu naponi u razvoju raznih metoda za poboljšanje funkcionalne raznolikosti enzima, a neke od njih se već uspješno primjenjuju na HheA2 i HheC. Takvim pristupom rješavaju se specifični nedostaci roditeljskih enzima i sintetiziraju novi, poboljšani HHDH enzimi. Međutim, novonastale modificirane enzimske inačice još su prilično slične roditeljskom enzimu, na primjer, HheC-2360 pokazuje više od 85% identičnosti sekvenci aminokiselina. [11]

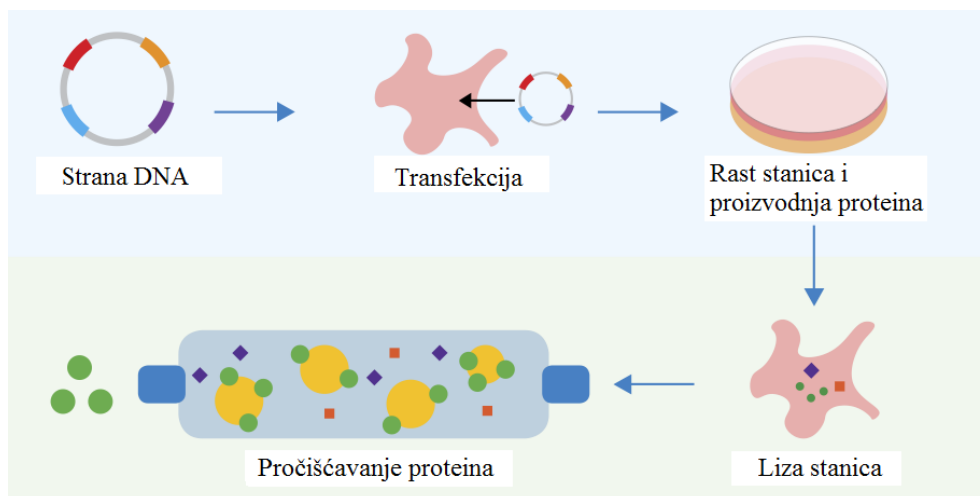
### **2.3. Rekombinantna DNA i prekomjerna ekspresija proteina**

Tehnologija rekombinantne DNA predstavlja niz molekularno-genetičkih metoda uz pomoć kojih je moguće mijenjati nasljednu tvar stanice. Razdoblje rekombinantne DNA tehnologije započelo je otkrićem restrikcijskih enzima, 70-ih godina prošloga stoljeća. [18] Ovom tehnologijom može se identificirati gen ili više gena, izrezati i umetnuti u genom drugog organizma. Na ovaj način proizvedeni su mnogi lijekovi, kao na primjer ljudski inzulin. Bio je to prvi lijek na svijetu dobiven uz pomoć rekombinantne DNA tehnologije. [19]

Tehnologija koristi enzime (restrikcijske enzime, polimeraze i ligaze), vektore koji nose željene gene i stanicu domaćina. Najčešće se kao vektori koriste plazmidi i bakteriofagi, dok su stanice domaćina uglavnom bakterije, gljivice ili životinjske stanice. [20] Postupak se sastoji od izolacije strane DNA te izrezivanja željenog fragmenta (gena) pomoću restrikcijskih enzima i njihove ugradnje u vektorsku DNA uz pomoć ligaze. Vektor se ubacuje u stanicu domaćina, gdje se umnaža stvarajući kopije strane DNA čiji se geni zatim se prepisuju i prevode u željeni polipeptidni produkt. [18] Za razliku od DNA koja se može relativno lako sintetizirati, proces sinteze proteina je nešto složeniji. Postoji nekoliko vrsta ekspresijskih sustava koji se koriste za proizvodnju i pročišćavanje proteina. Ekspresije mogu biti iz stanica sisavaca, insekata, bakterija, biljaka, kvasca ili *in vitro*, odnosno bez upotrebe žive stanice. Općenito, postupak se



sastoji od ubacivanja plazmida u stanicu, razmnožavanja stanica i uzgoja proteina, razaranja stanice domaćina i na kraju ekstrakcije i pročišćavanja proteina, prikazan je na slici 2.5.



**Slika 2.5.** Postupak izolacije i pročišćavanja proteina [21]

Odabir postupka ekspresije ovisi o vrsti i količini proteina koji se ekstrahira, te njegovoj daljnjoj upotrebi. Životinjske stanice idealan su sustav za ekspresiju proteina koji se planiraju višestruko modificirati nakon ekstrakcije. Nedostatak metode je što su životinjske stanice puno zahtjevnije s obzirom na uvjete uzgoja u odnosu na druge tipove stanica. Sustavi za ekspresiju iz stanica insekata su korisni jer omogućuju veliku ekspresiju složenih proteina, koji se ne mogu proizvesti u *E. coli* ili stanicama kvasca. Kada je potrebno proizvesti veliku količinu proteina, na brz, jednostavan i ekonomski prihvatljiv način, gotovo uvijek se odabire ekspresija iz stanica bakterija. Najčešće se koriste stanice *E. coli*, kao što je korišteno i u ovom radu. Postoji nekoliko DNA vektora koji se mogu koristiti u bakterijskim stanicama, na primjer, pET, pRSET, Gateway pDEST i pBAD. Unatoč njihovoj jednostavnoj upotrebi, važno je napomenuti da bakterije obično ne mogu proizvesti funkcionalne multi-domenske proteine (kao one sintetizirane u životinjskim stanicama) jer nisu razvijene za dodavanje odgovarajućih post-translacijskih modifikacija. Uz to, mnogi proteini sintetizirani iz stanica bakterija postaju netopljivi, tvoreći inkluzijske jedinice koje je teško pročititi bez djelovanja agresivnih reagensa. Biljne stanice služe za masovnu ekspresiju rekombinantnih proteina. Koriste se mnoge biljne vrste, poput kukuruza, duhana, riže, šećerne trske, pa čak i gomolja krumpira. Iako je ova metoda skupa i dugotrajna, koristi se za ekspresiju raznih proteina, antitijela i farmaceutika, naročito interleukina koji imaju ključnu ulogu u imunološkom sustavu. Kvasac je sjajan ekspresijski sustav koji stvara velike količine rekombinantnih eukariotskih proteina. Iako se mnoge vrste kvasaca mogu koristiti za ekspresiju proteina, pivski kvasac,

*Saccharomyces cerevisiae*, je najčešće korištena vrsta. Sustavi za ekspresiju iz kvasca su jeftiniji i lakši za rad od stanica sisavaca i često su sposobni za post-translacijske modifikacije složenih proteina, za razliku od bakterijskih sustava. Međutim, stanice kvasca se sporije množe od bakterijskih i često je potrebno optimizirati uvjete rasta. U ekspresijskim sustavima bez stanica, proteini se sintetiziraju *in vitro*, pomoću ribosoma, RNA polimeraza, tRNA, ribonukleotida i aminokiselina. Ekspresijski sustavi bez stanica idealni su za brzu sintezu više proteina u jednoj reakciji. Glavna prednost ovog sustava je njihova sposobnost sinteze proteina s obilježenim ili modificiranim aminokiselinama, no ovakvi sustavi su vrlo skupi i tehnički zahtjevni za upotrebu. [21]

## 2.4. Hranjive podloge

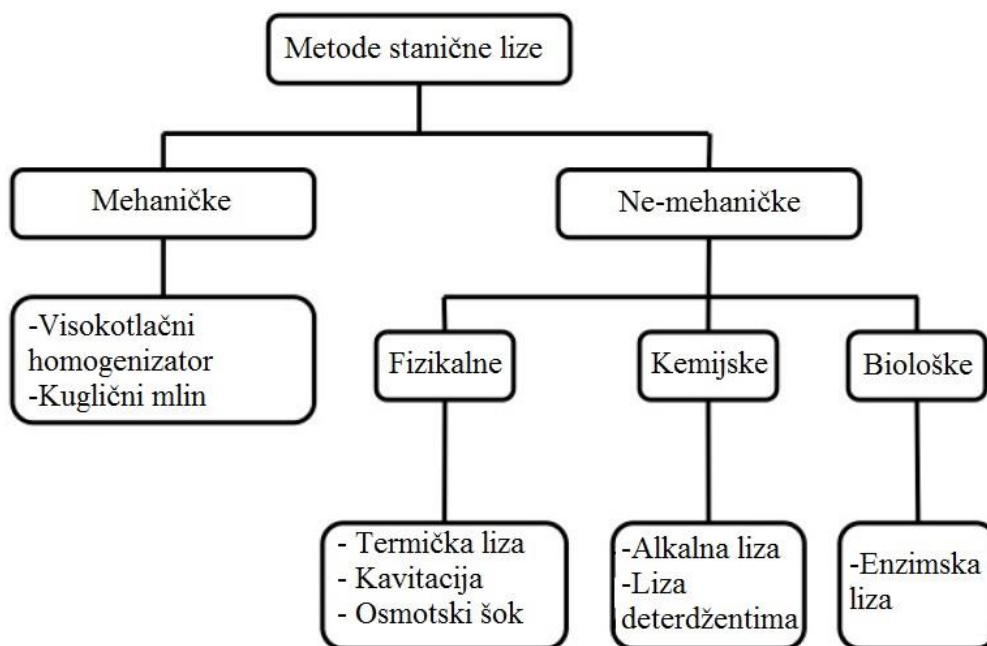
Hranjiva podloga je prirodni ili umjetni medij za uzgoj organizama ili njihovih dijelova (tkiva, stanica), u kojem rastu trošeći tvari potrebne za sintezu staničnih sastojaka i za proizvodnju energije. Koristi se od devetnaestog stoljeća. [22] Podloga je namijenjena stvaranju uvjeta sličnih prirodnom okruženju u kojem se mikroorganizmi inače hrane, rastu i razmnožavaju. Uzgoj je kompleksan zbog specifičnih prehrambenih i okolišnih potreba mikroorganizama i zbog raznolikosti tih potreba između različitih vrsta. [23]

Hranjive podloge se najčešće dijele prema fizikalnom stanju u kojem se nalaze, na krute (agar), polukrute i tekuće (bujon). [24] Razlikuju se po udjelu agara u svojem sastavu. Agar je prah koji se dobiva ekstrakcijom i sušenjem sluzaste tvari, dobivene preradom morske trave iz roda *Gelidium*. [25] Tekuća hranjiva podloga ili bujon, ne sadrži agar i koristi se za obilni rast mikroorganizama. Polutvrda hranjiva podloga sadrži 0,1 - 0,5% agara, a koristi se za ispitivanje pokretljivosti mikroorganizama. Čvrsta hranjiva podloga, odnosno agar sadrži 2% agara, koristi se za izolaciju čistih bakterijskih kultura i proučavanje miješanih kultura. [24] Uz osnovnu podjelu na krute, polukrute i tekuće, podloge se mogu podijeliti u kategorije kao što su podloge za rast (za uzgoj većine heterotrofnih mikroorganizama), transportne podloge (za očuvanje mikroorganizama), podloge za obogaćivanje (specijaliziran medij za povećanje broja željenih mikroorganizama) i selektivne podloge za rast. Odabir hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama ovisi o brojnim čimbenicima, kao što su prisutnost kisika ili drugih plinova, hranjive tvari, količina vlage, temperatura i pH. [26]

Hranjive podloge sadrže razne hranjive tvari, čimbenike koji potiču rast mikroorganizma, puferske soli, minerale, metale, agense za geliranje (za krute medije) i temperaturu potrebnu za uspješan uzgoj željenog mikroorganizma. [26] Esencijalni makronutrijenti koji su potrebni za rast stanica su ugljik, vodik, kisik, dušik, fosfor i sumpor. Suha tvar stanica većinom je građena od organskih molekula (čiji su osnovni elementi ugljik i vodik, te često kisik), stoga su za uzgoj stanica potrebni isti ti gradivni elementi. Dušik je potreban za sintezu proteina, nukleinskih kiselina i još nekih staničnih komponenti. Fosfor ima bitnu ulogu u sintezi nukleinskih kiselina, fosfolipida i adenozin trifosfata. Sumpor sudjeluje u izgradnji aminokiselina i vitamina. U nešto manjoj količini potrebni su sporedni makronutrijenti koji su prisutni u koncentracijama reda veličine  $\text{mg L}^{-1}$ , to su najčešće kationi.  $\text{Fe}^{2+}$  sudjeluje u sistemu transporta elektrona i zajedno s  $\text{K}^{+}$  koristi se za pravilno funkcioniranje enzima, te  $\text{Mg}^{2+}$  koji služi za stabilizaciju ribosoma i membrana. Također prisutni, mikronutrijenti su metali u tragovima, poput kobalta, bakra, mangana i cinka. Uz sve navedeno bitna je prisutnost vode i vitamina. Neki mikrobi mogu sami sintetizirati određene organske molekule koje su im potrebne, iz izvora ugljika i anorganskih soli. Ostalima je za rast neophodno da su ti spojevi prethodno sintetizirani. Te organske molekule neophodne za rast nazivaju se faktorima rasta i dijele se u tri glavne kategorije: aminokiseline, dušične baze (purini i pirimidini) i vitamini (enzimski kofaktori). [23]

## 2.5. Liza stanica

Stanična liza je metoda u kojoj se stanična membrana dezintegrira s ciljem dobivanja željenih komponenti iz stanica mikroorganizama. Koristi se u molekularnoj dijagnostici patogena, imunološkim ispitivanjima, pročišćavanju proteina u svrhu proučavanja njihove strukture i funkcije, dijagnostici karcinoma, određivanju transkripta mRNA, te analizama sastava specifičnih proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Stanična liza može biti djelomična ili potpuna. Djelomična liza se koristi u *patch-clamping* tehnikama, a potpuna razgradnja membrane za izolaciju i analizu DNA, RNA, proteina ili staničnih organela. Na temelju mehanizma dezintegracije metode se dijele na mehaničku i ne-mehaničku lizu koja može biti fizikalna, kemijska ili biološka, kao što je prikazano na slici 1.6. [27]



**Slika 2.6.** Metode lize stanica [27]

Kod mehaničke lize stanična membrana se fizički razgrađuje upotrebom sile smicanja. Najčešće se koriste metoda visokotlačnog homogenizatora i metoda s kugličnim mlinom. U metodi s visokotlačnim homogenizatorom, stanice se poguraju kroz otvor spremnika pomoću visokotlačne pumpe. Do disrupcije membrane dolazi zbog velike sile smicanja, kad se stanica izloži kompresiji. Ovisno o tipu stanica, potreban je tlak od 15 do 150 MPa. Uređaj daje bolje rezultate u kombinaciji s drugim metodama, na primjer uz primjenu kemijske lize. Kuglični mlin široko je korištena metoda laboratorijske mehaničke lize stanica. Stanice se uništavaju miješanjem sitnih kuglica od stakla, čelika ili keramike pri velikim brzinama. Kuglice se sudaraju sa stanicama, razarajući staničnu membranu. Pomoću ove tehnike može se lizirati nekoliko vrsta stanica, na primjer kvasci i bakterije. Stanična membrana može se u potpunosti razoriti ovom metodom, uz visoku učinkovitost. Međutim, raspadom membrane nastaju sitne stanične krhotine koje otežavaju razdvajanje i pročišćavanje uzorka. Također, dolazi do oslobađanja velike količine toplinske energije zbog sudara između kuglica i stanica, koja može razgraditi proteine i nukleinske kiseline. Uz prethodno navedene, postoje i druge mehaničke metode, poput rotor/stator homogenizatora, krutog tlačnog pritiska, mlaznog udarca i koloidnih mlinova. Općenito, mehaničke metode su vrlo učinkovite za liziranje širokog spektra stanica. Međutim, problemi poput zagrijavanja uzorka, propadanja staničnih proizvoda, staničnih ostataka koji otežavaju daljnju izolaciju produkta i većih troškova, ograničavaju upotrebu ove metode. [27]

Ne-mehaničke metode stanične lize mogu se podijeliti u tri glavne skupine, fizikalnu, kemijsku i biološku lizu. Fizikalna liza može biti termička liza, ultrazvučna ili hidrodinamička kavitacija i metoda osmotskog šoka. Kod termičke lize, visoka temperatura razara membranu denaturiranjem membranskih proteina i rezultira oslobađanjem staničnih organela. Metoda je korisna na mikro skali, koristi se u mnogim mikrofluidnim uređajima. Međutim, skupa je, zbog čega se ne koristi u industriji, a duže zagrijavanje stanica može oštetiti željeni stanični materijal. Kavitacija je tehnika koja se koristi za stvaranje i naknadnu rupturu nastalih šupljina ili mjehurića. Za stvaranje kavitacije koriste se ultrazvučne i hidrodinamičke metode. Kod ultrazvučne kavitacije koriste se ultrazvučne vibracije (15–20 kHz) koje mogu biti kontinuirane ili u obliku pulsa, a dužina izlaganja vibracijama ovisi o vrsti, veličini i koncentraciji stanica. Vibracije visoke frekvencije uzrokuju formiranje mjehurića unutar kapljevitoz medija u kojemu se nalaze suspendirane stanice. Dolazi do pucanja mjehurića i oslobađanja mehaničke energije u obliku udarnih valova koji razaraju staničnu membranu. Nedostatak metode je oslobađanje velike količine topline koja može oštetiti enzime koji se oslobode iz stanica. Kako bi se prevladali problemi koji se javljaju kod ultrazvučne kavitacije, uvedena je hidrodinamička kavitacija, koja nastaje pumpanjem suspenzije stanica kroz suženi kanal što dovodi do povećanja protoka. Iako metoda zahtjeva puno manji utrošak energije od ultrazvučne lize, upotreba joj je ograničena zbog skupe tehnologije i zahtjevnog pročišćavanja uzorka od ostatka staničnih stijenki, međutim pokazala se učinkovitom za ekstrakciju lipida. Metoda osmotskog šoka temelji se na procesu osmoze. Osmoza je difuzija vode kroz polupropusnu membranu iz otopine niže koncentracije u otopinu više koncentracije, dok ne dođe do uspostave ravnoteže. Ako je koncentracija soli izvan stanice niža, voda će ulaziti u stanicu što uzrokuje bubrenje i pucanje stanice, odnosno razaranje stanične membrane. Metoda nije djelotvorna za gram-negativne bakterije, kod kojih dolazi jedino do oslobađanja periplazmatskih proteina. [27]

U kemijskim postupcima koriste se puferi za lizu stanica, a razaranje stanične stijenke je posljedica promjene pH. Također, u puferu se mogu dodati deterdženti koji pomažu pri otapanju stanične membrane, što dovodi do njenog pucanja. Kemijska liza se može klasificirati kao alkalna liza i liza deterdžentima. U alkalnoj lizi, pufer za lizu se sastoji od natrijevog hidroksida i natrijevog dodecil sulfata. Hidroksidni ioni čine staničnu membranu propusnom i istovremeno s njom reagiraju, što dovodi do pucanja esterskih veza u trigliceridima, a natrijev dodecil sulfat otapa proteine i membranu. Za lizu stanica poželjan je pH od 11,5 do 12,5. Iako je metoda pogodna za sve vrste stanica, postupak je vrlo spor, zbog čega se uglavnom koristi samo za izoliranje plazmida iz stanica bakterija. Deterdženti su površinski aktivne tvari, imaju

sposobnost narušavanja hidrofobno-hidrofilnih interakcija poput lipid-lipid, lipid-protein i protein-protein interakcija zbog čega se koriste za lizu staničnih membrana. S obzirom na naboj, dijele se na kationske, anionske i neionske deterdžente, a najčešće se koriste za lizu stanica sisavaca. Ako se u procesu stanične lize koriste deterdženti, potreban je dodatni korak pročišćavanja produkta. [27]

Enzimska liza je biološka liza stanica u kojoj se koriste brojni enzimi, poput lizozima, lizostafina, zimolijaze, celulaze, proteaze ili glukanaze. Prednosti ove metode su velika specifičnost enzima i njihova dostupnost na tržištu. Na primjer, lizozim se koristi za lizu bakterijskih stanica, reagira s peptidoglikanskim slojem i razara glikozidnu vezu. Iz tog razloga, gram-pozitivne bakterije mogu biti izravno izložene lizozimu, međutim, kod gram-negativnih bakterija potrebno je prethodno djelovati deterdžentima kako bi se uklonila vanjska membrana bakterijskih stanica. [27]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Aparatura

##### 3.1.1. Autoklav

Pripremljene krute i tekuće podloge sterilizirane su vlažnom sterilizacijom pri temperaturi 121 °C i tlaku 1 bar u autoklavu tijekom 20 minuta (slika 3.1.).



Slika 3.1. Autoklav

##### 3.1.2. Termostat

Petrijeve zdjelice s naciepljenim kulturama *E. coli* na krutoj hranjivoj podlozi termostatirane su u termostatu WiseCube Fuzzy Control System (Wisd Laboratory Instruments, Njemačka), na 37°C tijekom 24 sata (slika 3.2.).



Slika 3.2. Termostat

### 3.1.3. Tresilica

Prekonoćne kulture *E. coli* stavljene su na inkubaciju u termostatoranu tresilicu PSE-T150A (BioLAB Scientific, SAD) preko noći pri odgovarajućim uvjetima temperature i broja okretaja (slika 3.3.).



**Slika 3.3.** Tresilica

### 3.1.4. Centrifuga

Centrifugiranje uzoraka provedeno je na centrifugi Universal 320/320R (Hettich, Njemačka) (slika 3.4.).



**Slika 3.4.** Centrifuga

### 3.1.5. Aparatura za sonifikaciju

Ultrazvukom su razbijanje stanične stijenke *E. coli* pomoću ultrazvučnog homogenizatora SONOPULS mini20 (Bandelin, Njemačka). Postupak je trajao 3 minute. Aparatura se sastoji od tri osnovne komponente: generatora GM visoke frekvencije (HF),



ultrazvučnog pretvarača UW, funkcionalnog vrha, sonde MS73 (Bandelin, Njemačka) i čaše za sonifikaciju (slika 3.5.).



**Slika 3.5.** Aparatura za sonifikaciju

### 3.1.6. Analitička vaga

Sve kemikalije i uzorci korišteni u radu vagani su na analitičkoj vagi AUW120 (Shimadzu, Japan) (slika 3.6.).



**Slika 3.6.** Analitička vaga

### 3.1.7. Homogenizator

Prije provođenja analiza, uzorci su homogenizirani na homogenizatoru Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija) (slika 3.7.).



Slika 3.7. Homogenizator

### 3.1.8. pH metar

Za podešavanje pH i pripremu pufera korišten je pH-metar Lab 860 (Schott Instruments, Njemačka) (slika 3.8.).

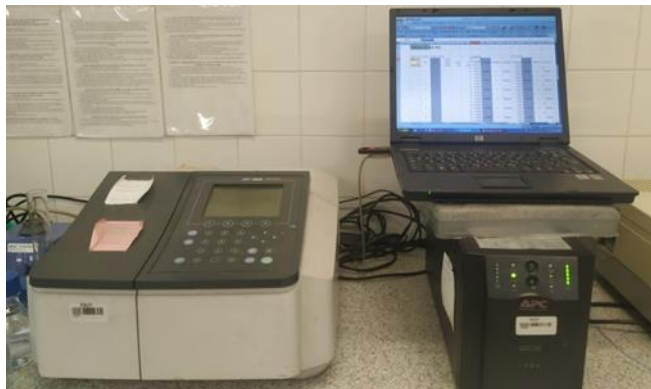


Slika 3.8. pH metar

### 3.1.9. Spektrofotometar

U radu su korištena dva spektrofotometra. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu provedeno je na UV-1601 spektrofotometru (Shimadzu, Japan) (slika 3.9.).

Određivanje aktivnosti enzima HDHH provedeno je na UV-1800 spektrofotometru (Shimadzu, Japan) (slika 3.10.).



**Slika 3.9.** UV-Vis spektrofotometar UV-1601



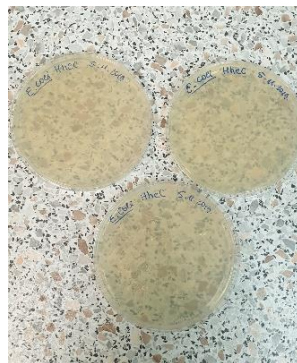
**Slika 3.10.** UV-Vis spektrofotometar UV-1800

## **3.2. Uzgoj bakterija i izolacija enzima**

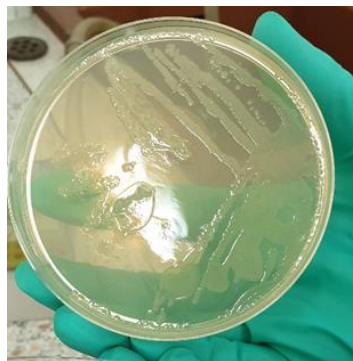
### **3.2.1. Uzgoj bakterijskih stanica *E. coli* s prekomjernom ekspresijom enzima HheC**

Pripremljena je tekuća i kruta hranjiva podloga za uzgoj *E. coli*. Pripremljeno je 1600 mL tekuće hranjive podloge LB-Medium (Luria/Miller) (ROTH, Njemačka) masene koncentracije 25 g/L otopljene u ultračistoj vodi. Uzeto je 150 mL pripremljene otopine u koju je dodan agar, tako da masena koncentracija agara bude 15 g/L te je pripremljena otopina krute hranjive podloge. Obje otopine sterilizirane su vlažnom sterilizacijom u autoklavu tijekom 20 minuta pri uvjetima  $T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $p = 1\text{ bar}$ . Korištena je indikator traka za sterilizaciju koja je promijenila boju iz žute u sivu što je znak da je postupak sterilizacije uspješno proveden. U

obje hranjive podloge bilo je potrebno dodati ampicilin natrijevu sol (čistoću  $\geq 91\%$ ) (Roth, Njemačka). Budući da genetski modificirane bakterijske stanice *E. coli* sadrže gen za rezistentnost na ampicilin, dodatkom ovog antibiotika sprječava se rast neželjenih bakterijskih kultura. Pripremljeno je 5 mL otopine ampicilina masene koncentracije 100 mg/L. Otopina je pripremljena u sterilnim uvjetima uz plamenik i alkoholom dezinficiranu radnu površinu. Filtrirana je sterilnim filterom Minisart Syringe Filter (Sartorius, Njemačka) u sterilnu Falcon epruvetu. Ovako pripremljena otopina čuva se u hladnjaku pri +4 °C. Otopina krute hranjive podloge izlivena je u Petrijeve zdjelice te ostavljena prvo na sobnoj temperaturi, a potom u hladnjaku do sutradan, da se stvrdne. Na krute hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama mikrobiološkom ušicom su sutradan naciepljene stanice *E. coli* MC1061 pBAD-HHEC(1) 30.05.2019. koje su čuvane pri -70°C. Dezinficirana je površina uz plamenik i ušica je sterilizirana u plamenu. Petrijeve zdjelice (slika 3.11.) stavljene su poklopcem prema dolje u termostat WiseCube Fuzzy Control System (Wisd Laboratory Instruments, Njemačka) pri 37°C, pogodnoj temperaturi da se bakterije namnože tijekom 24 sata (slika 3.12.).



**Slika 3.11.** Naciepljene stanice *E. coli* na krutu hranjivu podlogu



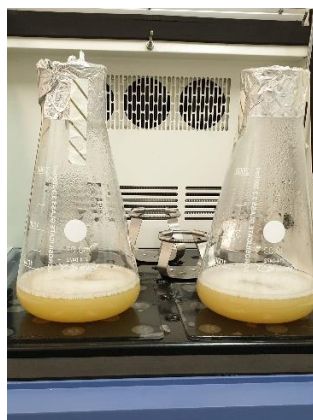
**Slika 3.12.** Izrasle stanice *E. coli* na hranjivoj podlozi nakon termostataranja

### 3.2.2. Priprema male i velike prekonoćne kulture

Za pripremu male prekonoćne kulture, u Erlenmeyer tikvicu od 200 mL stavljeno je 20 mL tekuće LB podloge, 20  $\mu$ L ampicilina i 5 kolonija bakterijskih kultura *E. coli*, uzgojenih prethodni dan na krutoj hranjivoj podlozi. Pripremljene prekonoćne kulture inkubirane su na tresilici PSE-T150A (BioLAB Scientific, SAD) pri 37 °C i 250 rpm preko noći. Za pripremu velike prekonoćne kulture, u Erlenmeyer tikvicu od 2 L stavljeno je 500 mL tekuće LB podloge, 500  $\mu$ L ampicilina, 500  $\mu$ L arabinoze koncentracije 200 mg/mL i 5 mL prethodno pripremljene male prekonoćne kulture. Otopina arabinoze prethodno je pripremljena i profitritana sterilnim filterom Minisart Syringe Filter (Sartorius, Njemačka) u sterilnu Falcon epruvetu. Pripremljene velike prekonoćne kulture inkubirane su na istoj tresilici pri 30 °C i 200 rpm preko noći (slika 3.13.). Otopina je nakon inkubacije 24 sata postala vidno zamućenija, što je znak da su narasle bakterijske stanice (slika 3.14.).



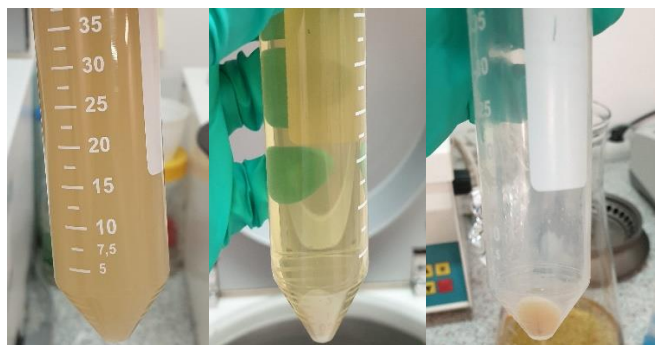
**Slika 3.13.** Velika prekonoćna kultura



**Slika 3.14.** Velika prekonoćna kultura nakon inkubacije 24 sata

### 3.2.3. Centrifugiranje

Velika prekonoćna kultura raspoređena je u Falcon epruvete od 50 mL i centrifugirana pri temperaturi od 4°C i 5000 rpm na 15 minuta. Stanice *E. coli* (talog) odvojene su od tekuće hranjive podloge (nadtalog). Dekantiranjem je uklonjen nadtalog (slika 3.15.). Bakterijske stanice su spremljene u hladnjak pri -70°C.



**Slika 3.15.** (1) Velika prekonoćna kultura prije centrifugiranja, (2) velika prekonoćna kultura nakon centrifugiranja, (3) bakterijske stanice (talog) nakon dekantiranja hranjive podloge

### 3.2.4. Izolacija enzima

Postupak izolacije enzima započinje resuspendiranjem taloga bakterijskih stanica *E. coli* u TEMG puferu. Pufer je dobio naziv prema početnim slovima tvari od kojih se sastoji, 10 mM Tris-SO<sub>4</sub> pH 7,5, 1 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), 1 mM β-merkaptotetanol i 5 mL glicerola (10% ukupnog volumena pufera). Izvađene su Falcon epruvete iz zamrzivača i talozi su otopljeni na ledu. Bakterijske stanice resuspendirane su dodatkom 2 mL pufera u svaku Falcon epruvetu. Resuspendiranje je provedeno pomoću homogenizatora Vortex-Genie (Scientific industries, Inc., SAD). Otopljeni talozi preneseni su u čašu za sonificiranje. Dodano je 2x400 µL inhibitora za proteaze cOmplete Tablets EDTA-free, EASYpack (Roche, Švicarska), koji zaustavlja proteaze oslobođene tijekom razbijanja stanične stijenke da razgrade proteine. Prvi korak u izolaciji enzima je razbijanje stanične stijenke *E. coli* sonificiranjem s ultrazvučnim homogenizatorom SONOPULS mini20 (Bandelin, Njemačka). Proces je trajao ukupno 3 minute s ritmom od 10 sekundi sonifikacije i 10 sekundi pauze. Čaša za sonifikaciju je cijelo vrijeme hladena ledom kako ne bi došlo do pregrijavanja smjese. Iz čaše za sonificiranje po 2 mL suspenzije prebačeno je u Eppendorf epruvete od 2 mL i centrifugirano je pri 11000 rpm 40 minuta. Kao talog zaostaju stanične stijenke bakterija i drugi stanični sadržaji. Nadtalog je bio sirovi enzimski ekstrakt koji je

prebačen u Eppendorf epruvete od 2 mL s nazivom enzima i datumom, te spremljen u hladnjak na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Ukupno je izolirano 40 mL sirovog enzimskog ekstrakta.

### 3.3. Analitičke metode

#### 3.3.1. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

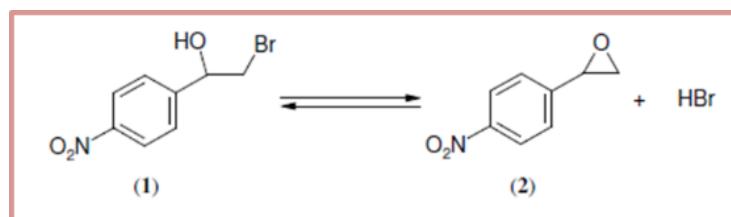
U radu je određena koncentracija proteina u uzorcima enzima kako bi se utvrdila uspješnost dobivanja i izolacije željenog enzima. Osim određivanja koncentracije uzorka izoliranog enzima, određene su koncentracije drugih HHDH u laboratoriju i uspoređeni su rezultati. Korištena je spektrofotometrijska metoda po Bradfordu. Prije određivanja koncentracije proteina u uzorku enzima potrebno je konstruirati baždarni pravac, prikazan u prilogu 8.3. na slici 8.1. Mjerene su apsorbancije standardne otopine albumina iz goveđeg seruma (*Bovine Serum Albumin*, BSA) pri različitim koncentracijama na apsorpcijskom maksimumu pri valnoj duljini  $\lambda = 595 \text{ nm}$ . Koncentracije BSA iznosile su  $1 \mu\text{g/mL}$ ;  $2,5 \mu\text{g/mL}$ ;  $5 \mu\text{g/mL}$  i  $7 \mu\text{g/mL}$ . Provedena su tri mjerenja za svaku koncentraciju, a u izračunu je korištena srednja vrijednost apsorbancije. Najprije je snimljena  $\text{Abs}_0$  kako bi se provjerila ispravnost kiveteta. Za snimanje apsorbancija BSA, u kivetama su pripravljene otopine od 0,8 mL BSA zadanih koncentracija i 0,2 mL reagensa. Korišten je Bradford reagens koji je prethodno pripremljen miješanjem 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 reagensa proizvođača Fluka s  $50 \text{ cm}^3$  etanola,  $100 \text{ cm}^3 \text{ H}_3\text{PO}_4$  (85 %-tna) i  $850 \text{ cm}^3$  redestilirane vode. [28] Iz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA dobivena je jednadžba pravca koja služi za preračunavanje izmjerenih apsorbancija uzoraka enzima u koncentracije. Mjerenja apsorbancija uzoraka enzima provode se analogno mjerenjima za konstruiranje baždarnog pravca; osim što se umjesto BSA zadane koncentracije u kiveti pripremila otopina sastava 0,8 mL uzorka enzima, razrijeđenja 1:2000 i 0,2 mL reagensa. Otopina je vorteksirana 5 sekundi i inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi prije snimanja apsorbancije.



**Slika 3.16.** Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

### 3.3.2. Mjerenje aktivnosti enzima HHDH – spektrofotometrijskim PNSHH testom

Uz određivanje koncentracije proteina, provedeno je mjerenje aktivnosti enzima, spektrofotometrijskim PNSHH testom. Analiza se temelji na razlici apsorbancije pri valnoj duljini  $\lambda = 310$  nm između halohidrina 1-(*p*-nitrofenil)-2-brometanola (PNSHH) i epoksida *p*-nitrostiren oksida (PNSO) (slika 3.17.).



**Slika 3.17.** Reakcija dehalogenacije PNSHH u PNSO katalizirana enzimom HHDH

Najprije je pripremljena 100 mM temeljna otopina PNSHH u dimetilsulfoksidu (DMSO). U kvarcne kivete je stavljeno 2  $\mu$ L otopine PNSHH u DMSO, 998  $\mu$ L Tris-SO<sub>4</sub> pH 7,5 pufera i 1 ili 2  $\mu$ L sirovog enzimskog ekstrakta (ovisno o koncentraciji proteina u uzorku). Snimana je promjena apsorbancije s vremenom,  $dA/dt$  ( $\text{min}^{-1}$ ) za izolirani enzim i ostale HHDH enzime u laboratoriju kako bi se usporedile aktivnosti.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je izolacija i pročišćavanje HHDH iz stanica genetski modificirane *E. coli*. Najprije je uzgojena biomasa s visokim udjelom HHDH. Nakon razbijanja bakterijskih stanica ultrazvukom, enzim je pročišćen. Određena je koncentracija proteina metodom po Bradfordu i aktivnost enzima spektrofotometrijskim PNSHH testom kako bi se utvrdila uspješnost izolacijskog postupka enzima.

### 4.1. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Prije mjerenja koncentracije proteina, konstruiran je baždarni pravac, prikazan u prilogu 8.3, na slici 8.1. Apsorbancija za svaki enzim mjerena je tri puta i izračunata je njena srednja vrijednost. Iz jednadžbe baždarnog pravca, ovisnosti apsorbancije o poznatim masenim koncentracijama BSA, izračunate su masene koncentracije enzima u uzorku. Vrijednost  $y$  u jednadžbi predstavlja apsorbanciju, a nepoznanica  $x$  željene koncentracije enzima. Budući da su otopine enzimskih ekstrakata prethodno razrijeđene 2000 puta, dobivene vrijednosti masenih koncentracija potrebno je pomnožiti s 2000 kako bi račun odgovarao stvarnoj situaciji.

**Tablica 4.1.** Srednje vrijednosti apsorbancija i masene koncentracije proučavanih enzima

Enzim	A(sred.)	$\gamma(R) \mu\text{g mL}^{-1}$	$\gamma_{\text{stvarna}} \mu\text{g mL}^{-1}$	$\gamma_{\text{stvarna}} \text{mg mL}^{-1}$
HheA	0,26	5,09	10178,81	10,18
HheA-N178A	0,26	5,27	10532,01	10,53
HheB	0,27	5,54	11072,85	11,07
HheC (19.04.2019.)	0,28	6,04	12077,26	12,08
HheC (11.11.2019.)	0,27	5,56	11128,04	11,13
HheC-W4	0,30	6,60	13203,09	13,20
HheC-W249P	0,28	6,01	12011,04	12,01
HheC-134V	0,29	6,10	12209,71	12,21
HheC-134A	0,31	6,92	13843,27	13,84

Iz rezultata prikazanih u tablici 1.1. vidljivo je da se vrijednosti masenih koncentracija enzimskih ekstrakata kreću između 10 i 14  $\text{mg mL}^{-1}$ . Najveća koncentracija zabilježena je kod uzorka enzima HheC-134A i iznosi 13,84  $\text{mg mL}^{-1}$ , a najmanja u uzorku HheA od 10,18  $\text{mg mL}^{-1}$ . Koncentracija enzima HheC (11.11.2019.), izoliranog u ovom eksperimentu iznosi 11,13

mg mL<sup>-1</sup>, slična je rezultatima drugih HheC enzima. U usporedbi s koncentracijom enzima HheC izoliranog 19.04.2019., dobivena koncentracija HheC je 7,86% manja.

## 4.2. Mjerenje aktivnosti enzima HHDH – spektrofotometrijskim PNSHH testom

U niže navedenim jednadžbama, *V.A.* predstavlja volumnu aktivnost enzima, *V<sub>r</sub>* je volumen uzorka u kiveti i iznosi 1 mL,  $\epsilon$  je ekstinkcijski koeficijent, za epoksid iznosi 4,29 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, *d* je širina kivete i iznosi 1 cm, *V<sub>E</sub>* je volumen sirovog enzimskog ekstrakta, iznosi 1 ili 2 μL (ovisno o koncentraciji proteina u uzorku),  $\frac{\Delta A}{\Delta t}$  je promjena apsorbancije u vremenu,  $\gamma$  je masena koncentracija enzima, a *S.A.* je specifična aktivnost enzima.

$$V.A. = \frac{V_r}{\epsilon d V_E} \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (4.1.)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma} \quad (4.2.)$$

Volumna aktivnost enzima i specifična aktivnost enzima izračunate su prema jednadžbi (4.1.), odnosno (4.2.) uz parametre prikazane u tablici 1.2. Specifična aktivnost enzima izračunata je kao omjer volumne aktivnosti (*V.A.*) i masene koncentracije enzima ( $\gamma$ ).

**Tablica 4.2.** Parametri za izračun volumne aktivnosti enzima

<b>V<sub>r</sub> [mL]</b>	1
<b><math>\epsilon</math> [mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>]</b>	4,29
<b><i>d</i> [cm]</b>	1
<b>V<sub>E</sub> [μL]</b>	1 ili 2

**Tablica 4.3.** Masene koncentracije enzimskih ekstrakata, vrijednosti volumne i specifične aktivnosti enzima

Enzim	$\gamma$ stvarna mg mL <sup>-1</sup>	V <sub>E</sub> $\mu$ L	$\frac{\Delta A}{\Delta t}$ min <sup>-1</sup>	R	V.A. U mL <sup>-1</sup>	S.A. U mg <sup>-1</sup>
HheA	10,18	2	0,03	1	3,92	0,38
HheA-N178A	10,53	2	0,07	1	8,43	0,80
HheB	11,07	1	0,05	1	11,00	0,99
HheC (19.04.2019.)	12,08	2	0,08	1	9,68	0,80
HheC (11.11.2019.)	11,13	2	0,09	1	10,35	0,93
HheC-W4	13,20	2	0,22	1	25,41	1,92
HheC-W249P	12,01	2	0,23	1	27,07	2,25
HheC-134V	12,21	2	0,17	1	19,64	1,61
HheC-134A	13,84	2	0,11	1	13,09	0,95

Enzimski ekstrakt HheC-W249P pokazuje najveću volumnu aktivnost koja iznosi 27,07 U mL<sup>-1</sup>, dok je najmanja zabilježena kod ekstrakta HheA, 3,92 U mL<sup>-1</sup>. Volumna aktivnost izoliranog enzima HheC (11.11.2019.) iznosi 10,35 U mL<sup>-1</sup>, u odnosu na druge enzime C-tipa, dobivena volumna aktivnost je relativno niska. Jedino prema enzimu HheC izoliranog 19.04.2019., volumna aktivnost izoliranog enzima je 6,92% veća.

Kao i kod vrijednosti volumnih aktivnosti, najveću specifičnu aktivnost pokazuje ekstrakt enzima HheC-W249P, 2,25 U mg<sup>-1</sup>, a najmanju, 0,38 U mg<sup>-1</sup> HheA. Specifična aktivnost enzima HheC (11.11.2019.) iznosi 0,93 U mg<sup>-1</sup>, u odnosu na specifične aktivnosti drugih HheC, ova relativno je niska. U odnosu na HheC (19.04.2019.) specifična aktivnost izoliranog enzima je 16,25% veća.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu izoliran je i pročišćen enzim halogenhidrin-dehalogenaza tipa C (HheC) iz stanica genetski modificirane *Escherichia coli*. Nakon uzgoja biomase s visokom koncentracijom enzima slijedila je izolacija i pročišćavanje. Proces započinje resuspendiranjem u TEMG puferu nakon čega su stijenke bakterijskih stanica razbijene ultrazvukom. Centrifugiranjem je izdvojen sirovi enzimski ekstrakt u nadtalogu. Uspješnost izolacije enzima utvrđena je mjerenjem koncentracije proteina metodom po Bradfordu, te mjerenjem volumne i specifične aktivnosti enzima spektrofotometrijskim PNSHH testom. U Bradfordovoj metodi koncentracije enzima izračunate su iz izmjerenih apsorbancija pri maksimumu valne duljine,  $\lambda = 595$  nm. Osim za izolirani enzim HheC, snimane su apsorbancije 8 prethodno izoliranih halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH) radi usporedbe rezultata. U eksperimentu je dobiveno 40 mL nadtaloga, u kojemu je određena koncentracija HheC enzima, metodom po Bradfordu i iznosi  $11,13 \text{ mg mL}^{-1}$ . Spektrofotometrijskim PNSHH testom snimana je razlika apsorbancije pri valjnoj duljini  $\lambda = 310$  nm između PNSHH i PNSO, dobivena je promjena apsorbancije s vremenom,  $dA/dt$ . Uvrštavanje masenih koncentracija i promjena apsorbancija, zajedno s parametrima iz tablice 4.2. u jednadžbe iz poglavlja 4, daje vrijednosti volumnih (V.A.) i specifičnih (S.A.) aktivnosti enzima. V.A. iznosi  $10,35 \text{ U mL}^{-1}$ , a S.A.  $0,93 \text{ U mg}^{-1}$ . Usporedno s dobivenim vrijednostima koncentracija i volumnih, odnosno specifičnih aktivnosti za druge HheC enzime, može se zaključiti da je izolacija i pročišćavanje enzima HheC uspješno provedena.

## 6. POPIS SIMBOLA

$Abs, A$	apsorbancija	[-]
$Abs_0$	apsorbancija prazne kivete	[-]
$\frac{\Delta A}{\Delta t}$	promjena apsorbancije u vremenu	[min <sup>-1</sup> ]
BSA	albumin iz goveđeg seruma	
$\gamma$	masena koncentracija	[mg mL <sup>-1</sup> ]
$d$	udaljenosti kroz koju prolazi svjetlost u kiveti	[cm]
DMSO	dimetilsulfoksid	
$\epsilon$	ekstinkcijski koeficijent	[mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
E	enzim	
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina	
[ES]	kompleks enzim-supstrat	
FAD <sup>+</sup>	flavin adenin dinukleotid	
FMN	flavin mononukleotid	
HHDH	halogenhidrin-dehalogenaza	
HheC	C-tip halogenhidrin-dehalogenaze	
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid	
NADP <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat	
PNSHH	1-(p-nitrofenil)-2-brometanol	
PNSO	p-nitrostiren oksid	
$R$	razrjeđenje	
rpm	broj okretaja u minuti	[min <sup>-1</sup> ]
S	supstrat	

$S.A.$	specifična aktivnost enzima	$[U\text{ mg}^{-1}]$
$V.A.$	volumna aktivnost enzima	$[U\text{ mL}^{-1}]$
$V_E$	volumen sirovog enzimskog ekstrakta	$[\mu\text{L}]$
$V_r$	volumen uzorka u kiveti	$[\text{mL}]$

## 7. LITERATURA

- [1] <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=18053> (pristup 30. ožujka 2020.)
- [2] A. Illanes (ed.): Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications, Springer Science + Business Media B.V., 2008., str. 1, 16-29
- [3] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer: Biochemistry, 5<sup>th</sup> edition, W. H. Freeman, New York, 2002., str. 96-114
- [4] A. S. Bommarius, B. R. Riebel: Biocatalysis, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004., str. 4-6, 19-22
- [5] S.H. Pine: Organic Chemistry, Školska knjiga, Zagreb, 1994., str. 844-846
- [6] <https://images.app.goo.gl/QwYHzL6QYbB44sf38> (pristup 11. ožujka 2020.)
- [7] <https://images.app.goo.gl/Kz3dZuMF2CYywCgr9> (pristup 19. ožujka 2020.)
- [8] M. Majerić Elenkov, W. Szymański, D.B. Janssen: Reactions Catalyzed by Halohydrin Dehalogenases, Science of Synthesis: Biocatalysis in Organic Synthesis, 2, 2015., str. 507-508
- [9] M. Majeric Elenkov, W. Hoeffken, L. Tang, B. Hauer, D.B. Janssen: Enzyme-catalyzed nucleophilic ring opening of epoxides for the preparation of enantiopure tertiary alcohols, Adv. Synth. Catal, 349, 2007., str. 2279-2285
- [10] M. Majerić Elenkov: Biokatalitička primjena halogenhidrin dehalogenaza u svrhu pripreve kiralnih građevnih blokova, Projekti, Institut Ruđer Bošković, 2011.
- [11] M. Schallmey, J. Koopmeiners, E. Wells, R. Wardenga, A. Schallmey: Expanding the Halohydrin Dehalogenase Enzyme Family: Identification of Novel Enzymes by Database Mining. *Appl Environ Microbiol.*, 80(23), 2014., str. 7303-7315
- [12] Z. You, Z. Liu, Y. Zheng: Chemical and enzymatic approaches to the synthesis of optically pure ethyl (R)-4-cyano-3-hydroxybutanoate, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(1), 2014., str. 11-21
- [13] A. Švarc, D. Skendrović, A. Vrsalović Presečki: Biocatalysis for the Production of Pharmaceutical Intermediates: Statin Precursors, *Kem. Ind.*, 68(9-10), 2019., str. 469-476

- [14] A. Endo: A historical perspective on the discovery of statins, Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci., 86(5), 2010., str. 484-493
- [15] H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, P.K. Moore: Farmakologija, Zagreb: Golden marketing-tehnička knjiga, 2006., str. 306-311
- [16] I. Buhaescu, H. Izzedine: Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications, Clin Biochem., 40, 2007., str. 575-84
- [17] W.H. Frishman, J. Horn: Statin-drug interactions: not a class effect, Cardiol Rev., 16(4), 2008., str. 205-212
- [18] <http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl20.html> (pristup 14. travnja 2020.)
- [19] <https://www.tim-studio.net/Forum/WEB/inzulin> (pristup 29. travnja 2020.)
- [20] D. Barh (ed.), V. Azevedo(ed.): Omics Technologies and Bio-Engineering, Towards Improving Quality of Life, Emerging Fields, Animal and Medical Biotechnologies. Elsevier, vol.1, 2018., str. 460-462
- [21] <https://blog.addgene.org/plasmids-101-protein-expression> (pristup 17. travnja 2020.)
- [22] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=26314> (pristup 25. travnja 2020.)
- [23] W. Keenleyside: Microbiology: Canadian Edition, 9.3 Media Used for Bacterial Growth, 2019., str. 602-607
- [24] <http://svet-biologije.com/biologija/mikrobiologija/bakterije/kultivisanje-bakterija> (pristup 26. travnja 2020.)
- [25] <https://hr.wikipedia.org/wiki/Agar> (pristup 26. travnja 2020.)
- [26] T. Sandle: Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control, Elsevier, 2015., str 47-59
- [27] M. Shehadul Islam, A. Aryasomayajula, P.R. Selvaganapathy: A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods, *Micromachines (Basel)*, 8(3), 2017., str. 83
- [28] Marion M. Bradford: Analytical Biochemistry, Elsevier, Volume 72, Issues 1-2, 1976., str. 248-254



[29] J. H. Lutje Spelberg, L. Tang, M. van Gelder, R. M. Kellogg, D. B. Janssen: Exploration of the biocatalytic potential of a halohydrin dehalogenase using chromogenic substrates, *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 13, Issue 10, 2002., str. 1083-1089

## 8. PRILOZI

### 8.1. Korišteni sirovi enzimski ekstrakti

Sirovi enzimski ekstrakti HheA, HheA-N178A, HheB, HheC (19.04.2019.), HheC (11.11.2019.), HheC-W4, HheC-W249P, HheC-134V, HheC-134A pripremljeni i pročišćeni u laboratoriju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

### 8.2. Korištene kemikalije

Hranjiva podloga LB-Medium (Luria/Miller) (Roth, Njemačka)

Agar-Agar (Roth, Njemačka)

Ampicilin natrijeva sol  $\geq 91\%$  (Roth, Njemačka)

Stanice *E. coli* MC1061 pBAD-HHEC(1) 30.05.2019.

Arabinoza (Roth, Njemačka)

Tris(hidroksimetil)aminometan (Avantor VWR Chemicals BDH, Belgija)

Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Roth, Njemačka)

Glicerol (Roth, Njemačka)

$\beta$ -Merkaptoetanol (Sigma Aldrich, SAD)

Inhibitor za proteaze (tablete), cOmplete Tablets EDTA-free, EASYpack (Roche, Švicarska)

Otopine albumina iz goveđeg seruma (engl. BSA – *Bovine Serum Albumin*)

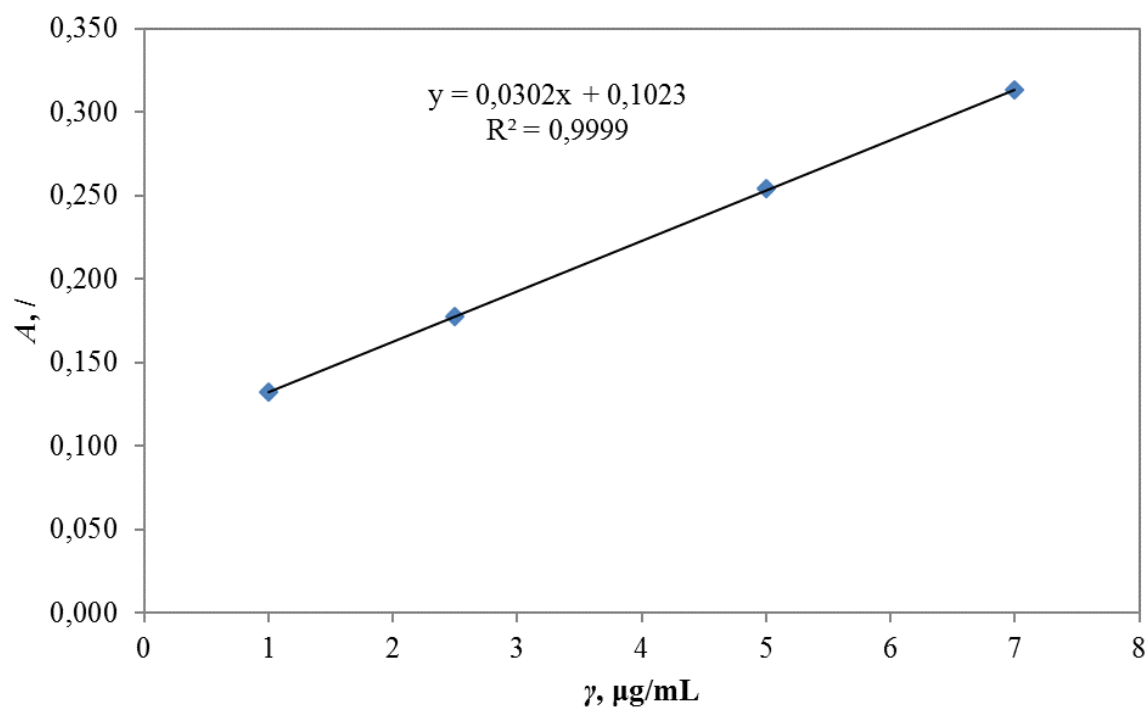
Coomassie Brilliant Blue G 250 reagens (Fluka)

Fosforna kiselina (85%) (Fluka)

PNSHH sintetiziran na Institutu Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju prema protokolu opisanom u znanstvenom radu [11]

Dimetilsulfoksid (DMSO) (Sigma Aldrich, SAD)

### 8.3. Baždarni pravac



**Slika 8.1.** Baždarni pravac izrađen s otopinama BSA (engl. bovine serum albumin), sljedećih koncentracija:  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $7 \text{ mg mL}^{-1}$