

Strukturalna istraživanja enzima purinske nukleozidne fosforilaze iz bakterije *Helicobacter pylori*

Papa, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:510076>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



LUCIJA PAPA

STRUKTURNA ISTRAŽIVANJA ENZIMA
PURINSKE NUKLEOZIDNE FOSFORILAZE IZ BAKTERIJE
HELICOBACTER PYLORI

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja
magistre kemije

**Zagreb
2017.**

Ovaj je diplomski rad izrađen u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Marije Luić i neposrednim vodstvom dr. sc. Zorana Štefanića.

Zahvaljujem svim dragim ljudima na PMF-u i IRB-u što su odlični kolege, suradnici, asistenti, profesori i znanstvenici, ali prije svega dobri ljudi. Posebno zahvaljujem profesorici Luić na mentorstvu i što mi je pružila izuzetnu priliku da se uključim u istraživački rad u njenoj skupini, kao i Zoranu na svim savjetima, strpljenju i nepresušnom izvoru dobre volje - bilo mi je prekrasno raditi s vama. Zahvaljujem profesoricama Vrdoljak i Cindrić što su me uvele u fascinantan svijet anorganske kemije i Ljubici što je obogatila moje kemijske dane. Na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na ljubavi i podršci za vrijeme studiranja i pisanja ovog diplomskog rada, kao i uvijek u životu.

Sadržaj

SAŽETAK.....	vi
ABSTRACT	vii
1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	3
3. TEORIJSKA OSNOVICA.....	13
3.1. KRISTALIZACIJA PROTEINSKIH UZORAKA.....	13
3.2. PRIPREME ZA EKSPERIMENT DIFRAKCIJE RENDGENSKOG ZRAČENJA NA MONOKRISTALU I PRELIMINARNO SNIMANJE.....	14
3.3. DIFRAKCIJA RENDGENSKOG ZRAČENJA NA MONOKRISTALU - PRIKUPLJANJE DIFRAKCIJSKIH PODATAKA.....	15
3.4. REDUKCIJA DIFRAKCIJSKIH PODATAKA	16
3.5. RJEŠAVANJE KRISTALNE STRUKTURE - RJEŠAVANJE PROBLEMA FAZE.....	18
3.6. UTOČNJAVANJE I EVALUACIJA KRISTALNE STRUKTURE	18
4. MATERIJALI I METODE	19
4.1. MATERIJALI	19
4.1.1. Purinska nukleozidna fosforilaza	19
4.1.2. Kristalizacijske otopine	19
4.1.3. Ligandi.....	19
4.1.4. Krioprotektanti	20
4.2. METODE	21
4.2.1. Kokristalizacijski eksperimenti.....	21
4.2.2. Naknadni dodatak liganada u kristalizacijske kapljice i namakanje kristala u otopinama liganada ..	26
4.2.2.1. Dobivanje binarnih kompleksa PNP s fosfatnim anionima.....	26
4.2.2.2. Dobivanje kompleksa PNP s FA	26
4.2.2.3. Dobivanje kompleksa PNP s TsA.....	27
4.2.3. Određivanje kristalnih struktura.....	27

5. REZULTATI	28
5.1. REZULTATI KOKRISTALIZACIJSKIH EKSPERIMENATA.....	28
5.2. REZULTATI NAKNADNIH DODATAKA LIGANADA U KRISTALIZACIJSKE KAPLJICE I NAMAKANJA KRISTALA U OTOPINAMA LIGANADA	30
5.2.1. Rezultati dobivanja binarnih kompleksa PNP s fosfatnim anionima	30
5.2.2. Rezultati dobivanja binarnih kompleksa PNP s FA.....	30
5.2.3. Rezultati dobivanja binarnih kompleksa PNP s TsA	31
5.3. ODREĐENE KRISTALNE STRUKTURE	31
5.3.1. Struktura binarnog kompleksa PNP s FA.....	35
5.3.2. Struktura binarnog kompleksa PNP s fosfatnim anionima	38
5.3.3. Struktura ternarnog kompleksa PNP s fosfatnim anionima i FA.....	41
6. RASPRAVA.....	44
6.1. KRISTALIZACIJA ISPITIVANIH KOMPLEKSA	44
6.2. VEZANJE LIGANADA U AKTIVNA MJESTA PROTEINA	46
6.2.1. Vezanje formicina A u aktivno mjesto proteina	46
6.2.2. Vezanje fosfata u aktivno mjesto proteina	48
6.3. KONFORMACIJA AKTIVNIH MJESTA.....	49
7. ZAKLJUČAK	57
8. LITERATURNI VRELA	59
9. POPIS KRATICA, SIMBOLA I OZNAKA	61
DODATAK.....	viii

ŽIVOTOPIS

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

STRUKTURNA ISTRAŽIVANJA ENZIMA PURINSKE NUKLEOZIDNE FOSFORILAZE IZ BAKTERIJE *HELICOBACTER PYLORI*

LUCIJA PAPA

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

Bakterija *Helicobacter pylori*, patogen ljudskog probavnog sustava, za biosintezu purinskih nukleozida koristi samo pomoćni metabolički put. Smatra se da bi inhibicija ključnih enzima navedenog puta mogla inhibirati rast ove bakterije. Jedan od takvih enzima je purinska nukleozidna fosforilaza (PNP), koja katalizira fosforolitičko cijepanje glikozidne veze u purinskim nukleozidima.

Kako bi se što bolje razumjelo vezanje liganada u aktivno mjesto PNP, pripremljeni su kristali binarnih kompleksa PNP s fosfatnim anionom, te s formicinom A - strukturnim analogom purinskog nukleozida adenzina, kao i kristali ternarnog kompleksa koji sadrži oba liganda. Trodimenzijske strukture kompleksa određene su metodom difrakcije rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu.

Vezanje fosfatnih aniona u aktivna mjesta enzima, koje je moguće samo u uvjetima snižene ionske jakosti, vjerojatno dovodi do konformacijske promjene u podjedinici i zatvaranja aktivnog mjesta. U otvorenim aktivnim mjestima konformacija formicina A razlikuje se od one u zatvorenim aktivnim mjestima. Navedeno je u skladu s trenutno pretpostavljenim katalitičkim mehanizmom za sličan PNP iz bakterije *E. coli*.

(61 stranica, 34 slike, 9 tablica, 50 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb

Ključne riječi: difrakcija rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu / formicin A / fosfat / *Helicobacter pylori* / proteinska kristalografija / purinska nukleozidna fosforilaza

Mentorica: Dr. sc. Marija Luić, zn. savj., naslovni red. prof

Ocjenitelji: Dr. sc. Marija Luić, zn. savj., naslovni red. prof
Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, red. prof.
Dr. sc. Davor Kovačević, red. prof.

Rad prihvaćen: veljača 2017.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Master thesis

STRUCTURAL INVESTIGATION OF ENZYME PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE FROM BACTERIA *HELICOBACTER PYLORI*

LUCIJA PAPA

Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

Bacterium *Helicobacter pylori* is a known human digestive system pathogen. For biosynthesis of purine nucleosides it relies exclusively on salvage pathway, therefore, new medicine could be developed by inhibiting salvage pathway's crucial enzymes. Purine nucleoside phosphorylase (PNP), one of those enzymes, catalyzes phosphorolytic cleavage of the glycosidic bond in purine nucleosides.

Binary complexes of PNP with phosphate ions (natural substrate) and formycin A (natural substrate's uncleavable structural analogue), and ternary complex of PNP with both of those ligands were prepared and crystallized in order to explore ligand binding into the active sites of the enzyme. Structures of the prepared complexes were determined using single-crystal X-ray crystallography.

Closing of the active sites is probably caused by conformational changes driven by phosphate binding, possible only in low ionic strength conditions. Formycin A adopts different conformations in open and closed active sites. Observed effects are in agreement with the currently proposed catalytic mechanism of the similar PNP protein from *E. coli*.

(61 pages, 34 figures, 9 tables, 50 references, original in Croatian language)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb

Keywords: formycin A / *Helicobacter pylori* / phosphate / protein crystallography /
purine nucleoside phosphorylase / single-crystal X-ray crystallography

Mentor: Dr. sc. Marija Luić, Adjunct Full Professor

Reviewers: Dr. sc. Marija Luić, Adjunct Full Professor
Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, Professor
Dr. sc. Davor Kovačević, Professor

Thesis accepted: February, 2017

1. Uvod

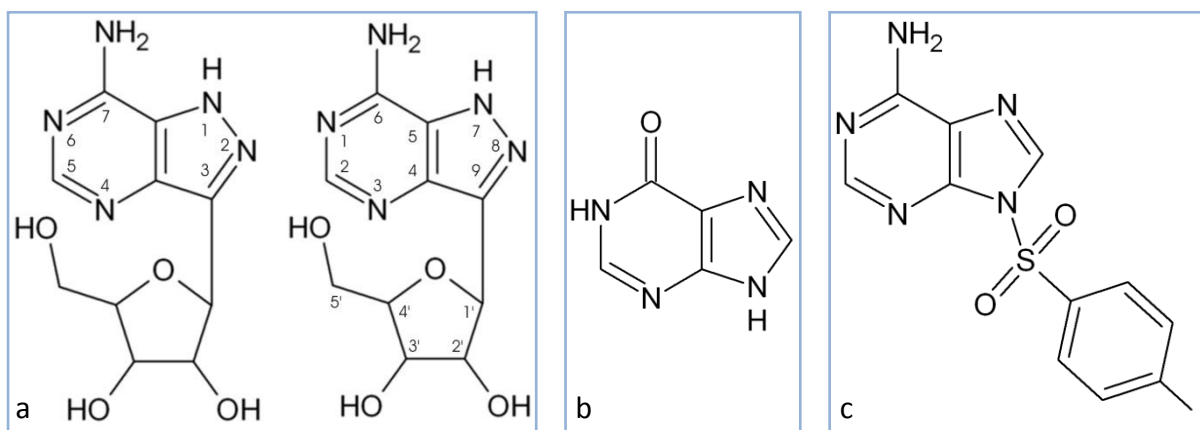
Bakterija *Helicobacter pylori* je humani patogen prisutan u probavnom sustavu otprilike polovice ljudske populacije.¹ Smatra se uzročnikom kroničnog gastritisa² i čira na želucu i duodenumu³, što naposljetku može dovesti do pojave opasnih oboljenja poput raka želuca⁴ ili ne-Hodgkinovog limfoma⁵. U probavnom traktu dugo vremena boravi asimptomatski, a do pojave bolesti dolazi pod utjecajem trenutno nedovoljno poznatih faktora.⁶ Tijekom evolucijske prilagodbe na život u organizmu čovjeka, bakterija *H. pylori* izgubila je gene za enzime potrebne u metaboličkom putu *de novo* biosinteze purinskih nukleozida, te se za njihovu sintezu oslanja isključivo na pomoćni metabolički put (eng. *salvage pathway*).⁷ Smatra se da bi inhibicija ključnih enzima navedenog puta mogla zaustaviti rast ove bakterije i biti interesantna meta za razvoj novih lijekova protiv *H. pylori*.

Jedan od ključnih enzima u pomoćnom metaboličkom putu biosinteze purina, koji bi se u tu svrhu mogao inhibirati, je purinska nukleozidna fosforilaza, PNP. PNP katalizira fosforolitičko cijepanje N-glikozidne veze između purinske baze i pentoze u ribonukleozidima i deoksiribonukleozidima, kao i reverznu reakciju kojom iz (2'-deoksi)riboza-1-fosfata i slobodne purinske baze nastaje odgovarajući nukleozid, uz oslobađanje fosfata.⁸

PNP iz bakterije *H. pylori* je sekvencom i strukturno slična dobro istraženom homolognom PNP iz *Escherichie coli*. Radi se o homoheksamernom proteinu čije su podjedinice međusobno povezane u dimere. Unutar svakog dimera po dva aktivna mjesta nalaze se okrenuta jedno prema drugome, naizmjenice s gornje i donje strane enzima, te se mogu nalaziti u otvorenoj i zatvorenoj konformaciji.⁹

Vežanje liganada (supstrata ili inhibitora) u aktivno mjesto enzima može se istraživati metodom difrakcije rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu. Određivanje trodimenzijskih struktura istraživanih kompleksa daje uvid u vežanje liganada u aktivno mjesto (npr. položaj vežanja ili konformacije koje ligandi poprimaju), interakcije koje protein i ligandi ostvaruju, kao i u djelovanje liganada na protein (poput otvaranja i zatvaranja aktivnih mjesta). Ovaj tip informacija ključan je prilikom određivanja mehanizma djelovanja enzima na molekularnoj razini.

Ovaj diplomski rad temeljen je na strukturnom istraživanju kompleksa PNP iz bakterije *H. pylori*. Kao ligandi su korišteni fosfatni anioni (prirodni supstrati PNP), formicin A (FA, strukturni analog adenzina, drugog prirodnog supstrata PNP), hipoksantin (produkt fosforolitičkog cijepanja purinskog nukleozida inozina) i 9-tozil-9H-purin-6-amin (TsA, derivat adenzina kojem je na položaju N9 adenina umjesto riboze vezana tozilna skupina). U FA glikozidna veza između riboze i purinskog dijela molekule (8-aza-9-deazapurina, analoga adenina) ostvaruje se preko ugljikovih atoma i PNP ju ne može cijepati, zbog čega FA djeluje kao inhibitor PNP.¹⁰ Strukture korištenih liganada prikazane su na slici 1.



Slika 1. Strukture FA (a), hipoksantina (b) i TsA (c). Prema napucima Međunarodne unije za čistu i primjenjenu kemiju (IUPAC), numeriranje atoma koji pripadaju purinskom dijelu molekule FA trebalo bi se vršiti prema slici a lijevo.¹⁰ Međutim, zbog lakše usporedbe FA s purinskim nukleozidima (prirodnim supstratima PNP), u ovom radu numeracija atoma koji pripadaju analogu adenina u molekuli FA odgovara numeraciji atoma dušične baze u purinskim nukleozidima, i prikazana je na slici a desno. Numeracija ribofuranoznog prstena jednaka je u oba slučaja.

Diplomski rad je uključivao pripremu kompleksa PNP s navedenim ligandima, njihovu kristalizaciju metodom difuzije para tehnikom viseće kapi, te obradu podataka sakupljenih na sinkrotronu *Elettra* u Trstu ili na rendgenskom difraktometru za monokristalne uzroke *Xcalibur Nova R* na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Cilj rada bio je odrediti i utočniti trodimenzijske strukture navedenih kompleksa PNP. Pretpostavljeno je da će s obzirom na značajnu sličnost u sekvenci i strukturi koju proučavani protein dijeli s homolognim PNP iz bakterije *Escherichia coli*, i vezanje liganada u aktivna mjesta PNP iz bakterije *H. pylori* vjerojatno biti slično onome kod PNP iz bakterije *E. coli*.

2. Literaturni pregled

Prema definiciji leksikografskog zavoda Miroslav Krleža, lijekovi ili medikamenti su tvari ili smjese tvari prirodnog ili sintetskog porijekla, koje se dokazano mogu u određenim količinama i primijenjene na određen način koristiti u dijagnostici, te za liječenje, ublažavanje ili prevenciju bolesti ili simptoma bolesti, kao i drugih patoloških pojava u živim organizmima.¹¹ Smatra se da su ljudi u svrhu liječenja već u prapovijesti koristili tvari prirodnog porijekla, poput biljnog materijala, glina i tla, međutim ne postoje pisani tragovi iz tog razdoblja ljudske prošlosti i ovo je stajalište nemoguće znanstveno potvrditi.¹² Ipak, u prilog navedenoj tezi idu proučavanja suvremenih nekontaktiranih naroda (izoliranih plemena i naroda koji žive bez dodira s ostatkom ljudske civilizacije), kao i činjenica da je upotreba prirodnih materijala u svrhu liječenja uočena i kod više vrsta životinja. Tako, na primjer, maslinasti i grivasti babuni koji žive u staništima na kojima se nalazi puž *Biomphalaria* sp. povremeno konzumiraju biljku *B. aegyptica* kao zaštitu protiv nametničke bolesti šistosomijaze, čijeg uzročnika prenosi navedeni puž.¹³

U suvremeno doba pronalazak novih lijekova temelji se na dva različita pristupa. S jedne strane mogu se prepoznati tvari koje u organizmu izazivaju željeni učinak, no za koje mehanizam djelovanja često nije poznat, te se on otkriva kasnije. Na ovaj se način često otkrivaju lijekovi prirodnog porijekla. S druge strane, početna točka istraživanja može biti identificiranje biokemijskog puta ili ciljne molekule (receptora ili enzima) čija se aktivnost želi modificirati ili inhibirati, nakon čega se traži ili dizajnira spoj koji može uzrokovati željeni efekt. Općenito, do otkrića lijeka može doći slučajno, pretraživanjem knjižnica spojeva ili modeliranjem i sintezom željene molekule.¹⁴

Jedan od biokemijskih procesa koji se mogu ciljati prilikom liječenja je biosinteza nukleotida. Radi se o izrazito bitnom procesu neophodnom za život stanice, koji služi kao meta nekih postojećih lijekova, ali i potencijalna meta novih lijekova. Njegova važnost leži u činjenici da su nukleotidi prijeko potrebni za normalno funkcioniranje stanice, u kojoj služe kao prekursori ili komponente većeg broja molekula: DNA i RNA, NAD, FAD, koenzima A, UDP-glukoze, CDP-diacilglicerola i drugih. Također, ATP i GTP služe za pohranu stanične energije, a njihovi ciklički oblici sudjeluju u prijenosu signala.¹⁵

U stanici se nukleotidi mogu sintetizirati na dva različita načina: *de novo* sintezom te pomoćnim metaboličkim putem. U *de novo* sintezi ne sudjeluju gotovi oblici dušičnih baza: purinski se prstenovi grade na ribozu u nizu koraka, dok se pirimidinski prstenovi najprije sintetiziraju u obliku orotata, a zatim vežu na ribozu i dalje modificiraju. S druge strane, pomoćni metabolički put temelji se na recikliranju iz metaboličkog otpada, a uključuje vezanje slobodnog purinskog ili pirimidinskog prstena (cjelovite baze) na ribozu.¹⁵

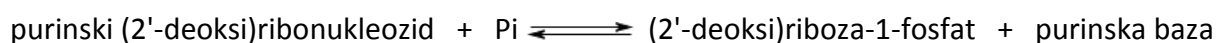
Ne uzimajući u obzir ATP, koncentracije nukleotida su u stanici općenito vrlo niske i, zbog velike potrošnje uslijed njihove ugradnje u DNA i RNA, nužno ih je konstantno sintetizirati. Zaustavljanje normalne biosinteze nukleotida inhibicijom enzima u određenim koracima biosinteze narušava osjetljivu ravnotežu njihovih koncentracija u stanici, što dovodi do većeg broja pogrešnih ugradnji¹⁶. Također, nedostatak određene vrste nukleotida u potpunosti zaustavlja sintezu DNA. Obje pojave na kraju dovode do stanične smrti.¹⁷ S druge strane, poremećaje u radu stanice može uzrokovati i nakupljanje supstrata inhibiranog enzima.¹⁸

Inhibicija biosinteze nukleotida je posebno prikladna za borbu protiv patogena koji nukleotide sintetiziraju pomoću samo jednog od dva navedena biokemijska puta (koristeći samo *de novo* sintezu ili koristeći samo pomoćni metabolički put). Ukoliko se zaustavi jedini put kojim takvi patogeni sintetiziraju nukleotide, dolazi do njihove smrti dok s druge strane stanice pacijenta preživljavaju oslanjajući se na alternativni biokemijski put za sintezu vlastitih nukleotida.¹⁹ Na primjer, Scheibel i Sherman navode da uzročnik malarije, *P. falciparum*, za sintezu pirimidina koristi isključivo *de novo* sintezu²⁰, te bi se novi selektivni lijekovi protiv malarije mogli bazirati na inhibiciji navedenog metaboličkog puta.¹⁹

Jedan od organizama koji za sintezu purina koristi samo pomoćni metabolički put je humani patogen *Helicobacter pylori*, mikroaerofilna Gram negativna bakterija⁷. *H. pylori* dobro je prilagođena za život u želucu čovjeka: nakon prihvaćanja za epitelne stanice stijenke želuca, bakterijske stanice pomoću enzima ureaze proizvode amonijak i bikarbonatne anione kojima neutraliziraju kiselu sredinu u kojoj se nalaze.⁶ Nedostatak većine enzima potrebnih za biosintezu nukleotida *de novo* putem također se može objasniti dobrom prilagodbom ovog patogena na život u ljudskom organizmu: u okolišu u kojem je dostupna dovoljna količina dušičnih baza za recikliranje iz metaboličkog otpada biokemijski put *de novo* sinteze nije nužan za preživljavanje, te je tijekom evolucije došlo do gubitka

odgovarajućih gena.²¹ *H. pylori* smatra se uzročnikom kroničnog gastritisa te čireva na želucu i duodenumu³, što naposljetku može dovesti do nastanka raka⁴. Putevi prijenosa bakterije nisu do kraja razjašnjeni: pretpostavlja se da se bakterija može prenijeti s čovjeka na čovjeka oralno-oralnim ili oralno-fekalnim putem, no pronađena je i u uzorcima vode te kao patogen nekih životinja. Do zaraze vjerojatno dolazi u ranijoj životnoj dobi nakon čega bakterija asimptomatski boravi u organizmu, sve do trenutka pojave bolesti pod utjecajem zasad nedovoljno razjašnjenih faktora.⁶ Velika raširenost ove bakterije, nepoznati faktori koji potiču razvoj bolesti i teška stanja koja može prouzročiti, zajedno sa sve većom otpornošću na postojeće antibiotike²² ukazuju na važnost novih istraživanja i razvoja novih lijekova za suzbijanje *H. pylori*. Takvi lijekovi mogli bi se temeljiti na zaustavljanju biosinteze nukleotida inhibicijom proteina purinske nukleozidne fosforilaze.

Purinska nukleozidna fosforilaza (purinska nukleozidna ortofosfat ribozil transferaza,²³ PNP) je protein uključen u razgradnju purinskih nukleozida i njihovu sintezu pomoćnim metaboličkim putem.⁸ Poznat je i istražen u brojnim prokariotskim i eukariotskim vrstama.²⁴ Katalizira fosforolitičko cijepanje N-glikozidne veze između purinske baze i pentoze u ribonukleozidima i deoksiribonukleozidima, kao i reverznu reakciju kojom iz (2'-deoksi)riboza-1-fosfata i slobodne purinske baze nastaje odgovarajući nukleozid i oslobađa se fosfat²⁵, prema sljedećoj jednadžbi:



Iako je proces sinteze nukleozida termodinamički povoljniji, u stanici se ova reakcija odvija u smjeru fosforolize jer se dušične baze oslobođene cijepanjem veze odvede u druge reakcije, što dovodi do pomicanja ravnoteže u navedenom smjeru.⁸

Prema relativnoj molekularnoj masi, broju podjedinica, specifičnosti prema supstratima i porijeklu, purinske nukleozidne fosforilaze iz različitih organizama mogu se grubo podijeliti u dvije skupine. Fosforilaze prve i druge skupine međusobno se gotovo u potpunosti razlikuju u aminokiselinskom slijedu i strukturi aktivnog mjesta,⁸ no dijele vrlo sličnu sekundarnu i tercijarnu strukturu.

U prvu skupinu spadaju PNP koje imaju malu relativnu molekularnu masu (približno 80 - 100 kDa), po strukturi su homotrimeri i do sada su pronađene u stanicama sisavaca i

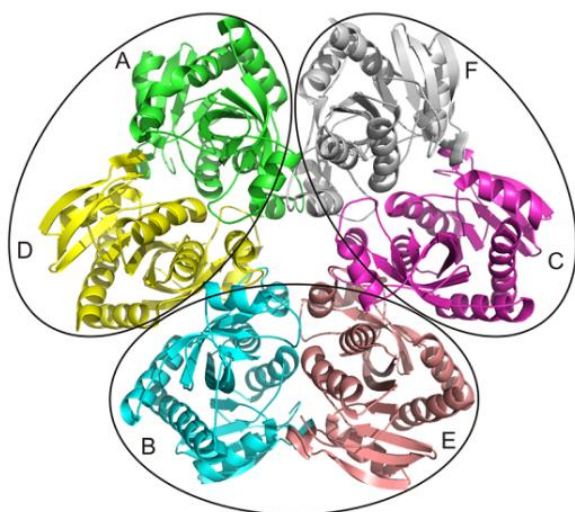
nekim mikroorganizama. One kao supstrate prihvaćaju 6-oksopurine i njihove nukleozide (primjerice gvanozin i inozin), te njihove analoge, stoga se nazivaju i Ino-Guo fosforilazama.

U drugu skupinu spadaju PNP koje imaju veliku relativnu molekulsku masu (približno 110 - 160 kDa), po strukturi su homoheksameri i nalaze se u različitim vrstama mikroorganizama. Prihvaćaju veći raspon supstrata: osim 6-oksopurina, njihovih nukleozida i analoga, kataliziraju i reakcije koje uključuju 6-aminopurine (primjerice adenilat), te njihove nukleozide i analoge. Kako je adenozin u nekim slučajevima bolji supstrat druge skupine purin-nukleozid fosforilaza od gvanozina i inozina, ponekad se one nazivaju i Ado fosforilazama.⁸ PNP iz bakterije *H. pylori* je homoheksamer⁹ ukupne relativne molekulske mase 154,72 kDa i spada u navedenu skupinu.

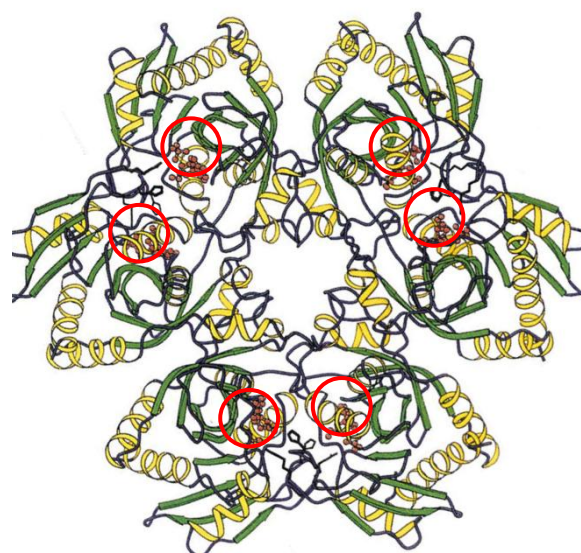
Pojedine PNP ne uklapaju se u danu podjelu. Takve fosforilaze mogu imati drugačiji broj podjedinica (primjerice, u *B. stearothermophilus* postoje dva različita PNP od kojih je jedan dimer, a drugi tetramer²⁶), netipičnu relativnu molekulsku masu (PNP iz bakterija roda *Cellulomonas* je homotrimer s relativnom molekulskom masom od 114 kDa²⁷) ili drugačiju specifičnost prema supstratima. S druge strane, ne smije se zanemariti činjenica da je dio istraživanja na PNP proteinima proveden prije 40 i više godina. U to su vrijeme za određivanje relativne molekulske mase i broja podjedinica korištene metode koje se danas smatraju nedovoljno preciznim u tu svrhu, poput elektroforeze i gel filtracije, te bi u nekim slučajevima nemogućnost jednoznačnog svrstavanja pojedinih PNP u prvu ili drugu skupinu mogla biti posljedica pogrešnih informacija koje su o proteinu dostupne.⁸ Za pouzdaniju klasifikaciju PNP i njihovo bolje razumijevanje idealno bi bilo ponoviti navedena istraživanja koristeći kristalografiju za konačnu potvrdu proteinske strukture i sekvenciranje za potvrdu pripadnosti prvoj ili drugoj skupini PNP.

Najbolje istraženi predstavnik purinskih nukleozidnih fosforilaza velike relativne molekulske mase je PNP iz bakterije *E. coli*.⁸ Po svojstvima je slična drugim proteinima te skupine, a tako i PNP iz bakterije *H. pylori*, s kojom dijeli i značajnu sličnost u aminokiselinskoj sekvenci (50 % identičnosti, 70 % sličnosti u slijedovima⁹).

PNP iz bakterije *E. coli* je protein u obliku diska, čija debljina iznosi otprilike 60 Å, a promjer otprilike 100 Å. Središnja šupljina proteina ima promjer od otprilike 20 Å.⁵ Struktura ovog homoheksamera se s obzirom na položaj podjedinica može bolje opisati kao trimer dimera²⁸ i prikazana je na slici 2. Naime, po dva monomera u strukturi okrenuta su jedan prema drugome i zajednički grade dva aktivna mjesta blizu površine proteina, jedno s gornje i jedno s donje strane enzima. Aktivno mjesto jednog monomera upotpunjuju His4 i Arg43 drugog monomera i obratno¹⁰. Monomeri su u heksamer povezani vodikovim vezama i hidrofobnim interakcijama, pri čemu su monomeri koji stvaraju dimer međusobno bolje povezani od dimera međusobno.⁸



Slika 2. Raspored podjedinica PNP iz bakterije *E. coli*. Svaka podjedinica označena je slovom i drugom bojom. Podjedinice koje zajedno čine dimer nalaze se unutar istog ovala. Slika je preuzeta i prilagođena iz (9).



Slika 3. Sekundarna struktura PNP iz bakterije *E. coli*. α-zavojnica označene su žuto, β-lanci zeleno, a petlje plavo. Molekule liganada (fosfatnih aniona i formicina B) zaokružene su crveno. U svakom dimeru jedno se aktivno mjesto nalazi s gornje, a drugo s donje strane proteina. Slika je preuzeta i prilagođena iz (8).

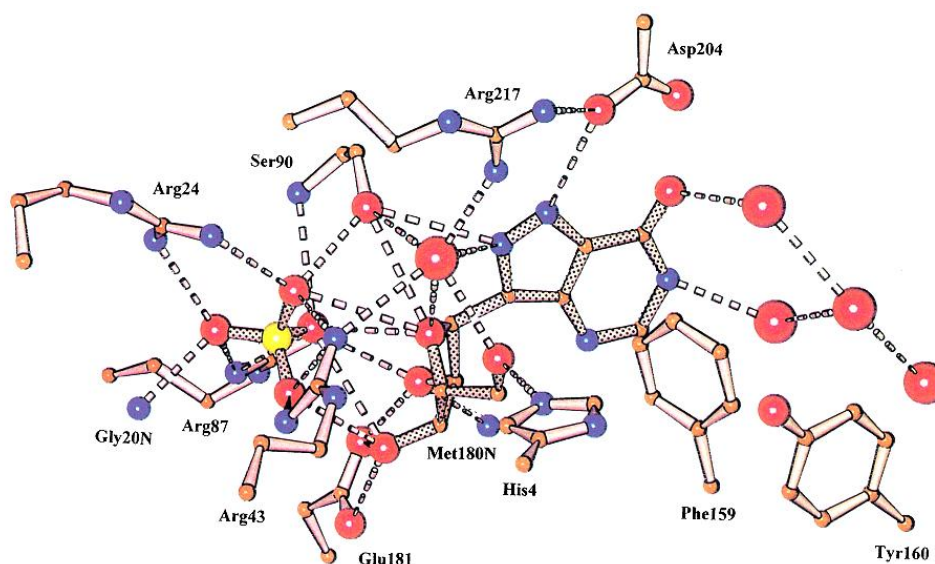
Svi monomeri imaju istu sekvencu i svaki je građen od 238 aminokiselina.²⁹ Značajne sekundarne strukture uključuju 8 α-zavojnica i središnju β-ploču miješanog paralelnog i antiparalelnog karaktera sačinjenu od 8 lanaca, koja zajedno s devetim lancem stvara β-bačvu. Na slici 3 elementi sekundarne strukture označeni su različitim bojama: α-zavojnica žuto, β-lanci zeleno, dok je u aktivnim mjestima zaokruženim crveno prikazan položaj fosfata i formicina B, strukturnog analoga purinskog nukleozida.⁸

Svako aktivno mjesto PNP sadrži tri vezna mjesta: za fosfat, ribozu i purinsku bazu. Aktivno mjesto s vezanim ligandima prikazano je na slici 4.

Vezno mjesto za fosfat najudaljenije je od površine proteina i nabijeno je pozitivno. Vezanje fosfata se ostvaruje preko elektrostatskih interakcija ili vodikovih veza u kojima sudjeluju atomi N iz Gly20 i Ser90, N^η iz Arg24, Arg87 i Arg43 (koji pripada susjednom monomeru) te O^γ iz Ser90. Fosfat također ostvaruje interakcije s 2'-OH i 3'-OH skupinama, te 4'-kisikom riboze.

Vezno mjesto za ribozu nalazi se između veznih mjesta za fosfat i purinsku bazu. Osim navedenih interakcija s fosfatom, ribeza preko 2'-OH skupine stupa u kontakt s N^η iz Arg87, N iz Met180 i O^ε iz Glu181; preko 3'-OH skupine i 4'-kisika također sa O^ε iz Glu181 i O^γ iz Ser90. 5'-OH skupina riboze ostvaruje interakcije s His4 iz susjednog monomera. Također su aminokiseline Val178, Glu179, Met180 i Phe159 uključene u ostvarivanje hidrofobnih interakcija s ribozom.

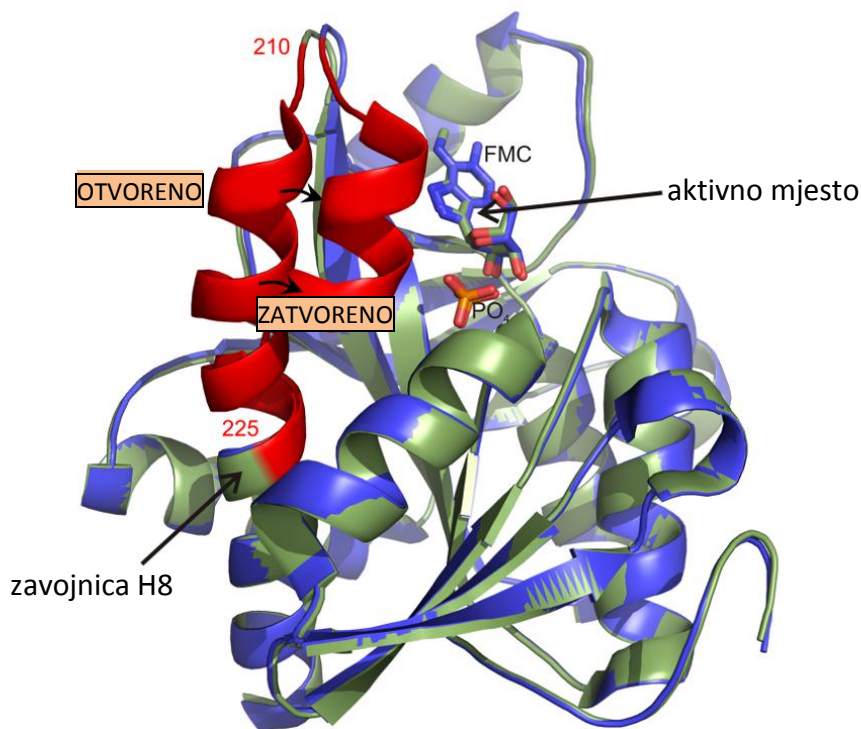
Vezno mjesto za purinsku bazu nalazi se na površini proteina. Baza s proteinom ostvaruje prvenstveno nespecifične π-π i hidrofobne interakcije u koje su uključene aminokiseline Phe159, Tyr160, Val178, Met 180 i Leu206. Mogućnost ostvarivanja pojedinih vodikovih veza znatno ovisi o funkcionalnim skupinama prisutnim na vezanoj purinskoj bazi, međutim vodikove veze nisu toliko značajne za vezanje purina kao u slučaju vezanja fosfata ili riboze.⁸



Slika 4. Aktivno mjesto PNP iz bakterije *E. coli* s ligandima (fosfatnim ili sulfatnim anionom i formicinom B, analogom purinskog nukleozida) vezanim u pripadna vezna mjesta. Prikazane su i glavne vodikove veze koje ligandi ostvaruju s aminokiselinama aktivnog mjesta. Slika je preuzeta iz (28).

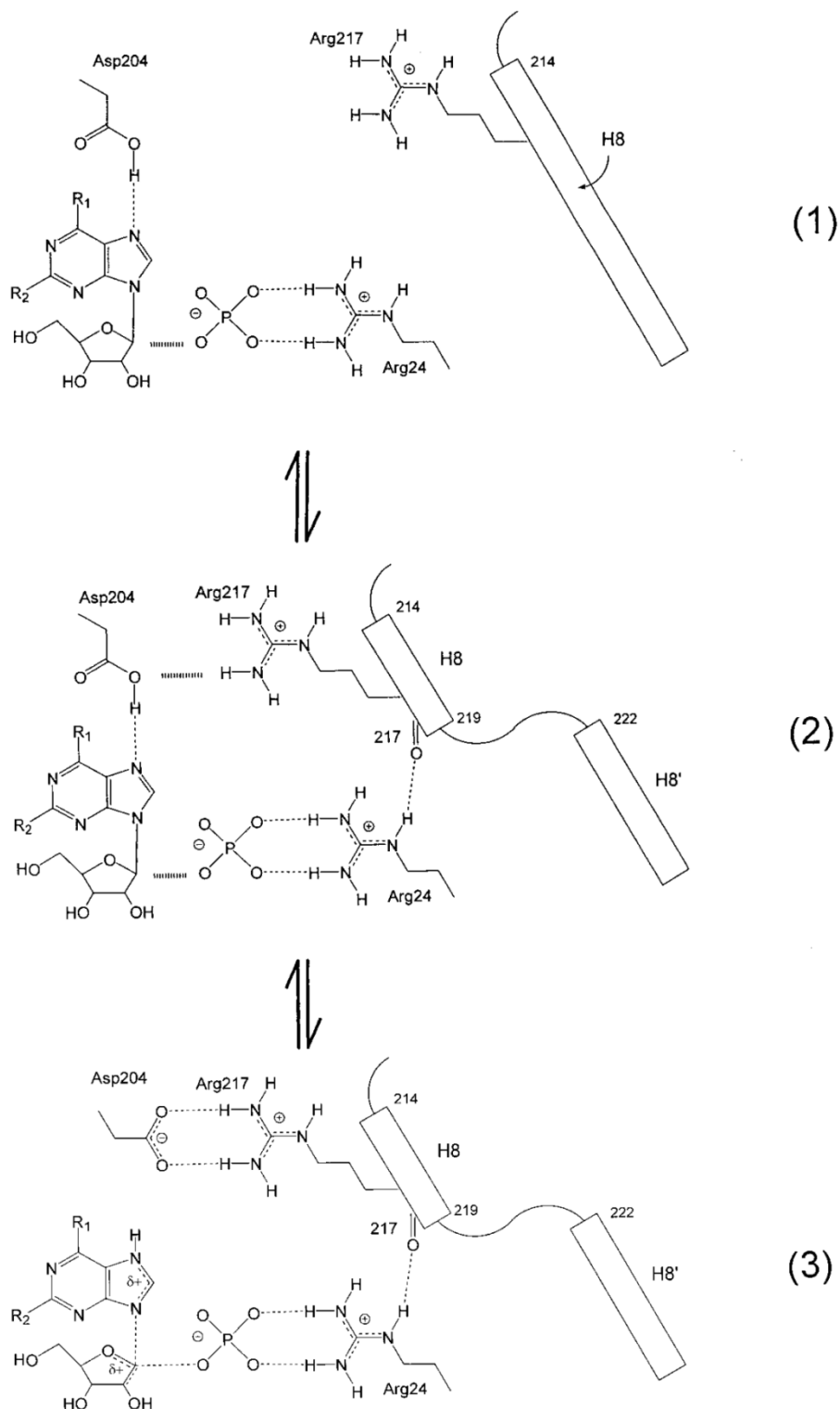
Općenito se u istraživanjima katalitičkih mehanizama enzima proučavaju enzimski kinetika, efekti koji se javljaju uslijed zamjene pojedinih aminokiselina drugim aminokiselinama, te trodimenzijske strukture enzima i njihovih kompleksa sa supstratima.¹⁵ Katalitički mehanizam PNP iz bakterije *E. coli* (također i drugih PNP velike relativne molekulske mase) je slabo istražen i još uvijek nije u potpunosti razjašnjen.¹⁰

PNP iz bakterije *E. coli* (kao i drugi PNP proteini) u reakcijama s određenim supstratima ne prati kinetiku Michaelis-Menten.^{30,31} Kao uzrok je predložena kooperativnost među podjedinicama,^{8,10} aktivacija supstratom pri visokim koncentracijama supstrata⁸ i razlika u konformaciji aktivnih mjesta¹⁰. Pod pretpostavkom da kinetika Michaelis-Menten vrijedi u uskim rasponima koncentracija supstrata, određena su dva seta kinetičkih konstanti (pri niskim i visokim koncentracijama supstrata). Disocijacijske konstante koje opisuju vezanje fosfata u otopini tako iznose 29,4 μM i 1,12 mM.³² Smatra se da se navedene disocijacijske konstante odnose na fosfate vezane u dva aktivna mjesta različitih konformacija: otvorenoj konformaciji u kojoj su supstrati slabije vezani (eng. *open*, "*loose binding*") ili zatvorenoj konformaciji u kojoj su supstrati jače vezani (eng. *closed*, "*tight binding*"). U otvorenoj konformaciji aktivnog mjesta, uobičajenoj ukoliko u njemu nema vezanih fosfatnih aniona, aminokiseline 214 do 236 tvore α -zavojnica H8. Ulaz u aktivno mjesto je otvoren i ono je izloženo otapalu. Zatvaranje aktivnog mjesta prouzročeno je podjelom H8 zavojnice na dva dijela: dio zavojnice koji čine aminokiseline 223-236 ostaje u istom položaju kao u otvorenoj konformaciji, a dio zavojnice koji čine aminokiseline 214-219 pomiče se za otprilike 5,5 Å u stranu, čime prekriva veći dio ulaza u aktivno mjesto. U zatvorenoj konformaciji supstrat je čvrsto zarobljen unutar aktivnog mjesta i ostvaruje potpuniji kontakt i snažnije interakcije s proteinom.¹⁰ Konformacije otvorenog i zatvorenog aktivnog mjesta prikazane su na slici 5.



Slika 5. Otvorena i zatvorena konformacija aktivnog mjesta PNP iz bakterije *E. coli*. U aktivnom mjestu prikazani su fosfat i formicin B (strukturni analog purinskog nukleozida). U otvorenoj konformaciji aktivnog mjesta aminokiseline 214 do 236 tvore α -zavojnicu H8. Zatvaranje aktivnog mjesta prouzročeno je podjelom zavojnice H8 na dva dijela, prilikom čega dio zavojnice koji čine aminokiseline 223-236 ostaje u istom položaju kao u otvorenoj konformaciji, a dio zavojnice koji čine aminokiseline 214-219 se pomiče se u stranu i prekriva veći dio ulaza u aktivno mjesto. Slika je preuzeta i prilagođena iz (9).

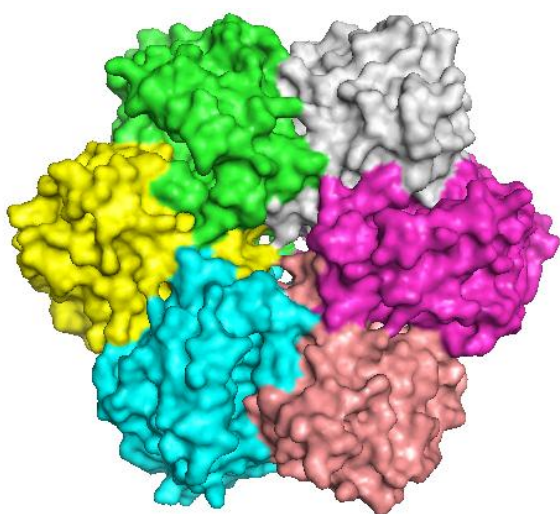
Predloženi katalitički mehanizam PNP iz bakterije *E. coli* prikazan je na slici 6. Pretpostavlja se da je mehanizam reakcije sekvencijski (reakciji prethodi vezanje oba supstrata).^{33,34} Vezanje fosfata u aktivno mjesto i ostvarivanje interakcije s Arg24 pokreće konformacijsku promjenu u aktivnom mjestu, dijeljenje zavojnice H8 na dva dijela i pomicanje jednog dijela zavojnice, uslijed čega se aktivno mjesto zatvara. Istovremeno Arg24 ostvaruje vodikovu vezu s karbonilnim kisikom na Arg217, što dovodi do nastanka vodikove veze između Arg217 i otprije protoniranog Asp204. Slijedi prijenos protona s Asp204 na dušik N7 purinske baze i formiranje prijelaznog stanja u obliku ribooksokarbenijevog iona. Zatvaranje aktivnog mjesta omogućava bliski kontakt Arg217 s Arg24 i Asp204, nužan za nastanak potrebnih vodikovih veza.¹⁰



Slika 6. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja PNP iz bakterije *E. coli*. Vežanjem fosfata u aktivno mjesto ostvaruje se vodikova veza s Arg24 (1) koja uzrokuje dijeljenje H8 zavojnice i zatvaranje aktivnog mjesta. Pomicanje dijela H8 zavojnice dovodi Arg 217 u povoljan položaj za ostvarivanje vodikovih veza s Arg24 (preko karbonilnog kisika) i Asp204 (preko bočnog ogranka) (2). Slijedi prijenos protona s Asp204 na purinski prsten (3). Slika je preuzeta iz (10).

Kompleksi PNP iz bakterije *E. coli* s različitim ligandima uspješno su kristalizirani u prostornoj grupi $P6_122$ s pola heksamera u asimetričnoj jedinici, te u prostornim grupama $P2_1$, $P2_12_12_1$ i $P4_122$ s cijelim heksamerom u asimetričnoj jedinici. Za sada su poznati kompleksi PNP iz bakterije *E. coli* sa sljedećom raspodjelom konformacija aktivnih mjesta: svih šest aktivnih mjesta u otvorenoj konformaciji, četiri aktivna mjesta u otvorenoj i dva u zatvorenoj konformaciji (zatvorena aktivna mjesta nalaze se jedno do drugog i pripadaju susjednim dimerima), tri aktivna mjesta u otvorenoj i tri u zatvorenoj konformaciji (monomeri se naizmjenice nalaze u otvorenim ili zatvorenim konformacijama).⁹

Purinska nukleozidna fosforilaza iz bakterije *H. pylori* je u usporedbi s PNP iz bakterije *E. coli* mnogo slabije istražen protein, iako s PNP iz bakterije *E. coli* dijeli mnoge zajedničke karakteristike i vrlo sličnu strukturu. PNP iz bakterije *H. pylori* je homoheksamer u kojem su, kao i kod PNP iz bakterije *E. coli*, podjedinice poslagane u obliku diska, te se struktura proteina može opisati kao trimer dimera.⁹ Svaka podjedinica proteina sastoji se od 233 aminokiseline, te ima relativnu molekulsku masu od 25,79 kDa.³⁵ Svaki heksamer PNP iz bakterije *H. pylori* također sadrži šest aktivnih mjesta blizu površine proteina. Kao i kod PNP iz bakterije *E. coli*, aktivna mjesta nalaze se u parovima okrenuta jedno prema drugome, naizmjenice s gornje i donje strane proteina (neobjavljeni podaci), te se međusobno upotpunjuju. Svako aktivno mjesto može se nalaziti u otvorenoj i zatvorenoj konformaciji.⁹ Struktura PNP iz bakterije *H. pylori* prikazana je na slikama 7 i 8.



Slika 7. Prostorna struktura PNP iz bakterije *H. pylori*. Podjedinice su označene različitim bojama.



Slika 8. Sekundarna struktura PNP iz bakterije *H. pylori*. α -zavojnice označene su crveno, β -lanci žuto, a petlje zeleno.

3. Teorijska osnovica

Rendgenska kristalografija je znanstvena disciplina koja se bavi određivanjem struktura (prostornog rasporeda atoma, iona ili molekula) kristalnih čvrstih tvari koristeći rendgensko zračenje. Jedna od osnovnih metoda u rendgenskoj kristalografiji je difrakcija rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu, a može se provoditi na kristalima "malih" molekula ili na kristalima makromolekula.

Proteinska kristalografija bavi se određivanjem trodimenzijske strukture proteina, što može dati uvid u konformacijske promjene i interakcije u proteinu te između proteina i liganada. Ovakve informacije mogu biti vrlo korisne prilikom istraživanja katalitičkog mehanizma proteina ili dizajniranja potencijalnih supstrata ili inhibitora.³⁶

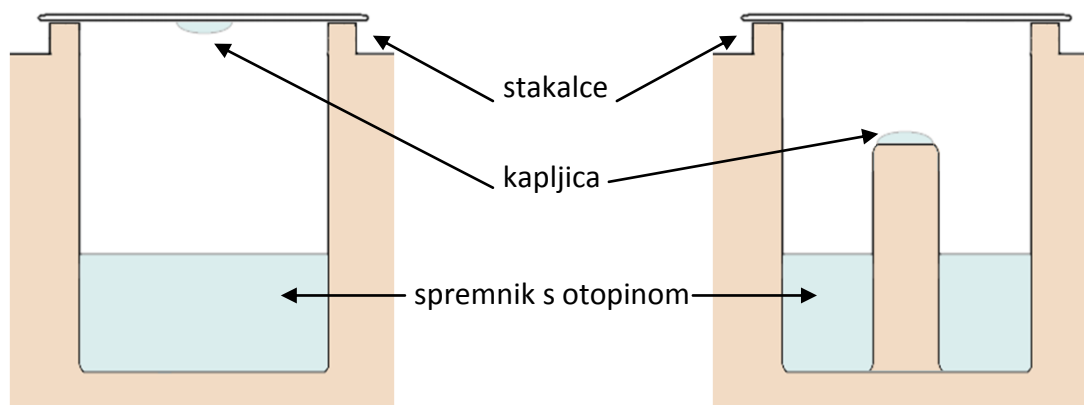
3. 1. KRISTALIZACIJA PROTEINSKIH UZORAKA

Iako je moguće dobiti proteinske kristale, oni su vrlo osjetljivi i krhki.³⁶ Uzorak proteina koji se kristalizira mora biti izuzetno dobro pročišćen i homogen, te otopljen u pogodnom otapalu (s obzirom na biološko porijeklo proteina, najčešće se koriste vodene otopine proteina). Kristalizacija proteina provodi se u kristalizacijskoj otopini, koja se najčešće sastoji od pufera s dodanim solima i precipitantima (poput polietilen glikola ili amonijevog sulfata). Na samu kristalizaciju, osim sastava kristalizacijske otopine, veliki utjecaj imaju i uvjeti u kojima se ona provodi: pH, ionska jakost i temperatura.

Za kristalizaciju proteinskih kristala najčešće se koristi metoda difuzije para tehnikama viseće kapi (eng. *hanging drop vapor diffusion*) ili sjedeće kapi (eng. *sitting drop vapor diffusion*), a u upotrebi je i metoda kristalizacije u gelu.

U metodi difuzije para tehnikom viseće kapi koriste se kristalizacijske ploče s 24 do 96 spremnika. Spremnici se napune kristalizacijskom otopinom. U kapljici na silikoniziranom stakalcu pomiješaju se jednaki volumeni otopine proteina i kristalizacijske otopine, stakalce se preokrene i pritisne na spremnik, čime se on hermetički zatvara. Dobro prijanjanje stakalca uz spremnik omogućuje silikonska mast koja je prethodno nanosena na rub spremnika. Koncentracija sastojaka kristalizacijske otopine u kapljici upola je manja od

koncentracije sastojaka kristalizacijske otopine u spremniku. Zbog toga dolazi do postupne difuzije para vode iz kapljice u otopinu u spremniku, čime se u kapljici veoma polagano povećava koncentracija proteina, što dovodi do kristalizacije.³⁶ Metoda difuzije para tehnikom sjedeće kapi funkcionira na jednakom principu, osim što kristalizacijska kapljica ne visi iznad otopine u spremniku, već je položena na dio spremnika koji se izdiže nad otopinom. Obje tehnike prikazane su na slici 9.



Slika 9. Kristalizacija metodom difuzije para, tehnikama viseće kapi (lijevo) i sjedeće kapi (desno). Spremnik s otopinom (plavo) poklopljen je stakalcem. U tehnici viseće kapi kapljica visi sa stakalca, dok je u tehnici sjedeće kapi ona položena na dio spremnika koji se izdiže nad otopinom.

3.2. PRIPREME ZA EKSPERIMENT DIFRAKCIJE RENDGENSKOG ZRAČENJA NA MONOKRISTALU I PRELIMINARNO SNIMANJE

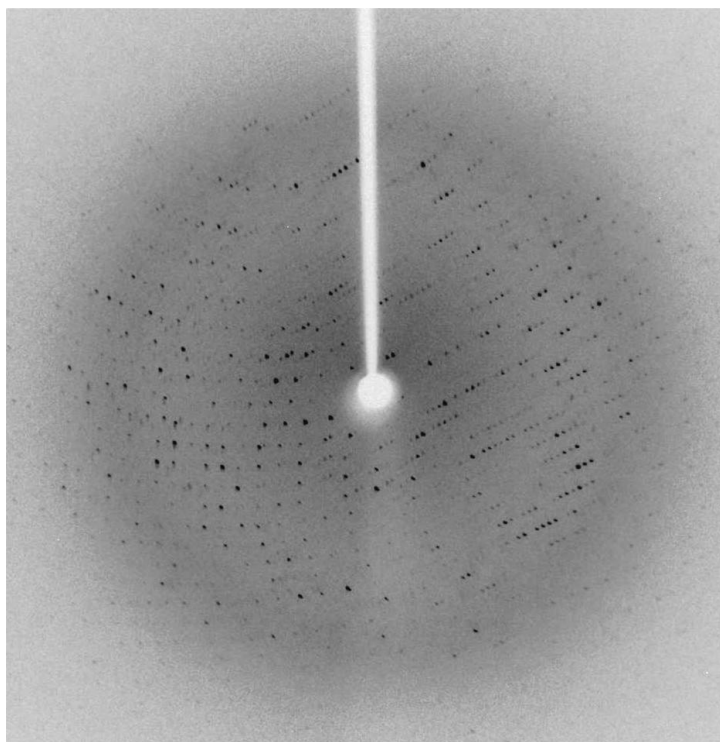
Proteinski kristali su veoma osjetljivi i isušivanjem se uništavaju. Zbog toga se, nakon vađenja iz kristalizacijske kapljice hvatanjem u plastične omče, čuvaju smrznuti u tekućem dušiku. Snimanje se također često provodi u struji dušika, pri temperaturi od 100 K.³⁶ Da bi se izbjeglo smrzavanje matičnice oko kristala uhvaćenog u omču, te zbog velikog udjela vode koje sadrže proteinski kristali (50 - 80 %)³⁷, prije smrzavanja kristale je potrebno uroniti u otopinu koja sadrži krioprotektant (poput glicerola, etilen glikola ili metanola). Korištenje krioprotekcijske otopine nije potrebno ukoliko sama matičnica ima krioprotekcijska svojstva. Krioprotektant zamjenjuje dio molekula vode prisutnih u kristalu, te sprečava smrzavanje matičnice oko kristala uhvaćenog u omču.

Nakon postavljanja kristala na goniometarsku glavu instrumenta u struji dušika, vrši se preliminarno snimanje koje omogućuje provjeru kvalitete difrakcije kristala, optimizaciju programa prikupljanja podataka (na primjer vrijeme trajanja snimanja ili duljinu ekspozicije) i određivanje parametara jedinične ćelije.³⁶

3.3. DIFRAKCIJA RENDGENSKOG ZRAČENJA NA MONOKRISTALU - PRIKUPLJANJE DIFRAKCIJSKIH PODATAKA

Kao izvori monokromatskog rendgenskog zračenja mogu se koristiti klasične rendgenske cijevi i cijevi s rotirajućom anodom, iako je za određivanje proteinskih struktura sinkrotron optimalan izvor zračenja - prvenstveno zbog mnogo većeg intenziteta dobivenog zračenja koje omogućava značajno kraće snimanje.³⁸ U proteinskoj kristalografiji najčešće se koristi CuK_α zračenje valne duljine 1,5418 Å.

Iako se rendgensko zračenje definira kao dio spektra elektromagnetskog zračenja s valnim duljinama između 0,1 Å i 100 Å,³⁶ valne duljine između 0,5 Å i 2,0 Å su izuzetno pogodne za ovaj tip eksperimenata jer redom veličine odgovaraju udaljenostima među atomima u kristalnoj rešetki.³⁸ Atomi, ioni ili molekule su u kristalima poslagani na pravilan, periodički način u sve tri dimenzije, stvarajući tako kristalnu rešetku. Ukoliko se kroz rešetku propusti zračenje s valnom duljinom koja redom veličine odgovara udaljenostima među atomima rešetke, javlja se fenomen difrakcije: rendgensko zračenje raspršuje se na elektronima, te dolazi do interferencije. Prikupljanjem difraktiranih zraka na detektorima dobivaju se difrakcijske slike, poput one prikazane na slici 10.



Slika 10. Primjer difrakcijske slike kristala PNP iz bakterije *H. pylori*, dobivene korištenjem CCD detektora na rendgenskom difraktometru za monokristalne uzorke *Xcalibur Nova R*. Refleksi (crne točke vidljive na slici) odgovaraju mjestima upada difraktiranih zraka na detektor. Bijela linija u sredini slike je sjena koju zaustavljač zrake (eng. *beamstop*) baca na detektor.

Difrakcijske slike prikupljaju se za različite položaje kristala, dobivene rotiranjem kristala oko jedne osi. Kristal se obično rotira u koracima od jednog stupnja ili manje. S obzirom na simetriju kristala, za skupljanje svih jedinstvenih refleksa (skupa svih refleksa na svim difrakcijskim slikama koji se međusobno ne ponavljaju i nisu povezani simetrijom³⁹) potrebno je sakupiti difrakcijske slike za rotacije od maksimalno 180 °.

3.4. REDUKCIJA DIFRAKCIJSKIH PODATAKA

Difrakcijske slike dobivene raspršenjem rendgenskih zraka na elektronima atoma u strukturi direktno su povezane s prostornim rasporedom elektronske gustoće u promatranom kristalu.³⁷

Funkcija elektronske gustoće može se definirati jednadžbom (1) kao Fourierov red čiji su članovi strukturni faktori \mathbf{F}_{hkl} . V označava volumen jedinične ćelije, a x , y i z te h , k i l koordinate u realnom, odnosno recipročnom prostoru.³⁶

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \mathbf{F}_{hkl} e^{-2\pi i (hx+ky+lz)} \quad (1)$$

Strukturni faktor \mathbf{F}_{hkl} prikazan je jednadžbom (2),³⁶ a odnosi se na refleks hkl . Za atom j , f_j je atomski faktor raspršenja, a x_j , y_j i z_j su njegove koordinate.

$$\mathbf{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (2)$$

Strukturni faktor \mathbf{F}_{hkl} može se napisati i u obliku (3), gdje je $|F_{hkl}|$ amplituda strukturnog faktora, a α_{hkl} relativna faza strukturnog faktora.

$$\mathbf{F}_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\alpha_{hkl}} \quad (3)$$

Iz jednadžbe (3) slijedi da se jednadžba (1) može napisati kao³⁶:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{i\alpha_{hkl}} e^{-2\pi i (hx + ky + lz)} \quad (4)$$

Za računanje mape elektronske gustoće potrebno je poznavati koordinate svakog dobivenog jedinstvenog refleksa, kao i amplitudu i fazu u tom položaju. Detektor bilježi samo podatak o intenzitetu difraktiranog zračenja na određenom položaju (intenzitet i koordinate pojedinog refleksa).

Iz intenziteta je moguće izračunati amplitude strukturnih faktora: amplituda strukturnog faktora povezana je s intenzitetom pojedinog refleksa hkl preko jednadžbe (5), u kojoj je K konstanta koja se odnosi na moć raspršenja elektrona, A je apsorpcijski koeficijent, y je ekstinkcijski koeficijent, $L(\theta)$ je Lorentzov faktor, a $P(\theta)$ polarizacijski faktor.³⁸

$$I_{hkl} = |F_{hkl}|^2 K A y L(\theta) P(\theta) \quad (5)$$

Prije izračuna intenziteta pojedinog refleksa, prikupljene podatke potrebno je skalirati, odnosno podesiti ih tako da je razlika intenziteta nekog refleksa i intenziteta njemu simetrijski ekvivalentnih refleksa opaženih na drugim difrakcijskim slikama što manja.

Difrakcijom rendgenskog zračenja na kristalu dobivaju se informacije o položajima refleksa i njihovim intenzitetima, no za računanje mape elektronske gustoće potrebno je poznavati i fazu α_{hkl} , podatak koji nije moguće saznati iz difrakcijskog eksperimenta.

3.5. RJEŠAVANJE KRISTALNE STRUKTURE - RJEŠAVANJE PROBLEMA FAZE

Problem nedostatka podataka o fazi može se riješiti metodom izomorfne zamjene, u kojoj se priprema derivat proučavanog kristala koji u strukturi sadrži teške atome (primjerice Hg, Pt ili Au), metodom anomalnog raspršenja, ukoliko su u proučavanoj strukturi prisutni atomi koji imaju veliku moć anomalnog raspršenja rendgenskog zračenja, ili metodom molekulske zamjene.³⁶

Metoda molekulske zamjene može se koristiti ukoliko je riješena struktura molekule sa sličnom tercijarnom strukturom koja se može koristiti kao model. Model se rotira i translacija kako bi se pronašla orijentacija i položaj u kojem se strukturni faktori izračunati iz modela najbolje slažu s opaženim amplitudama strukturnih faktora proučavanog kristala³⁷, te se iz modela računaju faze. Umjesto faza koje nedostaju za rješavanje nepoznate strukture koriste se faze izračunate iz modela.⁴⁰

3.6. UTOČNJAVANJE I EVALUACIJA KRISTALNE STRUKTURE

Rješavanjem kristalne strukture dobiva se model koji sadrži podatke o koordinatama svih atoma prisutnih u strukturi. Utočnjavanje strukture provodi se iterativnim podešavanjem položaja atoma tako da oni najbolje odgovaraju opaženoj elektronskoj gustoći, odnosno tako da se difrakcijski podaci izračunati iz modela najbolje poklapaju s eksperimentalno dobivenim difrakcijskim podacima.³⁷

Slaganje izračunatih i eksperimentalno dobivenih podataka, odnosno točnost strukturnog modela opisuje faktor nepouzdanosti (*R*-faktor). Faktor nepouzdanosti za svaki refleks računa razliku u opaženim ($|F_{obs}|$) i izračunatim ($|F_{calc}|$) amplitudama strukturnih faktora prema formuli (6)³⁶:

$$R = \frac{\sum | |F_{obs}| - |F_{calc}| |}{\sum |F_{obs}|} \quad (5)$$

U proteinskoj kristalografiji realno je da faktor nepouzdanosti riješene strukture iznosi više od 10 %, a poželjno je da je manji od 20 %.³⁶

4. Materijali i metode

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Purinska nukleozidna fosforilaza

Prethodno izolirana i pročišćena PNP iz *Helicobacter pylori* soj 26695 (UniProt P56463) nalazila se u 50 mM Tris-HCl puferu, pH 7,6 u koncentraciji 11,0 mg mL⁻¹. Do izvođenja eksperimenata čuvana je na -80 °C.

4.1.2. Kristalizacijske otopine

Prilikom kristalizacije korišteni su kupljeni setovi kristalizacijskih otopina JCSG+ B8 i MIDAS B7 i njihove modifikacije:

- **JCSG+ B8 (originalni set):** 0,2 M MgCl₂; 0,1 M Tris, pH 7,0;
10 % (w/v) polietilen glikol 8000; 0,02 % NaN₃
- **JCSG+ B8 s 20 mM PO₄³⁻:** 0,2 M MgCl₂; 0,1 M Tris, pH 7,0; 10 % (w/v) polietilen glikol 8000;
20 mM Na, K-fosfatni pufer; 0,02% NaN₃
- **JCSG+ B8 bez MgCl₂:** 0,1 M Tris, pH 7,0; 10 % (w/v) polietilen glikol 8000; 0,02 % NaN₃
- **JCSG+ B8 s 0,1 M MgCl₂:** 0,1 M MgCl₂; 0,1 M Tris, pH 7,0; 10 % (w/v) polietilen glikol 8000;
0,02 % NaN₃
- **MIDAS B7 (originalni set):** 40 % (w/v) polipropilen glikol 400; 0,2 M imidazol, pH 7,0;
0,02 % NaN₃

4.1.3. Ligandi

Kao izvori fosfatnih iona korištene su sljedeće otopine:

- 50 mM otopina Na₃PO₄
- 10 mM Na,K-fosfatni pufer, pH 6,49
- JCSG+ B8 otopina s 2 mM PO₄³⁻: 0,2 M MgCl₂; 0,1 M Tris, pH 7,0; 10 % (w/v) polietilen glikol 8000; 2 mM Na, K-fosfatni pufer, pH 6,49 ; 0,02 % NaN₃

Korištene su sljedeće otopine formicina A:

- 5 mM otopina FA u vodi (maksimalna moguća koncentracija otopine FA u vodi)
- 20,8 mM otopina FA u 20 % DMSO
- 10 mM otopina FA u metanolu
- 5 mM otopina FA u JCSG+ B8 uvjetima bez MgCl_2 (0,1 M Tris, pH 7,0; 10 % (w/v) polietilen glikol 8000; 0,02% NaN_3)

Korištena je 5 mM otopina hipoksantina u 96 %-tnom etanolu i 5 mM otopina TSA u 96 %-tnom etanolu.

4.1.4. Krioprotektanti:

Za krioprotekciju su korištene sljedeće vodene otopine:

- **KRIO1:** 0,14 M MgCl_2 ; 0,07 M Tris, pH 7,0; 7 % (w/v) polietilen glikol 8000; 0,014 % NaN_3 ; 30 % etilen glikol
- **KRIO2:** 0,2 M MgCl_2 ; 0,1 M Tris, pH 7,0; 10 % (w/v) polietilen glikol 8000; 0,02 % NaN_3 ; 30 % etilen glikol
- **KRIO3:** 0,1 M Tris, pH 7,0; 10 % (w/v) polietilen glikol 8000; 30 % etilen glikol

4.2. METODE

4.2.1. Kokristalizacijski eksperimenti

Kristalizacija PNP iz bakterije *H. pylori* i njegovih kompleksa provedena je metodom difuzije para tehnikom viseće kapi, na temperaturi od 18 °C. Korištene su plastične LINBRO ploče s 24 spremnika. U svaki spremnik pipetirano je 700 μL odabrane kristalizacijske otopine (JSCG+ B8, MIDAS B7 ili njihovih modifikacija). Otopina proteina (11,0 mg mL^{-1} u 50 mM Tris-HCl, pH 7,6) je odmrznuta i centrifugirana 5 minuta na 10 000 rpm.

Za kristalizaciju čistog PNP korištena je navedena otopina PNP. U cilju pripreve binarnih i ternarnih kompleksa PNP s ligandima, u otopinu proteina dodane su otopine jednog ili više liganada i inkubirane u razdoblju od 20 do 45 minuta.

Kapljice su dobivene miješanjem 1 μL otopine proteina (s ili bez dodanih liganada) i 1 μL pripadne kristalizacijske otopine, na stakalcu koje je potom preokrenuto i pritisnuto na spremnik. U svakom kristalizacijskom eksperimentu (za svaku skupinu kapljica), postavljeno je 4 do 18 identičnih kapljica.

Detalji kristalizacijskih eksperimenata dani su u tablicama 1 i 2.

Tablica 1. Detalji kristalizacijskih eksperimenata u kojima su korištene kristalizacijske otopine JCSG+ B8 i JCSG+ B8 s 20 mM fosfatom.

SKUPINA	PRIPREMA OTOPINE PROTEINA	PRIPREMA KAPLJICA
1 ČISTI PNP kristalizacijska otopina: JCSG+ B8	SASTAV OTOPINE PROTEINA: otopina čistog proteina	SASTAV KAPLJICA: 1 μ L otopine čistog proteina 1 μ L kristalizacijske otopine JCSG+ B8 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 5,5 \text{ mg mL}^{-1}$
2 PNP + FOSFAT kristalizacijska otopina: JCSG+ B8	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 6 μ L otopine čistog proteina 1 μ L otopine fosfata (50 mM Na_3PO_4 , pH 7,0) INKUBACIJSKI PERIOD: 40 minuta	SASTAV KAPLJICA: 1 μ L otopine proteina s fosfatom 1 μ L kristalizacijske otopine JCSG+ B8 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 4,7 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{PO}_4^{3-}) = 3,8 \text{ mM}$
3 PNP + FOSFAT kristalizacijska otopina: JCSG+ B8 s 20 mM fosfatom	SASTAV OTOPINE PROTEINA: otopina čistog proteina	SASTAV KAPLJICA: 1 μ L otopine čistog proteina 1 μ L kristalizacijske otopine JCSG+ B8 s 20 mM fosfatom KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 5,5 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{PO}_4^{3-}) = 10 \text{ mM}$
4 PNP + FA kristalizacijska otopina: JCSG+ B8	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 6 μ L otopine čistog proteina 1 μ L otopine FA (5 mM FA u vodi) INKUBACIJSKI PERIOD: 40 minuta	SASTAV KAPLJICA: 1 μ L otopine proteina s FA 1 μ L kristalizacijske otopine JCSG+ B8 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 4,7 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{FA}) = 0,4 \text{ mM}$
5 PNP + FA kristalizacijska otopina: JCSG+ B8	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 12,5 μ L otopine čistog proteina 0,6 μ L otopine FA (20,8 mM FA u 20% DMSO) INKUBACIJSKI PERIOD: 20 minuta	SASTAV KAPLJICA: 1 μ L otopine proteina s FA 1 μ L kristalizacijske otopine JCSG+ B8 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 5,2 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{FA}) = 0,5 \text{ mM}$
6 PNP + FOSFAT + FA kristalizacijska otopina: JCSG+ B8	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 6 μ L otopine čistog proteina 1 μ L otopine FA (5 mM FA u vodi) 0,5 μ L otopine fosfata (50 mM Na_3PO_4 , pH 7,0) INKUBACIJSKI PERIOD: 40 minuta	SASTAV KAPLJICA: 1 μ L otopine proteina s FA i fosfatom 1 μ L kristalizacijske otopine JCSG+ B8 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 4,4 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{PO}_4^{3-}) = 1,7 \text{ mM}$ $c(\text{FA}) = 0,3 \text{ mM}$

Tablica 1 (nastavak).

SKUPINA	PRIPREMA OTOPINE PROTEINA	PRIPREMA KAPLJICA
7 PNP + FOSFAT + FA kristalizacijska otopina: JCSG+ B8 s 20 mM fosfatom	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 12,5 μL otopine čistog proteina 0,6 μL otopine FA (20,8 mM FA u 20% DMSO) INKUBACIJSKI PERIOD: 20 minuta	SASTAV KAPLJICA: 1 μL otopine proteina s FA 1 μL kristalizacijske otopine JCSG+ B8 s 20 mM fosfatom KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 5,2 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{PO}_4^{3-}) = 10,0 \text{ mM}$ $c(\text{FA}) = 0,5 \text{ mM}$
8 PNP + TsA kristalizacijska otopina: JCSG+ B8	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 6 μL otopine čistog proteina 1 μL otopine TSA (5 mM TsA, u 96 %-tnom etanolu) INKUBACIJSKI PERIOD: 20 minuta	SASTAV KAPLJICA: 1 μL otopine proteina s TsA 1 μL kristalizacijske otopine JCSG+ B8 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 4,7 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{TsA}) = 0,4 \text{ mM}$
9 PNP + FOSFAT + TsA kristalizacijska otopina: JCSG+ B8	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 6 μL otopine čistog proteina 1 μL otopine TSA (5 mM TsA, u 96 %-tnom etanolu) 0,5 μL otopine fosfata (50 mM Na_3PO_4 , pH 7,0) INKUBACIJSKI PERIOD: 20 minuta	SASTAV KAPLJICA: 1 μL otopine proteina s TsA i fosfatom 1 μL kristalizacijske otopine JCSG+ B8 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 4,4 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{PO}_4^{3-}) = 1,7 \text{ mM}$ $c(\text{TsA}) = 0,3 \text{ mM}$
10 PNP + HIPOKSANTIN kristalizacijska otopina: JCSG+ B8	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 4 μL otopine čistog proteina 0,7 μL otopine hipoksantina (5 mM hipoksantin, u 96 %-tnom etanolu) INKUBACIJSKI PERIOD: 40 minuta	SASTAV KAPLJICA: 1 μL otopine proteina s hipoksantinom 1 μL kristalizacijske otopine JCSG+ B8 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 4,7 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{hipoksantin}) = 0,4 \text{ mM}$
11 PNP + FOSFAT + HIPOKSANTIN kristalizacijska otopina: JCSG+ B8	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 4 μL otopine čistog proteina 0,7 μL otopine hipoksantina (5 mM hipoksantin, u 96 %-tnom etanolu) 0,4 μL otopine fosfata (50 mM Na_3PO_4 , pH 7,0) INKUBACIJSKI PERIOD: 40 minuta	SASTAV KAPLJICA: 1 μL otopine proteina s fosfatom i hipoksantinom 1 μL kristalizacijske otopine JCSG+ B8 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 4,3 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{PO}_4^{3-}) = 1,7 \text{ mM}$ $c(\text{hipoksantin}) = 0,3 \text{ mM}$

Tablica 2. Detalji kristalizacijskih eksperimenata u uvjetima snižene ionske jakosti.

SKUPINA	PRIPREMA OTOPINE PROTEINA	PRIPREMA KAPLIJICA
12 PNP + FOSFAT kristalizacijska otopina: MIDAS B7	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 25 μL otopine čistog proteina 4,4 μL otopine fosfata (10 mM Na,K-fosfatni pufer) INKUBACIJSKI PERIOD: 30 minuta	SASTAV KAPLIJICA: 1 μL otopine proteina s fosfatom 1 μL kristalizacijske otopine MIDAS B7 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLIJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 4,7 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{PO}_4^{3-}) = 0,7 \text{ mM}$
13 PNP + FOSFAT kristalizacijska otopina: JCSG+ B8 s 0,1 M MgCl_2	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 25 μL otopine čistog proteina 4,4 μL otopine fosfata (10 mM Na,K-fosfatni pufer) INKUBACIJSKI PERIOD: 30 minuta	SASTAV KAPLIJICA: 1 μL otopine proteina s fosfatom 1 μL kristalizacijske otopine JCSG+ B8 s 0,1 M MgCl_2 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLIJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 4,7 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{PO}_4^{3-}) = 0,7 \text{ mM}$
14 ČISTI PNP kristalizacijska otopina: JCSG+ B8 bez MgCl_2	SASTAV OTOPINE PROTEINA: otopina čistog proteina	SASTAV KAPLIJICA: 1 μL otopine čistog proteina 1 μL kristalizacijske otopine JCSG+ B8 bez MgCl_2 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLIJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 5,5 \text{ mg mL}^{-1}$
15 PNP + FOSFAT kristalizacijska otopina: JCSG+ B8 bez MgCl_2	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 25 μL otopine čistog proteina 4,4 μL otopine fosfata (10 mM Na,K-fosfatni pufer) INKUBACIJSKI PERIOD: 30 minuta	SASTAV KAPLIJICA: 1 μL otopine proteina s fosfatom 1 μL kristalizacijske otopine JCSG+ B8 bez MgCl_2 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLIJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 4,7 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{PO}_4^{3-}) = 0,7 \text{ mM}$
16 PNP + FA kristalizacijska otopina: JCSG+ B8 bez MgCl_2	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 6 μL otopine čistog proteina 1 μL otopine FA (5 mM FA otopljen u JCSG+ B8 bez MgCl_2) INKUBACIJSKI PERIOD: 45 minuta	SASTAV KAPLIJICA: 1 μL otopine proteina s FA 1 μL kristalizacijske otopine JCSG+ B8 bez MgCl_2 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLIJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 4,7 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{FA}) = 0,4 \text{ mM}$
17 PNP + FA + FOSFAT kristalizacijska otopina: JCSG+ B8 bez MgCl_2	SASTAV OTOPINE PROTEINA: 12 μL otopine čistog proteina 2 μL otopine FA (5 mM FA otopljen u JCSG+ B8 bez MgCl_2) 2 μL otopine fosfata (10 mM Na,K-fosfatni pufer) INKUBACIJSKI PERIOD: 45 minuta	SASTAV KAPLIJICA: 1 μL otopine proteina s FA i fosfatom 1 μL kristalizacijske otopine JCSG+ B8 bez MgCl_2 KONAČNE KONCENTRACIJE U KAPLIJICAMA: $\gamma(\text{protein}) = 4,1 \text{ mg mL}^{-1}$ $c(\text{FA}) = 0,3 \text{ mM}$ $c(\text{PO}_4^{3-}) = 0,6 \text{ mM}$

Kristalizacija je u pojedinim kapljicama potaknuta prenošenjem klica kristala (eng. *seeding*) iz kapljice u kojoj je u prethodnim eksperimentima iskristalizirao čisti PNP u odgovarajućim uvjetima (JCSG+ B8). Kristalizacija u pojedinim kapljicama skupine 12, koje su sadržavale kristalizacijsku otopinu MIDAS B7, potaknuta je prenošenjem klica kristala iz kapljice iste skupine u kojoj je spontano došlo do kristalizacije. U svrhu prenošenja klica kristala, vrh čiste igle uronjen je u kapljicu s već postojećim kristalima PNP, a potom u kapljicu u kojoj se poticao kristalni rast.

Po jedan ili više kristala iz skupina 2-4, 6, 8-11, 13, 15 i 17 uronjeno je kroz 5 do 10 sekundi u otopinu odabranog krioprotektanta i zamrznuto u tekućem dušiku. U pojedinim skupinama različiti kristali uronjeni su u različite krioprotektante. Kristali skupine 12 nisu uronjeni u krioprotektant. Korištene krioprotekcijske otopine navedene su u tablici 3.

Tablica 3. Krioprotekcijske otopine korištene za zaštitu kristala navedenih skupina.

SKUPINA	KRIOPROTEKTANT
2	KRIO1 ili KRIO2
3	KRIO2
4	KRIO1, KRIO2 ili KRIO3
6	KRIO1
8	KRIO1, KRIO2 ili KRIO3
9	KRIO1
10	KRIO1
11	KRIO1
12	nije korišten krioprotektant
13	KRIO2 ili KRIO3
15	KRIO2
17	KRIO3

4.2.2. Naknadni dodatak liganada u kapljice i namakanje kristala u otopinama liganada

Dobivanje kompleksa PNP s fosfatom, FA i TsA pokušalo se postići dodatkom otopine željenog liganada u odgovarajuću kapljicu s prethodno formiranim kristalima ili uranjanjem prethodno formiranih kristala PNP u otopine željenih liganada (eng. *soaking*).

4.2.2.1. Dobivanje binarnih kompleksa PNP s fosfatnim anionima

a) Dodavanjem otopine fosfata u kapljicu s prethodno formiranim kristalima

U jednu kapljicu skupine 2 koja je sadržavala prethodno formirane kristale dodano je 0,5 μL otopine fosfata (1 M Na,K-fosfatni pufer, pH 6,49). Odabrani kristal provučen je kroz otopinu KRIO1 i zaleđen u tekućem dušiku.

b) Namakanjem prethodno formiranih kristala u otopini fosfata

Nekoliko kristala skupine 1 preneseno je u kapljicu koja je sadržavala 2 mM otopinu fosfata u JCSG+ B8. Kristali su iz otopine izvađeni nakon nekoliko sekundi ili idućeg dana, uronjeni u otopinu krioprotektanta KRIO2 i zaleđeni.

Nekoliko kristala skupine 2 uronjeno je na par sekundi u otopinu fosfata (1 M Na,K-fosfatni pufer, pH 6,49), zatim u otopinu krioprotektanta KRIO2 i zamrznuto u tekućem dušiku.

4.2.2.2. Dobivanje kompleksa PNP s FA

a) Dodavanjem otopine FA u kapljicu s prethodno formiranim kristalima

Po 1, 2 ili 4 μL 10 mM otopine FA u metanolu dodano je u pojedine kapljice skupina 1, 2, 4, 6 i 13. U pojedine kapljice skupina 14 i 15 dodano je 0,2 ili 1 μL 5 mM otopine FA u JCSG+ B8 bez MgCl_2 . U kapljicama su se prethodno nalazili kristali, osim u par kapljica skupine 15, u kojima je kristalizacija potaknuta par dana nakon dodatka otopine FA prenošenjem zametaka kristala.

Nakon razdoblja od jedan do mjesec dana kristali su izvađeni i smrznuti u tekućem dušiku. Prije smrzavanja kristali skupine 14 uronjeni su u krioprotektant KRIO3, a kristali

skupine 15 u krioprotektant KRIO2. Kioprotektant nije bio korišten ukoliko je u kapljice dodana otopina FA u metanolu.

b) Namakanjem prethodno formiranih kristala u otopini FA

Nekoliko kristala iz skupina 1, 4 i 6 uronjeno je u otopinu FA u metanolu na par sekundi, a zatim su smrznuti bez korištenja dodatnog krioprotektanta.

4.2.2.3. Dobivanje kompleksa PNP s TsA

U jednu kapljicu skupine 8 dodano je 2 μL 5 mM otopine TsA u etanolu, nakon čega su kristali izvučeni kapljice i smrznuti bez korištenja dodatnog krioprotektanta.

4.2.3. Određivanje kristalnih struktura

Za određivanje strukture odabranih kristala korištena je metoda difrakcije rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu. Difrakcijski podaci prikupljeni su na sinkrotronu *Elettra* u Trstu (na liniji XRD1), koristeći *Dectris Pilatus 2M* detektor ili na rendgenskom difraktometru za monokristale *Xcalibur Nova R (Oxford Diffraction)*, koristeći monokromatsko $\text{CuK}\alpha$ zračenje valne duljine 1,54 Å, na temperaturi od 100 K.

Podaci su obrađeni korištenjem programskog paketa CCP4⁴¹. Difrakcijske slike su procesirane korištenjem programa MOSFLM⁴², XDS⁴³ ili CrysAlisPro⁴⁴, redukcija podataka je provedena uz pomoć programa POINTLESS⁴⁵, AIMLESS⁴⁶ i SCALA⁴⁵. Strukture su riješene korištenjem metode molekulske zamjene. Kao model je korištena prethodno riješena struktura PNP iz bakterije *H. pylori* koja nije sadržavala vezane ligande niti molekule vode (neobjavljeni podaci). Rukovanje modelom provedeno je u programu Coot⁴⁷. Utočnjavanje strukturnog modela provedeno je korištenjem programa Refmac5⁴⁸ ili Phenix⁴⁹. Riješene strukture vizualizirane su pomoću programa PyMOL⁵⁰, koji je korišten i za određivanje vodikovih veza ostvarenih između proteina i vezanih liganada.

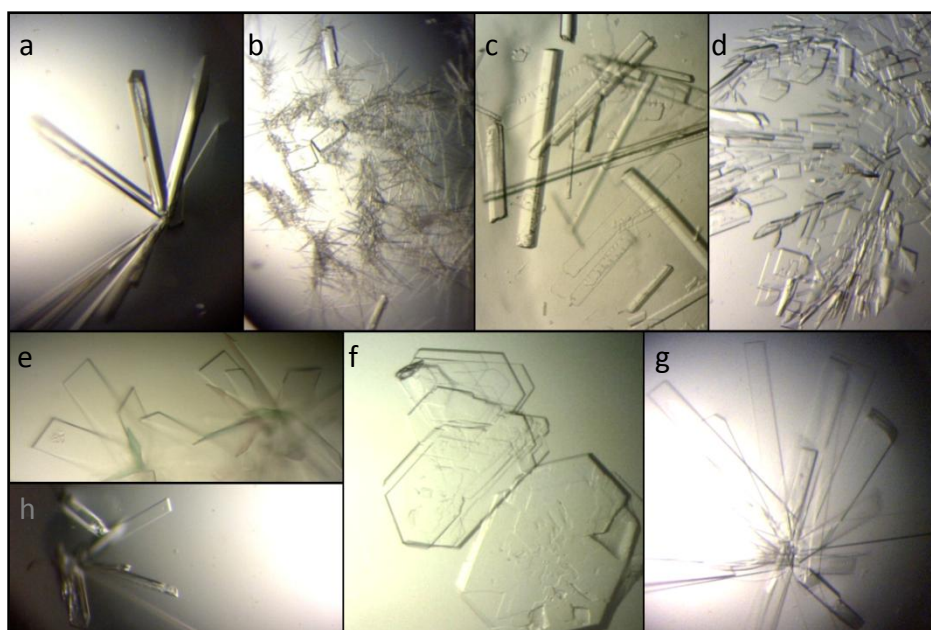
5. Rezultati

5.1. REZULTATI KOKRISTALIZACIJSKIH EKSPERIMENATA

Kristalizacija čistog PNP iz bakterije *H. pylori*, te njegovih binarnih i ternarnih kompleksa provedena je na temperaturi od 18 °C, metodom difuzije para, tehnikom viseće kapi.

Postavljene su kristalizacije čistog PNP, binarnih kompleksa s fosfatom, FA, TsA i hipoksantinom, te kristalizacije ternarnih kompleksa s fosfatom i FA, fosfatom i TsA, te fosfatom i hipoksantinom. Za kristalizaciju čistog PNP korištena je ishodna otopina proteina (11,0 mg mL⁻¹ u 50 mM Tris-HCl, pH 7,6). Za pripravu binarnih i ternarnih kompleksa PNP, u otopinu proteina dodani su odgovarajući ligandi. Spremnici su sadržavali 700 µL otopine JCSG+ B8, JCSG+ B8 s 20 mM fosfatom, JCSG+ B8 s 0,1 M MgCl₂, JCSG+ B8 bez MgCl₂ ili MIDAS B7. Kristalizacijske kapljice dobivene su miješanjem 1 µL otopine proteina i 1 µL kristalizacijske otopine iz pripadnog spremnika.

Pločasti i igličasti kristali različitih veličina spontano su narasli u mnogim kapljicama unutar tjedan dana. U dijelu preostalih kapljica kristalni rast potaknut je prenošenjem klica kristala iz kapljica u kojima su u prethodnim fazama istraživanja narasli kristali u odgovarajućim uvjetima.



Slika 11. Kristali narasli u kapljicama skupina 2 (a, d), 1 (b, h), 8 (c), 7 (e), 12 (f) i 6 (g).

Prenošenje klica kristala je uglavnom bilo uspješno i kristalni rast je uočen u roku od nekoliko minuta. U pojedinim kapljicama prenošenje klica nije izazvalo trenutnu kristalizaciju, već se ona dogodila kroz period od tjedan dana. Tijekom istraživanja više puta je došlo do otapanja kristala i njihove kristalizacije. Neki od naraslih kristala prikazani su na slici 11.

Po nekoliko kristala iz odabranih skupina (2-4, 6, 8-13, 15 i 17) uronjeno je u otopine odabranih krioprotektanata i zamrznuto u tekućem dušiku. Za određivanje strukture odabranih kristala korištena je metoda difrakcije rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu pri temperaturi od 100 K. Difrakcijski podaci prikupljeni su na sinkrotronu *Elettra* u Trstu ili na rendgenskom difraktometru za monokristalne uzroke *Xcalibur Nova R* na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu.

Difrakcija kristala je većinom bila loša. Najveći broj ispitanih kristala difraktirao je vrlo slabo ili su difrakcijski maksimumi bili loše kvalitete (preklapali su se ili bili razmrljani) i prikupljene podatke nije bilo moguće procesirati. Ipak, u svakoj odabranoj skupini, osim skupine 6, uspješno je pronađen bar jedan kristal zadovoljavajuće difrakcijske sposobnosti.

Rješavanje struktura pokazalo je da je do formiranja i kristalizacije željenih kompleksa došlo samo u skupinama 4, 15 i 17: kompleks proteina s FA uspješno je pripremljen kokristalizacijom uz korištenje kristalizacijske otopine JCSG+ B8, a kompleks proteina s fosfatom, te ternarni kompleks uspješno su pripremljeni kokristalizacijom u uvjetima snižene ionske jakosti (korištena je JCSG+ B8 kristalizacijska otopina bez $MgCl_2$). Ispitani kristali ostalih skupina sadržavali su samo čisti PNP, otvorenih aktivnih mjesta i bez vezanih liganada.

5.2. REZULTATI NAKNADNIH DODATAKA LIGANADA U KRISTALIZACIJSKE KAPLJICE I NAMAKANJA KRISTALA U OTOPINAMA LIGANADA

5.2.1. Rezultati dobivanja binarnih kompleksa PNP s fosfatnim anionima

Za dobivanje kompleksa proteina PNP s fosfatnim anionima, u kapljicu skupine 2, koja je sadržavala prethodno formirane kristale, dodan je Na,K-fosfatni pufer. Došlo je do otapanja prethodno formiranih kristala, te je samo jedan kristal uspješno zamrznut.

Također je nekoliko kristala skupine 1 preneseno u kapljicu 2 mM otopine fosfata u JCSG+ B8, na par sekundi ili do idućeg dana, a pojedini kristali skupine 2 uronjeni su na par sekundi u Na,K-fosfatni pufer. Svi su kristali uronjeni u odabrane otopine krioprotektanata i zamrznuti u tekućem dušiku.

Iako je većina kristala pokazivala vrlo slabu ili nikakvu difrakciju, jedan kristal skupine 1, prenesen u otopinu fosfata u JCSG+ B8 uspješno je snimljen i potvrđeno je da u strukturi nije došlo do vezanja fosfatnih aniona i da su sva aktivna mjesta proteina otvorena.

5.2.2. Rezultati dobivanja binarnih kompleksa PNP s FA

U pojedine kapljice skupina 1, 2, 4, 6 i 13 dodana je otopina FA u metanolu. U pojedine kapljice skupina 14 i 15 dodana je otopina FA u JCSG+ B8 bez $MgCl_2$. Pojedini kristali iz skupina 1, 4 i 6 uronjeni su u otopinu FA u metanolu na razdoblje od par sekundi. Prilikom smrzavanja kristala koji su došli u dodir s otopinom FA u metanolu nije korišten dodatni krioprotektant, dok su prije smrzavanja kristali u dodiru s FA otopljenim u JCSG+ B8 bez $MgCl_2$ uronjeni u krioprotekcijske otopine KRIO2 (za kristale skupine 15) i KRIO3 (za kristale skupine 14).

Većina kristala je, kao i u prethodnim eksperimentima, pokazivala vrlo slabu ili nikakvu difrakciju. Međutim, nekoliko kristala je uspješno snimljeno i potvrđen je nastanak binarnog kompleksa proteina s FA u jednom od kristala iz kapljice skupine 6 u koju je naknadno dodana otopina FA u metanolu. Također je potvrđen nastanak ternarnog kompleksa u jednom kristalu iz kapljice skupine 15 u koju je dodana otopina FA u JCSG+ B8 bez $MgCl_2$.

5.2.3. Rezultati dobivanja binarnih kompleksa PNP s TsA

U jednu kapljicu skupine 8 dodana je otopina TsA u etanolu. Kristali su prikupljeni nakon par minuta ili idućeg dana i smrznuti u tekućem dušiku. Niti jedan od prikupljenih kristala nije pokazivao zadovoljavajuću difrakciju.

5.3. ODREĐENE KRISTALNE STRUKTURE

Uspješno su riješene struktura kompleksa PNP s FA (dva kristala), struktura kompleksa PNP s fosfatnim anionima (jedan kristal) i struktura ternarnog kompleksa PNP s FA i fosfatnim anionima (dva kristala), tablica 4. Strukture označene zvjezdicom detaljno su opisane u daljnjem tekstu.

Tablica 4. Riješene strukture uspješno pripremljenih kompleksa PNP s ligandima. Strukture označene zvjezdicom detaljno su opisane u daljnjem tekstu.

KOMPLEKS	SKUPINA
PNP + FA	4 kokristalizacija PNP i FA kristalizacijska otopina: JCSG+ B8 (*)
	6 kristalizacija PNP s fosfatom i FA kristalizacijska otopina: JCSG+ B8 u kapljicu s postojećim kristalima naknadno je dodana otopina FA u metanolu
PNP + fosfat	15 kokristalizacija PNP i fosfata kristalizacijska otopina: JCSG+ B8 bez MgCl ₂ (*)
PNP + FA +fosfat	17 kokristalizacija PNP s FA i fosfatom kristalizacijska otopina: JCSG+ B8 bez MgCl ₂
	15 kristalizacija PNP s fosfatom kristalizacijska otopina: JCSG+ B8 bez MgCl ₂ u kapljicu je dodana otopina FA u JCSG+ B8 bez MgCl ₂ (*)

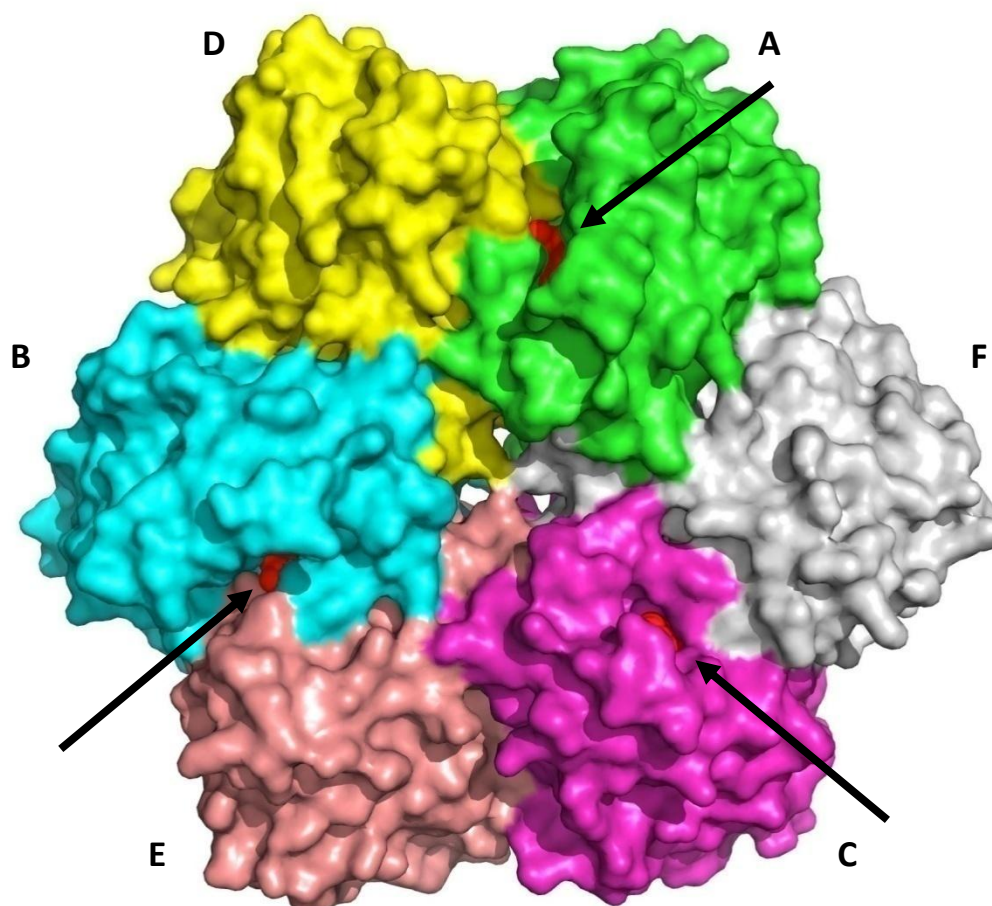
Za odabrane strukture, podaci o provedenim rendgenskim strukturnim analizama i utočnjavanju struktura nalaze se u tablici 5.

Tablica 5. Osnovni kristalografski podaci. U zagradama se nalaze podaci za ljusku najvećeg razlučivanja.

		Kompleks proteina s fosfatom	Kompleks proteina s FA	Kompleks proteina s fosfatom i FA
Valna duljina rendgenskog zračenja / Å		1,00	1,00	1,00
Rezolucija / Å		49,00 - 1,73 (1,79 - 1,73)	46,11 - 2,10 (2,18 - 2,10)	42,95 - 1,69 (1,76 - 1,69)
Kristalni sustav		rompski	rompski	rompski
Prostorna grupa		$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Parametri jedinične ćelije:	$a / \text{Å}$	59,52	63,09	59,89
	$b / \text{Å}$	86,31	84,85	85,90
	$c / \text{Å}$	268,45	274,63	269,31
	$\alpha / ^\circ$	90	90	90
	$\beta / ^\circ$	90	90	90
	$\gamma / ^\circ$	90	90	90
Ukupni broj refleksa		1 462 794 (156 510)	355852 (35 603)	604 409 (47 004)
Broj jedinstvenih refleksa		133 010 (12 916)	86 743 (8504)	153 656 (14 413)
Multiplicitet		11,0 (11,9)	4,1 (4,2)	3,9 (3,3)
Potpunost (%)		0,87 (0,92)	0,99 (0,99)	0,99 (0,94)
Srednji I/σ (I)		28,88 (3,86)	4,54 (0,48)	13,00 (1,76)
Wilsonov B-faktor		13,25	41,74	17,26
R_{merge}		0,64 (1,00)	0,18 (2,10)	0,08 (0,59)
R_{meas}		0,67 (1,04)	0,21 (2,40)	0,10 (0,70)
Broj refleksa korištenih prilikom utočnjavanja		126 742 (12 916)	86 496 (8504)	153 104 (14 413)
Broj refleksa korištenih za izračun R-free faktora		6216 (647)	4299 (423)	7640 (712)
R_{work}		0,18 (0,21)	0,24 (0,40)	0,20 (0,28)
R_{free}		0,23 (0,26)	0,27 (0,41)	0,24 (0,30)
Broj nevodikovih atoma		12 292	11 373	11 960
Standardna devijacija (RMS) veza		0,028	0,014	0,035
Standardna devijacija (RMS) kuteva		1,77	1,79	250
Favorizirano prema Ramachandranu (%)		97	98	96
Dozvoljeno prema Ramachandranu (%)		3,2	1,6	3,4
Izvan granica prema Ramachandranu (%)		0,14	0	0,72

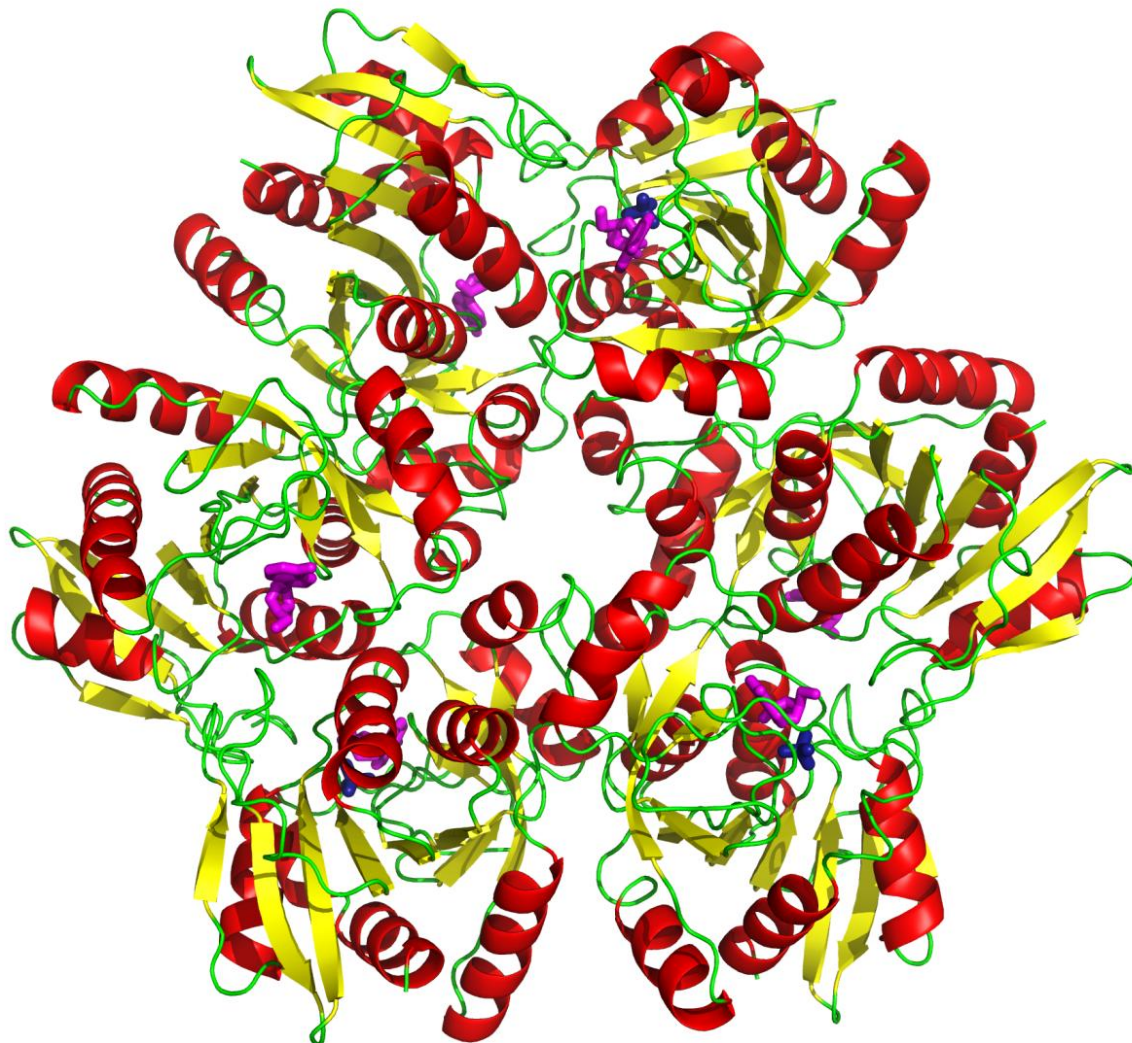
Prostorne, kao i sekundarne strukture sva tri kompleksa vrlo su slične (razlikuju se samo položaji H8 zavojnica u svakoj od podjedinica proteina, ovisno o tome nalazi li se podjedinica u predominantno otvorenoj ili zatvorenoj konformaciji).

Prostorna struktura (na primjeru ternarnog kompleksa PNP s FA i fosfatima) prikazana je na slici 12. Šest podjedinica proteina raspoređeno je u dimere A-D, B-E i C-F. Svaki dimer sadrži dva aktivna mjesta, po jedno s gornje i donje strane proteina. Na slici 12, u aktivnim mjestima podjedinica A, B i C, koja su vidljiva s gornje strane proteina, naziru se vezane molekule FA. Aktivna mjesta podjedinica D (žuto), E (ružičasto) i F (sivo) okrenuta su na drugu stranu proteina i nisu vidljiva u ovom prikazu.



Slika 12. Prostorna struktura ternarnog kompleksa PNP s FA i fosfatima. Svaka od šest podjedinica označena je različitom bojom. U aktivnim mjestima podjedinica A, B i C, koja su vidljiva s gornje strane proteina, naziru se vezane molekule FA (crveno, označeno strelicama).

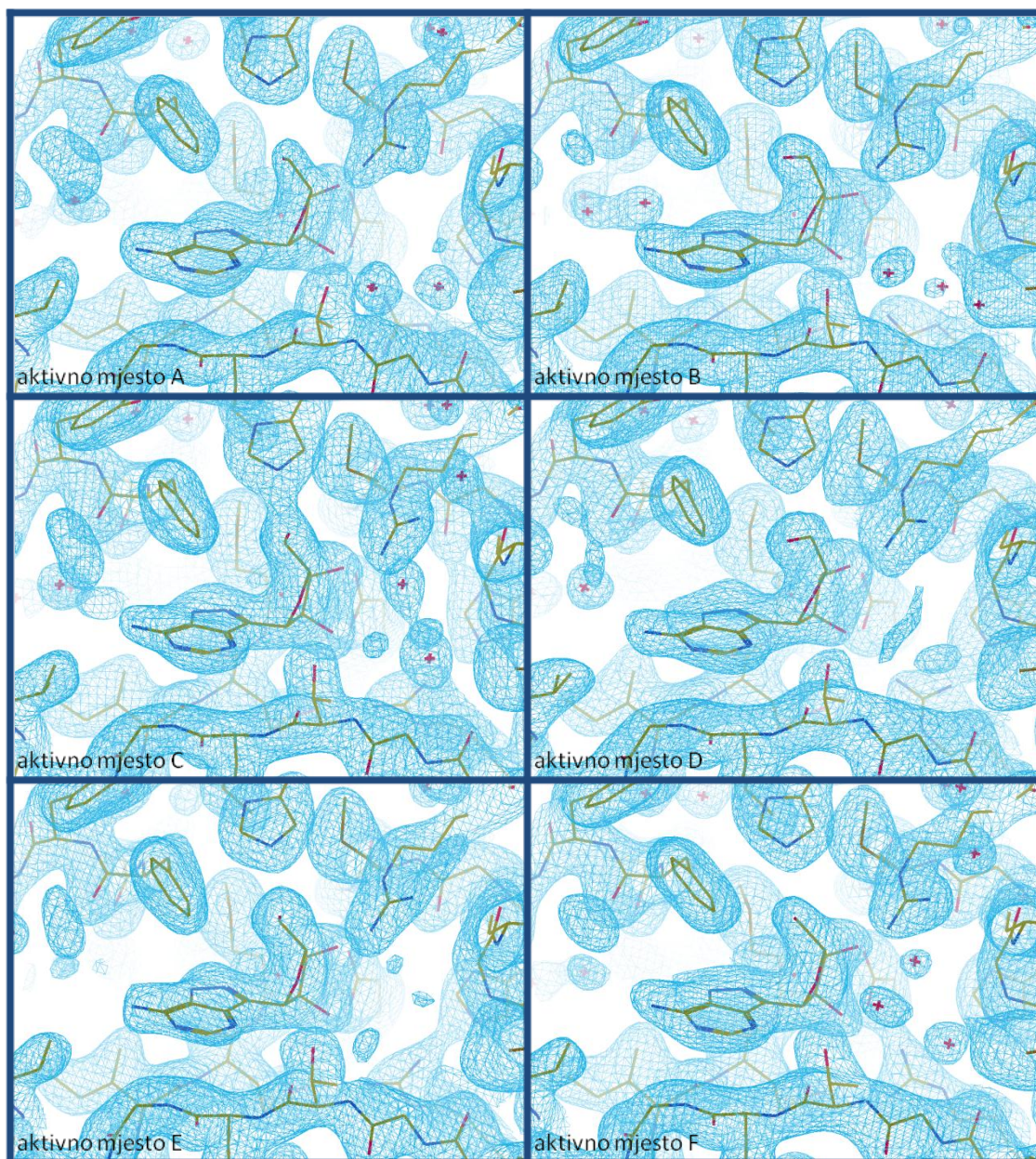
Sekundarna struktura (također na primjeru ternarnog kompleksa PNP s FA i fosfatima) prikazana je na slici 13. U strukturi svake podjedinice nalazi se osam α -zavojnica i devet β -lanaca, koji sudjeluju u stvaranju jedne β -ploče i jedne β -bačve.



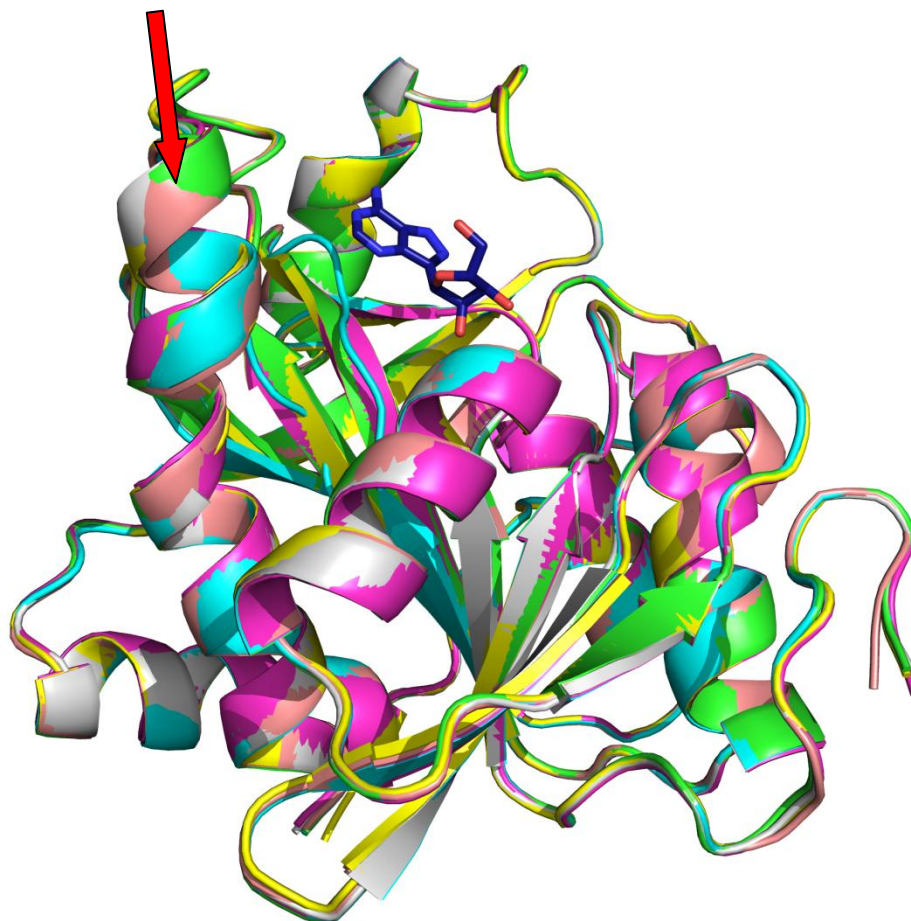
Slika 13. Sekundarna struktura ternarnog kompleksa PNP s FA i fosfatima. α -zavojnice obojene su crveno, β -lanci žuto, a petlje zeleno. Fosfatni anioni i molekule FA u aktivnim mjestima prikazani su plavo, odnosno ljubičasto.

5.3.1. Struktura binarnog kompleksa PNP s FA

U binarnom kompleksu PNP s FA po jedna molekula FA vezana je u svako od šest aktivnih mjesta (slika 14). Položaji zavojnica H8, odgovornih za zatvaranje aktivnih mjesta, ukazuju da se podjedinice nalaze u predominantno otvorenoj konformaciji (slika 15).

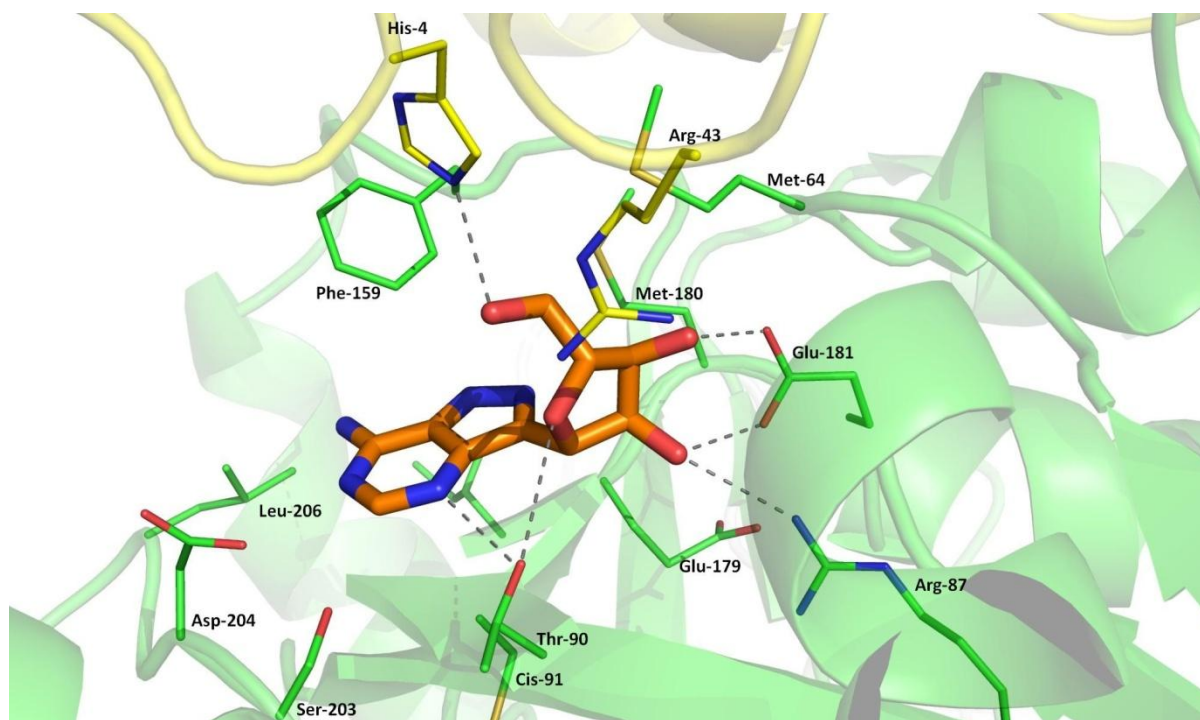


Slika 14. U svakom od šest aktivnih mjesta u binarnom kompleksu PNP s FA vezana je po jedna molekula FA.



Slika 15. Preklopljene strukture svih šest podjedinica. Položaj zavojnica H8, odgovornih za zatvaranje aktivnih mjesta (označene crvenom strelicom) ukazuje da se sve podjedinice nalaze u predominantno otvorenoj konformaciji. Prikazana je i molekula FA u odgovarajućem veznom mjestu.

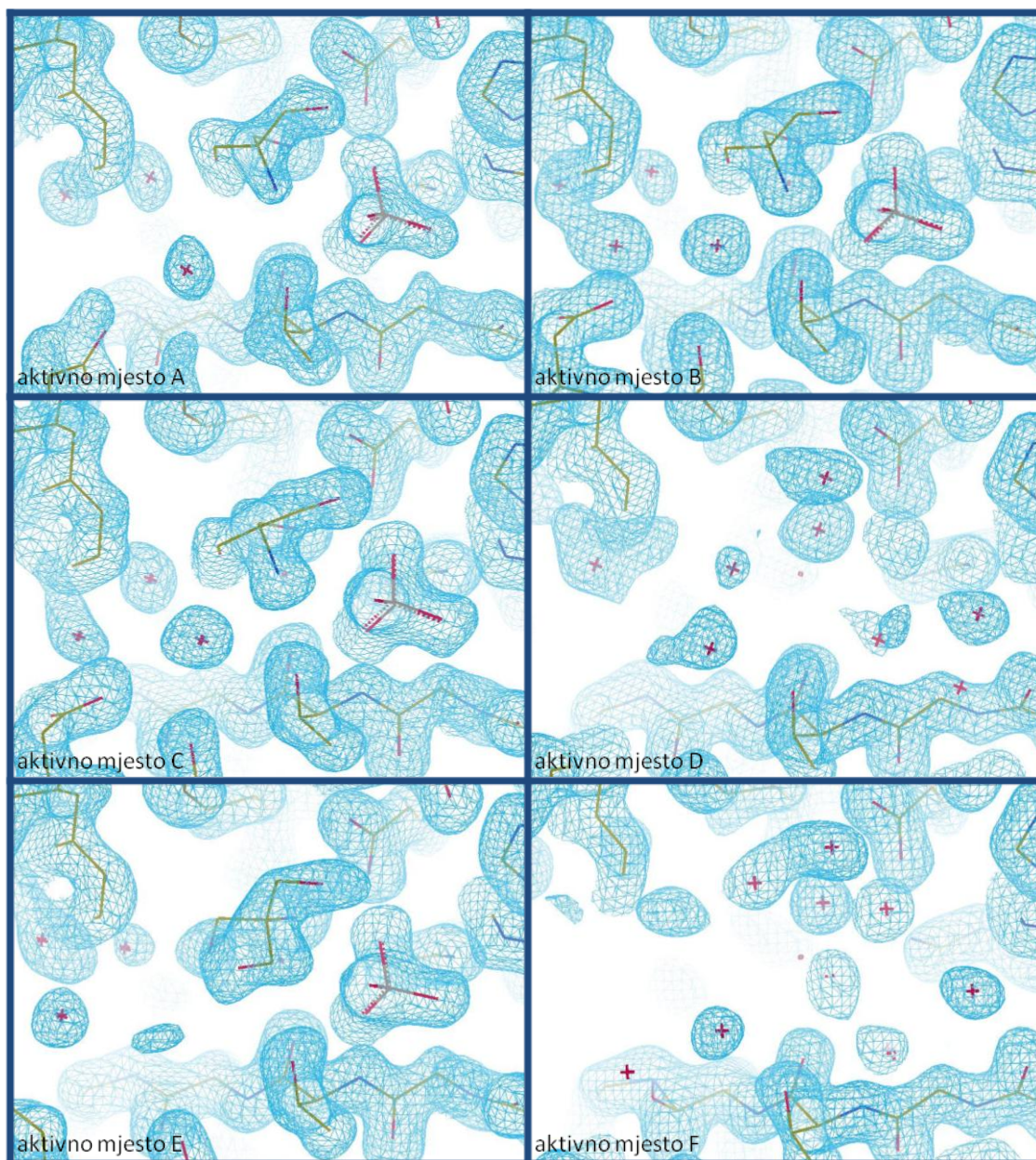
Na slici 16 prikazano je vezanje FA u aktivno mjesto proteina, kao i najvažnije vodikove veze koje molekula FA ostvaruje s aminokiselinama PNP. Popis svih vodikovih veza uočenih između molekula FA u heksameru i proteina nalazi se u Dodatku.



Slika 16. Vežanje FA u aktivno mjesto PNP. Posebno su istaknute važnije aminokiseline u blizini FA (udaljene od njega 4 Å ili manje). Dvije aminokiseline (His4 i Arg43) koje grade aktivno mjesto pripadaju susjednoj podjedinici (žuto). Sivim linijama istaknute su najvažnije vodikove veze ostvarene između molekule FA i aminokiselina PNP.

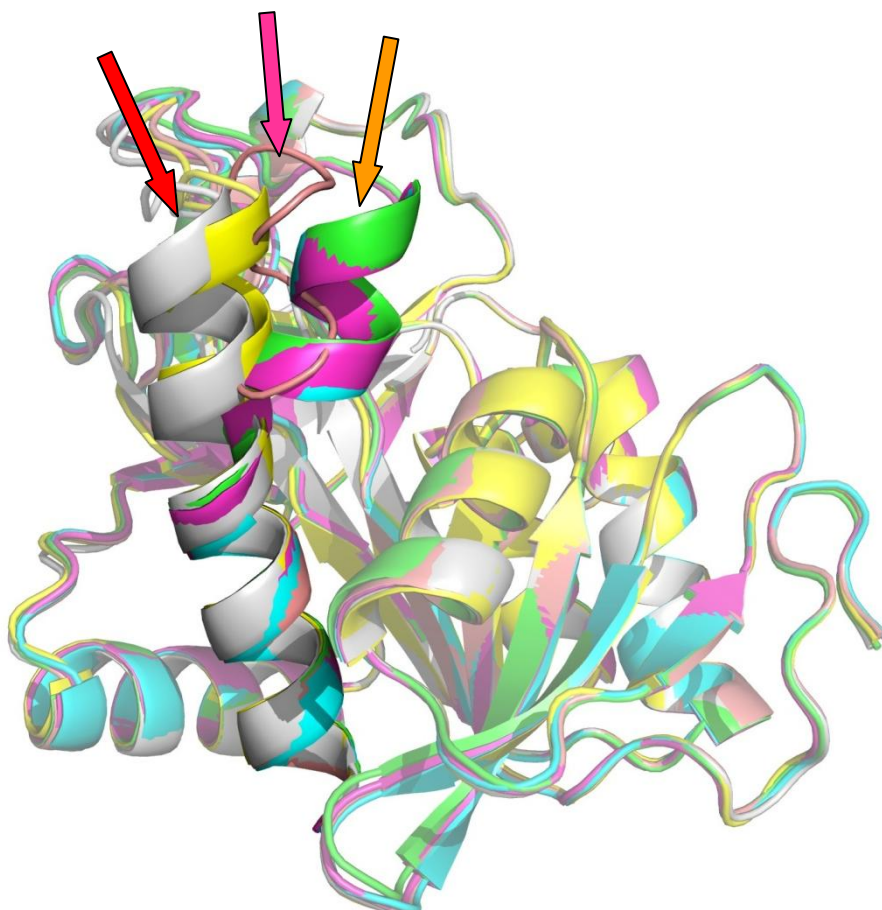
5.3.2. Struktura binarnog kompleksa PNP s fosfatnim anionima

U binarnom kompleksu PNP s fosfatnim anionima, fosfatni anioni prisutni su u četiri aktivna mjesta (A, B, C i E). Također se uz svaki fosfatni anion u aktivnom mjestu nalazi i po jedna molekula Tris-a. Aktivna mjesta prikazana su na slici 17.



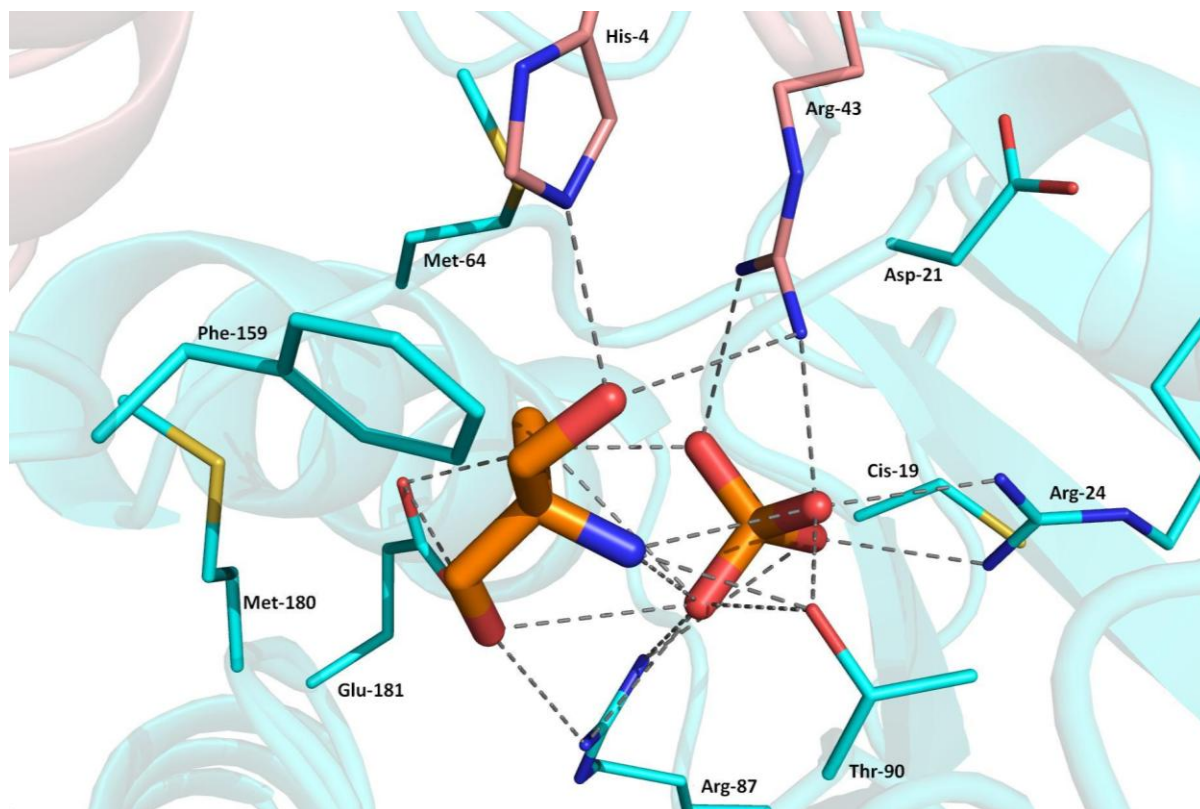
Slika 17. Aktivna mjesta u binarnom kompleksu PNP s fosfatnim anionima.

Prema položaju zavojnica H8, podjedinice A, B i C nalaze se u zatvorenoj konformaciji, a D i F u predominantno otvorenoj. U podjedinici E aktivno mjesto je napola zatvoreno: H8 zavojnica je pomaknuta iz otvorenog položaja prema zatvorenom, međutim pomak nije ostvaren u potpunosti (slika 18).



Slika 18. Preklopljene strukture šest svih podjedinica. Prema položaju zavojnica H8, podjedinice A (zeleno), B (plavo) i C (ljubičasto) su u zatvorenoj konformaciji (označeno narančastom strelicom). Podjedinice D (žuto) i F (sivo) su u otvorenoj konformaciji (označeno crvenom strelicom). Podjedinica E (ružičasto) pomaknuta je iz položaja otvorene konformacije, ali pomak nije ostvaren do položaja zatvorene konformacije (označeno ružičastom strelicom).

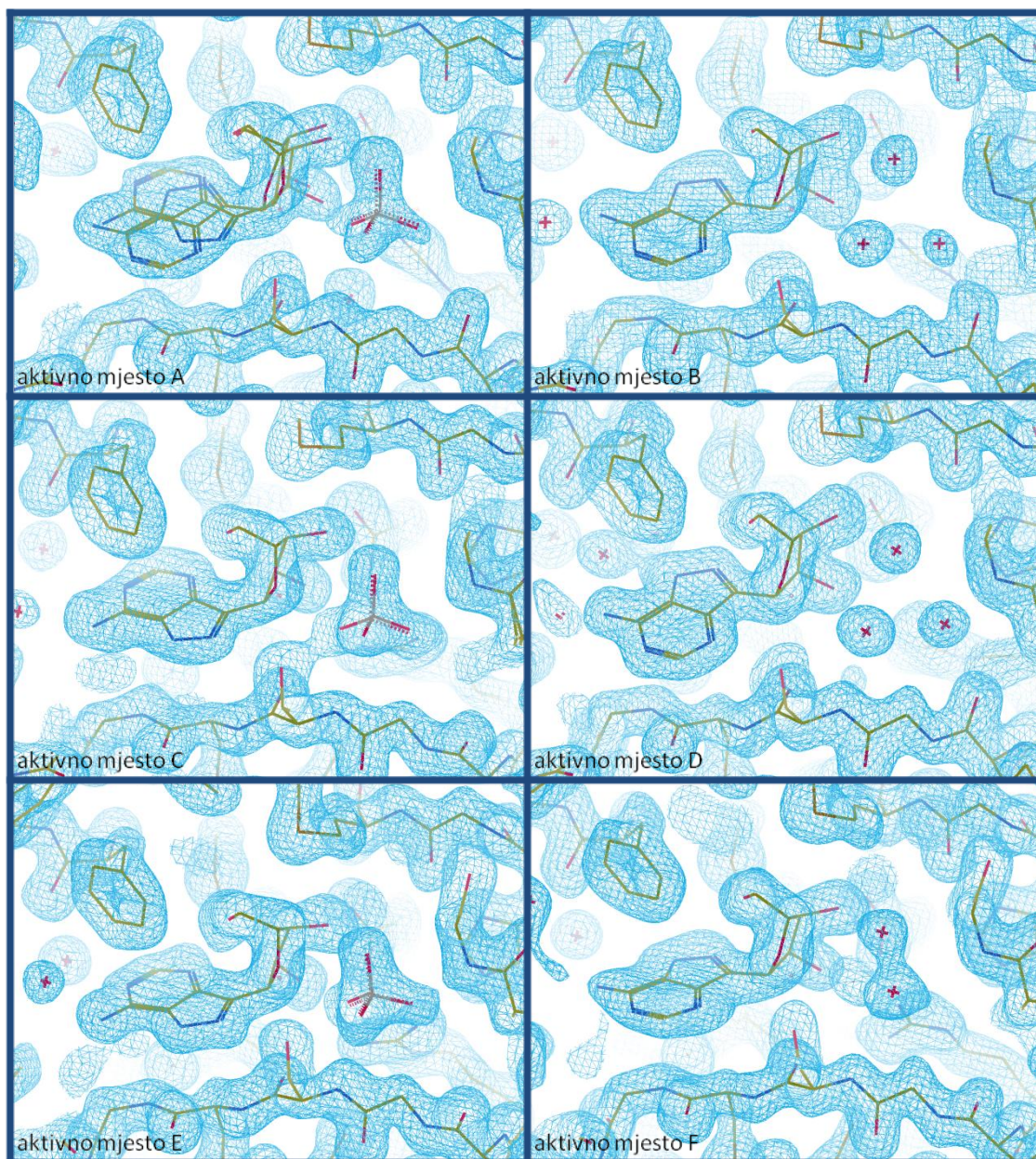
Vežanje fosfatnog aniona u aktivno mjesto PNP prikazano je na slici 19. Popis svih vodikovih veza uočenih između liganada i proteina nalazi se u Dodatku.



Slika 19. Vežanje fosfatnog aniona i molekule Tris-a u aktivno mjesto PNP. Posebno su istaknute važnije aminokiseline, udaljene 4 Å ili manje od liganada. Dvije aminokiseline (His4 i Arg43) koje grade aktivno mjesto pripadaju susjednoj podjedinici (ružičasto). Sivim linijama istaknute su neke od vodikovih veza koje ligandi mogu ostvarivati s aminokiselinama proteina.

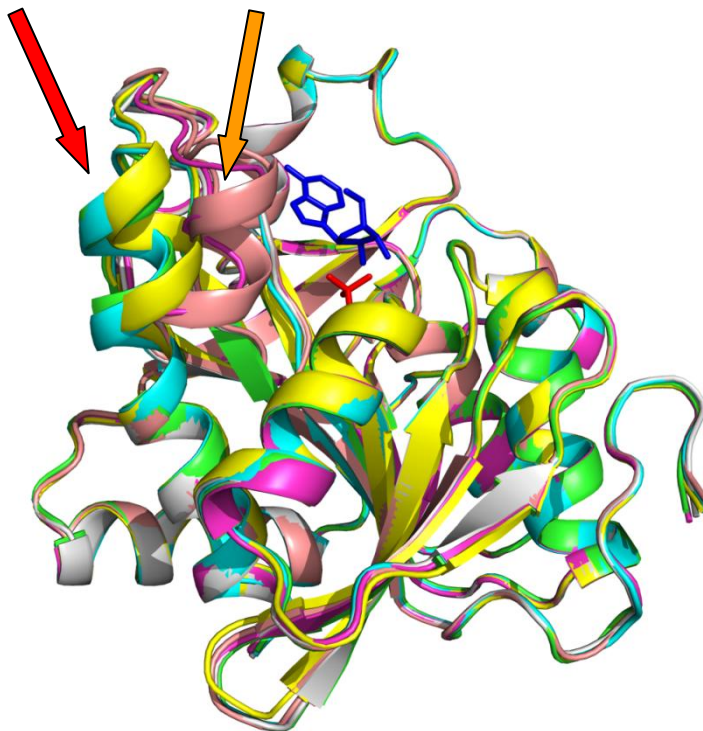
5.3.3. Struktura ternarnog kompleksa PNP s fosfatnim anionima i FA

U ternarnom kompleksu PNP s FA i fosfatnim anionima po jedna molekula FA vezana je u svako od šest aktivnih mjesta. Fosfatni anioni vezani su u tri od šest aktivnih mjesta (A, C i E). Aktivna mjesta prikazana su na slici 20.



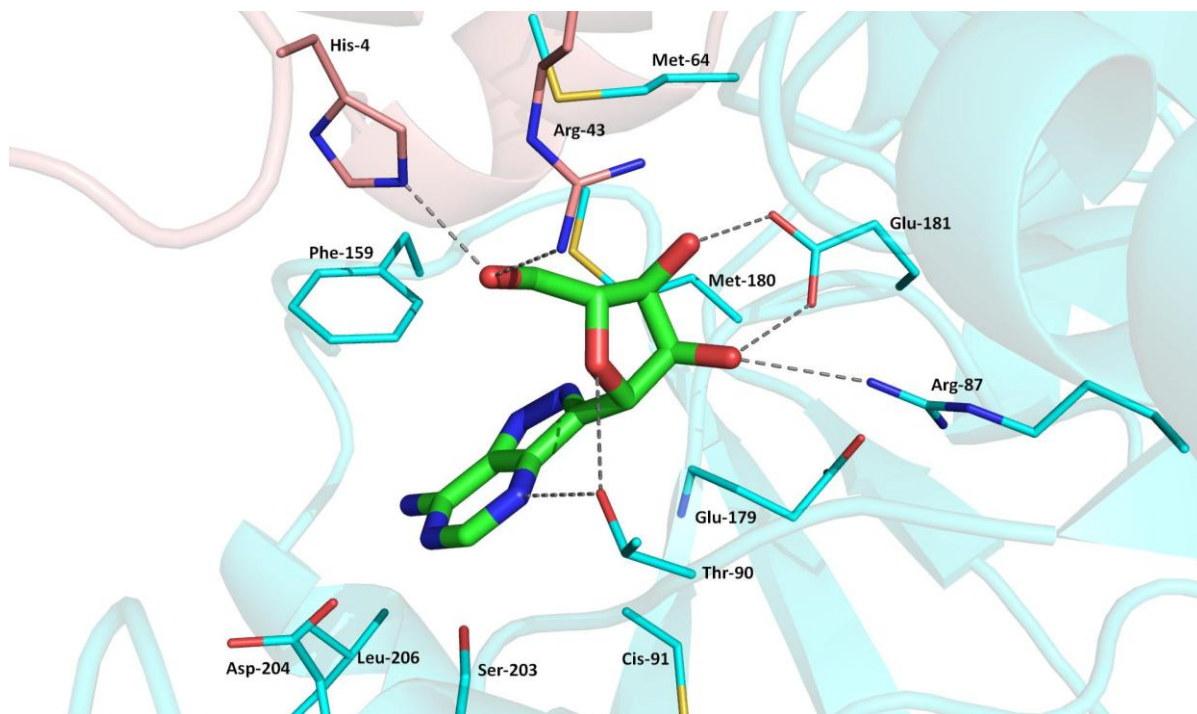
Slika 20. Aktivna mjesta u ternarnom kompleksu PNP s fosfatnim anionima i FA.

U strukturi su tri aktivna mjesta u predominantno otvorenoj konformaciji (A, B i D), a dva u predominantno zatvorenoj konformaciji (C i E), prikazano na slici 21. Za podjedinicu F ne može se odrediti nalazi li se ona predominantno u otvorenoj ili zatvorenoj konformaciji.

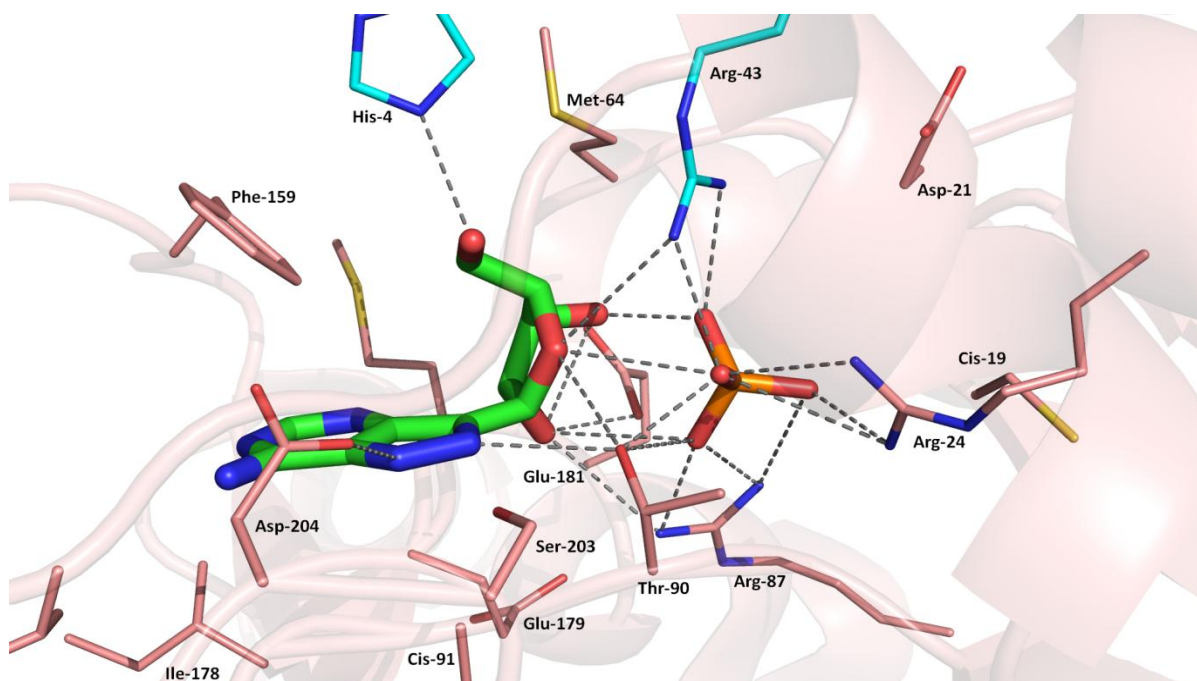


Slika 21. Preklopljene strukture svih podjedinica. Prema položaju zavojnica H8, podjedinice A (zeleno), B (plavo) i D (žuto) su u otvorenoj konformaciji (označeno crvenom strelicom). Podjedinice C (ljubičasto) i E (ružičasto) su u zatvorenoj konformaciji (označeno narančastom strelicom). Za podjedinicu F ne može se odrediti nalazi li se ona predominantno u otvorenoj ili zatvorenoj konformaciji, stoga su aminokiseline 211-219 podjedinice F izostavljene u prikazu.

Struktura aktivnog mjesta koje sadrži samo molekule FA prikazana je na slici 22. Struktura aktivnog mjesta koje sadrži oba liganda prikazana je na slici 23. Na slikama su prikazane i neke od vodikovih veza koje ligandi mogu ostvarivati s aminokiselinama proteina. Popis svih ostvarenih vodikovih veza između proteina i liganada nalazi se u Dodatku.



Slika 22. Aktivno mjesto ternarnog kompleksa PNP s FA i fosfatnim anionima koje sadrži samo FA. Posebno su istaknute važnije aminokiseline, od FA udaljene 4 Å ili manje. Dvije aminokiseline (His 4 i Arg43) koje grade aktivno mjesto pripadaju susjednoj podjedinici (ružičasto). Sivim linijama istaknute su najvažnije vodikove veze ostvarene između molekule FA i aminokiselina PNP.



Slika 23. Aktivno mjesto ternarnog kompleksa PNP s FA i fosfatnim anionima koje sadrži oba liganda. Posebno su istaknute važnije aminokiseline, od liganada udaljene 4 Å ili manje. Dvije aminokiseline (His4 i Arg43) koje grade aktivno mjesto pripadaju susjednoj podjedinici (plavo). Sivim linijama istaknute su neke od vodikovih veza koje ligandi mogu ostvarivati s aminokiselinama proteina.

6. Rasprava

6.1. KRISTALIZACIJA ISPITIVANIH KOMPLEKSA

Kokristalizacijski eksperimenti provedeni su s ciljem pripreme binarnih kompleksa PNP s fosfatnim anionima, FA, TsA i hipoksantinom, te ternarnih kompleksa PNP s fosfatnim anionima i navedenim ligandima. U prvoj fazi eksperimenta (kokristalizacije kompleksa PNP u JCSG+ B8 uvjetima ili JCSG+ B8 uvjetima s fosfatnim anionima koncentracije 20 mM) uspješno je nastao samo binarni kompleks PNP s FA, dok su ostali kristali umjesto očekivanih kompleksa sadržavali samo čisti protein.

Binarni kompleks PNP s FA također je uspješno dokazan u kristalu iz kapljice skupine 6 (kristalizacija ternarnog kompleksa proteina s fosfatom i FA u JCSG+ B8 uvjetima), u koju je naknadno dodana otopina FA u metanolu. Kapljica je prije dodatka metanolne otopine već sadržavala kristale, međutim, difrakcija kristala ispitanih prije dodatka bila je loša, te se ne može potvrditi potječe li FA prisutan u strukturi iz kokristalizacijskog eksperimenta ili je u strukturu prethodno formiranog kristala ušao naknadno - dodatkom metanolne otopine FA.

S obzirom na rezultate koji nisu ukazivali na uspješno vezanje TsA i hipoksantina u aktivna mjesta proteina, TsA i hipoksantin nisu uvršteni u iduće faze istraživanja, te je naglasak stavljen na pripremu binarnih kompleksa PNP s fosfatnim anionima, te ternarnog kompleksa s fosfatnim anionima i FA.

U prvoj fazi eksperimenata nije uspješno pripremljen niti jedan kompleks koji bi sadržavao fosfatne anione, prirodne supstrate PNP. Paralelnim istraživanjima uočeno je da bi visoka ionska jakost ili velika koncentracija fosfatnih aniona u kristalizacijskoj otopini mogle nepovoljno utjecati na vezanje fosfatnih aniona u aktivno mjesto proteina (neobjavljeni podaci), čime bi se mogao objasniti izostanak fosfatnih aniona tamo gdje bi bilo logično očekivati ih. Iduća faza eksperimenta stoga je bazirana na pripremi binarnog kompleksa PNP s fosfatom, te ternarnog kompleksa PNP s fosfatom i FA kokristalizacijom u uvjetima snižene ionske jakosti. Oba željena kompleksa uspješno su kristalizirala u JCSG+ B8 uvjetima koji nisu sadržavali $MgCl_2$. Kristalizacija kompleksa proteina s fosfatom u JCSG+ B8 uvjetima koji su sadržavali 0,1 M $MgCl_2$ (koncentracija magnezijevog klorida upola manja

nego u originalnim JCSG+ B8 uvjetima) i MIDAS B7 uvjetima nije dala željene rezultate: nastali kristali sadržavali su samo čisti protein.

Ternarni kompleks proteina s FA i fosfatom potvrđen je i u jednom kristalu skupine 15 (kristalizacija kompleksa proteina s fosfatom u JCSG+ B8 uvjetima bez $MgCl_2$), iz kapljice u koju je naknadno dodana otopina FA u JCSG+ B8 uvjetima bez $MgCl_2$. Navedeni kristal narastao je nakon dodatka otopine FA u kapljicu, stoga je do formiranja ternarnog kompleksa vjerojatno došlo prije kristalizacije.

Za razliku od čistog PNP iz bakterije *H. pylori*, koji u uvjetima koji su korišteni i u ovom istraživanju, kristalizira u prostornoj grupi $P2_1$ (monoklinski sustav), sva tri pripremljena kompleksa kristalizirala su u prostornoj grupi $P2_12_12_1$ (rompski sustav). Čini se da je ova promjena uzrokovana vezanjem liganada. I čisti protein i kompleksi u ovom istraživanju sadrže u pravilu jedan heksamer u asimetričnoj jedinici, uz iznimku kristala skupine 13, koji u asimetričnoj jedinici sadrže dva heksamera. Dobiveni kompleksi se strukturno ne razlikuju značajno od čistog proteina, osim u području u kojem se nalaze aminokiseline 208-221 i koje je odgovorno za zatvaranje aktivnog mjesta.

6.2. VEZANJE LIGANADA U AKTIVNA MJESTA PROTEINA

Iako je u početku istraživanja predviđena kristalizacija više kompleksa PNP s različitim ligandima - od čega su uspješno pripremljena i analizirana tri spomenuta kompleksa, dobiveni rezultati i dalje pružaju zaokružen uvid u vezanje supstrata u aktivno mjesto PNP iz bakterije *H. pylori*. Naime, fosfat je prvi prirodni supstrat navedenog enzima, a umjesto purinskog nukleozida, drugog prirodnog supstrata, kao drugi ligand korišten je FA, strukturni analog adenzina kojeg enzim ne može cijepati. Vezanje liganada u aktivna mjesta enzima vidljivo je na slikama 16, 19, 22 i 23, kao i neke od vodikovih veza koje ligandi mogu ostvarivati s aminokiselinama u aktivnom mjestu proteina. Numeracija atoma u molekuli FA prikazana je na slici 1. Kao i kod PNP iz bakterije *E. coli*, fosfat se veže dublje prema centru proteina, dok se nukleozid veže bliže površini.

6.2.1. Vezanje formicina A u aktivno mjesto proteina

U strukturi binarnog kompleksa s FA, kao i u strukturi ternarnog kompleksa s FA i fosfatnim anionima, po jedna molekula FA vezana je u svako aktivno mjesto proteina. U otvorenim aktivnim mjestima oba navedena kompleksa, ukoliko ta aktivna mjesta ne sadrže druge ligande (slike 16 i 22), riboza iz molekule FA stupa u interakcije s proteinom preko vodikovih veza između 5'-OH skupine i N^ε u His4 iz susjednog monomera, 4' kisika i O^γ u Thr90, kao i preko vodikovih veza 2'-OH skupine s N^η u Arg87 i s O^ε u Glu181 (uz izuzetak podjedinice E u slučaju binarnog i podjedinice D u slučaju ternarnog kompleksa, u kojima veza između 2'-OH skupine i Arg87 nije uočena). Umjesto 2'-OH skupine, veza s Glu181 može se ostvarivati i preko 3'-OH skupine.

Purinski dio molekule FA povezuje se s proteinom vodikovom vezom između N3 dušika i O^γ u Thr90. U dva aktivna mjesta uočena je vodikova veza između N1 i O^δ u Asp204. U aktivnom mjestu F ternarnog kompleksa nije uočena vodikova veza s N3 dušikom, no postoji dodatna veza između 2'-OH skupine riboze i dušika koji ostvaruje peptidnu vezu u Met180.

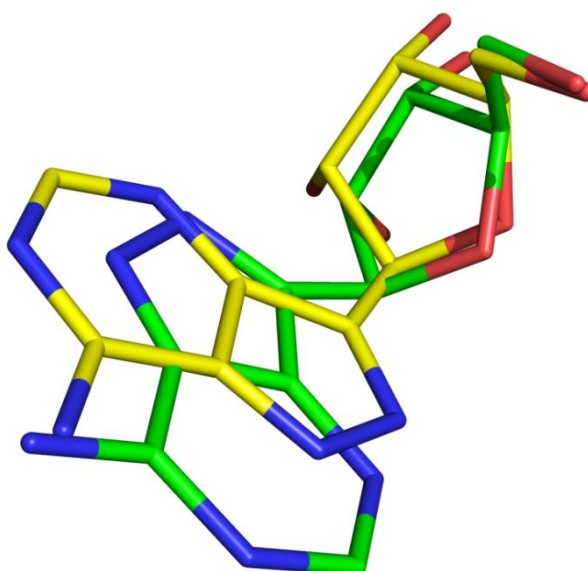
U zatvorenim aktivnim mjestima, koja osim molekula FA sadrže i vezane fosfatne anione, molekula FA nalazi se u drugačijoj konformaciji (slike 23 i 24): purinski dio molekule

zarotiran je za približno 180° oko glikozidne veze. Ova konformacija se od prethodne razlikuje u određenim vodikovim vezama ostvarenim između purinskog dijela molekule FA i aminokiselina u aktivnom mjestu: umjesto dušika N3, vodikovu vezu s O^{ν} iz Thr90 ostvaruje N8, a u jednom aktivnom mjestu javlja se i nova vodikova veza: između N7 i O^{δ} iz Asp204 (slika 23). U jednom zatvorenom aktivnom mjestu također je uočena veza između N8 i N^{η} iz Arg217. Zakretanje purinskog dijela molekule uzrokuje i malu promjenu u položaju riboze, no ona ne utječe znatno na vodikove veze koje riboza ostvaruje s proteinom (uočene su samo dodatne vodikove veze između 2'-OH skupine i dušika iz Met180). Purinski nukleozidi, prirodni supstrati PNP, na položaju 8 imaju atom ugljika, stoga kod njih vodikova veza između N8 atoma i Thr90 ne može nastati.

Prema trenutno pretpostavljenom mehanizmu, ostvarivanje vodikove veze između atoma dušika N7 i Asp204 ključno je za katalitički mehanizam jer dovodi do prijenosa protona s Asp204 na purinski prsten i nastanka prijelaznog stanja u obliku ribooksokarbenijevog iona. Konformacija koju molekula FA zauzima u zatvorenim aktivnim mjestima stoga bi mogla biti u skladu s pretpostavljenim mehanizmom.

Konformacija molekula FA pronađena u zatvorenim aktivnim mjestima u kojima su vezani i fosfatni anioni uočena je i u prijašnjim istraživanjima analognih kompleksa PNP iz bakterije *E. coli*, te je navedena konformacija nazvana standardnom. Konformacija molekula FA pronađena u otvorenim aktivnim mjestima koja ne sadrže druge ligande do sada nije uočena u navedenim istraživanjima, te je nazvana nestandardnom.

Slika 24. Molekula FA u otvorenim aktivnim mjestima u kojima nema drugih liganada poprima konformaciju označenu zelenom bojom (nestandardna konformacija), a u zatvorenim aktivnim mjestima u kojima su vezani i fosfatni anioni poprima konformaciju označenu žutom bojom (standardna konformacija).



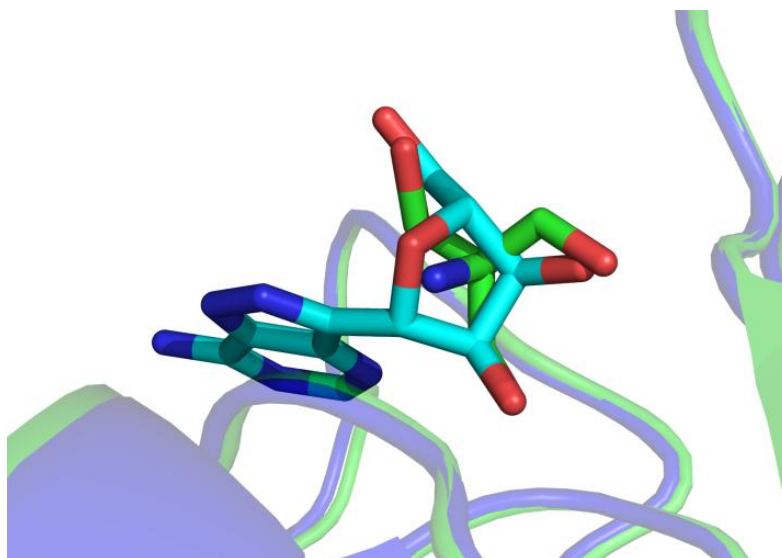
6.2.2. Vežanje fosfata u aktivno mjesto proteina

U strukturi binarnog kompleksa proteina s fosfatnim anionima, fosfat je vezan u četiri od šest aktivnih mjesta (A, B, C i E). U svakom aktivnom mjestu koje sadrži fosfatni anion nalazi se i molekula Tris-a, na položaju u kojem se obično veže riboza nukleozida. U aktivnim mjestima koja ne sadrže fosfatne anione Tris nije uočen. U ternarnom kompleksu fosfatni anioni se nalaze uz formicin A u tri aktivna mjesta (A, C i E).

U binarnom kompleksu PNP s fosfatnim anionima (slika 19), uočene su vodikove veze kisikovih atoma iz fosfatnih aniona s dušikom uključenim u stvaranje peptidne veze iz Gly20, s Nⁿ iz Arg24, Arg43 iz susjednog monomera i Arg87, te s Thr90 preko O^y ili preko O ili N koji su uključeni u stvaranje peptidne veze. Međutim, navedene vodikove veze nisu zajedničke svim fosfatnim anionima u strukturi, te svaki fosfatni anion ostvaruje samo neke od njih. Svaki fosfatni anion ostvaruje i vodikove veze s atomima kisika i dušika u molekuli Tris-a koja se u strukturi nalazi uz njega, na mjestu predviđenom za vežanje nukleozida.

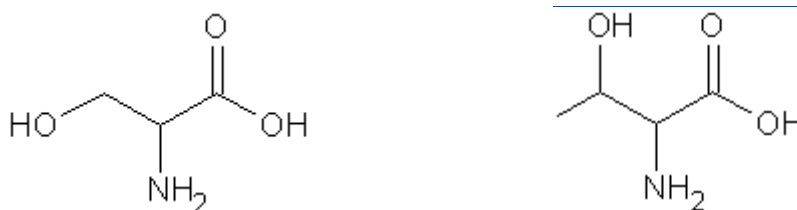
Amino i hidroksilne skupine molekule Tris-a usmjerene su u aktivnom mjestu kao hidroksilne skupine i 4'-kisik riboze (slika 25). Molekula Tris-a s proteinom je povezana vodikovim vezama prema atomima kisika iz Thr90 (prema O^y ili O iz peptidne veze) i O^e iz Glu181, te prema atomu dušika koji sudjeluje u stvaranju peptidne veze iz Met180, Nⁿ iz Arg87 i N^e iz His4 koji pripada susjednom monomeru (slika 19). Svojim položajem i ostvarivanjem veza prema Arg87, Thr90, Glu181 i His4, molekula Tris-a imitira vežanje riboze.

Slika 25. Preklopljene molekule FA i Tris-a. Amino i hidroksilne skupine molekule Tris-a usmjerene su u aktivnom mjestu kao hidroksilne skupine i 4'-kisik riboze.



U aktivnim mjestima ternarnog kompleksa koja sadrže oba liganda (slika 23), fosfat ostvaruje jednake vodikove veze s proteinom kao i u binarnom kompleksu, uz izuzetak vodikove veze prema Arg24, koja je uočena u binarnom, ali ne i u ternarnom kompleksu. Vodikova veza između fosfata i FA ostvaruje se preko O2' ili O4' atoma molekule FA.

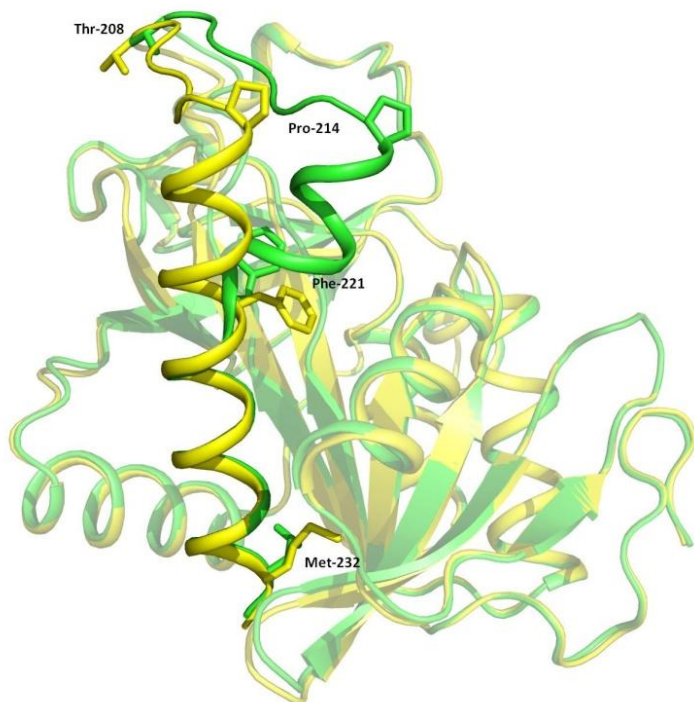
Zanimljiva je usporedba vodikovih veza koje ligandi ostvaruju u aktivnim mjestima PNP iz bakterije *H. pylori* s onima koje ligandi ostvaruju u aktivnim mjestima PNP iz bakterije *E. coli*. Naime, u oba slučaja ostvaruju se iste vodikove veze, uz razliku da se na položaju 90 umjesto treonina prisutnog kod PNP iz bakterije *H. pylori*, u PNP iz bakterije *E. coli* nalazi serin, aminokiselina vrlo slične strukture (slika 26), koja kao i treonin sadrži polarni nenabijeni bočni lanac. Također kod PNP iz bakterije *E. coli* do nastanka vodikovih veza između fosfata i FA osim preko 2'-OH skupine i O'4 kisika dolazi i preko 3'-OH skupine.



Slika 26. Strukture serina (lijevo) i treonina (desno).

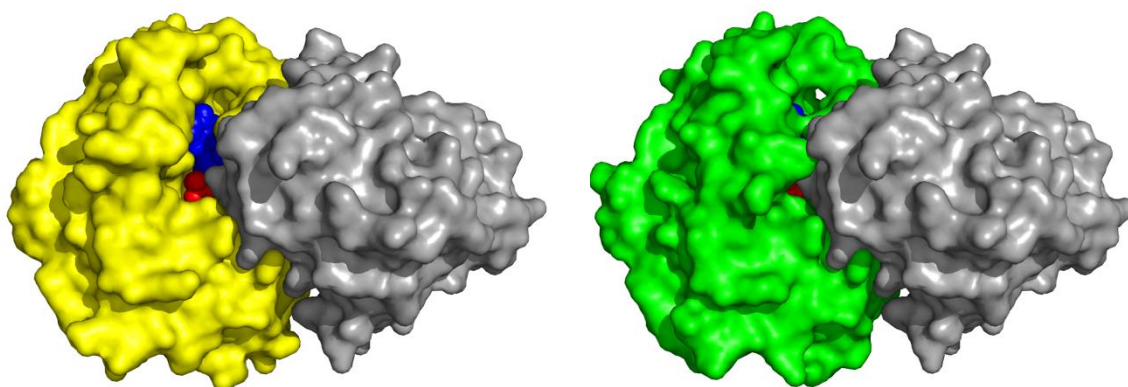
6.3. KONFORMACIJA AKTIVNIH MJESTA

Kao i kod PNP iz bakterije *E. coli*, aktivna mjesta PNP iz bakterije *H. pylori* mogu biti u otvorenoj ili zatvorenoj konformaciji. U otvorenoj konformaciji aminokiseline 214 do 232 oblikuju α -zavojnica H8. Zatvaranje aktivnog mjesta postiže se podjelom zavojnice na dva segmenta: aminokiseline 222-232 ostaju na svojim položajima, dok se aminokiseline 214-221, zajedno s aminokiselinama 208-213 (koje se nalaze direktno ispred zavojnice), pomiču prema susjednoj podjedinici i djelomično prekrivaju ulaz u aktivno mjesto (prikazano na slici 27).



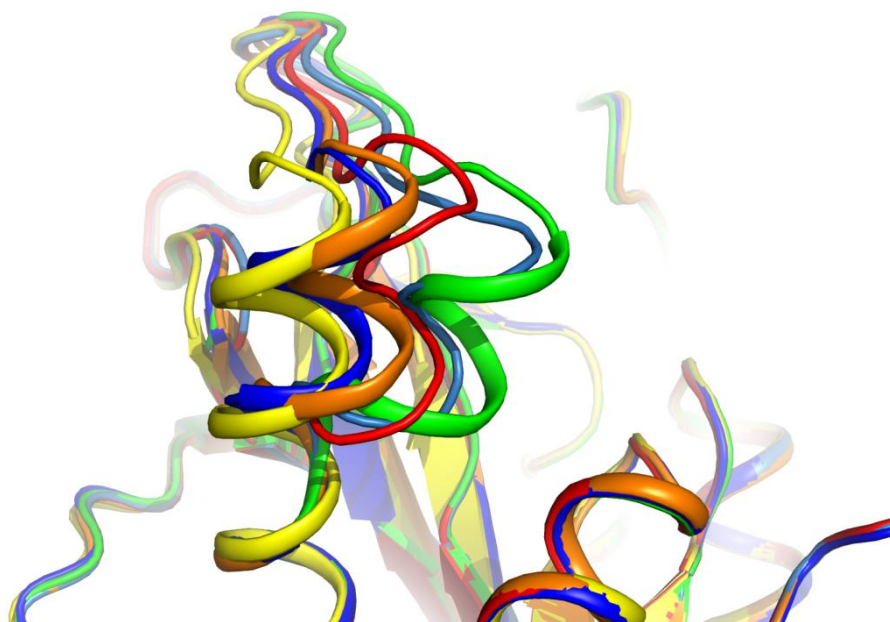
Slika 27. Zatvaranje aktivnog mjesta postiže se pomakom aminokiselina 208 - 221, prilikom čega se zavojnica H8, koju čine aminokiseline 214-232, dijeli na dva segmenta. Aminokiseline 222-232 ostaju na svojim položajima. Otvorena konformacija podjedinice označena je žutom bojom, a zatvorena zelenom.

Iako se proučavanjem samo jedne podjedinice pomak ostvaren zatvaranjem aktivnog mjesta čini relativno malim, on je značajan ako se u obzir uzme položaj susjedne podjedinice (prikazano na slici 28).

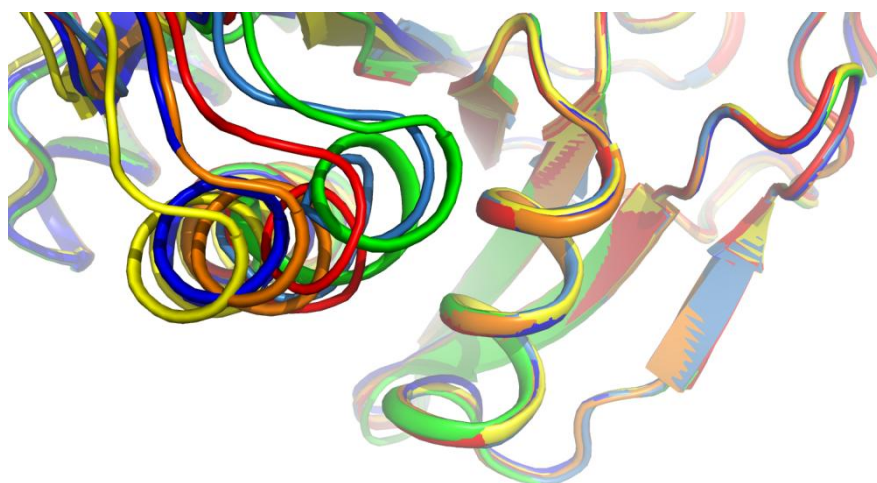


Slika 28. Aktivno mjesto s vezanim fosfatnim anionom (crveno) i FA (plavo) u otvorenoj (žuto) i zatvorenoj (zeleno) konformaciji. Prikazana je i susjedna podjedinica (sivo). Relativno malim pomakom aminokiselina 208-221 postiže se značajno zatvaranje aktivnog mjesta.

Usporedbom konformacija svih podjedinica u sva tri dobivena kompleksa, može se uočiti da otvorenost ili zatvorenost aktivnog mjesta nije jednoznačna i striktno određena, već se radi o rasponu položaja od otvorenog prema zatvorenom (slike 29 i 30).

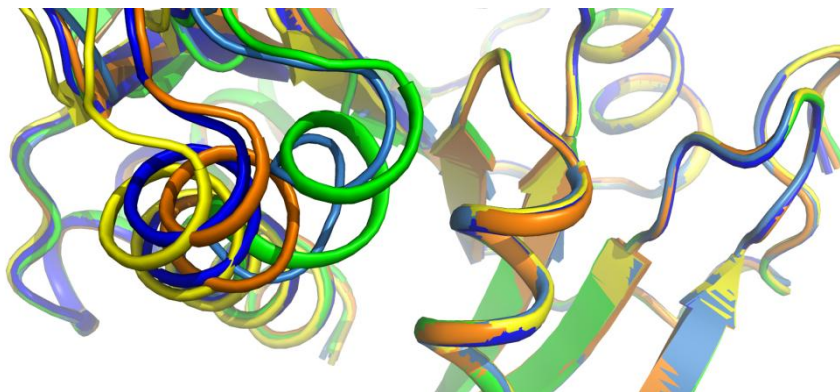


Slika 29. Položaji zavojnice H8 uočeni u podjedinicama sva tri dobivena kompleksa. Pojedine položaje zauzimaju slijedeće podjedinice: žuto - podjedinica F binarnog kompleksa s fosfatom, tamno plavo - podjedinica D binarnog kompleksa s fosfatom i podjedinice A i B ternarnog kompleksa, narančasto - sve podjedinice binarnog kompleksa s formicinom A i podjedinica D ternarnog kompleksa, crveno - podjedinica E binarnog kompleksa s fosfatom, svijetlo plavo - podjedinica C ternarnog kompleksa, zeleno - podjedinice A, B i C binarnog kompleksa s fosfatom i podjedinica E ternarnog kompleksa.



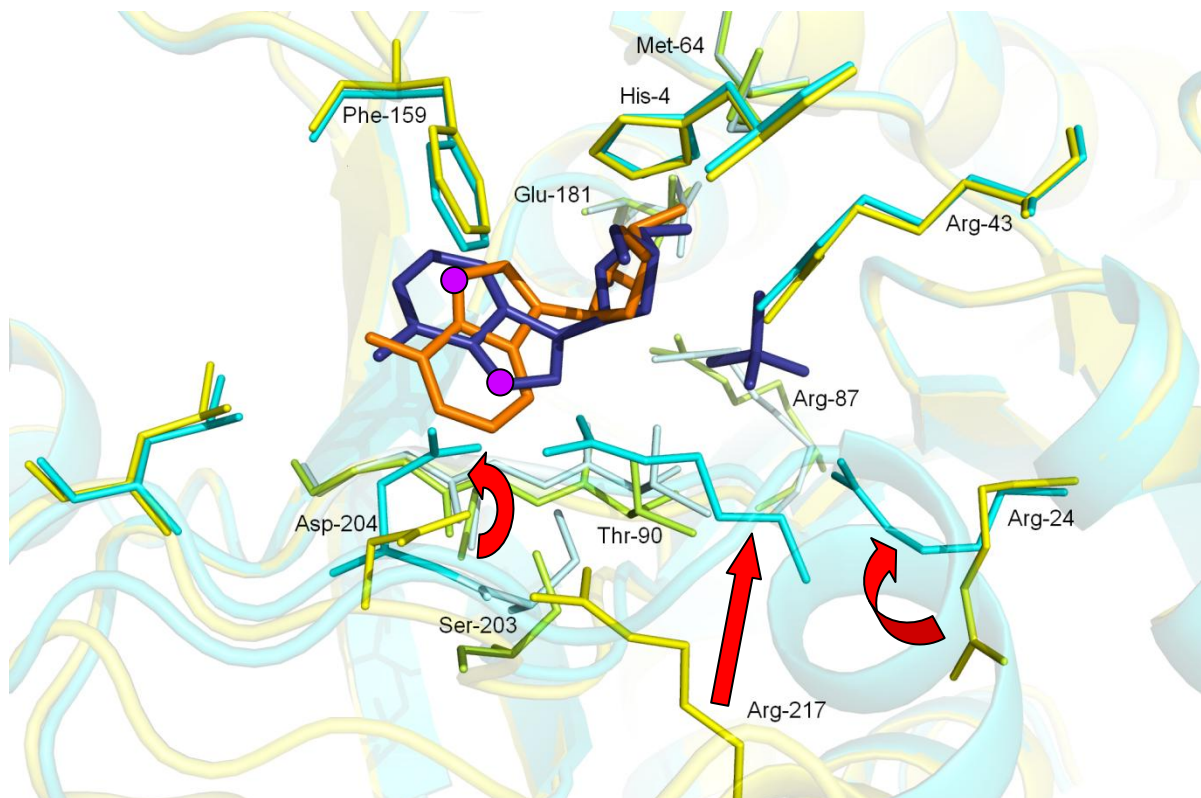
Slika 30. Položaji zavojnice H8 uočeni u podjedinicama sva tri dobivena kompleksa, pogled odozgo. Pojedine položaje zauzimaju slijedeće podjedinice: žuto - podjedinica F binarnog kompleksa s fosfatom, tamno plavo - podjedinica D binarnog kompleksa s fosfatom i podjedinice A i B ternarnog kompleksa, narančasto - sve podjedinice binarnog kompleksa s formicinom A i podjedinica D ternarnog kompleksa, crveno - podjedinica E binarnog kompleksa s fosfatom, svijetlo plavo - podjedinica C ternarnog kompleksa, zeleno - podjedinice A, B i C binarnog kompleksa s fosfatom i podjedinica E ternarnog kompleksa.

Ipak, zatvoreni položaji (svijetlo plavo i zeleno) odvojeni su od predominantno otvorenih položaja (žuto, tamno plavo i narančasto), osim u slučaju podjedinice E binarnog kompleksa s fosfatom, koja se nalazi u crvenom položaju i zauzima konformaciju između otvorene i zatvorene (slika 31). Stoga i dalje ima smisla govoriti o predominantno otvorenoj ili predominantno zatvorenoj konformaciji aktivnog mjesta.



Slika 31. Položaji zavojnice H8 uočeni u podjedinicama sva tri dobivena kompleksa, osim položaja podjedinice E binarnog kompleksa s fosfatom. Zatvoreni položaji (svijetlo plavo i zeleno) odvojeni su od predominantno otvorenih položaja (žuto, tamno plavo i narančasto).

Zatvaranje aktivnih mjesta uočeno je ukoliko se u njima nalazi vezan fosfatni anion, dok prisustvo FA nema sličan utjecaj. U zatvorenim aktivnim mjestima su, u usporedbi s otvorenim aktivnim mjestima, uočene dvije važne konformacijske promjene (prikazano na slici 32): bočni ogranak aminokiseline Arg24 približava se fosfatnom anionu, a molekula FA nalazi se u standardnoj konformaciji. Obje navedene promjene u skladu su s trenutno pretpostavljenim katalitičkim mehanizmom slične purinske nukleozidne fosforilaze iz bakterije *E. coli*, iako bi standardnu konformaciju, poput ove uočene u molekuli FA, trebalo potvrditi i u molekuli purinskog nukleozida - prirodnog supstrata PNP. Prema trenutno pretpostavljenom katalitičkom mehanizmu djelovanja PNP iz bakterije *E. coli*, približavanje bočnog ogranka Arg24 fosfatnom anionu pokreće konformacijsku promjenu koja dovodi do zatvaranja aktivnog mjesta i, preko Arg217, do pomicanja Asp204 u povoljan položaj za prijenos protona na dušik N7 purinske baze i formiranja prijelaznog stanja u obliku ribooksokarbenijevog iona. Dušik N7 (slika 32, ljubičasta točka) nalazi se u blizini Asp204 samo ukoliko se molekula FA nalazi u standardnoj konformaciji, stoga bi ona mogla biti ključna za odvijanje reakcije.



Slika 32. Glavne razlike između otvorenih (žuto) i zatvorenih (plavo) aktivnih mjesta (prikazana su aktivna mjesta B i E u ternarnom kompleksu PNP). Nestandardna konformacija molekule FA prikazana je narančastom, a standardna tamno plavom bojom. Dušik N7 u obje konformacije molekule FA označen je ljubičastom točkom. Fosfatni anion vezanjem u aktivno mjesto pomiče bočni ogranak Arg24 u svoju blizinu (prikazano strelicom desno). Promjene položaja Asp204 i Arg217 označene su strelicama lijevo i u sredini.

Povezanost prisustva fosfatnih aniona, konformacije aktivnog mjesta i molekule FA, te položaja aminokiselina Arg24, Arg217 i Asp204 pregledno je prikazana u tablici 6.

Tablica 6. Povezanost prisustva fosfatnih aniona, konformacije aktivnog mjesta, konformacije molekule FA i položaja aminokiselina Arg24, Arg217 i Asp204. U binarnom kompleksu PNP s fosfatom aktivno mjesto E zatvoreno je samo djelomično, pa su i pomaci aminokiselina Arg217 i Asp204 manji (u tablici označeno zagradama). U aktivnom mjestu F ternarnog kompleksa u veznom mjestu za fosfat nalaze se molekule vode koje svojim razmještajem nalikuju na fosfatni anion. Također, zbog velike neuređenosti regije 210-221 u lancu F, nije moguće odrediti točan položaj navedene regije, uključujući i aminokiselinu Arg217 (u tablici označeno upitnicima).

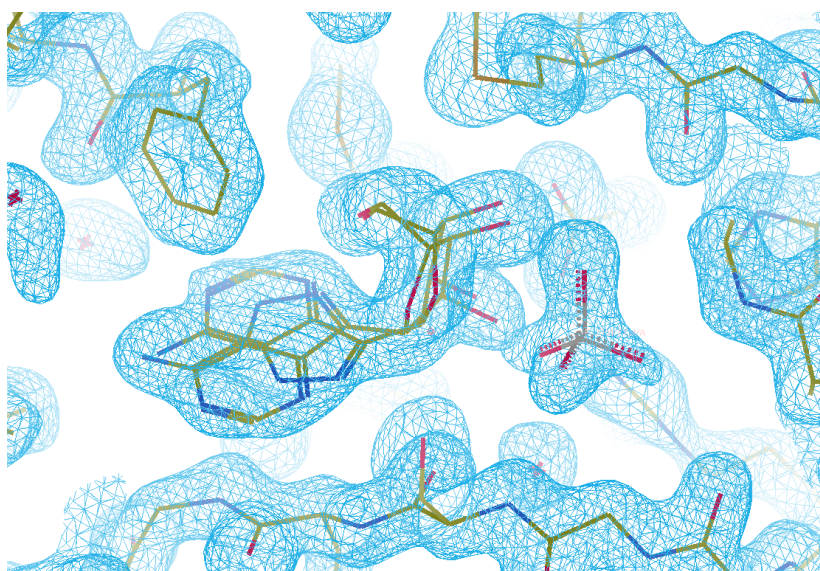
	Binarni kompleks PNP s FA	Binarni kompleks PNP s fosfatom	Ternarni kompleks PNP s FA i fosfatom
Aktivna mjesta koja sadrže FA u nestandardnoj konformaciji	A B C D E F	-	A B D F
Aktivna mjesta koja sadrže FA u standardnoj konformaciji	-	-	A C E
Aktivna mjesta koja sadrže fosfat	-	A B C E	A C E H ₂ O
Zatvorena aktivna mjesta	-	A B C (E)	C E ?
Aktivna mjesta u kojima je promijenjena konformacija Arg24	-	A B C E	C E F
Aktivna mjesta u kojima je promijenjen položaj Arg217	-	A B C (E)	C E ?
Aktivna mjesta u kojima je promijenjen položaj Asp204	-	A B C (E)	C E F

Ne računajući podjedinicu E iz binarnog kompleksa PNP s fosfatnim anionima i podjedinicu F iz ternarnog kompleksa, može se uočiti korelacija između vezanja fosfatnog aniona u aktivno mjesto, konformacije aktivnog mjesta, konformacije molekule FA (ukoliko je ona prisutna u aktivnom mjestu), te pomaka aminokiselina Arg24, Arg217 i Asp204. Ovi rezultati slažu se s predloženim mehanizmom djelovanja PNP iz bakterije *E. coli*.

Zatvaranje podjedinice E binarnog kompleksa PNP s fosfatnim anionima nije potpuno (slika 18), iako je fosfatni anion vezan u aktivnom mjestu. Manji pomak uslijed zatvaranja podjedinice dovodi i do manjeg pomaka aminokiselina Arg217 i Asp204. Ipak, pomak svih aminokiselina jasno se vidi, te se i podjedinica E smatra zatvorenom.

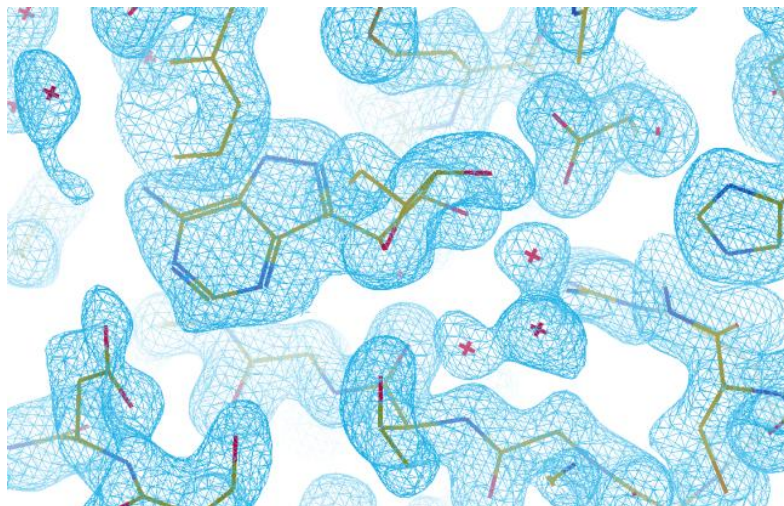
U aktivnom mjestu podjedinice A ternarnog kompleksa fosfatni anion je vezan s nešto manjom zaposjednutošću (eng. *occupancy*), a prema elektronskoj gustoći čini se da je

molekula FA u prisutna u obje konformacije (slika 33). Iz navedenog se može zaključiti da neke od molekula PNP u kristalnoj strukturi u podjedinicama A sadrže prisutan fosfat, te se u podjedinicama A tih molekula formicin A nalazi u standardnoj konformaciji, dok neke molekule PNP u podjedinici A nemaju vezan fosfat i FA se nalazi u nestandardnoj konformaciji. Dobivena mapa elektronske gustoće na kraju sadrži doprinose oba tipa podjedinica. Aktivno mjesto podjedinice A nije zatvoreno i pomak aminokiselina Arg24, Arg217 i Asp204 nije uočen, iz čega se može pretpostaviti da prisustvo fosfatnog aniona samo po sebi ne uzrokuje zatvaranje aktivnog mjesta u svim slučajevima, već, u skladu s predloženom teorijom o mehanizmu katalitičke reakcije, zatvaranje pokreće promjena konformacije Arg24.



Slika 33. U aktivnom mjestu podjedinice A ternarnog kompleksa, koje sadrži oba liganda, elektronska gustoća upućuje da se molekula FA nalazi u obje konformacije.

U aktivnom mjestu podjedinice F ternarnog kompleksa nema vezanog fosfata, a FA se nalazi u nestandardnoj konformaciji. Ipak, u elektronskoj gustoći vidljive su molekule vode koje se nalaze u veznom mjestu za fosfat (slika 34), s neobičnim rasporedom koji podsjeća na tri vrha tetraedra. Također su aminokiseline Arg24 i Asp204 pomaknute u položaje koji odgovaraju zatvorenim aktivnim mjestima. Elektronska gustoća u predjelu koji je odgovoran za zatvaranje aktivnog mjesta je izrazito loše definirana (u regiji 210-221 vlada velika neuređenost), i nije moguće sa sigurnošću utvrditi predominantnu konformaciju podjedinice.



Slika 34. U podjedinici F ternarnog kompleksa na položaju gdje se veže fosfatni anion nalaze se molekule vode, s neobičnim rasporedom koji podsjeća na tri vrha tetraedra.

Iz svih ovih razloga moguće je da je situacija u podjedinici F ekstremniji primjer situacije u podjedinici A, odnosno da se u kristalnoj strukturi nalazi određeni broj molekula PNP koje u podjedinici F imaju vezan fosfatni anion i koje su u zatvorenoj konformaciji, te određeni broj molekula PNP koje u podjedinici F nemaju vezan fosfatni anion, nego molekule vode i u kojima nije došlo do zatvaranja. Dobivena elektronska gustoća ponovo sadrži doprinose oba tipa strukture F podjedinica.

Upravo zbog važnosti detalja poput konformacije molekule formicina A ili razlikovanja molekula vode, za ovakav tip istraživanja (a pogotovo za istraživanje katalitičkih mehanizama proteina), bitni su dobri i kvalitetni difrakcijski podaci što bolje rezolucije.

7. Zaključak

U ovom radu opisane su strukture binarnih kompleksa purinske nukleozidne fosforilaze iz bakterije *H. pylori* s fosfatom (prirodnim supstratom) i inhibitorom formicinom A (strukturnim analogom purinskog nukleozida, drugog prirodnog supstrata), kao i struktura ternarnog kompleksa s oba liganda. Struktura ternarnog kompleksa važna je upravo zbog činjenice da sadrži oba navedena liganda, odnosno, pripremljeni ternarni kompleks analogan je ternarnom kompleksu koji vjerojatno nastaje tijekom katalitičke reakcije *in vivo*. Korištene kristalizacijske otopine, za razliku od prethodnih eksperimenata provedenih na sličnom PNP iz bakterije *E. coli*, nisu sadržavale fosfatne ili sulfatne anione koji bi otežali donošenje zaključaka o mogućem katalitičkom mehanizmu PNP.

Kristalizacija kompleksa PNP koji sadrže fosfatne anione uspješno je provedena isključivo u uvjetima snižene ionske jakosti, što je u skladu s otkrićem da visoka ionska jakost nepovoljno utječe na vezanje fosfatnih aniona u aktivno mjesto proteina. Za dobivanje kompleksa s fosfatnim anionima korištena je modifikacija kristalizacijske otopine koja nije sadržavala magnezijev klorid.

U binarnom kompleksu PNP s FA, po jedna molekula FA vezana je u svako od šest aktivnih mjesta. Sva aktivna mjesta su u predominantno otvorenoj konformaciji. Molekule FA u navedenom kompleksu nalaze se u konformaciji koja je različita od konformacije FA pronađene u prijašnjim istraživanjima kompleksa sličnog PNP iz bakterije *E. coli*, te je ta konformacija nazvana nestandardnom. U nestandardnoj konformaciji molekule FA, zbog steričkih razloga, nije moguć prijenos protona s Asp204 na N7 purinskog prstena, što je prema trenutno pretpostavljenom mehanizmu nužno za izvođenje katalitičke reakcije.

U binarnom kompleksu PNP s fosfatom, fosfatni anioni vezani su u četiri od šest aktivnih mjesta. Uz svaki fosfatni anion nalazi se i molekula Tris-a, koja svojim vezanjem oponaša vezanje riboze. Aktivna mjesta u kojima se nalaze fosfatni anioni su u predominantno zatvorenoj konformaciji, iako pomak u aktivnom mjestu E nije ostvaren do kraja. Iz ovog se može zaključiti da vezanje fosfata pokreće konformacijsku promjenu koja dovodi do zatvaranja aktivnog mjesta. Može se pretpostaviti da, kao i u slučaju PNP iz bakterije *E. coli*, postoje dvije konstante vezanja fosfata u aktivno mjesto enzima.

U ternarnom kompleksu PNP s FA i fosfatom po jedna molekula FA vezana je u svako od šest aktivnih mjesta, a po jedan fosfatni anion vezan je u tri od šest aktivnih mjesta. Aktivna mjesta koja ne sadrže fosfatne anione u pravilu se nalaze u predominantno otvorenoj konformaciji, i u njima je molekula FA u nestandardnoj konformaciji. Dva od tri aktivna mjesta koja sadrže fosfat nalaze se u zatvorenoj konformaciji i u njima je molekula FA u standardnoj konformaciji. Treće aktivno mjesto koje sadrži fosfat je otvoreno, a u njemu se molekula FA nalazi u obje konformacije. Položaj aminokiselina Arg24, Arg217 i Asp204 potreban za odvijanje katalitičke reakcije prema trenutno pretpostavljenom mehanizmu za PNP iz bakterije *E. coli*, u korelaciji je sa zatvorenom konformacijom aktivnog mjesta. Iz navedenog može se zaključiti da su položaji supstrata i katalitički bitnih aminokiselina povoljni za katalizu samo u zatvorenim aktivnim mjestima.

Raspodjela konformacija otvorenih i zatvorenih mjesta u binarnom kompleksu s FA već je poznata iz kompleksa PNP iz bakterije *E. coli* (svih šest aktivnih mjesta u otvorenoj konformaciji), međutim, u binarnom kompleksu PNP s fosfatnim anionima uočen je novi odnos otvorenih i zatvorenih aktivnih mjesta: dva aktivna mjesta u otvorenoj i četiri u zatvorenoj konformaciji.

8. Literaturna vrela

1. B. E. Dunn, H. Cohen, M. J. Blaser, *Clin. Microbiol. Rev.* **10** (1997) 720-741.
2. J. R. Warren, B. Marshall, *Lancet.* **321** (1983) 1273-1275.
3. F. Megraud F, H. Lamouliatte, *Dig. Dis. Sci.* **37**(5) (1992) 769-72.
4. D. Forman, P. Webb, J. Parsonnet, *Lancet.* **343**(8891) (1994) 243-4.
5. J. Parsonnet, S. Hansen, L. Rodriguez, A. B. Gelb, R. A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelman, G. D. Friedman, *N. Engl. J. Med.* **330**(18) (1994) 1267-71.
6. M. K. Cowan, K. P. Talaro, *Microbiology*, McGraw Hill, New York, 2009, str 695, 696.
7. G. Liechti, J. B. Goldberg, *J. Bacteriol.* **194**(4) (2012) 839-854.
8. A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar, *Pharmacol. Ther.* **88** (2000) 349-425.
9. M. Luić, Z. Štefanić, *Croat. Chem. Acta* **89**(2) (2016) 1-6.
10. G. Koellner, A. Bzowska, B. Wielgus-Kutrowska, M. Luić, T. Steiner, W. Saenger, J. Stepinski, *J. Mol. Biol.* **315** (2002) 351-371.
11. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=36490> (preuzeto 3. listopada 2016.)
12. W. Sneader, *Drug discovery*, John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, 2005, 1-11.
13. R. Raman, S. Kandula, *Resonance* **13**(3) (2008) 245-253.
14. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2006, 1001-1024.
15. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger's Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2008, 194, 882-896.
16. K. Bebenek, J. D. Roberts, T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 3589-3596.
17. R. E. Meyn, L. C. Stephens, N. R. Hunter, L. Milas, *Anticancer Drugs* **6** (1995) 443-450.
18. R. I. Christopherson, R. G. Duggleby, *Eur. J. Biochem.* **134** (1983) 331-335
19. R. I. Christopherson, S. D. Lyons, P. K. Wilson, *Acc. Chem. Res.* **35** (2002) 961-971.
20. L. W. Scheibel, I. W. Sherman u *Malaria: Principles and Practice of Malariology Vol. 1*, W. H. Wernsdorfer, I. McGregor (ur.), Churchill Livingston, Melbourne, 1988, 234-242.
21. I. Thiele, T. D. Vo, N. D. Price, B. O. Palsson, *J. Bacteriol.* **187** (2005) 5818-5830.
22. F. Megraud, P. Lehours, *Clin. Microbiol. Rev.* **20** (2007) 280-322.
23. D. Schomburg, D. Stephan, *Enzyme Handbook 12*, Volume 1, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1996, 2.4.2.1, 1-11.
24. <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.2.1> (preuzeto 7. listopada 2016.)
25. Z. Štefanić, G. Mikleušević, M. Narczyk, B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska, M. Luić, *Croat. Chem. Acta* **86**(1) (2013) 1-11.
26. N. Hori, M. Watanabe, Y. Yamazaki, Y. Mikami, *Agric. Biol. Chem.* **53** (1989) 2205 -2210.
27. A. Bzowska, J. Tebbe, B. Wielgus-Kutrowska, W. Schröder, D. Shugar, W. Saenger, G. Koellner, *Acta Cryst.D* **54** (1998) 1061-1063.
28. G. Koellner, M. Luić, D. Shugar, W. Saenger, and A. Bzowska, *J. Mol. Biol.* **280** (1998) 153-166.

29. M. S. Hershfield, S. Chaffee, L. Koro-Johnson, A. Mary, A. A. Smith, S. A. Short, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (1991) 7185-7189.
30. K. F. Jensen, P. Nygaard, *J. Biochem.* **51** (1975) 253-265.
31. K. F. Jensen *Eur. J. Biochem.* **67** (1976) 377-38.
32. B. Kierdaszuk, A. Modrak-Wojcik, D. Shugar, *Biophys. Chem.* **63** (1997) 107-118.
33. K. F. Jensen, *Eur. J. Biochem.* **67** (1976) 377-386.
34. T. A. Krenitsky, J. V. Tuttle, *Biochim. Biophys. Acta* **703** (1982) 247-249
35. <http://www.uniprot.org/uniprot/P56463> (preuzeto 15. veljače 2017.)
36. G. Rhodes, *Crystallography Made Crystal Clear*, Academic Press, San Diego, 2000, 5-154.
37. E. E. Lattman, P. J. Loll, *Protein Crystallography*, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2008.
38. D. Schwarzenbach, *Crystallography*, John Wiley & Sons, West Sussex, 1996, 89-157.
39. [http://spdbv.vital-it.ch/TheMolecularLevel/ModQual/#Reflections%20\(unique\)](http://spdbv.vital-it.ch/TheMolecularLevel/ModQual/#Reflections%20(unique)) (preuzeto 20. studenog 2016.)
40. P. Evans, A. McCoy, *Acta Cryst.D* **64** (2008) 1-10.
41. M. D. Winn i sur., *Acta Cryst. D* **67** (2011) 235-242.
42. T. G. G. Battye, L. Kontogiannis, O. Johnson, H. R. Powell, A. G. W. Leslie, *Acta Cryst D* **67** (2011) 271-281.
43. W. Kabsch, *Acta Cryst. D* **66** (2010) 125-132.
44. CrysAlisPRO, Oxford Diffraction /Agilent Technologies UK Ltd, Yarnton, England
45. P. R. Evans, *Acta Cryst.D* **62** (2006) 72-82
46. P. R. Evans, G. N. Murshudov, *Acta Cryst. D* **69** (2013) 1204-1214.
47. P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Cryst.D* **66** (2010) 486-501.
48. G. N. Murshudov, P. Skubak, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nichollis, M. D. Winn, F. Long, A. A. Vagin, *Acta Cryst.D* **67** (2011) 355-367.
49. P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, and P.H. Zwart, *Acta Cryst.D* **66** (2010) 213-221
50. The PyMOL Molecular Graphics System, verzija 1.74, Schrödinger, LLC.

9. Popis kratica, simbola i oznaka

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FA	formicin A
GUO	gvanozin
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
INO	inozin
PNP	purinska nukleozidna fosforilaza
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol
TsA	9-tozil-9H-purin-6-amin

AMINOKISELINE:

Ala	alanin	Leu	leucin
Arg	arginin	Lys	lizin
Asn	asparagin	Met	metionin
Asp	aspartat	Phe	fenilalanin
Cys	cistein	Pro	prolin
Gln	glutamin	Ser	serin
Glu	glutamat	Thr	treonin
Gly	glicin	Trp	triptofan
His	histidin	Tyr	tirozin
Ile	izoleucin	Val	valin

Dodatak

Vodikove veze koje ligandi ostvaruju s aminokiselinama PNP prikazane su u tablicama 7, 8 i 9. Prikazane su interakcije u kojima je duljina veze 3,5 Å ili manja, a granični kut 55 °. Radi bolje preglednosti tablica, pripadnost pojedinom lancu označena je bojom (A - zeleno, B - plavo, C- ljubičasto, D - narančasto, E - ružičasto, F - crno).

Tablica 7. Vodikove veze koje molekule FA ostvaruju s aminokiselinama PNP u binarnom kompleksu.

VODIKOVE VEZE OSTVARUJU SE IZMEĐU:						duljina veze / Å
MOLEKULE FA			AMINOKISELINE PNP			
MOLEKULA	LANAC	ATOM	LANAC	AMINOKISELINA	ATOM	
FA	A	O5'	D	His4	N ^E	2,96
FA	A	O4'	A	Thr90	O ^V	2,66
FA	A	O2'	A	Arg87	N ^N	2,66
FA	A	O2'	A	Glu181	O ^E	2,49
FA	A	N3	A	Thr90	O ^V	3,41
FA	B	O5'	E	His4	N ^E	3,34
FA	B	O2'	B	Arg87	N ^N	2,58
FA	B	O2'	B	Glu181	O ^E	3,32
FA	B	N3	B	Thr90	O ^V	2,91
FA	C	O5'	F	His4	N ^E	2,49
FA	C	O4'	C	Thr90	O ^V	3,33
FA	C	O2'	C	Arg87	N ^N	3,05
FA	C	O2'	C	Glu181	O ^E	2,64
FA	C	N3	C	Thr90	O ^V	3,48
FA	D	O5'	A	His4	N ^E	3,35
FA	D	O4'	D	Thr90	O ^V	3,06
FA	D	O3'	D	Glu181	O ^E	2,74
FA	D	O2'	D	Arg87	N ^N	2,93
FA	D	N3	D	Thr90	O ^V	3,40
FA	E	O5'	B	His4	N ^E	2,93
FA	E	O4'	E	Thr90	O ^V	2,45
FA	E	O2'	E	Arg87	N ^N	3,43
FA	E	N3	E	Thr90	O ^V	3,00
FA	F	O5'	C	His4	N ^E	2,96
FA	F	O4'	F	Thr90	O ^V	3,32
FA	F	O2'	F	Arg87	N ^N	2,66
FA	F	O2'	F	Glu181	O ^E	2,49
FA	F	N1	F	Asp204	O ^δ	3,41
FA	F	N3	F	Thr90	O ^V	3,34

Tablica 8. Vodikove veze koje fosfatni anioni i molekule Tris-a ostvaruju s aminokiselinama PNP u binarnom kompleksu.

VODIKOVE VEZE OSTVARUJU SE IZMEĐU:						duljina veze / Å
MOLEKULA	LIGAND		AMINOKISELINE PNP			
	LANAC	ATOM	LANAC	AMINOKISELINA	ATOM	
PO ₄ ³⁻	A	O1	A	Thr90	O ^v	2,65
PO ₄ ³⁻	A	O3	A	Gly20	N	2,71
PO ₄ ³⁻	A	O3	A	Arg24	N ⁿ	2,71
PO ₄ ³⁻	A	O3	A	Arg87	N ⁿ	3,49
PO ₄ ³⁻	A	O4	A	Arg87	N ⁿ	3,24
PO ₄ ³⁻	A	O4	A	Thr90	N	3,00
PO ₄ ³⁻	B	O1	B	Thr90	O ^v	2,51
PO ₄ ³⁻	B	O2	B	Gly20	N	2,71
PO ₄ ³⁻	B	O3	B	Arg87	N ⁿ	2,99
PO ₄ ³⁻	B	O3	B	Thr90	N	2,90
PO ₄ ³⁻	B	O4	B	Gly20	N	3,32
PO ₄ ³⁻	C	O1	F	Arg43	N ⁿ	2,77
PO ₄ ³⁻	C	O2	C	Arg87	N ⁿ	3,09
PO ₄ ³⁻	C	O2	C	Thr90	N	2,89
PO ₄ ³⁻	C	O3	C	Gly20	N	3,34
PO ₄ ³⁻	C	O4	C	Gly20	N	2,80
PO ₄ ³⁻	E	O1	E	Gly20	N	2,73
PO ₄ ³⁻	E	O1	E	Arg87	N ⁿ	3,35
PO ₄ ³⁻	E	O3	E	Arg87	N ⁿ	3,03
PO ₄ ³⁻	E	O3	E	Thr90	N	2,87
PO ₄ ³⁻	E	O3	E	Thr90	O	3,49
PO ₄ ³⁻	E	O4	B	Arg43	N ⁿ	2,78

Tablica 8 (nastavak).

VODIKOVE VEZE OSTVARUJU SE IZMEĐU:						duljina veze / Å
MOLEKULA	LIGAND		AMINOKISELINE PNP			
	LANAC	ATOM	LANAC	AMINOKISELINA	ATOM	
Tris	A	N	A	Thr90	O ^Y	3,00
Tris	A	O1	D	His4	N ^E	3,05
Tris	A	O2	A	Glu181	O ^E	3,11
Tris	A	O3	A	Arg87	N ^N	3,26
Tris	A	O3	A	Met180	N	3,05
Tris	A	O3	A	Glu181	O ^E	2,61
Tris	B	N	B	Thr90	O	3,37
Tris	B	N	B	Thr90	O ^Y	2,79
Tris	B	O1	E	His4	N ^E	2,92
Tris	B	O3	B	Arg87	N ^N	3,22
Tris	B	O3	B	Met180	N	3,05
Tris	B	O3	B	Glu181	O ^E	2,54
Tris	C	N	C	Thr90	O ^Y	3,08
Tris	C	O1	C	Arg87	N ^N	3,38
Tris	C	O1	C	Met180	N	2,97
Tris	C	O1	C	Glu181	O ^E	2,56
Tris	C	O2	C	Glu181	O ^E	3,12
Tris	C	O2	C	Glu181	O ^E	2,57
Tris	C	O3	F	His4	N ^E	2,79
Tris	E	N	E	Arg87	N ^N	3,42
Tris	E	N	E	Met180	N	3,12
Tris	E	N	E	Glu181	O ^E	2,58
Tris	E	O2	E	Thr90	O ^Y	3,22
PO ₄ ³⁻	A	O1	A	Tris	N	3,32
PO ₄ ³⁻	A	O2	A	Tris	O2	2,51
PO ₄ ³⁻	A	O4	A	Tris	N	3,04
PO ₄ ³⁻	B	O1	B	Tris	N	3,25
PO ₄ ³⁻	B	O3	B	Tris	O3	3,50
PO ₄ ³⁻	C	O1	C	Tris	N	3,47
PO ₄ ³⁻	C	O2	C	Tris	N	3,09
PO ₄ ³⁻	E	O3	E	Tris	N	3,43
PO ₄ ³⁻	E	O4	E	Tris	O3	2,65

Tablica 9. Vodikove veze koje fosfatni anioni i molekule FA ostvaruju s aminokiselinama PNP u ternarnom kompleksu.

VODIKOVE VEZE OSTVARUJU SE IZMEĐU:						duljina veze / Å
LIGAND			AMINOKISELINE PNP			
MOLEKULA	LANAC	ATOM	LANAC	AMINOKISELINA	ATOM	
FA	A	O5'	D	His4	N ^E	2,72
FA	A	O5'	D	His4	N ^E	2,66
FA	A	O4'	A	Thr90	O ^Y	3,33
FA	A	O3'	A	Glu181	O ^E	2,43
FA	A	O2'	A	Met180	N	3,13
FA	A	O2'	A	Glu181	O ^E	2,34
FA	A	O2'	A	Arg87	N ^η	3,00
FA	A	O2'	A	Glu181	O ^E	2,63
FA	A	N3	A	Thr90	O ^Y	3,17
FA	A	N8	A	Thr90	O ^Y	2,79
FA	B	O5'	E	His4	N ^E	2,73
FA	B	O4'	B	Thr90	O ^Y	3,40
FA	B	O2'	B	Arg87	N ^η	3,08
FA	B	O2'	B	Glu181	O ^E	2,69
FA	B	N3	B	Thr90	O ^Y	3,21
FA	C	O5'	F	His4	N ^E	2,64
FA	C	O4'	C	Thr90	O ^Y	3,03
FA	C	O2'	C	Arg87	N ^η	3,22
FA	C	O2'	C	Met180	N	3,13
FA	C	O2'	C	Glu181	O ^E	2,59
FA	C	N7	C	Asp204	O ^δ	3,15
FA	C	N8	C	Thr90	O ^Y	2,93
FA	C	N8	C	Arg217	N ^η	3,28
FA	D	O5'	A	His4	N ^E	2,67
FA	D	O4'	D	Thr90	O ^Y	3,41
FA	D	O2'	D	Glu181	O ^E	2,67
FA	D	N3	D	Thr90	O ^Y	2,97
FA	E	O5'	B	His4	N ^E	2,68
FA	E	O4'	E	Thr90	O ^Y	3,00
FA	E	O2'	E	Arg87	N ^η	3,23
FA	E	O2'	E	Met180	N	2,89
FA	E	O2'	E	Glu181	O ^E	2,76
FA	E	N7	E	Asp204	O ^δ	3,04
FA	E	N8	E	Thr90	O ^Y	2,87
FA	F	O5'	C	His4	N ^E	2,73
FA	F	O4'	F	Thr90	O ^Y	3,23
FA	F	O2'	F	Arg87	N ^η	3,15
FA	F	O2'	F	Met180	N	3,43
FA	F	O2'	F	Glu181	O ^E	2,60
FA	F	N1	F	Asp204	O ^δ	3,11

Tablica 9 (nastavak).

VODIKOVE VEZE OSTVARUJU SE IZMEĐU:						duljina veze / Å
MOLEKULA	LIGAND		AMINOKISELINE PNP			
	LANAC	ATOM	LANAC	AMINOKISELINA	ATOM	
PO ₄ ³⁻	A	O2	A	Arg87	N ⁿ	2,76
PO ₄ ³⁻	A	O2	A	Thr90	N	3,48
PO ₄ ³⁻	A	O3	A	Gly20	N	2,68
PO ₄ ³⁻	A	O4	A	Thr90	O ^y	3,33
PO ₄ ³⁻	A	O4	D	Arg43	N ⁿ	3,02
PO ₄ ³⁻	C	O1	C	Arg87	N ⁿ	3,19
PO ₄ ³⁻	C	O1	C	Thr90	N	2,95
PO ₄ ³⁻	C	O2	C	Thr90	N	3,44
PO ₄ ³⁻	C	O2	C	Thr90	O ^y	2,52
PO ₄ ³⁻	C	O3	C	Gly20	N	2,95
PO ₄ ³⁻	E	O2	E	Gly20	N	2,57
PO ₄ ³⁻	E	O2	E	Arg87	N ⁿ	3,46
PO ₄ ³⁻	E	O3	E	Arg87	N ⁿ	2,92
PO ₄ ³⁻	E	O3	E	Thr90	N	2,95
FA	A	O4 ⁱ	A	PO ₄ ³⁻	O4	3,10
FA	A	O2 ⁱ	A	PO ₄ ³⁻	O2	2,37
FA	C	O4 ⁱ	C	PO ₄ ³⁻	O2	3,04
FA	E	O4 ⁱ	E	PO ₄ ³⁻	O1	3,29

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1992. godine. Nakon završetka zagrebačke V. gimnazije upisala sam Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, na kojem sam 2014. godine stekla diplomu prvostupnice molekularne biologije. Studij sam nastavila na diplomskom studiju kemije u granama anorganske kemije i biokemije.

Uz studiranje volonterski se bavim radom s djecom i popularizacijom znanosti, za što sam nagrađena s dvije Posebne rektorove nagrade.