

Molekulsko modeliranje enzima katalaze

Fišer, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:104467>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Tea Fišer

MOLEKULSKO MODELIRANJE ENZIMA
KATALAZE

Završni rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Tea Fišer

MOLEKULSKO MODELIRANJE ENZIMA
KATALAZE

Završni rad

Osijek, 2024.

Rad je ostvaren u: Medicinskom fakultetu Osijek

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Hrvoje Brkić

Rad ima 26 listova, 8 tablica i 7 slika

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Enzimi.....	1
1.1.1. Kinetika enzimskih reakcija	1
1.1.2. Inhibicija enzima.....	2
1.2. Katalaza	2
1.2.1. Struktura i mehanizam djelovanja katalaze	3
1.2.2. Inhibitori katalaze	4
1.3. Računalne metode.....	5
2. CILJ	6
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. Ustroj studije.....	7
3.2. Materijali.....	7
3.3. Metode	7
3.3.1. Priprema molekula enzima i inhibitora.....	7
3.3.2. Metoda uklapanja.....	7
3.3.3. Vizualizacija molekula.....	8
4. REZULTATI.....	9
4.1. Rezultati dobiveni LeDock softverom i vizualizirani programom VMD.....	9
5. RASPRAVA.....	18
6. ZAKLJUČAK	20
7. SAŽETAK.....	21
8. SUMMARY	22
9. LITERATURA.....	23
10. ŽIVOTOPIS	26

POPIS KRATICA

Å – angstrom (10^{-10}), mjerna jedinica za duljinu

Ala – aminokiselina alanin

Arg – aminokiselina arginin

Asn – aminokiselina asparagin

CAT – katalaza (*engl. Catalase*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (*engl. Deoxyribonucleic acid*)

His – aminokiselina histidin

Leu – aminokiselina leucin

MD – molekulska dinamika

PDB – proteinska baza podataka (*engl. Protein Data Bank*)

Phe – aminokiselina fenilalanin

Pro – aminokiselina prolin

RNA – ribonukleinska kiselina (*engl. Ribonucleic acid*)

Ser – aminokiselina serin

Thr – aminokiselina treonin

Tyr – aminokiselina tirozin

VMD – računalni program za vizualiziranje molekula (*engl. Visual Molecular Dynamics*)

UVOD

1. UVOD

1.1. Enzimi

Enzimi su biokatalizatori čija je uloga ubrzanje biokemijskih reakcija u živom organizmu. Oni su proteini, s iznimkom ribozima koji posjeduje katalitičku aktivnost. Potrebni su u niskim koncentracijama zbog svog velikog katalitičkog učinka pa se tijekom kemijskih reakcija enzimi ne troše. Enzimi su od ključne važnosti u proizvodnji zaslađivača i modificiranju antibiotika. Također se koriste u proizvodima za čišćenje, prašcima za pranje, te u testovima za ekološku, kliničku i forenzičku svrhu (1). Ovisno o reakciji koju kataliziraju, svrstavaju se u sedam skupina: oksidoreduktaze, transferase, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze i translokaze (2). Enzimi koji su zasnovani na aminokiselinama su globularni proteini. Njihova veličina varira od manje od 100 do više od 200 aminokiselinskih ostataka. Ove aminokiseline mogu biti organizirane u jedan ili više polipeptidnih lanaca koji se savijaju kako bi formirali karakterističnu trodimenzionalnu strukturu i aktivno mjesto za koje se veže supstrat (1). Aktivno mjesto je udubljenje na površini enzima koje je, u odnosu na ostatak molekule, podložnije denaturaciji. Oko ili u aktivnom mjestu se obično nalazi voda, koja pomoću vodikovih veza stabilizira kompleks između proteina i liganda (3).

1.1.1. Kinetika enzimskih reakcija

Temperatura, pH i koncentracija supstrata su parametri koji utječu na brzinu enzimskih reakcija. Povišenjem temperature brzina reakcije raste, no istovremeno visoka temperatura dovodi do gubitka aktivnosti enzima uslijed denaturacije enzimskog proteina. Većina enzima ima određen optimalan pH pri kojem postižu maksimalnu brzinu katalizirane reakcije. Iznad i ispod tog pH brzina reakcije opada (1). Povećanje koncentracije supstrata znatno povećava brzinu enzimske reakcije. Ako se koncentracija supstrata i dalje povećava, počinju opadati učinci na brzinu reakcije, sve dok ne dođe do faze u kojoj povećanje koncentracije supstrata više nema učinka. Enzim u toj točki pokazuje svoju maksimalnu brzinu (V_{\max}). Michaelis-Mentenova jednačba daje odnos između početne koncentracije supstrata $[S]$ i početne brzine reakcije v_o (4).

$$v_o = \frac{V_{\max} * [S]}{K_m + [S]}$$

UVOD

1.1.2. Inhibicija enzima

Povremeno je potrebno usporiti rad enzima kako bi osigurao pravilan rad tjelesnih sustava. Inhibitori su tvari koji usporavaju aktivnost enzimski katalizirane reakcije. Mogu izravno ili neizravno utjecati na katalitička svojstva aktivnog mjesta. Postoji reverzibilna i ireverzibilna inhibicija (5). Reverzibilni inhibitori mogu biti kompetitivni, nekompetitivni i akompetitivni (6). Kompetitivni inhibitor je spoj slične strukture s određenim supstratom s kojim se natječe za vezanje na aktivno mjesto, dok se nekompetitivni inhibitor pričvršćuje na alosteričko mjesto, odnosno bilo koje mjesto na enzimu koje nije aktivno mjesto (5). Akompetitivni inhibitor se veže za već formirani kompleks enzim-supstrat (6). Za razliku od nekompetitivne inhibicije, kompetitivna inhibicija može se u potpunosti poništiti povećanjem koncentracije supstrata na razinu znatno višu od koncentracije inhibitora. Za regulaciju sinteze mnogih aminokiselina se koristi inhibicija povrate sprege. U tom biokemijskom procesu konačni proizvod inhibira enzim koji katalizira prvi korak u nizu reakcija. Ireverzibilni inhibitor uzrokuje trajni gubitak enzimске aktivnosti. Veza inhibitor-enzim je toliko jaka da se inhibicija ne može poništiti dodavanjem viška supstrata (5).

1.2. Katalaza

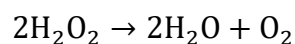
Katalaza (*engl. Catalase*, CAT; EC 1.11.1.6) je antioksidativni enzim koji metabolizira H_2O_2 i ima sposobnost reagirati s raznim drugim supstratima. Podrijetlo katalaze se može pratiti od 19. stoljeća, a kristalna struktura enzima katalaze izolirane iz bakterije *Enterococcus faecalis* utvrđena je 2004. godine. Katalaza je potrebna u obrani stanica od oksidativnog oštećenja vodikovog peroksida. H_2O_2 je toksičan zbog svojeg djelovanja u mnogim biološkim procesima. Ti procesi su apoptoza, signalizacija i proliferacija. Osim što razgrađuje vodikov peroksid na kisik i vodu, ima i peroksidativnu aktivnost, razgrađujući tako male supstrate hidroperoksid, azid i metanol. Mnogobrojne su funkcije katalaze, između ostalog to su detoksikacija i aktivacija toksičnih i antitumorskih spojeva. Također može oksidirati dušikov oksid u nitrit, a ono što doprinosi njegovom metabolizmu u jetri je oksidacija acetaldehida (7). Dokazano je kako enzim katalaza može vezati i oslobađati NADPH, što implicira na činjenicu da djeluje kao regulatorni protein u trenutku kada je stanica u stanju peroksidativnog stresa, te se brani oslobađanjem $NADP^+$ (8). Zbog niske oksidazne aktivnosti katalizira oksidaciju visoko reduktivnih supstrata, kao što je benzin, pri čemu mu pomaže molekularni kisik (9). Prisutna je u živim stanicama anaerobnih i

UVOD

aerobnih organizama gdje im je zadaća obrana od reaktivnih oksidativnih vrsta. Najviša koncentracija katalaze kod sisavaca nalazi se u jetri i u eritrocitima, dok je najniža u vezivnom tkivu. Podrijetlo utječe na različita svojstva enzima, a može biti biljno, gljivično ili bakterijsko. Obično se dobivaju iz mikroba radi brzog razmnožavanja, lakog rukovanja i sposobnosti genetske modifikacije (10,11). Neispravnost CAT ili manjak uočen je kod neurodegenerativnih bolesti, bipolarnih poremećaja, dijabetesa i slično (12).

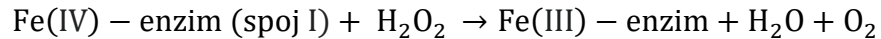
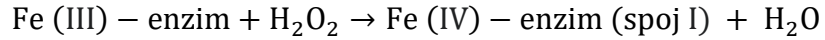
1.2.1. Struktura i mehanizam djelovanja katalaze

Razlike među katalazama su vidljive u različitim veličinama podjedinica, broju kvarternih struktura i hem prostetskim skupinama. Na temelju strukture i funkcije razvrstavaju se u četiri glavne skupine: klasični monofunkcionalni enzimi, katalaze-peroksidaze, ne-hem katalaze ili pseudokatalaze i niži red katalaza (10,13). Klasična katalaza je tetraedar građen od četiri identične podjedinice, a svaka podjedinica sadržava hem u aktivnom mjestu. Podjedinice su aminotermalna ruka, antiparalelna osmolančasta β -bačvasta domena, domena za odmotavanje i α -spiralna domena. Hem prostetička skupina odgovorna je za katalitičku aktivnost enzima. U središtu heterocikličkog organskog prstena porfirina sadrži atom željeza. Aminotermalna ruka ima ključnu ulogu u stvaranju interakcija između podjedinica, a ostaci iz ove domene omogućuju opisivanje hem džepa. β -bačvasta domena služi kako bi se formirala šupljina na distalnoj strani hem-a u prvoj polovici domene, a u drugoj polovici ima podjedinicu na koju se veže NADP(H). Uloga domene za odmotavanje je povezivanje β -bačvaste domene i α -spiralne domene. Ovaj dio polipeptidnog lanca sudjeluje u različitim interakcijama između domena i međupodjedinica. Posljednja je α -spiralna domena koja obuhvaća četiri antiparalelne spirale koje su blizu određenih spirala u β -bačvastoj domeni (14). Bifunkcionalni enzim katalaza-peroksidaza također sadržava hem i pojavljuje se u dimernom obliku. Obično se nalazi u aerobnim bakterijama gdje ima katalitičku i peroksidativnu aktivnost. Ne-hem katalaza kao što i samo ime kaže u svojoj strukturi ne sadržava hem, već mangan. U niži red katalaza svrstavaju se hem katalaze: kloroperoksidaza kao monomer, bromoperoksidaza i katalaze-fenol oksidaza kao tetramer (10). Ukupna reakcija katalaze pokazuje razgradnju dvije molekule H_2O_2 na kisik i vodu.



Katalitička reakcija se odvija dvije faze, pri čemu svaka faza ovisi o vrsti katalaze koja je uključena.

UVOD



U prvoj reakciji dolazi do oksidacije hem proteina pomoću vodikovog peroksida što rezultira stvaranjem spoja I koji se definira kao oksoferil-hem vrsta koja sadrži porfirinski kationski radikal. Druga reakcija pokazuje redukciju spoja I drugom molekulom vodikovog peroksida, gdje se regenerira enzim, voda i kisik. Ova druga reakcija pokazuje posebnu učinkovitost kod određenih katalaza, u usporedbi s hem proteinima poput mioglobina (7,14).

1.2.2. Inhibitori katalaze

Regulacija aktivnosti katalaze iznimno je važna zbog njezine uloge u deaktivaciji vodikovog peroksida koji je čimbenik oštećenja staničnih struktura. To su različite tvari prirodnog podrijetla i mnogobrojni sintetski spojevi. Inhibitori katalaze su metalni ioni, flavonoidi, natrijev azid, kalijev cijanid, 3-amino-1,2,4-triazol, hidroksilamin, 3,3'-diaminobenzidin i njegovi derivati. Njihov utjecaj može imati razne posljedice koje su vezane uz pravilan ili nepravilan rad organizma. Smanjena aktivnost katalaze pojavljuje se kod bolesti poput kolorektalnog karcinoma, adenoma želudca i Chronove bolesti. Bolesti koje su također povezane uz nepravilan rad ili nedostatak enzima katalaze su: hipertenzija, Alzheimerova bolest, dijabetes mellitus, anemija i mnoge druge. Konzumiranje proizvoda koji inhibiraju katalazu mogu pogoršati simptome bolesti, dok neke bakterije, poput *Escherichia coli* i *Helicobacter pylori*, radi obrane od imunološkog odgovora domaćina sintetiziraju katalazu (11). Flavonoidi, spojevi koji se nalaze u voću i povrću inhibiraju katalazu nekompetitivnim mehanizmom. Ova inhibicija rezultira povećanjem reaktivnim kisikovih spojeva i peroksidativnim svojstvom flavonoida (15). Uz njih proučavana je aktivnost katalaze u prisutnosti inhibitora na bazi borne kiseline (npr. dikalijev trioksohidroksitetrafluorotriborat) koji inhibiraju aktivnost katalaze nekompetitivnim mehanizmom. U prisutnosti inhibitora katalaza najpovoljnije djeluje pri pH vrijednosti 6,2, a kada inhibitori nisu prisutni djeluju pri pH vrijednosti 7,1. Prisutnost inhibitora utječe na katalazu mijenjajući stanje ionizacije aminokiselina u aktivnim mjestima enzima (16).

1.3. Računalne metode

Računalne metode za istraživanje enzima koriste se od sredine 20. stoljeća. Zahvaljujući raspoloživosti i razvoju računala bilježe sve veći razvoj. Molekulsko modeliranje sadrži metode kojima se oponaša i proučava ponašanje molekula i molekulskih sustava osiguravajući informacije o dinamičkim svojstvima enzima, utjecaju supstrata na ta svojstva, o vezanju liganda, vodikovim vezama unutar enzima, brzini reakcije, fizikalno-kemijskim svojstvima proteina. Primjenjuju se metode modeliranja različitog stupnja složenosti: semiempirijske, empirijske, kvantno mehaničke i kombinirane kvantno mehaničke-molekulsko mehaničke kako bi se kvalitetnije razumjelo djelovanje enzima. Metode polja sila, poznatiji kao empirijske metode primjenjuju se za sustave s velikim brojem atoma, dok se kvantno mehaničkim pristupom analizira raspodjelu elektrona. Kombinirane kvantno mehaničke-molekulsko metode se koriste za proučavanje reakcija u enzimima. Prednost semiempirijskog računa u odnosu na kvantno mehanički je brzina, što je idealno za preliminarne proračune, radi uštede energije i vremena. Nova metoda PM6 pogodna je za proučavanje željeza.

Za predviđanje preferirane orijentacije jedne molekule prema drugoj koristi se metoda uklapanja. Metoda uklapanja primjenjuje se u predviđanju vezanja proteinskih inhibitora i supstrata. Pri računanju se koristi pretpostavka da je slobodna energija vezanja određena kao pribrojena funkcija različitih komponenti koje doprinose jačini vezanja molekula. Softver koji omogućuje vizualizaciju i analizu molekula je VMD (*engl. Visual Molecular Dynamics*), pomoću kojeg su napravljene sve slike u radu (17).

Svjetska arhiva strukturnih podataka za biološke makromolekule je Proteinska baza podataka (*engl. Protein Data Bank, PDB*), koja se koristi za unaprijeđivanje istraživanja i usavršavanje. Sadrži 3D atomske koordinate velikog broja strukturnih proteina, RNA, DNA i njihovih kompleksa. Glavni je izvor informacija kako bi se razumjele funkcionalne uloge makromolekula u medicini i biologiji. Svaka PDB struktura obuhvaća atomske koordinate, položaje atoma koji su prikazani kao Kartezijeve koordinate (x, y, z) koristeći angstrom kao mjernu jedinicu za duljinu i desni koordinatni sustav (18).

CILJ

2. CILJ

Ciljevi istraživanja su:

- metodama molekuskog modeliranja ispitati inhibiciju enzima katalaze
- ispitati energijski najpovoljnije položaje inhibitora u enzimu
- ispitati vezanje različitih liganada s katalazom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je napravljeno kao *in silico* studija, računalni model enzima i inhibitora (17, 19).

3.2. Materijali

Podaci o enzimu katalaza preuzeti su iz Proteinske baze podataka (*engl. Protein Data Bank*, PDB; <https://www.rcsb.org/>), struktura enzima dostupna je u bazi pod kodom 1SI8 i napravljena je u rezoluciji 2,30 Å. Strukture inhibitora 4-[3-(Dimetilamino)-2-hidroksipropil]-1,7-dietil-8,9-difenil-4-azatriciklo[5.2.1.02,6]dec-8-ene-3,5,10-trion (72945037) (Inhibitor II), 4-[2-hidroksi-3-(propan-2- γ -amino)propil]-1,7-dimetil-8,9-difenil-4-azatriciklo[5.2.1.02,6]dec-8-ene-3,5,10-trion (101881450) (Inhibitor III), 4-[3-(Dimetilamino)-2-hidroksipropil]-1,7-dimetil-8,9-difenil-4-azatriciklo[5.2.1.02,6]dec-8-ene-3,5,10-trion (101881451) (Inhibitor IV) preuzete su iz PubChem baze. Struktura inhibitora (4-[2-hidroksi-3-(propan-2- γ -amino)propil]-1,7-dietil-8,9-difenil-4-azatriciklo[5.2.1.02,6]dec-8-ene-3,5,10-trion) (Inhibitor I) je napravljena u Avogadro programu (20). Svi podaci o enzimu i inhibitoru su javno dostupni u navedenim bazama. Za predikciju energijski najpovoljnijeg položaja korišten je softverski paket LeDock (21). Strukture su vizualizirane korištenjem softvera VMD (*engl. Visual Molecular Dynamics*) (22).

3.3. Metode

3.3.1. Priprema molekula enzima i inhibitora

Trodimenzionalna struktura katalaze preuzeta je iz baze podataka PDB (PDB_id 1SI8). Iz PubChem preuzete su strukture inhibitora II, inhibitora III, inhibitora IV i u Avogadro programu napravljena je struktura inhibitora I.

3.3.2. Metoda uklapanja

Prvi korak u uklapanju (*engl. docking*) je priprema strukture enzima katalaze koja je preuzeta iz PDB baze u pdb formatu. Sljedeći korak je priprema inhibitora koji su preuzeti iz baze PubChem, budući da inhibitor I nije imao strukturu u tom program, nacrtan je korištenjem Avogadro programa. Oni su prebačeni u format mol2 koji je kompatibilan s LeDockom, a to se

MATERIJALI I METODE

radilo pomoću programa Open Babel. Važno je naglasiti da se fokusiralo samo na lanac A, te su uklonjene kristalizirane vode i ligandi. Zatim se definiralo aktivno mjesto na enzimu gdje će se dokiranje odvijati. Sve navedeno je potrebno kako bi se napravilo uklapanje. Za uklapanje se koristio softverski paket LeDock. Za inhibitor I i inhibitor II se dobilo 9 energijskih položaja, za inhibitor III 8, dok za inhibitor IV 7 energijskih položaja. Najpovoljniji su oni koji su imali najnižu energiju.

3.3.3. Vizualizacija molekula

VMD (inačica 1.9.3. University of Illinois at Urbana-Champaign) je računalni program za modeliranje i vizualizaciju molekula. Istovremeno može prikazati bilo koji broj struktura jer koristi široku paletu stilova prikazivanja i metoda bojanja (22).

REZULTATI

4. REZULTATI

Za predviđanje najpovoljnijeg položaja za vezanje inhibitora na enzim katalazu koristila se metoda uklapanja. Korišten je javno dostupni softver LeDock. Najniža ostvarena energija odgovara najpovoljnijem položaju vezanja.

4.1. Rezultati dobiveni LeDock softverom i vizualizirani programom VMD

U tablici 1. prikazane su energije za tri energijski najpovoljnija klastera inhibitora I koja su predviđena softverom LeDock.

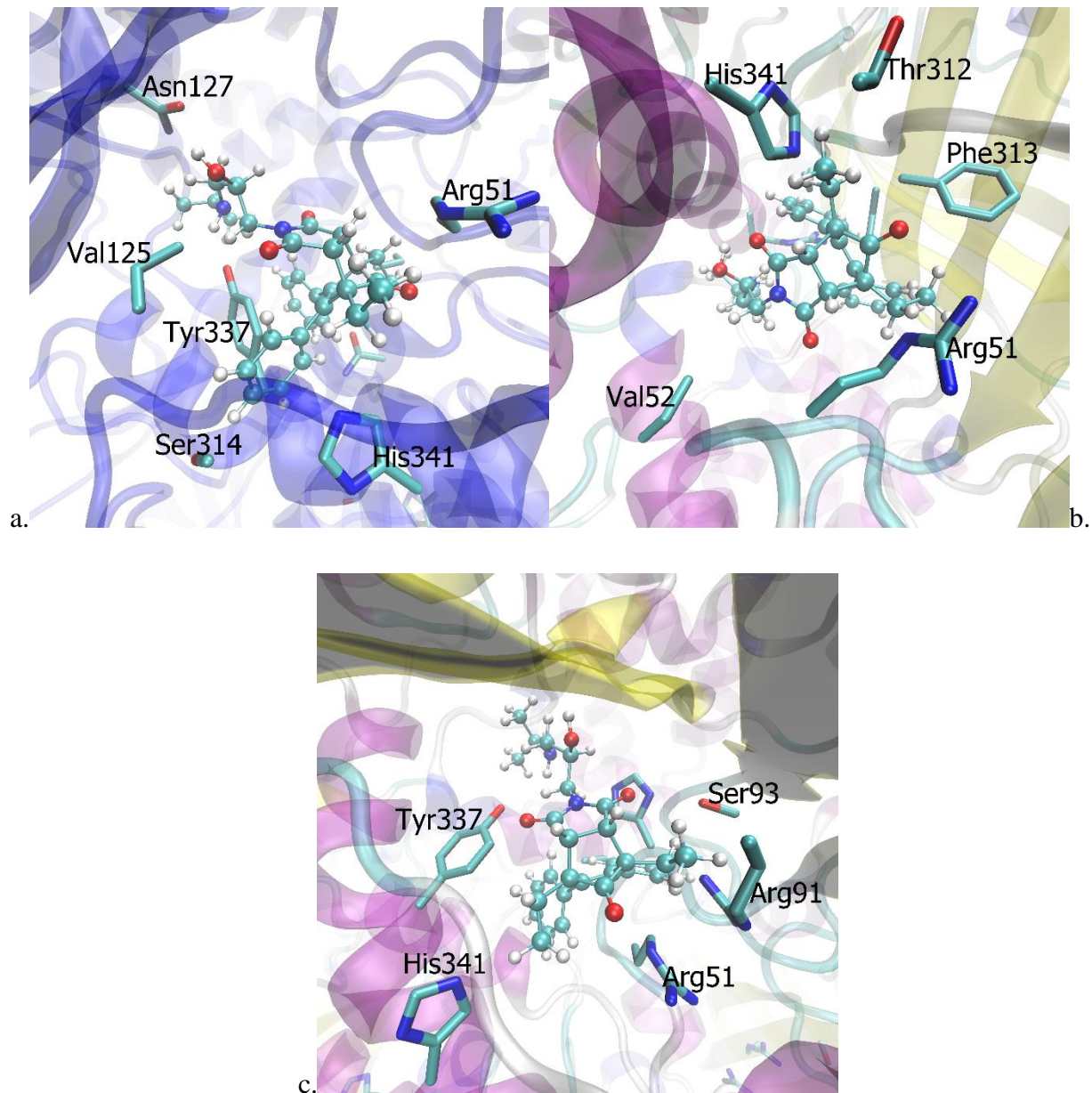
Tablica 1. Prikaz rezultata energije za inhibitor I

Klaster	Energije (kcal/mol)
0	-2,66
1	-1,77
2	-1,30

Tablica 2. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	Klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	Ser314:OG	1,95	Val125:CG	1,88	His54:NE2	2,90
2	His341:NE2	2,90	Phe313:CB	2,91	Arg51:CD	2,66
3	Tyr337:CB	0,99	Pro315:CD	1,37	His53:CB	2,53
4	Arg51:CB	2,04	Arg333:NH2	2,55	Val53:CG2	1,98
5	Val52:CG1	2,46	Val52:CG1	3,00	Tyr337:CD2	2,72
6	Val125:CG1	2,12	Arg51:NE	1,36	His341:NE2	2,25
7	Asn44:OD1	2,84	His341:CD2	1,81	Arg91:CG	1,42
8	Asn127:OD1	2,81	Thr312:CB	2,61	Ser91:NH1	2,60

REZULTATI



Slika 4. Koordinacija inhibitora I za klaster 0 (a), klaster 1 (b), klaster 2 (c). Okosnica proteina prikazana je u transparentnoj New Cartoon reprezentaciji, bočni lanci aminokiselinskih ostataka u štapićastoj reprezentaciji, a inhibitor u CPK reprezentaciji. Sliku izradila autorica.

Svi klasteri imaju 8 interakcija manjih od 3 Å. Najniža energija vezanja pronađena za vezno mjesto u blizini aminokiselinskih ostataka za klaster 0 je Tyr337, za klaster 1 Arg51, a za klaster 2

REZULTATI

Arg91. Ostala vezna mjesta za klaster 0 su: Ser314, His341, Asn44, Asn127, Val125, Val52, Arg51. Za klaster 1 vezna mjesta su: Val125, Phe313, Pro315, Arg333, Val52, His341 i Thr312, a za klaster 2 Ser93, His341, His53, His54, Tyr337, Val53, Arg51.

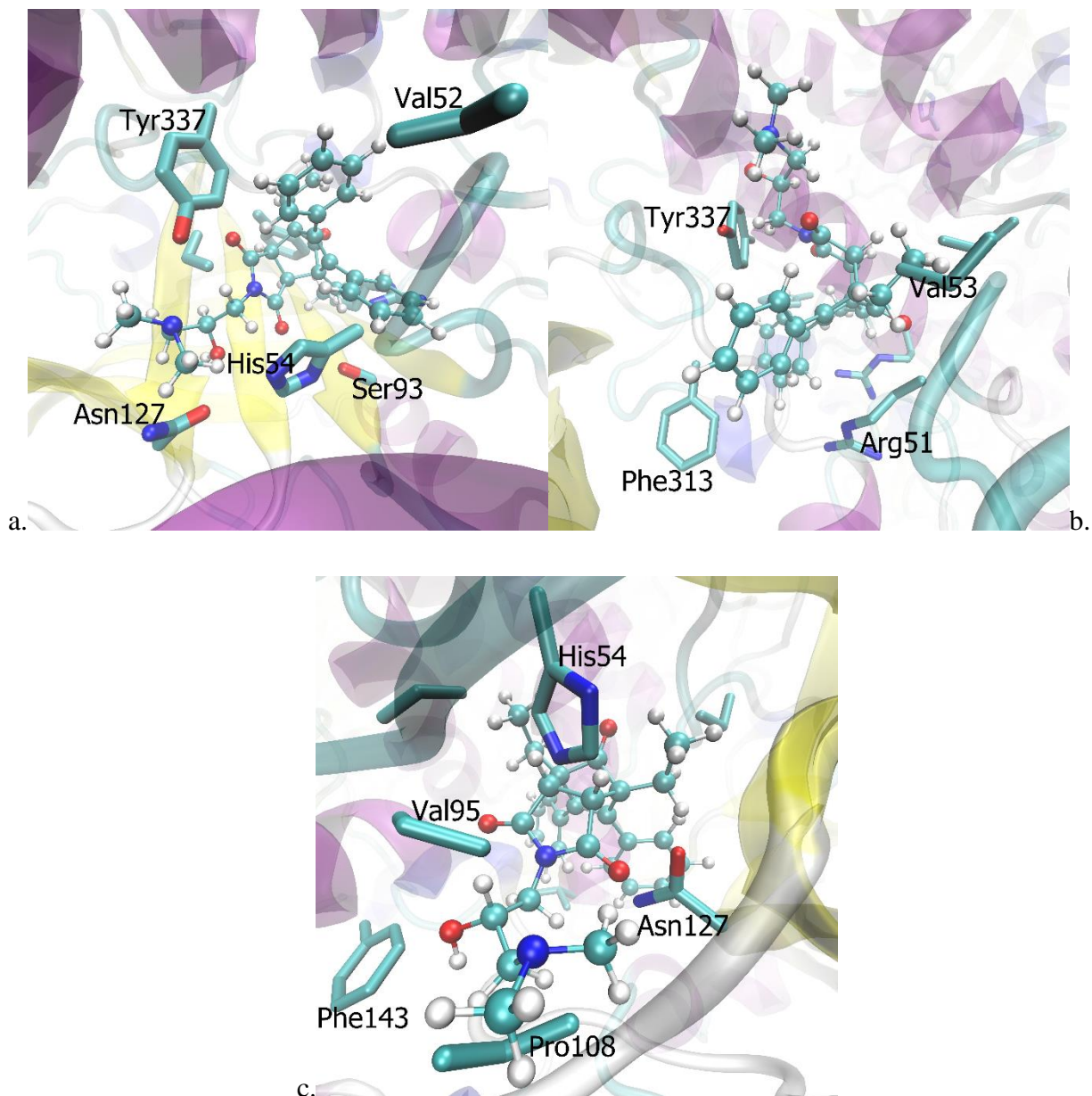
Tablica 3. Prikaz rezultata energije za inhibitor II

Klaster	Energije (kcal/mol)
0	-1,18
1	-0,95
2	-0,90

Tablica 4. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	Klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	His54:NE2	2,05	Val53:CB	0,86	Phe143:CE1	2,94
2	Asn127:CG	2,98	Arg51:NE	2,45	Val95:CG1	2,52
3	Ser93:OG	2,85	Val52:CG1	2,12	His54:CD2	1,59
4	Tyr337:CD2	2,33	Tyr337:CG	1,33	Asn127:CG	2,61
5	Val125:CG1	2,69	His341:CD2	2,99	Pro108:CG	2,23
6	Phe313:CB	2,65	Phe313:CB	2,75	Val125:CG1	2,84
7	Arg91:CD	2,18	Arg344:NE	2,80	Leu329:CD2	2,38
8	Val52:CG1	2,66	Ala336:CB	1,94		

REZULTATI



Slika 5. Koordinacija inhibitora II za klaster 0 (a), klaster 1 (b), klaster 2 (c). Okosnica proteina prikazana je u transparentnoj New Cartoon reprezentaciji, bočni lanci aminokiselnih ostataka u štapičastoj reprezentaciji, a inhibitor u CPK reprezentaciji. Sliku izradila autorica.

Klasteri 0 i 1 ostvarili su 8 interakcija manjih od 3 Å. Najniža energija vezanja pronađena je za vezno mjesto u blizini aminokiselnih ostataka His54 za klaster 0 i 2, a za klaster 1 to je Val53. Ostala vezna mjesta za klaster 0 su Asn127, Ser93, Tyr337, Val125, Phe313, Arg91, Val52.

REZULTATI

Za klaster 1 su Arg51, Val52, Try337, His341, Phe313, Arg344, Ala336, a za klaster 2 Val95, Asn127, Pro108, Val125, Leu329 i Phe143.

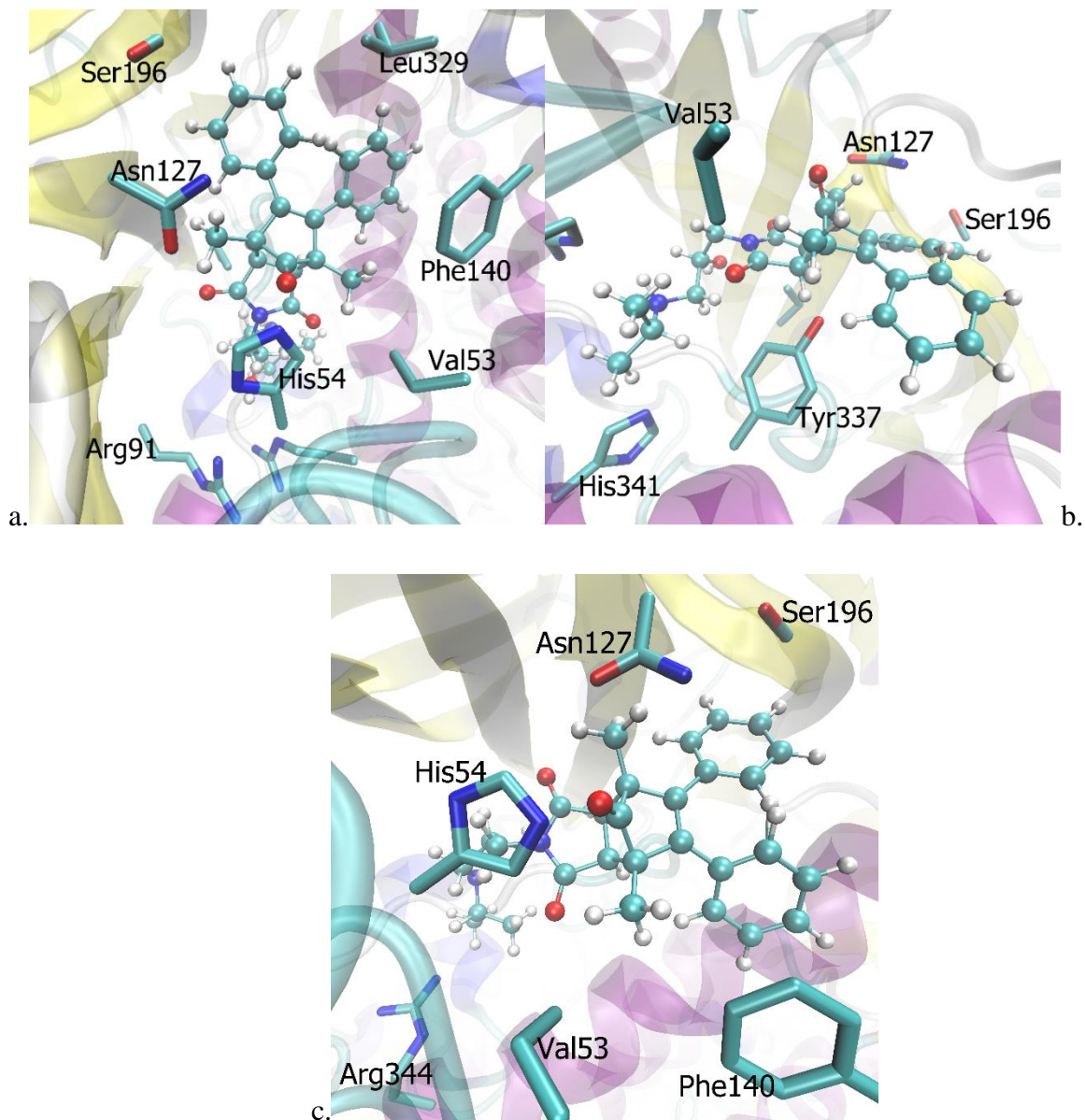
Tablica 5. Prikaz rezultata energije za inhibitor III

Klaster	Energije (kcal/mol)
0	-4,68
1	-4,30
2	-4,01

Tablica 6. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	Klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	Arg51:NE	2,92	Leu329:CD2	2,36	Asn127:CB	2,81
2	Val53:CG2	2,49	Ser196:CB	2,22	Ser196:CB	2,32
3	His54:CB	2,40	Val53:CG2	2,20	Leu329:CD2	2,35
4	Asn127:CG	1,52	Asn127:CG	1,78	Phe140:CZ	2,72
5	Arg91:NH1	2,73	Arg51:CB	2,80	Val53:CG2	2,60
6	Ser196:CB	2,87	Val125:CG1	2,61	Arg344:NH2	2,26
7	Phe140:CZ	2,51	Tyr337:CE2	2,70	His54:CB	2,95
8	Leu329:CG	2,57	His341:CD2	2,56	Val125:CG	2,67

REZULTATI



Slika 6. Koordinacija inhibitora III za klaster 0 (a), klaster 1 (b), klaster 2 (c). Okosnica proteina prikazana je u transparentnoj New Cartoon reprezentaciji, bočni lanci aminokiselinskih ostataka u štapićastoj reprezentaciji, a inhibitor u CPK reprezentaciji. Sliku izradila autorica.

Sva tri klastera su ostvarila 8 interakcija manjih od 3 Å. Najniža energija vezanja pronađena je za vezno mjesto u blizini aminokiselinskog ostatka Asn127 za klaster 0 i 1, dok je za klaster 2 Arg344. Ostali aminokiselinski ostatci za klaster 0 su: Arg51, Val53, His54, Arg91, Val125,

REZULTATI

Ser196, Leu329, Phe140. Za klaster 1 su: His341, Tyr337, Val125, Arg51, Val53, Ser196, Leu329, a za klaster 3 Val125, Asn127, Leu329, Ser196, Val53, His54, Phe140.

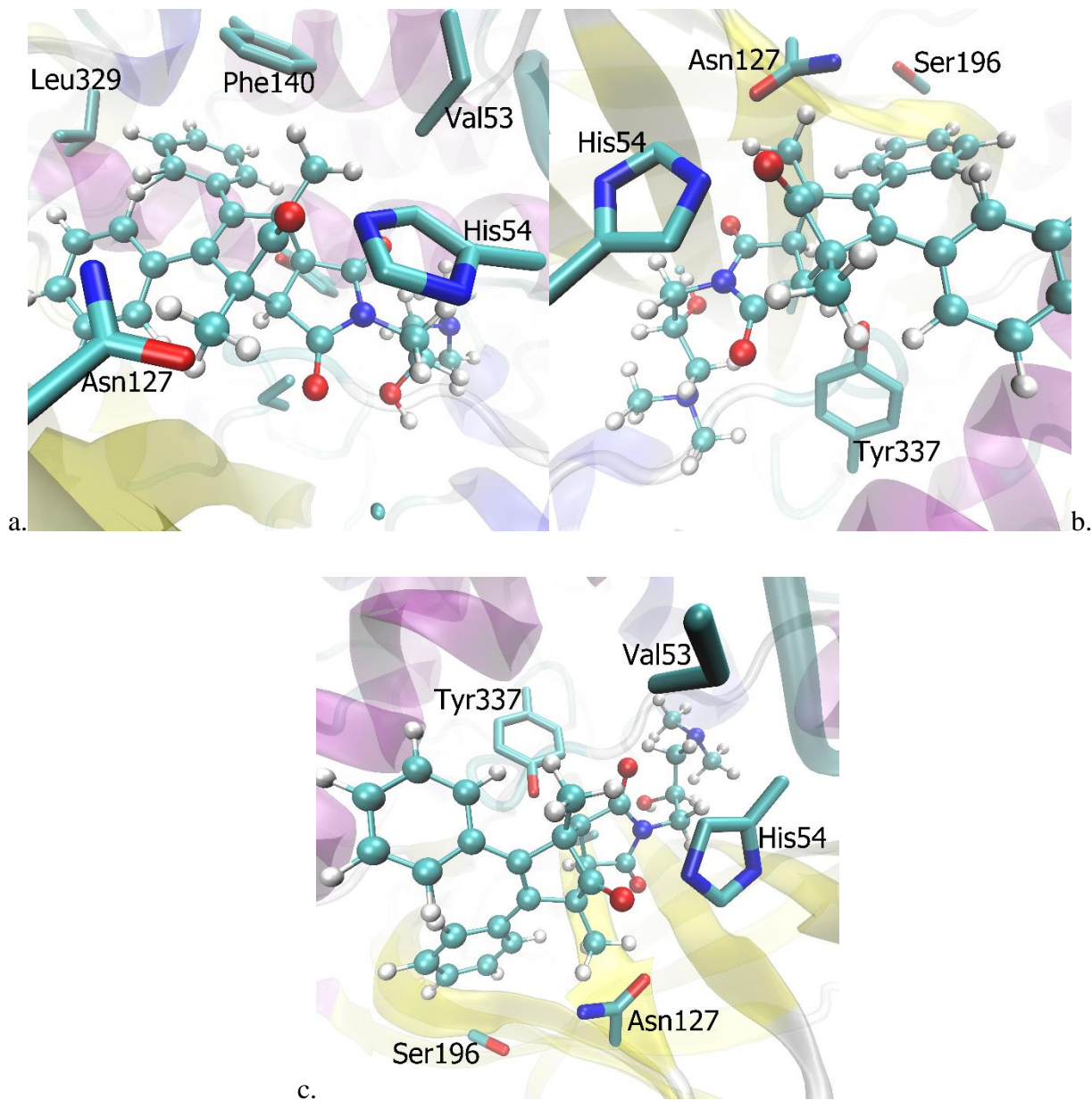
Tablica 7. Prikaz rezultata energije za inhibitor IV

Klaster	Energije (kcal/mol)
0	-4,03
1	-3,56
2	-3,53

Tablica 8. Aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u vezanju klastera 0, 1 i 2 i pripadajuće duljine veza

	Klaster 0		Klaster 1		Klaster 2	
	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
1	His54:CB	2,33	Asn127:CB	2,87	Ser196:CB	2,90
2	Ala112:CB	2,60	Val125:CG1	2,68	Asn127:CG	2,20
3	Asn127:CG	1,40	Leu329:CD2	2,87	Val125:CG1	2,79
4	Val125:CG1	2,70	Asn127:CG	2,44	Val53:CG2	2,59
5	Val53:CG2	2,59	Tyr337:CE2	2,85	Leu329:CG	2,55
6	Leu329:CD2	2,35	His54:CB	2,50	His54:CB	2,54
7	Ser196:CB	2,35	Ser196:CB	2,95	Tyr337:CE2	2,95
8	Phe140:CZ	2,73			Leu329:CD2	2,25

REZULTATI



Slika 7. Koordinacija inhibitora IV za klaster 0 (a), klaster 1 (b), klaster 2 (c). Okosnica proteina prikazana je u transparentnoj New Cartoon reprezentaciji, bočni lanci aminokiselinskih ostataka u štapićastoj reprezentaciji, a inhibitor u CPK reprezentaciji. Sliku izradila autorica.

Klaster 0 i 2 imaju 8 interakcija koji su kraći od 3 Å, dok klaster 2 ima 7 interakcija. Najniža energija vezanja pronađena je za vezno mjesto u blizini aminokiselinskog ostatka Asn127 za sva tri klastera, a ostala vezna mjesta su His54, Val125, Ser196, Leu329, Try337.

REZULTATI

Računalnim metodama LeDock prikazano je da najnižu energiju vezanja ima inhibitor III, čija je energija -4,86 kcal/mol.

5. RASPRAVA

Predmet istraživanja završnog rada bila je inhibicija enzima katalaze izolirane iz bakterije *Enterococcus faecalis*. Radi softverskih zahtjeva fokusiralo se samo na lanac A, te su izbačene sve kristalizirane vode i svi ligandi koji se nalaze u PDB zapisu. Nakon toga pristupljeno je uklapanju. Korišten je softverski paket LeDock koji ima široku primjenu u predviđanju najpovoljnijeg položaja jedne molekule prema drugoj. Najpovoljniji položaj je onaj koji ima najnižu energiju. Jedan lanac pri računalnom uklapanju korišten je iz razloga jer količina radne memorije potrebne za uklapanje cijelog enzima višestruko nadmašuje resurse komercijalno dostupnih računala, te se u protivnom postupak ne može izvršiti. Izbacivanje kristaliziranih voda i dodataka u kristalnoj strukturi enzima uobičajeni je postupak pripreme enzima za uklapanje.

Katalaza je ključan enzim u ljudskom tijelu koji uklanja reaktivne kisikove spojeve, stoga je važno ispitati nove i potencijalno ljekovite tvari na njegovo funkcioniranje. Derivati aminoalkana, čija je inhibicija proučavana, pokazuju potencijalna antikancerogena svojstva i djeluju kao inhibitori raznih drugih enzima. Spojevi s antikancerogenim svojstvima izazivaju veliko zanimanje u medicini jer njihova prisutnost utječe na aktivnost enzima koji štite od raka (11).

Najbolji inhibitor enzima katalaze izolirane iz bakterije *Enterococcus faecalis* je inhibitor III, jer ima najnižu energiju vezanja, što potvrđuje i istraživanje koje su proveli Grodner i suradnici na humanoj katalazi (11). To istraživanje je pokazalo kako su derivati aminoalkana kompetitivni inhibitori enzima, te ovise o supstituentu koji se nalazi u glavnoj strukturi. Rezultati ukazuju da su derivati aminoalkana vrlo slabi inhibitori, odnosno imaju slab utjecaj na aktivnost i djelovanje katalaze.

Aminokiselinski ostatci koji prema predviđenom modelu uklapanja imaju važnu ulogu u stabilizaciji inhibitora, za sva četiri testirana inhibitora u ovom radu, su aminokiseline His54, Val53, Tyr337 i Asn127. Za aminokiselinske ostatke His54 i Val53, koji se nalaze na petlji između alfa uzvojnice i beta nabrane ploče, pokazano je da sudjeluju u vezanju hem-a (23). Za Asn127, koji je smješten na završetku beta nabrane ploče, dokazano je identično, kao i za aminokiselinski ostatak Tyr337 koji je smješten na alfa uzvojnici. Sve ove aminokiseline zajedno osiguravaju pravilnu funkciju i stabilnost katalaze, te njihove točkaste mutacije mogu narušiti funkcionalnost

RASPRAVA

katalaze i smanjiti njenu sposobnost zaštite od oksidativnog stresa (24). Ovaj model uklapanja daje veliku važnost navedenim aminokiselinskim ostacima i vrijedilo bi provesti daljnja istraživanja kako bi se provjerio njihov potencijal vezanja za inhibitore. Točkastim mutacijama navedenih aminokiselinskih ostataka može se testirati smanjivanje inhibicijske aktivnosti enzima. Istraživanja bi se mogla provesti računalnim modelima provođenjem molekulske mehanike i dinamike, te na taj način ispitati potencijal za stvaranje vodikovih veza i drugih neveznih interakcija, ali i eksperimentalno. Osim toga navedenim metodama mogli bi se provjeriti i aminokiselinski ostatci koji su navedeni u radu Grodnera i suradnika. U navedenom radu analiza je rađena na humanoj katalazi, dok je u ovom istraživanju korištena bakterijska.

Također ovo istraživanje je pokazalo da su najpovoljniji aminokiselinski ostatci za vezanje inhibitora I Tyr337, Arg51 i Arg91, za inhibitor II to su His54 i Val53. Inhibitor III ima najbliže interakcije s aminokiselinskim ostacima Asn127 i Arg344, dok je za inhibitor IV to ostvareno sa aminokiselinskim ostatakom Asn127.

Istraživanje inhibicije katalaze izolirane iz *E. faecalis* važno je za medicinu i farmaciju zbog potencijalnog doprinosa u razvoju novih terapija za bolesti povezane s oksidativnim stresom i infekcija uzrokovanim *E. faecalis*. To je moguće budući da sekvence humane katalaze i katalaze izolirane iz bakterije *E. faecalis* identificiraju iste aminokiselinske ostatke koji su važni u stabilizaciji hem-a. Radi boljeg razumijevanja inhibicije ovoga enzima, vrijedilo bi provesti daljnja istraživanja, kao što su sinteza novih derivata s boljim inhibicijskim svojstvima ili ispitivanje njihove učinkovitosti *in vivo*.

ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- najbolji inhibitor enzima katalaze je inhibitor III (4-[2-hidroksi-3-(propan-2- γ -amino)propil]-1,7-dimetil-8,9-difenil-4-azatriciklo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5,10-trion) jer koji ima najnižu energiju vezanja.
- aminokiselinski ostatci His54, Tyr337, Val53 i Asn127 ostvaruju veze u sva 4 modela inhibitora.
- za svaki od navedenih inhibitora identificirani su ključnim aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u njegovom vezanju i izračunata je energija vezanja za svaki inhibitor.

SAŽETAK

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ciljevi istraživanja su metodama molekuskog modeliranja ispitati inhibiciju enzima katalaze, ispitati energijski najpovoljnije položaje inhibitora u enzimu te ispitati vezanje različitih liganada s katalazom.

Nacrt studije: Istraživanje je napravljeno kao *in silico* studija - pronalaženje znanstvenih dostignuća i smanjila skupa klinička i laboratorijska istraživanja.

Materijali i metode: Podaci o enzimu katalaze preuzeti su iz baze PDB, a strukture inhibitorima preuzeti su iz PubChem baze, osim jednog inhibitora koji je napravljen u Avogadro programu. Za predikciju energetski najpovoljnijeg položaja korišten je softverski program LeDock. Strukture su vizualizirane pomoću softvera VMD.

Rezultati: Najnižu energiju vezanja ima inhibitor III. Aminokiselinski ostatci koji su isti u veznim mjestima sva četiri inhibitora su His54, Val53, Tyr337 i Asn127.

Zaključak: derivati aminoalkana vrlo slabi inhibitori katalaze, najpovoljniji položaj inhibitora I je u mjestu Try337, Arg51 i Arg91, inhibitora II je u mjestu His54 i Val53, inhibitora III je u mjestu Arg344 i Asn127, a najpovoljniji položaj inhibitor IV je u mjestu Asn127.

Ključne riječi: enzim, inhibicija, MD simulacija, molekulsko uklapanje, VDM vizualizacija

SUMMARY

8. SUMMARY

Molecular modeling of the enzyme catalase

Objectives: The objectives of the research are to use molecular modeling methods to examine the inhibition of the catalase enzyme, to examine the most energetically favorable position of the inhibitor in the enzyme, and to examine the binding of different ligands to catalase.

Study Design: The research was done as an in silico study - finding scientific achievements and reducing the set of clinical and laboratory research.

Materials and methods: Data on the catalase enzyme were taken from the PDB database, and inhibitor structures were taken from the PubChem database, except for one inhibitor that was created in the Avogadro program. The software program LeDock is used to predict the most energetically favorable position. Structures were visualized using VMD software.

Results: Inhibitor III has the lowest binding energy. The amino acid residues that are the same in the binding sites of all four inhibitors are His54, Val53, Tyr337, and Asn127.

Conclusion: aminoalkane derivatives are very weak inhibitors of catalase, the most favorable position of inhibitor I is in Try337, Arg51, and Arg91, inhibitor II is in position His54 and Val53, inhibitor III is in position Arg344 and Asn127, and the most favorable position of inhibitor IV is in position Asn127.

Keywords: catalase, enzyme, inhibition, MD simulation, molecular docking, VMD visualization

9. LITERATURA

1. Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* 2015;59:1-41. doi: 10.1042/bse0590001. Erratum in: *Essays Biochem.* 2015;59:75. PMID: 26504249; PMCID: PMC4692135.
2. Singh SP, Ashok P, Reeta RS, Larroche C, Li Z. Biomass, biofuels, biochemicals: advances in enzyme catalysis and technologies. Amsterdam: Elsevier; 2020.
3. Selvaraj C, Rudhra O, Alothaim AS, Alkhanani M, Singh SK. Chapter Three- Structure and chemistry of enzymatic active sites that play a role in the switch and conformation mechanism. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology.* 2022;130;59-83. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2022.02.002>.
4. Yun KI, Han TS. Relationship between enzyme concentration and Michaelis constant in enzyme assays. *Biochimie.* 2020;176;12-20. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.06.002>
5. Soult A. Enzyme Inhibition. LibreTexts Chemistry. 2021;8.7.
6. Kennelly PJ, Rodwell VW. Enzimi: kinetika. U: Lovrić J, Sertić J, ur. Harperova ilustrirana biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 62-75.
7. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem.* 2017; 26;398(10):1095-1108. doi: 10.1515/hsz-2017-0131. PMID: 28384098.
8. Kirkman HN, Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(14):4343-7. doi: 10.1073/pnas.81.14.4343. PMID: 6589599; PMCID: PMC345585.
9. Gebicka L, Krych-Madej J. The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *J Inorg Biochem.* 2019;197:110699. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110699. Epub 2019 Apr 26. PMID: 31055214.
10. Peran J, Pušić T, Soljačić I. Značenje katalaza u procesima oplemenjivanja tekstila. *Tekstil* 65. 2016;11-12;410-416.
11. Grodner B, Napiorkowska M, Maciej Pisklak D. Catalase Inhibition by Aminoalkanol Derivatives with Potential Anti-Cancer Activity—In Vitro and In Silico Studies Using Capillary Electrophoresis Method. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(13);7123.

LITERATURA

12. Nandi A, Liang-Jun Yan, Kumar Jana C, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cellular Longev.* 2019; 2019; 9613090. doi: 10.1155/2019/9613090. PMID: 31827713; PMCID: PMC6885225.
13. Galasso M, Gambino S, Romanelli MG, Donadelli M, Scupoli MT. Browsing the oldest antioxidant enzyme: catalase and its multiple regulation in cancer. *Free Radical Biology and Medicine.* 2021;172;264-272.
14. Yuzugullu Karakus Y. Typical Catalases: Function and Structure [Internet]. *Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease.* IntechOpen; 2020. doi: <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90048>.
15. Debashis M, Asmita D, Chabita S. Catalase inhibition an anti cancer property of flavonoids: A kinetic and structural evaluation. *Int J Biol Macromol.* 2017;104(Pt A):929-935. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.100 PMID: 28663152.
16. Islamovic S, Galic B, Milos M. A study of the inhibition of catalase by dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate $K_2[B_3O_3F_4OH]$. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 2014;29(5);744–748. doi: <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.848203>.
17. Brkić H. Proučavanje o željezu ovisnih dioksigenaza računalnim metodama. Doktorska disertacija. Prirodoslovni matematički Fakultet, Fizički odsjek, Zagreb. 2014.
18. wwPDB consortium. Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic Acids Research.* 2019;47(D1);D520-D528. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gky949>.
19. Thurakkal L, Singh S, Roy R, Kar P, Sadhukhan S, Porel M. An in-silico study on selected organosulfur compounds as potential drugs for SARS-CoV-2 infection via binding multiple drug targets. *Chem Phys Lett [Internet].* 2021;763:138193.
20. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization and Analysis Platform. *Journal of Cheminformatics* 2012;4:17.
21. Ni Liu and Zhibin Xu 2019 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.218 012143.
22. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics.* 1996;14;33-38.

LITERATURA

23. Frankenberg L, Brugna M, Hederstedt L. Enterococcus faecalis heme-dependent catalase. J Bacteriol. 2002;184(22):6351-6. doi: 10.1128/JB.184.22.6351-6356.2002. PMID: 12399505
24. Mashhadi Z, Boeglin WE, Brach AR. Inhibitory effects of a novel Val to THR mutation on the distal heme of human catalase. Biochimie. 2014;2016;180-183.

ŽIVOTOPIS

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Tea Fišer

Datum i mjesto rođenja:

2. travnja 2002, Vinkovci

Adresa:

Mirkova ulica 106, Mirkovci, Vinkovci

Broj mobitela:

098/539/200

Obrazovanje:

2017. - 2021. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2021. - 2024. Sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu u Osijeku