Stabilnost i strukturna karakterizacija proteina FlgD iz bakterije Helicobacter pylori

Stojanović, Mario

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:871935

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mario Stojanović

Stabilnost i strukturna karakterizacija proteina FlgD iz bakterije *Helicobacter pylori*

Diplomski rad

Zagreb 2016.

Ovaj rad je izrađen u Labaratoriju za proteinsku kristalizaciju na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom profesorice dr. sc. Dubravke Matković-Čalogović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

STABILNOST I STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA PROTEINA FlgD IZ BAKTERIJE *Helicobacter pylori*

Mario Stojanović

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Protein FlgD bakterije *Helicobacter pylori* (*Hp*FlgD) šaperon je koji igra ulogu tijekom sastavljanja kuke biča. Kuka biča dio je aparata za pokretanje koji je ujedno i faktor virulencije u ove bakterije. Bakterije koje su mutanti i nemaju tog proteina daju fenotipski nepokretne bakterije što govori da je njegova funkcija vrlo bitna prilikom sinteze kuke biča. Ovaj rad opisuje transformaciju bakterija *Escherichia coli* vektorom s ugrađenim genom proteina *Hp*FlgDHis$_6$, prekomjernu ekspresiju, pročišćavanje afinitetnom kromatografijom i gel filtracijom, postavljanje kristalizacije s čistim uzorkom proteina i rješavanje kristalne strukture proteina. Tijekom kristalizacije korišteni su uvjeti u kojima je variran udio (*w*/*v*) PEG 1500, pH pufera SPG, temperatura (4 °C i 16 °C) i koncentracija proteina. Podatci dobiveni rentgenskom strukturnom analizom kristala proteina *Hp*FlgD dali su strukturni model do rezolucije od 2,86 Å. Riješena struktura je pokazala da je protein građen iz dvije domene, Tudor i Fn III, koje su sastavljene od β ploča i petlji. Struktura je slična dvijema poznatim strukturama proteina, FlgD iz bakterija *Xanthomonas campestris* i *Pseudomonas aeruginosa*. Ključna razlika između već poznatih struktura i ove jest zarotirani položaj domene Tudor.

Rad sadrži: 50 stranica, 33 slike, 17 tablica, 29 literaturnih navoda. Izvornik je napisan na hrvatskom jeziku

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: humani patogen, pročišćavanje proteina, kristalizacija proteina, rentgenska strukturna analiza, struktura proteina

Voditelj: Prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović,

Neposredni voditelj: Ivana Kekez, prof. biologije i kemije

Ocjenitelji: Prof.dr.sc. Dubravka Matković-Čalogović,

Doc.dr.sc. Martina Šeruga Musić,

Izv.prof.dr.sc. Biljana Balen

Rad prihvaćen: 4. veljače 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

STABILITY AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THE FlgD PROTEIN FROM *Helicobacter pylori*

Mario Stojanović

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

FlgD protein from *Helicobacter pylori* (*Hp*FlgD) is a chaperon, which plays a role during hook assembly. The hook is a part of the motility apparatus and is also a virulence factor. The lack of the *flgD* gene makes bacteria immotile and that fact highlights the importance of the FlgD protein during synthesis of flagella. This thesis describes the transformation of *Escherichia coli* with the vector with sequence coding for *Hp*FlgD His_6, over-expresion of protein, isolation by affinity chromatography and gel-filtration methods, and crystallization trials with a pure protein sample. During the crystallization trials the following conditions were varied: concentration of PEG 1500 (*w*/*v*), pH of the SPG buffer, temperature (4 °C and 16 °C), and concentration of the protein. The data obtained by the X-ray structure analysis of FlgD protein enabled us to make a structural model up to 2,86 Å resolution. The solved structure of the *Hp*FlgD protein is similar to the two already known structures of FlgD proteins from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas aeruginosa*. The protein has two domains, Tudor and Fn III, which are built up of β sheets and loops. The main difference between the two known structures and this one is the rotated position of the Tudor domain.

(50 pages, 33 figures, 17 tables, 29 references. Original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: human pathogen, protein purification, protein crystallization, X-ray diffraction, protein structure

Supervisor: Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Prof.

Assistant Supervisor: Ivana Kekez, biology and chemistry professor

Reviewers: Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Prof.,
Dr. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.,
Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 4th of February 2016.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. *Helicobacter pylori* 2
1.2. Faktori kolonizacije i virulencije 2
1.2.1. Ureaza 2
1.2.2. Homeostaza metalnih iona i detoksifikacija 3
1.2.3. Pokretljivost 3
1.3. Građa biča 3
1.3.1 Bazalno tijelo 4
1.3.2. Kuka 4
1.3.3 Filament 5
1.4. Strukturne razlike biča u bakterija *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* i *Salmonella sp.* 5
1.5. Sastavljanje kuke 5
1.6. FlgD 6
2. TEORIJSKA OSNOVICA 8
2.1 Transformacija i uzgoj transformiranih stanica 8
2.2 Razbijanje bakterijskih stanica (homogenizacija) 8
2.3 Tehnike pročišćavanja proteina 8
2.4.Kromatografske metode 9
2.4.1. Afinitetna kromatografija 9
2.4.2. Gel-filtracijska kromatografija 9
2.4.3. Sustav za pročišćavanje proteina ÄKTA 10
2.5. Ugušćivanje proteina 10
2.6. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (*engl. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) 10
2.7. Metoda 'Western blotting' 11
2.8. Ograničena proteoliza tripsinom 11
2.9. Kristalizacija makromolekula 12
2.9.1. Osnove kristalizacije proteina 12
2.9.2. Rast kristala 13
2.9.3. Faktori koji utječu na rast kristala 15
a) Temperatura 15
b) pH 15
c) Vrijeme 16
d) Koncentracija proteina 16

2.10. Određivanje kristalne strukture proteina 16
2.10.1. Rentgenska strukturna analiza na jediničnom kristalu 16
2.10.2. Difrakcija rentgenskog zračenja na jediničnom kristalu 17
2.10.3. Rješavanje problema faze 19
a) Molekulska zamjena 19
3. MATERIJAL I METODE 20
3.1. Transformacija bakterijskih stanica 20
3.2. Uzgoj transformiranih stanica 20
3.3. Razbijanje bakterijskih stanica 21
3.4. Pročišćavanje proteina 21
3.4.1. Afinitetna kromatografija 21
3.4.2. Gel-filtracija 22
3.5. Ugušćivanje proteina ultrafiltracijom 22
3.6. Ograničena proteoliza tripsinom 22
3.7. SDS-PAGE elektroforeza 23
3.8. Metoda 'Western blotting' 24
3.9. Kristalizacija proteina 25
3.9.1. Prva kristalizacija 25
3.9.2. Druga kristalizacija 26
3.9.3. Treća kristalizacija 27
3.9.4. Četvrta kristalizacija 28
3.10. Rješavanje kristalne strukture proteina FlgD 28
4. REZULTATI 29
4.1. Dobivanje čistog i koncentriranog proteina *Hp*FlgD iz soja 26695 29
4.2. Dobivanje čistog i koncentriranog proteina SeMetFlgD 32
4.3. Stabilnosti proteina *Hp*FlgD 34
4.4. Analiza metodom 'Western blotting' 36
4.5. Kristalizacija proteina *Hp*FlgD 37
4.6. Rješavanje strukture proteina *Hp*FlgD rentgenskom strukturnom analizom 39
5. RASPRAVA 41
6. ZAKLJUČAK 47
7. LITERATURNA VRELA 48
8. PRILOG 50

Popis kratica

Å – Ångstrom (1 Å = 10^{-10} m)

Asn - asparagin

APS – amonijev persulfat

Arg – arginin

DTT – ditiotreitol

Gln – glutamin

Glu – glutamat

Gly – glicin

GST – glutation S-transferaza

Ile – izoleucin

IPTG – izopropil–β–D–1–tiogalaktopiranozid

Lys – lizin

MES – 2– (*N*–morfolino)etansulfonska kiselina

MBP – Maltoza vezujući protein (*engl. maltose binding protein*)

Ni-NTA – nikal- nitrotriacetat

PEG – poli(etilen-glikol)

Phe – fenilalanin

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid

Ser – serin

SPG – pufer sastava: jantarna kiselina, natrijev fosfat monobazični monohidrat, glicin u omjeru 2:7:7 (*engl. succinic, phosphate, glycine buffer*)

SDS – natrijev dodecilsulfat (*engl. sodium dodecyl sulphate*)

TBST- Tris puferirana NaCl i Tween 20 otopina (*engl. Tris buffered Saline and Tween 20*)

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin

Tris – tris(hidroksimetil)amino metan

V5 – epitop α podjedinice RNA polimeraze primatova parainfluenza virusa tipa 5

1. UVOD

Humani patogen, bakterija *Helicobacter pylori*, preživljava i kolonizira ljudski probavni sustav zahvaljujući svojoj pokretljivosti. Kretanje bakterije omogućuju bičevi građeni od niza proteina za čiju su pravilnu ugradnju tijekom biogeneze zaduženi dodatni proteini (šaperoni) među kojima je i protein FlgD. Bič je građen iz tri dijela, bazalnog tijela, kuke i izvanstaničnog filamenta. [1, 2, 3] FlgD je protein neophodan za pravilno sastavljanje kuke biča, ali nije prisutan u novonastalom biču. Smatra se da je to protein koji izgrađuje kapu kuke biča te je potreban za modifikaciju štapića bazalnog tijela[1, 2].

Zbog izuzetne važnosti proteina FlgD u pravilnoj strukturnoj organizaciji kuke i u konačnici izgradnji funkcionalnog biča pojavila se i potreba za njegovom strukturnom karakterizacijom i boljem razumijevanju procesa u kojima sudjeluje. Eksperimentalni dio ovog diplomskog rada uključuje ekspresiju proteina FlgD iz *H. pylori* (soja 26695) u sustavu bakterije *Escherichia coli*, pročišćavanje te kristalizaciju pri raznim uvjetima radi dobivanja što kvalitetnijih i većih kristala za rentgensku difrakciju na jediničnom kristalu. Konačni cilj je sakupiti difrakcijske podatake za određivanje kristalne strukture monoklinske forme skraćene verzije proteina FlgD kako bi se isti strukturno okarakterizirao. Uz to će se ispitati i stabilnost proteina u otopini pri različitim pH vrijednostima uz dodatak aditiva.

1.1. *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori je Gram-negativna mikroaerofilna bakterija spiralnog oblika, 2,5 do 5 μm duga i 0,5 do 1,0 μm široka (slika 1).[3, 4] Ljudski je patogen prvi puta izoliran 1982. godine zahvaljujući znanstvenicima Warrenu i Marshalu.[3, 4, 5] Danas je opće prihvaćeno da je *H. pylori* jedan od uzročnika kroničnog gastritisa tipa B te da je moguć faktor koji dovodi do nastajanja želučanih čireva ili krajnje nepoželjnih malignih oboljenja gornjeg gastrointestinalnog trakta.[6] Zbog velike uloge u oboljenjima gornjeg gastrointestinalnog trakta i brze izmjene genetičkog materijala koji uzrokuje rezistenciju *H. pylori* na antibiotike, [3, 5, 7] pojavila se potreba za pronalaskom alternativnih lijekova. Istraživanja su usmjerena na proteine koji bakteriji omogućuju preživljavanje u ekstremnim uvjetima i ujedno su faktori zaduženi za virulenciju i kolonizaciju te se od njezinog otkrića do danas iscrpno istražuju.



Slika 1. *H. pylori* snimljena pod elektronskim mikroskopom[8]

1.2. Faktori kolonizacije i virulencije

Aktivnost enzima ureaze, pokretljivost pomoću bičeva, detoksifikacija i homeostaza metalnih iona su faktori koji omogućuju *H. pylori* kolonizaciju sluznice želudca čovjeka[5, 9, 10] i daljnje preživljavanje u ekstremnim uvjetima unutar želudca.

1.2.1. Ureaza

Ureaza je enzim koji katalizira cijepanje ureje na amonijak (NH_4) i ugljikov(IV) oksid (CO_2). Javlja se kao heksamer sastavljen od dvije podjedinice (stehiometrije 1:1) u čijem je aktivnom mjestu smješten ion nikla (Ni^{2+}).[3] U *H. pylori* ureaza je u velikim količinama prisutna u vanjskoj staničnoj membrani i u citoplazmi[3] gdje obavlja istu katalitičku funkciju, ali s različitom namjenom. Zahvaljujući svojoj katalitičkoj aktivnosti pri niskim koncentracijama ureje ureaza osigurava neutralni mikrookoliš oko bakterije i omogućuje život na mjestima niskog pH zbog kemijske reakcije neutralizacije želučane klorovodične kiseline.[3, 5, 9, 10] I sam produkt razgradnje ureje, amonijak, je štetan za ljudski organizam te pridonosi, uz katalitičku aktivnost enzima, upalnim procesima.[3]

1.2.2. Homeostaza metalnih iona i detoksifikacija

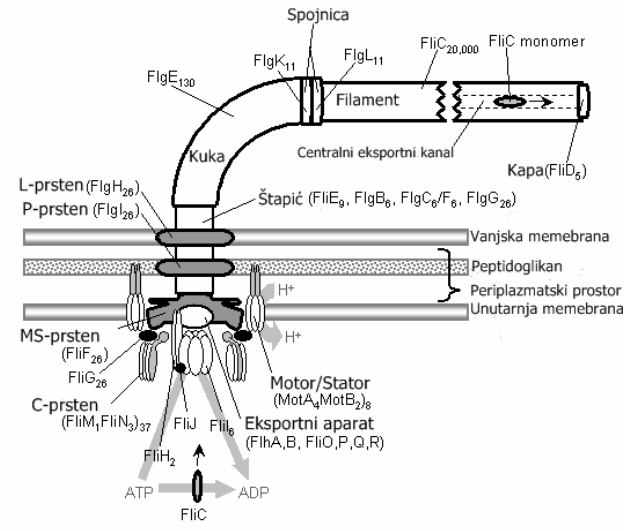
Kao i u svih mikroorganizama, tako i u *H. pylori*, potreba za mikroelementima poput prijelaznih metala (Fe^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}) i njihova stroga regulacija unosa i skladištenja osigurava joj ne samo pravilno funkcioniranje metabolizma već i omogućuje preživljavanje u ekstremnim uvjetima koji vladaju u želudcu.[10] Ni^{2+} je bitan za katalitičku aktivnost ureaze dok je u kombinaciji s Fe^{2+} bitan dio [Ni^{2+}–Fe^{2+}] hidrogenaze. Oba enzima svojom aktivnošću omogućuju kolonizaciju, a njihov nedostatak izaziva ekspresiju faktora virulencije.[10] Proteini Fur, ovisan o Fe^{2+}, i NikR, ovisan o Ni^{2+}, glavni su proteini zaduženi za homeostazu iona i kontrolu rada feredoksin oksidoreduktaze i feredoksina koji igraju ulogu u rezistenciji na antibiotike te u inicijaciji ekspresije proteina zaduženih za biogenezu biča i ostalih kolonizacijskih faktora.[10]

1.2.3. Pokretljivost

Istraživanjem nepokretnih mutanata *H. pylori* dokazano je da su nesposobni za kolonizaciju i invaziju želudca što je uvrstilo pokretljivost, uz prethodno spomenute čimbenike, među jedan od bitnih kolonizacijskih faktora i faktora virulencije.[3] Pokretljivost bakteriji *H. pylori* omogućuje kretanje iz lumena kroz viskozni mukozni sloj do epitelnih stanica želučane sluznice.[9] Dva do šest bičeva čine snop[11] i omogućuju pokretanje bakterije *H. pylori*. Bičevi su smješteni polarno, dugi su 30 nm i debeli 2,5 nm te završavaju karakterističnim zadebljanjem koje je nastavak zaštitnog omotača.[3] Zaštitni omotač je građen od lipopolisaharida u koji su umetnuti proteini koji sastavom podsjećaju na vanjsku membranu.[3, 11] Kao i u većine bakterija, bič je građen od bazalnog tijela i kuke na koju se nastavlja filament .[1, 2, 3, 9, 12, 13]

1.3. Građa biča

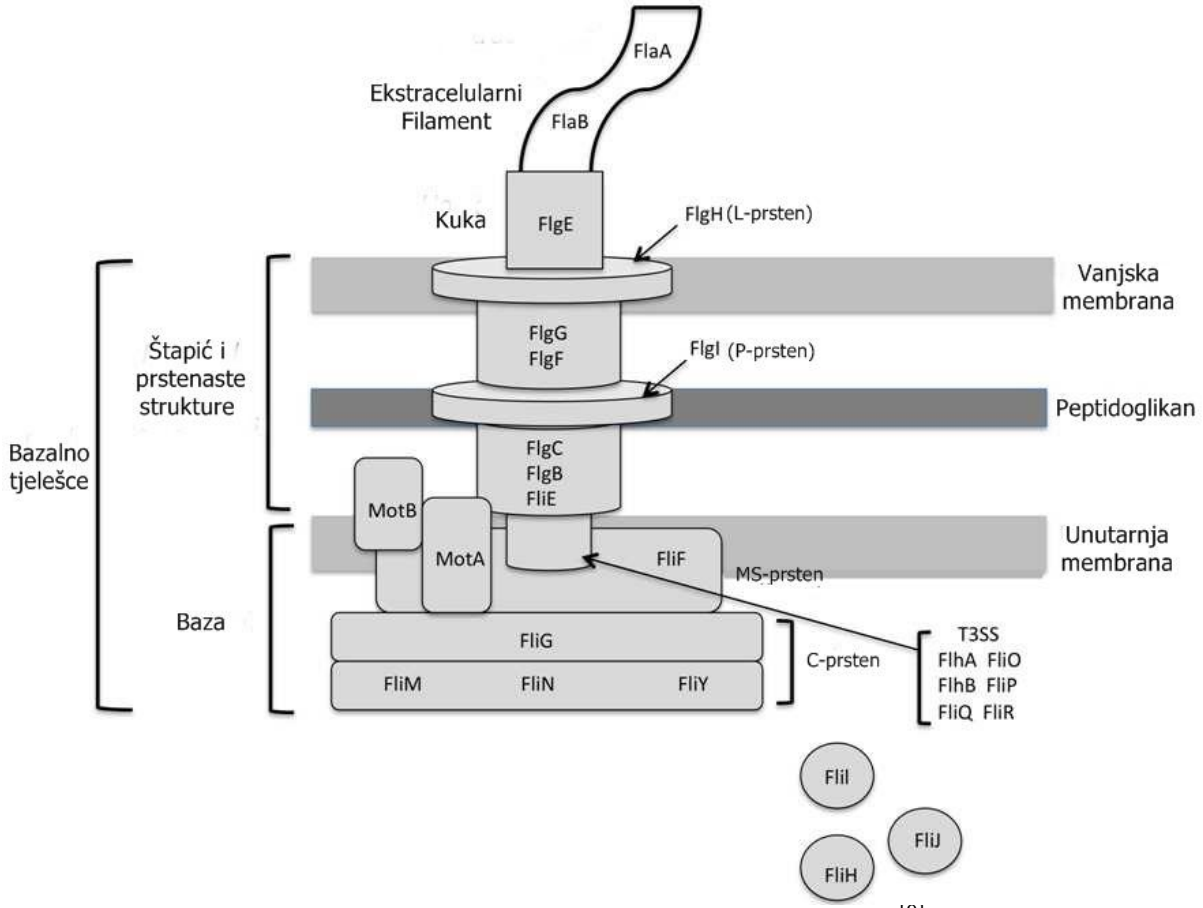
Kao što je već navedeno, bazalno tijelo, kuka i filament su osnovni dijelovi biča (slika 2).



Slika 2. Građa biča u bakteriji *Salmonella sp.* sa svim pripadajućim proteinima[14]

1.3.1 Bazalno tijelo

Struktura koja se proteže kroz citoplazmatsku membranu, periplazmu i vanjsku membranu je osnovna jedinica biča i naziva se bazalno tijelo.[9] Kroz bazalno tijelo se prenosi moment sile koji rotira bič oko svoje osi te ga pokreće.[12] Za vrijeme biogeneze biča, zahvaljujući translokacijskom aparatu sekrecijskog sustava tipa 3 (*engl*. T3SS), kroz bazalno tijelo se prenose nativni i djelomično smotani proteini koji grade i sudjeluju u izgradnji kasnijih strukturnih jedinica biča - kuke i filamenta.[7, 9] Bazalno tijelo je građeno iz dva dijela: baze te štapićastih i prstenastih struktura (slika 3). Baza je sastavljena od C i MS prstena uz koje su asocirani proteini sekrecijskog sustava tipa 3. Zatim se nastavlja štapićasta struktura bazalnog tijela (od unutrašnje membrane kroz periplazmu), te P (umetnut u peptidoglikanskom sloju) i L prsten (umetnut u vanjskoj membrani).[9]



Slika 3. Pojednostavljena građa biča u *H. pylori*[9]

1.3.2. Kuka

Kuka je cilindrična struktura koja povezuje bazalno tijelo i filament biča. Građena je isključivo od višestrukih kopija proteina FlgE[9] i služi kao univerzalni zglob.[12] U slučaju vrste roda *Salmonella*, kao i u *H. pylori*, kuka je bitna da bičevi koji tvore snop funkcioniranju kao jedinstvena cjelina prilikom pokretanja. Kuka se sastoji iz tri domene; na površini je vanjska domena, a zatim se nastavljaju srednja domena te unutarnja jezgrena domena.[12]

1.3.3 Filament

Filament je struktura koja koristi moment sile motora (statora i rotora) za helikalne pokrete[9, 12] i u konačnici uzrokuje pokretanje bakterije. U *H. pylori* je građen od više kopija dvaju monomera, flagelina FlaA i FlaB.[3, 9] Stehiometrijski omjer ova dva proteina u filamentu nikada nije 1:1[12] već se smatra da varira ovisno o okolišnim faktorima. To omogućuje izgradnju biča posebnih karakteristika što je uzrok efikasnijem i mnogo boljem pokretanju bakterije u viskoznom mediju.[9] Flagelini biča su, uz veliki broj ostalih proteina *H. pylori*, visoko glikozilirani[9], a glikozilacija pseudaminičnom kiselinom C9 šećera je esencijalan proces prilikom formiranja funkcionalnog biča.[9] Mutanti kojima nedostaje jedan od enzima u biosintetskom putu pseudaminične kiseline bakterije su nepokretni i ne posjeduju mogućnost kolonizacije.[9]

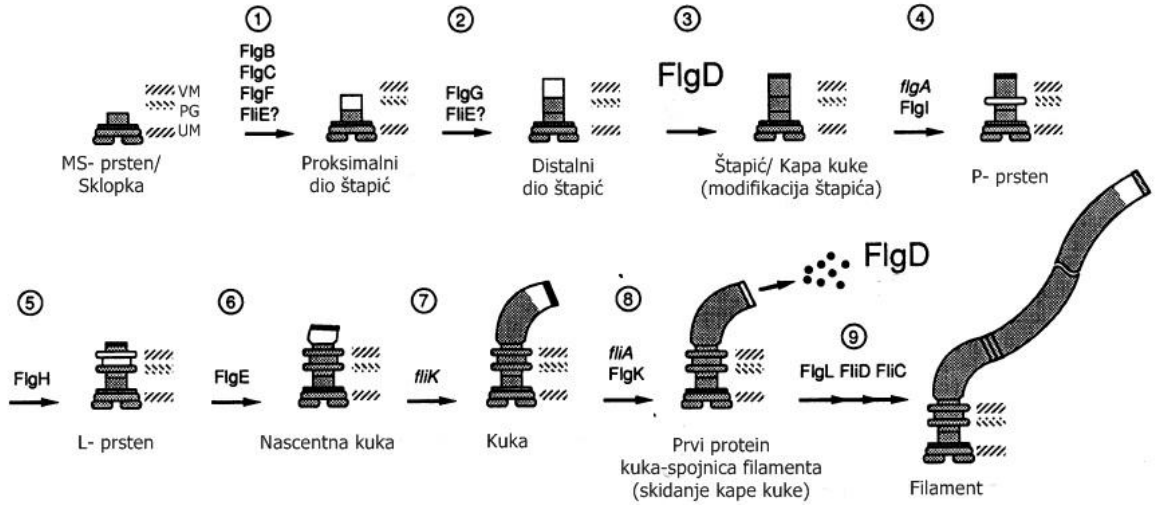
1.4. Strukturne razlike biča u bakterija *Helicobacter pylori, Escherichia coli* i *Salmonella sp.*

Kako *H. pylori, E. coli* i *Salmonella sp.* spadaju u Gram-negativne bakterije, građa biča im je vrlo slična, ali ipak postoje manje razlike u sastavu i veličini proteina koji ga izgrađuju. Morfološki gledano, *E. coli* ima peritrihan raspored bičeva, to jest bičevi su raspoređeni po cijeloj bakterijskoj stanici u svim smjerovima, dok *Salmonella sp.* i *H. pylori* imaju lopotrihan raspored bičeva, snop bičeva je smješten na jednom polu bakterijske stanice. Filamenti biča *E. coli* i *H. pylori* su građeni iz dva monomera flagelina u različitom omjeru, FlaA i FlaB, dok je filament *Salmonella* vrsta građen isključivo od monomera flagelina FliC[9] dajući homopolimernu strukturu filamenta. Unatoč činjenici da se FlaA i FlaB proteini razlikuju u aminokiselinskom slijedu i po drugačijoj funkciji od FlgE, modeli njihovih 3D struktura pokazuju da zauzimaju vrlo sličnu prostornu konformaciju.[9] Uočene su i razlike u strukturi proteina statora, MotB, između *H. pylori* i *Salmonella sp.* što upućuje na drugačiju organizaciju MotB proteina unutar membrane.[9] Proteini zaduženi za regulaciju motora biča, sklopka (*engl. switch*), u bakterija *E. coli* i *Salmonella* broje tri člana (FliG, FliM i FliN), dok je u *H. pylori* pronađen još jedan (FliY)[9] što bi moglo upućivati na kompleksniju regulaciju prilikom gibanja bakterije prema određenim kemijskim komponentama u okolišu. Velike razlike su pronađene i u primarnoj strukturi proteina FlgE koji izgrađuje kuku biča. Protein je sa svojih 718 aminokiselina gotovo duplo veći, no u ostalih bakterijskih vrsta.[9, 11] Poklapanje aminokiselinskog slijeda proteina FlgE iz *H. pylori* i proteina FlgE iz *E. coli* iznosi 36%, dok je poklapanje s proteinom FlgE iz *Salmonella* 35%.[9] Ova razlika govori o tome da bi povećan broj aminokiselina mogao omogućiti efikasnije slaganje monomera prilikom sastavljanja kuke u ekstremnim uvjetima u kojima živi *H. pylori*.[12] Također kuka je i robusnije strukture u *H. pylori* što je vrlo vjerojatno prilagodba za pokretanje u viskoznom mediju.[11]

1.5. Sastavljanje kuke

Nakon formiranja bazalnog tijela što uključuje sastavljanje P i L prstena i skidanje kape sa štapića[12] slijedi izgradnja kuke biča (slika 4). Kako bi se kuka što preciznije izgradila, osim monomera FlgE koji strukturno izgrađuje kuku biča, potrebna su još tri dodatna proteina – FliK, FlhB i FlgD.[9] FliK je protein koji je zadužen za mjerenje točne duljine kuke[9], dok je FlhB dio sekrecijskog sustava tipa 3[7, 9] i u interakciji s FliK kontrolira sekreciju FlgE koji izgrađuje kuku biča.[12] U organizmima s mutiranim proteinima FliK i FlhB dobivaju se fenotipi s višestrukim kukama koji mogu biti bez filamenta ili s filamentom.[12] FlgD je

protein koji izgrađuje kapu kuke biča te je zadužen za kontrolu ugradnje pravilnog broja FlgE monomera koji izgrađuju kuku.[9] Međutim nakon što se kuka strukturno do kraja izgradi nije više prisutan u biču.[9] U FlgD mutanata ne dolazi do izgradnje kuke[1] što govori o velikoj važnosti ovog proteina u biogenezi i sastavljanju kuke biča.

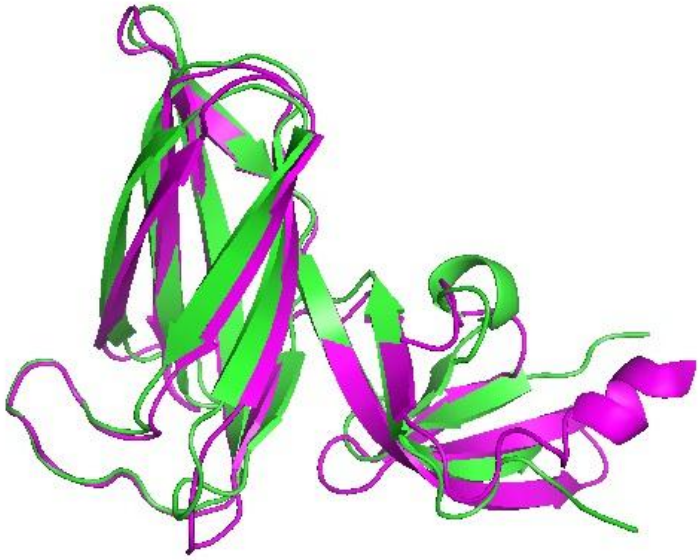


Slika 4. Shematski prikaz sastavljanja strukturnih dijelova biča u bakteriji *Salmonella*[1]

1.6. FlgD

Protein FlgD formira kapu kuke biča te uz pomoć proteina FliK kontrolira pravilnu polimerizaciju FlgE monomera, sprječava njihovu disocijaciju u okolni medij i kontrolira duljinu kuke prilikom izgradnje.[2, 13] Važno je naglasiti da FlgD nije dio novonastalog biča[1, 2, 13], već se uklanja uz pomoć FlgK prije izgradnje filamenta što je jasan dokaz da je njegova funkcija isključivo bitna prilikom sastavljanja kuke[7, 9]. Osim toga pretpostavlja se da FlgD igra ulogu kao protein koji modificira štapićastu strukturu bazalnog tijela.

U *H. pylori* soju 26695 protein FlgD broji 301 aminokiselinu[9] te strukturno još uvijek nije okarakteriziran. Do danas su riješene kristalne strukture proteina FlgD iz *Xanthomonas campestris* (*Xc*FlgD, PDB KOD 3C12,[13]) i *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*FlgD, PDB KOD 3OSV,[2]) i sličnost njihovih primarnih sekvenci iznosi 55% (75/134 aminokiselinskih ostataka unutar sekvence), a sličnost strukturnih modela iznosi rmsd = 2,441 Å za 106 C_α atoma. Strukturno oba proteina sadrže slične motive Tudor i fibronektinske domene III (FnIII) (slika 5).



Slika 5. Preklopljene kristalne strukture *Pa*FlgD[12] (ružičasto) i *Xc*FlgD[13] (zeleno)

2. TEORIJSKA OSNOVICA

Kako bi se došlo do konačnog cilja dobivanja čistog proteina koji se tada može koristiti u svrhe različitih istraživanja bitno ga je pročistiti nakon izolacije iz modelnog sustava. Svaki protein je jedinstven svojom strukturom i aktivnošću te je vrlo bitno primijeniti pravilne tehnike pročišćavanja pomoću kojih će isti ostati u nativnoj konformaciji i zadržati svoju aktivnost. Uz sve to bitno je i ne izgubiti na količini prilikom pročišćavanja kako bi dobivena količina bila dostatna za predviđene svrhe.

2.1 Transformacija i uzgoj transformiranih stanica

Danas se za dobivanje velike količine proteina uvelike koriste modelni organizmi, dok se nešto rjeđe koriste tkiva. Najčešće korišten modelni organizam, kao i u ovom diplomskom radu, jest bakterija *E. coli*. Bakterijski soj BL21 (DE3) korišten je za kemijsku transformaciju i transformaciju elektroporacijom. Transformacija stanica, bila ona kemijska ili elektroporacijska, koristi isto načelo stvaranja pora u membrani bakterijskih stanica kako bi kroz njih u stanicu ušao vektor s ugrađenim genom od interesa, u ovom slučaju *flgD* gen iz *H. pylori* soja 26695. Nakon kratkotrajnog šoka, protoka električnog impulsa ili toplinskog šoka, bakterije se stavljaju u tekući hranjivi medij u inkubator na odgovarajućoj temperaturi uz potresanje. Sljedeći korak je izlijevanje bakterijske suspenzije na ploču s krutim medijem u koji je prethodno dodan antibiotik. Preko noći na ploči se umnože samo transformirane stanice to jest kolonije na ploči su nastale od stanica koje su uspješno primile plazmid s genom od interesa i mogu se koristiti dalje za prekomjernu ekspresiju proteina.

2.2 Razbijanje bakterijskih stanica (homogenizacija)

Kako bi se izolirao prekomjerno eksprimiran protein, stanice se iz velikog uzgoja obaraju centrifugiranjem. Postoje različiti načini kako razbiti stanice i doći do proteina koji je sadržan u citoplazmi. Kemijski se stanica razbija primjerice korištenjem deterdženata, a fizikalno može biti mehaničko pomoću staklenih kuglica ili noževa, propuštanjem suspenzije stanica kroz uski prolaz, usitnjavanjem u tarioniku materijala tretiranog tekućim dušikom te korištenjem ultrazvuka (sonikacija). Bakterijske stanice učinkovito se razbijaju sonikatorom koji koristi zvučne valove visoke frekvencije za razbijanje stanične stijenke i citoplazmatske membrane. Prije sonikacije stanice se resuspendiraju u željenom puferu uz moguć dodatak lizozima i inhibitora proteaza. Soniciranje se odvija na ledu u intervalima: nakon minute sonikacije slijedi prekid rada jednakog trajanja da se sadržaj koji se obrađuje ne bi pretjerano zagrijao i oštetio proteine. Dobivena mutna suspenzija razbijenih stanica se centrifugira kako bi se topljiva proteinska frakcija odvojila od staničnog lizata u talogu.

2.3 Tehnike pročišćavanja proteina

Na temelju karakterističnih svojstava svakog proteina iz supernatanta se mogu različitim načinima odvojiti topljivi proteini. Najčešće korištena svojstva proteina za razdvajanje jesu njihova veličina, naboj, oblik, topljivost pri različitim pH vrijednostima, temperaturi, sastavu otopine i drugim faktorima. Kromatografske metode na koloni su najzastupljenije u pročišćavanju proteina. Kolona je punjena stacionarnom fazom, najčešće poroznim materijalom posebnih karakteristika, dok se kroz kolonu propušta mobilna faza. Kolona se

prije nanošenja proteinskog ekstrakta uravnoteži određenim puferom. Vezanje proteina na kolonu je nekovalentne prirode te ovisi o odabranom svojstvu proteina na temelju kojeg se razdvaja iz smjese (naboj, veličina, topljivost, afinitet spram stacionarne faze, itd.). Za potrebe ovog diplomskog rada korištene su afinitetna kromatografija i gel filtracija. Kontrola uzgoja i ishod svake kromatografije praćen je elektroforezom proteina u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (*engl.* SDS-PAGE). Nakon dobivanja čistog proteina i prije kristalizacije protein je ugušćen ultrafiltracijom, a koncentracija mu je određena spektrofotometrijski.

2.4.Kromatografske metode

Nakon što je dobiven proteinski ekstrakt koji sadrži protein, kreće se u njegovu izolaciju i pročišćavanje od ostatka proteina u smjesi. Gen *flgD* ugrađen je u vektor pETite (*Lucigen*) tako da nakon ekspresije nastaje fuzijski protein koji na C–kraju sadrži heksahistidinski privjesak (His_6) koji mu omogućuje pročišćavanje metodom afinitetne kromatografije.

2.4.1. Afinitetna kromatografija

Pomoću ove metode odvajaju se proteini koji imaju visok afinitet vezanja za stacionarnu fazu, a najčešće su to proteini obilježeni raznim privjescima (*engl. –tag*) (His–privjesak, GST–privjesak, MBP–privjesak, V5–privjesak, itd). Za odvajanje proteina koji su obilježeni histidinskim privjeskom, kao i u slučaju FlgD, koristi se Ni–NTA (Nikal–nitrilotriacetatna kiselina) agaroza. U strukturi smole Ni–NTA, dva od četiri koordinacijska mjesta iona nikla zauzimaju atomi dušika trinitriloacetatne kiseline. Preostala dva koordinacijska zauzimaju molekule vode. Budući da su histidinski privjesci bogati atomima dušika, oni lako ostvaruju koordinacijske veze s niklovim ionima. Zahvaljujući tome proteini s histidinskim privjeskom se nekovalentnim interakcijama vežu na smolu dok ostali proteini slabijeg afiniteta prema smoli prolaze kroz nju prilikom ispiranja. Smola se prije korištenja ispire vodom i uravnoteži puferom nakon čega se kroz nju propušta proteinski ekstrakt. Ispiranje se vrši puferom koji sadrži nisku koncentraciju imidazola kako bi se sa smole isprali proteini koji su nespecifično vezani na nju. Povećanjem koncentracije imidazola u puferu omogućuje se efikasno skidanje vezanog proteina sa smole. Interakcije između smole i proteinskog privjeska slabe zbog sve većeg broja molekula imidazola koje konkuriraju za koordinacijska mjesta iona nikla u smoli. To dovodi do ispiranja proteina sa smole.

2.4.2. Gel-filtracijska kromatografija

Gel-filtracijska kromatografija odvaja čestice unutar smjese samo na temelju njihove veličine. Ovim postupkom je uvelike smanjeno oštećenje proteina jer ne dolazi do stvaranja interakcija između stacionarne faze i proteina. Osim pročišćavanja proteina, može se vršiti izmjena pufera u kojem se nalazi protein. Stacionarnu fazu najčešće čine porozne granule različitih dimenzija. Granice veličina proteina koji se odvajaju na koloni određene su dimenzijama poroznih granula te se krupnije granule koriste za razdvajanje proteina visokih molekulskih masa i preparativne svrhe, dok su sitnije rezervirane za proteine nižih molekulskih masa i analitičke svrhe. Prolaskom proteinskog uzorka kroz kolonu proteini veće molekulske mase, brže se kreću između pora stacionarne faze te prije napuštaju kolonu, a proteini niže molekulske mase sporije putuju kroz stacionarnu fazu kolone te kasnije izlaze iz kolone. Razdvajanjem se dobivaju proteini od najvećih do najmanjih molekulskih masa. Vrijeme zadržavanja proteina na koloni, retencijsko vrijeme, služi za određivanje relativne molekulske mase proteina. Kako bi se odredila relativna molekulska masa proteina kroz kolonu se puštaju

proteini poznatih molekulskuh masa te se na temelju njihovog zadržavanja na koloni i izlasku s nje dobiva krivulja pomoću koje se određuje relativna molekulska masa istraživanog proteina. Prolazak uzorka kroz kolonu praćen je promjenom apsorbancije pri 280 nm, a protein se sakupljao u tubice na automatskom sakupljaču uzoraka.

2.4.3. Sustav za pročišćavanje proteina ÄKTA

ÄKTA je sustav za brzu kromatografiju proteina u tekućem mediju ili FPLC (*engl. Fast Protein Liquid Chromatography*). U ovom sustavu se mobilna faza protiskuje kroz kolonu pod zadanim tlakom i temperaturom. Stacionarna faza u *Superdex 200 10/300* koloni su nestlačive kuglice (staklene ili plastične) obložene visoko umreženom agarozom na koju je kovalentno vezan dekstran. Uređaj je povezan sa sučeljem na računalu u kojemu se zadaju uvjeti kromatografije i pomoću kojeg se prati tijek iste. Ovo omogućuje vrlo efikasno i brzo odvajanje proteina.

2.5. Ugušćivanje proteina

Nakon što je gel-filtracijom dobiven vrlo čisti uzorak proteina, za potrebe kristalizacije isti treba ugustiti do odgovarajuće koncentracije. Sustav za ultrafiltraciju sadrži hidrofilnu celuloznu membranu određene veličine pora koja propušta molekule manjih relativnih molekulskih masa od one definirane veličinom pora.

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

Nakon svakog postupka izolacije proteina dobro je načiniti diskontinuiranu SDS-PAGE elektroforezu kako bi se pratila čistoća i veličina proteina u dobivenom uzorku. Elektroforeza se temelji na kretanju nabijenih čestica u električnom polju. Ona se za proteine izvodi u poliakrilamidnom gelu koji poput sita odjeljuje proteine isključivo po njihovoj masi. Varirajući postotak akrilamida/bisakrilamida (aa/bis) u gelu postiže se različit stupanj umreženja molekula i omogućuje se razdvajanje molekula viših i nižih molekulskih masa. Kako bi se postigla uniformnost molekula u uzorku, uzorak se tretira natrijevim dodecilsulfatom (*engl. Sodium dodecyl sulphate*, SDS). SDS je deterdžent koji denaturira proteine. Broj molekula SDS-a vezanog na protein po njegovoj jedinici mase je konstantan, 1,4 g SDS na 1 g proteina, dok naboj dolazi isključivo od SDS-a. Ova dva svojstva SDS-a omogućuju proteinima da imaju isti omjer naboja i mase te zauzimaju linearnu konformaciju što ih isključivo razdvaja na temelju njihove mase tijekom elektroforeze. Diskontinuirani sustavu elektroforeze govori o tome da se za pripravu gelova i tijekom elektroforeze koriste puferi različitih pH vrijednosti. U sustavu gel za sabijanje je pH vrijednosti 6,8, gel za razdvajanje pH vrijednosti 8,8, a elektrodni pufer ima vrijednost od pH 8,6. Vrijednost pH u puferima za gelove dolazi od Tris–HCl-a. Gel za sabijanje je nižeg postotka aa/bis, a gel za razdvajanje višeg postotka aa/bis. Aminokiselina glicin glavni je sastojak elektroforetskog pufera, te činjenica da pri različitim pH vrijednostima glicin ima drugačiji ukupni naboj, promjena vrijednosti pH unutar gelova omogućuje sabijanje proteinskog uzorka. Kada se sustav upogoni negativno nabijene molekule glicina iz elektroforetskog pufera ulaze u gel za sabijanje gdje prelaze u *zwitterion* oblik, ukupan naboj im postaje nula. Zbog gubitka naboja molekule glicina se počinju kretati vrlo sporo, dok u drugu ruku disocirani ioni Cl^-, iz Tris–HCl pufera, se kreću velikom brzinom u električnom polju tvoreći liniju koja se kreće

ispred molekula glicina. Ioni Cl^- tvore vrlo usku liniju sa uskim voltažnim gradijentom koja povlači za sobom neutralne molekule glicina što u konačnici čini dvije uske linije migrirajućih iona. Kako su proteini unutar gela svojim nabojem između dva ekstrema, brzo migrirajućih Cl^- iona i sporih neutralnih molekula glicina, oni se koncentriraju u uskoj liniji između njih. Ovaj proces se događa sve dok linija ne dođe do gela za razdvajanje. Kako je vrijednost pH 8,8 u gelu za razdvajanje, molekule glicina prelaze u negativno nabijeni oblik te prolaze proteinski uzorak puno brže, ostavljajući proteine u uskoj liniji između dva gela. Zahvaljujući većem postotku aa/bis gela za razdvajanje, proteini se počinju razdvajati isključivo na osnovi svoje molekulske mase. Za potrebe detekcije proteina FlgD korišteni su gelovi različitog postotka aa/bis. Gelovi većeg postotka (20% aa/bis) se koriste za određivanje relativne molekulske mase proteina FlgD, a oni nižeg postotka (16% aa/bis) za kontrolu čistoće i količinu proteina u frakcijama nakon svake kromatografske metode.

2.7. Metoda 'Western blotting'

'Western blotting' (WB) je tehnika pomoću koje se detektiraju proteini. Proteini se prvo razdvajaju na gelu, SDS-PAGE elektroforezom nakon čega se prenose na membranu visokih retencijskih svojstava i afiniteta prema proteinima. Elektroforetski prijenos proteina može biti mokri ili polusuhi. Polusuhi prijenos odvija se u posebnim uređajima za polusuhi prijenos dok se mokri provodi u elektroforetskim kadicama. Princip prijenosa je isti kao u SDS PAGE, negativno nabijeni proteini putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi. Proteini se zaustavljaju na membrani koja ima visok afinitet prema proteinima i visoka retencijska svojstva. Uz nitrocelulozu membranu može se koristiti i PVDF (polivinil difluorid) membrana. Uspješnost prijenosa provjerava se reverzibilnom bojom za detekciju proteina. Kako bi se smanjilo nespecifično vezanje protutijela i pozadinsko bojanje membrane, ona se blokira pomoću BSA (*engl. Bovine serum albumin*) ili obranog mlijeka u prahu u TBST puferu. Membrana se tretira primarnim protutijelima, a potom sekundarnim protutijelima. Primarna protutijela prepoznaju specifičan topos proteina (privjeske, fosfatne skupine, dijelove domena itd.), dok sekundarna protutijela prepoznaju primarna. Sekundarna na sebi imaju vezan protein, najčešće peroksidazu iz hrena (HRP, *engl. horseradish peroxidase*), koji zahvaljujući svojoj aktivnosti daju produkt koji je moguće detektirati u tamnoj komori na filmu. Na filmu se vidi položaj proteina od interesa. Ovo je semikvantitativna metoda za detekciju proteina.

2.8. Ograničena proteoliza tripsinom

Tretiranje proteina proteazama koristi se kako bi se unutar uređene strukture proteina uklonile fleksibilne omče koje mogu otežavati kristalizaciju proteina. Prilikom slaganja molekula proteina u pravilnu kristalnu strukturu, omče mogu ometati nastanak uređene strukture zbog velikog stupnja slobode, dok se u njihovom odsustvu protein može efikasnije i brže posložiti u uređenu strukturu. Protein i proteaza se miješaju u omjeru u kojem koncentracija proteaze nije dostatna da u potpunosti degradira protein, već samo može zahvatiti fleksibilne dijelove proteina koji nisu unutar domena, ostavljajući gusto pakirane dijelove intaktnim. Problem može nastati ako su unutar fleksibilnih omči aminokiseline koje igraju bitnu ulogu tijekom katalize, kao što je KMSK fleksibilna omča kod TyrRS, ili sudjeluju u interakcijama s ostalim proteinima. Ograničena proteoliza tripsinom se između ostalog koristi u kulturi animalnih stanica i tkiva kod presađivanja i razrjeđivanja kulture. Tripsin degradira proteine pomoću kojih su stanice adherirane za podlogu te ih oslobađa u medij.

2.9. Kristalizacija makromolekula

Za određivanje kristalne strukture proteina prvotno je potrebno prirediti jedinične kristale željenog proteina. Kristalizacija proteina iziskuje korištenje proteina zadovoljavajuće čistoće u koncentraciji 3–50 mg ml^{-1}.[15]
Nakon što se uspješno dobije kristal proteina njegova se struktura određuje korištenjem rentgenske difrakcije na jediničnom kristalu. Kako bi kristal proteina što bolje difraktirao potrebno je da bude dovoljno velik (0,05 mm ili veći) iako se danas korištenjem sinkrotronskog zračenja mogu snimati i manji kristali.[16] Dobivanje strukture proteina pomoću ove metode može pomoći i u istraživanjima funkcije istraživanog proteina.

2.9.1. Osnove kristalizacije proteina

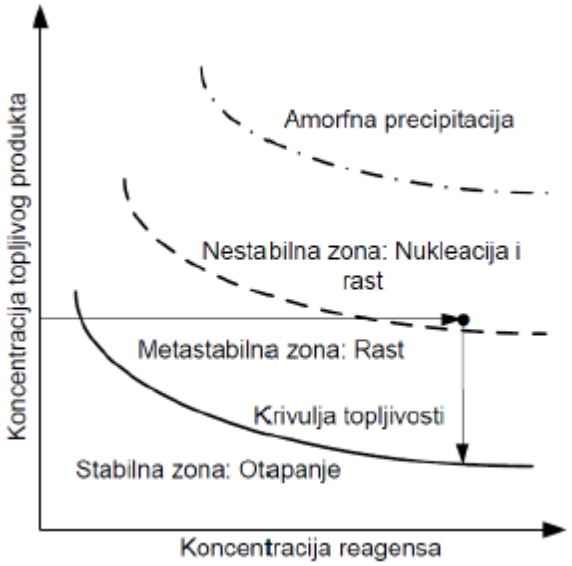
Čistoća uzorka je važan čimbenik uspješne kristalizacije proteina. Kada su zadovoljeni aspekti biokemijske i strukturne čistoće[17], to jest kada molekule s jedinstvenom molekulskom formulom i konformacijom prevladavaju u otopini protein je spreman za korištenje u kristalizacijskom eksperimentu. Prisutnost nečistoća uvelike narušava mogućnost kristalizacije i nastajanje jediničnog kristala proteina. Isto tako ako uzorak nije homogen rast kristala, odnosno periodično stvaranje veza između molekula je narušeno. Jedinstveni elementi kristala, simetričnost i periodična tanslokacija osnovne jedinice kristala za stvaranje iziskuju uniformnost svih molekula proteina. Ako proteinske molekule koje sadrže oštećenje ili nepravilnosti u strukturi postanu dio kristalne rešetke one imaju negativan utjecaj na rast kristala, od stvaranja defekata do ranog prestanaka rasta kristala.
Najčešće korištene metode kristalizacije su difuzija para sjedeće ili viseće kapi, dijaliza, metoda 'Batch', slobodna međupovršinska difuzija, mikrodijaliza, isparavanje i dr. Cilj svake metode je dovesti molekule proteina do kritične točke u kojoj mu je topljivost toliko smanjena, otopina je prezasićena proteinom, da dolazi do njegovog izdvajanja iz otopine u obliku kristala. Za postizanje ovih uvjeta čisti proteinski uzorak se miješa s kristalizacijskom otopinom, matičnicom. Različite komponente kristalizacijske otopine smanjuju dielektričnu konstantu otapala te time optimiziraju površinski naboj proteina i omogućuju stvaranje što većeg broja elektrostatskih veza sa partnerima.[15,18] Komponente kristalizacijske otopine su slabi puferi, precipitanti i razni aditivi koji dovode do stvaranja kristala. Precipitant je glavni sastojak matičnice koji smanjuje topljivost proteina čime se postiže prezasićenost otopine proteinom.[16,17] Precipitante dijelimo na soli, organska otapala i polimere (tablica 1). Razni deterdženti, dvovalentni metalni ioni i organska otapala spadaju u aditive. Oni svojim djelovanjem stabiliziraju protein, omogućuju međumolekulske interakcije i smanjuju dielektričnu konstantu otapala.[17] Moduliranjem ovih faktora uvelike se pospješuje kristalizacija.

Tablica 1. Precipitanti koji se mogu koristiti u kristalizaciji proteina[15,16]

Soli	Organska otapala		Polimeri
	Hlapljiva	**Nehlapljiva**	
Amonijev sulfat Natrijev sulfat Natrijev klorid Natrijev citrat Amonijev citrat Litijev klorid Litijev sulfat Magnezijev suffat Kalcijev klorid Amonijev nitrat Natrijev acetat	Etanol Izopropanol Aceton Dioksan Dimetil sulfoksid (DMSO) Acetonitril Butanol Metanol 1,3–Butriolakton Etilen glikol 400	2–metilpenta–2,4–diol (MPD) Heksan–2,5–diol Etilen glikol 400	Poli(etilen glikol) (PEG) M_r = 1 000 – 20 000 Jeffamin T, M Poliamin

2.9.2. Rast kristala

Proces izdvajanja kristala iz otopine nazivamo kristalizacija.[16] Sam proces kristalizacije se odvija u tri faze: nukleacija, rast kristala i završetak rasta kristala. Dovođenjem otopine u stanje prezasićenosti ispunjava se osnovni uvjet za početak nukleacije. Primarni nukleusi se stvaraju u nestabilnoj zoni prezasićene otopine. Visoka koncentracija proteina može dovesti do stvaranja amorfnog precipitata i gubitka proteina. Kako se koncentracija otapala smanjuje, a koncentracija precipitanta raste primarni nukleus raste te se uslijed smanjenja koncentracije otopljenog proteina nukleus pomiče iz nestabilne zone u metastabilnu zonu gdje se odvija rast kristala (slika 6.).



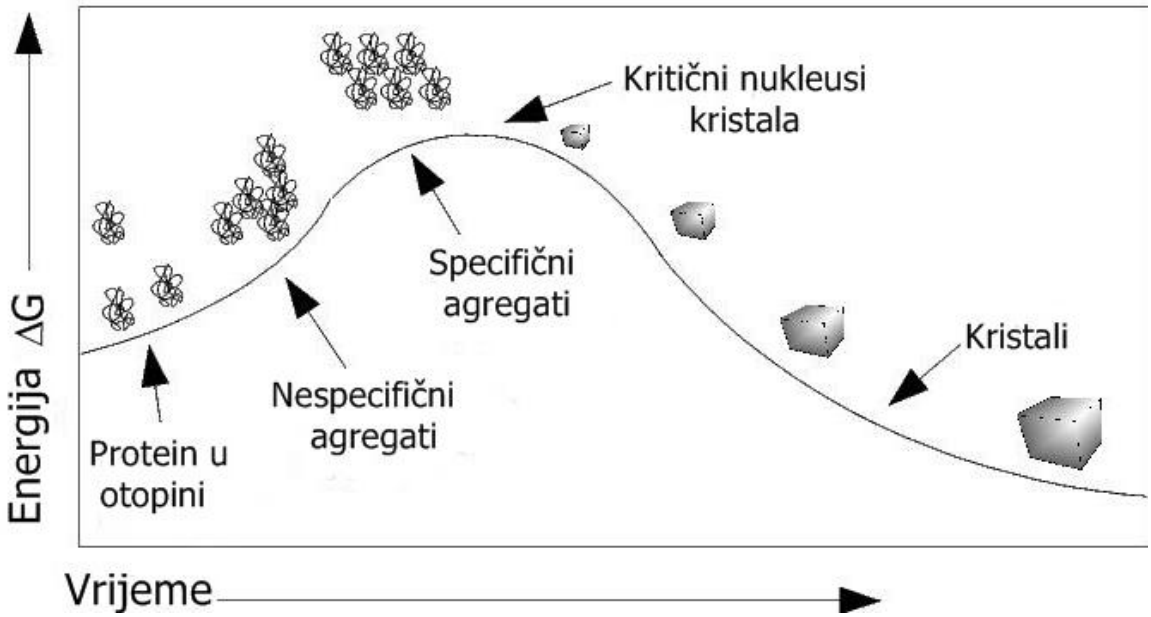
Slika 6. Fazni dijagram topljivosti[16]

Ishod nukleacije nije nužno i nastanak kristala. Nespecifični agregat mora se reorganizirati u specifični agregat kritične mase (do 100 molekula) kako bi nukleacija mogla započeti jer u protivnom nastali agregat disocira. Ukoliko su uvjeti povoljni za nukleaciju ona može dovesti

do stvaranja velikog broja nukleusa i u konačnici do mnoštva malih kristala. Proces rasta kristala mora biti što sporiji i što homogeniji kako se ne bi dobio mikrokristalični precipitat ili amorfni agregat. Uslijed homogenog rasta kristala molekule se polagano i pravilno orijentiraju stvarajući pravilnu i simetričnu mrežu tzv. kristalnu strukturu. Kako bi se uvjeti za smanjenje topljivosti proteina mogli kontrolirali potrebno je modificirati razne fizikalne i kemijske parametre matičnice.

Precipitanti poput polietilenglikola (PEG-a) i raznih soli imaju visok afinitet prema vodi i mogu ju imobilizirati smanjujući tako topljivost proteina. U slučaju PEG-a, molekule su robusne i ne mogu se približiti molekularnoj površini proteina više od vlastitog radijusa, tako se oko molekula proteina stvara sloj koji je nedostupan molekulama PEG-a. Ako molekule proteina počnu agregirati nedostupni slojevi molekula proteina se preklapaju te smanjuju površinu koja je nedostupna molekulama PEG-a. Više mjesta za molekule PEG-a povećava njihovu entropiju dok slobodna energija sustava pada (Slika 7.).[18]

Budući da se proteine može promatrati poput polivalentnih iona Debye-Huckelova teorija može se koristiti za opisivanje njihove topljivosti. Dva procesa su bitna za topljivost proteina, isoljavanje i usoljavanje (*engl. salting out* i *salting in*). U procesu smanjivanja ionske jakosti otopine, isoljavanjem, gubitak nabijenih iona koji su u interakciji s proteinom dovodi do otkrivanja nabijenih grupa na površini proteina te počinje stvaranje protein-protein interakcija što dovodi do eksponencijalnog pada topljivosti i stvaranja proteinskog precipitata. Uslijed usoljavanja, povećanjem ionske jakosti otopine, povećava se i topljivost proteina, stoga regulacijom elektrostatskih sila možemo pospješiti kristalizaciju. Optimizacijom pH otopine, dodavanjem organskih otapala i odgovarajućih soli mijenja se omjer elektrostatskih sila, odbojnih i privlačnih, koje utječu na kristalizaciju proteina.



Slika 7. Ovisnost promjene Gibssove energije o vremenu kristalizacije

2.9.3. Faktori koji utječu na rast kristala

U tablici 2 navedeni su neki od fizikalnih, kemijskih i biokemijskih faktora koji utječu na proces kristalizacije.

Tablica 2. Faktori koji utječu na kristalizaciju[15]

Fizikalni	Kemijski	Biokemijski
Temperatura i temperaturne varijacije	pH	Čistoća makromolekule
Površina	Svojstva precipitanta	Ligandi, supstrati, inhibitori
Gravitacija	Koncentracija precipitanta	Posttranslacijska modifikacija
Tlak	Ionska jakost	Izvor makromolekule
Zvuk i vibracija	Stupanj prezasićenosti	Proteoliza/hidroliza
Vrijeme	Reduktivna/oksidativna svojstva okoliša	Kemijska modifikacija
Električno i magnetno polje	Koncentracija makromolekula	Genetička modifikacija
Dielektrična svojstva matičnice	Metalni i specifični ioni	Stabilnost makromolekule
Viskoznost matičnice	Deterdženti	Izoelektrična točka
Homogena i heterogena nukleacija		Starost uzorka

a) Temperatura

Kako bi se razlučio utjecaj temperature na kristalizaciju preporučljivo je, uz dovoljnu količinu proteina, postaviti dvije paralelne kristalizacije na različitim temperaturama (najčešće na 4 °C i 20 °C). Ovisno o precipitantu i ionskoj jakosti kristalizacijske otopine određena temperatura može imati pozitivan ili negativan učinak na topljivost i kristalizaciju proteina. Topljivost proteina kao funkcija temperature je izraženija pri niskim ionskim jakostima nego pri visokim. To govori u prilog da niže temperature pospješuju kristalizaciju u prisutnosti organskih polimera (npr. PEG-a) dok u prisutnost soli kao precipitanta to nije slučaj.[15] Kako je stupanj difuzije pri niskim temperaturama niži kristalizacija traje duže, što je ujedno i pozitivan i negativan aspekt kristalizacije. Pri visokim ionskim jakostima kristalizacijskog uvjeta porastom temperature opada topljivost što je negativni temperaturni čimbenik topljivost, a pri niskim ionskim jakostima porastom temperature raste i topljivost proteina što je pozitivan temperaturni čimbenik topljivosti.[17]

b) pH

Jedan od najvažnijih faktora koji utječu na kristalizaciju jest pH kristalizacijske otopine jer igra ulogu u naboju proteina koji je u direktnoj vezi s njegovim fizikalnim i kemijskim svojstvima. Naboj aminokiselina, njihov ionizacijski status i distribucija naboja uvelike pridonosi konformaciji molekule, dipolnom momentu molekule i agregacijskom stanju.[15] Topljivost proteina je najniža pri vrijednostima pH u blizini vrijednosti njegove izoelektične točke (pI) jer je ukupan naboj jedinke približno jednak nuli. Vrlo uski raspon pH može imati utjecaj između stvaranja amorfnog precipitata, mikrokristaličnih precipitata i jediničnog

kristala.[15] Kristalizacija u širokom rasponu pH je jedan od ključnih koraka u pronalasku optimalnih uvjeta za stvaranja velikih i kvalitetnih kristala koji se mogu koristiti za rentgensku difrakciju.

c) Vrijeme

Kao i u svakom istraživanju vrijeme je bitna stavka i prilikom kristalizacije. Postizanje ravnoteže unutar matičnice između nukleacije i rasta kristala ovisno je o vremenu. Vrijeme potrebno za oba procesa ovisi o temperaturi. Niže temperature usporavaju procese, dok je pri višim proces ubrzan. Kristal će sporije rasti pri nižim temperaturama što u konačnici može rezultirati većim i kvalitetnijim kristalima. No ovisno o prirodi kristala i matičnici u kojoj se nalazi, čekanje na pogodan kristal može trajati od nekoliko sati pa do nekoliko mjeseci.

d) Koncentracija proteina

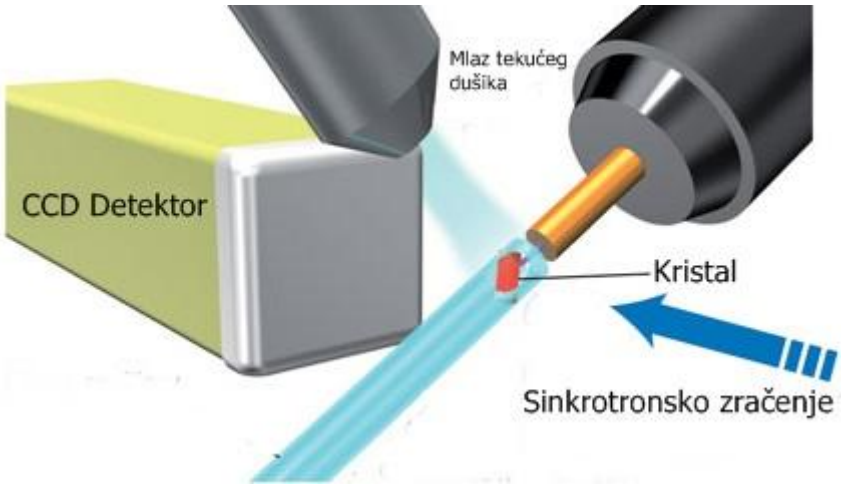
Dostatna koncentracija proteina rezultira i dovoljno brzom postizanju uvjeta pri kojim se protein izdvaja iz matičnice u obliku kristala. Proces nukleacije i rasta kristala ovisi o početnoj koncentraciji proteina koja se iz nestabilne zone, nakon stvaranja nukleusa, smanjuje i spušta u metastabilnu zonu gdje se odvija rast kristala (Slika 7). U slučaju previsoke koncentracije protein precipitira ili nastaje mnoštvo sitnih kristala. Smanjenjem koncentracije proteina usporava se i optimizira rast kristala, no preniska koncentracija može rezultirati čistom i bistrom matičnicom bez kristala.

2.10. Određivanje kristalne strukture proteina

Nakon što se dobije kristal odgovarajuće veličine i kvalitete kristal se testira metodom rentgenske strukturne analize na jediničnom kristalu. Za eksperiment je potrebno imati dobar izvor rentgenskog zračenja. Izvori rentgenskog zračenja su rentgenska cijev, rentgenska cijev s rotirajućom anodom i sinkrotronsko zračenje. Prednosti sinkrotronskog zračenja nad rentgenskim zračenjen proizvedenim rentgenskom cijevi su u intenzitetu zračenja, podesivosti, polarizaciji, vijeku trajanja i vremenskoj strukturi.[18] Intenzitet sinkrotronskog zračenja je za dva reda veličine jači nego intenzitet klasičnog rentgenskog zračenja rentgenske cijevi. Također sinkrotronske zrake rezultiraju oštrijim difrakcijskim maksimumima. Sinkrotronsko zračenje je podesivo te se pomoću monokromatora može podesiti na bilo koju valnu duljinu potrebnu za izvođenje eksperimenta. Najčešće se za potrebe rentgenske strukturne analize sinkrotronsko zračenje podešava na valnu duljinu od 1 Å, a može i na kraće ili veće valne duljine (maksimum bakrene anode jest 1,5 Å). Vrijeme prikupljanja podataka koristeći sinkrotronsko zračenje je smanjeno na vrlo kratko vrijeme.

2.10.1. Rentgenska strukturna analiza na jediničnom kristalu

Eksperiment rentgenske strukturne analize na jediničnom kristalu se izvodi u krio uvjetima te je kristal potebno, prije izlaganja sinkrotronskom zračenju, 'upecati' omčicom te zamrznuti u tekućem dušiku. Prije zamrzavanja u matičnicu se ukoliko postoji potreba dodaje krioprotektant kako se kod zamrzavanja proteinski kristal ne bi raspao zbog velikog postotka vode unutar svoje strukture. Kristal se zatim postavlja na goniometar pomoću kojega se kristal pozicionira prema izvoru zračenja i okreće tijekom difrakcijskog eksperimenta. Nakon izlaganja kristala zračenju određuje se strategija snimanja kako bi se sakupilo što više podatka, te se kristal izlaže zračenju dok se ne sakupi što više podataka za obradu.



Slika 8. Difrakcijski eksperiment[19]

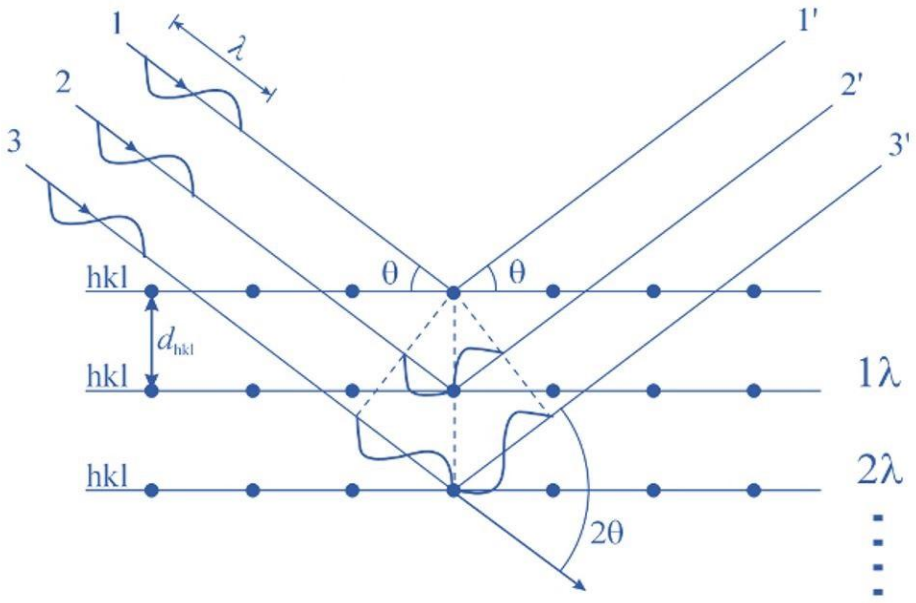
2.10.2. Difrakcija rentgenskog zračenja na jediničnom kristalu

Difrakcija s jedne molekule proteina je kontinuirana funkcija čija difrakcijska slika postaje jasnija povećanjem broja molekula s kojih se difraktira rentgensko zračenje, dakle kristal je idealno sredstvo koje daje oštru i jasnu difrakcijsku sliku. Detektiraju se samo valovi koji se raspršuju u fazi (konstruktivno interferiraju). Podatci o difrakcijskim maksimumima (refleksima) se dobivaju ako kristal dobro difraktira. Difrakcija se događa ako je zadovoljen Braggov zakon (slika 9) koji glasi:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin\theta$$

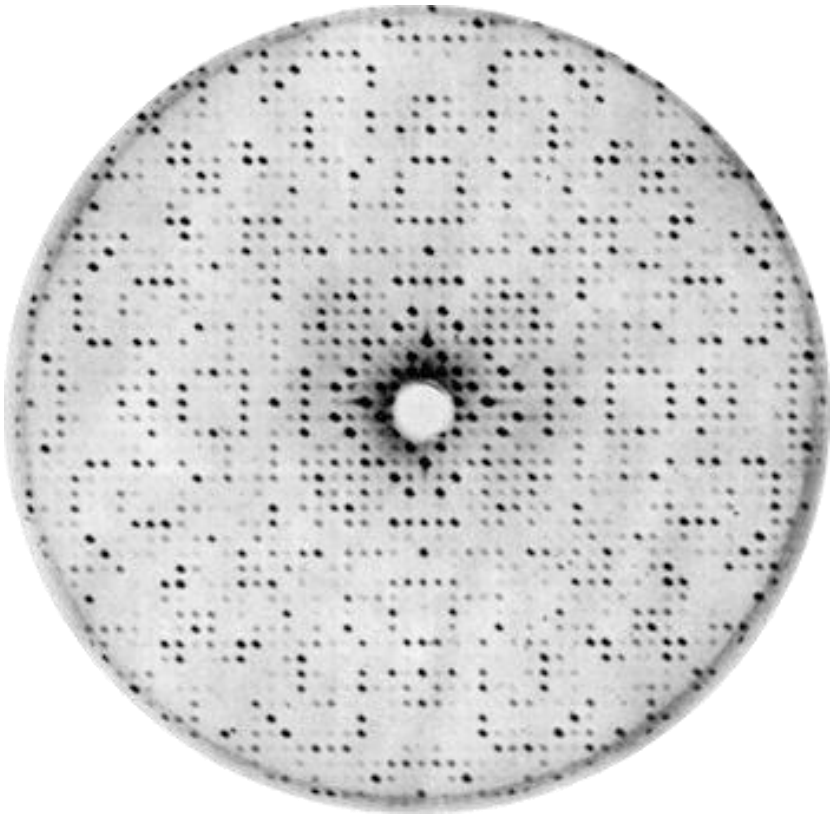
gdje je λ valna duljina ulaznog vala, d_{hkl} je razmak između ravnina *hkl* (*Millerove* ravine[1]), θ je iznos ulaznog i izlaznog kuta zrake.[16,18] Konstruktivna interferencija se događa ako i samo ako je n cijeli broj. Difrakcijski maksimumi su rezultat konstruktivne interferencije svih valova raspršenih na svim atomima u kristalu. Kristali nisu građeni od ravnina, već od atoma, a Braggov zakon olakšava shvaćanje difrakcije.[18]

[1] Miller je definirao sustav označavanja ravnina koje su povezane s geometrijom jedinične ćelije. Millerove ravnine nisu stvarni fizički objekti, već konstrukt zamišljen u odnosu na kristalnu rešetku. One dijele a, b i c osi jedinične ćelije kristala na jednake dijelove za iznos cijelog broja (h,k i l). Braggov zakon i Millerove ravine su samo pomoć kako bi se lakše vizualizirala difrakcija na jediničnom kristalu.



Slika 9. Prikaz Braggova zakon[20]

Difrakcijska slika se dobiva koherentnim raspršenjem kratkih valnih duljina na kristalu. Sliku čini mnoštvo difrakcijskih maksimuma (slika 10), a svaki predstavlja sumu reflektiranih valova koji su definirai amplitudom i relativnom fazom. Detektor bilježi samo intenzitet koji je proporcionalan kvadratu amplitude reflektiranog vala dok se informacija o fazi reflektiranog vala gubi tijekom difrakcijskog eksperimenta.



Slika 10. Difrakcijska slika kristala lizozima dobivena metodom precizne fotografije[21]

2.10.3. Rješavanje problema faze

Podatci dobiveni rentgenskom difrakcijom se koriste za dobivanje strukturnog modela proteina. Odnos između difrakcijske slike i objekta, strukturnog modela protein, zadan je matematičkim izrazom, *Fourierovom transformacijom*. Uzimanjem svih parametara potrebnih za dobivanje proteinskog modela i korištenjem *Fourierove tranformacije* dobiva se jednadžba elektronske gustoće proteina. Jednadžba elektronske gustoće[22] glasi:

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V}\sum_{h}\sum_{k}\sum_{l}\left|F_{hkl}\right| e^{2\pi i\Phi_{hkl}}\ e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

gdje je ρ elektronska gustoća u prostoru, V je volumen elementarne ćelije, F_{hkl} je amplituda vala, Φ_{hkl} je faza vala, *x*,*y* i *z* su koordinate u stvarnom prostoru, *h*,*k* i *l* su Millerovi indeksi (koordinate u imaginarnom prostoru). Izraz:

$$\left|F_{hkl}\right| e^{2\pi i\Phi_{hkl}}$$

je poznat pod nazivom strukturni faktor gdje je $|F_{hkl}|$ amplituda reflektiranog vala, a Φ_{hkl} faza reflektiranog vala.[16,18,22] Budući da je informacija o fazi izgubljena prilikom difrakcijskog eksperimenta postoje razni načini za dolaženje do informacija o fazi. Metode za rješavanje faznog problema su molekulska zamjena, izomorfna zamjena, anomalna disperzija i direktna metoda.

a) Molekulska zamjena

Molekulska zamjena se javila kao metoda za rješavanje problema faze kod bioloških makromolekula. Makromolekule koje obavljaju istu funkciju u različitim organizmima najčešće su istog evolucijskog podrijetla. Budući da im je ista funkcija, molekule dijele vrlo slične strukturne karakteristike. Razlike su ponekad samo u jednom aminokiselinskom ostatku. Uz vrlo dobar početni model, ali i sličnost od 30–40% unutar proteinske sekvence, vrlo je lako doći do modela istraživanog proteina. To se postiže korištenjem informacija o amplitudama proteina od interesa i fazama proteinskog modela. Dva strukturno slična proteina ne moraju kristalizirati u istoj prostornoj grupi. Samim time i molekule proteina unutar jedinične ćelije nisu u jednakoj orijentaciji. Molekulska zamjena oslanja se na rotacijsku i translacijsku funkciju.[18] Cilj molekulske zamjene je rotiranje i translatiranje početnog modela po kristalnoj rešetci dok se ne smjesti u jednaku orijentaciju kao i molekula u kristalu.[18] Molekulska zamjena se može objasniti pomoću *Pattersonove mape*[2], za izradu koje se koriste samo vrijednosti intenziteta (I_{hkl}) da bi se došlo do konačnog modela proteina. AMoRe[23] je jedan od programa koji se koristi za molekulsku zamjenu. Program koristi tri ključna programa: ROTING za orijentaciju, TRAING za translaciju i FITING za utočnjavanje rezultata.[16]

[2] Pattersonova mapa je vektorska mapa. Vektori između atoma u stvarnom prostoru prikazani su kao vektori od ishodišta do maksimuma u Pattersonovoj mapi. Unutrašnje regije Pattersonove mape će biti jednake za iste molekule u različitim kristalnim strukturama neovisno o razlici u rotaciji.[16]

3. MATERIJAL I METODE

Popis kratica korištenih u ovom poglavlju nalazi se na početku rada.

3.1. Transformacija bakterijskih stanica

Elektrokompetentne i kemijski kompetentne bakterijske stanice *E. coli* soja BL21 (DE3) korištene su za transformaciju elektroporacijom i kemijsku transformaciju. Za transformaciju je korišten vektor pETite C–His (*Lucigen*) s ugrađenim *flgD* genom pod inducibilnim galaktoznim promotorom koji je potreban za prekomjernu ekspresiju proteina FlgD. U posebnim kivetama, širine 1 mm, za elektroporaciju pomiješano je 50 μL elektrokompetentnih stanica i 2 μL plazmida pETite s ugrađenim genom *flgD*. Na uređaj za elektroporaciju, elektroporatoru (*MicroPulser; BioRad*), stavljena je hladna kiveta sa smjesom bakterija i plazmida te je kroz nju pušten kratak puls električne energije napona 1800 V. Nakon 5 ms pulsa smjesi je dodano 500 μL LB (*engl. Luria Bertani*) medija. Sadržaj je premješten u sterilnu epruvetu te je inkubiran 1 sat pri 37 °C. Za kemijsku transformaciju korišten je također pETite plazmid. 50 μL kemijski kompetentnih stanica je pomiješano s 2 μL plazmida u sterilnoj tubici. Tubica je potom smještena 30 minuta na led, a nakon toga je premještena na 1 minutu u kupku na 42 °C. Smjesi je potom dodano 350 μL LB medija te je dalji postupak bio jednak kao i nakon transformacije elektroporacijom. Nakon inkubacije bakterijska suspenzija je izlivena na sterilnu krutu agaroznu podlogu LB, u kojoj je prethodno dodan kanamicin (konačne koncentracije, γ = 30 μg mL^{-1}), te je inkubirana na 37 °C preko noći. Recept za tekući medij LB i krutu agaroznu podlogu LB dan je u tablici 3.

Tablica 3. Komponente potrebne za pripremu 1 L vodene otopine LB medija i LB agaroze

LB	**LB agaroza**	***m*/g**
Ekstrakt kvasca	Ekstrakt kvasca	5
Tripton	Tripton	10
Natrijev klorid	Natrijev klorid	5
	Agaroza	15

3.2. Uzgoj transformiranih stanica

Prije svega je pripremljena mala prekonoćna kultura na način da je u tekući LB medij dodana ezom odabrana kolonija s ploče te kanamicin (konačne koncentracije, γ = 30 μg mL^{-1}). Tikvica je potom zatvorena i ostavljena u inkubatoru s tresilicom (*Thermo Scientific*) pri 37 °C preko noći. Za kulturu, volumena 2 L pripremljena je prekonoćna kultura u 25 mL LB medija. U svaku tikvu sa tekućim LB medijem (V = 0,5 L) je dodan kanamicin do konačne koncentracije 30 μg mL^{-1} te je medij inokuliran s 6,25 mL prekonoćne kulture. Kulture su inkubirane u inkubatoru (*Thermo Scientific*) na 37 °C uz trešnju dok OD_{600} (optička gustoća pri 600 nm) nije dosegnuo vrijednost između 0,6 i 0,8, to jest dok bakterije ne uđu u logaritamsku fazu kada se najbrže dijele. OD_{600} je mjeren na spektrofotometru *Evolution60* (*Thermo Scientific*). Nakon 2 sata je OD_{600} prešao vrijednost od 0,6 te je svaka kultura inducirana s IPTG (konačna koncentracija IPTG, c = 0,5 mM) te su stanice uzgajane 4 sata

nakon indukcije. Zatim je stanična kultura bakterija taložena centrifugiranjem (*Sigma 6K15*, rotor 125 000) na 4000 rpm 15 min pri 4 °C. Oborene stanice su odvojene od supernatanta te resuspendirane s 3,5 mL LB medija i prebačene u *Falkon* tubice. Stanice su iznova oborene u centrifugi (*Eppendorf*) na 4500 rpm u trajanju od 30 min pri 4°C. Nakon odlijevanja medija stanice su smrznute na −80 °C.

3.3. Razbijanje bakterijskih stanica

Bakterijski talog resuspendiran je u puferu A (tablica 4), koji se dodaje po 5 mL na 1 g taloga. Nakon resuspendiranja u smjesu je dodan PMSF do konačne koncentracije 3 mM, lizozim do konačne koncentracije 0,1 mg mL^{-1}, DNaza I do konačne koncentracije 0,05 mg mL^{-1} i $MgCl_2$ do konačne koncentracije 1 mM. Razbijanje stanica izvođeno je na sonikacijskom uređaju *Vibra Cell* (*Bioblock Scientific*) u posudi s ledom uz pomoć sonde promjera 0,2 cm pri 80 Hz. Nakon minute sonikacije slijedila je minuta odmora i tako u 5 intervala. Dobiveni lizat stanica je centrifugiran u ohlađenoj (4 °C) centrifugi na 10 000 rpm-a 60 min radi odvajanja supernatanta od taloga.

Tablica 4. Sastav pufera A

20 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl
20 mM imidazol
10% glicerol
1 mM DTT

3.4. Pročišćavanje proteina

3.4.1. Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija je provedena na smoli Ni-NTA. Kolona sa smolom je prije upotrebe isprana s 50 mL redestilirane vode (ReH_2O) te uravnotežena puferom A. Potom je kroz kolonu propušteno 20 mL supernatanata bakterijskog lizata. Postupak je ponovljen tri puta kako bi se osiguralo vezanje što veće količine proteina FlgD. Kolona je potom ispirana a 40 mL pufera A kako bi se uklonili svi nespecifično vezani proteini. Ispiranje proteina FlgD vršilo se puferom B (tablica 5) te su frakcije po 1 mL skupljane u 10 *Eppendorf* epruveta.

Tablica 5. Sastav pufera B

20 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl
500 mM imidazol
10% glicerol
1 mM DTT

.

3.4.2. Gel-filtracija

Nakon provjere SDS-PAGE elektroforezom u kojim se frakcijama nalazi najviše proteina, odvojene su frakcije s najvećom koncentracijom proteina. Frakcija 2 je dalje pročišćena gel filtracijom. Za potrebe gel–filtracije korištena je kolona *Superdex 200 10/300* (*GE Healthcare*) u sustavu *ÄCTA Purifier* (*GE Healthcare*) i pufer sastava danog u tablici 6. Puferi su prije korištenja degazirani na ultrazvučnoj kupelji (*Elma*). Za gel filtraciju I (GFI) je korišten volumen uzorka od 500 μL, a za gel filtraciju II (GFII) 300 μL uzorka. Uvjeti pod kojima je tekao postupak su bili sljedeći: tlak do maksimalne vrijednosti 1,5 MPa (na koloni je bio u rasponu 0,89–0,95 tijekom postupka), protok pufera od 0,5 mL min^{-1}, apsorbancija je mjerena pri 280 nm. Nakon što je *Hamilton* injekcijom uzorak nanesen na kolonu, omča je isprana dvostrukim volumenom pufera. Prolazak proteina je praćen promjenom absorbancije pri 280 nm. Skupljeno je 10 frakcija tijekom gel-filtracija, označene GFI 1–10 i GFII 1–10, te su zamrznute na –20 °C. 15 μL svake frakcije je odvojeno za provjeru SDS-PAGE elektroforezom.

Tablica 6. Sastav pufera za gel-filtraciju

20 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl

Frakcije 12, 13, 14 prve i 6, 7, 8 iz druge gel-filtracije su spojene te su frakcije prve gel-filtracije ugušćene do željene koncentracije za potrebe kristalizacije, a frakcije druge gel-filtracije su korištene za ograničenu proteolizu tripsinom nakon čega su opet podvrgnute postupku gel-filtracije, te su korištene za kristalizaciju nakon ugušćivanja.

3.5. Ugušćivanje proteina ultrafiltracijom

Frakcije koje su sadržavale najveću koncentraciju proteina nakon gel-filtracije su spojene te prenešene u sustav *CENTRIKON* radi ugušćivanja ultrafiltracijom. Ugušćivanje se odvijalo u intervalima od 15 minuta na 4500 rpm pri 4 °C nakon čega je uzorak resuspendiran. Za ugušćivanje su korišteni centrikoni s različitim veličinama pora u membrani i to manja veličina pore (M_r = 3 000) za protein obrađen tripsinom i veća veličina pore (M_r = 30 000) za nativni protein. Proces je provođen dok se nije postigla željena koncentracija. Koncentracija proteina nakon svakog ciklusa praćena je na *Nanodrop 1000* uređaju (*Nanodrop*) mjerenjem promjene apsorbancije aromatskih aminokiselina pri 280 nm.

3.6. Ograničena proteoliza tripsinom

Kako bi se ispitala stabilnost proteina FlgD, protein je tretiran tripsinom u reakciji ograničene proteolize. FlgD i tripsin pomiješani su u omjeru 1:10 te ostavljeni na sobnoj temperaturi 1 sat. Smjesa je zatim pročišćena gel-filtracijom. Postojanost proteina praćena je i držanjem proteina na sobnoj temperaturi (25 °C) u različitim uvjetima. Uvjeti pri kojima je istražena postojanost oponašali su uvjete koji vladaju u matičnici prilikom kristalizacije. Protein je pomiješan s PEG-om 1500 udjela 8,5% (*w*/*v*) i SPG puferom pri različitim pH vrijednostima (pH 4, pH 6 – pH 9). Protein je ostavljen i bez ikakvih dodataka da stoji u puferu (tablica 6). Stanje proteina je provjereno nakon dva mjeseca, dok je protein u 8,5% (*w*/*v*) PEG 1500 provjeravan svaka dva tjedna.

3.7. SDS-PAGE elektroforeza

Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima upotrebljena je za provjeru ishoda uzgoja te svih koraka tijekom pročišćavanja proteina. Korištena je diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u vertikalnom sustavu za elektroforezu *Mini-PROTEAN Tetra System* (*BioRad*) u prisutnosti SDS-a. Uzorci od 15 μL su tretirani s 5 μL 4x pufera za obradu proteina (tablica 7**)**, u slučajevima s manjim volumenom uzorka korišten je omjer od 3 volumna dijela uzorka prema 1 volumnom dijelu pufera za obradu proteina. Uzorci su denaturirani na 100 °C u termobloku (*CH 100; BioSan*) te su potom nanošeni na gel. Spravljani su gelovi od 16% i 20% akrilamid/bisakrilamid (aa/bis), sastav gelova za razdvajanje i sabijanje dan je u tablici 9. Gel za razdvajanje se izlijeva između dva stakla do visine 1,5 cm prije ruba stakla. Nadsvođuje se destiliranom vodom kako ne bi došao u kontakt sa zrakom. Nakon 30 minuta gel je u potpunosti polimerizirao te se voda poviše gela izlije i na njezino mjesto se ulijeva gel za sabijanje u koji se potom umeće češljić kako bi se formirale jažice u koje se kasnije dodaje uzorak. Nakon polimerizacije gela za sabijanje, gel se stavlja na postolje koje se smješta u kadicu za elektroforezu (*Mini–PROTEAN Tetra cell, BioRad*). U jažice se dodaju denaturirani uzorci. Marker molekulskih masa (*Biorad*) na svaki gel je nanošen u volumenu od 6 μL. Cijeli sustav se ispunjava puferom za SDS elektroforezu (tablica 8) Za sabijanje uzoraka kroz sustav je puštena električna energija napona 120 V, a potom za razdvajanje 190 V. Uređaj *PowerPack Basic* (*BioRad*) je osiguravao neprestan protok električne energije zadane voltaže. Nakon elektroforeze proteini su detektirani pomoću boje *Coomassie Brilliant Blue* sastava 0,1% (*w*/*v*) *Coomassie Blue*, 7,5% (*v*/*v*) octene kiseline, 50% (*v*/*v*) etanola. Gelovi su u boji protresani 15 minuta nakon čega su odbojani u kipućoj vodi. Nakon skeniranja gelovi su zbrinuti u posebnom otpadu.

Tablica 7. Sastav pufera za obradu proteina

1,5 mL 1 M Tris-HCl pH 6,8
3 mL 1 M DTT
0,6 g SDS
0,03 g bromfenol blue
2,4 mL glicerol

Tablica 8. Sastav elektroforetskog pufera

25 mM Tris
250 mM glicin
1% SDS.

Tablica 9. Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje; recept odgovara količini za dva gela

	Gel za sabijanje 4%	**Gel za razdvajanje 16%**	**Gel za razdvajanje 20%**
Aa/bis 29:1 40%	0,4 mL	4 mL	5 mL
Pufer za sabijanje pH 6,8	1 mL	/	/
Pufer za razdvajanje pH 8,8	/	2,5 mL	2,5 mL
ReH_2O	2,6 mL	3,5 mL	2,5 mL
20% APS	28 μL	35 μL	35 μL
TEMED	4 μL	8 μL	8 μL

3.8. Metoda 'Western blotting'

Radi ispitivanja stabilnosti His–privjeska na C–kraju proteina, napravljena je analiza metodom 'Western blotting' za detekciju His–privjeska na proteinu. Analizirana su četiri uzorka proteina FlgD, netom izolirani protein, protein zamrznut par mjeseci na –20 °C, protein obrađen tripsinom i protein koji je u prisutnosti 8,5% (*w*/*v*) PEG 1500 stajao dva tjedna na sobnoj temperaturi. Nakon što su uzorci podvrgnuti SDS-PAGE elektroforezi, gel je korišten za polusuhi transfer proteina na nitrocelulozu membranu. Kako bi se lakše pratio transfer korišten je već obojeni marker *PageRuler Plus Prestained* (*BioRad*). Gel se prije prijenosa natapa 15 minuta u puferu za transfer (*engl. transfer buffer*, TB) (tablica 10). Za transfer je bilo potrebno složiti sendvič sljedeće sheme: na anodu se stavljaju tri filter-papira na koje se stavlja nitrocelulozna membrana, a na membranu se stavlja gel koji se prekiva s tri filter-papira. Svi filter-papiri i nitrocelulozna membrana su prethodno namočeni u TB-u. Sendvič je potom poklopljen katodom i stavljen na uređaj za prijenos *2117 Multiphor II* (*LKB*). Kroz sustav se pušta električna energija stalnog napona kroz jedan sat. Jakost struje potrebne za prijenos iznosila je 35,2 mA (0,8 mA po 1 cm^2). Po isteku jednog sata aparatura je rastavljena te je pomoću reverzibilne boje *PonceauRouge* provjerena uspješnost transfera. Membrana je nakon odbojavanja blokirana s 5% (*w*/*v*) obranog mlijeka u prahu u TBST puferu (tablica 10) sat vremena. Zatim se membrana inkubirala preko noći s primarnim protutijelom (anti-His Mouse monoclonal, 1:1000) pa sekundarnim protutijelom (Goat anti-mouse HRP, 1:10000).

Tablica 10. Sastav TB i TBST pufera

TB (500 mL)	**TBST (1 L)**
192 mM Glicin	25 mM Tris
25 mM Tris	150 mM NaCl
20% Etanol	0,2% TWEEN
ReH_2O do 500 mL	ReH_2O do 1 L

3.9. Kristalizacija proteina

Za kristalizaciju FlgD korištena je metoda difuzije para viseće kapi. Korištene su ploče s 24 rezervoara volumena precipitatnih otopina od 400 mL. Pretraživanjem kristalizacijskih uvjeta (*engl. screening*) pomoću *PACT suite*-a utvrđeni su uvjeti u kojima protein FlgD kristalizira u *P*2 prostornoj grupi. Uvjeti A4, A5, A6 su korišteni prilikom optimizacije kristalizacije kao i modificirani uvjeti u kojima je variran pH, postotak precipitanta i temperatura (tablica sa popisom uvjeta *PACT suite* nalazi se u prilogu, a sastav korištenih otopina prikazan je u tablici 11). Za pripravu otopina 1 M SPG pH 8 – 6 korištene su otopine 1 M SPG pH 9 i pH 4. Za pripremu uvjeta u matičnicama korištene su pripremljene otopine SPG pufera odgovarajućeg pH, otopina 50% (*w*/*v*) PEG 1500 te redestilirana voda. Sve otopine su nakon priprave filtrirane i skladištene na 4 °C.

Tablica 11. Sastav otopina *PACT suite* korištenih za kristalizaciju

A4	0,1 M SPG, pH 7, 25% (*w*/*v*) PEG 1500
A5	0,1 M SPG, pH 8, 25% (*w*/*v*) PEG 1500
A6	0,1 M SPG, pH 9, 25% (*w*/*v*) PEG 1500

3.9.1. Prva kristalizacija

Na dvije ploče postavljena je kristalizacija nativnog proteina FlgD, koncentracije 15,5 mg mL^{-1}, i FlgD tretiranog tripsinom koncentracije 6,2 mg mL^{-1}. Shema kristalizacijske ploče prikazana je u tablici 12. Uz već navedene uvjete dodan je novi uvjet u kojemu je pH iznosio 6. Ploče su pohranjene na 4 °C.

Tablica 12. Shema postavljenih uvjeta prve kristalizacije nativnog proteina FlgD

<table>
<tr><th></th><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th></tr>
<tr><td>A</td><td colspan="4">0,1 M SPG, pH 9, 25% (w/v) PEG 1500
1 μL proteina + 1 μL matičnice</td><td colspan="2" rowspan="2">0,1 M SPG, pH 9, 25% (w/v) PEG 1500
2 μL proteina + 2 μL matičnice</td></tr>
<tr><td>B</td><td colspan="4">0,1 M SPG, pH 9, 25% (w/v) PEG 1500
3 μL proteina + 3 μL matičnice</td></tr>
<tr><td>C</td><td colspan="2" rowspan="2">0,1 M SPG, pH 8, 25% (w/v) PEG 1500
1 μL proteina + 1 μL matičnice</td><td colspan="2" rowspan="2">0,1 M SPG, pH 7, 25% (w/v) PEG 1500
1 μL proteina + 1 μL matičnice</td><td colspan="2" rowspan="2">0,1 M SPG, pH 6, 25% (w/v) PEG 15000
1 μL proteina + 1 μL matičnice</td></tr>
<tr><td>D</td></tr>
</table>

Tablica 13. Shema postavljenih uvjeta prve kristalizacije proteina FlgD obrađenog tripsinom

	1	2	3	4	5	6
A	0,1 M SPG, pH 9, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL proteina + 1 μL matičnice		/		/	
B	/					
C	0,1 M SPG, pH 8, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL proteina + 1 μL matičnice		0,1 M SPG, pH 7, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL proteina + 1 μL matičnice		0,1 M SPG, pH 6, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL proteina + 1 μL matičnice	
D	/					

3.9.2. Druga kristalizacija

Ploča s nativnim proteinom FlgD postavljena je prema tablici 14, a koncentracija proteina je iznosila 15,5 mg mL^{-1}. Ploča je pohranjen na 16 °C. U uvjetima je variran pH u rasponu od 9 do 6.

Tablica 14. Shema postavljenih uvjeta druge kristalizacije

	1	2	3	4	5	6
A	0,1 M SPG, pH 9, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL proteina + 1 μL matičnice		0,1 M SPG, pH 8, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL proteina + 1 μL matičnice		0,1 M SPG, pH 7, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL proteina + 1 μL matičnice	
B	0,1 M SPG, pH 6, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 2 μL proteina + 2 μL matičnice	0,1 M SPG, pH 7, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 2 μL proteina + 2 μL matičnice	0,1 M SPG, pH 8, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 2 μL proteina + 2 μL matičnice	0,1 M SPG, pH 9, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 2 μL proteina + 2 μL matičnice	0,1 M SPG, pH 8, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 2 μL proteina + 2 μL matičnice	/
C	/					
D						

3.9.3. Treća kristalizacija

Za treću kristalizaciju variran je udio precipitanat u uvjetu A4. Volumni udio precipitanta PEG 1500 je variran od 20% do 30%, a uz spomenute korišten je i uvjet 0,1 M SPG, pH 6, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 (tablica 15). Koncentracija proteina FlgD tretiranog tripsinom iznosila je 6,2 mg mL^{-1}. Na jednom stakalcu su postavljene po dvije kapljice. Kapljica označena crnom točkom sadržavala je 1 μL proteina i 1 μL matičnice, a neoznačena je sadržavala 1 μL proteina i 0,5 μL matičnice.

Tablica 15. Shema postavljenih uvjeta treće kristalizacije

	1	2	3	4	5	6
A	0,1 M SPG, pH 7, **20%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **20%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **21%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **21%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **22%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **22%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL
B	0,1 M SPG, pH 7, **23%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **23%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **24%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **24%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **25%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **25%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL
C	0,1 M SPG, pH 7, **26%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **26%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **27%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **27%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M, SPG pH 7, **28%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **28%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL
D	0,1 M SPG, pH 7, **29%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **29%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **30%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 7, **30%** (*w*/*v*) PEG 1500 1 μL + 1 μL 1 μL + 0,5 μL	0,1 M SPG, pH 6, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 2 μL + 2 μL	0,1 M SPG, pH 6, 25% (*w*/*v*) PEG 1500 2 μL + 1 μL

3.9.4. Četvrta kristalizacija

Korišten je FlgD (γ = 3,0 mg mL^{-1}) tretiran tripsinom. Za kristalizaciju su korištena 3 uvjeta 0,1M SPG pH 7 i to s PEG 1500 od (*w*/*v*) 21%, 22% i 28%. Shema kristalizacijske ploče dana je u tablici 16.

Tablica 16. Shema postavljenih uvjeta četvrte kristalizacije

<table>
<tr><th></th><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th></tr>
<tr><td>A</td><td colspan="4">0,1M SPG, pH 7,
21% (w/v) PEG 1500
1 μL proteina + 0,5 μL matičnice</td><td colspan="2">0,1M SPG, pH 7,
28% (w/v) PEG 1500
1 μL proteina + 1 μL matičnice</td></tr>
<tr><td>B</td><td colspan="4">0,1M SPG, pH 7,
22% (w/v) PEG 1500
1 μL proteina + 0,5 μL matičnice</td><td>/</td><td>/</td></tr>
<tr><td>C</td><td colspan="6" rowspan="2">/</td></tr>
<tr><td>D</td></tr>
</table>

Sve ploče su redovito pregledavane.

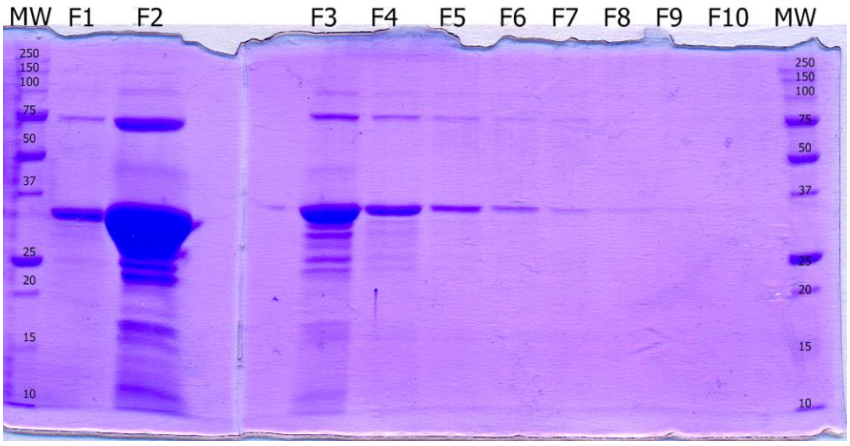
3.10. Rješavanje kristalne strukture proteina FlgD

Kristalografski podatci su sakupljeni metodom rentgenske difrakcije na jediničnom kristalu proteina FlgD, iz soja 26696, na sinkrotronu Elettra u Trstu (linija XRD1). Podatci su procesirani korištenjem programa XDS[24], a program AmoRe[23] (dio CCP4[25] programskog paketa) je korišten za rješavanje strukture proteina FlgD metodom molekulske zamjene pri čemu je kao model korištena struktura PDB koda 4ZZK. Utočnjavanje je napravljeno koristeći Refmac5[26] program te je proteinski model FlgD izrađen ručno u programu WinCoot[27]. Slike modela su generirane u programu PyMol.[28]

4. REZULTATI

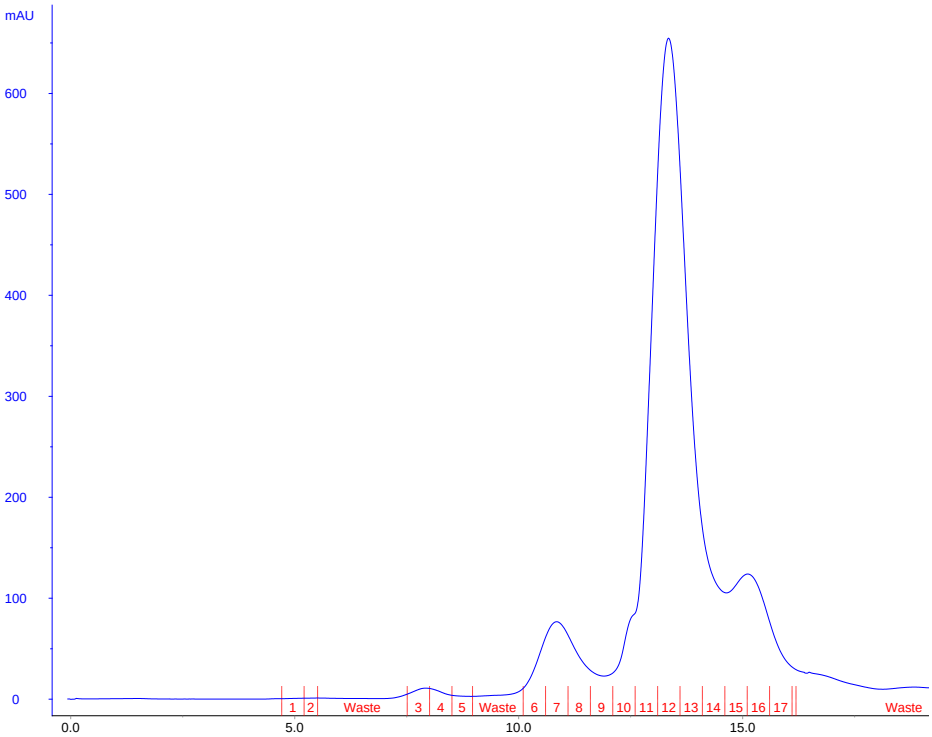
4.1. Dobivanje čistog i koncentriranog proteina *Hp*FlgD iz soja 26695

Čistoća proteina *Hp*FlgD ($M_r \approx 36\ 000$) nakon afinitetne kromatografije provjerena je SDS-PAGE elektroforezom. Prema slici 11 utvrđeno je da se najveća količina proteina nalazi u frakciji 2, a nešto manja količina proteina nalazila se u frakcijama 1, 3, 4, dok je u preostalim frakcijama količina proteina zanemarivo mala i daljnjim pročišćavanjem bi se gotovo i izgubila. Standard molekulskih masa proteina nalazi se u dodatcima.

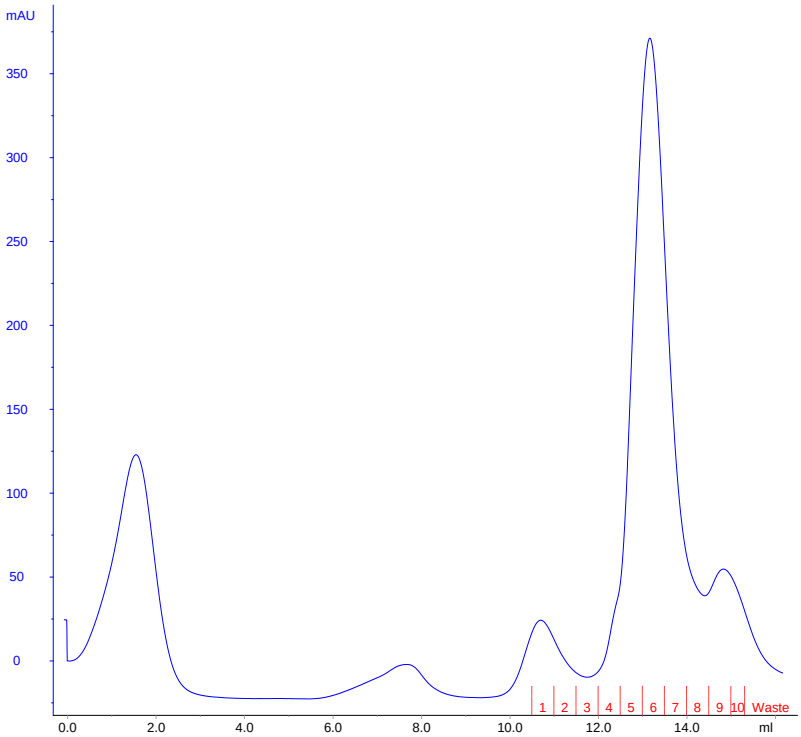


Slika 11. SDS-PAGE elektroforeza na 16% aa/bis gelu nakon afinitetne kromatografije *Hp*FlgDHis$_6$; MW- marker standardnih molekulskih masa (6 μL), F1 - F10 - sakupljene frakcije. Volumen svakog uzorka je bio 20 μL (15 μL uzorka + 5 μL pufera za elektroforezu).

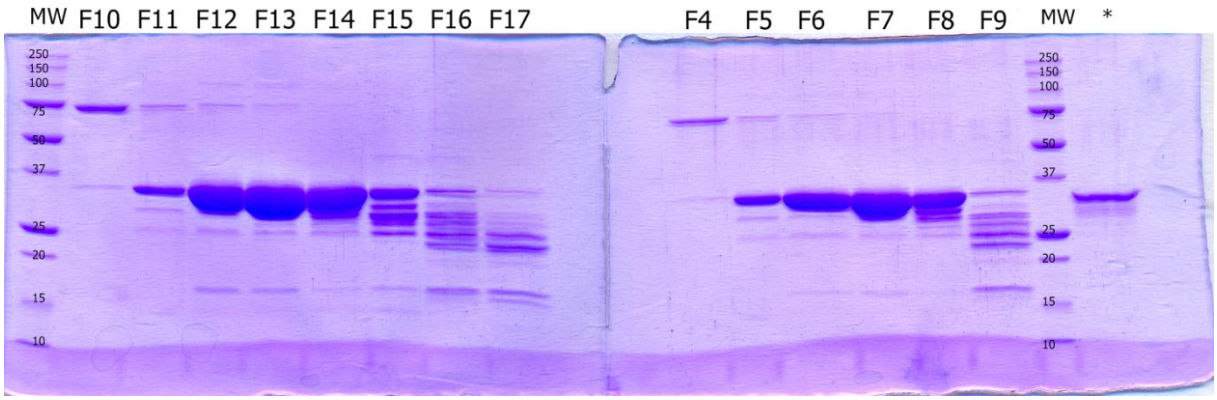
Pročišćavanje proteina nastavljeno je gel-filtracijom. Frakcija 2 je podijeljena na dvije frakcije po 500 μL koje su bile zasebne dvije gel-filtracije (GFI i GFII). Prolazak proteinskog uzorka frakcije 2 kroz kolonu praćen je promjenom apsorbancije uzorka pri valnoj duljini od 280 nm. Uzorak čistog proteina *Hp*FlgD počeo je silaziti s kolone kod volumena od 13 mL što odgovara molekulskoj masi $M_r = 36\ 000$ (slika 12 i 13). Čistoća izoliranih frakcija također je ispitana SDS-PAGE elektroforezom. Prema slici 14 vidi se da se najveća količina proteina nalazi u frakcijama 12–14 te frakcijama 6–8. Frakcije 12–14 su potom spojene i ugušćene. Nakon 4 sata ultrafiltracije uzorka volumen se spustio na 50 μL u kojemu je na uređaju *Nanodrop 1000* određena koncentracija od 15,5 mg mL^{-1}. Proteinski uzorak je potom zamrznut na –20 °C. Frakcije 6–7 su ugušćene i korištene za ograničenu proteolizu tripsinom. Nakon 1 sata inkubacije proteina s tripsinom reakcija je zaustavljena na gel-filtraciji. Iz grafa gel-filtracije frakcija 6–8 (slika 15) se vidi da se molekulska masa proteina smanjila (volumen eluiranja je 17 mL) što je i očekivano zbog pretpostavke da je N-terminalni dio proteina fleksibilan te da služi kao signalni dio molekule te je sklon razgradnji proteazom. Frakcije 6–9 su spojene i nakon 5 sati ultrafiltracije ugušćene do volumena od 100 μL u kojemu je na uređaju *Nanodrop 1000* određena koncentracija od 6,2 mg mL^{-1}. Istom postupku je podvrgnut uzorak proteina *Hp*FlgD iz druge ekspresije (slika 16) te je nakon ugušćivanja frakcija 3–7 utvrđena koncentracija od 3,0 mg mL^{-1} u 100 μL. Uzorci su zamrznuti na –20 °C.



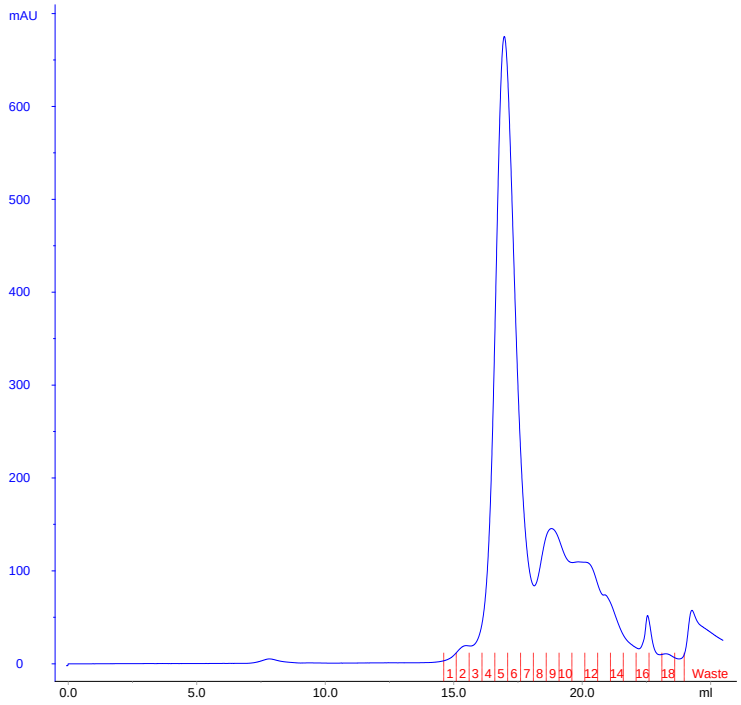
Slika 12. Graf gel-filtracije I frakcije 2 nakon afinitetne kromatografije, mAU – jedinica absorbancije (*engl. mili absorbance units*)



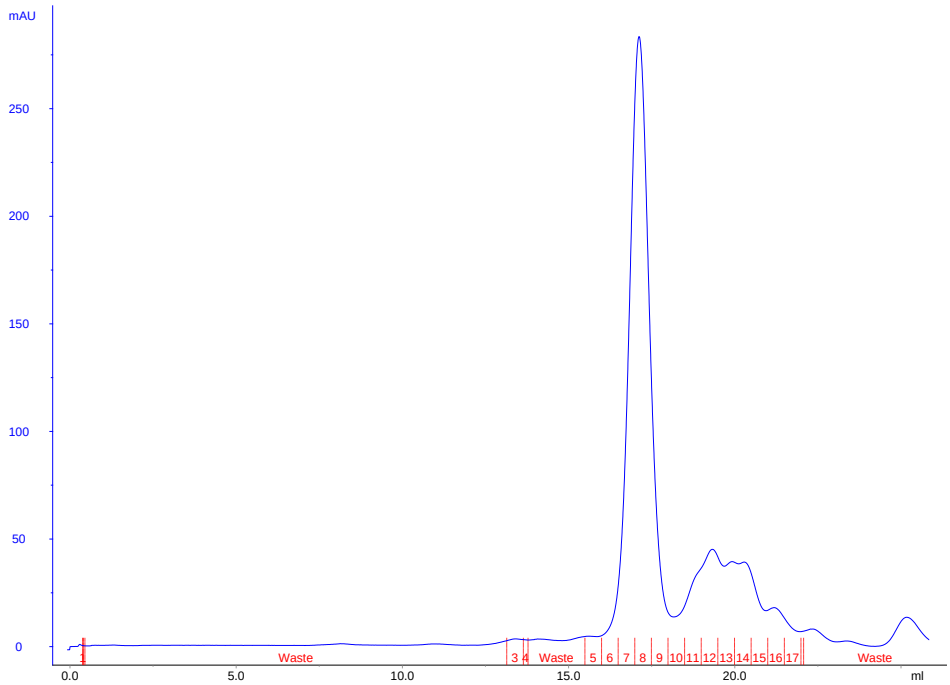
Slika 13. Graf gel-filtracije II frakcije 2 nakon afinitetne kromatografije.



Slika 14. SDS-PAGE elektroforeza na 20% aa/bis gelu nakon gel-filtracije *Hp*FlgD His_6; 1. gel, gel-filtracija I (GFI) – MW- marker standardnih molekulskih masa (6 μL), F10–F17 – frakcije nakon GFI; 2. gel, gel-filtracija II (GFII) – F4–F9 – frakcije nakon GFII, *-SeMetFlgD u 8,5% (*w*/*v*) PEG 1500. Volumen svakog uzorka je bio 20 μL (15 μL uzorka + 5 μL pufera za elektroforezu).



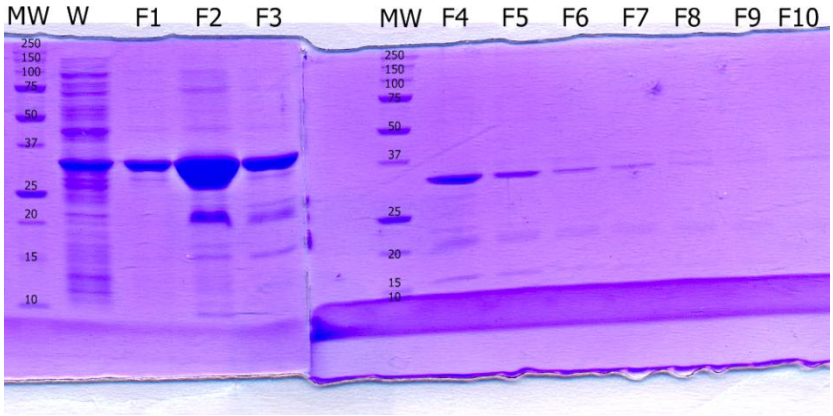
Slika 15. Graf gel-filtracije proteina *Hp*FlgD nakon ograničene proteolize tripsinom (ekspresija 1)



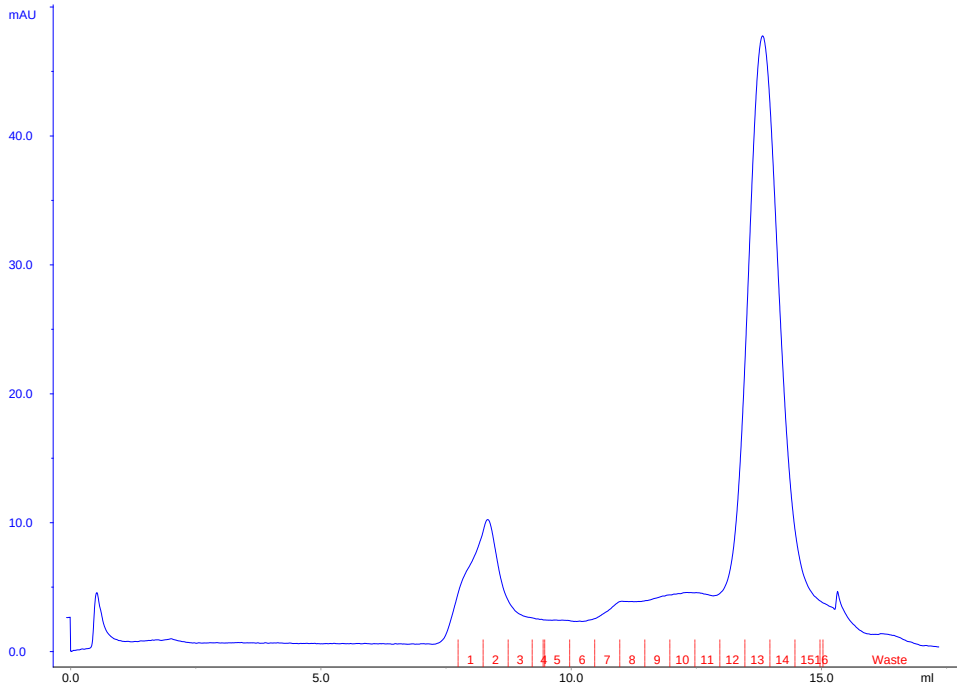
Slika 16. Graf gel-filtracije proteina *Hp*FlgD nakon ograničene proteolize tripsinom (ekspresija 2)

4.2. Dobivanje čistog i koncentriranog proteina SeMetFlgD

Protein SeMetFlgD korišten je za ispitivanje strukturne stabilnosti. Dobiveni proteinski ekstrakt iz malog uzgoja od 500 mL pročišćen je na afinitetnoj kromatografiji (slika 17). Frakcija 2 je pokazala da sadrži najveću količinu proteina i korištena je za daljnje pročišćavanje na gel-filtraciji (GFI– slika 18 i GFII– slika19).

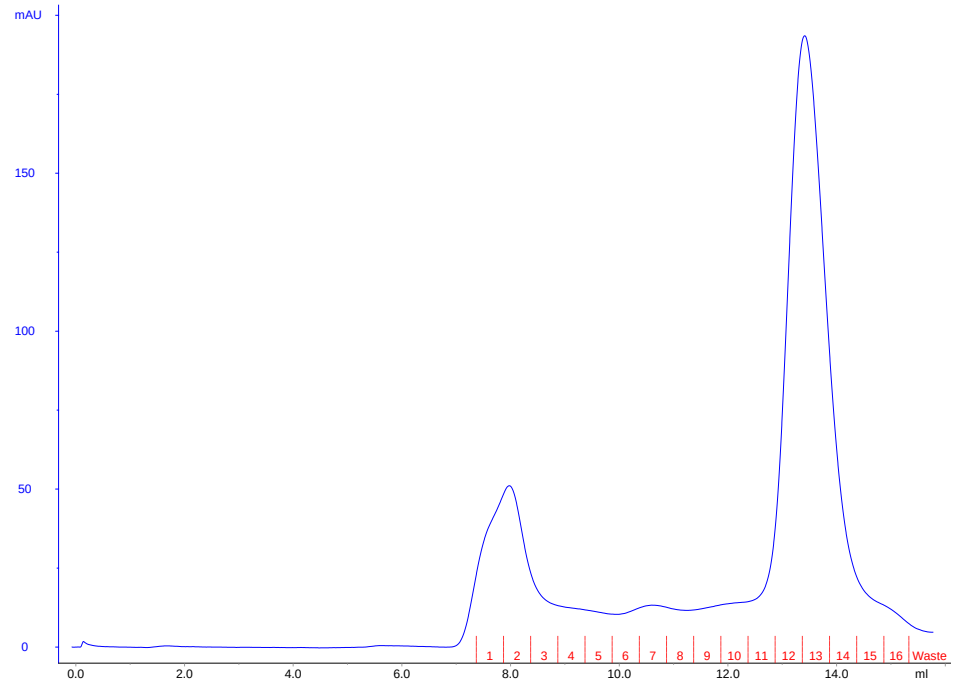


Slika 17. SDS-PAGE elektoforeza na 16% aa/bis gelu nakon afinitetne kromatografije SeMetFlgD; MW – marker standardnih molekulskih masa (6 μL), W – Frakcija ispiranja (*engl*. *wash*), F1–F10 – sakupljene frakcije. Volumen svakog uzorka je bio 20 μL (15 μL uzorka + 5 μL pufera za elektroforezu).

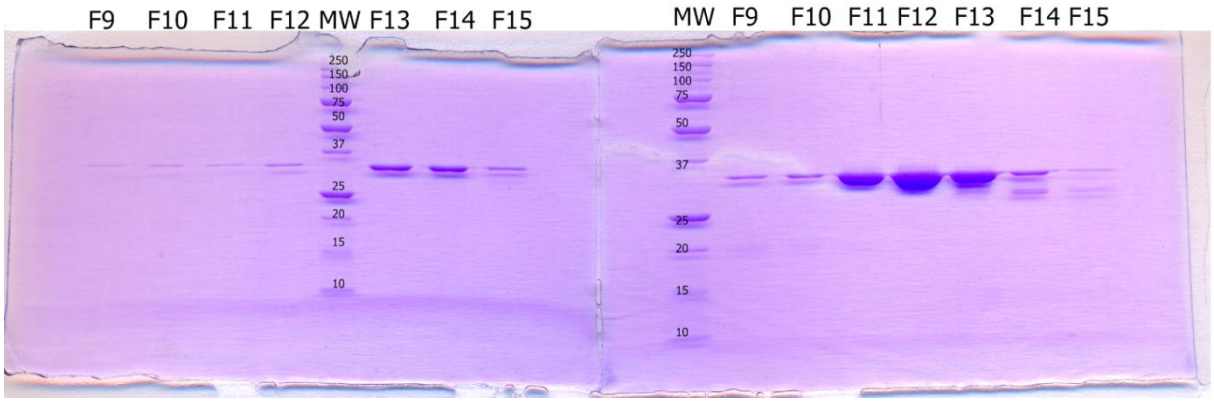


Slika 18. Graf gel-filtracije I frakcija 2

Pomoću grafova gel-filtracija izdvojene su frakcije 9–15 obje gel-filtracije te su provjerene SDS-PAGE elektroforezom. Rezultati prve gel-filtracije pokazuju iznimno niske količine proteina, no unatoč tome izdvojene su frakcije 13, 14 i zamrznute na –20 °C. Frakcije 11–13 druge gel-filtracije pokazale su najveću koncentraciju proteina te su zamrznute na –20 °C, a frakcije 14 i 15 su korištene za provjeru stabilnosti proteina.



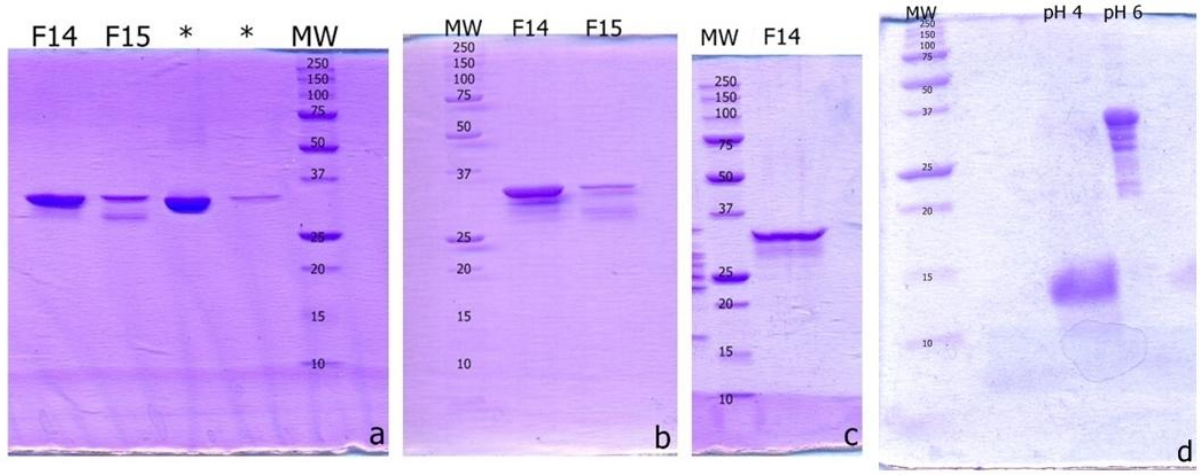
Slika 19. Graf gel-filtracije II frakcije 2



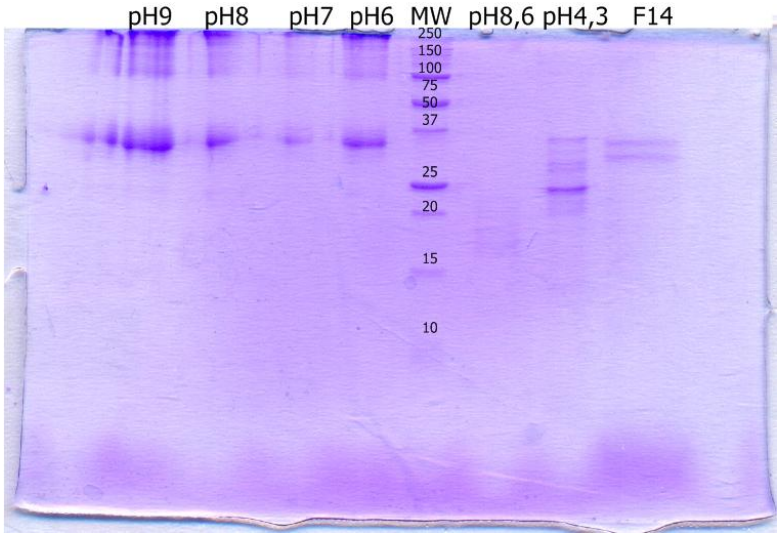
Slika 20. SDS-PAGE elektroforeza na 16% aa/bis gelu nakon gel-filtracije SeMetFlgD; 1. gel, gel-filtracija I (GFI) – MW- marker standardnih molekulskih masa (6 μL), F9–F15 – frakcije nakon GFI; 2. gel, gelfiltracija II (GFII) – F9–F15 – frakcije nakon GFII; Volumen svakog uzorka je bio 20 μL (15 μL uzorka + 5 μL pufera za elektroforezu).

4.3. Stabilnosti proteina *Hp*FlgD

Dva poznata modela proteina FlgD (*Xc*FlgD i *Pa*FlgD) upućuju na to da se protein, unatoč činjenici da je izoliran kao cijeli protein, u kristalu nalazi skraćen te je zbog toga provjerena njegova stabilnost u otopini. Protein SeMetFlgD, frakcije 14 i 15, je ostavljen nakon izolacije na sobnoj temperaturi kako bi se vidjelo utječe li viša temperatura na njegovu stabilnost. Nakon 3 dana i nakon 3 tjedna na sobnoj temperaturi napravljena je SDS-PAGE elektroforeza koja je pokazala da je protein jednake molekulske mase kao i nakon gel-filtracije te nisu uočeni degradacijski produkti nižih molekulskih masa (slika 21–a,b). Kako se za kristalizaciju koriste i PEG 1500 i SPG pufer bilo je dobro provjeriti utječu li možda te dvije kemikalije na njegovu stabilnost. PEG 1500 je dodan u frakciju 14 do konačnog masenog udjela (*w*/*v*) 8,5%. SDS-PAGE elektoforeza urađena je isti dan kada je dodan PEG 1500, 2 tjedna nakon dodavanja i mjesec dana nakon dodavanja PEG-a 1500. Rezultati su pokazali da PEG 1500 također ne utječe na stabilnost proteina (slika 21 c, 22 i 23). Frakcija 15 i 13 tretirane su SPG puferom. U frakciju 15 dodan je 1 M SPG pufer pH 8,6, a u frakciju 13 1 M SPG pufer pH 4,3. Uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi te provjereni SDS-PAGE elektroforezom nakon mjesec dan. Utvrđeno je da je niski pH 4,3 SPG pufera potaknuo degradaciju proteina što se jasno vidi u obliku degradacijskog produkta niže molekulske mase (25 kDa) na gelu (slika 22). Uzorak frakcije 15 dao je vrlo slab signal i nije bilo moguće razaznati je li pufer uzrokovao degradaciju i blijedu mrlju između 25 i 15 kDa ili je mrlja uzrok nečistoće u uzorku (slika 22). Postupak je ponovljen sa intervalom vrijednosti pH 4, 6, 7, 8 i 9. Uzorci su nakon 2 mjeseca provjereni SDS-PAGE elektroforezom. Pokazalo se da jedino niski pH 4 uzrokuje degradaciju te je masa degradacijskog produkta pala na 15 kDa (slika 21 d) što je i za očekivati jer većina staničnih proteina nije građena da podnese niske vrijednosti pH, a svi ostali uzorci su i nakon dva mjeseca pokazali izrazitu stabilnost i nisu upućivali na degradaciju. Uzorak proteina uz dodatak PEG-a 1500 nije pokazao ni nakon 5 mjeseci stajanja na sobnoj temperaturi znakove degradacije. Utječu li PEG 1500 i SPG pufer u kombinaciji na stabilnost proteina također je ispitano i za kristalizacijske kapljice (smjesa postavljena za proteinski uzorak i kristalizacijski uvjet mjesec dana nakon postavljanja prve kristalizacije). Nakon SDS-PAGE elektroforeze jasno se moglo vidjeti da ove dvije kemikalije u kombinaciji također ne uzrokuju degradaciju otopljenog proteina u kapljici (slika 22)



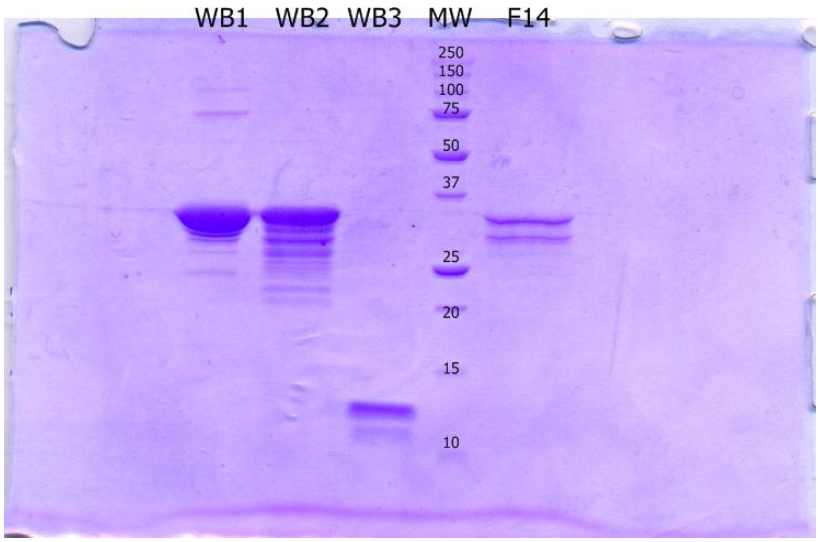
Slika 21. (a) SDS-PAGE elektroforeza frakcije 14 i 15 na 16% aa/bis gelu nakon 3 dana na sobnoj temperaturi; MW- marker standardnih molekulskih masa, * – Frakcija 13 i koncentrirani stanični ekstrakt nakon afinitetne kromatografije (*engl*. *flowtrough* (FT)); Volumen svakog uzorka je bio 20 μL (15 μL uzorka + 5 μL pufera za elektroforezu). (b) SDS-PAGE elektroforeza frakcije 14 i 15 na 20% aa/bis gelu nakon 3 tjedna na sobnoj temperaturi; Volumen svakog uzorka je bio 20 μL (15 μL uzorka + 5 μL pufera za elektroforezu). (c) SDS-PAGE elektroforeza na 20% aa/bis gelu frakcije 14 SeMetFlgD + 8,5% (*w*/*v*) PEG 1500 (3 tjedna na sobnoj temperaturi i 1 dan u PEG-u); Volumen uzorka je bio 20 μL (15 μL uzorka + 5 μL pufera za elektroforezu); (d) SDS-PAGE elektroforeza uzoraka nakon 2 mjeseca u SPG puferu, uzorak pH 6 je F15 GFI *Hp*FlgD His_6 u puferu SPG.



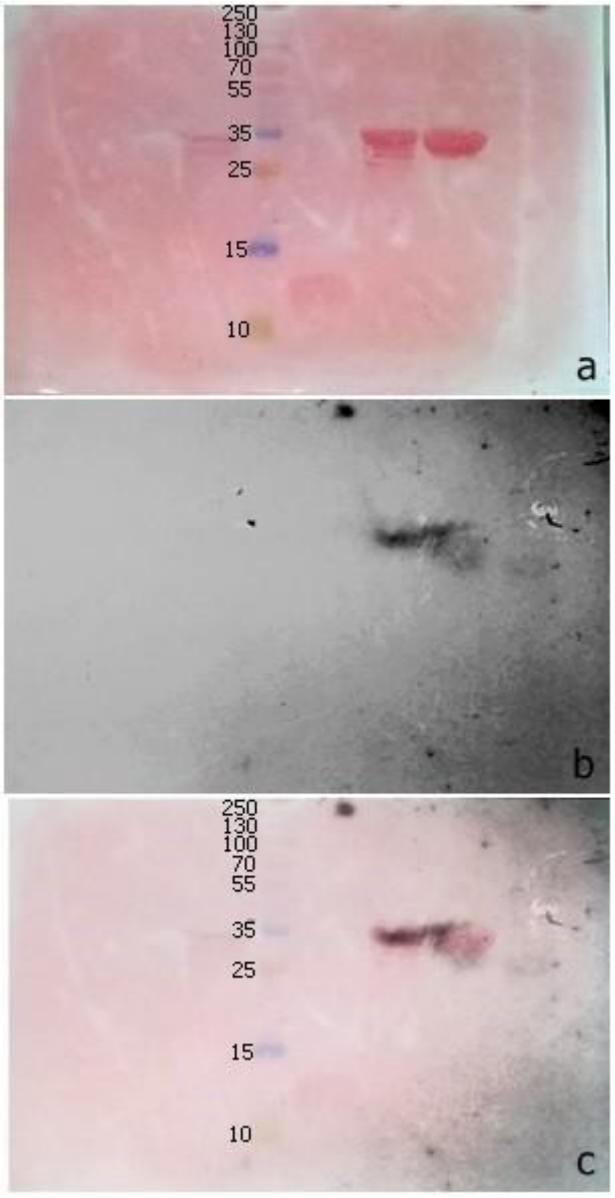
Slika 22. SDS-PAGE elektroforeza na 20% aa/bis gelu kristalizacijskih uzoraka; pH 9 – 4 μL kristalizacijskog uvjeta A6, pH 8 – 4 μL kristalizacijskog uvjeta A5, pH 7 – 4 μL kristalizacijskog uvjeta A4, pH 6 – 4 μL kristalizacijskog uvjeta 0,1 M SPG, 25% (*w*/*v*) PEG 1500, pH 8,6 – 3 μL proteina *Hp*FlgD u SPG puferu, pH 4, 3 – 3 μL proteina *Hp*FlgD u SPG puferu, F14 – frakcija 14 + 8,5% (*w*/*v*) PEG 1500 (2,5 mjeseca na sobnoj temperaturi i mjesec dana u PEG-u); za sve uzorke je korišten 1 μL pufera za elektroforezu; Volumen uzorka F14 je bio 15 μL (10 μL uzorka + 5 μL pufera za elektroforezu).

4.4. Analiza metodom 'Western blotting'

Da bi se dokazala prisutnost histidinskog privjeska na C–kraju proteina *Hp*FlgD provedena je analiza metodom 'Western blotting'. Nakon SDS-PAGE elektroforeze (slika 23) i prijenosa na nitroceluloznu membranu, membrana je tretitrana primarnim protutijelima za detekciju histidinskog privjeska preko noći i nakon toga sekundarnim protutijelima radi vizualizacije. Nakon izlaganja membrane reagensu u tamnoj komori na filmu je uočeno pojavljivanje signala (slika 24) koje je odgovaralo proteinu od $M_r \approx 36\ 000$ što upućuje da je protein intaktan prije kristalizacije, dok je protein tretiran tripsinom izgubio histidinski privjesak. Riješena trodimenzionalna struktura proteina *Hp*FlgD pokazala je da proteinu nedostaje 29 aminokiselina na C–kraju proteina uključujući i histidinski privjesak što upućuje na spontanu degradaciju tijekom kristalizacije.



Slika 23. SDS-PAGE elektroforeza na 20% aa/bis gelu proteina *Hp*FlgD prije prijenosa na nitroceluloznu membranu i 'Western blotting-a'; WB1– *Hp*FlgD; 15,5 mg mL^{-1}(6 μL), WB2– *Hp*FlgD; 6,00 mg mL^{-1}(8 μL), WB3– *Hp*FlgD obrađen tripsinom; 3,0 mg mL^{-1}(10 μL), frakcija 14 SeMetFlgD + 8,5% (*w*/*v*) PEG 1500 (2 mjeseca na sobnoj temperaturi i 2 tjedna u PEG-u), za uzorke volumena do 10 μL korišteno je 2 μL pufera za elektroforezu; Volumen uzorka F14 je bio 20 μL (15 μL uzorka + 5 μL pufera za elektroforezu).

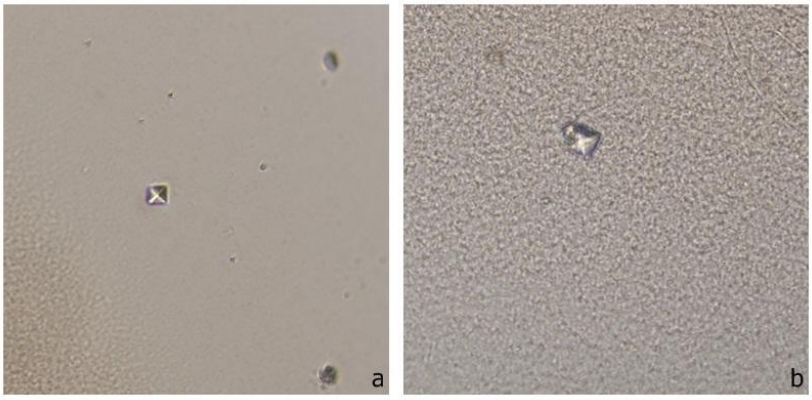


Slika 24.(a) Membrana nakon prijenosa tretirana reverzibilnom bojom *PonceauRouge*; (b) signal na filmu; (c) preklopljene slike (a) i (b), položaj proteina na membrani odgovara signalu na filmu

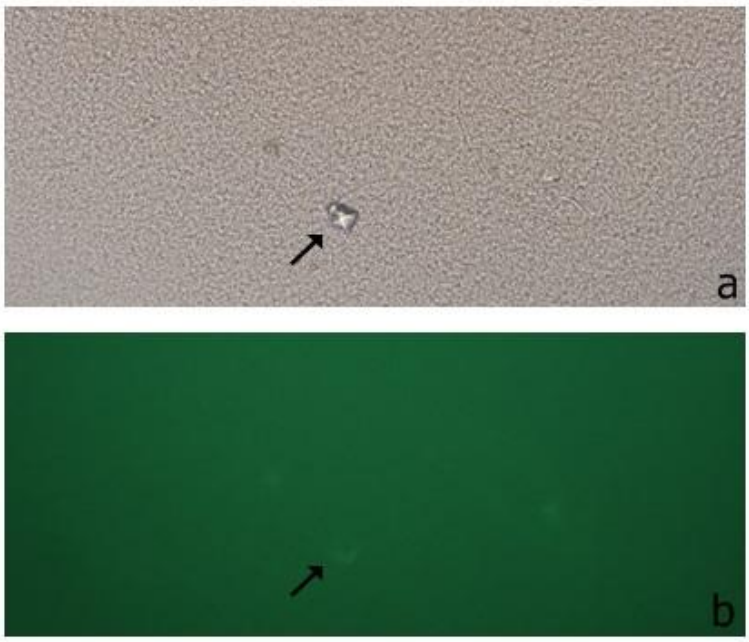
4.5. Kristalizacija proteina *Hp*FlgD

Nakon postavljanja kristalizacije uočeno je da na kristalizaciju najveći utjecaj imaju temperatura, koncentracija proteina, pH otopine i vrijeme. Dva dana uoči postavljanja prve kristalizacije uočeno je da je nativni protein *Hp*FlgD precipitirao te je premješten sa 4 °C na 16 °C, te je postavljena druga kristalizacija koja je odmah stavljena na 16 °C. Pregledom ploča mjesec dana nakon postavljene kristalizacije nije uočena nikakva promjena na kristalizacijskim pločama s nativnim proteinom *Hp*FlgD, dok su na kristalizacijskim pločama s proteinom *Hp*FlgD obrađenim tripsinom uočeno razdvajanje faza u uvjetima pH 7 i 8 (C 1–4) koji su indikacija prijelaza faza, iz neuređene u uređenu strukturu. Pregledom ploča, mjesec i pol nakon postavljanja kristalizacije, kristalizacijska ploča s nativnim proteinom druge kristalizacije pokazala je prisutnost mnoštvo sitnih kristalića u uvjetima pH 8, A3 i A4, te su uočena dva kristalića u uvjetima A5 i A6 (slika 25). Kako bi se dokazalo da kristalići ne

potječu od soli uzorak je pregledan pod fluorescencijskim mikroskopom (slika 26) čime je zaključeno da je kristal uistinu proteinskog podrijetla. Proteinski kristali zbog aromatskih aminokiselina unutar svoje strukture pod UV svjetlom fluoresciraju, dok kristali soli ne. Pregledom ploče prve kristalizacije proteina *Hp*FlgD obrađenog tripsinom uočeni su mogući maleni kristalići u C 1–4 (slike u dodatku).

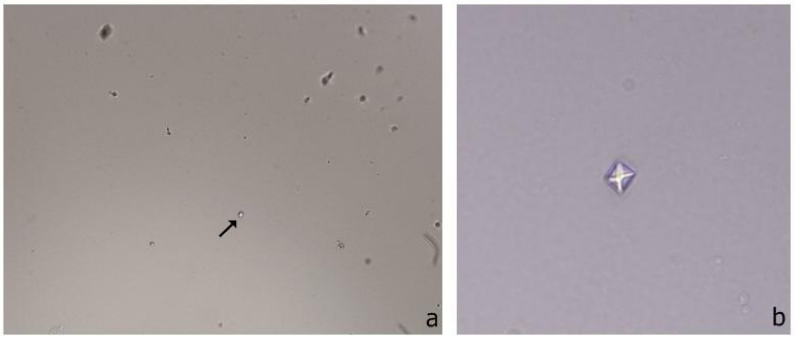


Slika 25. Kristalić proteina *Hp*FlgD; druga kristalizacija, A5 i A6



Slika 26. (a) Kristal proteina *Hp*FlgD, druga kristalizacija, A6, (b) kristal promatran pod fluorescencijskim mikroskopom (λ_{exc}= 375 nm)

Dva i pol mjeseca od postavljanja prve i druge kristalizacije u uvjetima A 3–6 nije bilo promjena, kristalići u uvjetima A5 i A6 su bili iste veličine kao i prilikom prethodnog pregleda, no u uvjetu C4 ploče prve kristalizacije je uočen kristalić (slika 27). Kristalić je također promotren pod fluorescencijskim mikroskopom te je zaključeno da se radi o proteinskom kristalu. Budući da je uočeno da se kristalići najčešće pojavljuju u SPG puferu pH 7, odlučeno je postaviti treću kristalizaciju sa variranjem postotka PEG 1500 od 20–30% da se ispita utjecaj promjene udjela precipitanta na stvaranje kristala.



Slika 27. Kristal proteina *Hp*FlgD obrađenog tripsinom, prva kristalizacija, C4, (b) 50x uvećan kristalić sa slike (a)

Mjesec i pol dana nakon postavljanja kristalizacije, u uvjetima A 3–6 ploče treće kristalizacije uočeni su kristalići, no uslijed tehničkih poteškoća i porasta temperature u hladnjaku u kojem su ploče bile pohranjene, kristalići su se otopili. Nakon dva mjeseca, prilikom pregleda ploča treće kristalizacije uočeni su ponovno kristalići u uvjetima A3, A6 i C5. Kao rezultat toga postavljena je četvrta kristalizacija u kojoj su izdvojeni uvjeti u kojima su se pojavili kristalići. Ploče prve i druge kristalizacije su bile kao i pri prethodnom pregledu bez promjena. Difrakcijska sposobnost kristala iz uvjeta A3 testirana je u sinkrotronu (Elettra, linija XRD1), ali zbog svojih malih dimenzija kristal nije difraktirao i nisu prikupljeni difrakcijski podatci.

4.6. Rješavanje strukture proteina *Hp*FlgD rentgenskom strukturnom analizom

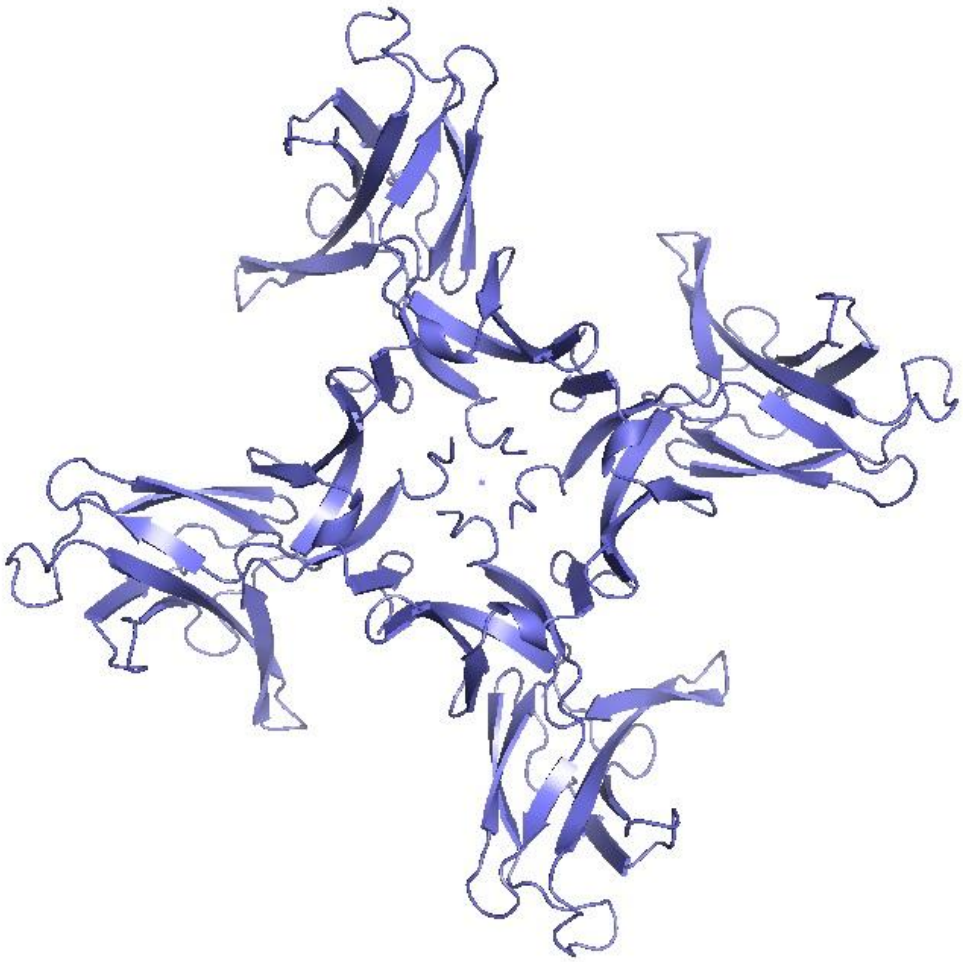
Za rješavanje kristalne strukture korišteni su podatci dobiveni rentgenskom difrakcijom na većem kristalu proteina *Hp*FlgD koji su bili procesirani koristeći program XDS. Detalji o eksperimentalnim podacima navedeni su u tablici 17.
Analizom podataka dobiveno je da *Hp*FlgD protein pripada monoklinskom sustavu, *P*2 prostornoj grupi i da su dimenzije elementarne ćelije a = 77,372 Å, b = 33,508 Å, c = 133,327 Å. Koristeći metodu molekulske zamjene i početnog modela PBD koda 4ZZK dobivena je početna struktura proteina *Hp*FlgD. Rješavanjem i utočnjavanjem strukture proteina *Hp*FlgD nađeno je da protein nije nativan jer u strukturi nedostaju N– i C–terminalni krajevi proteina te sadrži 146 aminokiselina (127–272). Struktura je utočnjena do iznosa od 21,137% R_{work} i 25,025% R_{free}**.** Standardna odstupanja (rmsd, *engl. root-mean-square deviation*) duljina veza iznosi 0,011 Å, a vrijednosti kuteva 1,390°. Nakon posljednjeg kruga utočnjavanja model pokazuje da je 91,14% aminokiselina u okvirima dozvoljenih rotamera te niti jedna aminokiselina nije smještena izvan okvira Ramachandranovog grafikona. Nađeno je da aminokiselina Gly D247 zauzima *cis* položaj. 10 aminokiselina i to 4 Lys 165 svih lanaca, Lys D246 i Lys D248 i 4 Arg 236 iz svih lanaca imaju mala odstupanja u geometriji dijela aminokiseline koja uključuje C_α atom. Zbog veličine aminokiselina i velikog stupnja slobode rotacije, neke aminokiseline tijekom snimanja nisu doprinijele difrakciji rentgenskog zračenja pa se u mapi elektronske gustoće javlja nedostatak elektronske gustoće na njihovim mjestima. Program zbog toga pozicionira aminokiseline u položaj u kojemu ona ima najnižu energiju na uštrb geometrije.

Tablica 17. Podatci rentgenske strukturne analize i statistika utočnjavanja za *Hp*FlgD

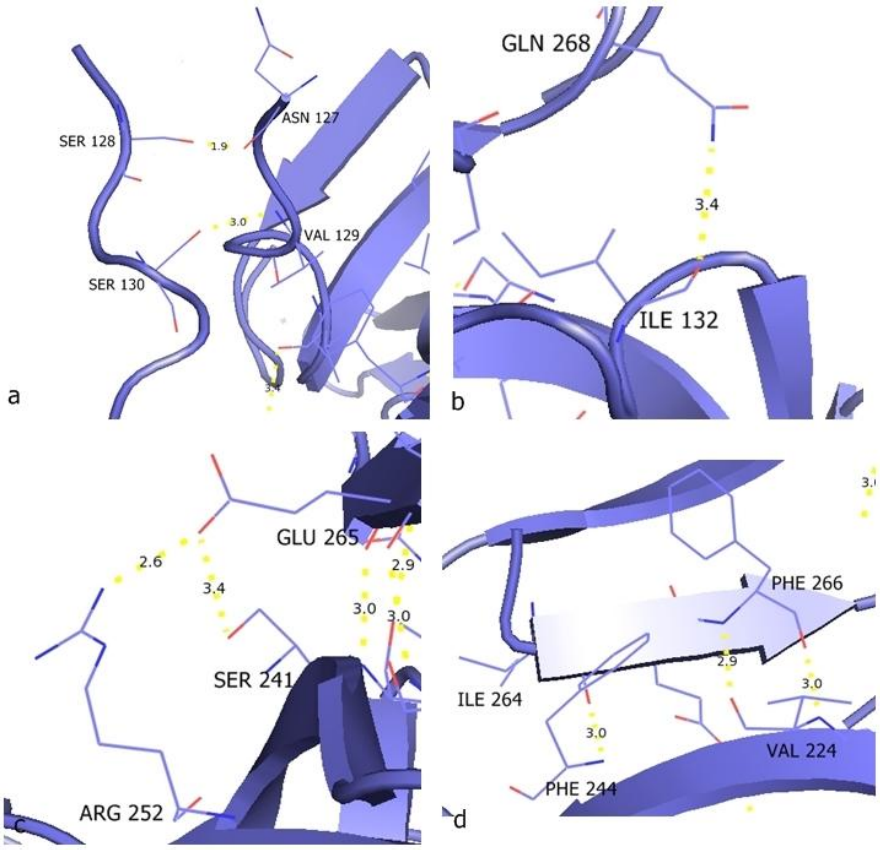
Sustav	Monoklinski	**Prostorna grupa**	*P*2	**Z**	2
Dimenzije elementarne ćelije					
a/Å			77,372		
b/Å			33,508		
c/Å			133,327		
β/°			99,03		
Valna duljina /Å			0,99888		
Rezolucija /Å			43,89 – 2,87		
Ukupno refleksa			26259		
Jedinstvenih refleksa			11318		
Multiplicitet			2,3		
R_{merge}			0,053		
Utočnjavanje					
Rezolucija /Å			43,89 – 2,87		
R_{free}			0,255		
R_{work}			0,219		
Standardna devijacija veza (rmsd) /Å			0,010		
Standardna devijacija kuteva veza (rmsd) /°			1,359		

5. RASPRAVA

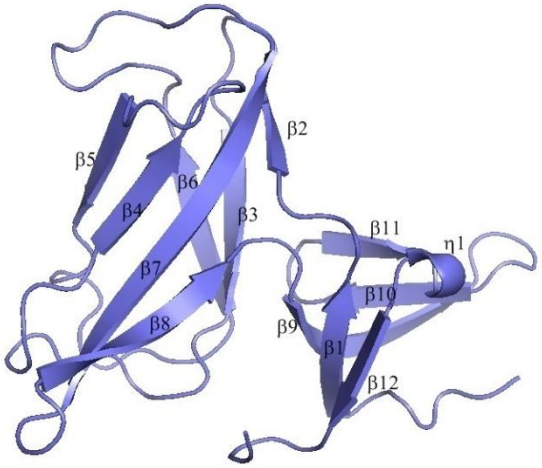
Asimetrična jedinica sadrži 4 molekule proteina (i 8 molekula vode), a kvaterna struktura proteina može se opisati tetramerom (slika 28). Monomeri unutar tetramera povezani su polarnim kontaktima sljedećih aminokiselina: Asn 127 i Ser 128, Val 129 i Ser 130, Val 132 i Gln 268, Ser 241 i Arg 252 s Glu 265, Ile 264 i Phe 244, Phe 266 i Val 242 (slika 29). Monomer proteina *Hp*FlgD čine dvije domene: Fibronektinska domena III (Fn III) i Tudor domena građene uglavnom od β ploča koje su povezane petljama. Unutar strukture nalazi se jedan vrlo kratki segment α zavojnice na C–terminalnom kraju. Tudor domenu čini 5 β ploča i kratki segment α zavojnice dok je Fn III domena bačvastog oblika i čine ju 7 β ploča (slika 30). Unutar tudor domene (β9 i β12) su aminokiseline koje su zaslužne za stvaranje tetramera i nalaze se na N– i C–kraju. Razlika između *Hp*FlgD, *Pa*FlgD i *Xc*FlgD je u tome što u kristalnoj strukturi *Pa*FlgD i *Xc*FlgD tvore dimere.[2,13] 20 aminokiselina je zaslužno za stvaranje interakcija između monomera u dimeru *Xc*FlgD i *Pa*FlgD što je mnogo više, nego u dimeru *Hp*FlgD, a manje no u tetrameru.



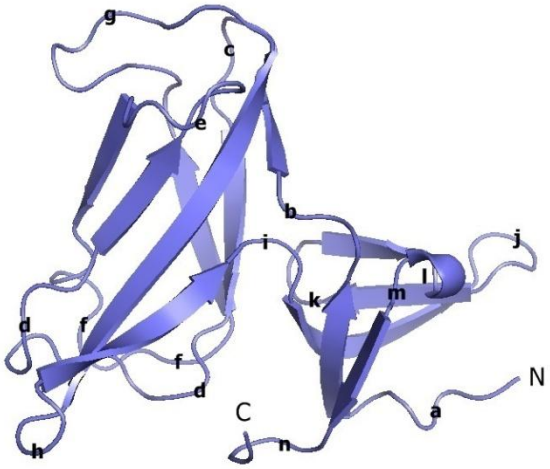
Slika 28. Tetramer proteina *Hp*FlgD



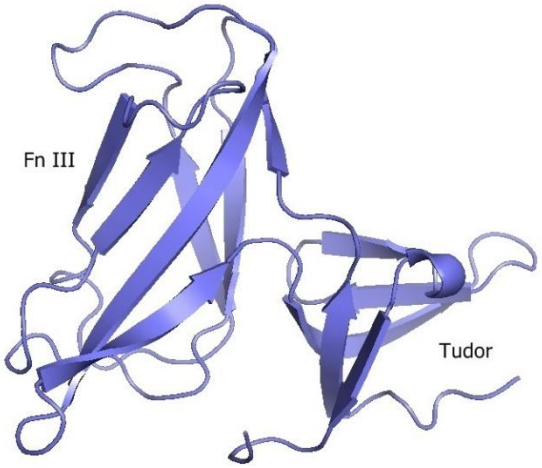
Slika 29. Polarni kontakti monomera u tetrameru proteina *Hp*FlgD unutar kristalne rešetke



a



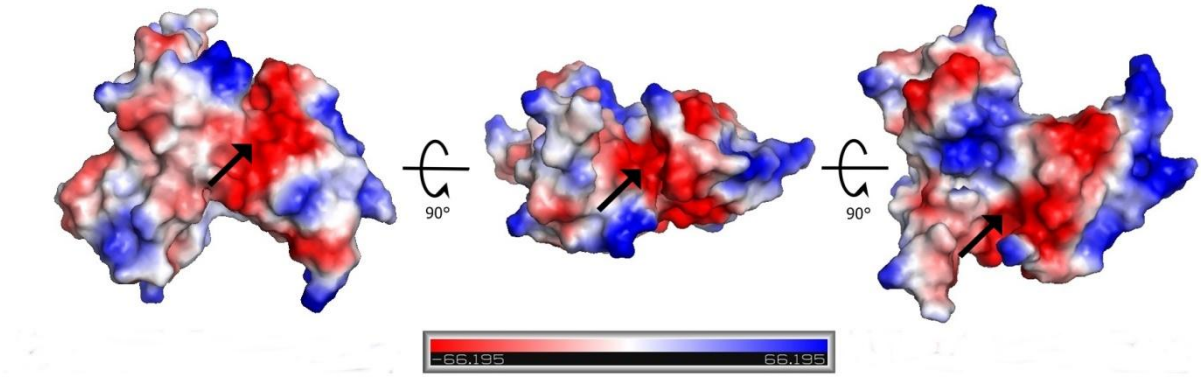
b



c

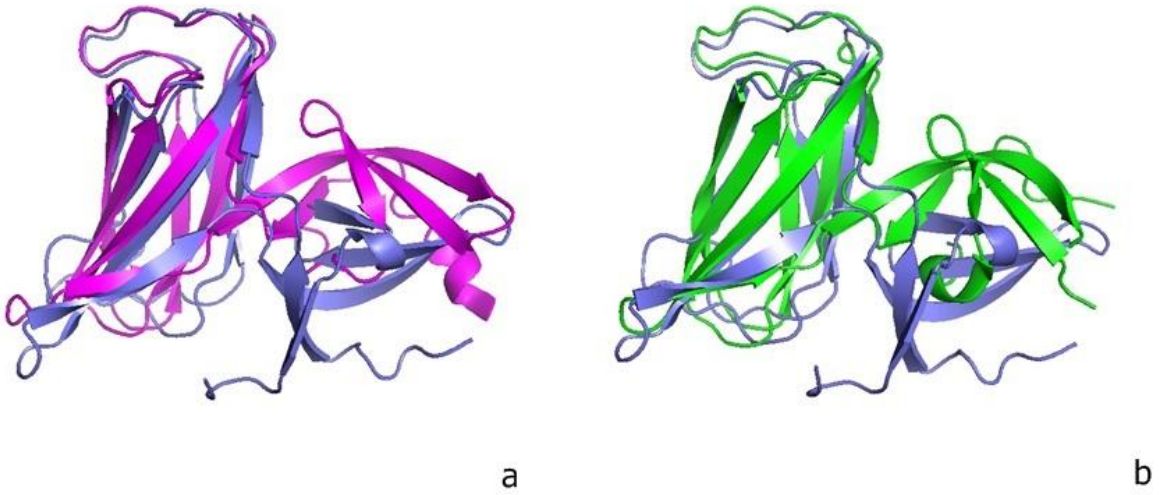
Slika 30. Elementi sekundarne strukture u monomeru *Hp*FlgD; (a) β ploče i α zavojnice, (b) petlje, N– i C–krajevi, (c) domene, Tudor domena i fibronektinska domena III (Fn III)

Generiranjem površinskog naboja proteina *Hp*FlgD dobiva se elektrostatski potencijal molekule. Iz slike 31 jasno se vidi postojanje negativno nabijenog utora. Utor ne sudjeluje u stvaranju polarnih kontakata u tetrameru te se može pretpostaviti da igra ulogu u funkciji proteina i služi kao mjesto kontakta sa proteinima koji također sudjeluju u izgradnji kuke biča ili je mjesto interakcija s manjim organskim molekulama. Ova karakteristika je prisutna i kod *Xc*FlgD i *Pa*FlgD.[2,13] Pozitivno nabijeni kraj molekule sudjeluje u stvaranju polarnih kontakata između monomera u tetrameru.



Slika 31. Elektrostatski potencijal proteina *Hp*FlgD

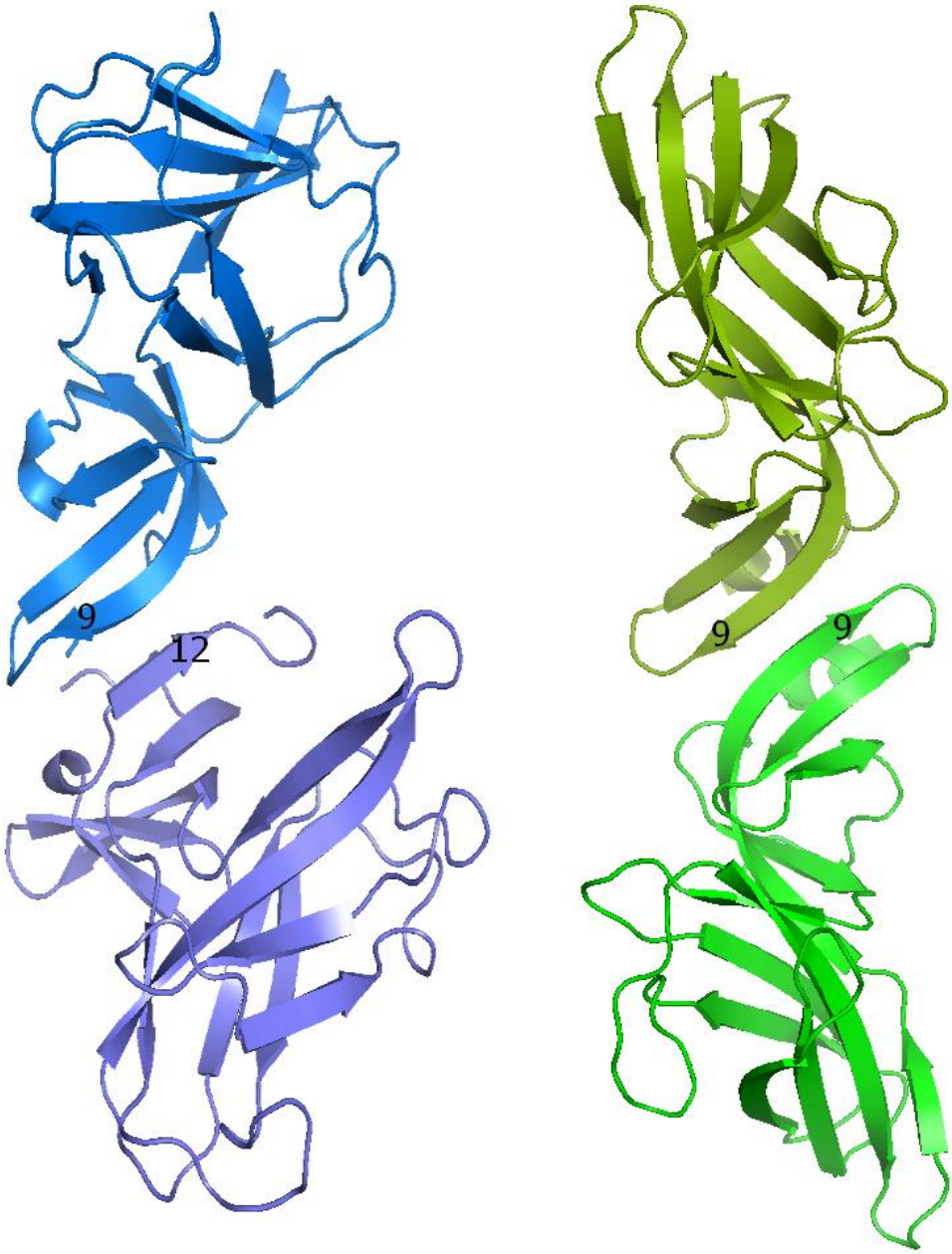
Sličnost proteinske sekvence *Hp*FlgD i *Pa*FlgD iznosi 34%, a sličnost strukturnih modela iznosi rmsd = 4,866 Å za 92 C_α atoma (slika 32 a) dok sličnost proteinske sekvence *Hp*FlgD i *Xc*FlgD iznosi 28%, a sličnost strukturnih modela iznosi rmsd = 5,492 Å za 71 C_α atom (slika 32 b). Tudor domena modela *Hp*FlgD je zakrenuta za razliku od modela *Xc*FlgD i *Pa*FlgD dok su im Fn III domene vrlo slične i dobro se preklapaju u oba slučaja. *Hp*FlgD kao i *Xc*FlgD na C-terminalnom kraju sadrži kratku α zavojnicu dok se ona u *Pa*FlgD ne nalazi.



Slika 32. Preklopljeni strukturni modeli (a) *Hp*FlgD (plavo) i *Pa*FlgD (ružičasto), (b) *Hp*FlgD (plavo) i *Xc*FlgD (zeleno).

Nakon izvedenih eksperimenata i dobivenih rezultata može se zaključiti da, iz niza postavljenih kristalizacija, protein *Hp*FlgD kao i tripsinom obrađeni *Hp*FlgD daje kristale pri pH 7 i udjelu precipitanta PEG 1500 (*w*/*v*) od 21, 22, 25 i 28%. Kristali tripsinom obrađenog proteina *Hp*FlgD nastaju pri temperaturi od 4 °C i koncentraciji od 6,2 mg mL^{-1} u vremenu od 2 mjeseca dok kristali nativnog proteina *Hp*FlgD nastaju pri koncentraciji od 15,5 mg mL^{-1}, temperaturi od 16 °C i vremenu od 2 mjeseca. U slučaju *Pa*FlgD kristali su dobiveni u uvjetu 0,1 M MES pH 6,6 i 18% (*w*/*v*) PEG 6000 u vremenu od 3 dana i pri 24 °C, dok su u slučaju *Xc*FlgD kristali nastali u dva različita uvjeta: 1,7 M natrijev acetat i 0,1 M natrijev kakodilat te 2,5 M natrijev klorid, 0,1 M Tris pH 7,0 i 0,2 M magnezijev klorid u vremenu od 14 dana i pri 20 °C.[2,13] Važnu ulogu tijekom stvaranja kristala imaju temperatura i koncentracija proteina jer uslijed naglih promjena temperature dolazi do otapanja kristala, a niže koncentracije proteina onemogućuju nastajanje kristala.

Riješena struktura proteina *Hp*FlgD pokazuje slične karakteristike kao i poznate dvije strukture proteina *Xc*FlgD i *Pa*FlgD, te ju čini kraća verzija proteina od 146 aminokiselina (127–274), dakle bez N– i C– kraja proteina. Istu takvu karakteristiku pokazuju *Pa*FlgD sa 135 aminokiselina (102–236) i *Xc*FlgD sa 138 aminokiselina (84–221).[2,13] Struktura proteina *Hp*FlgD je riješena do rezolucije od 2,87 Å i pokazuje da se molekule monomera unutar kristalne rešetke povezuju u tetramer. Monomer *Hp*FlgD se sastoji iz dvije domene, Tudor i Fn III. Model također sadrži kratku α zavojnicu na C-terminalnom kraju što je karakteristika proteina *Xc*FlgD, ali ne i proteina *Pa*FlgD. Elektrostatski potencijal molekule pokazuje negativno nabijeni utor što je karakteristika svih do sada riješenih strukura proteina FlgD. Budući da utor ne služi za povezivanje monomera u tetramer, može se pretpostaviti da igra ulogu u funkciji proteina i služi kao mjesto kontakta sa proteinima koji također sudjeluju u izgradnji kuke biča ili je mjesto interakcija s manjim organskim molekulama. Rotirana orijentacija domene Tudor je mogući razlog zbog kojega *Hp*FlgD može tvoriti tertramer, a *Xc*FlgD i *Pa*FlgD ne mogu. *Xc*FlgD i *Pa*FlgD su u kristalnoj strukturi u obliku dimera (slika 33). [2,13]



Slika 33. Dimer *Hp*FlgD (plave nijanse) i dimer *Xc*FlgD (zelene nijanse) s označenim β pločama zaduženim za ostvarivanje kontakata između monomera

Protein FlgD se u otopini nalazi u obliku dimera, kao i PaFlgD i XcFlgD,[2,13] te se pokazao iznimno stabilnim. Nakon 5 mjeseci stajanja na sobnoj temperaturi protein je pokazao iznimnu stabilnost bez znakova degradacije. Sastavnica kristalizacijske otopine, PEG 1500, ne potiče njegovu degradaciju, dok ju SPG pufer nižih pH vrijednosti (pH 4) potiče, što je i za očekivati jer većina proteina nije stabilna pri niskim vrijednostima pH. Vrijednosti pH od 6 na više ne utječu na njegovu stabilnost. Razlog kristalizacije samo centralnog dijela proteina je vjerojatno u spontanoj degradaciji N– i C–terminalnog kraja proteina.

6. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu je pokazano da se protein FlgD iz bakterije *H. pylori* može prekomjerno proizvesti koristeći ekspresijski pET sustav bakterije *E. coli*, te biokemijskim tehnikama pročistiti do zadovoljavajuće čistoće za kristalizacijski eksperiment. Rezultati ovog istraživanja dali su uvid u stabilnost proteina *Hp*FlgD, dobre smjernice za daljnje kristalizacijske eksperimente proteina te podatke o trodimenzionalnoj strukturi monoklinske forme skraćene verzije proteina. Kristalna struktura proteina *Hp*FlgD ukazala je na značajnu razliku orijentacije Tudor i Fn-III domene u odnosu na orijentaciju tih domena u do sada poznatim strukturnim homolozima (*Xc*FlgD i *Pa*FlgD).
Ovi rezultati su doprinos strukturnoj karakterizaciji proteina uključenih u patogenost *H. pylori* koji se provode na Zavodu za opću i anorgansku kemiju.

7. LITERATURNA VRELA

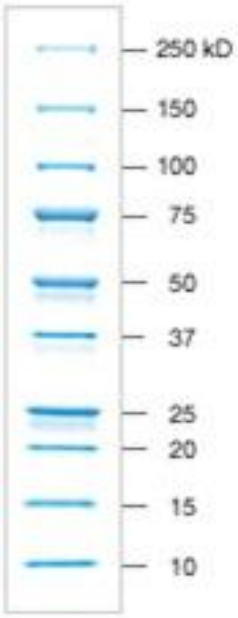
1. K. Ohnishi, Y. Ohto, S. Aizawa, R. M. Macnab, T. Iino, *J. Bacteriol.* **176** (1994) 2272–2281.
2. H. Zhou, M. Lou, X. Cai, J. Tang, S. Niu, W. Zhang, Y. Hu, Y. Yin, A. Huang, D. Wang, D. Wang, *Proteins* **79** (2011) 2346–2351.
3. B. Dunn, H. Cohen, M. J. Blaser, *Clin. Microbiol. Rev.* **10** (1997) 720–741.
4. L. M. Brown, *Epidemiol. Rev.* **22** (2000) 283–297.
5. H. Yoshiyama, T. Nakazawa, *Microbes Infect*. **2** (2000) 55-60.
6. S. Suerbaum, *Trends Microbiol.* **3** (1995) 168–171.
7. S. Suerbaum, P. Michetti, *N. Engl. J. Med.* **347** (2002) 1175–1186.
8. URL: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/pluym_evan/pictures/H%20pylori%20DJ.jpg, 11. studenoga 2015.
9. I. Pulić, V. Loconte, G. Zanotti, *Am. J. Biochem. Biotechnol*. **10** (2014) 143–161.
10. A. Blocker, K. Komoriya, S.-I. Aizawa, *PNAS* **100** (2003) 3027–3030.
11. P. W. O'Toole, M. C. Lane, S. Porwollik, *Microbes Infect*. **2** (2000) 1207–1214.
12. R. M. Macnab, Annu. Rev. Microbiol. **57** (2003) 77–100.
13. W.-T. Kuo, K.-H. Chin, W.-T. Lo, A. H.-J. Wang, S.-H. Chou, *J. Mol. Biol*. **381** (2008) 189–199.
14. URL: http://4.bp.blogspot.com/-J-aXOkkJq_I/U4pAozvmjiI/AAAAAAAAAlo/edBJOik-l-U/s1600/1.png, 11. studenoga 2015.
15. A. McPherson, *Macromolecular Crystallography*, 2nd ed., A John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, 2009.
16. I. Pulić, *Kristalizacija proteina - metode pripreme kristala proteina pogodnog za rentgensku difrakciju na jediničnom kristalu*, Kemijski seminar I, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2012.
17. L. Vuković, *Pročišćavanje i određivanje uvjeta kristalizacije seril-tRNA sintetaze iz Saccharomyces cerevisiae*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2005. pp 21–33.
18. J. Drenth, *Principles of Protein X-Ray Crystallography*, 3rd ed., Springer Science+Business Media, LLC, New York, 2007.

19. URL: http://www.nature.com/nchem/journal/v3/n5/fig_tab/nchem.1031_F8.html, 11. studenoga 2015.
20. URL: https://publish.illinois.edu/x-raycrystallography/2014/12/18/introduction/, 11. studenoga 2015.
21. URL: http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_06-en.html, 12. studenoga 2015.
22. URL: http://faculty.washington.edu/stenkamp/bstr515/btintro.html, 12. studenoga 2015.
23. J. Navaza, *Acta Cryst.* **A50**, (1994) 157–163.
24. W. Kabsch, *Acta Cryst.* D**66**, (2010) 125–132.
25. M. D. Winn et al., *Acta. Cryst.* **D67**, (2011) 235–242.
26. G.N. Murshudov, A.A.Vagin and E.J.Dodson, *Acta. Cryst*. **D53**, (1997) 240–255.
27. Emsley P, Lohkamp B, Scott W, Cowtan K, *Acta. Cryst.* **D66**, (2010) 486–501.
28. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

8. PRILOG

I. Standard molekulskih masa proteina
II. Popis kristalizacijskih uvjeta *PACT suite*
III. Fotografije kristala snimljene pomoću mikroskopa (Olympus, SZX 12) pod povećanjem 1,6 × i fotoaparata (Olympus, SGX 12) na Zavodu za opću i anorgansku kemiju.

I.



Slika 1. Standard molekulskih masa proteina

II.

The PACT Suite Composition Table

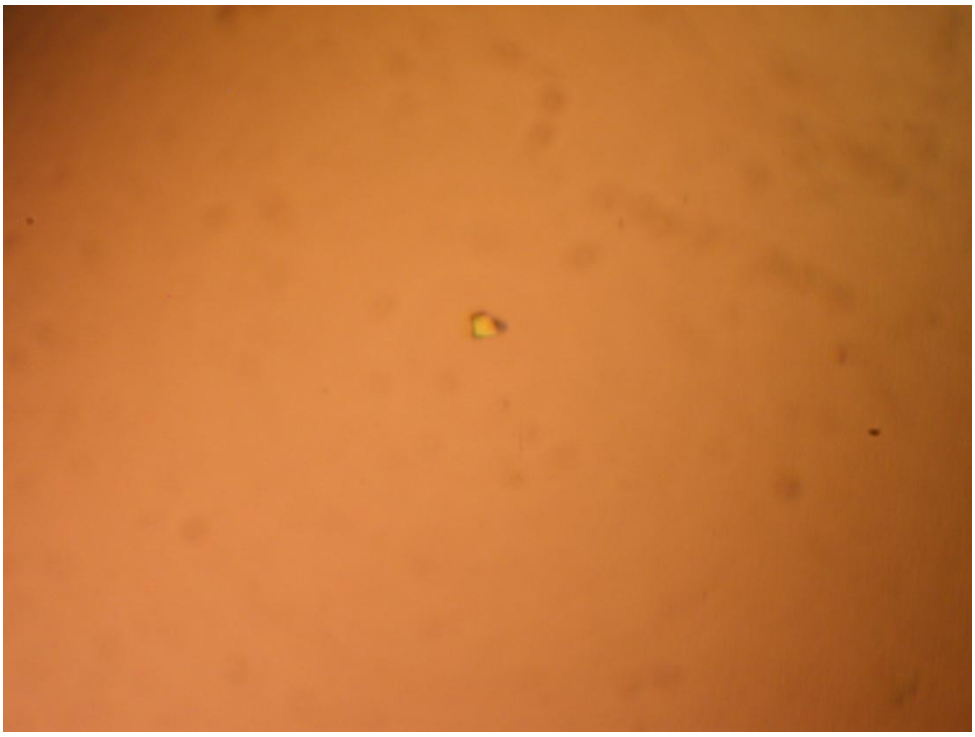
Number	Salt	Buffer	Precipitant	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
1		0.1 M SPG buffer pH 4	25% (w/v) PEG 1500	135701
2		0.1 M SPG buffer pH 5	25% (w/v) PEG 1500	135702
3		0.1 M SPG buffer pH 6	25% (w/v) PEG 1500	135703
4		0.1 M SPG buffer pH 7	25% (w/v) PEG 1500	135704
5		0.1 M SPG buffer pH 8	25% (w/v) PEG 1500	135705
6		0.1 M SPG buffer pH 9	25% (w/v) PEG 1500	135706
7	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 5	20% (w/v) PEG 6000	135707
8	0.2 M Ammonium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 5	20% (w/v) PEG 6000	135708
9	0.2 M Lithium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 5	20% (w/v) PEG 6000	135709
10	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 5	20% (w/v) PEG 6000	135710
11	0.2 M Calcium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 5	20% (w/v) PEG 6000	135711
12	0.01 M Zinc chloride	0.1 M Sodium acetate pH 5	20% (w/v) PEG 6000	135712
13		0.1 M MIB buffer pH 4	25% (w/v) PEG 1500	135713
14		0.1 M MIB buffer pH 5	25% (w/v) PEG 1500	135714
15		0.1 M MIB buffer pH 6	25% (w/v) PEG 1500	135715
16		0.1 M MIB buffer pH 7	25% (w/v) PEG 1500	135716
17		0.1 M MIB buffer pH 8	25% (w/v) PEG 1500	135717
18		0.1 M MIB buffer pH 9	25% (w/v) PEG 1500	135718
19	0.2 M Sodium chloride	0.1 M MES pH 6	20% (w/v) PEG 6000	135719
20	0.2 M Ammonium chloride	0.1 M MES pH 6	20% (w/v) PEG 6000	135720
21	0.2 M Lithium chloride	0.1 M MES pH 6	20% (w/v) PEG 6000	135721
22	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M MES pH 6	20% (w/v) PEG 6000	135722
23	0.2 M Calcium chloride	0.1 M MES pH 6	20% (w/v) PEG 6000	135723
24	0.01 M Zinc chloride	0.1 M MES pH 6	20% (w/v) PEG 6000	135724
25		0.1 M PCB buffer pH 4	25% (w/v) PEG 1500	135725
26		0.1 M PCB buffer pH 5	25% (w/v) PEG 1500	135726
27		0.1 M PCB buffer pH 6	25% (w/v) PEG 1500	135727
28		0.1 M PCB buffer pH 7	25% (w/v) PEG 1500	135728
29		0.1 M PCB buffer pH 8	25% (w/v) PEG 1500	135729
30		0.1 M PCB buffer pH 9	25% (w/v) PEG 1500	135730
31	0.2 M Sodium chloride	0.1 M HEPES pH 7	20% (w/v) PEG 6000	135731
32	0.2 M Ammonium chloride	0.1 M HEPES pH 7	20% (w/v) PEG 6000	135732
33	0.2 M Lithium chloride	0.1 M HEPES pH 7	20% (w/v) PEG 6000	135733
34	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M HEPES pH 7	20% (w/v) PEG 6000	135734
35	0.2 M Calcium chloride	0.1 M HEPES pH 7	20% (w/v) PEG 6000	135735
36	0.01 M Zinc chloride	0.1 M HEPES pH 7	20% (w/v) PEG 6000	135736
37		0.1 M MMT buffer pH 4	25% (w/v) PEG 1500	135737
38		0.1 M MMT buffer pH 5	25% (w/v) PEG 1500	135738
39		0.1 M MMT buffer pH 6	25% (w/v) PEG 1500	135739
40		0.1 M MMT buffer pH 7	25% (w/v) PEG 1500	135740
41		0.1 M MMT buffer pH 8	25% (w/v) PEG 1500	135741
42		0.1 M MMT buffer pH 9	25% (w/v) PEG 1500	135742
43	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Tris pH 8	20% (w/v) PEG 6000	135743
44	0.2 M Ammonium chloride	0.1 M Tris pH 8	20% (w/v) PEG 6000	135744
45	0.2 M Lithium chloride	0.1 M Tris pH 8	20% (w/v) PEG 6000	135745
46	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Tris pH 8	20% (w/v) PEG 6000	135746
47	0.2 M Calcium chloride	0.1 M Tris pH 8	20% (w/v) PEG 6000	135747
48		0.1 M Tris pH 8	20% (w/v) PEG 6000	135748

The PACT Suite Composition Table

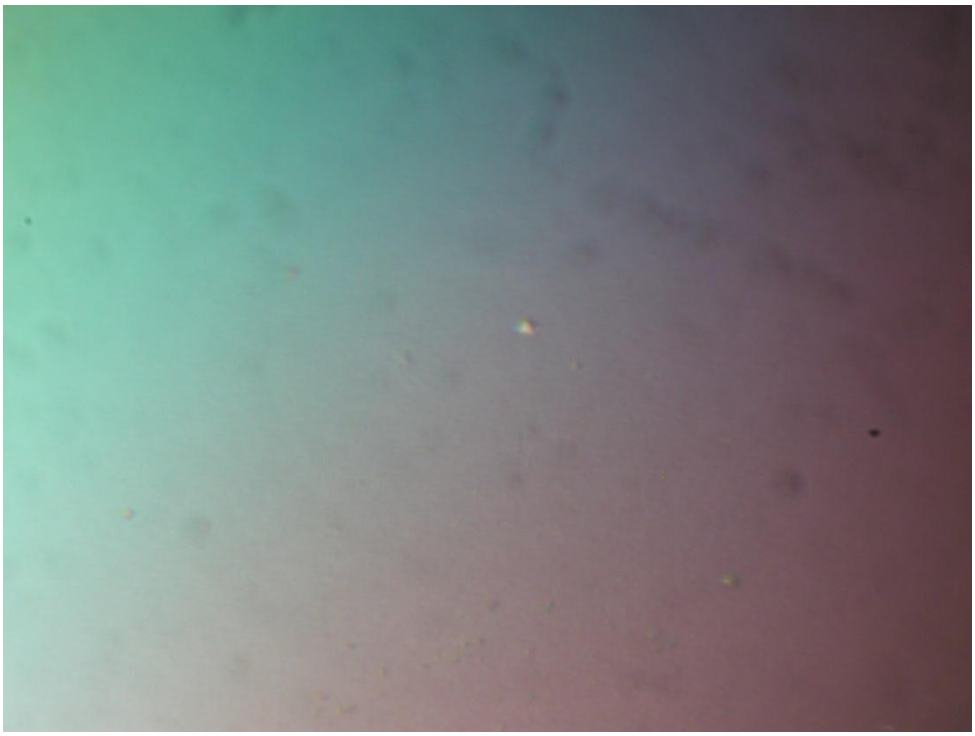
Number	Salt	Buffer	Precipitant	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
49	0.2 M Sodium fluoride		20% (w/v) PEG 3350	135749
50	0.2 M Sodium bromide		20% (w/v) PEG 3350	135750
51	0.2 M Sodium iodide		20% (w/v) PEG 3350	135751
52	0.2 M Potassium thiocyanate		20% (w/v) PEG 3350	135752
53	0.2 M Sodium nitrate		20% (w/v) PEG 3350	135753
54	0.2 M Sodium formate		20% (w/v) PEG 3350	135754
55	0.2 M Sodium acetate		20% (w/v) PEG 3350	135755
56	0.2 M Sodium sulfate		20% (w/v) PEG 3350	135756
57	0.2 M Potassium/sodium tartrate		20% (w/v) PEG 3350	135757
58	0.2 M Sodium/potassium phosphate		20% (w/v) PEG 3350	135758
59	0.2 M Sodium citrate		20% (w/v) PEG 3350	135759
60	0.2 M Sodium malonate		20% (w/v) PEG 3350	135760
61	0.2 M Sodium fluoride	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135761
62	0.2 M Sodium bromide	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135762
63	0.2 M Sodium iodide	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135763
64	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135764
65	0.2 M Sodium nitrate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135765
66	0.2 M Sodium formate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135766
67	0.2 M Sodium acetate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135767
68	0.2 M Sodium sulfate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135768
69	0.2 M Potassium/sodium tartrate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135769
70	0.2 M Sodium/potassium phosphate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135770
71	0.2 M Sodium citrate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135771
72	0.2 M Sodium malonate	0.1 M Bis Tris propane pH 6.5	20% (w/v) PEG 3350	135772
73	0.2 M Sodium fluoride	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135773
74	0.2 M Sodium bromide	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135774
75	0.2 M Sodium iodide	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135775
76	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135776
77	0.2 M Sodium nitrate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135777
78	0.2 M Sodium formate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135778
79	0.2 M Sodium acetate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135779
80	0.2 M Sodium sulfate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135780
81	0.2 M Potassium/sodium tartrate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135781
82	0.2 M Sodium/potassium phosphate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135782
83	0.2 M Sodium citrate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135783
84	0.2 M Sodium malonate	0.1 M Bis Tris propane pH 7.5	20% (w/v) PEG 3350	135784
85	0.2 M Sodium fluoride	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135785
86	0.2 M Sodium bromide	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135786
87	0.2 M Sodium iodide	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135787
88	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135788
89	0.2 M Sodium nitrate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135789
90	0.2 M Sodium formate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135790
91	0.2 M Sodium acetate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135791
92	0.2 M Sodium sulfate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135792
93	0.2 M Potassium/sodium tartrate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135793
94	0.2 M Sodium/potassium phosphate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135794
95	0.2 M Sodium citrate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135795
96	0.2 M Sodium malonate	0.1 M Bis Tris propane pH 8.5	20% (w/v) PEG 3350	135796

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

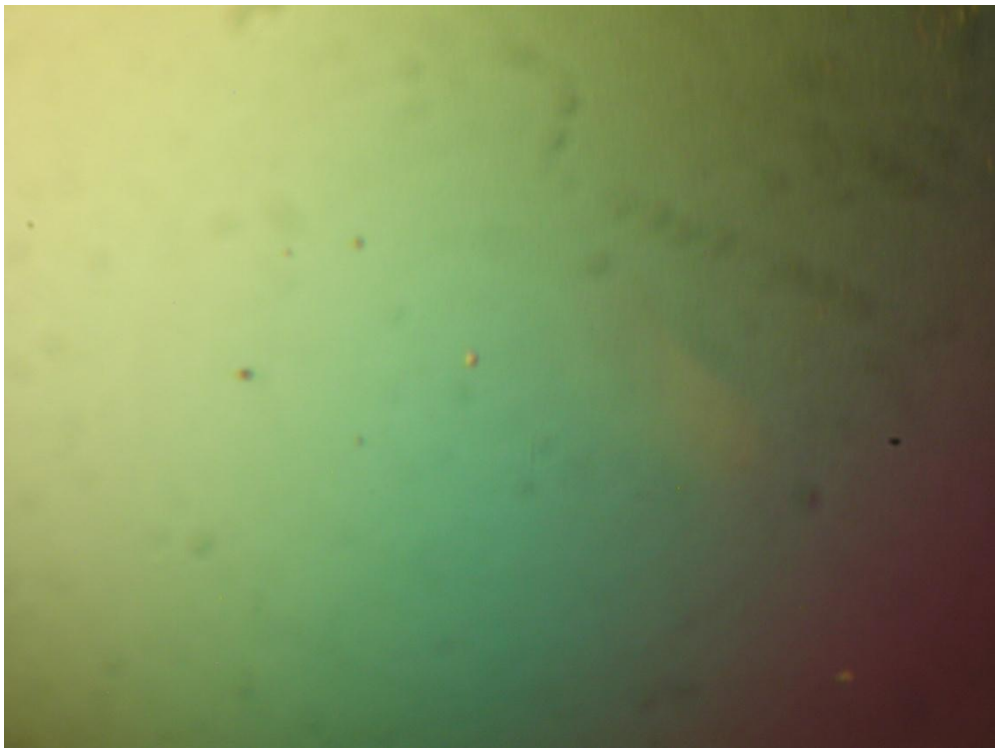
III.



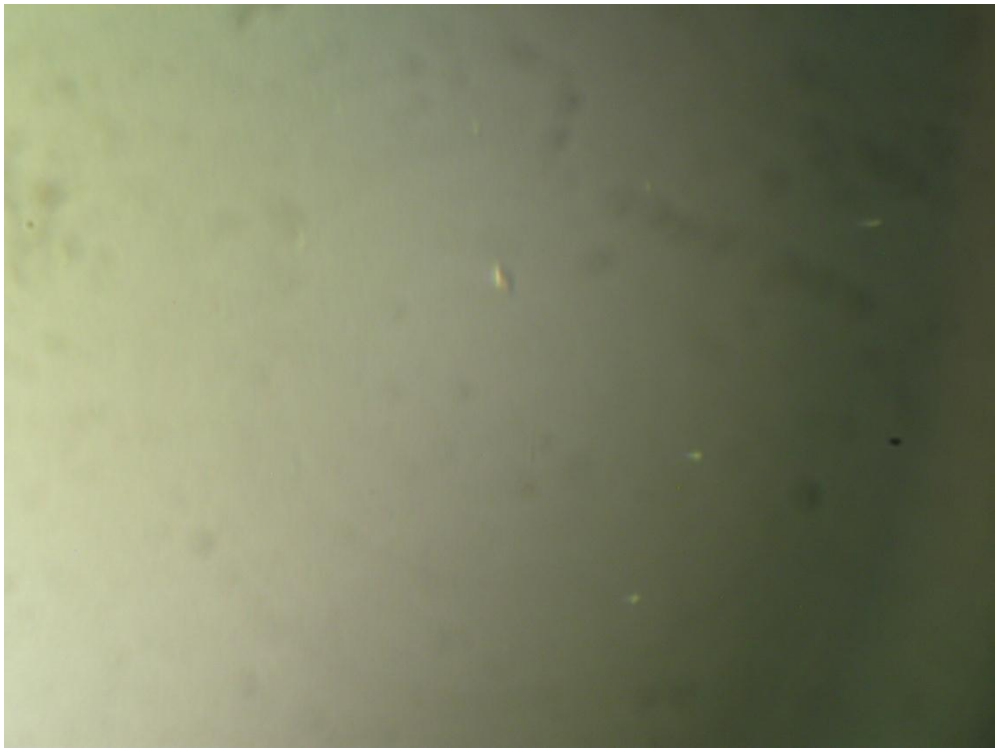
Slika 1. Kristalić tripsinom obrađenog proteina FlgD, C1



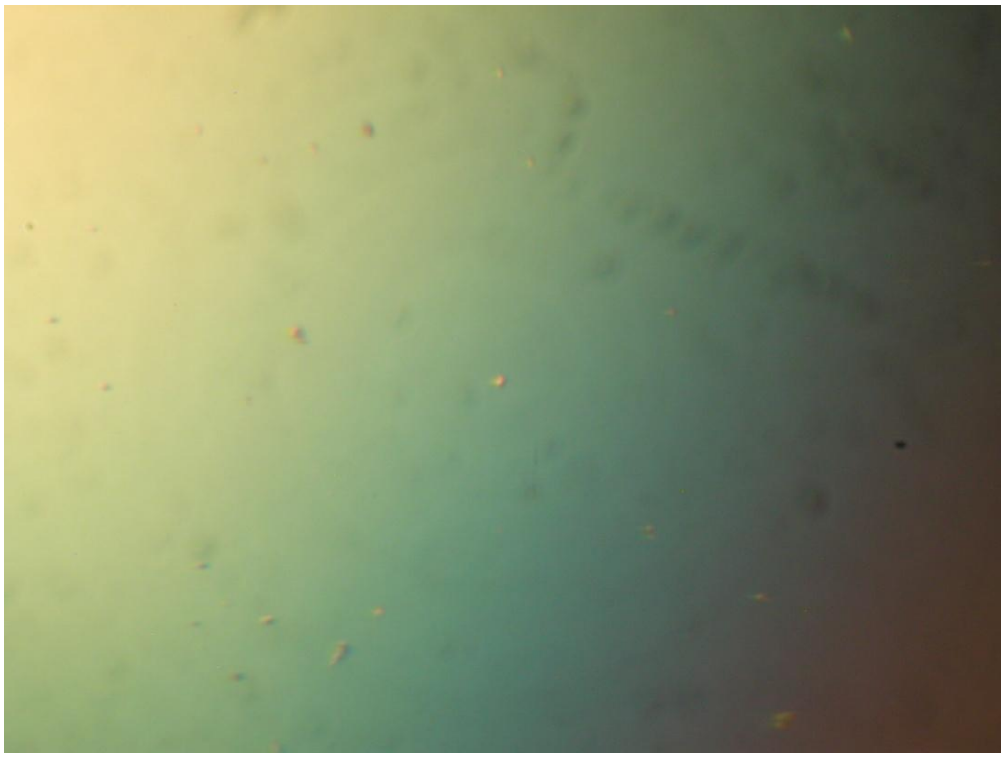
Slika 2. Kristalić proteina FlgD, A6



Slika 3. Kristalić proteina FlgD, A5



Slika 4. Kristalići tripsinom obrađenog proteina FlgD, C3



Slika 5. Kristalići tripsinom obrađenog proteina FlgD, C2

ŽIVOTOPIS

Rođen sam 13. travnja 1991. u Osijeku. Pohađao sam osnovnu školu 'Grigor Vitez' nakon koje upisujem 'II. (jezičnu) Gimnaziju Osijek'. Nakon srednjoškolskog obrazovanja upisujem Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, smjer molekularna biologija na kojemu studiram do danas. Godine 2014./2015. sudjelujem u međunarodnoj razmjeni studenata programa za razmjenu studenata Erasmus + te studiram na University of South Bohemia. Po povratku sa studentske razmjene započinjem sa izradom diplomskog rada pod voditeljstvom Prof. dr. sc. Dubravke Matković-Čalogović.