

Utjecaj afinitetnog privjeska na svojstva adenilosukcinat-sintetaze iz bakterije *Helicobacter pylori*

Petek, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:562036>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Ana Petek

**UTJECAJ AFINITETNOG PRIVJESKA NA
SVOJSTVA ADENILOSUKCINAT-
SINTETAZE IZ BAKTERIJE
*HELICOBACTER PYLORI***

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra(e) kemije

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Ivane Leščić Ašler i neposrednim voditeljstvom mag. chem. Ante Bubić. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Alosterički komunikacijski putevi u oligomernim enzimima (IP-2019-04-6764).

Zahvale

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Ivani Leščić Ašler na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada, na njenom uloženom vremenu, strpljenju, a ponajviše njenom trudu i stručnim savjetima pomoću kojih sam naučila raditi u laboratoriju i koji mi služe kao podloga za daljnje učenje. Također se zahvaljujem na njenom strpljenju tijekom pisanja samo diplomskog rada, na korisnim savjetima, smjernicama i komentarima. Zahvaljujem se Ante Bubiću, mag. chem. na prenesenom znanju i velikoj dozi strpljenja tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Zahvaljujem se svim ljudima laboratorija za kemijsku i biološku kristalografiju na IRB-u kao i svim profesorima PMF-a, a posebno izv. prof. dr. sc. Branimiru Bertoši. Na kraju, zahvaljujem se svojoj obitelji na beskonačnoj podršci i svojim prijateljima na motivaciji i lijepim trenucima.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IV
ABSTRACT	V
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Cilj rada	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. <i>Helicobacter pylori</i>	3
2.1.1. <i>Rod i vrste Helicobacter</i>	3
2.1.2. <i>Glavna obilježja H. pylori</i>	4
2.1.3. <i>Epidemiologija i patogeneza</i>	5
2.1.4. <i>Klinička obilježja H. pylori</i>	6
2.1.5. <i>Dijagnoza i liječenje</i>	7
2.1.6. <i>Metabolizam nukleotida</i>	8
2.2. Adenilosukcinat-sintetaza, AdSS	8
2.2.1. <i>Adenilosukcinat-sintetaza iz bakterije Escherichia coli</i>	10
2.3. Afinitetni privjesak	11
2.3.1. <i>Histidinski afinitetni privjesak</i>	12
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. <i>Standardne kemikalije</i>	13
3.1.2. <i>Enzimi, enzimski supstrati i inhibitor</i>	13
3.1.3. <i>Proteinski markeri</i>	13
3.1.4. <i>Plazmid i bakterijski sojevi za prekomjernu ekspresiju</i>	13
3.2. Prekomjerna ekspresija proteina	14
3.2.1. <i>Priprema hranjive podloge</i>	14

3.2.2. Transformacija bakterijskih stanica	14
3.2.3. Priprema prekoćne kulture	15
3.2.4. Ekspresija proteina	15
3.3. Ekstrakcija proteina iz stanice.....	16
3.4. Pročišćavanje proteina	16
3.4.1. Priprema pufera za pročišćavanje proteina	16
3.4.2. Afinitetna kromatografija.....	17
3.4.3. Gel filtracijska kromatografija	19
3.5. Koncentriranje proteina.....	19
3.6. Mjerenje koncentracije proteina	20
3.7. Mjerenje enzimске aktivnosti	20
3.8. Elektroforeza u gelu.....	21
3.8.1. Priprema gelova za elektroforezu.....	21
3.8.2. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE).....	22
3.9. Izoelektrično fokusiranje.....	23
3.10. Cirkularni dikroizam.....	24
3.11. Određivanje kinetičkih parametra.....	26
3.12. Utjecaj temperature i pH na stabilnost proteina.....	27
3.13. Kristalizacija proteina	28
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Pročišćavanje proteina	30
4.2. Izoelektrična točka i molekulska masa	33
4.3. Elementi sekundarne strukture	35
4.4. Kinetički parametri.....	37
4.5. Utjecaj temperature i pH na stabilnost proteina.....	40
4.6. Kristalizacija proteina	43

§ 5. ZAKLJUČAK	46
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	48
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	50
§ 8. ŽIVOTOPIS	VI



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

UTJECAJ AFINITETNOG PRIVJESKA NA SVOJSTVA ADENILOSUKCINAT-SINTETAZE IZ BAKTERIJE *HELICOBACTER PYLORI*

Ana Petek

Bakterija *Helicobacter pylori* za sintezu purina koristi reciklirajući put, a ključni enzim u tom putu jest adenilosukcinat-sintetaza (AdSS). Histidinski afinitetni privjesak omogućuje jednostavnije pročišćavanje proteina uz veći prinos, no istovremeno može utjecati na prvobitnu funkciju enzima. Stoga je provedena usporedba nativnog AdSS-a i AdSS-a obilježenog histidinskim privjeskom, kao cilj ovog diplomskog rada. Obilježeni AdSS je pročišćen u dva koraka, afinitetnom kromatografijom i gel filtracijom. Izmjerena mu je specifična enzimska aktivnost, te su određeni kinetički parametri za sva tri supstrata reakcije. Provedena je inhibicija AdSS-a jednim od produkata reakcije – GDP-om. Određeno je temperaturno i pH područje stabilnosti ovog enzima. Udio elemenata sekundarne strukture u AdSS-u određen je metodom cirkularnog dikroizma. Enzim je kristaliziran tehnikom difuzije para iz viseće kapi, pri različitim koncentracijama proteina. Dobiveni rezultati pokazuju kako histidinski privjesak ne utječe znatno na funkciju AdSS, te se tako obilježeni enzim može pouzdano koristiti u budućim istraživanjima.

(52 stranice, 17 slika, 12 tablica, 49 literaturnih 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: adenilosukcinat-sintetaza, afinitetna kromatografija, enzimska kinetika, *Helicobacter pylori*, histidinski privjesak

Mentor: dr. sc. Ivana Leščić Ašler

Neposredni voditelj: Ante Bubić, mag. chem.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
2. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
3. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
4. Zamjena: doc. dr. sc. Nikola Bregović

Datum diplomskog ispita: 29. rujna 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

EFFECT OF AFFINITY TAG ON PROPERTIES OF ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE FROM *HELICOBACTER PYLORI*

Ana Petek

The bacterium *Helicobacter pylori* utilises the recycling pathway for purine synthesis, and the key enzyme of this pathway is adenylosuccinate synthetase (AdSS). The histidine affinity tag makes protein purification easier and protein yield higher but simultaneously it can affect the original function of the enzyme. Therefore, a comparison of native and histidine tagged AdSS was conducted as the aim of this thesis. The tagged AdSS was purified in two steps, by affinity chromatography and gel filtration. Its specific enzyme activity was measured and the kinetic parameters for all three reaction substrates were determined. Inhibition of AdSS was performed by one of the reaction products – GDP. The temperature and pH range of stability of this enzyme was determined. The content of the secondary structure elements in AdSS was determined by the circular dichroism method. The enzyme was crystallized by hanging drop vapor diffusion technique at different protein concentrations. Obtained results showed that histidine tag does not affect function of AdSS significantly so tagged enzyme can be used reliably in the future research.

(52 pages, 17 figures, 12 tables, 49 references, original in Croatian)

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: adenylosuccinate synthetase, affinity chromatography, *Helicobacter pylori*, histidine tag, kinetic parameters

Mentor: Dr. Ivana Leščić Ašler, Research Associate

Assistant mentor: Ante Bubić, mag. chem.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Branimir Bertoša, Associate Professor

Reviewers:

1. Dr. Branimir Bertoša, Associate Professor
2. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Full Professor
4. Substitute: Dr. Nikola Bregović, Assistant Professor

Date of exam: 29. September 2020.

Ime Prezime

Diplomski rad

§ 1. UVOD

Inhibicija enzima važna je kod same regulacije aktivnosti enzima, a veliku primjenu pronalazi i kod razvijanja novih lijekova protiv ciljnih enzima.¹ Inhibicija enzima adenilosukcinat-sintetaze (AdSS) mogla bi omogućiti razvijanje potencijalnih lijekova protiv želučanog patogena, bakterije *Helicobacter pylori*.

Problem infekcije bakterijom *H. pylori* poznat je diljem svijeta što nije ni čudno pošto približno 50% svjetske populacije pati od zaraze s *H. pylori*.² Radi se o gram-negativnom, mikroaerofilnom patogenu koji se prilagodio životu u želucu čovjeka. Bakterija prvenstveno uzrokuje infekciju želučane sluznice, a time i povećava rizik od razvitka ozbiljnih bolesti kao što su kronični gastritis, čir na želucu i dvanaesniku, karcinom želuca te MALT limfom.³ 1994. godine Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je klasificirala bakteriju *H. pylori* kao karcinogen skupine I.⁴ Da bi bakterija mogla živjeti i replicirati se, kao i sva ostala živa bića, nužno je da sintetizira purine i pirimidine, gradivne elemente nukleinskih kiselina. Kod većine ostalih organizama postoje dva načina sinteze purina, *de novo* i reciklirajućim putem (engl. *salvage pathway*), ali *H. pylori* posjeduje gene samo za enzime reciklirajućeg puta.⁵

Jedan od ključnih enzima koji sudjeluje i u putu *de novo* i u reciklirajućem putu biosinteze purina je AdSS. AdSS katalizira prvi korak biosinteze AMP-a iz IMP-a pri čemu nastaje adenilosukcinat, prekursor AMP-a. Pokazano je da je enzim prisutan u svim živim stanicama osim u eritrocitima. Kod sisavaca postoji u dvije izoforme, bazičnoj (pI~9) i kiseloj (pI~6) pri čemu je kiseli izoenzim povezan sa *de novo* sintezom purina, a bazični sudjeluje u nukleotidnom (reciklirajućem) ciklusu purina.⁶ U svrhu proučavanja inhibicije AdSS-a nužna je ekspresija i pročišćavanje enzima. Dobivanje veće količine enzima i brži način pročišćavanja moguće je dodavanjem afinitetnog privjeska na protein.

Histidinski afinitetni privjesak obično se sastoji od šest histidina ugrađenih na N- ili C- kraj proteina. Za pročišćavanje proteina s histidinskim privjeskom koristi se afinitetna kromatografija s imobiliziranim ionima (engl. *immobilized metal affinity chromatography*, IMAC) koja se temelji na interakciji histidina s ionima prijelaznih metala kao što je Ni²⁺. Zbog svoje relativno male veličine koja iznosi oko 2,5 kDa vjeruje se da histidinski privjesak

minimalno utječe na strukturu i funkcionalnost enzima. Štoviše, u nekim slučajevima poboljšava ekspresiju proteina i povećava njegovu topljivost.^{7,8} S druge strane, dostupna literatura upozorava na moguće loše efekte histidinskog privjeska na pojedine enzime. (His)₆ se može se vezati na aktivno mjesto i smanjiti afinitet enzima prema supstratu te također može utjecati na smanjenu toplinsku stabilnost enzima.^{7,9}

1.1. Cilj rada

Karakterizacija i proučavanje strukture adenilosukcinat-sintetaze i njenih interakcija s potencijalnim inhibitorima zahtijeva ekspresiju i pročišćavanje većih količina enzima. Cilj ovog istraživanja je proučiti da li postoji utjecaj histidinskog privjeska na funkcionalnost enzima, usporedbom kinetičkih svojstava s nativnim AdSS-om koji ne nosi privjesak. Izostanak negativnog utjecaja histidinskog privjeska na svojstva AdSS pokazao bi da je moguće s pouzdanjem nastaviti istraživanja s obilježenim enzimom.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. *Helicobacter pylori*

Krajem 19. i početkom 20. stoljeća pronađeni su do tada nepoznati spiralni mikroorganizmi u želucu životinja. Ista bakterija nađena je i kod ljudi koji su patili od čira na želucu ili raka želuca. Sve do ranih 1980.-tih smatralo se kako su te bakterije posljedica kontaminacije s hranom.¹⁰ Nešto kasnije, 1983. australski znanstvenici Robin Warren i Barry J. Marshall identificirali su bakteriju kod 58 od 100 pacijenta.¹¹ Organizam je na početku bio nazvan *Campylobacter pylori*, ali je kasnije preimenovan u *Helicobacter pylori* zbog činjenice da se ipak razlikuje od članova roda *Campylobacter*.¹⁰

Helicobacter pylori je bakterija koja uzrokuje infekciju želučane sluznice čovjeka i povećava rizik od razvitka ozbiljnih bolesti, posebice kroničnog gastritisa, čira na želucu, čira na dvanaesniku i karcinoma želuca. Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) je 1994. godine klasificirala bakteriju *H. pylori* kao karcinogen skupine I.⁴ Prevalencija zaraze uvelike varira između različitih geografskih područja i etničkih skupina no smatra se da je *H. pylori* prisutna kod približno 50% svjetske populacije.¹² Infekcija bakterijom javlja se kao posljedica izravnog prijenosa s čovjeka na čovjeka, bilo oralnim, fekalno-oralnim putem ili oboje.¹⁰

2.1.1. Rod i vrste *Helicobacter*

Poznato je i identificirano najmanje 24 vrste u rodu *Helicobacter*, a mnoge vrste još čekaju formalno priznanje.¹³ Svi pripadnici roda *Helicobacter* su mikroaerofilni organizmi i većina ih posjeduje enzime katalazu i oksidazu, a neke vrste i ureazu. Vrste roda *Helicobacter* mogu se podijeliti u dvije skupine, gastričke (želučane) i negastričke (crijevno-jetrene). Obje skupine pokazuju visoku specifičnost prema organima, tako da gastričke vrste nisu u mogućnosti kolonizirati probavni trakt i obrnuto. Neke od vrsta *Helicobacter* prikazane su u tablici 2.1.¹⁰

Tablica 2.1. Vrste *Helicobacter*. Tablica preuzeta i prilagođena iz literaturnog izvora ¹⁰.

Vrste	Primarni domaćin	Patogeneza
Gastričke <i>Helicobacter</i>		
<i>H. pylori</i>	Čovjek	Gastritis, peptički ulkus, želučani adenokarcinom, limfom želuca
<i>H. felis</i>	Mačka, pas, miš	Gastritis koji se može razviti u peptički ulkus i želučani adenokarcinom kod miša
<i>H. mustelae</i>	Feretka	Gastritis, peptički ulkus, želučani adenokarcinom, limfom želuca
<i>H. acinonychis</i>	Gepard, tigar i druge velike mačke	Gastritis, peptički ulkus
<i>H. heilmannii</i>	Čovjek, pas, mačka, majmun, gepard, štakor	Gastritis, simptomi dispepsije, limfom želuca
Negastričke <i>Helicobacter</i>		
<i>H. hepaticus</i>	Miš i ostali glodavci	Proliferativni tiflokolitis, hepatitis, hepatom

2.1.2. Glavna obilježja *H. pylori*

H. pylori je gram-negativna bakterija duljine od 2 do 4 μm te širine od 1 μm . Općenito je spiralnog oblika no u rijetkim slučajevima može se pojaviti i u obliku štapića. Kružni oblici bakterije javljaju se samo nakon tretiranja bakterije antibioticima. Organizam ima od 2 do 6 obloženih bičeva duljine oko 3 μm . Bičevi osiguravaju pokretljivost te omogućuju brzo gibanje bakterije u viskoznim otopinama poput sloja sluzi koji prekriva stanice epitela želuca.¹⁰ Bakterija je vrlo dobro prilagođena životu u jakim, kiselim uvjetima želuca. Sposobna je promijeniti uvjete okruženja i reducirati kiselost što joj omogućava preživljavanje.¹² Istraživanja su pokazala da *H. pylori* ima nekoliko mehanizama pomoću kojih se prilagođava kiselom pH u želucu. Jedan od načina je proizvodnja velike količine

enzima ureaze koji čini ukupno 10% od svih bakterijskih enzima. Amonijak koji nastaje enzimskom razgradnjom uree pomoću ureaze olakšava preživljavanje i rast u kiselim uvjetima.^{4,14} *H. pylori* je mikroaerofilna bakterija koja ne podnosi visoke količine kisika, ali joj je potrebno najmanje 2% O₂ za život. Bakterija se dijeli svaka 3 sata, a prestaje se razmnožavati pri pH 3,5.¹⁵

2.1.3. Epidemiologija i patogeneza

Prema provedenim istraživanjima, 2015. godine je oko 6,6 milijardi ljudi bilo zaraženo bakterijom *H. pylori*. To ukupno čini 60,3% svjetske populacije. Na prijelazu 21. stoljeća, u razvijenim zemljama prevalencija se smanjila dok se naglo povećala u zemljama u razvoju. Novije istraživanje pokazalo je manju prevalenciju infekcije. Što se tiče zemalja u razvoju postotak zaraženih iznosi oko 50,8, a u razvijenim zemljama oko 34,7%.^{2,16,17} Ovo izvješće sugerira da je infekcija bakterijom *H. pylori* u blagom padu, pogotovo u razvijenim zemljama. Pokazano je da u europskim državama prevalencija infekcije varira od 20 do 40%, a na području SAD-a postotak zaraženih iznosi oko 25,4%. S druge strane, najveći broj zaraženih javlja se u području Istočnog Sredozemlja gdje prevalencija prelazi preko 80%.² Socioekonomski status zajedno s razinom urbanizacije, higijenskim i sanitarnim uvjetima su vjerojatno važni faktori zbog kojih prevladavaju razlike prevalencije *H. pylori* u različitim zemljama.³

Točan put prenošenja ove bakterije nije u potpunosti razjašnjen; međutim, dokazi podupiru prijenos bakterije oralno-oralno ili fekalno-oralno.³ Do infekcije bakterijom najčešće dolazi u ranoj dječjoj dobi no simptomi se javljaju tek kasnije.¹² Nakon što bakterija uđe u želudac domaćina, odmah pomoću enzima ureaze neutralizira kiselo okruženje u želucu. Potom se gibanjem posredovanim flagelama, tj. bičevima pomakne prema epitelnim stanicama želuca. Tu dolazi do specifičnih interakcija između bakterijskih adhezina i staničnih receptora domaćina što dovodi do uspješne kolonizacije i infekcije. Konačno, *H. pylori* oslobađa nekoliko efektorskih proteina/toksina, uključujući CagA (engl. *cytotoxin-associated gene A*) i VacA (engl. *vacuolating cytotoxin A*) što uzrokuje oštećenje tkiva.¹⁸

2.1.4. Klinička obilježja *H. pylori*

Kolonizacija *H. pylori* sama po sebi nije bolest, već stanje koje utječe na rizik razvoja različitih kliničkih poremećaja gornjeg dijela gastrointestinalnog trakta. Iako zaraza s *H. pylori* inducira gastritis kod gotovo svih zaraženih pojedinaca, samo manjina razvije očite kliničke znakove zaraze.¹⁰

Gastritis se definira kao upala želučane sluznice. Neposredno nakon infekcije, bakterija će prvo izazvati akutni gastritis pri čemu dolazi do smanjenog lučenja želučane kiseline, tj. stanja hipokloridije. Takvo stanje može uzrokovati kronični gastritis koji može dovesti do atrofije želuca ili potpunog nedostatka želučane kiseline. Gastritis antruma želuca, odnosno površinski gastritis javlja se kod 95% zaraženih i predstavlja visoki rizik od razvitka čira na dvanaesniku. Kod manjeg broja oboljelih javlja se gastritis korpusa želuca, tzv. dubinski gastritis koji predisponira nastajanju čira na želucu.¹²

Čir na želucu i dvanaesniku koji se obično nazivaju peptički ulkusi definirani su kao oštećenja sluznice gornjeg dijela probavnog trakta. Oštećenja promjera najmanje 0,5 cm nazivaju se ulkusi, odnosno čir ili vried. Posljedica su agresivnog djelovanja želučane kiseline i pepsina.^{10,19} Čak 80% slučajeva čira na dvanaesniku i 50% slučajeva čira na želucu povezano je s infekcijom *H. pylori*.¹²

Kronična upala uzrokovana bakterijom *H. pylori* može dovesti do uništenja želučanih žlijezda i crijevnog epitela što dovodi do gubitka normalne strukture želučane sluznice. Time dolazi do razvoja atrofičnog gastritisa i crijevne metaplazije u otprilike 50% ljudi zaraženih s *H. pylori*. Cijeli niz događaja može dovesti do razvitka raka želuca. Do sada su dvije vrste raka povezane s infekcijom *H. pylori*, MALT limfom i adenokarcinom.²⁰ MALT limfom definira se kao B stanični limfom, a potječe od stanica marginalne zone sekundarnih folikula koje nastaju kao posljedica infekcije.²¹ Smatra se da do razvitka malignih bolesti dolazi zbog izlaganja oksidacijskom stresu koji nastaje kao posljedica imunosnog odgovora tijekom gastritisa.²⁰ Najvjerojatniji mehanizam uključuje kontinuirano oslobađanje reaktivnih kisikovih vrsta koje mogu dovesti do oštećenja DNA i prouzročiti višestruke mutacije.¹⁰ Iako je infekcija s *H. pylori* povezana s karcinomom želuca, treba naglasiti da mnogi ljudi koji razviju rak želuca nisu zaraženi. Prema tome, važni su i drugi okolišni faktori i čimbenici.

2.1.5. Dijagnoza i liječenje

Postoje različiti testovi pomoću kojih se može detektirati bakterija *H. pylori*, a dijele se na invazivne i neinvazivne testove. Invazivni testovi se temelje na želučanim uzorcima za histologiju, kulturu ili druge metode. Kod neinvazivnih testova uzimaju se uzorci krvi, uzorci daha, stolice, urina ili sline za otkrivanje antitijela. Međutim, metoda dijagnoze ovisi o prevalenciji infekcije *H. pylori* i učestalosti karcinoma želuca. Na primjer, neinvazivne metode preferiraju se u područjima gdje je učestalost karcinoma želuca mala, dok se endoskopija preporučuje pacijentima koji imaju veliku vjerojatnost za razvoj karcinoma želuca, poput onih starijih od 60 godina.³ Urejni izdisajni test je siguran, brz i precizan test za detekciju *H. pylori* u želucu. Deset do dvadeset minuta nakon gutanja kapsule koja sadrži označenu ureu, uzima se uzorak daha koji se analizira. Test je pozitivan ako se u uzorku daha nađe označeni ugljikov dioksid. Krvni testovi daju uvid u antitijela na *H. pylori*. Međutim, antitijela mogu još godinama ostati u krvi i nakon liječenja i iskorjenjivanja bakterije. Krvni testovi su korisni u dijagnosticiranju infekcije, ali nisu poželjni kod provjere uspješnosti liječenja. U uzorku stolice također se traže antitijela na bakterije. Ukoliko su ona prisutna u stolici znači da je infekcija *H. pylori* aktivna. Test se može koristiti za utvrđivanje uspješnosti iskorjenjivanja bakterije.¹²

H. pylori sposobna je razviti rezistenciju i iz toga razloga teško ju je iskorijeniti iz želuca domaćina. Danas se najčešće kao početni tretman liječenja koristi trostruka terapija koja se sastoji od primjene dva antibiotika, klaritromicina i amoksicilina, te dodatno tome, inhibitora protonske crpke (engl. *Proton Pump Inhibitors*, PPI).¹² Kako antibiotici ne djeluju pri niskim pH vrijednostima kao što je slučaj u želucu, dodaju se PPI koji povećavaju pH i time omogućavaju djelovanje antibiotika.¹⁵ No ako je rezistencija na klaritromicin veća od 15%, kao alternativni način liječenja primjenjuje se četverostruka terapija koja uključuje bizmut, PPI, tetraciklin i metronidazol ili druga četverostruka solucija, PPI, amoksicilin, klaritromicin i metronidazol.³ Zadnjih nekoliko godina u nekim zemljama postotak rezistencije na klaritromicin se naglo povećao, npr. u Japanu postotak rezistencije na klaritromicin iznosi oko 30%, u Turskoj 40% i u Kini 50%.¹² Različiti načini liječenja, doze i kombinacije lijekova su proučavani, ali nijedan nije dosegao razinu iskorjenjivanja bakterije veću od 90 do 95%. Razlog tome može biti nedovoljno pridržavanje terapije, razne nuspojave i prisutnosti antimikrobne rezistencije.¹⁰

2.1.6. Metabolizam nukleotida

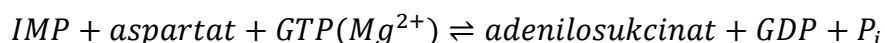
Nukleotidi imaju važnu ulogu u fiziologiji svakog organizma. Esencijalni su za sintezu nukleozid-trifosfata, prekursora nukleinskih kiselina pa su iz tog razloga potrebni za replikaciju i transkripciju genetske informacije. Nukleotidi omogućavaju skladištenje kemijske energije, strukturni su dijelovi koenzima i metaboličkih regulatora. Proučavanje i razumijevanje metabolizma nukleotida bakterije *H. pylori* važno je u mikrobiologiji pošto omogućuje razvoj novih terapija u svrhu eradikacije bakterije.²²

H. pylori je prva bakterija koja ima sekvencirane genome dva različita soja, što je omogućilo bioinformatičku analizu i usporedbu genoma bakterijskih vrsta. Rezultati takve analize pokazali su relativno mali genom s brojnim izmjenama metaboličkih putova u usporedbi s onima drugih bakterijskih vrsta.⁵ Mikroorganizmi koji se prilagođavaju novim životnim sredinama često prolaze kroz promjenu genoma tijekom koje gube gene koji im više nisu potrebni, a stječu nove gene, specifične za okoliš. *H. pylori* je snažno prilagođena životu u sloju sluznice koja prekriva epitelne stanice želuca. Nedostatak metaboličkih puteva sugerira gubitak gena koji više nisu potrebni za rast u relativno stabilnom okruženju ljudskog domaćina kojem se bakterija prilagodila.^{5,10} Bioinformatičkom analizom je pokazano kako je *H. pylori* prošla kroz genetsku promjenu pri čemu je izgubila gene za *de novo* sintezu purina, a zadržala gene za sintezu purina reciklirajućim putem. Bakterija *H. pylori* posjeduje tri enzima koji sudjeluju u reciklirajućem putu, a s druge strane, posjeduje samo dva od ukupno deset enzima koji su potrebni za *de novo* sintezu purina.⁵

2.2. Adenilosukcinat-sintetaza, AdSS

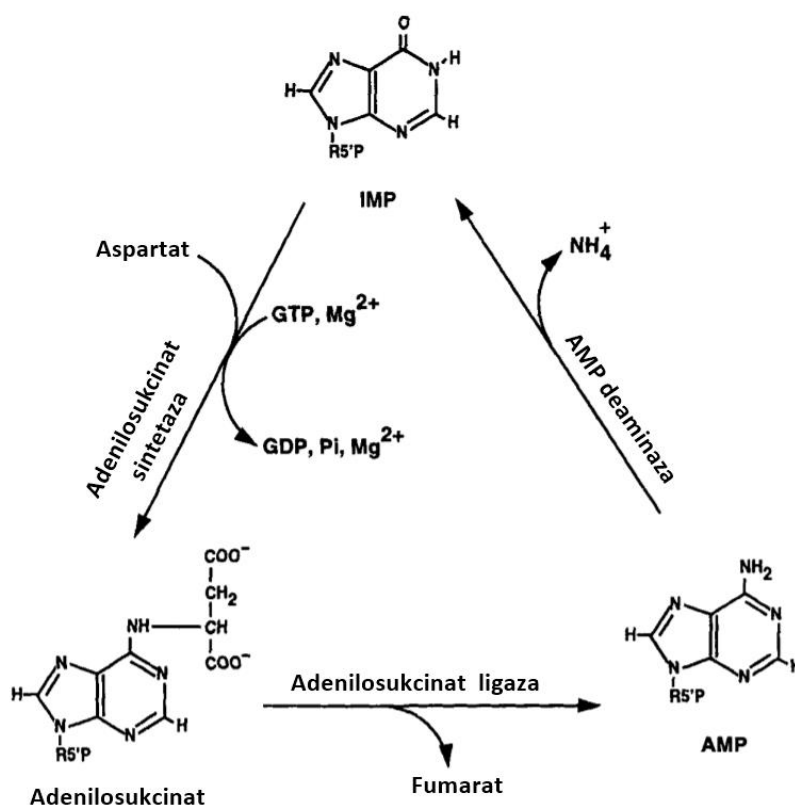
Adenilosukcinat-sintetaza katalizira prvi korak *de novo* biosinteze AMP-a povezujući hidrolizu GTP-a sa sintezom adenilosukcinata iz L-aspartata. Jednako važnu ulogu ima i u organizmima koji se u potpunosti oslanjaju na reciklirajući put biosinteze purina. Kao takav predstavlja potencijalnu metu inhibitora koji bi mogli postati novi lijekovi protiv *H. pylori* infekcije. Zbog svoje ključne uloge u sintezi nukleotida, a time i nukleinskih kiselina, nalazi se u svim živim stanicama osim u zrelih krvnim stanicama.²³

Mehanizam biosinteze AMP-a prikazan je na slici 2.1, a reakcija koju katalizira AdSS je sljedeća:



Potrebna su dva iona Mg^{2+} kako bi se AdSS nalazio u svom aktiviranom obliku, barem za AdSS iz *E. coli*. Jedan ion magnezija intregira s β - i γ -fosforilnim skupinama GTP-a, a drugi s aspartatom u aktivnom mjestu enzima. Na taj način se povećava afinitet enzima za Asp.²⁴

AdSS kod sisavaca postoji u dvije izoforme koje se nazivaju kiseli i bazični izoenzim. Pretpostavlja se da je kiseli izoenzim odgovoran za sintezu purina *de novo* dok bazični izoenzim sudjeluje u nukleotidnom ciklusu purina.²⁵ Kako se te dvije izoforme enzima podosta razlikuju, promjene u njihovoj količini mogu drastično utjecati na regulaciju katalizirane reakcije i time utjecati na metabolizam purinskih nukleotida.⁶



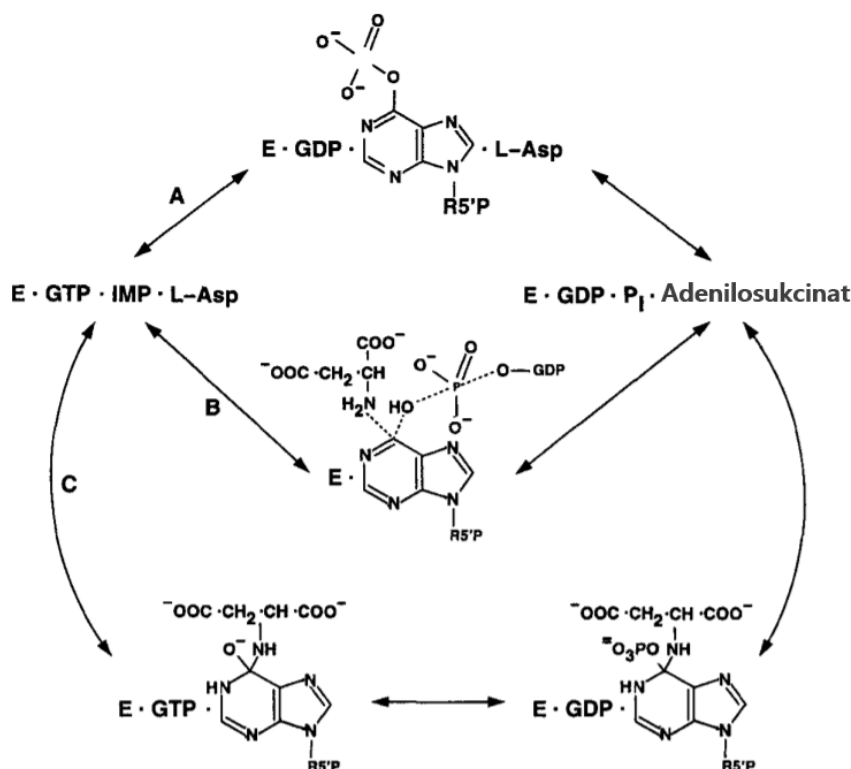
Slika 2.1. Enzimaska reakcija pretvorbe IMP-a i AMP-a. R5'P označava riboza-5-fosfat. Adenosukcinat je prvo formiran pomoću AdSS-a, a potom ga cijepa adenosukcinat-ligaza čime nastaje AMP. Pretpostavlja se da ova tri enzima čine tzv. nukleotidni ciklus. Slika preuzeta i prilagođena iz referenci^{6,23}.

2.2.1. Adenilosukcinat-sintetaza iz bakterije *Escherichia coli*

Najbolje okarakterizirani enzim AdSS je onaj iz bakterije *E. coli*. Taj protein postoji u otopini kao ravnotežna smjesa monomera i dimera. Masa jedne podjedinice enzima iznosi 47 kDa.²⁶ Vezanjem liganda u *in vitro* uvjetima AdSS prelazi iz monomernog oblika u dimer. Radi se o dimerizaciji induciranom ligandom u kojoj vezanje liganda potiče stvaranje potpuno aktivnog mjesta. Pretpostavlja se da dimerizacija inducirana ligandom može biti prirodni mehanizam aktivacije sintetaze.²⁵

Polipeptidni lanac adenilosukcinat-sintetaze uglavnom se sastoji od β -ploče građene od 10 β -lanaca. Prvih 9 lanaca β -ploče su međusobno paralelni dok je deseti β -lanac antiparalelan. Segmenti polipeptidnog lanca koji povezuju pojedine β -lance mogu biti u obliku kratkih petlji ili u obliku manjih domena koje su sastavljene od nekoliko elemenata sekundarne strukture. Konformacijske promjene povezane s ligandima uključuju pomicanje tih segmenta prema aktivnom mjestu. Od tri supstrata, AdSS značajno reagira na IMP pri čemu dolazi do konformacijskih promjena koje uređuju aktivno mjesto enzima.²³

Postoje tri alternativna mehanizma reakcije u kojoj sudjeluje AdSS (slika 2.2). Mehanizam A predložio je Lieberman koji je zaključio da nukleofilnim napadom kisikovog atoma IMP-a na γ -fosforni atom GTP-a nastaje 6-fosforil-IMP. Drugi korak uključuje nukleofilni napad dušika aspartata na ugljik 6-fosforil-IMP-a pri čemu dolazi do otpuštanja anorganskog fosfata.⁶ Miller i Buchanan su predložili mehanizam B u kojem se ugljikov atom aspartata dodaje na IMP pri čemu nastaje tetraedalni međuprodukt. Kisikovi anioni međuprodukta fosforiliraju se GTP-om, a otpuštanjem fosfata potom nastaje adenilosukcinat.²³ Mehanizam C predložili su Markham i Reed za enzim iz *Azotobacter vinelandii*. Temelji se na kinetičkim proučavanjima ustaljenog stanja reakcije izvedene pomoću alternativnog supstrata gvanozin-5'-O-3-tiotrifosfat (GTP γ S). Daljnja kinetička proučavanja AdSS-a iz bakterije *E. coli* sugerirala su da je u pitanju ili potpuno nasumični mehanizam ili potpuno organizirani. Inhibicija AdSS kompetitivnim inhibitorima i produktom pokazala je da je mehanizam reakcije u potpunosti nasumični.^{6,23}



Slika 2.2. Mogući mehanizmi reakcije koju katalizira adenilosukcinat-sintetaza. A) mehanizam koji je predložio Lieberman, B) predložili Miller i Buchanan i C) predložili Markham i Reed. Slika preuzeta i prilagođena iz literaturnog izvora ²³.

2.3. Afinitetni privjesak

Razvitkom afinitetne kromatografije, tradicionalne metode pročišćavanja proteina koje se oslanjaju na pH, ionsku jakost ili temperaturu zamijenjene su novim, sofisticiranijim pristupom temeljenom na afinitetnim privjescima.⁸ Afinitetne metode temelje se na molekularnom prepoznavanju ciljne molekule i molekule koja je imobilizirana na kromatografskoj koloni. Afinitetne privjeske možemo definirati kao slijed aminokiselina s visokim afinitetom i specifičnošću za određeni ligand. Modifikacija DNA sekvence rekombinantnog proteina omogućuje ugradnju afinitetnog privjeska na N- ili C- kraj proteina. Dodatno tome, može se ugraditi specifično mjesto cijepanja koje prepoznaje specifična proteaza. Na taj način se afinitetni privjesak može ukloniti. Najčešće korišteni afinitetni privjesci su (His)₆, GST, MBP i tioredoksin.⁷

2.3.1. Histidinski afinitetni privjesak

Histidinski afinitetni privjesak tipično se sastoji od šest uzastopnih ostataka histidina, a može se ugraditi na N- ili C- kraj ciljnog proteina. Relativno je male veličine, oko 2,5 kDa.⁷ Koristi se kod pročišćavanja proteina afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima (engl. *immobilized metal affinity chromatography*, IMAC). Metoda se temelji na interakciji histidina s dvovalentnim kationima, najčešće Ni²⁺ ili Co²⁺ koji su imobilizirani na kromatografskoj koloni. Zbog navedene male veličine, histidinski privjesak ima minimalni učinak na smatanje proteina, a u nekim slučajevima olakšava ekspresiju i poboljšava topljivost proteina. Metodama afinitetne kromatografije mogu se pročistiti proteini i u nativnim i denaturirajućim uvjetima što je posebno važno ako se ciljni protein nalazi u inkluzijskim tijelima. Histidinski privjesak lako se uklanja proteazom. Prvenstveno zbog njegove male veličine i značajnih prednosti u odnosu na ostale afinitetne privjeske, nedostaci histidinskog privjeska su često zanemareni. Prva loša strana je da ako dođe do proteolitičke razgradnje nekoliko histidinskih ostataka, afinitet proteina za dvovalentne katione na koloni se uvelike smanjuje što dovodi do smanjenja prinosa proteina. Drugo, protein koji ima ugrađen histidinski privjesak sklon je stvaranju dimera i tetramera u prisustvu metalnih iona. Ovo često ne predstavlja veliki problem no može dovesti do netočne procjene molekularne mase ciljnog proteina. Problem predstavljaju i proteini koji prirodno nose dva ili tri histidinska ostataka s kojima se vežu na metalne ione u koloni.⁸ Važno je naglasiti da se povećava količina literature koja opisuje razne utjecaje histidinskog privjeska na funkciju i strukturu određenog proteina. Tako je tijekom proučavanja strukture Gcn5 povezane N-acetiltransferaze (GNAT) iz *Pseudomonas aeruginosa* (PA4794) pronađeno da histidinski privjesak ne utječe na kristalizaciju proteina, ali se veže na aktivno mjesto proteina tako da djeluje kao slabi kompetitivni inhibitor supstrata.⁹ Stoga, prisustvo histidinskog privjeska može utjecati i na aktivnost proteina i na afinitet vezanja supstrata pošto privjesak blokira aktivno mjesto. Drugo istraživanje pokazalo je da (His)₆ privjesak može doprinijeti toplinskoj nestabilnosti proteina.⁷ Također, dodatkom privjeska na protein mioglobin koji ima vezan ugljikov monoksid došlo je do razlika u dinamici proteina.²⁷ Dakle, korištenje afinitetnog privjeska svakako olakšava pročišćavanje proteina, ali taj privjesak nije uvijek neutralan kao što se obično pretpostavlja. Kao posljedica toga, pažljiva usporedba proteina divljeg tipa i proteina obilježenog histidinskim privjeskom ostaje nužna kako bi se izbjegle slijepa pretpostavka da se ponašaju i funkcioniraju jednako.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Amonijev persulfat, APS (*Carl Roth*), Ampicilin (*Sigma-Aldrich*), Bacto Agar (*Becton, Dickinson and Company*), dinatrijev hidrogen fosfat (*Carl Roth*), fenilmetilsulfonil fluorid, PMSF (*Sigma*), N-(2-hidroksietil) piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina, HEPES (*Carl Roth*), imidazol (*Sigma*), izopropil- β -tiogalaktopiranozid, IPTG (*Ambion*), Luria-Bertani, LB medij (*Carl Roth*), magnezijev (II) klorid tetrahidrat (*Aldrich*), 2-merkaptioetanol (*Sigma*), metanol (*Kemika*), natrijev dodecilsulfat, SDS (*Merck*), natrijev dihidrogen fosfat (*Carl Roth*), natrijev klorid (*Kemika*), Ni-NTA agarozna (*Protino*), octena kiselina (*Kemika*), tris-(2-karboksietil) fosfin hidroklorid, TCEP (*Carl Roth*), N,N,N',N'-tetrametiletan-1,2-diamin, TEMED (*Serva*),

3.1.2. Enzimi, enzimski supstrati i inhibitor

L-asparaginska kiselina, Asp (*Alfa Aesar*), deoksiribonukleaza, DNaza (*Sigma*), gvanozin 5'-difosfat, GDP (*Sigma*), gvanozin 5'-trifosfat, GTP (*Sigma*), inozin 5'-monofosfat, IMP (*Sigma*), lizozim (*Sigma*)

3.1.3. Proteinski markeri

Marker molekulskih masa, LMW-SDS Marker Kit (*GE Healthcare*), marker izoelektričnih točaka, IEF markers 3-10 (*Serva*)

3.1.4. Plazmid i bakterijski sojevi za prekomjernu ekspresiju

Rekombinantni plazmid, pET21b(+)-AdSS-HisTag, koji je dobiven ugradnjom gena *purA* za adenilosukcinat sintetazu u ekspresijski plazmid pET21b(+) pripremljen je na Institutu Ruđer Bošković, Zagreb. Za prekomjernu ekspresiju korišten je soj bakterije *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)RIL. Ovaj soj sadrži gen za T7-RNA-polimerazu integriran u bakterijski kromosom pod kontrolom inducibilnog promotora *lacUV5* i ne eksprimira aktivne proteaze *lon* i *ompT*, zbog čega je pogodan za prekomjernu ekspresiju proteina induciranu dodatkom IPTG-a.

3.2. Prekomjerna ekspresija proteina

3.2.1. Priprema hranjive podloge

Krute hranjive podloge dobivene su otapanjem LB medija u destiliranoj vodi do konačne koncentracije 5 g L^{-1} ekstrakta kvasca, 10 g L^{-1} triptona, 10 g L^{-1} NaCl uz dodatak 1,8%-tnog agara. Dobivena smjesa je sterilizirana u autoklavu 20 min na $121 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon što se otopina ohladila na otprilike $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (procijenjeno dodirrom), dodaje se ampicilin koncentracije 100 mg mL^{-1} (konačna koncentracija antibiotika: $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). Radi postizanja sterilnih uvjeta, volumeni smjese od 25 mL izlijevaju se u sterilne, plastične Petrijeve zdjelice uz plamenik. Krute hranjive podloge spremljene su na $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tekuće hranjive podloge za uzgoj stanica pripremljene su na isti način, ali bez dodatka agara, u volumenu od 20 mL za prekonoćnu kulturu i 500 mL za uzgoj bakterija.

3.2.2. Transformacija bakterijskih stanica

Transformacija bakterijskih stanica je proces uvođenja strane DNA u bakterijske stanice i jedan je od ključnih koraka pri stvaranju rekombinantnih sojeva stanica. Jedna od metoda koja se koristi u tu svrhu je elektroporacija. To je fizikalna metoda transformacije koja pomoću kratkog, visokonaponskog električnog polja stvara kratkotrajne pore na bakterijskim stanicama. Sama metoda je jednostavna i brza. Stanice domaćina i ciljne molekule suspendiraju se u elektrolitnoj otopini nakon čega se propušta optimizirani električni napon u trajanju od nekoliko mikrosekundi do milisekunde. Na taj način se narušava fosfolipidni dvosloj membrane što rezultira stvaranjem privremenih pora. Električni potencijal kroz staničnu membranu raste kako bi nabijene molekule poput DNA mogle proći kroz pore membrane. Prije početka transformacije, važno je proučiti koja jačina napona se koristi, to jest koji program odabrati. U slučaju previsokog i dugotrajnog napona dolazi do stvaranja prevelikih pora na staničnoj membrani čime dolazi do oštećenja stanice, odnosno do neuspješne transformacije jer se pore ne mogu zatvoriti.²⁸

U svrhu ovog rada, rekombinantni plazmid (pET21b(+)-AdSS-HisTag) koji ima ugrađen gen *purA* za enzim AdSS te šest histidinskih ostataka na C- kraju proteina unesen je u stanice soja BL21-CodonPlus(DE3)RIL bakterije *E. coli*.

U $40 \text{ } \mu\text{L}$ elektrokompetentnih stanica soja BL21-CodonPlus(DE3)RIL dodan je $1 \text{ } \mu\text{L}$ otopine rekombinatnog plazmida pET21b(+)-AdSS-HisTag koncentracije $108 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Dobivena suspenzija prebačena je u kivetu za elektroporaciju širine 2 mm koja je prethodno bila ohlađena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kiveta se tijekom cijelog postupka nalazila na ledu. Potom je izvršena elektroporacija na uređaju *Gene Pulser Xcell, Bio-Rad* pri naponu od 2,5 kV, odnosno prema protokolu proizvođača za bakteriju *E. coli* odabere se program *Bacterial 1*.

Nakon elektroporacije suspenzija stanica je prebačena u plastičnu epruveticu i pomiješana s 1 mL svježeg LB medija (bez antibiotika) i potom inkubirana sat vremena pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 400 rpm. Po završetku inkubacije uslijedilo je centrifugiranje od 1 min na $20198 \times g$. Višak medija se uklonio, a talog se pomiješao s 100 μL LB medija. Suspenzija bakterijskih stanica nanosena je na krutu hranjivu podlogu (LBA ploče) s prethodno dodanim ampicilinom konačne koncentracije $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Nakon završetka inkubacije u trajanju od 16 sati na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, transformacijske ploče su spremljene na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3. Priprema prekonoćne kulture

Prije postavljanja prekonoćne kulture pripremljeno je 20 mL LB medija. Tijekom cijelog postupka radi se u sterilnim uvjetima pa su iz toga razloga LB medij, voda i nastavci za pipete sterilizirani 20 min na $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. U četiri epruvete za uzgoj, uz plamenik dodano je po 5 mL LB medija i po 5 μL ampicilina koncentracije 100 mg mL^{-1} . Vrhom sterilnog nastavka za pipetu uzeta je jedna od bakterijskih kolonija koje su narasle na prethodno pripremljenim krutim hranjivim podlogama (transformacijskim pločama). Bakterijska kolonija je potom prebačena u tekući medij s ampicilinom konačne koncentracije $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Nakon toga uslijedila je prekonoćna inkubacija na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 400 rpm.

3.2.4. Ekspresija proteina

Rast bakterija prati se mjerenjem optičke gustoće pri valnoj duljini od 600 nm, tj. očitava se vrijednost OD_{600} (engl. *optical density*) koja je proporcionalna broju bakterija. Indukcija ekspresije započinje kada bakterijske kulture dosegnu vrijednost OD_{600} u rasponu od 0,5 do do 0,8. U tom rasponu bakterijske stanice se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta, intenzivno se dijele i metabolički su najsposobnije.

Pripremljene su dvije tikvice od 500 mL LB-medija te je u svaku dodano po 500 μL ampicilina koncentracije $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Potom se inokuliralo s po 10 mL prekonoćne kulture nakon čega je slijedila inkubacija na 230 rpm i $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sve dok bakterijske stanice nisu dosegle vrijednost OD_{600} oko 0,6. Stanice su potom inducirane dodatkom prethodno pripremljenog

IPTG-a, konačna koncentracija $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Suspenzija induciranih bakterijskih stanica inkubirana je preko noći, oko 16 h na $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i 230 rpm. Nakon provedene ekspresije, dobivena suspenzija centrifugirana je 20 min na $5000 \times g$. Po završetku, medij se odlio, a talog stanica je spremljen na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3. Ekstrakcija proteina iz stanice

Prvi korak kod izolacije proteina je razbijanje stanica pri čemu dolazi do oslobađanja svih staničnih proteina. Bakterijske stanice mehanički su razbijene pri visokom tlaku koristeći uređaj *Avestin Emulsiflex C3*. Radi se o visokotlačnom i protočnom homogenizatoru koji pomoću visokog tlaka od 150 MPa potiskuje uzorak kroz usku cijev pri čemu dolazi do razaranja (lize) stanica.²⁹

Prije same izolacije, prethodno dobiveni talog prebačen je u bocu i pomiješan sa 60 mL pufera A (sastav pufera A, vidi 3.4.1). Kako bi se spriječilo djelovanje proteolitičkih enzima koriste se inhibitori proteaza, kao što je PMSF. Dodano je $65 \text{ }\mu\text{L}$ PMSF-a koncentracije 100 mmol L^{-1} i $650 \text{ }\mu\text{L}$ lizozima koncentracije 100 mg mL^{-1} koji razgrađuje peptidoglikanski sloj stanične stijenke. Nakon toga, smjesa je stavljena u homogenizator i postupak izolacije proveden je dva puta. Dobiveni uzorak je potom centrifugiran 40 min na $14461 \times g$.

3.4. Pročišćavanje proteina

3.4.1. Priprema pufera za pročišćavanje proteina

Nakon izolacije proteina iz stanica, ciljani protein je pročišćen pomoću afinitetne kromatografije i gel filtracije. Sastavi pufera korištenih za afinitetnu kromatografiju prikazani su u tablici 3.1. Ukupno je pripremljeno 100 mL pufera A koji je korišten i kao pufer za lizu stanica, 50 mL pufera B kojim se ispiru kolona te 30 mL pufera C za eluciju proteina sa kolone. pH vrijednost svih pufera iznosi 8.

Tablica 3.1. Sastav pufera za afinitetnu kromatografiju.

	PUFER A	PUFER B	PUFER C
c(NaPO ₄) / mmol L ⁻¹	50	50	50
c(NaCl) / mmol L ⁻¹	500	500	500
c(imidazol) / mmol L ⁻¹	10	20	300
pH pufera	8		

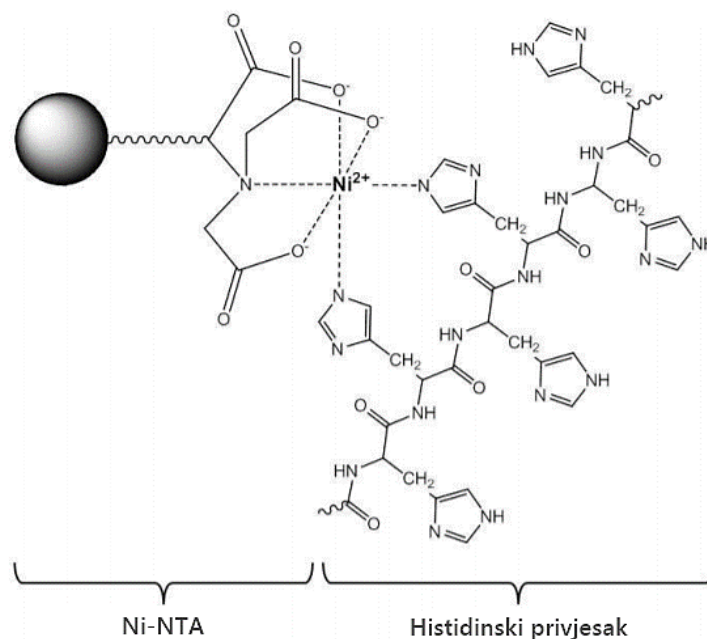
Za postupak pročišćavanja proteina gel filtracijom potrebno je pripremiti 1000 mL pufera čiji je sastav naveden u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Sastav pufer korištenog kod pročišćavanja proteina gel filtracijom.

Komponenta	HEPES	NaCl	β-merkaptetanol
c / mmol L ⁻¹	20	150	1
pH pufera	7		

3.4.2. Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija je metoda pročišćavanja proteina koja se temelji na visoko specifičnoj interakciji dviju molekula kao što su na primjer enzim i supstrat, receptor i ligand ili antitijelo i antigen. Naš ciljni protein obilježen je histidinskim privjeskom, a tipična metoda za pročišćavanje proteina obilježenih histidinom je kromatografija s imobiliziranim metalnim ionima (engl. *IMAC*). Metoda se temelji na činjenici da imidazolni prsten histidina kao donor elektrona lako formira koordinatne veze s ionima prijelaznih metala, najčešće Ni²⁺. Kao kromatografsko punilo koristi se nikal–nitrilotriacetatna kiselina (Ni-NTA), kelatni spoj u kojem je nikal centralni atom sa šest koordinacijskih mjesta. Četiri koordinacijska mjesta zauzimaju atomi trinitrioloacetatne kiseline, a preostala dva mogu ostvariti interakciju s imidazolnim prstenima histidinskog privjeska (slika 3.1). AdSS će se vezati za tu stacionarnu fazu zbog visokog afiniteta histidinskih dušika prema niklovom atomu. Ostali proteini koji imaju slabiji afinitet vezanja tijekom ispiranja lako prolaze kroz kolonu. Eluiranje proteina s kolone postiže se dodatkom imidazola koji konkurrira za koordinacijska mjesta iona nikla čime dolazi do otpuštanja proteina sa stacionarne faze.³⁰



Slika 3.1. Kompleks formiran između histidinskih afinitetnih privjeska i nikel–nitrilotriacetatne kiseline (Ni-NTA). Slika preuzeta i prilagođena iz literaturnog izvora ⁸.

Dimenzije kolone korištene kod pročišćavanja afinitetnom kromatografijom iznose 1,6 x 1,5 cm. Kolona je prvo isprana s 20 mL vode, a potom ekvilibrirana s 20 mL prethodno pripremljenog pufera A. Prije nego što je uzorak nanesen na kolonu, dodane su mu DNaza i $MgCl_2$ kako bi se riješili nepoželjnih nukleinskih kiselina koje se nalaze u smjesi s uzorkom. DNaza u prisustvu Mg^{2+} nasumično cijepa dvolančane DNA. Dodano je 8 μL DNaze koncentracije 10 $mg\ mL^{-1}$, 300 μL $MgCl_2$ koncentracije 1 $mol\ L^{-1}$ i na kraju streptomycin sulfat, konačne koncentracije 5 $mg\ mL^{-1}$ u svrhu taloženja DNA. Cijela smjesa je potom centrifugirana na $14461,8 \times g$, 30 min. Nakon centrifugiranja, supernatant je profiltriran kroz filter veličine pora 0,45 μm i nanesen na kolonu protokom od 0,5 $mL\ min^{-1}$. Potom je uslijedilo ispiranje s 15 mL pufera B, a protein je eluiran s kolone puferom C (9 mL). Kolona je na kraju isprana s 9 mL imidazola konačne koncentracije 1 $mol\ L^{-1}$. Kolona se čuva u 20%-tnom etanolu.

3.4.3. Gel filtracijska kromatografija

Gel filtracijska kromatografija ili kromatografija molekularnog isključivanja je učinkovita separacijska metoda koja odjeljuje i pročišćava molekule na temelju različite molekularne mase. Stacionarna faza u gel filtracijskoj kromatografiji sastoji se od porozne matrice koja je načinjena od malih, sfernih čestica netopljivog polimera kao što je agarozna ili dekstran. Mobilna faza je pufer koji prolazi između tih poroznih čestica. Pore na matrici imaju određenu veličinu te molekule koje su veće od pora ostaju u mobilnoj fazi i gibaju se s puferom brže prema izlazu kolone. Male molekule koje mogu ući u pore matrice zaostaju u koloni, gibaju se sporije jer trebaju proći veći volumen te zadnje izlaze iz kolone. Molekule srednje veličine prolaze kolonom nekom srednjom brzinom jer mogu povremeno ući u pore matrice. Metoda je primjenjiva i za separaciju biomolekula koje su osjetljive na koncentraciju metalnih iona i promjene pH jer nema interakcije biomolekula s matricom.³¹

Fracije koje su dobivene pročišćavanjem pomoću afinitetne kromatografije, a sadrže najviše eksprimiranog proteina su odvojene i potom pročišćene gel filtracijom. U tu svrhu korišten je uređaj *ÄKTA FPLC (GE Healthcare Life Sciences)* i kolona *Sephacryl S-200 16/60*. Kolona je prvo isprana sa 180 mL deionizirane vode, a zatim ekvilibrirana u puferu čiji je sastav prikazan u tablici 3.2. Prema uputama proizvođača, uvjeti na koloni uključuju maksimalni tlak od 1,5 MPa i protok pufera od 0,6 mL min⁻¹. Prolazak proteina kroz kolonu praćen je promjenom apsorbancije UV zračenja pri 280 nm. Na kolonu je injekcijom nanoseno po 2 mL uzorka proteina dobivenog pročišćavanjem afinitetnom kromatografijom. Sakupljane su frakcije od po 2 mL.

3.5. Koncentriranje proteina

Fracije najveće koncentracije koje su dobivene nakon provedene gel filtracije spojene su nakon centrifugiranja u trajanju od 7 min na $20198 \times g$. Koncentriranje proteina uključuje proces ultrafiltracije kojim se odvajaju vrlo male i otopljene molekule iz otopine. Ovisno o tome koja se molekula želi zadržati, koriste se celulozne membrane različitih pora, u našem slučaju *Amicon Ultra (Merck Millipore)*, čije su pore membrane veličine 30 000 NMWL (engl. *nominal molecular weight limit, NMWL*). Cijeli postupak izveden je u centrifugi *Universal 320 R (Hettich)*, a odvijao se u intervalima od po 3 min na $2460 \times g$ i 4 °C. Nakon svakog intervala centrifugiranja uzorak je resuspendiran.

3.6. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija uzoraka ciljnog proteina izmjerena je na spektrofotometru *BioDrop DUO* (*BioDrop*). Prije početka mjerenja na uređaju se postave uvjeti mjerenja koji uključuju apsorbanciju pri 280 nm te molarni apsorpcijski koeficijent proteina koji iznosi $38850 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$. Molarni apsorpcijski koeficijent izračunat je pomoću alata *ProtParam*.³² Prije mjerenja koncentracije proteina potrebno je izmjeriti apsorbanciju pufera u kojem se nalazi uzorak, a čiji je sastav prikazan u tablici 3.2. Pri svakom mjerenju koncentracije nanosilo se po 1 μL uzorka.

3.7. Mjerenje enzimske aktivnosti

Enzimi su biološke molekule, tipično proteini koji ubrzavaju kemijske reakcije. Kinetika enzima i njene osnovne jednadžbe omogućuju nam proučavanje i određivanje kinetičkih parametara enzimski kataliziranih reakcija. Važan parametar je također i specifična aktivnost nekog enzima koja je pokazatelj čistoće enzima. Definira se kao količina supstrata nastalog enzimskom reakcijom po jedinici vremena i masi ukupnog enzima. Aktivnost enzima određuje se mjerenjem promjene količine supstrata ili produkta u određenom vremenskom razdoblju.³³

Enzimska aktivnost AdSS-a mjerena je na spektrofotometru *Camspec M509T* (*Camspec*) praćenjem promjene apsorbancije UV zračenja pri 280 nm. Sastav reakcijske smjese korišten u tu svrhu prikazan je u tablici 3.3. Reakcija koju katalizira AdSS prikazana je u poglavlju 3.11.

Tablica 3.3. Sastav standardne reakcijske smjese za mjerenje enzimske aktivnosti.

Komponenta	c / mmol L ⁻¹	Volumen / μL
Deionizirana H ₂ O		760
Pufer HEPES (pH = 7,5)	200	200
GTP	6	10
IMP	15	10
Asp	500	10
MgCl ₂	100	10

Svaki uzorak ispitivao se 3 puta u trajanju od 3 min pri sobnoj temperaturi. Korištene su kvarcne kivete duljine puta 1 cm i ukupnog volumena od 1,4 mL. Prvo se mjeri apsorbancija slijepe probe, odnosno same reakcijske smjese, bez dodatka enzima. Nakon toga dodaje se enzim AdSS u reakcijsku smjesu čime započinje reakcija. AdSS koncentracije $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ dodan je u volumenu od $5 \text{ }\mu\text{L}$ za sva 3 mjerenja.

Promjena apsorbancije na 280 nm prevedena je u enzimsku aktivnost pomoću ekstincijskog koeficijenta od $1,17 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ (nastajanje adenilosukcinata).³⁴ Jedna jedinica (U) enzimske aktivnosti definirana je kao količina nastalog adenilosukcinata (u μmol) u minuti, na $25 \text{ }^\circ\text{C}$, u danim uvjetima. Specifična aktivnost je izražena u jedinicama enzimske aktivnosti po masi proteina (u mg) u uzorku – U/mg.

3.8. Elektroforeza u gelu

3.8.1. Priprema gelova za elektroforezu

Za gel elektroforezu pri denaturirajućim uvjetima (engl. *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*) potrebno je pripremiti gel koji se sastoji od dvije komponente, sabijajuće i razdvajajuće. Komponenta s 12,5% akrilamida služi za razdvajanje dok komponenta manjim udjelom akrilamida, od 4%, služi za sabijanje. Sastavi komponenta za jedan gel prikazani su tablici 3.4.

Tablica 3.4. Sastav gela za razdvajanje i sabijanje.

Komponenta (koncentracija početne otopine)	Gel za razdvajanje (12,5%) Volumen (komponenta) / μL	Gel za sabijanje (4%) Volumen (komponenta) / μL
akrilamid/ bisakrilamid (30 %)	2080	400
Tris-HCl ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 8,8)	1190	-
Tris-HCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,8)	-	750
SDS (10 %)	50	30
APS (10 %)	30	20
TEMED	3	2
Deionizirana H_2O	1650	1790

Neposredno prije izlivanja gelova dodani su APS i TEMED. Prvo je pipetom nanešen gel za razdvajanje između dva stakalca do oko 1,5 cm ispod ruba stakla. Na sam rub stavljena je manja količina destilirane vode kako bi se izbjegao kontakt gela sa zrakom. Nakon otprilike 45 min, koliko je potrebno da gel polimerizira, voda se ukloni, a gel za sabijanje se nanosi povrhu gela za razdvajanje. Potom se u gel za sabijanje stavlja češalj kako bi se formirale jažice za nanošenje uzorka. Nakon 30-45 min, češljevi se pažljivo uklone. Prije nego što se uzorak proteina nanese na gel potrebno ga je pomiješati s puferom za obradu uzorka i inkubirati 10 minuta na 98 °C. Sastav pufera za obradu uzorka prikazan je u tablici 3.5.

Tablica 3.5. Sastav pufera za obradu uzorka.

125 mmol L ⁻¹ Tris-HCl, pH=6,8
4% SDS
20% glicerol
2% β-merkaptetanol
bromfenol modriilo ($\gamma = 0,2 \text{ g L}^{-1}$)

3.8.2. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)

Kako bi provjerili dobivenu količinu i pratili čistoću proteina nakon pojedinih koraka pročišćavanja izvodi se SDS-PAGE elektroforeza. Odjeljivanje proteina iz uzorka temelji se na osnovi mase. Natrijev-dodecilsulfat (SDS) razara nekovalentne interakcije u nativnom proteinu pri čemu protein poprima negativan naboj i može se gibati u smjeru električnog polja dok β-merkaptetanol služi za reduciranje disulfidnih veza. Velike molekule sporije se kreću kroz gel i zaostaju na vrhu, blizu mjesta nanošenja uzorka, dok se male molekule gibaju brže kroz gel. Pokretljivost proteina u ovim uvjetima linearno je proporcionalna logaritmu njihove molekulske mase.³¹

Gel elektroforeza provedena je na uređaju Mini-PROTEAN Tetra Cell (*Biorad*). Prije nanošenja uzorka na gel, uzorci su pomiješani s puferom za obradu uzorka (tablica 3.5) u omjeru 1:1 i potom stavljeni na inkubaciju u trajanju od deset minuta u termobloku na 98 °C. Prvih 15 min elektroforeza se provodila pri naponu 120 V, a sljedećih 45 min pri naponu od 180 V. Po završetku elektroforeze, gel je prebačen u Petrijevu zdjelicu i obojan s otopinom

boje *Coomassie Brilliant Blue* uz potresanje od 15 min na sobnoj temperaturi. Sastav boje prikazan je u tablici 3.6. Gel je stavljen u kipuću destiliranu vodu na oko 30 min kako bi se uklonio višak boje. Na temelju opaženih proteinskih vrpca može se provjeriti uspješnost ekspresije ciljnog proteina i njegova molekulska masa uspoređujući ga s proteinima poznate molekulske mase.

Tablica 3.6. Sastav *Coomassie Brilliant Blue R-250* otopine za bojanje gelova nakon SDS-PAGE elektroforeze.

Coomassie Brilliant Blue R-250 ($\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$)
octena kiselina ($\varphi = 0,10$)
metanol ($\varphi = 0,30$)

U svrhu određivanja molekulske mase proteina, SDS-PAGE provedena je i na uređaju *PhastSystem* (*Pharmacia*), na 12,5%-tnom kupovnom gelu (*PhastGel SDS 12.5*), prema uputama proizvođača (30 min do 67 AVh). Ovaj gel bojan je istom *Coomassie Brilliant Blue R-250* otopinom kao i ostali gelovi.

3.9. Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje (IEF) je elektroforetska metoda koja se koristi kod odjeljivanja proteina na temelju njihovih izoelektričnih točaka (pI) unutar kontinuiranog pH gradijenta. Razdvajanje se postiže oblikovanjem pH gradijenta uzduž gela pomoću malih, višestruko nabijenih amfolita, različitih pI vrijednosti. Komponente uzorka putuju kroz pH gradijent u gelu pod utjecajem električnog polja. Pri visokim pH vrijednostima proteini su negativno nabijeni, gube protone pa putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi, anodi, dok pri niskim pH vrijednostima proteini imaju ukupni naboj pozitivan pa se gibaju prema katodi. Kada protein dosegne pH vrijednost koja odgovara njegovoj pI točki prestaje se gibati jer je njegov ukupni naboj nula. Ovom tehnikom mogu se odvojiti spojevi čije se pI vrijednosti razlikuju samo za 0,01 pH jedinica. Na temelju dobivenih vrpca može se očitati pI proteina uspoređujući ga s proteinima poznate pI vrijednosti.³¹

Izoelektrično fokusiranje provedeno je na uređaju *PhastSystem* (*Pharmacia*), na kupovnom gelu (*PhastGel IEF 3-9*). Prema uputama proizvođača odabere se program s rasponom pH od 3 do 9. Naneseno je po 4 μL uzorka. Uzorci su naneseni bez prethodne

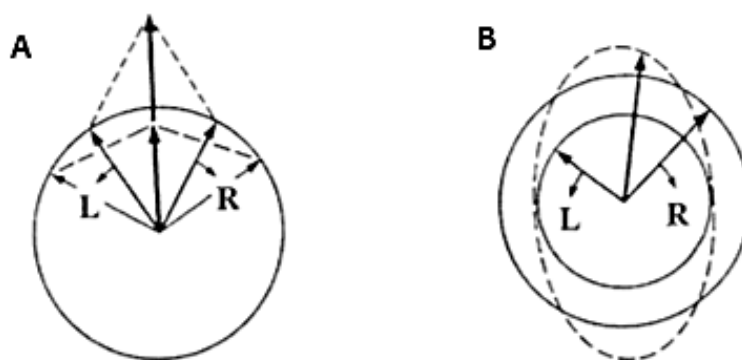
obrade. Koncentracija nanošenog uzorka iznosila je $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. IEF je provedeno 30 min do 509 AVh (engl. *accumulated volthours*). Za bojanje IEF gelova korištena je boja *Coomassie Brilliant Blue R-250* čiji je sastav prikazan u tablici 3.7.

Tablica 3.7. Sastav *Coomassie Brilliant Blue R-250* otopine za bojanje gelova nakon izoelektričnog fokusiranja.

Coomassie Brilliant Blue R-250 ($\gamma = 0,2 \text{ g L}^{-1}$)
metanol ($\varphi = 0,30$)
ocetna kiselina ($\varphi = 0,10$)
voda ($\varphi = 0,60$)
bakrov (II) sulfat ($\varphi = 0,01$)

3.10. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam (CD) je vrsta spektroskopske metode višestruke namjene. Osim što predstavlja moćnu tehniku u predviđanju sekundarne strukture bioloških molekula i praćenju samih strukturnih promjena, još se koristi i kod proučavanja optički aktivnih spojeva, identifikaciji kiralnih spojeva te kod proučavanja termodinamike i kinetike smatanja proteina. Linearno polarizirana svjetlost sastoji se od dvije cirkularno polarizirane komponente od kojih je jedna desno, a druga lijevo polarizirana. Obje komponente imaju jednaku amplitudu (slika 3.1 A). Metoda CD-a temelji se na činjenici da optički aktivni spojevi u različitoj mjeri apsorbiraju desno i lijevo cirkularno polariziranu svjetlost, a sama ta pojava naziva se cirkularni dikroizam. Ukoliko optički aktivan medij različito apsorbira desno i lijevo polariziranu svjetlost, rezultatni val više neće biti linearno polariziran već eliptično. U tom slučaju cirkularne komponente imaju različite amplitude (slika 3.1 B). Intenzitet te pojave i njezina ovisnost o valnoj duljini svjetlosti služe za objašnjenje i razlikovanje različitih elemenata sekundarne strukture proteina kao što su α -zavojnice i β -ploče.³⁵



Slika 3.1. Cirkularni dikroizam. A) Linearno polarizirana svjetlost koja nastaje superpozicijom lijevo (L) i desno (D) polarizirane svjetlosti, jednakih amplituda, ali različitog smjera. B) Lijevo (L) i desno (D) polarizirana svjetlost različitih amplituda čija superpozicija rezultira eliptično polariziranom svjetlošću. Preuzeto iz literaturnog izvora ³⁵.

Instrumenti na kojima se provodi CD analiza mjere razliku apsorbacije lijevo (L) i desno (D) polarizirane komponente ($\Delta A = A_L - A_D$) što se u većini slučajeva izražava kao:

$$\theta = \tan^{-1} \frac{b}{a}$$

gdje su a i b glavna i sporedna os rezultatne elipse. Postoji jednostavna numerička veza između ΔA i eliptičnosti (u stupnjevima): $\theta = 32.98 \Delta A$.³⁵

Kako je CD metoda pogodna za proučavanje strukture proteina u otopini, provedena je CD analiza obilježenog AdSS-a i nativnog AdSS-a bez histidinskog privjeska. U tu svrhu korišten je spektrometar *Jasco J-815* i kvarcne kivete debljine 0,2 mm. Prije mjerenja potrebno je napraviti razrjeđenje proteina tako da konačna koncentracija iznosi oko 1×10^{-5} mol L⁻¹. Prvo je snimljena bazna linija s puferom HEPES, pH vrijednosti 7, a potom su praćeni CD spektri i apsorbacije oba proteina u području valnih duljina od 260–190 nm na sobnoj temperaturi. Brzina snimanja iznosila je 50 nm min⁻¹, a razlučivost 0,2 nm. Dobiveni spektri interpretirani su pomoću programa *Dichroweb*.^{36,37,38}

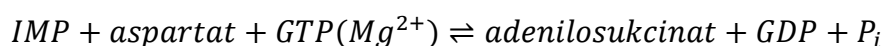
3.11. Određivanje kinetičkih parametra

Kinetički parametri koji uključuju kinetičku konstantu i brzinu reakcije omogućuju nam proučavanje aktivnosti i stabilnosti enzima. Michaelisova konstanta je jedinstvena vrijednost za svaki enzim i ne ovisi o koncentraciji enzima. Ukazuje na afinitet enzima prema supstratu. Jednadžba koja nam omogućuje izračunavanje navedenih parametra je:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Gdje su v i v_{max} početna i maksimalna brzina, K_m je Michaelisova konstanta, mjera jačine $[ES]$ kompleksa, a $[S]$ je koncentracija supstrata.

Enzim AdSS katalizira prvi korak biosinteze AMP iz IMP pri čemu nastaje adenilosukcinat:



Kako su u samu reakciju uključena tri supstrata, IMP, Asp i GTP, kinetički parametri određivali su se za svaki supstrat posebno na način da se varira koncentracija jednog od supstrata dok druga dva imaju konstantnu koncentraciju (0,06 mmol L⁻¹ za GTP, 0,15 mmol L⁻¹ za IMP i 5 mmol L⁻¹ za Asp). Prvo je mjerena enzimaska aktivnost AdSS sa šest različitih koncentracija Asp (0,03 mmol L⁻¹, 0,05 mmol L⁻¹, 0,1 mmol L⁻¹, 0,3 mmol L⁻¹, 0,5 mmol L⁻¹ i 1,0 mmol L⁻¹) dobivene razrjeđivanjem otopine Asp početne koncentracije 10 mmol L⁻¹. Ukupni volumen reakcijske smjese čiji je sastav prikazan u tablici 3.3. uvijek iznosi 1 mL. Sljedeće mjerenje uključuje supstrat IMP, također šest različitih koncentracija (7,5 μmol L⁻¹, 15 μmol L⁻¹, 30 μmol L⁻¹, 75 μmol L⁻¹, 150 μmol L⁻¹ i 225 μmol L⁻¹) koje su pripremljene razrjeđivanjem početne otopine IMP-a koncentracije 2,25 mmol L⁻¹. Zadnje je mjerena aktivnost varirajući koncentracije GTP-a (3 μmol L⁻¹, 9 μmol L⁻¹, 15 μmol L⁻¹, 30 μmol L⁻¹, 60 μmol L⁻¹, 120 μmol L⁻¹) dobivene razrjeđivanjem početne otopine GTP-a koncentracije 1,2 mmol L⁻¹. Dobiveni podaci prvo su obrađeni u programu Excel (*Microsoft Office*), a potom u programu *GraphPad Prism*.³⁹

Također, praćena je i kinetika inhibicije AdSS. Kao potencijalni kompetitivni inhibitor AdSS-a u odnosu na GTP, testiran je GDP, produkt reakcije AdSS. Inhibicija se prati tako da se u standardnu smjesu koja se pripremala za GTP (svih šest koncentracija) dodatno dodaje

jedna od koncentracija GDP-a ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ i $6 \mu\text{mol L}^{-1}$) prema izračunatim volumenima. Konstanta inhibicije K_i određena je pomoću formule:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

Gdje su v i v_{max} početna i maksimalna brzina, K_m je Michaelisova konstanta, $[S]$ je koncentracija supstrata, $[I]$ koncentracija inhibitora i K_i predstavlja konstantu inhibicije. Sva kinetička mjerenja rađena su u triplicatu pri sobnoj temperaturi.

3.12. Utjecaj temperature i pH na stabilnost proteina

Stabilnost AdSS-a ispitana je spektrofotometrijski pri različitim temperaturama i različitim pH vrijednostima. Cijeli eksperiment proveden je na spektrofotometru *Camspec M509T* (*Camspec*) pri valnoj duljini od 280 nm. Korištene su kvarcne kivete duljine puta od 1 cm i ukupnog volumena 1,4 mL. Sva mjerenja odrađena su u duplikatima.

Kod proučavanja utjecaja temperature na aktivnost i stabilnost AdSS-a korištena je standardna reakcijska smjesa (pog. 3.7, tablica 3.3) i pufer HEPES koncentracije 20 mmol L^{-1} , pH vrijednosti 7,7. Enzim koncentracije $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ inkubiran je sat vremena u navedenom puferu HEPES pri različitim temperaturama u rasponu od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ do $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon toga, izmjerena je aktivnost inkubiranog enzima u standardnoj reakcijskoj smjesi na sobnoj temperaturi.

Stabilnost AdSS u ovisnosti o vremenu ispitana je pri dvije različite temperature, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Enzim koncentracije $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ u puferu HEPES koncentracije 20 mmol L^{-1} , pH=7,7 inkubiran je u trajanju od ukupno 3h pri čemu se aktivnost enzima (u standardnoj reakcijskoj smjesi na sobnoj temperaturi) mjerila svakih 30 min.

Ispitivanje stabilnosti AdSS-a u rasponu različitih pH vrijednosti postignuto je korištenjem *Britton-Robinsonovog* univerzalnog pufera (BR pufer) umjesto pufera HEPES (pH=7,7). Pufer BR sadrži 40 mmol L^{-1} borne kiseline, 40 mmol L^{-1} fosforne kiseline i 40 mmol L^{-1} octene kiseline.⁴⁰ Pripremljeno je 10 bočica po 20 mL BR pufera u intervalu pH vrijednosti od 5 do 9,5. Pufer je titriran s NaOH koncentracije 1 mol L^{-1} do željenog pH. Enzim koncentracije $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ inkubiran je po sat vremena u puferima različitih pH vrijednosti (od 5 do 9,5).

3.13. Kristalizacija proteina

U svrhu određivanja i proučavanja trodimenzionalne strukture makromolekula kao što su proteini potrebno je formirati kristale proteina. Zakoni fizike i termodinamike kontroliraju proces kristalizacije. Termodinamički, kristalizacija proteina ne razlikuje se od kristalizacije soli. Oba slučaja zahtijevaju postizanje prezasićene otopine. U prezasićenom stanju dio otopljene tvari, sol ili protein, prelazi u čvrstu fazu. Na taj način formiraju se mali kristalni centri od kojih nastaju kristali određene veličine. Ovisno o proteinu, koriste se različite metode kristalizacije za dobivanje prezasićene otopine proteina. Cilj je postepeno smanjivanje topljivosti proteina koja ovisi o više faktora kao što su temperatura, pH, ionska jakost i koncentracija soli u puferu. Promjenama tih faktora može se postići prezasićeno stanje otopine. Također, za uspješnu kristalizaciju važna je čistoća i homogenost uzorka.^{41,42}

Jedna od metoda koja se koristi u svrhu kristalizacije proteina je metoda difuzije para iz viseće kapi. Sustav uključuje kristalizacijsku otopinu (otopina precipitanta) i koncentriranu otopinu proteina koje se pomiješaju na pokrovnom stakalcu (najčešće u omjeru 1:1). Kristalizacijska otopina nalazi se također i u spremniku, koji se zatvara tim pokrovnim stakalcem. Koncentracija precipitanta u spremniku je veća od koncentracije precipitanta na stakalcu, te zbog izjednačavanja koncentracija dolazi do isparavanja vode iz kapljice u spremnik. Na taj način se smanjuje volumen kapljice, a povećava koncentracija proteina i precipitanta. U nekom trenutku postiže se prezasićeno stanje što je uvjet formiranja kristalnih centara.⁴³

AdSS koncentracije 25 mg mL^{-1} kristaliziran je pomoću metode difuzije para iz viseće kapi. Eksperiment je proveden na kristalizacijskim pločama s 24 spremnika. Volumen kristalizacijske otopine je iznosio $700 \text{ }\mu\text{L}$, a njen sastav prikazan je u tablici 3.8. Korištene su različite koncentracije proteina AdSS koje su dobivene razrjeđivanjem s puferom, $\text{pH}=7,0$ (tablica 3.9).

Tablica 3.8. Sastav kristalizacijske otopine.

$0,16 \text{ mol/dm}^3 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
$0,08 \text{ mol/dm}^3 \text{ CH}_3\text{COONa}$
20% PEG 3350
20% glicerol

Tablica 3.9. Redosljed i koncentracije AdSS-a pripremljenog za kristalizaciju.

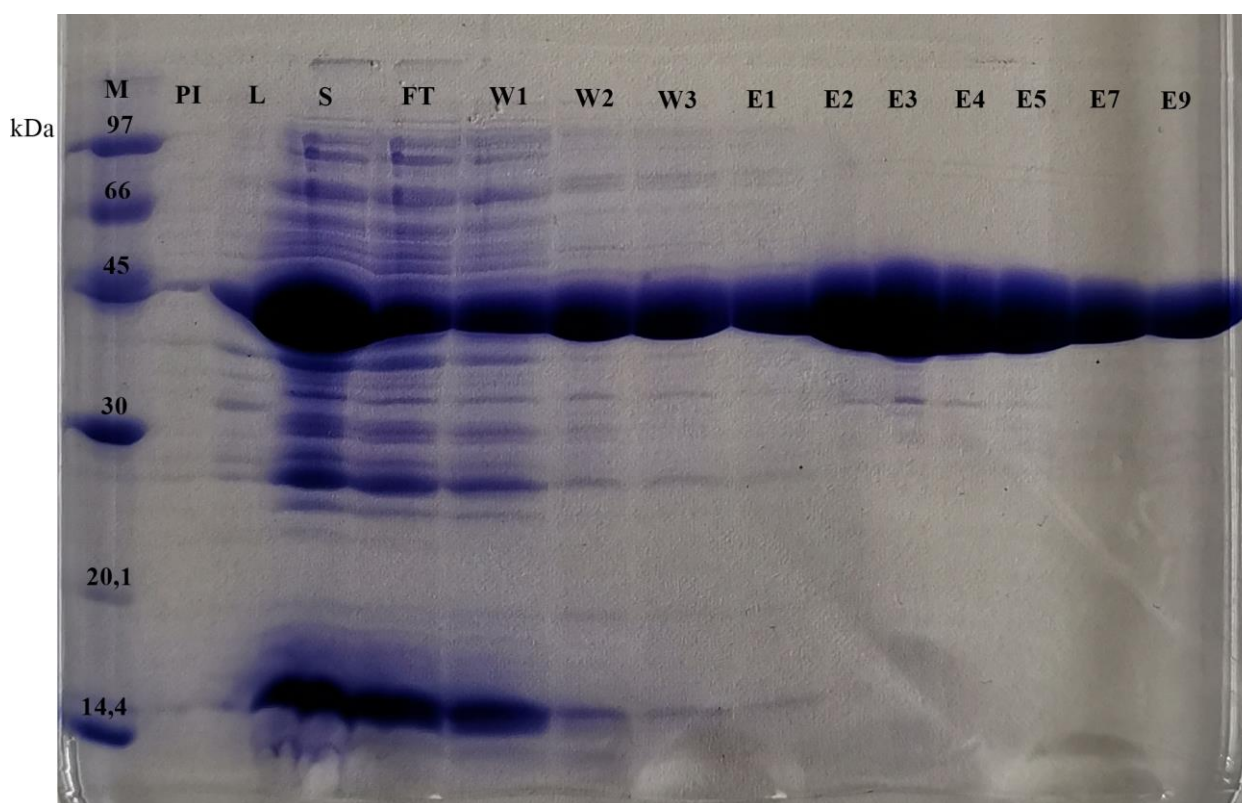
Redosljed spremnika na pločama	Koncentracija AdSS-a (mg mL ⁻¹)
A ₁ -A ₃	25
A ₄ -A ₆	15
B ₁ -B ₃	10
B ₄ -B ₆	5
C ₁ -C ₃	2,5
C ₄ -C ₆	1,25

Pufer za razrjeđivanje sadrži 20 mmol L⁻¹ HEPES (pH vrijednosti 7), 150 mmol L⁻¹ NaCl, 2 mmol L⁻¹ TCEP. Ukupno je iskorišteno 18 spremnika i pripremljeno 6 različitih koncentracija proteina. Po 1 μL uzorka proteina pomiješan je s 1 μL kristalizacijske otopine na stakalcu te stavljeno nad odgovarajući spremnik. Na rubovima spremnika nalazi se premaz silikonske masti koja osigurava zatvorenost sustava. Kristalizacijske ploče spremljene su na 18 °C, istoj temperaturi na kojoj se i izvodio cijeli postupak.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

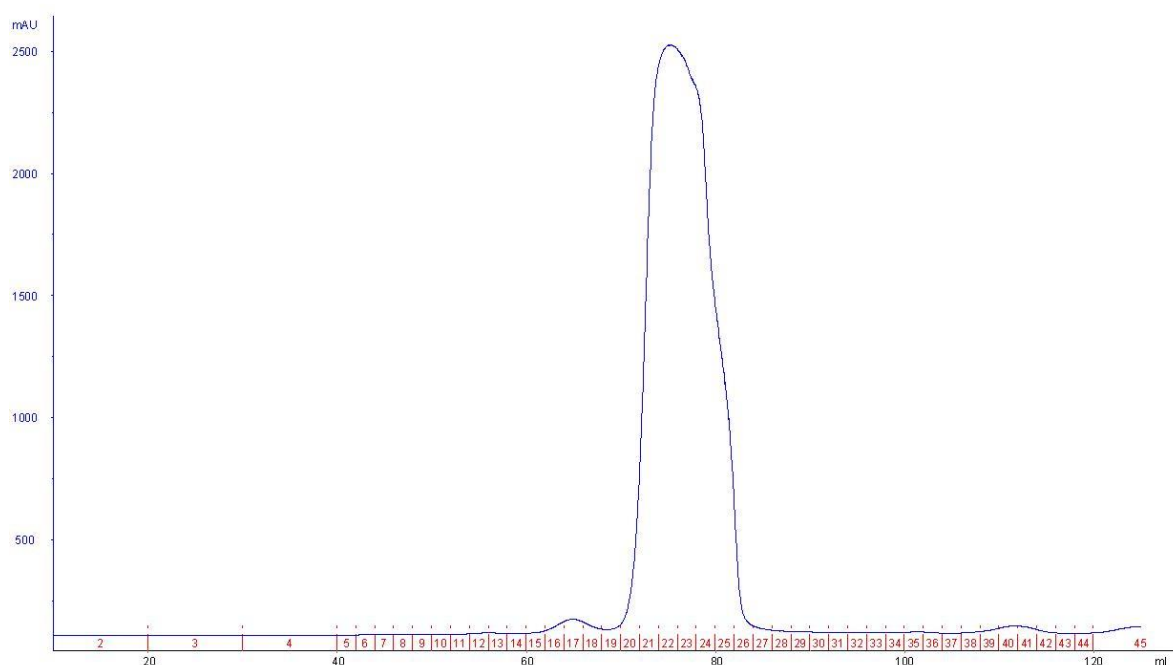
4.1. Pročišćavanje proteina

Za većinu biokemijskih ispitivanja, a posebno za kristalizaciju proteina, uzorak proteina mora imati visoku čistoću. Nakon provedene ekspresije i lize bakterijskih stanica, AdSS je iz dobivenog supernatanta pročišćena afinitetnom kromatografijom na koloni Ni-NTA. Efikasnost pročišćavanja proteina praćena je SDS-PAGE elektroforezom. Rezultati gel elektroforeze pokazuju da su ekspresija i pročišćavanje ciljnog proteina AdSS bili uspješni te da već nakon prvog koraka pročišćavanja protein pokazuje visoku čistoću (slika 4.1).



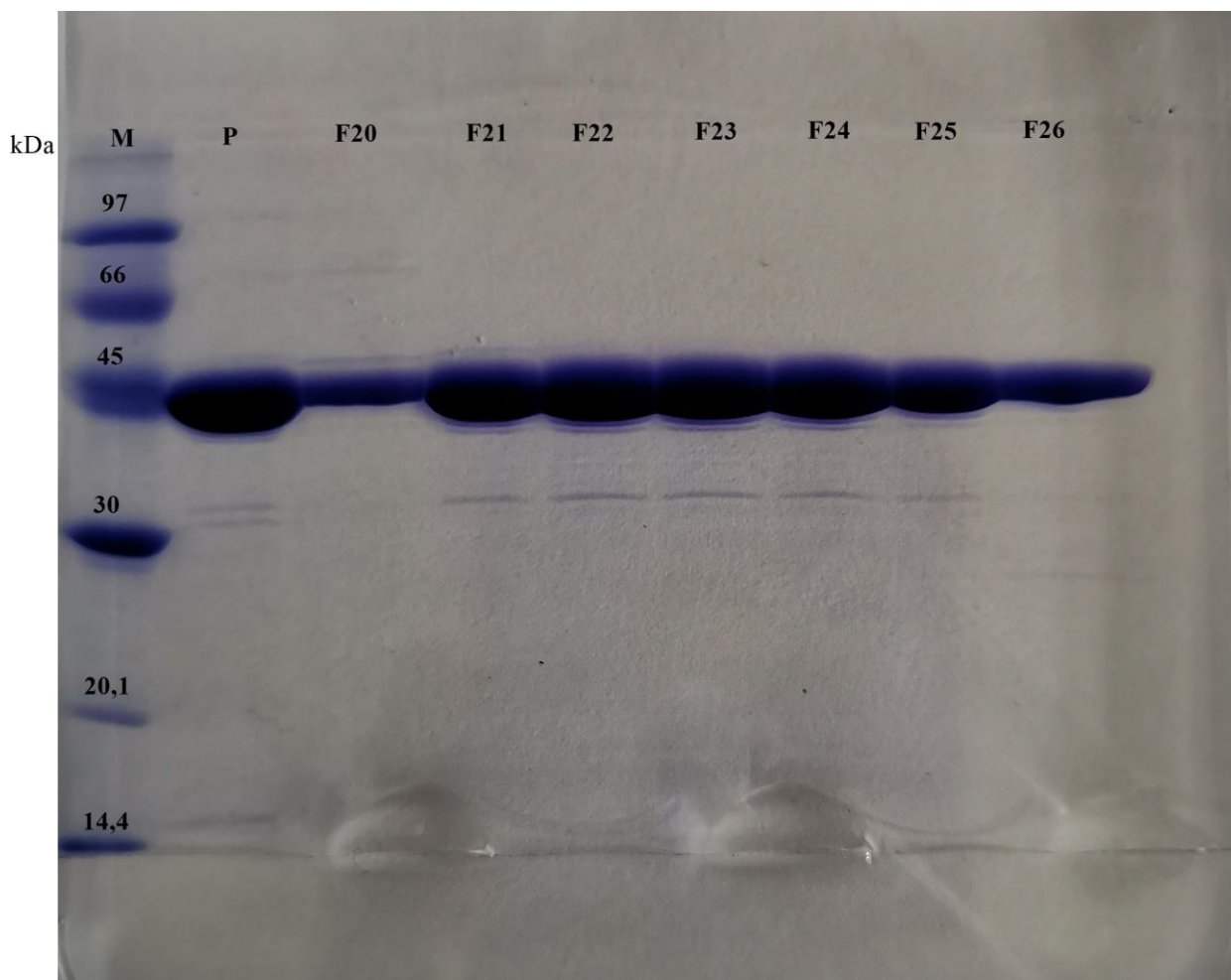
Slika 4.1. SDS-PAGE elektroforeza na 12,5% poliakrilamidnom gelu provedena nakon pročišćavanja proteina afinitetnom kromatografijom. M-marker molekularnih masa, LMW-SDS Marker Kit (*GE Healthcare*), PI-stanice prije indukcije, L-stanice nakon lize, S-proteinski ekstrakt, odnosno supernatant nakon lize stanica, FT-nevezna frakcija, W1-W3-frakcije dobivene nakon ispiranja kolone, E1-E9-elucijske frakcije.

Nakon afinitetne kromatografije, frakcije E3 i E4, koje su prema rezultatima elektroforeze pokazivale najveći stupanj čistoće i najveću količinu proteina, su spojene i centrifugirane 5 min na $20198 \times g$. Kako bi dodatno pročistili protein i uklonili moguće nastale agregate u uzorku proteina, pročišćavanje je dalje nastavljeno gel filtracijom. Spojene frakcije propuštene su kroz kolonu u volumenu od 2 mL. Kolona je prethodno ekvilibrirana u puferu HEPES čiji je sastav prikazan u tablici 3.2. Praćenjem promjene apsorbancije UV zračenja pri 280 nm pratio se prolazak proteina kroz kolonu. Prema rezultatima gel filtracije možemo vidjeti da se protein eluirao s kolone u frakcijama od 20 do 26, a maksimum se nalazi na oko 76 mL (slika 4.2).



Slika 4.2. Kromatogram gel filtracije spojenih frakcija proteina E3 i E4. Crvenom bojom su označene frakcije.

Uzorci dobiveni pročišćavanjem proteina gel filtracijom su koncentrirani i potom analizirani SDS-PAGE elektroforezom. Rezultati elektroforeze potvrđuju da se najveća količina AdSS-a nalazi u frakcijama od 21 do 26 (slika 4.3). Kao konačni uzorak pročišćenog AdSS-a spojene su frakcije 21-26.



Slika 4.3. SDS-PAGE elektroforeza na 12,5% poliakrilamidnom gelu provedena nakon gel filtracije. M-marker molekulskih masa, LMW-SDS Marker Kit (*GE Healthcare*), P-uzorak prije gel filtracije, F₂₀-F₂₆-frakcije dobivene gel filtracijom

Preostale frakcije E2, E5, E6, E7, E8 i E9 dobivene pročišćavanjem afinitetnom kromatografijom su također spojene i na isti način pročišćene gel filtracijom.

Pročišćavanjem iz ukupno 1L bakterijske kulture dobiven je AdSS koncentracije 25,04 mg mL⁻¹ i specifične enzimske aktivnosti od 0,729 U mg⁻¹. Proteinski uzorci spremljeni su u plastične epruvetice u volumenima po 100 μL i pohranjeni na -80 °C.

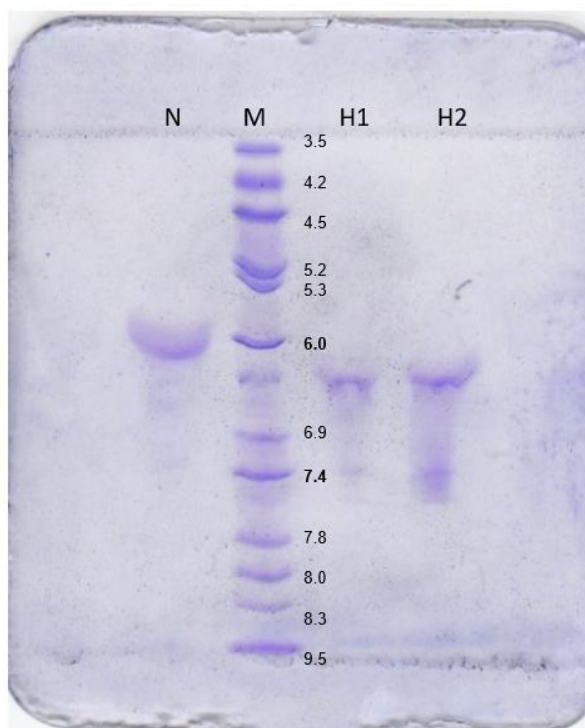
Prema dostupnoj literaturi, postupci pročišćavanja su specifični za svaki protein, ovisno o njegovim svojstvima. Općenito, bakterijski AdSS enzimi su anionski (imaju pI<7) i vežu se za anionske izmjenjivače kao što je dietilaminoetil celuloza (DEAE), pa se u pročišćavanju često koristi ova metoda.⁶ Npr. AdSS iz *E. coli* pročišćen je u tri koraka:

taloženje amonijevim sulfatom, kromatografija ionske izmjene na anionskom izmjenjivaču (DEAE) i kromatografija hidrofobnih interakcija na koloni fenil-sefaroze.⁴⁴ Nativni AdSS iz *H. pylori* pročišćen je sljedećim postupkom: kromatografija ionske izmjene na kationskom izmjenjivaču (SP-sefaroza), gel filtracija i kromatografija ionske izmjene na anionskom izmjenjivaču (MonoQ 5/50 GL).²⁶ Vežanje histidinskog privjeska na AdSS iz *H. pylori* znatno je skratilo i pojednostavilo postupak pročišćavanja ovog proteina.

4.2. Izoelektrična točka i molekulska masa

ProtParam je alat koji nam omogućuje izračunavanje različitih fizikalnih i kemijskih parametra proteina na temelju proteinske sekvence. Unošenjem primarne sekvence za AdSS s histidinskim privjeskom izračunata je teorijska pI koja iznosi 7,22.³²

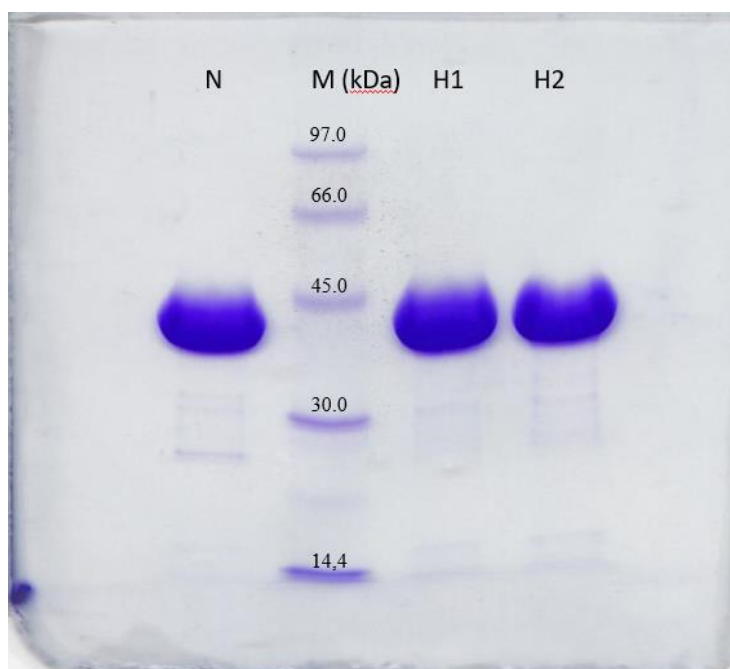
Izoelektrična točka ciljnog proteina određena je eksperimentalno izoelektričnim fokusiranjem provedenim u *PhastGel-u* i gradijentu pH od 3 do 9. Na gel je nanesen uzorak obilježenog AdSS-a dobiven pročišćavanjem afinitetnom kromatografijom te uzorak nakon drugog koraka pročišćavanja gel filtracijom. Radi usporedbe, na gel je nanesen i nativni AdSS koji nije obilježen. Prema rezultatima provedenog IEF-a možemo vidjeti da se pI nativnog proteina i proteina s afinitetnim privjeskom neznatno razlikuju (slika 4.4). pI nativnog AdSS-a iznosi 6,1 što je približno jednako pI obilježenog AdSS-a koja iznosi 6,2. Međutim, teorijska pI za nativni AdSS (izračunata pomoću alata *ProtParam*) iznosi 7,53, dakle eksperimentalno dobivene vrijednosti za oba proteina odstupaju prilično od teorijskih. Ova nepodudarnost vjerojatno se može objasniti činjenicom da AdSS djeluje kao homodimer⁶, dok *ProtParam* računa pI na temelju proteinske sekvence monomera. Moguće je da dimerizacijom dolazi do sakrivanja nekih aminokiselinskih ostataka, što čini dimer više negativno nabijenim. Do sada okarakterizirani bakterijski AdSS enzimi posjeduju pI u rangu od 5 do 6.



Slika 4.4. Izoelektrično fokusiranje provedeno na *PhastGel-u* i gradijentu pH od 3 do 9. N-AdSS bez afinitetnog privjeska (His)₆, M-marker pI (*Serva* 3-9), H1-obilježeni AdSS pročišćen afinitetnom kromatografijom, H2-obilježeni AdSS nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom i gel filtracijom.

Nakon IEF-a provedena je i SDS-PAGE elektroforeza na uređaju *PhastSystem*. Na temelju rezultata elektroforeze izračunata je molekulska masa nativnog i AdSS-a s afinitetnim privjeskom (slika 4.5). Prema rezultatima elektroforeze molekulska masa obilježenog AdSS za monomer iznosi 47,5 kDa što je u dobroj korelaciji s teoretski izračunatom masom koja iznosi 46,8 kDa (izračunata pomoću alata *ProtParam*).³² Monomer nativnog AdSS-a očekivano ima nešto manju molekulsku masu pošto nema afinitetni privjesak. Eksperimentalno izračunata molekulska masa nativnog proteina iznosi 46,1 kDa što je također približno jednako teoretskoj masi od 45,7 kDa.

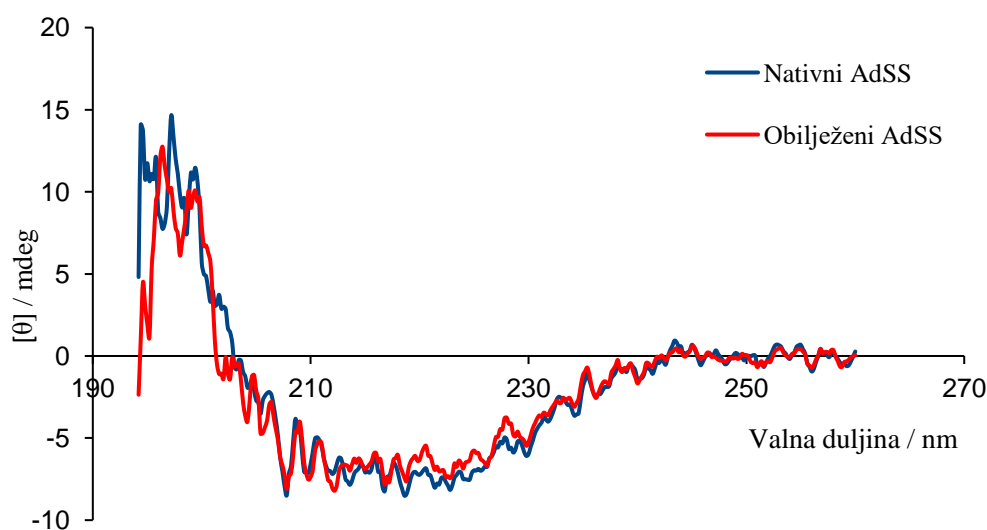
Enzim AdSS iz bakterije *H. pylori* prema molekularnoj masi monomera pripada u skupinu tipičnih bakterijskih AdSS enzima. Većina njih ima molekularnu masu oko 50 kDa i za potpunu katalitičku aktivnost potrebne su obje podjedinice enzima. Razlog postojanja monomera i dimera AdSS-a još nije u potpunosti poznat, no za sada je pokazano da samo dimer AdSS-a djeluje katalitički.⁶



Slika 4.5. SDS-PAGE elektroforeza provedena nakon izoelektričnog fokusiranja. N-nativni AdSS bez afinitetnog privjeska, M-marker molekularnih masa, LMW-SDS Marker Kit (*GE Healthcare*), H1-obilježeni AdSS pročišćen afinitetnom kromatografijom, H2-obilježeni AdSS nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom i gel filtracijom.

4.3. Elementi sekundarne strukture

Metoda cirkularnog dikroizma (CD) nam omogućuje uvid u strukturne elemente koji uključuju α -zavojnice i β -ploče. CD analiza provedena je na uređaju *Jasco J-815* radi usporedbe sekundarne strukture AdSS-a obilježenog afinitetnim privjeskom i nativnog AdSS-a, bez afinitetnog privjeska. Apsorpcija je mjerena u području spektra od 260 do 190 nm na sobnoj temperaturi.



Slika 4.6. CD spektar nativnog i AdSS-a obilježenog histidinskim privjeskom. Prikazana je ovisnost molarne eliptičnosti θ o valnoj duljini.

Iz slike 4.6. vidljivo je da se CD spektri nativnog AdSS-a i AdSS-a obilježenog histidinskim privjeskom ne razlikuju. To ukazuje na to da uvođenjem oznake (His)₆ nije došlo do promjena u sekundarnoj strukturi ovog proteina. Navedeni zaključak je dodatno potkrijepljen rezultatima obrade CD spektara u programu *Dichroweb*.^{36,37,38} Dotični program računa udjele elemenata sekundarne strukture u strukturi proteina iz oblika CD spektra i za analizirane proteine izračunate brojke se odlično slažu (tablica 4.1.).

Tablica 4.1. Rezultati analize CD spektara programom *Dichroweb*, za nativni i AdSS obilježen histidinskim privjeskom.

	Obilježeni AdSS	Nativni AdSS
α -uzvojnica	0,52	0,51
β -ploča	0,20	0,22
Okreti	0,08	0,07
Neuređeno	0,20	0,20

4.4. Kinetički parametri

Enzimi su proteini koji kataliziraju biološke reakcije na način da ubrzavaju pretvorbu supstrata u produkt. Visoko su specifični i selektivni prema određenim molekulama. Enzime karakteriziraju dva glavna svojstva. Prvo, ubrzavaju kemijske reakcije, a da pri tome oni ostanu nepromijenjeni i drugo, povećavaju brzinu reakcija bez promjene kemijske ravnoteže između reaktanata i produkata.⁴⁵ Kinetička svojstva mnogih enzima možemo opisati *Michaelis-Menten* modelom prema sljedećem izrazu:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Brzina reakcije (v) se povećanjem koncentracije supstrata $[S]$ asimptotski približava maksimalnoj brzini reakcije (v_{max}). Michaelisova konstanta (K_m) ukazuje na afinitet enzima prema supstratu i jednaka je koncentraciji supstrata kod koje se postiže polovica maksimalne brzine.

Kinetički parametri za AdSS određeni su metodom izolacije prema kojoj su svi supstrati osim jednog prisutni u velikom suvišku pa ih možemo smatrati konstantnim. Reakcija u kojoj sudjeluje AdSS uključuje tri supstrata Asp, IMP i GTP. Eksperiment je proveden pri sobnoj temperaturi koristeći reakcijsku smjesu (tablica 3.3.) i pufer HEPES pH vrijednosti 7,7.

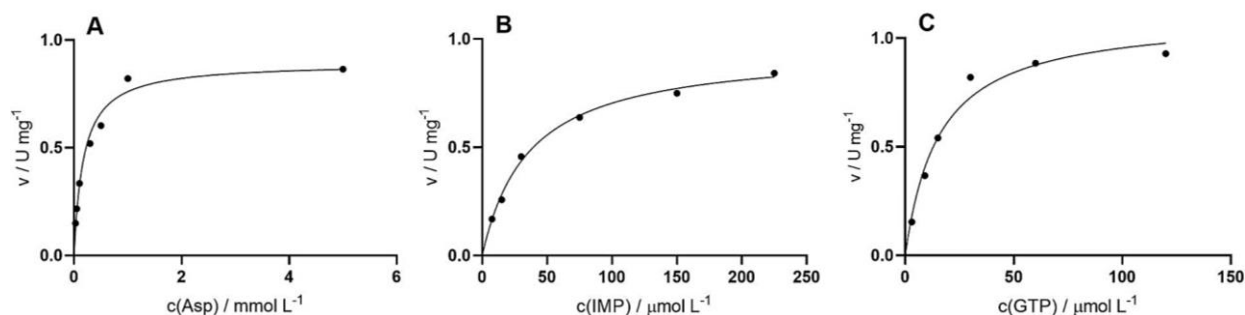
Pomoću programa *GraphPad Prism 8* za svaki od supstrata izračunati su kinetički parametri (v_{max} i K_m) koji su prikazani u tablici 4.2. Tablica također prikazuje usporedbu kinetičkih parametara obilježenog i nativnog AdSS-a. Podaci za nativni AdSS preuzeti su iz literaturnog izvora²⁶.

Tablica 4.2. Kinetički parametri za AdSS obilježen afinitetnim privjeskom (His)₆ i nativni AdSS izračunati iz eksperimentalnih podataka prema *Michaelis-Menten* modelu u programu *GraphPad Prism 8*.

	Supstrat	Fiksirana koncentracija supstrata / mmol L ⁻¹	K_m / $\mu\text{mol L}^{-1}$	v_{max} / U mg ⁻¹
Obilježeni AdSS	Asp	IMP-0,15, GTP- 0,06	176,3 ± 18,9	0,894 ± 0,030
	IMP	Asp-5, GTP-0,06	35,9 ± 4,6	0,956 ± 0,040
	GTP	Asp-5, IMP-0,15	15,6 ± 1,9	1,103 ± 0,040
Nativni AdSS	Asp	IMP-0,15, GTP- 0,06	125,4 ± 7,7	1,103 ± 0,016
	IMP	Asp-5, GTP-0,06	40,1 ± 2,9	1,456 ± 0,036
	GTP	Asp-5, IMP-0,15	8,7 ± 0,6	1,418 ± 0,023

Uspoređujući Michaelisove konstante koje su dobivene za obilježeni AdSS, najveću vrijednost K_m ima Asp, a najmanju GTP. Prema značenju Michaelisove konstante, AdSS manjim afinitetom veže Asp nego GTP ili IMP. To ukazuje da je potrebna veća koncentracija Asp-a u usporedbi s koncentracijom GTP-a i IMP-a da bi se postigla maksimalna brzina reakcije koja se neznatno razlikuje za sva tri supstrata. Parametri za nativni AdSS u skladu su s dobivenim parametrima za obilježeni AdSS, nešto su više vrijednosti K_m konstanti za Asp i GTP za obilježeni AdSS. Također, postoji vrlo mala razlika ako se uspoređuju vrijednosti v_{max} za obilježeni i nativni AdSS. Od dostupnih podataka u literaturi, kinetičke konstante za AdSS iz *H. pylori* mogu se usporediti npr. s onima za AdSS iz *E. coli*: $K_m(\text{Asp})=230 \mu\text{mol L}^{-1}$, $K_m(\text{IMP})=30 \mu\text{mol L}^{-1}$, $K_m(\text{GTP})=26,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (ref. 46) i $v_{max}=1,7 \text{ U mg}^{-1}$.⁴⁴

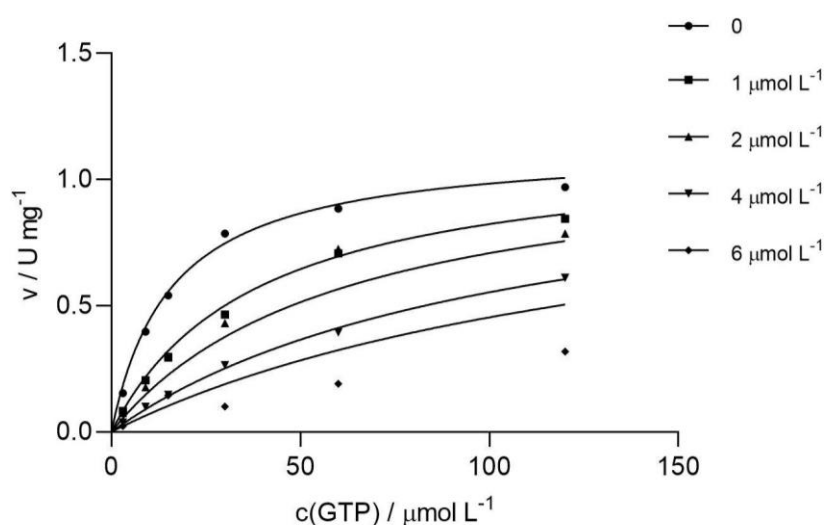
U programu *GraphPad Prism 8* izrađeni su grafovi koji prikazuju početnu brzinu reakcije kao funkciju koncentracije supstrata. Iz priloženih grafova možemo vidjeti da enzimska reakcija za svaki od supstrata slijedi *Michaelis-Menten* kinetiku (slika 4.7).



Slika 4.7. Grafovi ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata, A-Asp, B-IMP i C-GTP dobiveni nelinearnom regresijom prema *Michaelis-Menten* modelu u programu *GraphPad Prism 8*.

Ispitana je inhibicija AdSS-a obilježenog afinitetnim (His)₆ privjeskom s GDP-om, produktom reakcije AdSS-a. Eksperiment je proveden s 4 različite koncentracije GDP-a, a grafovi početnih brzina kao funkcije koncentracija supstrata izrađeni su u programu *GraphPad Prism 8*. Prema dobivenim rezultatima, GDP se pokazao kao kompetitivni inhibitor u odnosu na GTP (slika 4.8), kao što je bilo i očekivano prema literaturnim podacima.⁶ Dobivena konstanta inhibicije K_i za GDP iznosi 0,9 μmol L⁻¹. Vidljivo je da se povećanjem koncentracije GDP-a brzina reakcije smanjuje i time je potrebna veća koncentracija supstrata, GTP-a, da bi se postigla v_{max} .

Kao produkt reakcije AdSS, GDP je ispitan kao inhibitor AdSS-a iz više izvora i određene konstante inhibicije su u rasponu 5-30 μmol L⁻¹.⁶ Npr. za AdSS iz *E. coli* $K_i(\text{GDP})=12$ μmol L⁻¹.³⁴ Konstanta inhibicije određena u ovom radu niža je od navedenih vrijednosti, znači AdSS iz *H. pylori* je jače inhibirana GDP-om. Također, ta je vrijednost usporediva s konstantama inhibicije određenima za nativni AdSS iz *H. pylori* za hadacidin (inhibitor kompetitivan obzirom na Asp, $K_i=0,19$ μmol L⁻¹) i adenilosukcinat (produkt reakcije, inhibira kompetitivno obzirom na IMP, $K_i=3,5$ μmol L⁻¹).²⁶

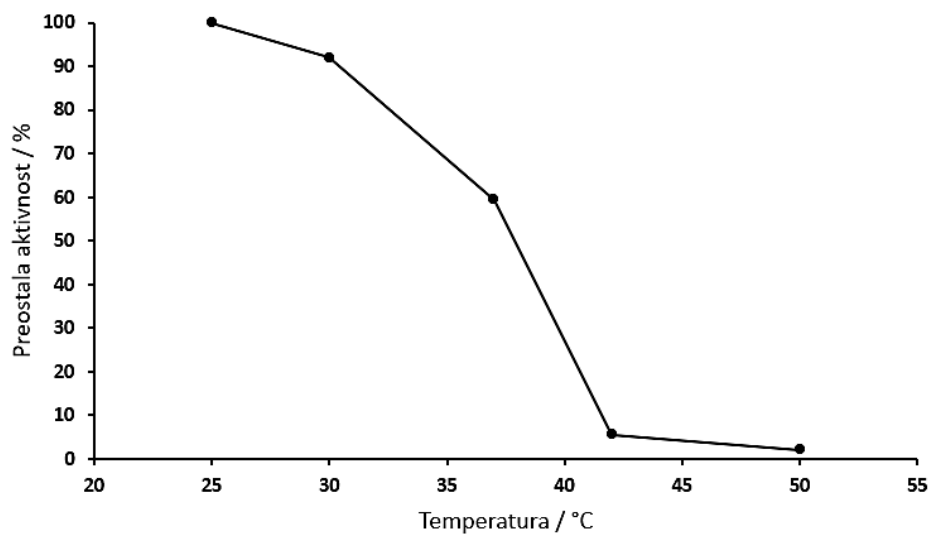


Slika 4.8. Inhibicija obilježenog AdSS-a s različitim koncentracijama GDP-a. Simboli prikazani na slici prikazuju različite koncentracije GDP-a.

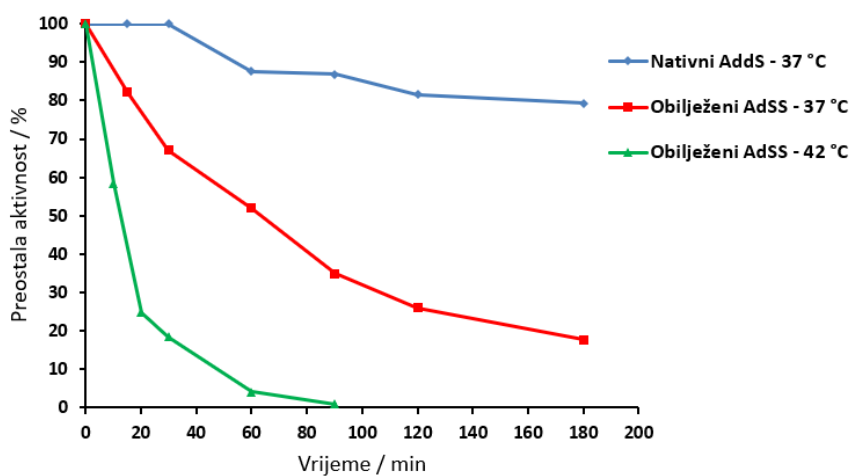
4.5. Utjecaj temperature i pH na stabilnost proteina

Stabilnost AdSS-a pri različitim temperaturama i različitim pH vrijednostima ispitana je spektrofotometrijski pomoću standardne reakcijske smjese (tablica 3.3) i pufera HEPES pH vrijednosti 7,7 ili Britton-Robinson različitim pH vrijednosti. Dobiveni podaci obrađeni su u programu *Excel* (*Excel Microsoft Office*).

Podaci dobiveni inkubiranjem obilježenog AdSS sat vremena pri različitim temperaturama pokazuju da je inkubirani AdSS najstabilniji pri temperaturi od 25 °C. Enzim zadržava stabilnost sat vremena sve do temperature od oko 30 °C, a na višim temperaturama počinje gubiti aktivnost (slika 4.9). Mjerenje preostale aktivnosti AdSS-a u ovisnosti o vremenu izvršeno je pri dvije različite temperature, 37 °C i 42 °C. Prema slici 4.10 AdSS dulje zadržava veću stabilnost na 37 °C, a specifična aktivnost enzima pada na ½ početne vrijednosti pri toj temperaturi za 65 min. Specifična aktivnost enzima pada na ½ početne vrijednosti brže pri temperaturi od 42 °C, za 13 min. Podaci izmjereni za nativni AdSS pri 37 °C pokazuju da nativni AdSS ima višu aktivnost od obilježenog.

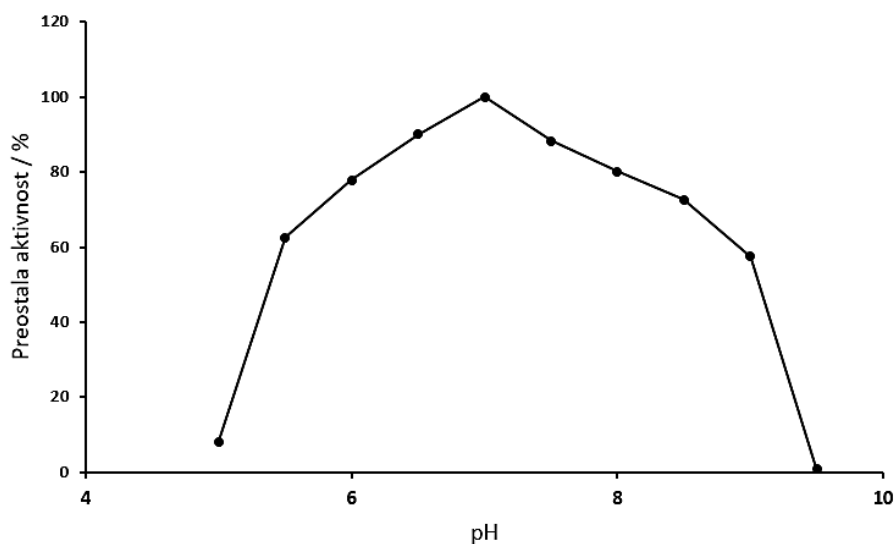


Slika 4.9. Utjecaj temperature na stabilnost AdSS obilježenog afinitetnim privjeskom (His)₆.



Slika 4.10. Aktivnost AdSS-a u ovisnosti o vremenu inkubacije pri dvjema različitim temperaturama. Plavom bojom označena je krivulja za nativni AdSS pri 37 °C, crvenom bojom je označena krivulja za obilježeni AdSS pri 37 °C i zelena boja označava obilježeni AdSS pri 42 °C.

Područje pH u kojem obilježeni AdSS pokazuje najveću stabilnost je između 6,5 i 7,5 pri čemu enzim zadržava oko 90% početne aktivnosti (slika 4.11).



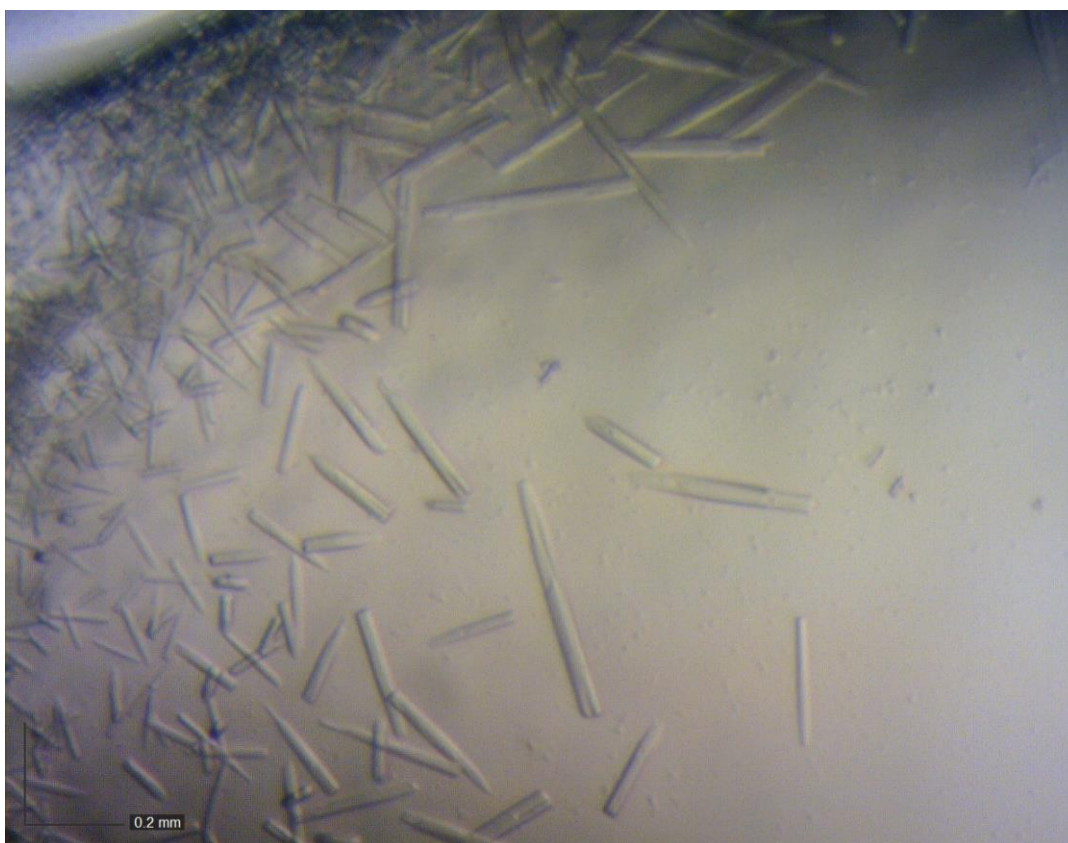
Slika 4.11. Utjecaj pH na stabilnost AdSS-a obilježenog afinitetnim privjeskom (His)₆.

Područja temperaturne i pH stabilnosti obilježenog AdSS-a iz *H. pylori* (do 30 °C i pH 6,5-7,5) nešto su uža od onih kod nativnog AdSS-a (do 37 °C i pH 6,5-8,5).²⁶ U dostupnoj literaturi postoji podatak samo za stabilnost AdSS-a iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* – do 37 °C i u širokom rasponu pH od 5 do 10.⁴⁷

Zanimljivo je kako bakterija *H. pylori* živi uz ljude već stotinama tisuća godina i to u vrlo specifičnim uvjetima ljudskog želuca.⁵ Ipak, usprkos veoma niskom pH navedenog okoliša, ova bakterija je pronašla načine za prilagodbu i modifikaciju uvjeta u svom neposrednom okruženju (npr. zavlacenje u sluznicu želuca, izlučivanje ureaze koja cijepa ureu na ugljikov dioksid i amonijak koji podiže pH oko bakterije).⁴⁸ U skladu s tim prilagodbama je i stabilnost bakterijskih enzima pri fiziološkoj temperaturi od 37 °C i neutralnom pH koji je održan u samoj bakteriji i njejoj neposrednoj okolini.

4.6. Kristalizacija proteina

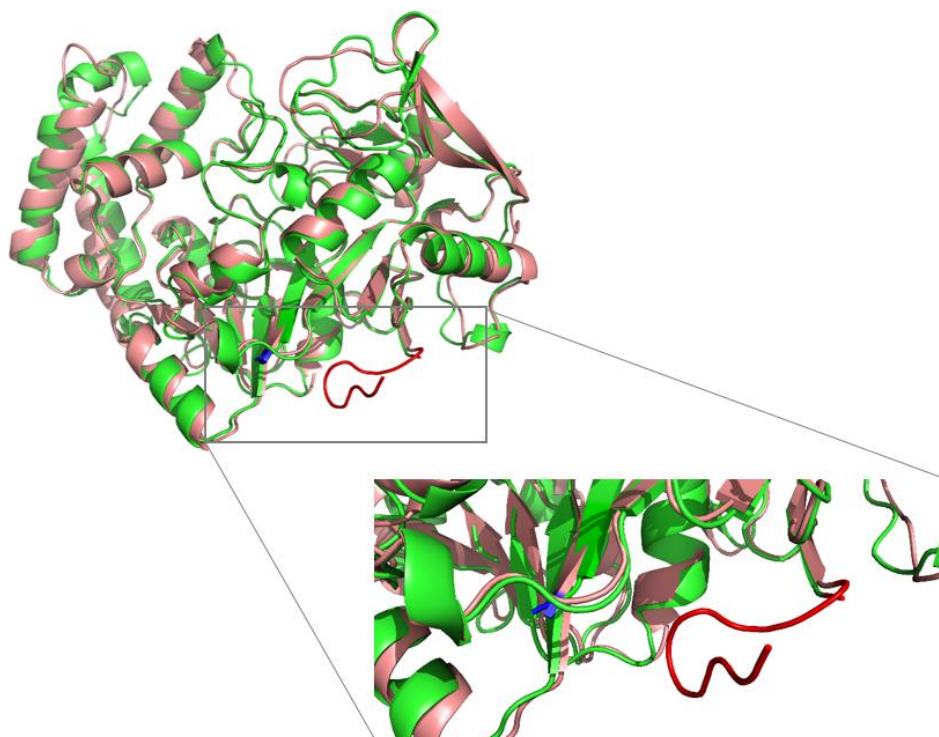
Prethodno su u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju s nativnim AdSS iz *H. pylori* pronađeni uvjeti u kojima enzim kristalizira, ali u obliku brojnih tankih iglica. Budući da su se svojstva obilježenog AdSS pokazala dovoljno slična svojstvima nativnog enzima, odlučeno je optimizirati koncentraciju proteina (obilježenog AdSS) za kristalizaciju u poznatim uvjetima, kako bi se dobili kristali odgovarajuće veličine za sakupljanje podataka o difrakciji rendgenskih zraka. Pročišćeni i koncentrirani uzorak AdSS-a kristaliziran je metodom difuzije para iz viseće kapi. Sam postupak kristalizacije detaljno je opisan u poglavlju 3.13. Kristali AdSS-a obilježenog afinitetnim privjeskom (His)₆ dobiveni navedenom metodom pri koncentraciji AdSS-a od 12 mg mL⁻¹ prikazani su na slici 4.12. Veći kristali rasli su pri nižim koncentracijama unutar testiranog raspona koncentracija (5-25 mg mL⁻¹).



Slika 4.12. Kristali obilježenog AdSS-a iz *H. pylori* dobiveni metodom difuzije para iz viseće kapi pri 18 °C.

Kako bi se pokušalo predvidjeti hoće li afinitetni privjesak utjecati na 3D-strukturu AdSS, izrađeni su homologni modeli obilježenog i neobilježenog proteina pomoću programa *Phyre2*.⁴⁹ Dotični program temelji se na naprednim metodama pronalaženja niske homologije (prepoznavanje načina smatanja proteina usporedbom profila njegove sekvence s bazom podataka profila sekvenci proteina s riješenim strukturama), te omogućuje predviđanje trodimenzijske strukture proteinske sekvence, neuređenost i funkcionalnost pojedinih regija te mjesta vezanja liganda.⁴⁹ Dobiveni modeli bili su identični, što ukazuje na to da afinitetni privjesak ne bi trebao imati utjecaja na 3D-strukturu ovog proteina. Doduše, treba uzeti u obzir i da je (His)₆ možda premala razlika u sekvenci proteina da bi imala utjecaj na rezultate predviđanja 3D-strukture.

Nakon završetka izrade ovog diplomskog rada, određena je kristalna struktura obilježenog AdSS-a (A. Bubić, neobjavljeni podaci). Homologni model za obilježeni AdSS dobiven programom *Phyre2* uspoređen je s kristalnom strukturom (slika 4.13).



Slika 4.13. Usporedba homolognog modela i kristalne strukture obilježenog AdSS-a. Zelenom bojom je prikazana kristalna struktura, a rozom homologni model. Crvenom bojom je označen C- kraj, plavom N- kraj proteina.

Preklapanjem homolognog modela i kristalne strukture može se vidjeti da nema drastičnih razlika u strukturnim elementima te da su model i kristalna struktura izuzetno slični. Manje razlike vide se uglavnom u položajima neuređenih petlji. C- i N- kraj proteina nalaze se na vanjskoj strani proteina što ukazuje na to da histidinski privjesak na C- kraju ne stvara interakcije bilo s aktivnim mjestom, bilo s nekim strukturnim elementom važnim za oblikovanje aktivnog mjesta, te tako nema utjecaj na funkciju enzima. Ovaj zaključak potvrđuje i činjenica da se u eksperimentalno određenoj 3D-strukturi afinitetni privjesak uopće ne vidi, što znači da je potpuno neuređen, nevezan (npr. vodikovim vezama) na strukturne elemente proteina i slobodan za pomicanje.

§ 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je okarakterizirati enzim adenilosukcinat-sintetazu (AdSS) iz bakterije *Helicobacter pylori*, obilježenu afinitetnim privjeskom (His)₆ na C-kraju proteina, kako bi se provjerilo ima li afinitetni privjesak utjecaj na svojstva ovog enzima.

Enzim AdSS je pročišćen u dva koraka, afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionima (IMAC) i gel filtracijom, čime je dobiven uzorak visoke čistoće.

Određena je izoelektrična točka (pI) obilježenog i nativnog AdSS-a: 6,2, odnosno 6,1. Dobivene vrijednosti odstupaju od teorijski izračunatih (programom *ProtParam*): 7,22, odnosno 7,53. Do odstupanja vjerojatno dolazi zbog toga što AdSS djeluje kao dimer, dok program računa pI na osnovi proteinske sekvence monomera.

Eksperimentalno određena molekulska masa AdSS-a obilježenog histidinskim privjeskom za monomer iznosi 47,5 kDa, a za monomer nativnog AdSS-a 46,1 kDa. Molekulske mase oba proteina dobro se slažu s teorijskim molekulskim masama: 46,8 kDa za obilježeni AdSS i 45,7 kDa za nativni AdSS. AdSS iz *H. pylori* spada u skupinu tipičnih bakterijskih AdSS-a čija molekulska masa iznosi oko 50 kDa.

Spektri cirkularnog dikroizma obilježenog i nativnog AdSS ukazuju na to da uvođenje histidinskog privjeska nema utjecaja na elemente sekundarne strukture. To je potvrđeno pomoću alata *Dichroweb* koji računa udjele elemenata sekundarne strukture iz oblika CD spektra i za analizirane proteine dobivene vrijednosti su gotovo identične.

Određivanjem kinetičkih parametara obilježenog AdSS-a pokazano je da enzimska reakcija za svaki od supstrata slijedi *Michaelis-Menten* kinetiku. Vrijednosti v_{max} za obilježeni AdSS se neznatno razlikuju za sva tri supstrata (0,894-1,103 U mg⁻¹). Vrijednosti K_m iznose 176,3 μmol L⁻¹ za Asp, 35,9 μmol L⁻¹ za IMP i 15,6 μmol L⁻¹ za GTP. Može se zaključiti da će AdSS manjim afinitetom vezati Asp nego GTP ili IMP. Kinetički parametri obilježenog AdSS-a u dobrom su slaganju s prethodno određenim parametrima za nativni AdSS (vrijednosti K_m za Asp i GTP su nešto više za obilježeni enzim).

Ispitivanje inhibicije AdSS-a produktom reakcije, GDP-om, pokazalo je da je GDP kompetitivni inhibitor u odnosu na GTP, dobivena konstanta inhibicije K_i iznosi 0,9 μmol L⁻¹.

Obilježeni AdSS je stabilan do 30 °C i u rasponu pH 6,5-7,5, što predstavlja nešto uže područje stabilnosti u odnosu na nativni AdSS.

Uspješno su dobiveni kristali obilježenog AdSS-a unutar raspona koncentracije proteina unutar ispitivanog raspona koncentracija. U međuvremenu je određena kristalna struktura obilježenog AdSS-a. Homologni model obilježenog AdSS-a i kristalna struktura ne pokazuju efektivne razlike u strukturi, te možemo zaključiti da histidinski privjesak na C-kraju ne narušava strukturu i funkciju istraživaniog enzima.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AdSS – adenilosukcinat sintetaza

APS – amonijev persulfat

Asp – L-asparaginska kiselina

AVh – engl. *accumulated volthours*

CD – cirkularni dikroizam

DEAE – dietilaminoetil celuloza

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

GDP – gvanozin 5'-difosfat

GTP – gvanozin 5'-trifosfat

HEPES – N-(2-hidroksietil) piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina

IARC – Međunarodna agencija za istraživanje raka, engl. *International Agency for Research on Cancer*

IMAC – kromatografija s imobiliziranim metalnim ionima

IMP – inozin 5'-monofosfat

IPTG – izopropil-β-tiogalaktopiranozid

LMW Marker – engl. *low molecular weight marker*

Ni-NTA – nikal–nitrilotriacetatna kiselina

NMWL – engl. *nominal molecular weight limit*

OD₆₀₀ – optička gustoća kod 600 nm

PEG – polietilen glikol

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid

Pufer BR – *Britton-Robinsonov* univerzalni pufer

rpm – engl. *rounds per minute*

SDS – natrijev dodecilsulfat

SDS–PAGE – gel elektroforeza pri denaturirajućim uvjetima

TEMED – tetraetilmetildiamin

TCEP – tris-(2-karboksietil) fosfin hidroklorid

Tris – 2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol

U – jedna jedinica (U) enzimske aktivnosti definirana je kao količina enzima koji katalizira reakciju 1 μ mola supstrata u minuti, u danim uvjetima

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. M. Balbaa, *Biochemistry & Physiology: Open Access* **01** (2012) 1–8.
2. M. Zamani, F. Ebrahimitabar, V. Zamani, W.H. Miller, R. Alizadeh-Navaei, J. Shokri-Shirvani, M.H. Derakhshan, *Aliment. Pharmacol. Ther.* **47** (2018) 868–876.
3. Y. Yamaoka, S. Ansari, *F1000Res* **7** (2018) 1–10.
4. S. Ansari, Y. Yamaoka, *Helicobacter* **22** (2017) 1–25.
5. G. Liechti, J.B. Goldberg, *J. Bacteriol.* **194** (2012) 839–854.
6. M.M. Stayton, F.B. Rudolph, H.J. Fromm, u B. L. Horecker, E. R. Stadtman (ur.) *Current Topics in Cellular Regulation* , Vol 22, Academic Press Inc., San Diego, 1983, str. 103–141.
7. W.T. Booth, C.R. Schlachter, S. Pote, N. Ussin, N.J. Mank, V. Klapper, L.R. Offermann, C. Tang, B.K. Hurlburt, M. Chruszcz, *ACS Omega* **3** (2018) 760–768.
8. S. Magdeldin, A. Moser, *Affinity Chromatography : Principles and Applications*, InTech, 2012
9. K.A. Majorek, M.L. Kuhn, M. Chruszcz, W.F. Anderson, W. Minor, *Protein Sci.* **23** (2014) 1359–1368.
10. J.G. Kusters, A.H.M. Van Vliet, E.J. Kuipers, *Clin. Microbiol. Rev.* **19** (2006) 449–490.
11. B.J. Marshall, J.R. Warren, *The Lancet* **323** (1984) 1311–1315.
12. S. Diaconu, A. Predescu, A. Moldoveanu, C.S. Pop, C. Fierbințeanu-Braticevici, *J Med Life* **10** (2017) 112–117.
13. J.G. Fox, *Gut* **50** (2002) 273–283.
14. K. Stingl, K. Altendorf, E.P. Bakker, *Trends Microbiol.* **10** (2002) 70–74.
15. M. Specht, F. Dempwolff, S. Schätzle, R. Thomann, B. Waidnera, *J. Bacteriol.* **195** (2013) 1411-1420.

16. O. Sjomina, J. Pavlova, Y. Niv, M. Leja, *Helicobacter* **23** (2018) 6–11.
17. J.K.Y. Hooi, W.Y. Lai, W.K. Ng, M.M.Y. Suen, F.E. Underwood, D. Tanyingoh, P. Malfertheiner, D.Y. Graham, V.W.S. Wong, J.C.Y. Wu, F.K.L. Chan, J.J.Y. Sung, G.G. Kaplan, S.C. Ng, *Gastroenterology* **153** (2017) 420–429.
18. C.Y. Kao, B.S. Sheu, J.J. Wu, *Biomed. J.* **39** (2016) 14–23.
19. M. Katičić, *Medicus* **15** (2006) 39–52.
20. P.B. Ernst, B.D. Gold, *Annu. Rev. Microbiol.* **54** (2000) 615–640.
21. *Malt limfom želuca s infiltracijom koštane srži i transformacijom u DLBCL*, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 2012.
22. G.L. Mendz, u G.L. Mendz, S.L. Hazzel, H.L.T. Mobley (ur.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, Poglavlje 13, ASM Press, Washington, 2001.
23. M.M. Stayton, H.J. Fromm, R.B. Honzatko, u D. L. Purich (ur.), *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Vol 73, Wiley, New Jersey, 1999.
24. E.A. Oshchepkova-Nedosekina, V.A. Likhoshvai, *Theor. Biol. Medical Model.* **4** (2007) 1–11.
25. R.B. Honzatko, H.J. Fromm, *Arch. Biochem. Biophys.* **370** (1999) 1–8.
26. A. Bubić, N. Mrnjavac, I. Stuparević, M. Łyczek, B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska, M. Luić, I. Leščić Ašler, *J Enzyme Inhib Med Chem* **33** (2018) 1405–1414.
27. M.C. Thielges, J.K. Chung, J.Y. Axup, M.D. Fayer, *Biochemistry* **50** (2011) 5799–5805.
28. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/electroporation.html> (datum pristupa 15. kolovoza 2020.)
29. <https://biopharma.co.uk/> (datum pristupa 17. kolovoza 2020.)
30. J.. Bornhorst, J.A., Falke, *Methods Enzymol.* **2000** (2010) 245–254.
31. J. M. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str.65 - 78
32. E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch, *Humana Press* (2005) 571–607.

33. <https://www.biomol.com/resources/biomol-blog/guide-to-enzyme-unit-definitions-and-assay-design> (datum pristupa 10. kolovoza 2020.)
34. F.B. Rudolph, H.J. Fromm, *J. Biol. Chem.* **244** (1969) 3832–3839.
35. S.M. Kelly, T.J. Jess, N.C. Price, *Biochim. Biophys. Acta* **1751** (2005) 119–139.
36. L. Whitmore, B.A. Wallace, *Biopolymers* **89** (2008) 392–400.
37. L. Whitmore, B.A. Wallace, *Nucleic Acids Res.* **32** (2004) 668–673.
38. A. Lobley, L. Whitmore, B.A. Wallace, *Bioinformatics* **18** (2002) 211–212.
39. GraphPad Prism verzija 8.0.0 za Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com
40. H.T.S. Britton, R.A. Robinson, *J. Chem. Soc.* (1931) 1456–1462.
41. M.C. Deller, L. Kong, B. Rupp, *Acta Cryst.* **72** (2016) 72–95.
42. <https://proteinstrutures.com/Experimental/Experimental/protein-crystallization.html> (datum pristupa 10. kolovoza 2020.)
43. <https://hamptonresearch.com/index.php> (datum pristupa 10. kolovoza 2020.)
44. M.B. Bass, H.J. Fromm, M.M. Stayton, *Arch. Biochem. Biophys.* **256** (1987) 335–342.
45. G.M. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*, Sunderland (MA), Sinauer Associates, 2000.
46. W. Wang, A. Gorrell, R.B. Honzatko, H.J. Fromm, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 7078–7084.
47. T.A. Ryzhova, Y. V. Andreichuk, V.D. Domkin, *Biochemistry (Moscow)* **63** (1998) 773–780.
48. G.L. Mendz, S.L. Hazell, *Helicobacter* **2** (1997) 1–12.
49. L.A. Kelley, S. Mezulis, C.M. Yates, M.N. Wass, M.J. Sternberg, *Nat. Protoc.* **10** (2016) 845–858.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ana Petek

Datum rođenja: 11.05.1994.

Mjesto rođenja: Zabok

Obrazovanje

2001–2009 Osnovna škola Đurmanec, Đurmanec

2009–2013 Srednja škola Krapina, Krapina

2013–2017 Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek

2017-2020 Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu