# Dizajnerski proteini

**Hanić, Maja**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:263251

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Maja Hanić

3. godina Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# DIZAJNERSKI PROTEINI

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov-Plavec

Zagreb, godina 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 11. rujna 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 22. rujna 2017.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov-Plavec Potpis:

# SADRŽAJ

**§ SAŽETAK ..... III**
**§ 1. UVOD ..... 1**
**1.1. Općenito – uloga i građa proteina ..... 1**
**§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME ..... 5**
**2.1 O različitim vrstama proteina ..... 5**
**2.2 Općenito o proteinskom inženjerstvu ..... 6**
**2.3 Eksperimentalne metode dobivanja modificiranih proteina ..... 7**
2.3.1 Racionalni dizajn ..... 7
2.3.2 Nasumična mutageneza ..... 9
**2.4 Ugradnja nestandardnih aminokiselina u proteine ..... 13**
**2.5 Primjena proteinskog inženjerstva ..... 14**
2.5.1 PRIMJENA U ZNANOSTI ..... 14
2.5.1.1 Primjena u analitičke svrhe ..... 14
2.5.1.2 Fotoosjetljive aminokiseline ..... 14
2.5.1.3 Primjena u području organske sinteze ..... 15
2.5.2 PRIMJENA U INDUSTRIJI ..... 16
**2.6. Sasvim umjetni proteini ..... 20**
**§ 3. LITERATURNI IZVORI ..... 22**

# § Sažetak

Proteini su sastavni dio živog svijeta te su s vremenom postali i ključan dio industrije čovječanstva. Potreba za dodavanjem novih svojstava i poboljšavanjem postojećih proteina rodila je novu granu biokemije – proteinsko inženjerstvo. Proteinsko inženjerstvo ima dvije glavne grane stvaranja novih proteina – racionalni dizajn i nasumična mutageneza. Racionalni dizajn je elegantnija metoda koja daje manje varijanti proteina, no zahtijeva više informacija o samom proteinu. Nasumična mutageneza metoda je koja se koristi kada imamo manje informacija o strukturi i funkciji proteina, no ona daje puno više mutiranih varijanti koje onda zahtijevaju temeljito pretraživanje. Kada se primjenjuje metoda nasumične mutageneze nužno je unaprijed odabrati željena svojstva koje protein mora imati kako bi se olakšalo pretraživanje velikog broja dobivenih proteinskih varijatni. Nove varijante proteina dobivene proteinskim inženjerstvom često se koriste za istraživanje odnosa strukture i funkcije proteina. Osim toga, nove varijante proteina često imaju poboljšana svojstva koja su važna za njihovu industrijsku primjenu. Organska sinteza također je grana koja je prosperirala od uporabe modificiranih proteina kao alat koji olakšava regioselektivne sinteze.

Osim široke primjene u industriji, danas se razvijaju i sasvim umjetni proteini čija se namjena tek istražuje. Za dizajniranje tih novih, sasvim umjetnih proteina, donesena su pravila koja omogućuju dizajniranje mnogo stabilnijih proteina koji se mogu koristiti i kao nova vrsta materijala.

# § 1. UVOD

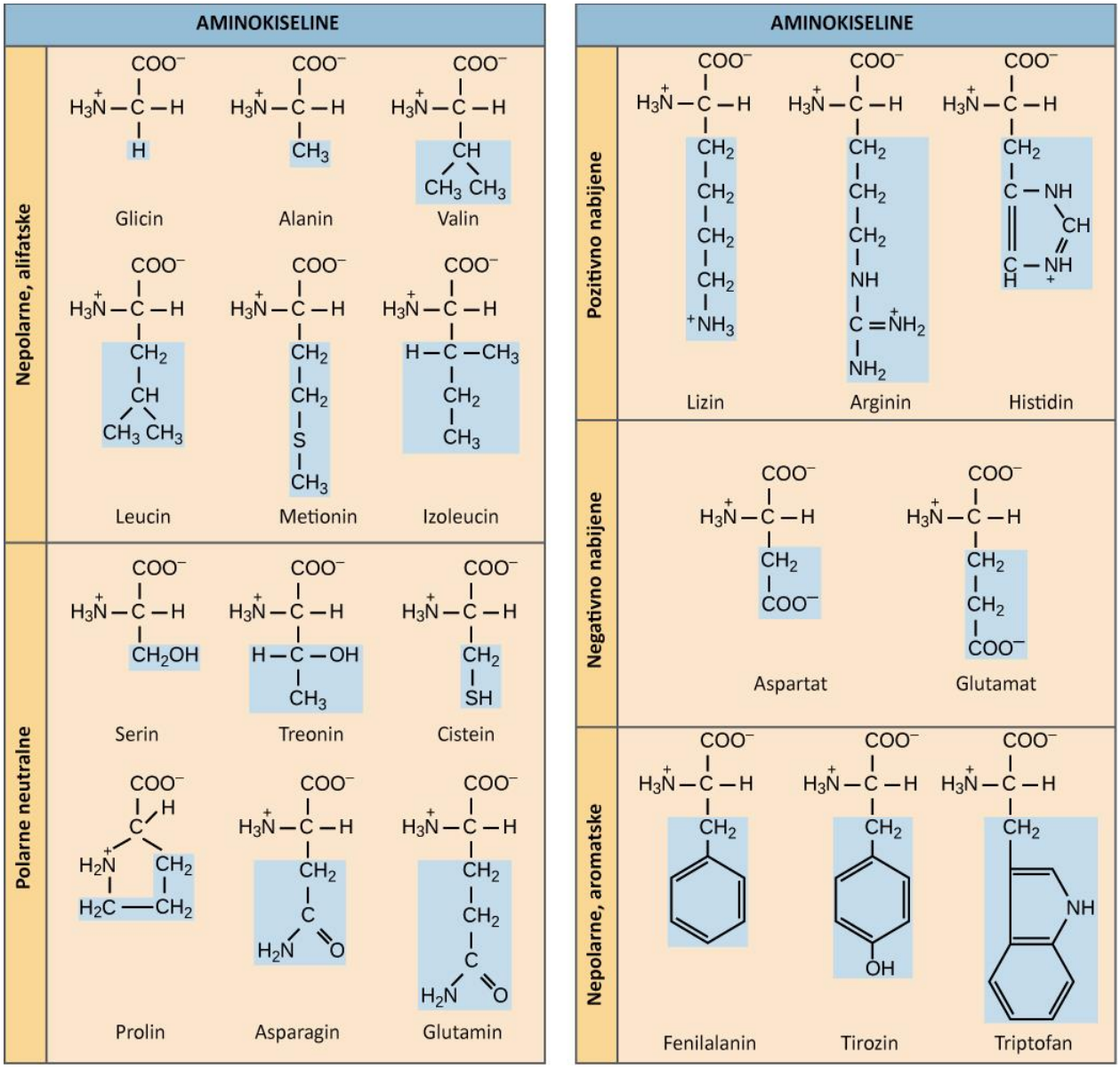
## 1.1. Općenito – uloga i građa proteina

U živom svijetu proteini imaju vrlo raznoliku i bitnu ulogu.
Proteini su linearni polimeri aminokiselina. Pojedinačni dijelovi polimera odnosno aminokiselinski ostaci, povezani su peptidnom vezom. Svaka od aminokiselina koja izgrađuje protein ima svoj karakterističnu i jedinstveni bočni ogranak. Većina polipeptida odnosno proteina sadržava između 50 i 2000 aminokiselina. Neki peptidi mogu biti građeni od manje aminokiselina, no u tom slučaju nazivamo ih oligopeptidima.
Aminokiselinski slijed proteina odnosno njegova primarna struktura zapisana je u genima živog bića odnosno u molekuli DNA. Primarna struktura proteina je slijed aminokiselina u proteinu te ona određuje tj. definira moguće sekundarne i tercijarne strukture proteina.

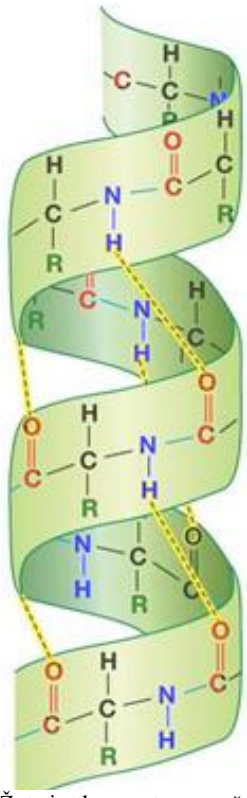
Iako u prirodi posotji 500 različitih aminokiselina, u svim živim bićima, od bakterije do čovjeka, proteini su sazdane od 20 aminokiselina. Iako proteini sadrže samo 20 različitih aminokiselina, povezujući ih u različite kombinacije, stanica je sposobna stvoriti proteine koje uvelike variraju u strukturi i namjeni – od proteina koji su bitni za građu biološkog organizma do proteina kojima je zadatak ubrzavati kemijske reakcije odnosno enzima. Primarna struktura proteina, odnosno kovalentni slijed aminokiselina, određuje njegovu tercijarnu strukturu što također uvjetuje funkciju proteina iz čega se dade zaključiti da je kovalentni slijed aminokiselina izuzetno bitan za razumijevanje funkcije proteina.
Aminokiseline dijelimo u više različitih skupina s obzirom na njihove ogranke: nepolarne-alifatske, aromatske, polarne-neutralne, pozitivno nabijene i negativno nabijene. Nepolarne-alifatske su glicin, alanin, prolin, valin, leucin, izoleucin i metionin. Aromatske su: fenilalanin, tirozin i triptofan. Polarne-neturalne su: serin, treonin, cistein, asparagin i glutamin. Polarne pozitivno nabijene su lizin, histidin i arginin, a negativno nabijene su aspartat i glutamat (slika 1). Osim ovih nabrojanih postoje i aminokiseline koje su pojavjuju u organizmima tokom odvijanja različitih biokemijskih reakcija no ne izgrađuju proteine te ih zovemo neproteinogenim aminokiselinama.[1]
Proteini imaju više razina strukture. Na primarnu strukturu nadograđuju se sekundarna, tercijana i kvaterna struktura. Kvaterna struktura postoji samo kod proteina koji imaju više

različitih podjedinica – pošto se ona odnosi na međusoban položaj podjedinica proteina. . Tercijarna struktura govori o međusobnom odnosu svih atoma u prostornim okvirima proteina odnosno određuje međuodnos elemenata sekundarne strukture unutar proteina tj. govori o npr. međusobnom položaju dviju alfa-zavojnica, ali i o odnosu onih elemenata strukture koji ne spadaju nužno pod sekundarne sturkture. Elementi sekundarne strukture su npr. alfa-zavojnica i beta-ploče. To su strukture unutar kojih se veći dio aminokiselina, koje stvaraju protein, slaže i smata. Alfa-zavojnica ima puno faktora koji pridonose njenoj stabilizaciji. Ponajprije se to odnosi na stvaranje nekovaletnih veza – elektrostatske interakcije, hidrofobne interakcije i vodikove veze. Alfa-zavojnica duguje svoju stabilnost vodikovim vezama, kojih zbog svoje strukture, može stvoriti velik broj. Svaki zavoj u alfa-zavojnici stabiliziran je sa 3 do 4 vodikove veze. Vodikove veze stvaraju se između vodikovog atoma NH-skupine n-te aminokiseline i kabonilnog kisika n+4-te aminokiseline (slika 2). Vodik i karbonilni kisik udaljeni su za 4 jedinice aminokiselina. Ono što još dodatno stabilizira strukturu alfa-zavojnice jest činjenica da je ona efektivno dipol, zbog načina na koji su razmještene aminokiseline – blizu karboksilnog kraja odnosno negativno nabijenog kraja nalaze se aminokiseline s pozitivnim nabojem, a blizu amino kraja odnosno pozitivno nabijenog kraja nalaze se aminokiseline s negativno nabijenim bočnim ograncima.

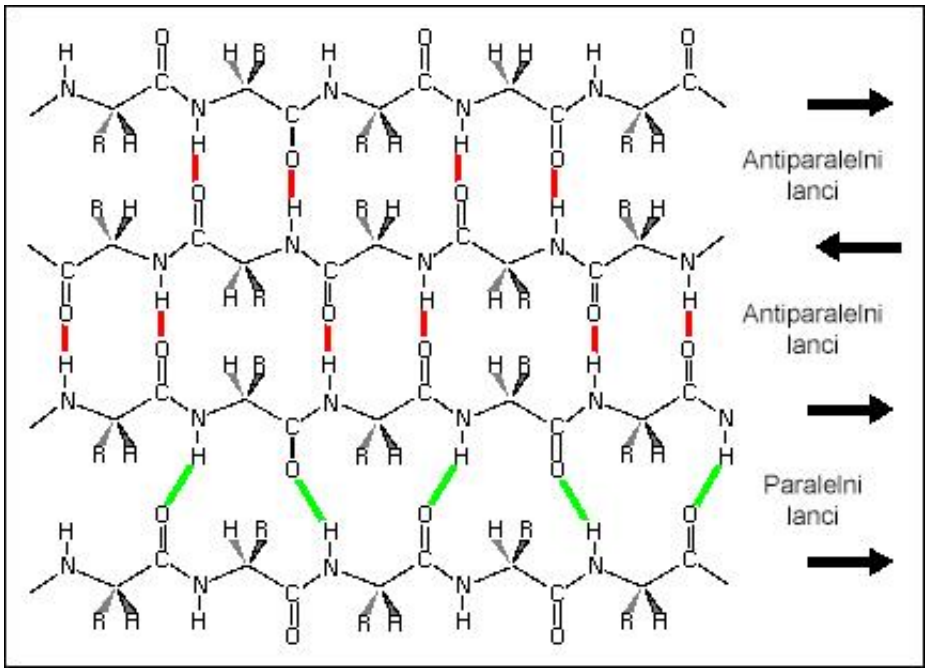
β-ploče su strukture u proteinima u kojima se β-lanci međusobno povezuju vodikovim vezama. Vodikova veza stvara se između kisika na karbonilnom C-atomu i vodika koji je vezan na dušik koji sudjeluje u stvaranju peptidne veze (slika 3). β-lanci se sastoje od aminokiselina povezanih peptidnom vezom, s time da se polipeptdina okosnica proteže u „cik-cak“ smjeru. β-ploče postoje postoje u dvije verzije – paralelne i antiparalelne. Antiparalelne su stabilnije zbog činjenice da se donor i akceptor vodika u vodikovom mostu nalaze u istoj ravnini. β-ploče često se u literaturi prikazuju kao naslagane plohe koje na jednom kraju imaju strelicu koja je usjmerena prema C-kraju proteina (slika 4).




**Slika 1.** Prikaz 20 proteinogenih aminokiselina razvrstanih u 5 grupa s obzirom na karateristike bočnog ogranka. (Preuzeto iz 11)



**Slika 2.** Žute isctkane crte naznačuju mjesto nastanka vodikove veze. (Preuzeto iz 12)




**Slika 3.** Prikaz paralelnih i antiparalelnih β-lanaca u β-ploči. Zelene i crvene crte oredstavljaju mjesto nastanka vodikove veze.(Preuzeto iz 13)

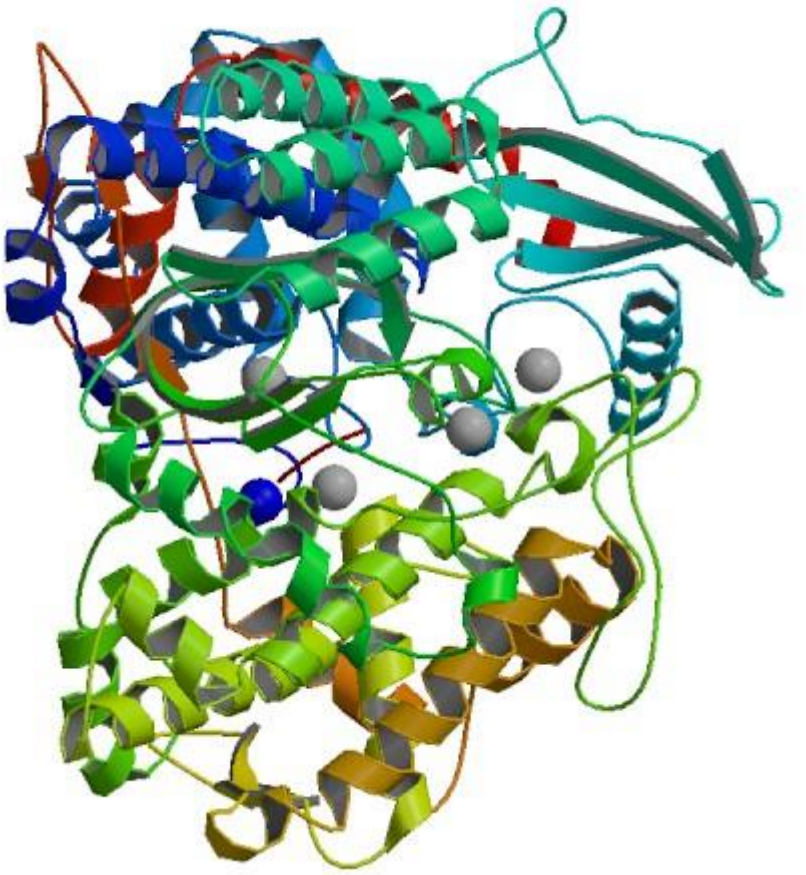
# § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

## 2.1 O različitim vrstama proteina

Kao što je već spomenuto, proteini mogu imati mnoge raznolike uloge.

Keratin i kolagen su proteini koji izgrađuju našu kožu, kosu i nokte te služe kao pirmjer proteina koji imaju sturkturnu ulogu. Proteini mogu imati i katalitičku ulogu. Enzimi su biološki katalizatori – oni omogućuju život kakav nam je poznat zbog svoje moći da ubrzavaju kemijske reakcije bitne za funkcioniranje jednog biološkog organizma. Serinske proteaze klasa su enzima koji cijepaju peptidne veze između drugih proteina te ih na taj način razgrađuju. Hemoglobin je protein koji prenosi kisik u krvi, od pluća, gdje je parcijalni tlak kisika visok, do raznih tkiva u cijelom tijelu koja potrebuju kisik – stoga kažemo da hemoglobin protein koji ima prenositeljsku ulogu. Nadalje postoje i skladišni enzimi kao npr. feritin koji pohranjuje željezo. Proteini mogu imati i signalnu ulogu te su neki od njih hormoni. Jedan poznat primjer sinalnog proteina koji je povezan sa sve više zabrinjavajućim trendovima pretilosti i dijabetesa u ljudi jest inzulin. Inzulin je također primjer proteina bitnog za proteinsko inženjerstvo jer se njegovom preciznom modifikacijom dijabetičarima može dostaviti veoma pouzdan i otporan protein. Motorna uloga također je povezana s proteinima pa su tako aktin i miozin proteini zaslužni za kretanje mišića. Imunoglobulini su tip proteina koji prepoznaju strana tijela te omogućuju njihovu eradikaciju tako što ih prezentiraju makrofagima – stanicama koji probavljaju ta strana tijela. Valja još spomenuti i proteinske neurotransmitere – endorfin je protein zaslužan za prijenos informacije između neurona u mozgu.

Enzimi su vrsta proteina. Oni su ključni za život jer bez njih stanica ne može selektivno provoditi reakcije koje su joj potrebne. Postoji 6 klasa eznima s obzirom na reakcije koje kataliziraju. S obzirom na vrstu reakcije koju katalizira, enzim dobiva svoje ime pa tako npr. transferaze prebacuju grupu atoma s jednog kraja molekule na drugi, liaze cijepaju C-C, C-O i C-N vezu dok ligaze formiraju te iste veze. Ključne reakcije katalize odvijaju se u aktivnom mjestu eznima. Molekula koja se veže za aktivno mjesto te koja je izmjenjena nakon jednog ciklusa katalitičkih reakcija naziva se supstratom.



**Slika 4. Prikaz proteina endomorfina-2** Prikaz globularnog proteina koji ima ulogu neurotransmitera. Alfa-zavojnice prikazane su kao zavojite spirale, a beta ploče kao strelice. Endomorfin-2 je kao protein agonist μ-receptora u mozgu, receptora koji su zaslužni za pozitivno potkrepljenje (eng. *positive reinforcement*.) (Preuzeto iz 14)

## 2.2 Općenito o proteinskom inženjerstvu

Proteinsko inženjerstvo grana je tehnologije koja se bavi dobivanjem rekombinantnih proteina. Rekombinantni proteini su proteini koji su drugačiji od proteina koje nalazimo u prirodi jer je neki njihov dio ljudskim djelovanjem izmijenjen. Ova grana tehnologije počela se značajnije razvijati tek u drugoj polovici 80-tih godina prošlog stoljeća. Postoji mnogo načina dobivanja rekombinatnih proteina te mnogo primjena tih proteina. Većina tehnologija bazira se na korištenju rekombinantne DNA tehnologije. Dvije glavne grane na koje dijelimo metode dobivanja rekombinantnih proteina su racionalni dizajn i usmjerena evolucija „*in vitro*“ – odnosno nasumična mutageneza (slika 5 i slika 8).

Prvi način moguće je primijeniti tek kada je poznata struktura proteina ili enzima odnosno kada je poznat mehnizam njegova djelovanja te selektivnost prema supstratu. To je nerijetko nepoznato te se zbog toga koristi i nasumična mutageneza – metoda u kojoj se izmijeni neki

dio aminokiselinskog slijeda (ili samo jedna aminokiselina) te se promatra kakav to učinak ima na aktivnost proteina. Prednost racionalnog dizajna je ta što se često radi s manjim sustavima te se zato dobije manji broj varijanti čija se selektivnost može brže ispitati uspoređujući $k_{cat}$ i $K_M$ s nemutiranom verzijom enzima.[2, 6]

## 2.3 Eksperimentalne metode dobivanja promijenjenih proteina

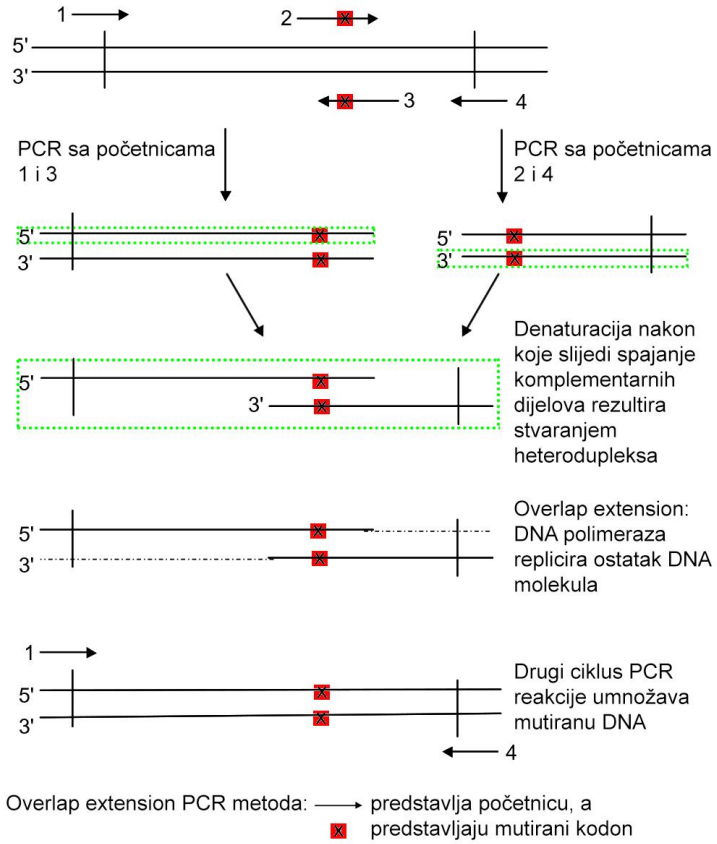
### 2.3.1 Racionalni dizajn




**Slika 5. Shematski prikaz racionalnog dizajna** (Prema ideji iz 2)

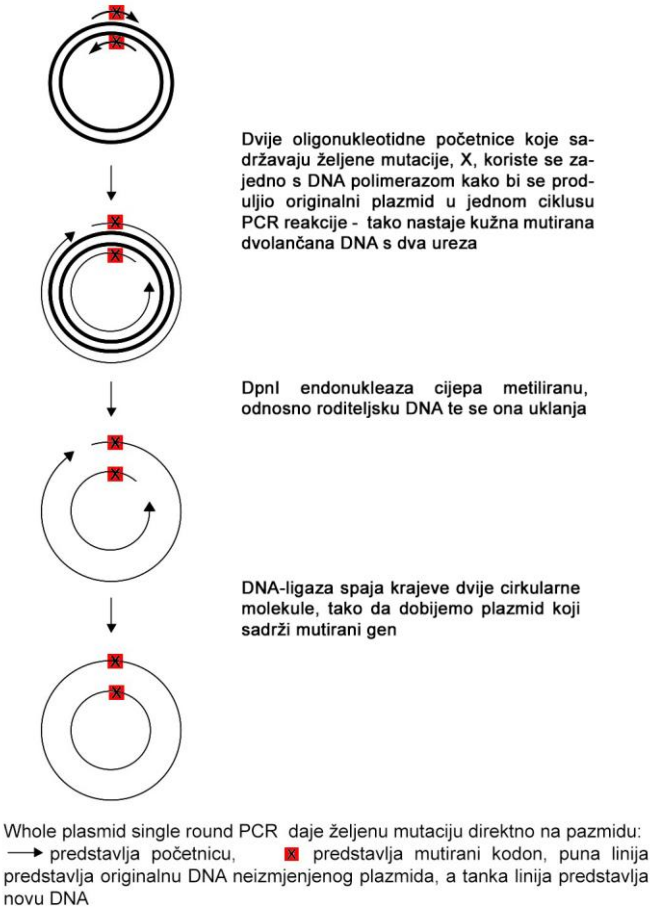
Racionalni dizajn ima dvije najčešće metode koje se primjenjuju.

*Overlap extension* (produljenje preklopa) metoda se bazira na uvođenju mutacija u gen pomoću mutagenih početnica koristeći umnožavanje DNA pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR, eng. *polymerase chain reaction*). Metoda započinje tako da sintetički napravljene početnice, koje sadrže željenu mutaciju, zajedno s nemutiranim početnicama, stavimo u smjesu sa molekulom DNA na kojoj želimo uvesti promjenu (slika 6).
Provedemo dvije PCR reakcije: jednu u kojoj koristimo početnicu 1 i početnicu 3 (koja sadrži mutaciju), te drugu u kojoj koristimo početnicu 2 (koja također sadrži mutaciju) i početnicu 4. Na taj način nastaju dva PCR produkta koja imaju dijelove koji se mogu preklopiti. Ovo i jest razlog zašto ova metoda nosi naziv "*overlap*" - preklop. Kad se ta dva fragmenta ujedine u zajedničku smjesu i denaturiraju dobivamo preklopljene lance. Djelovanjem DNA-polimeraze nastaje cjeloviti mutirani gen. Dodatkom početnica 1 i 4 ovaj mutirani gen se umnaža PCR-om.[6]



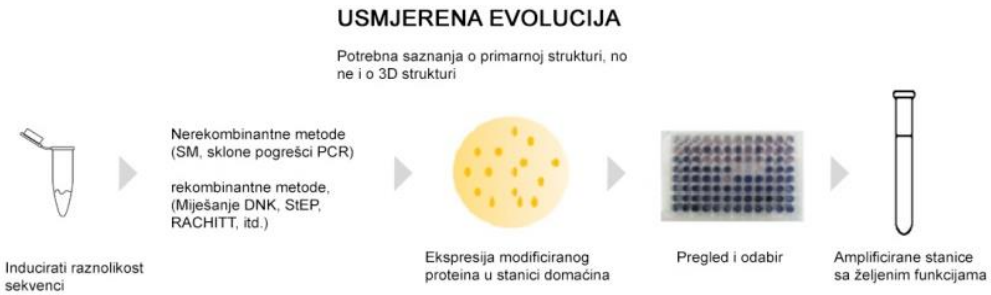

**Slika 6. Shematski prikaz metode produljenje preklopa** (eng. *Overlap extension PCR metode*) (Preuzeto i prilagođeno iz 5)

Kružna mutageneza (eng. izraz *whole plasmid single round PCR*) jednostavnija je metoda od *overlap-extension* metode jer zahtijeva manje početnica i manje ciklusa PCR-a. Bazira se na tome da imamo dvije sintetički pripravljene mutagene početnice koje su komplementarne kružnim molekulama DNA odnosno plazmidu. Provede se PCR pri čemu nastaju novi lanci komplementarni plazmidnoj DNA koji sadrže mutacije. Ovi lanci su međusobno komplementarni i tvore kružnu mutiranu DNA s dva ureza/prekida. Dodatkom *Dpn*I endonukleaze razgrađuju se roditeljske kružne molekule DNA jer su one metilirane na adeninu u GATC slijedu, te se na taj način uklanjaju. DNA-ligaza spaja ureze, te nastaje kružni dvolačani plazmid koji sadrži mutirani gen. Kod ove tehnike je problem je što uglavnom nije učinkovita s većim plazmidima (iznad 10 kB) (slika 7) [6].




**Slika 7. Shematski prikaz Whole plasmid single round PCR metode**. (Preuzeto i prilagođeno iz 5)

## *2.3.2 Nasumična mutageneza*




**Slika 8. Shematski prikaz nasumične mutageneze odnosno usmjerene evolucije** (Prema ideji iz 2)

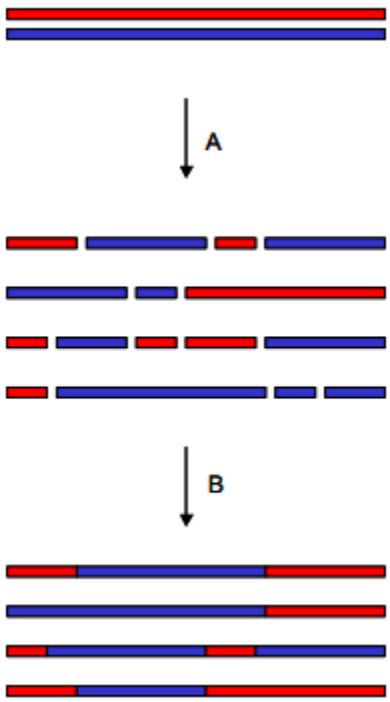
Korištenje nasumične mutageneze odnosno usmjerene evolucije „*in vitro*“ generira zbirku različitih varijanti mutiranih proteina. Ove metode moraju imati unaprijed postavljene

odrednice koje se odnose na aktivnost, stabilnost ili strukturu proteina koje diktiraju selekciju između mnogo dobivenih varijanti.

*Zasićena ili saturacijska mutageneza* je metoda u kojoj se aminokiselina na točno određenoj poziciji mutira u sve druge proteinogene aminokiseline te se potom promatra učinak te izmjene na strukturu odnosno na funkciju enzima.[2]

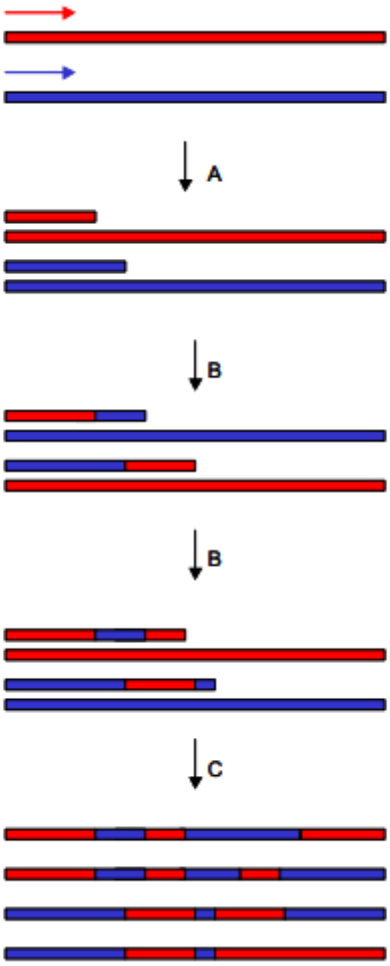
Lokalna ili regiospecifična nasumična mutageneza slična je zasićenoj mutagenezi, no umjesto jedne, mutira se više aminokiselina unutar jedne lokalne regije te se promatra učinak na strukturu odnosno funkciju. Za određen katalitčki učinak ili vezanje, enzim najčešće ima nekoliko aminokiselina u nizu koje su bitne za tu aktivnost te se ovim načinom mutageneze može dobiti bolji uvid nego mutacijom samo jedne aminokiseline.

DNA *shuffling* ili miješanje DNA metoda je u kojoj se rekombiniraju geni sličnih nukeotidnih sljedova. DNA se pribavi iz više različitih organizama koji imaju relativno slične gene ili iz PCR metoda koje su sklone stvaranju pogreške odnosno PCR s greškom (eng. *error-prone* PCR). Nakon dodavanja DNazeI u smjesu stvori se mnogo malih nasumično odrezanih dijelova molekule DNA. Tada se provede PCR no bez dodatnih početnica već se fragmenti DNA koji su dovoljno komplementarno slični spoje te se nastala molekula produljuje djelovanjem DNA-polimeraze. Na ovaj način nastaju hibridni nukleotidni sljedovi koji imaju porijeklo iz više DNA izvora (slika 9).




**Slika 9. Shematski prikaz metode miješanja DNA**. (A) Roditeljska DNA (crveno i plavo) nasumično je fragmentirana pomoću DNazeI ili restrikcijskim enzimima. (B) Fragmenti su nanovo posloženi u PCR reakciji bez početnica u kojoj fragmenti sad istovremeno služe kao početnice i kao kalup. Replikacija daje hibridnu molekulu. (Preuzeto iz 5)

„*Staggered extension process*“ (StEP) odnosno zastakujući proces produljivanja metoda je koja također uključuje korištenje PCR metode i smjesu relativno sličnih gena. U ovoj metodi vrijeme sinteze, odnosno produljivanja novih lanaca pomoću DNA polimeraze ,vrlo je kratko te tijekom jednog ciklusa PCR-a nastaju kratki segmenti DNA. Nakon denaturacije novonastali segmenti mogu se spariti s različitom molekulom DNA (u smjesi), koja onda služi kao kalup za daljnu replikaciju. Do sparivanja dolazi s obzirom na sličnost komplementarnih dijelova.Takvi ciklusi ponavljaju se sve dok se ne replicira cijela molekula DNA. Pošto su vremena produljenja vrlo kratka, rastuća DNA ubrzano mijenja kalup te tako akumulira izmiješane varijante roditeljskih molekula DNA (slika 10).[6]




**Slika 10. Shema zastakujućeg procesa produljivanja.** (A) Primeri se koriste da bi se replicirala molekula DNA s tim da je replikacija zaustavljena nakon kratkog intervala vremena kako bi se proizveli mali segmenti repliciranе DNA. (B) Fragmenti se denaturiraju, te se oni dijelovi koji su bili komplementarni kalupu, sparuju s drugačijim roditeljskim kalupom te se replikacija nastavlja za kratko vrijeme. Ovaj korak ponavlja se više puta. (C) Na kraju se dobiva hibridna DNA. (Preuzeto iz 5)

## 2.4 Ugradnja nestandardnih aminokiselina u proteine

Kao što je već rečeno, proteini sadrže 20 proteinogenih aminokiselina. Da bi se proširila funkcionalnost proteina, osmišljene su metode koje omogućuju ugradnju neproteinogenih aminokiselina u proteine. Neke od tih aminokiselina mogu se naći u živim bićima gdje sudjeluju u različitim biokemijskim procesima, a neke su dizajnirane i sintetizirane metodama organske sinteze.

Ove tehnike zapravo proširuju genetički kod jer omogućuju da STOP kodon u mRNA više ne bude signal za završetak translacije već kodon koji omogućuje ugradnju nestandardne aminokiseline. U procesu translacije, svaka aminokiselina ima svoj odgovarajući par tRNA/aminoacil-tRNA-sintetaza stoga je potrebno pronaći odgovarajući par tRNA/aminoacil-tRNA-sintetaza par koji će omogućiti ugradnju nestandardne aminokiseline tijekom čitanja STOP kodona. Potrebno je dizajnirati aminoacil-tRNA-sintetazu koja će prepoznavati nestandardnu aminokiselinu i povezati je s tRNA koja prepoznje STOP kodon – ovako dizajniran par tRNA/aminoacil-tRNA-sintetaza ubacuje se u stanicu domaćina. Način koji to omogućuje naziva se ortogonalnim zato što tRNA i aminoacil-tRNA-sintetaza ne dolaze iz istog organizma nego iz evolucijski divergentnog s obzirom na domaćina. Do unakrsnih reakcija između domaćinske aminoacil-tRNA-sintetaze i strane aminoacil-tRNA-sintetaze ne dolazi zbog drugačije razvijenih sekvenci koje su posljedica divergentne evolucije.[5]

Drugi način bio bi „ugradnja pod pritiskom“ ( eng. *selective pressure incorporation,* SPI). SPI metoda bazira se na uzgajanju bakterijske kulture na podlozi koja je auksotrof za neku određenu aminokiselinu. Prvo se podloga obogati s ograničenim količinama aminokiseline za koju je određeni soj bakterije auksotrof (tj. bakterija ne može rasti bez te aminokiseline), a kada se ta zaliha potroši podloga se obogati s nestandardnom aminokiselinom koju želimo ugraditi u protein. Osim te aminokiseline na podlogu se doda i induktor koji je zaslužan za prekomjernu ekspresiju gena koji kodira protein u koji želimo ugraditi nestandardnu aminokiselinu. Na ovaj način moguće je ugraditi aminokiseline slične tj. analogne originalnoj proteinogenoj aminokiselini.

## 2.5 Primjena proteinskog inženjerstva

### 2.5.1 PRIMJENA U ZNANOSTI

#### 2.5.1.1 Primjena u analitičke svrhe

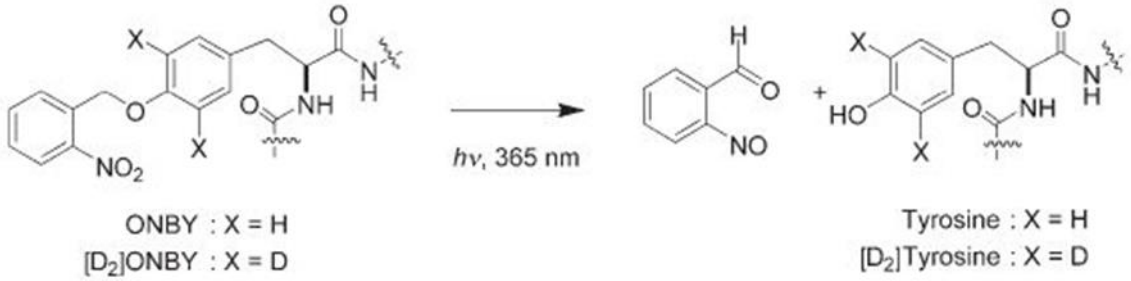
Proteinsko inženjerstvo odigralo je vrlo bitnu ulogu u omogućavanju iskorštavanja naprednih analitčkih uređaja i metoda za biokemijska istraživanja. Proučavanje nekih reakcija *in vivo*, sa neizmjenjenihm proteinom ponekad je vrlo teško provesti iz razloga što se neke reakcije odvijaju pri velikim brzinama. Za takve reakcije klasičnim analitičkim metodama nije moguće dobiti pouzdane rezultate. Jedna od tih primjena bila bi i omogućavanje praćenja kemijskih reakcija koje se događaju u enzimu zbog toga što izmjenjeni protein reagira sa supstratom sporije nego neizmjenjeni protein. Ako aminokiselini, koja je ključna za odvijanje nekog mehanizma, određene atome zamjenimo težim atomima, sama reakcija ići će sporije. To omogućuje pouzdaniju detekciju međuprodukata i dodatno potkrepljuje pretpostavljene mehanizme (ili ih pak oporvgava). Osim navedene primjene, ugradnja nestandardnih aminokiselina u proteine vrlo je bitna iz razloga jer omogućuje 3D rentgensku kristalografiju. Kako bi se riješila struktura nekih proteina, potrebno je dobiti njihove kristale, no to nije uvijek moguće. Ciljanom ugradnjom nestandardnih kiselina omogućuje se lakša kristalizacija proteina što olakšava rješavanje strukture. Također, ugradnja težih atoma fluora u aminokiselina proteina, omogućuje proučavanje proteina pomoću 19F-NMR.[4]

#### 2.5.1.2 Fotoosjetljive aminokiseline

Praćenje reakcija te određivanje točne funkcije proteina pomoću metoda proteinskog inženjerstva veoma je bitno i kod spektrokemijskih istraživanja proteina. Jedna od metoda koristi se fotoosjetljivim (eng. photocaged) aminokiselinama. Ova metoda bazira se na tome da se fotoosjetljive-aminokiseline ugrade u proteine te kao takve onemogućuju određenu funkciju proteina. Slanjem impulsa svjetlosti spomenuta aminokiselina se „aktivira“ te se na taj način omogući normalno djelovanje enzima (slika 11). Ovo omogućuje da se uloga enzima istražuje *in vivo,* unutar stanice na mjestu gdje se protein prirodno nalazi te također da se enzim aktivira u željenom trenutku.[3]

Fotoosjetljivi proteini su modificirani proteini, a ime im potječe od činjenice da mogu biti kontolirani svjetlom. Na sebi najčešće imaju dodanu neku funkcionalnu grupu koja je osjetljiva na svjetlost. Jedna od najčešćih skupina je o-nitrobenzil i njeni derivati. Pošto se

radi molekuli koja u sebi sadržava kisik moguće je preko njega povezati dvije molekule stvarajući tako etersku vezu. Ta veza se po slanju svjetlosnog signala može pokidati i na taj način tirozin se aktivira odnosno vraća u svoj prirodni oblik. Tirozin je pogodna aminokiselina za proučavanje, ne samo zbog činjenice da ima hidroksilnu skupinu na kraju svog bočnog ogranka što onda olakšava adiciju različitih skupina, nego i zato što su tirozin-kinaze čest način regulacije metaboličkih puteva i procesa u stanici. Tirozin-kinaze su posebna vrsta enzima koja fosforilira proteine na ograncima na kojima se nalazi tirozin (ili određeni slijed aminokiselina među kojima se gotovo uvijek nalazi i tirozin). Kinaze općenito su enzimi koji fosforiliraju druge proteine i na taj način ih aktiviraju ili deaktiviraju.



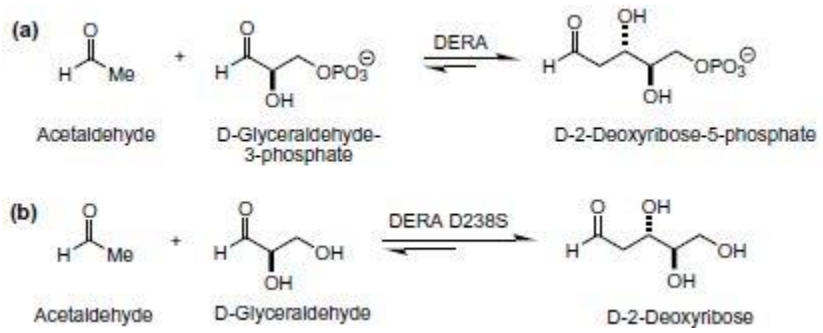

**Slika 11. Prikaz fotodeprotekcije o-nitrobenzilnog derivata daje aminokiselinu tirozin i o-nitrobenzil** (Preuzeto iz 3)

Provedeni eksperimenti, in vivo i in vitro, potvrdili su da je moguće kontrolirati enzime na opisani način: enzim β-galaktozidaza koja na položaju 503 sadržava modificirani tirozin nakon iradijacije svjetlošću valne duljine 365 nm u trajanju od 30 minuta pokazala je porast aktivnosti od 67% (s obzirom na divlji tip).[3]

### 2.5.1.3 Primjena u području organske sinteze

U području biokatalize, uporaba enzima kao katalizatora česta je u organskoj kemiji gdje se određene transformacije mogu lakše sprovesti zbog kemoselektivnosti i regioselektivnosti enzima. Za očekivati je da je proteinsko inženjerstvo ključno kako bi se uporaba enzima mogla raširiti na cijeli niz organskih sinteza. U sintezi antitumorskog agenta epotilon A koristi se 2-deoksiriboza-5-fosfat-aldolaza (odnosno DERA) koja reverzibilno katalizira kondenzaciju dva aldehida. Problem je taj što navedeni enzim ima visok afinitet za

fosforilirane supstrate što je ograničavalo uporabu u organskoj sintezi. Kako bi se riješio taj problem bilo je potrebno naći način kako proširiti vrstu supstrata za taj enzim. Tim istraživača proizveo je 5 varijanti DERA enzima. Dvjema varijantama su bazični džepovi aktivnih mjesta pretvoreni u kisele džepove, a drugim trima varijantama su u veznom mjestu tri neutralna bočna ogranka promijenjena u kisele. Promjene su u svim varijantama izazvale manji afinitet za prirodni supstrat (D-2-deoksiriboza-5-fosfat), točno određena varijanta S238D DERA pokazala je sposobnost kataliziranja retroaldolne reakcije za neprirodni supstrat D-2-deoksiribozu čime nastaje D-gliceraldehid i acetaldehid (slika 11). Također je došlo do povećanja aktivnost izmjenjenog eznima te do 7000 puta veće selektivnosti za taj neprirodni supstrat. S238D varijanta također je pokazala da katalizira aldolnu reakciju 3-azidopropinaldehida i actetaldehida te tako stvara ključni međuprodukt u sintezi epotilona A.[6]




**Slika 12. (a) Reakcije koje enzim DERA katalizira s normalnim supstratom D-gliceraldehid-3-fosfatom (b) D238S varijanta enzima DERA koja katalizira rekacije s neprirodnim supstratom gliceraldehidom. (**Preuzeto iz 6)

### *2.5.2 PRIMJENA U INDUSTRIJI*

Primjena modificiranih proteina odnosno enzma u industriji vrlo je rasprostranjena. Neke od grana gdje se može naći primjera primjene takvih proteina su industrija hrane, industrija deterdženata, okolišne aplikacije, medicinska industrija te nanobiotehnologija.[2]

Kod primjene u industriji hrane, enzimi se često dodatno modificiraju kako bi mogli podnijeti uvjete modernih procesa proizvodnje hrane. Glavni faktori na koje se gleda uglavnom su vezani uz termnostabilnost, stabilnost pri određenih pH vrijednostima, specifičnost i katalitičku efektivnost.[2]

Jedan od primjera bila bi uporaba hidrolitičkih enzima u proizvodnji zaslađivača hrane poput glukoznog ili fruktoznog sirupa. Tokom proizvodnje sirupa, škrob se zagrije na 105°C 2-5 min te potom 1-2 sata na 90-100°C kako bi se preveo u tekuće stanje. Proteinskim inženjerstvom dobivena je alfa-amilaza koja ima povećanu temperaturnu stabilnost pri

temperaturama pri kojima se odvija likvefakcija. Stabilnost je uvedena mijenjajući određene aminokiseline putem djelovanja na kodirajući slijed za alfa-amilazu.[10]

U proizvodnji sira koristi se enzim kimozin. Kimozin je enzim koji omogućava zgrušavanje mlijeka te je također poznat pod imenom renin. Kimozin je prvi rekombinantni enzim koji se koristio u proizvodnji hrane.

*Aspergillus oryzae* vrsta je gljivice koja se od davnina koristi u proizvodnji tzv. *koji* plijesni koja se koristi za dobivanje fermentirane hrane poput soja umaka, namaza od soje - miso te rižina vina - sake. Iako se gljivice koje se koriste za proizvodnju smatraju sigurnima za ljude, tokom nastajanja *koji* plijesi nastane i dio toksičnih supstanci kao što su aflatoksini i mikotoksini u koje spadaju 3-β-nitropropionska kiselina, kojična kiselna (eng. *kojic acid*) te ciklopiazonska kiselina. Sojevi gljivica koji se koriste u industriji modificirani su na taj način da su im geni zaslužni za proizvodnju aflatoksina i ciklopiazonske kiseline uklonjeni. Radi se o tri gena za TAKA-amilazu, genu za alkalnu-proteazu te genu za metaloproteazu. Takav modificirani soj zatim je podvrgnut metodama klasične mutageneze nakon čega se selekcijom odabrao soj koji ima smanjenu sintezu kojične kiseline te je bio najmanje toksičan. [10]

U industriji deterdženata od enzima se često koriste razne proteaze i hidrolaze koje pomažu pri učinkovitom uklanjanju mrlja. Sastav deterdženata često se mijenja kao posljedica razvijanja uspješnijih sredstava za uklanjanje mrlja. Kako bi razni enzimi mogli biti stabilni u takvom, često alkalnom okruženju, potrebno ih je dodatno modificirati. Jedna od primjena proteinskog inženjerstva također je usmjerena ka razvijanju niskotemperaturnih enzima koji se koriste u deterdžentima kako bi se u kućanstvima manje energije trošilo za jednak učinak čistoće tkanina.[8]

Tablica 1. Prikaz široke primjene enzima u industriji (Preuzeto i prilagođeno iz 8)

| Industrija | Klasa enzima | Aplikacija |
|---|---|---|
| Pića | Pektinaza | Depektinizacija, mljevenje |
| | Amilaza | Tretiranje sokova, niskokalorično pivo |
| | β-glukanaza | Mljevenje |
| | Acetolakat dekarboksilaza | Sazrijevanje (pive) |
| | Lakaza | Bistrenje (soka), okus (piva), tretman pluta |
| Tekstil | Celulaze | Obrada trapera, omekšavanje pamuka |
| | Pektat-liaza | Izbjeljivanje |
| | Katalaza | Zaustavljanje izbjeljivanja |
| | Lakaza | Izbjeljivanje |
| | Peroksidaza | Uklanjanje suvišne boje |
| Papir | Proteaza | Uklanjanje biofilma |
| | Amilaze | Oblaganje škrobom, micanje tinte |
| | Ksilanaze | Pojačavanje izbjeljivanja |
| | Celulaze | Micanje tinte, modifikacija vlakna |
| Masti i ulja | Lipaze | Transesterifikacija |
| | Fosfolipaze | proizvodnja lizo-lekticina |
| Organska sinteza | Lipaze | Rezolucija kiralnih alkohola i amida |
| | Acilaze | Sinteza semisintetskog penicilina |
| | Nitrilaze | Sinteza enantiomerski čistih karboksilnih kiselina |
| Koža | Proteaze | Uklanjanje dlaka, omekšavanje kože |
| | Lipaze | Olakšavaju proces bojanja kože |
| Osobna njega | Amiloglukozidaze | Antibakterijski učinak |
| | Glukoza-oksidaza | Izbjeljivanje, antibakterijski učinak |
| | Peroksidaza | Antibakterijski učinak |

Tablica 1. Prikaz šrioke primjene enzima u industriji (Preuzeto i prilagođeno iz rada 8.)

| Industrija | Klasa enzima | Aplikacija |
|---|---|---|
| Deterdžent | Proteaze | Uklanjanje mrlja proteina |
| | Amilaze | Uklanjanje mrlja škroba |
| | Lipaze | Uklananje masnih mrlja |
| | Celulaze | Čišćenje |
| | Manaze | Uklanjanje mrlja |
| Škrob i gorivo | Amilaze | Hidoliza polisaharida |
| | Amiloglukozidaze | Hidoliza polisaharida |
| | Glukoza izomeraza | Konverzija glukoze u fruktozu |
| | Ciklodekstrin-glikoziltransferaza | Proizvodnja ciklodekstrina |
| | Ksilanaza | Redukcija viskoznosti |
| | Proteaza | Proteaza (gorivo) |
| Hrana | Proteaza | Zgušnjavanje mlijeka, hipoalergena hrana, okusi |
| | Lipaze | Okusi sireva |
| | Laktaze | Uklanjanje laktoze iz mlijeka |
| | Pektin-metil-esteraze | Očvršćivanje proizvoda s voćem |
| | Pektinaze | Proizvodi s voćem |
| | Transglutaminaze | Podešavanje viskozno-elastičnih svojstava |
| Pečenje | Amilaze | Mekoća kruha i volumen, modifikacije brašna |
| | Ksilanaze | Modifikacija brašna |
| | Lipaze | Stabilnost brašna i modifikacija brašna |
| | Fosfolipaze | Stabilnost brašna i modifikacija brašna |
| | Glukoza-oksidaza | Jačanje elastičnosti brašna |
| | Lipoksigenaza | Jačanje elastičnosti brašna i izbjeljivanje kruha |
| | Proteaza | Kolačići |
| | Transglutaminaze | Jačanje elastičnosti brašna |
| Stočna hrana | Fitaze | Probava fitata - otpuštanje fosfata |
| | Ksilanaza | Probavljivost |
| | β-glukanaza | Probavljivost |

## 2.6. Sasvim umjetni proteini

Struktura i funkcija proteina međusobno su povezani. Danas je napretkom računalne tehnologije moguće predvidjeti strukture umjetnih proteina – proteina koji ne postoje u prirodi, no vrlo je teško predvidjeti njihovu funkciju. Proteini koji su sasvim umjetni mogu biti rezultat spajanja dva već postojeća proteina u jedan koji je onda bifunkcionalan i kao takav ne postoji u prirodi, no to mogu biti i proteini čije strukture u prirodi nikad prije nisu viđene. Korištenje proteinskog inženjerstva u svrhu dobivanja novih materijala može se iskoristiti kao zamjena za materijale poput metala, slitina, keramike i sl., ali i u medicini kao materijal koji omogućuje zacjeljivanje rana ili način kako dostaviti lijekove do točno određene lokacije unutar tijela.[9]

Proteini nastali prirodnim evolucijskim putem sadrže različite energetski nepovoljne neidealne strukture, npr. izvijene alfa-zavojnice, ispupčene beta-lance, polarne skupine smještene u hidrofobnoj unutrašnjosti proteina, što je važno za njihovu funkciju, ali zbog toga nisu savršeno stabilni stoga se pri dizajniranju proteina danas smatra da je moguće dizajnirati savršeniji stabilniji protein. Savršeniji umjetni protein, ne mora imati aminokiselinski slijed koji se pojavljuje u prirodi stoga dizajniranje proteina kreće od kompjuterske simulacije za optimalni redoslijed aminokiselina koji će onda poprimiti željenu strukturu ili funkciju.

Danas se proteini dizajniraju prema pravilima za dizajniranje proteina koja su donešena na temelju proučavanja mnogo prirodnih proteina. Iako je primarna struktura odnosno kovalentni slijed aminokiselina koreliran s funkcijom i strukturom proteina, tercijarne i kvaterne strukture rezultat su djelovanja nekovalentnih interakcija. Kako te nekovalentne interakcije poput vodikovih veza, van der Waalsovih interakcija i hidrofobne interakcije stabiliziraju jednu sturkturu proteina, a drugu ne – nije uvijek očito. Kako bi se dobio ljevkasti energetski profil bilo je potrebno postaviti uvjet da interakcije između aminokiselinskih ogranaka, koji su blizu u primarnoj sturkturi (pridonose sekundarnoj sturkturi) i interakcije između ogranka koji nisu blizu međusobno (pridonose tercijarnoj strukturi) konstantno idu ka istoj konformaciji proteina. Kobinacijom *de novo* kalkulacija pomoću Rosetta programa i analizom proteina iz PDB (Protein data bank) donešena su pravila koja diktiraju kako povezati dva elementa sekundarne strukture i kako povezati tri elementa sekundarne strukture. Konkretno ta pravila govore o tome kako odabrati pravu duljinu sekundarnih elemenata i njihovih

poveznica kako bi se dobila željena konformacija proteina. Kasnijom eksperimentalnom karakterizacijom dobivena su vrlo dobra slaganja. Korištene metode uključuju kromatografiju isključenja kombiniranu s višekutnim raspršenjem svjetlosti cirkularnim dikromizmom i NMR spektroskopijom. Eksperimentalno dobiveni rezultati struktura konzistentni su sa rezultatima dobivenim računalnim kalkulacijama.[7]

# § 3. LITERATURNI IZVORI


1. Albert L. Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox. *Principles of biochemistry, 6th edition.* New York: W.H.Freeman and company , 2013.
2. Burcu Turanli-Yildiz, Ceren Alkim, Z. Petek Cakar. »Protein Engineering Methods and Applications.« U *Protein Engineering*, autor Pravin Kaumaya, 43-69. Rijeka: In Tech, 2012.
3. Deiters A., Groff D., Ryu Y., Xie J., Schultz PG. »A genetically encoded photocaged tyrosine.« *Angew Chem Int Ed Engl., 45*, 2006: 2728-2731.
4. Federica Agostini, Jan-Stefan Völler, Beate Koksch, Carlos G. Acevedo-Rocha, VladimirKubyshkin, Nediljko Budisa. »Xenobiology meets enzymology: Exploring the potential of unnatural building blocks in biocatalysis.« *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016.
5. Lloyd Davis, Jason W. Chin. »Designer proteins: applications of genetic code expansion in cell biology.« *Nature Reviews Molecular Cell Biology 13*, 2012: 168-182.
6. Nina M. Antikainen, Stephen F. Martin. »Altering protein specificity: techniques and applications.« *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13 (2005): 2701–2716.
7. Nobuyasu Koga, Rie Tatsumi-Koga, Gaohua Liu, Rong Xiao, Thomas B. Acton, Gaetano T. Montelione, David Baker. »Principles for designing ideal protein structures.« *Nature* 491 (November 2012): 222-228.
8. Ole Kirk, Torben Vedel Borchert, Claus Crone Fuglsang. »Industrial enzyme applications.« *Curr Opin Biotechnol*, 2002: 345-51.
9. Shuguang Zhang, Davide M Marini, Wonmuk Hwang, Steve Santoso. »Design of nanostructured biological materials through self-assembly of peptides and proteins.« *Current Opinion in Chemical Biology 2002* 6 (2002): 865–871.
10. Zofia S. Olempska-Beer, Robert I. Merker, Mary D. Ditto, Michael J. DInovi. »Food-processing enzymes from recombinant.« *Regulatory Toxicology and Pharmacology 45*, 2006: 144-158
11. https://www.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/proteins-and-amino-acids/v/introduction-to-amino-acids (datum pristupa 20. kolovoza 2017.)
12. http://cbm.msoe.edu/teachingResources/proteinStructure/secondary.html ( datum pristupa 15. rujna.2017.)
13. http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section8/ss-960531_10.html (datum pristupa 15. rujna.2017.)
14. http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=5ehh (datum pristupa 20. kolovoza.2017.)