

Biokatalitička azidoliza fluoriranih derivata stiren oksida

Marin, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:923960>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2020.

Petra Marin
1267/BPI

**Biokatalitička azidoliza fluoriranih
derivata stiren oksida**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković pod stručnim vodstvom dr.sc. Maje Majerić Elenkov, više znanstvene suradnice na Institutu Ruđer Bošković te doc.dr.sc. Marine Cvjetko Bubalo, sa Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Enzimaska sinteza fluoriranih kiralnih građevnih blokova (EnzyFluor)“ (IP-2018-01-4493).

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu Instituta Ruđer Bošković na pomoći, susretljivosti i ugodnoj radnoj atmosferi. Posebno zahvaljujem dr. sc. Maji Majerić Elenkov na svim pruženim prilikama za rad i učenje, vremenu, velikoj motivaciji i pomoći u svim fazama izrade ovog rada.

Zahvaljujem mentorici na fakultetu, doc. dr. sc. Marini Cvjetko Bubalo na iznimnoj podršci i savjetima od samog početka studija.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Martini Sudar i mag. ing. Neveni Milčić s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na pruženoj pomoći i opremi pri izolaciji enzima i doc. dr. sc. Marini Svetec Miklenić na izolaciji plazmidne DNA.

Hvala mojim roditeljima, braći i prijateljima na bezrezervnoj pomoći i razumijevanju. Hvala Matiji na pozitivnoj energiji, emotivnoj podršci i odmoru.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

BIOKATALITIČKA AZIDOLIZA FLUORIRANIH DERIVATA STIREN OKSIDA

Petra Marin, 1267/BPI

Sažetak: Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) su enzimi koji kataliziraju nukleofilno otvaranje epoksida koristeći niz malih aniona kao što su azid, cijanid, cijanat i dr. Upotrebom ovih enzima moguće je pripremiti enantiomerno čiste fluorirane građevne blokove čija je dostupnost od velikog značaja pri razvoju lijekova u farmaceutskoj industriji. U okviru ovog rada, provedena je prekomjerna ekspresija 7 različitih HHDH, divljih tipova (HheA, HheB i HheC) i genetski modificiranih varijanti (HheA-N178A, HheC-T134V, HheC-W249P i HheC-W4). Uspješnost prekomjerne ekspresije proteina potvrđena je SDS-poliakrilamidnom elektroforezom.

Ispitana je katalitička aktivnost genetski modificiranog enzima HheA-N178A u reakcijama azidolize 5 fluoriranih derivata stiren oksida različitog položaja supstitucije (**1a-1e**). HheA-N178A je pokazala nisku do vrlo visoku *S*-enantioselektivnost prema ispitanim supstratima ($E = 2 - 165$). Za visoku enantioselektivnost reakcije presudan je supstituent na *para*-položaju, a izrazito nepovoljan utjecaj na enantioselektivnost ima metilna skupina kao drugi supstituent na kiralnom centru supstrata.

Ključne riječi: azidoliza, epoksidi, halogenhidrin-dehalogenaze, kinetička rezolucija, β -azidoalkoholi

Rad sadrži: 43 stranice, 16 slika, 9 tablica, 41 literaturni navod, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Doc.dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo*

Pomoć pri izradi: *Dr.sc. Maja Majerić Elenkov, v.zn.sur.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Ivana Radojčić Redovniković*
2. Doc.dr.sc. *Marina Cvjetko Bubalo*
3. Dr.sc. *Maja Majerić Elenkov, v. zn. sur.*
4. Doc.dr.sc. *Ana Jurinjak Tušek (zamjena)*

Datum obrane: 9. 6. 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

BIOCATALYTIC AZIDOLYSIS OF FLUORO-SUBSTITUTED STIREN OXIDE DERIVATIVES

Petra Marin, 1267/BPI

Abstract: Halohydrin dehalogenases (HHDH) are enzymes that catalyze the nucleophilic opening of epoxides using a number of anionic nucleophiles, including azide, cyanide, nitrite, cyanate, etc. The use of HHDH gives possibility to prepare enantiomerically pure fluorinated building blocks whose availability is of great importance in pharmaceutical industry. In this thesis, overexpression of 7 different HHDH, wild-type (HheA, HheB and HheC) and genetically modified variants (HheA-N178A, HheC-T134V, HheC-W249P and HheC-W4) was performed. The success of protein overexpression was determined by SDS-polyacrylamide electrophoresis.

Catalytic activity of genetically modified halohydrin dehalogenase HheA-N178A in reactions of azidolysis of 5 fluorinated styrene oxide derivatives of different substitution positions (**1a-1e**) was explored. HheA-N178A showed low to very high *S*-enantioselectivity towards the tested substrates ($E = 2 - 165$). *Para*-position of substituent is crucial for the high enantioselectivity of the reaction, and the methyl group has an extremely unfavorable effect on the enantioselectivity as a second substituent at the chiral center of substrate.

Keywords: azidolysis, epoxides, halohydrin-dehalogenases, kinetic resolution, β -azidoalcohols

Thesis contains: 43 pages, 16 figures, 9 tables, 41 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Marina Cvjetko Bubalo, Assistant professor*

Technical support and assistance: *PhD. Maja Majerić Elenkov, Senior Research Associate*

Reviewers:

1. PhD. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor
2. PhD. *Marina Cvjetko Bubalo*, Assistant professor
3. PhD. *Maja Majerić Elenkov*, Senior Research Associate
4. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 9 June 2020

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. OPĆENITO O ENZIMIMA	2
2.2. ENZIMSKA KINETIČKA REZOLUCIJA.....	2
2.3. HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZE (HHDH)	5
2.3.1. Otkriće HHDH.....	5
2.3.2. Klasifikacija HHDH	5
2.3.3. Strukturne karakteristike HHDH	6
2.4. REAKCIJE OTVARANJA EPOKSIDA.....	9
2.4.1. Biokatalitička azidoliza epoksida	10
2.4.1.1. Azidoliza epoksida katalizirana HheC	11
2.4.1.2. Azidoliza epoksida katalizirana HheA	14
2.4.1.3. Azidoliza epoksida katalizirana HheA-N178A.....	15
2.4.1.4. Azidoliza epoksida katalizirana novim skupinama HHDH.....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Plazmidna DNA i enzimski preparat	18
3.1.2. Kemikalije	18
3.1.3. Oprema i uređaji.....	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Priprema enzima	19
3.2.1.1. Priprema elektrokompetentnih stanica MC1061	19
3.2.1.2. Transformacija elektrokompetentnih stanica MC1061 plazmidnom DNA.....	20
3.2.1.3. Prekomjerna ekspresija proteina	20
3.2.1.4. Izolacija proteina.....	21
3.2.2. SDS-poliakrilamid gel elektroforeza	21
3.2.2.1. Polimerizacija gelova za SDS-PAGE elektroforezu	21
3.2.2.2. Priprema uzoraka	22
3.2.2.3. Priprema jedinice za gel elektroforezu i „gel running“	23
3.2.2.4. Detekcija proteinskih vrpca	23
3.2.3. Spektrofotometrijski test aktivnosti enzima s <i>rac</i> -1-(<i>p</i> -nitrofenil)-2-brometanolom (PNSHH test) ..	24
3.2.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	24
3.2.5. Biokatalitičke transformacije katalizirane HheA-N178A.....	25
3.2.5.1. Otvaranje epoksida 1a-1e s azidom katalizirano HheA-N178A – opći postupak.....	25
3.2.5.2. Otvaranje epoksida 1a-1e s azidom – reakcija bez prisustva enzima.....	25
3.2.5.3. Testiranje hidrolitičke stabilnosti epoksida – reakcija bez prisustva enzima i azida.....	25
3.2.6. Kromatografske metode.....	26
3.2.6.1. Praćenje tijeka enzimskih reakcija i određivanje β-regioselektivnosti.....	26
3.2.6.2. Određivanje enantiomerne čistoće i apsolutne konfiguracije produkata enzimskih reakcija	26

4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. UVOD U RASPRAVU	29
4.2. PRIPREMA ENZIMA	30
4.3. AZIDOLIZA FLUORIRANIH DERIVATA STIREN OKSIDA KATALIZIRANA HheA-N178A	33
5. ZAKLJUČCI	38
6. LITERATURA	39

1. UVOD

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) su enzimi koji kataliziraju nukleofilno otvaranje epoksida koristeći niz malih aniona kao što su azid, cijanid, cijanat i dr. Reakcije se odvijaju u blagim uvjetima, pri sobnoj temperaturi, neutralnom pH i atmosferskom tlaku, a usto pokazuju visoku regio- i enantioselektivnost te kao takve predstavljaju dobru alternativu klasičnim kemijskim metodama sinteze. Upotrebom ovih enzima moguće je pripremiti niz kiralnih građevnih blokova čija je dostupnost od velikog značaja u kemijskoj, farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji (Hasnaoui-Dijoux i sur., 2008).

Divlji sojevi mikroorganizama sadrže niske koncentracije enzima i kao takvi nisu dobar odabir primarnog izvora enzima za industrijsku primjenu. Izolacija enzima iz divljih sojeva mikroorganizama obično rezultira slabim iskorištenjem, stoga se upotrebom metoda molekularne biologije nastoji postići više koncentracije enzima u stanicama. U tu se svrhu provodi prekomjerna ekspresija željenih proteina u genetski modificiranim mikroorganizmima kao što je *E. coli*. Ova tehnologija omogućava i poboljšanje svojstava enzima, poput stabilnosti, aktivnosti i enantioselektivnosti (Reetz, 2013).

U ovom radu, prekomjernom ekspresijom pripravljeno je 7 različitih halogenhidrin dehalogenaza, divlji tipovi (HheA, HheB i HheC) i genetski modificirane varijante (HheA-N178A, HheC-T134V, HheC-W249P i HheC-W4). Prema dosadašnjim istraživanjima, genetski modificirani enzim HheA-N178A pokazao je povećanu enantioselektivnost u odnosu na divlji tip HheA te smanjenu regioselektivnost u katalizi azidolize stiren oksida (Mikleušević i sur., 2016). Provedena ispitivanja u ovom radu usredotočena su na određivanje aktivnosti i enantioselektivnosti HheA-N178A na setu fluoriranih derivata stiren oksida kao supstrata uz natrijev azid kao nukleofil.

Sinteza fluoriranih derivata aromatskih spojeva je od sve većeg interesa u farmaceutskoj industriji i proizvodnji agrokemikalija. Ekološki prihvatljivija biokatalitička modifikacija jednostavnijih molekula koje već posjeduju C–F vezu privlačna je alternativa često skupoj i toksičnoj metalima kataliziranoj fluorinaciji molekula, posebice u slučaju upotrebe enantioselektivnih enzima kada se kao produkti dobivaju optički aktivne tvari. Produkti, fluoroaromatski vicinalni azidoalkoholi, su vrijedni kiralni građevni blokovi sa širokim spektrom primjene u dizajnu i razvoju novih lijekova (Gillis, 2015).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OPĆENITO O ENZIMIMA

Enzimi su proteini, proizvodi živih stanica koji posjeduju katalitičku aktivnost. Strukturno se sastoje od velikog broja aminokiselina kovalentno povezanih peptidnom vezom koja se formira između ugljikova atoma karboksilne skupine te atoma dušika α -amino skupine. Svojstva enzima određena su prirodom aminokiselina koje ih čine (mogu biti nepolarne ili polarne – s nabojem ili neutralnog naboja) i njihovom raspodjelom unutar molekule enzima. Specifični su prema reaktantima u reakciji koju kataliziraju, a specifičnost može biti grupna (prema različitim suspratima) ili apsolutna (prema samo jednom supstratu). Prednost enzimom kataliziranih reakcija, u odnosu na kemijski katalizirane reakcije, su visoka specifičnost, aktivnost i velika brzina konverzije pri fiziološkim uvjetima (niski tlak, temperatura i pH) te mogućnost višekratne uporabe (imobilizacija) (Illanes, 2008).

Većina enzima također zahtjeva i pomoć manjih molekula kako bi funkcionirali kao katalizatori, a te molekule nazivamo koenzimima ili kofaktorima. Koenzimi su organske molekule male molekularne mase koje se reverzibilno vežu s enzimima i nisu dio njihove strukture. Koenzimi vezani za enzime sudjeluju u samoj reakciji te se zbog toga ponekad nazivaju i kosupstrati. Često funkcioniraju kao prenositelji elektrona, specifičnih atoma ili funkcionalnih skupina koje se prenose u reakciji (Illanes, 2008).

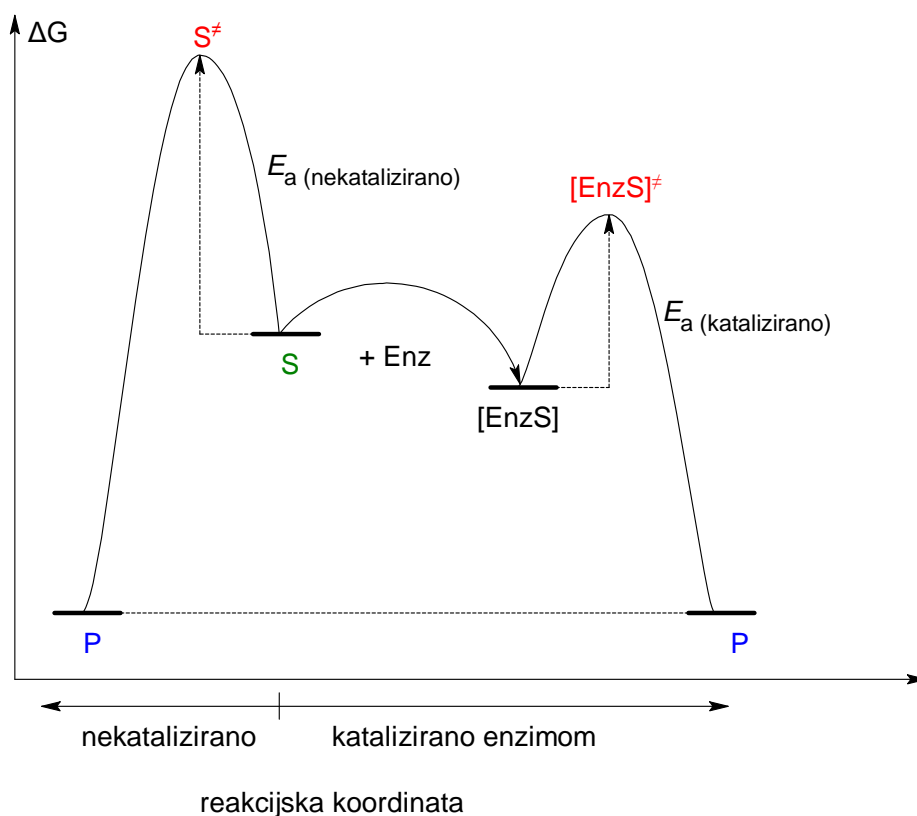
Enzimi se prema IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) dijele u 6 skupina: oksidoreduktaze – kataliziraju oksidacijsko/redukcijske reakcije koje uključuju prijenos elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma, transferaze – kataliziraju prijenos funkcionalne skupine sa donora na akceptor, hidrolaze – kataliziraju reakcije hidrolize, liaze – kataliziraju reakcije ne-hidrolitičkog i ne-oksidativnog cijepanja kemijskih veza, izomeraze – kataliziraju reakcije konverzije supstrata u izomer i ligaze – kataliziraju reakcije kovalentnog povezivanja dvaju molekula (Illanes 2008).

2.2. ENZIMSKA KINETIČKA REZOLUCIJA

Enzimi posebnu primjenu imaju u organskoj sintezi, naročito u sintezi enantiomerno čistih spojeva koji se koriste za proizvodnju građevnih jedinica potrebnih u farmaceutskoj, agrokemijskoj, kemijskoj i prehrambenoj industriji (Ahmed i sur., 2012). Enzimi su kemoselektivni, dakle imaju sposobnost selektivnog djelovanja na određenu funkcionalnu skupinu, dok druge osjetljive funkcionalne skupine ostaju nepromijenjene. Osim toga, enzimi djeluju regioselektivno zahvaljujući složenoj trodimenzionalnoj strukturi koja im omogućuje razlikovanje kemijski identičnih funkcionalnih skupina smještenih u drugačijoj okolini.

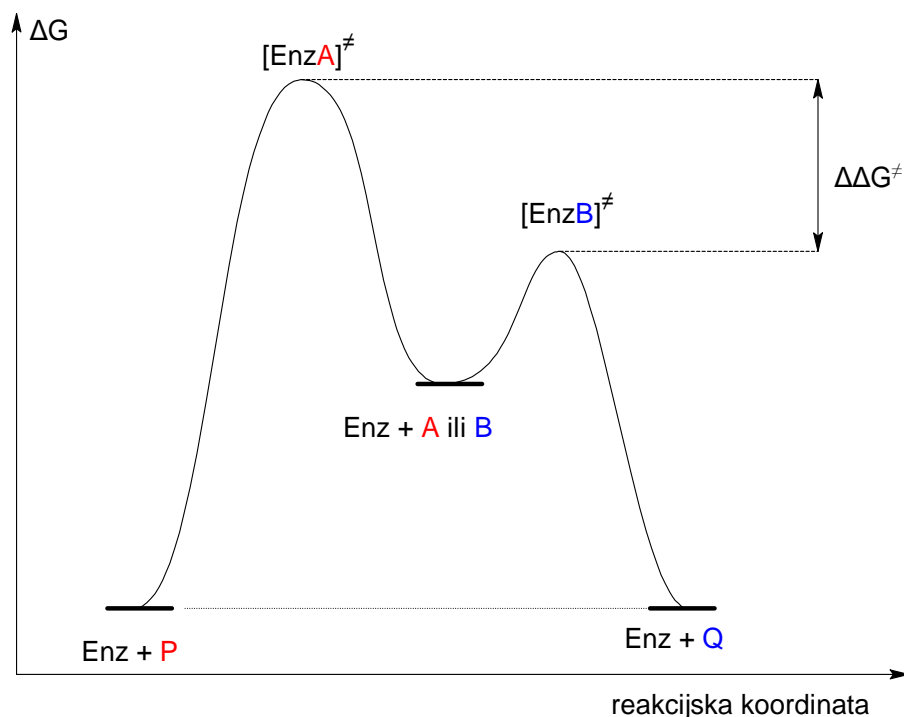
Enantioselektivnost je najvažnija karakteristika enzima koja opravdava njihovu široku primjenu u organskoj sintezi. Aktivno mjesto enzima ima kiralnu građu zbog čega može prepoznavati kiralne molekule i razlikovati enantiomere, odnosno enantiotopne skupine (Faber, 2011; Ahmed i sur., 2012).

Enzim (Enz) ubrzava reakciju tako da snižava energiju aktivacije (E_a) između supstrata (S) i produkta (P). Ova katalitička sposobnost enzima ostvaruje se zbog stabilizacije prijelaznog stanja pomoću enzima, koji se za supstrat veže mnogo jače u prijelaznom, nego u osnovnom stanju (slika 1) (Faber, 2011).



Slika 1. Dijagram energije katalizirane i nekatalizirane reakcije. Enz = enzim; S = supstrat; P = produkt; [EnzS] = kompleks enzim-supstrat; E_a = energija aktivacije; [‡] označava prijelazno stanje (Faber, 2011)

Stereoselektivnost enzima posljedica je razlike sadržaja energije prijelaznih stanja kompleksa enzim-supstrat pojedinog enantiomera (slika 2). Budući da aktivno mjesto enzima ima kiralnu građu, nastaju diastereomerni kompleksi enzim-supstrat [EnzA] i [EnzB] s različitim vrijednostima slobodne energije (ΔG) za odgovarajuća prijelazna stanja [EnzA][‡] i [EnzB][‡]. Rezultat je razlika u energiji aktivacije ($\Delta\Delta G^\ddagger$) za oba enantiomera supstrata. Zbog toga, jedan enantiomer reagira brže od drugog. Dakle, rezolucija racemičnog supstrata pomoću enzima svodi se na kinetičku rezoluciju. Veličina razlike u energiji aktivacije direktna je mjera za enantioselektivnost biokatalize (Faber, 2011).



Slika 2. Dijagram energije enzimom katalizirane enantioselektivne reakcije. Enz = enzim; A i B = enantiomeri supstrata; P i Q = enantiomeri produkta; [EnzA] i [EnzB] = diastereomeri kompleksa enzim-supstrat; ‡ označava prijelazno stanje; $\Delta\Delta G^\ddagger$ = razlika slobodne energije (Faber, 2011)

Enantomerni omjer (*E*-vrijednost) služi za mjerenje efikasnosti kinetičke rezolucije. Njegova vrijednost predstavlja omjer specifičnih konstanti – maksimalne brzine (v_{max}) i Michaelisove konstante (K_M) za oba enantiomera. *E*-vrijednost dana izrazom [1] ovisi o eksperimentalno određenim parametrima kao što su stupanj konverzije supstrata u produkt (*c*) i enantiomerna čistoća supstrata i produkta izražena kao enantiomerni višak (*ev*). Enantiomerni višak u izrazu [2] definiran je kao kvocijent razlike i sume pojedinih enantiomera (Chen i sur., 1982).

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + ev_p)]}{\ln[1 - c(1 - ev_p)]} \qquad E = \frac{\ln[1 - c(1 - ev_s)]}{\ln[1 - c(1 + ev_s)]} \quad [1]$$

$$ev_R = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \cdot 100 \qquad ev_S = \frac{[S] - [R]}{[R] + [S]} \cdot 100 \quad [2]$$

Rezolucija racemata jedan je od glavnih načina dobivanja enantiomerno čistih spojeva u laboratorijskom i industrijskom mjerilu. Kinetička rezolucija zasniva se na činjenici da jedan enantiomer reagira brže od drugog što rezultira optički obogaćenim produktom. Tako nastali produkt i neizreagirani enantiomer supstrata imaju različita fizikalna svojstva pa je

njihovo razdvajanje jednostavno. Ograničenje kinetičke rezolucije predstavlja iskorištenje reakcije čija je maksimalna vrijednost 50 % (Faber, 2001).

2.3. HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZE (HHDH)

2.3.1. Otkriće HHDH

Castro i Bartnicki 1969. godine po prvi put su izvijestili o enzimu izoliranom iz *Flavobacterium* sp. koji razgrađuje 2,3-dibromo-1-propanol uklonjenjem bromosupstituenta s drugog ugljikovog atoma uz istovremenu tvorbu odgovarajućeg epihalogenhidrina. Ubrzo su ustanovili da su reakcije zatvaranja halogenalkohola reverzibilne, uz pretpostavku da do otvaranja odgovarajućeg epoksida dolazi isključivo na terminalnom ugljikovom atomu pri čemu nastaju 1,3-dihalogen-2-propanoli (Bartnicki i Castro, 1969). Od tada, izolirano je nekoliko enzima iz različitih bakterijskih vrsta koji imaju sposobnost dehalogenacije vicinalnih halogenhidrina te su opisani prema pripadajućim biokemijskim i biokatalitičkim svojstvima. Ovi enzimi nazvani halogenhidrin-dehalogenaze, halogenhidrin-epoksidaze, haloalkohol-dehalogenaze ili halogenhidrin-liaze pripadaju enzimskoj skupini liaza (EC 4.5.1.-). Kataliziraju reverzibilnu dehalogenaciju halogenhidrina uz istovremeni nastanak epoksidnog prstena (De Jong i sur., 2003).

2.3.2. Klasifikacija HHDH

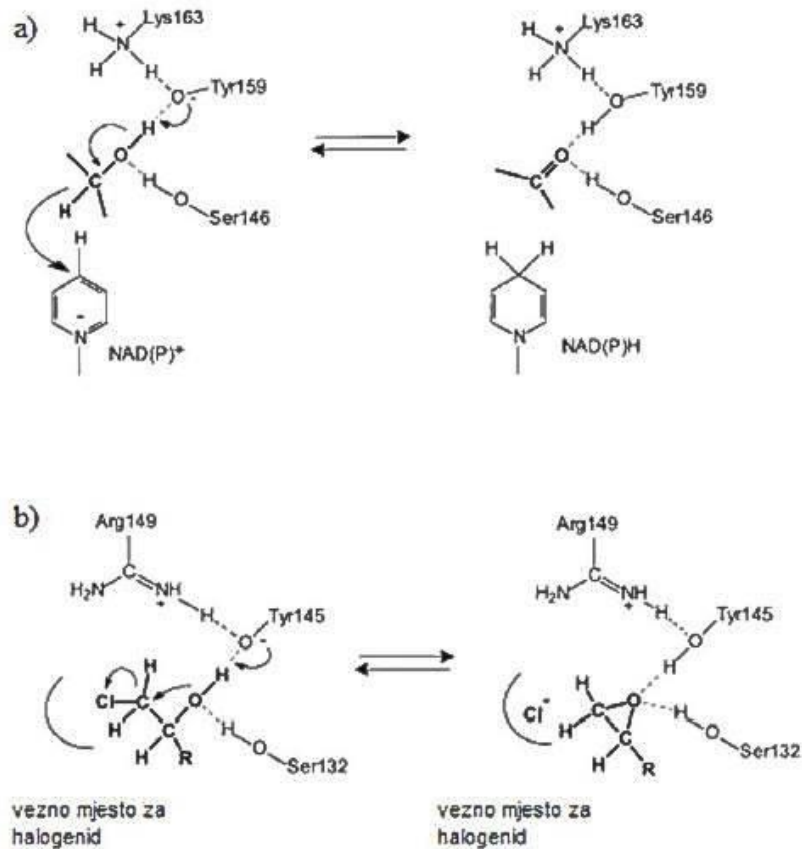
Unatoč prilično velikom broju istraživanja u kojima je provedena izolacija mikrobnih sojeva s prisutnom aktivnošću HHDH te pročišćavanje navedenih enzima, vrlo je mali broj dosad kloniranih gena koji kodiraju HHDH. Iz tog razloga, donedavno je bilo objavljeno samo pet različitih HHDH sekvenci prema kojima su podijeljene u tri različita filogenetska tipa –A, B i C: *hheA* iz *Corynebacterium* sp. N-1074 (Yu i sur., 1994), *hheA2* iz *Arthrobacter* sp. AD2 (van Hylckama Vlieg i sur., 2001), *hheB* iz *Corynebacterium* sp. N-1074 (Yu i sur., 1994), *hheB2* iz *Mycobacterium* sp. GP1 (van Hylckama Vlieg i sur., 2001) i dvije identične *hheC* sekvence iz *Agrobacterium radiobacter* AD1 (van Hylckama Vlieg i sur., 2001) i *Rhizobium* sp NHG3 (Higgins i sur., 2005). Od svih nabrojanih, najviše je istraživana *HheC* iz *A. radiobacter* AD1 zahvaljujući izvanrednoj (enantio)selektivnosti (Koopmeiners i sur., 2016). Članovi skupine A međusobno pokazuju 97 % identičnosti, dok članovi skupine B pokazuju 98 % identičnosti, a *HheC* je jedini predstavnik skupine C (Yu i sur., 1994; van Hylckama Vlieg i sur., 2001; Higgins i sur., 2005). Međusobnim sravnjivanjem identičnosti

aminokiselinskog slijeda enzima različitih skupina utvrđena je identičnost između skupina 24 % do 33 % (Schallmey i sur., 2012).

Schallmey i suradnici predstavili su novu strategiju u izolaciji HHDH sekvenci korištenjem *in silico* metoda izolacije enzima. Upotreba ovih metoda u izdvajanju novih aktivnih enzimskih sekvenci, za razliku od ranije korištenih metoda obogaćivanja bakterijskih kultura, omogućila je identifikaciju 37 novih HHDH sekvenci (Schallmey i sur., 2014). Filogenetskom analizom pokazano je da se nove sekvence HHDH ne mogu svrstati ni u jedan od prethodno klasificiranih tipova A do C, stoga se razvila potreba za četiri dodatna tipa – od D do G. U svrhu istraživanja biokatalitičkog potencijala novih HHDH, Koopmeiners i suradnici 2016. godine objavili su biokatalitičku i biokemijsku karakterizaciju 17 novih HHDH s obzirom na raspon supstrata na koje djeluju, stabilnost i enantioselektivnost. Iako većina novih odabranih 17 HHDH pokazuje nisku identičnost aminokiselinskog slijeda enzima s prethodno poznatim tipovima, njihova su biokemijska i biokatalitička svojstva vrlo slična. Među tim enzimima, ističu se samo HheA3, HheA5, HheD, HheD3 i HheD5 zbog povećane termostabilnosti u odnosu na HheC (Schallmey i Schallmey, 2016).

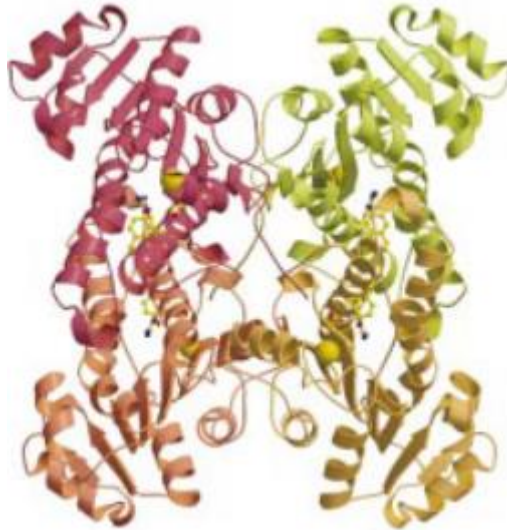
2.3.3. Strukturne karakteristike HHDH

HHDH su strukturno slične proteinima koji pripadaju porodici kratkolančanih dehidrogenaza/reduktaza (engl. *short-chain dehydrogenases/reductases*, *SDRs*) s kojima dijele sličnost u strukturi, aminokiselinskom slijedu i mehanizmu djelovanja. Strukturno, to su homotetrameri sastavljeni od dva para dimera, a svaki monomer sadrži oko 250 aminokiselina. Katalitička trijada HHDH sastoji se od Ser/Tyr/Arg, dok se kod SDR enzima u katalitičkoj trijadi nalaze Ser/Tyr/Lys. Međutim, za razliku od SDR enzima, HHDH ne posjeduju vezno mjesto za kofaktor, nego na tom mjestu imaju vezno mjesto za halogenid (slika 3) (van Hylckama Vlieg i sur., 2001).



Slika 3. Prikaz aktivnog mjesta SDR enzima i HDDH. a) reakcijski mehanizam i aktivno mjesto SDR enzima 7-hidroksisteroid-dehidrogenaze iz *E. coli*; b) reakcijski mehanizam i aktivno mjesto HheC iz *A. radiobacter* AD1 (van Hylckama Vlieg i sur., 2001)

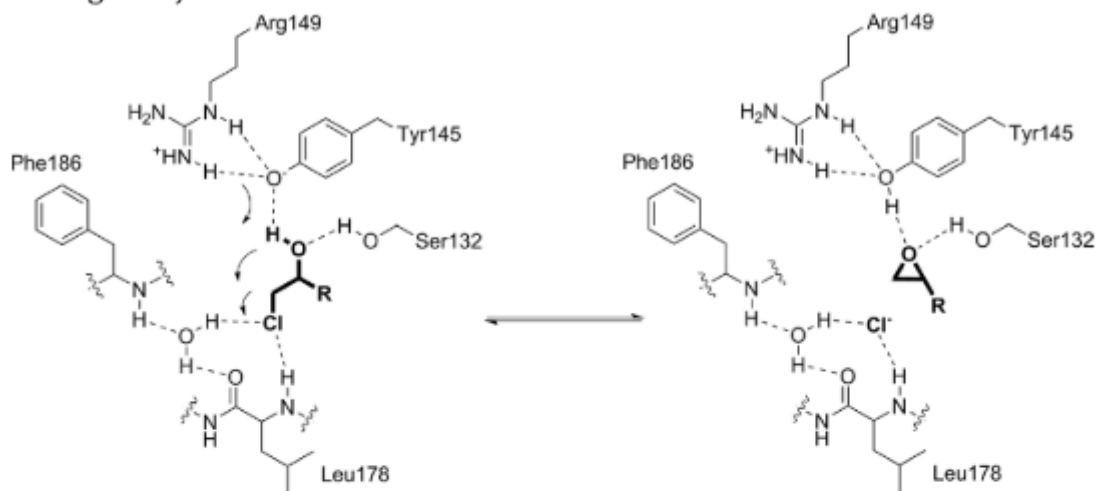
Dosad su poznate kristalne strukture HheA (Watanabe i sur., 2015), HheA2 (De Jong i sur., 2006), HheB (Watanabe i sur., 2015) i HheC (De Jong i sur., 2003) prema kojima je ustanovljena velika sličnost u motivima sekundarne strukture. Kod monomera je vidljiv tipični Rossmannov nabor, karakterističan i za druge SDR enzime, koji se sastoji od šest ili sedam β -nabranih ploča okruženih sa sedam ili osam α -uzvojnica (slika 4). Aktivno mjesto pojedinog monomera smješteno je unutar enzima i s okolinom povezano preko utora za vezanje supstrata čiji aminokiselinski ostatci utječu na enzimsku aktivnost i enantioselektivnost (Schallmey i sur., 2013).



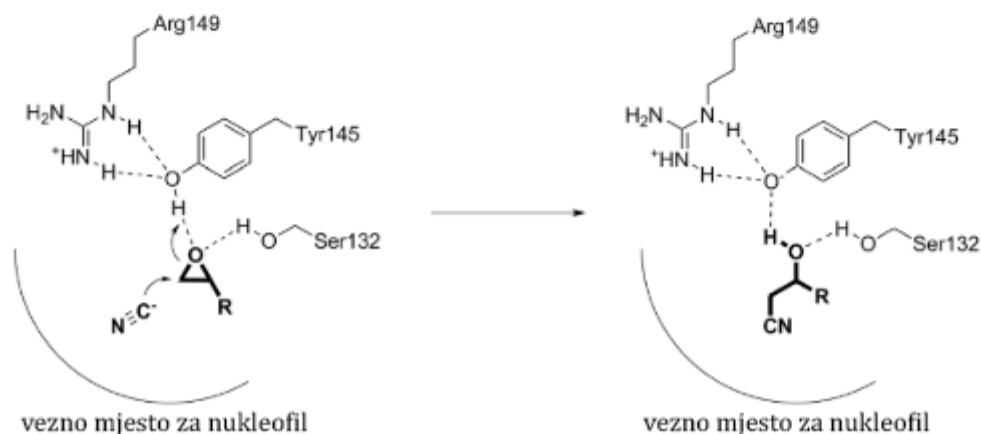
Slika 4. Tetramerna struktura HHDH (de Jong i sur., 2003)

U katalitičkoj trijadi unutar aktivnog mjesta, serin i tirozin stvaraju vodikove veze s hidroksilnom skupinom supstrata. Arginin snižava pK_a vrijednost tirozinu koji deprotonira hidroksilnu skupinu. Nastali oksianion napada susjedni ugljikov atom uz izlazak halogenidnog iona i nastanak epoksida. Asparaginska kiselina koja se nalazi blizu površine enzima sudjeluje u prijenosu protona u otapalo preko mreže vodikovih veza bočnih ogranaka i molekula vode. Mehanizam otvaranja epoksida je obrnut, istovremeno dolazi do nukleofilnog napada halogenidnog iona (ili nekog drugog nukleofila) i protonacije kisikovog atoma supstrata te nastaje halogenalkohol. Tirozin i serin vodikovim vezama stabiliziraju tetraedarski kisik, a prijenos protona se sada odvija u suprotnom smjeru. Arginin aktivira tirozin koji se sada ponaša kao kiselinski katalizator (slika 5). Reakcijski mehanizam ove katalitičke trijade jednak je za HheC i HheA. Kristalna struktura pokazala je da je aktivno mjesto u HheA mnogo otvorenije, čime se može objasniti lošija selektivnost ovog enzima u odnosu na HheC (de Jong i sur., 2003; de Jong i sur. 2006; Janssen i sur., 2006).

Dehalogenacija:



Otvaranje epoksida:

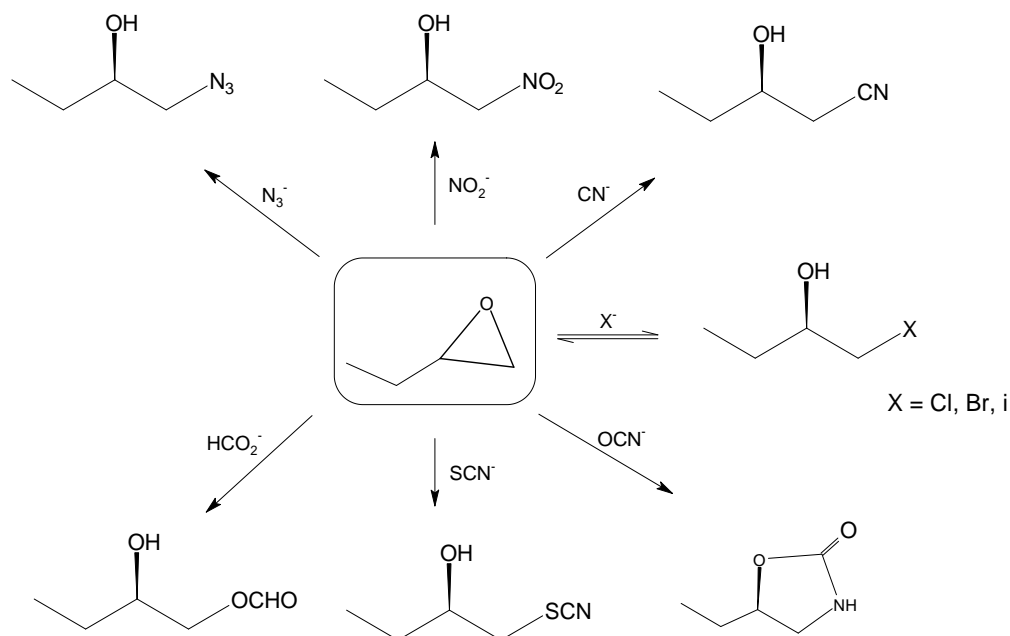


Slika 5. Mehanizam katalize HHDH u dehalogenaciji i otvaranju epoksidnog prstena pomoću cijanida kao nukleofila na primjeru HheC (Schallmeyer i Schallmeyer, 2016)

2.4. REAKCIJE OTVARANJA EPOKSIDA

Iako su HHDH i reverzibilne reakcije dehalogenacije otkrivene 1968. godine (Castro i Bartnicki, 1968), enzimski kataliza reakcije otvaranja epoksida pomoću različitih nukleofila počela se istraživati tek u 1990-ima (Yu i sur., 1994), a posljednjih godina se intenzivnije proučava. Budući da se enzimski reakcije otvaranja prstena odvijaju na sobnoj temperaturi, pri neutralnom pH i atmosferskom tlaku te su visoko kemoselektivne, predstavljaju atraktivnu alternativu metalima kataliziranim reakcijama. Reakcije otvaranja epoksida katalizirane pomoću HHDH pokazuju visoku regio- i enantioselektivnost. Usto, HHDH u navedenim reakcijama mogu koristiti najmanje devet različitih negativno nabijenih nukleofila uključujući azid, cijanid, nitrit, cijanat, tiocijanat i formijat, omogućujući pripremu raznih 1,2-

difunkcionaliziranih spojeva (slika 6). Formiranjem novih ugljik-dušik, ugljik-kisik, ugljik-sumpor i ugljik-ugljik veza omogućuje se primjena ovog enzima u sintezi visoko enantioobogaćenih β -supstituiranih alkohola ili njihovih derivata, uključujući cijanoalkohole, nitroalkohole i oksazolidinone (Hasnaoui-Dijoux i sur., 2008).



Slika 6. Konverzije 1,2-epoksibutana katalizirane HheC (Hasnaoui-Dijoux i sur., 2008)

Epoksid hidrolaze također imaju sposobnost enantioselektivne katalize racemičnih epoksida (Archelas i Furstoss, 2001), ali nemaju mogućnost prihvaćanja alternativnih nukleofila. Nedostatak HHDH je uski raspon supstrata koji je djelomično ograničen na terminalne epoksidge, otežana konverzija 2,2-disupstituiranih epoksidge te nereaktivnost u prisutnosti nenabijenih nukleofila (npr. vode ili amonijaka). Najbolje su opisane *R*-selektivne HHDH čemu doprinosi i slaba dostupnost *S*-selektivnih enzima. Budući da je topljivost epoksidge u vodi vrlo slaba, korištenjem dvofaznih sustava bila bi omogućena bolja produktivnost reakcije (Majerić Elenkov i sur., 2014).

2.4.1. Biokatalitička azidoliza epoksidge

Enzimom katalizirana azidoliza epoksidge prvi put je opisana za sirovi enzimski ekstrakt iz *Rhodococcus* sp. Azidolizom (*S*)-1-metil-1-pentilen oksidge dobiven je (*S*)-1-metil-1-pentil-2-azidoetanol u niskom enantiomernom višku, a u reakcijskoj smjesi preostala je većina neizreagiranih (*R*)-epoksidge. Time je dokazana mogućnost enantioselektivne

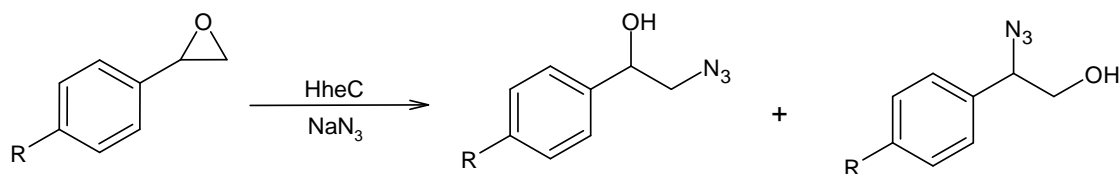
biokatalize otvaranja epoksida pomoću azida, ali enzim zaslužan za konverziju ostao je nepoznat (Mischitz i Faber, 1994).

Produkti reakcije otvaranja epoksida katalizirane pomoću HHDH s azidom kao nukleofilom su vicinalni 1,2-azidoalkoholi koji su važni prekursori 1,2-aminoalkohola i hidrositriazola. Nekataliziranu reakciju karakterizira niska regioselektivnost, osobito u slučaju aril-supstituiranih epoksida. U takvim reakcijama dolazi do nukleofilnog napada na oba ugljikova atoma epoksidnog prstena što rezultira smjesom α - i β -supstituiranih produkata (Majerić Elenkov i sur., 2014).

2.4.1.1. Azidoliza epoksida katalizirana HheC

Azidolizom nekoliko *para*-supstituiranih aromatskih epoksida kataliziranoj s HheC pripremljeni su optički čisti aromatski β -azidoalkoholi (tablica 1). Enzim je pokazao visoku β -regioselektivnost i enantioselektivnost ($E > 200$) s (*R*)-epoksidom kao preferabilnim supstratom. Visoka β -regioselektivnost enzimske reakcije ($C\alpha/C\beta = 2:98$) je suprotna opaženoj regioselektivnosti u nekataliziranoj reakciji otvaranja epoksida ($C\alpha/C\beta = 98:2$) (Lutje Spelberg i sur., 2001).

Tablica 1. Kinetička rezolucija epoksida katalizirana HheC (Lutje Spelberg i sur., 2001)

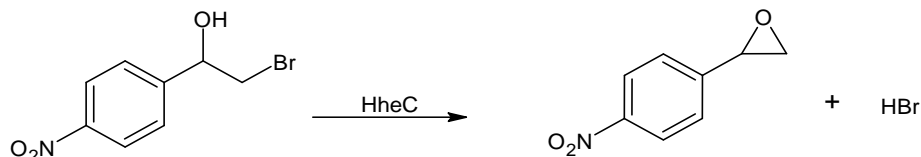


R	Konv. (%)	ev_s (%)	ev_p (%)	E-vrijednost		β -napad (%)*
				ev_s, ev_p	Konv. ev_s	
NO ₂	51	> 99 (<i>S</i>)	96 (<i>R</i>)	> 200	> 200	98 (37)
Cl	55	> 99 (<i>S</i>)	98 (<i>R</i>)	> 200	51	89 (3)
H	64	> 99 (<i>S</i>)	98 (<i>R</i>)	> 200	15	79 (2)

*u zagradama je vrijednost u kemijskoj reakciji.

Ispitujući biokatalitičke reakcije HheC s različitim nukleofilima na kromogenom supstratu *p*-nitrostiren oksidu (PNSO), dokazano je da HheC prihvaća klorid, cijanid, nitrit i azid pri čemu nastaju alkoholi visoke optičke čistoće. Nukleofili koje ovaj enzim ne prihvaća su fluorid, formijat, acetat, cijanat i tiocijanat. Svi nukleofili, osim cijanida, pokazali su se dobrim inhibitorima obrnute reakcije zatvaranja halogenalkohola u epoksid. U istom

istraživanju, osmišljen je spektrofotometrijski test kojim je moguće ispitati aktivnost HheC uz *p*-nitro-2-brom-1-feniletanol (PNSHH) koji se temelji na promjeni apsorbancije praćene pri 310 nm (slika 7) (Lutje Spelberg i sur., 2002).

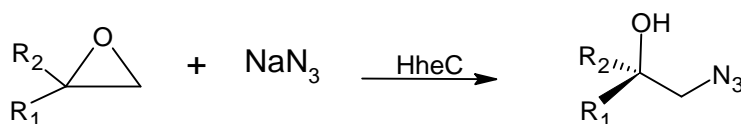


Slika 7. Zatvaranje PNSHH katalizirano HheC (Lutje Spelberg i sur., 2002)

Kvantno-kemijskim računima i „docking“ simulacijama proučavane su orijentacije supstrata u aktivnom mjestu enzima HheC pomoću kojih je analiziran reakcijski mehanizam azidolize i cijanolize (*R*)-stiren oksida s HheC. Uvidom u rezultate analize, utvrđena je znatno kraća udaljenost od napadajućeg atoma nukleofila do *C* β , nego do *C* α atoma (*R*)-stiren oksida, čime se može objasniti β -regioselektivnost HheC (Hopmann i Himo, 2008).

Ispitana je azidoliza 2,2-disupstituiranih epoksida pomoću HheC u kojoj su optičke čistoće nastalih β -azidoalkohola bile vrlo visoke (tablica 2). Time je pokazano da je kinetička rezolucija 2,2-disupstituiranih epoksida pogodna metoda za pripremu optičkih čistih terciarnih azidoalkohola (Majerić Elenkov i sur., 2007).

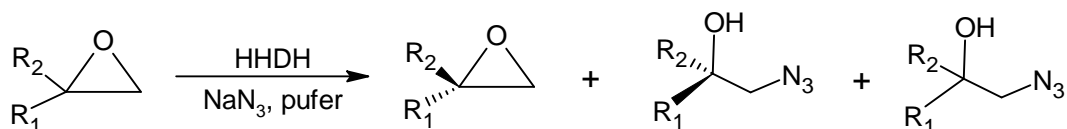
Tablica 2. Kinetička rezolucija 2,2-disupstituiranih epoksida katalizirana HheC (Majerić Elenkov i sur., 2007)



R₁	R₂	t / h	Konv. (%)	ev_s (%)	ev_p (%)
Et	Me	0,5	50	> 99	> 99
<i>c</i>-C₆H₁₁	Me	1,5	45	82	> 99
CH₂C₆H₅	Me	2	47	89	> 99
CO₂Me	Me	5	29	40	90
CH₂CO₂Me	Me	0,5	47	89	> 99

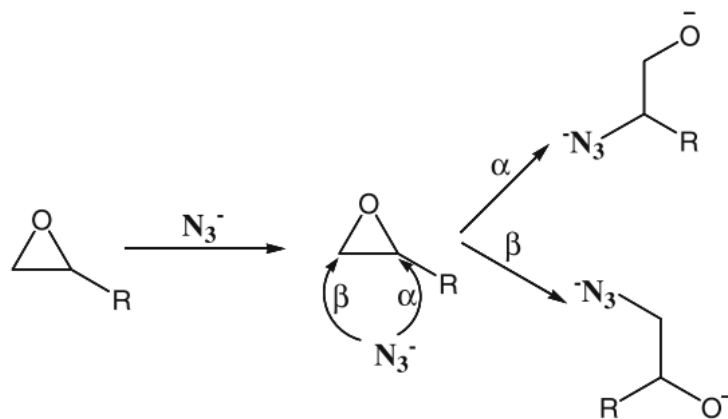
Kinetičkom rezolucijom 2-alkil-2-aryl-disupstituiranih epoksida kataliziranom genetski modificiranom HheC (P2E2) dobiveni su enantiomerno čisti (*R*)-azidoalkoholi koji se koriste za pripravu enantiomerno obogaćenih aminoalkohola i aziridina koji imaju tercijski stereocentar (tablica 3) (Molinari i sur., 2010).

Tablica 3. Kinetička rezolucija 2-alkil-2-aryl-disupstituiranih epoksida katalizirana genetski modificiranom HheC (P2E2) (Molinari i sur., 2010)

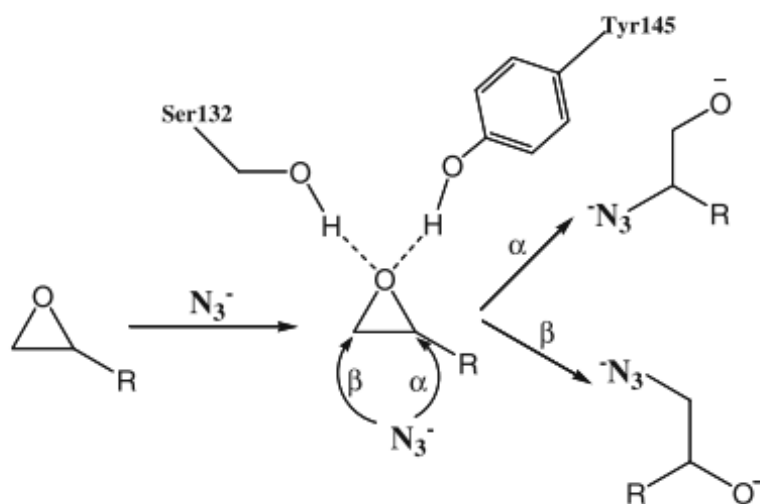


R₁	R₂	ev_p (<i>R</i>) (%)	Omjer α : β
C₆H₅	Me	98	> 25 : 1
4-ClC₆H₄	Me	99	> 25 : 1
4-FC₆H₄	Me	> 97	> 25 : 1
3,5-F₂C₆H₃	Me	99	> 25 : 1
4-BrC₆H₄	Me	99	> 25 : 1
4-BrC₆H₄	Et	98	> 25 : 1

Analizom mehanizma azidolize devet nesimetričnih epoksida u plinskoj i vodenoj otopini te izračunima energije aktivacije dokazana je 100 %-na β -regioselektivnost HheC (slika 8). U nekataliziranim reakcijama, svi alifatski epoksidi podliježu β -cijepanju, a kod tri ispitana aromatska epoksida, stiren oksida i *p*-nitrostiren oksida dolazi do α -cijepanja epoksidnog prstena (slika 9). Općenito, velike grupe na supstratu zasjenjuju ugljikov atom i onemogućuju pristup nukleofila, u ovom slučaju azida. Međutim, u slučaju stiren oksida i *p*-nitrostiren oksida nukleofilni napad azidnog iona na C α se lakše ostvaruje zbog stabilizacije pozitivnog naboja delokalizacijom elektrona u konjugiranom sustavu – aromatskom prstenu. Zbog toga u azidolizi supstrata kataliziranoj HheC dolazi do promjene α -regioselektivnosti enzima u β -regioselektivnost (Senthilnathan i sur., 2011).



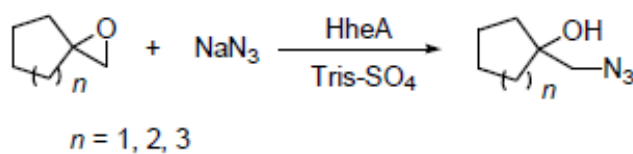
Slika 8. Mehanizam nekatalizirane azidolize epoksida (Senthilnathan i sur., 2011)



Slika 9. Mehanizam azidolize epoksida katalizirane HheC (Senthilnathan i sur., 2011)

2.4.1.2. Azidoliza epoksida katalizirana HheA

Majerić Elenkov i suradnici ispitali su biokatalitičku aktivnost HheA za otvaranje petero-, šestero- i sedmeročlanih spiroepoksida s azidom kao nukleofilom. Provedena reakcija bila je vrlo regioselektivna i znatno brža od nekatalizirane azidolize (slika 10).

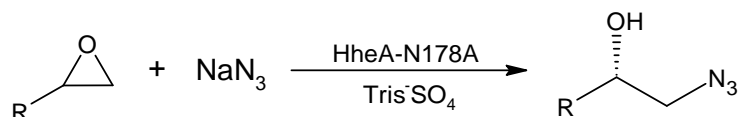


Slika 10. Otvaranje spiroepoksida katalizirano HheA (Majerić Elenkov i sur., 2012)

2.4.1.3. Azidoliza epoksida katalizirana HheA-N178A

Tang i suradnici metodama genetičkog inženjerstva uspješno su pripravili nekoliko modificiranih enzima HheA (Tang i sur., 2012). Na temelju poznate kristalne strukture te racionalnog razmatranja, konstruirana je biblioteka enzima (engl. *saturation mutagenesis library*). Provedena je ciljana modifikacija aminokiselina L141, V136 i N178 koje su smještene u aktivnom mjestu čime su dobiveni aktivni mutanti poboljšanih svojstava (Tang i sur., 2012). Mutant HheA-N178A pokazao je izvrsno poboljšanje kinetičke rezolucije 2-klor-1-feniletanola ($E > 200$) u odnosu na divlji tip ($E = 1,7$) te visoku *S*-selektivnost. U laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu Instituta Ruđer Bošković provedena su testiranja biokatalitičkih svojstava enzima HheA-N178A na malom setu supstrata koji predstavljaju različite klase epoksida. Ovaj modificirani enzim katalizira kinetičku rezoluciju stiren oksida i glicidil etera uz čak 48 puta veću enantioselektivnost, a mutacija na položaju N178 nema nikakv utjecaj na rezoluciju alifatskih i ostalih epoksida (tablica 4) (Mikleušević i sur., 2016).

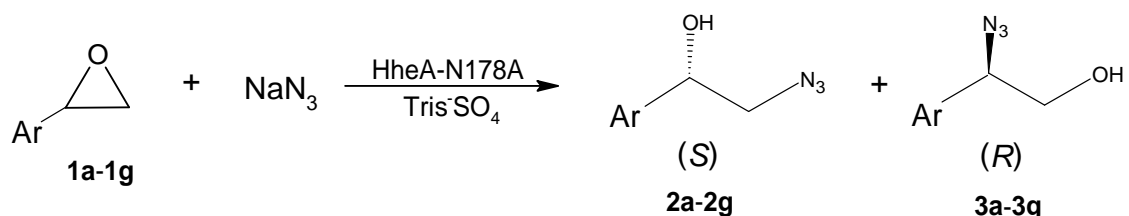
Tablica 4. Enantioselektivnosti HheA i HheA-N178A u reakciji otvaranja epoksida s azidom (Mikleušević i sur., 2016)



R	HheA <i>E</i> -vrijednost	HheA-N178A <i>E</i> -vrijednost
<i>n</i> -Bu	10 (<i>S</i>)	10 (<i>S</i>)
CH ₂ CO ₂ Me	1 (<i>R</i>)	1 (<i>R</i>)
CH ₂ OCH ₂ CH=CH ₂	1 (<i>R</i>)	48 (<i>R</i>)
CH ₂ OC ₆ H ₄	1,5 (<i>S</i>)	20 (<i>R</i>)
CH ₂ C ₆ H ₄	16 (<i>S</i>)	6 (<i>S</i>)
C ₆ H ₅	5 (<i>S</i>)	108 (<i>S</i>)

S obzirom na ostvarenu veću enantioselektivnost HheA-N178A u rezoluciji stiren oksida, isti autori ispitali su kinetičku rezoluciju niza različitih aromatskih epoksida u reakciji otvaranja s azidom kao nukleofilom. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Kinetička rezolucija epoksida **1a-1g** katalizirana HheA-N178A (Mikleušević i sur., 2016)



Pokus	Supstrat	Ar	<i>t</i> / h	Konv. (%)	<i>ev</i> ₁ (%)	<i>ev</i> ₂ (%)	<i>ev</i> ₃ (%)	Omjer 2 : 3
1	<i>rac</i> - 1a	C ₆ H ₅	2	45	72 (<i>R</i>)	99 (<i>S</i>)	91 (<i>R</i>)	57 : 43
2	<i>rac</i> - 1b	4-Cl-C ₆ H ₄	0,75	50	>99 (<i>R</i>)	>99 (<i>S</i>)	>99 (<i>R</i>)	69 : 31
3	<i>rac</i> - 1c	4-Br-C ₆ H ₄	0,75	50	>99 (<i>R</i>)	>99 (<i>S</i>)	>99 (<i>R</i>)	70 : 30
4	(<i>S</i>)- 1c	4-Br-C ₆ H ₄	0,75	100	/	100 (<i>S</i>)	100 (<i>R</i>)	70 : 30
5	(<i>R</i>)- 1c	4-Br-C ₆ H ₄	1	0	/	/	/	/
6	<i>rac</i> - 1d	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	0,5	53	97 (<i>R</i>)	88 (<i>S</i>)	n.o	74 : 26
7	<i>rac</i> - 1e	4-CN-C ₆ H ₄	2	51	85 (<i>R</i>)	>99 (<i>S</i>)	n.o	81 : 19
8	<i>rac</i> - 1f	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	1,5	52	98 (<i>R</i>)	>99 (<i>S</i>)	n.o	94 : 6
9	<i>rac</i> - 1g	2-N-C ₅ H ₅	20	35	43 (<i>R</i>)	63 (<i>R</i>)	/	100 : 0

Genetski modificirana HheA-N178A pokazala je visoku enantioselektivnost prema derivatima stiren oksida. Rezultatima je potvrđeno da je zamjena aminokiselinskog ostatka Asn178 u aktivnom mjestu s alaninom ključna za enantioselektivnost HheA. Osim što ova mutacija utječe na aktivnost i enantioselektivnost (Tang i sur., 2012), ona utječe i na regioselektivnost enzima. Divlji tip HheA pokazuje visoku sklonost napadu nukleofila na terminalni ugljikov atom dok mutant HheA-N178A katalizira nastajanje oba regioizomera. Napad se zbiva na manje zaklonjenom ugljikovom atomu, iako omjer regioizomera ovisi o supstituentu. Najveći omjer regioizomera uočen je kod epoksida s elektron odvlačećim supstituentima. Dakle, u odnosu na divlji tip HheA, mutant HheA-N178A pokazuje smanjenu

regioselektivnost u katalizi azidolize stiren oksida. Iz svih ispitanih *para*-supstituiranih stiren oksida dobiveni su optički čisti (*S*)- β -azidoalkoholi i (*R*)- α -azidoalkoholi. HheA-N178A je prva *S*-enantioselektivna HHDH i izvanredan je primjer kako samo jedna mutacija u aktivnom mjestu može rezultirati tako značajnom promjenom u enantioselektivnosti. U istom radu provedena su testiranja biokatalitičke sposobnosti HheA-N178A u katalizi dvije uzastopne reakcije – zatvaranje halogenhidrina u epoksid i nukleofilnog otvaranja epoksida. Prema rezultatima, dokazano je da HheA jednako efikasno katalizira nastanak azidoalkohola iz bromoalkohola kao i iz epoksida (Mikleušević i sur., 2016).

2.4.1.4. Azidoliza epoksida katalizirana novim skupinama HHDH

Jedna od 17 novoistraženih halogenhidrin dehalogenaza je HheG iz *Ilumatobacter coccineus* koja se pokazala aktivnom u azidolizi cikličkih epoksida koju nisu prihvaćeni kao supstrati od HheC, HheA2 i HheB2 (Elenkov i sur., 2006; Koopmeiners i sur., 2017). U reakciji otvaranja cikloheksan oksida s HheG pomoću azida dobiven je azidoalkohol u enantiomernom višku od 40 %, što ukazuje na umjerenu enantioselektivnost ovog enzima (Koopmeiners i sur., 2017). Isti enzim korišten je u visoko α -regioselektivnom otvaranju derivata stiren oksida u odgovarajuće azidoalkohole s prinosima do 96 % (An i sur., 2019).

2019. godine unutar skupine HHDH otkriven je novi enzim *AbHHDH*, izoliran iz alfavroteobakterije, s visokom aktivnošću i dobrom enantioselektivnošću prema (*R,S*)-fenil glicidil eteru. *AbHHDH* pokazuje nisku do umjerenu *S*-enantioselektivnost u reakciji azidolize ispitanih epoksida (Xue i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Plazmidna DNA i enzimski preparat

Plazmidna DNA nabavljena je od doc.dr.sc. Marine Svetec Miklenić, Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Korištena je za transformaciju elektrokompetentnih stanica MC1061.

Enzim halogenhidrin-dehalogenaza HheA-N178A korištena za biokatalizu u ovom radu dobivena je prekomjernom ekspresijom u stanicama *E. coli* te je izolirana u formi sirovog enzimskog ekstrakta.

3.1.2. Kemikalije

- Amonijev persulfat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Ampicilin, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka
- Destilirana voda
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka
- Glicerol, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka
- Glukoza, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka
- L-arabinoza, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka
- Luria-Bertani hranjiva podloga, Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka
- *N, N, N', N'*-tetrametil etilendiamin (TEMED), Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka
- Natrijev dodecilsulfat (SDS), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Otapalo dimetil sulfoksid (DMSO), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Otapalo za ekstrakciju metil *tert*-butil eter (MTBE), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Tris-SO₄, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- β -merkaptioetanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

3.1.3. Oprema i uređaji

- Analitička vaga, BAS 31 plus, BOECO, Njemačka
- Homogenizator – IKA vortex GENIUS 3, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Jedinica za vertikalnu elektroforezu
- Magnetska miješalica s grijanjem, Tehnica, Železniki, Slovenija
- Plinski kromatograf s plameno-ionizacijskim detektorom, Agilent Series 7820A, SAD

- Sonifikator sa sondom MS 73 od 3 mm, Sonoplus mini20, Bandelin, Njemačka
- Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) s UV/VIS detektorom, Hewlett-Packard Series 1050, Knauer, Njemačka
- UV-VIS spektrofotometar, UV-1601, Shimadzu, Japan
- UV-VIS spektrofotometar, UV-1800, Shimadzu, Japan

3.2. METODE

3.2.1. Priprema enzima

3.2.1.1. Priprema elektrokompetentnih stanica MC1061

Nacijepljivanje trajne bakterijske kulture

Za pripremu krute hranjive podloge, otopljeno je 25 g Luria-Bertani podloge u prahu i 15 g agara u 1 L destilirane vode i autoklavirano tijekom 20 minuta pri 120 °C i 100 kPa. U sterilnim uvjetima (uz plamenik) je izliveno po 20 mL podloge u plastične Petrijeve zdjelice. Stanice *E. coli* soja MC1061 nacijepljene su mikrobiološkom ušicom metodom iscrpljivanja na krutu LB podlogu u Petrijevoj zdjelici (bez dodatka antibiotika). Petrijeva zdjelica je stavljena na inkubaciju preko noći na 37 °C.

Priprema prekonoćne bakterijske kulture

Za pripremu tekuće hranjive podloge, otopljeno je 25 g LB podloge u prahu u 1 L redestilirane vode i autoklavirano tijekom 20 minuta pri 120 °C i 100 kPa. U 5 mL tako pripremljene tekuće LB podloge pipetirano je u sterilnu tikvicu za uzgoj te je u nju mikrobiološkom ušicom dodana 1 kolonija bakterija izraslih preko noći na krutoj LB podlozi. Bakterijska kultura uzgojena je preko noći na 37 °C i 250 rpm.

Uzgoj i pranje stanica

U 200 mL tekuće LB podloge u Erlenmeyerovoj tikvici od 2 L dodano je 450 µL glukoze ($\gamma = 0,5$). U tako pripremljenu hranjivu podlogu dodano je 4 mL svježe prekonoćne bakterijske kulture. Bakterijska kultura uzgajana je na 37 °C i 250 rpm sve dok optička gustoća stanica pri $\lambda = 600$ nm nije dosegla vrijednost apsorbancije $A = 0,389$. Zatim je bakterijska kultura stavljena na led tijekom 20 minuta. Nakon toga je centrifugirana tijekom 20 minuta na 4000 rpm pri 4 °C. Nadtalog je dekantiran, a talog nježno resuspendiran

sterilnom plastičnom pipetom u 45 mL sterilne hladne vode po kiveti. Slijedi ponovno centrifugiranje 20 minuta na 4000 rpm pri 4 °C.

Pranje stanica provodi se uzastopnim centrifugiranjem nakon nježnog resuspendiranja taloga stanica. Kod svakog sljedećeg koraka resuspendiranja, koristi se sve manji volumen deionizirane vode (37,5 mL, 25 mL i 12,5 mL). Nakon posljednjeg centrifugiranja talozi iz svih kiveta se spoje te se resuspendiraju u 20 mL sterilnog hladnog glicerola ($\rho = 0,10$) i po 50 μL stanica se prebaci u pothlađene sterilne epruvete od 1,5 mL. Epruvete s elektrokompetentnim stanicama su smrznute tekućim dušikom i spremljene na -80 °C.

3.2.1.2. Transformacija elektrokompetentnih stanica MC1061 plazmidnom DNA

1 μL plazmidne smjese dodan je u epruvetu s 50 μL elektrokompetentnih stanica MC1061 (prethodno pripremljenih i čuvanih na -80 °C). Ukupni volumen pažljivo je prenesen u pothlađenu kivetu za elektroporaciju. Elektroporacija je izvedena uz napon od 2500 V u trajanju od 5 ms. Nakon elektroporacije, u kivetu je brzo dodan 1 mL LB hranjive podloge, a sadržaj kivete je prebačen u sterilnu tubu za uzgoj i inkubiran je tijekom 30 minuta pri 37 °C uz 250 rpm. 100 μL suspenzije bakterija razmazivanjem sterilnim staklenim štapićem je nacijepljeno na krutu LB podlogu s dodatkom ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ u Petrijevoj zdjelici i ostavljeno na sobnoj temperaturi dok podloga nije upila svu tekućinu. Inkubacija je provedena preko noći na 37 °C.

3.2.1.3. Prekomjerna ekspresija proteina

Priprema prekončne bakterijske kulture: u 20 mL tekuće LB/amp podloge, u Erlenmeyerovoj tikvici od 200 mL, mikrobiološkom ušicom nacijepljeno je 2-5 kolonija transformanata. Bakterijska kultura uzgajana je preko noći pri 37 °C i 250 rpm.

Priprema velike kulture: u 500 mL tekuće LB/amp podloge, u Erlenmeyerovoj tikvici od 2 L, dodano je 500 μL arabinoze (temeljna otopina $\gamma = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$). U tako pripremljenu hranjivu podlogu dodano je 5 mL svježe pripremljene prekončne bakterijske kulture. Bakterijska kultura uzgajana je preko noći pri 30 °C i 200 rpm.

3.2.1.4. Izolacija proteina

Prije postupka izolacije proteina, potrebno je pripremiti TEMG pufer odgovarajućeg sastava:

Tris-SO ₄ (pH 7,5)	10 mmol L ⁻¹
EDTA	1 mmol L ⁻¹
β-merkaptoetanol	1 mmol L ⁻¹
Glicerol	10 %
Deionizirana voda	

500 mL prekonoćne bakterijske kulture podijeljeno je u Falcon epruvete i centrifugirano tijekom 15 minuta na 5000 rpm. Nadtalog je bačen, a talozi zamrznuti na -20 °C. Idući dan zamrznuti talozi su spojeni i pažljivo, na ledu, resuspendirani u TEMG puferu (20 mL pufera po ukupnoj masi taloga). U suspenziju stanica dodan je proteazni inhibitor (Complete, EDTA free, Roche, 400 µL na 10 mL pufera) i suspenzija je sonificirana u ciklusima 10x10" (na ledu, 10 puta po 10 sekundi sonificiranja nakon kojih slijedi 10 sekundi pauze). Sonifikacija je provedena sonifikatorom sa sondom MS 73 od 3 mm, amplitude A = 80, cycle = 1. Nakon soniciranja, suspenzija stanica je centrifugirana tijekom 40 minuta na 11 000 rpm. Nadtalog je razdijeljen u epruvete od 1,5 mL i pohranjen na -20 °C te je kasnije, kao sirovi enzimski ekstrakt, korišten za enzimske reakcije.

3.2.2. SDS-poliakrilamid gel elektroforeza

3.2.2.1. Polimerizacija gelova za SDS-PAGE elektroforezu

Pripremljeni su sljedeći gelovi odgovarajućeg sastava:

Gel za razdvajanje za SDS-PAGE

Deionizirana voda	0,335 %	3,35 mL
1,5 M Tris-SO ₄ pH 8,8	0,25 %	2,5 mL
Poliakrilamid 30 %	0,4 %	4,0 mL
SDS 10 %	0,01 %	100 µL
APS 10 %	0,005 %	50 µL
TEMED	0,0005 %	7 µL

Gel za razdvajanje za SDS-PAGE

Deionizirana voda	0,335 %	3,35 mL
1,5 M Tris-SO ₄ pH 8,8	0,25 %	2,5 mL
Poliakrilamid 30 %	0,4 %	4,0 mL
SDS 10 %	0,01 %	100 µL
APS 10 %	0,005 %	50 µL
TEMED	0,0005 %	7 µL

Kalup za izlivanje gela za elektroforezu sastavljen je od staklene i urezane ploče između kojih se nalaze dvije razmaknice, na svakom rubu ploče. Ploče su postavljene na gumenu brtvu te pričvršćene vijcima i stezaljkama čineći tako pogodnu formu kalupa za izlivanje gela. U kalup je najprije pomoću pipete brzo izliven gel za razdvajanje tako da gornja površina gela bude vodoravna, a zatim je dodan sloj vode za sprječavanje sušenja gela tijekom polimerizacije tijekom 30 minuta. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje, iz kalupa je izlivena voda, a vrh gela posušen je filter papirom. Zatim je u kalup izliven gel za sabijanje te je u njega umetnut „češljic“ koji zbog specifičnog oblika formira pravilne utore u gelu (jažice) koje služe za nanošenje uzoraka. Nakon polimerizacije (oko 30 minuta), iz gela je pažljivo izvučen češljic nakon čega je gel oslobođen iz kalupa i ispran vodom.

3.2.2.2. Priprema uzoraka

Za pripremu uzoraka za SDS-PAGE elektroforezu potrebno je pripremiti pufer sljedećeg sastava:

Deionizirana voda	3,55 mL
0,5 M Tris-SO ₄ pH 6,8	1,25 mL
Glicerol	2,5 mL
SDS 10 %	2 mL
Bromfenolplavo 10 %	0,2 mL

Neposredno prije pripreme uzoraka, 950 µL pufera za pripremu uzorka pomiješano je s 50 µL β-merkaptetanola koji je zatim pomiješan s uzorkom pojedinog enzima u omjeru 1:1 (10 µL uzorka : 10 µL pufera). Uzorci su stavljeni na vortex 1 minutu, a zatim 10 minuta na 95 °C i ponovno 1 minutu na vortex.

3.2.2.3. Priprema jedinice za gel elektroforezu i „gel running“

Najprije je pripremljen pufer za SDS-page elektroforezu sljedećeg sastava:

Deionizirana voda	1 L
Tris	30,285 g
Glicin	144,1344 g
SDS	10 g

Pripremljeni gel umetnut je u jedinicu za elektroforezu, u kojoj je učvršćen stezaljkama, te je dodan pufer za elektroforezu u prostor iznad gela i u gornju komoru za pufer (oko 75 mL). Prva jažica napunjena je s 5 μ L markera, a ostale s 10 μ L uzorka. Zatim je s puferom za elektroforezu napunjena i donja komora za pufer te je jedinica poklopljena poklopcem. Jedinica za elektroforezu spojena je na izvor struje uz napon od 100 V tijekom prvih 10 minuta, a zatim na 200 V. Nakon otprilike 45 minuta, kada je crta s uzorcima spuštена gotovo do dna stakalca, elektroforeza je zaustavljena. Jedinica je rastavljena, a gel s razdvojenim uzorcima oslobođen.

3.2.2.4. Detekcija proteinskih vrpca

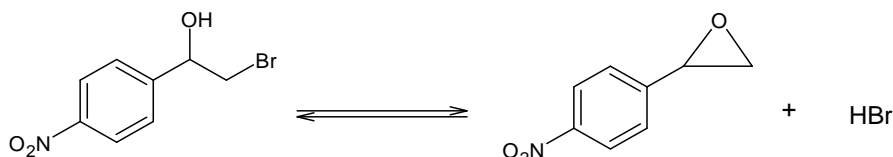
Pripremljena je otopina boje Coomasie Brilliant Blue za bojanje gelova:

Coomasie Brilliant Blue	1 g L ⁻¹
Metanol	100 mL
Octena kiselina 10 %	14 mL
Destilirana voda	86 mL

Da bi se detektirale proteinske vrpce na gelu nakon provedene SDS-PAGE elektroforeze, gel je stavljen u posudu s otopinom za bojanje gela na tresilicu tijekom 1 h na 100 rpm. Nakon toga, otopina za bojanje gela je izlivena, a posuda se nadopunjena 10 %-tnom octenom kiselinom za odbojavanje gela na 100 rpm. Odbojavanje je provođeno do pojave vidljivih proteinskih vrpca na gelu (oko 1 h).

3.2.3. Spektrofotometrijski test aktivnosti enzima s *rac*-1-(*p*-nitrofenil)-2-brometanolom (PNSHH test)

Aktivnost izoliranih proteina potvrđena je mjerenjem vrijednosti apsorbancije pri $\lambda = 310$ nm u reakciji sirovog enzimskog ekstrakta s *rac*-1-(*p*-nitrofenil)-2-brometanolom (PNSHH) u kojoj nastaje *p*-nitrostiren oksid (PNSO) (slika 11). PNSHH je prethodno pripremljen standardnim kemijskim metodama na Institutu Ruđer Bošković.



Slika 11. Reakcija sirovog enzimskog ekstrakta s *rac*-1-(*p*-nitrofenil)-2-brometanolom

Mjerenje aktivnosti enzima temelji se na praćenju porasta razlike apsorbancije između PNSHH i PNSO u vremenu ($\frac{\Delta A}{\Delta t}$, min^{-1}) pomoću koje se računa volumetrijska aktivnost enzima

($V. A.$, U mL^{-1}):

$$V. A. = \frac{V_r}{\varepsilon d V_E} \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad [3]$$

V_r (mL) – volumen uzorka u kiveti

E ($\text{mmol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$) – ekstincijski koeficijent, ε (epoksid) = $4,289 \text{ mmol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$

d (cm) – širina kivete ($d = 1$ cm)

V_E (mL) – volumen enzima

2 μL matične otopine PNSHH u DMSO (100 mmol L^{-1}) dodano je u 998 μL Tris- SO_4 pufera (pH 7,5) u kvarčnoj kiveti te je pomoću UV/ VIS spektrofotometra (UV-1800, Shimadzu) pri $\lambda = 310$ nm provjereno da se početna vrijednost apsorbancije nalazi unutar zadanog raspona ($A = 0,6 - 0,7$). Reakcija je započeta dodatkom 10 μL enzima u otopinu u kvarčnoj kiveti.

3.2.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

U 0,8 mL uzorka u plastičnoj kiveti dodano je 0,2 mL Bradfordovog reagensa. Uzorci su miješani na vortexu 5 sekundi i stavljeni na inkubaciju tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, izmjerena je apsorbancija pri $\lambda = 595$ nm na UV/VIS

spektrofotometru (UV-1601, Shimadzu). Koncentracija proteina izračunata je pomoću baždarnog pravca koji prikazuje ovisnost apsorbancije otopina goveđeg serumskog albumina (BSA) o pripadajućoj vrijednosti koncentracije. Za izradu baždarnog dijagrama pripremljene su otopine BSA u koncentracijama od 0; 1; 2,5 i 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2.5. Biokatalitičke transformacije katalizirane HheA-N178A

3.2.5.1. Otvaranje epoksida **1a-1e** s azidom katalizirano HheA-N178A – opći postupak

U Tris-SO₄ pufer (2 mL, 50 mmol L⁻¹, pH 7,5) pri sobnoj temperaturi dodana je temeljna otopina epoksida **1a-1e** u DMSO-u (100 μL , 5,0 mmol, konačna koncentracija 2 mmol L⁻¹), zatim temeljna otopina NaN₃ (150 μL , 7,5 mmol, konačna koncentracija 3 mmol L⁻¹). Reakcije su započete dodatkom 250 μL sirovog enzimskog ekstrakta HheA-N178A u TEMG puferu. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 2,5 mL. Reakcije su praćene uzimanjem 0,5 mL uzorka svakih sat vremena, unutar 3 h. Uzorci su zatim ekstrahirani u 1 mL MTBE (metil *tert*-butil eter) uz mesitilen kao unutarnji standard te su osušeni propuštanjem kroz stupac Na₂SO₄. Tako pripremljeni uzorci analizirani su plinskom kromatografijom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti na kolonama s kiralnom nepokretnom fazom.

3.2.5.2. Otvaranje epoksida **1a-1e** s azidom – reakcija bez prisustva enzima

U Tris-SO₄ pufer (2,25 mL, 50 mmol L⁻¹, pH 7,5) pri sobnoj temperaturi dodana je temeljna otopina epoksida **1a-1e** u DMSO-u (100 μL , 5,0 mmol, konačna koncentracija 2 mmol L⁻¹), zatim temeljna otopina NaN₃ (150 μL , 7,5 mmol, konačna koncentracija 3 mmol L⁻¹). Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 2,5 mL. Reakcije su praćene uzimanjem 0,5 mL uzorka svakih sat vremena, unutar 3 h. Uzorci su zatim ekstrahirani u 1 mL MTBE (metil *tert*-butil eter) uz mesitilen kao unutarnji standard te su osušeni propuštanjem kroz stupac Na₂SO₄. Tako pripremljeni uzorci analizirani su plinskom kromatografijom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti na kolonama s kiralnom nepokretnom fazom.

3.2.5.3. Testiranje hidrolitičke stabilnosti epoksida – reakcija bez prisustva enzima i azida

U Tris-SO₄ pufer (2,4 mL, 50 mmol L⁻¹, pH 7,5) pri sobnoj temperaturi dodana je temeljna otopina epoksida **1a-1e** u DMSO-u (100 μL , 5,0 mmol, konačna koncentracija 2 mmol L⁻¹). Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 2,5 mL. Reakcije su praćene uzimanjem 0,5 mL uzorka svakih sat vremena, unutar 3 h. Uzorci su zatim ekstrahirani u 1

mL MTBE (metil *tert*-butil eter) uz mesitilen kao unutarnji standard te su osušeni propuštanjem kroz stupac Na₂SO₄. Tako pripremljeni uzorci analizirani su plinskom kromatografijom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti na kolonama s kiralnom nepokretnom fazom.

3.2.6. Kromatografske metode

Plinska kromatografija (GC) rađena je na instrumentu Agilent Series 7820A s plameno-ionizacijskim detektorom i dušikom kao plinom nosiocem. Temperatura injektora iznosila je 250 °C, a temperatura detektora 300 °C.

Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (HPLC) provedena je na Hewlett-Packard Series 1050 instrumentu uz UV/VIS detektor tvrtke Knauer K-2301, na kolonama s kiralnom nepokretnom fazom.

3.2.6.1. Praćenje tijeka enzimskih reakcija i određivanje β -regioselektivnosti

Tijek reakcija praćen je pomoću metode plinske kromatografije na HP 5 koloni (Agilent, 30 m x 0,32 mm) prema temperaturnom programu 50 °C 2 min, 15 °C min⁻¹ do 200 °C, temperatura detektora 300 °C, temperatura injektora 250 °C.

β -regioselektivnost određena je prema jednadžbi 4:

$$\beta - \text{regioselektivnost (\%)} = \frac{\beta}{\alpha + \beta} \cdot 100 \quad [4]$$

gdje je β površina pika ispod sekundarnog azidoalkohola **2a-2e**, a α površina pika ispod primarnog azidoalkohola **3a-3e**.

3.2.6.2. Određivanje enantiomerne čistoće i apsolutne konfiguracije produkata enzimskih reakcija

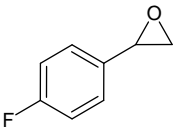
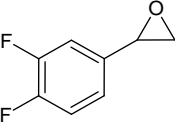
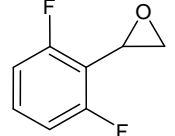
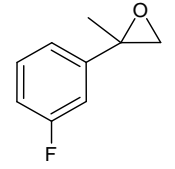
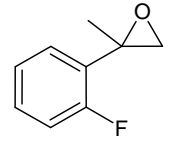
Enantiomerna čistoća kiralnog spoja izražava se kao enantiomerni višak *ev* (engl. *enantiomeric excess, ee*) i predstavlja omjer razlike i sume količina pojedinih enantiomera u smjesi, a računa se prema jednadžbi 5:

$$ev (\%) = \frac{S - R}{S + R} \cdot 100 \quad [5]$$

gdje je *R* površina ispod pika zastupljenijeg enantiomera, a *S* površina pika drugog enantiomera. Enantiomerni višak produkta i supstrata u reakcijskoj smjesi ovise o stupnju konverzije.

Metodama plinske kromatografije na kolonama s kiralnom nepokretnom fazom određena je enantiomerna čistoća neizreagiranih supstrata (*e*_{v1}). Eksperimentalni podaci o uvjetima, kolonama i retencijskim vremenima za odjeljivanje spojeva **1a-1e** nalaze se u tablici 6.

Tablica 6. Analiza racemičnih epoksida na kolonama s kiralnom nepokretnom fazom.

Spoj	Epoksid	Kolona	Uvjeti	<i>t</i> _R /min
1a		Lipodex E	100 °C, 5 °C min ⁻¹ do 150 °C	4,1 (<i>S</i>) / 4,4 (<i>R</i>)
1b		Chirasil-DEX CB	100 °C, 2 °C min ⁻¹ do 120 °C	8,4 (<i>R</i>) / 8,8 (<i>S</i>)
1c		Chirasil-DEX CB	100 °C, 1 °C min ⁻¹ do 120 °C	7,7 (<i>R</i>) / 7,9 (<i>S</i>)
1d		Lipodex E	100 °C izotermno	9,0 (<i>R</i>) / 9,9 (<i>S</i>)
1e		Lipodex E	100 °C 2 min, 5 °C min ⁻¹ do 140 °C	8,5 (<i>R</i>) / 8,8 (<i>S</i>)

Pomoću iste metode te korištenjem referentnih spojeva određena je apsolutna konfiguracija produkata. Enantiomerne čistoće produkata azidoalkohola (ev_2 i ev_3) određene su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) na kolonama s kiralnom nepokretnom fazom. Eksperimentalni podaci o uvjetima, kolonama i retencijskim vremenima za odjeljivanje spojeva prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Uvjeti HPLC analize za određivanje enantiomerne čistoće produkata **2a-2e** i **3a-3e**.

Spoj	Kolona	Uvjeti	t_R /min
2a	Chiralpak IC-3	1 % 2-PrOH/heksan, 1 mL min ⁻¹ , 254 nm, 30 °C	19,0 (<i>R</i>) / 20,3 (<i>S</i>)
3a			26,5 (<i>R</i>) / 28,9 (<i>S</i>)
2b	Chiralpak IC-3	1 % 2-PrOH/heksan, 1 mL min ⁻¹ , 254 nm, 30 °C	19,2 (<i>R</i>) / 20,1 (<i>S</i>)
3b			28,0 (<i>R</i>) / 34,1 (<i>S</i>)
2c	Chiralpak IC-3	1 % 2-PrOH/heksan, 1 mL min ⁻¹ , 254 nm, 30 °C	21,9 (<i>R</i>) / 24,4 (<i>S</i>)
3c			28,6 (<i>R</i>) / 29,9 (<i>S</i>)
2d	Chiralpak IC-3	1 % 2-PrOH/heksan, 1 mL min ⁻¹ , 254 nm, 30 °C	15,5 (<i>R</i>) / 16,0 (<i>S</i>)
3d			19,8 (<i>R</i>) / 22,9 (<i>S</i>)
2e	Chiralpak IC-3	1 % 2-PrOH/heksan, 1 mL min ⁻¹ , 254 nm, 30 °C	8,6 (<i>R</i>) / 9,2 (<i>S</i>)
3e			19,1 (<i>R</i>) / 20,4 (<i>S</i>)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UVOD U RASPRAVU

Halogenhidrin dehalogenaze (HHDH), u početku otkrivene zbog sposobnosti razgradnje halogeniranih spojeva (Castro i Bartnicki, 1986), jako su korisni biokatalizatori koji kataliziraju reverzibilnu dehalogenaciju vicinalnih halogenalkohola formiranjem odgovarajućih epoksida (You i sur., 2013). HHDH također imaju mogućnost otvaranja epoksida pomoću niza malih anionskih nukleofila poput azida, cijanida, nitrita, cijanata ili tiocijanata čime je omogućena regio- i enantioselektivna tvorba novih C-N, C-C, C-O i C-S veza. Stoga, reakcije katalizirane ovim enzimima predstavljaju novu strategiju u sintezi sintetski važnih β -supstituiranih alkohola i kiralnih epoksida (Hasnaoui-Dijoux i sur., 2008).

HHDH pripadaju superobitelji kratkolančanih dehidrogenaza/reduktaza (engl. *short-chain dehydrogenases/reductases*, SDRs). U odnosu na ostale SDR enzime, HHDH ne posjeduju vezno mjesto za kofaktor, nego na tom mjestu imaju vezno mjesto za halogenid (van Hylckama Vlieg i sur., 2001). Katalitička trijada HHDH sastoji se od aminokiselinskih ostataka Ser/Tyr/Arg (de Jong i sur., 2003).

Najveći nedostatak kod upotrebe HHDH je relativno malen broj poznatih enzima. (*R*)-selektivna HheC je najbolje biokatalitički karakterizirana, dok je dostupnost (*S*)-selektivnih enzima ograničena. Genetskim modifikacijama aminokiselinske sekvence moguće je poboljšati svojstva enzima, kao što su aktivnost, enantioselektivnost, stabilnost. Dosadašnjim istraživanjima dokazano je da aminokiselinski ostatak W249 na C-terminalnom kraju HheC enzima ima ključnu ulogu u regulaciji termostabilnosti i aktivnosti ovog enzima. Genetski modificirana varijanta PX14 koja je pokazala bolje kinetičke karakteristike u odnosu na divlji tip HheC imala je modifikaciju W249P (Wang i sur., 2015). U istraživanju otvaranja epoksidnog prstena pomoću cijanida kataliziranom HheC-T134A uočeno je da ta mutacija uzrokuje kidanje vodikove veze između aminokiselinskog ostatka 134 i Ser132 kojom se u aktivnom mjestu stabilizira kisik supstrata. Također je uočeno povećanje brzine enzimskih reakcija s različitim supstratima (Schallmey i sur., 2015). Mutacija HheC-T134A u ispitivanjima nije pokazala negativan utjecaj na enantioselektivnost enzima HheC, a u kombinaciji s drugim mutacijama ostvareno je dvostruko povećanje enantioselektivnosti, bez utjecaja na aktivnost divljeg tipa enzima (Guo i sur., 2015).

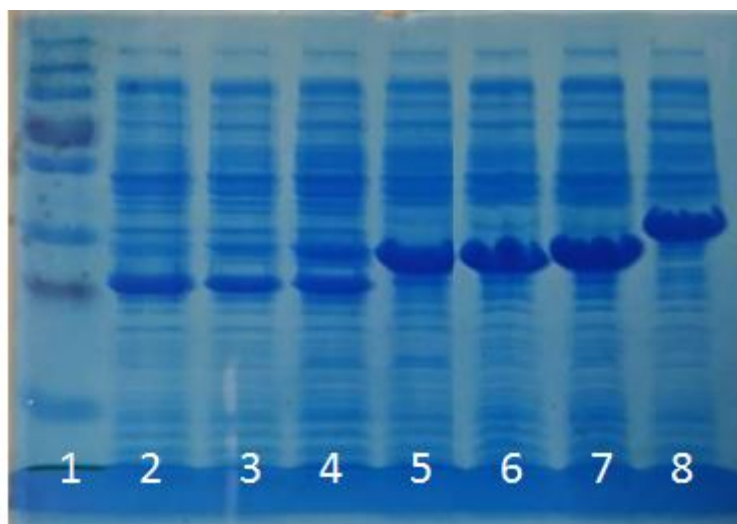
Kristalna struktura pokazala je da je aktivno mjesto u HheA mnogo otvorenije, čime se može objasniti lošija selektivnost ovog enzima u odnosu na HheC (de Jong i sur., 2006). Dosadašnjim istraživanjima dokazano je da tri aminokiselinska ostatka – L141, V136 i N178, koja se nalaze u blizini aktivnog mjesta enzima, imaju ključnu ulogu u enantioselektivnosti

HheA. Konkretno, aminokiselinski ostatci na pozicijama 136 i 141 odgovorni su za kontrolu vezanja fenilne skupine ispitanog supstrata, dok je modifikacijom N178 u veznom mjestu halogenida ostvarena visoka *S*-enantioselektivnost enzima (Tang i sur., 2012).

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti niz različiti HHDH, uključujući divlje tipove enzima kao i genetski modificirane varijante, te ispitati biokatalitička svojstva jednog od enzima kao biokatalizatora za enantioselektivnu sintezu fluoroaril-supstituiranih azidoalkohola.

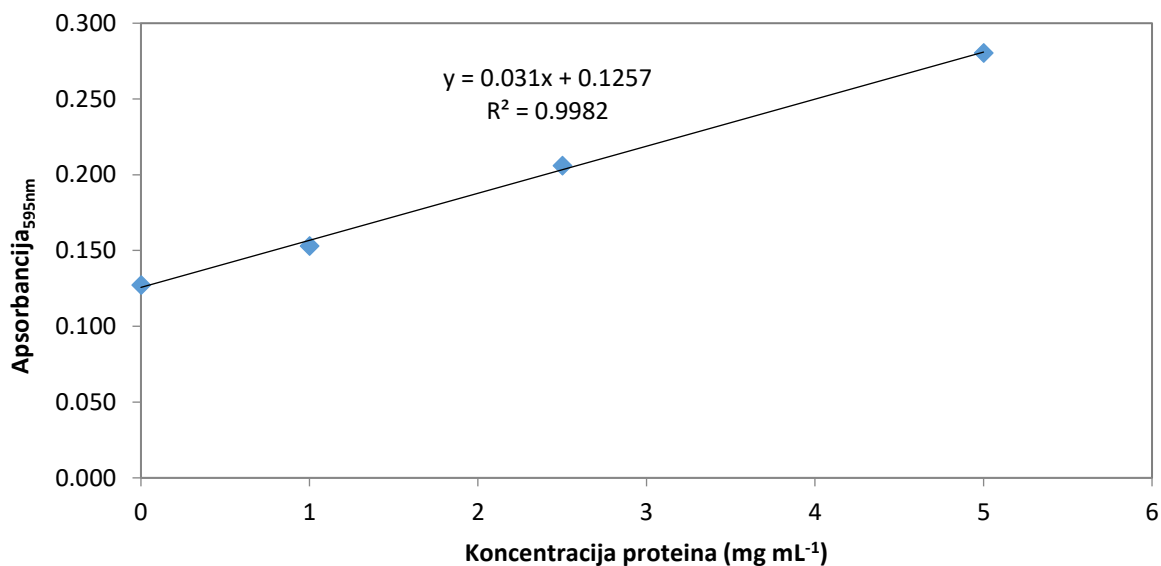
4.2. PRIPREMA ENZIMA

U okviru ovog rada, pripremljene su elektrokompetentne stanice *E. coli* MC1061 metodom obogaćivanja trajne bakterijske kulture. Zatim je pomoću napona (elektroporacijom) provedena transformacija pripremljenih elektrokompetentnih stanica odgovarajućom plazmidnom DNA koja je izolirana u Laboratoriju za genetiku i mikrobiologiju mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Za pripravu enzima odabrano je 7 različitih HHDH: 3 divlja tipa – HheA, HheB i HheC i 4 genetski modificirane varijante – HheA-N178A, HheC-T134V, HheC-W249P i HheC-W4, koje bi prema saznanjima dosadašnjih istraživanja mogle pokazati bolja biokatalitička svojstva u odnosu na divlji tip enzima. Geni za odabrane enzime koji su sadržani u plazmidnoj DNA, prekomjerno su eksprimirani u stanicama *E. coli*. Prekomjerna ekspresija proteina uspješno je provedena za sve odabrane HHDH što je potvrđeno elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (slika 12).



Slika 12. Elektroforeza pripremljenih sirovih enzimskih ekstrakata: 1. marker, 2. HheA, 3. HheA-N178A, 4. HheB, 5. HheC, 6. HheC-T134V, 7. HheC-W249P, 8. HheC-W4

Koncentracija ukupnih proteina određena je metodom po Bradfordu. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije mjerene pri $\lambda = 595 \text{ nm}$ o poznatim koncentracijama otopina goveđeg serumskog albumina (BSA) prema kojem je određena koncentracija ukupnih proteina u sirovom enzimskom ekstraktu prikazan je na slici 13.



Slika 13. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ukupnih proteina u sirovom enzimskom ekstraktu metodom po Bradfordu

Izmjerene vrijednosti koncentracije ukupnih proteina u sirovim enzimskim ekstraktima su u rasponu od 2,8 do 6 mg mL⁻¹ (tablica 8) te odgovaraju vrijednostima ostvarenim u dosadašnjim istraživanjima.

Aktivnost izoliranih proteina određena je testom kromogenog supstrata koji se temelji na praćenju razlike apsorbancije pri $\lambda = 310 \text{ nm}$ u reakciji sirovog enzimskog ekstrakta s *rac*-1-(*p*-nitrofenil)-2-brometanolom (PNSHH) u kojoj nastaje *p*-nitrostiren oksid (PNSO). Postupak je opisan u poglavlju 3. 2., a rezultati su prikazani u tablici 8.

Tablica 8. Rezultati priprave enzima.^a

Enzim	Volumen dobivenog enzimskog ekstrakta (mL)	Koncentracija ukupnih proteina (mg mL ⁻¹)	Aktivnost enzima (U mL ⁻¹)
HheA	24	4,0	3,5
HheA-N178A	24	2,8	6,7
HheB	24	3,5	2,7
HheC	24	5,4	10,2
HheC-T134V	24	5,1	3,5
HheC-W249P	24	6,0	3,5
HheC-W4	24	5,5	10,6

^aenzimski ekstrakti dobiveni iz 0,5 L bakterijske kulture

Enzimi su uspješno eksprimirani i izolirani iz svih uzgojenih stanica. Ekspresija HheC i njenih modificiranih varijanti znatno je viša u odnosu na HheA i HheB te iznosi otprilike 60 % ukupnih proteina u stanici. Na ovaj način iz 0,5 L bakterijske kulture dobiveno je između 67 i 144 mg proteina. Svi sirovi enzimski ekstrakti sadrže aktivne proteine što je potvrđeno mjerenjem enzimске aktivnosti te su kao takvi, bez dodatnog pročišćavanja, korišteni u biokatalizi.

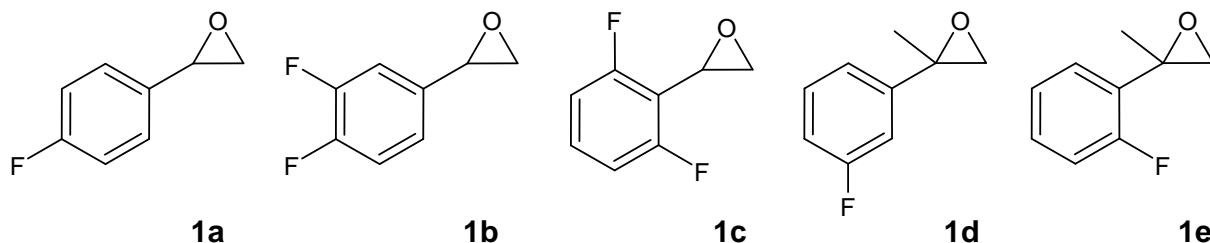
Za daljna biokatalitička ispitivanja odabran je genetski modificirani enzim HheA-N178A zbog svojih interesantnih katalitičkih svojstava.

4.3. AZIDOLIZA FLUORIRANIH DERIVATA STIREN OKSIDA KATALIZIRANA HheA-N178A

Zamjenom asparaginskog ostatka na mjestu 178 u alanin u aktivnom mjestu HheA postignuto je značajno povećanje enantioselektivnosti tog enzima. Ovo otkriće je bilo od velikog značaja budući da je modificirani enzim HheA-N178A prva *S*-enantioselektivna HHDH (Tang i sur., 2012). HheA-N178A pokazuje povećanu enantioselektivnost te smanjenu regioselektivnost u katalizi azidolize stiren oksida i derivata (*p*-Cl-, *p*-Br-, *p*-CN- i *p*-NO₂-stiren oksid) (Miklušević i sur., 2016).

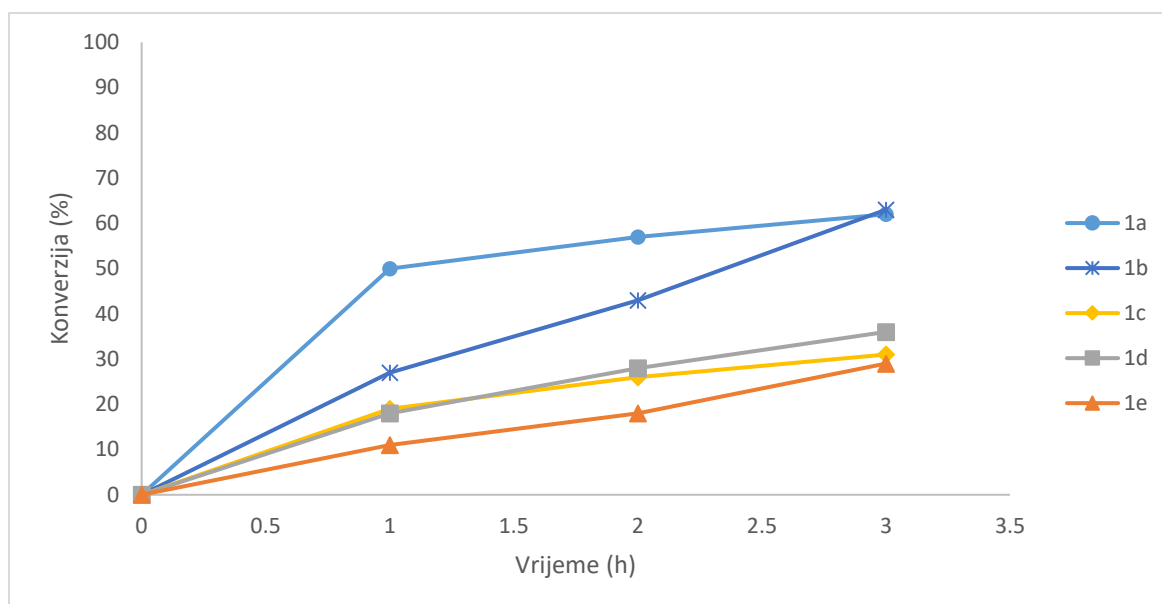
Dostupnost enantiomerno čistih, fluoriranih građevnih blokova i prekursora od ključne je važnosti pri dizajnu i razvoju lijekova u farmaceutskoj industriji. Zahvaljujući jakoj elektronegativnosti, fluor je moćan modulator fizikalnih i kemijskih svojstava organskih molekula. Osim toga, ima mogućnost povećanja farmakološke učinkovitosti i bioapsorpcije potencijalnog lijeka. U cilju dobivanja biološki aktivnih fluoriranih spojeva, biokatalitička modifikacija jednostavnijih molekula koje već posjeduju C-F vezu privlačna je alternativa skupoj i toksičnoj, metalima kataliziranoj fluorinaciji molekula (Gillis i sur., 2015).

U ovom radu izabran je set od 5 fluoriranih aromatskih epoksida **1a-1e** (slika 14) različitog položaja supstitucije, te je provedena kinetička rezolucija katalizirana HheA-N178A u prisutnosti azida kao nukleofila. Svi racemični supstrati, kao i standardni spojevi prethodno su pripremljeni standardnim kemijskim metodama na Institutu Ruđer Bošković.



Slika 14. Supstrati za ispitivanje biokatalitičkih svojstava HheA-N178A

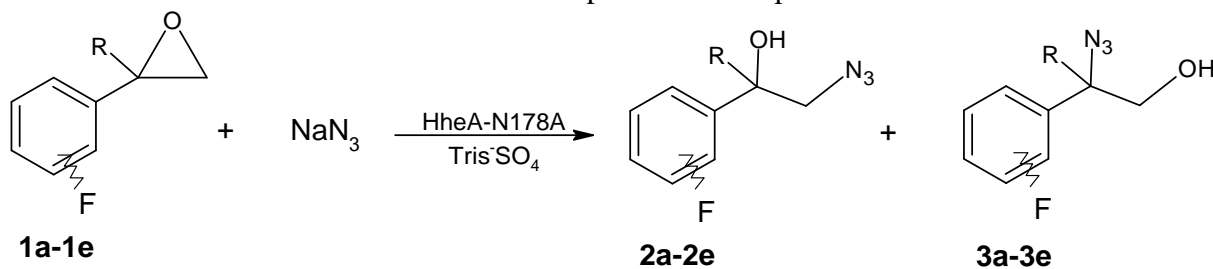
Reakcije su provedene koristeći sirovi enzimski ekstrakt u Tris-SO₄ puferu, epoksid **1a-1e** (2 mmol L⁻¹) te NaN₃ u koncentraciji od 3 mmol L⁻¹. Reakcije su praćene plinskom kromatografijom te je pomoću dobivenih podataka određena konverzija supstrata. Reakcije su paralelno provedene bez prisustva enzima, kako bi se odredio udio spontane, nekatalizirane reakcije. Hidrolitička stabilnost supstrata provjerena je u Tris-SO₄ puferu bez prisustva enzima i NaN₃. Krivulje tijekom reakcija prikazane su na slici 15.



Slika 15. Konverzija epoksida **1a-1e** u reakciji azidolize kataliziranoj HheA-N178A. Reakcijski uvjeti: 2 mmol L⁻¹ epoksida; 3 mmol L⁻¹ NaN₃; 250 μL HheA-N178A u 50 mmol L⁻¹ Tris-SO₄ puferu; 25 °C

Enantiomerni višak supstrata **1** (ev_1) određen je plinskom kromatografijom, a enantiomerna čistoća produkata **2** (ev_2) i **3** (ev_3) tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti na kolonama s kiralnom nepokretnom fazom. Iz dobivenih podataka (ev_1 i ev_2) izračunate su E -vrijednosti. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 9 i na slici 16.

Tablica 9. Rezultati biokatalitičke azidolize epoksida **1a-1e** pomoću HheAN178A.^a



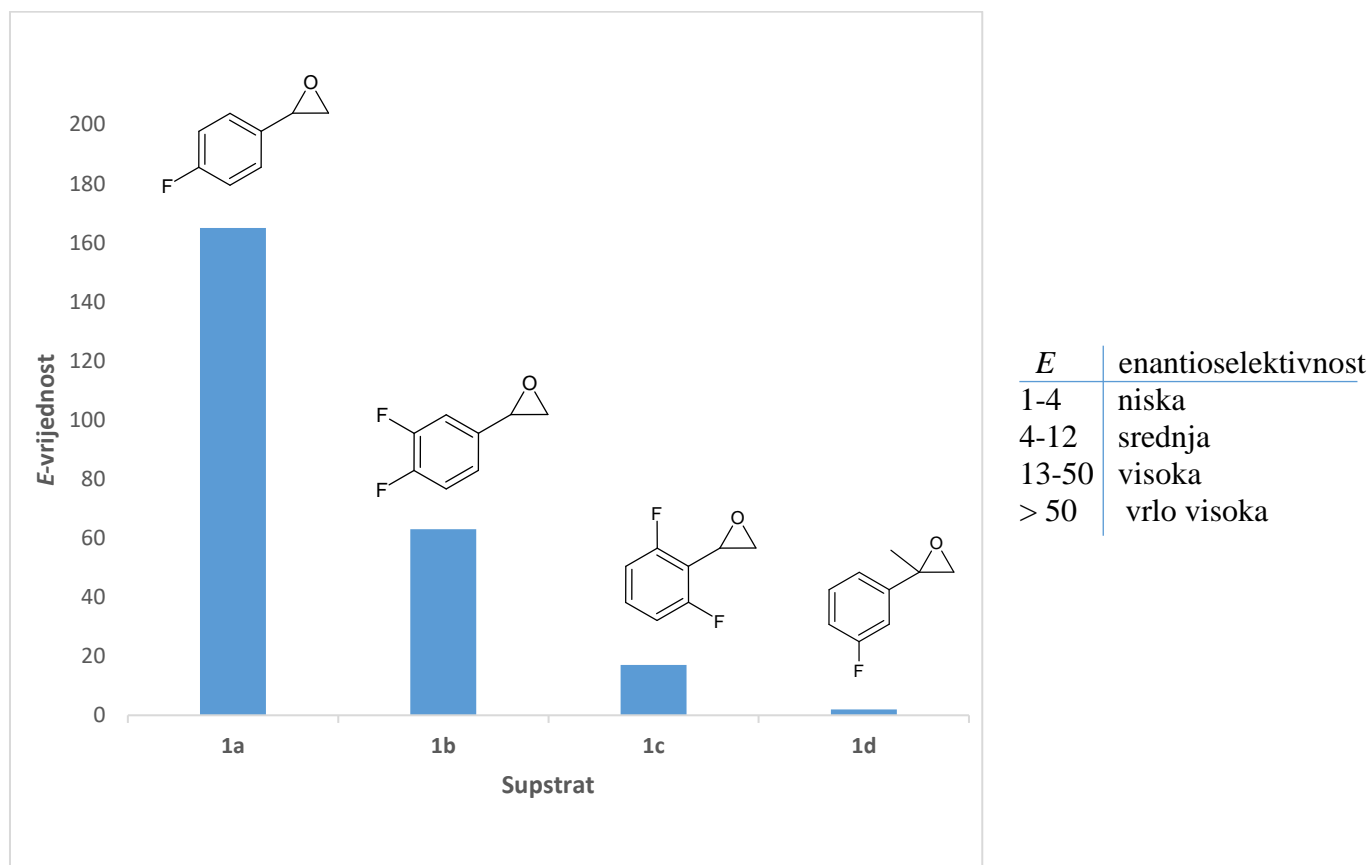
R = H, Me

Supstrat	Konverzija (%)		<i>ev</i> ₁ (%)	<i>ev</i> ₂ (%)	<i>ev</i> ₃ (%)	<i>E</i> -vrijednost	β-regioselektivnost	
	Ukupna	Enzimska					Ukupna	Enzimska
1a	57	50	97 (<i>R</i>)	95 (<i>S</i>)	67	165	59	66
1b	43	33	48 (<i>R</i>)	95 (<i>S</i>)	67	63	72	77
1c	26	6	6 (<i>R</i>)	88 (<i>S</i>)	/	17	100	100
1d	28	9	3 (<i>R</i>)	31 (<i>S</i>)	/	2	100	100
1e	18	0	/	/	/	/	/	/

^a Uvjeti: epoksid (5,0 μmol, 2 mmol L⁻¹), NaN₃ (7.5 μmol, 3 mmol L⁻¹), 250 μL HheA-N178A u Tris-SO₄ puferu (2 mL, 50 mmol L⁻¹, pH 7.5); 25 °C, reakcijsko vrijeme 2h.

Prema rezultatima, vidljivo je da enzimska reakcija napreduje sa svim ispitanim supstratima, osim s **1e** čija je konverzija rezultat spontane hidrolize epoksida koja se odvija u danim reakcijskim uvjetima. I kod ostalih supstrata primjećena je razlika između ukupne konverzije i one katalizirane enzimom. Ta je razlika u najvećoj mjeri posljedica hidrolitičke nestabilnosti epoksida i u nešto manjoj spontane azidolize. Utvrđeno je da se spontana hidroliza epoksida odvija brzinom od 5 – 10 % h⁻¹, ovisno o supstratu, te ima znatan utjecaj na iskorištenje reakcije. Enzim pokazuje najveću aktivnost prema supstratima **1a** i **1b**, kao i najveću enantioselektivnost. U oba slučaja, nukleofilni napad odvija se neselektivno na oba C-atoma prstena te u reakciji nastaje smjesa regioizomera (**2a:3a** = **66:34** i **2b:3b** = **77:23**). Oba produkta rezultat su enzimске reakcije. Nastanku α-azidoalkohola (**3a** i **3b**) u manjoj mjeri doprinosi i spontana reakcija azidolize bez prisustva enzima što za posljedicu ima nešto nižu enantiomernu čistoću (*ev* = 67 %), dok je **2a** i **2b** nastaju isključivo enzimskom reakcijom u visokoj enantiomernoj čistoći od 95 %. Znatno nižu aktivnost enzim je pokazao prema supstratima **1c** i **1d**, kod kojih su postignute konverzije ispod 10 % unutar 2 h. Obje reakcije odvijaju se potpuno regioselektivno uz preferirani napad azida na βC-atom.

Svi nastali β -azidoalkoholi **2a-2d** su (*S*)-apsolutne konfiguracije što znači bržu konverziju (*S*)-enantiomera supstrata u reakcijama kataliziranim HheA-N178A. Primarni azidoalkoholi **3a-3d** imaju (*R*)-apsolutnu konfiguraciju kao posljedicu nukleofilnog α -napada na C1 atom (*S*)-enantiomera supstrata.



Slika 16. *E*-vrijednost u reakcijama azidolize sa supstratima **1a-1d** kataliziranim HheA-N178A

Ovi rezultati pokazuju da položaj supstituenata na fenilnom prstenu ima velik utjecaj na enzimsku aktivnost, enantioselektivnost i regioselektivnost. Za visoku enantioselektivnost reakcije, čini se da je presudan supstituent na *para*-položaju. HheA-N178A pokazuje visoku enantioselektivnost prema oba supstrata koja posjeduju F-atom na *para*-položaju (**1a** i **1b**: *E* >50, slika 16). Pomicanjem supstituenta prema epoksidnom prstenu (**1c**: *E*=17), enantioselektivnost pada, dok najnepovoljniji učinak ima metilna skupina kao drugi supstituent na kiralnom centru (**1d** i **1e**).

Ova istraživanja potvrdila su kako je HheA-N178A *S*-enantioselektivna HDDH pomoću koje se uspješno mogu provesti kinetičke rezolucije fluoriranih derivata stiren oksida, koje na kiralnom centru posjeduju samo jedan supstituent. Za provođenje ovih reakcija na preparativnoj skali nužno je optimizirati reakcijske uvjete. Budući da se radi o relativno

hidrolitički nestabilnim supstratima, koji su ujedno u vodenom mediju topivi u niskim koncentracijama (*cca.* 2 mM), za preparativne svrhe i razvoj procesa bit će nužno modificirati reakcijske uvjete. To se u prvome redu odnosi na upotrebu organskih otapala, odnosno provođenje reakcija u dvofaznom mediju gdje se mogu postići više koncentracije supstrata te povećati stabilnost supstrata.

5. ZAKLJUČCI

1. Pripravljeno je 7 različitih halogenhidrin dehalogenaza – divlji tipovi (HheA, HheB i HheC) i genetski modificirane varijante (HheA-N178A, HheC-T134V, HheC-W249P i HheC-W4). Enzimi su dobiveni prekomjernom ekspresijom proteina koja je potvrđena SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom te je izmjerena njihova aktivnost i koncentracija ukupnih proteina u sirovim enzimskim ekstraktima.
2. Za biokatalitička istraživanja odabran je enzim HheA-N178A te je korišten u biokatalitičkim transformacijama racemičnih epoksida **1a-1e** s azidom kao nukleofilom s ciljem ispitivanja katalitičke aktivnosti i enantioselektivnosti enzima.
3. Za praćenje enzimskih reakcija, analizu produkata enzimskih reakcija te za određivanje enantiomerne čistoće supstrata i produkata korištene su metode plinske kromatografije i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.
4. Položaj supstituenta na fenilnom prstenu i prisutnost metilne skupine na epoksidnom prstenu supstrata utječu na brzinu enzimske reakcije, regioselektivnost i enantioselektivnost.
5. Metilna skupina kao drugi supstituent na kiralnom centru ima izuzetno nepovoljan utjecaj na enzimsku aktivnost i enantioselektivnost.
6. Za visoku enantioselektivnost reakcije presudan je supstituent na *para*-položaju.
7. Najbolji supstrat za HheA-N178A pokazao se *p*-F-stiren oksid (**1a**).
8. Azidolizom racemičnih epoksida **1a-1e** kataliziranom HheA-N178A dobiveni su odgovarajući β -azidoalkoholi (*S*) apsolutne konfiguracije i (*R*)- α -azidoalkoholi.

6. LITERATURA

Ahmed, M., Kelly, T., Ghanem, A. (2012) Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation. *Tetrahedron*. **68**, 6781–6802.

An, M., Liu, W., Zhou, X., Ma, R., Wang, H., Cui, B., Han, W., Wan, N., Chen, Y. (2019) Highly α -position regioselective ring-opening of epoxides catalyzed by halohydrin dehalogenase from *Ilumatobacter coccineus*: A biocatalytic approach to 2-azido-2-aryl-1-ols. *RSC Adv*. **9**, 16418–16422.

Archelas, A., Furstoss, R. (2001) Synthetic applications of epoxide hydrolases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 112–119.

Bartnicki, E. W., Castro, C. E. (1969) Biodehalogenation. The Pathway for Transhalogenation and the Stereochemistry of Epoxide Formation from Halohydrin. *Biochemistry* **8**, 4677–4680.

Castro, C. E., Bartnicki, E. W. (1968) Biodehalogenation. Epoxidation of Halohydrins, Epoxide Opening and Transhalogenation by a *Flavobacterium* sp. *Biochemistry* **7**, 3213–3218.

Chen, C.-S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C. J. (1982) Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **104**: 7294–7299.

De Jong, R. M., Tiesinga, J. J. W., Rozeboom, H.J., Kalk, K. H., Tang, L., Janssen, D. B., Dijkstra, B. W. (2003) Structure and mechanism of a bacterial haloalcohol dehalogenase: A new variation of the short-chain dehydrogenase/reductase fold without an NAD(P)H binding site. *EMBO J.* **22**, 4933–4944.

De Jong, R. M., Kalk, K. H., Tang, L., Janssen, D. B., Dijkstra, B. W. (2006) The X-ray structure of the haloalcohol dehalogenase HheA from *Arthrobacter* sp. strain AD2: Insight into enantioselectivity and halide binding in the haloalcohol dehalogenase family. *J. Bacteriol.* **188**, 4051–4056.

Elenkov, M. M., Hoeffken, H. W., Tang, L., Hauer, B., Janssen, D. B. (2007) Enzyme-catalyzed nucleophilic ring opening of epoxides for the preparation of enantiopure tertiary alcohols. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 2279–2285.

- Elenkov, M. M., Hauer, B., Janssen, D. B. (2006) Enantioselective ring opening of epoxides with cyanide catalysed by halohydrin dehalogenases: A new approach to non-racemic β -hydroxy nitriles. *Adv. Synth. Catal.* **348**, 579–585.
- Faber, K. (2001) Non-Sequential Processes for the Transformation of a Racemate into a Single Stereoisomeric Product: Proposal for Stereochemical Classification. *Chem. Eur. J.* **7**, 5004-5010.
- Faber, K. (2011) *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6. izd., Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Gillis, E. P., Eastman, K. J., Hill, M.D., Donnelly, D. J., Meanwell, N. A. (2015) Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **58**, 8315-8359.
- Guo, C., Chen, Y., Zheng, Y., Zhang, W., Tao, Y., Feng, J., Tang, L. (2015) Exploring the Enantioselective Mechanism of Halohydrin Dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 by Iterative Saturation Mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 2919-2926.
- Hasnaoui-Dijoux, G. Majerić Elenkov M., Lutje Spelberg J. H., Hauer B., Janssen D. B. (2008) Catalytic promiscuity of halohydrin dehalogenase and its application in enantioselective epoxide ring opening. *ChemBioChem* **9**, 1048–1051.
- Higgins, T. P., Elenkov, M. M., Lutje Spelberg, J. H., Hauer B., Janssen, D. B. (2005) Biochemical and molecular characterisation of the 2,3-dichloro-1-propanol dehalogenase and stereospecific haloalkanoic dehalogenases from a versatile *Agrobacterium* sp. *Biodegradation* **16**, 485–492.
- Hopmann, K. H., Himo, F. (2008) Cyanolysis and azidolysis of epoxides by haloalcohol dehalogenase: Theoretical study of the reaction mechanism and origins of regioselectivity. *Biochemistry* **47**, 4973–4982.
- Illanes, A. (2008) *Principles and Applications, U: Enzyme Biocatalysis*, (Illanes, A., ured.), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, str. 1-29.
- Janssen, D. B., Majerić Elenkov, M., Hasnaoui, G., Hauer, B., Lutje Spelberg, J. H. (2006) Enantioselective formation and ring-opening of epoxides catalysed by halohydrin dehalogenases. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 291–295.

Johan, E. T., Vlieg, H., Tang, L., Spelberg, J. H., Smilda, T., Poelarends, G. J., Bosma, T., van Merode A. E. J., Fraaije, M. W., Janssen, D. B. (2001) Halohydrin Dehalogenases Are Structurally and Mechanistically Related to Short-Chain Dehydrogenases / Reductases. *CAS* **183**, 5058–5066.

Koopmeiners, J., Halmschlag, B., Schallmey, M., Schallmey, A. (2016) Biochemical and biocatalytic characterization of 17 novel halohydrin dehalogenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 7517–7527.

Koopmeiners, J., Diederich, C., Solarczek, J., Voß, H., Mayer, J., Blankenfeldt, W., Schallmey, A. (2017) HheG, a halohydrin dehalogenase with activity on cyclic epoxides. *ACS Catal.* **7**, 6877–6886.

Lutje Spelberg, J. H., Tang, L., Van Gelder, M., Kellogg, R. M., Janssen, D. B. (2002) Exploration of the biocatalytic potential of a halohydrin dehalogenase using chromogenic substrates. *Tetrahedron Asymmetry* **13**, 1083–1089.

Lutje Spelberg, J. H., J. E. T. Van Hylckama Vlieg, L. X. Tang, D. B. Janssen, R. M. Kellogg (2001) Highly enantioselective and regioselective biocatalytic azidolysis of aromatic epoxides. *Org. Lett.* **3**, 41–43.

Majerić Elenkov, M., Szymański, W., Janssen D.B. (2014) Reactions Catalyzed by Halohydrin Dehalogenases U: *Science of Synthesis, Biocatalysis in Organic Synthesis 2*, (Faber, K., Fessner, W. D., Turner, N. J., ured.), Thieme, Stuttgart.

Mikleušević, A., Primožič, I., Hrenar, T., Salopek-Sondi, B., Tang, L., Elenkov, M. M. (2016) Azidolysis of epoxides catalysed by the halohydrin dehalogenase from *Arthrobacter* sp. AD2 and a mutant with enhanced enantioselectivity: an (*S*)-selective HHDH. *Tetrahedron: Asymmetry* **27**, 930–935.

Mischitz, M., Faber, K. (1994) Asymmetric opening of an epoxide by azide catalyzed by an immobilized enzyme preparation from *Rhodococcus* sp. *Tetrahedron Lett.* **35**, 81–84.

Molinaro, C., Guilbault, A. A., Kosjek, B. (2010) Resolution of 2,2-disubstituted epoxides via biocatalytic azidolysis. *Org. Lett.* **12**, 3772–3775.

Reetz, M. T. (2013) Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. *J Am Chem Soc.* **135**, 12480-12496.

- Schallmey, A., Schallmey, M. (2016) Recent advances on halohydrin dehalogenases from enzyme identification to novel biocatalytic applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 7827–7839.
- Schallmey, M., Floor, R. J., Szymanski, W., Janssen, D. B. (2012) 7.8 Hydrolysis and Reverse Hydrolysis: Halohydrin Dehalogenases. U: Comprehensive chirality (Carreira, E. M., Yamamoto, H., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 143-155.
- Schallmey, M., Floor, R. J., Hauer, B., Breuer, M., Jekel, P. A., Wijma, H. J., Dijkstra, B., Janssen, D. B. (2013) Biocatalytic and Structural Properties of a Highly Engineered Halohydrin Dehalogenase. *ChemBioChem* **14**, 870–881.
- Schallmey, M., Koopmeiners, J., Wells, E., Wardenga, R., Schallmey, A. (2014) Expanding the halohydrin dehalogenase enzyme family: Identification of novel enzymes by database mining. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 7303–7315.
- Senthilnathan, D., Tamilmani, V., Venuvanalingam, P. (2011) Biocatalysis of azidolysis of epoxides: Computational evidences on the role of halohydrin dehalogenase (HheC). *J. Chem. Sci.* **123**, 279–290.
- Spelberg, J. H. L., Van Vlieg, J. E. T. H., Tang, L., Janssen, D. B. , Kellogg, R. M. (2001) Highly enantioselective and regioselective biocatalytic azidolysis of aromatic epoxides. *Org. Lett.* **3**, 41–43.
- Tang, L., Zhu, X., Zheng, H., Jiang, R., Elenkov, M. M. (2012) Key residues for controlling enantioselectivity of halohydrin dehalogenase from *Arthrobacter* sp. strain AD2, revealed by structure-guided directed evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2631–2637.
- Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Tang, L., Lutje Spelberg, J. H., Smilda, T., Poelarends, G.J., Bosma, T., van Merode, A. E. J., Fraaije, M. W., Janssen, D. B. (2001) Halohydrin dehalogenases are structurally and mechanistically related to short-chain dehydrogenases/reductases. *J. Bacteriol.* **183**, 5058–5066.
- Watanabe, F., Yu, F., Ohtaki, A., Yamanaka, Y., Noguchi, K., Yohda, M., Odaka, M (2015) Crystal structures of halohydrin hydrogen-halide-lyases from *Corynebacterium* sp. N-1074. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **83**, 2230–2239.

Xue, F., Ya, X., Xiu, Y., Tong, Q., Wang, Y., Zhu, X., Huang, H. (2019) Exploring the Biocatalytic Scope of a Novel Enantioselective Halohydrin Dehalogenase from an Alphaproteobacterium. *Catal. Letters* **149**, 629–637.

You, Z., Liu, Z., Zheng, Y. (2013) Properties and biotechnological applications of halohydrin dehalogenases: current state and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 9–21.

Yu, F., Nakamura, T., Mizunashi, W., Watanabe, I. (1994) Cloning of Two Halohydrin Hydrogen-Halide-Lyase Genes of *Corynebacterium* sp. Strain N-1074 and Structural Comparison of the Genes and Gene Products. *Bioscience, Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1451–1457.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Petra Marin
