

Određivanje interakcije bakrovih iona i proteina CrdA iz bakterije *Helicobacter pylori*

Faletar, Mihovil

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:415997>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Mihovil Faletar

**ODREĐIVANJE INTERAKCIJE BAKROVIH
IONA I PROTEINA CrdA IZ BAKTERIJE
*HELICOBACTER PYLORI***

Diplomski rad

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

Zagreb, 2019.

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

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta HRZZ pod nazivom *Esencijalni metalni ioni u proteinima iz Helicobacter pylori i modelni kompleksni spojevi - struktura i funkcija/svojstvo* (HRZZ-IP-2014-09-4274).

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Dubravki Matković-Čalogović na pristupačnosti, strpljenju, pruženoj prilici i mogućnosti rada u Laboratoriju za kristalografiju proteina.

Uvelike se zahvaljujem asistentici Ivani Kekez na iznimnom strpljenju, trudu i pozitivu. Pokazala mi je kako treba gledati naprijed u naizgled bezizlaznim situacijama i da nikada ne treba odustati.

Zahvaljujem se svim predavačima sa diplomskog studija. Također se zahvaljujem i predavačima sa preddiplomskog studija Odjela za kemiju, Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Veliko hvala Ireni koja je uvijek bila tu kad je trebalo pomoći.

Posebno se zahvaljujem svim kolegicama, kolegama i prijateljima na pomoći, riječima podrške i utjehe, korisnim savjetima i razgovorima, bez njih bi ovaj završetak studija bio nemoguć i nezamisliv.

Na kraju bih se zahvalio svojoj obitelji koja mi je u svim trenucima bila podrška, oslonac i uzor u koji sam uvijek bio ugledan.

Hvala mojoj Gospi koja me je uvijek podizala iz očaja i slabosti.

„Quis ut Deus?“

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. <i>Helicobacter pylori</i> i čovjek.....	2
2.2. Regulacija Fe ²⁺ iona u Hp-u	3
2.3. Uloga ureaze i proteina uključenih u regulaciju Ni ²⁺ iona u Hp-u	6
2.4. Regulacija Cu ²⁺ iona u Hp-u.....	8
2.5. Sustav za detekciju i održavanje ravnoteže bakrovih iona u bakterijskim stanicama	9
2.6. Protein CrdA	11
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijali korišteni u radu.....	13
3.1.1. Instrumenti	13
3.1.2. Markeri.....	13
3.1.3. Bakterijski soj i plazmid.....	13
3.1.4. Kemikalije	14
3.2. Metode dobivanja i obrade proteina	15
3.2.1. Priprema prekonocne kulture transformiranih stanica vektorima pETite N-His SUMO-G-CrdA i pGEX-CrdA.....	15
3.2.2. Prekomjerna ekspresija fuzijskih proteina SUMO-G-CrdA i GST-CrdA	15
3.2.3. Liza bakterijskih stanica	18
3.2.4. SDS – PAGE elektroforeza.....	19
3.3. Pročišćavanje i rezanje fuzijskih proteina SUMO-G-CrdA i GST-CrdA	21
3.3.1. Afinitetna kromatografija na imobiliziranoj fazi metalnih iona (engl. immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC).....	21
3.3.2. Afinitetna kromatografija korištenjem GSTrap™ HP kolone.....	23
3.3.3. Određivanje koncentracije proteina	24
3.3.4. Kromatografija isključenjem prema veličini (engl. size-exclusion chromatography, SEC)	24
3.3.5. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija.....	26
3.3.6. Metode izmjene pufera proteinâ SUMO-G-CrdA i GST-CrdA.	26
3.3.7. Cijepanje fuzijskog proteina SUMO-G-CrdA SUMO Express proteazom.....	27
3.3.8. Cijepanje GST-CrdA fuzijskog proteina PreScission proteazom.....	29
3.4. Određivanje stabilnosti SUMO-G-CrdA	29
3.4.1. Dinamičko raspršenje svjetlosti (Dinamic light scattering, DLS)	29

3.4.2. Ispitivanje stabilnosti proteina SUMO-G-CrdA pomoću Tycho uređaja.....	30
3.5. Određivanje interakcije proteina CrdA s bakrovim(II) ionima metodom termoforeze na mikroskali (Microscale thermophoresis, MST).....	31
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. Prekomjerna ekspresija fuzijskog proteina SUMO-G-CrdA	34
4.2. Prekomjerna ekspresija i afinitetna kromatografija fuzijskog proteina GST-CrdA korištenjem <i>GSTrap</i> TM HP kolone	37
4.3. Kromatografija isključenjem na temelju veličine čestica frakcija 2, 3 i 4 SUMO-G-CrdA dobivenih nakon prve afinitetne kromatografije (SEC, gel-filtracija).....	38
4.4. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija.....	42
4.5. Pročišćavanje proteina SUMO-G-CrdA IMAC 2. afinitetnom kromatografijom	43
4.6. Cijepanje fuzijskih proteina.....	44
4.6.1. Cijepanje fuzijskog proteina SUMO-G-CrdA SUMO Express proteazom i kromatografija isključenjem na temelju veličine čestica (gel-filtracija).....	44
4.6.2. Cijepanje GST-CrdA fuzijskog proteina PreScission proteazom i pročišćavanje afinitetnom kromatografijom pomoću <i>GSTrap</i> TM kolone.....	49
4.7. Ispitivanje stabilnosti SUMO-G_CrdA.....	51
4.7.1. Ispitivanje stabilnosti metodom DLS	51
4.7.2. Ispitivanje stabilnosti uređajem Tycho (NanoTemper).....	51
4.8. Ispitivanje interakcije CrdA i Cu ²⁺ iona metodom MST	52
§ 5. ZAKLJUČAK	54
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)	55
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	56
§ 8. ŽIVOTOPIS	61



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Određivanje interakcije bakrovih iona i proteina CrdA iz bakterije *Helicobacter pylori*

Mihovil Faletar

Proučavan je protein CrdA humanog patogena bakterije *Helicobacter pylori*. Smatra se da protein CrdA sudjeluje u transportu iona bakra. U svrhu ispitivanja mehanizma regulacije iona bakra u *H. pylori* i dobivanja proteina CrdA provedena je prekomjerna ekspresija dva fuzijska proteina SUMO-G-CrdA i GST-CrdA u bakteriji *Escherichia coli*. Provedena su pročišćavanja fuzijskih i porezanih proteina pomoću afinitetne kromatografije, gel-filtracije i ionsko-izmjenjivačke kromatografije. Optimizirane su metode rezanja i pročišćavanja u svrhu dobivanja što čistih uzoraka proteina CrdA. Ispitana je stabilnost fuzijskog proteina SUMO-G-CrdA mjerenjem temperature denaturacije proteina pri različitim uvjetima kao i DLS metodom. Ustanovljeno je da je najveća stabilnost fuzijskog proteina u otopini koja sadrži Cu^{2+} ione što bi moglo upućivati na stvaranje interakcije između proteina CrdA i Cu^{2+} iona. Ispitivanjem interakcije proteina CrdA i Cu^{2+} iona mikrotermoforezom određena je konstanta disocijacije kompleksa $\text{CrdA}:\text{Cu}^{2+}$ koja iznosi $7,98 (\pm 1,94) \mu\text{mol dm}^{-3}$.

(74 stranica, 34 slika, 18 tablica, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

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

Ključne riječi: bakar, CrdA, *Helicobacter pylori*, humani patogen, mikrotermoforeza

Mentor: prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, redoviti profesor u trajnom zvanju
Neposredni voditelj: dr. sc. Ivana Kekez

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović
 2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 3. doc. dr. sc. Morana Dulić
- Zamjena: prof. dr. sc. Biserka Prugovečki

Datum diplomskog ispita: 30. 09. 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Determination of interaction of copper ions and CrdA protein from *Helicobacter pylori*

Mihovil Faletar

Protein CrdA from the human pathogen *Helicobacter pylori* was studied. The CrdA protein is thought to participate in the transport of copper ions. In order to investigate the mechanism of copper ion regulation in *H. pylori* and to obtain the CrdA protein, overexpression of two fusion proteins SUMO-G-CrdA and GST-CrdA was performed in the *Escherichia coli*. Purification of fusion and cleaved proteins was performed using affinity chromatography, gel-filtration and ion-exchange chromatography. Cleavage and purification were optimized to obtain pure CrdA protein samples. Stability of the fusion protein SUMO-G-CrdA was tested by measuring change in the thermal denaturation temperature under varying conditions and by the DLS method. The highest stability of the fusion protein was found to be in the Cu^{2+} solution suggesting a possible interaction between the CrdA protein and Cu^{2+} ions. The protein complex $\text{CrdA}:\text{Cu}^{2+}$ dissociation constant was determined by microthermophoresis and its value was determined to be $7.98 (\pm 1.94) \mu\text{mol dm}^{-3}$.

(74 pages, 34 figures, 18 tables, 57 references, original in Croatian)

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

Keywords: CrdA, copper, *Helicobacter pylori*, human pathogen, microscale thermophoresis

Mentor: Prof. Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović

Assistant mentor: Dr. sc. Ivana Kekez

Reviewers:

1. Prof. Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović

2. Prof. Dr. sc. Iva Juranović Cindrić

3. Assist. Prof. Dr. sc. Morana Dulić

Substitute: Prof. Dr. sc. Biserka Prugovečki

Date of exam: 30. 09. 2019

§ 1. UVOD

Početkom prošlog stoljeća otkrivena je spiralna bakterija koju su tek 1980.-ih identificirali gastroenterolog Barry Marshall i patolog Robin Warren.¹ Za identifikaciju i povezanost bakterije sa gastritisom i ostalim težim i lakšim bolestima gastrointestinalnog sustava su dobili Nobelovu nagradu iz fiziologije i medicine 2005. godine.² Na temelju analize nukleotidne sekvence, strukture i morfologije, staničnih masnih kiselina, karakteristikama rasta i enzimskim aktivnostima Goodwin i suradnici predlažu svrstavanje novootkrivene spiralne Gram-negativne bakterije u novu obitelj *Helicobacter* i konačno dobiva ime *Helicobacter pylori* (Hp).³

H. pylori se od niskog pH, odnosno kisele sredine brani stvaranjem mikroklima višeg pH u okruženju stanice. Kada pH okoline bakterije padne ispod 6,5 bakterija otvara kanale u membrani kroz koje ulaze molekule uree. Brojnim ureazama *H. pylori* razgrađuje ureu te nastali amonijak neutralizira okolinu bakterije i na taj način povećava pH do vrijednosti koja je pogodna za razvoj bakterijskih stanica *H. pylori*.⁴

Kao i ostali metalni ioni, tako su i bakrovi ioni u *H. pylori* od velike važnosti za normalan rad i funkcioniranje svih enzima. *H. pylori* sadrži enzime u kojima se bakrovi ioni nalaze u aktivnom mjestu i bez njih bi enzimi izgubili svoju funkciju. Jedan primjer takvih enzima su oksidaze koje su vrlo važne u respiratornom sustavu bakterije. U održavanju homeostaze bakrovih iona sudjeluje više proteinskih sustava kao što su ATPaza P-tipa CopA, CrdA i CrdB, CopC, Czc proteinski sustav i drugi. Najslabije su istraženi CrdA i CrdB. Uspoređivanjem aminokiselinskog slijeda CrdA sa proteinom CopC očita je prisutnost konzerviranih sljedova koji sudjeluju u vezanju bakra. CrdA je sekrecijski protein, velik 13,8 kDa i pretpostavlja se da ima važnu ulogu u uklanjanju bakrovih iona iz bakterije.⁵ Protein CrdA iz *H. pylori* je eksprimiran u obliku fuzijskog proteina sa SUMO proteinom na N-kraju koji sadrži i His-privjesak koji omogućuje pročišćavanje proteina na temelju afinitetnog vezanja na Ni²⁺ ione imobilizirane na NTA-koloni. CrdA protein je također eksprimiran kao fuzijski protein s GST-proteinom na N-kraju koji se veže na molekule glutationa vezane na agarozu u koloni. U svrhu pročišćavanja provedena je i gel-filtracija kao i ionsko-izmjenjivačka kromatografija. Stabilnost fuzijskog proteina je ispitana DLS metodom i mjerenjem intrinzične fluorescencije proteina pri različitim temperaturama. Ispitivanje interakcije proteina CrdA s otopinom bakrovih iona se provodilo MST metodom.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

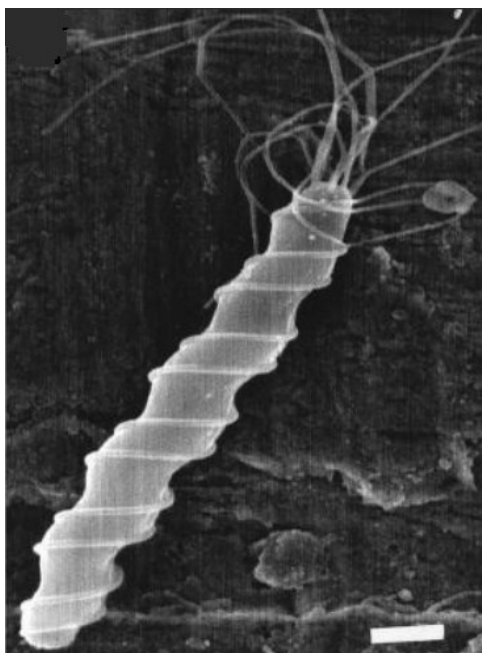
2.1. *Helicobacter pylori* i čovjek

Slučajnim uzgojem kulture bakterijskih stanica *Helicobacter pylori* (Hp) objavljeni su prvi opisi bakterije. Unatoč sličnim životnim uvjetima i sličnostima u genomskom sastavu, Hp ne pripada bakterijskoj porodici *Campylobacter* kao što se mislilo na samom početku. Baš kao i *Campylobacter* i Hp uzrokuje razne smetnje probavnog trakta, zbog toga je i sumnja na povezanost sa *Campylobacter* opravdana.² No razlike ipak postoje i vidljive su na morfološkoj razini. *Campylobacter* posjeduje jednostruke neovijene bičeve s jedne ili obje strane stanice dok Hp na jednom kraju stanice ima 2 - 5 ovijena biča,⁶ što ju čini vrlo pokretnom u viskoznom mediju^{6,7} (slika 1). Spiralni oblik, brojni adhezivni organeli i bičevi omogućuju bakteriji da se poput svrdla ugnijezdi u epitel želučane ovojnice. Kako bi se obranila od želučane kiseline, bakterija sadrži velik broj citoplazmatskih ureaza. Ispod pH 6,5 otvaraju se posebni kanali u membrani bakterijske stanice i omogućavaju ulazak i razgradnju uree ureazama. Amonijak proizveden hidrolizom uree neutralizira periplazmatski prostor kako bi se zadržao potencijal citoplazmatske membrane. Osim niskog pH, bakterija se mora oduprijeti i imunološkom obrambenom mehanizmu ljudskog tijela. Iako postoje urođena antitijela za Hp, imunološki odgovor napadnutih stanica je upalni proces, odnosno gastritis. Jačina upalnog procesa se razlikuje od soja do soja, ovisno o tome koliko bakterija eksprimira „zaraznih faktora“.^{1,7}

Hp je spiralna (slika 1) Gram–negativna bakterija s glatkom staničnom membranom koja može biti presvučena glikokaliksom, vanjskim staničnim slojem debljine od oko 40 nm, koji se sastoji od glikoproteina i glikolipida koji sudjeluju u održavanju strukture bakterijske stanice. Gledano s genetske strane, varijabilnost Hp sojeva je velika, a genotipi se mogu podijeliti prema geografskom položaju. Evolucija i razlikovanje sojeva Hp-a se može povezati evolucijom i seobom čovječanstva.⁷ Razlika među alelima u genomu Hp-a je vrlo velika, čak se razlikuju i genomi bakterija od čovjek do čovjeka, s time da je razlika između rodbinski povezanih osoba manja.⁸

Prije otkrića Hp bilo je uvriježeno mišljenje da je unutrašnjost želuca izolirana od mikroorganizama. Kad bi neki mikroorganizmi ipak i došli u unutrašnjost želuca, ne bi preživjeli zbog nepovoljnih uvjeta. Unatoč tomu, otkriveno je da Hp nastanjuje ljudski probavni trakt već tisućama godina i da je jedan od glavnih uzročnika bolesti kao što su smetnje gornjeg

gastrointestinalnog trakta, gastritisa, peptičkog ulkusa i limfoma želučane sluznice. Bitno za naglasiti je da je Hp proglašen kancerogenom prve kategorije.¹ Čovjek se zarazi Hp-om još kao dijete, iako se mehanizmi prijenosa samo pretpostavljaju. S obzirom da bakterijske stanice Hp majke i djeteta često imaju isti genotip, pretpostavlja se prijenos žvakanjem hrane, dodirima sa unutrašnjosti želuca (povraćanje) ili u dodiru sa izmetom. Ostali prijenosi bakterije mogu biti zagađenom hranom i vodom ili preko domaćih životinja.¹

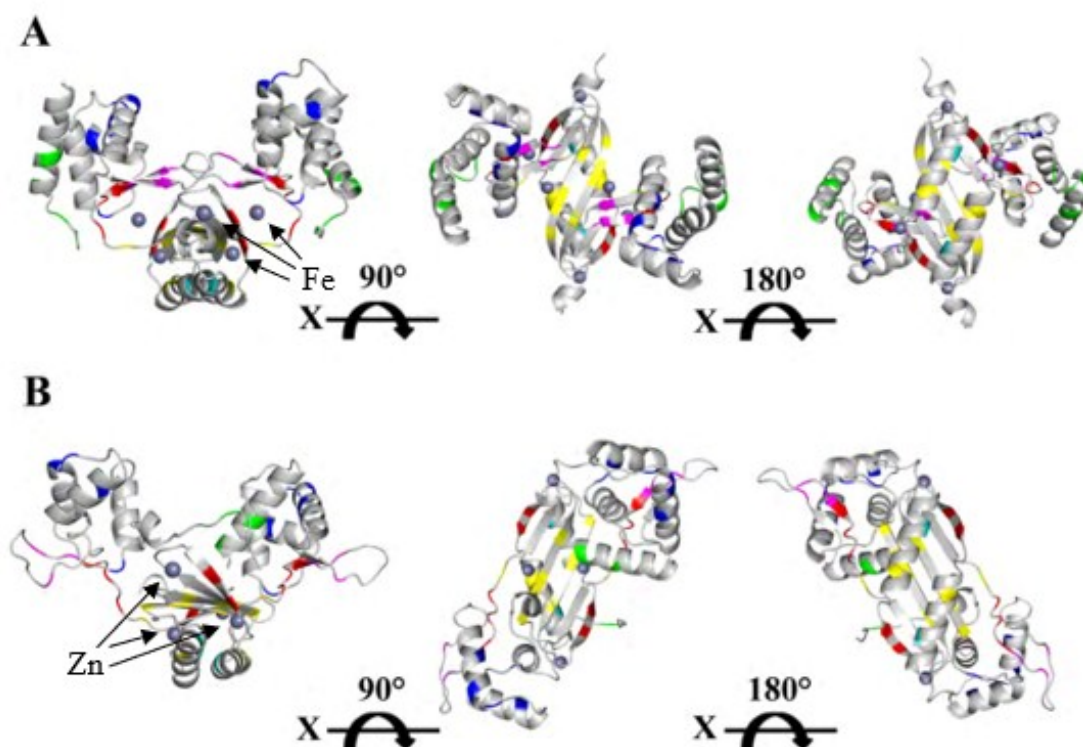


Slika 1. Prikaz bakterijske stanice *Helicobacter pylori* dobiven pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM). Vidljiva je spiralna struktura tijela bakterije i bičeva koji joj omogućavaju kretanje.⁹

2.2. Regulacija Fe^{2+} iona u Hp-u

Održavanje ravnoteže metalnih iona je od iznimne važnosti i za stanice domaćina i za Hp. Mnogi metalni ioni sudjeluju kao kofaktori proteina čija je uloga nezaobilazna u metabolizmu i zaštiti bakterijske stanice. Jedan od primjera je Fe^{2+} ion koji djeluje kao kofaktor u superoksid dismutazi (*SodB*) u Hp-u.^{10,11} Ioni metala u domaćinu su uglavnom u kompleksima sa proteinima, stoga su nametnici, kao što je Hp, morali izgraditi strategije dobivanja metalnih iona. Jedna od njih je sintetiziranje *siderofora*, kompleksa visokog afiniteta za vezanje iona metala kao i stvaranje sistema transporta istih. Druga strategija je upotreba proteinâ domaćina koji specifično vežu ione željeza (transferin, laktoferin, citrat, proteini koji sadrže hem, i dr.),

odnosno prepoznavanje i obrada proteina koji u sebi sadrže ione željeza (njihova oksidacija, približavanje membrani bakterije, i dr.). U čovjeku bi to bio hemoglobin, citokrom, razni transferini, feritini i drugi proteini.^{10,12} Ekspresija enzima koji sudjeluju u detekciji i vezanju Fe^{2+} iona je regulirana transkripcijskim regulatorima (TR). Jedan od njih je regulator unosa Fe^{3+} iona, Fur. Pri normalnom (fiziološkom) pH Fe^{2+} ioni se brzo oksidiraju u Fe^{3+} koji je u tim uvjetima netopljiv i veže se na transferin. U uvjetima niskog pH, kao što je želudac, topljivost Fe^{3+} se povećava. Povećana topljivost takvih oblika iona željeza omogućuje apsorpciju iona u bakterijsku stanicu. Fe^{3+} se u stanicama domaćina veže na feritin, protein koji „skladišti“ ione željeza.¹¹ Prema nekim istraživanjima¹³ pretpostavlja se redukcija Fe^{3+} iona prije ulaska u bakterijsku stanicu reduktazama u periplazmatskom prostoru. U unosu Fe^{2+} iona sudjeluje FeoB, transportni protein s velikim afinitetom vezanja iona željeza. Nakon unosa u bakterijsku stanicu Fe^{2+} ion se veže na već spomenuti regulator transkripcije Fur pri čemu nastaje Fe-Fur kompleks, Holo-Fur (slika 2). Nastali Holo-Fur se veže na konzervirani nukleotidni motiv 5-TAATAATnATTATTA-3' na bakterijskoj DNA i na taj način potiskuje ekspresiju enzima koji sudjeluju u unošenju iona željeza. U uvjetima nedostatka iona željeza protein Fur nije u mogućnosti vezati se na navedeni nukleotidni slijed, što rezultira povećanjem ekspresije enzima zaduženih za unos iona željeza, te povećanjem koncentracije iona željeza u bakterijskoj stanici. Fur koji nema vezani Fe^{2+} , Apo-Fur (slika 2), potiskuje transkripciju *pfr* gena koji nose kod za Pfr enzime koji imaju ulogu skladištenja iona željeza. Apo-Fur također potiskuje ekspresiju navedene superoksid-dismutaze koja stanicu štiti od djelovanja raznih radikala kisika.¹⁴ U slučaju kada je organizam u kojem se bakterijska stanica nalazi jedini izvor iona željeza, odnosno kad ioni željeza nisu prisutni kao slobodni ionu u bakterijskom okruženju, Hp luči virulencijske faktore CagA i VacA, koji uzrokuju mnoge promjene na stanicama domaćina. Takve promjene olakšavaju pristup bakterijske stanice ionima željeza u stanici domaćina. CagA ulaskom u epitelno tkivo domaćina biva podvrgnut tirozinskoj fosforilaciji pri čemu nastaje fosfo-CagA. Takav modificirani CagA aktivira nekoliko proteina, među kojima je stanična fosfataza (SHP-2) koja uzrokuje izduživanje i raspadanje stanice. Nemodificirani CagA uzrokuje gubitak stanične polarnosti, pojavu nefunkcionalnih agregata transmembranskih proteina i potiče ekspresiju proteina povezanih s nastankom kancerogenih stanica.

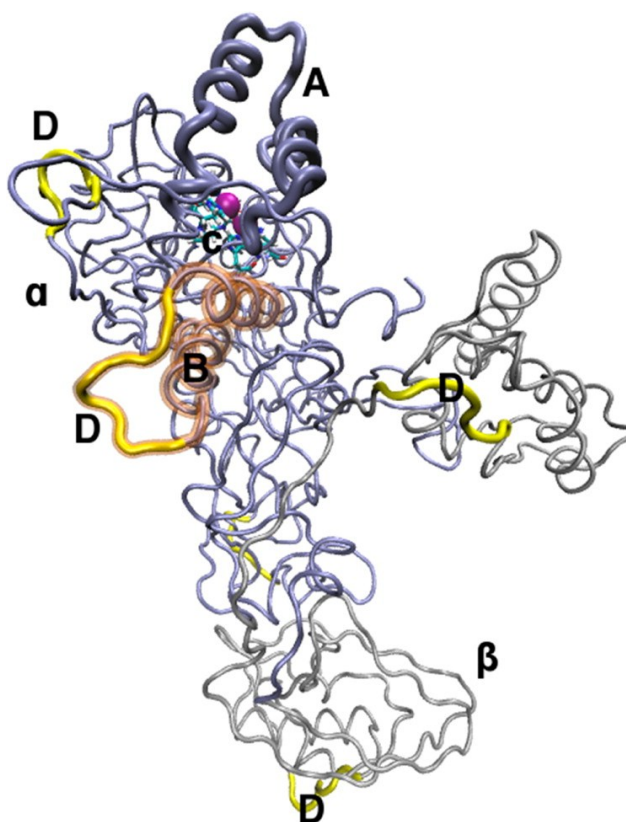


Slika 2. Prikaz struktura proteina Holo-Fur (A) (PDB ID: 5NHK) i Apo-Fur (B) (PDB ID: 2XIG).¹⁵

VacA u strukturi pretežno sadrži β -uzvojnice koje imaju ulogu stvaranja kanala u bakterijskim membranama (vanjskim i unutarnjim) odgovornih za unos različitih aniona. Iako mehanizam djelovanja VacA na stanice domaćina nije u potpunosti poznat, pretpostavlja se da ima veliku ulogu u početku infektivnog procesa. Naime, pokazalo se da su parijetalne stanice želuca osjetljive na djelovanje virulencijskog faktora VacA. Parijetalne stanice su odgovorne za niski pH u želudcu, i njihovo inaktiviranje je dobra strategija povišenja pH. Na taj način se Hp prilagođava kiseljoj okolini želuca u ranim fazama kolonizacije, prije nego se ugnijezdi na membranu želuca. Nakon bakterijske kolonizacije stijenke želuca, navedeno djelovanje VacA više nije potrebno jer se stanica nalazi na želučanoj sluznici bogatoj ureom i strategija povišenja pH se mijenja.¹⁶ VacA također uzrokuje razne promijene u stanici, kao što je povećanje propusnosti mitohondrijskih i ostalih staničnih membrana, autofagiju i staničnu smrt.¹⁷

2.3. Uloga ureaze i proteina uključenih u regulaciju Ni^{2+} iona u Hp-u

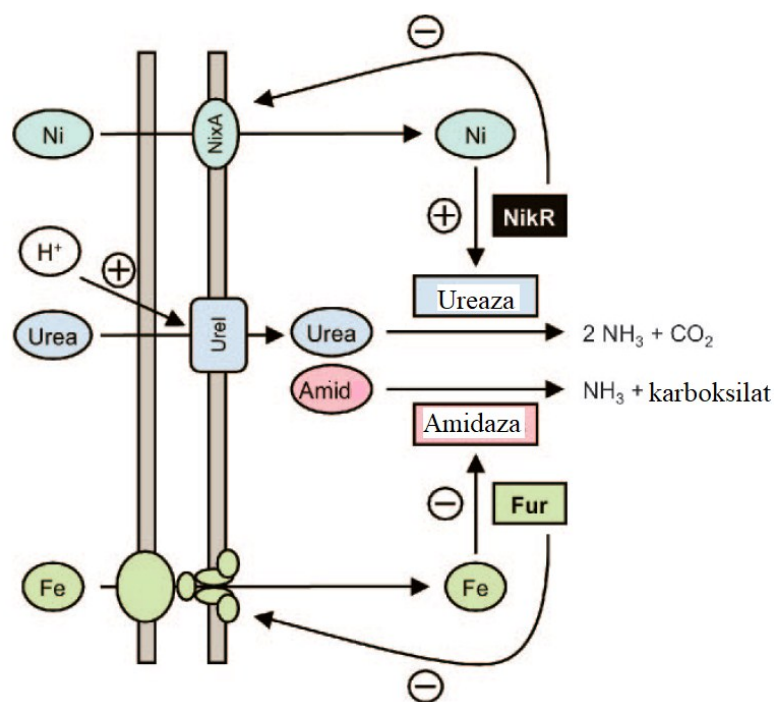
Genski klaster ureaze se sastoji od 7 gena, od kojih dva (*ureA* i *ureB*) kodiraju α i β podjedinice ureaze. Geni *ureE*, *-F*, *-G* i *-H* kodiraju pomoćne proteine koji sudjeluju u umetanju Ni^{2+} iona u ureazu. Gen *ureI* kodira membranski protein UreI koji je homologan membranskim proteinima AmiS, AmiS2 i ORFP3, za koje se pretpostavlja da sudjeluju u unosu amidnih spojeva u bakterijsku stanicu. Otkriveno je da se UreI aktivira pri niskom pH kako bi omogućio unos uree u stanicu, što je još poznato i kao H^+ aktivacija.^{18, 19}



Slika 3. Prikaz dimerne podjedinice sastavljene od α (svijetlo-plavi) i β (sivi) lanca. Dio lanca označen A (podebljani tamnoplavi dio lanac) predstavlja petlju koja zatvara aktivno mjesto, a B (smeđe-prozirno podebljani dio lanca) predstavlja drugu pomičnu petlju. Ljubičaste kuglice predstavljaju Ni^{2+} ione, a C (tirkizno obojeni dio lanca) prikazuju aminokiselinske ostatke u aktivnom mjestu. (PDB ID: 1E9Z).²⁰

Čak 10% svih staničnih proteina Hp-a čine ureaze, stoga i ne čudi činjenica da nastane amonijak u dostatnoj količini za mijenjanje pH okoline na razinu koja odgovara potrebama bakterije. Iako se ureaza nalazi i sa vanjske strane membrane, glavnu ulogu u stvaranju pogodne okoline za život bakterije imaju citosolne ureaze. Nije poznato kako su ureaze dospjele na vanjsku stranu

bakterijske stanice no pretpostavlja se da su „vanjske“ ureaze dospjele na membranu lizom susjednih bakterijskih stanica.^{21,22} Navedena teorija se pretpostavlja zbog nedostataka elemenata koji sudjeluju u dosad proučenim mehanizmima izlučivanja proteina u prokariotima. Jedan od dokaza da „vanjske“ ureaze ne pridonose u obrani bakterije od niskog pH jest to što se ureaza pri $\text{pH} < 4$ ireverzibilno inaktivira i gubi svoju funkcionalnost.²³ Ureaza kao funkcionalni protein je heksamerni heterodimer sastavljen od α i β podjedinice (slika 3). Aktivno mjesto se nalazi u α podjedinici, a sadrži dva Ni^{2+} iona vezana na protein preko dva histidinska, aspartatskog i premošćujućeg lizinskog ostatka. Ureaza katalizira reakciju hidrolize uree kako bi se dobili amonijak i karbamat, koji se kasnije spontanom razgradnjom prevode u amonijak i bikarbonat. Nastali spojevi djeluju kao puferirajuću agensi kako bi se održao što neutralniji citosolni pH. Proteini eksprimirani iz istog genskog klastera imaju razne uloge, a neki od njih su metal-vezujući chaperoni (UreG), faktori koji omogućavaju Ni^{2+} ionima i molekulama CO_2 pristup aktivnom mjestu u ureazi (kompleks UreF-UreH) i chaperoni koji međusobno omogućavaju pravilno smatanje ureaze.²⁴



Slika 4. Shematski prikaz ureazne aktivnosti i regulacije gena uključenih u metabolizam transporta metalnih iona. NikR potiče sintezu NixA koji unosi ione nikla, dok Fur regulira ekspresiju proteina koji tvore transmembranski kompleks za unos iona željeza.⁴

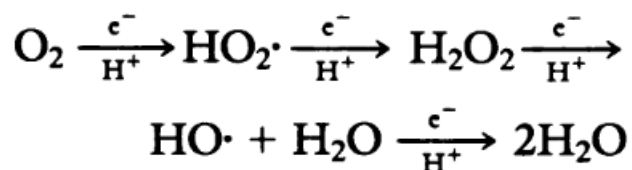
Važnost dostupnosti Ni^{2+} iona je očigledna, no pozornost se mora obratiti i na količinu unesenog Ni^{2+} iona jer u velikim količinama može biti toksičan. Zbog svega navedenog Hp posjeduje strogo kontroliran sustav unosa i izvoza Ni^{2+} iona. Glavni regulatorni protein povezan sa koncentracijom iona nikla je NikR (slika 4). Iako nije u potpunosti otkriven mehanizam detekcije koncentracije iona, poznato je mjesto vezanja NikR-a na DNA. NikR djeluje i kao represor i kao aktivator, a regulira ekspresiju proteinâ koji su povezani sa periplazmatskim transportom ionâ nikla, proteinâ koji unose ione kroz unutarnju membranu, i ekspresiju proteinâ zaduženih za skladištenje Ni^{2+} iona u citosolu. NikR je također auto regulator, što znači da potiskuje vlastitu ekspresiju. Unos iona nikla stvara kompleks Ni^{2+} -NikR koji inducira i transkripciju gena *ureA* koji kodira α podjedinicu ureaze.¹⁰ Unos nikla se odvija na taj način da se ioni najprije vežu na receptore vanjske membrane (FrpB4, FrpB2 i FecA3) koji zajedno sa proteinskim kompleksom ExbB/ExbD/TonB unose ione kroz vanjsku membranu. Protein u unutarnjoj staničnoj membrani, NixA, zatim „preuzima“ ione i otpušta ih u citosol.²⁵ U slučaju previsoke koncentracije ionâ nikla i njihovog izvoza iz stanice, bakterija sintetizira proteinski kompleks CznABC koji je zadužen za izlučivanje ionâ kobalta, cinka i nikla.

2.4. Regulacija Cu^{2+} iona u Hp-u

Hp kodira oksidazu koja kao kofaktor sadrži ione bakra, Cu^{2+} . Ona je vjerojatno zadnja oksidaza u respiratornom lancu, što je još jedan primjer proteina od velike važnosti za život bakterije. Cu^{1+} ion je slaba Lewisova kiselina i preferira tetraedarsku koordinaciju i vezu sa slabim bazama kao što su hidridi, alkilne skupine, fosfini, cistein tioli, tioeter i metionin. Cu^{2+} je srednje jaka Lewisova kiselina koja preferira vezanje sa sulfatima, dušikom na histidinima i kisikom na glutamatu i aspartatu.²⁶ Cbb3 citokromc-oksidaaza sadrži hem–bakar binuklearni centar,²⁷ no unos bakra u stanicu mora biti reguliran zbog zaštite od toksičnog djelovanja bakrovih iona. Prijetnju bakterijskoj stanici predstavljaju nestabilne, djelomično reducirane specije kisika. One se pojavljuju u metaboličkom putu molekule kisika (O_2) (slika 5). Pretpostavlja se da slobodni ioni bakra, i jednovalentni i dvovalentni, reduciraju O_2 stvarajući slobodni hidroksidni radikal koji se smatra najreaktivnijim oksidansom i ima mogućnost interakcije s gotovo svim molekulama u organizmu.²⁸ Velika moć oksidacije se temelji na velikom reduksijskom standardnom potencijalu radikala, koji je $> 2\text{V}$.²⁹ Jedan od načina uzrokovanja štete je inicijacija kaskade stvaranja lipidnih radikala. Peroksidni radikali ($\text{ROO}\bullet$, radikali alkilnih peroksida) nastali oksidacijom nezasićenih masnih kiselina reagiraju sa obližnjim molekulama

lipida stvarajući nove radikale i lančanu reakciju. Osim navedenog štetnog djelovanja, slobodni hidroksidni radikali reagiraju i s DNA.³⁰ Druga vrsta oštećenja DNA prouzrokovana je povišenom koncentracijom Cu^{2+} iona u blizini nukleosomske DNA. Ioni bakra vežu se na histone ili povećavaju reaktivnost i mogućnost reagiranja nukleinskih baza, što je rezultat konformacijskih promjena u DNA.²⁸ Još jedan mehanizam koji ne uključuje specije kisika jest formacija Cu^{1+} - tiol veze. Formiranje nastale veze uvelike utječe na funkcionalnost enzima čije djelovanje ovisi o slobodnim ostacima cisteina ili disulfidnih veza.³¹ Zbog svega navedenog, održavanje homeostaze bakrovih iona je od krucijalne važnosti za bakteriju.

Preveliko izlaganje bakterijskih stanica ionima bakra uvelike mijenjaju bakterijski ekspresijski profil. Ekspimiraju se proteini kao odgovor na povišenu koncentraciju metalnih iona, a oni reguliraju mobilnost stanice i bičeva, transport iona, prijenos energije, aktivnost transferaza i druge stanične aktivnosti.¹⁰ Osim navedenih enzima ekspimiraju se i proteini zaduženi za detekciju i regulaciju bakrovih iona.

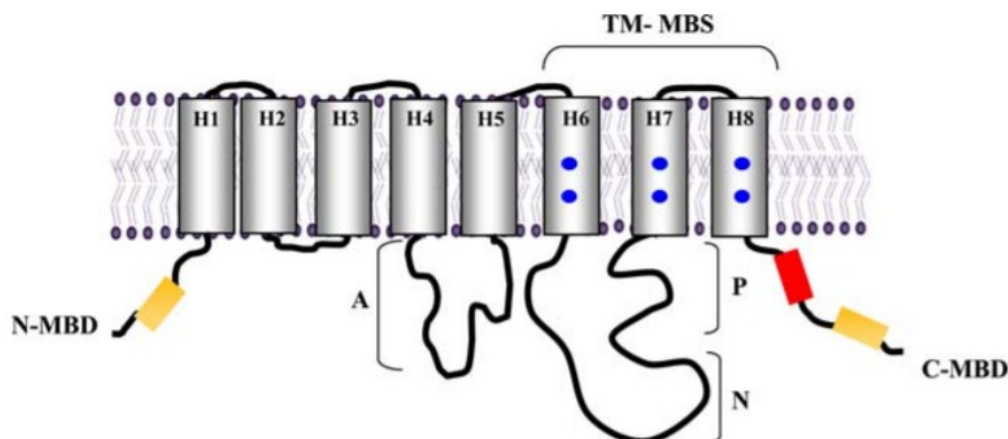


Slika 5. Metabolički put molekule kisika u bakterijskoj stanici.³²

2.5. Sustav za detekciju i održavanje ravnoteže bakrovih iona u bakterijskim stanicama

Osjetljivost bakterijskih stanica na bakrove ione je vrlo velika. Ekspresija proteina koji sudjeluju u prometu bakrovih iona je inducirana čak pri koncentracijama od 10^{-21} mol dm^{-3} bakra (kod *E. coli*). Regulacija ekspresije je pod CrdRS kompleksom. CrdS senzorna kinaza (pripada porodici histidinskih kinaza) fosforilira CrdR kao odgovor na detekciju povišene koncentracije bakrovih iona. CrdR spada u porodicu OmpR regulacijskih enzima. Ima ulogu vezanja na promotorsku sekvencu smještenu uzvodno, nedaleko od CrdA kodirajuće sekvence, i na taj način inicira ekspresiju proteina odgovornih za rezistenciju na bakrove ione i za njihov izvoz iz stanice.^{10,33} Najzastupljenija porodica proteina koji sudjeluju u izbacivanju bakrovih iona iz stanice je $\text{P}_{1\text{B}}$ tip ATPaza. Osim što koriste energiju dobivenu iz hidrolize ATP-a,

navedene ATPaze imaju sličan način rada strukturnih domena. Sastoje se od citoplazmatskog aktivatora, nukleotid - vezujuće domene i fosforilacijske domene koje su vezane na membranu.³⁴ Metal – vezujući motivi (MBS) se nalaze na N- i C-terminalnim citoplazmatskim domenama i na transmembranskim domenama ATPaze (slika 6).³⁵ Podvrsta ATPaze koja sudjeluje u izlučivanju bakra se naziva CopA.



Slika 6. Shematski prikaz P_{1B} -ATPaze. Prikazani su transmembranske domene (H1 - H8), crveni i žuti pravokutnici, kao i plave točke predstavljaju metal vezujuće domene. Označene su i ostale domene, citoplazmatski aktivator (A), fosforilacijska domena (P) i nukleotid – vezujuća domena (N).³⁵

Pravilno vezanje bakrovih iona u kompleks CopA- Cu^{2+} omogućuju chaperoni. CopC je protein iz *Pseudomonas syringae*, veličine približno 100 aminokiselina i nalazi se u periplazmatskom prostoru. Ima sposobnost vezanja dva iona bakra (I i II) u isto vrijeme, i to na vezujućem mjestu koje sadrži His1, Glu27, Asp89, i His91 aminokiseline (vežu Cu^{2+}) i na regiji bogatoj metioninom (vežu Cu^{1+}), koja je također nađena i u srodnim proteinima koji vežu ione bakra. CopC ima dvojaku ulogu; iniciranje ekspresije enzima za rezistenciju te unos/izvoz bakrovih iona, ovisno kojem proteinu preda vezani ion bakra. Usporedbom aminokiselinskog slijeda CopC, analognog proteina PcoC iz *Escherichia coli*, i CrdA iz *H. pylori* uočena je očuvanost regije bogate metioninom, pa se stoga pretpostavlja da sadrže i jednako mjesto za vezanje iona bakra.^{5, 36, 37}

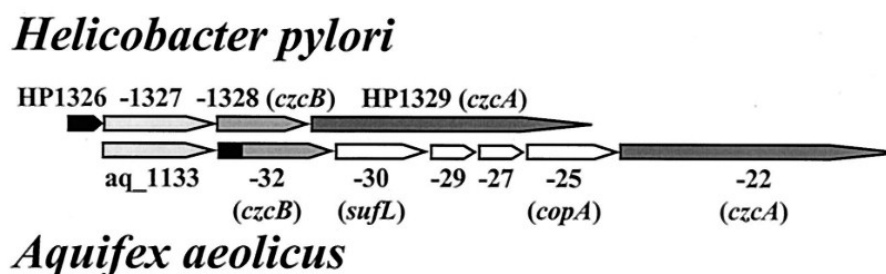
Za razliku od CopC, homologni protein u *E. coli*, PcoC, posjeduje samo mogućnost izbacivanja bakrovih iona, odnosno ili izbacivanja ili predavanja iona bakra periplazmatskom proteinu PcoA koji dalje izvozi ione bakra iz stanice.^{38,39} Kao i CopC, PcoA se sastoji od β -bačvi te veže jedan ion bakra po monomeru.⁴⁰ Što se tiče afiniteta veznih mjesta prema određenom ionu

bakra, svako mjesto veže ili Cu^{2+} ili Cu^{1+} ion s vrlo visokim afinitetom, ali pokazuje afinitet vezanja i prema drugom ionu. Unatoč istom elementarnom porijeklu, vezna mjesta Cu^{1+} i Cu^{2+} iona se drastično razlikuju, kao naprimjer kod CopC. Koordinacija vezanja liganda je također drugačija, kao i priroda liganada. Niži koordinacijski broj, odnosno manji broj veza u veznom mjestu za Cu^{1+} ion je pogodan za transfer Cu^{1+} iona između dva proteina PcoC, zato što je vezanje s nižom koordinacijom kinetički labilnije od vezanja s koordinacijom veznog mjesta za Cu^{2+} ione.^{41,42} Unatoč ispitivanju svih vrsta mehanizama prijenosa iona, oksidacijskog, redukcijanskog i prijenosa bez redoksa, mehanizam djelovanja PcoC kao chaperona nije poznat.

43

2.6. Protein CrdA

CrdA (HP1326) je sekrecijski protein, molekulske mase 13,8 kDa. U Hp genomu (slika 7) se njegov genetski kod nalazi u klasteru (HP1326 do HP1329) čija je pojačana ekspresija odgovor na povišenu koncentraciju bakrovih iona u okolini bakterije. Analizom aminokiselinske sekvence otkriven je motiv specifičan za vezanje metalnih iona. To je regija bogata metioninom (FMMPEMPGM PAMKEMA), a nađena je i kod homolognih proteina u drugih bakterija kao što *Aquifex aeolicus* (aq_1132), *Pseudomonas aeruginosa* (CopC) i *E. coli* (Pco).



Slika 7. Usporedni prikaz homolognih gena, HP1326 do HP1329, odgovornih za rezistenciju na bakar u bakterijama *H. pylori* i *Aquifex aeolicus*. Smjer strelice pokazuje smjer transkripcije gena. Naziv gena u zagradi je naziv homolognog gena iz *A. aeolicus*. Svijetlosiva, siva i tamnosiva područja prikazuju homologiju u obje vrste bakterija. Područja obojena crno prikazuju homologe HP1326 iz Hp-a i aq_1132 iz *A. aeolicus*. Područja označena bijelo nisu homologna.⁴⁴

Zbog svih navedenih činjenica pretpostavlja se da je u Hp-u proteinu CrdA odgovoran za rezistenciju na bakar, odnosno sudjeluje u mehanizmu smanjenja koncentracije bakrovih iona zajedno sa proteinima koji se eksprimiraju iz navedenog genskog klastera *hp1326* do *hp1329*,

a čine ih CrdB, CzcB i CzcA.⁴⁴ Unatoč sličnosti s proteinom CopC iz *Pseudomonas* i ostalim navedenim homolognim proteinima, CrdA ima vezno mjesto samo za jedan ion bakra.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

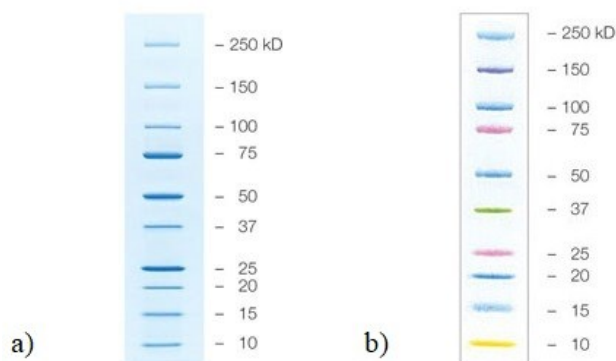
3.1. Materijali korišteni u radu

3.1.1. Instrumenti

ÄKTA sustav za brzu tekućinsku kromatografiju (*GE Healthcare Life Sciences*), centrifuga (*Thermo Scientific te Biosan*), pH-metar (*MP220 Basic pH/mV/°C Meter, Mettler Toledo*), sonikator (*VibraCell™, 50 Watt Model, Bioblock Scientific*), tresilice (*Orbital Shaker 420, Thermo Forma, Thermo Scientific*), uređaj za mikrotermoforezu *Monolith NT.115 (NanoTemper)*, uređaj za ispitivanje početne stabilnosti proteina *Tycho NT.6 (NanoTemper)*, pumpa za kromatografiju i pročišćavanje Peristaltic Pump P-1 (*GE Healthcare*), sustav za SDS-PAGE elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra System (*Biorad*) te PowerPac Basic (*BioRad*).

3.1.2. Markeri

Markeri veličine *Precision Plus Protein Standards Unstained (Bio-Rad)* i *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards (Bio-Rad)* za SDS-PAGE metodu.



Slika 8. Markeri korišteni u SDS-PAGE elektroforezi, a) *Precision Plus Protein Standards Unstained*, b) *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards*.

3.1.3. Bakterijski soj i plazmid

HI-Control BL21(DE3) (F⁻ ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3)/Mini-F lacIq1(GentR)) (Lucigen), *pETite™ N-His SUMO Kan (Lucigen)*, *pGEX-6P-1 (GE Healthcare)*.

Bakterijski soj *E. coli* BL21(DE3) (*Lucigen*) transformiran rekombinantnim vektorom pETite N-His SUMO, koji sadrži gen za G-CrdA (u nastavku CrdA) prethodno je napravio Vigor

Matković u okviru diplomskog rada.⁴⁵ Navedeni soj korišten je za prekomjernu ekspresiju proteina SUMO-G-CrdA s histidinskim privjeskom pod kontrolom inducibilnog promotora T7lac. Ekspresija SUMO-G-CrdA je pod kontrolom T7 promotora koji veže T7 RNA-polimerazu eksprimiranu iz modificiranog genoma bakterijskog soja. Modifikacija bakterijskog genoma se odnosi na uklonjene gene koji eksprimiraju Lon i OmpT proteaze (proteaza vanjske membrane), kao i sustav sprečavanja „cureće“ ekspresije proteina. LacI proteinski represor se veže na *lacO* operator i na taj način blokira transkripciju nizvodnog gena, odnosno ekspresiju T7 RNA-polimeraze. Bez inicijatora, bilo laktoze, bilo IPTG-a (izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid), ekspresija T7 RNA-polimeraze je uvelike smanjena, a time i ekspresija ciljanog fuzijskog proteina SUMO-G-CrdA. Kao selektivni faktor, plazmid sadrži gen odgovoran za rezistenciju na antibiotik kanamicin, a navedeni histidinski privjesak omogućuje pročišćavanje afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu.

Bakterijski soj *E. coli* BL21(DE3) (*Lucigen*) transformiran rekombinantnim vektorom pGEX-6P-1, koji sadrži gen za CrdA prethodno je napravila dr. sc. Ivana Kekez⁵, kao i gen odgovoran za ampicilinsku rezistenciju. Ekspresija željenog proteina je pod kontrolom inducibilnog promotora *tac*, a inducira se IPTG-om. Svi pGEX vektori sadrže i *lacI* gen koji eksprimira protein represor. Taj protein represor se veže na operatorsku regiju *tac* promotora i sprečava „cureću“ ekspresiju željenog proteina sve do indukcije IPTG-om.⁴⁶ Od drugih sojeva plazmida se razlikuje po mjestu prepoznavanja za *PreScission* proteazu kako bi se GST privjesak odcijepio od željenog proteina.⁵ Navedeni plazmid je korišten za prekomjernu ekspresiju GST-CrdA. Priređeni rekombinantnog protein sadrži GST-privjesak na N-kraju proteina radi pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na *GSTrap*TM HP koloni.

3.1.4. Kemikalije

Adenozin-5'-difosfat, ADP (*Sigma*), Agar (*Sigma*), agaroza (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), 40 %-tni akrilamid:bisakrilamid, 19:1 (*Merck*), 40 %-tni akrilamid:bisakrilamid, 29,1:0,9 (*AppliChem*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Sigma*), ampicilin (*Sigma*), askorbinska kiselina (*Sigma-Aldrich*), bromfenol-plavo (*Serva*), bakrov(II) klorid (*Sigma*), cinkov(II) sulfat (*Alkaloid Skopje*), *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (*Merck*), *Coomassie Brilliant Blue* R-250 (*Sigma*), EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (*Kemika*, p.a.), ekstrakt kvasca (*BD Fisher Scientific*), etanol (*Kemika*), glicerol, redestilirani, $w = 100 \%$ (*Kemika*, p.a.), glicin (*Fisher Scientific*), fenilmetilsulfonil-fluorid, PMSF (*Sigma*, $> 99 \%$), 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-

il]etansulfonska kiselina, HEPES (*AppliChem PanReac*), imidazol (*Sigma-Aldrich*, p.p.a.), izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid, IPTG (*Sigma*), kalijev klorid, KCl (*Kemika*), kanamicin-sulfat (*Sigma*), HCl, $w = 36,5 \%$ (*Kemika*, p.a.), kalijev hidroksid, KOH (*Kemika*, p.a.), Luria-Bertani agar, LB (*BD Fisher Scientific*), 1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol, ditiotreitol, DTT (*Sigma*), 3-morfolinopropan-1-sulfonska kiselina (MOPS), marker za poliakrilamidnu elektroforezu (*Precision Plus Protein™ Standards Unstained, Biorad*), marker za poliakrilamidnu elektroforezu (*SigmaMarker™ wide range*, mol wt 6,500-200,000 Da, *Sigma*), $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (*Kemika*, p.a.), β -merkaptetoetanol (*Serva*), natrijev dodecilsulfat, SDS (*Sigma*), NiSO_4 , NaCl (*Alkaloid, Skopje*), NaOH (*Sigma*), NaN_3 (*Sigma*), $(\text{NiSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O})$ (*Kemika*), polietilenglikol 6000 (*Sigma-Aldrich*), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin, TEMED (*Sigma*), tripton (*BD Fisher Scientific*), 2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol, tris (*Sigma*).

3.2. Metode dobivanja i obrade proteina

3.2.1. Priprema prekonoćne kulture transformiranih stanica vektorima *pETite N-His SUMO-G-CrdA* i *pGEX-CrdA*

Dobivanje velike količina željenog proteina se postiglo prvotno prekonoćnim uzgojem transformiranih bakterijskih stanica u tekućem LB mediju. U 5 mL LB medija s dodatkom 5 μL odgovarajućeg antibiotika (konačne koncentracije kanamicina $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ za *pETite N-His SUMO-G-CrdA* ili $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ za *pGEX-CrdA*) je ubačen prethodno sterilizirani nastavak pipete (u nastavku tipsa) s kojom je zahvaćen dio određene glicerolske kulture. Medij za uzgoj, antibiotik i tipsa su se nalazili u sterilnim *Falcon* epruvetama (u nastavku falkonica). Uzgoj se odvijao u inkubatoru preko noći (12-18 h) na 37°C uz miješanje na 200 rpm-a.

3.2.2. Prekomjerna ekspresija fuzijskih proteina *SUMO-G-CrdA* i *GST-CrdA*

Kako se tijekom izolacije i pročišćavanja izgubi određena masa proteina, za rad je nužna velika početna količina proteina te su navedeni proteini uzgajani u većim volumenima staničnih kultura.

Sastav otopine za veliki uzgoj je vidljiv u tablici 1. Otopine su pripremljene u 4 Erlenmeyerove tikvice s volumenom LB medija od 500 mL, te su autoklavirane. Nakon prekonoćnog uzgoja je slijedilo razrjeđivanje bakterijskih kultura, i to u omjeru 1:500, za slučaj *pETite N-His SUMO-G-CrdA*, što bi značilo da je 1 mL prekonoćne kulture transformiranih bakterijskih stanica

dodano u svakih 500 mL sterilnog LB medija. U slučaju pGEX-CrdA prekonoćna bakterijska kultura je razrijeđena 10 puta odnosno u svakih 500 mL sterilnog LB medija je dodano 50 mL prekonoćne kulture transformiranih bakterijskih stanica. Kulture su uzgajane na 30 °C (SUMO-G-CrdA) ili na 20 °C (GST-CrdA) uz trešnju.

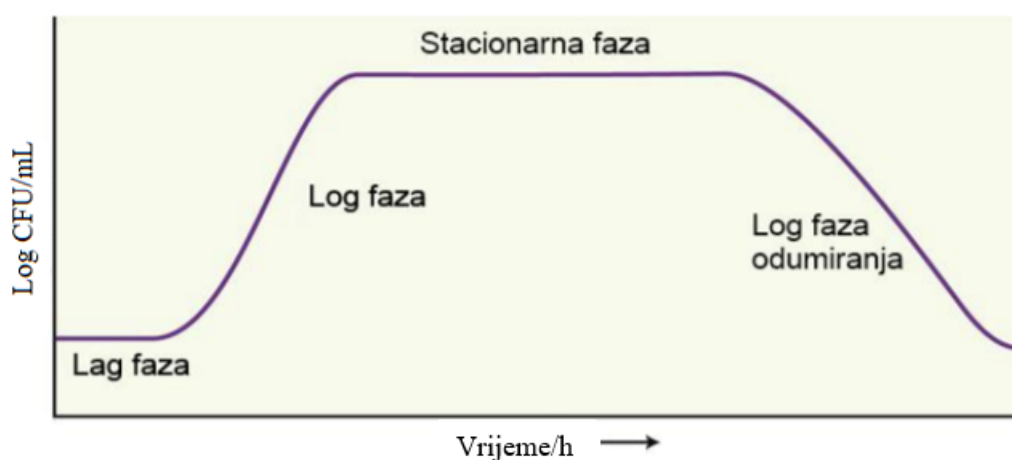
Ostatak prekonoćnih kultura je uskladišten na –80 °C i to na način da je napravljena glicerolska kultura. Na 750 µL prekonoćne kulture dodano je 250 µL glicerola ($v/v = 100\%$), tako da je krajnji volumni udio glicerola u glicerolskoj kulturi iznosio 25%. Glicerol smanjuje ekspanziju vode, odnosno smanjuje razliku u volumenu vode i leda koji nastaje smrzavanjem vode, a razlika u volumenu je oko 9 %. Upravo taj mehanički stres prouzrokovan povećanjem volumena vode, odnosno leda je uzrok smrti bakterije pri niskim temperaturama, a pomoću glicerola se ta razlika u volumenu vode i leda smanjuje. Na taj način se sprečava puknuće membrane bakterije i smrt bakterijske stanice. Tako pripremljena glicerolska kultura je spremna za skladištenje na niske temperature.

Tablica 1. Sastav otopine za veliki uzgoj SUMO-G-CrdA i GST-CrdA. Navedene mase i volumeni su dostatni za 0,5 L LB medija.

Ekstrakt kvasca	2,5 g
Trypton	5 g
NaCl	2,5 g
ReH ₂ O	500 mL
Antibiotik	500 µL (kanamicin, <i>stock</i> otopina $c = 30 \text{ mg mL}^{-1}$) ili 500 µL (ampicilin, <i>stock</i> otopina $c = 50 \text{ mg mL}^{-1}$)

Inokulirane otopine za veliki uzgoj su inkubirane na 30 °C u slučaju SUMO-G-CrdA ili na 20 °C u slučaju GST-CrdA na tresilici na 200 rpm uz praćenje rasta bakterijskih stanica mjerenjem optičke gustoće (OD_{600}) pri 600 nm. Prije indukcije uzeti su alikvoti bakterijskih kultura od 500 µL koji služe kao negativna kontrola i daju „sliku“ uzorka prije indukcije. Otpipetirani alikvoti su centrifugirani 2 min na 10000 rpm. Supernatant je odbačen bez da je dodirnut talog koji je ponovno otopljen u ReH₂O i dodan je pufer za obradu uzorka (*Sample buffer*, odlomak 3.2.4,

tablica 6). Omjer vode i pufera ovisi o optičkoj gustoći. Doda se više vode ako je optička gustoća uzorka prevelika i na taj način se postiže optimalna koncentracija za ispitivanje uzorka denaturirajućom gel elektroforezom (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, u nastavku SDS-PAGE). OD_{600} uzorka koji sadži SUMO-G-CrdA nakon indukcije iznosio je 0,4, stoga je omjer ReH_2O i uzorka bakterijskih stanica iznosio 1:3, odnosno 250 μL uzorka bakterijskih stanica i 750 μL ReH_2O . Pufer za obradu uzorka sadrži komponente koje denaturiraju proteine, β -merkaptetanol i natrijev dodecilsulfat, no uzorak je još dodatno denaturiran inkubacijom na grijačem bloku 10 min na 100 °C. Za zadovoljavajuće rezultate ekspresije, iznos optičke gustoće prije indukcije IPTG-om mora biti između 0,4 i 0,8. U tom rasponu optičke gustoće bakterijske stanice se nalaze u log, odnosno eksponencijalnoj fazi rasta pri kojoj su postignuti uvjeti za najbrže razmnožavanje (slika 9). U tablici 2 vidljiv je postupak praćenja optičke gustoće. Kada je dosegnut optimalan OD, dodan je IPTG, do konačne koncentracije 0,5 mmol dm^{-3} u obje bakterijske kulture. Uzgajanje bakterijskih stanica nakon indukcije ekspresije proteina trajalo 3 – 4 h za SUMO-G-CrdA, a u slučaju GST-CrdA je uzgoj išao preko noći.



Slika 9. Dijagram ovisnosti broja nastalih bakterijskih kolonija (engl. colony forming unit) o vremenu. Iz dijagrama se vidi da je u Log fazi razmnožavanje bakterijskih stanica najbrže.⁴⁷

Po završetku uzgoja odvojeni su alikvoti bakterijskih kultura nakon indukcije (razrijeđeni 4 puta) te su obrađeni na već prethodno opisan način kod uzorka bakterijskih stanica prije indukcije. Nakon pojačane ekspresije, kulture bakterijskih stanica su centrifugirane 20 min na 4000 rpm na 4 °C. Nakon prvog ciklusa centrifugiranja supernatant je odbačen, a u talogu su ostale bakterijske stanice. Talog je ponovno otopljen u minimalnom volumenu vode i

ponovljeno je centrifugiranje od 15 min na 5000 rpm pri temperaturi od 4 °C. Supernatant je ponovno odvojen, a bakterijske stanice (talog) su uskladištene na –80 °C.

Tablica 2. Ovisnost vrijednosti optičke gustoće o vremenu prije indukcije

Vrijeme nakon indukcije/ min	OD ₆₀₀ (SUMO-G-CrdA)	OD ₆₀₀ (GST-CrdA)
45	0,023	–
80	0,094	–
150	0,42	–
280	–	0,45

3.2.3. Liza bakterijskih stanica

Sljedeći korak je oslobađanje dobivenog proteina iz unutrašnjosti stanične membrane. Za to postoji više načina, a u ovom radu je odabran fizikalni proces, odnosno mehaničko narušavanje strukture stanične membrane ultrazvukom – liza bakterijskih stanica *sonikacijom*. Za početak, zaleđene bakterijske stanice je bilo potrebno resuspendirati na ledu u puferu za lizu (sastav u tablici 3) koji se sastoji od pufera A i PMSF-a (fenilmetilsulfonil-fluorid). Razlog dodavanja PMSF-a je njegovo inhibitorno djelovanje na serinske proteaze i samim time sprečavanje razgradnje proteina.

Za lizu je korišten sonikator (*VibraCell™, 50 Watt Model, Bioblock Scientific*) koji je prethodno baždaren prema uputama. Soniciranje se provodilo u intervalima od 1 min 7 puta, između kojih je bilo po minutu „odmora“ kako ne bi došlo do pregrijavanja lizata. Zbog toga a i zbog (ne)stabilnosti proteina, tijekom sonikacije falkonica je bila smještena u ledu. Sondu je potrebno postaviti tako da je blizu dna falkonice ali ju se ne smije dirati. Nakon lize je slijedilo centrifugiranje u trajanju od 1 h na 10000 rpm na 4 °C, a izdvojeni supernant je dalje pročišćavan.

Prije centrifugiranja (nakon lize) je iz obje bakterijske kulture otpipetirano po 50 µL uzorka za SDS-PAGE elektroforezu. Uzorci su centrifugirani 2 min na 10000 rpm. Supernatant je odvojen u posebnu mikroepruvetu, dodano je 50 µL ReH₂O i 50 µL pufera za nanošenje (engl. *Loading buffer*). Talog je resuspendiran u 100 µL ReH₂O (jer je gustoća veća) i dodano se još

50 μL pufera za nanošenje. Pripremljeni uzorci su zagrijani na 100 °C 10 min i spremljeni za elektroforezu.

Tablica 3. Sastav pufera za lizu bakterijskih stanica koje sadrže: GST-CrdA i SUMO-G-CrdA

	GST-CrdA	SUMO-G-CrdA
Tris	20 mmol dm ⁻³ (pH = 7,5)	20 mmol dm ⁻³ (pH = 8)
NaCl	150 mmol dm ⁻³	150 mmol dm ⁻³
PMSF	2 mmol dm ⁻³	1 mmol dm ⁻³
glicerol	-	10%

3.2.4. SDS – PAGE elektroforeza

Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu s dodatkom natrij dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) je zasigurno jedna od najraširenijih metoda analize proteina. Proteini se pomoću SDS-a (engl. *sodium dodecyl sulphate*) i merkptoetanolu denaturiraju kako bi poprimili sekundarnu lančastu strukturu. Protein veže negativno nabijeni deterdžent SDS čime se mijenja naboj proteina, odnosno prikriva se pravi naboj proteina i efektivan naboj biva onaj od SDS-a. Kako je naboj podjednak (konstantan) na svakom djelu proteina, razdjeljivanje se temelji na masi proteina, a negativni naboj osigurava kretanje proteina prema katodi pri čemu se veći proteini kreću sporije, a manji proteini brže. Medij kroz koji se proteini kreću je poliakrilamidni gel (PAG). PAG je pogodan za elektroforezu zbog svojih karakteristika kao što su relativna inertnost, termička stabilnost, lakoća pripreme i prosječna veličina pora koja se može lako odrediti. Bilo je potrebno pripremiti dvije vrste gela sa drugačijim sastavima akrilamid/bisakrilamida (aa/ba), od kojih je jedan gel bio za sabijanje (engl. *stacking gel*) a drugi gel za razdvajanje (engl. *separating gel*). Sastav gelova je naveden u tablici 4. Polimerizacija gelova se očekuje 10 – 15 minuta nakon dodatka *N,N,N',N'*-tetrametiletilenediamina (TEMED) koji služi kao inicijator polimerizacije. Nakon što se provjerila ispravnost složene aparature, gel za razdvajanje se nanosio u kalup između 2 stakalca do oko 2 cm ispod ruba. Do vrha stakalca se nanijela voda kako bi se izbjegao kontakt sa zrakom i zbog ravnomjerne i pravilne polimerizacije gornjeg ruba gela. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje, voda se zamijenila gelom za sabijanje u koji se stavio češljic kako bi se formirale jažice potrebne za nanošenje uzoraka. Nakon polimerizacije gela za sabijanje češljic se uklonio, stakalca sa odgovarajućim postoljem su se postavila u kadicu za elektroforezu koja

se punila puferom za elektroforezu (tablica 5). Za provedbu elektroforeze koristio se *Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad)* te uređaj *PowerPack Basic (BioRad)*. Uzorci su prije nanošenja u jažice pomiješani s puferom za obradu uzoraka (engl. *Sample buffer*) koji sadrži SDS i β -merkaptotanol (tablica 6) koji djelomično denaturiraju protein. Smjesa uzorka i navedenog pufera se pomoću termobloka dodatno zagrijao na 100 °C na 2-10 minuta (ovisno o vrsti uzorka) kako bi denaturacija bila što potpunija. U jažice se dodalo od 5 do 15 μ L smjese uzorka i pufera, ovisno o gustoći uzorka. Na svaki gel je bilo potrebno staviti 5 μ L markera molekulskih masa u jažicu koja je prethodnim planiranjem određena za marker. Prethodno planiranje nanošenja uzorka na gel je od iznimne važnosti. Korišteni su dva tipa markera prikazana na slici 4 (odlomak 3.1.2). Sama elektroforeza se sastojala od dva dijela: sabijanje frakcija do granice gelova, 10 – 15 minuta pri naponu od 120 V i razdvajanje, 20 – 25 minuta na 190 V. Nakon elektroforeze slijedilo je bojanje s *Coomassie blue* čiji je sastav vidljiv u tablici 7. Gel je inkubiran 15 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je slijedilo odbojavanje u vrućoj destiliranoj vodi i analiza dobivenih rezultata.

Tablica 4. Sastav PAG gelova za sabijanje i razdvajanje. Navedeni volumeni su dostatni za pripravu jednog gela.

	Gel za sabijanje	Gel za razdvajanje
aa/bis 29:1 (40 %)	0,2 mL	2 mL
Pufer za sabijanje (pH = 6,8)	0,5 mL	/
Pufer za razdvajanje (pH = 8,8)	/	1,25 mL
ReH ₂ O	1,3 mL	1,75 mL
APS 20%	7 μ L	17,5 μ L
TEMED	2-4 μ L	5 μ L

Tablica 5. Sastav pufera za elektroforezu sa konačnim pH = 8,3

Glicin	200 mmol dm ⁻³
Trizma®	25 mmol dm ⁻³
SDS	0,1 % (w/v)

Tablica 6. Sastav pufera za obradu proteina (*Sample buffer*)

Trizma® (titrirano HCl-om do pH = 6,8)	62,5 mmol dm ⁻³
β -merkaptetanol	12,5 mmol dm ⁻³
SDS	1,25 %(w/v)
Bromfenol plavo	0,002 % (w/v)
Glicerol	6,25 % (w/v)

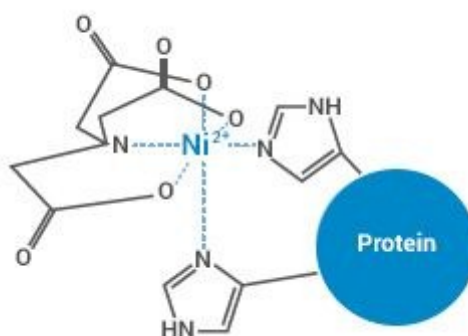
Tablica 7. Sastav otopine *Coomassie blue* za bojanje uzoraka

<i>Coomassie Brilliant Blue</i> R-250	2.5 g dm ⁻³
octena kiselina	10% (w/v)
etanol	45% (w/v)

3.3. Pročišćavanje i rezanje fuzijskih proteina SUMO-G-CrdA i GST-CrdA

3.3.1. Afinitetna kromatografija na imobiliziranoj fazi metalnih iona (engl. *immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC)

Pročišćavanje proteina s privjeskom se najčešće provodi afinitetnom kromatografijom na kelatiranim metalnim ionima na netopljivom matriksu. Proteini se odvajaju na temelju razlike u afinitetu prema ionu prijelaznog metala. Određeni proteini, odnosno aminokiselinski nastavci, kao što su histidin i cistein, imaju povećani afinitet za vezanje na metalni ion. Elektron-donorska skupina dušikovog atoma na imidazolu histidinskog ostatka se relativno dobro veže na imobilizirani ion prijelaznog metala. Zbog toga se genetski kod za specifični privjesak umeće u odabrani plazmid te se na N- ili C-kraju ciljanog proteina eksprimira i heksahistidinski privjesak. Genetski kod za ekspresiju heksahistidinskog privjeska se nalazio u pETite N-His SUMO vektoru te je protein SUMO-G-CrdA pročišćen iz proteinskog ekstrakta afinitetnom kromatografijom. Korištena je kolona punjena agaroznom smolom na koju je imobilizirana nitrilotrioctena kiselina (NTA) koja veže Ni²⁺. Niklov ion je tetradentatno koordiniran NTA-om, a preostala dva koordinacijska mjesta zauzimaju molekule vode. Nanošenjem uzorka ciljanog proteina s His-privjeskom, na mjesto molekula vode vezali su se imidazolni prsteni histidinskog privjeska i na taj način su proteini s His-privjeskom ostali vezani na koloni (slika 10) dok su se ostali proteini i nečistoće eluirali kroz kolonu u početnim stadijima pročišćavanja (FT, engl. *flow-through*). U ovoj Ni-NTA IMAC kromatografiji je korištena kolona *HisTrap HP* (GE Healthcare) volumena od 1 mL.



Slika 10. Selektivno vezanje imidazolskih prstena iz histidinskog privjeska na Ni^{2+} imobilizirani ion matriksa kolone.⁴⁸

Proces pročišćavanja proteina započet je ispiranjem kolone s 10 mL ReH_2O . Zatim je slijedilo uravnoteživanje kolone s 10 mL pufera A, čiji je sastav prikazan u tablici 8. To je pufer u kojem želimo da nam se nalazi protein za vrijeme nanošenja uzorka na kolonu. Slijedilo je nanošenje uzorka te je sakupljan dio uzorka koji se nije vezao na smolu (FT). Ovaj postupak je ponovljen tri puta. U slijedećem koraku uklonjeni su nespecifično vezani proteini i nečistoće ispiranjem smole s 10 mL pufera F (25 mmol dm^{-3} imidazolom) čiji je sastav prikazan u tablici 8 te su sakupljene elucije (W, engl. *wash*). Zatim je slijedila elucija ciljanog proteina s puferom B (tablica 8) koji sadrži imidazol konačne koncentracije 500 mmol dm^{-3} . Frakcije su se skupljale na sljedeći način: 1. frakcija je bila od 1 mL, frakcije od 2. – 9. su bile od 0,5 mL i 10. frakcija je bila od 5 mL (oznaka 1. – 10.). Iz sastava pufera je vidljivo povećanje koncentracije imidazola, posebice u puferu B. Razlog tomu je kompeticija između imidazola u puferu i imidazola na histidinskim privjescima. Zbog visoke koncentracije imidazola u puferu B, on postaje kompetitivniji za vezanje na imobilizirani ion Ni^{2+} , otpuštaju se imidazoli koji pripadaju His privjesku fuzijskog proteina i veže se imidazol iz pufera B. Na taj način su dobivene frakcije sa pročišćenim fuzijskim proteinom. Uspješnost pročišćavanja i čistoća proteina je provjerena SDS-PAGE elektroforezom. Kolona sa smolom je uskladištena nadslojavanjem etanolom ($v/v = 20\%$) na 4 °C.

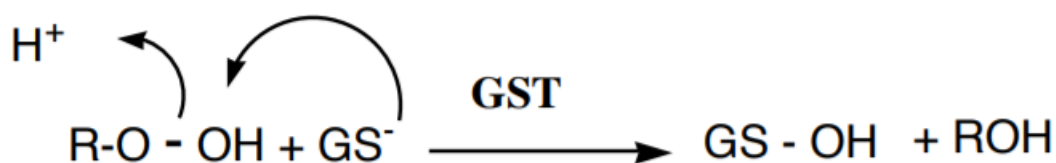
Tablica 8. Sastav pufera za pročišćavanje proteina SUMO-G-CrdA

Pufer	A	F	B
-------	---	---	---

Tris (titrirano HCl-om do pH = 7,4)	20 mmol dm ⁻³	20 mmol dm ⁻³	20 mmol dm ⁻³
NaCl	150 mmol dm ⁻³	150 mmol dm ⁻³	150 mmol dm ⁻³
Imidazol	-	25 mmol dm ⁻³	500 mmol dm ⁻³
Glicerol	10%	-	-

3.3.2. Afinitetna kromatografija korištenjem GSTrap™ HP kolone

Za pročišćavanje lizata bakterijskih stanica u kojima je eksprimiran fuzijski GST-CrdA korištene su dvije kolone volumena 1 mL s matriksom *Glutathione Sepharose™ High Performance* (GE Healthcare). Glutathion S-transferaza (GST) je izoenzim metaboličke faze II, katalizira konjugaciju glutathiona (GSH, slika 11) u ksenobiotski supstrat u cilju detoksifikacije. DNK kodirajuća sekvenca GST-a je uvezana na N-kraj kodirajuće sekvence CrdA proteina i stoga se eksprimira kao jedan fuzijski protein GST-CrdA. Prisutnost GST-a olakšava smatanje, poboljšava topljivost cijelog fuzijskog proteina i stabilizira ga.



Slika 11. Shema redukcije glutathiona pomoću glutathion-S-transferaze u metaboličkom putu glutathiona, faza II.⁴⁹

Matriks se zapravo sastoji od glutathiona vezanih alkilnom poveznicom od 10 atoma ugljika na gusto umreženu 6 %-tnu agarozu. Kapacitet kolone je približno 10 mg GST proteina na 1 mL smole, no on ovisi o fuzijskom proteinu, protoku i ostalim parametrima. Korišteni su pufer A i B čiji su sastavi vidljivi u tablici 9. Pročišćavanje se provodilo pomoću peristaltičke pumpe *Peristaltic Pump P-1* (GE Healthcare). Najprije su se puferom A napunile cjevčice pumpe i zatim su se spojile s kolonom kako bi se izbjeglo unošenje zraka u kolonu. U isto vrijeme se uklonio donji čep kolone i uključila pumpa, nakon čega je kolona uravnotežena s 10 mL pufera A. Nanošenje 4,5 mL uzorka je najbolje provesti uz protok od 1-5, u radu je bio 2,5 mL min⁻¹. Nanošenje uzorka je provedeno 3 puta uz protok 1 mL min⁻¹, te je FT propušten još dva puta kako bi se fuzijski protein što bolje vezao. Kolona je zatim isprana s 20 mL pufera A (sakupljen je W), nakon čega je slijedila elucija s 10 mL pufera B te su sakupljene frakcije.

Tablica 9. Sastav pufera A i B korištenih pri *GST* afinitetnoj kromatografiji

	Pufer A (pH =7,4)	Pufer B (pH=8,00)
Tris	-	25 mmol dm ⁻³
K ₂ HPO ₄	10 mmol dm ⁻³	-
KCl	2,7 mmol dm ⁻³	50 mmol dm ⁻³
NaCl	140 mmol dm ⁻³	-
Glicerol	-	5 %
NaH ₂ PO ₄	1,8 mmol dm ⁻³	-
Glutation (reducirani)	-	10 mmol dm ⁻³

Kao što je vidljivo u tablici 9 razlika između pufera A i B je u dodanom reduciranom glutatyonu koji se kompetitivno veže, ovaj puta na protein zbog čega se on otpušta s kolone i biva eluiran. Princip je isti kao i u IMAC kromatografiji s imidazolom i vezanjem na Ni²⁺ ione.

3.3.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određena spektrofotometrijskom metodom. Količina potrebnog uzorka je bila 2 µL. Uređaj koji se koristio je *Nanodrop 1000 (Nanodrop)*, pomoću njega je određena apsorbancija a masena koncentracija je dobivena preračunavanjem iz apsorbancije preko Beer-Lambertovog zakona. Prije korištenja uređaj se morao kalibrirati sa ReH₂O i puferom u kojem je protein. Apsorbancija uzorka se određivala pri valnoj duljini od 280 nm jer je to područje koje odgovara apsorpiranju aromatskih aminokiselina. Koncentracija se izračunala preko ekstincijskog faktora i molekulske mase. Ekstincijski faktor se dobio teoretskim izračunom ubacivanjem proteinske sekvence u računalni program *ProtParam (ExPASy)*.

3.3.4. Kromatografija isključenjem prema veličini (engl. size-exclusion chromatography, SEC)

Kromatografija isključenjem ili gel filtracija je kromatografska razdjelna metoda koja se temelji na razlici u veličini molekula. Stacionarna faza se sastoji od inertnog punila (kopolimera ili polimera) koji sadrži veliki broj pora određenih veličina u koje mogu ući manje molekule, dulje se zadržavaju u koloni i samim time imaju veće retencijsko vrijeme. U eksperimentu je gel-

filtracija korištena kao metoda pročišćavanja proteina u uzorcima (u određenim frakcijama) od zaostalih nečistoća nakon afinitetne kromatografije. Korištena kolona je *Superose 12 10/300 GL* (*GE Healthcare*), volumena 24 mL. Ova kolona se koristila za pročišćavanje proteina SUMO-G-CrdA nakon afinitetne kromatografije kako bi se uzorci još dodatno pročistili. Drugi protein koji je nanesen na kolonu je CrdA nakon rezanja i propuštanja kroz afinitetnu kolonu. Za početak rada kolona je isprana sa 50 mL ReH₂O pri protoku od 0,6 mL min⁻¹. Nakon ReH₂O slijedila ekvilibracija sa 50 mL pufera A (tablica 10) u kojem se nalazi uzorak, pri protoku od 0,6 mL min⁻¹. Potrebno je ukloniti zrak iz otopina, vode i pufera, a to je odrađeno ultrasoničnim pulsiranjem 15 min pomoću *Elmasonic S 60* (*Elmasonic*). Prije nanošenja pufer se filtrirao pomoću filtera *cut off*-a od 0,22 µm. Nakon što je sustav ohlađen na 4 °C, slijedilo je nanošenje uzorka pri protoku od 0,6 mL min⁻¹. Uzorci su prikupljeni u volumenima od 250 µL. Kvantifikacija uzorka se vršila spektrofotometrijom pri 280 nm. Uzorci u kojima je bila vidljiva prisutnost proteina su još dodatno ispitani SDS-PAGE elektroforezom.

Tablica 10. Sastav pufera A za gel filtraciju (pripremljen u volumenu od 1 L)

Tris (pH = 8,0)	20 mmol dm ⁻³
NaCl	150 mmol dm ⁻³
Glicerol	10%
+ 50 mmol dm ⁻³ HEPES, pH = 7,5 (kod gel filtracije u kojoj uzorak sadrži porezani CrdA)	

Kolona se prije skladištenja u natrijevom azidu na 4°C morala isprati sa ReH₂O. Frakcije 2 – 4 dobivene nakon prve afinitetne kromatografije su pročišćene gel-filtracijom kao i frakcije dobivene nakon rezanja fuzijskih proteina.

U gel filtraciji u kojoj je porezani CrdA protein (frakcije nakon rezanja i pročišćavanja) se koristio pufer (tablica 10) koji sadrži HEPES (2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfonska kiselina). Služi za stabilnije održavanje pH otopine pri nižim temperaturama što je iznimno važno za nestabilne proteine kao što je CrdA. Kod gel filtracije s porezanim proteinom nanosilo se 50 µL uzorka, a u slučaju kad se još dodatno provjeravala stabilnost CrdA proteina sa dodatkom 1 mmol dm⁻³ EDTA, nanijelo se 175 µL uzorka. Protok pri dvije zadnje navedene gel filtracije je također bio 0,6 mL min⁻¹.

Provodila se i gel-filtracija porezanog fuzijskog proteina GST-CrdA. 200 uL uzorka porezanog fuzijskog proteina GST-CrdA ($\gamma = 7 \text{ mg mL}^{-1}$) se nanijelo na kolonu Superdex 75 10/300 GL.

Postupak kao i sastav pufera za ispiranje su provedeni i korišteni već navedenim postupkom (tablica 10, pufer nije sadržavao glicerol i Tris).

3.3.5. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija

Ionsko-izmjenjivačka kromatografija razdvaja molekule koje se vrlo malo razlikuju u naboju. Temelji se na reverzibilnoj interakciji nabijene molekule i matriksa kolone koji je suprotno nabijen. Najčešće se uvjeti tako prilagode da se ciljana čestica veže na matriks kolone. Pri eluaciji se polako mijenja ionska jakost, povećava se, najčešće pomoću NaCl-a. Važno je naglasiti da ukupni površinski naboj uvelike ovisi o pH, stoga je njegova vrijednost vrlo važna u ovoj kromatografiji. U ovom radu je korištena Mono Q 4,6/100 PE (*GE Health Care, Life Science*). Kolona je jaka anionska, od polistirena, a nabojna skupina je $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$. Protokol je tekao na slijedeći način. Prvo je provedena ekvilibracija kolone pri protoku od 2 mL min^{-1} s puferom 1 (tablica 11), sa 17 mL, dok se pH, provodnost i apsorbancija nisu stabilizirali. U drugom koraku se nanosi otopina s uzorkom pri odabranom pH i ionskom jakosti. Slijedilo je ponovno ispiranje sa puferom 1, 17 mL. Cilj je bio ponovno poravnanje apsorbancije, pH eluenta i provodnosti i da sav nevezani materijal izađe iz kolone. Zatim je kolona isprana u gradijentu pufera 2 veće ionske jakosti (0 - 100%) (tablica 11).

Tablica 11. Puferi potrebni pri ionsko-izmjenjivačkoj kromatografiji i njihov sastav.

	Pufer 1	Pufer 2
Trizma® (pH = 8,0)	25 mmol dm^{-3}	25 mmol dm^{-3}
Glicerol	5%	5%
KCl	50 mmol dm^{-3}	800 mmol dm^{-3}

Za kraj se ispire sa 17 mL volumena kolone puferom 1, dok pH i provodnost ne dosegnu preporučene vrijednosti.

3.3.6. Metode izmjene pufera proteinâ SUMO-G-CrdA i GST-CrdA.

Nakon afinitetne kromatografije, odabrane su frakcije bogate fuzijskim proteinom SUMO-G-CrdA koje su relativno čiste. Njihova čistoća i koncentracija je donekle vidljiva na SDS-PAGE gelu (odlomak 4.2, slika 13), a odabrane frakcije za daljnju analizu su frakcije 9 i 10. Promjena pufera prije rezanja SUMO-G-CrdA je bila nužna zbog visoke koncentracije imidazola u puferu

koji je zaostao nakon afinitetne kromatografije. Pri ukoncentriravanju i promjeni pufera korišteni su komercijalno dostupni centrikon *Vivaspin Turbo 4* (*Sartorius*, cut-off 10 kDa). Centrikon je volumena 15 mL a sastoji se od dvije posudice razdvojene hidrofilnom celuloznom membranom s porama određene veličine, pa samim time i propušta molekule samo određene veličine. Ukoncentriravanje se odvijalo centrifugiranjem uzorka po 15 min na 4 °C pri 5000 rpm. Proces se ponavljao više puta (do željene koncentracije koja se odredila spektroskopski). Promjena pufera se odvijala dodavanjem po 500 µL uzorka u centrikon i dopunjavanjem do 2 mL sa puferom A (tablica 8) uz dodatak 3,8 mmol dm⁻³ deterdženta OG (oktil-β-D-glukopiranozid) jer odgovara puferu za cijepanje SUMO-His privjeska (vidi odlomak 3.3.7). Nakon što se volumen spusti na 500 µL, proces se ponovi još tri puta.

Komercijalno dostupna *PD-10* kolona sadrži *Sephadex G-25 Medium* punjenje, korištena je za izmjenu pufera u slučaju većeg volumena uzorka proteina SUMO-G-CrdA. Princip rada je sličan kao u kromatografiji isključenjem na temelju razlike u veličini molekula. Makromolekule veće od pora netopljivog medija bivaju prve eluirane. Male molekule su eluirane u sljedećem koraku ispiranjem sa željenim puferom. Željeni pufer je pufer za rezanje SUMO-His privjeska (odlomak 3.2.6, tablica 13). Nakon uklanjanja čepa i dna kolone, ispustila se otopina u kojoj se čuvao matriks kolone. Kolona je napunjena sa željenim puferom do vrha, pušten je da se spusti u matriks kolone i taj postupak je ponovljen četiri puta (potrebno je iskoristiti oko 25 mL pufera u cijelom procesu). Nakon ispuštanja i zadnjeg volumena željenog pufera, dodano je 2,5 mL uzorka. U slučaju da je volumen uzorka ispod 2,5 mL, doda se pufera do tog volumena. Prvih 2,5 mL propuštenih nakon nanošenja uzorka je *flow-trough*, i ne bi trebao sadržavati proteine. Nakon što se 2,5 mL uzorka spustilo u matriks, dodalo se 3,5 mL željenog pufera. Sljedeći eluat je sadržavao uzorak sa promijenjenim puferom. Na ovaj način su izmijenjeni puferi frakcijama spremanim za cijepanje *SUMO-Express* proteazom. Proteini su po potrebi bili ukoncentrirani *Vivaspin Turbo 4* (*Sartorius*, cut-off 10 kDa) centrikonima.

3.3.7. Cijepanje fuzijskog proteina SUMO-G-CrdA SUMO Express proteazom

Pri cijepanju fuzijskog proteina korištena je *SUMO Express* proteaza, koja spada u skupinu cisteinskih proteaza. Poznata je i pod nazivom *Ulp*, a dobivena je iz *Saccharomyces cerevisiae* iz *Ulp1* kompleksa. Proteaza je vrlo specifična, prepoznaje proteine nalik na ubikvitin na temelju njihove tercijarne strukture. Vrlo je efikasna pri cijepanju SUMO proteina od ostatka fuzijskog proteina. Ima relativno širok raspon djelovanja, od 4 do 37 °C i i pH 6,0–10,0. Prema

komercijalnim uputama efikasnost proteaze je 1 U (jedinica, engl. *unit*) na 10-100 µg fuzijskog proteina. Koncentracija frakcije 9 (nakona afinitetne kromatografije) je bila 0,3 mg mL⁻¹, stoga je 500 µL sadržavalo 0,15 mg proteina. 1 U proteaze cijepa 10-100 µg, stoga je uzeto 5 U *SUMO Express* proteaze. Uzorak se nalazio u puferu za cijepanje (pufer A (odlomak 3.3.1, tablica 8) + OG, no prije cijepanja bilo je potrebno dodati i DTT-a (1,4-ditiotreitol) konačne koncentracije 1 mmol dm⁻³. Oko 500 µL smjese za cijepanje je ostavljeno na 4 °C preko noći. I SUMO privjesak i *SUMO Express* proteaza na svojim N-krajevima sadrže His-privjesak i stoga se vežu na metalne ione inertnog punjenja IMAC kolone. Zbog kompetitivnosti vezanja imidazola i navedenih proteina sa His-privjescima, imidazol biva uklonjen iz pufera u što većoj mogućoj mjeri. Čisti porezani CrdA protein se nalazio u *wash* i *flowthrough* frakcijama, dok su na koloni ostale vezane ostale komponente i neporezan SUMO-G-CrdA protein.

Tablica 12. Sastav pufera R za rezanje

Tris (pH = 8,0)	20 mmol dm ⁻³
Glicerol	10 %
NaCl	150 mmol dm ⁻³
OG	3,8 mmol dm ⁻³
Netom prije nanošenja na kolonu u pufer za rezanje se dodaje DTT konačne koncentracije od 1 mmol dm ⁻³ .	

Drugo rezanje je postavljeno s frakcijama F4 - F8 iz prve afinitetne kromatografije. Koncentracija proteina nakon izmjene pufera u 3,5 mL je iznosila 1,57 mg mL⁻¹. Za rezanje je postavljeno 710 µL otopine proteina i 45 µL proteaze s dodatkom DTT-a konačne koncentracije 1 mmol dm⁻³. Također se inkubiralo na Ni-NTA kolonu 4 °C, 24 h. Omjer masa proteaze i proteina SUMO-G-CrdA je bio 1:10. Kolona je prije nanošenja uzorka uravnotežena puferom za rezanje (tablica 12). Nakon završetka inkubacije, smjesa je centrifugirana 2 min na 10000 rpm te je u daljnjem radu korištena samo topljiva frakcija. 10 µL topljive frakcije odvojen je za SDS-PAGE elektroforezu, a ostatak je inkubiran s Ni-NTA smolom prethodno uravnoteženom puferom R (tablica 12). U sljedećem koraku je sakupljana elucija označena FT u kojoj se nalazio CrdA protein. Dalje je kolona ispirana s 5 mL pufera F nakon čega je slijedilo ispiranje s puferom B (odlomak 3.3.1, tablica 8) te su u svakom koraku sakupljane frakcije za analizu SDS-PAGE elektroforezom.

Treće rezanje je provedeno s 3,5 mL uzorka fuzijskog proteina, 50 μL proteaze i 1 mmol dm^{-3} DTT-om. Nakon rezanja je slijedila inkubacija porezanog uzorka na smoli raspodijeljenoj u 3 epice, svaka sa 150 μL smole. Inkubacija je trajala 1 h nakon čega je slijedilo 5 min centrifugiranja na 10000 rpm. Odvojen je *Flow trough* (FT) kojeg je bilo iz svake epice otprilike 1 mL. Ove frakcije bi trebale sadržavati CrdA. Zatim je slijedilo ispiranje smole s puferom F (tablica 8). Smola je inkubirana s puferom 15 min uz povremeno miješanje, nakon čega je ponovljeno centrifugiranje na isti način. 3 odvojene tekuće frakcije iznad smole su predstavljale *Wash* frakcije. Zadnje ispiranje smole je slijedilo s puferom B, inkubacija i centrifugiranje su provedene na isti način. Skupljene su 3 frakcije (1-3) iz tri epice. Puferi se sadržavali 500 mmol dm^{-3} NaCl. Iz svake odvojene frakcije je odvojen određeni volumen uzorka potreban za SDS-PAGE elektroforezu.

3.3.8. Cijepanje GST-CrdA fuzijskog proteina PreScission proteazom

Protein GST-CrdA je nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom preveden u pufer za rezanje (tablica 13), te je inkubiran s PreScission proteazom (*GE Healthcare*) preko noći na 4 °C. Kao i kod afinitetne kromatografije pufer za rezanje ne smije sadržavati visoku koncentraciju zaostale komponente (glutation) koja je u kompeticiji za vezanje s proteinom na afinitetnoj smoli. Uzorku proteina mase 1540 μg je dodano 34 μg PreScission proteaze za optimalni omjer mase fuzijskog proteina i proteaze, 1:50.

Tablica 13. Sastav pufera za rezanje pomoću *PreScission* proteaze

Tris (pH = 7,5)	50 mmol dm^{-3}
NaCl	150 mmol dm^{-3}
EDTA	1 mmol dm^{-3}
DTT	1 mmol dm^{-3}
OG (dodaje se tek nakon zamjene pufera)	3,8 mmol dm^{-3}

3.4. Određivanje stabilnosti SUMO-G-CrdA

3.4.1. Dinamičko raspršenje svijetlosti (*Dinamic light scattering, DLS*)

Metoda određivanja veličine molekula DLS se temelji na razlici u raspršivanju svjetlosti na manjim i većim molekulama. Detektirao se intenzitet raspršenja svjetlosti tijekom osvjetljenja molekule laserom. Intenzitet raspršenja pri specifičnom kutu se mijenjao s vremenom, a ta promjena u intenzitetu se korelirala. Nastala krivulja se može analizirati u svrhu dobivanja veličine molekula ili distribucije veličine molekula.⁵⁰ Korišteni uređaj je *Zetasizer Nano ZS* (*Malvern Instruments Ltd.*), na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Za uzorak je korištena frakcija 2 druge afinitetne kromatografije. Pri pripremi uzorka važno je obratiti pozornost na koncentraciju uzorka. Ako je preniska, postoji mogućnost da intenzitet raspršene svjetlosti nije dostatan za detekciju. Ako je koncentracija previsoka može doći do duplog raspršenja, odnosno raspršenje sa jedne molekule se ponovno može raspršiti na drugoj molekuli, i to se naziva višestruko raspršenje. Na posljetku, ta idealna koncentracija ovisi o prosječnoj veličini molekule. U radu je pripremljeni uzorak sadržavao i 500 μL pufera A (odlomak 3.3.1). Dobiveno je 1 mL uzorka koncentracije 1 mg mL^{-1} .⁵¹

3.4.2. Ispitivanje stabilnosti proteina SUMO-G-CrdA pomoću Tycho uređaja

Uzorak sa SUMO-G-CrdA proteinom je analiziran na *Tycho* (*NanoTemper*) uređaju uz dodatak različitih metalnih iona ($M = \text{Cu}^{2+}, \text{Cu}^{1+}, \text{Zn}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$). Pratila se promjena intrinzične fluorescencije triptofana i tirozina pri 350 i 330 nm u rasponu temperatura od 35 – 95 °C s gradijentom temperature od 30 °C min^{-1} . Koncentracija proteina u uzorku je iznosila 0,8 mg mL^{-1} , što je u području granica detekcije uređaja (0,01 – 200 mg mL^{-1}). Napravljeno je 5 različitih otopina metalnih iona koje su dodane u uzorak proteina s ciljem ispitivanja stabilnosti proteina za daljnje istraživanje. U tablici 14 je vidljiv sastav dodanih otopina u uzorak proteina. Načinjeno je i kontrolno mjerenje proteina bez dodatka metalnog iona (ApoSUMO-G-CrdA).

Tablica 14. Sastav dodanih soli.

Sol	$c \text{ (sol) / mmol dm}^{-3}$
CuCl ₂	10
CuCl	0,5
ZnCl ₂	10
NiSO ₄	10
MgCl ₂	10

3.5. Određivanje interakcije proteina CrdA s bakrovim(II) ionima metodom termoforeze na mikroskali (*Microscale thermophoresis*, MST)

MST je korišten za ispitivanje interakcije CrdA proteina i bakrovih(II) iona. Kao što i samo ime metode kaže, temperaturni gradijent se uspostavlja na mikro području uzorka obilježenog odabranom fluorescentnom bojom pomoću zračenja infracrvenog lasera. Upravo taj laserski puls rezultira lokalnim fluorescencijskim promjenama na uzorku, odnosno termoforezom. Ona se definira kao usmjereno gibanje molekula zbog temperaturnog gradijenta, obično iz područja više temperature u područje niže temperature. Sustav je vrlo osjetljiv na promjene u hidratacijskim sferama, na promjene naboja i promjeni u veličini molekule, a barem jedna od njih se događa pri vezanju liganda. Na temelju navedenih promjena mogu se razlikovati vezna i nevezna stanja fluorescencije ciljne molekule. U radu je ispitano vezanje Cu²⁺ iona s proteinima SUMO-G-CrdA i CrdA. Kao što je rečeno, ciljna molekula mora imati vezani fluorescirajući privjesak (u nastavku „boja“), a u slučaju SUMO-G-CrdA korištena je *MonolithTM His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA (NanoTemper)* koja se veže na His-privjesak SUMO-G-CrdA proteina. Kod CrdA je korištena boja *MonolithTM Protein Labeling Kit RED-NHS (Amine Reactive) (NanoTemper)* koja se veže na amino skupine bočnih ostataka aminokiselina kao što su arginin, lizin, histidin i slične. Uzorak SUMO-G_CrdA je razrijeđen do konačne koncentracije 200 nmol dm⁻³ u puferu X (tablica 15). Zatim se boja otopila u HSB-u i 5 mmol dm⁻³ MgCl₂-u. 2 µL *MonolithTM His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA* boje je dodano u 98 µL pufera HSB. Slijedilo je miješanje boje (pripremljene otopine) s otopinom proteina u omjeru 1:1, a inkubacija boje i proteina trajala je 30 min na sobnoj temperaturi u mraku.

Uzorak sa CrdA se preveo u pufer za vezanje (sastav u tablici 16) kako bi se izbjeglo vezanje boje na komponente koje sadrže primarne amine, a to su amonijevi ioni, imidazol, Tris, glicin,

DTT, β -merkaptetanol i druge. Na početku obilježavanja boja je otopljena u 30 μL dimetil sulfoksida (DMSO). Ako je potrebno predlaže se i vorteksiranje. Boja se pripremi na taj način da je 2 - 3 puta manje koncentracije od koncentracije proteina ($5 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Boja je razrijeđena s puferom za obilježavanje (tablica 16). Uzorak s proteinom i boja su pomiješani u omjeru 1:1. Konačni volumen je iznosio 200 μL (100 μL uzorka proteina, 10 μL boje i 90 μL pufera za obilježavanje). Pripremljena smjesa je inkubirana 30 min pri sobnoj temperaturi u mraku. Također je i višak boje uklonjen na spin kolonama. Nakon toga je slijedio postupak u nastavku, isti je za obje metode bojanja.⁵²

Za vrijeme inkubiranja pripremljeno je i označeno 16 PCR tubica. U tubice 2 – 16 je ispipetirano po 10 μL pufera X, a u 1. tubicu 20 μL otopine CuCl_2 otopljenog u puferu X (krajnje koncentracije 4 mmol dm^{-3}), u njemu je koncentracija bakrovih iona najveća. Zatim je iz tubice 1 ispipetirano 10 μL otopine u 2. tubicu, promiješano je pomoću pipete i nastavak pipete je bačen. S novim nastavkom je ponovljen postupak s otopinom iz 2. i 3. tubice. Postupak se ponavljao sve do 16. tubice iz koje 10 μL otopine bačeno u otpad. Zbog vrlo malih količina, bilo je potrebno ukloniti svaki višak otopine zaostao na nastavku pipete prije nego ga se stavilo u novu otopinu. Ovim postupkom se razrijedila početna koncentracija bakra 16 puta. Nakon vezanja boje na protein, uzorak je centrifugiran 10 min na 10000 rpm. U 3. koraku je u svaku tubicu ispipetirano je po 10 μL otopine sa obilježenim proteinom. Od velike važnosti je dobro promiješati dodanu otopinu pipetom. Prije nanošenja u kapilare, otopine su inkubirane 5 min na sobnoj temperaturi. Slijedilo je nanošenje otopina u kapilare, a korištene kapilare su *MonolithTM NT.115 MST Premium Coated Capillaries*. Najprije je mjerena fluorescencija bez MST pobude, gdje je vidljiva preciznost pipetiranja i kvaliteta uzoraka. Dozvoljena su odstupanja od $\pm 20 \%$. Zatim je slijedilo MST pobuđivanje i detekcija s 20 % snage lasera, a kasnije i s 40 % snage lasera. U nastavku su očitani i analizirani dobiveni podatci. Isti postupak miješanja uzorka proteina i bakrovih iona kao i sama mjerenja izvedena su na isti način, za SUMO-G-CrdA i za CrdA.

Tablica 15. Sastav pufera X (pH = 7,5)

NaCl	150 mmol dm ⁻³
MOPS	20 mmol dm ⁻³
TWEEN (Polioksietilen (20) sorbat monolaurat)	(v/v) 0,05 %

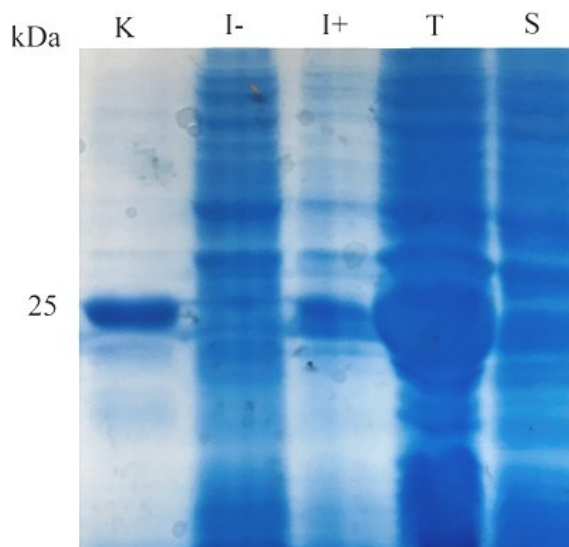
Tablica 16. Sastav pufera za obilježavanje (pH = 7,5)

HEPES	50 mmol dm ⁻³
NaCl	150 mmol dm ⁻³
OG	3,8 mmol dm ⁻³

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Prekomjerna ekspresija fuzijskog proteina SUMO-G-CrdA

Nakon ekspresije i izolacije proteina, uspješnost ekspresije i topljivost proteina je provjerena SDS-PAGE elektroforezom (slika 12).



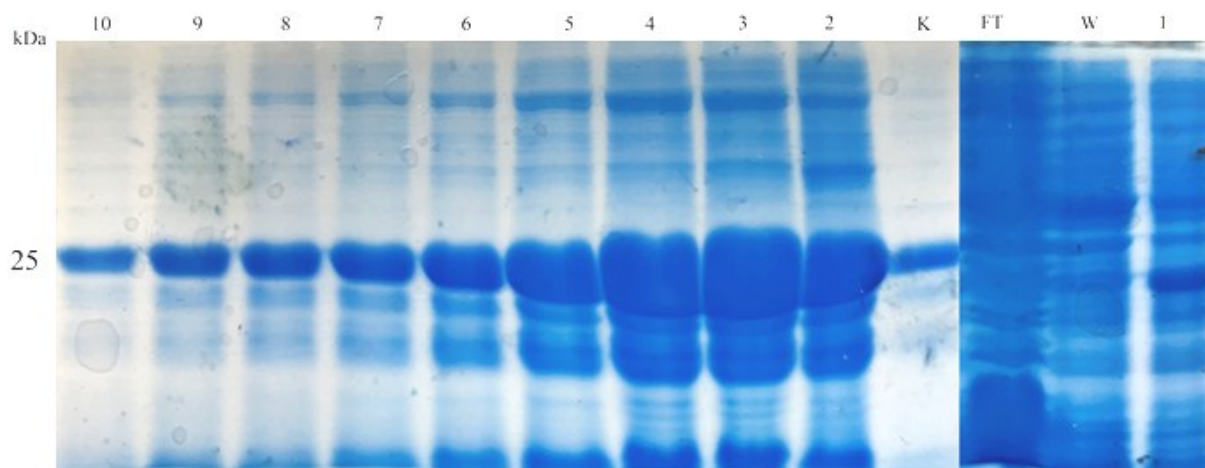
Slika 12. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon provedene SDS-PAGE elektroforeze uzoraka proteina tijekom bakterijskog uzgoja, iniciranja ekspresije proteina i tijekom pročišćavanja (K označava kontrolu, predstavlja SUMO-G-CrdA čija je veličina 31,1 kDa, I- i I+ predstavljaju uzorak iz otopine proteina prije i nakon indukcije ekspresije, T predstavlja netopljivi talog nakon lize bakterijskih stanica, S je topljivi dio nakon lize i centrifuge bakterijskih stanica).

Slika 12 potvrđuje uspješnost ekspresije. Prije indukcije (I-) je vidljivo da proteinski ekstrakt ne sadrži vrpce koja bi odgovarala veličini proteina SUMO-G-CrdA veličine 23,8 kDa. Nakon indukcije (I+) se pojavljuje vrpca na oko 25 kDa, koja odgovara molekularnoj masi proteina SUMO-G-CrdA. Ubacivanjem aminokiselinske sekvence svakog pojedinog proteina u računalni program *ProtParam (ExpASy)*, dobivene su slijedeće molekularne mase proteina: His₆-SUMO iznosi 12,3 kDa, a G-CrdA 11, 5 kDa. Unatoč uspješnoj ekspresiji proteina od interesa, nakon lize i centrifugiranja vidljivo je da je dosta proteina zaostalo u netopljivom dijelu uzorka u obliku inkluzijskih tijela (slika 12, frakcija T). Međutim, vidljiva je i vrlo intenzivna vrpca u frakciji koja odgovara topljivom dijelu uzorka (slika 12, frakcija S) na mjestu

koje po veličini odgovara eksprimiranom proteinu. Inkluzijska tijela su netopljivi agregati nepravilno smotanih proteina koji su izgubili svoju funkciju, osim ako im je konformacija agregata vrlo bliska nativnoj konformaciji. Čest uzrok nastajanja inkluzijskih tijela je sama brzina heterologne prekomjerne ekspresije, koja onemogućava proteinima da se potpuno i pravilno smotaju. Drugi razlog agregacije eksprimiranih proteina može biti nedostatak posttranslacijskih mehanizama ili sama priroda proteina (npr. membranski proteini su izvana hidrofobni i u citosolu su netopljivi i talože se u obliku inkluzijskih tijela). Problem prevođenja inkluzijskih tijela u topljivu formu proizlazi iz činjenice da ne postoji standardizirani protokol kojim se proteinima vraća nativni oblik, nego se nasumično mijenjaju solubilizacijski uvjeti kao što je koncentracija kaotropnih tvari (uree, SDS-a, acetonitrila i sličnih tvari) ne bi li se povećala topljivost proteina. Dodatni problem je i u renaturaciji, gdje se također nasumično biraju uvjeti u kojima bi protein poprimio nativnu konformaciju, a mijenjaju se uvjeti poput temperature inkubacije, ionski sastav otopine, koncentracija proteina, pH i drugi. Rad nije bio usmjeren na optimizaciju solubilizacijskih i renaturacijskih uvjeta jer je u topljivom dijelu uzorka dobivena dovoljna količina ciljanog proteina, te je dalje u radu korištena topljiva frakcija proteina. Pročišćavanje proteina SUMO-G-CrdA IMAC kromatografijom (1. afinitetna kromatografija).

Heksa-histidinski privjesak na N-kraju SUMO proteina omogućava afinitetno pročišćavanje fuzijskog proteina na Ni-NTA koloni. Rad s proteinima zahtijeva vrlo visok stupanj čistoće i relativno visoku koncentraciju proteina. Stoga je zbog vrlo velikog onečišćenja topljivog dijela uzorka (S, nakon lize i centrifuge) bilo potrebno pročišćavanje navedenom metodom. Protokol pročišćavanja je opisan u Odlomku 1.2.1, a rezultati pročišćavanja su vidljivi na slici 13. Postupak nanošenja i propuštanja topljivog uzorka kroz kolonu je proveden 3 puta, a uzorak za elektroforezu je odvojen iz zadnjeg, 3. propuštanja. Postupak vezanja je ponovljen zbog veće vjerojatnosti vezanja proteina na kolonu. Na slici 13 je vidljivo da frakcija (FT3) koja odgovara smjesi proteina koji se nisu vezali na smolu sadrži i vrpce na oko 25 kDa, što bi odgovaralo fuzijskom proteinu ($M_r = 23,8$ kDa), međutim može se zaključiti da se najveći dio fuzijskog proteina ipak vezao na smolu (frakcije 1 – 10), a samo mali dio je zaostao u FT3 frakciji. U sljedećoj frakciji (W) su se ispirale sve nečistoće nespecifično vezane na kolonu. Vidljiv je velik stupanj onečišćenja što je i bio cilj ovog ispiranja. U ovoj frakciji je također vidljiva vrpca na 25 kDa što bi odgovaralo proteinu koji se nije vezao na kolonu nego je eluiran. Vrpca ipak

nije toliko intenzivna kao u nadolazećim frakcijama, što se može smatrati vrlo dobrim rezultatom.



Slika 13. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon provedene SDS-PAGE elektroforeze frakcija dobivenih nakon pročišćavanja proteina SUMO-G-CrdA IMAC kromatografijom. K predstavlja kontrolnu frakciju od 25 kDa, a stupci 2 – 10 predstavljaju skupljane frakcije tijekom pročišćavanja (način skupljanja je opisan u Odlomku 1.2.1). FT i W su skupljeni na početku afinitetnog pročišćavanja, a 1 predstavlja prvu skupljenu frakciju tijekom pročišćavanja u kojoj bi se trebao nalaziti čisti protein.

Frakcije od 1 do 10 (slika 13) dobivene ispiranjem smole s elucijskom otopinom koja sadrži visoku koncentraciju imidazola sadrže ciljani protein jer su vidljive intenzivne vrpce na oko 25 kDa koje po veličini odgovaraju SUMO-G-CrdA. Frakcije 10 i 9 su bile zadovoljavajuće čistoće za daljnji rad, dok su u ostalim frakcijama vidljive nečistoće te su se frakcije 1 - 8 morale dodatno pročistiti. Intenzivne vrpce vidljive u frakcijama 2 - 6 (slika 12) na položajima ispod 25 kDa bi mogle predstavljati i degradacijske forme fuzijskog proteina. Najčišće frakcije, 9 i 10, su ugušćene i promijenjen im je pufer. Frakciji 9 je promijenjen pufer s puferom R (odlomak 1.2.7, tablica 12), čime je frakcija 9 bila pripremljena za rezanje sa SUMO-proteazom. Frakciji 10 je promijenjen pufer s puferom A (odlomak 1.2.1, tablica 8) i zbog svoje čistoće i relativno visoke koncentracije proteina odvojena je za paralelan eksperiment kristalizacije proteina, no to nije uključeno u ovom diplomskom radu. Frakcije 2, 3 i 4 su se morale još dodatno pročistiti i to gel-filtracijom. Prije gel-filtracije određene su koncentracije frakcija 2, 3 i 4 pomoću *Nanodrop 1000* (*Nanodrop*) uređaja (postupak opisan u odlomku 3.3.3). Uzorci su razrijeđeni 10 (frakcije 2 i 4) do 20 (frakcija 3) puta kako bi koncentracije bile u granicama detekcije

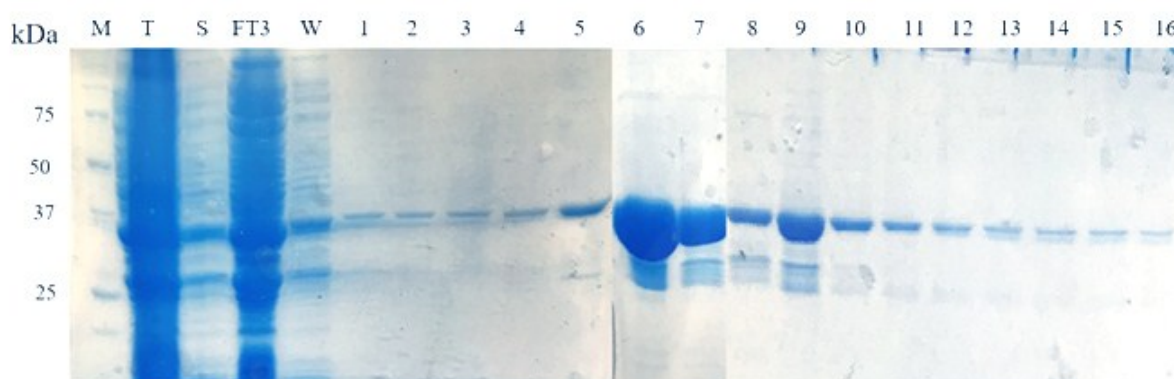
uređaja. Koncentracije proteina SUMO-G-CrdA izmjerene u frakcijama 2 – 4, 9 – 10 su prikazane u tablici 17.

Tablica 17. Izračunate koncentracije proteina pomoću apsorbancije dobivene *Nanodrop 1000* (*Nanodrop*) uređajem.

FRAKCIJA	<i>A</i>	$\gamma/\text{mg mL}^{-1}$
2	6,7	15,99
3	15,27	36,44
4	9,17	21,89
9	0,14	0,3
10	0,21	0,5

4.2. Prekomjerna ekspresija i afinitetna kromatografija fuzijskog proteina GST-CrdA korištenjem *GSTrap™ HP* kolone

Drugi eksprimirani fuzijski protein je CrdA na čijem N-kraju se nalazi GST (glutation-S-transferaza). Uzgoj bakterijskih stanica koje sadrže ekspresijski vektor (pGEX) za ekspresiju fuzijskog proteina GST-CrdA je proveden preko noći na 16 °C, za razliku od uzgoja bakterijskih stanica koje su sadržavale pETite_SUMO vektor za ekspresiju fuzijskog proteina SUMO-G-CrdA koji je trajao 3 – 4 h na 30 °C.



Slika 14. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon provedene SDS-PAGE elektroforeze frakcija odvojenih iz uzorka nakon izolacije proteinskog ekstrakta (T i S) i tijekom afinitetnog pročišćavanja pomoću *GSTrap™ HP* kolone. M označava marker veličina *Precision Plus Protein Standards Unstained*. Stupac T predstavlja netopljivi talog nakon lize stanica, a S je

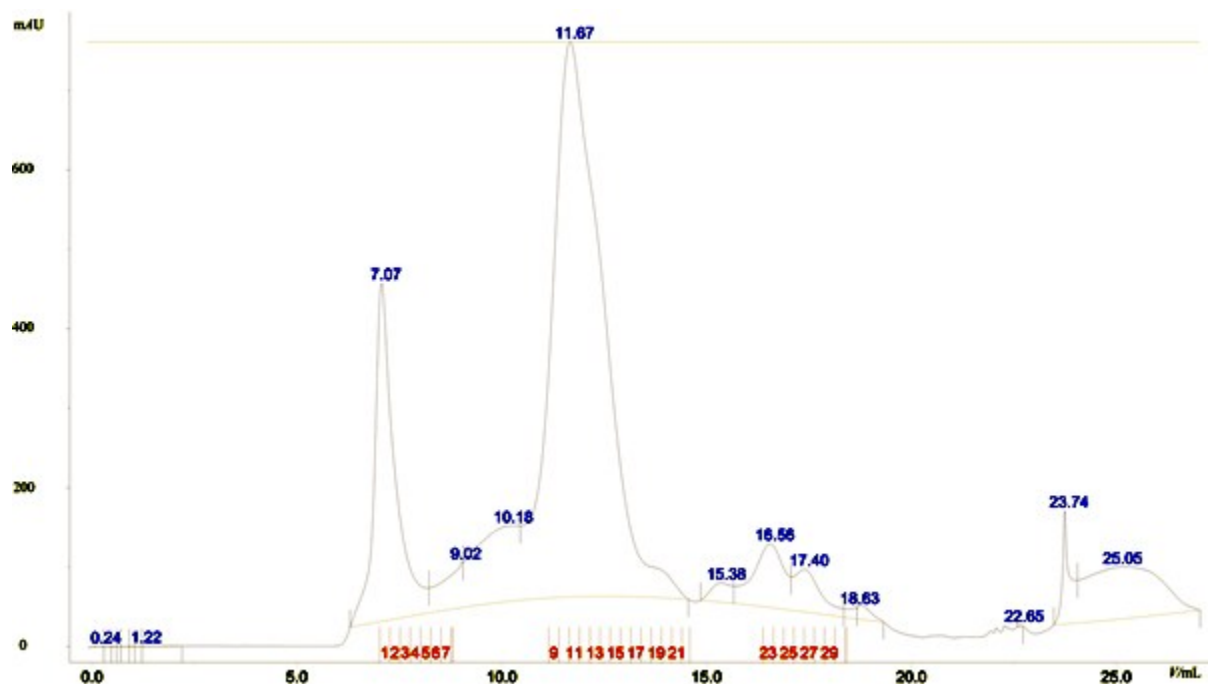
supernatant, topljiva frakcija nakon lize bakterijskih stanica. FT3 i W su frakcije koje sadrže proteine nevezane specifično na smolu, a 1 – 16 predstavljaju skupljene frakcije nakon elucije ciljanog proteina.

Na slici 14 je vidljivo uspješno eksprimiranje fuzijskog proteina GST-CrdA. U svim frakcijama je prisutna vrpca na oko 35 kDa, što bi odgovaralo fuzijskom proteinu (veličina CrdA iznosi 13,8 kDa, a GST 25,6 kDa).

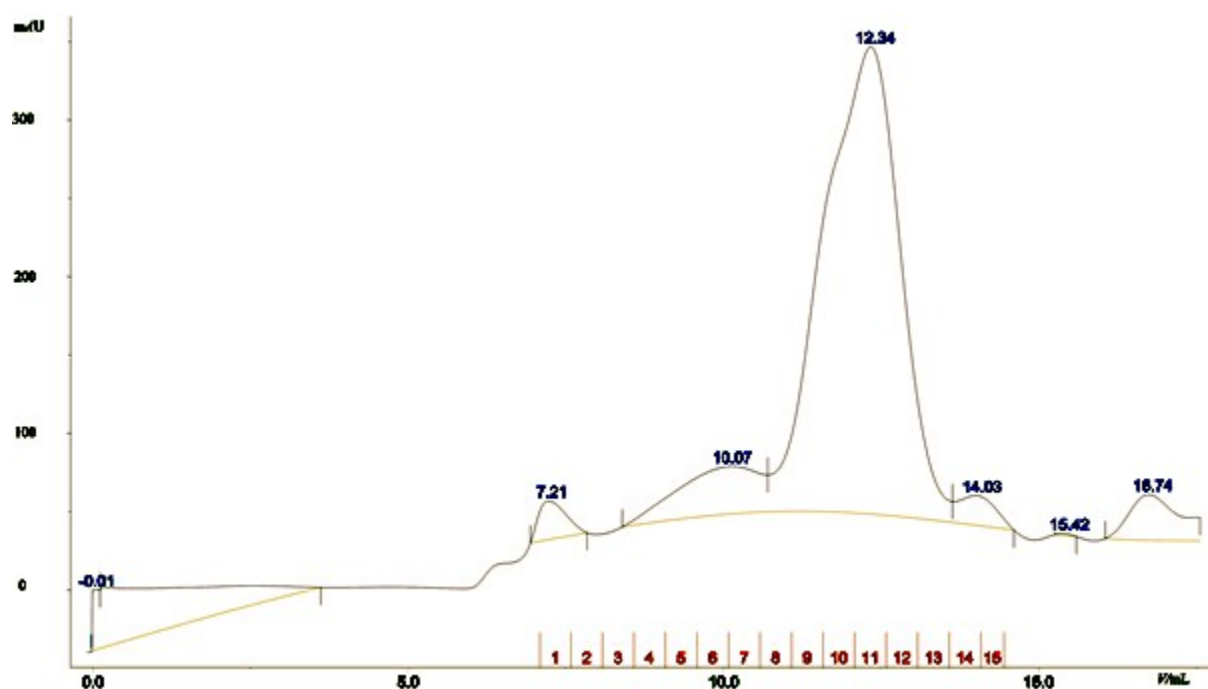
Prisutnost fuzijskog proteina vidljiva je i u topljivom dijelu (slika 14, frakcija S) i u talogu (slika 14, frakcija T). Iako se protein CrdA fuzijski eksprimira s drugim proteinom – GST kako bi ga stabilizirao, olakšao pravilno smatanje i pročišćavanje vidi se da je ipak dio fuzijskog proteina završio u inkluzijskim tijelima. Na slici 14 je vidljivo da frakcija (W) nakon ispiranja smole od nespecifično vezanih proteina također sadrži fuzijski protein. Budući da je ekspresijom dobivena velika količina proteina moguće je da je kapacitet smole bio premali za vezanje tako velike količine proteina te se dio fuzijskog proteina eluirao u frakcijama FT3 i W. Frakcije 1 – 7 predstavljaju eluciju ciljanog fuzijskog proteina sa smole, te frakcije 6 – 9 sadrže najveću količinu fuzijskog proteina (slika 14). Zanimljiva je pojava vrpce na u rasponu od 35 – 25 kDa u frakcijama T, S, FT3, W i 6 – 9 koje po veličini odgovaraju degradacijskim formama fuzijskog proteina.

4.3. Kromatografija isključenjem na temelju veličine čestica frakcija 2, 3 i 4 SUMO-G-CrdA dobivenih nakon prve afinitetne kromatografije (SEC, gel-filtracija)

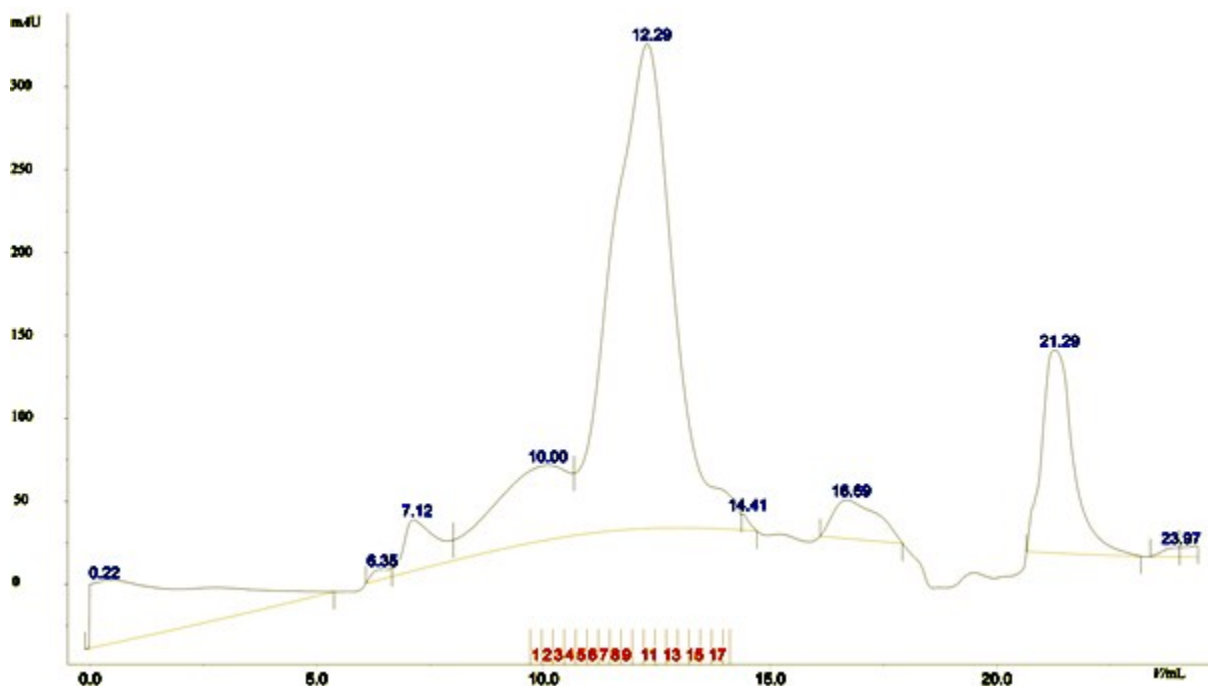
Zbog nezadovoljavajuće čistoće i velike koncentracije proteina, frakcije 2, 3, i 4 (odlomek 4.2, slika 12) proteina SUMO-G-CrdA dobivene nakon afinitetne kromatografije pročišćene su gel-filtracijom.



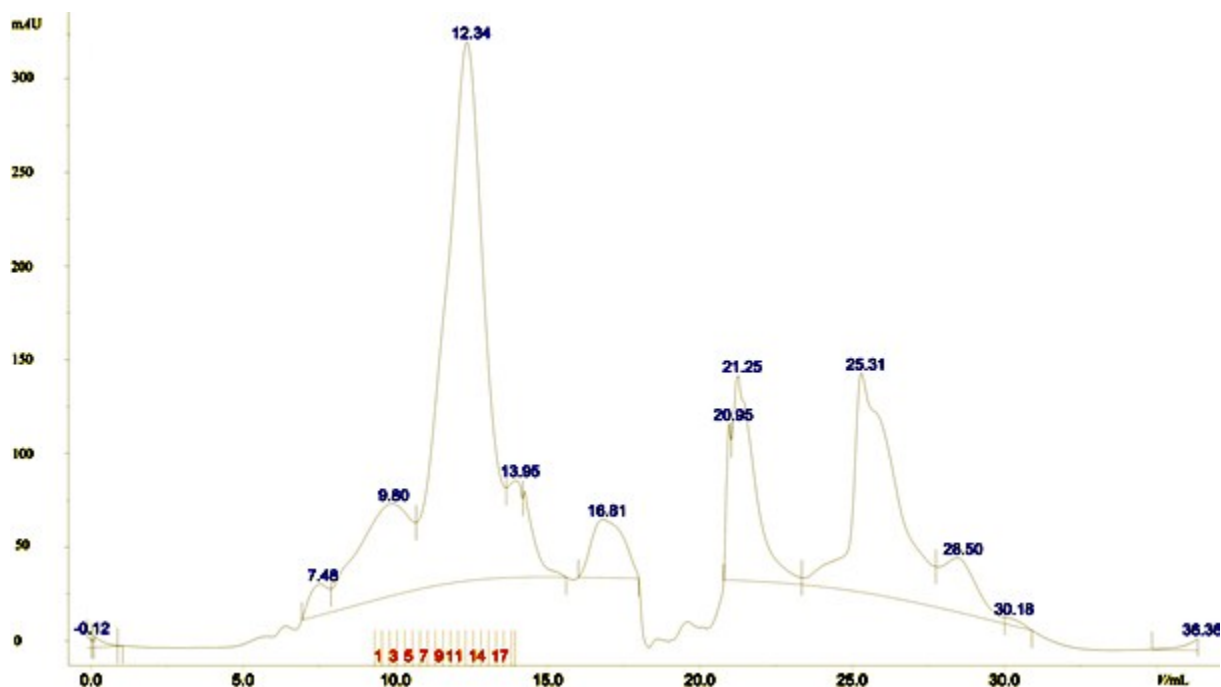
Slika 15. Prikaz gel-filtracijskog kromatograma frakcije 2 uzorka SUMO-G-CrdA dobivenog nakon prve afinitetne kromatografije. Siva krivulja predstavlja apsorbanciju uzorka pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o volumenu eluiranog uzorka.



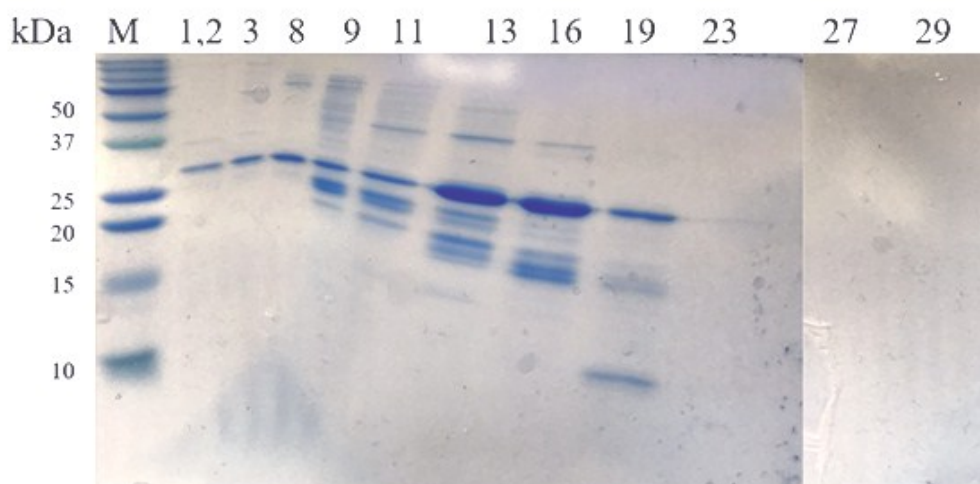
Slika 16. Prikaz gel-filtracijskog kromatograma pomješanih frakcija 2 i 3 uzorka SUMO-G-CrdA dobivenog nakon prve afinitetne kromatografije. Siva krivulja predstavlja apsorbanciju uzorka pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o volumenu eluiranog uzorka.



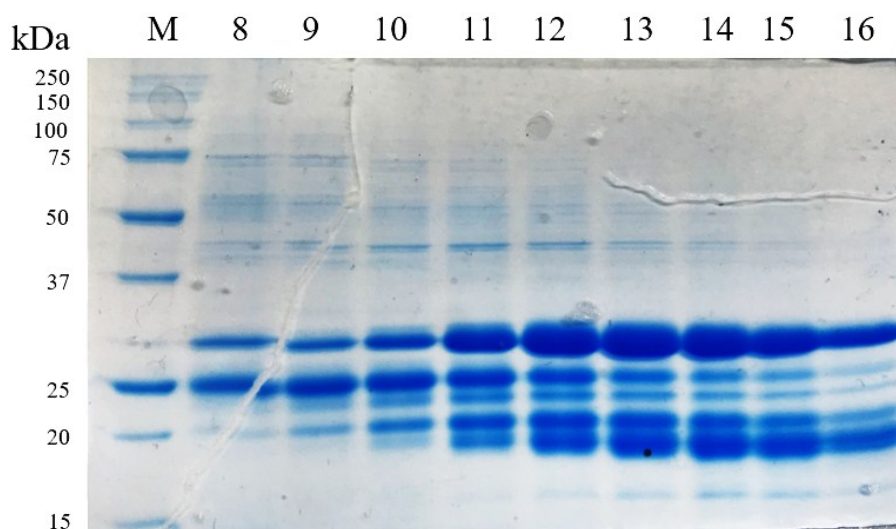
Slika 17. Prikaz gel-filtracijskog kromatograma razrijeđene frakcije 3 uzorka SUMO-G-CrdA dobivenog nakon prve afinitetne kromatografije. Siva krivulja predstavlja apsorbanciju uzorka pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o volumenu eluiranog uzorka.



Slika 18. Prikaz gel-filtracijskog kromatograma pomiješanih frakcija 3 i 4 uzorka SUMO-G-CrdA dobivenog nakon prve afinitetne kromatografije. Siva krivulja predstavlja apsorbanciju uzorka pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o volumenu eluiranog uzorka.



Slika 19. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze provedene nakon prve gel filtracije. M označava marker veličina *Precision Plus Protein Standards Unstained*. Brojevi označavaju frakcije dobivene nakon prve gel filtracije, njihova apsorbancija pri valnoj duljini od 280 nm je vidljiva na slici 15.



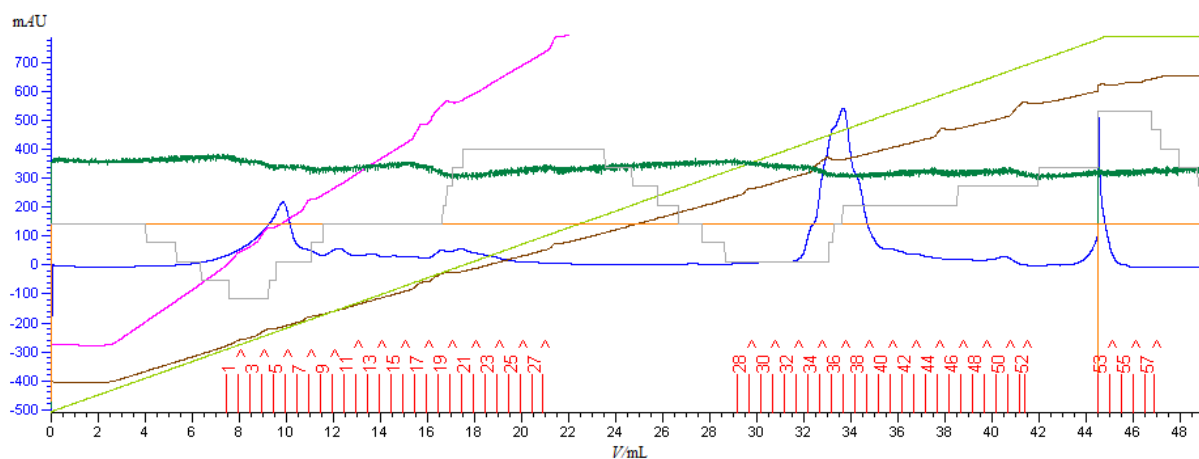
Slika 20. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze frakcija 8-16 dobivenih nakon četvrte gel-filtracije. M označava marker veličina *Precision Plus Protein Standards Unstained*.

Na sva četiri kromatograma (slike 15 – 18) vidljivo je povišenje apsorbancije na otprilike istom eluiranom volumenu uzorka i vrijednost apsorbancije (visina pika) je otprilike ista. To je ujedno i najveći pik u sva četiri kromatograma te su sakupljene frakcije u području opisanog pika najbogatije željenim fuzijskim proteinom SUMO-G-CrdA (slika 19, 20). Gel-filtracijom su se

uspješno odvojile neke od nečistoća, odnosno molekule većih i puno manjih molekulskih masa. Dobiveni rezultati su analizirani prema baždarnom pravcu za korištenu kolonu koji je konstruiran prema protokolu.⁵³ Ubacivanjem eluiranog volumena koji odgovara najvišem piku, u prosjeku 12,3 mL, u jednadžbu baždarnog pravca, dobivena molekularna masa proteina je 54,44 kDa. Teorijska masa fuzijskog proteina je 23,8 kDa, što bi značilo da se fuzijski protein u otopini javlja kao dimer. Analiziranjem pika koji se pojavljuje na oko 7 mL zaključeno je da dolazi do stvaranja agregata jer se dobije negativan rezultat jednadžbe baždarnog pravca. Dobiveni negativni rezultat ukazuje na molekulsku masu proteina veću od 200 kDa, koliko iznosi molarna masa proteina pomoću kojeg je dobiven V_0 („prazni volumen kolone“), korišten u jednadžbi za baždarni pravac. Na SDS-PAGE gelovima (slike 19 i 20) je vidljiv jasan trend podebljanja vrpce koje odgovaraju fuzijskom proteinu (između 25 i 37 kDa) i njegovim degradacijskim formama (vrpce ispod 25 kDa).

4.4. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija

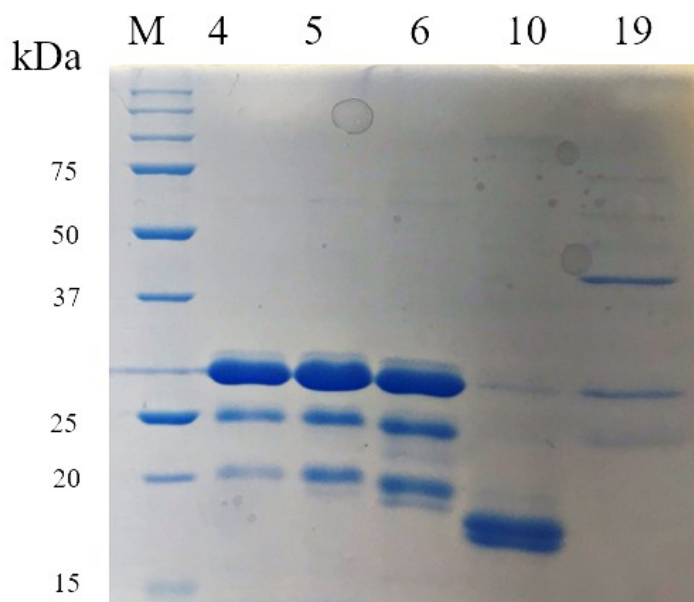
Pročišćavanje frakcija nakon gel filtracije ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom se provelo radi nezadovoljavajuće čistoće dobivene gel-filtracijom.



Slika 21. Prikaz kromatograma pročišćavanja frakcija (nakon gel-filtracije) ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom. Plava krivulja predstavlja apsorbanciju uzorka pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o volumenu eluiranog uzorka.

Za analizu SDS-PAGE elektroforezom uzete su frakcije čija je apsorbancija najveća kao i nekoliko okolnih frakcija. Iz SDS-PAGE gelova je vidljiva prisutnost vrpce velikog inteziteta između 25 i 37 kDa u stupcima 4, 5 i 6. Ta vrpca odgovara SUMO-G-CrdA fuzijskom proteinu.

Na gelu su vidljive i vrpce u istim navedenim stupcima ali u nešto nižim položajima. To su nečistoće koje su zaostajale i u gel-filtracijama (slika 22). Očito su sličnog naboja kao i cijeli fuzijski protein, ili su nečistoće ugrađene u fuzijski protein na način da se ne mogu odvojiti ni na temelju razlike u naboju, niti na temelju različite veličine. Moguće je da dolazi do degradacije proteina tijekom pripreme uzorka za SDS-PAGE elektroforezu. Na kromatogramu se ne vide manji dijelovi proteina tamo gdje bi se po SDS gelu (slika 22) trebao vidjeti. Moguće je da neki od uvjeta ne odgovaraju fuzijskom proteinu i zato dolazi do degradacije. Frakcija 10 (slika 22) je dobar primjer razdvajanje nečistoća, u njoj se nalazi čista frakcija proteina sličnih veličina odvojen od drugih vrpce iz drugih frakcija. To je poželjan način odvajanja dvije vrste proteina na temelju veličine.

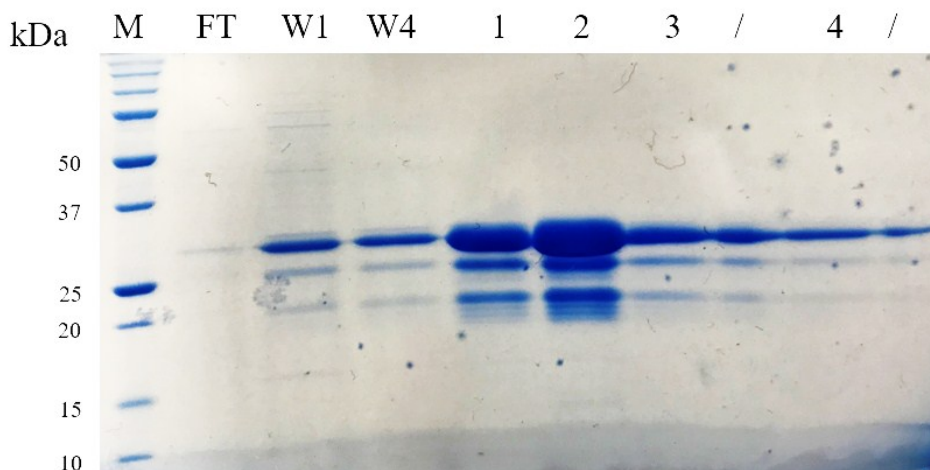


Slika 22. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze provedene nakon ionske izmjene. M označava marker veličina *Precision Plus Protein Standards Unstained*. Brojevi označavaju frakcije dobivene ionskom izmjenom, a apsorbancija frakcija pri 280 nm je vidljiva na slici 21.

4.5. Pročišćavanje proteina SUMO-G-CrdA IMAC 2. afinitetnom kromatografijom

U svrhu pročišćavanja fuzijskog proteina SUMO-G-CrdA provedena je još jedna afinitetna kromatografija. U ovom slučaju je poznato da odvajanje nečistoća ne funkcionira niti na temelju razlike u veličini niti u naboju čestica. Ovog puta se fuzijski protein ili nečistoća trebala vezati

na Ni-NTA kolonu, a ostatak je trebao biti eluiran. Tijekom 2. afinitetne kromatografije metoda je optimizirana korištenjem većih koncentracija soli i imidazola tijekom ispiranja nespecifično vezanih proteina na smolu, ne bi li se poboljšalo pročišćavanje fuzijskog proteina. Uzorak s fuzijskim proteinom se nije uspio bolje pročistiti niti nakon 2. afinitetne kromatografije. Na SDS gelu (slika 23) je vidljiva vrpca u svim frakcijama između 25 i 37 kDa i ona odgovara fuzijskom proteinu. Nečistoće su zaostale u skoro svim frakcijama, a najviše tamo gdje je najviše fuzijskog proteina. Mogući razlog za to je već spomenuta degradacija proteina u trenutku ispiranja. Očito je da se nečistoće otpuštaju kad i fuzijski protein, što bi značilo moguću degradaciju jednog dijela proteina sa C-kraja, obrnutog od mjesta His-privjeska. Zbog nedobivanja dovoljno čistog proteina, napravljeno je rezanja fuzijskog proteina.

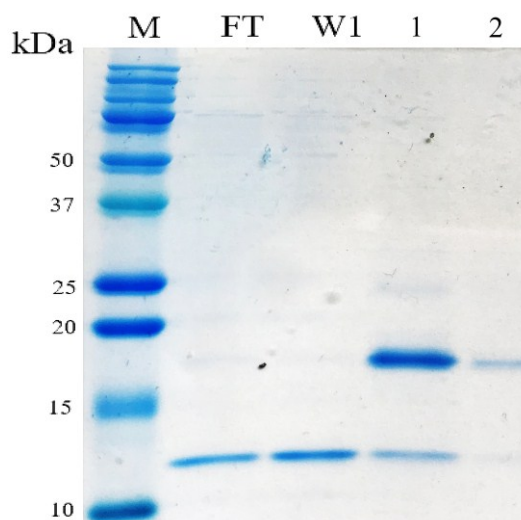


Slika 23. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze provedene nakon druge afinitetne kromatografije. M označava marker veličina *Precision Plus Protein Standards Unstained*. FT označava frakciju dobivenu spuštanjem uzorka u kolonu. Frakcije W1 i W4 su nastale ispiranjem sa 4 volumena kolone od kojih je uzorak W1 odvojen iz prvog ispiranja, a W4 iz četvrtog ispiranja. Pročišćene su frakcije 1 – 7 sa slike 21, no na gelu su prikazane samo do četvrte frakcije zbog tehničkih razloga. U ovoj slučaju su i pufer A i B sadržavali NaCl koncentracije 500 mmol dm^{-3} .

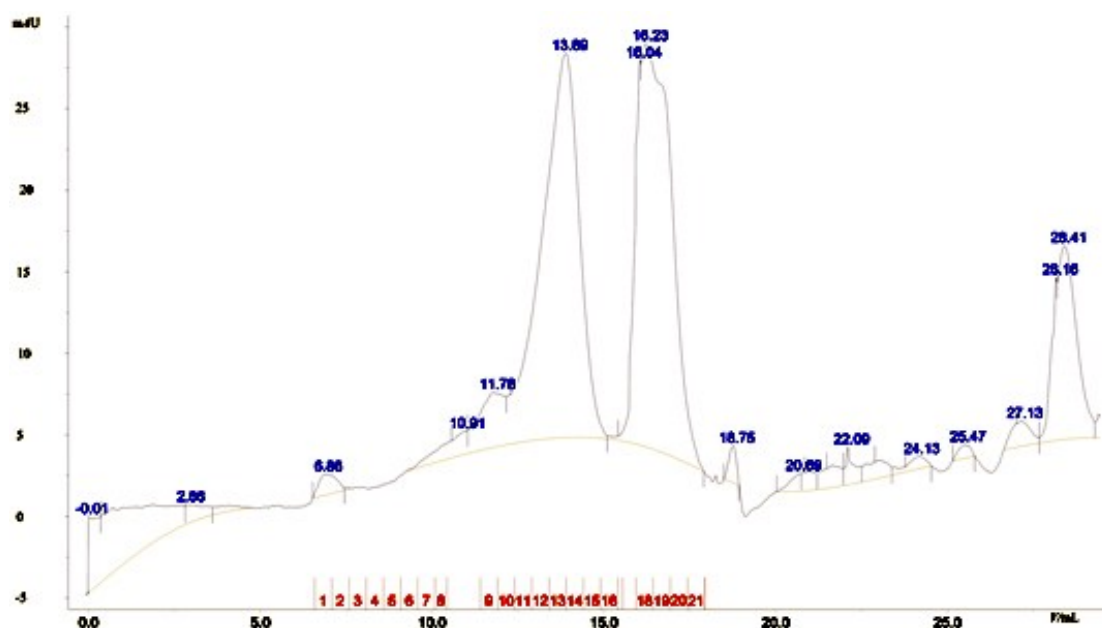
4.6. Cijepanje fuzijskih proteina

4.6.1. Cijepanje fuzijskog proteina SUMO-G-CrdA SUMO Express proteazom i kromatografija isključenjem na temelju veličine čestica (gel-filtracija)

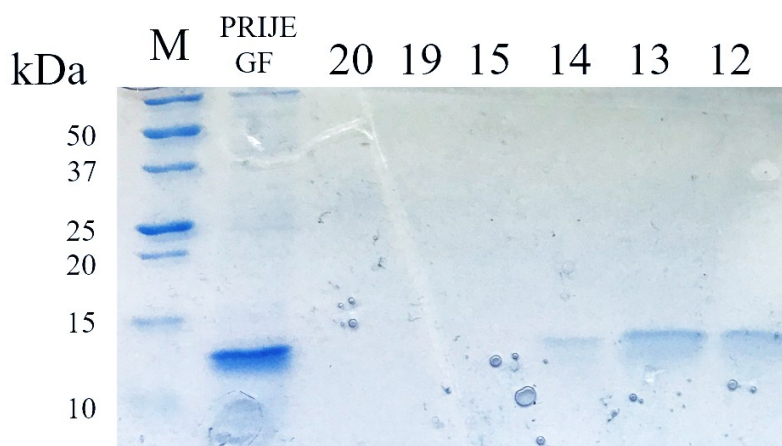
Najprije je provedeno cijepanje fuzijskog proteina iz frakcija 4 – 8 nakon prve afinitetne kromatografije. Nakon rezanja, uzorak je nanesen na Ni-NTA smolu te se protein SUMO vezao na smolu jer na svom N-kraju sadrži His₆-privjesak, a porezani G-CrdA se nije vezao na smolu. Prema slici 24 u frakcijama FT i W1 nalazi se CrdA što se vidi po položaju vrpce koje se nalaze između 10 i 15 kDa koje odgovaraju veličini G-CrdA (slika 24). Frakcije 1 i 2 sadrže vrpce ispod 20 kDa što odgovara veličini proteina SUMO. Zatim je provedena gel-filtracija čistog porezanog G-CrdA u koji je dodana otopina EDTA konačne koncentracije, $c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ (kromatogram je prikazan na slici 25). Analizom najvećeg pika (pri 13,89 mL) došlo se do zaključka da je i G-CrdA protein u otopini u dimernom obliku. Analiza je provedena preko jednadžbe za baždarni pravac.



Slika 24. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze provedene nakon postupka cijepanja i pročišćavanja frakcija 4 – 8 nakon prve afinitetne kromatografije. M označava marker veličina *Precision Plus Protein Standards Unstained*. FT označava frakciju skupljenu tijekom ispuštanja uzorka u kolonu. W1 je frakcija sakupljena ispiranjem, a frakcije 1 i 2 označavaju ispiranje kolone otopinom visoke koncentracije imidazola.



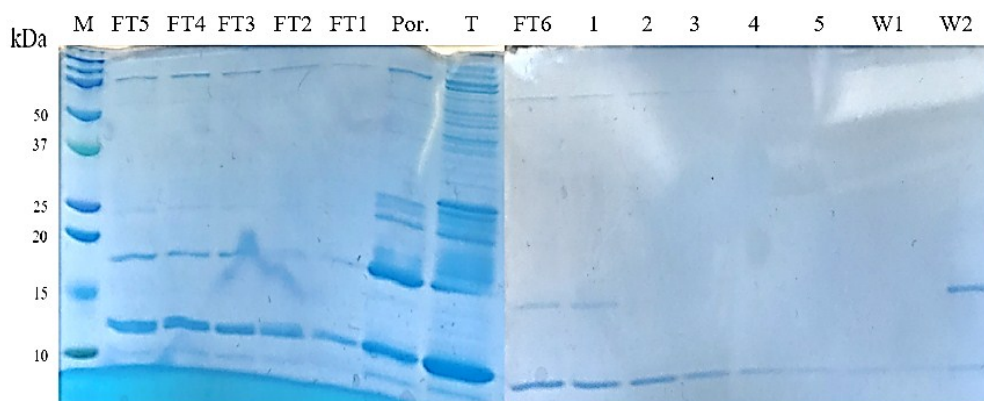
Slika 25. Prikaz gel-filtracijskog kromatograma porezanih frakcija 4 – 8 uzorka SUMO-G-CrdA dobivenog nakon prve afinitetne kromatografije. Siva krivulja predstavlja apsorbanciju uzorka pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o volumenu eluiranog uzorka. U uzorak je dodan 1 mmol dm^{-3} EDTA.



Slika 26. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze provedene nakon gel-filtracije porezanih frakcija 4 - 8 nakon prve afinitetne kromatografije. M označava marker veličina *Precision Plus Protein Standards Unstained*. Drugi stupac prikazuje uzorak prije gel filtracije, a brojevi označavaju uzete frakcije iz gel filtracije prikazane na slici 25.

Na kromatogramu (slika 25) su vidljiva dva dominantna pika, jedan koji pripada CrdA proteinu (13,89 mL) i drugi na 16,2 mL koji ne sadrži proteine (slika 26).

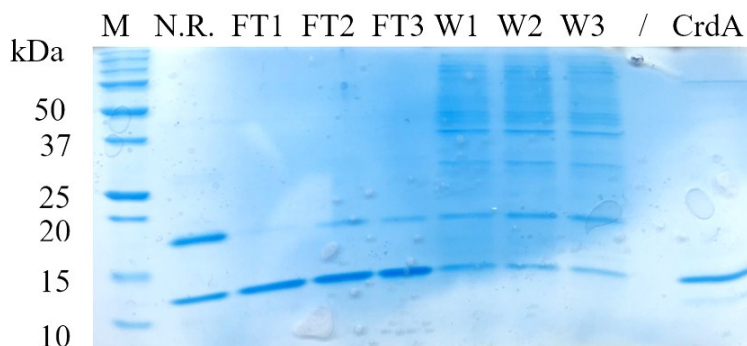
Nakon druge afinitetne kromatografije (odlomak 4.5.1) uzorci 1 – 6 (ostatak smjese frakcija 1 – 6, koji nije išao na rezanje, slika 23) su pročišćeni i porezani kao i prethodno opisan uzorak (slika 26).



Slika 27. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze provedene nakon rezanja SUMO-G-CrdA i pročišćavanja afintetnom kromatografijom. M označava marker veličina *Precision Plus Protein Standards Unstained*. FT frakcije su skupljane propuštanjem uzorka kroz kolonu, stupac Por. sadrži porezani nepročišćeni uzorak, a T predstavlja talog koji se istaložio nakon rezanja. Frakcije 1 – 5 su eluirane puferom F a W1 i W2 puferom B. Sastav pufera je vidljiv u tablici 8, odlomak 3.3.1.

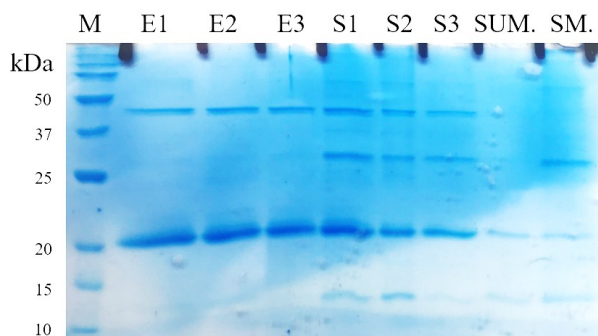
Vrpce između 15 i 10 kDa odgovaraju CrdA proteinu. Vrpca je najintenzivnija u FT frakcijama što je i očekivano jer porezani CrdA ne sadrži SUMO-privjesak i ne veže se na smolu. Vrpce između 20 i 15 kDa odgovaraju SUMO proteinu. Vrpca između 75 i 100 kDa odgovara proteazi i provlači se kroz skoro sve frakcije. Uzorak se nakon rezanja istaložio, što se vidi u frakciji T, a sadržavao je najviše CrdA proteina.

Treće cijepanje i pročišćavanje se odvijalo u tri epice koje su sadržavale 150 μ L smole. Proces je opisan u odlomku 3.3.7.



Slika 28. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze provedene nakon rezanja SUMO-G-CrdA i pročišćavanja Ni-NTA smolom u epicama. M označava marker veličina *Precision Plus Protein Standards Unstained*. FT i W frakcije su izdvojene na način opisan u odlomku 3.3.7. Stupac N.R. sadrži porezani nepročišćeni uzorak, a frakcija CrdA predstavlja primjer veličine za protein CrdA. Frakcije W su odvojene nakon inkubacije puferom F. Sastav pufera je vidljiv u tablici 8, odlomak 3.3.1.

Dva prethodna gela se odnose na isto pročišćavanje fuzijskog proteina u epicama nakon cijepanja. Za početak, frakcija N.R. (slika 28) potvrđuje uspješnost rezanja. Vrpca između 20 i 15 kDa predstavlja SUMO protein. Ta se vrpca pojavljuje u svim stupcima, iako puno slabijeg intenziteta što bi značilo da se taj udio proteina nije vezao na smolu. FT frakcije sadrže vrpce između 10 i 15 kDa koja odgovara porezanoj CrdA. To je i očekivano jer se ne veže na smolu nego ostaje u puferu. Frakcije W su od smole izdvojene puferom (F) koji sadrži optimalnu koncentraciju imidazola za ispiranje nespecifično vezanih nečistoća, što je i vidljivo u frakcijama gdje se pojavljuje puno vrpca s raznim veličinama.



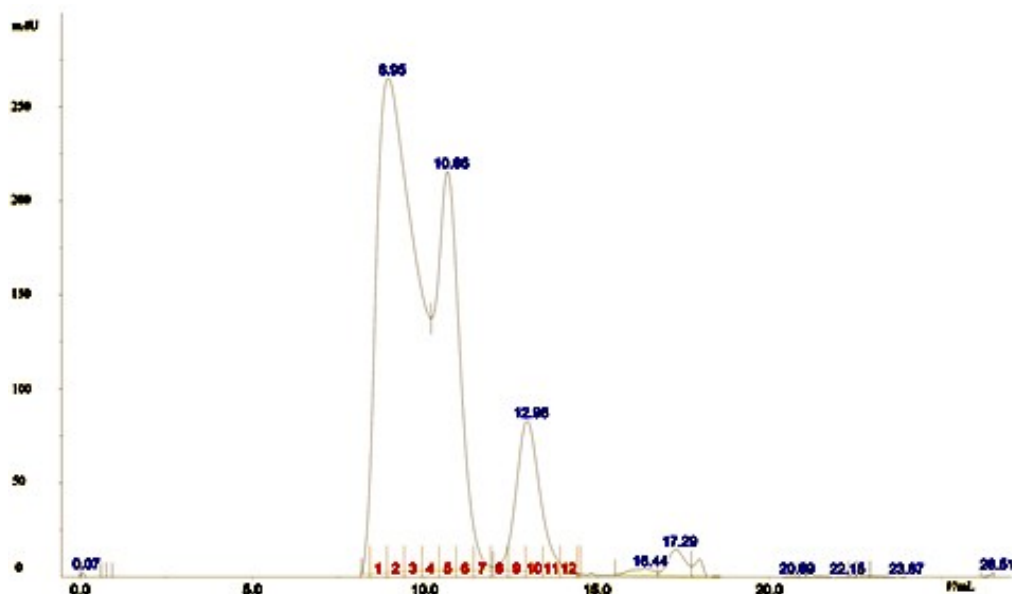
Slika 29. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze provedene nakon rezanja i pročišćavanja Ni-NTA smolom u epicama. M označava marker veličina *Precision Plus Protein Standards Unstained*. Frakcije E su izdvojene nakon inkubacije puferom B, na način opisan u odlomku 3.3.7. Frakcije S predstavljaju uzorak smole iz svake epice nakon

postupka pročišćavanja. Frakcija SUM. predstavlja uzorak SUMO proteina. A SM. uzorak smole prije pročišćavanja.

Na frakcijama E (slika 29) uočljive su dvije vrpce. Donja, na oko 20 kDa pripada SUMO proteinu koji se sa smole otpustio tek nakon ispiranja puferom B koji sadrži visoku koncentraciju imidazola (tablica 8, odlomak 3.3.1). Gornja vrpca, između 50 i 37 kDa može odgovarati proteazi. U smolama su vidljive vrpce koje odgovaraju svim komponentama: CrdA i SUMO proteinu, fuzijskom proteinu i proteazi. Vrpce su različitih intenziteta, a najveća koncentracija (prema gelu) je SUMO proteina, što bi značilo da ga je još dosta ostalo vezanog na smolu.

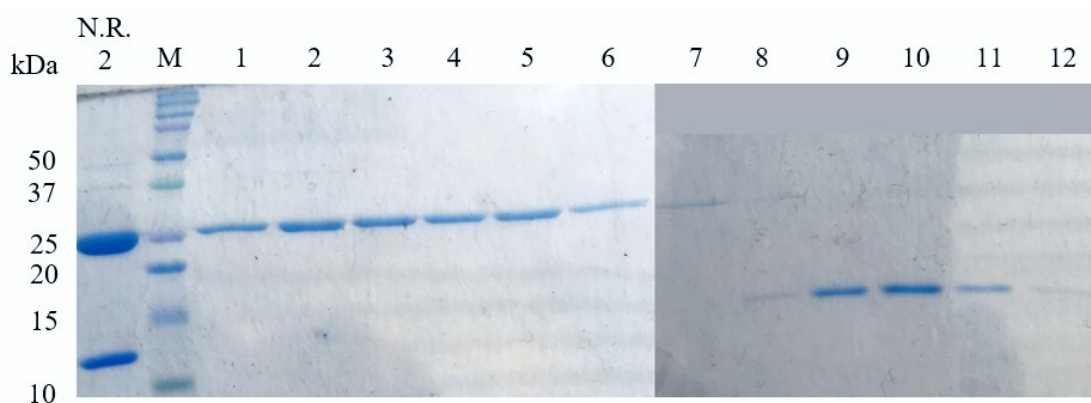
4.6.2. Cijepanje GST-CrdA fuzijskog proteina PreScission proteazom i pročišćavanje afinitetnom kromatografijom pomoću GSTrap™ kolone

Na slici 31 je prikazano cijepanje fuzijskog proteina GST-CrdA. Vidljive su vrpce koje odgovaraju proteinima GST (oko 25 kDa) i CrdA (oko 37 kDa). Provedena su dva rezanja, no efikasnost prvog rezanja je bila mala. Drugo rezanje je optimizirano dodavanjem veće mase proteaze što je rezultiralo dobivanjem uzoraka zadovoljavajuće čistoće za daljnje pročišćavanje gel-filtracijom.



Slika 30. Prikaz gel-filtracijskog kromatograma CrdA dobivenog nakon cijepanja fuzijskog proteina GST-CrdA. Siva krivulja predstavlja apsorbanciju uzorka pri valnoj duljini od 280 nm u ovisnosti o volumenu eluiranog uzorka.

Prema protokolu,⁵⁴ određene su približne teorijske vrijednosti molekularnih masa proteina prema jednadžbi baždarnog pravca. Frakcije ispod pika na 8,95 mL sadrže proteine molekulske mase od oko 67 kDa što bi odgovaralo agregatima proteina GST (trimeri ili veći oligomeri). Pik pri 10,66 mL odgovara proteinima veličine od oko 43 kDa, koji moguće odgovara dimerima proteina GST. Prema baždarnom pravcu, frakcije ispod pika na 12,98 mL sadržavaju proteine veličine 13,7 kDa što otprilike odgovara monomernom obliku CrdA proteina.



Slika 31. Prikaz poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE elektroforeze provedene nakon pročišćavanja porezanog GST-CrdA fuzijskog proteina gel-filtracijom. M označava marker veličina *Precision Plus Protein Standards Prestained*. Stupac N.R. 2 predstavlja otopinu proteina nakon rezanja (bez pročišćavanja), a frakcije 1-12 su označene na slici 30.

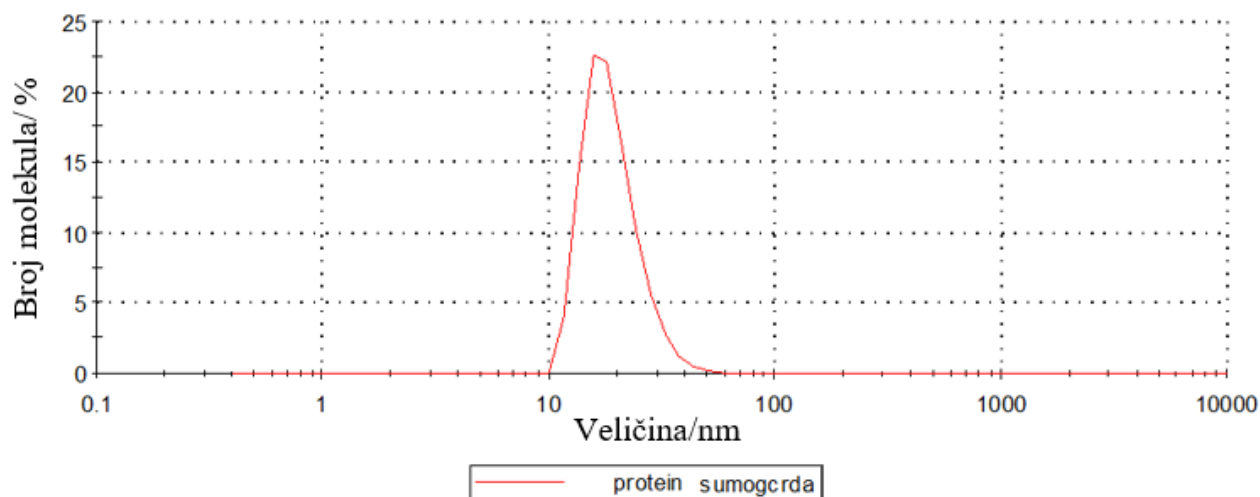
Prije pročišćavanja su vidljive samo dvije vrpce koje odgovaraju proteinu GST (oko 25 kDa) i CrdA (između 10 i 15 kDa). Za frakcije za koje se pretpostavlja da sadrže agregate, 1 – 7, je SDS-PAGE elektroforezom potvrđeno da sadrže protein GST (slika 31). Frakcije gel-filtracije od 8 – 12 sadrže porezani protein CrdA.

Uočena je veza između koncentracije iona bakra u otopini i dimer-monomer ravnoteže proteina CrdA. EDTA je kelirajući agens koji veže metalne ione, pa tako i ione bakra. Dodavanjem EDTA u otopinu određena količina metalnih iona biva „uklonjena“ iz otopine i na taj način se smanjuje koncentracija metalnih iona. U takvoj otopini je opaženo stvaranje dimernih oblika proteina CrdA (slika 25). U slučaju kad u otopinu porezanog proteina CrdA nije dodan EDTA, opažena je prisutnost monomernih oblika proteina (slika 30). Pretpostavlja se da povišenje koncentracije metalnih iona ravnotežu dimer-monomer pomiče prema stvaranju monomernih oblika proteina CrdA.

4.7. Ispitivanje stabilnosti SUMO-G_CrdA

4.7.1. Ispitivanje stabilnosti metodom DLS

Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) koristi se za određivanje distribucije veličina molekula prisutnih u uzorku. Eksperiment je proveden s uzorkom fuzijskog proteina SUMO-G-CrdA, dobivenog 2. afinitetnom kromatografijom (odlomak 4.5.1), točnije frakcijom 2 (slika 23).



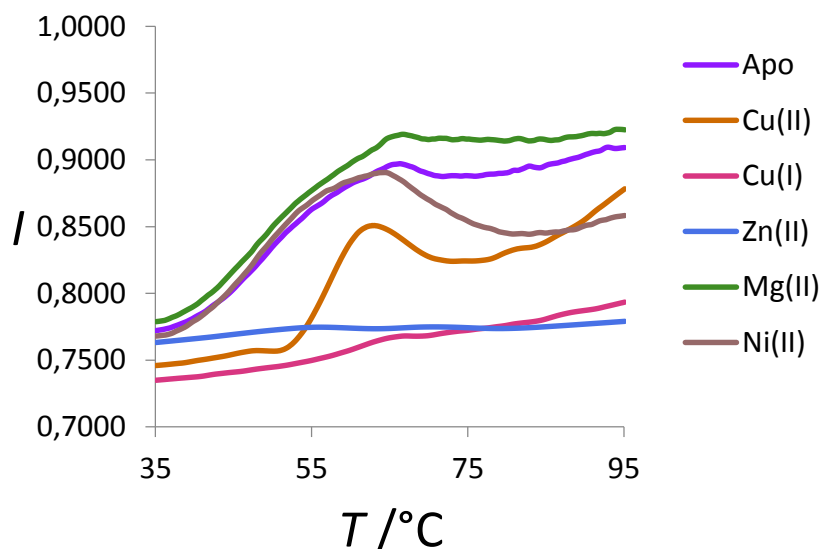
Slika 32. Graf prikazuje ovisnost veličine molekula o intenzitetu raspršene svjetlosti na molekuli.

Na slici 32 se uočava pik između 10 i 100 nm. Molekule unutar tog pika veličinom odgovaraju molekulama fuzijskog proteina. Zbog prisutnosti samo jednog pika zaključeno je da uzorak ne sadrži značajan broj molekula drugih veličina, odnosno da je uzorak monodisperzan.

4.7.2. Ispitivanje stabilnosti uređajem Tycho (NanoTemper)

Stabilnost fuzijskog proteina je ispitana u otopinama raznih metalnih iona, kao i pročišćenog uzorka samog fuzijskog proteina (apoprotein). Temperatura mekšanja, T_m , je temperatura pri kojoj se $\frac{1}{2}$ proteina u uzorku denaturira, nalazi se na sredini linearnog dijela krivulje. Što je T_m veća, to je protein stabilniji, potrebna je veća temperatura da dođe do odmotavanja proteina i denaturacije. Prema tome (slika 33), fuzijski protein je najstabilniji u otopini koja sadrži vodenu otopinu CuCl_2 ($c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$) jer ima veću T_m za $8,1^\circ\text{C}$ od vrijednosti T_m apoproteina, te proteina tretiranog s Mg(II) i Ni(II) . Pretpostavlja se da protein CrdA u navedene dvije otopine ne veže ion navedenog metala (Mg^{2+} i Ni^{2+}) jer se tijekom zagrijavanja ponašaju slično kao i

Apo-CrdA. Za proteine CrdA u Cu(I) i Zn(II) otopinama se pretpostavlja da su denaturirani, a T_m je izvan područja mjerenja.

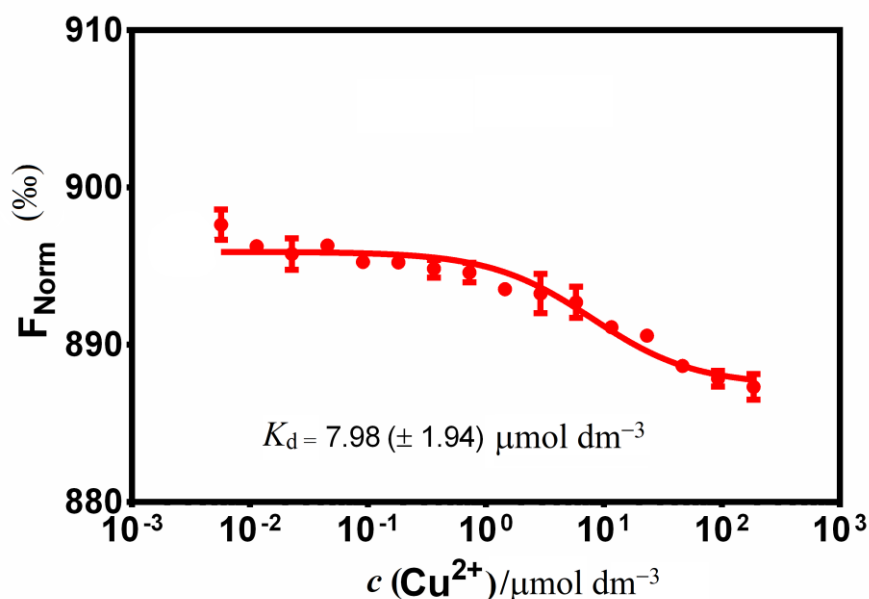


Slika 33. Graf prikazuje omjer intrinzične fluorescencije pri 350 i 330 nm tijekom povećanja temperature. Svaka krivulja predstavlja otopinu u kojoj je fuzijski protein pomiješan s odabranom otopinom metala dok ljubičasta krivulja predstavlja protein bez dodane otopine metala (objašnjenje kratica se nalazi u odlomku 3.4.1).

4.8. Ispitivanje interakcije CrdA i Cu^{2+} iona metodom MST

MST mjerenja interakcije SUMO-G-CrdA s bakrovim ionima su ukazala na probleme s agregacijom proteina te nisu prikazana u ovom radu. Nakon dobivanja proteina CrdA zadovoljavajuće čistoće (cijepanjem fuzijskog proteina GST-CrdA), ispitana je interakcija Cu^{2+} iona i proteina CrdA. Uzorak korišten u MST mjerenjima je frakcija 10 (slika 31). U svih šesnaest kapilara je koncentracija bojom obilježenog proteina jednaka, dok je koncentracija liganda, Cu^{2+} iona, različita u šesnaest serija. Na slici 34 vidi se vezanje iona bakra na protein te je izračunata $K_d (\text{CrdA}:\text{Cu}^{2+}) = 7,98 (\pm 1,94) \mu\text{mol dm}^{-3}$. Konstanta disocijacije govori uvelike o ulozi proteina i načinu na koji veže ligand. Prema nekim izvorima,⁵⁵ konstanta disocijacije vezanja metalnih iona (Fe^{2+}) na protein bakterijske stanice je slična kao i u slučaju $\text{CrdA}:\text{Cu}^{2+}$. Radi se o proteinu koji sudjeluje u unos iona željeza FeoB, a K_d iznosi $0,54 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Bakterije *E. coli* and *P. syringae* eksprimiraju PcoC i CopC za koje se pretpostavlja da

sudjeluju u unosu iona bakra. Proteini PcoC i CopC ujedno sudjeluju u oksidaciji Cu^{1+} u Cu^{2+} . K_d vezanja iona bakra kod njih je za koji red veličine nešto niža, a iznosi oko $10^{-13} \text{ mol dm}^{-3}$.⁴²



Slika 34. Ispitivanje interakcije CrdA i Cu^{2+} mikrotermoforezom. Graf pokazuje pravilan trend smanjenja fluorescencije boje vezane za CrdA protein povišenjem koncentracije bakrovih iona. Prikazana je i konstanta disocijacije kompleksa, $K_d(\text{CrdA}:\text{Cu}^{2+}) = 7,98 (\pm 1,94) \mu\text{mol dm}^{-3}$.

Transmembranski sustavi proteina za transport iona bakra (Ctr sustavi) su nađeni u raznim organizmima kao što su bakterije i kvasci, pa sve do biljaka i sisavaca. Kao i CrdA, također sadrže regiju bogatu metioninom ali na N-kraju proteina i pretpostavlja se da navedena regija sudjeluje u vezanju i unosu iona bakra. K_d vezanja iona bakra za navedeni proteinski sustav iznosi $1\text{--}5 \mu\text{mol dm}^{-3}$.⁵⁶ Uspoređivanje aminokiselinskih sekvenci upućuje na moguće vezanje iona bakra i proteina CrdA jer sekvenca proteina CrdA sadrži regiju bogatu metioninima kao i proteini (CopC, PcoC, Ctr sustavi i slični) koji sudjeluju u transportu iona bakra u drugim organizmima. Zbog slične uloge i načina vezanja iona bakra, pretpostavlja se uloga CrdA proteina u transportu iona bakra unutar i izvan stanice.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Nakon uspješne ekspresije fuzijskog proteina SUMO-G-CrdA provedeno je njegovo pročišćavanje i to trima različitim metodama: afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni, kromatografijom isključenjem na temelju veličine (gel-filtracijom) i ionsko - izmjenjivačkom kromatografijom. Uzorku fuzijskog proteina (određene frakcije) se niti nakon sva tri pročišćavanja nisu uspjele ukloniti sve nečistoće te se sumnja na degradaciju fuzijskog proteina. Metoda DLS je potvrdila da je ipak određena količina proteina SUMO-G-CrdA uspješno pročišćena. Mjerenja termičke stabilnosti fuzijskog proteina uz dodatak različitih metalnih iona pokazala su da je SUMO-G-CrdA najstabilniji u otopini Cu^{2+} iona, što ukazuje na svojstva prirodnog okruženja CrdA proteina. Protein G-CrdA dobiven nakon uklanjanja SUMO privjeska inkubiran je s EDTA te uspješno pročišćen gel-filtracijom, međutim nije se mogao uspješno obilježiti za MST mjerenja zbog problema s agregacijom. Veličina SUMO-G-CrdA ($M_r = 54,4$ kDa) određena gel-filtracijom ukazuje na postojanje dimernih oblika u otopini, kao i u slučaju G-CrdA tretiranog s EDTA ($M_r = 23,03$ kDa).
- GST privjesak na CrdA proteinu se pokazao vrlo koristan i zahvalan u stabilizaciji i pravilnom smatanju proteina CrdA. Ekspresija fuzijskog proteina GST-CrdA je bila vrlo uspješna (dobivena je velika koncentracija fuzijskog proteina). Nakon uklanjanja GST privjeska, protein CrdA je pročišćen gel-filtracijom te je dobiven čist uzorak pogodan za daljnja mjerenja. Veličina proteina CrdA određena gel-filtracijom ukazuje na prisutnost monomernih vrsta u otopini ($M_r = 13,7$ kDa). Veličina proteina G-CrdA tretiranog s EDTA ukazuje na prisutnost dimernih vrsta dok veličina netretiranog CrdA ukazuje na postojanje monomernih vrsta. U otopini postoji ravnoteža između monomernih i dimernih vrsta ovisno o dodatku EDTA.
- U konačnici se ispitalo vezanje Cu^{2+} iona kao liganda na protein CrdA metodom mikrotermoforeze. Detektirala se promjena fluorescencije u ovisnosti o koncentraciji Cu^{2+} iona, nakon čega je uspješno određena konstanta disocijacije od $K_d(\text{CrdA}:\text{Cu}^{2+}) = 7,98 (\pm 1,94) \mu\text{mol dm}^{-3}$. Budući da su slične vrijednosti konstanti disocijacija zabilježene za druge metaloproteine koji sudjeluju u transportu iona metala pretpostavlja se da i protein CrdA sudjeluje u transportu iona bakra u bakteriji *Helicobacter pylori*.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

Tablica 18. Popis kratica

KRATICA	PUNI NAZIV NA HRVATSKOM JEZIKU	PUNI NAZIV NA ENGLESKOM JEZIKU
ADP	adenozin-5'-difosfat	adenosine-5-diphosphate
Asp	aspartatska kiselina	aspartic acid
Cys	cistein	cystein
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti	acid dinamic light scattering
DNA	deoksiribonukleinska kiselina	deoxyribonucleic
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina	2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyl)dinitrilo)tetraacetic acid
Glu	glutaminska kiselina	glutamic acid
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etanesulfonska kiselina	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
His	histidin	histidine
HSB pufer	pufer sa visokim udjelom soli	high salt buffer
IPTG	izopropil- β -d-1-tiogalaktopiranozid	isopropyl- β -d-1-thiogalactopyranoside
LB	luria-bertani	luria-bertani
MBS	mjesto vezanja metala	metal binding sites
OG	oktil- β -d-glukopiranozid	n-octyl- β -D-glucoside
ReH ₂ O	redestilirana voda	redistilled water
RMSF	promjena korijena srednje kvadratne pogreške	root mean squared fluctuation
SDS-PAGE	natrijev dodecilsufat-poliakrilamidna gel elektroforeza	sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	kromatografija temeljena na isključenju prema veličini	size exclusion chromatography
SEM	pretražna elektronska mikroskopija	scanning electron microscopy
SUMO	mala molekula modifikator sličan ubikvitinu	small ubiquitin-like modifier

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. Bauer, B. & Meyer, T. F. The Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease. **2011**, (2011).
2. Marshall, B. J. & Warren, J. R. Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients With Gastritis and Peptic Ulceration. *Lancet* **323**, 1311–1315 (1984).
3. Goodwin, C. S. *et al.* Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to. **39**, 397–405 (1989).
4. Kusters, G. J., van Vliet, A. H. M. & Kuipers, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **21**, 19–25 (2016).
5. Kekez, I. STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF *Helicobacter pylori* PROTEINS REQUIRED FOR SURVIVAL OF THE BACTERIUM. (Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet Kemijski odsjek, 2016).
6. International Agency for Research on Cancer. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100: A Review of Carcinogens Part B: Biological Agents. 2011. Lyon, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Curr. Trop. Med. Reports* **1994**, (2007).
7. Atherton, J. C. & Blaser, M. J. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J. Clin. Invest.* **119**, 2475–2487 (2009).
8. Tycho NT.6 (NanoTemper) guide.
9. O'Rourke, J. & Bode, G. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. (ASM Press, 2001).
10. Haley, K. P. & Gaddy, J. A. Metalloregulation of *Helicobacter pylori* physiology and pathogenesis. *Front. Microbiol.* **6**, 1–14 (2015).
11. Becker, K. W. & Skaar, E. P. Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 1235–1249 (2014).
12. Dhaenens, L., Szczebara, F., Van Nieuwenhuysse, S. & Husson, M. O. Comparison of iron uptake in different *Helicobacter* species. *Res. Microbiol.* **150**, 475–481 (1999).
13. velayudhan2000.pdf.

14. Ernst, F. D. *et al.* Iron-Responsive Regulation of the *Helicobacter pylori* Iron-Cofactored Superoxide Dismutase SodB Is Mediated by Fur. *Society* **187**, 3687–3692 (2005).
15. Gilbreath, J. Novel Insights into Fur Regulation in *Helicobacter pylori*. (2013).
16. Boquet, P. & Ricci, V. Intoxication strategy of *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Trends Microbiol.* **20**, 165–174 (2012).
17. Cover, T. L. & Peek, R. M. Diet, microbial virulence and *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer. *Gut Microbes* **4**, 37–41 (2013).
18. Weeks, D. L., Eskandari, S., Scott, D. R. & Sachs, G. A H⁺-gated urea channel: The link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* (80-.). **287**, 482–485 (2000).
19. Bury-Moné, S., Skouloubris, S., Labigne, A. & De Reuse, H. The *Helicobacter pylori* Urel protein: Role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation. *Mol. Microbiol.* **42**, 1021–1034 (2001).
20. Minkara, M. S., Ucisik, M. N., Weaver, M. N. & Merz, K. M. Molecular Dynamics Study of *Helicobacter pylori* Urease. *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 1852–1862 (2014).
21. Marcus, E. A. & Scott, D. R. Cell lysis is responsible for the appearance of extracellular urease in *helicobacter pylori*. *Helicobacter* **6**, 93–99 (2001).
22. Dunn, B. E. & Phadnis, S. H. Structure, function and localization of *Helicobacter pylori* urease. *Yale J. Biol. Med.* **71**, 63–73 (1998).
23. Rektorschek, M., Weeks, D., Sachs, G. & Melchers, K. Influence of pH on Metabolism and Urease Activity of. *Gastroenterology* **115**, 628–641 (1998).
24. De Reuse, H., Vinella, D. & Cavazza, C. Common themes and unique proteins for the uptake and trafficking of nickel, a metal essential for the virulence of *Helicobacter pylori*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 1–6 (2013).
25. Schauer, K., Gouget, B., Carrière, M., Labigne, A. & De Reuse, H. Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol. Microbiol.* **63**, 1054–1068 (2007).
26. Ladomersky, E. & Petris, M. J. Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics* (2015). doi:10.1039/C4MT00327F
27. Cantu, R. C. A cbtype cytochrome=c oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori*. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **37**, S339 (2005).

28. Gaetke, L. M. & Kuang, C. Copper toxicity , oxidati v e stress , and antioxidant nutrients. **189**, (2003).
29. Freinbichler, W., Colivicchi, M. A., Stefanini, C., Linert, W. & Vares, D. Highly reactive oxygen species : detection , formation , and possible functions. 2067–2079 (2011). doi:10.1007/s00018-011-0682-x
30. Miller, R. A. & Britigan, B. E. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 1–18 (1997).
31. Hiniker, A., Collet, J. & Bardwell, J. C. A. Copper Stress Causes an in Vivo Requirement for the Escherichia coli Disulfide Isomerase DsbC *. **280**, 33785–33791 (2005).
32. Imiay, J. A., Chin, S. M. & Linnt, S. Toxic DNA Damage by Hydrogen Peroxide Through the Fenton Reaction in Vivo and in Vitro. *Science (80-.)*. **240**, 2–5 (1986).
33. Waidner, B. *et al.* The Helicobacter pylori CrdRS Two-Component Regulation System Copper-Mediated Induction of the Copper Resistance Determinant CrdA. *J. Bacteriol.* **187**, 4683–4688 (2005).
34. Andersson, M. *et al.* Copper-transporting P-type ATPases use a unique ion-release pathway. *Nat. Publ. Gr.* **21**, 43–48 (2013).
35. Gonza, M. The structure and function of heavy metal transport P 1B -ATPases. 233–248 (2007). doi:10.1007/s10534-006-9055-6
36. Zhang, L., Koay, M., Maher, M. J., Xiao, Z. & Wedd, A. G. Intermolecular Transfer of Copper Ions from the CopC Protein of Pseudomonas syringae . Crystal Structures of Fully Loaded Cu I Cu II Forms. 5834–5850 (2006).
37. Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Mangani, S. & Thompsett, A. R. A redox switch in CopC : An intriguing copper trafficking protein that binds copper (I) and copper (II) at different sites. **100**, (2003).
38. Brown, N. L., Barrett, S. R., Camakaris, J. & Lee, B. T. O. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from Escherichia coil plasmid pRJ1004. **17**, 1153–1166 (1995).
39. Huffman, D. L. *et al.* Spectroscopy of Cu (II) -PcoC and the Multicopper Oxidase Function of PcoA , Two Essential Components of Escherichia coli pco Copper Resistance Operon †. 10046–10055 (2002).
40. Wernimont, A. K. *et al.* Crystal structure and dimerization equilibria of PcoC , a

- methionine-rich copper resistance protein from *Escherichia coli*. 185–194 (2003).
doi:10.1007/s00775-002-0404-9
41. Huffman, D. L. & Halloran, T. V. O. FUNCTION , STRUCTURE , AND MECHANISM OF INTRACELLULAR COPPER TRAFFICKING PROTEINS. 677–701 (2001).
 42. Djoko, K. Y., Xiao, Z. & Wedd, A. G. Copper Resistance in *E. coli* : The Multicopper Oxidase PcoA Catalyzes Oxidation of Copper (I) in Cu I Cu II -PcoC. 1579–1582 (2008). doi:10.1002/cbic.200800100
 43. Peariso, K., Huffman, D. L., Penner-hahn, J. E. & Halloran, T. V. O. The PcoC Copper Resistance Protein Coordinates Cu (I) via Novel S-Methionine Interactions. 342–343 (2003).
 44. Waidner, B. *et al.* Identification by RNA profiling and mutational analysis of the novel copper resistance determinants CrdA (HP1326), CrdB (HP1327), and CzcB (HP1328) in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **184**, 6700–6708 (2002).
 45. Matković, V. POJAČANA EKSPRESIJA, PROČIŠĆAVANJE I KRISTALIZACIJA PROTEINA CrdA TE OPTIMIZACIJA KRISTALIZACIJE PROTEINA HP1026 IZ BAKTERIJE *Helicobacter pylori*. (diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2018).
 46. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/ge-gst-gene-fusion.pdf (23.09.2019.).
 47. Šain, A. PROMJENE MORFOLOŠKIH KARAKTERISTIKA ODABRANIH VINSKIH KVASACA I BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PRISUSTVU OKRATOKSINA A. (Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2017).
 48. https://www.expdeon.com/wp-content/uploads/2018/12/His-Tag-protein-complex_OS.jpg (23.09.2019.). Available at: https://www.expdeon.com/wp-content/uploads/2018/12/His-Tag-protein-complex_OS.jpg.
 49. http://courses.washington.edu/medch527/PDFs/527_15Atkins_Glutathione.pdf (23.09.2019.). in
 50. https://www.malvernpanalytical.com/en/assets/MRK1839_tcm50-17228.pdf (23.09.2019).
 51. http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-

- 1.1.pdf (23.09.2019. (2004).
52. <http://manualzilla.com/doc/5634202/monolith-nt%E2%84%A2-protein-labeling-kit-red-nhs> (23.09.2019.). 1–6
53. GE Healthcare. http://www.gelifesciences.co.kr/wp-content/uploads/2016/07/2016_Selection_guide_Size_exclusion_chromatography_columns_and_media18112419.pdf (22.09.2019). 1–12 (2015). doi:10.1111/j.1467-8330.1974.tb00606.x
54. http://research.med.helsinki.fi/corefacilities/b3p/manuals/columns/Superdex75and200_10-300GL.pdf (23.09.2019).
55. Velayudhan, J. *et al.* Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: A major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol. Microbiol.* **37**, 274–286 (2000).
56. Puig, S., Lee, J., Lau, M. & Thiele, D. J. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.* **277**, 26021–26030 (2002).

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Mihovil Faletar

Datum rođenja: 21.09.1994.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2013. završena opća gimnazija, Srednja škola Ilok

2017. završeni preddiplomski studij kemije na Sveučilištu J.J.Strossmayera u Osijeku (Tema završnog rada: Sinteza kvaternih amonijevih soli piperidina s potencijalnim antibaktericidnim djelovanjem.)

2017. – 2019. Diplomski studij kemije, grane: Anorganska kemija i biokemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu