

# Molekulsko modeliranje enzima lipaze B i njegovih liganada

---

**Diklić, Bruno**

**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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:521492>

*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**

**Bruno Diklić**

**MOLEKULSKO MODELIRANJE**  
**ENZIMA LIPAZE B I NJEGOVIH**  
**LIGANADA**

**Završni rad**

**Osijek, 2024.**

Rad je ostvaren u: Medicinskom fakultetu Osijek

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

Rad ima 23 lista, 4 tablice i 4 slike.

## Sadržaj

1.UVOD .....	1
1.1.Enzimi.....	1
1.1.2. Kinetika enzimskih reakcija.....	1
1.1.3. Inhibicija enzima.....	1
1.2. Lipaza B.....	1
1.2.1. Inhibitori lipaze .....	2
1.3. Računalne metode.....	3
1.4. Vizualizacija proteina .....	4
2.CILJ .....	5
3.MATERIJALI I METODE .....	6
3.1.Ustroj studije.....	6
3.2.Materijali .....	6
3.3.Metode .....	6
3.3.1. Priprema molekula enzima i inhibitora.....	6
3.3.2. Metoda uklapanja.....	6
3.3.3. Vizualizacija molekula.....	7
3.4. Statističke metode.....	7
4.REZULTATI.....	8
4.1. Rezultati uklapanja .....	8
5. RASPRAVA.....	15
6. ZAKLJUČAK .....	17
7. SAŽETAK.....	18
8. SUMMARY .....	19
9. LITERATURA.....	20

10. ŽIVOTOPIS .....	23
---------------------	----

## POPIS KRATICA

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

Arg – aminokiselina arginin (također oznaka R)

Asp – aminokiselina aspartat (također oznaka D)

Asn – aminokiselina asparagin (također oznaka N)

CALB – lipaza B od *Candida antartica* (*engl. lipase B from Candida antartica*)

Gly – aminokiselina glicin (također oznaka G)

Ile – aminokiselina izoleucin (također oznaka I)

Leu – aminokiselina leucin (također oznaka L)

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

Phe – aminokiselina fenilalanin (također oznaka F)

Pro – aminokiselina prolin (također oznaka P)

Ser – aminokiselina serin (također oznaka S)

Thr – aminokiselina treonin (također oznaka T)

Val – aminokiselina valin (također oznaka V)

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

## UVOD

### 1.UVOD

#### 1.1.Enzimi

Enzimi su proteini koji znatno ubrzavaju kemijske reakcije u živim organizmima te djeluju po principu sniženja energije aktivacije pri spajanju sa supstratom. Uloga enzima u živim bićima važna je jer bi brojni metabolički procesi bili onemogućeni bez njih. Stvaranje kompleksa enzim-supstrat ključan je proces pri katalizi, a događa se vezanjem supstrata za aktivno mjesto enzima koje je stabilizirano razgranatim polipeptidnim lancima i obuhvaća supstrat s nekoliko strana. Tijekom katalitičkog efekta ne dolazi do trošenja ni mijenjanja samih enzima (1, 2).

#### 1.1.2. Kinetika enzimskih reakcija

Kinetika enzimskih reakcija bavi se proučavanjem brzine kojom će neki enzim katalizirati supstrat. Brzina kojom će se neka enzimska reakcija odviti ovisi o raznim faktorima poput temperature, pH, koncentracije i ionske jakosti pufera, koncentraciji supstrata, prisutnosti koenzima, aktivatora i inhibitora (1). Za računanje kinetike enzimskih reakcija koristimo se Michaelis-Mentenovom jednadžbom koja opisuje međusobno djelovanje koncentracije supstrata i početne brzine reakcije.

#### 1.1.3. Inhibicija enzima

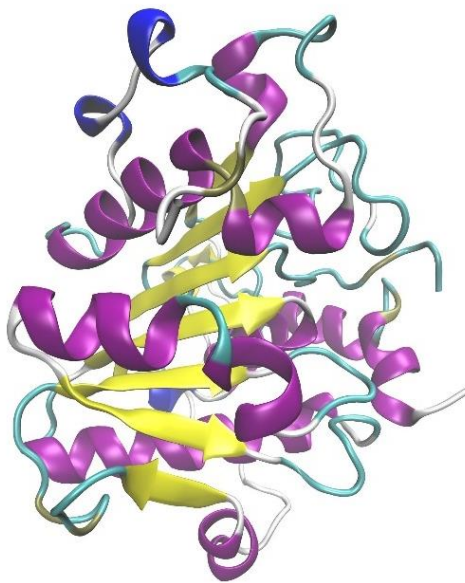
Enzimska inhibicija odvija se kada molekula stvara interferencije enzimu te njegovoj sposobnosti katalize reakcije, koja može biti presudan regulacijski mehanizam u biološkim sustavima kao i u istraživanju i proizvodnji lijekova. Vrste inhibicije enzima su reverzibilna i ireverzibilna. Inhibitori se dijele na kompetitivne i nekompetitivne ovisno o tome hoće li se „natjecati“ sa enzimom za aktivno mjesto (1).

### 1.2. Lipaza B

Lipaza B (*engl. Lipase B, CALB*), dobivena iz gljive *Candida antarctica*, koristi se za sintezu farmaceutskih proizvoda. Bitna je zbog njene široke specifičnosti za supstrat i povećane termostabilnosti i aktivnosti u organskim otapalima (3 - 5). Molekulske je mase 33,62 kDa i sastoji se od 316 aminokiselinskih ostataka. Protein je homodimerne strukture, sastavljene od  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabranih ploča, otkrivene difrakcijom x-zraka pri udaljenosti od 1,69 Å. Katalitički najaktivnija mjesta nalaze se u položajima Ser105, His224 i Asp187. CALB u svojoj strukturi ima vezan samoubilački inhibitor koji oponaša supstrat kako bi se mogao istraživati (5). Izuzev ovog oblika dobivenog iz gljive postoje humani, animalni i bakterijski oblici koji se

## UVOD

razlikuju u redosljedu aminokiselina i njihovim funkcionalnim svojstvima. Lipaze su ključni enzimi u metabolizmu lipida s obzirom da kataliziraju hidrolizu triglicerida u glicerol i slobodne masne kiseline. Lipaza ima ključnu ulogu u razgradnji masti i omogućuje njihovu daljnju razgradnju te apsorpciju u tijelu. Također, koriste se za liječenje raznih bolesti, poput pankreatitisa, jer se inhibicijom lipaze smanjuje opterećenje gušterače. Kod pretilih osoba koristi se tako što se inhibicijom lipaze smanjuje apsorpcija masti te samim time i regulira tjelesnu masu (6).



Slika 1. Prikaz lipaze B. Sliku izradio autor.

### 1.2.1. Inhibitori lipaze

Inhibitori korišteni u ovom radu su ružmarinska kiselina, epikatehin i epigalokatehin galat (7). Svi navedeni inhibitori prirodnog su podrijetla. Pronalazimo ih u biljkama poput ružmarina i kadulje te u napitcima kao što su kakao i zeleni čaj. Funkcioniraju na principu vezanja na aktivno mjesto kako bi se spriječilo vezanje supstrata (8 - 11). Ružmarinska kiselina prirodni je polifenol jakih antioksidativnih i protuupalnih svojstava zbog kojih je korištena u liječenju raznih upalnih stanja i neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i



Parkinsonove bolesti. Nadalje, koristi se u istraživanju prevencije oksidacije LDL kolesterola (*engl. Low density lipoprotein cholesterol*) i učinkovitosti u antikancerogenoj terapiji (12, 13). Epikatehin je flavonoid koji možemo pronaći u zelenom čaju, crnom vinu te jabukama, a uglavnom se koristi kako bi se poboljšala cirkulacija jer dovodi do povećane proizvodnje dušikovog oksida koji širi krvne žile (14). Epigalokatehin galat glavni je katehin u zelenom čaju te se zbog njegovog antibakterijskog djelovanja koristi za prevenciju i liječenje oralnih bolesti kao što su karijes i parodontitis (15).

### 1.3. Računalne metode

Korištenje računalnih metoda postalo je sve češće razvojem tehnologije. Glavni im je cilj ubrzano i jeftinije otkrivanje novih lijekova povezivanjem potencijalnih inhibitora s enzimima *in silico*. Za to se koriste računala snažnih procesora i ogromnih prostora za skladištenje. Temeljna im je uloga analiza, obrada i skladištenje podataka i informacija u bioinformatici. Također, koriste se za razumijevanje ponašanja bioloških molekula i njihovih procesa.

Uklapanje je metoda kojom predviđamo najpovoljniji položaj jedne molekule prema drugoj kada se međusobno vežu u stabilan kompleks. Cilj uklapanja je pronaći mjesto u kojem će biti najstabilnije i najjače vezanje između molekula. Nakon preuzimanja strukture enzima iz proteinske baze podataka (*engl. Protein Dana Bank, PDB*) uklapanje je odrađeno softverskim paketom LeDock. Program LeDock pronalazi optimalne položaje liganda unutar proteina te daje različite konformacije liganda i procjenu energije vezanja. Koriste se scoring funkcije; algoritmi koji omogućavaju procjenu stabilnosti i snage vezanja proteina s ligandom. Koristimo ih kako bismo razlikovali pravilno uklopljene od nepravilno uklopljenih konformacija. U radu su korišteni PDB zapisi, odnosno glavni format PDB-a. Oni nam daju informacije o koordinatama atoma, njihovim međusobnim vezama i sekundarnoj strukturi proteina.

$$\Delta G_{vez} = \Delta G_{otap} + \Delta G_{konf} + \Delta G_{int} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{t/r} + \Delta G_{vib} \quad (1)$$

Ova jednadžba prikazuje doprinose slobodnoj energiji. Doprinosi su uklanjanje liganda i pojedinih dijelova proteina iz otapala  $\Delta G_{otap}$ , konformacijske promjene u proteinu i ligandu  $\Delta G_{konf}$ , specifične ligand-protein interakcije  $\Delta G_{int}$ , gubitak energije zbog smanjenja rotacijske entropije liganda i proteina  $\Delta G_{rot}$ , gubitak translacijske i rotacijske entropije liganda  $\Delta G_{t/r}$  te promjenu vibracijske entropije  $\Delta G_{vib}$  (16).

### **1.4. Vizualizacija proteina**

Postoji cijeli niz softverskih paketa za vizualizaciju i molekulsko modeliranje željenih proteina poput VMD-a, PYMOL-a i JMOL-a. Molekule se prikazuju kao štapićasti i kuglasti modeli. Enzim u ovom radu predstavljen je novim crtanim stilom, dok su inhibitori prikazani stilom „sladić“ (*engl. Licorice*). Proteini se vizualiziraju kako bismo mogli dobiti prikaz dobivenih podataka u 3D obliku. Za jednostavniju analizu ulaza strukture možemo prikazivati u različitim bojama.

## CILJ

### **2.CILJ**

Ciljevi istraživanja su:

- metodama molekuskog modeliranja ispitati inhibiciju CALB
- ispitati energijski najpovoljnije položaje inhibitora u enzimu
- ispitati vezanje različitih liganada s navedenim enzimom

### 3.MATERIJALI I METODE

#### 3.1.Ustroj studije

Istraživanje je napravljeno kao *in silico* studija – izgradnja računalnog modela enzima i inhibitora (17). Takva proučavanja koriste se kao zamjena za skupocjeni rad u laboratoriju.

#### 3.2.Materijali

Podaci o enzimu lipazi B preuzeti su iz PDB-a ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)), struktura enzima dostupna je u bazi pod kodom 3icw i napravljena je u rezoluciji 1,69 Å. Strukture inhibitora ružmarinske kiseline, epikatehina i epigalokatehin galata preuzete su iz PubChem baze ([www.pubchem.com](http://www.pubchem.com)). Svi podaci o enzimu i inhibitoru su javno dostupni u navedenim bazama. Za predikciju energijski najpovoljnijeg položaja koristit će se softverski paket LeDock ([www.lephar.com](http://www.lephar.com)).

#### 3.3.Metode

##### 3.3.1. Priprema molekula enzima i inhibitora

Strukture i koordinate enzima Lipaze B preuzete su iz baze podataka PDB (PDB\_id 3icw) (5). Prethodno uklapanju (*engl. docking*) sve dvostruke konformacije metionina, lizina, aspartata, serina i leucina su uklonjene. Također su uklonjene sve B konformacije i ostavljene samo A konformacije aminokiseline. Iz strukture proteina uklonjene su molekule vode kao i samoubilački inhibitor. Strukture i koordinate inhibitora ružmarinske kiseline, epikatehina i epigalokatehin galata preuzete su iz PubChema te potom prebačene u mol2 oblik korištenjem programa Open Babel (18, 19).

##### 3.3.2. Metoda uklapanja

Uklapanje je metoda kojom predviđamo najpovoljniji položaj jedne molekule prema drugoj kada se međusobno vežu u stabilan kompleks. Ova metoda ima široku primjenu u predviđanju vezanja proteinskih inhibitora i supstrata. Tijekom korištenja ove metode pretpostavlja se da je slobodna energija vezanja određena kao pribrojena funkcija različitih komponenti koje doprinose jačini vezanja molekula.

### 3.3.3. Vizualizacija molekula

Za vizualizaciju enzima i inhibitora u ovom radu korišten je program VMD (*engl. Visual Molecular Dynamics*) koji služi za molekulsko modeliranje i analizu podataka poput koordinata molekula te duljinu veza između pojedinih atoma (20). Ovim programom moguće je simulirati molekule različitim stilovima animacije i prikazati strukture i pojedine atome različitim bojama.

### 3.4. Statističke metode

Računalne simulacije i modeliranje korišteni su za predviđanje interakcija između molekula empirijskim metodama i računalnim algoritmima. Tim metodama se statističke pogreške procjenjuju usporedbom rezultata predviđenih afiniteta vezanja s eksperimentalno procijenjenim afinitetima vezanja. Odstupanja su dana kao srednje kvadratno odstupanje (*engl. Root Mean Square Deviation, RMSD*) između dvaju rezultata. Algoritam za uklapanje koristi konvergencijski kriterij za usporedbu izračunatih konformacija liganada koji uključuje donju granicu za izračun promjena vrijednosti scoring funkcije, broj iteracija i druge parametre.

## REZULTATI

### 4.REZULTATI

Kako bi se dobili najpovoljniji položaji vezanja inhibitora za CALB, prvo je korištena metoda uklapanja nakon čega su izmjerene sve međusobne udaljenosti inhibitora i enzima kraće od 3 Å. Za to su korišteni softverski paket LeDock i program za vizualizaciju proteina VMD.

#### 4.1. Rezultati uklapanja

U Tablici 1. prikazane su energije klastera inhibitora korištenih u ovom radu. Rezultati najmanje vrijednosti imaju najveću energiju vezanja. Rješenja za ružmarinsku kiselinu označena su slovom A, rješenja za epikatehin označena su slovom B i rješenja za epigalokatehin galat označena su slovom C.

Tablica 1. Prikaz energija za različita rješenja.

Rješenje br.	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
Energija/ kcal/mol	-5,39	-4,65	-4,65	-4,16	-4,07	-4,02	-5,41	-5,40	-5,32

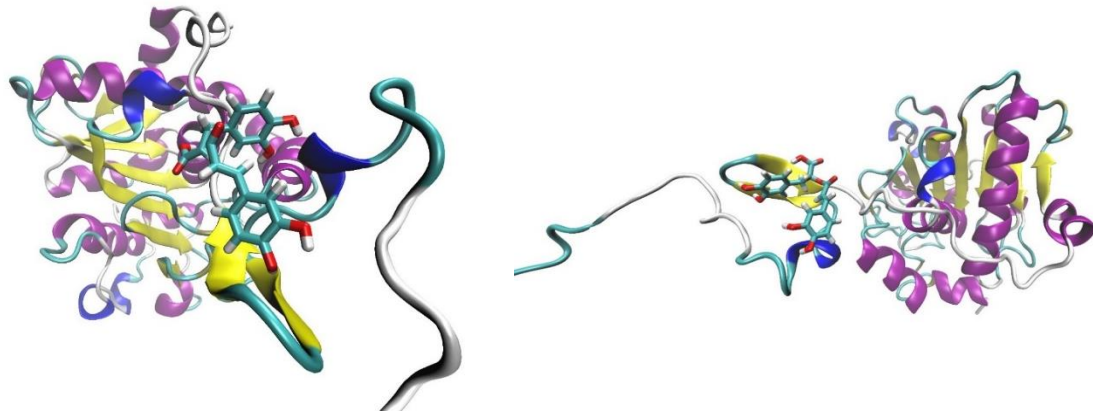
## REZULTATI

Tablica 2. Aminokiselinski ostaci i pripadajući atomi koji se nalaze na najmanjoj udaljenosti od inhibitora.

A1		A2		A3	
Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
GLY31:O	1,95	ASP14:OD1	2,02	ASP14:OD1	2,02
GLY31:O	2,67	ASP14:OD1	2,82	ASP14:OD1	2,11
GLY31:O	2,60	ASP14:OD1	2,90	ASP14:CG	2,38
GLY31:C	2,95	ASP14:CG	2,59	ASP14:CG	2,85
GLY31:C	2,55	ASP14:OD2	2,20	ASP14:CB	2,49
ILE32:N	2,95	ASP14:CG	2,42	ASP14:CA	2,84
GLY31:N	2,92	SER30:OG	2,33	THR28:OG1	1,77
THR28:OG1	1,90	SER30:CB	2,68	THR28:OG1	2,31
THR28:OG1	2,17	THR28:OG1	2,18	THR28:OG1	2,06
THR28:OG1	2,31	THR28:OG1	2,90	THR28:OG1	2,90
ASP14:OD1	1,96	VAL33:CG2	2,79	THR28:OG1	2,88
ASP14:OD1	2,82	VAL33:CA	2,58	GLY31:N	2,86
ASP14:CG	2,44	ARG20:NH1	2,49	GLY31:O	1,89
ILE32:O	2,63	ARG20:CZ	2,77	GLY31:O	1,83
ILE32:C	2,91	PRO17:CA	2,60	GLY31:C	2,81
ILE32:O	2,79	PRO17:O	1,74	GLY31:C	2,56
ARG20:NE	2,88	PRO17:O	2,56	ILE32:O	2,35
ARG20:CD	2,76	PRO17:C	2,37	ILE32:C	2,97
ARG20:NH1	2,97	PRO21CG	2,69	SER37:OG	2,09
LEU35:O	1,77	PRO36:CA	2,87	SER37:OG	2,93
LEU35:O	2,66	PRO36:CG	2,98	SER37:CB	2,56
LEU35:O	2,18	GLY34:N	2,78	LEU35:O	2,93
LEU35:C	2,86	GLY34:N	2,61	ARG20:C	2,61
GLY34:O	1,80			PRO21:N	2,18
GLY34:O	2,03			PRO21:N	2,61
GLY34:O	2,76			PRO21:CD	2,66
GLY34:O	2,94			PRO21:CD	2,59
GLY34:C	2,56			PRO21:CB	2,89
ARG20:CB	2,31			PRO21:CG	2,53
				PRO21:CG	2,45
				PRO21:CA	2,35
				GLY34:N	2,86
				GLY34:O	1,82
				GLY34:O	2,87
				GLY34:O	2,66

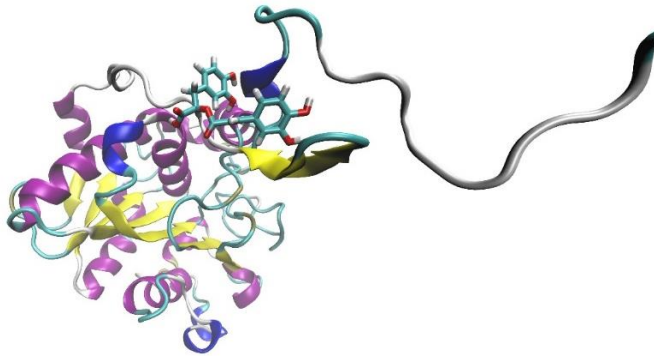
Iz Tablice 2. može se vidjeti da je najveći broj interakcija, 35, ostvaren u rješenju A3. Najznačajniji aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u koordinaciji inhibitora su Leu35, Pro17 i Thr28. Na Slici 2. prikazani su položaji vezanja inhibitora za rješenja A1, A2 i A3.

## REZULTATI



a.

b.



c.

Slika 2. a) Položaj vezanja ružmarinske kiseline za enzim lipazu B za rješenje A1. b) Položaj vezanja ružmarinske kiseline za enzim lipazu B za rješenje A2. c) Položaj vezanja ružmarinske kiseline za enzim lipazu B za rješenje A3. Sliku izradio autor.



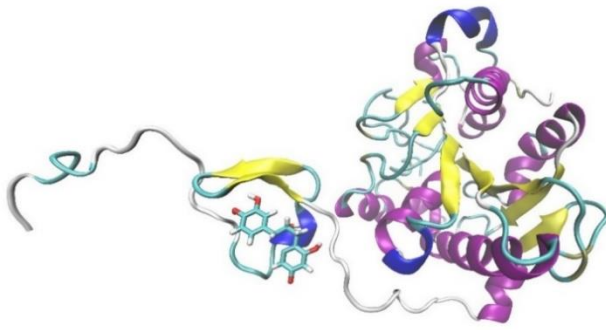
## REZULTATI

Tablica 3. Aminokiselinski ostaci i pripadajući atomi koji se nalaze na najmanjoj udaljenosti od inhibitora.

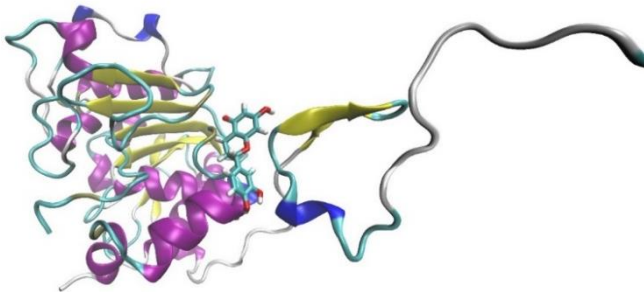
B1		B2		B3	
Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
ASP14:OD1	2,06	PHE22:O	2,26	ASP14:OD1	2,06
ASP14:OD1	2,06	PHE22:O	2,42	ASP14:OD1	2,92
ASP14:CG	2,55	PHE22:C	2,83	ASP14:OD1	2,19
ASP14:CG	2,70	PHE22:C	2,68	ASP14:CG	2,57
ASP14:CB	2,79	ASN203:O	2,20	ASP14:CB	2,72
THR28:OG1	2,14	ASN203:O	1,91	THR28:OG1	1,87
THR28:OG1	2,31	ASN203:O	2,83	THR28:OG1	2,37
GLY31:O	2,10	ASN203:O	2,83	THR28:OG1	1,79
GLY31:O	2,54	ASN203:C	2,48	THR28:OG1	2,91
GLY31:C	2,92	ASN203:CA	2,49	SER30:N	2,72
VAL33:CA	2,79	ASN203:CB	2,99	ARG20:CD	2,49
ILE32:O	2,91	LYS26:CE	2,45	ARG20:NE	2,77
GLY34:N	2,52	LYS26:CD	2,60	SER30:CB	2,89
GLY34:N	2,90	LYS26:CG	2,78	GLY31:O	2,50
GLY34:N	2,69	VAL24:O	2,70	GLY31:O	2,67
ARG20:NH1	2,93	VAL24:O	2,63	GLY31:C	2,42
ARG20:NH1	2,52	GLY25:O	1,76	GLY31:CA	2,81
SER37:OG	2,83	GLY25:O	2,72	GLY31:N	2,85
LEU35:O	1,94	GLY25:C	2,50	ILE32:O	2,96
LEU35:O	2,83	PHE239:CB	2,52	GLY34:N	2,63
LEU35:C	2,93	PHE239:CB	2,74	GLY34:CA	2,39
		PHE239:CG	2,90	GLY34:C	2,90
		PHE239:CG	2,58	LEU35:O	1,79
		PHE239:CD2	2,38	LEU35:O	2,73
		PHE239:CD2	2,95	LEU35:C	2,89
		PHE239:CD2	2,86	SER37:OG	2,58
		PHE239:CE2	2,67		
		THR208:OG1	1,90		
		THR208:OG1	2,14		
		THR208:OG1	2,40		
		THR208:OG1	2,87		

Iz Tablice 3. može se vidjeti da je najveći broj interakcija, 31, ostvaren u rješenju B2. Najznačajniji aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u koordinaciji inhibitora su Leu35, Gly25, Thr28. Na Slici 3. prikazani su položaji vezanja inhibitora za rješenja B1, B2 i B3.

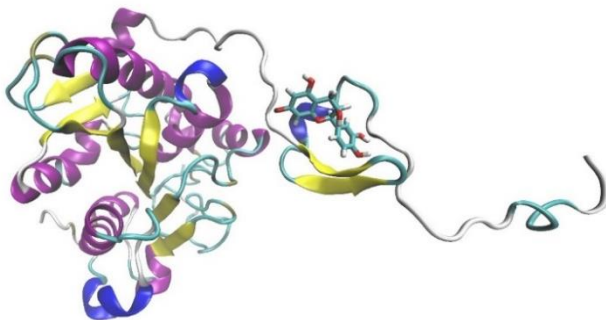
## REZULTATI



a.



b.



c.

Slika 3. a) Položaj vezanja ružmarinske kiseline za enzim lipazu B za rješenje B1. b) Položaj vezanja ružmarinske kiseline za enzim lipazu B za rješenje B2. c) Položaj vezanja ružmarinske kiseline za enzim lipazu B za rješenje B3. Sliku izradio autor.

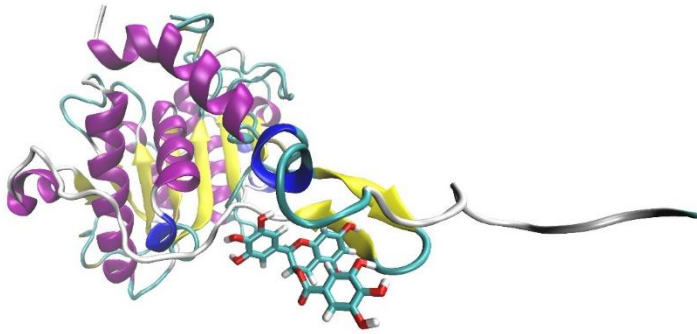
## REZULTATI

Tablica 4. Aminokiselinski ostaci i pripadajući atomi koji se nalaze na najmanjoj udaljenosti od inhibitora.

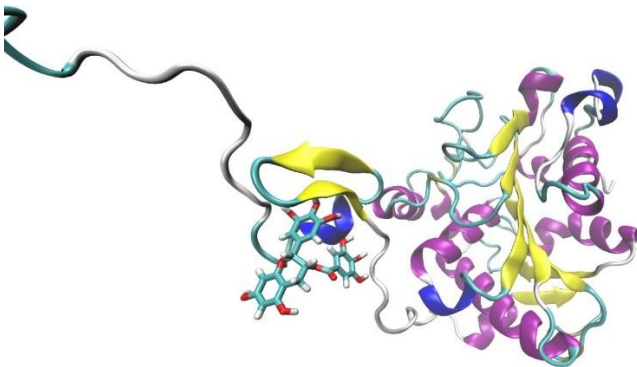
C1		C2		C3	
Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å	Aminokiselinski ostatak	Duljina veze/ Å
SER30:OG	2,37	ASP14:CB	2,74	ASP14:CA	2,97
SER30:OG	3,45	ASP14:CG	2,59	THR28:OG1	1,93
SER30:CB	3,59	ASP14:OD1	2,12	THR28:OG1	1,90
ASP14:OD2	1,91	THR28:OG1	2,43	THR28:OG1	2,23
ASP14:OD2	2,82	THR28:OG1	2,14	THR28:OG1	2,70
ASP14:OD2	2,22	THR28:OG1	2,79	THR28:OG1	2,92
ASP14:CG	2,70	GLY31:O	1,84	THR28:CB	2,86
ASP14:CG	2,29	GLY31:O	2,62	ASP14:OD1	2,72
ASP14:OD1	2,67	GLY31:C	2,75	LEU15:O	2,62
THR28:OG1	2,26	VAL33:CG2	2,97	ARG20:NE	2,47
THR28:OG1	2,50	VAL33:CG1	2,90	ARG20:NE	2,33
ARG20:CD	2,41	GLY34:N	2,45	ARG20:CZ	2,85
ARG20:CD	2,99	VAL33:N	2,98	ARG20:CZ	2,40
ARG20:CG	2,71	ILE32:C	2,42	ARG20:NH2	2,80
ARG20:CG	2,68	ILE32:O	1,82	ARG20:NH1	2,91
ARG20:CB	2,71	ILE32:O	2,60	GLY31:O	2,06
VAL33:CA	2,85	GLY34:O	1,91	GLY31:O	2,44
VAL33:CB	2,90	GLY34:O	1,94	SER30:O	1,80
VAL33:CG2	2,62	GLY34:O	2,78	SER30:O	2,70
VAL33:CG1	2,95	GLY34:O	2,63	ILE32:N	2,41
PRO36:CA	2,68	GLY34:C	2,51	ILE32:OB	2,69
SER37:N	2,57	GLY34:C	2,77	ILE32:CG1	2,85
SER37:N	2,81	SER37:N	2,77	ILE32:O	2,52
SER37:OG	2,06	SER37:OG	2,92	ILE32:O	2,76
SER37:OG	2,70	LEU35:O	2,16	SER37:OG	2,16
SER37:CB	2,95	LEU35:O	2,46	SER37:OG	2,90
SER30:O	2,13	LEU35:O	2,76	SER37:CB	2,91
SER30:O	2,70	LEU35:C	2,28	LEU35:O	1,81
SER30:C	2,37	LEU35:C	2,93	LEU35:O	2,76
SER30:C	2,76	PRO36:N	2,79	LEU35:C	2,71
GLY31:N	2,39	PRO36:CA	2,96	GLY34:O	1,89
GLY31:CA	2,84			GLY34:O	2,53
GLY31:C	2,83			GLY34:C	2,48
GLY31:C	2,88			GLY34:CA	2,76
GLY31:O	1,91			GLY34:N	2,50
GLY31:O	2,88			GLY34:N	2,90
GLY31:O	2,63				

Iz Tablice 4. može se vidjeti da je najveći broj interakcija, 37, ostvaren u rješenju C1. Najznačajniji aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u koordinaciji inhibitora su Asp14, Gly31, Ile32 i Ser30. Na Slici 4. prikazani su položaji vezanja inhibitora za rješenja C1, C2 i C3

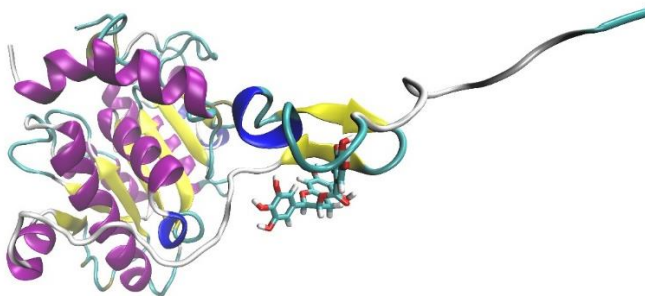
## REZULTATI



a.



b.



c.

Slika 4. a) Položaj vezanja ružmarinske kiseline za enzim lipazu B za rješenje C1. b) Položaj vezanja ružmarinske kiseline za enzim lipazu B za rješenje C2. c) Položaj vezanja ružmarinske kiseline za enzim lipazu B za rješenje C3. Sliku izradio autor.

### 5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem provedeno je uklapanje različitih liganada u vezno mjesto enzima lipaze B s ciljem ispitivanja energijski najpovoljnijih mjesta vezanja. Rezultati uklapanja pokazali su da različiti inhibitori imaju različita mjesta vezanja, što je potvrđeno specifičnim mjestima i energijama vezanja između inhibitora i aminokiselinskih ostataka. Široka specifičnost lipaze B za supstrat, povećana termostabilnost i aktivnost u organskim otapalima čine ju iznimno korisnom za istraživanje i razvoj novih lijekova. Kod pretilih osoba primjenjuje se za inhibiciju lipaze, čime se smanjuje apsorpcija masti i regulira tjelesna masa. Njeno istraživanje može imati doprinos u daljnjem razvoju i učinkovitosti te terapije.

Metoda uklapanja koristi se za predviđanje optimalnih položaja između dvije molekule, a vizualizacija proteina se koristi za bolje razumijevanje strukture enzima i njihovih inhibitora. U ovom radu dobiveni su rezultati koji mogu biti korišteni za razvoj novih lijekova i tretmana za liječenje pretilosti i disfunkcija metabolizma lipida. Ružmarinska kiselina prirodni je polifenol protuupalnih i antioksidativnih svojstava zbog kojih je korištena u liječenju raznih upalnih stanja i bolesti. Epikatehin je flavonoid korišten za poboljšanje cirkulacije dovodjenjem do povećane proizvodnje dušikovog oksida koji širi krvne žile. Epigalokatehin galat je katehin koji nalazimo u zelenom čaju te zbog njegovog antibakterijskog djelovanja služi za prevenciju i liječenje oralnih bolesti.

Rezultati inhibicije dobiveni eksperimentalnom metodom pokazuju određena odstupanja u odnosu na one prikazane u ovom istraživanju. Razlog tome je korištenje različitih softverskih programa za uklapanje. Energija vezanja dobivena u istraživanju Hao Zhang i suradnika provedenom na Institutu za kemiju Kineske akademije znanosti u Pekingu 2022. godine za ružmarinsku kiselinu iznosila je -6,19 kcal/mol, za epikatehin je -6,48 kcal/mol, a za epigalokatehin galat je iznosila -7,43 kcal/mol (7). Energije dobivene ovim radom za iste inhibitore bile su nešto niže jer kako je navedeno u uvodu, radi se o procjeni samo jednog dijela doprinosa. Energijski najpovoljnije rješenje za ružmarinsku kiselinu iznosi -5,39 kcal/mol, epikatehin -4,16 kcal/mol, dok je epigalokatehin galat pokazao najnižu energiju vezanja od -5,41 kcal/mol. Dobiveni rezultati ovog istraživanja poklapaju se s eksperimentalnim rezultatima (7).

Najmanje udaljenosti enzima i ružmarinske kiseline bile su kod aminokiselinskih ostataka Leu35, Pro17 i The28. Kod epikatehina su to bile aminokiseline Leu35, Gly25 i The28, a kod epigalokatehin galata su to bili Asp14, Gly31, Ile32 i Ser30. Iako niti jedan od

## RASPRAVA

aminokiselinskih ostataka nije direktno uključen u katalitičku aktivnost enzima, imaju ulogu u strukturalnoj stabilnosti i prepoznavanju supstrata. Bitnu ulogu imaju Gly25 i Gly31 koji omogućuju fleksibilnost molekuli jer je Gly najmanja aminokiselina, često prisutna u položajima koji zahtijevaju pokretljivost (21). Također, velikog je značaja Leu35 koji svojim hidrofobnim vezama stabilizira terciarnu strukturu proteina (22). Od navedenih inhibitora najvećeg je značaja epigalokatehin galat koji je pokazao najveću energiju vezanja u eksperimentalnom testiranju i predviđanjem metodom uklapanja. Njihova učinkovitost može biti korištena za liječenje pretilosti, a samim time što su prirodni spojevi koji su prisutni u biljkama i napitcima može smanjiti količinu i intenzitet nuspojava nakon njegovog korištenja. Potrebno je dodatno istražiti alosteričku inhibiciju, napraviti *in vivo* studije te farmakokinetička i farmakodinamička istraživanja.

## ZAKLJUČAK

### 6. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvest sljedeći zaključci:

- Metodom uklapanja dobiveno je da se inhibitori najviše vežu za aminokiselinske ostatke Gly, Pro, Asp, Thr
- Najpovoljnija energija vezanja je u rješenju C1
- Najmanja udaljenost nalazi se na veznom mjestu Pro17 u rješenju A2

## SAŽETAK

### 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Metodama molekuskog modeliranja ispitati inhibiciju lipaze B, ispitati energijski najpovoljnije položaje inhibitora u enzimu i ispitati vezanje različitih liganada s navedenim enzimom.

**Nacrt studije:** Istraživanje je napravljeno kao *in silico* studija – izgradnja računalnog modela enzima i inhibitora.

**Materijali i metode:** Podaci o enzimu lipaze B preuzeti su iz baze PDB, a podaci o ružmarinskoj kiselini, epikatehinu i epikatehin galatu preuzeti su iz baze PubChem. Za predviđanje najpovoljnijeg energijskog položaja korišten je softver LeDock. Sve molekule su vizualizirane u programu VMD.

**Rezultati:** Rezultati najpovoljnijeg položaja vezanja inhibitora za enzim Lipazu B, prvo je korištena metoda uklapanja nakon čega su izmjerene sve međusobne udaljenosti inhibitora i enzima kraće od 3 Å.

**Zaključak:** Metodom uklapanja dobiveno je da se inhibitori najviše vežu za aminokiselinske ostatke Gly, Pro, Asp, Thr te da je najpovoljnija energija vezanja u rješenju C1, a najmanja udaljenost enzima i inhibitora je u rješenju A2 na veznom mjestu Pro17.

**Ključne riječi:** epikatehin, epigalokatehin galat, inhibicija, lipaza B, molekulsko uklapanje, ružmarinska kiselina



## SUMMARY

### 8. SUMMARY

#### **Molecular modelling of the enzyme lipase B and its ligands**

**Objectives:** Using molecular modeling methods, investigate the inhibition of lipase B, examine the energetically most favorable positions of inhibitors within the enzyme, and analyze the binding of various ligands with the enzyme.

**Study design:** The research was conducted as an in silico study, involving the construction of a computational model of the enzyme and inhibitors.

**Materials and methods:** The data on the lipase B enzyme were obtained from the PDB database, while the data on rosmarinic acid, epicatechin, and epigallocatechin gallate were obtained from the PubChem database. The software LeDock was used to predict the most favorable energetic positions. All molecules were visualized using the VMD program.

**Results:** The results for the most favorable binding position of the inhibitors to the lipase B enzyme were first obtained using the docking method, after which all distances between the inhibitors and the enzyme shorter than 3 Å were measured.

**Conclusion:** Using the docking method, it was determined that inhibitors bind most strongly to the amino acid residues Gly, Pro, Asp, and Thr, with the most favorable binding energy in solution C1, while the shortest distance between the enzyme and the inhibitor is in solution A2 at the Pro17 binding site.

**Keywords:** epicatechin, epigallocatechin gallate, inhibition, lipase B, molecular docking, rosmarinic acid

## LITERATURA

### 9. LITERATURA

1. Štraus B, Petrik J. Enzimi. U: Čvorišćec D, Čepelak I (ur.). Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 245-313.
2. Kennelly PJ, Rodwell VW. Enzimi: mehanizam djelovanja. U: Lovrić J, Sertić J (ur.). Harperova ilustrirana biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 51-62.
3. Anderson EM, Larsson KM, Kirk O. One biocatalyst–many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*. 1998 Jan 1;16(3):181-204.
4. Wang Y, Li C, Zhang J, Zhao M. Engineering of *Candida antarctica* Lipase B for Enhanced Thermostability and Activity in Organic Solvents. *Biotechnology and Bioengineering*. 2023;120(3):567-577. doi:10.1002/bit.28321
5. Structure of a Circular Permutation on Lipase B from *Candida Antartica* with Bound Suicide Inhibitor. Dostupno na adresi: <https://www.rcsb.org/structure/3ICW>. Datum pristupa: 23.03.2024
6. Reetz MT, Zonta A, Simpelkamp J, Jaeger KE. Efficient Biocatalysts by Directed Evolution: The *Candida antarctica* Lipase B as a Case Study. In: Bornscheuer UT, Kazlauskas RJ, editors. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006. p. 125-142.
7. Hao Zhang, Feng-Qing Yang and Jian-Li Gao. A Simple and Portable Personal Glucose Meter Method Combined with Molecular Docking for Screening of Lipase Inhibitors. Sep 2022 doi: 10.1155/2022/4430050
8. Firuzi O, Miri R, Asadollahi M, Eslami S, Jassbi AR. Rosmarinic acid and its methyl ester as antioxidants: Implications for neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des*. 2014;20(30):5119-28.
9. López V, Martín S, Gómez-Serranillos MP, Carretero ME, Jäger AK, Calvo MI. Neuroprotective and neurochemical properties of rosmarinic acid and its methyl ester in isolated rat brain synaptosomes. *Eur J Pharmacol*. 2009;622(1-3):47-54.
10. Nagao T, Hase T, Tokimitsu I. A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(6):1473-83.

## LITERATURA

11. Kurita I, Makino Y, Takahashi Y, Fujii K. Roles of antioxidant and anti-inflammatory effects of green tea polyphenols in preventing atherosclerosis. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2006;127(1):15-21.
12. Azhar MK, Anwar S, Hasan GM, Shamsi A, Islam A, Parvez S, et al. Comprehensive insights into biological roles of rosmarinic acid: Implications in diabetes, cancer, and neurodegenerative diseases. *Nutrients*. 2023;15(19):4297. doi:10.3390/nu15194297
13. Islam A, Parvez S, Hassan MI. Comprehensive insights into biological roles of rosmarinic acid: implications in diabetes, cancer, and neurodegenerative diseases. *Nutrients*. 2023;15(19):4297. doi:10.3390/nu15194297
14. Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. () (2006). () "() Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans." (). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(4):1024-9.
15. Li Y, Cheng L, Li M. Effects of green tea extract epigallocatechin-3-gallate on oral diseases: A narrative review. *Pathogens*. 2024;13(8):634. doi:10.3390/pathogens13080634
1. Štraus B, Petrik J. Enzimi. U: Čvorišćec D, Čepelak I (ur.). Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 245-313.
16. Brkić H. Proučavanje o željezu ovisnih dioksigenaza računalnim metodama. Doktorska disertacija. Prirodoslovno matematički Fakultet, Fizički odsjek, Zagreb. 2014.
17. Thurakkal L, Singh S, Roy R, Kar P, Sadhukan 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.
18. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminf.* 2011; 3, 33. doi:10.1186/1758-2946-3-3
19. The Open Babel Package, version 2.3.1 <http://openbabel.org> (accessed April 2024)
20. Humphrey, William; Dalke, Andrew; Schulten, Klaus. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1996;14 (1): 33–38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5. PMID 8744570.
21. Branden C, Tooze J. Introduction to Protein Structure. 2nd ed. *Garland Science*; 1999.

## LITERATURA

22. Pak M.A., Markhieva K.A., Novikova M.S., Petrov D.S., Vorobyev I.S., Maksimova E.S.,  
Using AlphaFold to predict the impact of single mutations on protein stability and function.  
PLOS ONE. 2021;16(4):e0250038. doi:10.1371/journal.pone.0250038

## ŽIVOTOPIS

### 10. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:**

Bruno Diklić

**Datum i mjesto rođenja:**

17. siječanj 2003., Karlovac

**Adresa:**

Ulica kralja Petra Krešimira IV 8a, 47000 Karlovac

**Broj mobitela:**

099/512-9606

**Obrazovanje:**

2017. – 2021. Gimnazija Karlovac

2021. – danas Sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku