

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Krunoslav Ilić

Računalne simulacije kompleksa derivata ibuprofena i naproksena s
acil-CoA tioesterazom I (TesA) iz bakterije *Pseudomonas aeruginosa*

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za fizikalnu kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom doc. dr. sc. Branimira Bertoše. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

RAČUNALNE SIMULACIJE KOMPLEKSA DERIVATA IBUPROFENA I NAPROKSENA S ACIL-COA TIOESTERAZOM I (TesA) IZ BAKTERIJE

Pseudomonas aeruginosa

Krunoslav Ilić

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

GDSL hidrolaze su relativno slabo istražena porodica enzima. Karakterizira ih GDSL strukturni motiv koji se nalazi oko serina katalitičke trijade. Odlikuje se izraženim supstratnim promiskuitetom što ih čini zanimljivim područjem istraživanja, kako zbog fundamentalnog značaja, tako i zbog potencijalne primjene u farmaceutskoj i biotehnološkoj industriji. Jedan od enzima iz te porodice je Acil-CoA tioesteraza I (TesA) iz patogene bakterije *Pseudomonas aeruginosa* koji je istraživan u ovome radu.

Računalnim metodama prilagođenim istraživanju biokemijskih sustava, prvenstveno Monte Carlo konformacijskom pretragom i simulacijama molekulske dinamike, istražena je mogućnost produktivnog vezanja derivata ibuprofena i naproksena u aktivno mjesto enzima TesA. Pronađene su ključne interakcije za vezanje navedenih supstrata u aktivno mjesto enzima te interakcije koje se razlikuju između enantiomera istog lijeka. Računalno je istražen utjecaj mutacije L78F na enantioselektivnost enzima prema istraženim derivatima ibuprofena i naproksena. Produktivno vezanje utvrđeno je za derivat R-ibuprofena sa divljim tipom i mutantom enzima TesA te za derivat R-naproksena sa mutiranim enzimom. Također, pronađen je hidrofobni džep u blizini aktivnog mjesta enzima važan za vezanje supstrata i opisane su nevezne interakcije enzima i kovalentnog intermedijera supstrata potrebne za katalitičku reakciju te utjecaj mutacije L78F na navedene interakcije.

(35 stranica, 35 slika, 1 tablica, 23 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: GDSL hidrolaze, enantioselektivnost, molekulska dinamika, Monte Carlo konformacijska pretraga

Voditelj: doc. dr. sc. Branimir Bertoša

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić

doc. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Rad prihvaćen: 30. travnja 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

COMPUTATIONAL INVESTIGATION OF ACYL-COA THIOESTERASE I (TesA) FROM THE BACTERIA *Pseudomonas aeruginosa* IN COMPLEXES WITH IBUPROFEN AND NAPROXEN DERIVATIVES

Krunoslav Ilić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

GDSL hydrolases are relatively poorly described enzyme family. They contain a GDSL structural motif centered around nucleophilic serine from catalytic triad. They are characterized by substrate promiscuity, which makes them an interesting area of research, both for fundamental scientific value and potential uses in pharmaceutical and biotech industry. One of the enzymes from that family shown to be an interesting research target is Acyl-CoA thioesterase (TesA) from *Pseudomonas aeruginosa*, which was studied in this thesis.

Computational biochemistry methods, primarily Monte Carlo conformational search and molecular dynamics simulations, were used to test possibilities of catalytically productive substrate binding for ibuprofen and naproxen derivatives. Key interactions for active site binding were identified, as well as differences in binding between enantiomers of the same compound. Amino acid mutation L78F was introduced *in silico* and its effect on substrate binding and enantioselectivity was computationally assessed. Productive binding was obtained for R-ibuprofen derivate, both with wild-type enzyme and L78F mutant, as well as for R-naproxen derivate with mutated enzyme. Hydrophobic cavity for substrate binding was found in vicinity of the enzyme active site and non-bonding interactions required for catalysis were described, as well as the effect of L78F mutation on those interactions.

(35 pages, 35 figures, 1 table, 23 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: GDSL hydrolases, enantioselectivity, molecular dynamics, Monte Carlo conformational search

Supervisor: doc. dr. sc. Branimir Bertoša

Reviewers: doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić
doc. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Thesis accepted: 30th April 2015.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 GDSL hidrolaze	1
1.2 Ibuprofen i naproksen	2
1.3 Mehanizam katalitičke trijade	3
1.4 Ispitivanje enantioselektivnosti	4
2. Materijali i metode	5
2.1 Teorijska osnova Monte Carlo konformacijske pretrage i simulacija molekulske dinamike	5
2.1.1. Monte Carlo konformacijska pretraga	6
2.1.2. Molekulska dinamika	8
2.2 Korištene strukture i postavke za pretrage i simulacije	8
3. Rezultati	11
3.1 Simulacija divljeg tipa enzima <i>TesA</i> i derivata <i>R</i> -ibuprofena	13
3.2 Simulacija mutante enzima <i>TesA</i> i derivata <i>R</i> -ibuprofena	15
3.3 Simulacija divljeg tipa enzima <i>TesA</i> i derivata <i>R</i> -naproksena	19
3.4 Simulacija mutante enzima <i>TesA</i> i derivata <i>R</i> -naproksena	22
3.5 Simulacija divljeg tipa enzima <i>TesA</i> i derivata <i>S</i> -ibuprofena.....	24
3.6 Simulacija mutante enzima <i>TesA</i> i derivata <i>S</i> -ibuprofena.....	26
3.7 Simulacija divljeg tipa enzima <i>TesA</i> i derivata <i>S</i> -naproksena.....	28
3.8 Simulacija mutante enzima <i>TesA</i> i derivata <i>S</i> -naproksena	29
4. Rasprava	30
5. Zaključak	32
6. Literatura	33
7. Životopis	35

1. Uvod

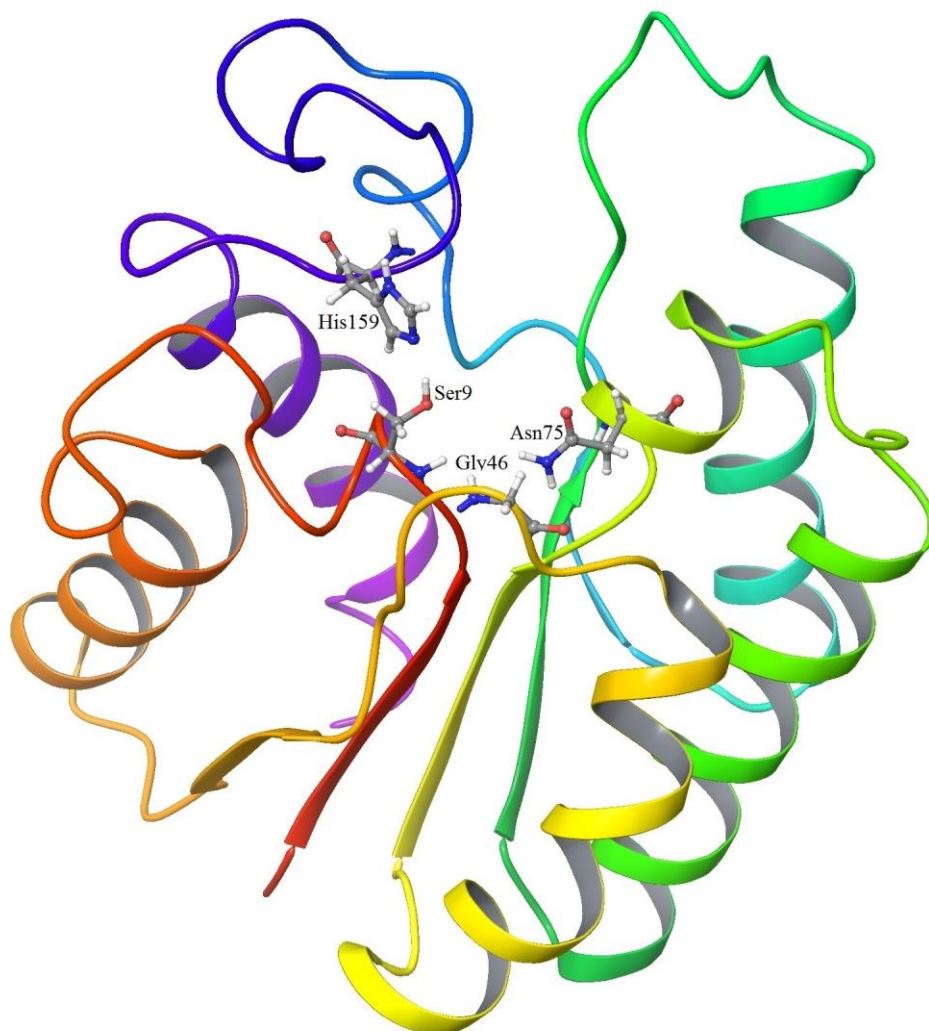
1.1 GDSL hidrolaze

GDSL hidrolaze su skupina enzima prvi put opisana prije 20 godina (Upton i Buckley 1995). Prema tada dostupnim rezultatima, klasificirani su kao lipaze sa specifičnim Gly-Asp-Ser-Leu (GDSL) strukturnim motivom, različitim od GX SXG motiva karakterističnog za brojne druge lipolitičke enzime. Četiri očuvane aminokiseline, Ser, Gly, Asn i His, dijelovi su katalitičke trijade i ključne su za hidrolitičku aktivnost, zbog čega je ova skupina enzima klasificirana pod novim imenom SGNH hidrolaze (Akoh i sur. 2004). Serin iz navedenog strukturnog motiva ima ulogu nukleofila i nalazi se bliže N-terminusu nego je to slučaj kod ostalih opisanih lipaza, a Gly i Asn stvaraju oksianionsku šupljinu (Leščić Ašler i sur. 2010). Histidin ima ulogu baze/kiseline u katalizi (Polgár 2005).

Funkcije GDSL hidrolaza su raznovrsne: osim lipolitičke uloge, enzimi ove skupine pokazuju proteaznu, arilesteraznu, tioesteraznu, lizofosfolipaznu i aciltransferaznu ulogu. Međutim, ne samo da različiti proteini sa SGNH strukturnim motivom imaju raznovrsne uloge, već i enzimi ove skupine pokazuju široku supstratnu specifičnost te jedan enzim može katalizirati reakcije sa različitim supstratima (Leščić Ašler i sur. 2010). Također, proteaza I/tioesteraza I/lizofosfolipaza L₁ (TAP) iz bakterije *Escherichia coli*, enzim koji je najviše korišten za istraživanje strukture i funkcije enzima ove skupine pokazuje enantioselektivnost prema supstratima (Leščić Ašler i sur. 2010). Mogućnost enantioselektivne hidrolize raznovrsnih supstrata korištenjem samo jednog enzima može doprinijeti razumijevanju odnosa strukture i funkcije proteina i naći praktičnu primjenu u biotehnologiji.

Acil-CoA tioesteraza I (TesA) je enzim iz patogene bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, lokaliziran u periplazmi bakterijskih stanica. Funkcionalna struktura je monomer građen od peterostruke β -ploče okružene sa pet α -zavojnica i tri 3_{10} zavojnice (slika 1). Takva $\alpha/\beta/\alpha$ struktura karakteristična je za GDSL porodicu enzima. Katalitičku trijadu čine Ser9, Asp156 i His159, a Gly46 i Asn75 stabiliziraju oksianion kovalentnog intermedijera i enzima. Osim strukturnih motiva, sa enzimima GDSL porodice dijeli i sličnosti u 3D strukturi (Kovačić i sur. 2013.). Upravo zbog sličnosti multifunkcionalnom enzimu TAP iz *Escherichie coli* TesA je dobio naziv acil-CoA tioesteraza. Tek je poslije eksperimentalno utvrđena njegova slaba tioesterazna aktivnost, dok najveću aktivnost pokazuje kao esteraza (Leščić Ašler i sur. 2010) te se

pretpostavlja da mu je fiziološka uloga regulacija sastava membranskih lipida (Kovačić i sur. 2013).

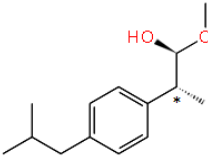
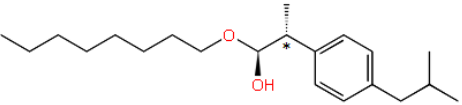
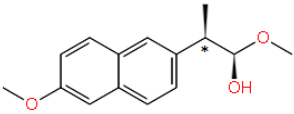
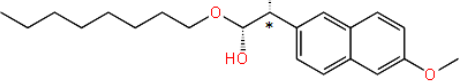


Slika 1. Struktura enzima TesA sa karakterističnim aminokiselinama SGNH motiva. Vizualizirano pomoću programa *Maestro* (Maestro 2010) prema kristalnoj strukturi (PDB kod: 4JGG).

1.2 Ibuprofen i naproksen

Ibuprofen (2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanska kiselina) i naproksen (2-(6-metoksinaftalen-2-il)propanska kiselina) (slika 2) dva su nesteroidna protuupalna lijeka široke primjene i velikog medicinskog i industrijskog značaja (Peterson i sur. 2010). Koriste se kao analgetici, a

djelovanje postižu blokiranjem ciklooksigenaza COX-1 i COX-2, ključnih enzima u sintezi prostaglandina. Oba su lijeka derivati 2-arilpropionske kiseline sa jednim kiralnim centrom na C_α atomu propionskog dijela molekule. Samo S-enantiomer je aktivan *in vivo*, ali u stanicama sisavaca je pronađen enzim 2-arilpropionil-CoA epimeraza koja neaktivni R-enantiomer epimerizira u aktivnu S-formu (Reichel i sur. 1997).

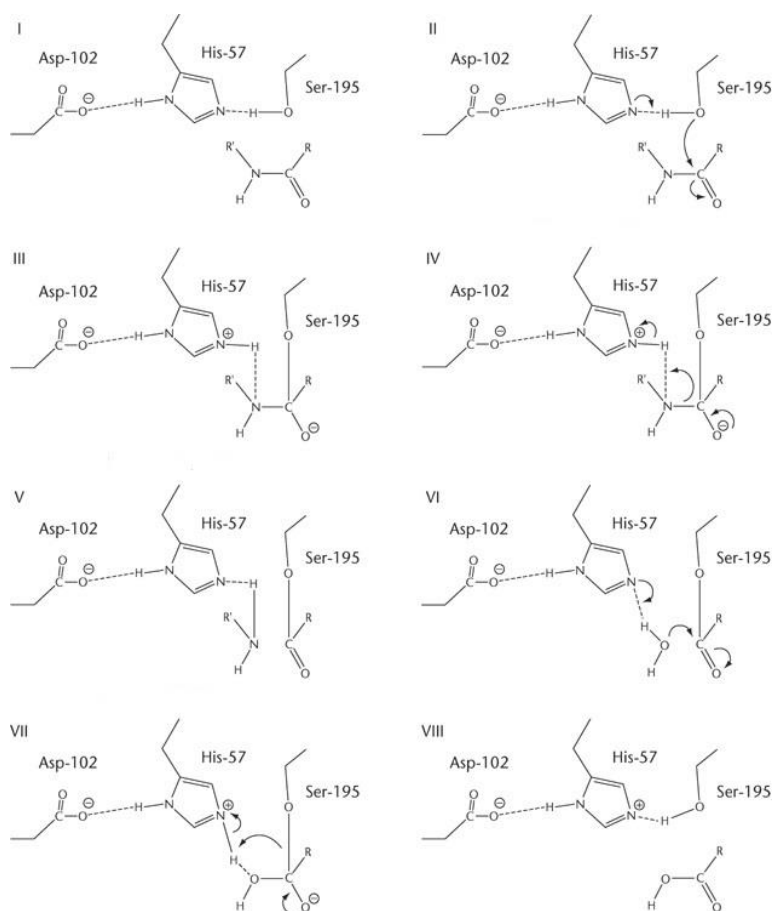
spojevi	struktura	konstruiran derivat
ibuprofen		
naproksen		

Slika 2. Strukture ibuprofena, naproksena i konstruiranih derivata s dodanim alifatskim lancem od 8 ugljikovih atoma. Oba lijeka i njihovi derivati imaju po jedan kiralni centar označen zvjezdicom. Vizualizirano pomoću programa *Maestro*.

1.3 Mehanizam katalitičke trijade

GDSL hidrolaze kataliziraju hidrolizu supstrata putem mehanizma katalitičke trijade koju čine serin, aspartat i histidin (Akoh i sur. 2004). Kod TesA katalitičku trijadu čine Ser9, His159 (dijelovi SGNH strukturnog motiva) i Asp156 (Kovačević i sur. 2013). Mehanizam se odvija u nekoliko koraka i uključuje nastanak kovalentnog intermedijera enzima i supstrata (slika 3). Prvi korak katalize je napad nukleofilnog serina na karbonilni atom supstrata čime nastaje tetraedarski intermedijer, gdje histidin ima ulogu baze i veže vodik serinove hidroksilne skupine. U sljedećem koraku taj se vodik donira prvoj izlaznoj skupini (amin ili alkohol, ovisno o tome je li supstrat peptid, odnosno ester). Nukleofilnim napadom molekule vode na karbonilni atom supstrata nastaje drugi tetraedarski intermedijer, a imidazolna skupina histidina ponovo ima ulogu baze jer veže jedan od vodika molekule vode. Taj se vodik u

zadnjem koraku reakcije donira serinovoj hidroksilnoj skupini što oslobađa drugu izlaznu skupinu i ponovno uspostavlja aktivno mjesto (Polgár 2005, Page i Cera 2007).



Slika 3. Mehanizam katalitičke trijade (preuzeto iz Page i Cera, 2007).

1.4. Ispitivanje enantioselektivnosti

Enzim TesA ne hidrolizira ibuprofen i naproksen (usmena komunikacija), stoga se eventualna enantioselektivna kataliza može postići sa derivatima ova dva spoja koji bi bili strukturno slični prirodnim supstratima enzima. Budući da enzim TesA najveću aktivnost pokazuje prema supstratima sa srednje dugim nerazgranatim alifatskim lancima koji imaju između 4 i 8 ugljikovih atoma (Lešćić Ašler i sur. 2010), konstruirani su derivati ibuprofena i naproksena sa nerazgranatim lancem od 8 ugljikovih atoma vezanim na estersku skupinu (slika 2).

Mogućnosti enantioselektivne hidrolize ibuprofena i naproksena ispitana je metodama računalne biokemije, konkretno Monte Carlo konformacijskom pretragom (MC) i simulacijama molekulske dinamike (MD). Metode se razlikuju u načinu pretraživanja

konformacijskog prostora proteina - MC generira strukture nasumičnim variranjem odabranih varijabli i njihovom energetsom optimizacijom prema jednadžbi polja sila, dok se kod MD simulacija atomima sustava daje kinetička energija i promatra njihovo kretanje i interakcije kroz vrijeme, također korištenjem jednadžbe polja sila. Energetski najpovoljnije strukture za sva četiri sustava kovalentnog kompleksa enzima i intermedijera supstrata - TesA sa R- i S-enantiomerom derivata svakog lijeka, nađene MC pretragom korištene su kao polazne strukture za MD simulacije. Također, u energetski najpovoljnije strukture iz MC pretrage uvedena je L78F mutacija i ispitan je njen učinak na interakcije enzima i intermedijera supstrata (dalje u tekstu za mutirani enzim koristi se kratica L78F TesA). MD simulacijama promatrana je dinamika sustava i promjene nekovalentnih interakcija tijekom trajektorije. Vjerojatnost hidrolize, odnosno produktivnog vezanja, za svaki od intermedijera ocijenjena je prema stvorenim interakcijama i njihovoj stabilnosti.

2. Materijali i Metode

2.1. Teorijska osnova Monte Carlo konformacijske pretrage i simulacija molekulske dinamike

Monte Carlo konformacijska pretraga (MC) i simulacija molekulske dinamike (MD) dvije su računalne metode za istraživanje strukture makromolekula. Čestice sustava, najčešće pojedinačni atomi, predstavljeni su skupom parametara koji opisuju njihova svojstva, a potencijalna energija atoma se računa funkcionalom koji objedinjuje modele kovalentnih i nekovalentnih međuatomskih interakcija. Parametri i funkcional zajedno se nazivaju polje sila. Postoje različita polja sila, prilagođena različitim sustavima.

Osnovna postavka metoda je računanje potencijalne energije sustava, koja se može izraziti kao zbroj potencijalnih energija kovalentnih i nekovalentnih interakcija.

$$E_{\text{ukupna}} = E_{\text{kovalent.}} + E_{\text{nekovalent.}}$$

Kovalentne interakcije uključuju energiju kovalentnih veza, valentnih i torzijskih kuteva, a u nekovalentne interakcije pripadaju van der Waals i elektrostatske interakcije te se može pisati

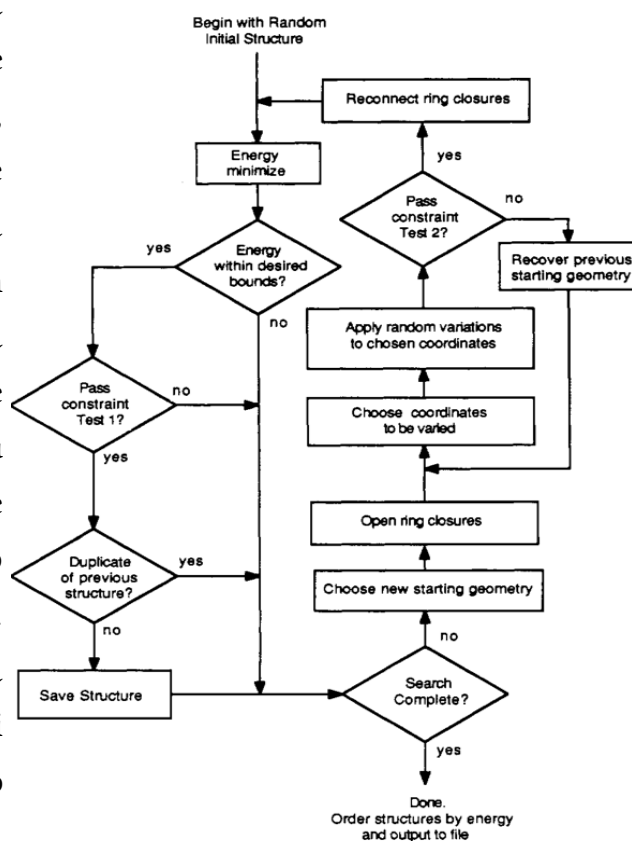
$$E_{\text{ukupna}} = E_{\text{veze}} + E_{\text{kut}} + E_{\text{tors}} + E_{\text{el.}} + E_{\text{vdw}}$$

Za računanje međuatomskih interakcija koriste se aproksimacije koje omogućuju korištenje rješenja iz klasične mehanike. Atomi se modeliraju kao kugle stalnog volumena i točkastog naboja, a za kovalentnu vezu koristi se model harmoničkog oscilatora. Potencijalna energija računa se za svaki pojedini atom ili skupinu atoma (u poljima sila gdje se neke funkcionalne skupine atoma parametriziraju kao jedna čestica, *united atom*), a derivacijom potencijalne energije dobije se sila koja djeluje na atome, što za MD omogućava rješavanje Newtonovih jednadžbi gibanja.

Ovakvo modeliranje atomskih sustava s pomoću klasične mehanike naziva se molekulska mehanika. Monte Carlo pretraga koristi ovaj pristup za računanje potencijalne energije generiranih konformacija proteina, na temelju čega se prihvaćaju ili odbacuju. Za molekulsku dinamiku se derivacijom potencijalne energije u odnosu na položaj dobije vektor sile preko kojeg se računa položaj atoma za sljedeći korak simulacije, što daje vremenski sukcesivne strukture i omogućuje praćenje dinamičnih procesa.

2.1.1. Monte Carlo konformacijska pretraga

Monte Carlo konformacijska pretraga često je korištena metoda za pronalaženje energetski najpovoljnijih struktura proteina, odnosno minimuma funkcije potencijalne energije sustava. Metoda se temelji na nasumičnom variranju vrijednosti odabranih varijabli, najčešće torzijskih kuteva, za generiranje struktura. Dobivene strukture zatim prolaze energetsku minimizaciju (optimizaciju geometrije) - kako bi se uklonili nepovoljni kontakti i interakcije, kao primjerice preklapanje položaja atoma. Struktura se zatim prihvaća ili odbacuje na temelju usporedbe energije polazne i dobivene strukture pomoću Monte Carlo kriterija (slika 4, Chang i sur. 1989).



Slika 4. Shema Monte Carlo konformacijske pretrage (preuzeto iz Chang i sur. 1989).

Prvi faza jednog koraka Monte Carlo pretrage je generiranje nove konformacije proteina iz početne nasumičnim mijenjanjem odabrane varijable. Jedna od opcija je mijenjanje koordinata pojedinih atoma i energetska optimizacija ostalih atoma sustava, ali to se pokazalo nepraktičnim za makromolekule - kako su kovalentne veze stabilne duljine, pomicanje jednog atoma može za sobom povući velik dio molekule i generiranje nove strukture može uzeti puno računalnog vremena. Češće je korištena metoda mijenjanja vrijednosti torzijskih kuteva - budući da međuatomske veze i kutevi ne variraju puno, torzijski kutevi su unutarnje koordinate proteina koje najviše variraju među konformerima. Također, mijenjanje vrijednosti torzijskih kuteva zahtjeva manje računalnog vremena od variranja tri prostorne koordinate svakog atoma, što olakšava temeljitu pretragu konformacijskog prostora i smanjuje vrijeme pretrage (Chang i sur. 1989).

Nakon geometrijske optimizacije nove strukture njezina se potencijalna energija uspoređuje sa polaznom i na temelju njihove razlike izračuna se vjerojatnost prijelaza iz jedne konformacije u drugu. Ukoliko nova struktura ima manju energiju, pohranjuje se kao valjana i prihvaća za polaznu strukturu sljedećeg MC koraka. Ako nova struktura ima veću potencijalnu energiju, ali unutar energetske okvira određenog prije pretrage, prolazi evaluaciju Monte Carlo kriterijem: generira se pseudonasumičan broj između 0 i 1 i ako je broj manji od vjerojatnosti za prijelaz između konformacija, struktura se prihvaća. Na taj se način strukture lokalnih i globalnog minimuma automatski prihvaćaju, a energetske manje povoljne strukture se prihvaćaju ovisno o tome koliko je vjerojatno da protein zauzme takvu konformaciju. Strukture za koje je razlika potencijalne energije veća od granice zadane na početku simulacije automatski se odbacuju (Earl i Deem, 2008).

Kako nasumično variranje torzijskih kuteva može dovesti do velikih konformacijskih promjena između dva koraka, eksplicitni model otapala nije praktičan, budući da bi energetska minimizacija strukture uključivala optimiranje interakcija velikog broja pojedinačnih molekula vode, što bi usporilo pretragu. Također, te bi interakcije utjecale na ukupnu potencijalnu energiju sustava i mogle smanjiti vjerojatnost prihvaćanja validnih struktura. Zbog toga se za konformacijske pretrage koristi implicitni model otapala, gdje ne postoje diskretne molekule već se otapalo promatra kao kontinuum pripadne opisane dielektrične konstante (Chang i sur. 1989).

2.1.2. Molekulska dinamika

Molekulska dinamika je metoda simuliranja kretanja i interakcija atoma i molekula. Kao i kod Monte Carlo pretrage, jednačba polja sila daje potencijalnu energiju, iz koje se zatim derivacijom može izračunati sila f koja djeluje na svaki pojedini atom:

$$m_i \ddot{\mathbf{r}}_i = \mathbf{f}_i \quad \mathbf{f}_i = -\frac{\partial}{\partial \mathbf{r}_i} \mathcal{U}$$

gdje je \mathcal{U} potencijalna energija i \mathbf{r} set trodimenzionalnih koordinata atoma. Prema vektoru sile računa se položaj atoma za sljedeći korak simulacije. Nakon svakog koraka ponovno se evaluira veličina i smjer sile prema kojoj će se računati sljedeća struktura (Allen, 2004). Ukupan slijed položaja, odnosno trajektorija, predstavlja ponašanje sustava kroz vrijeme (budući da se nove strukture generiraju rješavanjem jednačbi gibanja, a ne nasumičnim variranjem parametara).

Za MD simulacije koristi se eksplicitni model otapala sa diskretnim molekulama vode - budući da termičko gibanje otapala ima velik utjecaj na konformacijsku dinamiku proteina putem međuatomskim sudara, na taj se način vjernije modelira atomsko kretanje nego korištenjem kontinuiranog otapala. Također, u eksplicitnom modelu otapala molekule vode imaju naboj što omogućuje ispitivanje strukturne uloge polarnih interakcija proteina i otapala. Nedostatak modela je veći zahtjev za računalnim vremenom, jer u solvatiranom sustavu postoji velik broj molekula vode, za koje se jednačba gibanja računa jednako kao i za atome proteina (Adcock i McCammon, 2006).

2.2. Korištene strukture i postavke za pretrage i simulacije

Kristalna struktura apo oblika enzima TesA iz bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (RefSeq kod: NP_251546; PDB kod: 4JGG) modificirana je dodavanjem vodikovih atoma pomoću *WHAT IF* programa (Vriend 1990) te korištena za izgradnju kovalentnih intermedijera enzima i supstrata. Ti intermedijeri su bili početne strukture za MC pretrage. Ukupno je konstruirano četiri intermedijera, po jedan R- i S-enantiomer derivata ibuprofena i naproksena, koji su dobiveni zamjenom esterski vezane metilne skupine za zasićeni nerazgranati lanac od 8 ugljikovih atoma (dalje u tekstu korištene su kratice za naziv intermedijera - IR8 i IS8 za R- i S-enantiomere ibuprofena sa dodanim lancem od 8 ugljikovih atoma, odnosno NR8 i NS8 za

derivate naproksena). Nakon parametrizacije, kovalentno su vezani preko ugljika esterske skupine na γ -kisik Ser9 koji služi kao nukleofil u mehanizmu katalitičke trijade. Izgradnja, parametrizacija i vezanje intermedijera napravljeno je u modulu *MacroModel* programa *Maestro* (Mohamadi 1990, Maestro 2010).

U ovom radu korišteno je Amber polje sila (Case i sur. 2008) za sve MC konformacijske pretrage i simulacije molekulske dinamike jer je najbolje prilagođeno za simulacije makromolekulskih sustava. Za dio MD simulacija napravljen u programu *Gromacs* (van der Spoel i sur. 2004) korištena je ff99SB verzija Amber polja sila (Hornak i sur. 2006).

Za MC pretrage korišten je Generalised Born-Surface Accessible (GB/SA) implicitan model otapala sa stalnom dielektričnom konstantom. Provedene su za komplekse enzima divljeg tipa sa sva četiri konstruirana intermedijera u programu *MacroModel*. Svaka se pretraga sastojala od 10000 koraka u kojima su varirane vrijednosti 5 do 12 torzijskih kuteva intermedijera i Ser9. Atomi udaljeni više od 10 Å od aktivnog mjesta su fiksirani kako bi se skratilo vrijeme pretrage. Aminokiseline aktivnog mjesta (Ser9, Gly46, Asn75, Asp156, His159) i intermedijer su izabrani za komparaciju struktura kako bi se utvrdilo koliko je puta tijekom pretrage pronađena identična konformacija.

Za energetske optimizacije struktura dobivenih svakim korakom, odnosno pronalaženje lokalnog minimuma potencijalne energije najbližeg dobivenoj strukturi, koristio se algoritam najstrmijeg spusta (eng. *steepest descent (SD)*) za grubu optimizaciju i nakon njega Polak–Ribière algoritam konjugiranih gradijenata (eng. *PR Conjugate Gradient*) za finiju pretragu. Postavljen je energetska prozor od 20 kJ/mol za spremanje struktura.

S pomoću programa *Maestro* analizirane su međuatomske udaljenosti kod strukture globalnog minimuma i energetske bliskih struktura kako bi se utvrdile strukturne komponentne bitne za vezanje intermedijera, mogućnost katalitičke reakcije i potencijalne mutacije koje bi pospješile vezanje.

Ulazne strukture za simulacije MD dobivene su MC pretragom (L78F mutacija uvedena je s pomoću programa *Maestro* u energetske najpovoljniju strukturu pretrage sa enzimom divljeg tipa). Prije pokretanja simulacija MD, intermedijer je parametriziran s pomoću modula *Antechamber* programskog paketa *AMBER* (Wang i sur. 2006). Dodavanje nepolarnih vodikovih atoma, kovalentno povezivanje enzima i intermedijera, neutralizacija naboja sustava i solvatacija sustava napravljeni su u programu *tleap* iz programskog paketa *AMBER*. Sustav je solvatiziran TIP3P modelom molekule vode unutar paralelopipeda duljine brida 10 Å. Naboj je neutraliziran dodavanjem natrijevih iona. Simulacije su trajale ukupno 20 ns, a provedene su u koracima od 1 fs. Sve su simulacije provedene pod uvjetima 300 K i 1 bar sa Berendsenovim

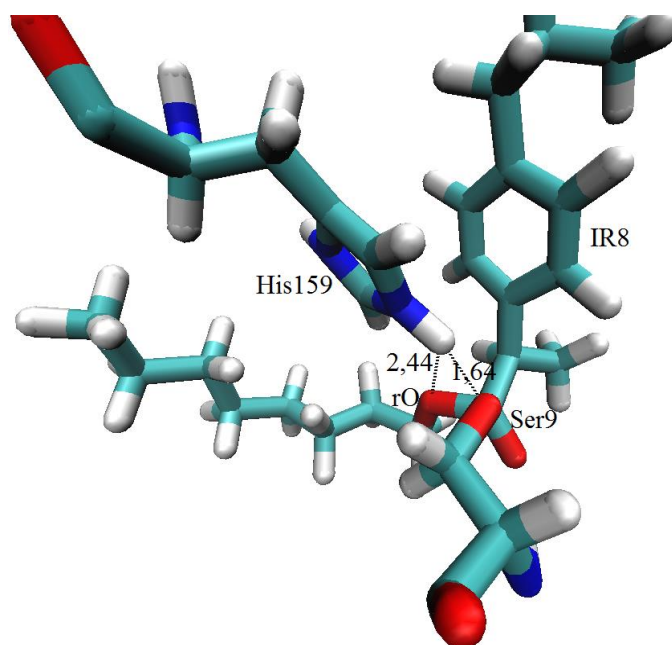
termostatom i barostatom te navedenim eksplicitnim modelom otapala. Elektrostatske interakcije su računate Particle Mesh Ewald (PME) metodom. Simulacije su provedene pod periodičnim graničnim uvjetima, a za nevezne interakcije korištena je granična vrijednost (eng. *cut-off*) od 10 Å.

Ekvilibracija sustava provedena je u *AMBER*-u tako da je u prvih 300 ps kretanje atoma proteina i intermedijera ograničeno potencijalom od 100 kcal/(mol/Å²), a molekulama vode je dozvoljeno kretanje. Sljedećih 200 ps potencijal je uklonjen. Nakon ekvibracije, simulacije su nastavljene u *Gromacs*-u do 20 ns. Međuatomske udaljenosti, dinamika neveznih interakcija i fluktuacije aminokiselina i intermedijera analizirani su s pomoću alata programa *Gromacs* i programa *VMD* (Humphrey i sur. 1996).

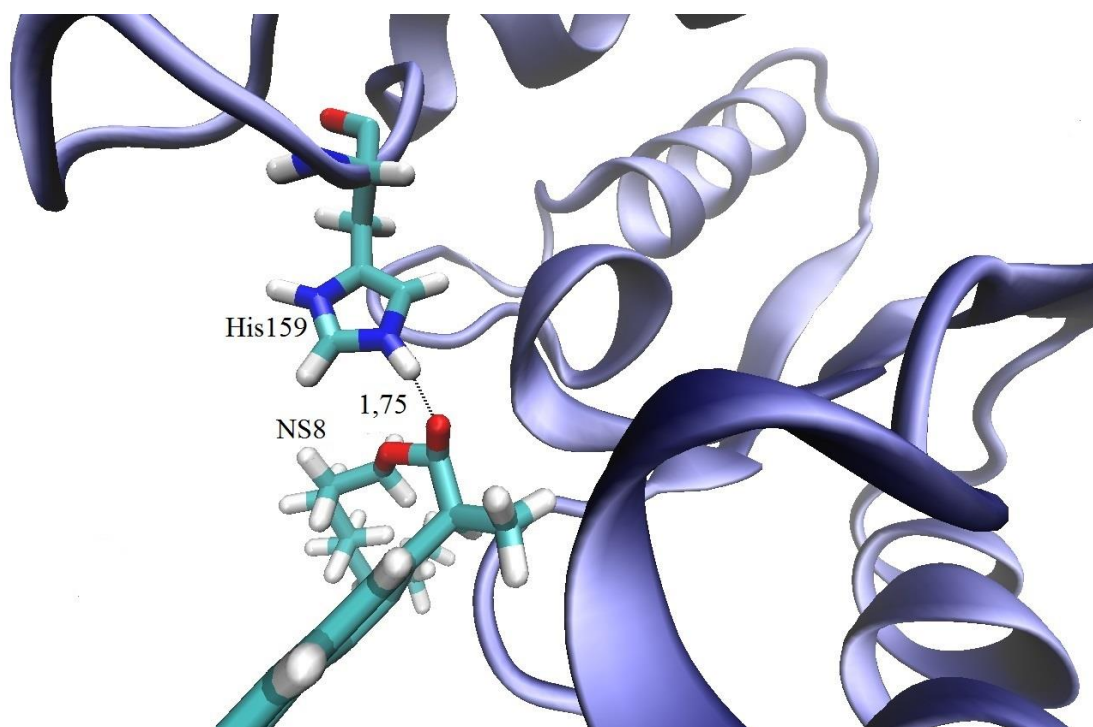
3. Rezultati

Rezultati MC pretraga i simulacija MD pokazali su da postoji mogućnost enantioselektivne hidrolize R-ibuprofena i R-naproksena sa divljim tipom enzima TesA i mutantom L78F. Međutim, u simulacijama divljeg tipa TesA γ -kisik Ser9, na kojeg je vezan intermedijer, nalazi se bliže ϵ -vodiku His159 nego kisik esterske skupine intermedijera (dalje u tekstu rO) (slika 5). Doniranje ϵ -vodika His159 sljedeći je korak reakcijskog mehanizma nakon nastanka kovalentnog intermedijera, a kako se kroz većinu simulacija divljeg tipa enzima s IR8 His159 nalazi bliže Ser9 nego rO, veća je vjerojatnost da će se dogoditi reakcija uklanjanja nepromijenjenog supstrata iz aktivnog mjesta nego hidroliza intermedijera. L78F mutacija uvodi skupinu koja može stvoriti dodatne nepolarne interakcije sa intermedijerom i pospješiti vezanje jer je aminokiselinski ostatak fenilalanina veći od leucina, koji se nalazi na poziciji 78 u divljem tipu enzima. Također, kod mutiranog TesA sa vezanim IR8 i NR8 Ser9 se ne nalazi dovoljno blizu His159 za reakciju te su ti derivati dobri supstrati za L78F TesA.

Zajednička karakteristika S-enantiomera ibuprofena i naproksena je stabilizacija oksianiona s pomoću vodikove veze s His159 umjesto aminokiselinama oksianionske šupljine (slika 6). Doniranje histidinovog protona uključenog u tu vodikovu vezu ključan je dio mehanizma katalitičke trijade, zbog čega hidrolitička reakcija sa S-enantiomerima nije moguća.



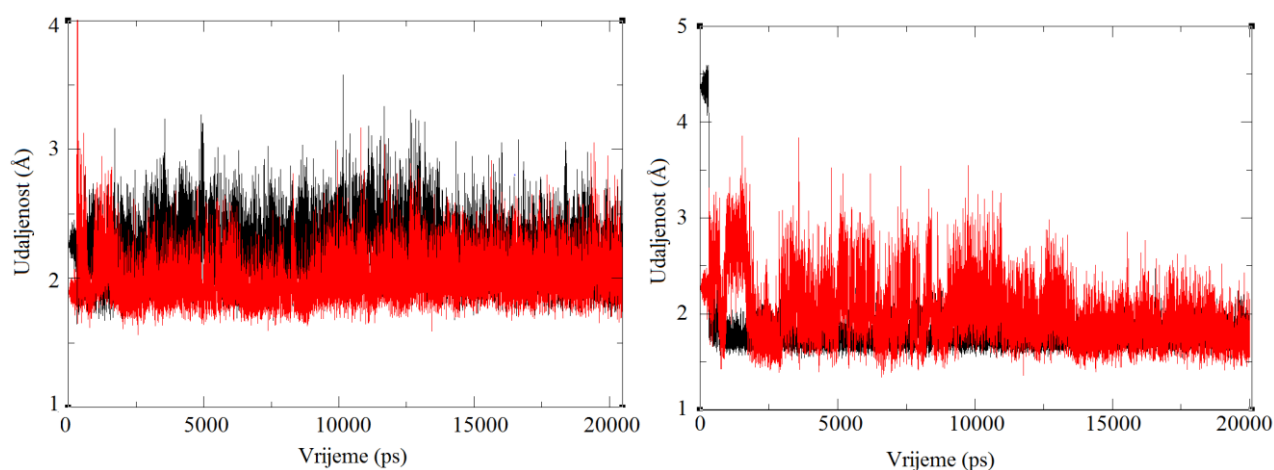
Slika 5. Udaljenosti ϵ -vodika His159 od rO i γ -kisika Ser9, struktura dobivena nakon 5 ns simulacije molekulske dinamike divljeg tipa TesA sa derivatom R-ibuprofena. Udaljenosti su izražene u Å.



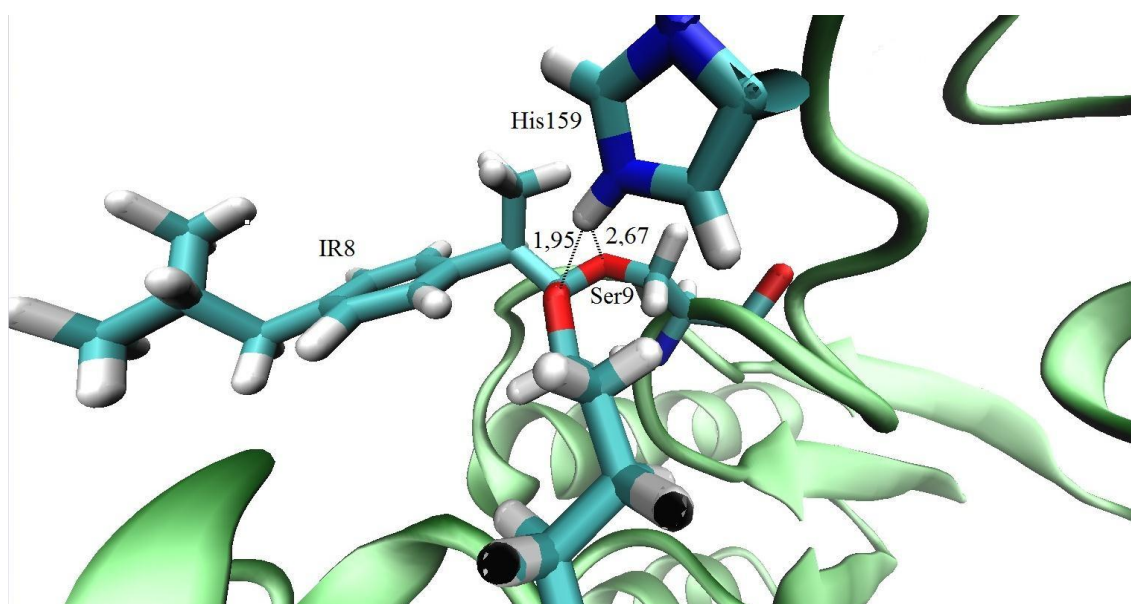
Slika 6. Stabilizacija oksianiona, struktura dobivena nakon 5 ns simulacije molekulske dinamike kompleksa enzima TesA s derivatom S-naproksena. Udaljenost je izražena u Å. Interakcije oksianiona sa His159 zajedničke su svim simuliranim strukturama S-enantiomera.

3.1. Simulacija divljeg tipa *TesA* i derivata *R*-ibuprofena

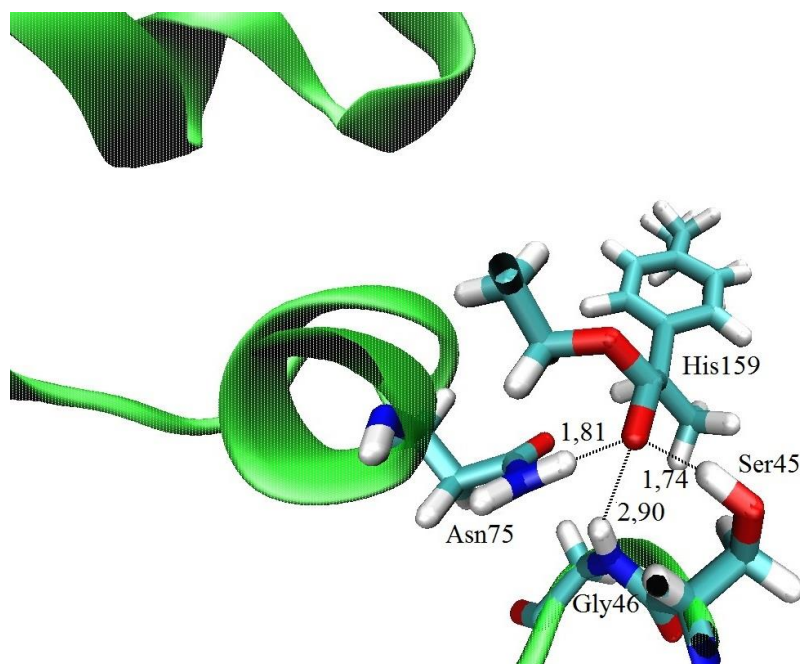
U simulaciji derivata *R*-ibuprofena oksianion je stabiliziran s pomoću Ser45 i Asn75, a esterski kisik intermedijera dostupan je imidazolnoj skupini His159. Međutim, ϵ -vodik His159 se kroz gotovo cijelu simulaciju nalazi bliže γ -kisiku Ser9, zbog čega je vjerojatnija reakcija uklanjanja nemodificiranog supstrata iz aktivnog mjesta (slike 7 i 8). Stabilizacija oksianiona razlikuje se od predviđene kristalnom strukturom, budući da u njoj sudjeluje Ser45 umjesto Gly46 iz SGNH strukturnog motiva (slika 9).



Slika 7. Lijevo - Udaljenosti ϵ -vodika His159 od γ -kisika Ser9 (crveno) i rO (crno) kroz simulaciju divljeg tipa enzima s derivatom *R*-ibuprofena. **Desno** - Udaljenosti Asn75 (crveno) i Ser45 (crno) od oksianiona intermedijera.

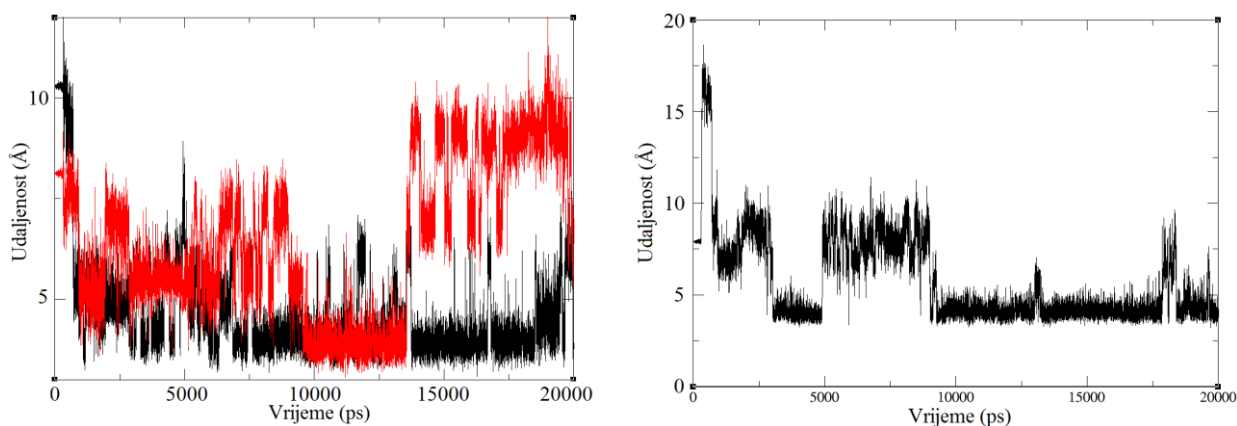


Slika 8. Udaljenosti ϵ -vodika His159 od γ -kisika Ser9 i kisika esterske skupine tetraedarskog intermedijera, struktura dobivena nakon 18 ns simulacije molekulske dinamike.

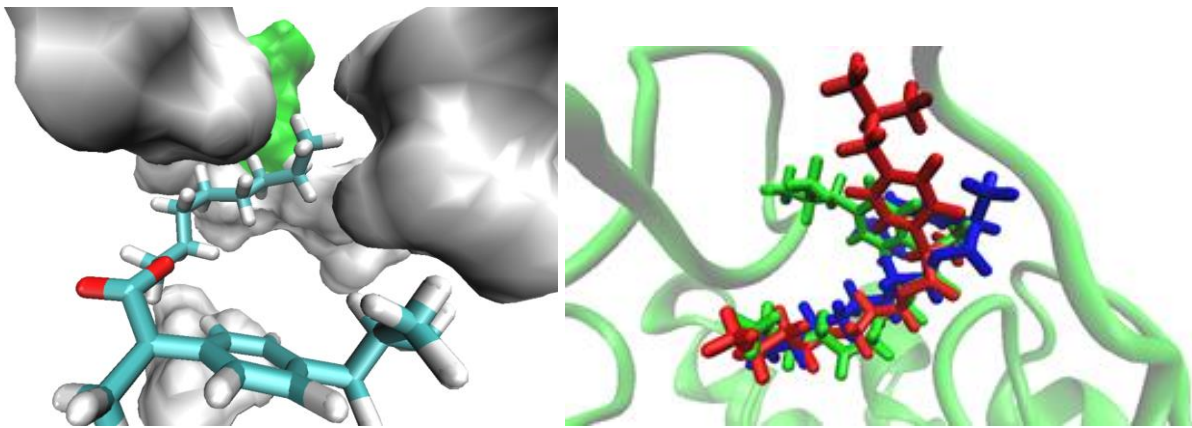


Slika 9. Stabilizacija oksianiona, struktura dobivena nakon 18 ns simulacije molekulske dinamike. Oksianion stvara jake vodikove veze sa Ser45 i Asn75.

Fenilni prsten intermedijera nije čvrsto vezan te su Leu14 i Leu78 jedine aminokiseline u njegovoj blizini (slika 10). Van der Waals interakcije se većinom ostvaruju s Leu78, a interakcije s Leu14 su manje stabilne. Izopropilna skupina vezana na fenilni prsten stvara interakcije s Gly157 koje su stabilne kroz drugih 10 ns simulacije. S druge strane, alifatski lanac je kroz svih 20 ns stabilno vezan u hidrofobni džep kojeg čine Ile10, Gly74, Leu78, Leu111, Pro112, Leu143, Met153 i Ile158 (slika 11).



Slika 10. Nepolarne interakcije IR8. **Lijevo** - Interakcije aromatskog prstena intermedijera. Leu14 (crveno) i Leu78 (crno) jedine su aminokiseline u blizini aromatske skupine intermedijera. **Desno** – interakcije izopropilne skupine tetraedarskog intermedijera vezane na fenilni prsten s Gly157.

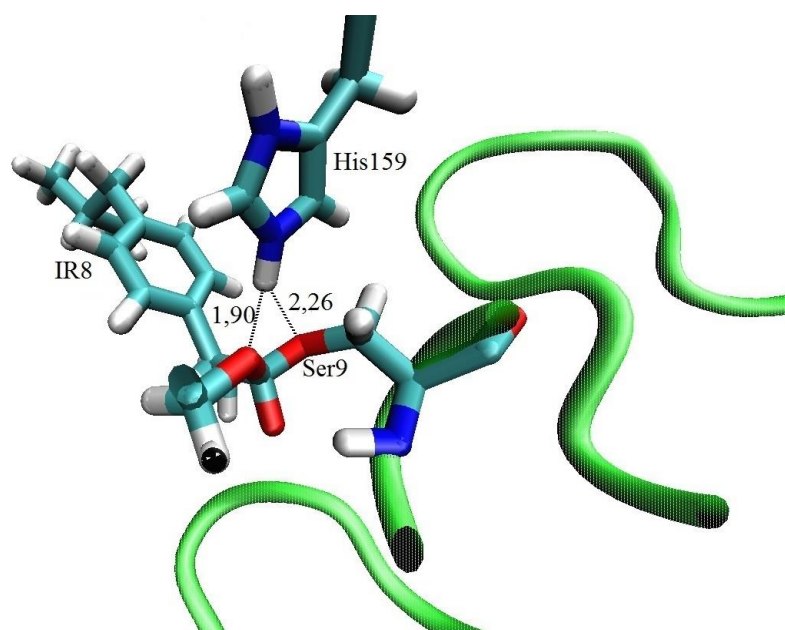


Slika 11. Lijevo – alifatski lanac okružen aminokiselinama hidrofobnog džepa, struktura dobivena na 10 ns simulacije molekulske dinamike. **Desno** - Položaj tetraedarskog intermedijera na 0 ns (plavo), 5 ns (crveno) i 10 ns (zeleno) simulacije molekulske dinamike. Alifatski lanac malo fluktuirá (prosječna vrijednost fluktuacije tijekom simulacije iznosi 0,09 Å) i čvrsto je vezan u hidrofobni džep.

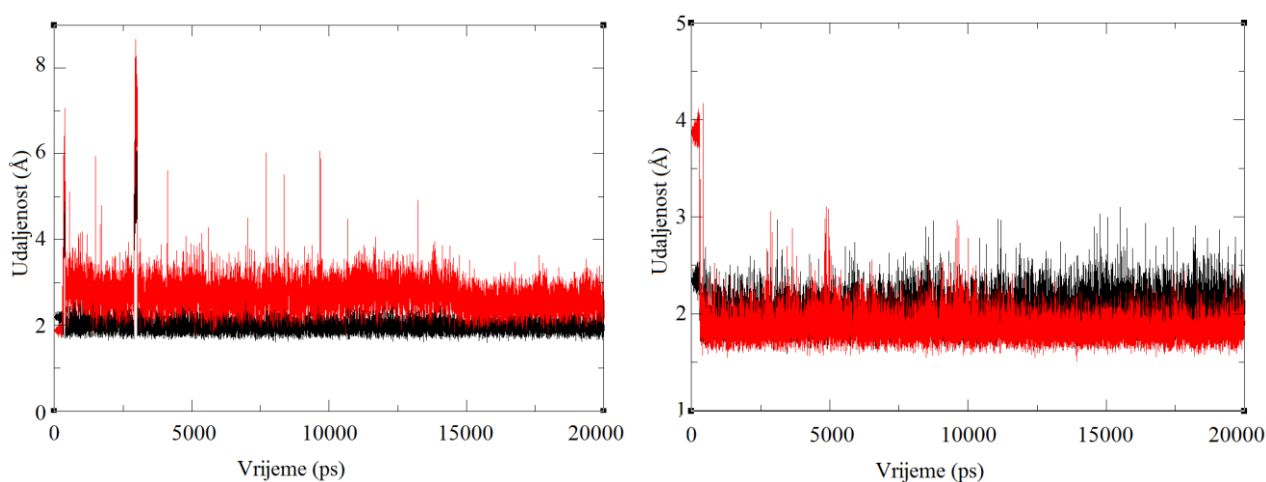
3.2. Simulacija mutante enzima *TesA* i derivata *R-ibuprofena*

Esterski kisik tetraedarskog intermedijera nalazi se na odgovarajućoj udaljenosti za katalitičku reakciju, a kroz cijelu simulaciju γ -kisik Ser9 je udaljen više od 2 Å od His159, zbog čega Ser9 ne kompetira intermedijeru supstrata za katalitičku reakciju te reakcija uklanjanja nemodificiranog supstrata nije vjerojatna (slika 12 i 13). Stabilizacija oksianiona odgovara predviđenoj kristalnom strukturu, budući da u njoj sudjeluju Gly46 i Asn75 (slika 13).

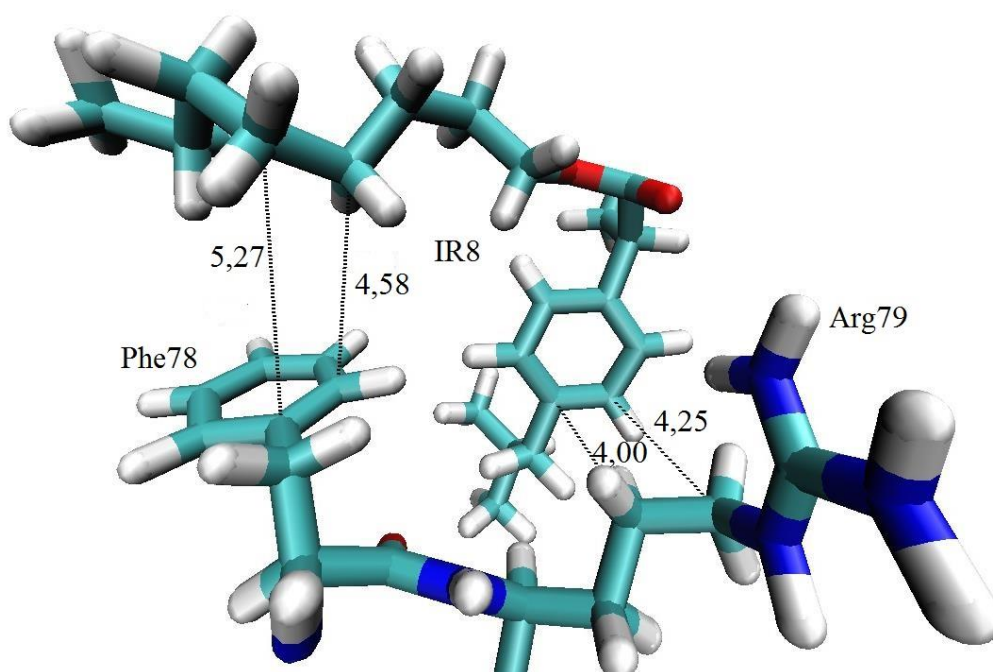
Mutacijom uvedeni fenilalanin na položaju 78 utječe na stabilnije vezanje intermedijera, uglavnom putem interakcija sa alifatskim lancem, a manje interakcijama s fenilnim prstenom (slika 14). Iako je Phe78 kroz cijelu simulaciju udaljen manje od 5 Å od aromatske skupine intermedijera, njihove interakcije nisu jako stabilne jer dolazi do rotacija fenilalaninske skupine što se može vidjeti iz oscilacija pojedinačnih ugljik-ugljik udaljenosti Phe78 i IR8 (Slika 15). Kroz većinu simulacije Phe78 se nalazi na odgovarajućoj udaljenosti od hidrofobnog lanca intermedijera za van der Waals interakcije. Kako je lanac stabilno vezan u hidrofobni džep koji čine Ile10, Gly74, Leu78, Leu111, Pro112, Leu143, Met153 i Ile158 (slika 16), oscilacije u udaljenosti uglavnom su uzrokovane fluktuiranjem položaja Phe78. Aromatski prsten se prvenstveno stabilizira C_γ i C_δ ugljikovim atomima aminokiselinskog ostatka Arg79 (slike 14 i 17).



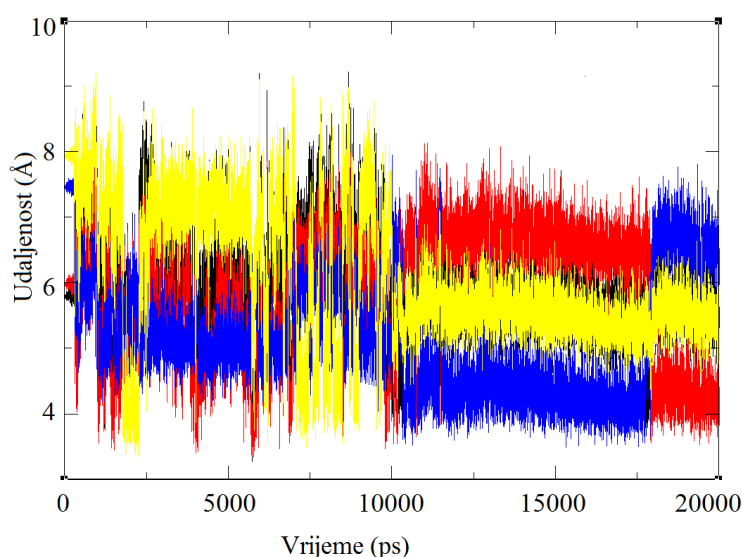
Slika 12. Udaljenosti His159 od esterskog kisika tetraedarskog intermedijera i γ -kisika Ser9, struktura dobivena nakon 10 ns simulacije molekulske dinamike. Udaljenosti su izražene u Å. ϵ -vodik His159 nalazi se na odgovarajućoj udaljenosti za katalitičku reakciju kroz cijelu simulaciju.



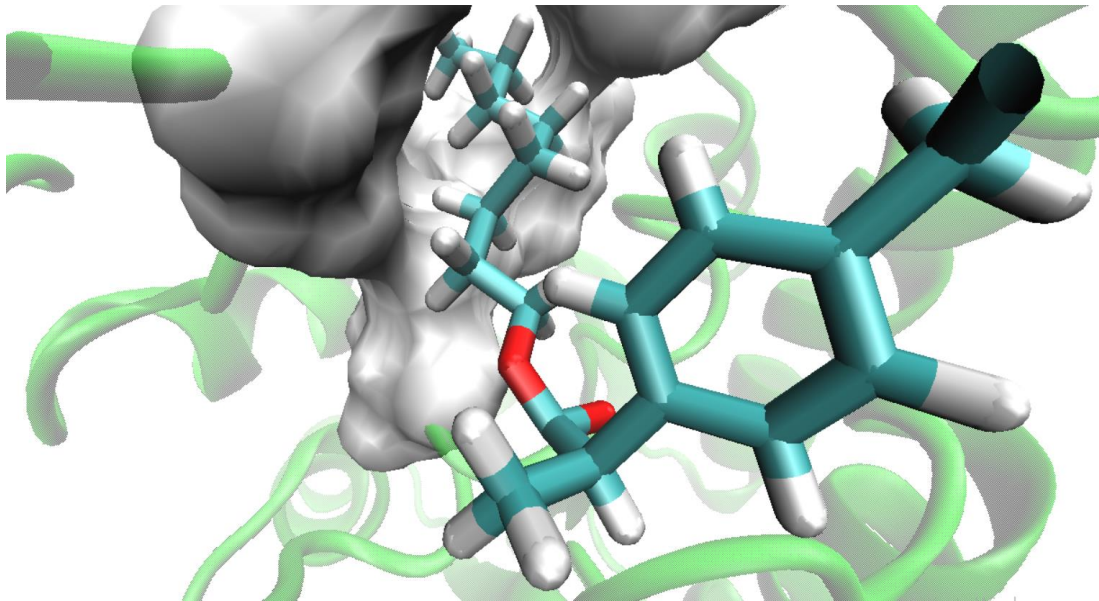
Slika 13. Lijevo - simulacija molekulske dinamike derivata R-ibuprofena sa mutiranim enzimom L78F TesA, udaljenosti ϵ -vodika His159 od esterskog kisika intermedijera supstrata (crno) i γ -kisika Ser9 (crveno). Većinu vremena simulacije udaljenost His159 i kisika intermedijera je manja od 2 Å, što je odgovarajuća udaljenost za vodikovu vezu, odnosno doniranje protona i katalitzu. **Desno** – udaljenosti oksianiona od Gly46 (crno) i Asn75 (crveno).



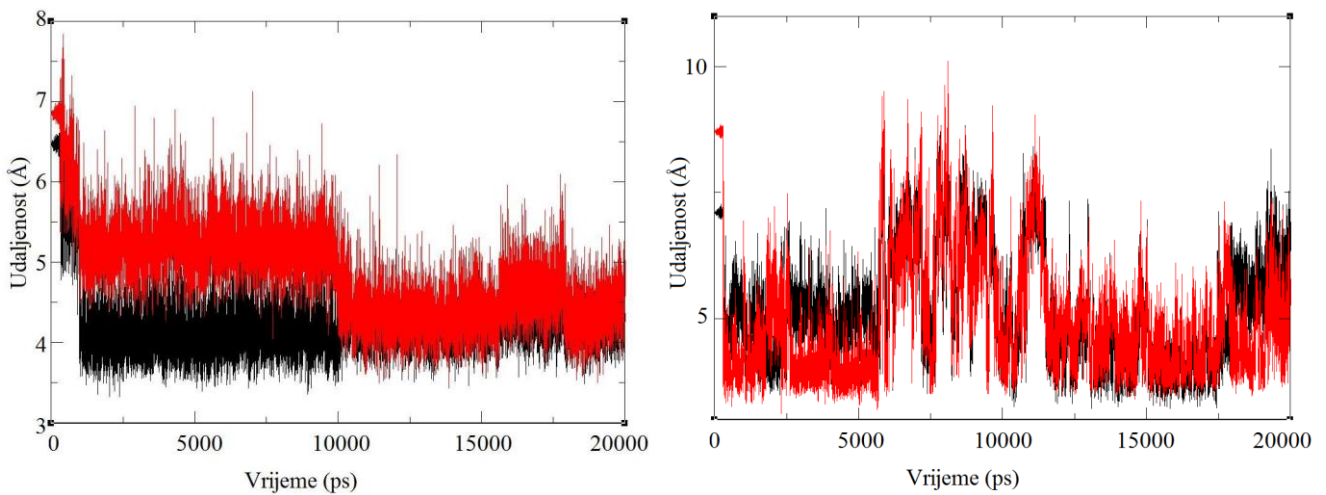
Slika 14. Nekovalentne interakcije IR8 sa L78F TesA, struktura dobivena na 20 ns simulacije molekulske dinamike. Udaljenosti su izražene u Å. Iako se Phe78 i aromatski prsten tetraedarskog intermedijera nalaze dovoljno blizu za van der Waalsove interakcije, fenilni se prsten stabilizira s nepolarnim dijelom aminokiselinskog ostatka Arg79, dok Leu78 stvara interakcije sa alifatskim lancem intermedijera.



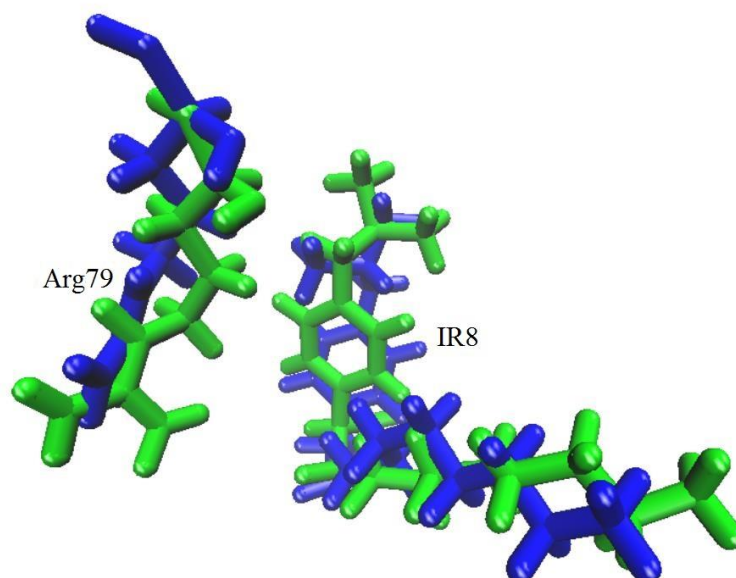
Slika 15. Udaljenost fenilnog prstena intermedijera i Phe78 mjerena preko udaljenosti njihovih najbližih ugljikovih atoma. Pojedinačne udaljenosti ugljikovih atoma prstena i aminokiselinskog ostatka Phe78 variraju zbog rotacija fenilalaninskog prstena, ali kroz svih 20 ns simulacije aromatska skupina intermedijera ostvaruje najmanje dva van der Waals kontakta sa Phe78.



Slika 16. Vežanje alifatskog lanca u hidrofobni džep enzima, struktura dobivena na 15 ns simulacije molekulske dinamike. Lanac je vezan u istu hidrofobnu šupljinu kao i kod simulacija IR8 i IS8 sa divljim tipom enzima.



Slika 17. Lijevo - Udaljenosti fenilnog prstena IR8 od Arg79. Fenilni prsten intermedijera supstrata stvara stabilne interakcije sa nepolarnim dijelom aminokiselinkog ostatka Arg79. **Desno** – Udaljenosti Phe78 od alifatskog lanca intermedijera.

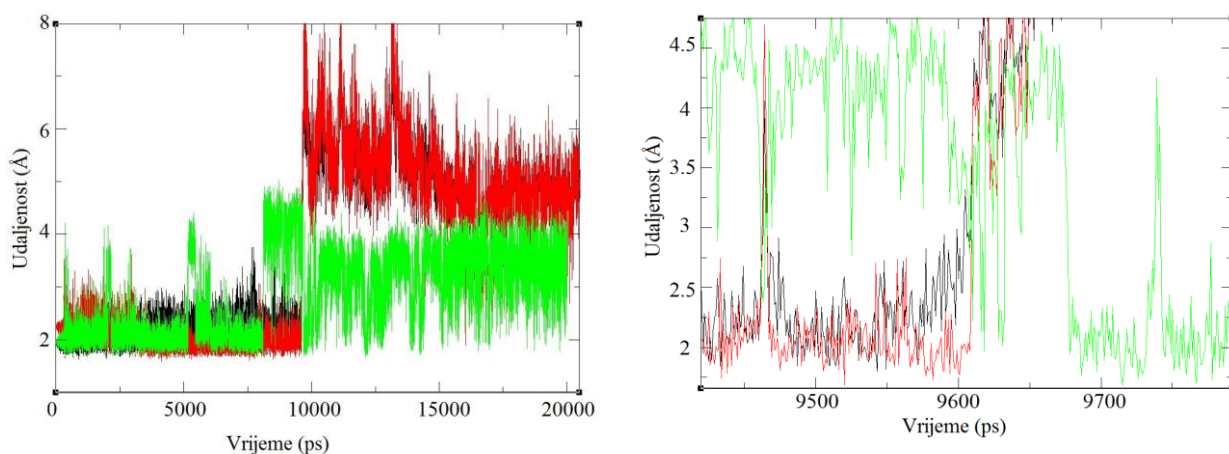


Slika 18. Superpozicija položaja IR8 i Arg79 na 0 (plavo) i 20 (zeleno) ns simulacije molekulske dinamike. Alifatski je lanac stabilno smješten u hidrofobnoj šupljini (prosječna vrijednost fluktuacije tijekom simulacije iznosi 0,10 Å), a fenilni prsten uglavnom ne mijenja položaj zbog stabilnih interakcija sa Arg79.

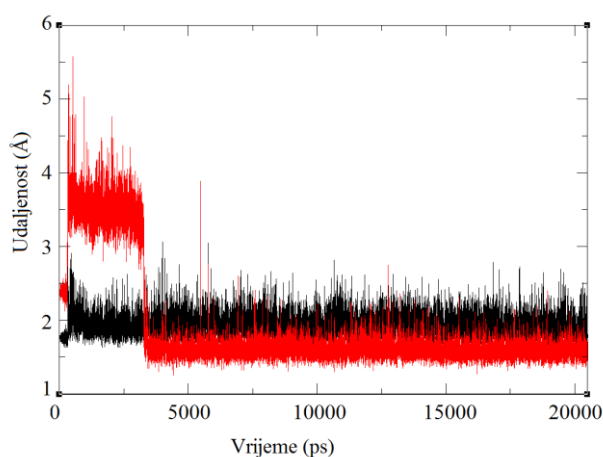
3.3 Simulacija divljeg tipa enzima *TesA* i derivata *R*-naproksena

U strukturi globalnog minimuma pronađenoj MC pretragom enzima *TesA* divljeg tipa sa derivatom *R*-naproksena tetraedarski intermedijer je povoljno smješten za stvaranje vodikovih veza potrebnih za katalizu. Međutim, kroz MD simulaciju se zbog fluktuacija strukture enzima His159 udalji od esterskog kisika intermedijera na više od 3 Å što onemogućuje hidrolizu (slika 19). Udaljenost His159 od Ser9 i na njega vezanog intermedijera je stabilna tijekom prvih 10 ns MD simulacije, nakon čega dolazi do naglog skoka, najvjerojatnije uzrokovanog oscilacijama vodikovih veza u proteinskoj okosnici između aminokiselina 154-159, od čega je najočitija promjena vodikove veze His159-Gly157. U isto vrijeme (~9700 ps) kada se imidazolna skupina udaljava od aktivnog mjesta, ova udaljenost u proteinskoj okosnici pada sa više od 4 Å na manje od 2 Å. Nakon konformacijske promjene koja dokida produktivno vezanje, His159-Gly157 udaljenost i dalje oscilira, ali aminokiselinski ostatak His159 se više ne približava intermedijeru.

Oksianion je stabiliziran s Gly46 iz SGNH strukturnog motiva i susjednim Ser45 (slika 20).

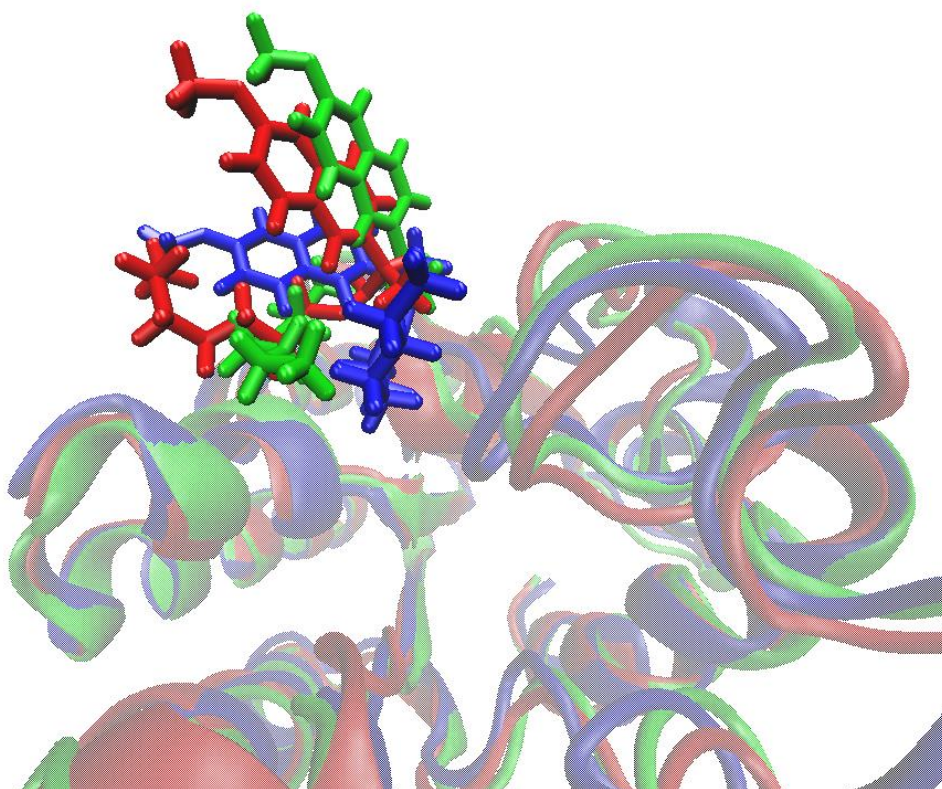


Slika 19. Lijevo - udaljenosti ϵ -vodika His159 od esterskog kisika tetraedarskog intermedijera (rO - crno), γ -kisika Ser9 (crveno) i udaljenost vodika amino skupine proteinske okosnice His159 od karboksilnog kisika proteinske okosnice Gly157 (zeleno). **Desno** – Detaljan prikaz udaljenosti sa slike lijevo oko 9700 ps.

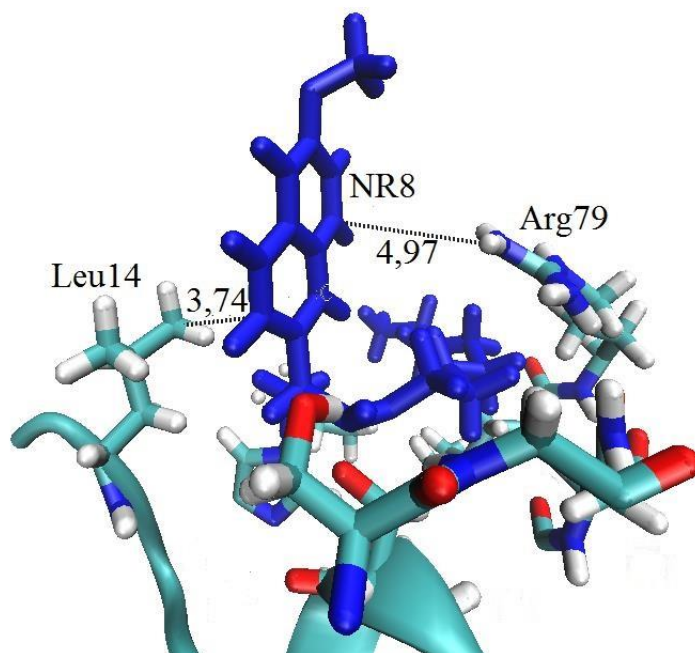


Slika 20. Udaljenosti Gly46 (crno) i Ser45 (crveno) od oksianiona. Oksianion je stabiliziran s Gly46 iz SGNH strukturnog motiva i susjednim Ser45.

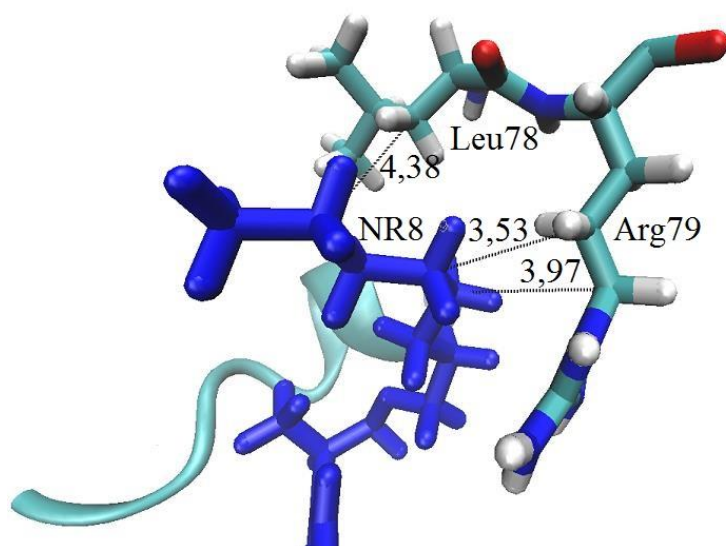
Niti pretragom MC, niti simulacijom MD nije pronađen način vezanja koji bi trajno stabilizirao intermedijer u aktivnom mjestu (slika 21). Samo se Leu14 i Arg79 nalaze u blizini aromatskog prstena kroz cijelu simulaciju, a eterski vezana metilna skupina se ne stabilizira ni sa kojom aminokiselinom (slika 22). Alifatski lanac se djelomično stabilizira s pomoću Leu78 i nepolarnim dijelom aminokiselinskog ostatka Arg79 (slika 23).



Slika 21. Superpozicija položaja intermedijera na 0 (plavo), 10 (crveno) i 20 (zeleno) ns simulacije molekulske dinamike. Intermedijer mijenja položaj i nekovalentne interakcije kroz simulaciju, što upućuje na nestabilno vezanje u aktivnom mjestu.



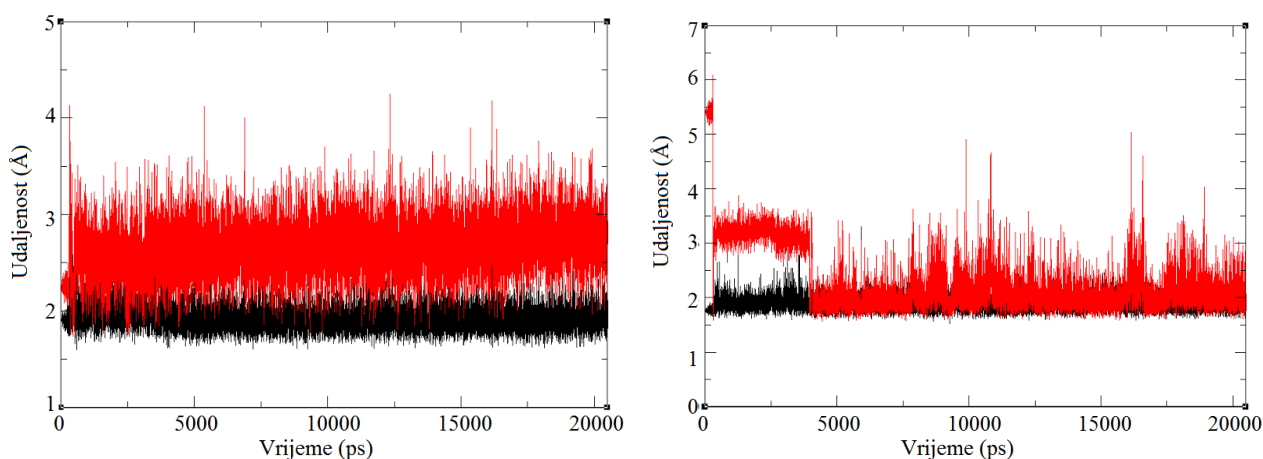
Slika 22. Simulacija molekulske dinamike divljeg tipa TesA s NR8, struktura dobivena nakon 20 ns. Udaljenosti su izražene u Å.



Slika 23. Simulacija molekulske dinamike divljeg tipa TesA s NR8, struktura dobivena nakon 20 ns. Udaljenosti su izražene u Å. Djelomična stabilizacija alifatskog lanca postiže se s Leu78 i nepolarnim dijelom aminokiselinskog ostatka Arg79.

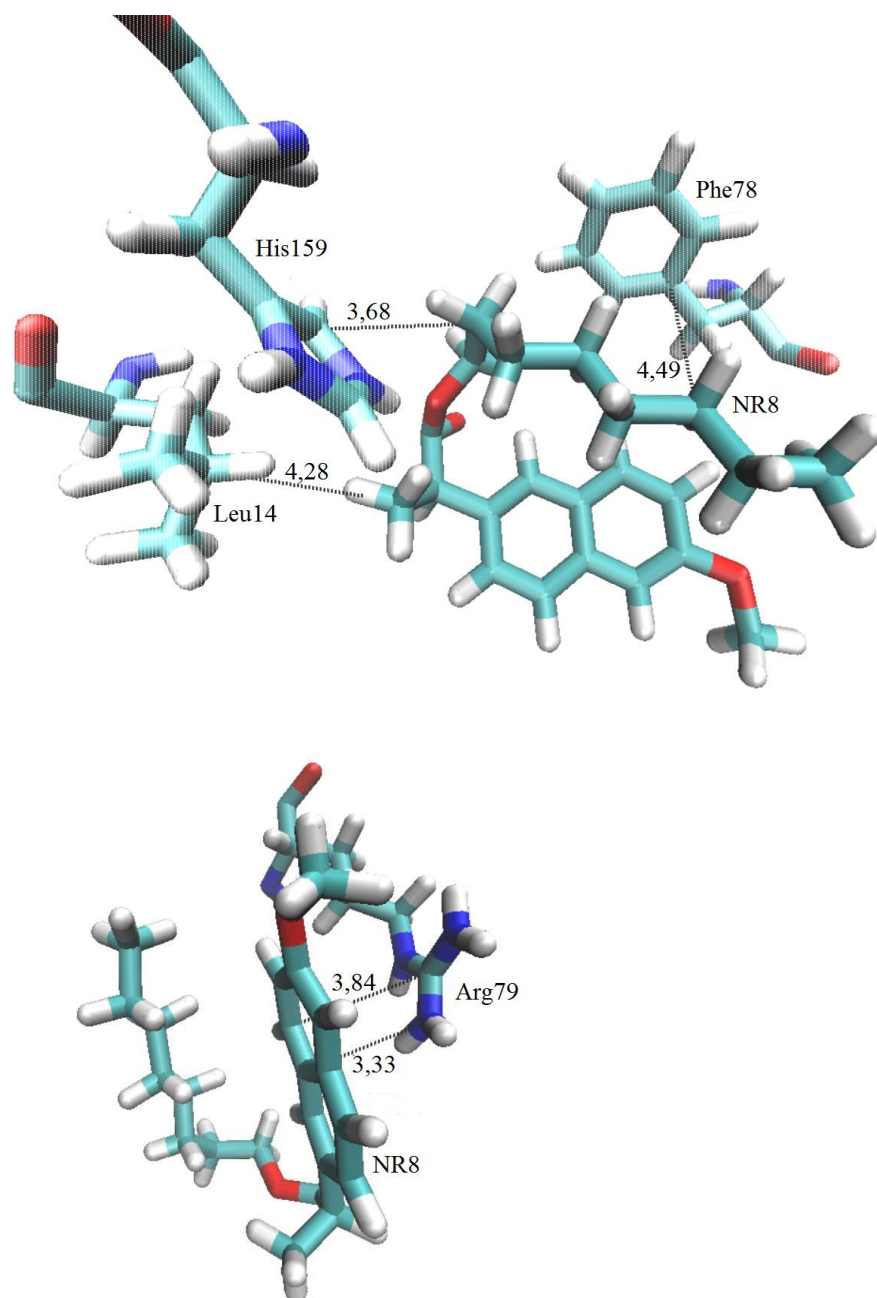
3.4 Simulacija mutante enzima *TesA* i derivata *R*-naproksena

Simulacijom derivata *R*-naproksena dobiveno je produktivno vezanje kod kojeg se može očekivati katalitička reakcija. ϵ -vodik His159 nalazi se kroz cijelu simulaciju na odgovarajućoj udaljenosti od esterskog kisika tetraedarskog intermedijera, a od γ -kisika Ser9 udaljen je više od 2 Å kroz cijelu simulaciju, što onemogućuje kompetirajuću reakciju uklanjanja nemođificiranog supstrata iz aktivnog mjesta. Oksianion se nalazi u Gly46-Asn75 oksianionskoj šupljini kroz cijelu simulaciju (slika 24).

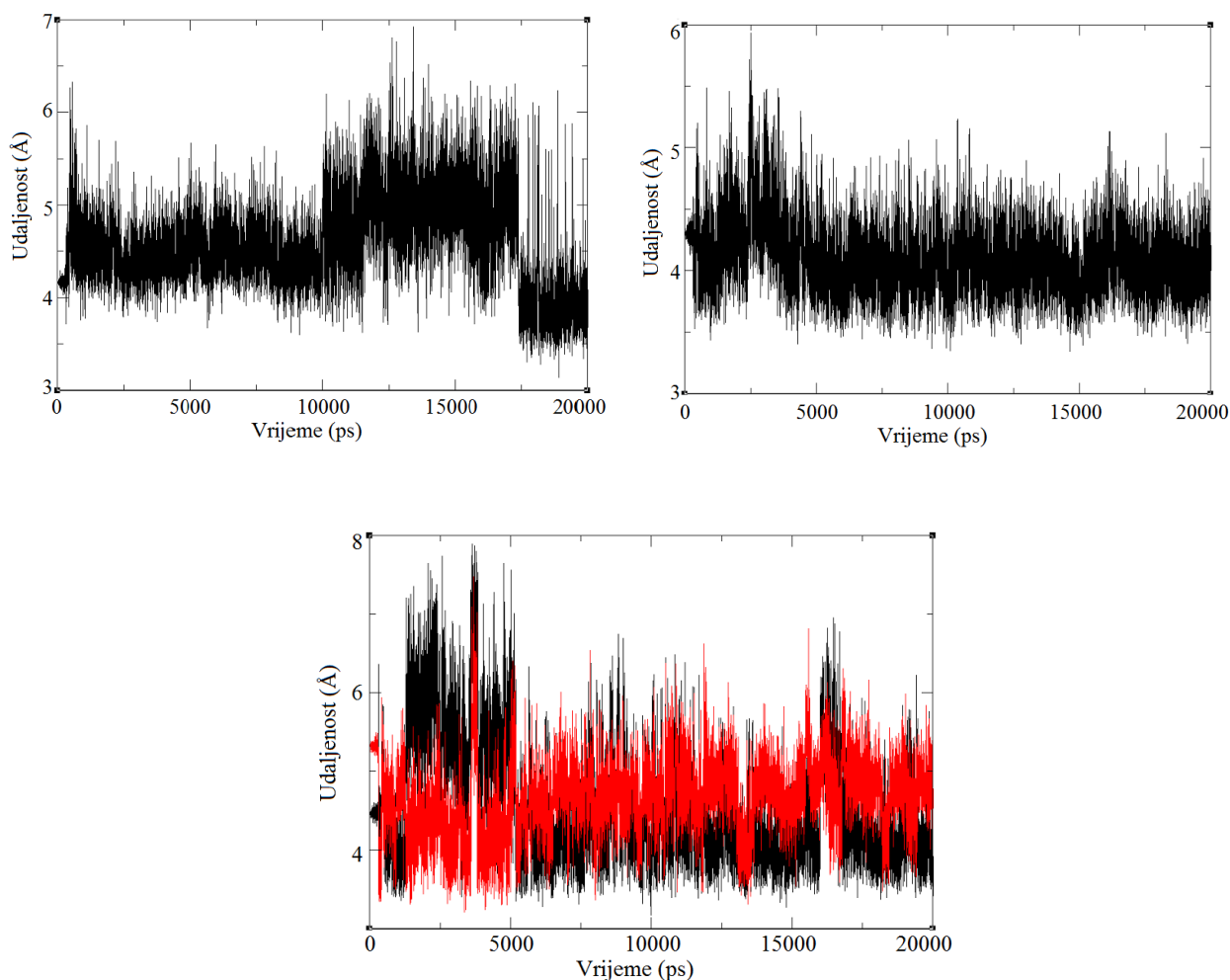


Slika 24. Lijevo - udaljenosti ϵ -vodika His159 od esterskog kisika intermedijera na kojem se odvija reakcija (rO) - crno, i γ -kisika Ser9 - crveno. Desno - udaljenosti Gly46 (crno) i Asn75 (crveno) od oksianiona.

Intermedijer je nepolarnim reakcijama čvrsto vezan u aktivno mjesto, iako alifatski lanac nije smješten u hidrofobnom džepu. Umjesto toga, lanac stvara interakcije sa mutacijom uvedenim Phe78 i sa imidazolnom skupinom His159 (slika 25). Naftalenski prsten intermedijera se kroz cijelu simulaciju stabilizira gvanidinskom skupinom Arg79, a metilna skupina je na stabilnoj udaljenosti za van der Waals interakcije od aminokiselinskog ostatka Leu14 (slika 26).



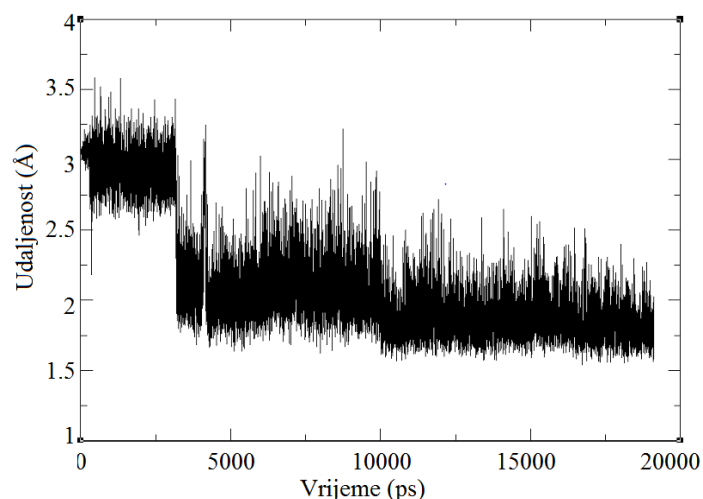
Slika 25. Stabilizacija derivata R-naproksena u aktivnom mjestu L78F mutante enzima TesA, struktura dobivena na 10 ns simulacije molekulske dinamike. Udaljenosti su izražene u Å. **Gore** – interakcije alifatskog lanca s Phe78 i His159 te metilne skupine sa Leu14. **Dolje** – interakcije naftalenskog prstena sa Arg79.



Slika 26. Udaljenosti aminokiselina od nepolarnih skupina intermedijera. **Gore lijevo** – udaljenost Leu14 od metilne skupine. **Gore desno** – udaljenost imidazolne skupine His159 od alifatskog lanca. **Dolje** – udaljenosti ugljikovih atoma Phe78 od alifatskog lanca. Mjerene udaljenosti su stabilne kroz trajanje simulacije i odgovarajuće za van der Waals interakcije aminokiselina i nepolarnih skupina intermedijera.

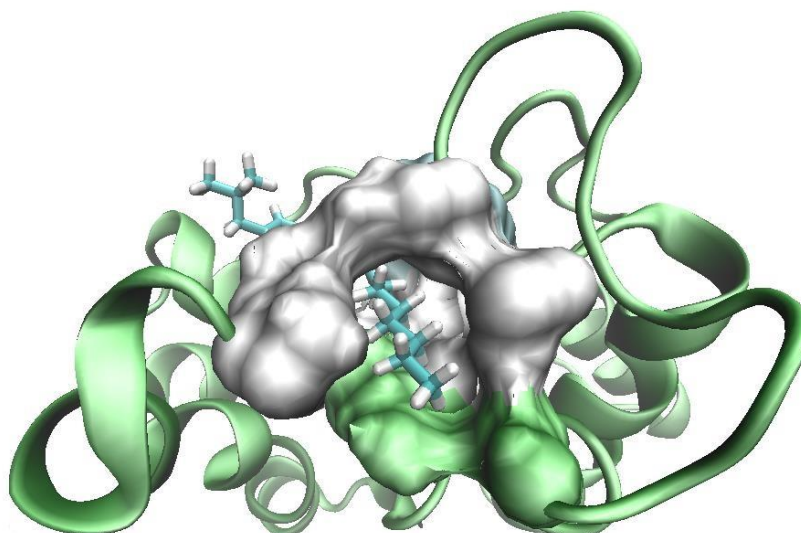
3.5 Simulacija divljeg tipa enzima *TesA* i derivata *S-ibuprofena*

Oksianion tetraedarskog intermedijera stabiliziran je vodikovom vezom s His159 (slika 27), što automatski isključuje mogućnost katalize budući da je doniranje histidinovog protona neophodan dio katalitičkog mehanizma, a u blizini oksianiona ne postoji druga aminokiselina koja bi ga stabilizirala.

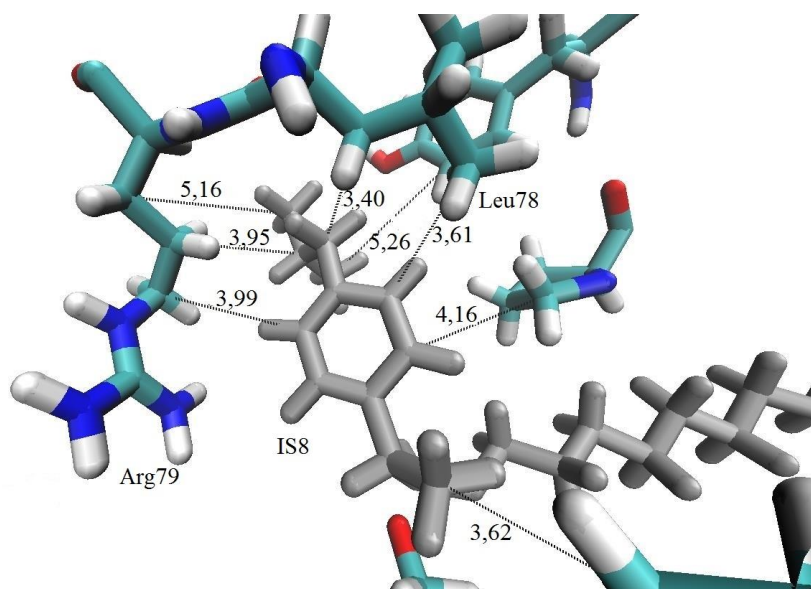


Slika 27. Udaljenost ϵ -vodika His159 i oksianiona kroz simulaciju molekulske dinamike sa derivatom S-ibuprofena. Oksianion je trajno stabiliziran sa His159.

Alifatski lanac IS8 je stabilno vezan u veliki hidrofobni džep kojeg čine Ile10, Gly74, Leu78, Leu111, Pro112, Leu143, Met153 i Ile158 (slika 28), a fenilni prsten sa izopropilnom skupinom stvara interakcije sa Leu78 i hidrofobnim dijelom bočnog ogranka Arg79 kroz svih 20 ns (slika 29). IS8 je stoga čvrsto vezan u aktivno mjesto enzima, iako ne postoji mogućnost katalitičke reakcije.



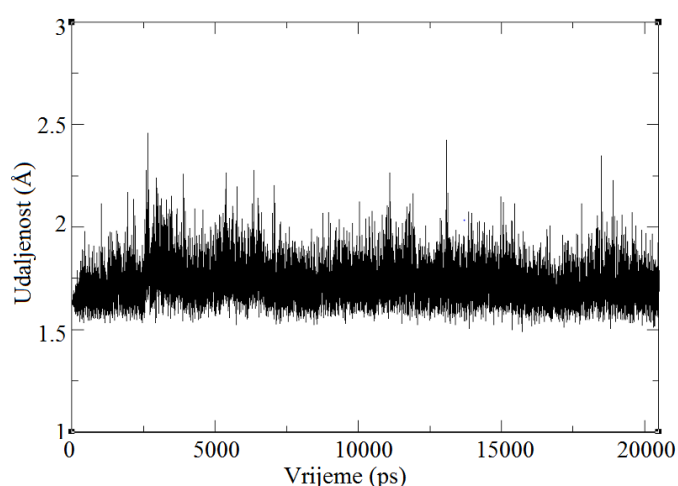
Slika 28. Nekovalentne interakcije derivata S-ibuprofena sa divljim tipom TesA, struktura dobivena nakon 20 ns simulacije molekulske dinamike. Bijelo i zeleno je označena površina koje stvaraju aminokiseline hidrofobnog džepa u kojeg se smjestio alifatski lanac intermedijera.



Slika 29. Nekovalentne interakcije derivata S-ibuprofena sa divljim tipom TesA, struktura dobivena na 20 ns simulacije molekulske dinamike. Udaljenosti su izražene u Å. Aromatski prsten sa vezanom izopropilnom skupinom nalazi se na odgovarajućoj udaljenosti za van der Waals interakcije s nepolarnim dijelom bočnog ogranka Arg79 i s Leu78.

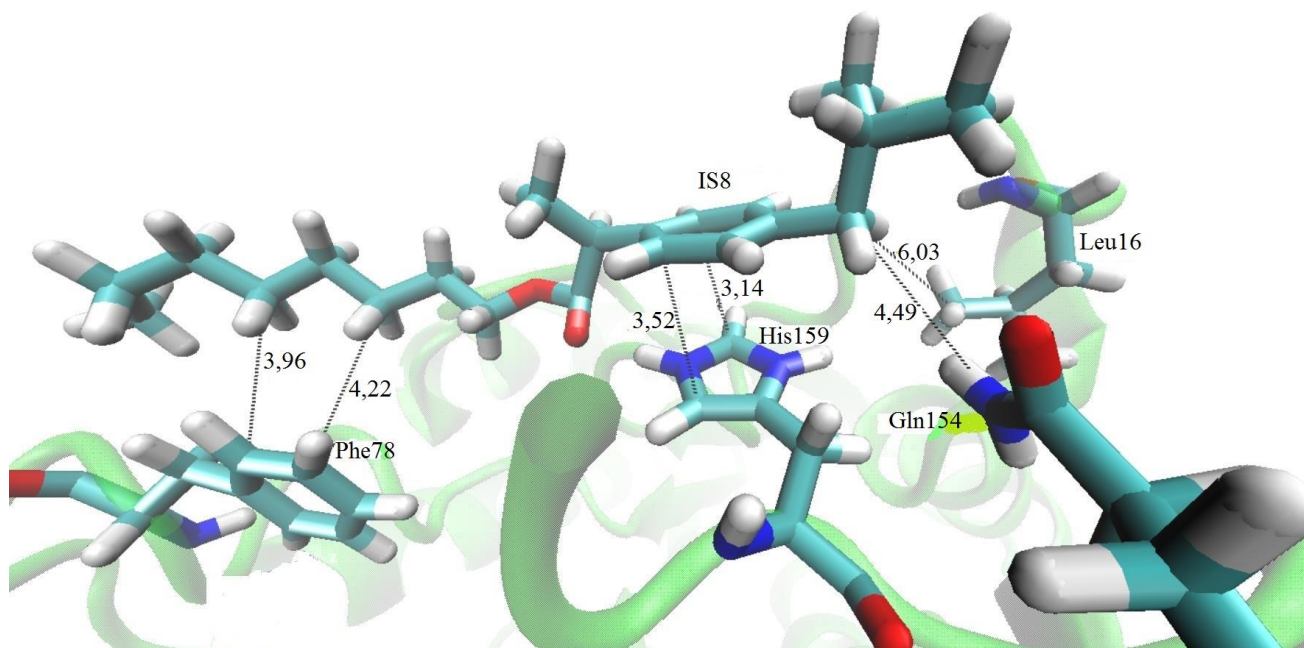
3.6. Simulacija mutante enzima TesA i derivata S-ibuprofena

Fenilalanin uveden mutacijom na položaju 78 uzrokovao je drugačiju dinamiku nekovalentnih interakcija enzima i tetraedarskog intermedijera u MD simulaciji. Međutim, oksianion je i u ovom sustavu stabiliziran s pomoću His159 te hidroliza intermedijera nije moguća (slika 30).



Slika 30. Udaljenost ϵ -vodika His159 i oksianiona intermedijera supstrata kroz simulaciju molekulske dinamike L78F mutante enzima TesA sa derivatom S-ibuprofena. Oksianion je trajno stabiliziran s His159.

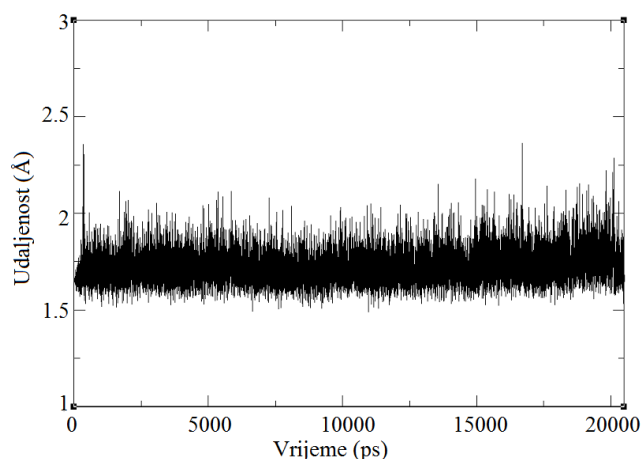
Aromatski prsten IS8 se kod L78F mutanta stabilizira uglavnom pomoću imidazolne skupine His159 te Gln154 i Leu16 (slika 31). Alifatski lanac nakon 20 ns nije vezan u hidrofobni džep već ostvaruje van der Waals interakcije sa površinskim aminokiselinama, uključujući i Phe78. Zbog manje čvrstog vezanja intermedijera, prvenstveno alifatskog lanca, S-ibuprofen stvara labilnije interakcije sa L78F mutantom nego sa divljim tipom enzima.



Slika 31. Nepolarne interakcije S-ibuprofen derivata sa L78F mutantom enzima TesA, struktura dobivena nakon 10 ns simulacije molekulske dinamike. Udaljenosti su izražene u Å. Aromatski dio molekule ostvaruje interakcije sa His159 i aminokiselinama u blizini, Gln154 i Leu16. Alifatski dio molekule nije vezan u hidrofobni džep, već ostvaruje interakcije sa mutacijom uvedenim Phe78.

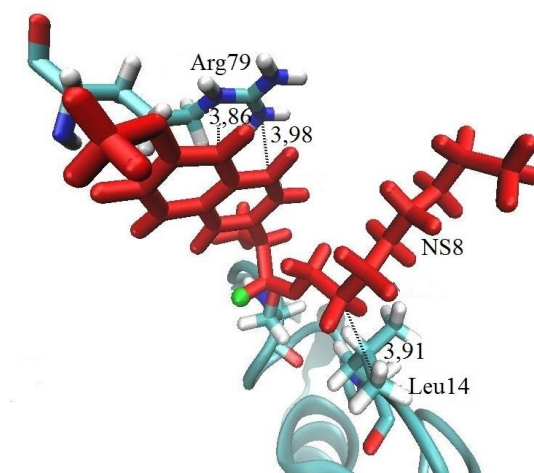
3.7 Simulacija divljeg tipa TesA i derivata S-naproksena

Kao i kod S-ibuprofen derivata, zbog vodikove veze His159 sa oksianionom intermedijera nije moguća katalitička reakcija (slika 32). Također, zbog manje nepolarnih interakcija, naproksen je lošiji supstrat za vezanje u aktivno mjesto od ibuprofena.



Slika 32. Udaljenost ϵ -vodika His159 i oksianiona kroz simulaciju molekulske dinamike sa derivatom S-naproksena. Oksianion je trajno stabiliziran sa His159.

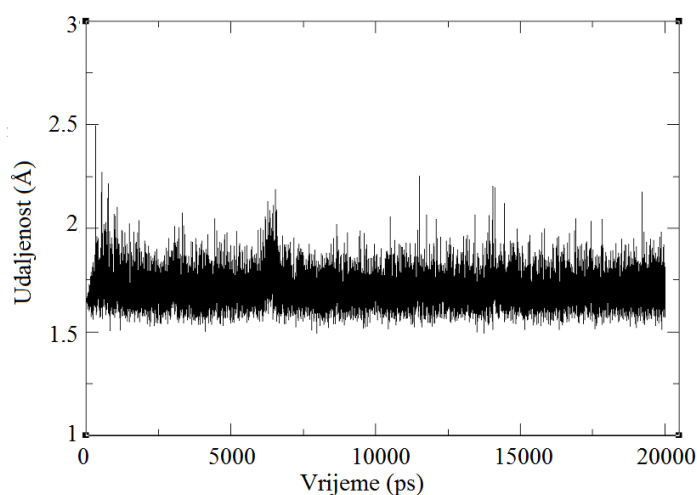
Dio aromatskog prstena stvara interakcije sa gvanidinskom skupinom Arg79 i prva dva ugljikova atoma hidrofobnog lanca se stabiliziraju s aminokiselinskim ostatkom Leu14, ali ostatak lanca, dio prstena i eterski vezana metilna skupina ne stvaraju interakcije sa proteinom (slika 33). Zbog malog broja nekovalentnih interakcija S-naproksen nije dobar supstrat za TesA i vjerojatno se neće vezati u aktivno mjesto *in vivo*.



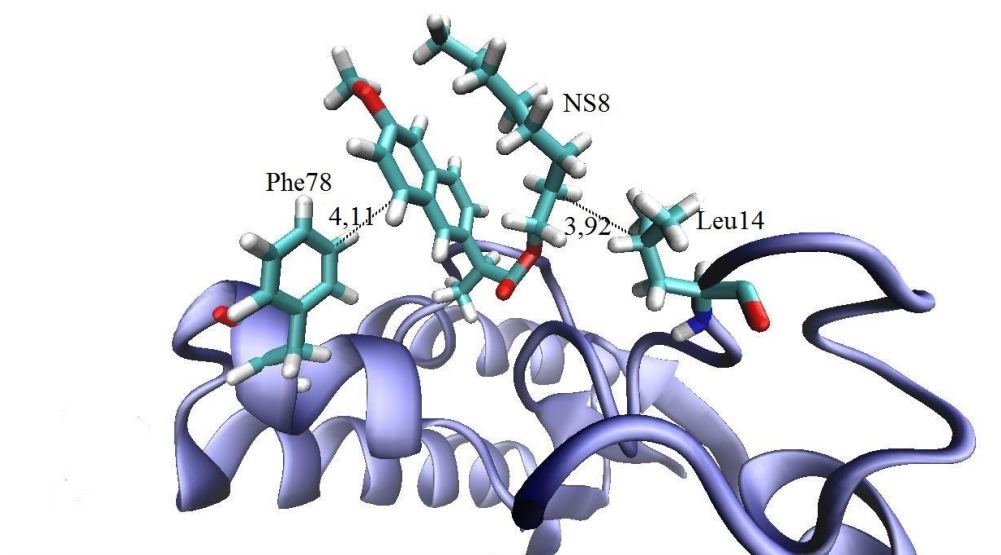
Slika 33. Nekovalentne interakcije derivata S-naproksena sa divljim tipom entima TesA, struktura dobivena na 20 ns simulacije molekulske dinamike. Udaljenosti su izražene u Å.

3.8 Simulacija mutante enzima *TesA* i derivata *S*-naproksena

Zbog stabilizacije oksianiona s His159 nije moguća katalitička reakcija (slika 34). Također, fenilalanin uveden mutacijom ne nalazi se dovoljno blizu aromatskog prstena tetraedarskog intermedijera za stabilne interakcije, a alifatski lanac nije vezan u hidrofobni džep (slika 35). Zbog malog broja nekovalentnih interakcija intermedijera i enzima nije izgledno da će doći do produktivnog vezanja ovog supstrata.



Slika 34. Udaljenost ϵ -vodika His159 i oksianiona kroz simulaciju molekulske dinamike L78F mutante enzima *TesA* sa derivatom *S*-naproksena. Oksianion je trajno stabiliziran sa His159.



Slika 35. Nekovalentne interakcije *S*-naproksen derivata s L78F mutiranim *TesA* enzimom, struktura dobivena na 20 ns simulacije molekulske dinamike. Udaljenosti su izražene u Å.

4. Rasprava

Monte Carlo konformacijska pretraga i simulacije molekulske dinamike korištene su za uvid u interakcije derivata ibuprofena i naproksena sa divljim tipom i L78F mutantom TesA. Konstruirani su kovalentno vezani tetraedarski intermedijeri oba enantiomera derivata ova dva lijeka na serin katalitičke trijade te su provedene simulacije MD s ciljem opisa dinamike i interakcija potrebnih za katalitičku reakciju u aktivnom mjestu enzima. Na temelju analize međuatomskih udaljenosti, nekovalentnih interakcija te fluktuacija aminokiselina ocijenjeno je koji od navedenih derivata bi mogao biti stereoselektivno hidroliziran s pomoću divljeg tipa enzima TesA ili njegovog L78F mutanta. Pregled rezultata analize simulacija za pojedinačne sustave nalazi se u Tablici 1.

Tablica 1. Simulirani sustavi i strukturne odlike neophodne za vezanje i hidrolizu supstrata nađene tijekom simulacija molekulske dinamike.

Sustav ^a	Katalitička vodikova veza	His159 bliži reakcijskom kisiku intermedijera nego Ser9	Oksianion smješten u oksianionsku šupljinu	Povoljne nepolarne interakcije	Mogućnost katalitičke reakcije
wt TesA – IR8	+	-	+	+	-/+
L78F TesA – IR8	+	+	+	+	+
wt TesA – NR8	-	-	+	+	-
L78F TesA – NR8	+	+	+	+	+
wt TesA – IS8	-	-	-	+	-
L78F TesA – IS8	-	-	-	+	-
wt TesA – NS8	-	-	-	-	-
L78F TesA – NS8	-	-	-	-	-

^a wt – divlji tip enzima, L78F – mutiran enzim gdje je Leu78 zamijenjen fenilalaninom

Osnovna razlika između svih simuliranih R- i S-enantiomera je stabilizacija oksianiona. Kod R-enantiomera oksianion se stabilizira sa Gly46 i Asn75, kako je predviđeno kristalnom strukturom (i dosljedno ulazi SGNH strukturnog motiva), ili je uključen Ser45 umjesto jedne od navedenih aminokiselina. S-enantiomeri, naprotiv, stabiliziraju oksianion s pomoću ϵ -vodika His159. Kako je doniranje tog protona His159 esterskom kisiku tetraedarskog intermedijera sljedeći korak katalitičkog mehanizma, njegovo uključivanje u vodikovu vezu sa oksianionom znači da hidrolitička reakcija neće biti moguća. U analizi S-enantiomera prikazana je udaljenost navedenog vodika His159 od oksianiona kroz cijelu simulaciju kako bi se pokazalo

da histidin ne može nastaviti katalitičku reakciju, neovisno o ostalim nekovalentnim interakcijama intermedijera. Mutacija L78F uvedena je kako bi se pokušale poboljšati hidrofobne interakcije R-enantiomera, kod kojih postoji mogućnost hidrolize.

Analizom nekovalentnih interakcija intermedijera utvrđeno je postojanje hidrofobne šupljine u blizini aktivnog mjesta koju zatvaraju aminokiseline Ile10, Gly74, Leu78, Leu111, Pro112, Leu143, Met153 i Ile158. U provedenim simulacijama sa derivatima ibuprofena hidrofobni džep je poslužio za stabilizaciju alifatskog lanca intermedijera, dok se alifatski lanac naproksena stabilizirao interakcijama s manjim brojem nepolarnih aminokiselina bliže površini enzima. Ovo upućuje na bolju stabilizaciju alifatskog lanca derivata ibuprofena, što pridonosi produktivnom vezanju i čini ih pogodnijim supstratima za enzim TesA od derivata naproksena.

Derivat R-ibuprofena čvrsto je vezan u aktivno mjesto divljeg tipa enzima i mutanta L78F te stvara vodikove veze potrebne za katalizu. Međutim, kod divljeg tipa, učinkovita hidroliza otežana je blizinom γ -kisika Ser9 katalitičkom histidinu. Kroz cijelu simulaciju, Ser9 se nalazi bliže His159 nego esterski kisik intermedijera, na udaljenosti manjoj od 2 Å, zbog čega je vjerojatnija reakcija uklanjanja nemodificiranog supstrata iz aktivnog mjesta nego njegova hidroliza. U simulaciji s mutiranim enzimom, vodikove veze koje intermedijer stvara u aktivnom mjestu pogodne su za hidrolizu, a van der Waals interakcije omogućavaju stabilno vezanje alifatskog lanca intermedijera u hidrofobni džep enzima. Iako mutacijom uvedeni fenilalanin nije doveo do stabilizacije aromatske skupine ibuprofena π - π interakcijama, stvoreni su povoljni van der Waals kontakti sa alifatskim lancem intermedijera, a aromatska jezgra stvara stabilne interakcije s Arg79.

Kod simulacije R-naproksen derivata s L78F-TesA, γ -kisik Ser9 je od histidina udaljen više od 3 Å, što zajedno sa ostalim vodikovim vezama i povoljnim hidrofobnim interakcijama znači da je taj sustav također pogodan za katalitičku reakciju. Vezanje intermedijera nije optimalno jer nije iskorišten hidrofobni džep za stabilizaciju alifatskog lanca, ali interakcije intermedijera sa Phe78, u usporedbi sa Leu78 divljeg tipa, pokazuju da nepolarna skupina veća od aminokiselinskog ostatka leucina može pospješiti vezanje supstrata.

Iako hidroliza S-enantiomera konstruiranih derivata nije moguća, zbog nekovalentnih interakcija sa aminokiselinama u aktivnom mjestu enzima, treba uzeti mogućnost

kompetitivne inhibicije u slučaju da se ovakva reakcija koristi za enantiomerno pročišćavanje. Derivat S-naproksena u provedenim simulacijama uglavnom ne stvara stabilne nekovalentne interakcije, za razliku od R-derivata naproksena koji je čvrsto vezan iako nije iskorišten hidrofobni džep. Prema tome, hidroliza R-enantiomera naproksena vjerojatno neće biti inhibirana S-formom. S druge strane, derivat S-ibuprofena čvrsto se veže u aktivno mjesto divljeg tipa TesA i za hidrolizu derivata R-ibuprofena može se očekivati kompetitivna inhibicija. U simulaciji S-forme sa mutiranim enzimom hidrofobni džep nije iskorišten za vezanje intermedijera, pa bi time i inhibicija hidrolize R-forme bila slabija zbog stvaranja manjeg broja van der Waals interakcija.

5. Zaključak

Metodama računalne biokemije analizirana je mogućnost enantioselektivne hidrolize derivata ibuprofena i naproksena s pomoću enzima TesA. Utvrđeno je da, zbog stabilizacije oksianiona histidinom katalitičke trijade, hidroliza nije moguća za S-enantiomere oba lijeka. Simulacije R-enantiomera sa divljim tipom TesA pokazale su da postoji mogućnost hidrolize, ali vodikove veze intermedijera sa katalitičkom trijadom nisu povoljne za katalitičku reakciju i vjerojatnije je uklanjanje nepromijenjenog supstrata iz aktivnog mjesta. Stoga je *in silico* uvedena mutacija L78F u strukturu enzima TesA kako bi se pospješilo vezanje i hidroliza R-forme derivata oba lijeka. U simulacijama R-derivata ibuprofena i naproksena s mutiranim enzimom dobiveno je produktivno vezanje gdje je vjerojatnija reakcija hidrolize suptrata od uklanjanja iz aktivnog mjesta. Analizom nekovalentnih interakcija utvrđeno je da je derivat ibuprofena bolji supstrat za enzim TesA od derivata naproksena jer je čvršće vezan u aktivno mjesto i koristi hidrofobni džep za stabilizaciju alifatskog lanca.

6. Literatura

Adcock SA, McCammon JA (2006) Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. *Chem Rev.* **106**, 1589–1615.

Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, Huang TH, Shaw JF (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.* **43**, 534–552.

Case DA, Babin V, Berryman JT, Betz RM, Cai Q, Cerutti DS, Cheatham TE, Darden TA, Duke RE, Gohlke H, Goetz AW, Gusarov S, Homeyer N, Janowski P, Kaus J, Kolossváry I, Kovalenko A, Lee TS, LeGrand S, Luchko T, Luo R, Madej B, Merz KM, Paesani F, Roe DR, Roitberg A, Sagui C, Salomon-Ferrer R, Seabra G, Simmerling CL, Smith W, Swails J, Walker RC, Wang J, Wolf RM, Wu X, Kollman PA (2008) AMBER 10. University of California, San Francisco.

Chang G, Guida WC, Still WC (1989) An internal-coordinate Monte Carlo method for searching conformational space. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 4379–4386.

Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, Simmerling C (2006) Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* **65**, 712-725.

Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33-38.

Kovačić F, Granzin J, Wilhelm S, Kojić-Prodić B, Batra-Safferling R, Jaeger KE (2013) Structural and Functional Characterisation of TesA - A Novel Lysophospholipase A from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* **8**(7): e69125.

Lešćić Ašler I, Ivić N, Kovačić F, Schell S, Knorr J, Krauss U, Wilhelm S, Kojić-Prodić B, Jaeger KE (2010) Probing enzyme promiscuity of SGNH hydrolases. *Chembiochem* **11**, 2158-2167.

Mohamadi F, Richards NGJ, Guida W, Liskamp R, Lipton M, Caufield C, Chang G, Hendrickson T, Still WC (1990) *J. Comput. Chem.* **11**, 440-467.

Maestro, version 9.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2010.

Page MJ, Cera ED (2007) Serine Proteases. eLS.

Peterson K, McDonagh M, Thakurta S, Dana T, Roberts C, Chou R, Helfand M. (2010) Drug Class Review: Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDs). Oregon Health & Science University Portland, Oregon

Polgar L (2005) The catalytic triad of serine peptidases. *CMLS* **62**, 2161-2172.

Reichel C, Brugger R, Bang H, Geisslinger G, Brune K (1997) Molecular Cloning and Expression of a 2-Arylpropionyl-Coenzyme A Epimerase: A Key Enzyme in the Inversion Metabolism of Ibuprofen. *Mol. Pharm.* **51**, 576-582.

van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, van Buuren AR, Apol E, Meulenhoff PJ, Tieleman DP, Sijbers AL, Feenstra KA, van Drunen R, Berendsen HJC Gromacs version 3.6, www.gromacs.org (2004)

Upton C, Buckley JT (1995) A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem. Sci.* **20**, 178-179.

Vriend G (1990) WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **8**, 52-56.

Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA (2006) Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph.* **25**, 247-260.

7. Životopis

Rođen sam 27. studenog 1990. u Bjelovaru. Osnovnu sam školu završio u Garešnici, a nakon toga sam u Dubrovniku završio opću gimnaziju. Godine 2009. upisao sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu koji sam 2012. nastavio diplomskim studijem molekularne biologije na istom fakultetu, usmjerenim na strukturnu biologiju i problematiku odnosa strukture i funkcije proteina. Od 2010. do 2013. sudjelovao sam u godišnjoj manifestaciji fakulteta Noć biologije, a osim toga sam od 2011. do 2015. bio član udruge studenata biologije BIUS i voditelj Sekcije za pauke.