

Pojačana ekspresija te pročišćavanje proteina CrdB i određivanje uvjeta kristalizacije proteina HP1026 bakterije *Helicobacter pylori*

Švorinić, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:106313>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Andrea Švorinić

**Pojačana ekspresija te pročišćavanje proteina CrdB i određivanje
uvjeta kristalizacije proteina HP1026 bakterije *Helicobacter pylori***

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj je rad izrađen u Laboratoriju za proteinsku kristalizaciju na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom profesorice dr. sc. Dubravke Matković-Čalogović, kao dio projekta Hrvatske zaklade za znanost (*IP-2014-09-4274*). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

POJAČANA EKSPRESIJA TE PROČIŠĆAVANJE PROTEINA CrdB I ODREĐIVANJE UVJETA
KRISTALIZACIJE PROTEINA HP1026 BAKTERIJE *Helicobacter pylori*

Andrea Švorinić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Gram-negativna patogena bakterija *Helicobacter pylori* kolonizira stijenke želuca preko polovine ljudske populacije. Dugoročna infekcija gotovo uvijek dovodi do razvoja kroničnog gastritisa, a u pojedinim slučajevima i do težih oboljenja poput adenokarcinoma želuca te limfoma mukoznog tkiva. U sklopu ovog rada istražena su dva proteina važna za preživljavanje i infektivni potencijal bakterije *H. pylori*. Protein CrdB identificiran je kao potencijalni sudionik u održavanju homeostaze iona bakra. Pretpostavlja se da se radi o proteinu vanjske membrane koji omogućuje izbacivanje iona bakra iz stanice, međutim struktura i funkcija ovog proteina još uvijek su neistražene. U ovom je diplomskom radu protein CrdB uspješno proizveden u obliku fuzijskog proteina SUMO-CrdB primjenom tehnologije rekombinantne DNA i prekomjernom ekspresijom u bakteriji *Escherichia coli*. Osmišljena je strategija pročišćavanja fuzijskog proteina SUMO-CrdB, te analizirana njegova sekundarna struktura. Pokazano je da među motivima sekundarne strukture prevladavaju β -ploče i β -okreti. Protein HP1026 je ATPaza čiji se gen nalazi pod kontrolom jednog od triju promotora toplinskog šoka bakterije *H. pylori*. U ovom su radu istraženi uvjeti kristalizacije proteina HP1026. Ispitivanjem različitih otopina precipitanata pronađeni su uvjeti u kojima nastaju mikrokristali proteina HP1026, stabilni kroz dulje vrijeme.

(54 stranice, 26 slika, 16 tablica, 33 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Helicobacter pylori*, pročišćavanje proteina, kristalizacija proteina, CrdB, HP1026

Voditelj: Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.; Dr. sc. Nataša Bauer, izv. prof.; Dr. Sunčica Bosak, doc.

Rad prihvaćen: 14.09.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation thesis

OVEREXPRESSION AND PURIFICATION OF CrdB PROTEIN AND DETERMINATION OF CRYSTALLIZATION CONDITIONS FOR HP1026 PROTEIN FROM BACTERIUM

Helicobacter pylori

Andrea Švorinić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The bacterial pathogen *Helicobacter pylori* colonizes human gastric mucosa of over half of the world's population. Chronic *H. pylori* infection is associated with development of severe gastrointestinal diseases such as chronic gastritis, invasive adenocarcinoma and lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. This thesis involves investigation of two proteins important for survival of *H. pylori* within the hostile environment of the human gastrointestinal tract. CrdB protein is a putative outer membrane efflux protein, potentially involved in maintaining copper ion homeostasis. Within this study, CrdB protein was produced as a fusion protein SUMO-CrdB by using recombinant DNA technology and overexpressed in the host bacterium *Escherichia coli*. A successful protein purification protocol was established. Circular dichroism was used for secondary structure determination. The analysis of circular dichroism data showed that the fusion protein SUMO-CrdB predominantly consists of β -sheets and β -turns. HP1026 is an ATPase with an interesting gene location under the control of one of the heat shock promoters. The second aim of this study was to determine crystallization conditions for HP1026 protein. Stable microcrystals were obtained after scanning a range of conditions.

(54 pages, 26 figures, 16 tables, 33 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *Helicobacter pylori*, protein purification, protein crystallization, CrdB, HP1026

Supervisor: Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Prof.

Reviewers: Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Prof.; Dr. Nataša Bauer, Assoc. Prof.; Dr. Sunčica Bosak, Asst. Prof.

Thesis accepted: 14.09.2017.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2. Homeostaza iona metala.....	2
1.2.1. Protein CrdB.....	2
1.3. Proteini termičkog šoka bakterije <i>H. pylori</i>	3
1.3.1. Protein HP1026.....	5
1.4. Cilj rada.....	5
2. MATERIJALI I METODE.....	6
2.1. Kloniranje.....	6
2.1.1. Umnažanje gena <i>crdB</i>	7
2.1.2. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu.....	8
2.1.3. Kotransformacija kemijski kompetentnih HI-Control 10G stanica <i>E. coli</i>	9
2.1.4. Izolacija, mjerenje koncentracije i ugušćivanje plazmida.....	10
2.1.5. Sekvenciranje.....	11
2.2. Prekomjerna ekspresija u T7 ekspresijskom sustavu.....	11
2.2.1. Transformacija ekspresijskog soja <i>E. coli</i>	12
2.2.2. Indukcija ekspresije fuzijskog proteina SUMO-CrdB.....	13
2.3. Liza stanica i test topljivosti.....	13
2.4. SDS-PAGE elektroforeza.....	14
2.5. Pročišćavanje fuzijskog proteina SUMO-CrdB.....	16
2.5.1. Afinitetna kromatografija (IMAC).....	16
2.5.2. Kromatografija isključenjem.....	18
2.6. Kvantifikacija proteina.....	19
2.7. Ugušćivanje proteina i izmjena pufera.....	19
2.8. Kružni dikroizam.....	20
2.9. Razlikovna pretražna mikrokolorimetrija.....	22
2.10. Cijepanje fuzijskog proteina SUMO pomoću SUMO <i>Express</i> proteaze.....	23
2.11. Kristalizacija proteina.....	24
2.11.1. Fizikalne osnove kristalizacije proteina.....	24
2.11.2. Tehnike kristalizacije proteina.....	27
2.11.3. Kristalizacija proteina HP1026.....	29
3. REZULTATI.....	31
3.1. Kloniranje.....	31
3.2. Ekspresija i topljivost fuzijskog proteina SUMO-CrdB.....	32
3.3. Pročišćavanje fuzijskog proteina SUMO-CrdB.....	34
3.3.1. Afinitetna kromatografija (IMAC).....	34
3.3.2. Kromatografija isključenjem.....	35
3.4. Kružni dikroizam.....	37
3.5. Razlikovna pretražna mikrokolorimetrija.....	39
3.6. Cijepanje fuzijskog proteina SUMO pomoću SUMO <i>Express</i> proteaze.....	40
3.7. Kristalizacija proteina HP1026.....	41
3.7.1. Prva kristalizacija.....	41
3.7.2. Druga kristalizacija.....	42
4. RASPRAVA.....	43
5. ZAKLJUČAK.....	47
6. LITERATURA.....	48
7. PRILOG.....	51
8. ŽIVOTOPIS.....	54

Popis kratica

aa/bis - akrilamid/bisakrilamid

ADP - adenzin 5'-difosfat

APS - amonijev persulfat

ATP - adenzin 5'-trifosfat

Bis-tris propan - 1,3-bis(tris(hidroksimetil)metilamino)propan

CV - volumen kolone (od engl. *column volume*)

dNTP - deoksinukleotid

DTT - 1,4-ditio-D-treitol

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

His - histidin

IPTG - izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid

Kan - kanamicin

LB - *Lysogeny broth* hranjivi medij

NTA - nitrilotrioctena kiselina

PEG - poli(etilenglikol)

SDS - natrijev dodecil sulfat

SDS-PAGE - elektorforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata

TAE - Tris-acetat-EDTA pufer

TEMED - tetrametiletildiamin

Triton X-100 - polietilenglikol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil eter

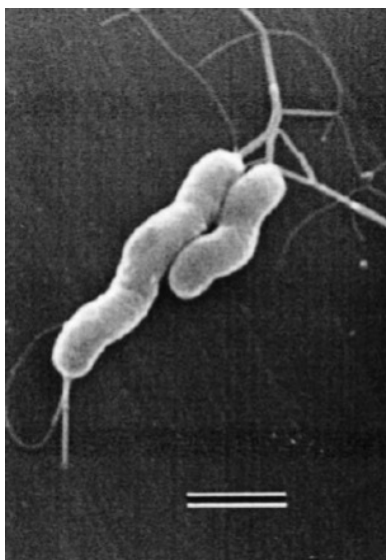
Tris - tris(hidroksimetil)aminometan

Tris-HCl - tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorid

1. UVOD

1.1. *Helicobacter pylori*

Gram-negativna mikroaerofilna bakterija *Helicobacter pylori* spiralnog je oblika i kolonizira stijenke ljudskog želuca (slika 1). Ovom je patogenom bakterijom zaraženo preko polovine ljudske populacije, što ju čini jednom od najuspješnijih ljudskih patogena. Dugoročna infekcija uzrokuje kroničnu i progresivnu inflamaciju mukoznog tkiva, koja gotovo uvijek dovodi do razvoja različitih stupnjeva gastritisa. Danas je poznato da je infekcija bakterijom *H. pylori* povezana s razvojem mnogih težih oboljenja gornjeg gastrointestinalnog trakta čovjeka, kao što su peptički i duodenalni ulkusi, limfom mukoznog tkiva (engl. *B-cell lymphoma of mucosal-associated lymphoid tissue*, MALT) te invazivni adenokarcinom želuca.^[1, 2] Iznimna genetička raznolikost među sojevima *H. pylori* kao i brza rekombinacija omogućuju bakteriji prilagodbu na različitosti imunološkog sustava i prehrambenih navika domaćina. Genom bakterije *H. pylori* je u usporedbi s drugim Gram-negativnim bakterijama relativno malen, budući da sadrži manje od 1600 gena.^[3] Do danas su u cijelosti sekvencirani genomi sedamnaest sojeva bakterije *H. pylori*, a u ovom je radu korišten soj P12 koji je prvi put izoliran 1994. godine iz pacijenta oboljelog od raka dvanaesnika.^[4] S obzirom na medicinsku važnost ove patogene bakterije danas se intenzivno istražuju proteini koji omogućuju *H. pylori* adaptaciju i preživljavanje u ekstremnim uvjetima, te posljedično infekciju i kolonizaciju.



Slika 1. Bakterija *H. pylori* snimljena pomoću elektronskog mikroskopa. Mjerilo je veličine 1 μm . Slika je preuzeta iz Yoshiyama i Nakazawa (2002).^[5]

1.2. Homeostaza iona metala

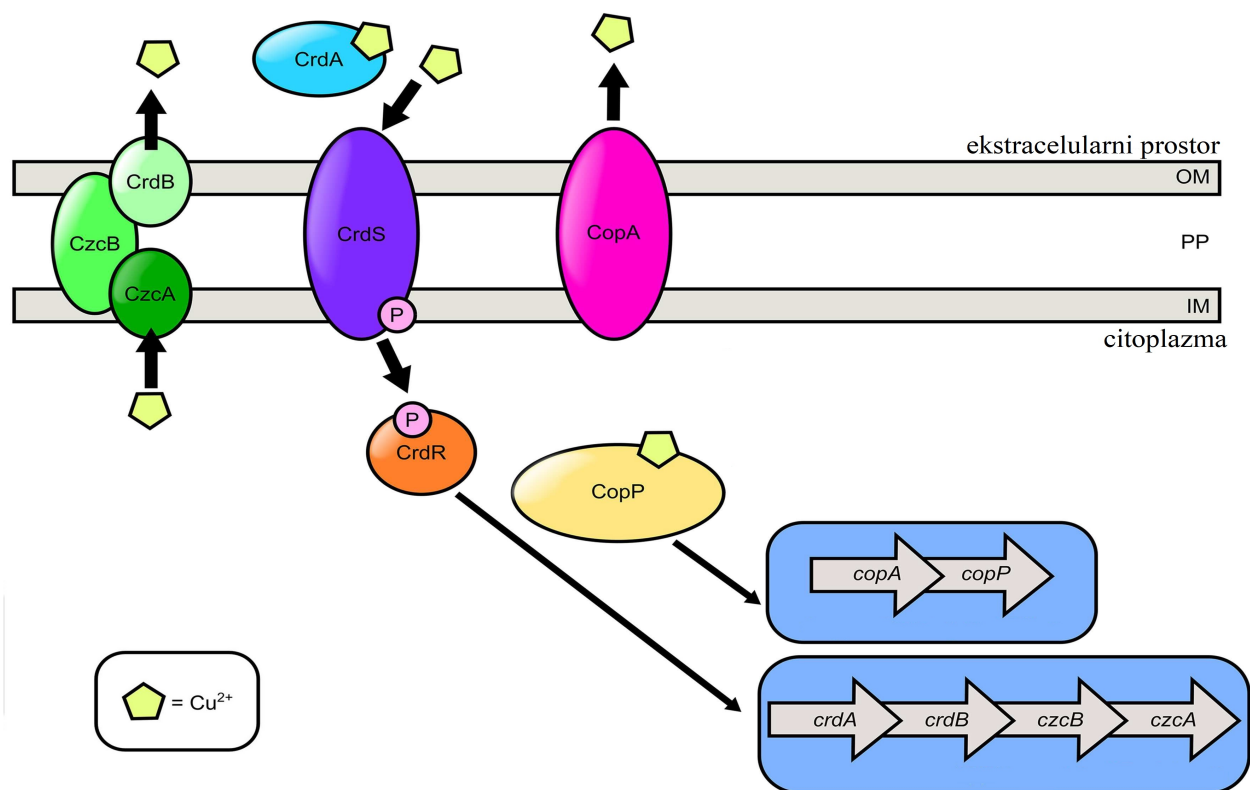
Prijelazni metali sudjeluju u nizu bioloških procesa, te su inkorporirani u različite metaloproteine, što ih čini važnim nutrijentima za sve žive organizme. Jedan od mehanizama obrane domaćina od patogene bakterije zasniva se upravo na iskorištavanju nužnosti metalnih iona za preživljavanje bakterije. Ovaj dinamični proces ograničavanja dostupnosti iona metala nazivamo nutritivnom imunošću. Nutritivna imunost bazira se na promjenama pH okoline, koje znatno utječu na topljivost metala, te ekspresiji proteina koji vežu metale. Pretpostavlja se da je bakterija *H. pylori* unutar gastrointestinalnog trakta čovjeka izložena ekstremnim varijacijama u dostupnosti ključnih metala. Preživljavanje, a time i patogenost bakterije *H. pylori* stoga uvelike ovisi o mogućnosti adaptacije na ove fluktuacije. Bakterija mora biti u mogućnosti detektirati suptilne promjene eksternih koncentracija važnih iona metala, te na njih pravovremeno reagirati ekspresijom faktora virulencije odnosno proteina koji omogućuju vezanje i pohranjivanje metalnih iona.^[1, 6]

Osnovni metabolički procesi bakterije *H. pylori* uvelike ovise o prisustvu iona bakra, koji su nužni za funkcioniranje niza oksidaza i hidrolaza. Između ostalog, bakar je kofaktor citokrom oksidaze *cb*-tipa, terminalne oksidaze respiratornog lanca kod bakterije *H. pylori*. S druge strane, kationi bakra u citoplazmi sudjeluju u stvaranju toksičnih hidroksilnih radikala, pa je stoga za bakteriju važno imati mehanizme koji održavaju koncentraciju slobodnih iona bakra u citoplazmi ispod razine toksičnosti. Održavanje homeostaze bakra omogućuje, dakle, *H. pylori* adaptaciju i preživljavanje u uvjetima kakvi vladaju u gastrointestinalnom traktu čovjeka te je stoga važan faktor patogenosti.^[6]

1.2.1. Protein CrdB

Protein HP1327 odnosno CrdB (od engl. *copper resistance determinand*) identificiran je RNA profiliranjem.^[6] Snažna indukcija gena *hp1327* bakrom, kao i osjetljivost mutanata navedenog gena na bakar ukazali su na potencijalnu ulogu proteina CrdB u održavanju homeostaze iona bakra. U pitanju je 47,04 kDa velik protein za kojeg se, na temelju primarne sekvence, pretpostavlja da na svom C-terminusu posjeduje motiv specifičan za proteinske pumpe vanjskih membrana kod Gram-negativnih bakterija. Weidner et al. (2002.)^[6] predlažu model u kojem CrdB zajedno s proteinima CzcB i CzcA čini pumpu koja omogućuje bakteriji *H. pylori* eksport iona bakra, kako je shematski

prikazano na slici 2. Za sada nisu provedena istraživanja kojima bi se prikupilo više informacija o strukturi i funkciji proteina CrdB.

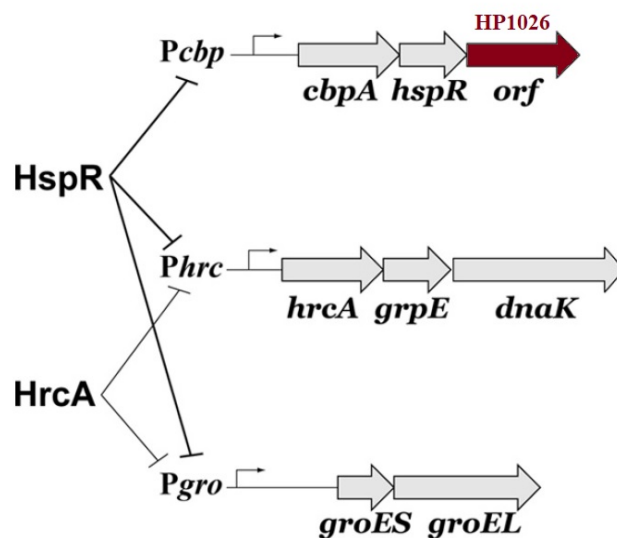


Slika 2. Model transporta bakra i regulacije gena ovisne o bakru kod bakterije *H. pylori*. Protein CrdB nalazi se na vanjskoj membrani te zajedno s proteinima CzcA i CzcB čini sustav za eksport bakra iz stanice, odnosno održavanje razine bakrovih iona u citoplazmi ispod razine toksičnosti. U detekciju i transport bakra kod bakterije *H. pylori* također su uključeni transmembranski proteini CrdS i CopA, citoplazmatski protein CopP, kao i sekretirani protein CrdA. Senzorna kinaza CrdS veže ione bakra iz izvanstaničnog prostora i fosforilira citoplazmatski protein CrdR, koji potom inducira ekspresiju gena *crdA*, *crdB*, *czcB* i *czcA*. OM, vanjska membrana (engl. *outer membrane*); PP, periplazmatski prostor (engl. *periplasmic space*); IM, unutarnja membrana (engl. *inner membrane*). Preuzeto i prilagođeno iz Haley i Gaddy (2015).^[1]

1.3. Proteini termičkog šoka bakterije *H. pylori*

Proteini termičkog šoka (engl. *heat shock proteins*, HSP) su skupina proteina čija je ekspresija povećana uslijed izlaganja stanice stresu. Njihove primarne funkcije su regulacija procesa smatanja,

kao i degradacije proteina, sastavljanja proteinskih kompleksa te transporta. Zbog svoje uloge u navedenim procesima, proteini termičkog šoka eksprimiraju se i u uvjetima normalnog rasta, ali je njihova pojačana ekspresija od presudne važnosti za stanicu u uvjetima stresa. Za bakteriju *H. pylori*, čiji je okoliš u mnogim parametrima ekstremno neprijateljski, proteini HSP obitelji presudni su za uspješnu adaptaciju i preživljavanje te, posljedično, infektivni potencijal bakterije.^[7] Osim za infekciju i prilagodbu na ekstremne uvjete kakvi vladaju u ljudskom želucu, pokazano je da je kod *H. pylori* ova skupina proteina uključena i u regulaciju aktivnosti ureaze te prijanjanje bakterijskih stanica na stanice epitela želuca.^[8] Geni za proteini skupine HSP kod *H. pylori* organizirani su u tri višecistronska operona, te je njihova transkripcija kontrolirana trima promotorima: *Pgro*, *Phrc* i *Pcbp*. Za razliku od većine Gram-negativnih bakterija kod kojih je regulacija transkripcije pozitivna i ostvarena pomoću σ faktora koji omogućuje vezanje RNA polimeraze na odgovarajuće promotore, kod *H. pylori* regulacija transkripcije je negativna.^[7, 8] Dva transkripcijska represora, HrcA i HspR, potrebna su za represiju transkripcije s promotora *Pgro* i *Phrc*, dok samo HspR kontrolira promotor *Pcbp*, kako je shematski prikazano na slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz organizacije triju operona termičkog šoka *H. pylori* i njihove transkripcijske regulacije. Gen *hp1026* nalazi se pod kontrolom promotora *Pcbp* koji je reguliran transkripcijskim represorom HspR. Preuzeto i prilagođeno iz Roncarati *et al.* (2011).^[7]

1.3.1. Protein HP1026

Gen *hp1026* pod kontrolom je promotora toplinskog šoka *Pcbp* i represora HspR. U istom operonu nalaze se i geni za protein CbpA, šaperon koji prepoznaje i veže zakrivljenu DNA, te represor HspR koji kontrolira ekspresiju sa sva tri promotora toplinskog šoka bakterije *H. pylori*. Prema UniProt bazi podataka 43,9 kDa velik protein HP1026 spada u AAA skupinu proteina. AAA proteini (od engl. *ATPases associated with diverse cellular activities*) su funkcionalno i organizacijski raznolika skupina proteina čije predstavnike nalazimo u svim organizmima, a uključeni su u niz različitih bioloških procesa. Karakterizira ih konzervirana centralna ATPazna domena koju sačinjava otprilike 230 aminokiselina, a nazivamo ju AAA modul.^[9] Na temelju sekvence proteina HP1026, prema UniProt bazi podataka, u pitanju protein koji veže DNA i vjerojatno ima funkciju helikaze te je uključen u replikaciju, rekombinaciju ili popravak DNA.^[9, 10] Donedavno je protein bio u potpunosti strukturno i funkcionalno neokarakteriziran. Istraživanjima provedenim na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu eksperimentalno je dokazana ATPazna aktivnost proteina HP1026, te je pokazano da u otopini formira dimerne vrste.^[11] Postavljeni su inicijalni kristalizacijski eksperimenti (engl. *screening*), međutim dobiveni kristali nisu bili stabilni niti pogodne veličine i kvalitete za difrakcijski eksperiment. Potrebna su, stoga, daljnja istraživanja kako bi se razjasnile struktura i funkcija ovog proteina važnog za preživljavanje patogene bakterije u ekstremnim uvjetima gastrointestinalnog trakta domaćina.

1.4. Cilj rada

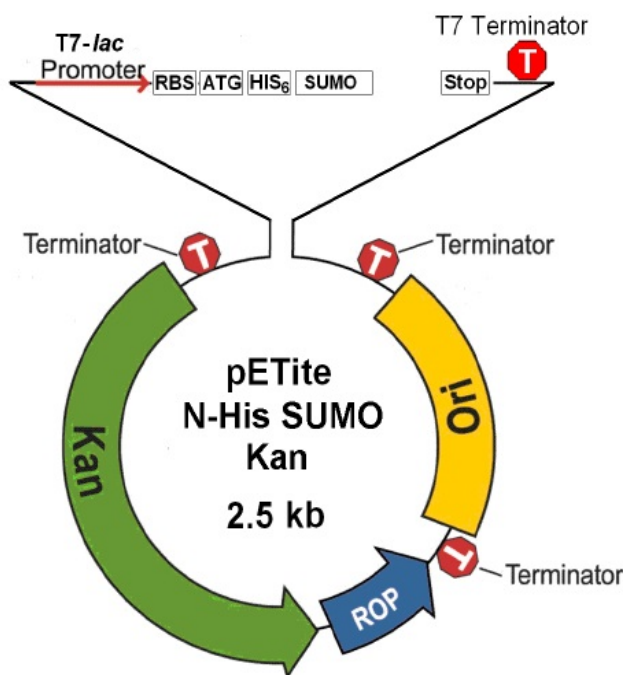
Ovaj rad obuhvaća istraživanje dva proteina važna za preživljavanje bakterije *Helicobacter pylori*. Cilj prvog dijela rada je proizvodnja proteina CrdB primjenom tehnologije rekombinantne DNA, odnosno ugradnjom u plazmidni vektor i prekomjernom ekspresijom u bakteriji *Escherichia coli*, te zatim razvoj efikasne metode pročišćavanja rekombinantnog proteina, pri čemu je važno održavanje nativne strukture.

Cilj drugog dijela rada je ispitati uvjete kristalizacije proteina HP1026 metodom difuzije para.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Kloniranje

U svrhu kloniranja gena *crdB* iz genoma bakterije *Helicobacter pylori* soja P12 upotrebljen je sustav *Expresso T7 SUMO Cloning and Expression* (Lucigen). Vektor pETite N-His SUMO Kan, prikazan na slici 4, služi za prekomjernu ekspresiju proteina od interesa u fuziji s proteinom SUMO (od engl. *small ubiquitin-like modifier*). Protein SUMO kao fuzijski partner u pravilu poboljšava topljivost i stabilnost proteina od interesa.^[12] Na N-terminusu fuzijskog proteina SUMO nalazi se i histidinski privjesak koji omogućuje pročišćavanje fuzijskog proteina afinitetnom kromatografijom. Strategija kloniranja zasniva se na rekombinaciji, te ne iziskuje korištenje restrikcijskih enzima niti ligaze. Do rekombinacije između umnoženog gena i lineariziranog vektora dolazi nakon kotransformacije, unutar same bakterije.^[13]



Slika 4. pETite N-His SUMO Kan ekspresijski vektor. RBS, mjesto vezanja ribosoma (engl. *ribosome binding site*); ATG, mjesto početka translacije; Stop, mjesto kraja translacije; Kan, gen za rezistenciju na kanamicin; ROP, (engl. *repressor of priming*), kontrola replikacije DNA; Ori, mjesto početka replikacije plazmida (engl. *origin of replication*); T, terminatori transkripcije.^[13]

2.1.1. Umnažanje gena *crdB*

Gen *crdB* umnožen je iz izoliranog genoma *H. pylori* soja P12 lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). PCR je metoda koja omogućuje specifično umnažanje željenog segmenta DNA *in vitro*. Reakcija je temeljena na ponavljanju tri koraka: denaturacije odnosno razdvajanja komplementarno sparenih lanaca dvolančane DNA (pri temperaturi od 92 °C - 98 °C), zatim sparivanja kalupa i početnica koje sadrže slijedove komplementarne kalupu (40 °C - 68 °C) i na kraju produljenju lanca DNA (oko 70 °C). Posljednji korak, produljenje lanca, kataliziran je termostabilnom DNA polimerazom. U svakom ciklusu se broj kopija gena povećava, te se nakon n ciklusa u reakcijskoj smjesi nalazi 2^n kopija gena od interesa.^[14] Za reakciju je korištena *Pfu* DNA polimeraza (*Thermo Scientific*) iz hipertermofilne arheje *Pyrococcus furiosus*. Ova polimeraza ima i 3'→5' egzonukleaznu aktivnost koja omogućuje popravak pogrešno ugrađenih nukleotida, i time osigurava nisku učestalost pogreške. Početnice su dizajnirane na način da prvih 18 nukleotida počevši od 5' kraja svake početnice odgovara krajevima pETite N-His SUMO Kan vektora, a preostali nukleotidi genu od interesa. Osmišljene početnice naručene su i sintetizirane u tvrtki *Sigma-Aldrich* (tablica 1). Sastojci navedeni u tablici 2 pomiješani su na ledu. Korišten je reakcijski pufer koji sadrži 20 mM MgSO₄. *Pfu* DNA polimeraza dodana je zadnja. Reakcija je provedena pomoću uređaja za PCR (*Thermal Cycler*, *Eppendorf*), koji omogućuje cikličko hlađenje i grijanje uzorka na zadane temperature. Provedeno je 25 ciklusa denaturacije, sparivanja početnica s kalupom te produljivanja lanca (tablica 3). Uspješnost reakcije PCR provjerena je elektroforezom produkata reakcije PCR u agaroznom gelu.

Tablica 1. Početnice korištene za umnažanje gena *crdB*.

Uzvodna početnica	5'-CGCGAACAGATTGGAGGTAAAGATTTAGAGATCCAATCT-3'	$T_m = 76,6\text{ °C}$
Nizvodna početnica	5'-GTGGCGGCCGCTCTATTATTCTAATCCTTTAAGGTTTTG-3'	$T_m = 77,4\text{ °C}$

Tablica 2. Reakcijska smjesa za PCR.

10x reakcijski pufer s MgSO ₄ (<i>Thermo Scientific</i>)	5 µL
otopina dNTP-ova (koncentracije 2,5 mM svaki)	4 µL
<i>forward</i> početnica (koncentracije 10 µM)	5 µL
<i>reverse</i> početnica (koncentracije 10 µM)	5 µL
DNA kalup	100 ng
<i>Pfu</i> DNA polimeraza (<i>Thermo Scientific</i>)	2.5 U
sterilna dH ₂ O	do ukupnog volumena 50 µL

Tablica 3. PCR protokol.

početna denaturacija	94 °C	2 min
denaturacija	94 °C	15 s
vezanje početnice na kalup	55 °C	14 s
produljenje lanca	72 °C	1,5 min
završno produljenje lanca	72 °C	10 min
	4 °C	∞

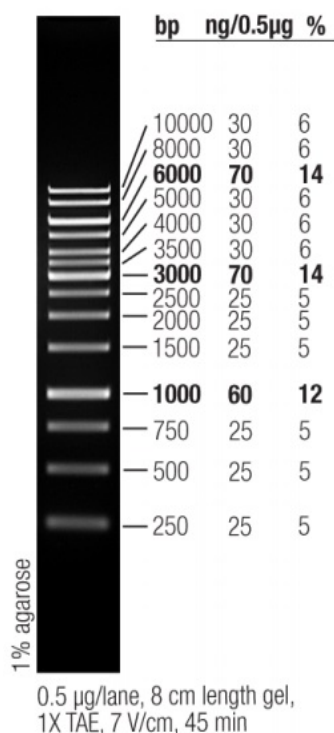
} 25 x

2.1.2. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Uspješnost umnažanja gena *crdB* PCR reakcijom provjerena je elektroforezom u agaroznom gelu. Fosfatne skupine čine DNA negativno nabijenom molekulom pri neutralnom pH, a naboj ovisi o veličini molekule. Pod utjecajem električnog polja, fragmenti DNA putuju kroz agarozni gel prema pozitivnoj elektrodi, anodi, i to brzinom koja ovisi o njihovoj veličini i obliku.^[15] Pripremljen je 1% (w/v) agarozni gel otapanjem 1 g agaroze u 100 mL TAE pufera (sastav u tablici 4) u kojeg je prethodno dodano 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ etidijevog bromida. Otopina je zagrijavana u mikrovalnoj pećnici dok nije postala potpuno prozirna odnosno dok se agaroz nije u potpunosti otopila, te potom ohlađena i izlivena u kalup za izlivanje gela koji sadrži i češljic za formiranje jažica. Gel je ostavljen da polimerizira na sobnoj temperaturi, otprilike 60 min, te potom premješten u kadicu za elektroforezu koja je prethodno napunjena TAE puferom s dodatkom 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ EtBr. Važno je da pufer u potpunosti prekriva gel. Uzorci su pomiješani s puferom za nanošenje uzoraka na gel (0,25 % (w/v) bromfenolno plavilo; 0,25 % ksilencijanол FF; 0,01 M EDTA pH = 8; 3% (w/v) glicerol) u omjeru 1:1. Glicerol povećava specifičnu gustoću uzoraka i omogućuje njihov ulazak u jažice gela, dok bromfenolno plavilo i ksilencijanол FF omogućuju vizualno praćenje napretka elektroforeze. U prvu jažicu nanoseno je 5 μL markera *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* proizvođača *Thermo Scientific* koji je prikazan na slici 5, a uzorci su nanoseni u volumenu od 3 μL . Elektroforeza je provedena pomoću aparature za horizontalnu elektroforezu *Sub Cell GT Cell (Bio-Rad)* pri konstantnom naponu od 120 V, na sobnoj temperaturi, otprilike 30 min. Nakon završene elektroforeze, DNA je na gelu vizualizirana UV transiluminacijom na 302 nm te je gel fotografiran pomoću uređaja *MiniBIS Imaging systems (DNR, Bio-Imaging Systems Ltd.)*.

Tablica 4. Sastav TAE pufera.

Tris	40 mM
octena kiselina	20 mM
EDTA (pH = 8)	1 mM



Slika 5. Marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* proizvođača *Thermo Scientific*. Slika je preuzeta sa stranice www.thermofisher.com.^[16]

2.1.3. Kotransformacija kemijski kompetentnih HI-Control 10G stanica *E. coli*

Alikvoti (40 µL) kemijski kompetentnih HI-Control 10G stanica *E. coli* (*Lucigen*) čuvaju se na -80 °C. Prije transformacije u potpunosti su otopljeni na ledu. Tekuća hranjiva podloga (*Recovery Medium*, *Lucigen*) otopljena je na sobnoj temperaturi. U jedan alikvot kemijski kompetentnih stanica dodano je 2 µL pETite N-His SUMO Kan vektora (*Lucigen*) i 3 µL produkta PCR reakcije, te je smjesa pažljivo promiješana ali bez pipetiranja, kako se ne bi stvorili mjehurići zraka koji bi zagrijali stanice. Smjesa je potom premještena u sterilnu polipropilensku mikroepruvetu od 1,5 mL prethodno ohlađenu na ledu. Uslijedila je inkubacija na ledu 30 min, nakon čega je smjesa premještena u termoblok prethodno zagrijan na 42 °C na 45 sekundi. Nakon toplinskog šoka, smjesa

je ponovno inkubirana na ledu, 2 min, te joj je potom dodano 960 μL tekuće hranjive podloge. Uslijedila je inkubacija na 37 °C, 1 h. Potom je 500 μL uzorka nanoseno ravnomjerno na površinu Petrijeve zdjelice koja je sadržavala LB krutu hranjivu podlogu s 30 $\mu\text{g/mL}$ kanamicina. Ovo je obavljeno pod otvorenim plamenom kako bi se izbjegla kontaminacija. Ploče su inkubirane na 37 °C preko noći u inkubatoru (*Thermo Scientific*). Idući dan odabrana je jedna od izraslih kolonija te je, pod plamenom, sterilnim nastavkom za pipetu prenesena u sterilnu tikvicu od 50 mL s 5 mL tekućeg LB medija (tablica 5) u kojega je dodan kanamicin do koncentracije 30 $\mu\text{g/mL}$. Slijedo je uzgoj preko noći u inkubatoru s tresilicom (*Thermo Scientific*) na 37 °C i 250 rpm. Ploče s bakterijskim kolonijama pohranjene su na 4 °C, dobro zatvorene parafilmom.

Tablica 5. Sastojci za pripravu 1 L tekućeg LB medija te LB-agar medija.

	LB medij	LB-agar medij
ekstrakt kvasca	5 g	5 g
tripton	10 g	10 g
NaCl	5 g	5 g
BACTO agar	/	15 g
dH ₂ O	do ukupnog volumena 1 L	do ukupnog volumena 1 L
<i>Medij je steriliziran u autoklavu na 120 °C te ohlađen prije dodavanja antibiotika.</i>		

2.1.4. Izolacija, mjerenje koncentracije i ugušćivanje plazmida

Iz prekončne bakterijske kulture plazmid je izoliran pomoću komercijalnog *GenElute HP Plasmid Miniprep Kit-a* (*Sigma-Aldrich*), metodom koja se temelji na alkalnoj lizi. Postupak je u potpunosti proveden prema uputama proizvođača.^[17]

Koncentracija dobivenih nukleinskih kiselina određena je mjerenjem apsorbancije na 260 nm pomoću uređaja *NanoDrop 1000* (*NanoDrop*). Čistoća uzorka, odnosno odsutnost zaostalih proteina, provjerena je računanjem omjera apsorbancije na 260 nm i 280 nm.

Kako bi se postigla koncentracija potrebna za sekvenciranje, uzorak je ugušćen metodom precipitacije etanolom. U uzorak je dodan otopljeni natrijev acetat (pH = 5,2) tako da mu je konačna koncentracija bila 0,3 M, te 250 μL prethodno ohlađenog 96% etanola. Smjesa je dobro promiješana pipetiranjem te pohranjena na -20 °C preko noći. Idući dan, uzorak je centrifugiran na 12400 g, 30 min. Supernatant je odliven, a na talog je dodan 1 mL 70% etanola. Uzorak je zatim ponovno centrifugiran na 12400 g, 5 min. Supernatant je ponovno odliven, a epice su potom ostavljene

otvorene kako bi se talog osušio na zraku, otprilike 30 min. Nakon što je sav etanol ispario, talog je resuspendiran u određenom volumenu sterilne dH₂O, do željene koncentracije.

2.1.5. Sekvenciranje

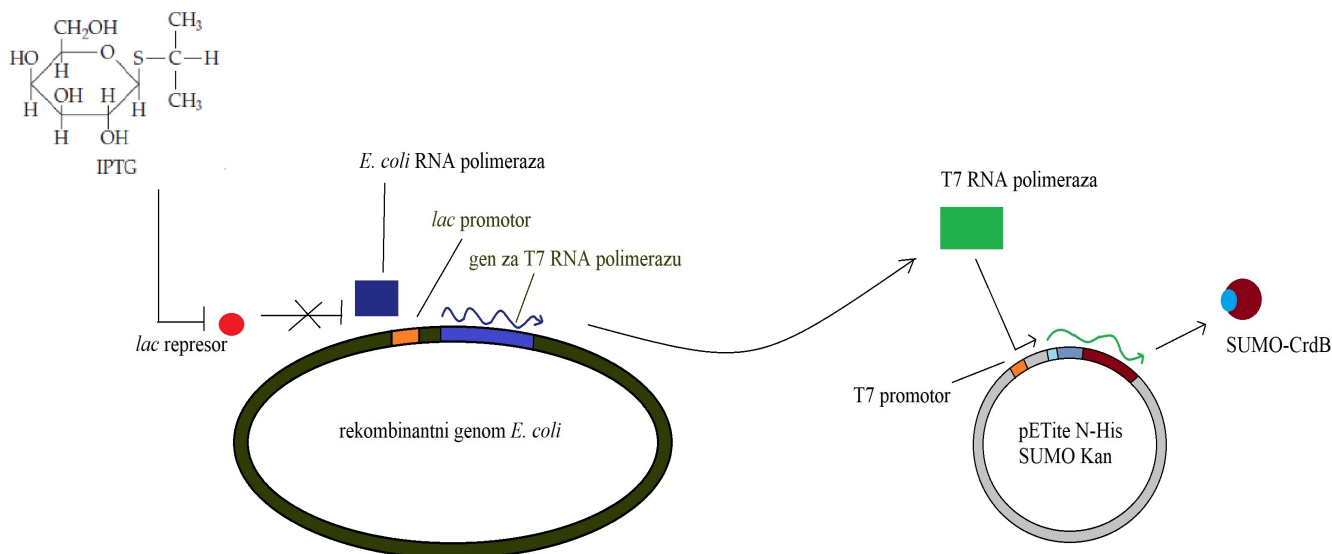
Ispravnost ugrađenog gena potvrđena je sekvenciranjem koje je obavila tvrtka *MacroGen*. Za sekvenciranje su korišteni standardne početnice za vektor pETite N-His SUMO Kan, čije su sekvence navedene u tablici 6. Rezultati sekvenciranja uspoređeni su s poznatom sekvencom gena *crdB* iz bakterije *H. pylori* soja P12 pomoću programa *BLAST* (NCBI).^[18]

Tablica 6. Početnice korištene za sekvenciranje.

<i>SUMO Forward</i> početnica	5'-ATTCAAGCTGATCAGACCCCTGAA-3'
<i>pETite Reverse</i> početnica	5'-CTCAAGACCCGTTTAGAGGC-3'

2.2. Prekomjerna ekspresija u T7 ekspresijskom sustavu

Unutar vektora pETite N-His SUMO Kan, gen *crdB* nalazi se pod kontrolom promotora T7-*lac*. U svrhu prekomjerne ekspresije upotrebljen je soj BL21(DE3) bakterije *E. coli*. Ovaj je soj DE3 lizogen i sadrži gen za T7 RNA polimerazu bakteriofaga T7 pod kontrolom promotora *lacUV5* (slika 6), koji je varijanta promotora *lac*, zbog čega se za indukciju koristi IPTG. T7 RNA polimeraza katalizira transkripciju viralnih gena, ali ne i gena *E. coli* budući da genom bakterije ne sadrži T7 promotore. Kada se u medij doda IPTG prvo dolazi do ekspresije T7 RNA polimeraze, koja zatim prepoznaje T7 promotor te katalizira transkripciju gena od interesa. Ovaj sustav omogućuje bolju kontrolu indukcije ekspresije gena od interesa.



Slika 6. Shema indukcije ekspresije u T7 ekspresijskom sustavu. Dodatak IPTG-a inhibira vezanje *lac* represora na *lac* operator, što omogućuje vezanje RNA polimeraze na promotor. Dolazi do ekspresije T7 RNA polimeraze, koja se zatim veže na T7 promotor na vektoru, što u konačnici rezultira ekspresijom gena od interesa.

2.2.1. Transformacija ekspresijskog soja *E. coli*

Nakon što je sekvenciranjem potvrđeno da konstruirani vektor sadrži ispravan gen, bez mutacija, uslijedila je transformacija ekspresijskog soja *E. coli*. Korišten je HI-Control BL21(DE3) soj proizvođača *Lucigen*. Transformacija je provedena po istom protokolu kakav je opisan u poglavlju 2.1.3., osim što je umjesto linearnog vektora i PCR produkta upotrebjeno otprilike 10 ng plazmida izoliranog alkalnom lizom kako je navedeno u poglavlju 2.1.4. U svrhu pripreme pozitivne kontrole topljivosti fuzijskog proteina SUMO-CrdB, jedan je alikvot istog ekspresijskog soja *E. coli* transformiran pETite N-His SUMO Kan vektorom koji nosi samo gen za SUMO protein. Transformacija alikvota stanica konstruiranim vektorom i kontrolom provedena je na isti način i u isto vrijeme. Petrijeve zdjelice s krutim hranjivim medijem koji sadrži antibiotik te izraslim kolonijama nakon prekonoćne inkubacije pohranjene su na 4 °C.

2.2.2. Indukcija ekspresije fuzijskog proteina SUMO-CrdB

Prvo je odabirana po jedna kolonija transformiranog ekspresijskog soja te je njome inokulirano 5 mL tekućeg LB medija s antibiotikom, nakon čega je uslijedio uzgoj na 37 °C i 250 rpm preko noći. Iduće jutro, kultura je razrijeđena 1:100 s LB medijem uz dodatak antibiotika. Za početnu evaluaciju ekspresije i topljivosti proteina, uzgojene su manje kulture, od ukupno 50 mL, dok je kasnije, u svrhu pročišćavanja proteina uzgajano po 400 mL kulture u sterilnoj Erlenmeyerovoj tikvi od 2 L. Uzgoj je nastavljen na 37 °C i 250 rpm, ali ovaj put do eksponencijalne faze rasta, odnosno dok optička gustoća kulture nije dosegla vrijednost između 0,5 i 1,0. Optička gustoća pri 600 nm (OD_{600}) mjerena je pomoću spektrofotometra *Evolution60* (*Thermo Scientific*). Tada je od kulture odvojen uzorak volumena 1 mL koji će poslužiti za analizu SDS elektroforezom. Uzorak je pripremljen na sljedeći način: stanice su oborene centrifugiranjem 15 min na 12400 g, nakon čega je supernatant odliven, a stanični talog resuspendiran u 100 μ L pufera za obradu proteina (sastav naveden u tablici 8). Uzorak je potom pohranjen na -20 °C. Kako bi se inducirala ekspresija, kulturi uzgojenoj do eksponencijalne faze rasta dodan je IPTG do koncentracije 1 mM. Uzgoj je nastavljen iduća 3 sata na 37 °C i 250 rpm, ili preko noći na 18 °C i 250 rpm. Nakon toga je ponovno odvojen 1 mL kulture za analizu SDS elektroforezom, kako je ranije opisano, a sama kultura je prebačena u posude za centrifugiranje te su stanice oborene centrifugiranjem na 4000 g, 20 min. Talozi bakterija zamrznuti su na -20 °C.

2.3. Liza stanica i test topljivosti

Prvi korak prema pročišćavanju rekombinantnog proteina je razbijanje odnosno liza bakterijskih stanica. Postoji niz metoda koje se koriste u ovu svrhu, od kojih su neke kemijske, a neke fizikalne. U ovom je radu odabrana metoda zamrzavanja i odmrzavanja stanica (engl. *freeze/thaw*). Stanice se u nekoliko ciklusa zamrzavaju u tekućem dušiku te odmrzavaju na sobnoj temperaturi. Ova procedura dovodi do pucanja stanične stijenke i membrane uslijed širenja zbog formacije kristala leda te ponovnog skupljanja tijekom odmrzavanja. Proceduru je potrebno ponoviti više puta da bi liza bila uspješna, pa je nedostatak ove metode njena dugotrajnost.^[19]

Stanični talog resuspendiran je u puferu za lizu (50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH = 8,0). Korišteno je otprilike 3 mL pufera po gramu taloga. Resuspendirane bakterije potom su zamrzavane u tekućem dušiku, ukupno 6 puta. Između dva zamrzavanja uzorci su ostavljeni da se u potpunosti

otope na sobnoj temperaturi. Lizat je potom centrifugiran 20 min na 5800 g, kako bi se odvojio topljivi od netopljivog dijela. Supernatant je odvojen od taloga, te su od jednog i drugog pripremljeni uzorci za analizu SDS elektroforezom. I supernatant i talog pohranjeni su na -20 °C.

2.4. SDS-PAGE elektroforeza

U svrhu provjere ishoda indukcije ekspresije proteina, praćenja čistoće proteina u pojedinim koracima pročišćavanja te potvrde cijepanja fuzijskog proteina odgovarajućom proteazom korištena je denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Metoda omogućuje razdvajanje proteina iz uzorka prema masi. Natrijev dodecilsulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS) je negativno nabijen deterdžent koji denaturira proteine i veže se na njih u konstantnom omjeru, ujedno prekrivajući površinski naboj samog proteina. Na taj je način osigurano da će negativni naboj proteina biti proporcionalan masi, što znači da će se manji proteini kroz pore poliakrilamidnog gela prema pozitivnoj elektrodi gibati brže, a veći sporije.^[15] Korišten je vertikalni sustav za elektroforezu *Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad)* te uređaj *PowerPack Basic (BioRad)* koji osigurava neprekidan protok električne energije. Gel za razdvajanje, čiji je sastav naveden u tablici 7, izlijeva se između dva stakla do 1,5 cm ispod ruba stakla te se potom nadsvođuje destiliranom vodom, što istovremeno onemogućuje kontakt sa zrakom te osigurava ravnomjernu polimerizaciju. Nakon što je gel za razdvajanje u potpunosti polimerizirao, za što je potrebno otprilike 45 min, voda se odlije te se povrh gela za razdvajanje izlijeva gel za sabijanje (sastav je naveden u tablici 7). U gel za sabijanje stavlja se češljic sa zupcima radi formiranja jažica za nanošenje uzorka. Nakon što gel za sabijanje polimerizira češljic se uklanja, a gelovi se premještaju na postolje koje se stavlja u kadicu za elektroforezu koja se potom puni puferom za elektroforezu (sastav naveden u tablici 8). Uzorci se miješaju s puferom za obradu proteina, čiji je sastav naveden u tablici 9, u omjeru 3:1. Denaturacija uzoraka provodi se zagrijavanjem na termobloku na 95 °C, 5 min. Uzorci se potom nanose u jažice na gelu. Na svaki gel nanoseno je i 7 µL markera molekulskih masa proizvođača *BioRad*, koji je prikazan na slici 7. Elektroforeza se provodi pri konstantnom naponu od 90 V kroz gel za sabijanje, odnosno 120 V kroz gel za razdvajanje. Nakon elektroforeze vizualizacija proteina na gelu postiže se bojanjem u otopini čiji je sastav naveden u tablici 10. Za bojanje je potrebno otprilike 45 min, nakon čega slijedi odbojavanje destiliranom vodom.

Tablica 7. Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje. Recept odgovara količini potrebnoj za pripravu dva gela.

	Gel za sabijanje 4%	Gel za razdvajanje 20%
aa/bis 29:1 40%	0,4 mL	5,0 mL
Pufer za sabijanje (pH = 6,8)	1,0 mL	/
Pufer za razdvajanje (pH = 8,8)	/	2,5 mL
ReH ₂ O	2,6 mL	2,5 mL
20% APS	14,0 µL	35,0 µL
TEMED	2,0 µL	5,0 µL

Tablica 8. Sastav pufera za elektroforezu.

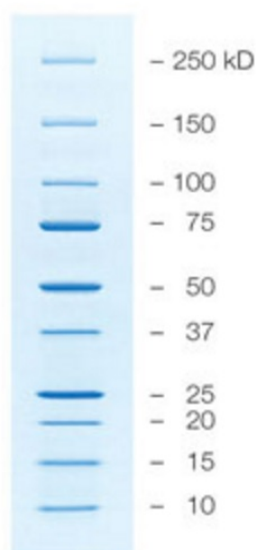
Tris-HCl	25 mM
glicin	200 mM
SDS	0,1% (w/v)

Tablica 9. Sastav pufera za obradu proteina (4x).

Tris-HCl (pH = 6,8)	62,5 mM
β-merkaptioetanol	12,5 mM
SDS	1,25 % (w/v)
bromfenol plavo	0,002 % (w/v)
glicerol	6,25 % (v/v)

Tablica 10. Sastav otopine za bojanje gelova.

<i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	2.5 g L ⁻¹
octena kiselina	10% (v/v)
etanol	45% (v/v)

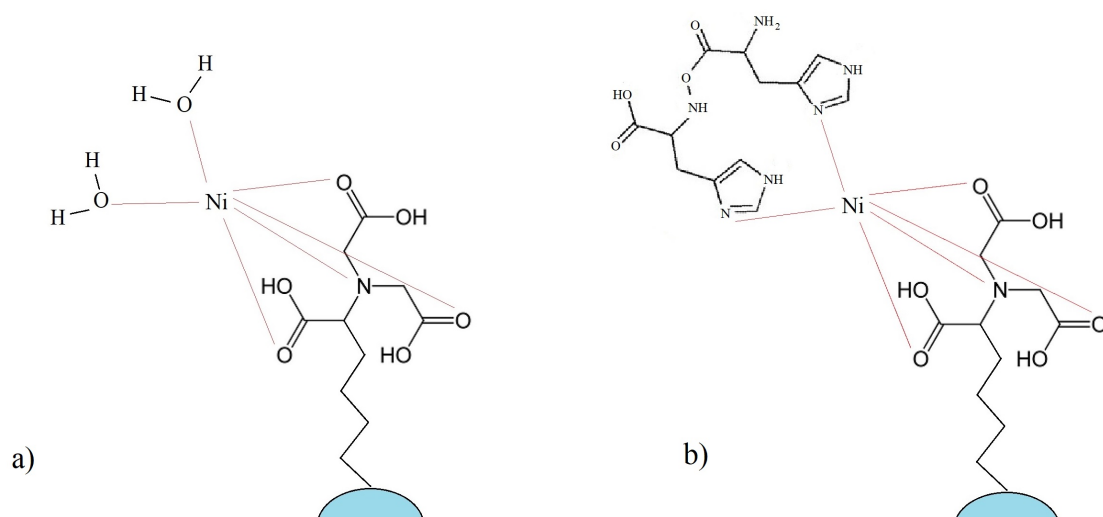


Slika 7. Marker molekulskih masa *Precision Plus Protein Standards Unstained* (#1610363) proizvođača *BioRad*. Slika je preuzeta sa stranice www.bio-rad.com.^[20]

2.5. Pročišćavanje fuzijskog proteina SUMO-CrdB

2.5.1. Afinitetna kromatografija (IMAC)

Budući da je fuzijski protein SUMO-CrdB obilježen polihistidinskim privjeskom na N-terminusu moguće ga je pročistiti afinitetnom kromatografijom na koloni koja sadrži imobilizirane ione metala (engl. *immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC). Korištena je *HisTrap HP* (*GE Healthcare*) kolona volumena 1 mL. Kolona je punjena unakrsno povezanim agaroznim kuglicama na kojima je imobilizirana nitriltriocetna kiselina (NTA). NTA je tetradentatni kelirajući adsorbens koji veže Ni^{2+} ione, kako je prikazano na slici 8. Preostala dva koordinacijska mjesta Ni^{2+} na ovaj način ostaju slobodna za interakciju s imidazolnim prstenima dvaju susjednih histidina iz histidinskog privjeska proteina. Na ovaj način protein obilježen afinitetnim privjeskom zaostaje vezan za stacionarnu fazu prilikom propuštanja uzorka kroz kolonu. Elucija se postiže ispiranjem kolone puferom koji sadrži visoku koncentraciju imidazola, koji se kompetitivno veže na imobilizirane ione nikla, zbog čega dolazi do otpuštanja proteina od interesa.^[21]



Slika 8. a) Ion nikla koordiniran nitriltriocetenom kiselinom i dvjema molekulama vode. b) Interakcija dvaju histidina s Ni^{2+} -NTA agarozom.

Sastavi pufera korištenih za afinitetnu kromatografiju navedeni su u tablici 11. Svi su puferi prije nanošenja na kolonu filtrirani propuštanjem kroz membranu veličine pora $0,45\ \mu\text{m}$ kako bi se odstranile veće čestice odnosno agregati koji bi mogli utjecati na protok kroz kolonu. Kolona je spojena na peristaltičku pumpu (*Peristaltic Pump P1, GE Healthcare*), preko koje su kroz kolonu propušteni uzorak i puferi za ispiranje odnosno eluciju. Budući da se pokazalo da je protein CrdB netopljiv, primijenjena je metoda pročišćavanja u denaturirajućim uvjetima te renaturacije na koloni, stoga je denaturacijski pufer ujedno i pufer za vezanje, te sadrži 20 mM imidazol, kako bi se smanjilo nespecifično vezanje. Kolona je prvo isprana s 10 mL sterilne dH_2O , te zatim ekvilibrirana s 10 mL denaturacijskog pufera, pri protoku 1 mL/min. Uzorak, odnosno talog netopljivog dijela dobivenog lizom bakterija kako je opisano u poglavlju 2.3., resuspendiran je u denaturacijskom puferu. Korišteno je otprilike 5 mL pufera po 1 g taloga. Talog je otprilike pola sata inkubiran u puferu za denaturaciju uz povremeno miješanje. Resuspendirani uzorak potom je centrifugiran 5 min na 10000g, kako bi se uklonile veće čestice, te je odvojeno 30 μL za analizu SDS elektroforezom. Na ekvilibriranu kolonu uzorak je nanesen pri protoku 1 mL/min. U svim daljnjim koracima ispiranja i elucije protok je također bio 1 mL/min. Prikupljen je uzorak nakon prolaska kroz kolonu za analizu SDS elektroforezom. Kolona je potom isprana s 10 mL renaturacijskog pufera koji je prethodno ohlađen na ledu, te je ponovno prikupljen uzorak za SDS-PAGE. Nakon toga kolona je dobro zatvorena parafilmom, kako bi se spriječila evaporacija pufera, i ostavljena preko noći na $4\ ^\circ\text{C}$. Idući dan slijedilo je ispiranje s elucijskim puferom, koji je također ohlađen na $4\ ^\circ\text{C}$. Prikupljeno je 6 elucijskih frakcija po 1 mL, od kojih su manji volumeni odvojeni za analizu

elektroforezom. Nakon korištenja kolona je očišćena sa sterilnom dH₂O te zatim pohranjena u 20% etanolu.

Tablica 11. Sastavi pufera korištenih za afinitetnu kromatografiju.

Denaturacijski pufer		Renaturacijski pufer		Elucijski pufer	
urea	8 M	Tris-HCl	20 mM	Tris-HCl	20 mM
Tris-HCl	100 mM	NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
NaH ₂ PO ₄	100 mM	Triton X-100	0,1% (v/v)	Triton X-100	0,1% (v/v)
imidazol	20 mM	glicerol	10% (v/v)	glicerol	10% (v/v)
		imidazol	20 mM	imidazol	500 mM
pH = 8,0		pH = 7,5		pH = 7,5	
Svi su puferi filtrirani prije nanošenja na kolonu.					

2.5.2. Kromatografija isključenjem

Gel filtracija ili kromatografija isključenjem (engl. *size-exclusion chromatography*) je kromatografska metoda razdvajanja čestica po veličini. Stacionarnu fazu čini inertno punilo čije granule sadrže pore različitih dimenzija. Tijekom prolaska tekuće faze odnosno uzorka kroz kolonu, veći proteini koji ne mogu ući u pore prolaze brže, dok se proteini manjih molekulskih masa zadržavaju dulje. Na ovaj se način proteini iz uzorka razdvajaju prema veličini.^[22] U ovom je radu gel filtracija korištena kao drugi korak pročišćavanja, nakon afinitetne kromatografije, kako bi se otklonile zaostale nečistoće. Upotrebljena je *Superose 12 10/300 GL* kolona (*GE Healthcare*). Kolona je spojena na *ÅKTA* sustav za brzu kromatografiju proteina u tekućem mediju (engl. *fast protein liquid chromatography*), koji omogućuje automatizirano potiskivanje tekuće faze kroz kolonu pri zadanoj brzini protoka i tlaku, te skupljanje uzoraka zadanog volumena. Kolona je prvo isprana s 50 mL sterilne dH₂O pri protoku 0,8 mL/min, te zatim ekvilibrirana s 50 mL pufera čiji je sastav naveden u tablici 12, ovaj put pri protoku 0,1 mL/min. I voda i pufer su prije nanošenja na kolonu degasirani ultrasoničkim pulsiranjem 15 min, pomoću uređaja *Elmasonic S 60* (*Elmasonic*). Pufer je prije korištenja filtriran propuštanjem kroz membranu veličine pora 0,22 µm. Uzorak je prije pročišćavanja kratko centrifugiran kako bi se otklonile veće čestice odnosno agregati. Koncentracija uzorka prije nanošenja na kolonu bila je 5,02 mg/mL. Prije početka gel filtracije, sustav je ohlađen na 4 °C. Uzorak je nanesen na kolonu, te je kromatografija provedena propuštanjem pufera kroz kolonu pri protoku od 0,1 mL/min. Prikupljani su uzorci volumena 250

μL . Uzorci su kasnije analizirani SDS elektroforezom. Kolona je nakon korištenja očišćena prvo sa sterilnom dH_2O , te zatim pospremljena u otopini natrijevog azida.

Tablica 12. Sastav pufera korištenog za gel filtraciju.

Tris-HCl	20 mM
NaCl	300 mM
Triton X-100	0,1% (v/v)
glicerol	10% (v/v)
pH = 7,5	

2.6. Kvantifikacija proteina

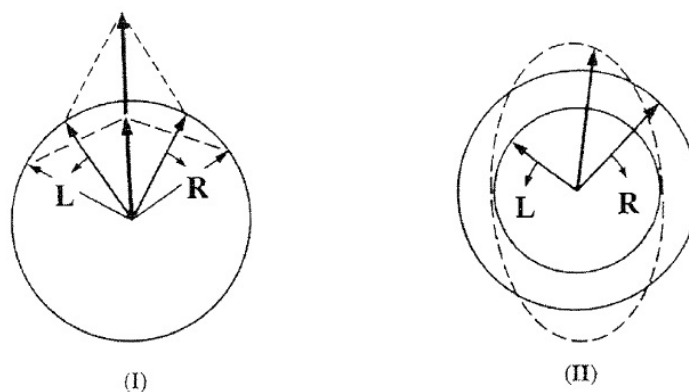
Koncentracija proteina u otopini nakon pročišćavanja te tijekom ugušćivanja praćena je spektrofotometrijski pomoću uređaja *Nanodrop 1000 (Nanodrop)*. Izmjerena je apsorpcija uzorka na 280 nm, budući da na ovoj valnoj duljini apsorbiraju aromatske aminokiseline. Ekstincijski koeficijent proteina izračunat je na temelju primarne strukture pomoću *ProtParam* programa (*ExPASy*), te je iz ovih parametara izračunata odgovarajuća koncentracija prema Beer-Lambertovom zakonu.

2.7. Ugušćivanje proteina i izmjena pufera

U svrhu povećanja koncentracije proteina u otopini kao i izmjene pufera korišteni su *Vivaspin Turbo 4 (Startorius)* koncentratori. Sustav zadrži dvije posudice odijeljene hidrofilnom celuloznom membranom koja propušta isključivo molekule čija je molekulska masa manja od 30 000. Koncentrator se puni otopinom proteina te centrifugira na 5000 g pri 4 °C. Tijekom centrifugiranja, pufer zajedno s molekulama manje molekulske mase prolazi kroz membranu dok protein zaostaje u gornjoj posudici budući da mu je molekulska masa veća od 30 kDa. U slučaju izmjene pufera, centrifugiranje se vrši u intervalima od 15 min, pri čemu se nakon svakog intervala dodaje novi pufer na uzorak. Nakon 3 ciklusa centrifugiranja, količina nepoželjnih sastojaka originalnog pufera je zanemariva.

2.8. Kružni dikroizam

Kružni dikroizam temelji se na različitoj apsorpciji lijevo i desno kružno polariziranog svjetla na određenoj valnoj duljini. Kod kružno polariziranog elektromagnetnog zračenja vektor električnog polja ima konstantan iznos, ali mu se smjer mijenja jer rotira oko smjera propagacije zračenja. Zapravo se planarno polarizirano svjetlo može promatrati kao kombinacija dvaju cirkularno polariziranih komponenti iste amplitude ali različitog smjera rotacije, odnosno jedne komponente koja rotira u smjeru kazaljke na satu (označava se kao desno polarizirano svjetlo, R), i jedne čija je rotacija u smjeru suprotnom od kazaljke na satu (lijevo polarizirano svjetlo, L). Ako takvo planarno polarizirano svjetlo propustimo kroz uzorak koji ga ne apsorbira ili apsorbira L i R komponentu u istoj mjeri, izlazna zraka biti će polarizirana u istoj ravnini kao i upadna. Međutim, ako uzorak različito apsorbira ove komponente izlazna zraka bit će eliptično polarizirana (slika 9).

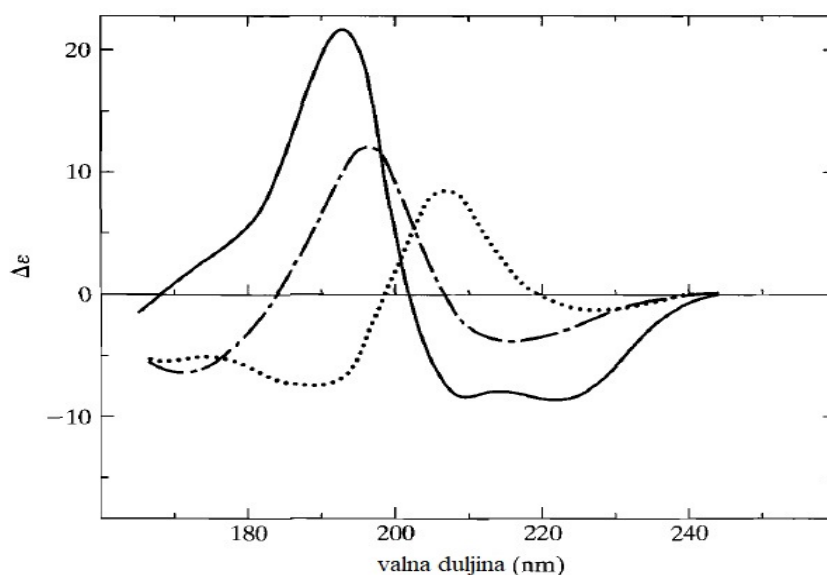


Slika 9. Efekt kružnog dikroizma. (I) Lijevo (L) i desno (R) kružno polarizirane komponente planarno polariziranog zračenja iste amplitude u kombinaciji daju planarno polarizirano zračenje. (II) Ako dvije komponente nisu iste amplitude njihov zbroj rezultira eliptično polariziranim zračenjem (isertana linija). Preuzeto iz Kelly *et al.* (2005).^[23]

Svojstvo diferencijalne apsorpcije L i R kružno polariziranog zračenja imaju molekule koje su kiralne. Kod bioloških makromolekula ovaj je efekt povezan s elementima sekundarne strukture. Glavni kromofor kod proteina je amidna skupina peptidne veze, stoga CD spektar proteina izrazito ovisi o interakcijama u koje je amidna skupina uključena, na primjer vodikovim vezama. Drugim riječima, CD spektar proteina ovisit će o udjelu pojedinih sekundarnih struktura u proteinu.^[23. 24] Tipični spektri različitih elemenata sekundarne strukture prikazani su na slici 10.

U ovom je radu kružni dikroizam poslužio kao metoda provjere uspješnosti renaturacije proteina nakon postupka denaturacije te renaturacije na koloni tijekom pročišćavanja, kako je opisano u

poglavlju 2.5.1. Prije svega je izmijenjen pufer u kojem se protein nalazi, budući da Tris pokazuje snažnu apsorbanciju ispod 190 nm, kao i kloridni ioni ispod 200 nm što rezultira smanjenom mogućnošću očitavanja apsorbancije koja nastaje kao posljedica različitih svojstava sekundarne strukture uzorka. Stoga je pripremljen 20 mM fosfatni pufer pH = 7,5 (korišteni su natrijev dihidrogenfosfat i dinatrijev fosfat u omjeru izračunatom Henderson-Hasselbackovom jednadžbom) s dodatkom 100 mM NaF. Uzorak je uspješno ukoncentriran do 1,87 mg/mL. U puferu koji sadrži 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 10% glicerol i 0,1% Triton X-100, pH = 7,5, uzorak se mogao ukoncentrirati do 3,02 mg/mL međutim pozadinski signal pufera kod mjerenja CD spektra je bio previsok da bi se rezultati mogli kvalitetno interpretirati. CD spektar snimljen je na Institutu Ruđer Bošković, na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju, pomoću spektropolarimetra *JASCO-J815*. Korištene su kivete optičkog puta 0,1 mm, a samo mjerenje je obavljeno na 4 °C. Spektar je snimljen kao ovisnost apsorbancije o valnoj duljini od 190 do 260 nm, u koracima od 0,2 nm. Snimljen je prvo spektar pufera pa zatim spektar uzorka, te je od drugog oduzeto prvo kako bi se dobili podaci o apsorbanciji koja je posljedica svojstava samog proteina. Sva su mjerenja ponovljena tri puta. Rezultati su analizirani pomoću programa *SELCON3* dostupnoj na internetskoj stranici *DichroWeb*.^[25] Program uspoređuje sirove podatke mjerenja s bazama podataka koje sadrže CD spektre proteina poznatih struktura, te na temelju njih određuje kompoziciju elemenata sekundarne strukture za protein od interesa.

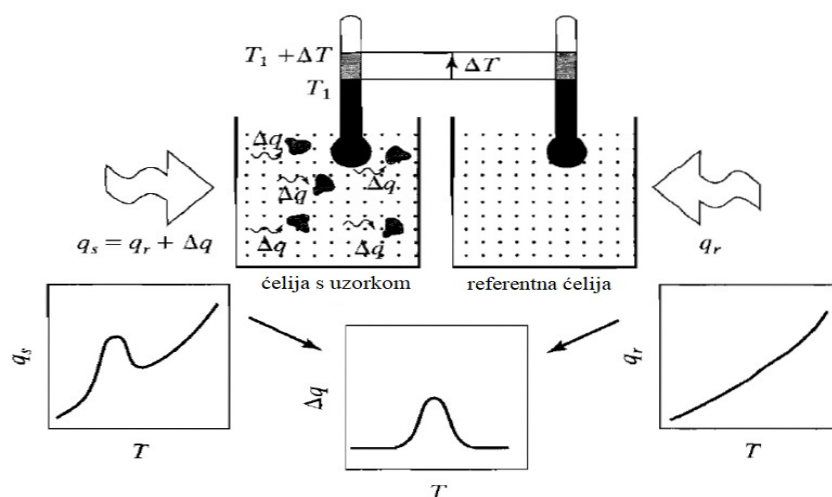


Slika 10. CD spektri različitih sekundarnih struktura: puna linija predstavlja α -uzvojnica, linija s naizmjeničnim crtama i točkama antiparalelnu β -ploču dok točkasta linija odgovara β -okretu. Preuzeto i prilagođeno iz van Holde (2006).^[24]

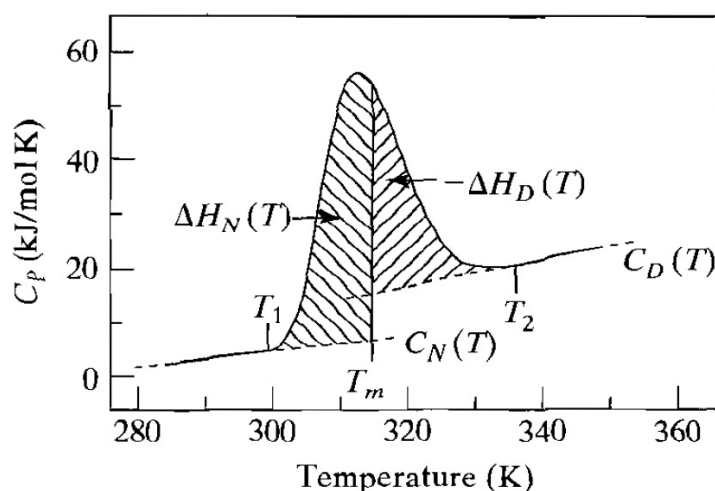
2.9. Razlikovna pretražna mikrokolorimetrija

Razlikovna pretražna mikrokolorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*, DSC) jest metoda kojom se mogu proučavati termokemijska svojstva jednostavnih biokemijskih reakcija, kao što je prijelaz biomolekule iz jedne konformacije u drugu odnosno proteina iz nativne u denaturiranu formu. Sustav se sastoji od dvije ćelije, od kojih jedna sadrži uzorak u određenom otapalu, a druga je referentna i sadrži identično otapalo kao mjerna, ali bez proteina (slika 11). Temperatura obje ćelije se postepeno povećava kroz određeni vremenski period, na način da je u svakom koraku mjerenja temperatura dvije ćelije identična. Uređaj potom bilježi razliku u toplini potrebnu da se temperatura ćelija održi jednakima, i ta razlika odgovara toplini apsorbiranoj (u endotermnom procesu) ili otpuštenoj (u egzotermnom procesu) od strane uzorka. Tijekom termičke denaturacije proteina odnosno faznog prijelaza dolazi do apsorpcije topline (slika 12).^[24]

U ovom je radu metoda DSC poslužila za određivanje T_m (temperatura pri kojoj je 50% proteina u nativnoj, a 50% u denaturiranoj formi) fuzijskog proteina SUMO-CrdB, te uz CD, kao dodatna provjera uspješnosti renaturacije proteina nakon pročišćavanja. Naime, za denaturirani uzorak ne može se uočiti promjena toplinskog kapaciteta niti maksimum u krivulji koji bi ukazao na apsorpciju topline pri faznom prijelazu. Mjerenje je obavljeno na Institutu Ruđer Bošković, na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju, pomoću uređaja *Nano DSC (TA Instruments)*. Korišten je isti uzorak kao i za CD, dakle protein koncentracije 1,87 mg/mL u fosfatnom puferu. Mjerenje je izvršeno povećavanjem temperature sustava od 25 °C do 100 °C brzinom od 1 °C/min.



Slika 11. Shematski prikaz razlikovne pretražne mikrokolorimetrije. Količina topline potrebna da se temperatura ćelija poveća za ΔT iznosi q_s za ćeliju s uzorkom, odnosno q_r za referentnu ćeliju. Razlika Δq odgovara toplini apsorbiranoj od strane uzorka. Preuzeto i prilagođeno iz van Holde (2006).^[24]



$$\int_{H1(T1)}^{H2(T2)} dH = \int_{T1}^{T2} C_p dT$$

Slika 12. Ovisnost toplinskog kapaciteta o temperaturi tijekom termičke denaturacije proteina. $C_N(T)$ označava toplinski kapacitet proteina u nativnoj formi, a $C_D(T)$ u denaturiranom stanju. Fazni prijelaz uočljiv je kao višak toplinskog kapaciteta koji pripada procesu denaturacije. T_m je temperatura pri kojoj je 50% proteina denaturirano. Integriranjem područja između T_1 (temperatura u kojoj je protein u cijelosti u nativnoj formi) i T_2 (u potpunosti denaturiran) dobivamo entalpiju denaturacije. Preuzeto iz van Holde (2006).^[24]

2.10. Cijepanje fuzijskog proteina SUMO pomoću SUMO *Express* proteaze

SUMO *Express* proteaza (*Lucigen*) specifično prepoznaje tercijarnu strukturu proteina SUMO te ga cijepa na C-terminusu. Za razliku od proteaza koje prepoznaju slijedove aminokiselina odnosno primarnu strukturu, ovaj način prepoznavanja i cijepanja osigurava vrlo visoku specifičnost, odnosno cijepanje SUMO proteazom ne rezultira zadržavanjem nenativnih aminokiselina na N-terminusu proteina, što je za mnoga daljnja strukturna i funkcionalna istraživanja često od velike važnosti.^[12, 13] Proteaza na sebi sadrži i histidinski afinitetni privjesak, kako bi se mogla jednostavno odvojiti od proteina od interesa afinitetnom kromatografijom, zajedno s odcijepljenim proteinom SUMO na čijem se N-terminusu također nalazi histidinski afinitetni privjesak.

Za reakciju je korišten uzorak proteina prethodno pročišćen afinitetnom kromatografijom. Prije reakcije uklonjen je imidazol iz pufera ultracentrifugiranjem kako je opisano u poglavlju 2.7., a koncentracija proteina određena kako je opisano u poglavlju 2.6. Izmjerena koncentracija proteina prije reakcije bila je 5,0 mg/mL. U reakcijsku smjesu dodan je DTT do koncentracije 2 mM. Prema

uputama proizvođača, za reakciju je korišteno 1 U proteaze za svakih 100 µg fuzijskog proteina. Prije dodavanja proteaze odvojeno je 15 µL uzorka za analizu SDS-PAGE elektroforezom. Reakcijska smjesa inkubirana je na 4 °C preko noći.

2.11. Kristalizacija proteina

Difrakcija rentgenskih zraka danas je glavna metoda određivanja strukture bioloških makromolekula. Metoda je u svojoj suštini analogna načinu na koji promatramo veće objekte, na primjer stanice, pomoću svjetlosnog mikroskopa. Naime, u tom se slučaju vidljiva svjetlost ili propušta ili odbija od uzorka, te se raspršene zrake potom skupljaju pomoću leća dajući golim okom vidljivu sliku. Za promatranje manjih objekata, atoma i molekula, potrebno je elektromagnetno zračenje manje valne duljine, odnosno rentgensko zračenje. Rentgenske zrake odbijaju se od pravilnog, ponavljajućeg niza molekula, odnosno jediničnog kristala i daju difrakcijsku sliku. Kao "leća" za interpretaciju difrakcijske slike koriste se Fourierove transformacije, koje nam omogućuju izračun elektronske gustoće.^[24] Za primjenu ove metode, makromolekule je prvo potrebno kristalizirati. Kristalizacija je stoga ujedno i ključan korak i primarna zapreka u istraživanju trodimenzionalne strukture makromolekula. Mnogo je razloga zašto je kristalizacija proteina i nukleinskih kiselina kompliciranija od kristalizacije malih molekula. Biološke su makromolekule iznimno složeni sustavi čija fizikalna i kemijska svojstva variraju kao funkcije niza okolišnih čimbenika, te ih često odlikuje i visok stupanj fleksibilnosti odnosno strukturne dinamičnosti kao i velik broj mogućih konformacija. Kristali dobiveni od proteina obično su mali i nestabilni, s obzirom na velik udio otapala. Iz primarne strukture proteina nije moguće predvidjeti u kakvim će uvjetima kristalizirati, pa je stoga metodologija koja se koristi empirijska. Drugim riječima, potrebno je isprobati niz različitih uvjeta, te na temelju informacija dobivenih na ovaj način pokušati optimizirati uvjete za dobivanje kristala pogodnih po veličini i kvaliteti za difrakcijski eksperiment.^[26]

2.11.1. Fizikalne osnove kristalizacije proteina

Molekula izlazi iz otopine kada joj koncentracija pređe granicu topljivosti, S^0 . S^0 ovisi o intrinzičnim svojstvima tvari u pitanju te vanjskim faktorima kao što su temperatura, tlak ili prisutnost različitih

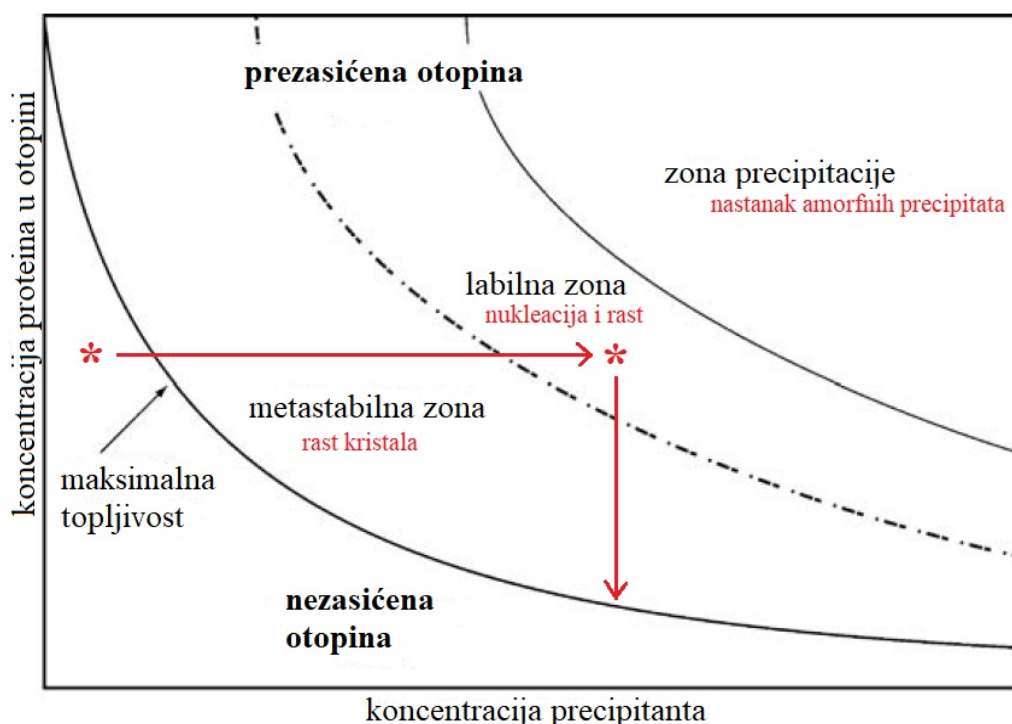
reagensa u otapalu. Na slici 13 prikazan je fazni dijagram kristalizacije. Fazni se dijagram sastoji od tri regije: regije nezasićenosti otopine, regije prezasićenosti te ravnotežne linije koja ih dijeli. Općenito je preduvjet za stvaranje kristala neke molekule dovođenje otopine iste do prezasićenosti. Jedan način da se to postigne je smanjenje volumena otapala, na primjer isparavanjem, budući da tako dolazi do povećanja koncentracije željene tvari u otopini. Druga strategija je smanjenje S^0 pri stalnoj koncentraciji, na primjer promjenom temperature ili promjenom ionske jakosti otapala.

U usporedbi s molekulom u otopini ili u formi amorfne krutine, kristali posjeduju znatno veći stupanj uređenosti odnosno manje stupnjeva rotacijske i translacijske slobode, pa posljedično i manju entropiju. Nukleacija je proces kooperativnog povezivanja minimalno četiri molekule na visoko uređen način, odnosno formacije kristalne rešetke. Upravo nukleacija predstavlja energetska barijeru procesa formacije kristala. Rast kristala dodavanjem pojedinačnih molekula na već formiranu jezgru rezultira manjim gubitkom entropije, pa je stoga vjerojatnost tog procesa veća od same nukleacije. Nakon nukleacije, do koje najčešće dolazi u labilnoj regiji (slika 13) kristal nastavlja rasti dok koncentracija ne padne do ravnotežne linije. Ovaj proces je shematski prikazan i na slici 14.^[24, 26]

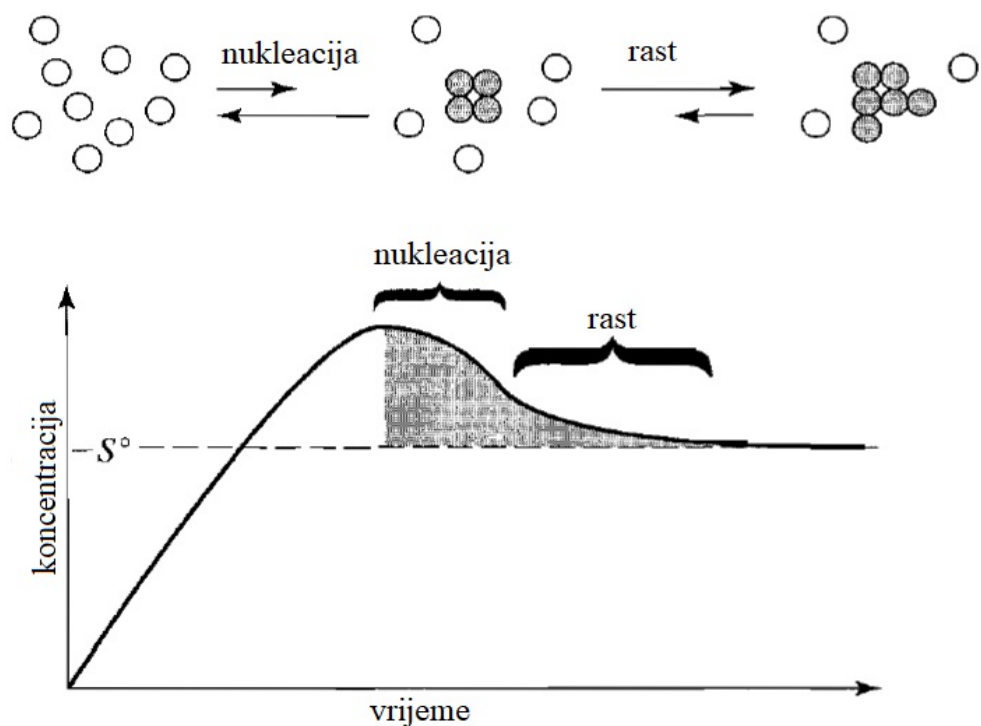
Kako bi se uspostavila uspješna strategija kristalizacije određenog proteina, potrebno je razumijeti faktore koji utječu na topljivost proteina. Prezasićenost otopine može se postići dodavanjem različitih taložnih reagensa i/ili mijenjanjem okolišnih parametara, kao što su temperatura ili pH. Taložne reagense tj. precipitante dijelimo na soli, organska otapala te dugolančane polimere. Koncentracija soli odnosno ionska jakost otopine može imati dvojak efekt na topljivost proteina. S jedne strane, topljivost se eksponencijalno smanjuje s povećanjem ionske jakosti, te se ovaj efekt naziva isoljavanje (engl. *salting-out*). Efekt isoljavanja posljedica je kompeticije iona u otopini s nabijenim skupinama površine proteina za molekule otapala. U nedostatku elektrostatskih interakcija s otapalom, proteini će početi stvarati interakcije među sobom, uslijed čega dolazi ili do formacije amorfni agregata ili kristala. S druge strane, topljivost također ima minimum pri vrlo niskoj ionskoj jakosti (usoljavanje, engl. *salting-in*). Budući da je površina proteina nabijena i polarna, efekt usoljavanja može se objasniti nedostatkom iona u otopini koji bi ušli u elektrostatske interakcije s nabijenim skupinama na površini proteina, zbog čega je protein slabije topljiv. U praksi to znači da se prezasićenost može postići ili povećanjem koncentracije soli, ili dijalizom koncentrirane otopine proteina deioniziranom vodom. Organska otapala djeluju kao precipitanti smanjujući dielektričnu konstantu otapala, međutim treba ih koristiti s oprezom budući da nerijetko imaju utjecaj na konformaciju proteina. Dugolančani polimeri, kao što je polietilenglikol (PEG) kompetiraju s proteinom za vodu, te posljedično dio volumena otopine postaje nedostupan proteinu što dovodi do smanjene topljivosti.

Jedan od najvažnijih faktora koji utječu na kristalizaciju je pH otopine, budući da o ovoj vrijednosti direktno ovisi distribucija naboja proteina. U pravilu je topljivost proteina najniža pri pH bliskom izoelektričnoj točki (pI), jer je pri toj vrijednosti ukupan naboj približno jednak nuli.^[26]

Još jedan aspekt od iznimne važnosti za uspjeh kristalizacijskog eksperimenta je strukturna i biokemijska čistoća uzorka proteina. Biokemijska čistoća znači da svaka makromolekula u uzorku ima istu molekularnu formulu. U pravilu je za uspješnu kristalizaciju proteina potrebno imati uzorak čija je čistoća minimalno 95% . Strukturna čistoća odnosi se na uniformnost konformacija proteina u uzorku. Iz ovog su razloga metode pročišćavanja korištene u pripremi uzorka neophodne za konačni uspjeh kristalizacije.^[24]



.Slika 13. Fazni dijagram kristalizacije. Sastoji se od tri regije: područja nezasićenosti, područja prezasićenosti te ravnotežne linije koja ih dijeli. Ravnotežna linija označava maksimalnu topljivost, odnosno koncentraciju proteina u otopini pri kojoj je brzina formacije krute faze jednaka brzini degradacije agregata. Regija prezasićenosti dijeli se na tri zone: zonu precipitacije u kojoj se formiraju amorfni precipitati, labilnu zonu u kojoj može doći do nukleacije i rasta kristala te metastabilne zone u kojoj kristali mogu rasti ali nukleacija nije vjerojatna. Preuzeto i prilagođeno iz McPherson (2009).^[26]



Slika 14. Mehanizam kristalizacije. S° označava maksimalnu topljivost pri zadanim uvjetima za određeni protein. Preuzeto i prilagođeno iz van Holde (2006).^[24]

2.11.2. Tehnike kristalizacije proteina

Postoji niz tehnika i procedura koje omogućuju postepeno povećanje koncentracije uzorka proteina i kristalizaciju. Najčešće korištene su "batch" kristalizacija, slobodna difuzija iz tekućeg u tekući medij, dijaliza te metoda difuzije para.

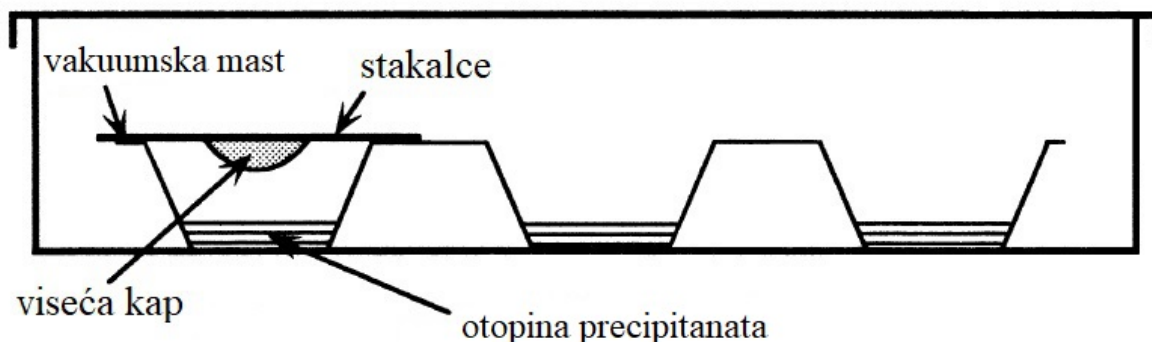
Najjednostavnija izvedba kristalizacijskog eksperimenta je *batch* kristalizacija. Sve se komponente miješaju direktno u zasićenu otopinu proteina. Uvjeti u otopini ostaju identični tijekom cijelog eksperimenta, što omogućuje lakšu analizu procesa kristalizacije odnosno određivanje točnih uvjeta pri kojima dolazi do nukleacije i rasta kristala. Koristi se i varijacija ove metode, *microbatch* tehnika, koja podrazumijeva uklapanje otopine proteina u uljnu kap, koja sprječava isparavanje uzorka. *Microbatch* kristalizacija u uljnoj kapi ima dvije prednosti; uz činjenicu da omogućuje korištenje manje količine uzorka, uklapanje u uljnu kap također štiti uzorak od moguće kontaminacije, budući da sam uzorak ne dolazi u kontakt sa zrakom.

Metoda slobodne difuzije iz tekućeg u tekući medij zasniva se na direktnoj difuziji iz otopine precipitanta u otopinu proteina, koje su smještene jedna pored druge unutar mikrokapilare. Brzina

difuzije manjih molekula precipitanta veća je od brzine difuzije proteina, stoga se koncentracija precipitanta u sloju koji sadrži uzorak polako povećava, te dolazi do prezasićenja. Prednost ove metode je stvaranje koncentracijskog gradijenta, što daje precizne informacije o točnim uvjetima u kojima nastaju kristali.

Dijaliza kao tehnika kristalizacije proteina zasniva se na odvajanju otopine proteina od precipitanata odnosno matične otopine polupropusnom membranom. Kroz polupropusnu membranu prolaze molekule manje molekulske mase, odnosno precipitant, dovodeći tako otopinu proteina do prezasićenja. Alternativno je moguće izvesti dijalizu pomoću destilirane vode, budući da mnogi proteini pokazuju smanjenu topljivost u otopinama niže ionske jakosti, zbog svog površinskog naboja. Kao i kod *batch* metoda kristalizacije, i kod dijalize koncentracija proteina tijekom eksperimenta ostaje ista, međutim ovdje dolazi do promjene sastava otopine. Postoji više izvedbi ove metode, na primjer korištenje kapilare ili gumba za dijalizu. Dijaliza omogućuje izmjenu sastava kristalizacijske otopine neograničen broj puta, što je velika prednost ove metode.

Metode difuzije para najraširenije su metode kristalizacije proteina. Mali volumen koncentrirane otopine proteina pomiješa se s otopinom precipitanta odnosno matičnicom (kristalizacijskom otopinom), ovisno o izvedbi ili na pokrovnom stakalcu (metoda viseće kapi, engl. "*hanging drop*") ili u manjoj udubini smještenoj iznad glavnog rezervoara (metoda sjedeće kapi, engl. "*sitting drop*"), dok se u većem rezervoaru nalazi samo otopina precipitanta. Budući da je sustav zatvoren, a koncentracija pojedinih precipitanata manja u kapi nego u otopini koja se nalazi u glavnom rezervoaru, dolazi do isparavanja otapala iz kapi, pri čemu se postepeno povećava koncentracija proteina. U ovom je radu korištena metoda difuzije para iz viseće kapi, pa je ista shematski prikazana na slici 15. Budući da je sustav zatvoren, a koncentracija precipitanata u mješavini s koncentriranom otopinom proteina u kapljici manja nego u rezervoaru, dolazi do isparavanja vode iz kapljice pri čemu se postupno povećava koncentracija proteina. Glavne su prednosti ovih metoda jednostavnost pripreme, te činjenica da se na brzinu ekvibracije može utjecati variranjem udaljenosti između kapi i rezervoara. Ipak, metode difuzije para imaju i određene nedostatke. Prvenstveno je to činjenica da se tijekom eksperimenta uvjeti u otopini konstantno mijenjaju, zbog čega je teško odrediti pri kojim točno uvjetima dolazi do nukleacije. Zbog toga je za analitičke studije procesa kristalizacije pouzdanije koristiti *batch* metodu, kod koje tijekom eksperimenta ne dolazi do promjene uvjeta u otopini.^[27]



Slika 15. Metoda difuzije para iz viseće kapi. Otopina proteina miješa se s otopinom precipitanata u određenom omjeru i postavlja na stakalce iznad spremnika koji sadrži samo otopinu precipitanta. U zatvorenom sustavu dolazi do isparavanja otopine iz kapi uslijed manje koncentracije precipitanata u odnosu na koncentraciju istih u otopini precipitanata u rezervoaru. Na ovaj se način koncentracija proteina u kapi postepeno povećava. Preuzeto i prilagođeno iz Drenth (2007).^[27]

2.11.3. Kristalizacija proteina HP1026

Za kristalizaciju proteina HP1026 korištena je metoda difuzije para iz viseće kapi. Uzorak je sadržavao prethodno pročišćen protein HP1026, koncentracije 15,5 mg/mL. Pripremljene su 24 kristalizacijske otopine za svaku kristalizacijsku ploču (tablice 13 i 14). U svaki rezervoar postavljeno je po 1 mL otopine precipitanata. Po 1,75 μ L uzorka pomiješano je s 1 μ L svake kristalizacijske otopine na stakalcu, koje je potom postavljeno iznad odgovarajućeg rezervoara. Sustav je dobro zatvoren vakuumskom mašću. Ploče su pohranjene na 20 °C i redovito pregledavane pomoću svjetlosnog mikroskopa (*Olympus SZX12*). Kristali su slikani pomoću kamere proizvođača *Dino-Lite*.

Tablica 13. Otopine precipitanata pripremljene za prvu kristalizaciju proteina HP1026.

	1	2	3	4	5	6
A	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 3350 0,2 M NaBr	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 3350 0,2 M NaBr 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,2 M NaBr	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,2 M NaBr 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 1450 0,2 M NaBr	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 1450 0,2 M NaBr 0,1 M MgCl ₂
B	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 3350 0,2 M CaCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 3350 0,2 M CaCl ₂ 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,2 M CaCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,2 M CaCl ₂ 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 1450 0,2 M CaCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 1450 0,2 M CaCl ₂ 0,1 M MgCl ₂
C	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 3350 0,2 M KSCN	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 3350 0,2 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,2 M KSCN	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,2 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 1450 0,2 M KSCN	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 1450 0,2 M KSCN 0,1 M MgCl ₂
D	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 3350 0,2 M LiCl	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 3350 0,2 M LiCl 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,2 M LiCl	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,2 M LiCl 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 1450 0,2 M LiCl	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 1450 0,2 M LiCl 0,1 M MgCl ₂

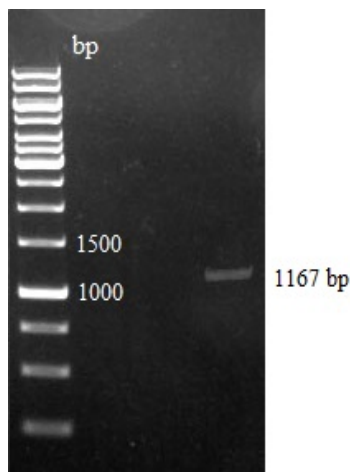
Tablica 14. Otopine precipitanata pripremljene za drugu kristalizaciju proteina HP1026.

	1	2	3	4	5	6
A	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 10% PEG 6000 0,1 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 10% PEG 6000 0,2 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 10% PEG 6000 0,3 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 10% PEG 6000 0,4 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 10% PEG 6000 0,5 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 10% PEG 6000 0,6 M KSCN 0,1 M MgCl ₂
B	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 15% PEG 6000 0,1 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 15% PEG 6000 0,2 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 15% PEG 6000 0,3 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 15% PEG 6000 0,4 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 15% PEG 6000 0,5 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 15% PEG 6000 0,6 M KSCN 0,1 M MgCl ₂
C	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,1 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,2 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,3 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,4 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,5 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 20% PEG 6000 0,6 M KSCN 0,1 M MgCl ₂
D	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 25% PEG 6000 0,1 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 25% PEG 6000 0,2 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 25% PEG 6000 0,3 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 25% PEG 6000 0,4 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 25% PEG 6000 0,5 M KSCN 0,1 M MgCl ₂	0,1 M Bis-Tris propan pH = 8,5 25% PEG 6000 0,6 M KSCN 0,1 M MgCl ₂

3. REZULTATI

3.1. Kloniranje

Gen *crdB* uspješno je umnožen PCR reakcijom iz izoliranog genoma bakterije *H. pylori* soja P12. Početnice su dizajnirane na način da gen bude umnožen bez prvih 87 nukleotida, budući da je pomoću bioinformatičkog alata za predviđanje signalnih sekvenci kod proteina Gram-negativnih bakterija *LipoP 1.0 Server (TU Denmark)*^[28] predviđeno da prvih 29 aminokiselina čini signalni peptid. Ishod PCR reakcije provjeren je analizom PCR produkta elektroforezom na agaroznom gelu. Ustanovljeno je da je umnažanje bilo uspješno, budući da je vizualizacijom gela pod UV svjetlom uočena jedna vrpca koja prema masi odgovara umnoženom genu (slika 16).



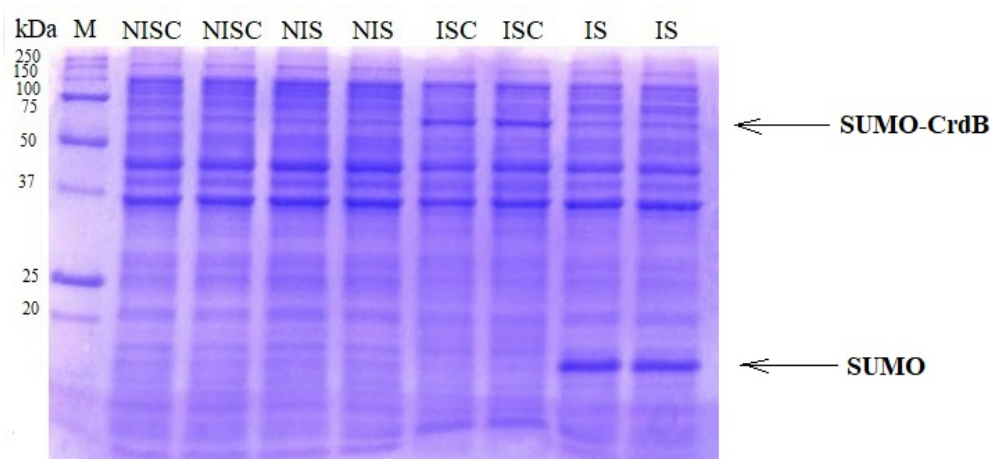
Slika 16. Analiza produkta PCR reakcije elektroforezom na agaroznom gelu. S lijeve strane nanesen je marker molekulskih masa, a s desne uzorak. Volumen nanesenog markera bio je 5 μ L, a uzorka 3 μ L.

Kemijski kompetentne stanice *E. coli* kotransformirane su lineariziranim vektorom i produktom PCR reakcije, te potom uzgojene preko noći na krutom hranjivom mediju koji sadrži kanamicin. Vektor nosi gen za rezistenciju na kanamicin, pa su izrasle kolonije od onih stanica kod kojih je transformacija i rekombinacija bila uspješna. Uslijedila je inokulacija tekućeg hranjivog medija te prekonozni uzgoj. Plazmid je izoliran i ukoncentriran kako je opisano u poglavlju 2.1.4 te poslan na sekvenciranje. Rezultati sekvenciranja uspoređeni su sa sekvencom gena *crdB* iz bakterije *H. pylori* soja P12 pomoću programa *BLAST (NCBI)*. Svrnavanje sekvenci prikazano je u prilogu.

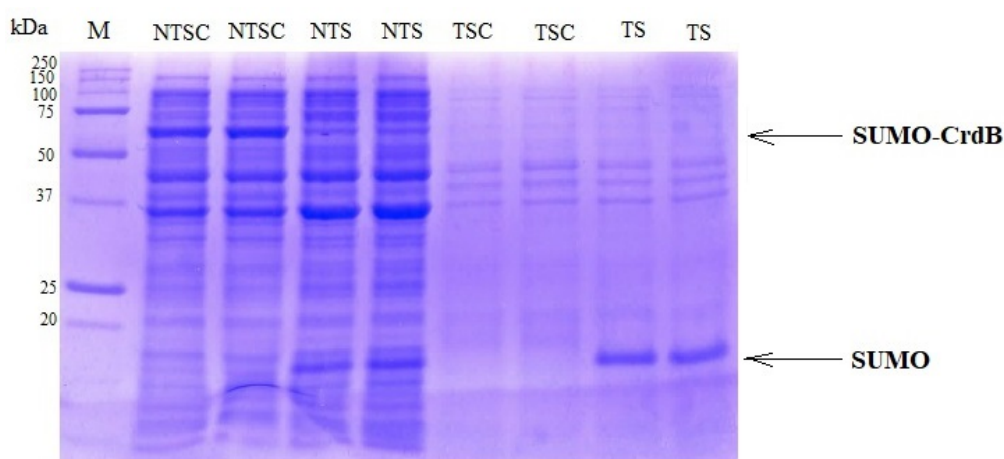
Ustanovljeno je da sekvenca gena ukloniranog u plazmid odgovara originalnoj sekvenci gena *crdB* iz genoma *H. pylori* soja P12, pa je dobiveni plazmid korišten u daljnjim koracima za ekspresiju fuzijskog proteina SUMO-CrdB.

3.2. Ekspresija i topljivost fuzijskog proteina SUMO-CrdB

Ekspresija fuzijskog proteina SUMO-CrdB inducirana je prvo na 37 °C, uz uzgoj ekspresijskog soja pri 250 rpm, 3 h. Istovremeno je, i na isti način, inducirana ekspresija proteina SUMO kod kontrolnog soja. Kod svakog pokušaja ekspresije prikupljeni su uzorci prije i nakon indukcije te analizirani SDS elektroforezom. Nakon lize stanica prikupljeni su uzorci topljivog i netopljivog dijela. Uočeno je, analizom SDS elektroforezom, kako se protein ne nalazi u topljivom dijelu, već u talogu. Vrpca koja prema masi odgovara fuzijskom proteinu SUMO-CrdB nalazi se na otprilike 56,0 kDa, a samom proteinu SUMO na 12,2 kDa. Kako bi se poboljšala topljivost fuzijskog proteina, isprobana je i ekspresija pri nižoj temperaturi, 18 °C, uz uzgoj preko noći također na 250 rpm, budući da je pri nižim temperaturama brzina sinteze proteina manja, što često pomaže topljivosti rekombinantnog proteina. Međutim, u ovom je slučaju rezultat, što se tiče topljivosti, ostao isti. Na slici 17 prikazana je analiza ekspresije kod prekonoćnog uzgoja na 18 °C, a na slici 18 analiza topljivosti proteina iz lizata tih istih stanica. Idući pokušaj otapanja fuzijskog proteina SUMO-CrdB bio je dodavanje deterdženta, 0,5% Triton X-100, u pufer za lizu, međutim niti ova strategija nije bila uspješna. Stoga je odlučeno da će u daljnjim koracima fuzijski protein SUMO-CrdB biti pročišćen iz inkluzijskih tijela, odnosno otopljen u denaturirajućim uvjetima, te naknadno renaturiran *in vitro*.



Slika 17. Analiza prekonoćne ekspresije fuzijskog proteina SUMO-CrdB pri 18 °C. Volumen nanesenog markera iznosio je 7 μ L, a uzoraka 3 μ L. NISC (neinducirani SUMO-CrdB), uzorak kulture bakterija transformiranih plazmidom koji nosi gen za fuzijski protein SUMO-CrdB prije indukcije ekspresije; ISC (inducirani SUMO-CrdB), isti uzorak nakon prekonoćne ekspresije; NIS (neinducirani SUMO), uzorak kulture bakterija transformiranih plazmidom koji nosi gen samo za protein SUMO prije indukcije ekspresije; IS (inducirani SUMO), isti uzorak nakon prekonoćne ekspresije. Po dva uzorka istih oznaka odgovaraju dvjema različitim kolonijama korištenim za inokulaciju tekućeg medija.

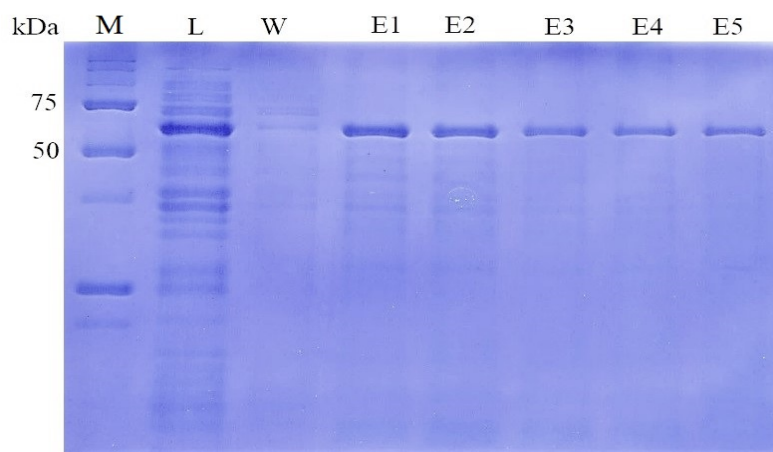


Slika 18. Analiza topljivosti proteina nakon lize stanica. NTSC (netopljivi dio SUMO-CrdB), netopljivi dio lizata stanica transformiranih plazmidom za ekspresiju fuzijskog proteina SUMO-CrdB; TSC (topljivi dio SUMO-CrdB) topljivi dio istog lizata; NTS (netopljivi dio SUMO), netopljivi dio lizata stanica transformiranih plazmidom za ekspresiju proteina SUMO; TS (topljivi dio SUMO), topljivi dio istog lizata. Volumen nanesenog markera iznosio je 7 μ L, a uzoraka 5 μ L.

3.3. Pročišćavanje fuzijskog proteina SUMO-CrdB

3.3.1. Afinitetna kromatografija (IMAC)

Fuzijski protein SUMO-CrdB nakon lize stanica nalazio se u netopljivom talogu, odnosno u inkluzijskim tijelima, stoga je postupak pročišćavanja afinitetnom kromatografijom ujedno poslužio kao *in vitro* denaturacija i renaturacija na koloni. Inkluzijska su tijela izolirana iz lizata stanica te otopljena pomoću denaturacijskog pufera, koji sadrži visoku koncentraciju uree. Denaturirani uzorak propušten je kroz Ni^{2+} -NTA kolonu, nakon čega je kolona ispirana ohlađenim renaturacijskim puferom, koji ujedno sadrži i 20 mM imidazol, kako bi se uklonile nespecifično vezane nečistoće s kolone. Ustanovljeno je da se najbolji rezultati dobivaju inkubacijom kolone u renaturacijskom puferu na 4 °C preko noći, prije elucije. Također je uočeno da dodatak 10% (v/v) glicerola u renaturacijskom i elucijskom puferu pomaže renaturaciji proteina, budući da su uzorci u takvom puferu uspješno koncentrirani do viših koncentracija bez stvaranja agregata, u usporedbi s istim puferom bez glicerola. Samo pročišćavanje afinitetnom kromatografijom praćeno je prikupljanjem uzoraka tijekom ispiranja i elucije te analizom istih SDS elektroforezom (slika 19). Vidljivo je da je fuzijski protein, čija je molekulska masa približno jednaka 56 kDa, uspješno pročišćen te da se nalazi u elucijskim frakcijama 1-5, pri čemu je koncentracija veća u ranijim frakcijama, a kasnije sve manja. Sve su elucijske frakcije spojene i ukoncentrirane. Prije pristupanja daljnjim koracima pročišćavanja, odnosno gel filtraciji, bilo je potrebno provjeriti da li je protein uspješno renaturiran. Za analizu stupnja renaturacije korištena je kombinacija dvaju metoda, kružnog dikroizma te razlikovne pretražne mikrokolorimetrije, koje su opisane u poglavljima 3.4. i 3.5.

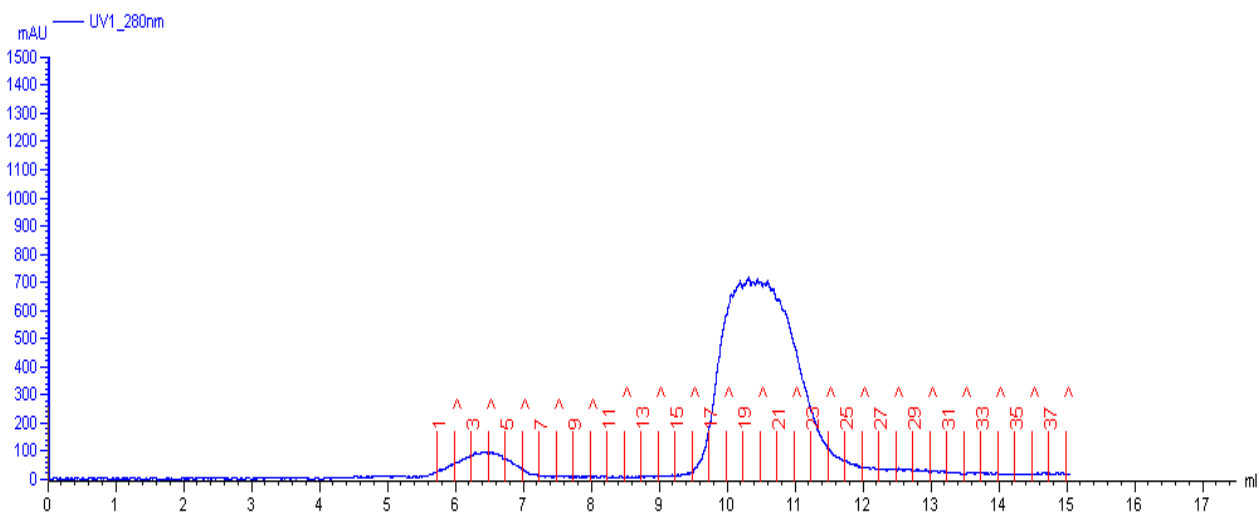


Slika 19. Analiza ishoda afinitetne kromatografije na Ni-NTA²⁺ agarози SDS elektroforezom. M, marker molekulskih masa; L, uzorak prije nanošenja na kolonu; W, ispiranje renaturacijskim puferom (prikupljen je 1 mL); E1-5, elucijske frakcije 1-5. Volumen nanesenog markera iznosio je 7 μ L, a uzoraka 10 μ L.

3.3.2. Kromatografija isključenjem

Kao dodatni korak pročišćavanja nakon afinitetne kromatografije korištena je gel filtracija (kromatografija isključenjem). Iako je uzorak nakon afinitetne kromatografije bio dovoljno čist za određene primjene, za kristalizacijske je eksperimente potrebno ukloniti što više moguće zaostalih nečistoća, pa je stoga nužan još jedan korak pročišćavanja.

Prije gel filtracije, uzorak proteina pročišćenog afinitetnom kromatografijom ukoncentriran je do 5,02 mg/mL, te podijeljen u dvije frakcije od 500 μ L od kojih je svaka zasebno propuštena kroz prethodno ekvilibriranu *Superose 12 10/300 GL* kolonu. Praćenjem apsorpcije na 280 nm vidljivo je da se proteini s kolone eluiraju u frakcijama 1-6 te 16-24 (slika 20). Prvi maksimum se nalazi na otprilike 6,5 mL a drugi na 10,5 mL. Frakcije su analizirane SDS elektroforezom (slika 21), te je ustanovljeno da je fuzijski protein SUMO-CrdB pretežito eluiran unutar frakcija koje se nalaze ispod prvog maksimuma, te u manjoj količini unutar drugog, gdje se također nalaze nečistoće nižih molekulskih masa. Prema elucijskom volumenu prvog maksimuma može se zaključiti da fuzijski protein SUMO-CrdB formira agregate, a vidljivo je i da se nečistoće eluiraju zajedno s agregatima proteina SUMO-CrdB.



Slika 20. Apsorpcija uzorka na 280 nm pri izlasku s kolone, u ovisnosti o eluiranom volumenu. mAU, jedinica apsorbancije (engl. *mili absorbance unit*). Crveno su označeni brojevi prikupljenih frakcija.



Slika 21. Analiza frakcija prikupljenih gel filtracijom. M, marker molekulskih masa; F3, F4, F16-22, frakcije. Volumen nanesenog markera iznosio je 7 μL , a uzoraka 20 μL .

3.4. Kružni dikroizam

Apsorpcija kružno polariziranog zračenja u ovisnosti o valnoj duljini izmjerena je pomoću uređaja *JASCO-J815*. Zabilježena je apsorpcija pufera pri valnim duljinama 190 nm do 260 nm u koracima od 0,2 nm. Na isti je način snimljena i apsorpcija uzorka. Spektar pufera oduzet je od spektra uzorka, kako bi konačan rezultat bio odraz isključivo svojstava proteina.

Pripremljeni su uzorci pročišćenog fuzijskog proteina u različitim puferima, međutim snimanje u puferu koji sadrži 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 10% glicerol i 0,1% Triton X-100, pH = 7,5 nije bilo uspješno zbog snažnog pozadinskog signala. Za daljnju analizu su, stoga, korišteni uzorci u 20 mM fosfatnom puferu s dodatkom 100 mM NaF. Isprobane su kivete različitih širina odnosno različite duljine optičkog puta kako bi se pronašli optimalni uvjeti za snimanje spektra. Najbolji rezultati dobiveni su korištenjem najkraćeg optičkog puta, 0,1 mm.

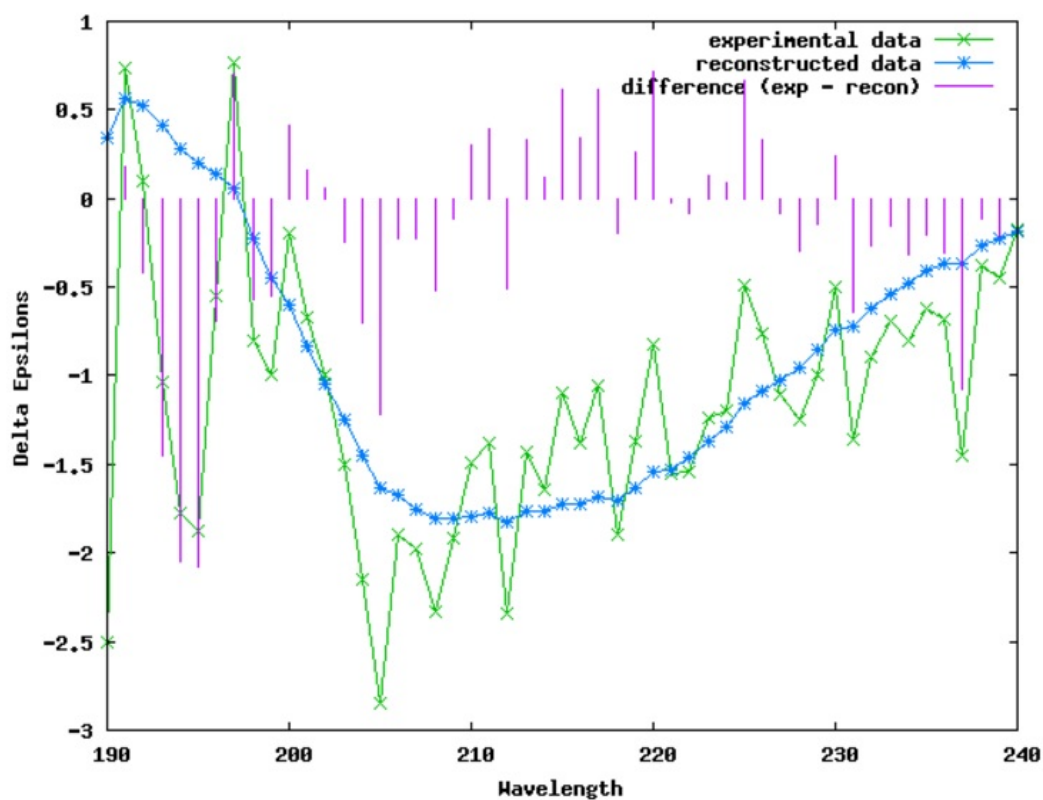
Spektar je zabilježen kao ovisnost eliptičnosti, θ (milideg) o valnoj duljini, λ (nm). Kako bi se uzorci različitih koncentracija mogli međusobno uspoređivati, eliptičnost je preračunata u $\Delta\epsilon$ prema formuli:

$$\Delta\epsilon = \theta \times (\text{MWR}/\gamma \times d) \times 100$$

pri čemu je MWR molekularna masa (Da) podijeljena s brojem aminokiselina, d duljina optičkog puta (cm), a γ koncentracija proteina (mg mL⁻¹).

Kako bi se iz snimljenog spektra dobile informacije o elementima sekundarne strukture proteina, dobiveni su podaci analizirani pomoću algoritma *SELCON3* koji je dostupan na internetskoj stranici *DichroWeb*.^[25, 29] Algoritam uspoređuje sirove podatke s nekoliko različitih baza podataka, koje su optimizirane u različitim rasponima valnih duljina.

Na slici 22 prikazan je spektar fuzijskog proteina SUMO-CrdB pročišćenog afinitetnom kromatografijom. Spektar ima minimum na valnoj duljini oko 210 nm, što je karakteristično za uređene strukture (slika 10). Procijenjen sastav različitih sekundarnih struktura prema algoritmu *SELCON3* naveden je u tablici 15. Prema ovoj procjeni među motivima sekundarne strukture dominiraju β -ploče i β -okreti, dok je α -uzvojnica relativno malo.



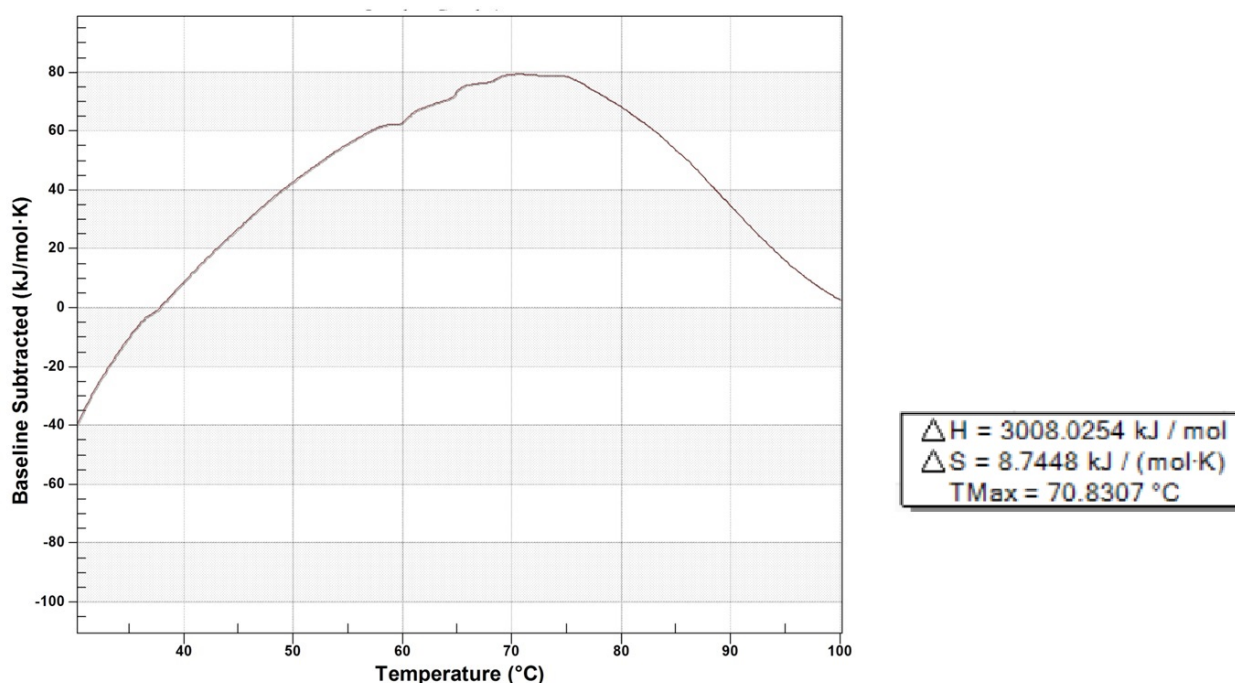
Slika 22. Spektar fuzijskog proteina SUMO-CrdB; ovisnost $\Delta\epsilon$ o valnoj duljini, λ (nm). Zelena linija predstavlja eksperimentalne podatke, plava podatke rekonstruirane pomoću algoritma *SELCON3*, a ljubičasta njihovu razliku.

Tablica 15. Procjena sastava elemenata sekundarne strukture fuzijskog proteina SUMO-CrdB prema algoritmu *SELCON3*.

α -uzvojnica	7,3%
β -ploča	30,7%
β -okret	21,4%
neuređeno	39,6%

3.5. Razlikovna pretražna mikrokolorimetrija

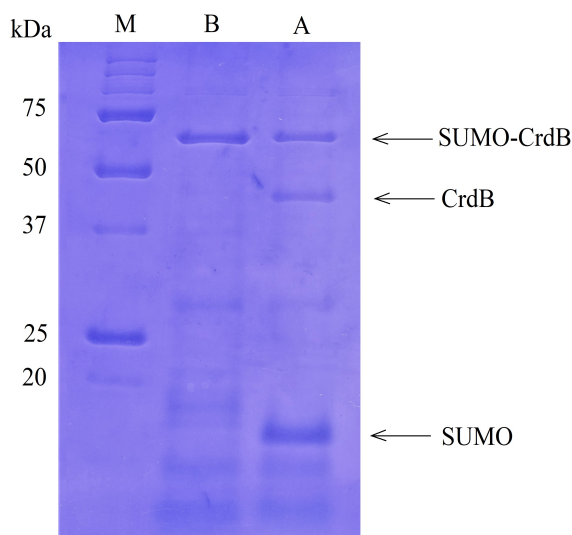
Razlikovnom pretražnom mikrokolorimetrijom istražena su termokemijska svojstva procesa denaturacije fuzijskog proteina SUMO-CrdB. Iz grafičkog prikaza ovisnosti topline apsorbirane od strane uzorka o temperaturi sustava (slika 23) uočljiv je maksimum pri 70,83 °C. Može se zaključiti da ovaj toplinski događaj odgovara faznom prijelazu, odnosno prijelazu proteina iz native u denaturiranu formu, te da fuzijski protein SUMO-CrdB ima temperaturu taljenja $T_m = 70,83$ °C. U kombinaciji s podacima dobivenim kružnim dikroizmom, ova informacija potvrđuje da je ranije opisani postupak pročišćavanja u denaturirajućim uvjetima te renaturacije *in vitro* bio uspješan.



Slika 23. Apsorbirana toplota korigirana baznom linijom u ovisnosti o temperaturi sustava. Krivulja ima maksimum pri 70,83 °C.

3.6. Cijepanje fuzijskog proteina SUMO pomoću SUMO *Express* proteaze

Kako bi se istražila mogućnost uklanjanja fuzijskog proteina SUMO, proveden je eksperiment cijepanja SUMO *Express* proteazom. Reakcijska smjesa inkubirana je na 4 °C preko noći, prema preporuci proizvođača. Analizom SDS elektroforezom (slika 24) ustanovljeno je da je proteoliza bila djelomično uspješna, ali ne u potpunosti, budući da je nepocijepani protein SUMO-CrdB prisutan i nakon 12 sati inkubacije s proteazom. Na gelu su vidljive vrpce koje prema masi odgovaraju fuzijskom proteinu SUMO-CrdB (otprilike 56 kDa), samom proteinu CrdB (43,1 kDa) te odcijepljenom proteinu SUMO (12,2 kDa). Protein CrdB nije bilo moguće odvojiti iz smjese afinitetnom kromatografijom, budući da se ispostavilo da u odsutnosti fuzijskog partnera koji mu poboljšava topljivost počinje agregirati.



Slika 24. Analiza reakcije cijepanja fuzijskog proteina SUMO *Express* proteazom SDS elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. M, marker molekulskih masa; B, uzorak prije dodavanja proteaze; A, uzorak nakon dodavanja proteaze i prekonoćne inkubacije na 4 °C. Volumen nanesenih uzoraka bio je 10 µL, a markera 7 µL.

3.7. Kristalizacija proteina HP1026

3.7.1. Prva kristalizacija

Tijekom prvog kristalizacijskog eksperimenta uočeni su mikrokristali proteina HP1026 nakon 5 dana inkubacije na 20 °C (slika 25), u uvjetima navedenim u tablici 16. Svi ostali uvjeti rezultirali su stvaranjem različitih amorfnih precipitata.

Tablica 16. Uvjeti pri kojima je došlo do pojave mikrokristala proteina HP1026 tijekom prvog kristalizacijskog eksperimenta.

C4	
Bis-tris propan (pH = 8,5)	0,1 M
PEG 6000	20% (w/v)
KSCN	0,2 M
MgCl ₂	0,1 M



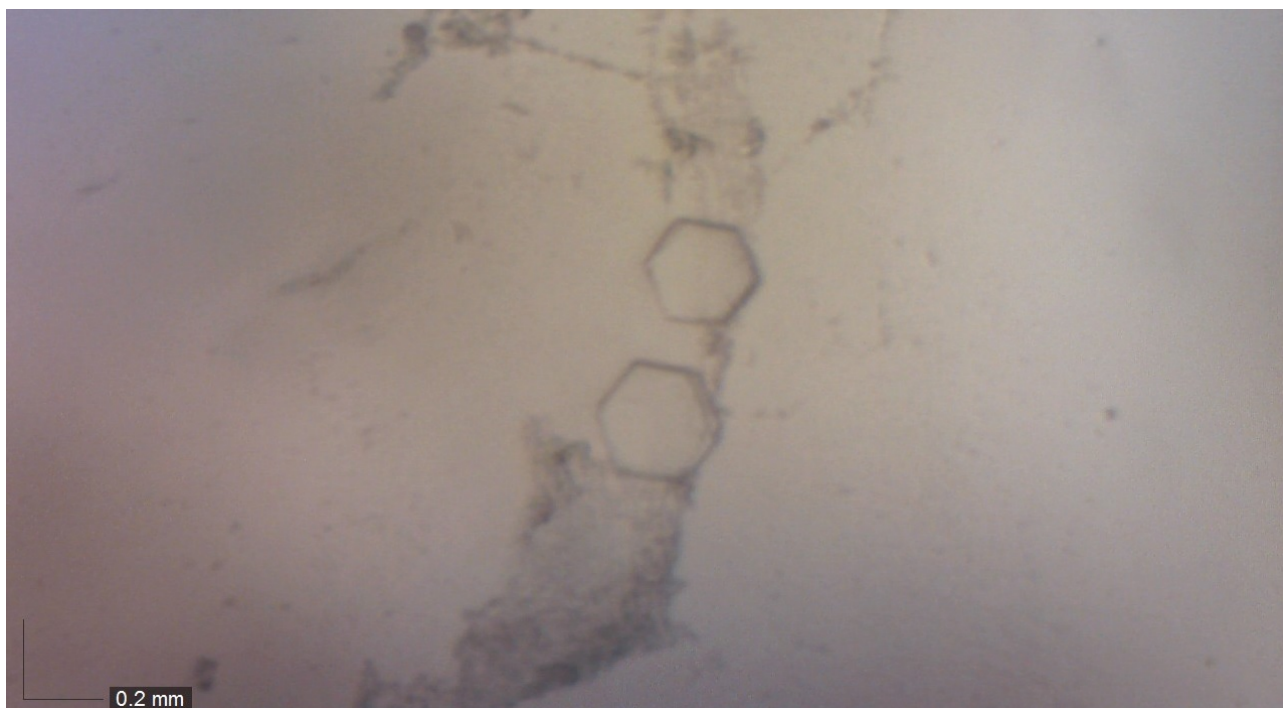
Slika 25. Mikrokristali proteina HP1026.

Kasnijim pregledavanjem ploče ustanovljeno je da su kristali ostali stabilni 7 tjedana nakon postavljanja eksperimenta.

3.7.2. Druga kristalizacija

Drugi je kristalizacijski eksperiment postavljen na temelju rezultata dobivenih prvom kristalizacijom. Varirane su koncentracije polietilen glikola 6000 i kalijeveg tiocijanata, u svrhu dobivanja većih i kvalitetnijih kristala proteina HP1026. Nakon 5 dana kristali su se pojavili pri uvjetima C2 i C3 (tablica 14), odnosno pri identičnim uvjetima kao u prvom kristalizacijskom eksperimentu, te uvjetima gdje je koncentracija kalijeveg tiocijanata bila nešto viša (0,3 M).

Vrlo sitni kristalići pojavili su se i pri višim koncentracijama PEG-a (25% (w/v)). Kod viših koncentracija kalijeveg tiocijanata (0,5 M i 0,6 M) došlo je do stvaranja amorfnih precipitata. Kristali iz uvjeta C2 prikazani su na slici 26.



Slika 26. Heksagonalni kristali proteina HP1026 nastali u uvjetima C2 tijekom drugog kristalizacijskog eksperimenta.

4. RASPRAVA

U ovom je radu protein CrdB iz bakterije *Helicobacter pylori* soja P12 uspješno eksprimiran u fuziji s proteinom SUMO, koji na N-terminusu sadrži histidinski privjesak (His₆) što omogućuje pročišćavanje fuzijskog proteina afinitetnom kromatografijom. Protein SUMO često je korišten fuzijski partner za ekspresiju proteina koji su inače zahtjevni u smislu niske topljivosti.^[12] Pokazalo se, međutim, da u slučaju proteina CrdB fuzija s proteinom SUMO nije omogućila ekspresiju u topljivoj formi, već je fuzijski protein SUMO-CrdB eksprimiran u obliku netopljivih inkluzijskih tijela. Inkluzijska su tijela agregati rekombinantnih proteina koji nastaju uslijed nepravilnog ili djelomičnog smatanja rekombinantnog proteina, do kojeg najčešće dolazi kada je brzina ekspresije veća od brzine potrebne da se postigne pravilno smatanje proteina.^[30, 21] Formacija inkluzijskih tijela općenito je česta pojava kod heterologne prekomjerne ekspresije rekombinantnih proteina, a u slučaju membranskih proteina, zbog njihove iznimne hidrofobičnosti, gotovo je pravilo.^[31] Izolacija rekombinantnog proteina iz inkluzijskih tijela zahtjevnija je zato što podrazumijeva denaturaciju i zatim renaturaciju proteina. Optimalne uvjete za renaturaciju pojedinog rekombinantnog proteina nemoguće je predvidjeti. Za renaturaciju odnosno uklanjanje denaturirajućih agensa koriste se različite metode, na primjer dijaliza, postepeno razrjeđivanje ili gel filtracija.^[30] U ovom je radu korištena renaturacija na koloni tijekom afinitetne kromatografije. Prednost ovog pristupa je brzina i jednostavnost, kao i činjenica da se uzorak istovremeno i pročišćava te ugušćuje. Uspjeh ove metode, međutim, zavisi o svojstvima samog proteina i nemoguće ga je predvidjeti. Ipak, u ovom je radu uspješno osmišljen protokol za dobivanje renaturiranog i relativno pročišćenog fuzijskog proteina SUMO-CrdB. Dodatak deterdženta (0,1% Triton X-100) i 10% glicerola u renaturacijski, kao i elucijski pufer te prekonoćna inkubacija kolone na 4 °C u renaturacijskom puferu pokazali su se kao dobra strategija stabilizacije proteina u otopini, odnosno renaturacije. Iako formacija inkluzijskih tijela svakako predstavlja zapreku u produkciji rekombinantnih proteina budući da ovako eksprimirani proteini nisu u svojoj nativnoj formi pa stoga nisu niti biološki aktivni, izolacija rekombinantnih proteina iz inkluzijskih tijela ima niz prednosti. Prvo, formacija inkluzijskih tijela omogućuje vrlo visoku razinu ekspresije rekombinantnog proteina, u pojedinim slučajevima i do 30% ukupne mase staničnih proteina. Osim toga formacija inkluzijskih tijela štiti rekombinantni protein od proteolitičke razgradnje proteazama stanice, a u slučaju da je rekombinantni protein u pitanju toksičan, štiti samu stanicu od nepovoljnih učinaka biološke aktivnosti proteina od interesa. Najveća prednost je homogenost samih inkluzijskih tijela. Naime, inkluzijska tijela sadrže gotovo isključivo agregirani rekombinantni protein, uz vrlo malo ostalih proteina stanice domaćina ili

fragmenata nukleinskih kiselina. Izolacija rekombinantnog proteina iz inkluzijskih tijela može se, stoga, promatrati kao prvi korak pročišćavanja.^[21, 32] Nakon procesa izolacije rekombinantnog proteina iz inkluzijskih tijela i naknadne renaturacije neophodno je analizirati uspješnost procesa renaturacije. Postoji više metoda kojima se može procijeniti ima li protein nativnu strukturu. Za proteine poznatih funkcija, koji imaju na primjer enzimsku aktivnost ili sposobnost vezanja nekog supstrata očigledna je i pouzdana opcija upravo analiza te enzimske funkcije. Jedino proteini u svojoj nativnoj formi biti će biološki aktivni. U slučaju proteina CrdB, o čijoj se strukturi i funkciji ne zna gotovo ništa, a pretpostavlja se da funkcionira kao membranski transporter bakrovih iona, test biološke aktivnosti nije bio opcija. Korištena je, stoga, metoda kružnog dikroizma. Kružni dikroizam, kako je ranije objašnjeno, daje informacije o kompoziciji sekundarnih struktura proteina u otopini. Metoda je iznimno popularna za analizu strukture bioloških makromolekula općenito, međutim dizajnu eksperimenta kao i kasnijoj interpretaciji dobivenih podataka svakako treba pristupiti s oprezom. Prvo, izbor pufera za mjerenje često predstavlja kompromis između stabilnosti proteina i zahtjeva uređaja, budući da veliki broj često korištenih tvari u puferima, na primjer Tris ili kloridni ioni, rezultira snažnim pozadinskim signalom koji otežava mjerenje. Valja također imati na umu da biološki sistemi općenito imaju nisku eliptičnost odnosno razliku u apsorpciji, pa svaka kontaminacija drugim kromoforima može drastično utjecati na rezultate mjerenja.^[23] Što se tiče analize podataka, dostupno je više algoritama koji omogućuju procjenu sekundarne strukture na temelju baza podataka CD spektara proteina već poznatih struktura. Kako je odmah uočeno da fuzijski protein SUMO-CrdB ima slab odziv, maksimalno je smanjena duljina optičkog puta, a mjerenje je ponovljeno više puta. Dobiveni podaci, analizirani algoritmom *SELCON3*, ukazuju na vjerojatno uspješnu renaturaciju, a što se tiče kompozicije sekundarnih struktura procjena ukazuje na dominaciju β -ploča i β -okreta. Pretpostavlja se da protein CrdB spada u skupinu proteina vanjske membrane Gram-negativnih bakterija.^[6] Proteini vanjske membrane najčešće su oblikovani upravo kao β -bačve sačinjene od 8 do 24 antiparalelno orijentiranih β -lanaca. Proteini ove skupine vrlo često oligomeriziraju, tvoreći u većini slučajeva trimere koji funkcioniraju kao transmembranske pore ili enzimski kompleksi. Za razliku od membranskih proteina čije transmembranske regije čine α -uzvojnice, β -ploče sastoje se od naizmjeničnih hidrofobnih i hidrofilnih aminokiselina zbog čega im je ukupna hidrofobičnost niža, a to ih posljedično čini i nešto stabilnijima u otopini.^[33] Ove karakteristike proteina vanjske membrane donekle otežavaju predikcije transmembranskih regija i motiva sekundarne strukture na temelju primarnih struktura, koje i inače treba uzeti sa zadržkom. Na primjeru proteina CrdB, isprobano je više bioinformatičkih alata za predikciju sekundarne strukture dostupnih na internetu, međutim predikcije su se međusobno značajno razlikovale. Iz eksperimentalnog se rada s druge strane može zaključiti da rezultati dobiveni analizom snimljenog

spektra fuzijskog proteina SUMO-CrdB imaju smisla s obzirom na pretpostavljenu pripadnost ovog proteina u skupinu proteina vanjske membrane. Ipak, s obzirom na loš odziv proteina, odlučeno je renaturaciju provjeriti još jednom dodatnom metodom. Razlikovnom pretražnom mikrokolorimetrijom detektiran je toplinski događaj tijekom zagrijavanja uzorka koji odgovara prijelazu proteina iz nativne u renaturiranu formu. Prema tome određena je i temperatura taljenja za fuzijski protein SUMO-CrdB, $T_m = 70,83$ °C. Kombinacija rezultata ovih dvaju metoda ukazuje na to da fuzijski protein SUMO-CrdB u otopini nakon izolacije iz inkluzijskih tijela, pročišćavanja afinitetnom kromatografijom te renaturacije na koloni posjeduje elemente sekundarne strukture odnosno da je vjerojatno u svojoj nativnoj formi. Tretiranjem otopine fuzijskog proteina SUMO-CrdB SUMO *Express* proteazom pokazano je da je moguće ukloniti fuzijski protein SUMO, ali kako protein CrdB bez fuzijskog partnera počinje agregirati, nije ga bilo moguće odvojiti afinitetnom kromatografijom. Kako dodatna metoda pročišćavanja fuzijskog proteina SUMO-CrdB isprobana je gel-filtracija, međutim ispostavilo se da fuzijski protein SUMO-CrdB s kolone izlazi u formi oligomera ili agregata, te da prisutne nečistoće također ostaju vezane. Idući korak istraživanja proteina CrdB svakako bi trebao biti ili optimizacija pročišćavanja gel filtracijom, ili isprobavanje neke druge kromatografske metode koja bi omogućila otklanjanje zaostalih nečistoća odnosno postizanje čistoće prikladne za postavljanje kristalizacijskih eksperimenata.

Protein HP1026 je donedavno bio u potpunosti strukturno i funkcionalno neokarakteriziran, unatoč interesantnoj lokaciji gena *hp1026* koji je pod kontrolom jednog od triju promotora toplinskog šoka u genomu *H. pylori*. Genski produkti čija je ekspresija kontrolirana na ovaj način, omogućuju bakteriji odgovor na stresne uvjete, što je za patogenu bakteriju poput *H. pylori* koja nastanjuje u mnogočemu ekstremnom okolišu ljudskog gastrointestinalnog trakta, od presudne važnosti. U sklopu nedavnih istraživanja provedenih na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu protein HP1026 uspješno je proizveden heterolognom ekspresijom u bakteriji *E. coli*, te nakon toga pročišćen kombinacijom kromatografskih metoda. Također je po prvi put eksperimentalno dokazana ATPazna aktivnost proteina HP1026. Iako je uzorak bio zadovoljavajuće čistoće, inicijalni kristalizacijski eksperimenti nisu dali kristale zadovoljavajuće veličine i stabilnosti. Dobiveni kristali pokazivali su slabu difrakciju, nedovoljnog razlučivanja za rješavanje kristalne strukture.^[10] Ovaj je rad, stoga, poslužio kao nastavak ranije provedenih istraživanja u smjeru određivanja uvjeta kristalizacije proteina HP1026. Prvi je kristalizacijski eksperiment osmišljen na način da je pomoću 24 otopine precipitanata sistematično ispitan utjecaj različitih soli te poli(etilenglikol)a različitih prosječnih molekulskih masa. Nakon 5 dana inkubacije ploče na 20 °C pojavili su se mikrokristali heksagonalnog oblika u kapljici u kojoj je otopina proteina bila pomiješana s otopinom precipitanata sljedećeg sastava: 0,1 M Bis-tris propan (pH = 8,5), 20% (w/v)

PEG 6000, 0,2 M KSCN, 0,1 M MgCl_2 . U ostalim je uvjetima uglavnom došlo do stvaranja različitih amorfnih precipitata, pa je stoga odlučeno da će drugi kristalizacijski eksperiment biti orijentiran na uvjete bliske navedenima. Postavljena je druga ploča s 24 otopine precipitanata koje su sadržavale različite koncentracije PEG-a 6000 i kalijevog tiocijanata. Kristali heksagonalnog oblika pojavili su se ponovno nakon 5 dana, no ovaj put u većem broju uvjeta. Najveći su kristali nastali u uvjetima identičnim prvoj uspješnoj kristalizaciji te u uvjetima s 0,3 M KSCN. Uvjeti s višim koncentracijama PEG-a rezultirali su pojavom vrlo sitnih kristalića. Vjerojatno je da je u ovim uvjetima došlo do prebrzog postizanja prezasićenja otopine proteina što rezultira većim brojem nukleacija, i posljedično stvaranja velikog broja vrlo sitnih kristala koji dalje ne rastu. Kod nižih koncentracija PEG-a nije došlo do pojave kristala. U svim otopinama koje su sadržavale koncentracije KSCN više od 0,3 M došlo je do pojave gustih amorfnih precipitata, što također ukazuje na prebrz postizanje prezasićenja. Kristali dobiveni tijekom prvog kristalizacijskog eksperimenta pokazali su se stabilnima kroz duži vremenski period. O kvaliteti dobivenih kristala za difrakcijski eksperiment znati će se više nakon što budu testirani sinkrotronskim zračenjem.

5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada konstruiran je vektor za ekspresiju proteina CrdB u fuziji s proteinom SUMO. Fuzijski protein SUMO-CrdB eksprimiran je u stanicama *E. coli* ekspresijskog soja BL21(DE3) pri 37 °C i 18 °C. Fuzija s proteinom SUMO nije omogućila topljivost proteina CrdB, pa je fuzijski protein pročišćen afinitetnom kromatografijom u denaturirajućim uvjetima te naknadno renaturiran na koloni. Renaturacija je provjerena kombinacijom metoda kružnog dikroizma i razlikovne skenirajuće mikrokolorimetrije. Analizom rezultata dobivenih metodom kružnog dikroizma dobivene su i informacije o sekundarnoj strukturi. Pokazano je da među motivima sekundarne strukture kod fuzijskog proteina SUMO-CrdB prevladavaju β -ploče (30,7 %) i β -okreti (21,4 %). Razlikovnom skenirajućom mikrokolorimetrijom određena je temperatura taljenja fuzijskog proteina nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom, $T_m = 70,83$ °C. Pokušaj dodatnog pročišćavanja fuzijskog proteina kromatografijom isključenjem nije bio uspješan, i zahtjeva daljnju optimizaciju.

U svrhu određivanja uvjeta kristalizacije proteina HP1026 korištena je metoda difuzije iz viseće kapi. Prvi je kristalizacijski eksperiment rezultirao pojavom mikrokristala nakon 5 dana u kapljici u kojoj je otopina proteina bila pomiješana s otopinom precipitanata koja je sadržavala: 0,1 M bis-tris propan (pH = 8,5), 20% (w/v) PEG 6000, 0,2 M KSCN te 0,1 M MgCl₂. Dobiveni mikrokristali pokazali su se stabilnima kroz dulji vremenski period. Na temelju rezultata dobivenih tijekom prve kristalizacije, postavljen je drugi kristalizacijski eksperiment variranjem koncentracije PEG-a i soli, u svrhu dobivanja većih i kvalitetnijih kristala. Kristali heksagonalnog oblika ponovno su se pojavili nakon 5 dana, u nekoliko postavljenih uvjeta, pri čemu su najveći nastali pri miješanju otopine proteina s otopinom precipitanata istog sastava kao u prvom kristalizacijskom eksperimentu, te s otopinom koja je sadržavala nešto višu koncentraciju kalijevog tiocijanata (0,3 M). Kvaliteta dobivenih kristala odnosno sposobnost difrakcije biti će ispitana sinkrotronskim zračenjem.

6. LITERATURA

1. Haley K. P., Gaddy J. A. (2015): Metalloregulation of *Helicobacter pylori* physiology and pathogenesis. *Front. Microbiol.* **6**: 911.
2. Spohn G., Danielli A., Roncarati D., Delany I., Rappuoli R., Scarlato V. (2004): Dual Control of *Helicobacter pylori* Heat Shock Gene Transcription by HspR and HrcA. *J. Bacteriol.* **186**(10): 2956 - 2965.
3. Marshall D. G., Dundon W. G., Beesley S. M., Smyth C. J. (1998): *Helicobacter pylori* - a conundrum of genetic diversity. *Microbiology* **144**: 2925-2939.
4. URL: <http://www.uniprot.org/proteomes/UP000008198>, 11.08.2017.
5. Yoshiyama H., Nakazawa T. (2000): Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect.* **2**(1): 55-60.
6. Waidner B., Melchers K., Ivanov I., Loferer H., Bensch K. W., Kist M., Bereswill S. (2002): Identification by RNA profiling and mutational analysis of the novel Copper Resistance Determinands CrdA (HP1326), CrdB (HP1327) and CzcB (HP1328) in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **184**: 6700-6708.
7. Roncarati D., Danielli A., Scarlato V. (2011): CbpA Acts as a Modulator of HspR Repressor DNA Binding Activity in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **139**(20): 5629-5623.
8. Danielli A., Amore G., Scarlato V. (2010): Built Shallow to Maintain Homeostasis and Persistent Infection: Insight into the Transcriptional Regulatory Network of the Gastric Human Pathogen *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog.* **6**(6):e1000938.
9. URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/O25670>, 05.08.2017.
10. Snider J., Thibault G., Houry W. A. (2008): The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biol.* **9**:216.1-216.8.
11. Kekez I. (2016): Structural characterization of *Helicobacter pylori* proteins required for survival of the bacterium (Doctoral dissertation). Croatian Scientific Bibliography (Bibliographic record number: 830648).
12. Panavas T., Sanders C., Butt T. R. (2009): SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Methods Mol. Biol.* **497**: 303-317.
13. *Lucigen* User Manual: Expresso T7 SUMO Cloning and Expression System (2016)
14. McPherson M. J., Moller S. G. (2006): PCR - Second Edition. Tylor & Francis Group, New York.

15. Ristov A. A., Brozović A., Mađarić B. B., Četković H., Hranilović D., Herak Bosnar M., Katušić Hećimović S., Meštrović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (2007): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
16. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0312>, 11.09.2017.
17. *Sigma Aldrich* User Manual: GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (2014)
18. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
19. Thermo Scientific: Cell Lysis Technical Handbook (Version 2) (2009)
20. URL: <http://www.bio-rad.com/en-jp/sku/1610363-precision-plus-protein-unstained-protein-standards-strep-tagged-recombinant-1-ml>, 11.09.2017.
21. *GE Healthcare*: Recombinant Protein Purification Handbook, Principles and Methods (2000)
22. *GE Healthcare*: Size Exclusion Chromatography, Principles and Methods (2000)
23. Kelly S. M., Jess T. J., Pierce N. C. (2005): How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* **1751**(2): 119-39.
24. van Holde K. E. (2006): Principles of Physical Biochemistry, 2. izdanje. Pearson Prentice Hall, New Jersey.
25. Whitmore L., Wallace B.A. (2008): Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and Reference Databases. *Biopolymers* **89**: 392-400.
26. McPherson A. (2009): Introduction to Macromolecular Crystallography, 2. izdanje. Wiley-Blackwell, New Jersey.
27. Drenth J. (2007): Principles of Protein X-Ray Crystallography, 3. izdanje. Springer, New York.
28. Juncker A. S., Willenbrock H., von Heijne G., Nielsen H., Brunak S., Krogh A. (2003): Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* **12**(8): 1652-62.
29. Sreerema N., Woody, R.W. (1993): A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* **209**: 32-44.
30. Singh S. M., Kumar Panda A. (2004): Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *J Biosci Bioeng.* **99**(4): 303-310.
31. Kubeck J., Block H., Maertens B., Spiersterbach A., Labahn J. (2014): Expression and Purification of Membrane Proteins. *Methods Enzymol.* **541**: 117-140.

32. Rinas U., Garcia-Fruitos E., Corchero J. L., Vazquez E., Seran-Franzoso J., Villaverde A. (2017): Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half. *Trends Biochem Sci.* S0968-0004(17): 30026-9.
33. Otzen D. E., Andersen K. K. (2012): Folding of outer membrane proteins. *Arch Biochem Biophys.* **531**(1-2): 34-43.

7. PRILOG

I. Sravnavanje sekvence gena *crdB* bakterije *H. pylori* soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću *SUMO Forward* početnice.

II. Sravnavanje sekvence gena *crdB* bakterije *H. pylori* soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću *pETite Reverse* početnice.

170424-073_C08_1_2_SUMO_Forward_Primer.ab1

Sequence ID: Query_23473 Length: 1474 Number of Matches: 1
Range 1: 53 to 1183

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
2015 bits(1091)	0.0()	1131/1147(99%)	16/1147(1%)	Plus/Plus	
Features:					
Query 1	AAAGATTTAGAGATCCAATCTTTTGTGGCTAAATACCTTTCTaaaaatcaaaaaTACAA	60			
Sbjct 53	AAAGATTTAGAGATCCAATCTTTTGTGGCTAAATACCTTTCTAAAAATCAAAAAATACAA	112			
Query 61	GCCCTACAAGAGCAAAATGACGCTTTAAATCTCAAGAAAAAGCCGTAGCAAAATGGGAT	120			
Sbjct 113	GCCCTACAAGAGCAAAATGACGCTTTAAATCTCAAGAAAAAGCCGTAGCAAAATGGGAT	172			
Query 121	AACCCCTATTTGTATTTAGGCTATAACAACGCTAACGTGAGCGATTTTTCAGACTGGAT	180			
Sbjct 173	AACCCCTATTTGTATTTAGGCTATAACAACGCTAACGTGAGCGATTTTTCAGACTGGAT	232			
Query 181	AGCACCTTAATGCAAAACATGAGCTTTGGGTTGTCTCAAAAAGTGGATTAAATGGTAAA	240			
Sbjct 233	AGCACCTTAATGCAAAACATGAGCTTTGGGTTGTCTCAAAAAGTGGATTAAATGGTAAA	292			
Query 241	AAACTCACGCAATCTAAAAATGATCCATCTAGaaaaacaaaaaaGATTTAGAGCTTaaa	300			
Sbjct 293	AAACTCACGCAATCTAAAAATGATCCATCTAGAAAAACAAAAAAGATTTAGAGCTTAAA	352			
Query 301	aaaaCCAAGCAGCAATAGCGATCAATTAATGATAAATGGCATTGAAAAATATAAAAAAC	360			
Sbjct 353	AAAAACCAAGCAGCAATAGCGATCAATTAATGATAAATGGCATTGAAAAATATAAAAAAC	412			
Query 361	CAACAAGAAATAGAGCTTTTAAACACAGCGATTAAAAATAGAAAAACACCTTTATCAA	420			
Sbjct 413	CAACAAGAAATAGAGCTTTTAAACACAGCGATTAAAAATAGAAAAACACCTTTATCAA	472			
Query 421	GCCCAACCATTCAGTTCGCCCGATTAAATAGCGATCGCCCAAGCTAGAAAAATTAATTCG	480			
Sbjct 473	GCCCAACCATTCAGTTCGCCCGATTAAATAGCGATCGCCCAAGCTAGAAAAATTAATTCG	532			
Query 481	CAATTAGAAATCAaaaaaaCAATTTAGAAAGAAACACTATCTGGTAGCCACTATTCATG	540			
Sbjct 533	CAATTAGAAATCAAAAAAACAATTTAGAAAGAAACACTATCTGGTAGCCACTATTCATG	592			
Query 541	GGCGAATTGACTTTTAAAGGAAAAACGAGCTTTTAAAGCATTGCCCTTAAAAATTTGAAT	600			
Sbjct 593	GGCGAATTGACTTTTAAAGGAAAAACGAGCTTTTAAAGCATTGCCCTTAAAAATTTGAAT	652			
Query 601	AATAAGGAGCAAGAGCTGTATAACATTAGCGCCACCAATTACGATATTGCGATCGCTAGG	660			
Sbjct 653	AATAAGGAGCAAGAGCTGTATAACATTAGCGCCACCAATTACGATATTGCGATCGCTAGG	712			
Query 661	CTTGATGAAGAAAAAGCGCAAAAAAGACATCACCTTTGGCCaaaaaaAGCTTTTAAAGGAC	720			
Sbjct 713	CTTGATGAAGAAAAAGCGCAAAAAAGACATCACCTTTGGCCAAAAAAGCTTTTAAAGGAC	772			
Query 721	GTGAATGTTACCGGGGTGTATTATTTCCGCTCCAAACAATACTACAACTACGACATGTT	780			
Sbjct 773	GTGAATGTTACCGGGGTGTATTATTTCCGCTCCAAACAATACTACAACTACGACATGTT	832			
Query 781	AGTATCGCTTTGTCTATCCCCCTACCCCTTTATGGCAAGCAGGCTAAATAGTGGAGCAG	840			
Sbjct 833	AGTATCGCTTTGTCTATCCCCCTACCCCTTTATGGCAAGCAGGCTAAATAGTGGAGCAG	892			
Query 841	aagaaaaaaagaagcttgggttttaaaagcgaagtggaaaaacactaaaaacaaaaccac	900			
Sbjct 893	AAAGAAAAAGAAAGCTTGGTGTTTAAAGCGAAAGTGGAACAACACTAAAAACAAAAACCCAC	952			
Query 901	cacctggccctaaaactccttaaaaaattagaaaccttgcaaaaaaacctGGAAAGCGATC	960			
Sbjct 953	CACCTGGCCCTAAAACCTCTTAAAAAATTAGAAACCTTGC-AAAAAACCTGGAAAGCGATC	1011			
Query 961	AATAAAATCATCAAAACAGAAATGAAAAATCGCGCAAAATATGCGTTGGATTGAAATCT	1020			
Sbjct 1012	-ATAAAATCATCAAAACAGAAATGAAAAA-TCGCGC-AATTTATGCGTTGGATTG-AATCT	1067			
Query 1021	AATGGCGATTACAAACGCTTATTACAAACGCTTTTAAACGACAAAATCACCATTCAAAATCACC	1080			
Sbjct 1068	AATGGCGATTAAACGCTTATT-CAACGCTTTTAAACGACAAA-TCACCATTCAATCACC	1122			
Query 1081	CAGCTTGAACCTTAAGCGCTCTAAATAGCGCTTATTTGCTTTACAAAAACCTTAAAGGA	1140			
Sbjct 1123	CAGCTTGAACCTTAAGCGCTCTAAATAGCGCTTATTTGCTTTAC-AAAACCTTAAAGGA	1177			
Query 1141	TTAGAAAT	1147			
Sbjct 1178	TTA-AAT	1183			

Slika I. Sravnavanje sekvence gena *crdB* bakterije *H. pylori* soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću *SUMO Forward* početnice.^[18]

170424-073_E08_1_2_pETite_Reverse_Primer.ab1
Sequence ID: Query_45941 Length: 1436 Number of Matches: 1
Range 1: 41 to 1187

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
2097 bits(1135)	0.0()	1143/1147(99%)	0/1147(0%)	Plus/Minus	
Features:					
Query 1	AAAGATTAGAGATCCAATCTTTTGTGGCTAAATACCTTTCTaaaaatcaaaaaTACAA	60			
Sbjct 1187	AAAGATTAGGGATCCAATCTTTTGGGGCTAAATCCCTTTCTAAAAATCAAAAAATCCAA	1128			
Query 61	GCCCTACAAGAGCAAAATGACGCTTTAAATTTCTCAAGAAAAAGCCGTAGCAAAATGGGAT	120			
Sbjct 1127	GCCCTACAAGAGCAAAATGACGCTTTAAATTTCTCAAGAAAAAGCCGTAGCAAAATGGGAT	1068			
Query 121	AACCTATTTTGTATTAGGCTATAACAACGCTAACGTGAGCGATTTTTTCAGACTGGAT	180			
Sbjct 1067	AACCTATTTTGTATTAGGCTATAACAACGCTAACGTGAGCGATTTTTTCAGACTGGAT	1008			
Query 181	AGCACCTTAATGCAAAACATGAGCTTGGGTGTCTCAAAAAGTGGATTTAAATGGTAAA	240			
Sbjct 1007	AGCACCTTAATGCAAAACATGAGCTTGGGTGTCTCAAAAAGTGGATTTAAATGGTAAA	948			
Query 241	AAACTCAGCAATCTAAAAATGATCCATCTAGaaaaacaaaaaaGATATTAGAGCTTaaa	300			
Sbjct 947	AAACTCAGCAATCTAAAAATGATCCATCTAGAAAAACAAAAAAGATATTAGAGCTTAAA	888			
Query 301	aaaaCCAAGCAGCAATAGCGATCAATTTAATGATAAATGGCATTGAAAAATTAAAAAAC	360			
Sbjct 887	AAAACCAAGCAGCAATAGCGATCAATTTAATGATAAATGGCATTGAAAAATTAAAAAAC	828			
Query 361	CAACAAGAAATAGAGCTTTTAAACACAGCGATTAAAAATTTAGAAAAACCCCTTTATCAA	420			
Sbjct 827	CAACAAGAAATAGAGCTTTTAAACACAGCGATTAAAAATTTAGAAAAACCCCTTTATCAA	768			
Query 421	GCCAAACCATTCAGTTGCGCCGATTAAATAGCGATCGCCAAGCTAGAAAAATTTAAATCG	480			
Sbjct 767	GCCAAACCATTCAGTTGCGCCGATTAAATAGCGATCGCCAAGCTAGAAAAATTTAAATCG	708			
Query 481	CAATTAGAAATCAaaaaaaaCAATTTAGAAAGAGCACTATCTGGTAGCCACTATTCATG	540			
Sbjct 707	CAATTAGAAATCAAAAAAACCAATTTAGAAAGAGCACTATCTGGTAGCCACTATTCATG	648			
Query 541	GGCGAATTGACTTTTAAAGAAAAACGAGCTTTTAAAGCATTGCCCTAAAAATTTGAAAT	600			
Sbjct 647	GGCGAATTGACTTTTAAAGAAAAACGAGCTTTTAAAGCATTGCCCTAAAAATTTGAAAT	588			
Query 601	AATAAGGAGCAAGAGCTGTATAACATTAGCGCCACCAATTACGATATTGCGATCGCTAGG	660			
Sbjct 587	AATAAGGAGCAAGAGCTGTATAACATTAGCGCCACCAATTACGATATTGCGATCGCTAGG	528			
Query 661	CTTGATGAAGAAAAAGCGCAAAAAGACATCACTTTGGCCaaaaaaGCTTTTGAAGAGC	720			
Sbjct 527	CTTGATGAAGAAAAAGCGCAAAAAGACATCACTTTGGCCAAAAAAGCTTTTGAAGAGC	468			
Query 721	GTGAATGTTACCGGGGTGTATTATTTCCGCTCCAAACCAATCTACAACACGACATGTT	780			
Sbjct 467	GTGAATGTTACCGGGGTGTATTATTTCCGCTCCAAACCAATCTACAACACGACATGTT	408			
Query 781	AGTATCGCTTTGTCTATCCCCTTACCCCTTTATGGCAAGCAGGCTAAATTAGTGGAGCAG	840			
Sbjct 407	AGTATCGCTTTGTCTATCCCCTTACCCCTTTATGGCAAGCAGGCTAAATTAGTGGAGCAG	348			
Query 841	aagaaaaaagaaagcttggtgtttaaaagcgaagtggaaaacactaaaaacaaaacccac	900			
Sbjct 347	AAGAAAAAGAAAGCTTGGTGTTTAAAGCGAAGTGGAAAACTAAAAACAAAAACCAAC	288			
Query 901	cacctggccctaaaaactccttaaaaaattagaaccttgcaaaaaaacctggaaagcgatc	960			
Sbjct 287	CACCTGGCCCTAAAACTCCTTAAAAAATTAGAAACCTTGCAAAAAAACCTGGAAGCGATC	228			
Query 961	AATAAAATCATCAAAACAGAAATGAAAAAATCGCGCAAAATTTATGCGTTGGATTTGAAATCT	1020			
Sbjct 227	AATAAAATCATCAAAACAGAAATGAAAAAATCGCGCAAAATTTATGCGTTGGATTTGAAATCT	168			
Query 1021	AATGGCGATTACAACGCTTATTACAACGCTTTTAAAGACAAAAATCACCATTCAAAATCACC	1080			
Sbjct 167	AATGGCGATTACAACGCTTATTACAACGCTTTTAAAGACAAAAATCACCATTCAAAATCACC	108			
Query 1081	CAGCTTGAAACCTTAAGCGCTCTAAATAGCGCTTATTGTCTTTACAAAACCTTAAAGGA	1140			
Sbjct 107	CAGCTTGAAACCTTAAGCGCTCTAAATAGCGCTTATTGTCTTTACAAAACCTTAAAGGA	48			
Query 1141	TTAGAAAT	1147			
Sbjct 47	TTAGAAAT	41			

Slika II. Sraňavanje sekvence gena *crdB* bakterije *H. pylori* soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću *pETite Reverse* početnice.^[18]

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 22. studenog 1993. u Zagrebu. Pohađala sam V. Gimnaziju u Zagrebu i maturirala 2012. godine s odličnim uspjehom. Iste godine upisujem preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Titulu prvostupnika stekla sam 2015. godine s temom "Transport glikoproteina u kloroplaste". Nakon završenog preddiplomskog studija odrađujem stručnu praksu u Istraživačkom centru Jülich u Njemačkoj, u području proteinske kristalografije, te upisujem diplomski studij molekularne biologije na PMF-u. U akademskoj godini 2016./2017. provodim jedan semestar na Sveučilištu Južne Češke u Českim Budějovicama u sklopu međunarodnog programa razmjene studenata Erasmus+. Po povratku sa studentske razmjene počinjem s izradom diplomskog rada pod vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Matković - Čalogović.