Pojačana ekspresija, pročišćavanje i kristalizacija proteina CrdA te optimizacija kristalizacije proteina HP1026 iz bakterije Helicobacter pylori

Matković, Vigor

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:729721

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Vigor Matković

POJAČANA EKSPRESIJA, PROČIŠĆAVANJE I KRISTALIZACIJA PROTEINA CrdA TE OPTIMIZACIJA KRISTALIZACIJE PROTEINA HP1026 IZ BAKTERIJE *Helicobacter pylori*

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra kemije

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za opću i anorgansku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Dubravke Matković-Čalogović i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Ivane Kekez.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Esencijalni metalni ioni u proteinima iz *Helicobacter pylori* i modelnim spojevima – struktura i funkcija/svojstvo (IP-2014-09-4274).

Zahvale

Dragi čitaoče, obraćam ti se upravo sa Ti, jer pretpostavljam da ćeš nakon čitanja ovog rada, postati blizak sa mnom, mojim problemima i rješenjima problema u ovom diplomskom radu. Kako vrijeme prolazi i pisanje diplomskog rada dolazi pri kraju, nostalgija raste, a i vrijeme je za napisati kome se sve to zahvaljujem.

Zaista, najviše se zahvaljujem mojoj mentorici prof. dr. sc. Dubravki Matković-Čalogović, koja mi je od samog početka rada ovog diplomskog rada bila osoba u koju sam se u bilo koji trenutak mogao pouzdati, uvijek raspraviti svoje probleme vezane uz eksperimentalni rad te bilo kakve ljudske opće, normalne probleme. Hvala Vam što ste me zarazili ljepotom proteinskih kristala, naučili me razmišljati o znanosti na jednostavan, ugodan te ispravan način, prepun korisnih savjeta iz iskustva te što ste mi omogućili da se bavim područjem kojeg volim i naučili me proteinskoj kristalizaciji te kristalografiji. Hvala vam na mogućnosti i radu na sinkrotronu koje je bilo toliko pozitivno iskustvo koje neću nikada zaboraviti. Hvala Kristini i Darku, što su mi uvijek pomogli tražiti kemikalije i bili uvijek osobe za razgovor i spremne odgovoriti mi na svakakva pitanja. Pinot sivi (onaj posebni) i muškat, stižu poštom. Hvala i docentu Điloviću, na svoj pomoći i uvijek dobrodošlim savjetima iz iskustva i kreiranju uvijek dobre atmosfere, pogotovo u Elettri. Veliko hvala ide i meni najdražoj tehničarki, Ireni, koja je uvijek bila spremna mi pomoći i ispuniti bilo kakve moje želje. Obećajem da ću do svog odlaska vratiti suđe koje sam posudio i javiti se kad dođem u Zagreb. Hvala na maloj čaši od 10 mL i na ugodnoj atmosferi, pozitivi i spremnosti na razgovor, uvijek. Želim se ovom prilikom zahvaliti mom matičnom Zavodu za opću i anorgansku kemiju. Zaista ste pravi i najbolji. Posebno se još zahvaljujem svima u metodici i kristalografskom dijelu. Veliko hvala ide i Mariju S., koji je atmosferu u proteinskom labosu činio uvijek pozitivnom. Hvala na svoj pomoći, savjetima i uskakanju dok sam bio na ručku ili spavao. Također se ovdje moram zahvaliti i drugom biokemijskom Mariju, Mariju K., hvala vam na darovanom mi optimizmu i spremnosti da mi bez ikakvog stresa objasnite i naučite me eksperimentalno raditi biokemiju. Hvala na markerima i odvoženim gelovima. Ovdje se moram zahvaliti i mojoj neposrednoj voditeljici, Ivani, koja je u zadnjim dva mjeseca još samo dodatno pojačala moj optimizam i dijelila trenutke, gledajući sa mnom kristale i odgovarajući na sva moja pitanja. Obećajem, pisat ću detaljan dnevnik rada i uvijek zapisivati hitove sa kristalima u bilježnicu. CrdA će kristalizirati, mora. Također se moram zahvaliti Zavodu za biokemiju, bez čijih instrumenata ne bih mogao

napraviti ovaj diplomski rad. Zahvaljujem se svim inspirirajućim profesorima Kemijskog odsjeka od kojih sam imao prilike neku novu stvar naučiti, neki novi problem riješiti i neko novo saznanje otkriti. Tijekom pet godina studija, upoznao sam mnogo ljudi koji su dijelili studentske probleme sa mnom na godini, stoga je vrijeme i da zahvalim ljudima koje smatram prijateljima. Hvala Ani V., što je bila spremna poslušati sve moje kristalografske probleme i bila uvijek od pomoći savjetima; Katarini Z., što je jednostavna i iskrena osoba, uvijek spremna za razgovore o svakakvim temama. Obećajem, neću ti spoilat zadnju sezonu, GOT-a. Hvala Nini Č., na uvijek zanimljivim razgovorima i frizbi igrama. Vedranu, hvala, za uvijek spremno rješavanje bilo kakvih mojih problema vezanih uz gradivo, hvala na statistici i kristalografiji, i vječitim raspravama oko zaista svih mogućih tema, pa i banalnih. Moram se zahvaliti i Kristin B., koja mi je bila od pomoći od prvog dana faksa, doslovce. Zaista veliko hvala ide i Mariji C. (čitaj: em si), bez čije pomoći i bilježnica ne bih nikad završio ovaj studij. Hvala ide i svim ostalim prijateljima koje ne stignem ovdje spomenuti, a svi su oni ugradili svoje fragmente u moj uspjeh, zato vam svima hvala na tome što ste mi pomogli i što sam imao privilegiju s vama raditi, dijeliti studentski život i od vas učiti. Također veliko hvala ide i ljudima koji su posijali sjeme radosti kemije i znanosti u meni, stoga hvala mojim profesorima K. Seki, na prvom kemijskom pokusu kojem me zarazila kemiju, I. Berbiću, što me naučio da masa i težina nije isto i dao mi da napravim prvo znanstveno mjerenje, te I. Kuvačić koja me je zarazila biokemijom i pokazala mi kakav prirodoslovac, čovjek treba biti.

Najveće HVALA ide mojoj užoj i široj obitelji, koji su cijeli moj život sa mnom. Čuvaju mi leđa i ispunjavaju sve moje želje, često žrtvujući vlastito vrijeme, na dobrobit mene. Hvala vam na svim vožnjama do Muzičke i vječite rute Opatija – bazen Kantrida. Hvala vam što vjerujete u mene i što uvijek stojite iza mene u dobru i zlu, u tužnim trenucima i onim puno češćim, radosnim i veselim trenucima. Privilegij jest imati vas. Postoje dvoje ljudi kojima ne postoje dovoljne riječi kojima biste se izrazili, a da kažete najveće hvala. Ipak, potrudit ću se to i napisati. Hvala vam što ste od prvog dana mog života sa mnom, što brinete o meni, i što ste uvijek u misiji kako meni pomoći, kako ispuniti moje najveće želje i snove. Moj uspjeh je uvijek bio i bit će izgrađen iz fragmenata mudrosti, poštenja i radosti kojeg ste me čitavi život učili i ustrajali u tim osnovnim ljudskim osobinama. Stoga ovaj diplomski rad posvećujem vama, mojim roditeljima, koji su tijekom ovih pet godina, svaki moj ispit proživljavali. Uspjeli smo, svih 53 kolegija je ovim činom položeno. Hvala i tebi dragi čitaoče, što si ustrajao do kraja zahvale, a sada uroni u moje misli i uživaj u proteinima i kristalima proteina.

„I always did just what I wanted to do“

Leo Henryk Sternbach

(Opatija, 1908. – Chapell Hill, 2005.)

Sadržaj

SAŽETAK ..... **XIII**

ABSTRACT ..... **XV**

§ 1. UVOD **1**

§ 2. LITERATURNI PREGLED **3**

2.1. *Helicobacter pylori* **3**

2.2.* Homeostaza metalnih iona u *Helicobacter pylori **5**

2.2.1. Ureaza *6*

2.3.* Homeostaza bakrovih iona u *Helicobacter pylori **7**

2.4.* Protein CrdA iz bakterije *Helicobacter pylori **9**

2.5.* Proteini toplinskog šoka iz *Helicobacter pylori **10**

2.5.1. Protein HP1026 iz Helicobacter pylori *11*

2.6. Proteinska kristalografija **12**

2.6.1. „Marš" strukturne biologije *12*

2.6.2. Kristalizacija proteina *14*

2.6.3. Fizikalna osnova kristalizacije proteina *15*

2.6.4. Metode kristalizacije proteina *17*

2.6.5. Selekcija kristala i priprema za snimanje *19*

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **21**

3.1. Materijali **21**

3.1.1. Kemikalije *21*

3.1.2. Bakterijski sojevi *22*

3.1.3. Hranjive podloge za uzgoj bakterije E. coli *23*

3.1.4. Hranjivi mediji za uzgoj bakterija E. coli *23*

3.1.5. Plazmidi *24*

3.1.6. Instrumenti *25*

3.1.7. Komercijalni kompleti *26*

3.1.8. Boje *26*

3.1.9. Enzimi, nukleinske kiseline i nukleotidi *26*

3.1.10. Oligonukleotidi *27*

3.1.11. Markeri veličine *27*

3.1.12. Komercijalno dostupni kompleti za kristalizaciju proteina *28*

3.2. Metode rada s bakterijama **28**

3.2.1. Transformacija kemijski kompetentnih HI-Control 10G stanica E. coli za gen G-crdA(-) te GS-crdA(-) *28*

3.2.2. Transformacija ekspresijskog soja HI-Control BL21(DE3) E. coli za gen crdA(-), crdA, G-crdA(-) te GS-crdA(-) *29*

3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama **30**

3.3.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR) *30*

3.3.2. Umnažanje gena crdA lančanom reakcijom polimeraze (PCR) *30*

3.3.3. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu nakon PCR reakcije *32*

3.3.4. Kloniranje *33*

3.3.5. Izolacija PCR produkta *34*

3.3.6. Određivanje koncentracije PCR produkta *34*

3.3.7. Lančana reakcija polimeraze na kolonijama (kolonijski PCR) *34*

3.3.8. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu nakon PCR reakcije na kolonijama *36*

3.3.9. Izolacija plazmidne DNA *37*

3.3.10. Određivanje koncentracije rekombinantnog plazmida tj. plazmidne DNA *37*

3.3.11. Sekvenciranje *37*

3.3.12. Analiza nukleotidnih sljedova *37*

3.4. Metode rada s proteinima **38**

3.4.1. Prekomjerna ekspresija u T7 ekspresijskom sustavu *38*

3.4.2. Postav noćne kulture bakterijskih stanica E. coli za ekspresiju fuzijskog proteina HP1026 ..... *38*

3.4.3. Postav noćne kulture bakterijskih stanica E. coli za ekspresiju fuzijskog proteina SUMO-CrdA(-) te SUMO-CrdA *39*

3.4.4. Indukcija ekspresije fuzijskog proteina HP1026 ..... *39*

3.4.5. Indukcija ekspresije fuzijskog proteina SUMO-CrdA, SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) *40*

3.4.6. Priprema proteinskih ekstrakata SUMO-CrdA, SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) sonikacijom *40*

3.4.7. Priprema proteinskih ekstrakata fuzijskog proteina HP1026 sonikacijom *41*

3.4.8. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (engl. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) *42*

3.4.9. Pročišćavanje fuzijskog proteina HP1026 afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima (IMAC) *44*

3.4.10. Pročišćavanje fuzijskog proteina HP1026 kromatografijom isključenja (gel-filtracija) *46*

3.4.11. Pročišćavanje fuzijskog proteina SUMO-CrdA, SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima (IMAC) *46*

3.4.12. Kvantifikacija proteina *48*

3.4.13. Ugušćivanje fuzijskog proteina SUMO-CrdA, SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) te izmjena pufera *48*

3.4.14. Ugušćivanje fuzijskog proteina HP1026 ..... *49*

3.4.15. Cijepanje fuzijskog proteina SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) pomoću SUMO Express proteaze *49*

3.5. Kristalizacije proteina **51**

3.5.1. Kristalizacije fuzijskog proteina HP1026 pomoću seta aditivnih uvjeta *51*

3.5.2. Kristalizacije fuzijskog proteina SUMO-CrdA(-) pomoću setova početnih kristalizacijskih uvjeta *51*

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA **53**

4.1. Pojačana ekspresija te pročišćavanje fuzijskog proteina HP1026 ..... **53**

4.2. Kristalizacija proteina HP1026 uz pomoć aditivnih kristalizacijskih uvjeta **57**

4.3. Pojačana ekspresija, topljivost te pročišćavanje fuzijskih proteina SUMO-CrdA(+) te SUMO-CrdA(-) **61**

4.4. Cijepanje ciljnog proteina SUMO-CrdA(-) pomoću SUMO Express proteaze **66**

4.5. Kloniranje crdA te pojačana ekspresija proteina SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) **67**

4.6. Cijepanje ciljnih proteina SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) pomoću SUMO Express proteaze **71**

4.7. Određivanje uvjeta kristalizacije proteina SUMO-CrdA(-) **72**

§ 5. ZAKLJUČAK **75**

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA **77**

§ 7. LITERATURNI IZVORI **79**

§ 8. DODATAK ..... **XV**

8.1. Nukleotidni sljedovi korištenih gena ..... **xv**

8.2. Sravnjivanje sekvence gena crdA bakterije H. pylori soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću početnica ..... **xvi**

8.2.1. Sravnjivanje sekvence gena G-crdA(-) bakterije H. pylori soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću SUMO Forward početnice ..... *xvi*

8.2.2. Sravnjivanje sekvence gena G-crdA(-) bakterije H. pylori soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću pETite Reverse početnice ..... *xvii*

8.2.3. Sravnjivanje sekvence gena GS-crdA(-) bakterije H. pylori soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću SUMO Forward početnice ..... *xviii*

8.2.4. Sravnjivanje sekvence gena GS-crdA(-) bakterije H. pylori soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću pETite Reverse početnice ..... *xix*

§ 9. ŽIVOTOPIS **21**

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

POJAČANA EKSPRESIJA, PROČIŠĆAVANJE I KRISTALIZACIJA PROTEINA CrdA TE OPTIMIZACIJA KRISTALIZACIJE PROTEINA HP1026 IZ BAKTERIJE *Helicobacter pylori*

Vigor Matković

Bakterija *Helicobacter pylori* je Gram-negativna spiralna bakterija koja u čovjeku kolonizira stijenku želuca te dugoročnom infekcijom s bakterijom (pogotovo soj P12) dolazi do razvoja mnogih oboljenja gornjeg gastrointestinalnog trakta. Izvršena je pojačana ekspresija proteina HP1026 (helikaze odgovorne za rekombinantne aktivnosti) iz soja P12 *H. pylori*, pročišćavanje te kristalizacija metodom difuzije para tehnikom sjedeće kapi (engl. "*sitting drop*"). Na *XRD1* stanici sinkrotrona *„Elettra Sincrotrone Trieste“* istražena je kvaliteta 20 kristala s obzirom na difrakciju rentgenskih zraka na monokristalu. Najbolji difrakcijski podaci sakupljeni su do razlučenja od 4 Å u heksagonskom kristalnom sustavu i s parametrima jedinične ćelije od a = 116,22(2) Å, c = 238,38(2) Å. Također je predložena vrlo jednostavna i uspješna metoda kloniranja gena *crdA*, indukcije pojačane ekspresije, pročišćavanja te kristalizacije proteina CrdA iz *H. pylori* soja P12 prethodnom pripravom fuzijskog SUMO proteina. U konačnici je dobiven čist i koncentriran protein CrdA u otopini, koji se može koristiti dalje u kristalizacijskim eksperimentima.
(107 stranica, 42 slike, 21 tablica, 82 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: CrdA, HP1026, kloniranje, kristalizacija, pročišćavanje, SUMO

Mentor: prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović
Neposredni voditelj: dr. sc. Ivana Kekez
Ocjenitelji:
1. prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović
2. izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević
3. doc. dr. sc. Morana Dulić
Zamjena: doc. dr. sc. Ivica Đilović

Datum diplomskog ispita: 10. srpnja 2018.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

OVEREXPRESSION, PURIFICATION AND CRYSTALLIZATION OF CrdA PROTEIN AND OPTIMIZATION OF CRYSTALLIZATION OF HP1026 PROTEIN FROM *Helicobacter pylori*

Vigor Matković

Helicobacter pylori is a Gram-negative spiral bacterium that colonizes the stomach cells, manages long-term bacterial infections (especially strain P12) and develops many diseases of the upper gastrointestinal tract. Overexpression of HP1026 (helicase responsible for recombinant activity) protein from P12 *H. pylori* strain, purification and crystallization using the "sitting drop" technique was performed. At the *XRD1* beamline of the synchrotron *"Elettra Sincrotrone Trieste"*, the quality of 20 crystals was investigated by X-ray diffraction on single crystals. The best diffraction data obtained had the resolution of 4 Å, in the hexagonal crystal system with unit cell parameters of a = 116.22(2), c = 238.38(2) Å. A very simple and successful method of cloning the *crdA* gene by creating the SUMO fusion protein was done, followed by protein overexpression, purification and crystallization of the CrdA protein from the *H. pylori* strain P12. The obtained result was a pure and concentrated solution of the CrdA protein which can be further used in crystallization experiments.

(107 pages, 42 figures, 21 tables, 82 references, original in Croatian language)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: CrdA, cloning, crystallization, HP1026, purification, SUMO

Mentor: Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Full Professor
Assistant mentor: Dr. Ivana Kekez
Reviewers:
1. Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Full Professor
2. Dr. Sanda Rončević, Associate Professor
3. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Substitute: Dr. Ivica Đilović, Assistant Professor

Date of exam: July, 10th 2018

§ 1. UVOD

Gram-negativna bakterija *Helicobacter pylori* kolonizira stijenke želuca kod čovjeka te dugoročnom infekcijom dovodi do razvoja mnogih težih oboljenja poput adenokarcinoma želuca te limfoma mukoznog tkiva. Davne 2008. godine sekvenciran je kompletni genom *Helicobacter pylori* specifičnog soja P12, koji je pronađen i izoliran iz pacijenta iz Njemačke 1992. godine koji je imao duodenalni čir. Zaista, preživljavanje bakterije *Helicobacter pylori* u kiselom želučanom mediju fasciniralo je znanstvenike od trenutka od kad su otkrili ovakvu bakteriju, pa sve do danas. Štoviše, mehanizmi preživljavanja takve bakterije mogu se, poput svih ostalih mehanizama, svesti na nizove kemijskih reakcija koje se događaju na molekularnoj te atomskoj skali.[1]

Stoga je nužno otkrivati nove mehanizme funkcioniranja takvih bakterija te razumijeti na koji način bakterija preživljava u izrazito kiselom mediju želuca. U sklopu projekta i ovog rada istražit će se dva proteina za koje se smatra kako su jedni od odgovornih proteina za preživljavanje bakterije *H. pylori* u stijenci želuca.[2] Osnova bilo kakvih zaključaka o radu enzima zahtijeva nužno poznavanje trodimenzionalne strukture proteina, kako bi se moglo razumijeti mehanizme djelovanja takvih enzimskih proteina te posrednim putem djelovati dizajniranjem specifičnih antibiotika, važnih za suzbijanje infekcije i uklanjanje bakterije iz ljudskog organizma.

Protein HP1026 posjeduje helikazna svojstva, stoga se smatra kako omogućava brzu rekombinantnu aktivnost, nužnu bakteriji *H. pylori* za brzu i efikasnu prilagodbu genetskog materijala u svrhu preživljavanja.[3,4] U ovom diplomskom radu istražit će se i optimizirati kristalizacijski uvjeti proteina HP1026 iz bakterije *H. pylori*, a sve u cilju dobivanja većih i boljih kristala, što će omogućiti veće razlučenje difrakcijskih podataka.

Naime, dosada se, pomoću kompleta osnovnih kristalizacijskih uvjeta uspjelo dobiti kristale proteina HP1026, no rezolucija difrakcijskih podataka je bila do 7 Å, što zahtijeva daljnja istraživanja uvjeta. Neke od korištenih metoda u ovom diplomskom radu za uzgoj i pročišćavanje proteina, kao nužne osnovne polazne točke za kristalizacijske ekperimente, jesu bile metode pročišćavanja afinitetnom kromatografijom te kromatografijom isključenja.[5]

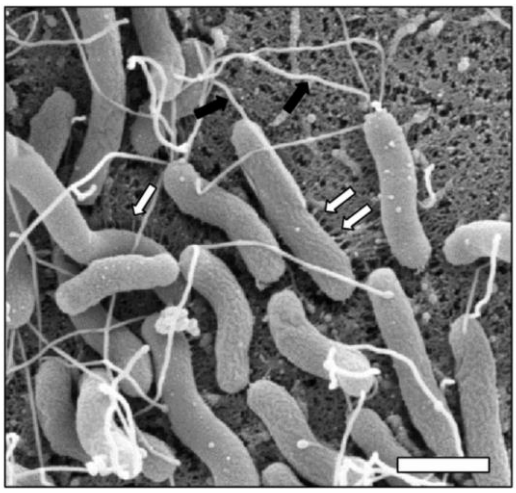
Dakako, kao rezultate takvog istraživanja, očekivalo se dobivanje kristala većih dimenzija s boljom rezolucijom difrakcijskih podataka, što posljedično vodi do konačnog cilja – rješavanja strukture proteina HP1026.

Drugi dio istraživanja diplomskog rada bavit će se proteinom CrdA. Smatra se kako protein CrdA bakteriji *H. pylori* pomaže pri regulaciji homeostaze bakrovih iona u bakterijskim stanicama.[6] Istražit će se načini indukcije pojačane ekspresije te će se, u skladu s rezultatima pojačane ekspresije proteina sa i bez signalne sekvence, odrediti put za daljnja pročišćavanja pomoću afinitetne kromatografije i, u slučaju postojanja frakcija nedovoljne čistoće, dodatnog pročišćavanja gel-filtracijom. Također će se, u slučaju potrebe, izvršiti dodatno kloniranje s prilagođenim genetskim materijalnom.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. *Helicobacter pylori*

Mnogo prijašnjih generacija znanstvenika je promatralo i opisalo postojanje bakterija na epitelnoj površini želučane stijenke te su čak i neki pokušavali predložiti vezu između takvih bakterija i gastroloških bolesti, no njihove su teze ostale nepotvrđene. Jedan od razloga je zasigurno bila svojevrsna dogma o želucu kao izrazito sterilnom organu uslijed izrazito kiselih uvjeta te nepostojanju bakterija u dotada istraženim stanicama želuca.[7,8]



Slika 1. Snimka bakterije *Helicobacter pylori* u kontaktu sa ljudskim epitelnim stanicama želuca dobivena visokorazlučujućom pretražnom elektronskom mikroskopijom. Bičevi (engl. *flagella*, označeno crnim strelicama) te cag-T4SS pile (označeno bijelim strijelicama) nalaze se na površini bakterijskih stanica i predstavljaju virulentne faktore *H. pylori*. Bičevi pomažu stanicama u prodiranju kroz mukozni sloj tkiva domaćina. Bijeli pravokutnik uvećanja prikazuje 1 μm.[9]

Otkriće bakterije *Helicobacter pylori* (slika 1) prije više od tridesetak godina predstavljalo je svojevrsni novi pogled u svijet bakterija u ljudskom organizmu. Patolog Robin Warren prvi je otkrio[10] kako postoji bakterija koja kolonizira želučano mukozno tkivo te je ona, po njemu, predstavljala direktan uzrok upale mukoznog tkiva. Grupa znanstvenika pod vodstvom Barryija Marshalla te Warrena su uspješno izolirali i uzgojili bakterijske stanice *Helicobacter pylori*,

dok je Marshall, kako bi dokazao i potvrdio svoje otkriće, odlučio popiti otopinu s bakterijskim stanicama, pritom potpuno opravdavajući se Kochovim postulatima. To je sustav postulata pomoću kojih se, znanstveno-istraživačkim radom i točno utvrđenim metodama, potvrđuje da neku bolest može uzrokovati točno određeni organizam.[11,12]

Helicobacter pylori (*H. pylori*) jest sporo rastuća Gram-negativna bakterija, veličine oko 3,5 μm x 0,5 μm (slika 1).[13,14] Mikroaerofilna je bakterija spiralnog oblika, bičasta, bez mogućnosti stvaranja spora. Po otkriću, bila je klasificirana kao *Campylobacter* (*C. pyloridis* te kasnije *C. pylori*), ali joj je već 1989. godine naziv promjenjen te pridodan novi rod *Helicobacter,* s obzirom na specifične taksonomske kriterije.[15]

Evolucijska međuigra[16] između patogenih te simbiotskih mikroorganizama i njihovih domaćina predstavlja i zahtijeva konstantan proces adaptacije bioloških vrsta. Genomi takvih mikrobioloških vrsta pokazuju takve procese prilagodbe kontinuiranim razvojem novih uvjeta prilagodbe domaćina, ali također i stjecanjem te gubitkom gena kroz horizontalni transfer gena. Ljudski patogen, bakterija *H. pylori,* kolonizira stijenku želuca gotovo pola ljudske populacije te je uzrok raznih bolesti – sve od blagog gastritisa pa do raka želuca te se smatra iznimno prilagođenim patogenom u odnosu na mali genom koji posjeduje.[17] *H. pylori* (jedan soj ili više sojeva istodobno) se obično unosi u organizam već u djetinjstvu unutarobiteljskom transmisijom te stvara cijeloživotnu infekciju u slučaju nepostojanja odgovarajućeg liječenja.[18,19]

S obzirom na izrazito visok stupanj mutacija i čestih rekombinacijskih faza, *H. pylori* predstavlja jednu od genetički najvarijabilnijih patogenih bakterija. Štoviše, svaka vrsta – domaćin posjeduje različite sojeve bakterije *Helicobacter pylori*. Grupa znanstvenika pod vodstvom prof. Linza dokazuje kako je infekcija želuca uzrokovana *H. pylori* sveprisutna u ljudskoj vrsti. Iako su različitosti sojeva *H. pylori* iz različitih geografskih prostora povezani s vrlo jasnom filogeografskom diferencijacijom, trenutak u povijesti ljudske rase kada je *Helicobacter pylori* ušla u ljudski organizam ostaje vrlo kontroverzna tema.[16]

Znanstvenici su, koristeći se genetskim sekvencama iz velikih setova podataka bakterijskih sojeva *H. pylori*, uspjeli dokazati kako genetička različitost *H. pylori* opada s geografskom udaljenosti od istočne Afrike, kolijevke ljudi. Računalne simulacije ukazuju da se, poput ljudi, *H. pylori* proširila Afrikom prije gotovo 58 000 godina. Također su utvrdili kako su suvremeni ljudi bili zaraženi spomenutom bakterijom, mnogo prije njihovih migracija iz Afrike u Europu,

što ukazuje kako je bakterija *H. pylori* bila i jest vezana uz ljudsku populaciju od samih početaka ljudske civilizacije.[20,21]

Usporedbom prvih dviju sekvenciranih genoma *H. pylori* smatralo se kako je samo oko 7 % svih gena specifično za sojeve, dok je soj izoliran iz pacijenta s želučanom atrofijom pokazao kako ima još i manje takvih gena. Kasnije studije temeljene na analizi pomoću mikročipova na velikom broju sojeva ukazale su na činjenicu kako gotovo 25 % svih gena jesu pomoćnički geni. Iako se vrlo jasno pokazalo kako je *H. pylori* neobična u svojoj genetičkoj raznolikosti, mehanizmi horizontalnog prijenosa gena koji vode ka takvoj različitosti još uvijek nisu poznati.[22,23]

Tek 2008. godine sekvenciran je kompletni genom *H. pylori* soja P12, koji je 1992. godine pronađen i izoliran iz pacijenta iz Njemačke koji je imao duodenalni čir. Genom *H. pylori* jest relativno mali[24] te sadrži manje od 1600 gena, što je malo u usporedbi s drugim prokariotskim Gram-negativnim bakterijama poput *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* te *Escherichia coli*, čiji genomi imaju više od 4000 gena.[25,26]

Prema *NCBI Genome* bazi podataka, do sada je sekvencirano gotovo 111 sojeva bakterije *Helicobacter pylori*.[27] Genom soja 26695 sadrži 1667867 parova baza te je 24 kb duži od genoma soja J99 koji sadrži 1643831 parova baza. Genom soja P12 sadrži 1684038 parova baza, 1579 gena koji kodiraju za proteine te 42 RNA gena. Genomi gotovo svih sekvenciranih sojeva sadrže otprilike jednake dužine kodirajućih sekvenci, gustoću kodirajućeg dijela, dok se vrlo vjerojatno uzrok tolike genetičke različitosti objašnjava evolucijskom potrebom *H. pylori*: prilagodbom na izrazito kisele želučane uvjete u domaćinu te također različitim prilagodbama na različite oblike imunološkog odgovora domaćina. [28-31]

2.2. Homeostaza metalnih iona u *Helicobacter pylori*

Kako bi patogena bakterija ostvarila uspješnu kolonizaciju u domaćinu, mora osjećati vrlo male promjene u okolini i biti sposobna vrlo brzo odgovoriti s promjenama u transkripcijskim profilima, što *H. pylori* čini i nije iznimka ovom pravilu. Takve promjene u okolini zasigurno uključuju niži pH karakterističan za područje želuca, promjene u dostupnosti dvovalentnih kationa, fluktuacije u osmolalnosti otopine te postojanje ljudskog (domaćinskog) imunološkog odgovora.[32]

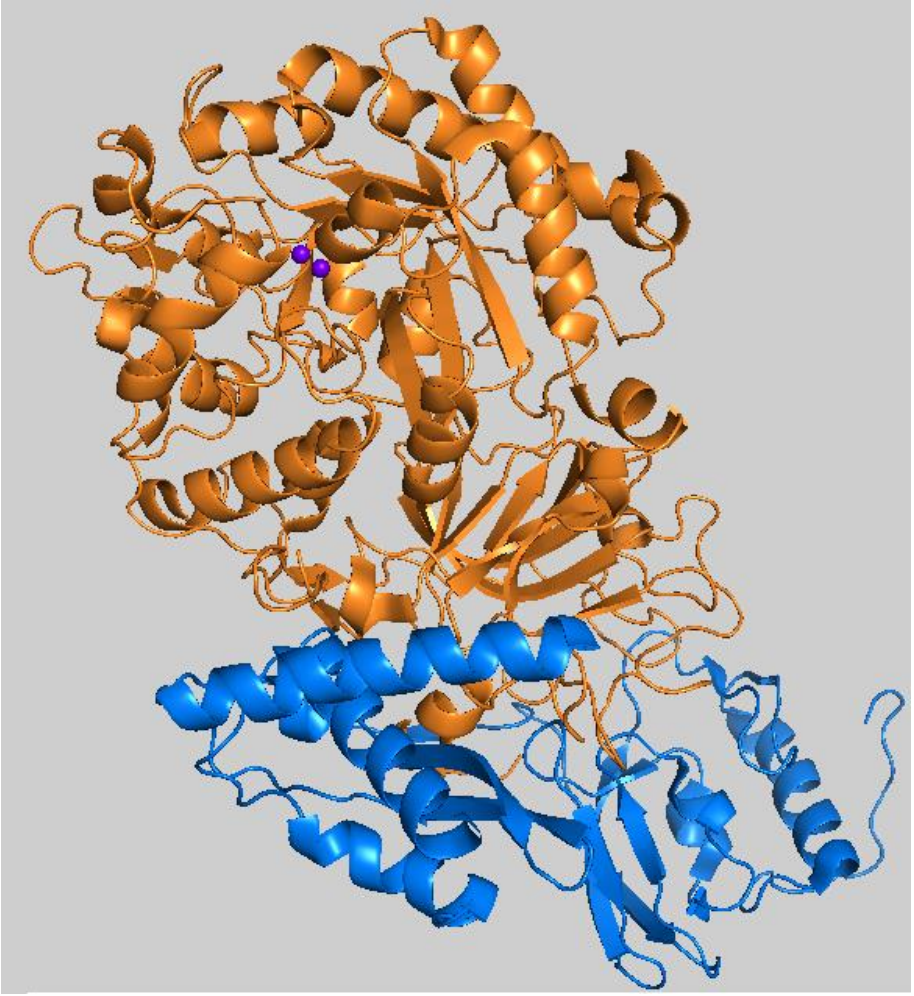
Najčešći kemijski elementi koji sudjeluju u višestrukim kemijsko–biološkim katalitičkim procesima jesu zasigurno prijelazni metali. Najčešće su u biološkim vrstama – proteinima

ugrađeni kao metalni centri te tvore metaloproteine, čineći ih pritom neophodno nužnim nutrijentima za sva živa bića. Ljudski organizam iskorištava takve činjenice u svoju korist na način da ograničava bakterijskim stanicama dovoljnu količinu metala u dinamičkom procesu zvanom nutricionalna imunost. Dokazano je kako je pristup metalima u želucu za bakteriju nevjerojatno nesiguran i varijabilan proces te se stoga smatra kako se *H. pylori* zna povremeno nalaziti u uvjetima visoke koncentracije kritičnih metala koji se korigiraju promjenama u pH okoline, što može utjecati na topljivost metala te ekspresiju metalo-vezujućih proteina poput kalgranulina te laktoferina.[33]

Najveći infekcijski potencijal *H. pylori* je izrazito ovisan o detekciji promjena u dostupnosti metala te koncentracija ostalih iona u mediju. Također je takav potencijal ovisan i o odgovoru ekspresije virulentnih faktora te o sustavu vezanja metala. Sposobnost detekcije promjene koncentracija metala u okolini, omogućava *H. pylori* pravodoban i brz odgovor na promjene u okolini, što je nužno za preživljavanje i osnovne stanične procese bakterije.[34]

2.2.1. Ureaza

Bakterija *Helicobacter pylori* preživljava u rasponu pH jedinica od 4,0 – 6,5 te to nužno uvjetuje bakterijama posjedovanje mehanizama kojima se prilagođava ekstremno kiselim uvjetima. Ureaza predstavlja enzim koji katalizira razlaganje ureje na amonijak te ugljikov(IV) oksid. Nalazi se u velikim količinama u staničnoj membrani i citoplazmi gdje obavlja iste katalitičke funkcije, no s drukčijom namjenom. Enzim se u otopini nalazi kao heksamer s dvije podjedinice (slika 2), dok se u aktivnom mjestu nalaze metalni centri nikla(II). Ureaza je jedan od onih enzima koja omogućava nastajanje baze odnosno amonijaka koji neutralizira kiselost želučanog lumena i tvori neutralno mikrookruženje u kojem djeluje, raste, razvija se i dijeli *H. pylori*. Citoplazmatska ureaza služi za obranu bakterije od kiselih uvjeta jer može povisiti pH periplazme te membranski potencijal, u suradnji s kanalom UreI, dok ureaza iz stanične membrane služi za direktno preživljavanje bakterije koja je izložena kiselim uvjetima.[35]



Slika 2. Prikaz kristalne strukture ureaze iz *H. pylori* u *cartoon* obliku (PDB ID: 1E9Z).[36] α i β podjedinice su redom obojane narančastom te plavom bojom, dok su dva niklova(II) iona prikazana sferama u ljubičastoj boji. Slika je izrađena u programskom paketu *PyMOL*.[37]

2.3. Homeostaza bakrovih iona u *Helicobacter pylori*

U kiselim uvjetima u želucu, hranom se može unijeti i otopiti gotovo više od 1 mg bakra, što ukazuje kako je bakar u lumenu želuca prisutan u mikromolarnim koncentracijama. Smatra se kako bakar jest vrlo bitna sastavnica makrofagske antimikrobiološke aktivnosti.[38]

Makrofagi iskorištavaju toksičnost bakra kako bi otrovali bakteriju pomoću fagosoma inducirajući Fenton-slične reakcije koje proizvode hidroksilne radikale. Bakterije također koriste bakrove ione kao kofaktore za oksidaze, elektron-transportne proteine te hidroksilaze. *H. pylori* kodira menakvinon-6 te cbb3 tip citokrom c oksidaze koje sadrže hemski bakrov binuklearni centar poput citokrom aa3 tip oksidaze.[39] Kod *H. pylori* najčešće terminalna oksidaza predstavlja dio lanca staničnog disanja te je stoga bakar kritičan i bitan kofaktor za

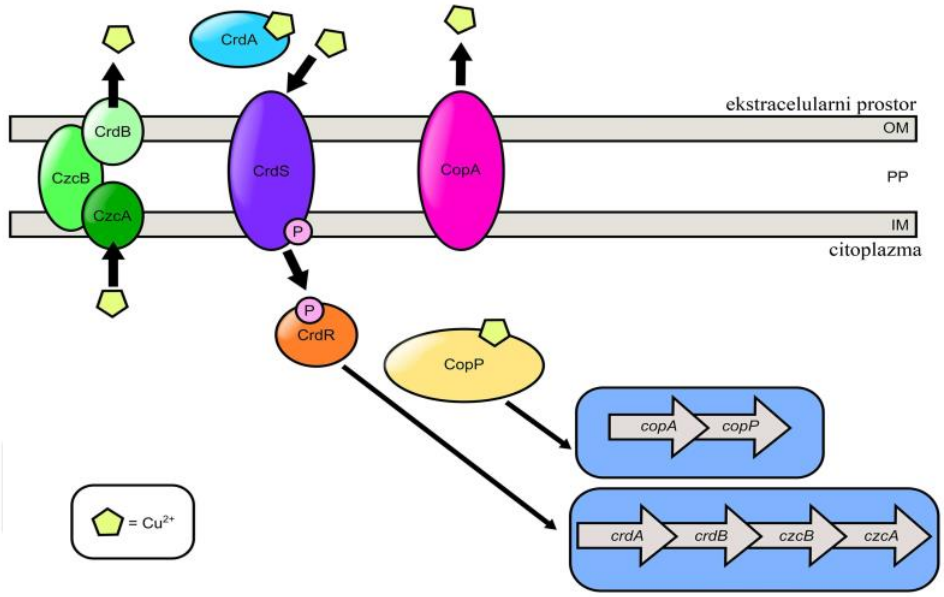
respiraciju. Bakar također omogućuje kolonizaciju *H. pylori* na mukoznoj površini te se ponaša kao kemotaktični repelant za pokretljivost bakterijskih stanica. Stoga, *H. pylori* cijelo vrijeme mora balansirati između potrebe za bakrom kao kofaktorom u staničnom disanju te s druge strane, važnosti zaštite od prevelike koncentracije bakra te posljedično takve toksičnosti za bakterijske stanice.[40]

Izlaganje *H. pylori* visokim koncentracijama bakra, uzrokuje promjenu u transkripcijskim profilima na mnogo načina. Takve se najčešće stvari događaju u uvjetima stresa u stanicama uzrokovanim promjenama u koncentracijama metalnih kemijskih vrsta. Bakar također uzrokuje promjenu transkripcije gena uključenih u nekoliko metaboličkih puteva poput nikotinat-nukleotid-pirofosforilaze, pirolin-5-karboksilat-reduktaze te triptofan-sintaze. *H. pylori* također regulira mnogo gena uključenih u homeostazu bakrovih vrsta poput *crdAB, czcAB* te *copAP* operona u staničnom odgovoru na stres uzrokovanom promjenom koncentracije bakra u stanici.[41]

Kako bi izbjegla toksičnost uzrokovanu bakrom, *H. pylori* razvila je vrlo bitne strategije mehanizama detekcije koncentracije bakra. *H. pylori* koristi *TCS crdRS* koji kodira za senzornu kinazu (CrdS) koja fosforilira pripadni regulator (CrdR) u prisutnosti bakra. CrdR inducira ekspresiju gena *crdAB* te *czcAB* koji kodiraju pripadni protein CrdA (engl. *secreted copper resistance protein*) te kompleks proteina koji se sastoji od crdB, czcB te czcA (Slika 3). *H. pylori* također koristi *copAP* operon, što kodira za citoplazmatski bakar-vezujući regulator homologan CopZ iz *E. coli* koji promovira ekspresiju CopA, proteina koji omogućava otpornost na visoke koncentracije bakra u stanici. Gledajući sve podatke zajedno, dolazi se do činjenice na koji su se to sve načine vrlo precizni molekulski mehanizmi genske regulacije u bakteriji *H. pylori* prilagodili i napredovali u odgovoru na promjenu u dostupnost bakrovih iona. [42] Štoviše, takvi regulatorni događaji ključni su za prilagodbu bakterije *H. pylori* izrazito kiselim uvjetima u želucu.[43]

2.4. Protein CrdA iz bakterije *Helicobacter pylori*

Protein HP1326 odnosno CrdA iz *H. pylori* (od engl. *copper resistance determinant*) predstavlja protein molekulske mase 13,8 kDa. U odnosu na poznate šaperone s metalnim centrima bakra, proteinska sekvenca CrdA je bogata metioninima, dok ne sadrži cisteine te histidine. S obzirom da se smatra kako je CrdA sekretorni protein, predviđa se kako je prvih dvadesetak aminokiselina – signalni peptid.[42]

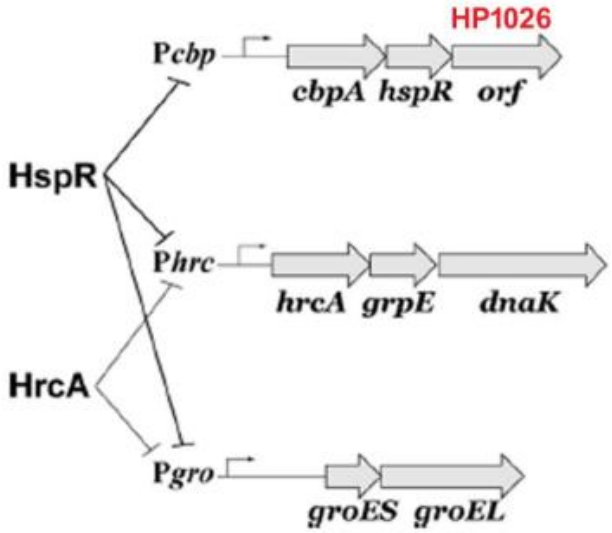


Slika 3. Modelni prikaz transporta bakra i bakar-ovisne regulacije gena u bakteriji *H. pylori*.[44]

Poznato je da postoji proteinska sekvenca poput CopC iz *Pseudomonas syringae* koja poput CrdA iz *H. pylori* sadrži identični MXXMPGMP aminokiselinski motiv. S druge strane, kristalne strukture bakar-vezujućih proteina CopC iz *P. syringae* (PDB ID: 2C9Q)[45] te iz *Methylosinus trichosporium* (PDB ID: 5ICU)[46] pokazale su kako takve klase proteina imaju zaista drukčije načine vezanja metalnih centara te mogu imati kanonska dvovezna mjesta (Cu(I) te Cu(II)) ili samo jedno vezno mjesto za atome bakra(II). S obzirom na svu dostupnu literaturu, trenutno ne postoje strukturni podaci za protein CrdA, te su jedino dostupna istraživanja temeljena na RNA profiliranju.[47]

2.5. Proteini toplinskog šoka iz *Helicobacter pylori*

Proteini termičkog šoka (engl. *heat shock proteins*, HSP) uz transkripcijske regulatorne faktore HrcA te HspR, predstavljaju važnu klasu proteina tj. faktora važnih u bakteriji *H. pylori* za vršenje infekcije i adaptacije u domaćinskom izrazito kiselom mediju.[48,49] Radi se o skupini proteina čija je osnovna zadaća zaštita bakterije od staničnog stresa za čijeg su perioda takvi proteini pojačano sintetizirani.



Slika 4. Strukturna organizacija operona toplinskog šoka i transkripcijska regulacija iz bakterije *H. pylori*. Crvenom bojom je istaknut protein HP1026 koji je dio operona reguliran od strane HspR.[45,49]

Proteini HSP su također uključeni u regulaciji aktivnosti ureaze te adheziji na stanice epitela želuca.[50,51] Gram-negativne bakterije poput *Escherichia coli* pokazuju pozitivnu regulaciju HSP pomoću specifičnih σ faktora RNA-polimeraza kojih nema u genomu *H. pylori*. Geni za proteine iz skupine HSP najčešće jesu organizirani u tri multicistronska operona, dok su transkripcijski kontrolirani pomoću tri uzvodna promotora (P*gro*, P*hrc*, P*cbp*). Također se dokazalo kako je u slučaju uvjeta normalnog rasta stanica nužno da proteini HrcA te HspR vrše represiju trankripcije s promotora P*gro* te P*cpb*. Takvo nešto mogu činiti kooperativno i/ili nezavisno jedan o drugome.[52] Kada je *H. pylori* izložena toplinskom šoku, represija je blokirana te transkripcija proteina toplinskog šoka može započeti.

2.5.1. Protein HP1026 iz Helicobacter pylori

HP1026 protein nastaje transkripcijom gena *hp1026* koji je u operonu s promotorom toplinskog šoka P*cbp* i pripadnog represora HspR te kasnijom translacijom pripadne mRNA na ribosomu (slika 4). Također se u istom operonu nalaze i ostala dva gena *cbpA* te *hspR* koji su locirani uzvodno od gena *hp1026* te su regulirani istim promotorom te represorm. Poznato je da gen *hspR* kodira za negativne regulatore P*gro,* P*cbp* te P*hrc* promotore, dok je gen *cbpA* odgovoran za sintezu šaperona koji inače u stanici služe za pomoć prilikom smatanja i vezanja zakrivljene molekule DNA u bakteriji.[53]

Kada govorimo o proteinu HP1026, radi se o strukturno još uvijek nepoznatom i neopisanom proteinu. Prema *UniProt*-u (proteinska baza podataka, od engl. *Universal Protein resource*) (referentni broj O25670)[54] radi se o konzerviranom hipotetskom helikazi-sličnom proteinu, molekulske mase 43,793 kDa. Na temelju aminokiselinskog slijeda proteina te *UniProt* baze, radi se o proteinu koji najvjerojatnije veže molekule DNA, ima helikaznu aktivnost te može biti uključen u replikaciju, rekombinaciju i/ili popravak DNA.[55] Također je istraživanjima dokazano kako se protein HP1026 u otopini nalazi u obliku dimera te posjeduje ATPaznu aktivnost.[47] Općenito govoreći, helikaze u *H. pylori* su proteini koji su inače strukturno vrlo slabo okarakterizirani te je dosada riješeno vrlo malo kristalnih struktura takvih proteina. Radi se o proteinima DnaB, dodekamernom replikativnoj helikazi (PDB ID: 4ZC0)[56] te helikaza vezujućoj domeni DnaG proteina (PDB ID: 4EHS).[57] Protein HP1026 nalazi se u kategoriji AAA+ superobitelji ATPaza (od engl. *ATPases associated with diverse cellular activities*). Radi se o velikoj i vrlo različitoj superobitelji proteina pronađenih u svim organizmima. Takvi se proteini specifično udružuju u heksamerne prstenaste komplekse koji su kasnije uključeni u energijski ovisna remodeliranja bioloških makromolekula. Članovi AAA+ superobitelji sadrže visoko očuvani ATPazni dio proteina s 200-250 aminokiselina.[58]
Proteini AAA+ su uključeni u mnoge procese te imaju širok spektar funkcija u kojem se energija hidrolize ATP-a koristi u procesima remodelacije. Također su uključeni u procesima razmatanja i razgradnje proteina, biogeneze peroksisoma, biosinteze bakterioklorofila te rekombinacije DNA, popravka te replikacije. AAA+ proteini uključuju i molekularne mašine poput dineina, helikaze korištene u replikaciji DNA, metalne kelataze te proteine vezane s proteazom. S obzirom na veoma široku primjenu, AAA+ proteini mogu se nalaziti u mnogim staničnim odjeljcima eukariotskih stanica te u arhejama, bakterijama te virusima.[59]

2.6. Proteinska kristalografija

Cijeli „svijet kemije“ se sastoji od različitih atoma koji se na različiti način mogu povezivati i tvoriti molekule. Molekule se mogu raznim interakcijama povezivati u veće molekulske sustave, te osim neživog svijeta (anorganskog), također graditi i tvoriti i živi svijet. Biološke makromolekule su osnova svakog živog svijeta i sustava. To su molekule velikih molarnih masa (primjer veličine enzima (proteina) LeuRS *E. coli* 119 kDa)[60] te ih se prema veličini najčešće može podjeliti u monomere te polimere od kojih su zasigurno najznačajniji te najistraživaniji enzimi (proteini te katalitičke tRNA). Strukturno gledajući, biološke makromolekule mogu imati i uređene strukturno neovisne podjedinice – domene od kojih svaka domena može imati nekoliko uloga: od strukturnih interakcija sa supstratima pa sve do katalitičkih uloga što je slučaj kod enzima.

Sva znanstvena istraživanja bioloških makromolekula (ali i ostalih molekula) moraju biti potkrepljena dokazima, odnosno znanstvenim rezultatima koji zahtijevaju strukturnu analizu istraživanih i novodizajniranih molekula. Nikakvim kemijskim metodama se ne može točno definirati trodimenzionalna struktura molekula, pa tako niti strukture bioloških makromolekula. Najbolja metoda za odrediti i definirati trodimenzionalnu strukturu molekula te bioloških molekula jest rendgenska strukturna analiza. U tu svrhu mora se prirediti kristal molekule kroz koji se na rendgenskom uređaju propušta rendgensko zračenje te na temelju difrakcijskih maksimuma određuje struktura..[61]

2.6.1. „Marš“ strukturne biologije

Gotovo pred više od stotinjak godina, znanstvenici su znali vrlo malo o biološkim makromolekulama i nisu posjedovali nikakva znanja, iskustva te instrumente s kojima bi mogli proučavati trodimenzionalne strukture. Strukturna biologija, odnosno kako kemičari vole govoriti, strukturna kemija postala je osnovno multidisciplinarno područje čija je temeljna zadaća intrepretirati trodimenzionalnu strukturu proteina i odgovoriti na temeljna pitanja vezana uz strukture i svojstva takvih bioloških makromolekula. Koordinate svih atoma u proteinu odnosno trodimenzionalne strukture proteina te ostalih bioloških makromolekula pohranjene su u velikim kristalografskim bazama podataka od kojih se najviše ističe Proteinska baza podataka, PDB (od engl. *Protein Data Bank*). Baza je 2002. godine imala pohranjene strukture više od 17000 proteina, dok na današnji dan ima gotovo nevjerojatnih 139717

trodimenzionalnih struktura proteina od kojih je gotovo 125072 struktura riješeno rendgenskom strukturnom analizom, s gotovo 10960 kristalnih struktura proteina s rezolucijom manjom od jednog angstrema.[62]

Prva od metoda određivanja struktura makromolekula jest bila interpretacija difrakcijskih eksperimenata nakon što je kristal proteina bio ozračen rendgenskim zračenjem. Uz rendgensku kristalografiju te vrlo blisku neutronsku kristalografiju, do sada su se razvile i metode krioelektronske mikroskopije te metoda nuklearne magnetske rezonancije.

Prvi pokušaji otkrivanja svojstava bioloških tvari ispod razine vidljive oku započele su s Robertom Hookeom (1635.-1703.) te Antoni van Leeuwenhoekom (1632.-1723.). Već krajem 19. stoljeća, svjetlosni mikroskop je došao do svojeg teoretskog maksimuma rezolucije, dok je za postizanje rezolucije na razini atomske bilo potrebno zračenje takvih valnih duljina koje su vrlo bliske dimenzijama atoma. Vidljiva svjetlost, dakako, ne može imati takve valne duljine. Paralelno su fizičari razvijali metode te izvore zračenja puno kraćih valnih duljima. Willhelm Röntgen je, nakon što je Tesla ustvrdio da postoji nekakvo zračenje velike energije (nažalost, tada je imao požar u laboratoriju), otkrio i prvi zapisao postojanje X-zraka 1895. godine. J. J. Thompson je 1897. otkrio elektrone, dok je neutrone otkrio J. Chadwick tek 1932. godine.[63]
Eksperimenti na kristalima bioloških makromolekula prestavljaju povijesno ključne eksperimente u razvoju strukturne biologije. Johannes Kepler je već prvi razmišljao o unutarnjoj periodičnoj strukturi kristalnih snježnih pahuljica, te su takve teze ostale nejasne sve do 1912. godine kada je Max von Laue predložio kako se metode rendgenskog zračenja mogu koristiti za istraživanje strukture kristala što je ubrzo dovelo do rješenja strukture natrijeva klorida 1913. godine od strane Lawrenca Bragga. Tek 1934. godine J. D. Bernal te Dorothy Crowfoot (kasnije Hodgkin) su prvi puta primijenili rendgensko zračenje na kristal pepsina te, začuđujuće, uspjeli dobiti difrakcijsku sliku čime se skinula dogma kako su proteini koloidi sa slučajnom strukturom. Već 1936. godine mladi Max Perutz pridružuje se Bernalovom laboratoriju te zajedno odlučuju kako će koristiti rendgenske zrake kako bi odredili strukturu proteina hemoglobina. Perutzu to uspijeva nakon gotovo 30 godina, iz razloga što nije znao kako i na koji način interpretirati difrakcijske slike te nije imao računalnu pomoć, danas nezamislivu.[64] Šest godina ranije, točnije 1958. godine Kendrew i suradnici[65] objavljuju prvu riješenu kristalnu strukturu mioglobina koja će dati snagu i ohrabrenje Perutzu i svim ostalim, tada značajnim, proteinskim kristalografima za nastavak rada i istraživanja u tom polju znanosti.

Rendgenske zrake se zbog elektrona u uzorku kristala raspršuju, stoga je cilj takvih difrakcijskih slika izračunati mapu elektronske gustoće iz difrakcijskih slika. Dok se kod mikroskopa, leće koriste za fokusiranje te osvjetljavanje objekta, rendgenske zrake se ne mogu fokusirati te se u procesu prikupljanja podataka, dio bitnih informacija izgubi: točke na fotografskom filmu nekada ili detektoru danas, daju podatke o amplitudama tj. intenzitetu difrakcijskog maksimuma, ali ne i o fazi. Tek su Max Perutz i suradnici riješili fazni problem uvođenjem teških atoma poput žive u proteinske kristale. Tek usporedbom takvih dviju difrakcijskih slika, tj. računalnom analizom, faza može biti određena. U povijesti kristalografije, dolazilo je do mnogih otkrića te tehnoloških napredaka. Jedan od njih, zasigurno predstavlja dostupnost sinkrotronskog izvora zračenja. Radi se o velikim uređajima s promjerima od oko 20-100 metara gdje dolazi do velikog ubrzavanja elektrona zadržanih u orbiti pomoću specifičnih magneta te uslijed njihovog skretanja nastaju rendgenske zrake velikih intenziteta što omogućuje brže snimanje uzoraka kristala koji više ne moraju biti velikih dimenzija.[66]

2.6.2. Kristalizacija proteina

Svaka biološka makromolekula je jedinstvena te ne postoji univerzalni recept za kristalizaciju odnosno priređivanje kristala takvih makromolekula, ali postoje preduvjeti od kojih je najosnovniji, uvjet čistoće tj. homogenosti uzorka. Prvi korak u postupku kristalizacije jest posjedovanje proteina u otopini. Metodama genetičkog i proteinskog inženjerstva mogu se pripraviti točno željeni fuzijski proteini koji se specifičnim tehnikama pročišćavaju te ugušćuju do željene masene koncentracije koja u području proteinskih kristalizacijskih tehnika najčešće variraju ovisno o proteinu između 3 – 50 mg mL^{-1}.

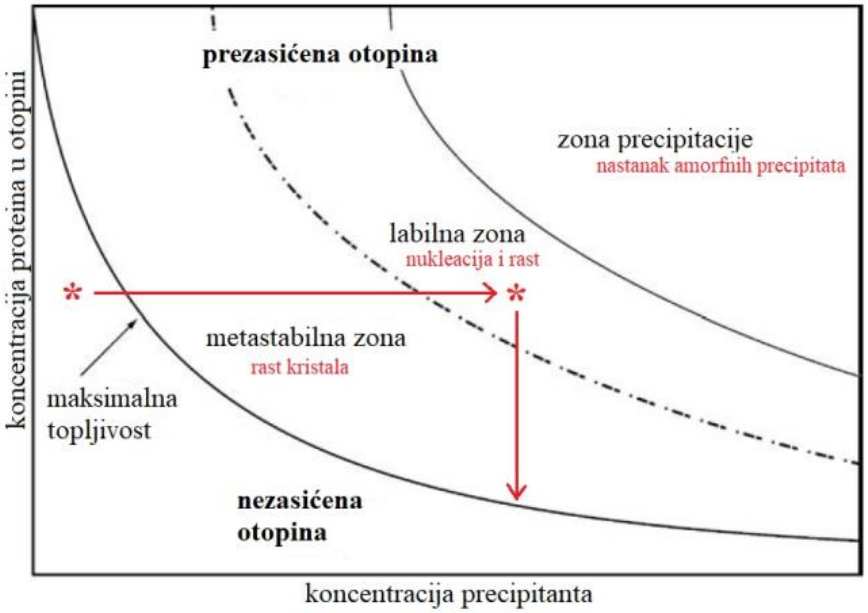
Slijedi korak otapanja biomolekula u prikladnom otapalu. Proteini su, recimo, slabo topljivi u čistoj vodi te se lako tope uz dodatak male količine soli, čime se povećava ionska jakost otopine proteina koji je također ionski spoj, a snižava aktivnost naboja proteina u okolini, čime se povećava topljivost. Daljnjim dodavanjem soli povećava se ionska jakost, no ioni soli oduzimaju vodu vezanu za nabijene grupe proteina te se time smanjuje topljivost proteina. Slijedeći je korak dovođenje otopine do prezasićenja, a iz prezasićene proteinske otopine nastaju jezgre kristalizacije te kasnije kristalni rast na jezgrama kristalizacije (reduciranje prezasićenja). Za postizanje prezasićenosti se često koriste taložni reagensi (precipitanti) od kojih su najčešće izrazito dobro topljive soli ($MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$)) koje mijenjaju kemijsku aktivnost vode te stvaraju nekovalentne interakcije s makromolekulama.[67]

Također se koriste i dugolančani polimeri koji također mijenjaju kemijsku aktivnost vode te smanjuju dielektričnu konstantu otapala te time dio volumena otopine postaje nedostupan biološkim makromolekulama (najznačajniji poli(etilen-glikoli) tj. PEG-ovi s relativnom molekulskom masom, M_r = 400 – 20000). Od ostalih korištenih precipitanata još se koriste i polimeri male molekulske mase te također i vrlo značajni precipitanti – organska otapala (metanol, etanol, aceton). Osim precipitanata, također postoje i ostali kristalizacijski faktori koji utječu na kristalizaciju od kojih su najznačajniji temperatura pri kojoj se odvija kristalizacija (najčešće pri dvije različite temperature 4 °C te pri 20 °C), vrijeme kristalizacije koje može biti između više dana do više mjeseci te pH otopine. Na kristalizaciju utječu također i supstrati, koenzimi, inhibitori, razni aditivi, reducensi, surfaktanti te vibracije.[47,67]

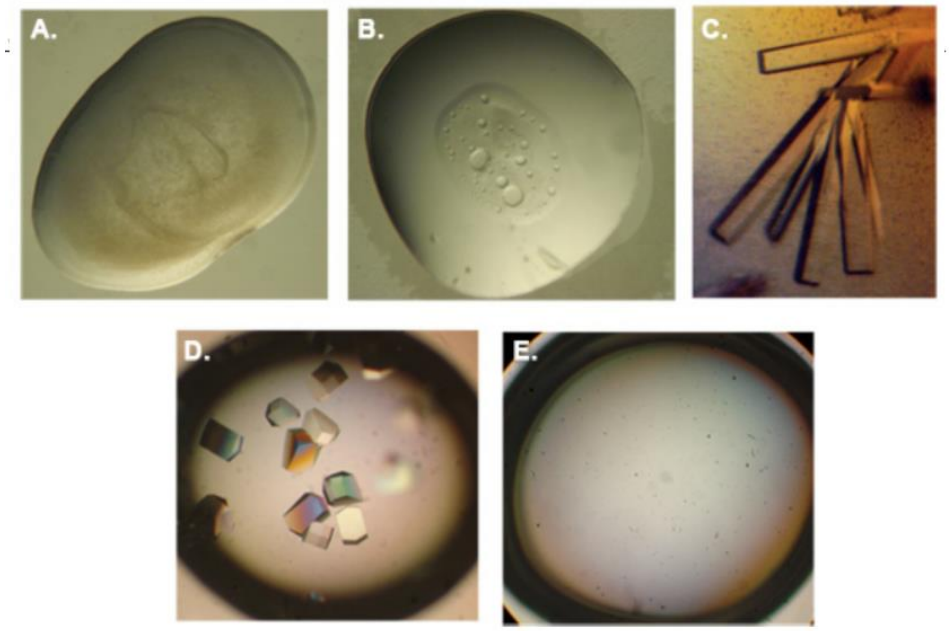
2.6.3. Fizikalna osnova kristalizacije proteina

Zamislimo molekule koje se nalaze otopljene tj. solvatirane molekulama vode u vodenoj otopini. Takve će molekule izaći iz otopine tj. prijeći iz tekućeg otopljenog stanja u kruto stanje tek onda kada im koncentracija u otopini prijeđe točno određenu granicu topljivosti, koja može ovisiti o intrinzičnim svojstvima te uvjetima poput tlaka, temperature, ionske jakosti, pH vrijednosti, viskoznosti ili/i prisutnosti ostalih reagensa u otopini koji na različite načine mogu stabilizirati tvari djelovanjem raznih nekovalentnih interakcija. Općenito se takvi prijelazi iz različitih agregacijskih stanja i oblika opisuju faznim dijagramima koji se u ovom slučaju nazivaju fazni dijagrami kristalizacije koji se sastoje od regije nezasićenosti otopine, regije prezasićenosti te ravnoteže koja ih dijeli (prikazano na slici 5).[68,69]

Nužan preduvjet za nastajanje kristala tvari jest dolazak otopine do stanja prezasićenosti koja se može postići npr. isparavanjem otapala čime dolazi do povećanja koncentracije otopljene tvari. Također se može smanjiti granicu topljivosti tako što se promjeni ionska jakost otapala dijalizom ili promjenom temperature koja je u slučaju kristalizacije proteina iznimno bitan faktor. U kapljici nakon postavljenog kristalizacijskog eksperimenta ne mora nužno nastati kristal proteina nego mogu nastati amorfni precipitati i agregati (slika 6).



Slika 5. Prikaz faznog dijagrama kristalizacije[44]



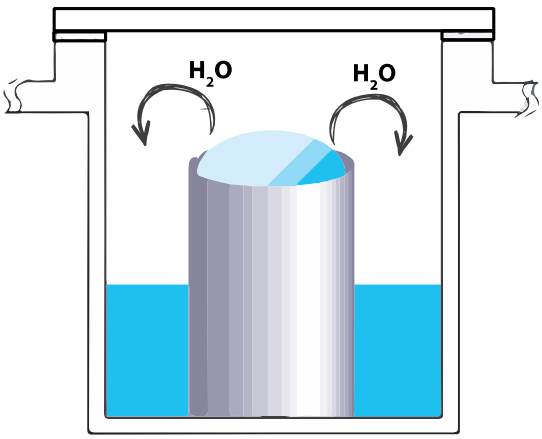
Slika 6. Prikazi različitih dobivenih vrsta tijekom kristalizacije proteina: a) otopina je lagano precipitirala, b) otopina je precipitirala i vidljiva je granica faza, c) nastaju igličasti kristali proteina u obliku sraslaca, d) nastaju jedinični kristali, e) otopina je intakna, najvjerojatnije uslijed male koncentracije proteina.[70]

Kada se promatraju molekule u kristalima u usporedbi s molekulama u otopini, kristalne molekule posjeduju veći stupanj uređenosti što se objašnjava manjim stupnjevima rotacijske i translacijske slobode odnosno manjom entropijom. Proces formiranja kristala, odnosno udruživanja najmanje 3 – 4 molekula na vrlo bliskom području i formiranje kristalne rešetke zaista je fascinantan prizor u svijetu kemije.

Potrebno je objasniti kako upravo nukleacija predstavlja energetsku barijeru cijelog procesa kristalizacije, dok se rast kristala događa kasnijim dodavanjem molekula na već formirane nukleacijske centre. Uistinu još fascinantniji prizor jest rast kristala u točno određenom smjeru te kao takav predstavlja proces koji se događa sve dok koncentracija proteina ne opadne do ravnotežne linije (prikazano na slici 5).[69]

2.6.4. Metode kristalizacije proteina

Osnovne metode kristalizacije jesu *batch* kristalizacija ili kristalizacija u jednom koraku pri kojoj se samo pomiješaju otopine proteina i otopine precipitirajućeg reagensa te se prati kristalizacija biomakromolekula, dok je druga, najčešće korištena metoda, metoda difuzije para otapala pri kojoj mogu postojati različite izvedbe: viseća kap, sjedeća kap te kap u sendviču (slika 7). Otopine precipitanata te otopine proteina pomiješaju se u kapi u omjeru 1:1 (ili većim omjerima u korist proteina), čime se koncentracija precipitanta smanji u odnosu na koncentraciju u spremniku, nejčešće, za pola koncentracije. Zbog difuzije para otapala iz kapljice dolazi do njenog prezasićenja te do kristalizacije proteina.[71]



Slika 7. Prikaz metode kristalizacije proteina difuzijom para otapala u izvedbi sjedeće kapi[47]

Za takav postupak kristalizacije koriste se Linbro posudice. Dijaliza se pak bazira na principu odvajanja otopine proteina od precipitanta polupropusnom membranom kroz koju prolaze samo

male molekule precipitanta te time dolazi do velikog smanjenja topljivosti proteina te u konačnici kristalizacije proteina.

Ako početni kristali nisu dobre kvalitete (premali ili imaju defekte) potrebno je cijepiti matičnicu kristalnom klicom kako bi se potakla kristalizacija. Nakon odabira metode, koristi se *screening* metoda kojom se iskušavajući pomoću različitih kristalizacijskih uvjeta (temperatura, puferi, aditivi) pokušava utvrditi koji su parametri najučinkovitiji kako bi se u daljnjim istraživanjima uštedjelo vrijeme i novac. Najčešće su to automatizirani postupci pomoću kristalizacijskih robota i radnih stanica koji su vrlo efikasni u provođenju višefaktorskog eksperimentiranja (slika 8).



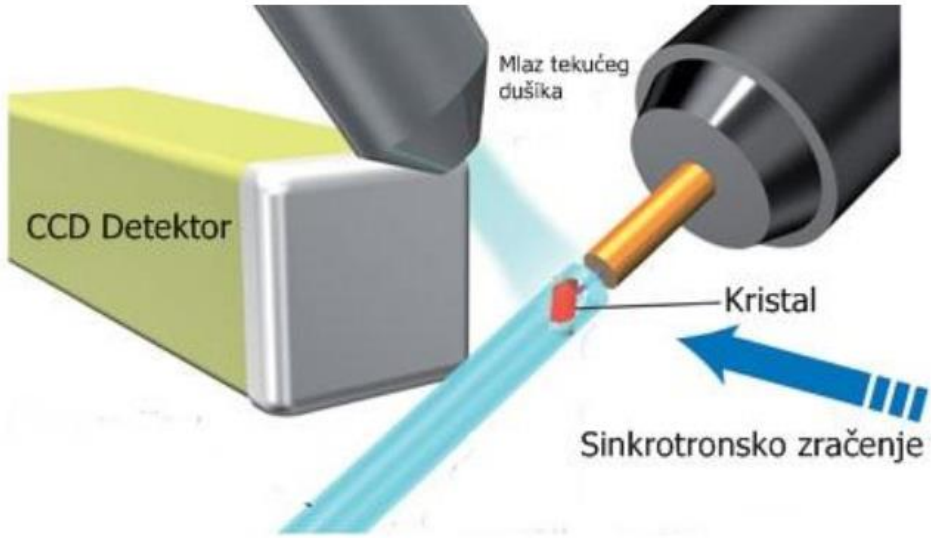
Slika 8. Robot za automatsko postavljanje kristalizacija tj. kristalizacijskih uvjeta (*Crystal Gryphon, Art Robbins Instruments*, Institut „Jožef Stefan“, Ljubljana)

2.6.5. Selekcija kristala i priprema za snimanje

Nakon dobivanja kristala bioloških makromolekula, slijedi korak difrakcijskih eksperimenata (slika 9) za koje je potrebno također prethodno napraviti dobar odabir prikladnog jediničnog kristala za difrakcijski pokus. Takvi kristali bioloških makromolekula su u svojim otopinama vrlo stabilni, dok izvan otopine počinju gubiti otapalo kojeg uvelike sadržavaju u svojim šupljinama (25 - 90 % otapala). Jedan od uzroka mekanih i vrlo lomljivih kristala su i vrlo slabe međumolekulske interakcije koje prevladavaju. Stoga je potrebno, s iznimno velikom pažnjom pristupiti kristalima biomakromolekula kako ne bi došlo do narušavanja strukture i potencijalno loše difrakcijske slike.

Kristal se najčešće iz matičnice zahvaća najlonskom omčom odnosno stručno se to naziva „pecanje“ kristala (engl. *fishing*) te se na kratko vrijeme prebaci u otopinu krioprotektanta (najčešće 25 - 30 % glicerol ili etilen-glikol), iz te otopine se opet „upeca“ te se zatim brzo smrzava u tekućem dušiku te stavlja u specifični spremnik (engl. *vial*), a takvih 10 spremnika sprema u okrugli veći spremnik (engl. *puck*) koji se čuva u tekućem dušiku prije difrakcijskih eksperimenata. Krioprotektant štiti od nastajanja kristalića leda čija difrakcija se na difrakcijskim slikama očituje u obliku prstenova koji narušavaju difrakcijsku sliku proteina.

Postoje automatizirani roboti koji su u stanju automatski uzimati omče s kristalima i direktno ih stavljati na goniometarsku glavu rendgenskog uređaja u sinkrotronskom postrojenju gdje se na 100 K u struji dušika sakupljaju difrakcijski maksimumi. Metode za određivanja strukture proteina su: metoda izomorfne zamjene, metoda anomalne difrakcije te metoda molekulske zamjene.



Slika 9. Grafički prikaz difrakcijskog pokusa na sinkrotronu[67]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Adenozin difosfat (ADP, *Sigma*), Agar (*Sigma*), agaroza (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), 40 %-tni akrilamid:bisakrilamid, 19:1 (*Merck*), 40 %-tni akrilamid:bisakrilamid, 29,1:0,9 (*AppliChem*), amonijev peroksodisulfat (APS) (S*igma*), ampicilin (*Sigma*), bis-trispropan (Sigma), bromfenol-plavo (*Serva*), *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (*Merck*), *Coomassie Brilliant Blue* R-250 (*Sigma*), EDTA-Na_2 · 2 H_2O (*Kemika*, p.a.), ekstrakt kvasca (*BD Fisher Scientific*), etanol (Kemika), glicerol, redestilirani, w = 100 % (*Kemika*, p.a.), glicin (*Fisher Scientific*), fenilmetilsulfonil-fluorid, PMSF (*Sigma*, > 99 %), gvanidinijev klorid (*Carl Roth*, p.a.), 2-[4-(2- hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfonska kiselina, HEPES (*AppliChem PanReac*), imidazol (*Sigma-Aldrich*, p.p.a.), izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid, IPTG (*Sigma*), kalijev klorid (*Kemika*), kalijev tiocijanat (*Kemika*), kanamicin-sulfat (*Sigma*), HCl, *w* = 36,5 % (*Kemika*, p.a.), KCl (*Kemika*, p.a.), KOH (*Kemika*, p.a.), kvaščev ekstrakt (BD Fisher Scientific), ksilencijanol-fluorofosfat (*Serva*), LB agar (*BD Fisher Scientific*), 1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol, ditiotreitol, DTT (*Sigma*), marker za agaroznu elektroforezu (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific*), marker za poliakrilamidnu elektroforezu (*Precision Plus Protein™ Standards Unstained, Biorad*), marker za poliakrilamidnu elektroforezu (SigmaMarker™ wide range, mol wt 6,500-200,000 Da, Sigma), $MgCl_2$·6 H_2O (*Kemika*, p.a.), $MgSO_4$ (*Kemika*), β-merkaptoetanol (*Serva*), natrijev dodecilsulfat, SDS (*Sigma*), NaCl (*Alkaloid, Skopje*.), natrijev dodecilsulfat (*Sigma*), NaOH (*Sigma*), NaN_3 (Sigma), ($NiSO_4$·7 H_2O (*Kemika*), *N*,*N*,*N*',*N*'-tetrametiletilendiamin (TEMED), octena kiselina (*Kemika*), polietilenglikol 6000 (*Sigma-Aldrich*), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin, TEMED (*Sigma*), tripton (BD Fisher Scientific), tris (*Sigma*), triton X-100 (*Sigma*), urea (*Kemika).*

3.1.2. Bakterijski sojevi

BL21 (DE3) (F– *ompT hsdS*$_B$ *(r*$_B$*-m*$_B$*-) gal dcm* (DE3)) (*Invitrogen*) su kemijski kompetentne bakterijske stanice *E. coli* deficijentne za lon te ompT proteaze. Oznaka (DE3) ukazuje na činjenicu da je domaćin lizogen od λDE3 i nosi kromosomsku kopiju T7-RNA-polimeraznog gena koji je pod kontrolom *lacUV5* promotora. Ovakvi sojevi su iznimno korisni za proizvodnju ciljanih proteina kloniranih u pET vektorima, a sve uz korištenje IPTG-a (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid) kao sredstva za poticanje indukcije sinteze ciljanih proteina. Radi se o ekspresijskom soju koji je u ovom radu korišten za sintezu ciljanog proteina HP1026.

HI-Control^{TM} 10G (*mcrA* Δ*(mrr-hsdRMS-mcrBC) endA1 recA1 φ80dlacZ*Δ*M15* Δ*lacX74 araD139* Δ*(ara,leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) nupG λ- tonA /Mini-F lacI^{q1}(Gent^R)*) (*Lucigen*) su kemijski kompetentne bakterijske stanice *E. coli* odnosno bakterijski soj optimiziran za transformacije visoke učinkovitosti. Idealan je soj za kloniranje i propagaciju plazmidnih klonova te daje visoko iskorištenje kloniranja i vrlo kvalitetnu plazmidnu DNA zbog *end*A1 te *rec*A1 mutacija. HI-Control 10G soj ne sadrži T7-RNA-polimerazu, stoga nije ni u stanju vršiti ekspresiju proteina sa T7-promotora. Nedostatak lac represora u ovom soju minimalizira bilo kakvu pozadinsku transkripciju bakterijske polimeraze. Soj se koristi isključivo s ciljem ugradnje PCR produkta u pETite^{TM} N-His SUMO Kan (*Lucigen*) vektor te dobivanja takvog rekombinatnog plazmida s ugrađenim genom CrdA u vektoru.

HI-Control BL21(DE3) (*F– ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)/Mini-F lacI^{q1}(Gent^R)*) (*Lucigen*) su kemijski kompetentne bakterijske stanice *E. coli* odnosno derivat soja BL21(DE3) s poboljšanom kontrolom ekspresije ciljanog gena. BL21(DE3) je T7 soj, najčešće korišten za ekspresiju ugrađenog gena u vektor pETite^{TM} N-His SUMO Kan (*Lucigen*), a sve uz korištenje IPTG-a kao sredstva za poticanje indukcije sinteze ciljanih proteina. Radi se o ekspresijskom soju koji je u ovom radu korišten za sintezu ciljanog proteina SUMO-CrdA.

3.1.3. Hranjive podloge za uzgoj bakterije E. coli

Za pripremu hranjive podloge za uzgoj bakterija *E. coli* tj. Luria-Bertani (LB)-agar medij za volumen od 1 L, odvagnuto je 8 g triptona, 5 g kvaščevog ekstrakta te 15 g agara te dodano redestilirane vode do volumena od 1 L, te sve dobro promiješano do otapanja. Potrebno je naglasiti kako je za autoklaviranje potrebno uvijek imati posudu najmanje četverostrukog volumena od volumena otopine koju se treba autoklavirati. Medij se sterilizirao u autoklavu na 120 °C te su nakon hlađenja do temperature pri kojoj se može posudu držati rukom (iznimno bitna što niža temperatura zbog nestabilnosti antibiotika pri višim temperaturama, a opet ne preniska kako ne bi došlo do polimerizacije agaroze u steriliziranoj posudi) dodani antibiotici zbog selekcije. Radilo se o antibiotiku kanamicinu zbog postojanja gena za otpornost na kanamicin za vektor pETite^{TM} N-His SUMO Kan (*Lucigen*) do konačne koncentracije od 30 μg mL^{-1} te u slučaju nanošenja bakterijskih stanica s vektorom pET15b (*Novagen*) ampicilin do konačne koncentracije od 100 μg mL^{-1}. Agarozna otopina je uz otvoreni plamen izlivena u petrijeve posudice (promjera 90 mm) ispod ruba posude te je ostavljeno da agaroza polimerizira nakon čega su petrijevke zatvorene pokrovom te dodatno zatvorene parafilmom i pohranjene na 4°C.

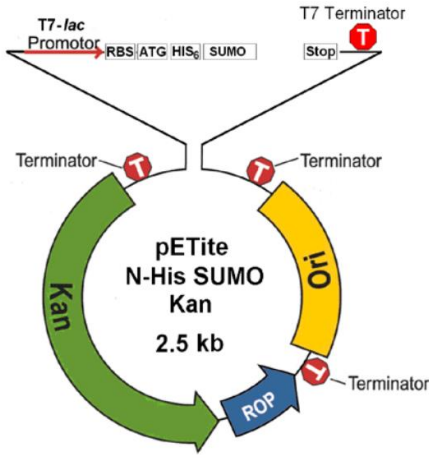
3.1.4. Hranjivi mediji za uzgoj bakterija E. coli

Za pripremu hranjivog medija za uzgoj bakterija *E. coli* tj. tekućeg LB medij za volumen od 1 L, odvagnuto je 5 g ekstrakta kvasca, 10 g triptona, 5 g natrijeva klorida te dodano redestilirane vode do volumena od 1 L, te sve dobro promješano do otapanja. Potrebno je naglasiti kako je za autoklaviranje potrebno uvijek imati posudu najmanje četverostrukog volumena od volumena otopine koju se treba autoklavirati. Medij se sterilizirao u autoklavu na 120 °C te su nakon hlađenja do temperature pri kojoj se može posudu držati rukom (iznimno bitna što niža temperatura zbog nestabilnosti antibiotika pri višim temperaturama, a opet ne preniska kako ne bi došlo do polimerizacije agaroze u steriliziranoj posudi) dodani antibiotici zbog selekcije. Radilo se o antibiotiku kanamicinu zbog postojanja gena za otpornost na kanamicin za vektor pETite^{TM} N-His SUMO Kan (*Lucigen*) do konačne koncentracije od 30 μg mL^{-1} te u slučaju nanošenja bakterijskih stanica sa vektorom pET15b (*Novagen*) ampicilin do konačne koncentracije od 100 μg mL^{-1}.

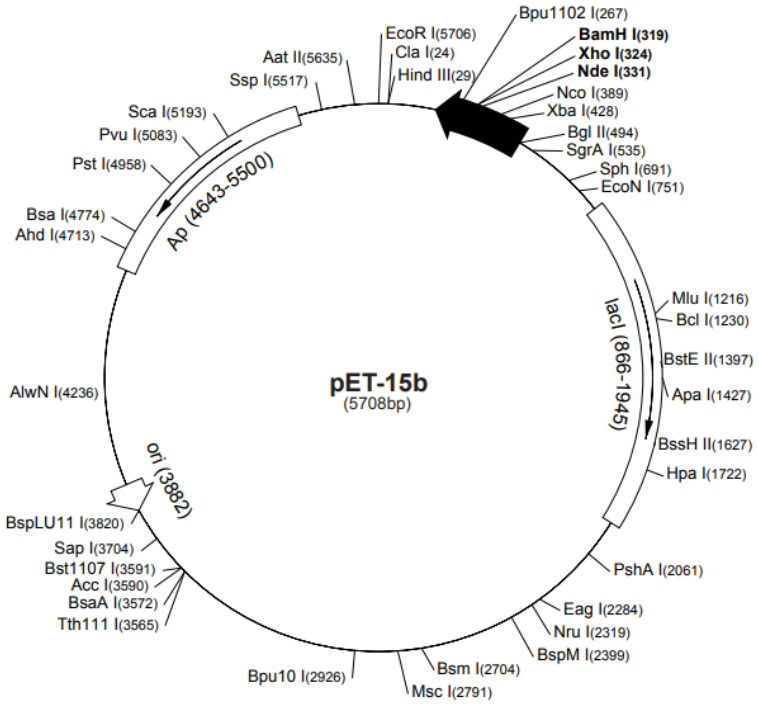
3.1.5. Plazmidi

pETite™ N-His SUMO Kan (*Lucigen*) je vektor (prikazan na slici 10) s 2535 parova baza koji služi za prekomjernu ekspresiju ciljanog proteina (CrdA) u fuziji sa SUMO proteinom (SUMO od engl. *small ubiquitin-like modifier*). Vektor posjeduje na N-kraju heksahistidinski privjesak koji omogućuje pročišćavanje fuzijskog proteina afinitetnom kromatografijom. Ekspresija gena (za protein SUMO-CrdA) kloniranog u ovom vektoru nalazi se pod kontrolom T7-lac promotora. Vektor sadrži gen za rezistenciju na kanamicin (Kan) za selekciju.

pET15b (*Novagen*) (prikazan na slici 11) je vektor s 5708 parova baza koji posjeduje N-terminalni heksahistidinski privjesak iza kojeg slijedi mjesto cijepanja prepoznato od trombina te MCS koji uključuje pozicije za XhoI, BamHI and NdeI. Ekspresija gena (za protein HP1026) klonirana u ovom vektoru nalazi se pod kontrolom T7-lac promotora. Vektor sadrži gen za rezistenciju na ampicilin (ampR) za selekciju.



Slika 10. pETite™ N-His SUMO Kan (*Lucigen*) vektor: RBS označava mjesto vezanja ribosoma (engl. *ribosome binding site*), ATG, mjesto početka te STOP mjesto kraja transkripcije i translacije. Kan označava gen za otpornost na antibiotik kanamicin, dok Ori predstavlja mjesto početka replikacije plazmida, a T je terminator transkripcije[72]



Slika 11. Mapa pET15b (*Novagen*) vektora sa T7 promotorom i terminatorom, genom za otpornost na ampicilin, MCS, te lacI te brojna restrikcijska mjesta[73]

3.1.6. Instrumenti

ÄKTA sustav za brzu tekućinsku kromatografiju (*GE Healthcare Life Sciences*), centrifuga (*Thermo Scientific te Biosan*), kamera mikroskopa *Olympus SZX12* (*Dino-Lite)*, optički mikroskop (*Olympus BX51M, Zavod za molekularnu biologiju, BO, PMF*), optički mikroskop (*Olympus SZX12*), PCR uređaj (*Mastercycler® ep, Eppendorf*), pH-metar (*MP220 Basic pH/mV/°C Meter, Mettler Toledo*), robot za postavljanje kristalizacije *Crystal Gryphon, Art Robbins Instruments*, Institut „Jožef Stefan“, Ljubljana), sonikator (*VibraCell™, 50 Watt Model, Bioblock Scientific*), spektrofotometar (*Evolution*™60S UV-*Visible Spectrophotometer, Thermo Scientific*), spektrofotometar (*NanoDrop* 1000 *Spectrophotometer, Thermo Scientific*), termoblok (*Biosan*), tresilice (*Orbital Shaker* 420, *Thermo Forma, Thermo Scientific*), uređaj za agaroznu elektroforezu(EPS 600 *Electrophoresis Power Supply*, 120 V, *Pharmacia Biotech*), UV kamera (*MiniBIS Pro,* DNR *Bio-Imaging Systems*), vaga (tehnička i analitička, *Metler Toledo)*

3.1.7. Komercijalni kompleti

Za ekstrakciju PCR produkata iz agaroznog gela i pročišćavanje od proteina, malih molekula u lančanoj reakciji polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR), korišten je komercijalni komplet GenElute™ Gel Extraction Kit (*Sigma Aldrich*) po uputama proizvođača.[74]

Za izolaciju plazmidne DNA tj. rekombinantnih plazmida (pETite™ N-His SUMO-CrdA(-), pETite™ N-His SUMO-G-CrdA(-) Kan te pETite™ N-His SUMO-GS-CrdA(-) (*Lucigen*)) korišten je komercijalni komplet GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (*Sigma Aldrich*) po uputama proizvođača.[75]

3.1.8. Boje

Pri agaroznoj elektroforezi, koristila se boja GelRed™ (*Biotium*)[76] tj. tvar koja se interkalira između parova baza, i služi za vizualizaciju nukleinskih kiselina nakon ozračenja zrakama valne duljine od 312 nm. Boja *Coomassie Brilliant Blue R-250* (*Merck*) koristila se za bojenje poliakrilamidnih gelova pri SDS-PAGE (elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata, od eng. *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*) tehnici.

3.1.9. Enzimi, nukleinske kiseline i nukleotidi

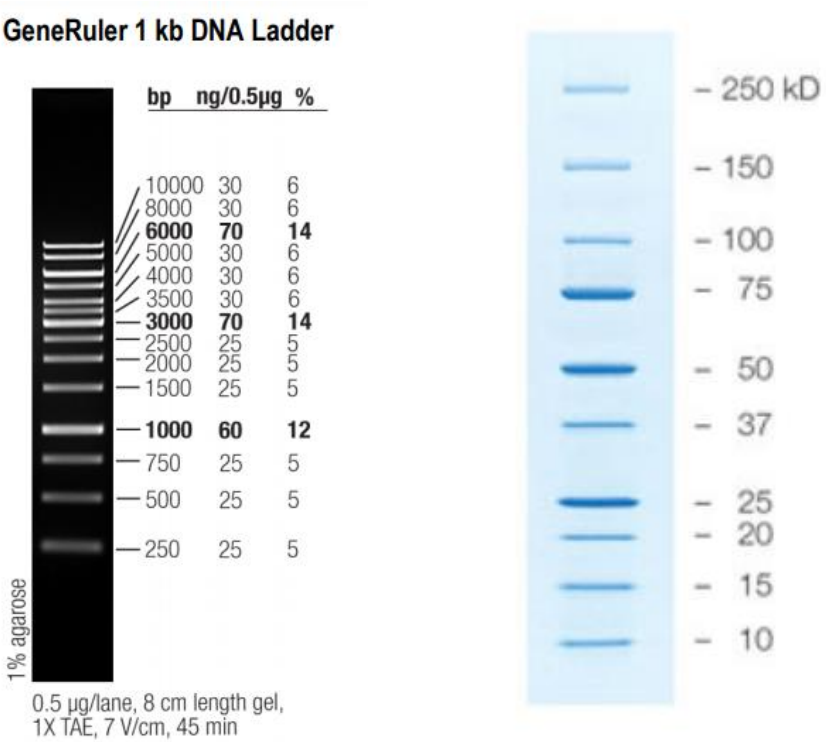
Za PCR eksperimente kao mješavinu nukleotida korišten je dNTP *mix* (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Sigma*), dok je kao polimeraza za PCR korištena Pfu DNA-polimeraza (*Thermo Scientific*) s odgovarajućim 10× Pfu puferom i magnezijevim sulfatom (*Thermo Scientific*), dok je za tehniku PCR na kolonijama korištena Taq DNA-polimeraza (*Thermo Scientific*) s odgovarajućim 10× Taq puferom i magnezijevim sulfatom (*Thermo Scientific*). U svrhu rezanja SUMO dijela s fuzijskog SUMO-CrdA proteina, korištena je specifična SUMO proteaza™ (*Lucigen*). Za kristalizaciju proteina HP1026 korišten je ADP (adenozin difosfat, *Sigma*).

3.1.10. Oligonukleotidi

Oligonukleotidi prikazani u tablici 1, sintetizirani su u tvrtci *Sigma Aldrich*. Liofilizirani te odsoljeni oligonukleotidi su otopljeni u sterilnoj redestiliranoj profiltriranoj vodi do konačne koncentracije od 100 μmol L^{-1} po uputama proizvođača te pohranjeni pri temperaturi od -20 °C.

3.1.11. Markeri veličine

Za agaroznu elektroforezu, kao marker veličine korišten je *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Scientific*) (slika 12a), dok su kao markeri veličine pri elektroforezi proteina u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata korišteni marker veličine *Precision Plus Protein Standards*, Unstained (*Bio-Rad*) (slika 12b) te SigmaMarker™ wide range, molekulske mase 6500 - 200000 Da (*Sigma*).



a) b)

Slika 12. a) Markeri veličine *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Scientific*) za agaroznu gel-elektroforezu[77], b) markeri veličine *Precision Plus Protein Standards*, Unstained (*Bio-Rad*) za SDS-PAGE metodu[78]

3.1.12. Komercijalno dostupni kompleti za kristalizaciju proteina

Prilikom postavljanja kristalizacijskih uvjeta za protein HP1026 koristio se MD1-93 Morpheus Additive Screen (*Molecular Dimensions*) te Silver Bullets (*Hampton Research*), a za kristalizaciju proteina SUMO-CrdA koristili su se slijedeći kristalizacijski uvjeti (engl. *screenovi*): NeXtal DWBlock JCSG Core Suite I (*Qiagen*), NeXtal DWBlock JCSG Core Suite II (*Qiagen*), NeXtal DWBlock JCSG Core Suite III (*Qiagen*), The PEGs Suite (*Qiagen*), The PEGs II Suite (*Qiagen*), NeXtal DWBlock JCSG Core Suite IV (*Qiagen*), Morpheus® HT-96 (*Molecular Dimensions*), NeXtal DWBlock PACT Suite (*Qiagen*),

3.2. Metode rada s bakterijama

3.2.1. Transformacija kemijski kompetentnih HI-Control 10G stanica E. coli za gen G-crdA(-) te GS-crdA(-)

Prethodnim istraživanjima kolega, obavljena je uspješna ugradnja gena *crdA* (bez signalne sekvence, u daljnjem tekstu *crdA(-)* te gena *crdA* (sa signalnom sekvencom, u daljnjem tekstu samo *crdA*) u pETite N-His SUMO Kan vektor što je također potvrđeno sekvenciranjem od strane tvrtke *Macrogen*. Ugradnja gena *crdA* bez signalne sekvence s ugrađenim linkerom, *G-crdA(-)* i *GS-crdA(-) u* pETite N-His SUMO Kan vektor bit će opisana u daljnjem tekstu. Alikvoti (20 μL) HI-Control 10G stanica *E. coli* (*Lucigen*) prije upotrebe čuvaju se na temperaturi od -80 °C, stoga ih je potrebno pripremiti za kasniju upotrebu otapanjem na ledu. Tekuća hranjiva podloga (eng. *Recovery medium, Lucigen*) otopljena je na temperaturi prostorije te dobro promiješana svakih 5-10 minuta. Prethodno pročišćen uzorak PCR produkta s genima *G-crdA(-)* te *GS-crdA(-)* također je prije transformacije pripremljen otapanjem/taljenjem na ledu. U alikvote (20 μL) HI-Control 10G stanica *E. coli* dodano je 2 μL pETite N-His SUMO Kan lineariziranog plazmida (mase 25 ng) te u svaki pojedinačno, 1 μL PCR produkta s genima *G-crdA(-)* te *GS-crdA(-)* (mase 25-100 ng) te je smjesa pažljivo prenijeta u prethodno dobro ohlađenu sterilnu mikroepruvetu (2mL) te inkubirana točno 20 minuta na ledu. Potom je takva mikroepruveta s uzorkom brzo prenijeta u termoblok (*BioSan*) te je uzorak inkubiran 45 sekundi na 42 °C. Nakon termičkog šoka, uzorak je inkubiran na ledu 2 minute te mu je nakon inkubacije dodano 280 μL tekuće hranjive podloge (engl. *Recovery medium, Lucigen*). Slijedila je inkubacija 45 minuta na 37 °C u inkubatoru (*BioSan*) uz neprestano mješanje pri 200 rpm-a.

Nakon inkubacije, uzorak (300 μL) je nanijet na površinu plastičnih petrijevki (promjera 90 mm) koje su sadržavale krutu hranjivu podlogu (agaroza - hranjivi medij Luria Bertani) s antibiotikom kanamicinom (koncentracije 30 μg mL^{-1}), uz otvoreni plamen kako bi se izbjegla kontaminacija. Takve petrijevke su kasnije zatvorene parafilmom te inkubirane na 37 °C u inkubatoru (*Thermo Scientific, Zavod za biokemiju, KO*) preko noći.

3.2.2. Transformacija ekspresijskog soja HI-Control BL21(DE3) E. coli za gen crdA(-), crdA, G-crdA(-) te GS-crdA(-)

Alikvot (40 μL) HI-Control BL21(DE3) stanica *E. coli* (*Lucigen*) prije upotrebe čuva se na temperaturi od -80 °C, stoga ga je potrebno pripremiti za kasniju upotrebu otapanjem na ledu. Tekuća hranjiva podloga (eng. *Recovery medium, Lucigen*) otopljena je na temperaturi prostorije te dobro promiješana svakih 5−10 minuta tijekom procesa taljenja. Uzorak plazmida pETite N-His SUMO Kan s ugrađenim genom *crdA(-) tj. crdA* (koncentracije 41,0 ng μL^{-1} te 43,0 ng μL^{-1}, redom) i uzorci plazmida pETite N-His SUMO Kan s ugrađenim genima G-crdA(-) te GS-crdA(-) (koncentracije redom: 60,97 ng μL^{-1} te 77,70 ng μL^{-1}) također su prije transformacije pripremljeni otapanjem na ledu. U alikvot (40 μL) HI-Control BL21(DE3) stanica *E. coli* dodan je 1 μL crdA(-)pETite N-His SUMO Kan plazmida (mase 10 ng) tj. crdA pETite N-His SUMO Kan plazmida (mase 10 ng) dok je 0,5 μL G-crdA(-)pETite N-His SUMO Kan tj. GS-crdA(-)pETite N-His SUMO Kan dodano u 20 μL HI-Control BL21(DE3) stanica *E. coli*. U svim slučajevima daljnji postupak je bio jednak. Smjesa je pažljivo prenijeta u prethodno dobro ohlađenu sterilnu mikroepruvetu (2 mL) te inkubirana 30 minuta na ledu. Potom je takva mikroepruveta s uzorkom brzo prenijeta u termoblok (*BioSan*) te je uzorak inkubiran 45 sekundi na 42 °C. Nakon termičkog šoka, uzorak je inkubiran na ledu 2 minute te mu je nakon inkubacije dodano 960 μL tekuće hranjive podloge (engl. *Recovery medium, Lucigen*) u slučaju crdA(-)pETite N-His SUMO Kan plazmida i crdA pETite N-His SUMO Kan plazmida odnosno 300 μL LB medija u slučaju G-crdA(-)pETite N-His SUMO Kan i GS-crdA(-)pETite N-His SUMO Kan. Slijedila je inkubacija sat vremena na 37 °C u inkubatoru (*BioSan*) uz neprestano mješanje pri 250 rpm-a.

Nakon inkubacije, 100 μL te 500 μL uzorka nanijeto je na površinu plastičnih petrijevki (promjera 90 mm) koje su sadržavale krutu hranjivu podlogu (agaroza - hranjivi medij LB) s antibiotikom kanamicinom (koncentracije 30 μg mL^{-1}), uz otvoreni plamen kako bi izbjegli

kontaminaciju. Takve petrijevke su kasnije zatvorene parafilmom te inkubirane na 37 °C u inkubatoru (*Thermo Scientific, Zavod za biokemiju, KO*) preko noći.

3.3. Metode rada s nukleinskim kiselinama

3.3.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (od engl. *Polymerase chain reaction,* PCR) predstavlja jednu od osnovnih biokemijskih metoda pri kojoj se vrši umnažanje DNA *in vitro*. Osnova lančane reakcije polimeraze se može slikovito objasniti riječima jednog biologa[79]: „Prvi dio je kao priprema juhe: dodate malo DNA koju želite umnožiti, početnice kojima ćete ciljano umnožiti samo onaj komad koji želite, DNA-polimerazu koja će obaviti prljavi posao, deoksiribonukleotide koji su potrebni za taj posao i, za kraj, malo soli, konkretno magnezijeva klorida. Juha se kuha, a ova se smjesa malo kuha, pa malo hladi, pa opet malo kuha… i tako u 30 do 40 ciklusa koji ukupno traju 2 do 3 sata.“

Temelj cijele metode je ponavljanje ciklusa koji se sastoje od denaturacije dvolančane DNA koje se razdvajaju, na koje se lijepe oligonukleotidne početnice od kojih DNA-polimeraza počinje produljivati komplementaran lanac od lanca kalupa i tako u krug brojem ciklusa, koji se povrh ostalih uvjeta zadaje na uređaju za PCR, specifičnom uređaju koji je u iznimno malom vremenu spreman promjeniti temperaturu i omogućavati takve cikluse. Metoda PCR-a je u ovom radu korištena u svrhu dodavanja nukleotida između gena za SUMO protein te gena *crdA* za protein CrdA, kako bi se olakšala kasnija proteazna aktivnost SUMO proteaze (*Lucigen*).

3.3.2. Umnažanje gena crdA *lančanom reakcijom polimeraze (PCR)*

Gen *crdA* umnožen je iz izoliranog plazmida čiji se sastav gena *crdA* potvrdio sekvenciranjem od strane tvrtke *Macrogen*. PCR reakcija je bila, kao i obično temeljena na ponavljanju koraka denaturacije tj. razdvajanja dvolančane DNA pri temperaturi od 95 °C, sparivanju lanca kalupa sa početnicama pri 54 °C te produljivanju lanca pomoću *Pfu* DNA.polimeraze (*Thermo Scientific*), termostabilnom DNA-polimerazom iz hipertermofilne arheje *Pyrococcus furiosus,* koja sadržava 3' prema 5' egzonukleaznu aktivnost čime popravlja pogrešno ugrađene nukleotide i osigurava iznimno niske pogreške. Potrebno je bilo prethodno dizajnirati početnice, koje su prema uputama proizvođača na svojim 5' krajevima trebale imati 18 točno određenih

nukleotida kojima se kasnije vrši rekombinacija sa vektorom pETite N-His SUMO Kan. Početnice su sintetizirane u tvrtci *Sigma Aldrich*. U tablici 1 se nalaze nukleotidne sekvence početnica koje su korištene za umnažanje gena *crdA*, dok se u tablici 2 nalazi sastav pripremne reakcijske smjese korištene u PCR eksperimentu kojoj se neposredno pred početak PCR reakcije dodaje *Pfu* DNA-polimeraza. Tablica 3 predstavlja korišten PCR protokol za umnažanje gena *crdA*.

Tablica 1. Početnice korištene za umnažanje gena *crdA*

Uzvodna početnica, G-CrdA_F1	5'-CGCGAACAGATTGGAGGTGGACAAACCCTAAAAGCCAATGATTTG-3'	*Tm* = 58,7 ºC
Uzvodna početnica, GS-CrdA_F2	5'-CGCGAACAGATTGGAGGTGGATCCCAAACCCTAAAAGCCAATGATTTG-3'	*Tm* = 58,7 ºC
Nizvodna početnica, CrdA_R	5'-GTGGCGGCCGCTCTATTATAAATCCAGGCTTGTTTTAGCG-3'	*Tm* = 58,6 ºC

Tablica 2. Pripremna reakcijska smjesa za PCR (engl. *master mix*)

10× reakcijski pufer s $MgSO_4$ (*Thermo Scientific*)	25 µL
otopina dNTP-ova (2,5 mmol L^{-1} svaki)	20 µL
forward početnica (10 µmol L^{-1})	25 µL
reverse početnica (10 µmol L^{-1})	25 µL
DNA kalup (plazmid)	1,25 µL
Pfu DNA polimeraza (*Thermo Scientific*)	/
sterilna redestilirana H_2O	152,75 µL

Nakon priprave tzv. master mixa, odpipetiralo se 99,5 μL smjese master mixa u dvije mikroepruvete za PCR reakciju te se u svaku dodalo 0,5 μL *Pfu* DNA polimeraze (2,5 U μL^{-1}) (*Thermo Scientific*). Potrebno je naglasiti kako su pripremljena dva *master mixa,* u kojim su bile različite *forward* početnice (*reverse* početnice su bile jednake), stoga se zapravo radilo o 4 PCR reakcije od kojih su po dvije bile jednake. Takvu se promješanu smjesu postavilo u PCR uređaj (*Thermal Cycler, Eppendorf*) te namjestio program rada prikazan u tablici 3.

Tablica 3. PCR protokol

početna denaturacija	95 °C	2 min	
denaturacija	95 °C	30 s	30 puta
vezanje početnice na kalup	**54 °C**	30 s	
produljenje	72 °C	2 min/kb	
završno produljenje lanca	72 °C	10 min	
držanje na temperaturi	4 °C	∞	

3.3.3. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu nakon PCR reakcije

Nakon provedene PCR reakcije u čijim se mikroepruvetama za PCR nalazilo 100 μL uzorka, što predstavlja velik volumen, potrebno je bilo provjeriti uspješnost umnažanja gena *crdA* te kasnije izolirati i pročistiti ciljani PCR produkt koji se koristio dalje u kotransformaciji. Deoksiribonukleinske kiseline posjeduju fosfatne skupine koje čine DNA negativno nabijenom molekulom pri neutralnom pH, dok ukupni naboj ovisi o veličini molekule. Stoga se može i očekivati kako će pod utjecajem električnog polja, fragmenti DNA putovati kroz agarozni gel prema pozitivnoj elektrodi koju nazivamo anodom, ovisno o veličini i obliku. Na takav način se fragmenti različite veličine mogu razdvojiti i kasnije, izrezivanjem iz gela, pročistiti. Istovremeno se dodatkom markera u dodatnu jažicu, može otprilike odrediti veličina fragmenta, jer markeri se sastoje od fragmenata točno definirane veličine.

Stoga je bilo potrebno prvo pripremiti 1 % agarozni gel što se učinilo otapanjem 3 g agaroze u 300 mL TAE pufera (sastav TAE pufera prikazan u tablici 4.). Otopinu se pažljivo zagrijalo u mikrovalnoj pećnici, te nakon potpunog otapanja, otopina se kratko ohladila i izlila u kalup za izlijevanje gelova koji je sadržavao češljić za nastajanje jažica. Pripremio se velik gel, iz razloga što je volumen u PCR reakcijama bio velik, kako bi se kasnije, pri pročišćavanju PCR produkta, moglo što više takvog produkta dobiti. Gel je nakon izlijevanja, pušten da se ohladi i

polimerizira u kalupu te kasnije prebačen u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazio TAE pufer.

Tablica 4. Sastav TAE pufera

Trizma®	40 mmol L^{-1}
octena kiselina	20 mmol L^{-1}
EDTA (pH = 8,0)	1 mmol L^{-1}

Uzorke PCR produkata je prije nanošenja u jažice agaroznog gela, bilo potrebno pripremiti, što se učinilo na slijedeći način: 100 μL PCR produkata je pomiješano sa 10 μL 10× pufera za nanošenje (sastava: γ (ksilencijanolfluorofosfat) = 2,5 g dm^{-3}, γ (bromfenol-plavo) =2,5 g dm^{-3}, c (EDTA) = 0,07 mol dm^{-3}, φ (glicerol) = 30 %, pH = 8) koji sadrži 100× GelRed™ boje. Provedene su dvije elektroforeze u vremenu od 50 minuta pri naponu od 120 V, od kojih je jedan bio u kvalitativne, a drugi u kvantitativne svrhe. U većem gelu (kvantitativnom gelu koji se kasnije koristio za izrezivanje i pročišćavanje PCR produkta) u jažice su se povrh 12 μL markera veličine (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, *Thermo Scientific*) koji je sadržavao 100× GelRed™ boje, nanosilo 108 μL obrađenih PCR produkata iz PCR reakcije (u četiri jažice, redom) puferom za nanošenje. Elektroforeza sa manjim gelom služila je za prethodnu potvrdu, kako se može ići u trošak većeg gela i cijelog uzorka. U manji gel se povrh 12 μL markera veličine (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, *Thermo Scientific*) koji je sadržavao 100× GelRed™ boje, nanosilo 2 μL obrađenih PCR produkata iz PCR reakcije (u četiri jažice, redom) puferom za nanošenje. Detekciju DNA omogućava GelRed™ koji se interkalira između parova baza, što uvelike povećava intenzitet fluorescencije, te se ozračenjem uzorka pomoću UV-lampe može odrediti pozicija svakog od fragmenata DNA. Gelovi su nakon elektroforeze, snimljeni pomoću kamere MiniBIS Pro (*Bio-Imaging Systems, Zavod za biokemiju, KO*).

3.3.4. Kloniranje

Kako bi se uklonirao gen *crdA* koji se nalazi u genomu bakterije *Helicobacter pylori* soja P12, koristio se komercijalno dostupan komplet *Expresso® T7 SUMO Cloning and Expression System* (*Lucigen*). Komplet sadržava pETite N-His SUMO Kan vektor, koji služi za prekomjernu ekspresiju fuzijskog proteina koji se sastoji od heksahistidinskog privjeska na N-kraju, proteina SUMO (eng. *small ubiquitin-like modifier*). Takav SUMO sustav se najčešće

koristi kada je riječ o ekspresiji proteina iz nekih drugih organizama koji sami, bez fuzije sa SUMO proteinom, stvaraju inkluzijska tijela te SUMO protein omogućava tj. poboljšava topljivost i stabilnost proteina od interesa iz drugih organizama u bakteriji *Escherichia coli*. Kloniranje u ovakvom sustavu se temelji na rekombinaciji te ne zahtjeva korištenje restrikcijskih enzima, pročišćavanja te ligaze pri kasnijim ligacijama. Do same rekombinacije umnoženog gena lančanom reakcijom polimeraze i linearnog vektora pETite N-His SUMO Kan dolazi nakon kotransformacije unutar specifičnog soja HI-Control 10G stanica *E. coli*.

3.3.5. Izolacija PCR produkta

Nakon izvršene elektroforeze DNA u agaroznom gelu, gel je pogledan pod UV svjetlom te su izrezane vrpce u jažicama 1, 2, 3, te 4 koje po broju nukleotida odgovaraju ciljanom PCR produktu. Takve izrezane vrpce su izvagane te prenijete u mikroepruvete. PCR produkt je pročišćen koristeći se komercijalno dostupnim kompletom GenElute^{TM} Gel Extraction Kit (*Sigma Aldrich*) po uputama proizvođača, s jedinom iznimkom, elucije u zadnjem koraku koja je bila vršena s 30 μL elucijskog pufera.

3.3.6. Određivanje koncentracije PCR produkta

Koncentracije PCR produkta bile su određene na instrumentu NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*). Potrebno je bilo nulirati uređaj s vodom te kasnije s elucijskim puferom u kojem se nalazi PCR produkt. Koncentracija se određivala spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije uzorka pri valnoj duljini od 260 nm. Mjerno područje instrumenta se nalazi u području od 2 − 37000 ng μL^{-1}.

3.3.7. Lančana reakcija polimeraze na kolonijama (kolonijski PCR)

Nakon kotransformacije kemijski kompetentnih HI-Control 10G stanica *E. coli* te rasta bakterijskih kolonija, potrebno je prije izolacije plazmida i slanja plazmida na sekvenciranje, provjeriti ukoliko je zaista došlo do ugradnje gena u vektore odnosno provjeriti kako nije došlo do transformacije i unošenja praznog plazmida (prazni plazmid se uobičajeno smatra plazmidom s neuspješnom ugradnjom ciljnog gena). Cijeli takav proces provjerava se lančanom reakcijom polimeraze koja ima identičnu teorijsku osnovu poput u poglavlju 3.3.2, uz male korekcije. Koriste se druge početnice, koje prema uputama proizvođača jesu *SUMO Forward*

te *pEtite Reverse*. One, naime, sjedaju na kalup, na puno većoj udaljenosti od početnica prikazanih u poglavlju 3.3.2, na način da takvim PCR reakcijama zahvaćaju (ne)ugrađeni gen te nukleotidne sljedove koje su uzvodno i nizvodno od sekvence ciljnog gena. Kao kalupi se koriste plazmidi iz bakterijskih stanica, koje je potrebno u sterilnim uvjetima, prenijeti u tzv. *master mix* za PCR na kolonijama, te u programu PCR protokola je stoga nužno povećati vrijeme početne denaturacije kako bi plazmid iz bakterije mogao prijeći u otopinu i postati kalup. Isto tako, nije nužno koristiti *Pfu* DNA-polimerazu, koja iznimno vjerno prepisuje genetički materijal, već se koristi *Taq* DNA-polimeraza koja je puno procesivnija, ali i manje točnija, što nam u ovakvom eksperimentu nije bitno, već nam je jedino bitno dobiti informaciju ukoliko je došlo do ugradnje gena u vektor, što se kasnije nakon agarozne elektroforeze, može vidjeti, a kasnijim sekvenciranjem i potvrditi. U tablici 5 se nalaze nukleotidne sekvence početnica koje su korištene u PCR-u na kolonijama, dok se u tablici 6 nalazi sastav pripremne reakcijske smjese korištene u PCR eksperimentu kojoj se neposredno pred početak PCR reakcije, nastavkom za pipetu dodaju bakterijske stanice iz pojedinih kolonija. Tablica 7 predstavlja korišten protokol za PCR na kolonijama.

Tablica 5. Početnice korištene za PCR na kolonijama

Uzvodna početnica, *SUMO Forward*	5'–ATTCAAGCTGATCAGACCCCTGAA–3'
Nizvodna početnica, *pETite Reverse*	5'–CTCAAGACCCGTTTAGAGGC–3'

Tablica 6. Pripremna reakcijska smjesa za PCR na kolonijama (engl. *master mix*)

10× *Taq* reakcijski pufer (*Thermo Scientific*)	25 μL
magnezijev klorid (25 mmol L^{-1}, *Thermo Scientific*)	15 μL
otopina dNTP-ova (2,5 mmol L^{-1} svaki)	20 μL
SUMO Forward početnica (50 μmol L^{-1})	2,5 μL
pETite Reverse početnica (50 μmol L^{-1})	2,5 μL
DNA kalup (bakterijske stanice)	/
Taq DNA polimeraza (5 U μL^{-1}, *Thermo Scientific*)	1,3 μL
sterilna redestilirana H_2O	183,7 μL

Tablica 7. Protokol za PCR na kolonijama

početna denaturacija	95°C	10 min	
denaturacija	95°C	30 s	30 puta
vezanje početnice na kalup	**55°C**	30 s	
produljenje lanca	72°C	2 min/kb	
završno produljenje lanca	72°C	10 min	
držanje na temperaturi	4 °C	∞	

Nakon priprave tzv. *master mixa*, odpipetiralo se 20 μL smjese master mixa u dvanaest mikroepruveta za PCR reakciju te se u svaku mikroepruvetu, uz sterilne uvjete sa petrijevke nastavkom za pipetu prenijelo bakterijske kolonije 1-5 sa petrijevke koje su sadržavale PCR produkt koji bi trebao imati vektor pETite N-His SUMO Kan s ugrađenim genom *G-crdA(-)* te bakterijske kolonije 6 − 10 koje su sadržavale PCR produkt koji bi trebao imati vektor pETite N-His SUMO Kan s ugrađenim genom *GS-crdA(-)*. Također se, kao negativna kontrola koristio prazan vektor pETite N-His SUMO Kan kojeg se u jednu od mikroepruveta za PCR sa master mixom dodalo 0,4 μL koncentracije vektora 12,5 ng μL^{-1}. Takvu se promješanu smjesu postavilo u PCR uređaj (*Thermal Cycler, Eppendorf*) te namjestio program rada prikazan u tablici 3.

3.3.8. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu nakon PCR reakcije na kolonijama

Elektroforeza DNA u agaroznom gelu nakon PCR reakcije na kolonijama provedena je po istim pravilima poput u poglavlju 3.3.4, uz iznimku drukčije pripreme markera i PCR uzoraka prije nanošenja na gel i trajanja elektroforeze. Naime, 1 μL uzoraka svih *colony* PCR (ili PCR na kolonijama) produkata je bilo pomiješano sa 2 μL 5× pufera za nanošenje na gel te 1 μL 100× GelRed™ boje uz dodatak 6 μL redestilirane vode. Isto tako marker je pripremljen na način da je 3 μL markera veličine (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, *Thermo Scientific*) pomiješano s 2 μL 5× pufera za nanošenje na gel, 1 μL100× GelRed™ boje te 4 μL redestilirane vode. U jažice su nanešena 2 μL obrađenog uzorka markera veličine te svih uzoraka PCR reakcija na kolonijama. Elektroforeza je provedena uz stalni napon od 120 V u trajanju od 35 minuta.

3.3.9. Izolacija plazmidne DNA

Za izolaciju plazmidne DNA tj. rekombinantnih plazmida (pETite^{TM} N-His SUMO-CrdA(-), pETite^{TM} N-His SUMO-G-CrdA(-) Kan te pETite^{TM} N-His SUMO-GS-CrdA(-) (*Lucigen*)) korišten je komercijalni komplet GenElute^{TM} HP Plasmid Miniprep Kit (*Sigma Aldrich*) po uputama proizvođača, s iznimkom kako je u zadnjem koraku eluiran uzorak sa 30 μL elucijskog pufera. Ovakav sustav izolacije je temeljen na metodi alkalne lize, u kojoj se nakon razaranja bakterijskih stanica, plazmidi vežu na male kolone, te nakon serija ispiranja, plazmid eluira pomoću elucijskog pufera.

3.3.10. Određivanje koncentracije rekombinantnog plazmida tj. plazmidne DNA

Koncentracije plazmidne DNA bile su određene na instrumentu NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*). Potrebno je bilo nulirati uređaj s vodom te kasnije s elucijskim puferom u kojem se nalazi plazmidna DNA. Koncentracija se određivala spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije uzorka pri valnoj duljini od 260 nm. Mjerno područje instrumenta se nalazi u području od $2 - 37000$ ng μL^{-1}.

3.3.11. Sekvenciranje

Izolirani plazmidi za sekvenciranje su pripremljeni prema uputama tvrtke koja obavlja poslove sekvenciranja (*Macrogen*). Uz izolirane plazmide (pETite^{TM} N-His SUMO-G-CrdA(-) Kan te pETite^{TM} N-His SUMO-GS-CrdA(-)), bilo je potrebno poslati u paketu i početnice *SUMO Forward* te *pEtite Reverse*.

3.3.12. Analiza nukleotidnih sljedova

Nakon sekvenciranja od strane tvrke *Macrogen*, slijedila je analiza sekvenci tj. nukleotidnih sljedova koja je napravljena pomoću NCBI-jevog alata (od engl. *National Center for Biotechnology Information*) BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*), usporedbom dobivenih rezultata s teoretski predviđenim rezultatima.

3.4. Metode rada s proteinima

3.4.1. Prekomjerna ekspresija u T7 ekspresijskom sustavu

pET sustav se po mnogim sveučilišnim knjigama i znanstvenim literaturama smatra jednim od najboljih i najkorištenijih sustava za ugradnju željenih gena u plazmid, kloniranje te induciranje prekomjerne ekspresije proteina u domaćinu – bakteriji *E. coli*. Koristi se soj BL21(DE3) bakterije *E.coli* koji ne sadrži gene za Lon i ompT proteazu koje bi u kasnijim procesima pročišćavanja proteina mogle razoriti ciljni protein. Također je u kromosomskoj DNA dodatno ugrađen gen *lacI* za protein lac represor. *lac* operon se sastoji od *lac* promotora, *lac* operatora te *T7* gena 1 koji kodira za protein T7-RNA-polimerazu. Dodatkom IPTG-a (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid) u otopinu takvih stanica, dolazi do kompeticije IPTG-a i operatora za vezanje na *lac* represor, te preferencijalnog vezivanja IPTG-a na *lac* represor, čime se oslobađa mjesto na *lac* operatoru, te se bakterijska RNA-polimeraza može vezati na promotor operator je slobodan, te sterički ne ometa vezanje RNA-polimeraze na promotor te transkribirati T7 gen 1, čime u konačnici dolazi do sinteze specifične T7-RNA-polimeraze. Plazmid sadrži T7 promotorsku regiju na koju, uslijed dodatka IPTG-a, novosintetizirana T7-RNA-polimeraza započinje s transkripcijom ugrađenih željenih gena, što će u konačnici rezultirati sintezom željenog proteina.

3.4.2. Postav noćne kulture bakterijskih stanica E. coli *za ekspresiju fuzijskog proteina HP1026*

S obzirom na činjenicu kako je za postavljanje i optimizaciju uvjeta kristalizacije potrebna velika količina proteina relativno visokih koncentracija, potrebno je bilo prethodno ponovno uzgojiti i pročistiti fuzijski protein HP1026 s His-privjeskom na N-kraju. Na temperaturi od -80 °C, bio je pohranjen prethodno pripravljen (iz prethodnih istraživanja) alikvot glicerolske kulture bakterijskih stanica *E. coli* soja BL21(DE3) koji sadrži vektor s ugrađenim genom za sintezu fuzijskog proteina HP1026. Sterilnim nastavkom za pipetu zagrabljen je dio uzorka po površini zamrznute glicerolske kulture u mikroepruveti te uz otvoren plamen prenijet u sterilnu konusnu epruvetu od 50 mL (falkonica od engl. *Falcon*) s 5 mL LB medija u kojem je prethodno dodan antibiotik ampicilin do konačne koncentracije od 100 μg mL^{-1}. Potom su uzgajane stanice u prekonoćnom uzgoju u inkubatoru (*Thermo Scientific*) na 37 °C uz neprestano

miješanje pri 250 rpm-a. Ukupno je uzgojeno 50 mL prekonoćne kulture zbog potrebe za uzgoj proteina u velikim količinama.

3.4.3. Postav noćne kulture bakterijskih stanica E. coli za ekspresiju fuzijskog proteina SUMO-CrdA(-) te SUMO-CrdA

Dan nakon što se kultura bakterijskih stanica nasadila na kruti medij, došlo je do rasta bakterija te su odabrane po tri kolonije od kojih je od svake kolonije - polovina kolonija prenešena na krutu hranjivu podlogu u petrijevkama te inkubirana preko noći na 37 °C . Druga je polovina kolonija sterilnim nastavcima za pipete (engl. *tips*) uz otvoren plamen prenijeta u plastičnu sterilnu konusnu epruvetu od 50 mL (falkonica od engl. *Falcon*) s 5 mL LB medija u kojem je prethodno dodan antibiotik kanamicin do konačne koncentracije od 30 μg mL^{-1}. Stanice su potom prekonoćno uzgajane u inkubatoru (*Biosan*) na 37 °C uz neprestano mješanje pri 250 rpm-a. Petrijevke su nakon korištenja ponovno zatvorene parafilmom te pohranjene na 4 °C.

3.4.4. Indukcija ekspresije fuzijskog proteina HP1026

Odpipetirano je osam puta po 5 mL stanične kulture u sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu (volumena 2 L) gdje je prethodno dodano 495 mL LB medija kako bi se postiglo razrjeđenje kulture sa LB medijem u 1:100 omjeru, uz dodatak ampicilina do konačne koncentracije od 100 μg mL^{-1}.

Tada je nastavljen uzgoj na 37 °C uz protresanje pri 250 rpm-a, te je svakih sat vremena uzet alikvot uzoraka je praćen rast stanica mjerenjem optičke gustoće (apsorbancije na UV/Vis spektrofotometru) pri valnoj duljini 600 nm. Kada je OD_{600} kulture dosegla vrijednost između 0,5-0,9 (nakon otprilike tri sata), započeta je indukcija dodatkom 250 μL 1 mol L^{-1} IPTG-a do konačne koncentracije IPTG-a od 0,5 mmol L^{-1}. Takva je kultura potom inkubirana 4 sata na 37 °C na tresilici pri 250 rpm-a. Također su alikvoti uzoraka (50 μL) prije i nakon indukcije spremljeni za kasniju analizu sa SDS-PAGE tehnikom. Nakon indukcije, stanična kultura je centrifugirana u specifičnim posudama za centrifugiranje velikih volumena staničnih kultura te su stanice istaložene centrifugiranjem pri 5000 rpm-a, 15 minuta pri temperaturi od 4 °C. Supernatant je potom odliven, dok su talozi bakterijskih stanica prebačeni u konusne epruvete te zamrznuti na -80 °C.

3.4.5. Indukcija ekspresije fuzijskog proteina SUMO-CrdA, SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-)

Dan nakon postava noćne kulture bakterijskih stanica *E. coli* za ekspresiju fuzijskih proteina SUMO-CrdA, SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-), odabrane su dvije od tri kolonije s kojima se išlo dalje u indukciju ekspresije fuzijskih proteina na maloj skali (do 100 mL stanične kulture), što je u slučaju uspješnosti procesa, napravljeno i na većoj skali (500 mL kulture u sterilnoj Erlenmeyerovoj tikvici od 2 L). Odpipetiran je 1 mL stanične kulture u sterilnu Erlenmeyerovu tikvicu (volumena 1 L) gdje je prethodno dodano 99 mL LB medija kako bi se postiglo razrjeđenje kulture sa LB medijem u 1:100 omjeru, uz dodatak kanamicina do konačne koncentracije od 30 μg mL^{-1}.

Tada je nastavljen uzgoj na 37 °C uz protresanje pri 250 rpm-a, te se svakih sat vremena alikvotirao uzorak te pratilo rast stanica mjerenjem optičke gustoće (apsorbancije na UV/Vis spektrofotometru) pri valjnoj duljini 600 nm te kada je OD_{600} kulture dosegla vrijednost između 0,5 - 0,9 (nakon otprilike tri sata), započela se indukcija dodatkom 1 mol L^{-1} IPTG-a do konačne koncentracije IPTG-a od 1 mmol L^{-1}. Takvu je kultura potom inkubirana 3 sata na 37 °C na tresilici pri 250 rpm-a. Također su alikvoti uzoraka (50 μL) prije i nakon indukcije spremljeni za kasniju analizu sa SDS-PAGE tehnikom. Nakon indukcije, stanična kultura je centrifugirana u posudama za centrifugiranje te stanice su staložene centrifugiranjem pri 5000 g, 25 minuta pri temperaturi od 4 °C. Supernatant je potom odliven, dok su talozi bakterijskih stanica zamrznuti na -80 °C. Također se i pripremio alikvot za glicerolnu kulturu na sljedeći način: u sterilnu mikroepruvetu (2 mL) odpipetiralo se 1 mL 50 % glicerola u koji se kasnije dodao 1 mL prekonoćne stanične kulture kako bi se dobilo 25 %-tnu glicerolnu smjesu bakterijskih stanica te su se takve dvije (stanične kulture od odabranih dviju kolonija) mikroepruvete odmah pohranile na -80 °C, s obzirom da bakterijske stanice ne preživljavaju dugo na sobnoj temperaturi u takvim uvjetima, dok im glicerol služi kao krioprotektant.

3.4.6. Priprema proteinskih ekstrakata SUMO-CrdA, SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) sonikacijom

Nakon indukcije, eksprimirani proteini nalaze se u bakterijskim stanicama u velikim koncentracijama. Kako bi se protein mogao pročistiti, potrebno je razbiti bakterijske stanice da bi se protein mogao kasnije izolirati. U ovom radu, liza stanica je vršena sonikacijom. Tehnika sonikacije predstavlja tehniku kojom se ultrazvukom lizira bakterijske stanice odnosno pucaju

stanične membrane i stjenke te stanične tvari izlaze iz stanice te se neke od njih otapaju u otapalu.

Prvi korak je zahtijevao otapanje zamrznutih taloga na ledu, nakon kojeg se stanični talog resuspendirao u puferu za lizu (engl. *Lysis buffer*, 50 mmol L^{-1} Tris, 300 mmol L^{-1} NaCl, pH = 8,0) kako bi se otprilike postigao omjer od 3 mL pufera po gramu staničnog taloga, uz dodatak inhibitora serinskih proteaza, PMSF-a (fenilmetilsulfonil-fluorid, od engl. *phenyl-methylsulphonyl fluoride*) (do konačne koncentracije od 1 mmol L^{-1}).

Sonikator (*VibraCell™, 50 Watt Model, Bioblock Scientific)* je bilo potrebno baždariti prema uputama proizvođača, te je kasnije sonicirano 7 puta bakterijske stanice u ciklusima po minutu uz pauzu od minute kako ne bi došlo do zagrijavanja uzoraka, što je čest slučaj. Lizat je bilo potrebno poslije centrifugirati 20 minuta pri 6000 g na 4° C. Supernatant se odvojio od taloga te zamrznuo na -80 °C, dok je talog također spremljen na -80 °C, u slučaju lošeg soniciranja uzorka. Također su se prethodno uzeli alikvoti (50 μL) taloga i supernatanta za kasniju analizu SDS-PAGE tehnikom.

3.4.7. Priprema proteinskih ekstrakata fuzijskog proteina HP1026 sonikacijom

Prvi korak je zahtjevao otapanje zamrznutih taloga na ledu, nakon kojeg se stanični talog resuspendirao u puferu za lizu 2 (engl. *lysis buffer*) prikazanog u tablici 8 kako bi se otprilike postigao omjer od 3 mL pufera po gramu staničnog taloga.

Tablica 8. Sastav pufera za lizu 2

Tris (pH = 7,5)	20 mmol L^{-1}
natrijev klorid	150 mmol L^{-1}
PMSF	2 mmol L^{-1}

Sonikator (*VibraCell™, 50 Watt Model, Bioblock Scientific)* je bilo potrebno baždariti prema uputama proizvođača, te je kasnije sonicirano 7 puta bakterijske stanice u ciklusima po minutu uz pauzu od minute kako ne bi došlo do zagrijavanja uzoraka, što je čest slučaj. Lizat je bilo potrebno poslije centrifugirati 30 minuta pri 18 000 rpm-a na 4 °C. Supernatant se odvojio od taloga te zamrznuo na -80 °C, dok je talog također spremljen na -80 °C, u slučaju lošeg soniciranja uzorka.

3.4.8. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (engl. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*)*

Prije elektroforeze, bilo je potrebno napraviti gelove što je i učinjeno po uputama u tablici 11. Za ovaj protein bio je dovoljan 16 % gel za razdvajanje,. Nakon priprave otopine gela za razdvajanje, otopina je ulivena u kalupe između dva stakla do 1,6 cm ispod ruba stakla te je pažljivo nadslojena sa redestiliranom vodom zbog što bolje polimerizacije gela. Nakon 35 minuta gel je izpolimerizirao, voda se izlila te se ulila prethodno pripremljena otopina gela za sabijanje, sve do vrha. Odmah se unio i kalup za stvaranje jažica na vrh glavnog kalupa. Nakon polimerizacije gela za sabijanje, cijeli kalup sa gelovima se unio u kadicu za elektroforezu koja se do oznake (po uputama proizvođača) puni sa puferom za elektroforezu (tablica 12). Uzorci koji će kasnije biti nanešeni u jažice su bili prethodno obrađeni. Alikvoti uzoraka (10 μL) su se pomiješali sa otopinom pufera za obradu proteina (tablica 13) (5 μL). Uzorci su se potom denaturirali zagrijavanjem na termobloku pri temperaturi od 95 °C deset minuta. Na svaki gel se u prvu jažicu nanio marker molekulskih masa (*Biorad*) u volumenu od 5 μL, dok su se u ostale jažice nanijeli denaturirani uzorci u volumenu od 10 μL.

Pri elektroforezi, korišten je sustav za elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra System (*Biorad*) te PowerPac Basic (*BioRad*). Elektroforeza se provodila pri konstantnom naponu od 110 V za postizanje sabijanja kroz gel za sabijanje 30 minuta, te pri konstantnom naponu od 185 V kroz gel za razdvajanje u vremenu koje je bilo potrebno da uzorci stignu do samog dna gela. Gelovi su se nakon elektroforeze bojili u petrijevki sa *Coomasie* otopinom za bojanje petnaest minuta u inkubatoru pri sobnoj temperaturi uz mješanje od 110 rpm-a. Nakon bojenja slijedilo je odbojavanje gelova, što se vršilo uranjanjem i višestrukim ispiranjem gelova u vrućoj redestiliranoj vodi. Gelovi su nakon odbojenja pohranjeni u petrijevkama sa destiliranom vodom te fotografirani za analizu.

Tablica 9. Sastav pufera za razdvajanje 4× SDS (100 mL, pH = 8,8)

Trizma®	18,16 g
SDS	0,40 g
Redestilirana H_2O	80 mL
titrirano s koncentriranom HCl do pH = 8,8 i nadopunjeno redestiliranom H_2O do 100 mL	

Tablica 10. Sastav pufera za sabijanje 4× SDS (100 mL, pH = 6,8)

Trizma®	6,06 g
SDS	0,40 g
Redestilirana H_2O	80 mL
titrirano s HCl (6 mol L^{-1}) do pH = 6,8 i nadopunjeno redestiliranom H_2O do 100 mL	

Tablica 11. Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje

	Gel za sabijanje 4 %	Gel za razdvajanje 16 %	Gel za razdvajanje 20 %
aa/bis 29:1 40 %	0,4 mL	4,0 mL	5,0 mL
Pufer za razdvajanje 4× SDS (pH = 8,8)	/	2,5 mL	2,5 mL
Pufer za sabijanje 4× SDS (pH = 6,8)	1,0 mL	/	/
redestilirana H_2O	2,6 mL	35 mL	2,5 mL
20 % APS	14,0 μL	35 μL	35,0 μL
TEMED	2,0 μL	35 μL	5,0 μL

Tablica 12. Sastav pufera za elektroforezu (10× SDS-PAGE *Running buffer*)

	odvage	konačne koncentracije
Trizma®	30,3 g	250 mmol L^{-1}
glicin	144,1 g	1,92 mol L^{-1}
SDS	10,0 g	1 %
redestilirana H_2O	do 1 L	/

Najčešće se koristi 1× pufer za elektroforezu koji se dobije desetorostrukim razjeđenjem 10× pufera za elektroforezu.

Tablica 13. Sastav pufera za obradu proteina (4×)

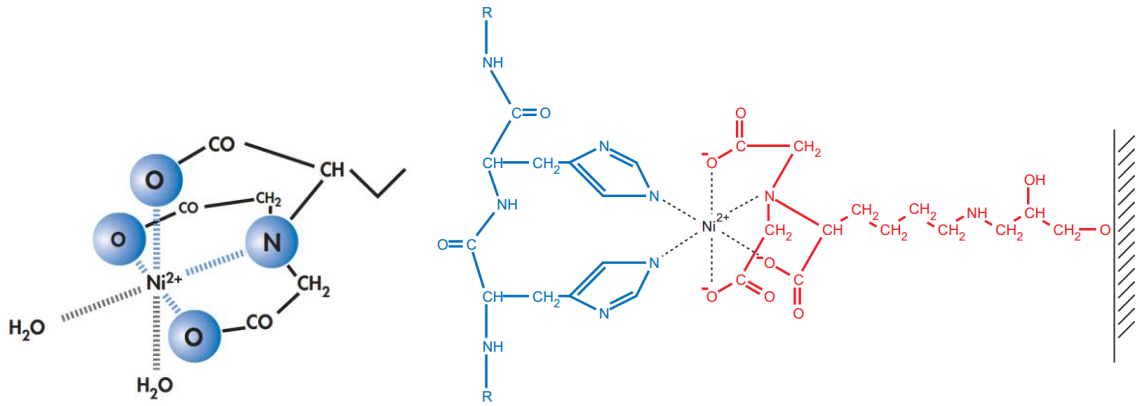
Trizma® (titrirano HCl-om do pH = 6,8)	62,5 mmol L^{-1}
β-merkaptoetanol	12,5 mmol L^{-1}
SDS	1,25 % (*w/v*)
bromfenol plavo	0,002 % (*w/v*)
glicerol	6,25 % (*w/v*)

Tablica 14. Sastav Coomassie otopine za bojenje gelova

Coomassie Brilliant Blue R-250	2,5 g L^{-1}
octena kiselina	10 % (*v/v*)
etanol	45 % (*v/v*)

3.4.9. Pročišćavanje fuzijskog proteina HP1026 afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima (IMAC)

Za pročišćavanje proteina HP1026 tehnikom afinitetne kromatografije, kao kolona, korištena je HisTrap HP (*GE Healthcare*) volumena 1 mL koja kao punilo sadrži agarozne kuglice imobilizirane s nitrilotrioctenom kiselinom koordiniranom na niklove metalne centre (slika 13). Korištene su dvije takve kolone, spojene serijski (kako bi se u jednom koraku moglo što veće količine proteina pročistiti), na *ÄKTA* sustav za brzu tekućinsku kromatografiju proteina. Takav sustav je omogućio automatizirani protok tekuće faze kroz kolonu uz stalan tlak (3 bar, propisan od proizvođača Ni-NTA kolone) te temperaturu od 16 °C. Prednost sustava je da posjeduje UV detektor na izlazu s kolone, čime se može pratiti elucija proteina koja se očituje porastom apsorbancije u realnom vremenu te se u poželjnom trenutku mogu skupljati samo frakcije za koje je sigurno da sadrže neki proteinski uzorak, dok elucija ciljanog proteina se odlikuje iznimno velikim porastom apsorbancijskih jedinica.



a) b)

Slika 13. a) Strukturni prikaz niklovog(II) centra koordiniranog s nitrilotrioctenom kiselinom koja je vezana na kuglice agaroze, te dvije molekule vode (slučaj bez postojanja proteina s His- privjeskom u otopini), b) strukturni prikaz niklovog(II) centra koordiniranog s nitrilotrioctenom kiselinom koja je vezana na kuglice agaroze, te proteinom preko bočnih ogranaka histidinskih aminokiselina iz histidinskog privjeska.[80]

Kolona je isprana s 50 mL sterilne destilirane H_2O te zatim ekvilibrirana s 50 mL pufera C (tablica 15). Svi puferi su nakon pripremanja te prije korištenja i nanošenja na kolonu degazirani ultrasoničkim pulsom petnaestak minuta na uređaju Elmasonic S 60 (*Elmasonic*). Nakon nanošenja proteinskog uzorka na kolonu, vršila se gradijentna elucija pomoću pufera D koji je sastavom identičan puferu C, dok dodatno samo sadrži visoku koncentraciju imidazola, stoga se u tu svrhu postepeno povećavala koncentracija pufera D (tablica 15), na način da je prvih 30 mL elucija sadržavala 100 mmol L^{-1} imidazola, slijedećih 10 mL 300 mmol L^{-1} imidazola, slijedećih 10 mL 400 mmol L^{-1} imidazola te ostatak sa 500 mmol L^{-1} imidazola iz pufera D. Prikupljane su frakcije s 0,5 mL uzorka koje su pohranjene na led uz klasično alikvotiranje uzoraka radi kasnije analize na SDS-PAGE-u.

Tablica 15. Sastav pufera C te pufera D

	pufer C	pufer D
Trizma® (pH = 7,5)	20 mmol L^{-1}	20 mmol L^{-1}
natrijev klorid	120 mmol L^{-1}	120 mmol L^{-1}
kalijev klorid	30 mmol L^{-1}	30 mmol L^{-1}
magnezijev klorid	1 mmol L^{-1}	1 mmol L^{-1}
glicerol (*w/v*)	10 %	10 %
imidazol	/	500 mmol L^{-1}

3.4.10. Pročišćavanje fuzijskog proteina HP1026 kromatografijom isključenja (gel-filtracija)

Gel filtracija odnosno kromatografija isključenjem po veličini (eng. *size exclusion chromatography*) predstavlja takvu kromatografsku tehniku pri kojoj dolazi do procesa razdvajanja tvari na temelju njihove veličine i oblika na kromatografskoj koloni. U slučaju ovakve metode kao stacionarna faza u koloni se koristi inertno punilo tj. granule određenih tvari koje mogu sadržavat pore raznih veličina. Tijekom procesa elucije otopine koje sadrže tvari odnosno najčešće biološke makromolekule – proteine različitih molekularnih masa kroz kolonu, molekule veće od pora punila slobodno prolaze, dok tvari veličinom manje od pora, djelomično zaostaju u porama te na taj način dolazi do razdvajanja tvari različitih molekulskih masa. Gel filtracija se u proteinskoj kristalizaciji koristi nakon afinitetne kromatografije kako bi se dobio što čišći i homogeniji željeni protein te kako bi u konačnici protein mogao lakše kristalizirati.

U ovom radu korištena je Superose 12 10/300 GL kolona (*GE Healthcare*) koja je spojena na sustav *ÄKTA* za brzu tekućinsku kromatografiju čiji je rad prethodno objašnjen. Kolona je bila isprana s 55 mL sterilne destilirane vode te ekvilibrirana puferom C čiji je sastav prikazan u tablici 15. Potrebno je također naglasiti kako su voda te pufer C neposredno prije korištenja degazirani pomoću sustava Elmasonic S 60 (*Elmasonic*) te je tijekom cijelog procesa održavana temperatura od 4 °C. Nakon ekvilibracije kolone, nanošeni su prethodno spojeni uzorci proteina za koje se pomoću SDS-PAGE tehnike utvrdilo da je potrebno pročišćavanje, te su se skupljale frakcije volumena 250 μL. Nakon elucije, sve frakcije su kasnije analizirane SDS-PAGE tehnikom. Kolonu je kasnije bilo potrebno pročistiti destiliranom vodom te spremiti u otopini natrijeva azida koji spriječava rast i razvoj bakterijskih stanica.

3.4.11. Pročišćavanje fuzijskog proteina SUMO-CrdA, SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima (IMAC)

Supernatant nakon sonikacije sadrži pored pojačano eksprimiranih ciljanih fuzijskih proteina SUMO-CrdA, SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-), također i ostale proteine bitne stanici *E. coli* za rast, razvoj i život, stoga je potrebno pročistiti ciljani fuzijski protein. Genetičkim i proteinskih inženjerstvom dizajnirani su i eksprimirani proteini SUMO-CrdA, SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) koji na svom N-kraju imaju heksahistidinski privjesak te ih je stoga moguće pročistiti afinitetnom kromatografijom koja

sadrži ione metala koji su imobilizirani na nekom od punila, najčešće smolom ili agaroznim kuglicama. Kolona (4 mL) sadrži agarozne kuglice na koje je imobilizirana nitrilotrioctena kiselina (NTA) koja tetradentatno koordinira metalne centre nikla(II). Poznato je da je u vodenim otopinama nikal(II) heksadentatno koordiniran u oktaedarskoj geometriji, stoga preostala dva koordinacijska mjesta nikla(II) koja su koordinirana molekulama vode, mogu zauzeti dva susjedna histidina koja se koordiniraju preko ogranaka na niklov centar. Na taj način ciljani protein se ciljano veže na kolonu, dok svi ostali proteini koji se ne mogu vezati, jednostavno prolaze kroz kolonu. Eluciju ciljanog proteina vrši se puferom visoke koncentracije imidazola (500 mmol L^{-1}) koji kompetitira za dva koordinacijska mjesta na niklu(II) te time se eluira ciljani fuzijski protein.

Kolonu je prije upotrebe bilo potrebno očistiti od prethodno pročišćenih proteina što se učinilo na slijedeći način. U kolonu volumena 4 mL u kojoj su se nalazile agarozne kuglice do volumena od 2 mL, ulilo se do vrha kolone NaOH (1 mol L^{-1}) te inkubiralo na sobnoj temperaturi 2 - 3 minute bez protoka tekućine, nakon kojeg je otopina istekla do razine agaroznih kuglica što je uvijek bio slučaj sa istjecanjima tekućina kroz kolonu. Slijedeće se nanijelo 10 volumena kolone otopine F (tablica 16) te dvadeset volumena redestilirane vode. Razina tekućine se u koloni spustila do vrha agaroznih kuglica kako kolona ne bi presušila te se potom dodalo 4 mL $NiSO_4$ (c = 0,1 mol L^{-1}) te ostavilo 5 minuta da dođe do vezanja nikla(II) na kolonu. Potom se je kolona ispirana s 10 volumena destilirane vode te 5 volumena otopine F. U slučaju spremanja kolone, potrebno je kolonu nadslojiti s 20 %-tnim etanolom, te u slučaju ponovnog korištenja, kolona se isprala sa 10 volumena otopine F.

Tablica 16. Sastav otopine A te B

Otopine	F	B
Trizma® (pH = 7,4)	20 mmol L^{-1}	20 mmol L^{-1}
natrijev klorid	500 mmol L^{-1}	500 mmol L^{-1}
Imidazol	20 mmol L^{-1}	500 mmol L^{-1}

Nakon ispiranja kolone, volumen se u koloni spustio do granice uzorka agaroze te se nanio uzorak supernatanta (3,5 mL) koji se želi pročistiti, što se učinilo dva puta s istim uzorkom kako bi došlo do što boljeg vezanja za kolonu. Slijedilo je ispiranje otopinom A u deset volumena kolone te su se uzorci skupljali u Erlenmeyerovu tikvicu (100 mL). Nakon ispiranja, slijedila je

elucija ciljanog proteina sa otopinom B (tablica 16). Skupljalo se 15 frakcija po 1 mL uz tri predfrakcije. Svi uzorci su kasnije podvrgnuti SDS-PAGE elektroforezom kako bi se provjerilo u kojim frakcijama se nalazi ciljani protein, koje su čistoće te koje frakcije se mogu spojiti i koristiti dalje za postavljanje kristalizacijskih uvjeta. S obzirom na zadovoljavajuću čistoću, nije bilo potrebno dalje pročišćavati proteine gel-filtracijom zbog velikog broja čistih frakcija. Frakcije proteina su zamrznute na -20 °C do daljnjeg korištenja.

3.4.12. Kvantifikacija proteina

Iznimno je bitno bilo odrediti koncentraciju proteina koja je bila određena na spektrofotometru NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*). Instrument je prvo potrebno baždariti te nulirati instrument s vodom kao pozadinom (engl. *blank*) te puferom u kojem se protein nalazi. Nanosi se 2 μL uzorka što uvelike štedi na potrošnji uzorka. Uređaj kao rezultat određuje apsorbanciju određenog proteina pri valnoj duljini od 280 nm zbog apsorbancije aromatskih aminokiselina, što se kasnije preračunava pomoću molekulske mase i ekstincijskog faktora dobivenog teoretskim izračunom (online program *ProtParam*) u koncentraciju proteina izraženu u mg mL^{-1}.

3.4.13. Ugušćivanje fuzijskog proteina SUMO-CrdA, SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) te izmjena pufera

S obzirom na činjenicu kako je za postavljanje kristalizacijskih uvjeta potrebno imati vrlo čist protein u otopini koja ne sadrži tvari koje najčešće mogu utjecati na stabilnost proteina, potrebno je u mnogim slučajevima izmjeniti pufer. U ovom slučaju, problem predstavlja imidazol koji se u otopinama proteina nalazi u velikim koncentracijama zbog prirode elucije i afinitetne kromatografije. Također je potrebno naglasiti kako se izmjena pufera vrši i kada se želi omogućiti takve pufere koje same po sebi mogu biti krioprotektanti u kristalizacijskim uvjetima, što kasnije uvelike olakšava procese pripreme kristala proteina za snimanje.

U tu svrhu izmjene pufera koristili su se komercijalno dostupni centrikoni/koncentratori. Radi se o sustavu dvije plastične posude koje su odijeljene specifičnom hidrofilnom celuloznom membranom poznate gustoće koja može propustiti tvari odgovarajuće molarne mase. Svaki centrikon sadrži informaciju o molekulskoj masi tvari koje prolaze kroz centrikon koje su u ovom slučaju bile 10 kDa iz razloga što je naš protein molekulske mase oko 26 kDa. Radilo se o komercijalno dostupnim Vivaspin Turbo 4 (15 mL) (*Startorius*, cut-off 10 kDa). U centrikon

se stoga ulilo 500 μL proteina te 1,5 mL pufera A (tablica 17) te se započelo sa centrifugiranjem pri 5500 g na 4 °C, uz zaustavljanje centrifuge svakih sat vremena. Nakon što je došlo do spuštanja volumena do oznake za 500 μL, cijeli proces dodavanja pufera P je još tri puta ponovljen. Nakon izmjene pufera, više takvih volumena proteina sa izmjenjenim puferom se spojio te se ponovno spektrofotometrijski odredila koncentracija proteina. Uslijedilo je ponovno spuštanje volumena tj. ugušćivanje proteina, dok se između serija centrifugiranja, pratila koncentracija proteina kako ne bi došlo do prevelike koncentracije koja može dovesti do agregacije proteina odnosno precipitacije proteina, koji se kasnije ne mogu niti ne smiju koristiti za postavljanje kristalizacijskih uvjeta. Nakon postizanja zadovoljavajuće koncentracije proteina, uzorci su pohranjeni na -20 °C.

Tablica 17. Sastav pufera A

otopine	pufer A
Trizma® (pH = 8,0)	20 mmol L^{-1}
natrijev klorid	150 mmol L^{-1}
glicerol	10 %

3.4.14. Ugušćivanje fuzijskog proteina HP1026

Ponovljen je jednaki postupak kao u odjeljku 3.4.13 s iznimkom da je bilo potrebno prirediti ugustiti otopinu proteina nakon spajanja frakcija nakon gel filtracije s koncentracijom do 22 mg mL^{-1}, kako bi se moglo dodati ADP-a do konačne koncentracije od 6 mmol L^{-1}, odnosno uzorak proteina se razrijedio do konačne koncentracije proteina od 15 mg mL^{-1}. Uzorcima proteina određene su koncentracije, mjerenjem apsorbancije, metodom spektrofotometrije, pri valnoj duljini od 280 nm na uređaju *NanoDrop 1000* (*Thermo Scientific*).

3.4.15. Cijepanje fuzijskog proteina SUMO-CrdA(-), SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) pomoću SUMO Express proteaze

Specifična *SUMO Express* proteaza je vrlo robusna proteaza, originalno iz kvaščevog gena *ULP1*. Koristi se za uklanjanje SUMO proteinskog dijela iz SUMO-fuzijskog proteina nakon pročišćavanja. Specifično je dizajnirana za prepoznavanje te rezanje SUMO oznake u specifičnim proteinima dizajniranima pomoću *Lucigen* kompleta (eng. *Lucigen's Expresso*™

SUMO Cloning and Expression kits), specifično na N-kraju proteina. Također SUMO proteaza sadrži i histidinski privjesak, stoga se također veže na kolonu te nakon rezanja fuzijskog proteina dolazi do elucije ciljanog proteina, a na koloni zaostaju SUMO protein te SUMO proteaza.

Fuzijskom proteinu SUMO-CrdA(-) je prije dodatka proteaze, izmjenjen pufer (prikazano u poglavlju 3.4.13) te mu je izmjerena koncentracija koja je iznosila 8 mg mL^{-1}. Prema uputama proizvođača (*Lucigen*), u reakcijsku smjesu je potom dodano DTT-a (ditiotreitol) do konačne koncentracije od 2 mmol L^{-1} te je zatim na svakih 100 μg fuzijskog proteina, korištena 1 U proteaze (1 U μL^{-1}). Također se, paralelno provodio i protokol proteaznih aktivnosti uz korištenje blago denaturirajućih tvari poput uree te Tritona X-100 (protokol s uvjetima 1 te 2, redom, prikazan u tablici 18) za varijantu SUMO-CrdA(-). Fuzijskim proteinima SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) je prije dodatka proteaze, izmjenjen pufer (prikazano u poglavlju 3.4.13) te mu je izmjerena koncentracija koja je iznosila 1 mg mL^{-1}. Pripremljene su otopine s proteinima SUMO-G-CrdA(-) i SUMO-GS-CrdA(-) po uvjetu 3 kako bi se omogućilo rezanje fuzijskog proteina. Svi su uzorci inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi te preko noći na 4 °C. Uzorci su kasnije alikvotirani (20 μL) te provjereni SDS-PAGE metodom.

Tablica 18. Uvjeti prilikom procesa rezanja fuzijskog proteina SUMO-crdA(-),SUMO-G-crdA(-) te SUMO-GS-crdA(-) pomoću SUMO Express proteaze (*Lucigen*)

	uvjet 1	uvjet 2	uvjet 3
SUMO proteaza (1U μL^{-1})	0,5 μL	0,5 μL	3 μL
protein (8 mg mL^{-1} za uvjet 1 te 2, a 1 mg mL^{-1} za uvjet 3)	5 μL	5 μL	300 μL
glicerol (100 %)	/	/	60 μL
DTT (100 mmol L^{-1})	0,5 μL	0,5 μL	6 μL
urea (5 mol L^{-1})	5 μL	/	/
Triton X-100 (5 %, *w/v*)	/	2,5 μL	60 μL
pufer A	14 μL	16,5 μL	171 μL
konačni volumen	25 μL	25 μL	600 μL

3.5. Kristalizacije proteina

3.5.1. Kristalizacije fuzijskog proteina HP1026 pomoću seta aditivnih uvjeta

Kristalizacija proteina HP1026 provođena je metodom difuzije para otapala iz sjedeće kapi. Korišten je prethodno pročišćen uzorak proteina iste koncentracije od 15 mg mL^{-1} u koji je dodano ADP-a do konačne koncentracije od 2,5 mmol L^{-1}. Koristile su se kristalizacijske ploče (MRC Maxi 48-Well Crystallization Plate (*Swissci, Hampton Research*) s 48 jažica u svakoj od ploča. Princip postavljanja kristalizacijskih ploča je bio jednak u svim jažicama svih ploča. U velikom rezervoaru nalazilo se 90 μL otopine početnog kristalizacijskog uvjeta nazvanog C4 (sastav prikazan u tablici 19) te 10 μL aditiva (koji su u screenu bili različiti), dok se u malom rezervoaru nalazilo 1,8 μL otopine prethodno opisanog proteina te 1 μL pripremljenog kristalizacijskog uvjeta s aditivima. Ukupno je postavljeno 192 kristalizacijskih uvjeta koji su bili dio komercijalno dostupnih paketa s recipitantima za kristalizaciju.

Radilo se o paketima Morpheus Additive Screen (*Molecular dimensions*) te Silver Bullets (*Hampton Research*). Kristalizacijske ploče su zalijepljene specifičnom folijom te je polovina uzoraka pohranjena u komori na stalnoj temperaturi od 20 °C, dok je druga polovica s istim uvjetima pohranjena na temperaturi od 4 °C, radi praćenja procesa kristalizacija. Kristalizacijske ploče redovito su pregledavane pomoću svjetlosnog mikroskopa (*Olympus SZX12*), dok su kristali slikani pomoću kamere proizvođača *Dino-Lite*. Također kristali su slikani pomoću mikroskopa (*Olympus BX51M, Zavod za molekularnu biologiju, BO, PMF*) pri vidljivoj svjetlosti te pri valnoj duljini od 280 nm.

Tablica 19. Sastav otopine C4

Bis-tris propan (pH = 8,5)	0,1 mol L^{-1}
PEG 6000	20 % (*w/v*)
Kalijev tiocijanat	0,2 mol L^{-1}
magnezijev klorid	0,1 mol L^{-1}

3.5.2. Kristalizacije fuzijskog proteina SUMO-CrdA(-) pomoću setova početnih kristalizacijskih uvjeta

Kristalizacija proteina SUMO-CrdA provođena je metodom difuzije para otapala iz sjedeće kapi. Korišten je prethodno pročišćen uzorak proteina iste koncentracije od 8 mg mL^{-1} u koji

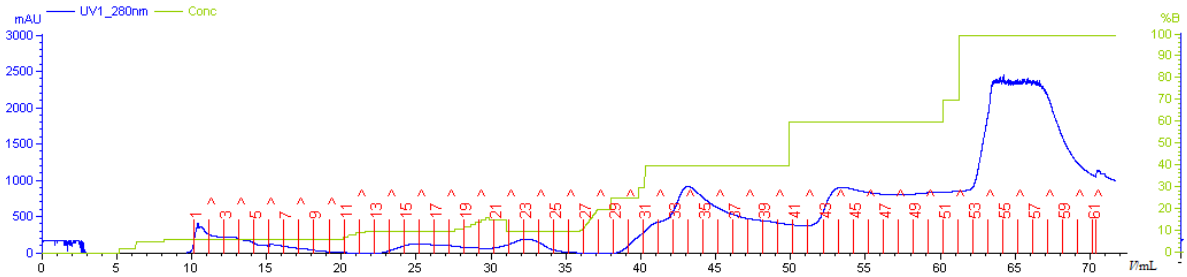
je dodano bakrovog(II) klorida do konačne koncentracije od 1 mmol L^{-1}. Korištene su kristalizacijske ploče (MRC Maxi 48-Well Crystallization Plate (*Swissci, Hampton Research*)) sa 48 jažica u svakoj od ploča. Princip postavljanja kristalizacijskih ploča je bio jednak u svim jažicama svih ploča. U velikom rezervoaru nalazilo se 100 μL otopine precipitanta iz kristalizacijskih paketa s različitim precipitantima poput različitih soli, pufera, metala, aminokiselina, peptida, polietilenglikola te šećera, dok u malom rezervoaru se nalazilo 1 μL otopine proteina prethodno opisanog te 1 μL precipitanta iz većeg rezervoara. U slučaju korištenja automatiziranog robota za postavljanje kristalizacije *Crystal Gryphon (Art Robbins Instruments*, Institut „Jožef Stefan“, Ljubljana), princip postavljanja kristalizacija je bio identičan, osim što je robot u malom rezervoaru miješao otopine 100 nL proteina prethodno opisanog sa 100 nL precipitanta. Ukupno je postavljeno 596 kristalizacijskih pokusa s različitim precipitantnim otopinama korištenjem komercijalnih paketa.

Radilo se o paketima kristalizacijskih uvjeta: NeXtal DWBlock JCSG Core Suite I (*Qiagen*), NeXtal DWBlock JCSG Core Suite II (*Qiagen*), NeXtal DWBlock JCSG Core Suite III (*Qiagen*), NeXtal DWBlock JCSG Core Suite IV (*Qiagen*), Morpheus® HT-96 (*Molecular Dimensions*), NeXtal DWBlock PACT Suite (*Qiagen*), The PEGs Suite (*Qiagen*), The PEGs II te Suite (*Qiagen*). Kristalizacijske ploče su zalijepljene specifičnom folijom te je polovina uzoraka pohranjena u komoru na stalnu temperaturu od 20 °C. Neke od kristalizacijskih ploča postavljene su pomoću automatiziranog robota za postavljanje kristalizacije *Crystal Gryphon (Art Robbins Instruments*, Institut „Jožef Stefan“, Ljubljana), te su pregledavane pomoću web sučelja koji svakih 6 sati automatizirano slika svaku od jažica, dok su ostale postavljene ručno. Takve su kristalizacijske ploče redovito ručno pregledavane pomoću svjetlosnog mikroskopa (*Olympus SZX12*), dok su kristali slikani pomoću kamere proizvođača *Dino-Lite*. Kristali su slikani pomoću optičkog mikroskopa (*Olympus BX51M,* Zavod za molekularnu biologiju, BO, PMF) pri vidljivoj svjetlosti te pri valnoj duljini od 280 nm.

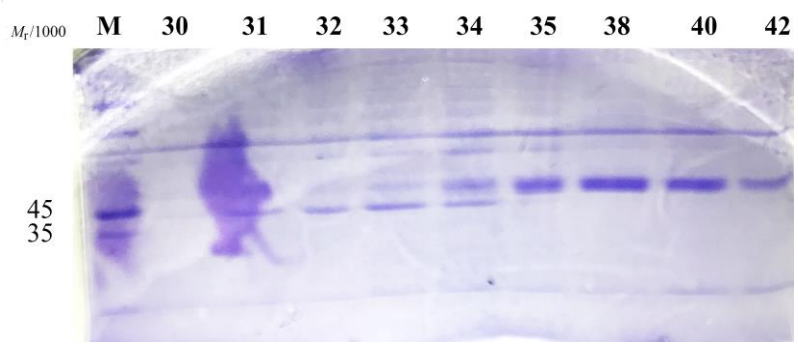
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Pojačana ekspresija te pročišćavanje fuzijskog proteina HP1026

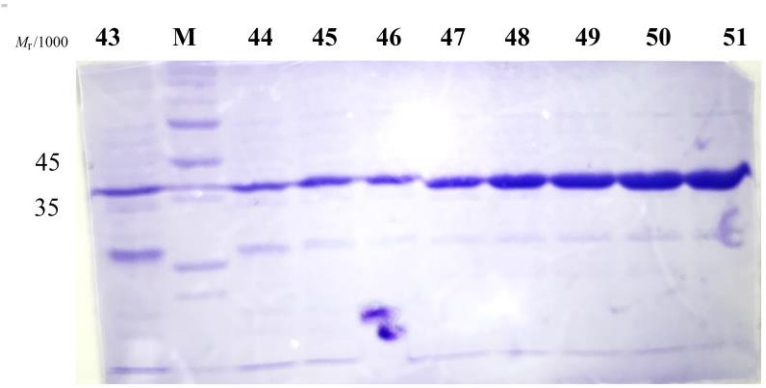
Za postavljanje kristalizacijskih eksperimenata fuzijskog proteina HP1026 pripremljena je svježa otopina proteina s obzirom na činjenicu kako proteini koji su neposredno prije kristalizacije pročišćeni, puno lakše kristaliziraju od proteina koji su višestruko zamrzavani. Stoga se, po prethodno utvrđenoj metodi, krenulo u uzgoj bakterijskih stanica transformiranih plazmidom pET15b (*Novagen*) i u indukciju pojačane ekspresije proteina HP1026, po postupku opisanom u poglavlju 3.4.4. Za postavljanje bilo kakvih kristalizacijskih eksperimenata, potrebne su otopine proteina visoke čistoće, više od 95 % (engl. *purity*), zbog činjenice kako bilo kakva, pa makar i mala nečistoća, može biti nukleacijski centar za rast amorfnog precipitanta ili/i kristala anorganskih soli iz kristalizacijskih otopina. U tu svrhu pročišćen je heksahistidinski fuzijski protein HP1026 afinitetnom kromatografijom, uz kromatogram prikazan na slici 14.



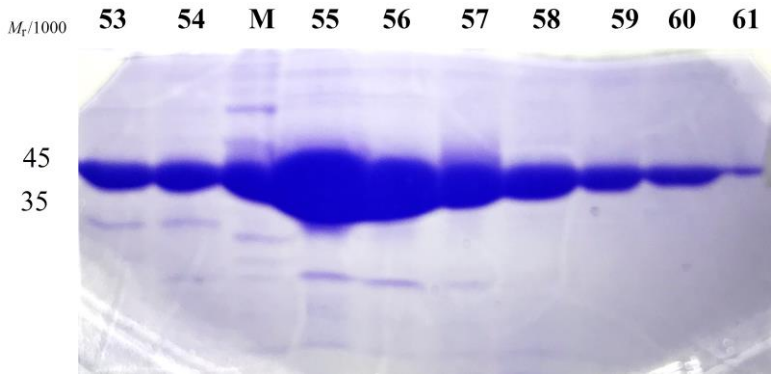
Slika 14. Kromatogram afinitetne kromatografije s prikazanim apsorbancijama frakcija (plavom bojom) izraženim kao mAU (jedinica apsorbancije engl. *mili apsorbance unit*) pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o eluiranom volumenu uzorka. Crveno su označeni brojevi prikupljenih frakcija, a zelenom, volumni udio pufera B (20 mmol L^{-1} Tris (pH = 7,4); 500 mmol L^{-1} natrijev klorid; 500 mmol L^{-1} imidazol; vidi tablicu 16) kojim se eluira protein.



Slika 15. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijski protein HP1026 nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom (M predstavlja marker, brojevi predstavljaju frakcije te se broj frakcija podudara s brojem frakcija sa slike 14).

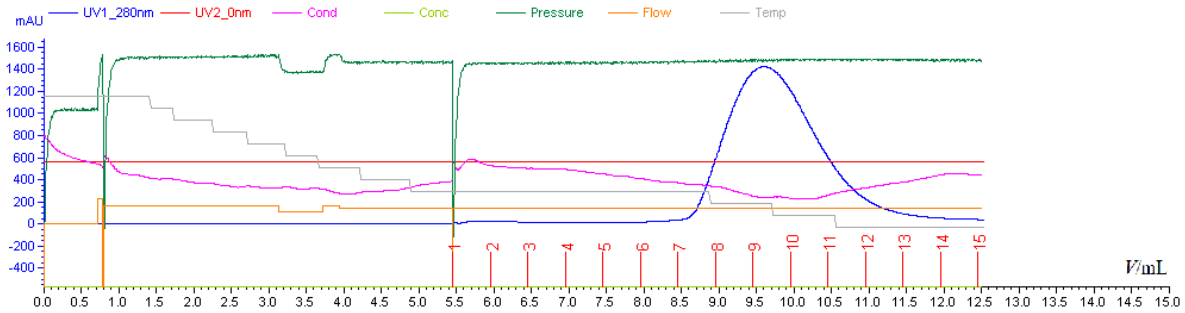


Slika 16. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijski protein HP1026 nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom (M predstavlja marker, brojevi predstavljaju frakcije te se broj frakcija podudara s brojem frakcija sa slike 14).

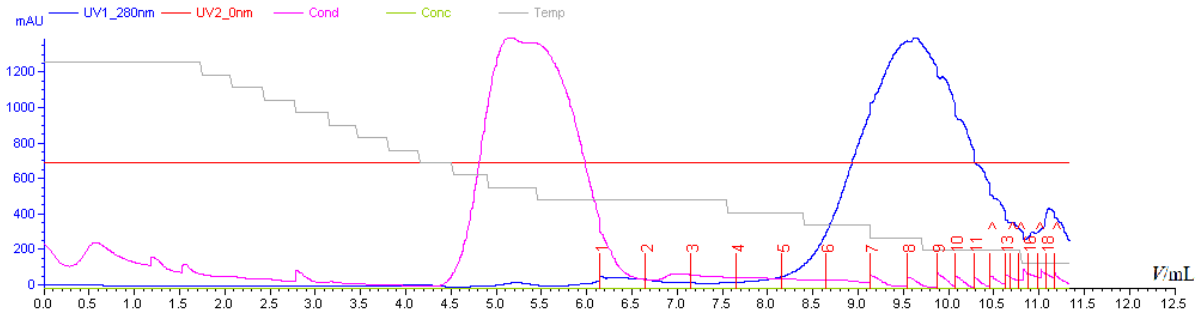


Slika 17. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijski protein HP1026 nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom (M predstavlja marker, brojevi predstavljaju frakcije te se broj frakcija podudara s brojem frakcija sa slike 14).

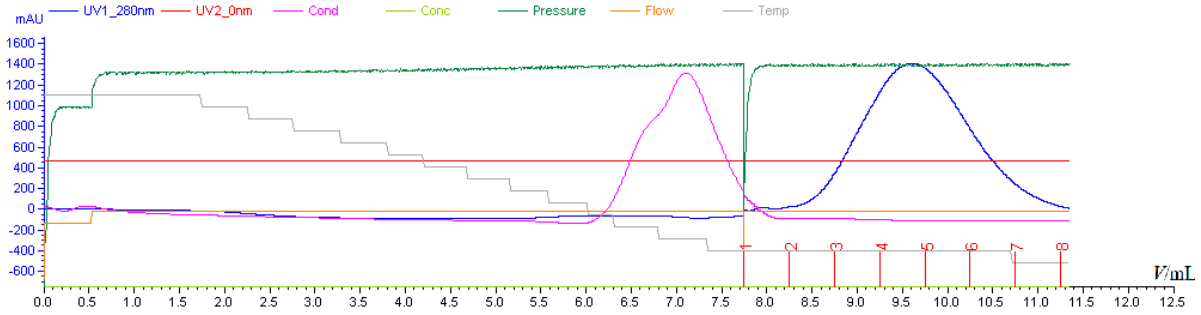
Iz slika 15, 16 te 17 može se vidjeti kako je uspješno pročišćen protein HP1026 afinitetnom kromatografijom. Količina proteina u frakcijama s gela na slikama 15, 16 te 17 se poklapa s porastom apsorbancije u istim frakcijama prema kromatogramu na slici 14. Velike količine proteina još uvijek nisu bile dovoljne čistoće, stoga se za kasniju kristalizaciju proteina, odlučilo fuzijski protein HP1026 dodatno pročistiti gel-filtracijom tj. kromatografijom isključenja.



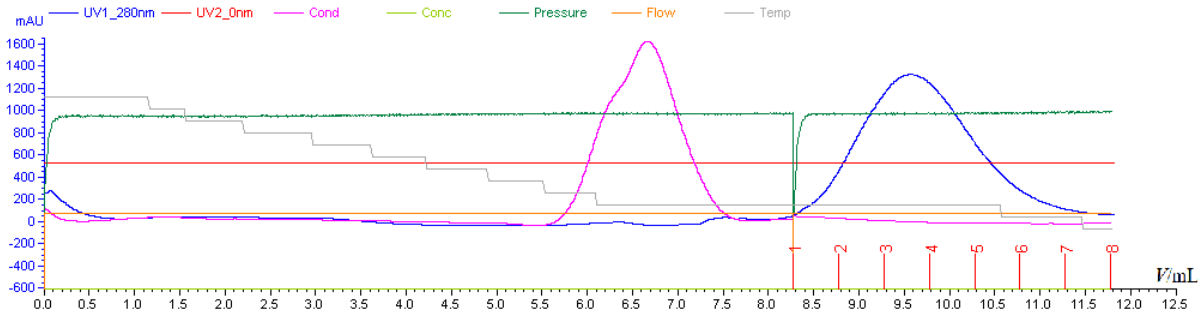
Slika 18. Prikaz kromatograma prve serije pročišćavanja (gel-filtracija) s prikazanim apsorbancijama frakcija (plavom bojom) pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o eluiranom volumenu. mAU, jedinica apsorbancije (engl. *mili apsorbance unit*). Crveno su označeni brojevi prikupljenih frakcija.



Slika 19. Prikaz kromatograma druge serije pročišćavanja (gel-filtracija) s prikazanim apsorbancijama frakcija (plavom bojom) pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o eluiranom volumenu. mAU, jedinica apsorbancije (engl. *mili apsorbance unit*). Crveno su označeni brojevi prikupljenih frakcija.

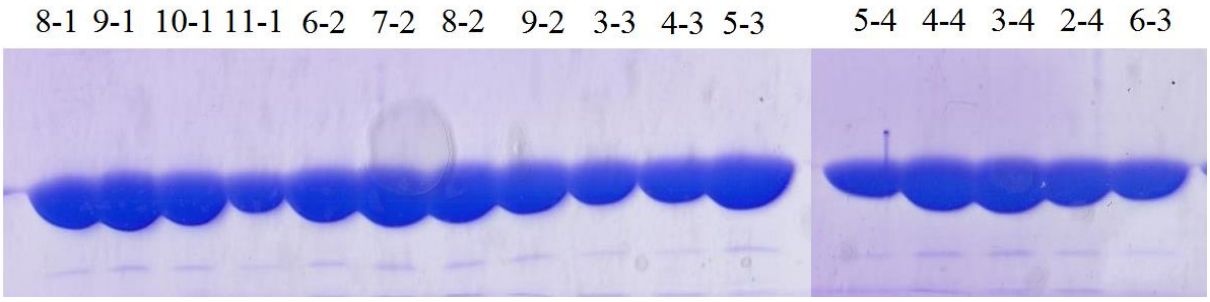


Slika 20. Prikaz kromatograma treće serije pročišćavanja (gel-filtracija) s prikazanim apsorbancijama frakcija (plavom bojom) pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o eluiranom volumenu. mAU, jedinica apsorbancije (engl. *mili apsorbance unit*). Crveno su označeni brojevi prikupljenih frakcija.



Slika 21. Prikaz kromatograma četvrte serije pročišćavanja (gel-filtracija) s prikazanim apsorbancijama frakcija (plavom bojom) pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o eluiranom volumenu. mAU, jedinica apsorbancije (engl. *mili apsorbance unit*). Crveno su označeni brojevi prikupljenih frakcija.

Na slikama 18, 19, 20 te 21 prikazani su kromatogrami svih četiri serija gel-filtracija. Zbog velike početne količine nedovoljno čistih frakcija proteina, bilo je potrebno pročistiti uzorak u četiri navrata. Na slici 22 vidljivo je kako su sve prikazane frakcije gotovo idealne čistoće za kasniju daljnju upotrebu u kristalizacijskim eksperimentima.



Slika 22. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijski protein HP1026 nakon pročišćavanja gel-filtracijom (brojevima su označene frakcije, koje se podudaraju sa slikama 18, 19, 20 te 21; npr. 8-1 označava osmu frakciju u prvoj seriji pročišćavanja).

Nakon afinitetne kromatografije i gel-filtracije, dobivene su otopine fuzijskog proteina HP1026 zadovoljavajuće čistoće za daljnje kristalizacijske eksperimente, no koncentracije proteina su bile preniske za direktno korištenje u kristalizacijskim eksperimentima, stoga je bilo potrebno ugustiti protein pomoću centrikona do koncentracije od oko najmanje 20 mg mL^{-1}, što je uspješno i učinjeno pripravom proteina koncentracije 22 mg mL^{-1}.

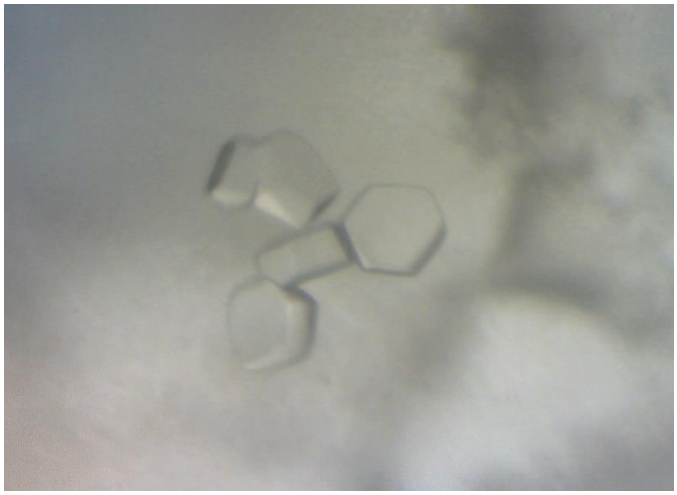
4.2. Kristalizacija proteina HP1026 uz pomoć aditivnih kristalizacijskih uvjeta

Do sada se HP1026 pokazao kao iznimno težak protein za kristalizirati, te su dobivene rezolucije difrakcijskih podataka od početnih 15 Å do 7 Å. Radilo se o kristalima za koje su uvjeti kristalizacije određeni iz setova različitih kristalizacijskih uvjeta. Veličinom su nastajali iznimno mali kristali te mikrokristali, stoga se u ovom radu pokušalo pomoću setova aditiva, dodatno pospješiti rast kristala u svrhu nastajanja većih kristala koji bi mogli difraktirati do rezolucije pogodne za rješavanje strukture takvog proteina. Koristili su se komercijalno dostupni setovi aditivnih kristalizacijskih uvjeta poput MD1-93 Morpheus Additive Screen (*Molecular Dimensions*) te Silver Bullets (*Hampton Research*). Uspješno je kristaliziran protein u nekim od uvjeta (prikazani u tablici 20 te slikama 23, 24, 25 te 26) u kompletu MD1-93 Morpheus Additive Screen (*Molecular Dimensions*) te su pritom izgledom bili veći i morfološki lijepši kristali od prethodno pripravljenih, dok je u kompletu Silver Bullets (*Hampton Research*) došlo do nastajanja manjih kristala u uvjetima u kojima su se kao aditivi koristile otopine aminokiselina te peptida. Tek nakon testiranja kristala na sinkrotronu, moći će se reći rešto više

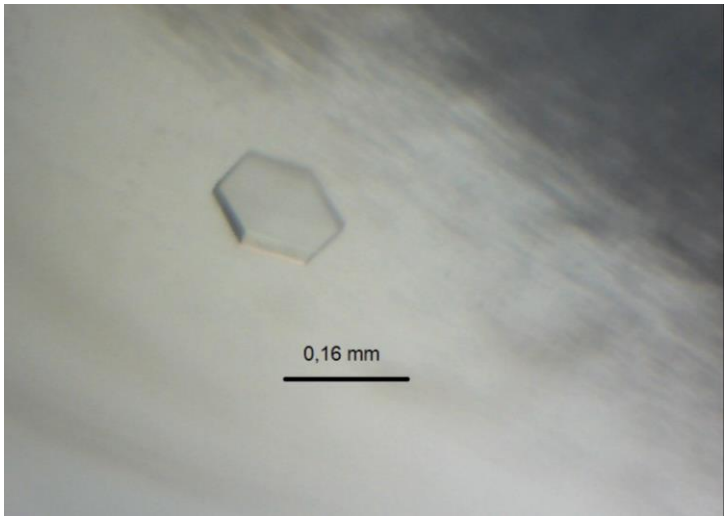
o kvaliteti takvih manjih kristala. Stoga će se u daljnjem tekstu posvetiti riječ rezultatima dobivenim kristalizacijom pomoću MD1-93 Morpheus Additive Screen (*Molecular Dimensions*).

Tablica 20. Prikaz uvjeta i korištenih aditiva iz kompleta MD1-93 Morpheus Additive Screen (*Molecular Dimensions*)

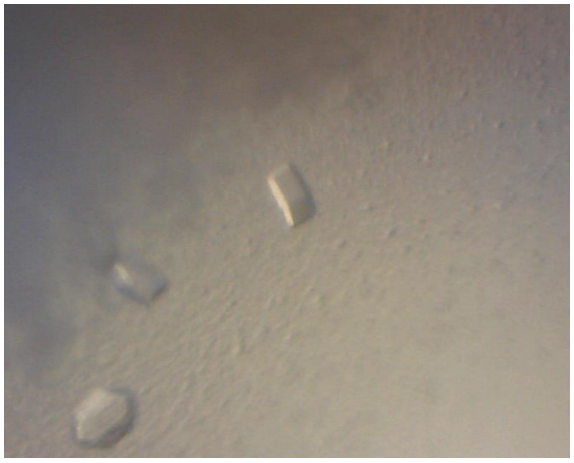
broj i vrsta uvjeta	korišten aditiv u uvjetu	koncentracija ili udio
A5	etilen glikol	40 % *v/v*
A7	glicerol	20 % *w/v*
A12	imidazol	0,5 mol L^{-1}
B4	Trizma® baza	0,5 mol L^{-1}
C2	1,4-butandiol	0,4 mol L^{-1}
D8	kalijev, natrijev tartarat tetrahidrat	0,4 mol L^{-1}
D12	dl-alanin	0,4 mol L^{-1}
E1	glicin	0,4 mol L^{-1}
E3	PEG 3000	30 % *w/v*
E4	1,2,4-butantriol	40 % *v/v*
F3	AMPD	0,5 mol L^{-1}
F12	cezijev acetat	0,02 mol L^{-1}
G1	rubidijev klorid	0,02 mol L^{-1}
G5	natrijev ortovanadat	0,01 mol L^{-1}
H3	*myo*-inozitol	0,4 mol L^{-1}
H4	DL-arginin hidroklorid	0,4 mol L^{-1}
H5	DL-5-hidroksilizin hidroklorid	0,4 mol L^{-1}



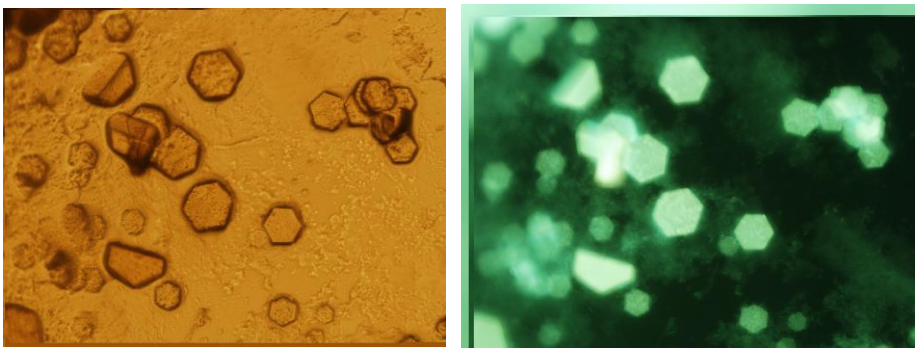
Slika 23. Kristali proteina HP1026 nastali pomoću aditiva iz MD1-93 Morpheus Additive Screen (*Molecular Dimensions*) u uvjetu H4.



Slika 24. Kristal proteina HP1026 nastao pomoću aditiva iz MD1-93 Morpheus Additive Screen (*Molecular Dimensions*) u uvjetu G5.



Slika 25. Kristali proteina HP1026 nastali pomoću pomoću aditiva iz kompleta MD1-93 Morpheus Additive Screen (*Molecular Dimensions*) u uvjetu D8.



a) b)

Slika 26. Kristali proteina HP1026 nastali pomoću pomoću aditiva iz kompleta MD1-93 Morpheus Additive Screen (*Molecular Dimensions*) u uvjetu F2, a) pri vidljivoj svjetlosti, b) pri valnoj duljini od 280 nm.

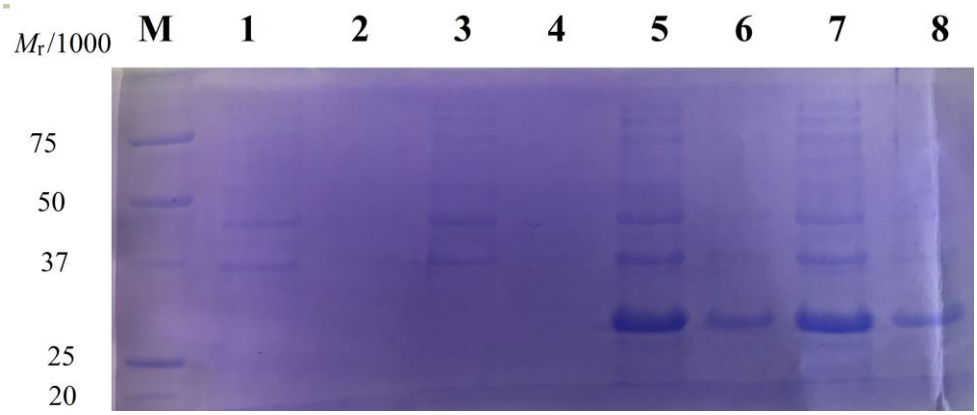
Iz slika 23, 24, 25 te 26 vidljivo je kako se radi o pravilnim heksagonskim kristalima. Također se na slici 26b može vidjeti fluorescencija u kristalu proteina. S obzirom na činjenicu da proteine grade aminokiseline, proteini sadrže i aromatske aminokiseline koje svojim bočnim aromatskim ograncima omogućuju proces fluorescencije u proteinskim kristalima jer se radi o gusto pakiranim molekulama te je takva fluorescencija vidljiva pomoću optičkog mikroskopa koja ima UV izvor zračenja te filtre koji propuštaju svjetlost odgovarajuće valne duljine potrebne za pobudu odgovarajućih elektrona i proces fluorescencije. S druge strane, takvo specifično svojstvo fluorescencije proteinskih kristala koristi se kako bi se brzo i jednostavno utvrdilo radi li se o kristalima proteina, ili u slučaju kada ne dolazi do fluorescencije, najčešće

se radi o kristalima anorganskih soli koji se nalaze u otopini koje također mogu kristalizirati. U kristalizacijskoj kapljici mogu se također nalaziti i nečistoće koje tijekom priprave otopine precipitanata kristalizacijskih uvjeta mogu također ući u otopinu, stoga je potrebno s dozom opreza zaključivati o fluorescenciji u kristalizacijama proteina. U tablici 20 navedeni su aditivni uvjeti koji daju kristale većih dimenzija. Radi se o kristalima, koji su u usporedbi s prethodnim istraživanjima, morfološki puno veći, stoga se očekivalo kako će puno bolje difraktirati sinkrotronsko zračenje. Na XRD1 stanici sinkrotrona „Elettra Sincrotrone Trieste" istražena je kvaliteta kristala s obzirom na difrakciju rentgenskih zraka na monokristalu. Istraženo je 20 kristala (od kojih su neki prikazani na slikama 22, 23, 24 te 25) te su najbolji difrakcijski podaci sakupljeni do razlučenja od 4 Å u heksagonskom kristalnom sustavu i s parametrima jedinične ćelije od a = 116,22(2) Å, c = 238,38(2) Å. Riječ je bilo o kristalu iz uvjeta D8 kompleta MD1-93 Morpheus Additive Screen (*Molecular Dimensions*). S dobivenim podatcima pokušala se riješiti struktura proteina HP1026 metodom molekulske zamjene koristeći model proteina MgsA iz *E. coli* (PDB kod: 3PVS),[81] međutim niska rezolucija podataka i mala sličnost proteinskih sekvenci (svega 31 %) nije rezultirala rješavanjem strukture proteina HP1026. Daljna istraživanja idu u smjeru nalaženja uvjeta za kristalizaciju proteina koji će još bolje difraktirati rendgensko zračenje i kristalizaciju proteina uz dodatak teškog atoma što bi omogućilo lakše rješavanje trodimenzionalne strukture proteina što je bio i konačni cilj ovog istraživanja.

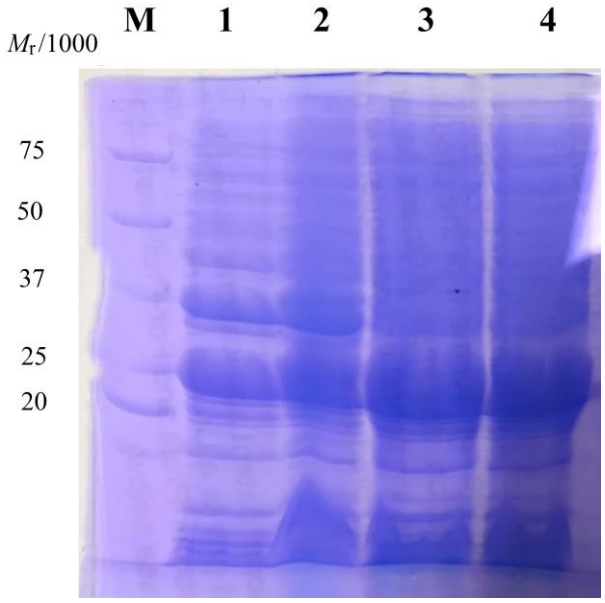
4.3. Pojačana ekspresija, topljivost te pročišćavanje fuzijskih proteina SUMO-CrdA(+) te SUMO-CrdA(-)

U prethodnim istraživanjima, izoliran je plazmid pETite N-His SUMO Kan koji sadrži ugrađen gen *crdA* sa i bez signalne sekvence (koji se u tekstu nazivaju *crdA(+)* te *crdA(-)*) te je ugradnja potvrđena rezultatima sekvenciranja od strane tvrtke Macrogen (u dodatku su prikazana sravnjivanja svih nukleotidnih sekvenci napravljena pomoću računalnog programa *BLAST,* od engl. *Basic Local Alignment Search Tool*). U odjeljku 3.2.2 prikazano je na koji način je obavljena uspješna transformacija bakterijskih stanica *E. coli* ekspresijskog soja HI-Control BL21(DE3) (*Lucigen*), što je potvrđeno rastom mnogobrojnih kolonija bakterijskih stanica na hranjivoj agaroznoj podlozi s kanamicinom. Takvo što se objašnjava činjenicom kako radom u sterilnim uvjetima samo bakterije s ugrađenim plazmidom jesu rezistentne na kanamicin zbog posjedovanja gena za otpornost na kanamicinu koji se nalazi na plazmidu. Također je nakon

transformacije uspješno izvršen i prekonoćni uzgoj bakterija u tekućem mediju, dok su rezultati pojačane ekspresije fuzijskih proteina SUMO-CrdA(+) te SUMO-CrdA(-) prikazani na slijedećim slikama.



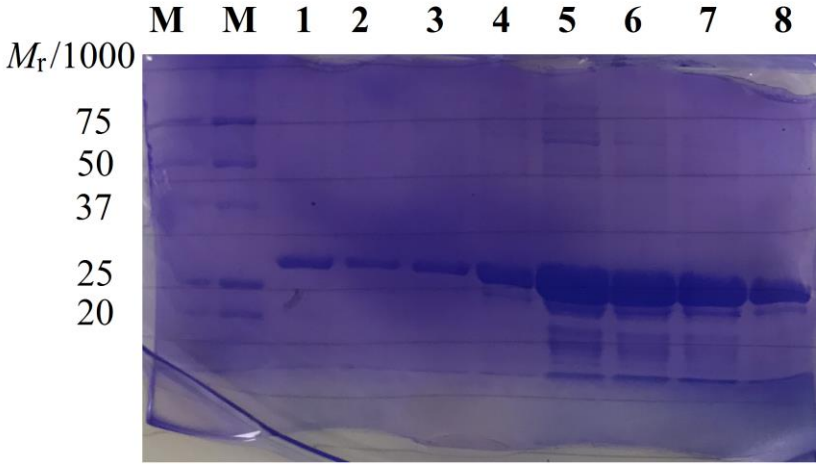
Slika 27. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijski protein SUMO-CrdA(-) (M predstavlja marker, 1 te 3 predstavljaju frakcije neinduciranih stanica dviju kolonija, dok 2 i 4 predstavljaju 10 puta razrijeđene frakcije istih uzoraka (redom), 5 i 7 predstavljaju frakcije induciranih stanica dviju kolonija, dok 6 i 8 predstavljaju 10 puta razrijeđene frakcije istih uzoraka, redom).



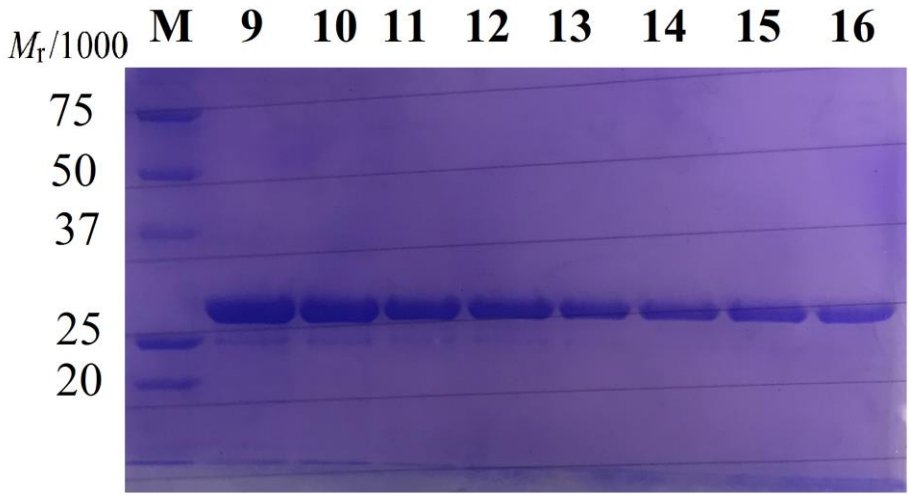
Slika 28. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijski protein SUMO-CrdA(-) (M predstavlja marker, 1 predstavlja supernatant kolonije 1 nakon sonikacije, 2 predstavlja talog kolonije 1 nakon sonikacije, 3 predstavlja supernatant kolonije 2 nakon sonikacije, 4 predstavlja talog kolonije 2 nakon sonikacije).

Iz slika 27 te 28 može se zaključiti kako je izvršena uspješna indukcija ciljanog proteina SUMO-CrdA(-). Naime, na slici 26, u jažicama 5, 6, 7 i 8 pojavljuju se vrpce proteina pri otprilike 25 kDa. Protein SUMO-CrdA(-) je veličine 24 kDa, što otprilike ukazuje kako se radi o ciljnom proteinu. Naime, u jažicama 1, 2, 3 i 4 pri istoj visini, ne nailazimo na slične vrpce, što ukazuje kako se protein ne eksprimira prije dodatka, već tek nakon dodatka IPTG-a.. Na slici 27, nakon sonikacije, vidljivo je kako se ciljni protein nalazi djelomično u talogu, što govori u prilog činjenici kako dio proteina ipak odlazi u inkluzijska tijela, dok se veći dio proteina nalazi otopljen u supernatantu.

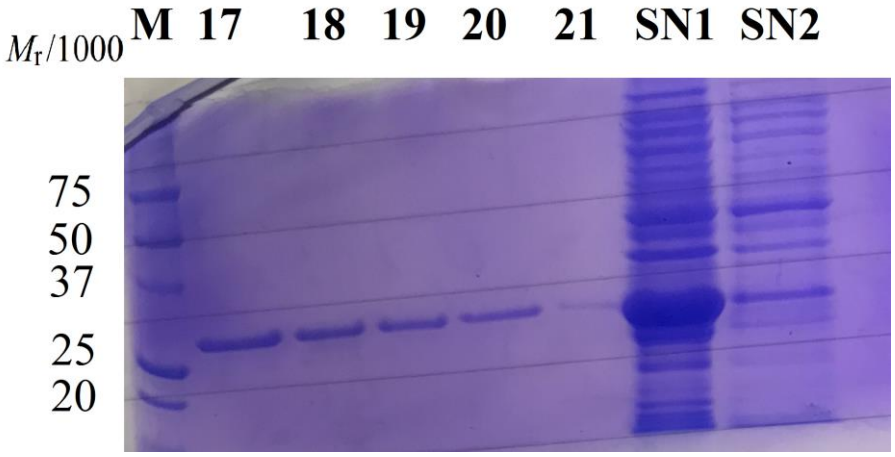
Na slikama 29, 30 te 31 nalaze se frakcije koje su izuzimane tijekom pročišćavanja fuzijskog proteina SUMO-CrdA(-) afinitetnom kromatografijom (IMAC) te je iz slika vidljivo kako je obavljeno uspješno pročišćavanje ciljnog fuzijskog proteina. Stoga su frakcije 12 – 20 (slika 29 i 30) koje su bile zadovoljavajuće čistoće spojene u jednu frakciju. Nakon uspješne izmjene pufera koji je sadržavao imidazol koncentracije 500 mmol L^{-1} (metoda opisana u 3.4.13), protein je ukoncentriran do koncentracije od 8 mg mL^{-1}.



Slika 29. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijski protein SUMO-CrdA(-) (M predstavlja marker, 1 - 8 predstavljaju frakcije elucije ciljanog proteina).



Slika 30. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijski protein SUMO-CrdA(-) (M predstavlja marker, 9 - 16 predstavljaju frakcije elucije ciljanog proteina).

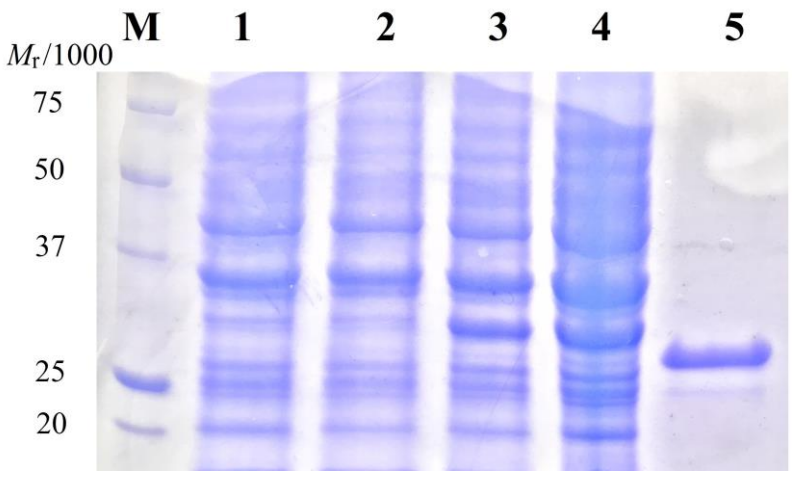


Slika 31. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijski protein SUMO-CrdA(-) (M predstavlja marker, 17 - 21 predstavljaju frakcije elucije ciljanog proteina, dok SN1 predstavlja supernatant prije nanošenja na kromatografsku kolonu tj. prije pročišćavanja, dok SN2 predstavlja supernatant nakon propuštanja kroz kolonu).

Povrh indukcije pojačane ekspresije proteina SUMO-CrdA(-), vršena je i indukcija pojačane ekspresije proteina SUMO-CrdA(+), koji sadržava i signalnu sekvencu te je veličine 26 kDa. Na slici 32 prikazan je poliakrilamidni gel nakon SDS-PAGE elektroforeze, u kojem se u jažicama 1 i 2 nalaze frakcije supernatanata izolarne nakon sonikacije iz kultura dviju kolonija, te je vidljivo kako se pri visini od 26 kDa nalaze vrlo slabe vrpce, što ukazuje na vrlo

nisku ili gotovo nezamjetnu topljivost proteina u otopini. S druge strane, u jažicama 3 i 4 pri visini od 26 kDa, vidljivo je kako postoje jasne debele vrpce ciljnog proteina SUMO-CrdA(+), što ukazuje kako je sva količina proteina zaostala u inkluzijskim tijelima, odnosno pokazuje da je protein netopljiv. U jažici 5 nalazi se SUMO-CrdA(-) protein, samo zbog lakše usporedbe proteina jer je razlika u veličini između SUMO-CrdA(-) te SUMO-CrdA(+) oko 2 kDa.

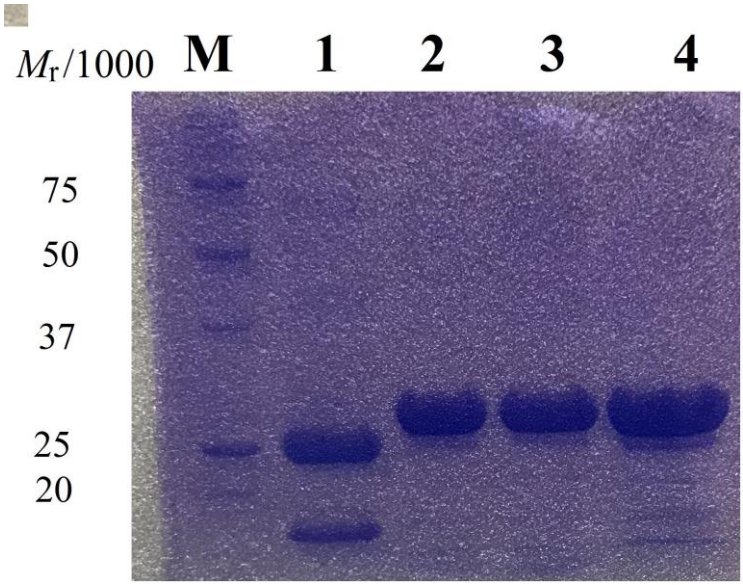
Štoviše, kako bi dodatno opravdali sumnje frakcije iz jažica 1 i 2 su pročišćene afinitetnom kromatografijom. Rezultati su pokazali da pročišćeni uzorci nakon poliakrilamidne elektroforeze ne sadrže ciljani protein SUMO-CrdA(+) budući da gel nije sadržavao vrpce koje bi odgovarale bilo kakvim proteinima u rasponu od 20 – 75 kDa. Potrebno je naglasiti kako postoje razne tehnike kojima se proteini mogu iz inkluzijskih tijela denaturirati i ponovno renaturirati, međutim u tom slučaju potrebno je provjeriti uspješnost renaturacije mjerenjem aktivnosti proteina ili drugim fizikalno-kemijskim metodama (1D ili 2D NMR, CD spektroskopija). Budući da je prethodno opisana uspješna izolacija topljivog i čistog SUMO-CrdA(-) u daljnim kristalizacijskim eksperimentima se koristio SUMO-CrdA(-) te se nije vršila renaturacija proteina SUMO-CrdA(+) iz inkluzijskih tijela.



Slika 32. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijski protein SUMO-CrdA(+) (M predstavlja marker, 1 predstavlja supernatant kolonije 1 nakon sonikacije, 2 predstavlja supernatant kolonije 2 nakon sonikacije, 3 predstavlja talog kolonije 1 nakon sonikacije, 4 predstavlja talog kolonije 2 nakon sonikacije. U petoj jažici nalazi se kao negativna kontrola, pročišćen protein SUMO-CrdA(-) iz supernatanta).

4.4. Cijepanje ciljnog proteina SUMO-CrdA(-) pomoću SUMO Express proteaze

Nakon uzgoja te pročišćavanja proteina SUMO-CrdA(-), kako bi se u otopini dobio protein CrdA(-) bez privjeska, bilo je potrebno odrezati SUMO dio fuzijskog proteina pomoću specifične SUMO Express proteaze, što se izvršilo prema uputama proizvođača. Razlog i svrha rezanja fuzijskog proteina je pročistiti i kristalizirati nativni protein CrdA(-). Nakon rezanja proteina prema uputama proizvođača, i vizualizacije rezultata SDS-PAGE tehnikom, pokazalo se da SUMO privjesak nije uklonjen s proteina. Zbog sumnje na otežan pristup proteaze mjestu za rezanje u fuzijskom proteinu, pokušalo se optimizirati rezanje uz postavljanje blago denaturirajućih uvjeta (tablica 18), kako bi proteaza mogla lakše prići ciljanom mjestu i odrezati fuzijski protein.. Također, se ispitala i aktivnost same proteaze u kontrolnom eksperimentu u kojem se postavilo rezanje kontrolnog proteina (od dobavljača *Lucigen*) koje je bilo uspješno što pokazuje da je proteaza aktivna (slika 33). Iz slike 33 se može vidjeti da niti blago denaturirajući uvjeti nisu omogućili rezanje, jer u svim uvjetima (jažice 2, 3 i 4) postoji vrpca koja odgovara fuzijskom proteinu SUMO-CrdA(-) bez postojanja vrpci koje bi odgovarale veličini SUMO te CrdA(-) proteina zasebno.



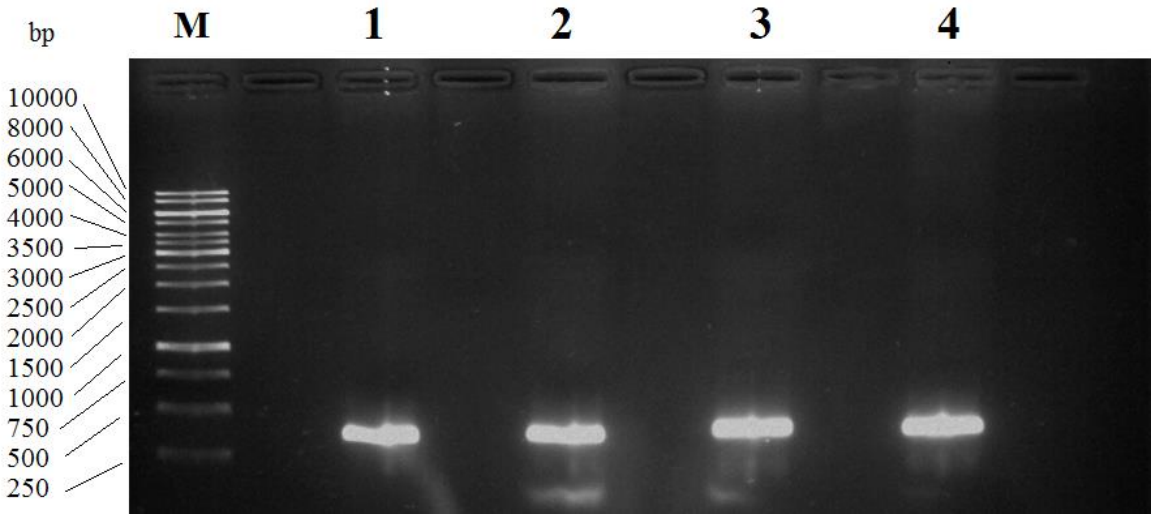
Slika 33. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze nakon pokušaja rezanja fuzijskog proteina SUMO-CrdA(-). M predstavlja marker, 1 predstavlja uzorak kontrolnog fuzijskog SUMO proteina (*SUMO Cleveage Control Protein®, Lucigen*, fuzijski protein migrira u gelu pri približno 40 kDa, dok nakon rezanja, migriraju pri 25 kDa te SUMO protein pri 15-18 kDa) nakon cijepanja proteazom; 2 i 3 predstavljaju SUMO-CrdA(-) nakon

pokušaja cijepanja u blago denaturirajućim uvjetima, dok se u jažici 4 nalazi uzorak proteina SUMO-CrdA(-) nakon pokušaja cijepanja pomoću SUMO Express proteaze u uvjetima propisanim od strane proizvođača.

Naime, do sada se u radu prikazalo neuspješno rezanje fuzijskog proteina SUMO-CrdA(-) koji se za razliku od SUMO-CrdA(+) nalazio u topljivim frakcijama. Kako bi se riješio problem nemogućnosti rezanja fuzijskog proteina SUMO-CrdA(-), odlučilo se prirediti nove konstrukte koji će između proteina SUMO i CrdA imati linker od jedne (G) ili dvije aminokiseline (GS).

4.5. Kloniranje crdA te pojačana ekspresija proteina SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-)

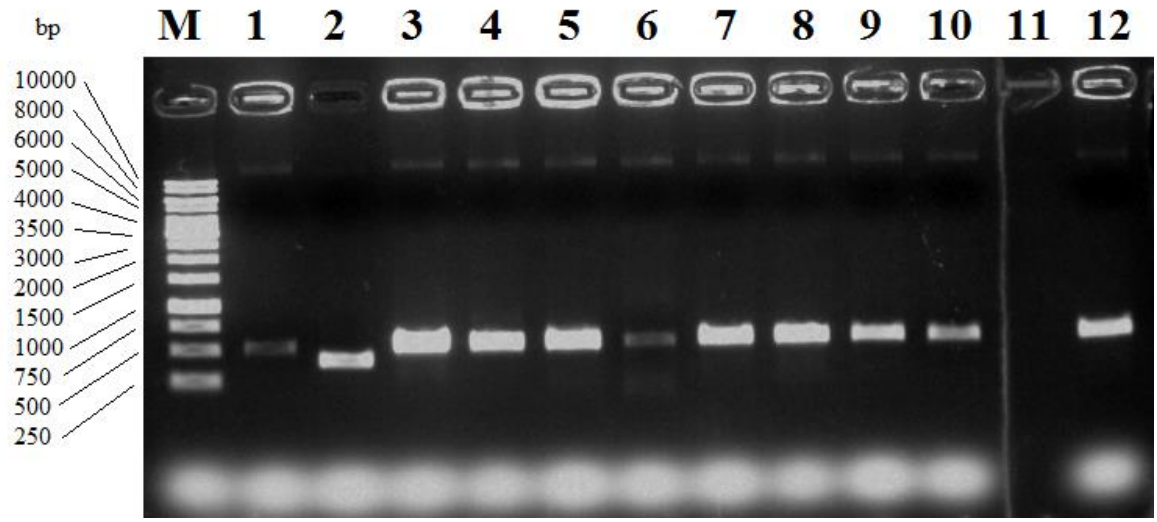
Dizajnirane su početnice (koje su prikazane u tablici 1) te su PCR ekperimentima uspješno umnoženi geni s dodatnih 3 (GGA) odnosno 6 nukleotida (GGATCC) između *SUMO* dijela gena te *crdA* dijela gena (slika 33).



Slika 34. Agarozni gel nakon agarozne elektroforeze (M predstavlja marker, 1 te 2 predstavljaju uzorke iz paralelnih PCR eksperimenata gdje su ugrađena tri dodatna nukleotida u svrhu uzgoja SUMO-G-CrdA(-) proteina, dok 3 i 4 predstavljaju uzorke iz paralelnih PCR eksperimenata gdje su ugrađeni dodatnih šest nukleotida u svrhu uzgoja SUMO-GS-CrdA(-) proteina)

S obzirom na izračunatu teoretsku duljinu fragmenata koje iznose 384/387 parova baza, iz slike 34 možemo vidjeti kako se vrpce točno nalaze u odgovarajućem području. S obzirom da

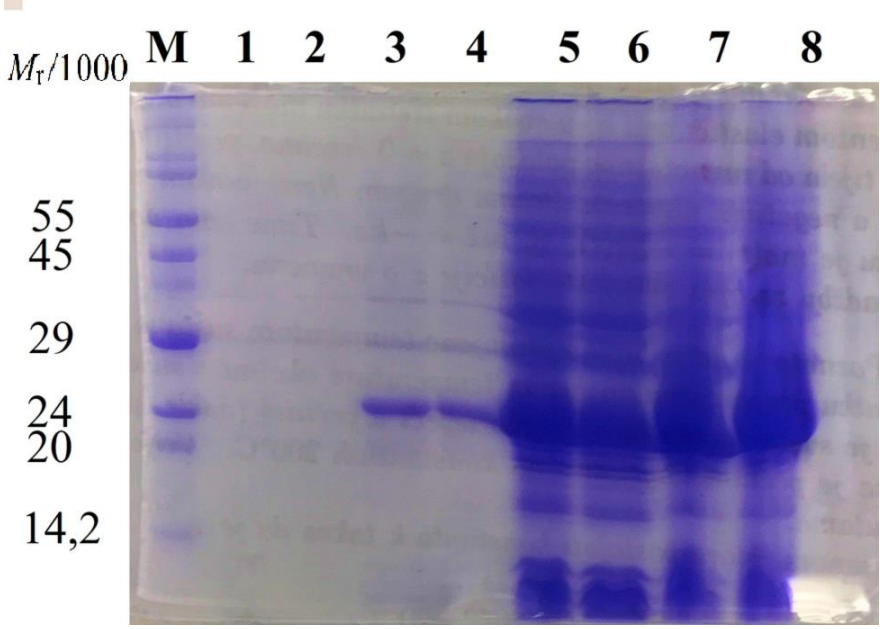
je kalup za ovakve PCR reakcije bio plazmid tj. vektor s ugrađenim genom *crdA(-)*, nakon agarozne elektroforeze je pod UV svijetlom izrezan fragment odgovarajuće vrpce te je pomoću komercijalnih kompleta (poglavlje 3.3.5) pročišćen i izoliran PCR produkt radi kasnije uspješnije transformacije.



Slika 35. Agarozni gel nakon obavljene gel elektroforeze na PCR uzorcima iz PCR-a na kolonijama (M predstavlja marker, dok 1-5 predstavljaju PCR eksperimenti s kolonijama koje su sadržavale PCR produkt s tri dodatna nukleotida, 6 predstavlja negativnu kontrolu, 7-10 te 12 predstavljaju PCR eksperimente s kolonijama koje su sadržavale PCR produkt s šest dodatnih nukleotida).

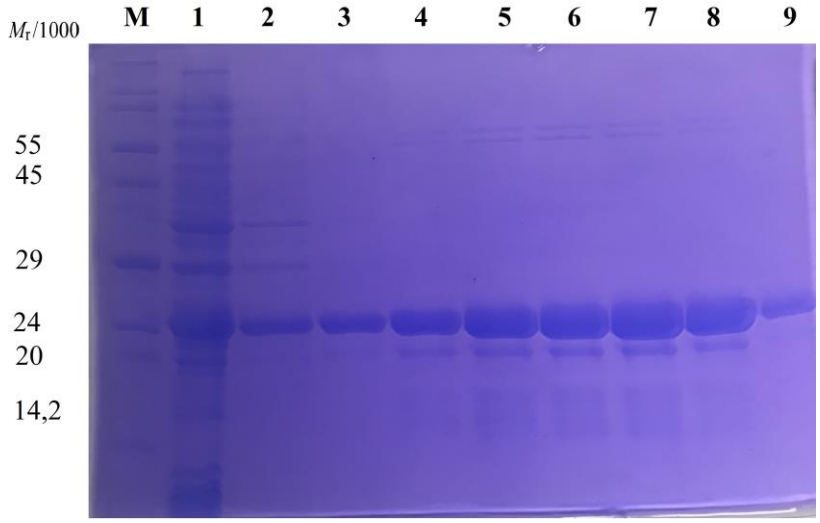
Iz slike 35 vidljivo je kako je izvršena uspješna transformacija bakterijskih stanica koje sadržavaju plazmid s ugrađenim genom *crdA* te tri odnosno šest dodatnih nukleotida. Prema teoretskom izračunu takvi uspješni PCR produkti bi trebali sadržavati 480/483 parova baza, što je bilo uspješno u uzorcima 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 i 12 (slika 35). U jažicu uzorka 6 nanio se PCR produkt praznog vektora, no s obzirom na sliku, vidljivo je kako je došlo do kontaminacije u procesu priprave uzorka za PCR. Također, jasno je vidljivo kako se u jažici 2 nalazi fragment manje veličine, što vjerojatno jest prazan vektor tj. vektor bez ugrađenog gena. Odabrane su kolonije 3,4, 7 te 12, kao one kolonije iz kojih će se izolirati plazmid, što je uspješno izvršeno. Takvi plazmidi su pripremiljeni prema uputama tvrtke za sekvenciranje (*Macrogen*), te poslani na sekvenciranje, čiji su rezultati dodatno potvrdili kako su svi nukleotidi upravo željeni nukleotidi, bez delecija i mutacija, čime se potvrdio sastav plazmida. Sravnjivanje nukleotidnih baza sekvenciranog plazmida s genom *crdA* prikazano je u dodatku 8.2.

Slijedila je potom uspješna transformacija ekspresijskog soja bakterijskih stanica *E. coli* (prikazano u poglavlju 3.2.3) s plazmidima 4 te 12, te indukcija fuzijskih proteina SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-).

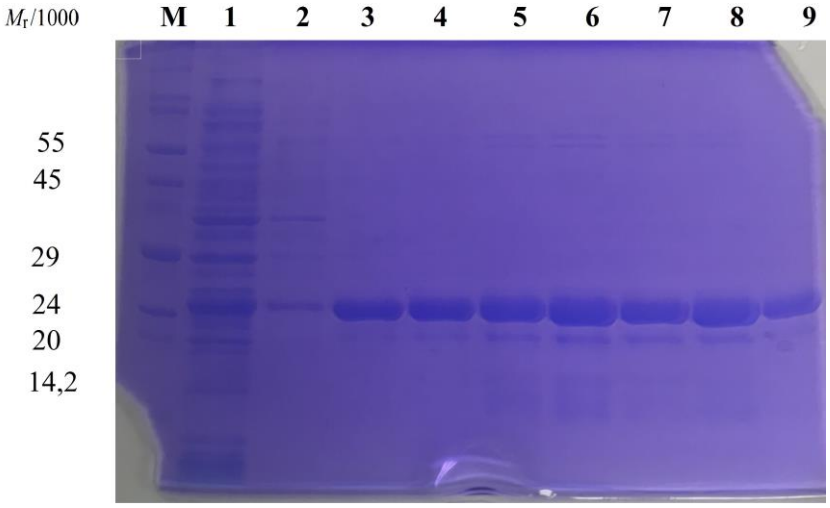


Slika 36. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijske proteine SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) (M predstavlja marker, 1 predstavlja neinducirane stanice za kasniju indukciju SUMO-G-CrdA(-), 2 predstavlja neinducirane stanice za kasniju indukciju SUMO-GS-CrdA(-), 3 predstavlja inducirane stanice za protein SUMO-G-CrdA(-), dok 4 predstavlja inducirane stanice za protein SUMO-GS-CrdA(-). U jažici 5 nalazi se frakcija supernatanta s proteinom SUMO-G-CrdA(-) nakon sonikacije, dok u jažici 6 se nalazi frakcija supernatanta s proteinom SUMO-GS-CrdA(-) nakon sonikacije. U jažicama 7 te 8 nalaze se, frakcije taloga nakon sonikacije s proteinima SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-), redom.

Iz slike 36 vidljivo je kako je izvršena uspješna pojačana ekspresija proteina SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-). Štoviše, proteini se poput SUMO-CrdA(-) proteina također nalaze u supernatantu, dok se dio proteina također nalazi u talogu agregiran u obliku inkluzijskih tijela. Iz slika 37 i 38 vidljivo je uspješno pročišćavanje ciljnih proteina afinitetnom kromatografijom (IMAC), odnosno vidi se također i kako je kolona bila potpuno zasićena proteinom jer je i dio ciljnih proteina izašao u predfrakcijama.



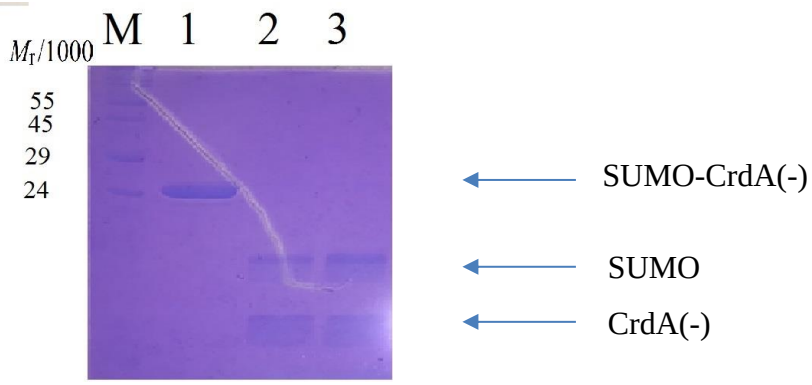
Slika 37. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijski protein SUMO-G-CrdA(-) (M predstavlja marker, 1 predstavlja supernatant nakon pročišćavanja, 2 predstavlja frakciju nakon prolaska kroz kolonu te 3 do 9 predstavljaju frakcije elucije ciljanog proteina).



Slika 38. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze za fuzijski protein SUMO-GS-CrdA(-) (M predstavlja marker, 1 predstavlja supernatant nakon pročišćavanja, 2 predstavlja frakciju nakon prolaska kroz kolonu te 3 do 9 predstavljaju frakcije elucije ciljanog proteina).

4.6. Cijepanje ciljnih proteina SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-) pomoću SUMO Express proteaze

Nakon uspješnih pročišćavanja fuzijskih proteina SUMO-G-CrdA(-) te SUMO-GS-CrdA(-), paralelno su se spojile frakcije 3 i 9 prikazane na slikama 40 i 41 te su proteini porezani.



Slika 39. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze nakon provedenog rezanja fuzijskog proteina SUMO-CrdA(-) (M predstavlja marker veličina, 1 predstavlja uzorak proteina SUMO-GS-CrdA(-) prije rezanja, 2 predstavlja protein SUMO-G-CrdA(-) koji je uspješno porezan pomoću *SUMO Express* proteaze u uvjetima propisanim od strane proizvođača, 3 predstavljaprotein SUMO-GS-CrdA(-) koji je uspješno porezan pomoću *SUMO Express* proteaze u uvjetima propisanim od strane proizvođača).

Iz slike 39 vidljivo je kako je izvršeno uspješno rezanje oba fuzijska proteina, što se dokazuje postojanjem dviju vrpci od kojih gornja vrpca predstavlja SUMO protein, dok niža vrpca po veličini odgovara proteinu G-CrdA(-) odnosno GS-CrdA(-). Na ovakav način uspješno je pripremljen topljivi protein CrdA(-) bez SUMO privjeska. U daljnjem radu dobiveni CrdA(-) će se pročistiti afinitetnom kromatografijom kako bi se uklonio SUMO protein te SUMO proteaza koji sadrže heksahistidinski privjesak kojim se vežu na kolonu. Dosada se na razne načine pokušavao dobiti protein CrdA(-) u otopini, što se uspjelo u prethodnim istraživanjima u doktorskoj disertaciji dr. sc. Ivane Kekez[47], gdje se CrdA nalazila u fuziji s GST proteinom, međutim zbog pojavljivljanja degradiranog proteina pročišćavanje nije bilo uspješno. U ovom diplomskom radu se pokušalo riješiti spomenuti problem te će se dobiveni rezultati primjeniti u daljnjim eksperimentima CrdA(-) u svrhu kristalizacije čistog CrdA(-) bez potrebe za renaturacijom ili sličnim postupcima.

4.7. Određivanje uvjeta kristalizacije proteina SUMO-CrdA(-)

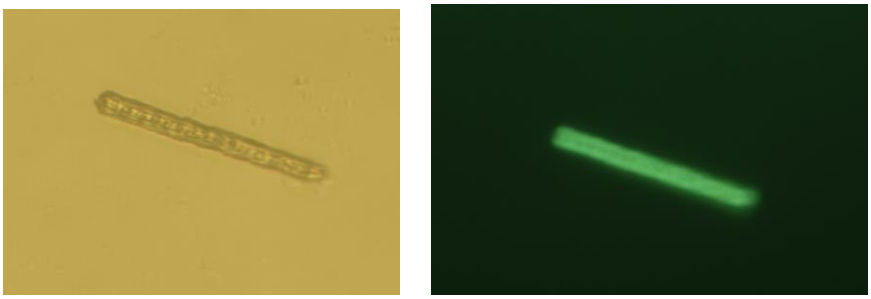
Postavljeni su brojni kristalizacijski eksperimenti SUMO-CrdA(-) (vidi poglavlje 3.5.2). U dodatku se nalazi popis svih kristalizacijskih uvjeta iz korištenih kristalizacijskih kompleta. Naime, najveći problem u kristalografiji predstavlja problem faza, koji se može riješiti na različite načine, stoga poznavanje strukture SUMO proteina olakšava rješavanje faznog problema. Struktura SUMO proteina je već odavna poznata te pomoću metode molekulske zamjene se može vrlo jednostavno riješiti struktura fuzijskog proteina koji sadrži SUMO protein, no put do takvih kristala fuzijskih proteina zna biti poprilično dug.

Princip postavljanja kristalizacija se mogao podijeliti u dva pravca od kojih je jedan predstavljao ručno postavljanje kristalizacijskih uvjeta, a drugi pravac jest uključivao automatski robot za kristalizaciju. Naime, koncentracija proteina za ručno postavljanje je bila 8 mg mL^{-1}, dok je koncentracija proteina za postavljanje pomoću automatskog robota bila 5 mg mL^{-1}. Ukupno je ručno postavljeno 240 kristalizacijskih uvjeta iz kompleta Morpheus HT-96 (*Molecular Dimensions*), NeXtal DWBlock Pact Suite (*Qiagen*) te Crystal Screen HT (*Hampton Research*). Povrh mnogo otopina punih agregata i raznih kristala soli, u nekim su nastali i mogući kristali proteina, tablica 21.

Tablica 21. Prikaz kristalizacijskih uvjeta u kojem su dobiveni kristali

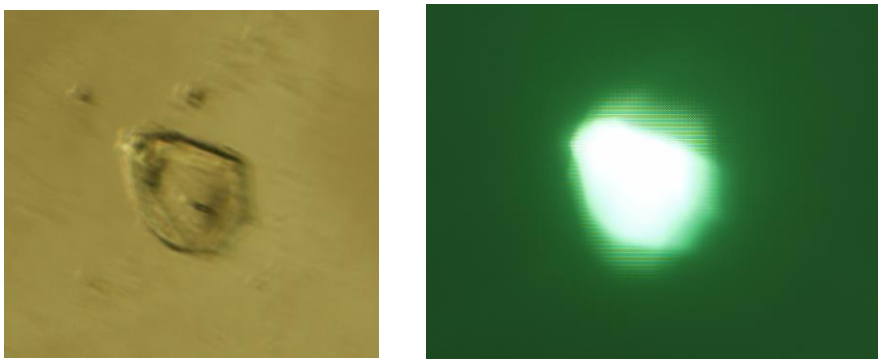
	A	B	S	K
magnezijev klorid	/	0,2 mol L^{-1}	0,2 mol L^{-1}	/
kalcijev klorid dihidrat	/	/	/	0,2 mol L^{-1}
natrijev acetat	/	0,1 mol L^{-1}	/	0,1 mol L^{-1}
amonijev acetat	0,2 mol L^{-1}	/	/	/
trinatrijev citrat dihidrat	0,1 mol L^{-1}	/	/	/
(*w*/*v*) PEG 6000	/	20 %	20 %	/
tris	/	/	0,1 mol L^{-1}	/
(v/*v*) MPD	30 %	/	/	/
(v/v) propan-2-ol	/	/	/	20 %
pH	5,6	5	8	4,6
proizvođač	Hampton Research	Qiagen	Qiagen	Hampton Research
komplet	Crystal screen	PACT Suite	PACT Suite	Crystal screen
uvjet br.	26	10	46	24

Na slikama 40, 41 te 42 prikazan je kristal proteina snimljen pomoću optičkog mikroskopa (*Olympus BX51M, Zavod za molekularnu biologiju, BO, PMF*), pri osvjetljenju vidljive svjetlosti (lijevo; a) te osvjetljenju pri valnoj duljini od 280 nm pomoću specifičnih filtera (desno; b)).



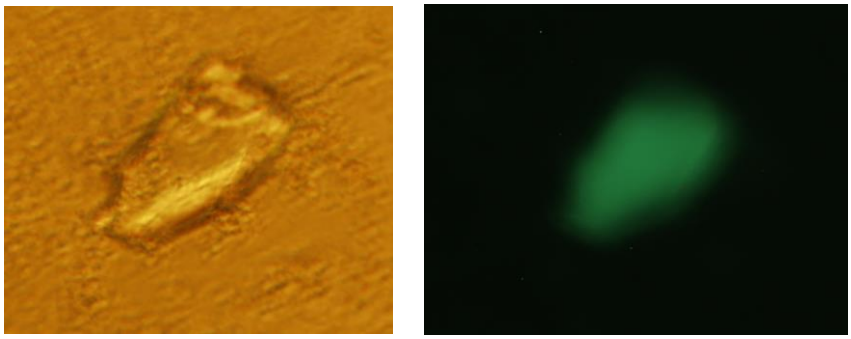
a) b)

Slika 40. Kristal proteina SUMO-CrdA(-) (tablica 21, kristalizacijski uvjet A): a) pri vidljivoj svjetlosti, b) pri valnoj duljini od 280 nm.



a) b)

Slika 41. Kristal proteina SUMO-CrdA(-) (tablica 21, kristalizacijski uvjet B): a) pri vidljivoj svjetlosti, b) pri valnoj duljini od 280 nm.



a) b)

Slika 42. Kristal proteina SUMO-CrdA(-) (tablica 21, kristalizacijski uvjet S): a) pri vidljivoj svjetlosti, b) pri valnoj duljini od 280 nm.

Kristali uvjeta B i S su testirani na difraktrometru za monokristal s bakrovom anodom te je uočena slaba difrakcija. Radi se, naime, o prvim pretraživanjem kristalizacijskih uvjeta, stoga bi trebalo dodatno istražiti, te ponoviti i optimizirati kristalizacijske eksperimente pomoću komercijalno dostupnih kompleta aditivnih uvjeta i/ili cijepiti klicama kristala kvalitete. Kristal iz uvjeta A tek će biti testiran u nadolazećem terminu na sinkrotronu *Elettra*. Što se tiče, ostalih eksperimenata kristalizacije koji su vršeni pomoću automatiziranog robota, zasada nije uočeno nastajanje kristala proteina, što je djelomično posljedica manje početne koncentracije proteina.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Nakon uspješne ekspresije proteina HP1026 te kasnijeg pročišćavanja afinitetnom kromatografijom te gel-filtracijom, pripravljeni su heksagonski kristali HP1026 iz bakterije *H. pylori* dodatkom različitih aditiva u kristalizacijske otopine. Pripravljeni kristali su, za razliku od prethodnih istraživanja, morfološki veći i deblji s puno boljom rezolucijom difrakcijskih podataka u iznosu od 4 Å, što predstavlja napredak u kvaliteti dobivenih kristala, međutim preostaje daljnja optimizacija kristalizacije do dobivanja podataka dovoljne kvalitete za rješavanja kristalne strukture proteina HP1026.

- Drugi dio istraživanja u sklopu ovog diplomskog rada bila je ekspresija, pročišćavanje te kristalizacija proteina CrdA iz *H. pylori*. Naime, u prethodnim istraživanjima nije dobiven topljiv protein CrdA te je najčešće završavao agregiran u inkluzijskim tijelima. U ovom diplomskom radu, uspješno je pročišćen CrdA bez signalne sekvence u fuziji s proteinom SUMO, koji mu je povećao topljivost. S obzirom da protein SUMO-CrdA bez signalne sekvence SUMO Express proteaza nije uspješno porezala, pristupilo se pripravi fuzijskog proteina s ugrađenim linkerom koji je olakšao pristup proteazi. U tu svrhu uspješno je kloniran gen *crdA* u željeni plazmid, na način da u konačnici, produkt indukcije – fuzijski protein ima između SUMO i CrdA jednu ili dvije dodatne aminokiseline. Indukcija oba proteina SUMO-CrdA s linkerom je bila uspješnai većinom se protein nalazio u topljivoj frakciji te je pročišćen afinitetnom kromatografijom. SUMO proteaza je uspješno odrezala fuzijski protein, te se protein CrdA bez signalne sekvence nalazio topljiv u otopini. Potrebno je naglasiti, da je nakon višestrukih različitih istraživanja, u ovom radu pokazan način uspješnog rješavanja problema agregiranja pomoću SUMO-fuzijskih proteina.. Kloniranje je brzo i efikasno kao i ekspresija, rezanje, te pročišćavanje željenog proteina CrdA(-), s kojom se može ići dalje u postupke kristalizacijskih eksperimenata. Nadalje, u slučaju SUMO-CrdA(-) pripravljeni su i kristali proteina, čiji se kristalizacijski uvjeti moraju dodatno optimizirati. Dobivenim kristalima se kvaliteta tek treba odrediti pomoću sinkrotronskog zračenja.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ADP	adenozin-difosfat
AMPD	2-amino-2-metilpropan-1,3-diol
BLAST	od engl. *Basic Local Alignment Search Tool*
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfat
DTT	ditiotreitol (1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol)
EDTA	engl. *ethylenediaminetetraacetic acid* (etilendiamintetraoctena kiselina)
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfonska kiselina
IPTG	izopropil-*β*-D-1-tiogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani
MPD	2-metilpentan-2,4-diol
myo-inozitol	1,2,3,4,5,6-heksahidroksicikloheksan
NCBI	od engl. *National Center for Biotechnology Information*
NTP	nukleozid-trifosfat
pb /bp	par baza (od engl. *base pair*)
PCR	lančana reakcija polimeraze (od engl. *polymerase chain reaction*)
PEG	polietilenglikol
Pfu	od lat. *Pyrococcus furiosus*
PMSF	fenilmetilsulfonil-fluorid (od engl. *phenylmethylsulphonyl fluoride*)
SUMO	kratica od engl. *Small Ubiquitin-like Modifier* (protein)
SDS	natrijev dodecilsulfat (od engl. *sodium dodecyl sulphate*)
SDS-PAGE	poliakrilamidna elektroforeza uz dodatak natrijeva dodecilsulfata (od engl. *sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*)
TAE	skraćeni naziv za pufer koji sadrži tris, octenu kiselinu i EDTA
Ta	temperatura sljepljivanja
Taq	od lat. *Thermus aquaticus*
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
Tm	temperatura mekšanja
Tris	2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol (TRIZMA®)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. K. P. Haley, J. A. Gaddy, *Front. Microbiol.* **6** (2015) 911.
2. G. Spohn, A. Danielli, D. Roncarati, I. Delany, R. Rappuoli, V. Scarlato, *J. Bacteriol.* **186** (10) (2004) 2956 – 2965.
3. D. Roncarati, A. Danielli, V. Scarlato, *J. Bacteriol.* **193** (20) (2011) 5629-5636.
4. T. Ogura, A. J. Wilkinson, *Genes Cells* **6** (2001) 575-597.
5. B. Waidner, K. Melchers, I. Ivanov, H. Loferer, K. W. Bensch, M. Kist, S. Bereswill, *J. Bacteriol.* **184** (2002) 6700-6708.
6. J. G. Kusters, A. H. M. van Vliet, E. J. Kuipers, *Clin. Microbiol. Rev.* **19** (2006) 449-490.
7. S. Ito, Handbook of Physiology, American Physiological Society, Washington, DC, 1967, str. 705-741
8. https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0028-1142055 (datum pristupa 20. lipnja 2018.)
9. https://www.hindawi.com/journals/ijg/2015/386905 (datum pristupa 20. lipnja 2018.)
10. S. Pincock, *Lancet.* **366** (2005) 1429.
11. B. J. Marshall, J. A. Armstrong, D. B. McGechie, R. J. Galncy, *Med. J. Aust.* **142** (1985) 436-439.
12. P. Malfertheiner, A. Link, M. Selgrad, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11** (2014) 628-638.
13. C.S. Goodwin, M. M. Mendall, T. C. Northfield, *Lancet.* **349** (1997) 265-269.
14. J. G. Kusters, A. H. van Vliet, E. J. Kuipers, *Clin. Microbiol. Rev.* **19** (2006) 449-490.
15. C. S. Goodwin, J. A. Armstrong, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9** (1990) 1–13.
16. W. Fischer, L. Windhager, S. Rohrer, M. Zeiller, A. Karnholz, R. Hoffmann, R. Zimmer, R. Haas, *Nucleic Acids Res.* **38** (2010) 6089-6101.
17. N. Tegtmeyer, S. Wessler, S. Backert, *FEBS J.* **278** (2011) 1190-1202.
18. R. M. Jr Peek, M. J. Blaser, *Nature Rev. Cancer* **2** (2002) 28–37.
19. S. Suerbaum, P. N. Michetti, *Engl. J. Med.* **347** (2002) 1175-1186.
20. B. Linz, F. Balloux, Y. Moodley, A. Manica, H Liu, P. Roumagnac, D. Falush, C. Stamer, F. Prugnolle, S. W. van der Merwe, Y. Yamaoka, D. Y. Graham, E. Perez-

Trallero, T. Wadstrom, S. Suerbaum, M. Achtman, *Nature* **445** (2011) 1190-1202.

21. http://science.sciencemag.org/content/351/6269/162.full (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
22. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16788065 (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
23. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16217547 (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
24. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC187308/ (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
25. F. R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. ColladoVides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao, *Science* **277** (1997) 1453-1462.
26. C. T. Parker, S. Huynh, L. Gorski, K. K. Cooper, and W. G. Miller, *Genome Announc*. **3** (2015)
27. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Helicobacter+pylori (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
28. J. F. Tomb, O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A.Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzegerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W.S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter, *Nature* **388** (1997) 539-547.
29. R. A. Alm, L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. UriaNickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust, *Nature* **397** (1999) 176-180.
30. J. D. Oh, H. Kling-Backhed, M. Giannakis, J. Xu, R. S. Fulton, L. A. Fulton, H. S. Cordum, C. Wang, G. Elliott, J. Edwards, E. R. Mardis, L. G. Engstrand, J.I.Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103** (2006) 9999-10004.
31. D. A. Baltrus, M. R. Amieva, A. Covacci, T. M. Lowe, D. S. Merrell, K. M. Ottemann, M. Stein, N. R. Salama, and K. Guillemin, *J. Bacteriol.* **191** (2009) 447-448.

32. H. M. S.Algood, T. Cover, *Clin. Microbiol.* **19** (2006) 597-613.
33. C. Belzer, J. Stoof, , A. H. Vliet, *Biometals* **20** (2007) 417-249
34. S.Tan, J. M. Moto, J. Romero-Gallo, R. M. Peek, M. R. Amieva, *PLoS Pathog.* **7** (2011)
35. N.-C. Ha, S.-T. Oh, J. Y. Sung, K. Ah Cha, M. H. Lee, B.-H. Oh, *Nat. Struct. Biol.* **8** (2001)
36. N.-C. Ha, S.-T. Oh, J. Y. Sung, K. Ah Cha, M. H. Lee, B.-H. Oh, *Nat. Struct. Biol.* **9** (2003)
37. W. L. DeLano, Pymol: An open-source molecular graphics tool. CCP4 **40** (2002) 82-92.
38. D. G. Barceloux,. *Copper. J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **37** (1999) 217–230.
39. A. N. Pham, G. Xing, C. J. Miller, D. Waite, *J. Catal.* **301** (2013) 54-64.
40. L. Sanders, T. M. Andermann, K. M. Ottemann, *Microbiology* **159** (2013) 46-57
41. S. Bereswill, S. Greiner, A. H. van Vliet, B. Waidner, F. Fassbinder, E. Schiltz, *J. Bacteriol.* **182** (2000) 5948–5953.
42. B. Waidner, K. Melchers, I. Ivanov, H. Loferer, K. W. Bensch, M. Kist, *J. Bacteriol.* **184** (2002) 6700–6708.
43. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5076771/ (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
44. https://zir.nsk.hr/islandora/object/pmf%3A2003 (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
45. L. Zhang, M. Koay, M. J. Maher, Z. Xiao, A. G. Wedd, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 5834.
46. T.J. Lawton, G. E. Kenney, J. D. Hurley, A. C. Rosenzweig, *Biochemistry* **55** (2016) 2278-2290.
47. https://repozitorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf:142/preview (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
48. D. Ronacarti, A. Danielli, G. Spohn, I. Delany, V. Scarlato, *J. Bacteriol.* **189** (2007)
49. D. Roncarati, A. Danielli, V. Scarlato, *J. Bacteriol.* **193** (2011) 5629-5636.
50. S. H. Phadnis, M. H. Parlow, M. Levy, D. Ilver, C. M. Caulkins, J. B. Connors, B. E. Dunn, *Infect. Immun.* **64** (1996) 905–912.
51. J. Evans, Jr. D. G. Evans, L. Engstrand, D. Y. Graham, *Infect. Immun.* **60** (1992) 2125-2127.
52. G. Spohn, A. Danielli, D. Roncarati, I. Delany, R. Rappuoli, V. Scarlato, *J. Bacteriol.* **186** (2004) 2956-2965.
53. G. Spohn, V. Scarlato, *Mol. Microbiol.* **34** (1999) 663-674.

54. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=O25670 (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
55. T. Ogura, A. J. Wilkinson, *Genes Cells* **6** (2001) 575–597.
56. A. Bazin, M. V. Cherrier, I. Gutsche, J. Timmins, L. Terradot, *Nucleic Acids Res.* **43** (2015) 8564-8576.
57. S. A: Abdul Rehman, V. Verma, M. Mazumder, S. K. Dhar, S. Gourinath, *J.Bacteriol.* **195** (2013) 2826-2838.
58. J. Snider, G. Thibault, W. A. Houry, *Genome Biol.* **9** (2008) 216.1-216.8.
59. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643927/ (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
60. N. Cvetesic, A. Palencia, I. Halasz, S. Cusack, I. Gruic-Sovulj, *EMBO J.* **33** (2014) 1639-1653.
61. B. Prugovečki, D. Matković-Čalogović, Predavanja iz difrakcijskih metoda određivanja kristalnih struktura, ZOAK, PMF, Zagreb, 2016.
62. https://www.rcsb.org/#Subcategory-search_statistics (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
63. I. D. Campbell, *Nat. Rev.* **3** (2002) 377.
64. M. Perutz, *Methods Enzymol.* **114** (1985) 3-19.
65. J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wychoff, D. C. Phillips, *Nature* **181** (1958) 662-666.
66. G. Rosenbaum, K. C. Holmes, J. Witz, *Nature* **230** (1971) 434-437.
67. https://zir.nsk.hr/islandora/object/pmf%3A1256 (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
68. K. E. van Holde, Principles of Physical Biochemistry, Person Prentice Hall, New Jersey, 2006.
69. A. McPherson, Introduction to Macromolecular Crystallography, WileyBlackwell, New Jersey, 2006.
70. https://www.researchgate.net/figure/Typical-outcomes-of-a-protein-crystallization-experiment-A-Amorphous-precipitation_fig3_49820512 (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
71. J. Drenth, Principles of Protein X-Ray Crystallography, Springer, New York, 2007.
72. https://www.lucigen.com/docs/manuals/MA108-Expresso-T7-SUMO-Cloning-Expression-System.pdf (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
73. http://ecoliwiki.net/colipedia/index.php/pET-15b (datum pristupa 25. lipnja 2018.)

74. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/na1111bul.pdf (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
75. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/na0160bul.pdf (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
76. https://biotium.com/wp-content/uploads/2015/02/PI-41002-41003.pdf (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
77. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0013004_GeneRuler_1kb_DNALadder_250ug_UG.pdf (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
78. http://www.bio-rad.com/en-us/sku/1610363-precision-plus-protein-unstained-protein-standards-strep-tagged-recombinant-1-ml?ID=1610363 (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
79. V. Vuković, nerecenzirana skripta za studente biologije, PMF, BO (2017)
80. https://www.qiagen.com/dk/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en (datum pristupa 25. lipnja 2018.)
81. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3069411/ (datum pristupa 29. lipnja 2018.)
82. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (datum pristupa 25. lipnja 2018.)

§ 8. DODATAK

8.1. Nukleotidni sljedovi korištenih gena

Slijedeći nukleotidni sljedovi prikazuju korištene varijante gena *crdA* iz *H. pylori* soja P12 za usporedbu s rezultatima sekvenciranja (prikazano u *FASTA* obliku):

a)

>crdA

ATGAAGAAGTTAGCCGCTTTATTTTTAGTAAGCGTGTTGGGGGTTATGAGTTTAAACGCATG
GGAGCAAACCCTAAAAGCCAATGATTTGGAAGTGAAAATCAAATCCGTGGGTAACCCCATTA
AAGGCGATAACACTTTCGTGCTTAGCCCCACTTTAAAAGGTAAGGCTTTAGAAAAAGCTATC
GTTAGGGTGCAGTTTATGATGCCTGAAATGCCCGGCATGCCAGCGATGAAAGAAATGGCGCA
AGTGAGTGAAAAAAACGGCCTTTATGAAGCAAAAACCAATCTTTCTATGAACGGGACATGGC
AGGTTAGGGTGGATATTAAATCTAAAGAGGGCCAGGTTTATCGCGCTAAAACAAGCCTGGAT
TTATAA

(Napomena: podcrtano predstavlja signalnu sekvencu)

b)

>crdA(-)

CAAACCCTAAAAGCCAATGATTTGGAAGTGAAAATCAAATCCGTGGGTAACCCCATTAAAGG
CGATAACACTTTCGTGCTTAGCCCCACTTTAAAAGGTAAGGCTTTAGAAAAAGCTATCGTTA
GGGTGCAGTTTATGATGCCTGAAATGCCCGGCATGCCAGCGATGAAAGAAATGGCGCAAGTG
AGTGAAAAAAACGGCCTTTATGAAGCAAAAACCAATCTTTCTATGAACGGGACATGGCAGGT
TAGGGTGGATATTAAATCTAAAGAGGGCCAGGTTTATCGCGCTAAAACAAGCCTGGATTTAT
AA

c)

>G-crdA(-)

GGACAAACCCTAAAAGCCAATGATTTGGAAGTGAAAATCAAATCCGTGGGTAACCCCATTAA
AGGCGATAACACTTTCGTGCTTAGCCCCACTTTAAAAGGTAAGGCTTTAGAAAAAGCTATCG
TTAGGGTGCAGTTTATGATGCCTGAAATGCCCGGCATGCCAGCGATGAAAGAAATGGCGCAA
GTGAGTGAAAAAAACGGCCTTTATGAAGCAAAAACCAATCTTTCTATGAACGGGACATGGCA
GGTTAGGGTGGATATTAAATCTAAAGAGGGCCAGGTTTATCGCGCTAAAACAAGCCTGGATT
TATAA

(Napomena: podrcrtano predstavlja dodatna 3 ugrađena nukleotida)

d)

>GS-crdA(-)

GGATCCCAAACCCTAAAAGCCAATGATTTGGAAGTGAAAATCAAATCCGTGGGTAACCCCAT
TAAAGGCGATAACACTTTCGTGCTTAGCCCCACTTTAAAAGGTAAGGCTTTAGAAAAAGCTA
TCGTTAGGGTGCAGTTTATGATGCCTGAAATGCCCGGCATGCCAGCGATGAAAGAAATGGCG
CAAGTGAGTGAAAAAAACGGCCTTTATGAAGCAAAAACCAATCTTTCTATGAACGGGACATG
GCAGGTTAGGGTGGATATTAAATCTAAAGAGGGCCAGGTTTATCGCGCTAAAACAAGCCTGG
ATTTATAA

(Napomena: podcrtano predstavlja dodatnih 6 ugrađenih nukleotida)

8.2. Sravnjivanje sekvence gena crdA bakterije H. pylori soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću početnica

8.2.1. Sravnjivanje sekvence gena G-crdA(-) bakterije H. pylori soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću SUMO Forward početnice

180523-085_M15_1_SUMO_Forward_F.ab1
Sequence ID: Query_98609 Length: 1455 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
582 bits(315)	2e-170	315/315(100 %)	0/315(0 %)	Plus/Plus

Range 1: 54 to 368

```
Query  1    GGACAAACCCTAAAAGCCAATGATTTGGAAGTGAAAATCAAATCCGTGGGTAACCCCATT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  54   GGACAAACCCTAAAAGCCAATGATTTGGAAGTGAAAATCAAATCCGTGGGTAACCCCATT  113

Query  61   AAAGGCGATAACACTTTCGTGCTTAGCCCCACTTTAAAAGGTAAGGCTTTAGAAAAAGCT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  114  AAAGGCGATAACACTTTCGTGCTTAGCCCCACTTTAAAAGGTAAGGCTTTAGAAAAAGCT  173

Query  121  ATCGTTAGGGTGCAGTTTATGATGCCTGAAATGCCCGGCATGCCAGCGATGAAAGAAATG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  174  ATCGTTAGGGTGCAGTTTATGATGCCTGAAATGCCCGGCATGCCAGCGATGAAAGAAATG  233

Query  181  GCGCAAGTGAGTGAAAAAAACGGCCTTTATGAAGCAAAAACCAATCTTTCTATGAACGGG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  234  GCGCAAGTGAGTGAAAAAAACGGCCTTTATGAAGCAAAAACCAATCTTTCTATGAACGGG  293

Query  241  ACATGGCAGGTTAGGGTGGATATTAAATCTAAAGAGGGCCAGGTTTATCGCGCTAAAACA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  294  ACATGGCAGGTTAGGGTGGATATTAAATCTAAAGAGGGCCAGGTTTATCGCGCTAAAACA  353

Query  301  AGCCTGGATTTATAA  315
            |||||||||||||||
Sbjct  354  AGCCTGGATTTATAA  368
```

Sravnjivanje je napravljeno pomoću *NCBI*-jevog programa *BLAST* (blastn)[82].

8.2.2. Sravnjivanje sekvence gena G-crdA(-) bakterije H. pylori soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću pETite Reverse početnice

180523-085_O15_1_pETite_Reverse_R.ab1
Sequence ID: Query_158717 Length: 1850 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
582 bits(315)	2e-170	315/315(100 %)	0/315(0 %)	Plus/Minus

Range 1: 40 to 354

```
Query  1    GGACAAACCCTAAAAGCCAATGATTTGGAAGTGAAAATCAAATCCGTGGGTAACCCCATT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  354  GGACAAACCCTAAAAGCCAATGATTTGGAAGTGAAAATCAAATCCGTGGGTAACCCCATT  295

Query  61   AAAGGCGATAACACTTTCGTGCTTAGCCCCACTTTAAAAGGTAAGGCTTTAGAAAAAGCT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  294  AAAGGCGATAACACTTTCGTGCTTAGCCCCACTTTAAAAGGTAAGGCTTTAGAAAAAGCT  235

Query  121  ATCGTTAGGGTGCAGTTTATGATGCCTGAAATGCCCGGCATGCCAGCGATGAAAGAAATG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  234  ATCGTTAGGGTGCAGTTTATGATGCCTGAAATGCCCGGCATGCCAGCGATGAAAGAAATG  175

Query  181  GCGCAAGTGAGTGaaaaaaaCGGCCTTTATGAAGCAAAAACCAATCTTTCTATGAACGGG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  174  GCGCAAGTGAGTGAAAAAAACGGCCTTTATGAAGCAAAAACCAATCTTTCTATGAACGGG  115

Query  241  ACATGGCAGGTTAGGGTGGATATTAAATCTAAAGAGGGCCAGGTTTATCGCGCTAAAACA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  114  ACATGGCAGGTTAGGGTGGATATTAAATCTAAAGAGGGCCAGGTTTATCGCGCTAAAACA  55

Query  301  AGCCTGGATTTATAA  315
            |||||||||||||||
Sbjct  54   AGCCTGGATTTATAA  40
```

Sravnjivanje je napravljeno pomoću *NCBI*-jevog programa *BLAST* (blastn)[82].

8.2.3. Sravnjivanje sekvence gena GS-crdA(-) bakterije H. pylori soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću SUMO Forward početnice

180523-085_I17_4_SUMO_Forward_F.ab1
Sequence ID: Query_210261 Length: 1881 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
588 bits(318)	4e-172	318/318(100 %)	0/318(0 %)	Plus/Plus

Range 1: 54 to 371

```
Query  1    GGATCCCAAACCCTAAAAGCCAATGATTTGGAAGTGAAAATCAAATCCGTGGGTAACCCC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  54   GGATCCCAAACCCTAAAAGCCAATGATTTGGAAGTGAAAATCAAATCCGTGGGTAACCCC  113

Query  61   ATTAAAGGCGATAACACTTTCGTGCTTAGCCCCACTTTAAAAGGTAAGGCTTTAGAAAAA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  114  ATTAAAGGCGATAACACTTTCGTGCTTAGCCCCACTTTAAAAGGTAAGGCTTTAGAAAAA  173

Query  121  GCTATCGTTAGGGTGCAGTTTATGATGCCTGAAATGCCCGGCATGCCAGCGATGAAAGAA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  174  GCTATCGTTAGGGTGCAGTTTATGATGCCTGAAATGCCCGGCATGCCAGCGATGAAAGAA  233

Query  181  ATGGCGCAAGTGAGTGaaaaaaaCGGCCTTTATGAAGCAAAAACCAATCTTTCTATGAAC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  234  ATGGCGCAAGTGAGTGAAAAAAACGGCCTTTATGAAGCAAAAACCAATCTTTCTATGAAC  293

Query  241  GGGACATGGCAGGTTAGGGTGGATATTAAATCTAAAGAGGGCCAGGTTTATCGCGCTAAA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  294  GGGACATGGCAGGTTAGGGTGGATATTAAATCTAAAGAGGGCCAGGTTTATCGCGCTAAA  353

Query  301  ACAAGCCTGGATTTATAA  318
            ||||||||||||||||||
Sbjct  354  ACAAGCCTGGATTTATAA  371
```

Sravnjivanje je napravljeno pomoću *NCBI*-jevog programa *BLAST* (blastn)[82].

8.2.4. Sravnjivanje sekvence gena GS-crdA(-) bakterije H. pylori soja P12 s rezultatima dobivenim sekvenciranjem konstruiranog vektora pomoću pETite Reverse početnice

180523-085_K17_4_pETite_Reverse_R.ab1
Sequence ID: Query_229855 Length: 1851 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
588 bits(318)	4e-172	318/318(100 %)	0/318(0 %)	Plus/Minus

Range 1: 44 to 361

```
Query  1    GGATCCCAAACCCTAAAAGCCAATGATTTGGAAGTGAAAATCAAATCCGTGGGTAACCCC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  GGATCCCAAACCCTAAAAGCCAATGATTTGGAAGTGAAAATCAAATCCGTGGGTAACCCC  302

Query  61   ATTAAAGGCGATAACACTTTCGTGCTTAGCCCCACTTTAAAAGGTAAGGCTTTAGAAAAA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  ATTAAAGGCGATAACACTTTCGTGCTTAGCCCCACTTTAAAAGGTAAGGCTTTAGAAAAA  242

Query  121  GCTATCGTTAGGGTGCAGTTTATGATGCCTGAAATGCCCGGCATGCCAGCGATGAAAGAA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  GCTATCGTTAGGGTGCAGTTTATGATGCCTGAAATGCCCGGCATGCCAGCGATGAAAGAA  182

Query  181  ATGGCGCAAGTGAGTGaaaaaaaCGGCCTTTATGAAGCAAAAACCAATCTTTCTATGAAC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  ATGGCGCAAGTGAGTGAAAAAAACGGCCTTTATGAAGCAAAAACCAATCTTTCTATGAAC  122

Query  241  GGGACATGGCAGGTTAGGGTGGATATTAAATCTAAAGAGGGCCAGGTTTATCGCGCTAAA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  GGGACATGGCAGGTTAGGGTGGATATTAAATCTAAAGAGGGCCAGGTTTATCGCGCTAAA  62

Query  301  ACAAGCCTGGATTTATAA  318
            ||||||||||||||||||
Sbjct  61   ACAAGCCTGGATTTATAA  44
```

Sravnjivanje je napravljeno pomoću *NCBI*-jevog programa *BLAST* (blastn)[82].

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Vigor Matković

Datum rođenja: 25. travnja 1994.

Mjesto rođenja: Rijeka

Obrazovanje

2001–2009	Osnovna škola „Rikard Katalinić Jeretov“, Opatija
2004–2009	Osnovna glazbena škola „Ivan Matetić Ronjgov“, Rijeka
2009–2013	„Gimnazija Eugena Kumičića“, Opatija
2013–2016	Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
ljeto 2017	Stručna praksa u Xellia Hrvatska d. o. o. (Xellia Pharmaceuticals)

Nagrade i priznanja

2010–2014	Stipendije Grada Opatije
2013–2018	Stipendije Primorsko–goranske županije
2018	3. nagrada za najbolje postere, „Susret mladih kemijskih inženjera“, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2014–2018	„Otvoreni dan kemije“, Kemijski odsjek, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Postersko priopćenje; Vigor Matković, Andrea Švorinić, Ivana Kekez, Dubravka Matković-Čalogović POJAČANA EKSPRESIJA I KRISTALIZACIJA PROTEINA HP1026 IZ BAKTERIJE Helicobacter pylori, „Susret mladih kemijskih inženjera“, Zagreb, Veljača, 2018.