

# Utjecaj fosfata na promjenu konformacije aktivnih mjesta enzima purinske nukleozidne fosforilaze iz bakterije *Helicobacter pylori*

---

Bošnjaković, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:772159>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Marta Bošnjaković

**Utjecaj fosfata na promjenu konformacije aktivnih mjesta enzima  
purinske nukleozidne fosforilaze iz bakterije *Helicobacter pylori***

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Zorana Štefanića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

## ***Zahvale***

Zahvaljujem se mentoru, dr. sc. Zoranu Štefaniću, na uloženom trudu i vremenu te brojnim savjetima tijekom izrade i pisanja ovoga rada, posebice u vezi korištenih računalnih metoda. Nadalje, dr. sc. Ivani Lešćić Ašler na pomoći prilikom eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada te također na mnogim korisnim savjetima tijekom pisanja. Zatim, prof.dr.sc. Mariji Luić na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju, te na stručnom vođenju za vrijeme izrade i pisanja rada. Zahvaljujem se i izv.prof.dr.sc. Biljani Balen, na pomoći prilikom pisanja samoga rada kroz smjernice i reviziju rada. Naposljetku, zahvaljujem se prijateljima i posebno obitelji na podršci tijekom cjelokupnog studija.

Ovaj rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta Enzimi purinskog reciklirajućeg ciklusa iz *Helicobacter pylori* i *Escherichie coli* (br. 7423).

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## UTJECAJ FOSFATA NA PROMJENU KONFORMACIJE AKTIVNIH MJESTA ENZIMA PURINSKE NUKLEOZIDNE FOSFORILAZE IZ BAKTERIJE *Helicobacter pylori*

Marta Bošnjaković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Hp*-PNP (purinska nukleozidna fosforilaza iz *Helicobacter pylori*) je ključni enzim pomoćnog metaboličkog puta purina u bakteriji *H. pylori*. Katalizira fosforolitičko cijepanje glikozidne veze u purinskim nukleotidima. Protein je homoheksamer sa 6 aktivnih mjesta u dvije moguće konformacije: zatvorenoj (neophodnoj za odvijanje katalize) i otvorenoj. Cilj rada je bio provjeriti dolazi li do vezanja fosfata (jednog od dva supstrata *Hp*-PNP) u aktivna mjesta enzima, namakanjem kristala u otopinama s rastućom koncentracijom fosfata i utjecaj tog vezanja na konformaciju aktivnog mjesta. Opisan je postupak transformacije bakterija *Escherichia coli* vektorom s ugrađenim *deoD* genom za *Hp*-PNP protein, prekomjerna ekspresija, pročišćavanje kromatografskim metodama, mikrokristalizacijski eksperimenti, te određivanje i utočnjavanje strukture proteina metodom rendgenske difrakcije. Određene su dvije strukture dobivene iz različitih koncentracija fosfata. U strukturi s višom koncentracijom fosfata došlo je do vezanja fosfata u 5 od 6 aktivnih mjesta, ali niti u jednom nije došlo do zatvaranja aktivnog mjesta. U strukturi s nižom koncentracijom fosfata nije došlo do njegovog vezanja i također su sva aktivna mjesta ostala otvorena. Ove strukture su prve određene strukture *Hp*-PNP u kojima vezanje fosfata nije dovelo do promjene konformacije, čime je pokazano da to nije dovoljan uvjet za zatvaranje aktivnog mjesta kod *Hp*-PNP enzima.

(59 stranica, 25 slika, 5 tablica, 55 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: humani patogen, pročišćavanje proteina, kristalizacija proteina, rentgentska strukturalna analiza, heksamerni protein

Voditelj: Dr. sc. Zoran Štefanić

Suvoditelj: Dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.

Ocjenitelji:

1. Dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.
2. Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.
3. Dr. sc. Vesna Benković, izv. prof.

Rad prihvaćen: 01.03.2018.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

## THE INFLUENCE OF PHOSPHATE ON CONFORMATION CHANGE OF THE ACTIVE SITES OF PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE FROM *Helicobacter pylori* BACTERIA

Marta Bošnjaković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

*Hp*-PNP (purine nucleoside phosphorylase from *Helicobacter pylori*) is the key enzyme of salvage pathway of purines in *H. pylori*. It catalyzes phosphorolytic cleavage of the glycosidic bond in purine nucleotides. The protein is a homohexamer with 6 active sites in two possible conformations: closed (essential for catalysis) and open. The aim of the study was to determine phosphate binding (one of two substrates of *Hp*-PNP) by soaking the crystals in solutions with increasing phosphate concentration, and its effect on the conformation of the active sites. This thesis describes transformation of *Escherichia coli* bacteria with *deoD* gene coding for *Hp*-PNP, protein over-expression, chromatography purification, micro-crystallization experiments and X-ray structure determination and refinement. Two structures were obtained from different phosphate concentrations. In the structure with higher phosphate concentration, phosphate binding occurred in 5 out of 6 active sites, but none of the active sites were closed. In the structure with lower phosphate concentration there was no binding and all active sites remained open. These structures are the first determined *Hp*-PNP structures in which the binding of phosphate did not lead to a change of conformation, thus indicating that this is not sufficient condition for closing of the active site in *Hp*-PNP enzyme.

(59 pages, 25 figures, 5 tables, 55 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: human pathogen, protein purification, protein crystallisation, X-ray diffraction, hexamer protein complex

Supervisor: Dr. sc. Zoran Štefanić

Cosupervisor: Dr. sc. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Reviewers:

1. Dr. sc. Biljana Balen, Assoc. Prof.
2. Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.
3. Dr. sc. Vesna Benković, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 01.03.2018.

# Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| 1. Uvod .....   | 1  |
| 1.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....   | 1  |
| 1.1.1. Bakterijski rod <i>Helicobacter</i> .....  | 1  |
| 1.1.2. Gastričke vrste roda <i>Helicobacter</i> .....   | 1  |
| 1.1.3. Osnovne karakteristike bakterije <i>Helicobacter pylori</i> .....                              | 2  |
| 1.1.4. Rasprostranjenost bakterije <i>H. pylori</i> .....   | 3  |
| 1.1.5. Bakterija <i>H. pylori</i> i karcinom želuca .....   | 3  |
| 1.1.6. Tretmani infekcije s bakterijom <i>H. pylori</i> .....   | 4  |
| 1.2. Purinska nukleozidna fosforilaza .....   | 5  |
| 1.2.1. Osnovne karakteristike enzima purinska nukleozidna fosforilaza .....                           | 5  |
| 1.2.2. Podjela proteina purinskih nukleozidnih fosforilaza .....                                      | 5  |
| 1.2.3. Struktura homoheksamera purinske nukleozidne fosforilaze iz bakterije <i>H. pylori</i> .....   | 6  |
| 1.2.4. Struktura monomera purinske nukleozidne fosforilaze iz bakterije <i>H. pylori</i> .....        | 7  |
| 1.2.5. Struktura aktivnog mjesta purinske nukleozidne fosforilaze iz bakterije <i>H. pylori</i> ..... | 8  |
| 1.2.6. Pretpostavljeni mehanizam katalize .....   | 9  |
| 1.2.7. Konformacijska promjena tj. zatvaranje aktivnog mjesta .....                                   | 11 |
| 1.3. Kristalizacija makromolekula .....   | 14 |
| 1.3.1. Nukleacija i rast proteinskih kristala .....   | 14 |
| 1.3.2. Čimbenici koji utječu na rast proteinskih kristala .....                                       | 15 |
| 1.3.3. Svojstva makromolekulskih kristala .....   | 16 |
| 1.3.4. <i>Seeding</i> metoda .....  | 17 |
| 1.4. Određivanje kristalne strukture proteina .....   | 17 |
| 1.4.1. Difrakcija rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu .....                                   | 18 |
| 1.4.2. Rješavanje problema faze .....   | 20 |
| 1.4.3. Simetrija kristala .....   | 21 |
| 1.5. Cilj istraživanja .....  | 21 |

|  |    |
|--|----|
| 2. Materijali i metode .....   | 23 |
| 2.1. Materijali .....  | 23 |
| 2.2. Metode .....  | 23 |
| 2.2.1. Eksperimentalne metode.....   | 23 |
| 2.2.1.1. Pročišćavanje proteina.....   | 23 |
| 2.2.1.1.1. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom.....                                   | 24 |
| 2.2.1.1.2. Priprema prekonoćne kulture .....   | 26 |
| 2.2.1.1.3. Ekspresija proteina.....  | 26 |
| 2.2.1.1.4. Ekstrakcija proteina.....   | 26 |
| 2.2.1.1.5. Pročišćavanje proteina kromatografijom u koloni.....  | 27 |
| 2.2.1.1.6. Filtriranje pufera korištenih u kromatografiji .....  | 28 |
| 2.2.1.1.7. Pakiranje kromatografskih kolona .....  | 28 |
| 2.2.1.1.8. Kromatografija na koloni Q-Sepharose .....  | 28 |
| 2.2.1.1.9. Kromatografija na koloni Sepharose-FA .....   | 29 |
| 2.2.1.1.10. Mjerenje apsorbancije frakcija dobivenih elucijom s kolona Q-Sepharose i Sepharose-FA..... | 30 |
| 2.2.1.1.11. Metoda za određivanje koncentracije proteina po Bradfordu.....                             | 30 |
| 2.2.1.1.12. Mjerenje aktivnosti proteina PNP .....   | 30 |
| 2.2.1.1.13. Natrijev dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza (SDS - PAGE) .....               | 31 |
| 2.2.1.1.14. Bojanje gelova s bojom <i>Coomassie Brilliant blue</i> R-250.....                          | 32 |
| 2.2.1.1.15. Ugušćivanje proteina .....   | 32 |
| 2.2.1.1.16. Dijaliza pročišćenog proteina.....   | 33 |
| 2.2.1.2. Kristalizacija proteina.....  | 33 |
| 2.2.1.2.1. Postavljenje kristalizacija.....  | 33 |
| 2.2.1.2.2. Metoda korištenja klica (engl. <i>seeding</i> ) .....                                       | 34 |
| 2.2.1.2.3. Namakanje kristala u otopinama različitih koncentracija fosfata .....                       | 34 |
| 2.2.1.3. Snimanje kristala na sinkrotronu i na uređaju za rendgensku difrakciju.....                   | 34 |



|   |    |
|---|----|
| 2.2.2. Računalne metode.....  | 35 |
| 2.2.1.2. Određivanje i utočnjavanje struktura .....                             | 35 |
| 3. Rezultati .....  | 36 |
| 3.1. Pročišćavanje proteina .....   | 36 |
| 3.1.1. Apsorbancije frakcija dobivenih s kolona Q-Sepharose i Sepharose-FA..... | 36 |
| 3.1.2. Sažetak pročišćavanja proteina <i>Hp</i> -PNP .....                      | 38 |
| 3.1.3. SDS-PAGE .....   | 39 |
| 3.2. Kristalizacija proteina <i>Hp</i> -PNP .....                               | 40 |
| 3.3. Određivanje strukture .....  | 41 |
| 4. Rasprava .....   | 49 |
| 5. Zaključak .....  | 52 |
| 6. Literatura .....   | 53 |
| 7. Životopis.....   | 59 |

## ***Popis kratica i simbola***

Å – Angstrom ( $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ )

Ado – adenzin

ATP – adenzin trifosfat

APS – amonijev persulfat (engl. *ammonium persulfate*)

BSA – albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)

D2 lampa – deuterijeva lampa u spektrofotometru

DNA – engl. *deoxyribonucleic acid*

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

FA – formicin A

GTP – gvanozin trifosfat

Guo – gvanozin

Hepes – *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina

IMP – inozin monofosfat

Ino – inozin

IPTG – izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid

hranjivi medij LB – hranjivi medij Luria-Bertani

hranjivi medij LBA – hranjivi medij Luria-Bertani s agarom

LMW – engl. *low molecular weight*

MALT – engl. *mucosa associated lymphoid tissue*

m<sup>7</sup>Guo – 7-metilgvanozin

OD<sub>600</sub> – engl. *optical density* (pri valnoj doljini od 600 nm)

PAGE – engl. *polyacrylamide gel electrophoresis*

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PDB – engl. *Protein Data Bank*

PEG – polietilen glikol

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid

PNP – purinska nukleozidna fosforilaza

PPG – polipropilen glikol

ReH<sub>2</sub>O – redestilirana voda

rpm – engl. *rounds per minute*

RMS – kvadratni korijen aritmetičke sredine (engl. *root mean square*)

SDS – natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

TEMED – tetrametiletildiamin

Tris – tris(hidroksimetil)-aminometan

U – jedinica enzimске aktivnosti, količina enzima koja katalizira pretvorbu 1 μmol supstrata u minuti (engl. *unit*)

W lampa – lampa u spektrofotometru sa žarnom niti od volframa



# 1. Uvod

Bakterija *Helicobacter pylori* je patogen koji je prisutan u preko 50% svjetske populacije (Testerman i Morris 2014) i povezan je s mnogobrojnim bolestima želuca i probavnog trakta (kao što su čir i karcinom želuca) (Cao i Yu 2015). Poseban problem u borbi protiv ove bakterije je njezina sve veća rezistencija na postojeće antibiotike, iz koje proizlazi potreba za pronalaženjem alternativnih lijekova (Cao i Yu 2015). Bakterija *H. pylori* nema *de novo* put sinteze purina te se oslanja isključivo na pomoćni metabolički put (engl. *salvage pathway*). Jedan od enzima koji su ključni na tom metaboličkom putu je enzim purinska nukleozidna fosforilaza (PNP) (Liechti i Goldberg 2012). Stoga se inhibicija tog enzima javlja kao mogući put eradikacije same bakterije. Enzim PNP iz bakterije *H. pylori* (*Hp*-PNP) je homoheksamerni protein koji katalizira reakciju cijepanja glikozidne veze ribo- i deoksiribonukleozida u prisutnosti anorganskog fosfata kao drugog supstrata, pri čemu nastaju purinska baza i riboza(deoksiriboza)-1-fosfat (Bzowska i sur. 2000). Heksamer je organiziran kao tri dimera. Monomeri unutar dimera recipročno upotpunjuju aktivno mjesto drugom monomeru s dva aminokiselinska ostatka. Svako od šest aktivnih mjesta može biti u otvorenoj ili zatvorenoj konformaciji, koje se najviše razlikuju po položaju i strukturi jedne od  $\alpha$ -zavojnica (zavojnica H8).

## 1.1. *Helicobacter pylori*

### 1.1.1. Bakterijski rod *Helicobacter*

Rod *Helicobacter* pripada koljenu *Proteobacteria*, glavnom koljenu Gram-negativnih bakterija (Woese 1987; Suzuki i sur. 2016). Vrste ovog roda se mogu podijeliti na dvije glavne skupine, gastričke, odnosno vrste koje mogu kolonizirati želudac te negastričke ili enterohepatičke, vrste koje mogu kolonizirati niže dijelove probavnog trakta (Kusters i sur. 2006).

### 1.1.2. Gastričke vrste roda *Helicobacter*

Sve gastričke vrste roda *Helicobacter* vrlo su pokretne zbog toga što posjeduju flagele, koji im omogućuje veću mobilnost i kretanje prema dijelovima želuca koji imaju neutralnu pH vrijednost, mukozi (Solnich i Schauer 2001). Također posjeduju enzim ureazu koja im omogućuje preživljavanje u kiselim uvjetima unutar želuca. Ureaza katalizira hidrolizu uree na amonijak, zbog čega *H. pylori* uspijeva održati pH vrijednost citoplazme neutralnim (Yoshiyama i Nakazawa 2000). Upravo ove dvije karakteristike, zajedno sa spiralnim

oblikom, omogućuju bakterijama kolonizaciju gastične mukoze. Neutralna pH vrijednost gastične mukoze pogoduje rastu bakterija (Stingl i sur. 2002; Schreiber i sur. 2005).

### 1.1.3. Osnovne karakteristike bakterije *Helicobacter pylori*

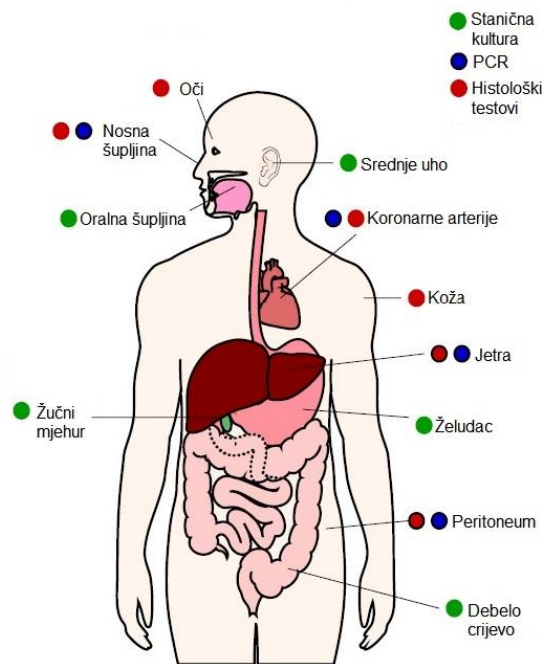
Najviše istraživana bakterija roda *Helicobacter* je vrsta *Helicobacter pylori*, koja je duljine od 2 do 4  $\mu\text{m}$  te debljine od 0.5 do 1  $\mu\text{m}$  (Kusters i sur. 2006). Sadrži dva do šest unipolarnih bičeva dugačkih oko 3  $\mu\text{m}$  s kuglastim proširenjem na kraju, koji služe za pokretanje kroz mukozu koja pokriva gastične epitelne stanice (O' Toole 2000) (Slika 1).



Slika 1. Bakterije *Helicobacter pylori* snimljene elektronskim mikroskopom. Preuzeto i prilagođeno iz Sycuro i sur. (2010.)

*H. pylori* je mikroaerofilna bakterija s optimalnim rastom pri 2 do 5 % kisika, 5 do 10 % ugljikovog dioksida te pri visokoj vlažnosti okoliša (Mendz i sur. 1997). Optimalna temperatura rasta je 37 °C, no rast je moguć i od 37 do 40°C (Kusters i sur. 2006). Neutrofil je, rast je moguć samo pri pH vrijednosti od 5,5 do 8,0, dok je optimalan rast pri pH vrijednosti 7,0 (Stingl i sur. 2002). Kao i mnoge druge enterične bakterije, ne posjeduje sve biosintetičke puteve potrebne za samostalan život (Marais i sur. 1999). Tako nema mogućnost sinteze nekih aminokiselina: arginina, histidina, izoleucina, leucina, metionina, fenilalanina i valina (neki sojevi također i alanina i serina) (Nedenskov 1994). Također, nema sposobnost sinteze purinskih nukleotida *de novo*, točnije inozin monofosfata (IMP), koji služi kao prekursor u sintezi adenozin trifosfata (ATP) i gvanozin trifosfata (GTP) (Liechti i Goldberg 2012). Stoga se oslanja na pomoćni metabolički put, engl. *salvage pathway*.

Glavni organ koji bakterija *H. pylori* kolonizira je želudac, no zamijećena je i u ostalim organima, što je prikazano na Slici 2 (Testerman i Morris 2014).



Slika 2. Mjesta detekcije bakterije *H. pylori* u ljudskom tijelu. Obojenim krugovima je naznačena metoda korištena za detekciju. Preuzeto i prilagođeno iz Testerman i Morris (2014).

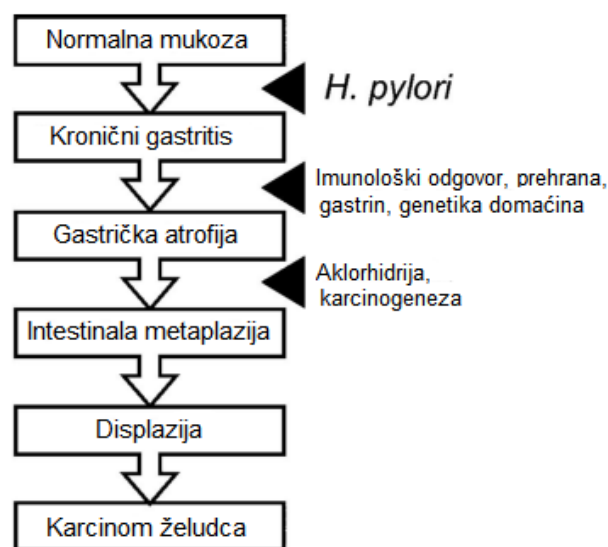
#### 1.1.4. Rasprostranjenost bakterije *H. pylori*

Bakterija *H. pylori* je pronađena gotovo isključivo u ljudima i nekoliko drugih vrsta iz reda primata (Kusters i sur. 2006). Smatra se da je do 40 % ljudske populacije u razvijenijim zemljama zaraženo ovom bakterijom, pri čemu je udio zaraženih manji u djece i adolescenata (Pounder i Ng 1995). Nasuprot tome, u siromašnim područjima, primjerice Africi i Brazilu, 80 do 90 % populacije je zaraženo, čak i mlađe dobi (Perez-Perez i sur. 2004; Suzuki i sur. 2016). Najvjerojatniji način prijenosa je direktnim ljudskim kontaktom s obzirom na visoku osjetljivost *H. pylori* na udio kisika u atmosferi (Mendz i sur. 1997) te na temperaturu preživljenja unutar vrijednosti od 34 °C do 41 °C (Kusters i sur. 2006; Morris i Nicholson 1987).

#### 1.1.5. Bakterija *H. pylori* i karcinom želuca

Povezanost bakterije *H. pylori* s nastankom gastritisa i čira želuca dokazali su Morris, Marshall i Warren (Morris i Nicholson 1987; Marshall i Warren 1984), za što su posljednja dvojica dobila i Nobelovu nagradu 2005. Također, *H. pylori* povećava vjerojatnost nastanka karcinoma želuca i limfoma MALT (engl. *mucosa associated lymphoid tissue*), zbog čega ova bakterija i spada u Grupu 1 karcinogena, zajedno s pušenjem, radijacijom i azbestom (Testerman i Morris 2014). Karcinom želuca povezan s *H. pylori* čini čak 25 % svih

karcinoma povezanih s bakterijskim infekcijama (Mbulaiteye i sur. 2009), te je peti po smrtnosti među karcinomima (Cao i Yu 2015). Na Slici 3 prikazan je model uloge bakterije *H. pylori* i ostalih čimbenika u nastanku karcinoma želuca. Zbog toga što *H. pylori* uzrokuje proinflamatorni odgovor domaćina, što dovodi do oštećenja epitela mukoznih stanica, s vremenom dolazi do upale želučane sluznice odnosno kroničnog gastritisa. Kronični gastritis može dovesti do atrofije želuca, koju karakterizira smanjenje sekrecije želučanih sekreta. Nakon toga slijedi intestinalna metaplazija odnosno histološka i funkcionalna pretvorba epitela želuca u crijevni epitel. Posljednji korak u kaskadi nastanka karcinoma želuca je displazija stanica odnosno povećanje broja nezrelih, nediferenciranih stanica epitela (Kusters i sur. 2006; Solnick i sur. 2002).



Slika 3. Model s prikazom uloge bakterije *H. pylori* i ostalih čimbenika u nastanku karcinoma želuca.

Preuzeto i prilagođeno iz Kusters i sur. (2006), prema Correa i sur. (1975).

Osim uzrokovanja gastrointestinalnih bolesti, ustanovljena je povezanost infekcije bakterijom *H. pylori* s bolestima kao što su anemija uzrokovana manjkom željeza (Monzón i sur. 2013), idiopatska trombocitopenija purpura (Gasbarrini i sur. 1998), ali i s različitim kožnim bolestima, poremećajima kardiovaskularnog sustava, bolestima pluća te autoimunim bolestima (Testerman i Morris 2014).

### 1.1.6. Tretmani infekcije s bakterijom *H. pylori*

Današnji tretman infekcije bakterijom *H. pylori* uključuje najčešće trojnu ili četverostruku terapiju. Trojna terapija uključuje tretman s dva antibiotika i inhibitorom protonskih pumpi, koji zapravo smanjuje lučenje želučane kiseline. Najčešće korišteni antibiotici su klaritromicin, metronidazol te amoksicilin. Četverostruka terapija uključuje još dodatno



tretman s bizmutom, teškim metalom koji ima antibakterijsku aktivnost (Safavi i sur. 2016; Kusters i sur. 2006).

Poseban problem u borbi protiv *H. pylori* je njezina sve veća rezistencija na postojeće antibiotike (Mégraud 2012; Cao i Yu 2015), iz čega onda proizlazi potreba za pronalaženjem alternativnih lijekova. Jedna od alternativnih mogućnosti je inhibicija esencijalnog enzima purinske nukleozidne fosforilaze (PNP), koji je važan enzim u pomoćnom metaboličkom putu dobivanja purina (engl. *salvage pathway*), osnovnih građevnih jedinica molekula DNA i RNA.

## 1.2. Purinska nukleozidna fosforilaza

### 1.2.1. Osnovne karakteristike enzima purinska nukleozidna fosforilaza

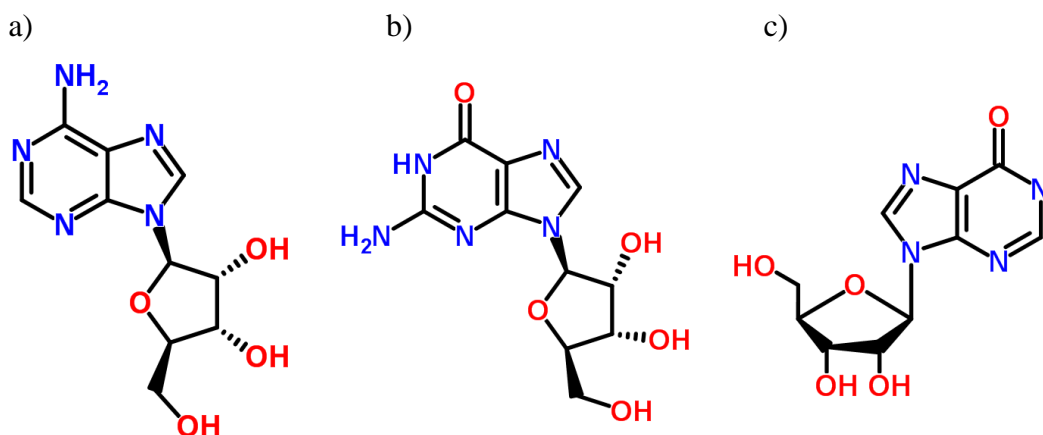
Purinska nukleozidna fosforilaza (PNP) je enzim koji ima ključnu ulogu na putu razgradnje purinskih nukleozida i nekih njihovih analoga. Prisutan je u svim organizmima, od prokariota i protozoa do viših eukariota. Pripada obitelji glikoziltransferaza, točnije, pentoziltransferaza. Katalizira reakciju cijepanja N-glikozidne veze ribo- i deoksiribonukleozida, uz prisutnost drugog supstrata, anorganskog fosfata, pri čemu nastaje purinska baza i riboza(deoksiriboza)-1-fosfat:



Iako je termodinamički ravnoteža reakcije pomaknuta u smjeru sinteze nukleozida, u uvjetima *in vivo* se događa reakcija fosforolize zbog toga što se nastala purinska baza odvodi u daljnje reakcije (Bzowska 2000).

### 1.2.2. Podjela proteina purinskih nukleozidnih fosforilaza

Prema molekularnoj masi, proteine PNP možemo klasificirati u dvije glavne skupine: homotrimeri s malom molekularnom masom od otprilike  $m \sim 80 - 100$  kDa i homoheksameri s velikom molekularnom masom od otprilike  $m \sim 110 - 160$  kDa. Prvi tip je specifičan za katalizu 6-oksopurina i njihovih nukleozida te nekih analoga. Izoliran je iz eukariota, najviše sisavaca (Bzowska 1995; Bzowska 2000), ali i nekoliko mikroorganizama kao što je *Cellulomonas sp.* (Wielgus-Kutrowska i sur. 2002). Drugi tip enzima kao supstrat može koristiti i 6-oksopurine i 6-aminopurine, njihove nukleozide i mnoge analoge. Karakterističan je za većinu bakterija (Bzowska 2000). Primjeri prirodnih supstrata koje PNP može fosforilizirati su adenzin (nukleozid 6-aminopurina), te gvanozin i inozin (nukleozidi 6-oksopurina) (Slika 4).

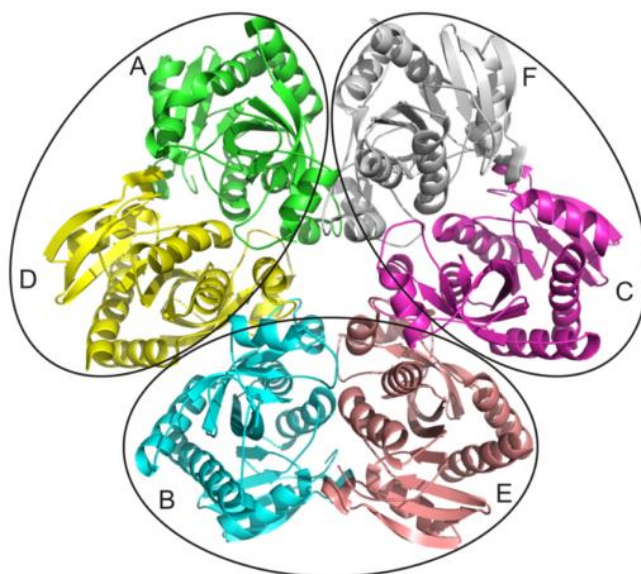


Slika 4. Prirodni nukleozidni supstrati enzima purinske nukleozidne fosforilaze. Pod a) je prikazan adenzin (nukleozid 6-aminopurina), pod b) gvanozin te pod c) inozin (nukleozidi 6-oksopurina).

Preuzeto sa <http://www.chemspider.com/>

### 1.2.3. Struktura homoheksamera purinske nukleozidne fosforilaze iz bakterije *H. pylori*

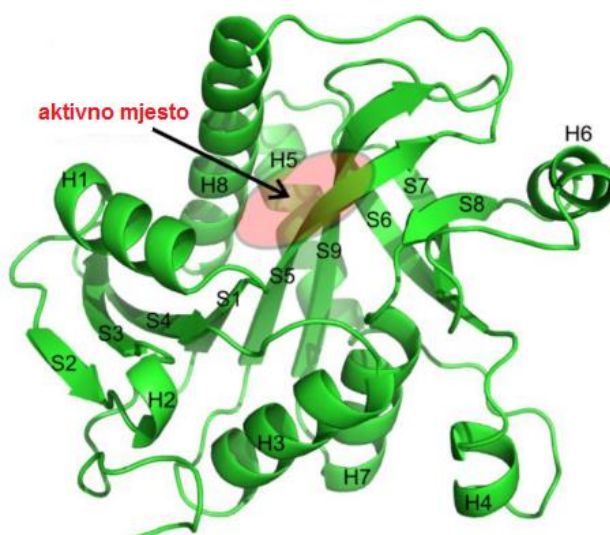
Homoheksamerni PNP iz bakterije *H. pylori* (*Hp*-PNP) je sastavljen od 6 jednakih monomera, od kojih se svaki sastoji od 233 aminokiseline. Molekulska masa monomera je 25786,06 Da a izoelektrična točka je pri pH=8,15 (<https://web.expasy.org/protparam/>, pristupljeno sa UniProt kodom P56463). Heksamer ima oblik diska s promjerom od oko 100 Å i širinom 40 Å (Narczyk i sur. 2018). Svakom monomeru su za aktivnost potrebne aminokiseline His4 i Arg43 iz drugog monomera kako bi aktivno mjesto bilo potpuno. Rotacijom monomera za 180° nastaje dimer u kojem svaki monomer recipročno daje drugome aminokiseline potrebne za sastavljanje aktivnog mjesta. Heksamer se dobije rotacijom dimera oko glavne osi za 120°. Stoga možemo reći da je heksamer proteina PNP zapravo trimer dimera (Slika 5) (Luić i Štefanić 2016; Štefanić i sur. 2017).



Slika 5. Heksamerna struktura proteina PNP. Heksameri se mogu zapravo prikazati kao trimeri dimera, označeno elipsama. Lanci A i D, B i E te C i F tvore dimere. Preuzeto i prilagođeno iz Luić i Štefanić (2016).

#### 1.2.4. Struktura monomera purinske nukleozidne fosforilaze iz bakterije *H. pylori*

Monomeri *Hp*-PNP se sastoje od  $\beta$ -ploče u središnjem dijelu proteina i osam  $\alpha$ -zavojnica koje okružuju  $\beta$ -ploču.  $\beta$ -ploča se sastoji od devet  $\beta$ -lanaca (S1-S9). Lanci S5-S9 tvore  $\beta$ -bačvu. Aktivno mjesto svakog monomera se nalazi između  $\alpha$ -zavojnica H1 i H8 na jednoj strani i  $\beta$ -lanaca S5 i S9 na drugoj strani (Slika 6) (Štefanić i sur. 2017). Djelomično je otvoreno prema površini kako bi se omogućio ulazak supstrata.



Slika 6. Struktura monomera proteina *Hp*-PNP (Protein Data Bank, PDB kod strukture je 5MX4). Položaj aktivnog mjesta je označen ružičastim obojenjem. Preuzeto i prilagođeno iz Štefanić i sur. (2017).

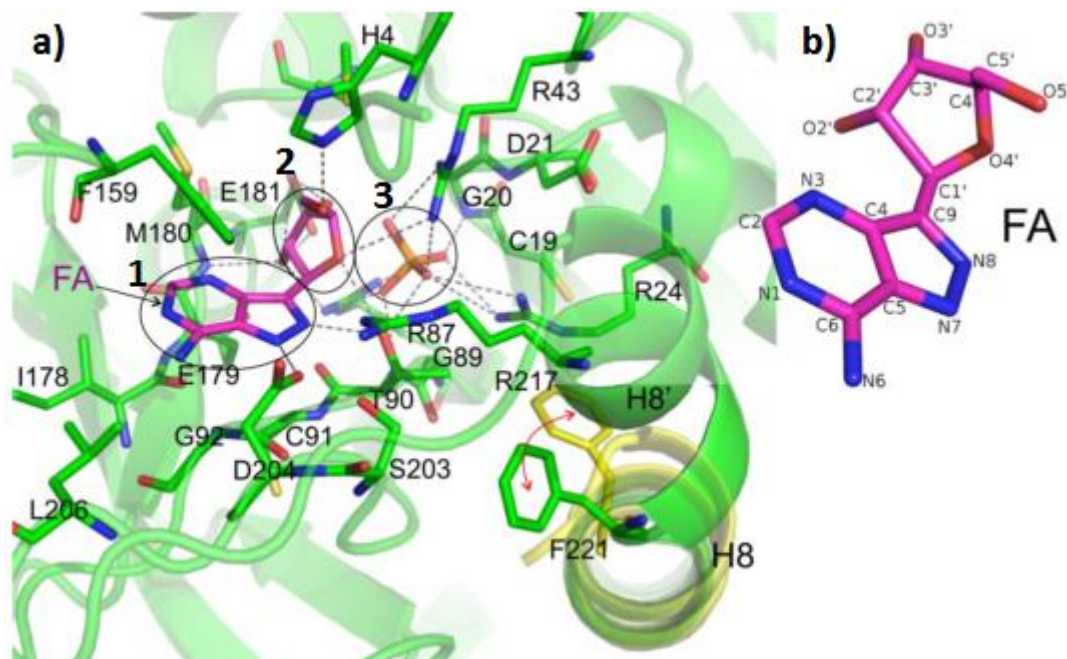
### 1.2.5. Struktura aktivnog mjesta purinske nukleozidne fosforilaze iz bakterije *H. pylori*

Aktivno mjesto proteina *Hp*-PNP se sastoji od tri glavna dijela: vezno mjesto za fosfat, vezno mjesto za pentozu (ribozu ili deoksiribozu), te vezno mjesto za purinsku bazu.

Džep u koji se veže fosfat je zapravo pozitivno nabijen zbog tri argininska ostatka, Arg87, Arg24 i Arg43. Arg43 je jedna od dvije aminokiseline koju monomeru donira susjedni monomer iz dimera. Osim s argininima, ion fosfata tvori još i vodikove veze s Gly20 i Thr90 (Slika 7, a, položaj označen brojem tri). Simulacijama molekulske dinamike je potvrđeno da Arg24, Thr90 i Arg43 imaju najveću ulogu u smještanju fosfata (Narczyk i sur. 2018). Prilikom usporedbe zatvorene konformacije aktivnog mjesta proteina PNP iz bakterije *Escherichia coli* (PDB kod 1K9S) i zatvorenog aktivnog mjesta iz *Hp*-PNP (PDB kod 5MX8) pokazano je vrlo dobro preklapanje položaja fosfata u aktivnim mjestima (Štefanić i sur. 2017).

Odmah do veznog mjesta za fosfat, nalazi se vezno mjesto za pentozu. Vezno mjesto za pentozu prikazano je na Slici 7a, na položaju označenom brojem dva u strukturi *Hp*-PNP proteina u kompleksu s formicinom A (formicini su inače prirodni antibiotici). Formicin A je inhibitor proteina PNP, strukturni analog adenzina u kojem je N-glikozidna C-N veza između purinske baze i riboznog ostatka zamijenjena C-C vezom (Slika 7b). Vezno mjesto čine slijedeći aminokiselinski ostaci: Arg87, Thr90, Met64, Met180, Glu181 te His4 iz susjednog monomera iz dimera (Štefanić 2017). Smještanju pentoze najviše pridonosi aminokiselina Glu181, koja ostvaruje vodikove veze s kisikovim atomima riboze na položajima 2' i 3', zatim His4 s kisikom na položaju 5' te Thr90 s kisikom na položaju 4' (Slika 7a, položaj označen brojem dva) (Narczyk i sur. 2018).

Vezno mjesto za bazu je zapravo hidrofobni džep kojeg čine aminokiselinski ostaci Cys91, Gly92, Met180, Ile178, Leu206 i Phe159 (Slika 7a, položaj označena brojem jedan). Fenilalanin tvori specifičnu vrstu tzv. *stacking* interakciju s purinskom bazom (Štefanić i sur. 2017). Aminokiselina Asp204 ostvaruje jednu ili dvije vodikove veze s bazom, pri čemu je najvažnija ona sa 6-amino grupom purinskog nukleozida. Molekulskim simulacijama je pokazano da su najvažniji aminokiselinski ostaci za smještanje već spomenuti Thr90 i Phe159, ali i Glu181 (Narczyk i sur. 2018).



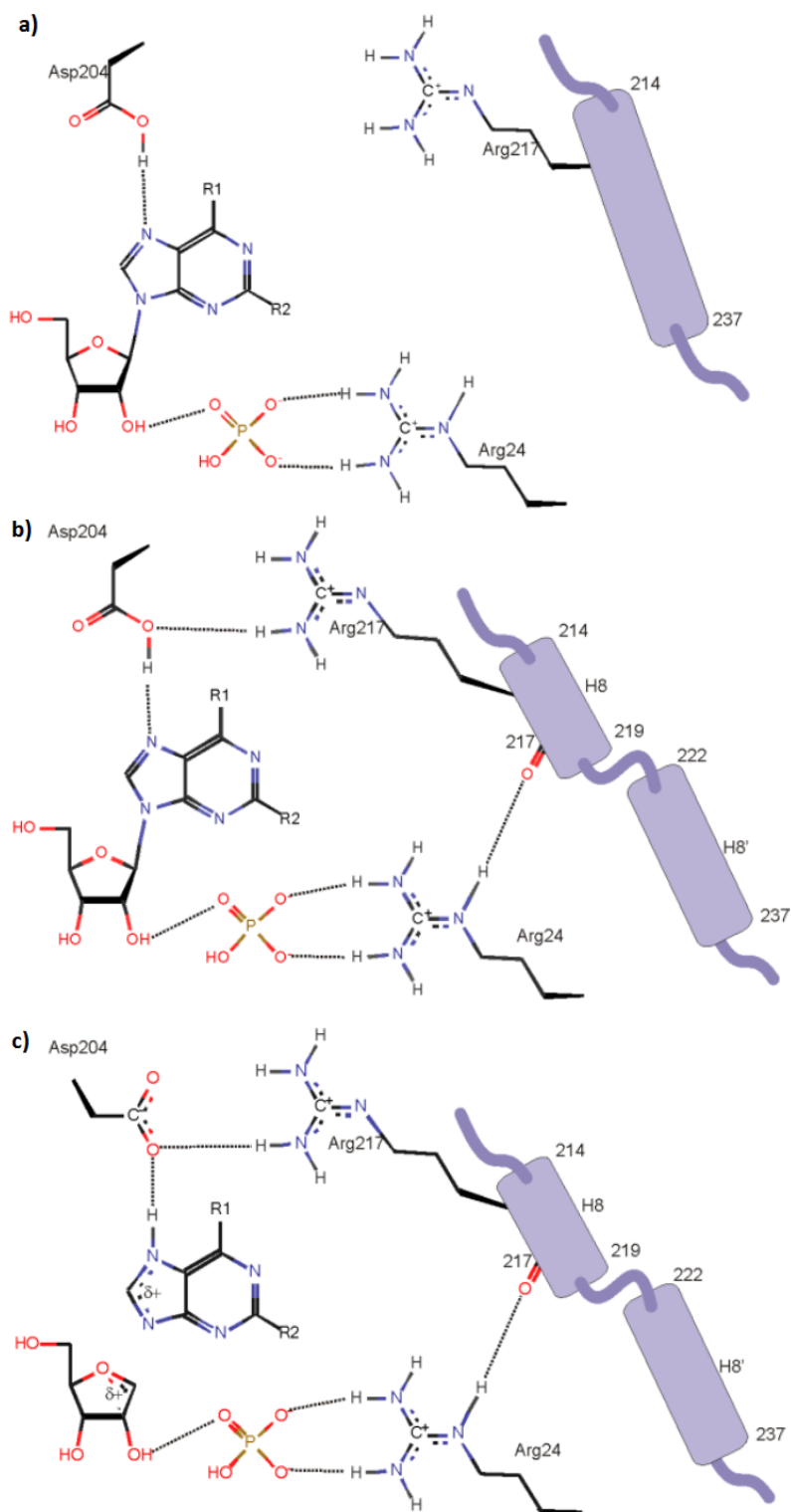
Slika 7. a) Struktura aktivnog mjesta proteina *Hp*-PNP (PDB kod 6F4X). Polarni kontakti su prikazani sivim isprekidanim crticama. Vezno mjesto za fosfat (označeno brojem tri) je pozitivno nabijeno zbog tri argininska ostatka. Fosfat dodatno ostvaruje još dva kontakta s Gly20 i Thr90. Vezno mjesto za ribozu je označeno brojem dva. Ribozu ostvaruje kontakte s His4, Thr90, Glu181, Arg43, Arg87 i Met180. Brojem jedan je označeno vezno mjesto za bazu koje je hidrofobnog karaktera. Phe159 ostvaruje tzv. *stacking* interakcije s jedne strane baze dok se s druge nalaze aminokiselinasti ostaci Gly92, Cys91 i Thr90. Preuzeto iz Narczyk i sur. (2018).

b) Prikaz strukture formicina A i numeracije atoma. Preuzeto iz Narczyk i sur. (2018).

### 1.2.6. Pretpostavljeni mehanizam katalize

Mehanizam katalize proteina PNP još uvijek nije u potpunosti rasvijetljen. Pretpostavljen je za protein PNP iz bakterije *E. coli* i može se opisati u tri koraka (Bzowska i sur. 1993; Kline i Schramm 1993; Koellner i sur. 2002).

- 1) U prvom koraku, bočni lanac Asp204 protonira purinsku bazu na položaju N7 (Slika 8a).
- 2) U drugom koraku vezanje fosfata stabilizira inače fleksibilni bočni lanac Arg24 i omogućava posredno segmentaciju zavojnice H8. Aktivno mjesto je sada zatvoreno, ali još uvijek ima dovoljno prostora za ulazak drugog supstrata, purinskog nukleozida, iako postoji i mogućnost da dolazi do ponovnog otvaranja (Slika 8b).
- 3) U trećem koraku, zbog konformacijske promjene koja se dogodila, gvanidinska skupina Arg217 dođe u kontakt s Asp204. Dolazi do prijenosa protona, nakon čega slijedi formiranje ionskog mosta između Arg217 i Asp204. Pozitivan naboj nastao na purinskoj bazi dovodi do nastajanja prijelaznog stanja u cijepanju glikozidne veze, okso-karbenijevog iona riboze (Slika 8c).



Slika 8. Mehanizam reakcije cijepanja glikozidne veze purinskih nukleozida pomoću enzima PNP u *E. coli*. Pod a) je prikazana otvorena konformacija aktivnog mjesta i vodikova veza između bočnog lanca Asp204 i N7 atoma nukleozida. Pod b) dolazi do zatvaranja aktivnog mjesta, segmentacije  $\alpha$ -zavojnice i približavanja bočnog lanca Arg217 te stabilizacije Arg24 vezanjem fosfata. Pod c) dolazi do prijenosa protona s bočnog lanca Asp204 na N7 položaj baze i formiranja ionskog mosta između Arg217 i Asp204. Preuzeto iz Štefanić i sur. (2013).

### 1.2.7. Konformacijska promjena tj. zatvaranje aktivnog mjesta

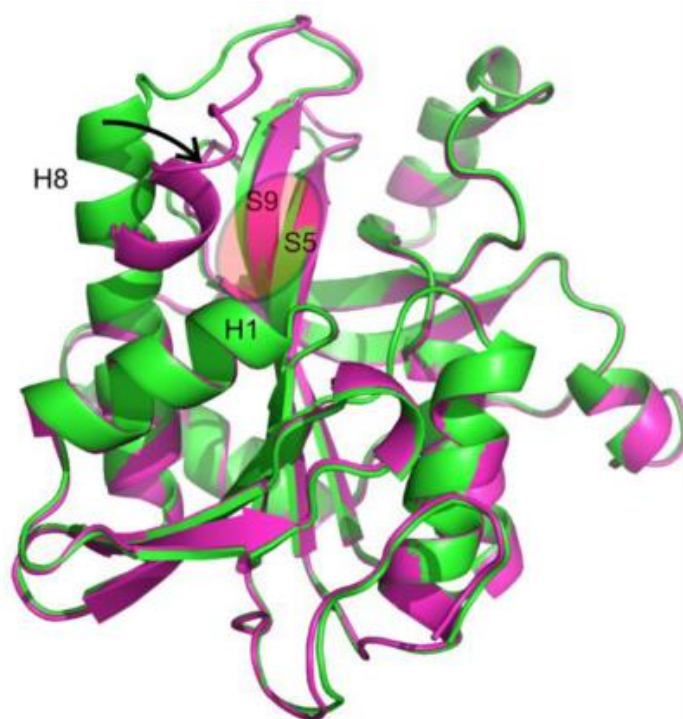
Smatra se da vezanje fosfata dovodi do konformacijske promjene tj. zatvaranja aktivnog mjesta proteina PNP (Kierdaszuk i sur. 1997; Mikleušević i sur. 2011; Luić i Štefanić 2016; Štefanić i sur. 2017; Narczyk i sur. 2018). Najveća promjena koja se zamjećuje na razini strukture monomera je da dolazi do pomicanja N-terminalnog kraja  $\alpha$ -zavojnice H8 prema središtu aktivnog mjesta (Slika 9). Štoviše, dolazi do njezine segmentacije na dva dijela na poziciji Phe221. Aminokiselinski ostaci u području od 214 do 220 tvore manju  $\alpha$ -zavojnicu koja se primiče aktivnom mjestu i time ga djelomice zatvara i tvori tzv. zatvorenu konformaciju. Ova konformacijska promjena omogućava da se Arg217 (koji se zapravo nalazi u sredini segmentirane  $\alpha$ -zavojnice) primakne centru aktivnog mjesta i dođe u blizinu Arg204 što je i prikazano na Slici 10 u usporedbi sa strukturom proteina PNP iz *Bacillus subtilis*. Za usporedbu je korišten protein PNP iz *B. subtilis* (PDB kod 4DAB) zbog toga što je u kompleksu sa hipoksantinom kao i *Hp*-PNP (PDB kod 5MX8) (Bzowska i sur. 2002; Štefanić i sur. 2017). Hipoksantin je derivat purina koji zajedno s ribozom gradi inozin. U nekim do sada riješenim kristalnim strukturama proteina *Hp*-PNP zamijećena je i prijelazna konformacija između u potpunosti zatvorene i otvorene, u kojoj je zavojnica H8 manje primaknuta aktivnom mjestu (Narczyk i sur. 2018).

Svako od šest aktivnih mjesta u heksamernu može biti ili u zatvorenoj ili u otvorenoj konformaciji. Postoji negativna kooperativnost vezanja fosfata u aktivna mjesta heksamera, što znači da vezanje fosfata u jedno aktivno mjesto otežava vezanje fosfata u drugo aktivno mjesto. Do sada nije objašnjeno koji je mehanizam prijenosa ove informacije između monomera u dimeru i dimera u heksamernu (Kierdaszuk i sur. 1997; Koellner i sur. 2002; Mikleušević i sur. 2011). Najučestaliji odnos između broja otvorenih i zatvorenih aktivnih mjesta je (otvorena+zatvorena): 6+0, 3+3, 4+2 i 0+6 (Luić i Štefanić 2016), a nedavno je uočena i konformacija 5+1 upravo u proteinu *Hp*-PNP (Štefanić i sur. 2017). U Tablici 1. su navedene do sada određene strukture proteina *Hp*-PNP i odnos otvorenih i zatvorenih konformacija monomera u jednom heksamernu (Štefanić i sur. 2017; Narczyk i sur. 2018).

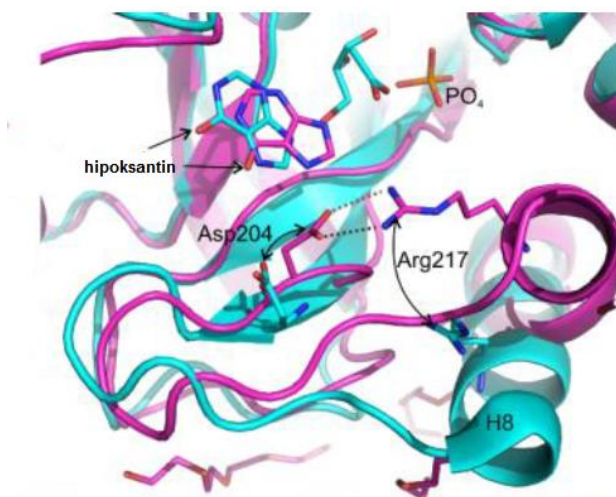
Tablica 1. Raspodjela otvorenih i zatvorenih konformacija aktivnog mjesta enzima *Hp*-PNP s obzirom na prisutnost različitih liganada. Preuzeto iz Štefanić i sur. (2017) i Narczyk i sur. (2018).

| <b>PDB kod</b> | <b>Konfiguracija aktivnih mjesta u heksameru (broj otvorenih + broj zatvorenih)</b> | <b>Ligandi (u aktivnom mjestu)</b>   |
|----------------|---|--|
| <b>5MX4</b>    | 5+1   | Hipoksantin i fosfat u zatvorenom aktivnom mjestu  |
| <b>5MX6</b>    | 5+1   | Hipoksantin i fosfat/sulfat u svim aktivnim mjestima   |
| <b>5MX8</b>    | 0+6   | Hipoksantin i fosfat u svim aktivnim mjestima  |
| <b>6F52</b>    | 6+0   | -  |
| <b>6F5A</b>    | 6+0   | -  |
| <b>6F5I</b>    | 5+1   | -  |
| <b>5LU0</b>    | 2+4   | Fosfat u zatvorenim aktivnim mjestima, molekula TRIS-a u svim aktivnim mjestima  |
| <b>6F4W</b>    | 6+0   | Formicin A u svim aktivnim mjestima  |
| <b>6F4X</b>    | 1+3(poluzatvorena konformacija)+2   | Dva aktivna mjesta s fosfatom i formicinom A su zatvorena, jedno aktivno mjesto s formicinom A je otvoreno, dva aktivna mjesta s formicinom A su djelomično zatvorena jednako kao i aktivno mjesto s formicinom A i parcijalnom elektronskom gustoćom koja ukazuje na prisutnost fosfata |





Slika 9. Preklopljene strukture otvorene (prikazane zelenom bojom) i zatvorene (prikazane ružičastom bojom) konformacije proteina *Hp*-PNP (PDB kod strukture je 5MX4). Položaj aktivnog mjesta je označen ružičastom bojom. Preuzeto iz Štefanić i sur. (2017).



Slika 10. Preklopljene strukture zatvorenog aktivnog mjesta *Hp*-PNP (prikazano ružičastom bojom, PDB kod 5MX8) i otvorenog aktivnog mjesta proteina PNP iz bakterije *B. subtilis* (prikazano tirkiznom bojom, PDB kod 4DAB). U oba aktivna mjesta je vezan hipoksantin, a u proteinu *Hp*-PNP i fosfat. Najveće razlike se zamjećuju u pomaku hipoksantina, Asp204 i Arg217. Isprekidanim crticama su prikazane vodikove veze između spomenutih aminokiselina. Preuzeto i prilagođeno iz Štefanić i sur. (2017).

### **1.3. Kristalizacija makromolekula**

Za određivanje strukture proteina PNP korištena je metoda difrakcije rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu. Metoda rendgenske difrakcije nam omogućava da odredimo strukturu proteina na atomskoj razini. Kao nužan preduvjet za tu metodu potrebno je kristalizirati protein koji se istražuje. Za kristalizaciju proteina, potrebno je prirediti visoko pročišćeni protein i to u koncentraciji od 10 do 50 g L<sup>-1</sup> (McPherson 2009). Slijedeći korak, koji se još uvijek velikim dijelom temelji na metodi pokušaja i pogrešaka, je pronalaženje kristalizacijskih uvjeta. Nakon što se dobiju kristali proteina (veličine približno 0,1 mm i veće), slijedi prikupljanje niza difrakcijskih slika na rendgenskom difraktometru ili sinkrotronu, što ovisi o veličini kristala i kvaliteti difrakcije. Iz difrakcijskih podataka se, naposljetku, korištenjem cijelog niza vrlo zahtjevnih računalnih metoda rekonstruira trodimenzijska struktura proteina.

#### **1.3.1. Nukleacija i rast proteinskih kristala**

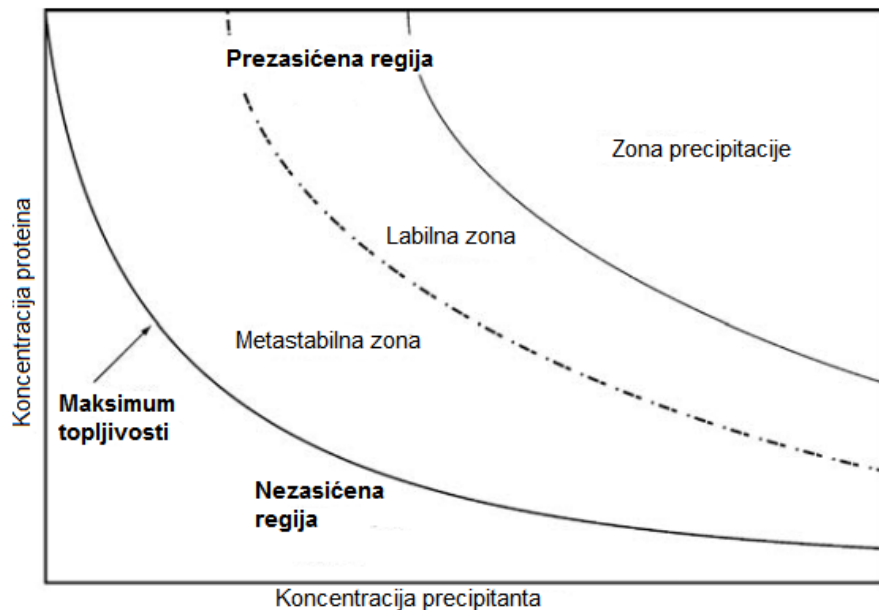
Osnovni termodinamički princip na kojem počiva kristalizacija je potreba za smanjenjem slobodne Gibbsove energije sustava. U kristalima, ali i u amorfnim precipitatima, to se postiže stvaranjem dodatnih interakcija između molekula koje kao takve ne postoje kada su molekule u otopini, što dovodi do smanjenja entalpije i Gibbsove slobodne energije. U kristalima su te interakcije najpovoljnije i nastaje ih najviše.

Dva ključna koraka u kristalizaciji su nukleacija i rast kristala. Za oba koraka je nužno imati sustav u neravnoteži odnosno prezasićenu otopinu. Sustav se može dovesti u neravnotežu primjerice isparavanjem otapala, snižavanjem temperature ili dodatkom precipitanta. Do prestanka rasta kristala dolazi u zasićenoj otopini, kada su čvrsta tvar (kristal) i otopljena tvar (molekule proteina u otopini) u dinamičkoj ravnoteži.

Na Slici 11 je prikazan fazni dijagram rasta kristala. Naznačene su tri glavne regije, nezasićena, prezasićena te zasićena između dviju prethodnih pri kojoj je čvrsta tvar u ravnoteži s otopljenom tvari.

Prezasićena regija je podijeljena na labilnu zonu u kojoj je moguća nukleacija i rast kristala, metastabilnu zonu, u kojoj je vjerojatnost za nukleaciju mala ali je rast moguć, te na zonu precipitacije u kojoj nastaju isključivo precipitati. Većina nukleusa i agregata koji nastanu nisu stabilni, već brzo dolazi do njihovog ponovnog otapanja. Za rast kristala potrebno je da prvo nastane stabilni nukleus. Stabilni nukleus se definira kao uređeni molekulski agregat takve veličine i fizikalnih svojstava da ima sposobnost ostvarivanja interakcija s molekulama proteina iz otopine. Također je nužno da zadržava molekule proteina iz otopine brže nego što

dolazi do uklanjanja drugih molekula proteina s njegove površine (McPherson 2009). Takav nukleus raste sve dok je otopina u stanju prezasićenosti. Nije poželjno da je sustav predaleko u labilnoj zoni prezasićene regije. Vjerojatnost za nukleaciju je tada veća kao i brzina rasta, no upravo zbog toga dolazi do nastanka većeg broja stabilnih nukleusa i posljedično manjih kristala. Također, brzi rast kristala povećava vjerojatnost nastajanja defekata, dislokacija te vezanja nečistoća (McPherson 2009).



Slika 11. Fazni dijagram kristalizacije prikazan kao ovisnost koncentracije proteina o koncentraciji precipitanta. Sastoji se od tri regije, nezasićene, prezasićene i ravnotežnog područja koje ih odvaja. Ravnotežno područje označava područje maksimalne topljivosti. Pri toj koncentraciji otopljene tvari, čvrsto stanje tvari je u ravnoteži s molekulama tvari u otapalu. Prezasićena regija je podijeljena na labilnu zonu, u kojoj je moguća nukleacija i rast kristala; metastabilnu zonu, u kojoj je vjerojatnost za nukleaciju mala, ali rast je moguć; te na zonu precipitacije, u kojoj nastaju isključivo precipitati.

Preuzeto i prilagođeno iz McPherson (2009).

### 1.3.2. Čimbenici koji utječu na rast proteinskih kristala

Čimbenici koji utječu na rast proteinskih kristala navedeni su u Tablici 2. Dije se na tri osnovna tipa: fizikalni, kemijski i biokemijski. pH vrijednost kao kemijski čimbenik ima veliki utjecaj na kristalizaciju proteina zbog toga što se pri različitim vrijednostima pH mijenja distribucija naboja na proteinu, odnosno dipolni moment, a time i konformacija proteina. Temperatura (fizikalni čimbenik) također utječe na konformaciju proteina, ali i na nukleaciju i rast kristala mijenjanjem topljivosti proteina i prezasićenosti otopine. Precipitanti (kemijski čimbenik), koji se koriste za kristalizaciju mogu se podijeliti u četiri osnovne skupine: soli (litijev sulfat, natrijev citrat, amonijev citrat, natrijev fosfat itd.), hlapljiva

organska otapala (etanol, aceton, metanol itd.), polimeri (poli(etilen glikol), poliamin itd.) i nehlapljiva organska otapala (2,5-heksandiol itd.). Precipitanti su u kompeticiji s molekulama proteina za vodu. Njihovim dodatkom se zapravo smanjuje topljivost proteina i potiče kristalizacija. Jedan od osnovnih biokemijskih čimbenika koji utječe na kristalizaciju i na kvalitetu kristala je čistoća i homogenost proteina. Nečistoće pridonose sporijem rastu, lošijoj kvaliteti nastalih kristala i pojavi artefakata. Sličan utjecaj ima i niska homogenost proteinskih molekula. Posttranslacijske modifikacije, denaturacije, proteolitičko djelovanje ili kemijske modifikacije proteina također uvode nepravilnosti u kristal, koje kad se akumuliraju, dovode do nastanka defekata u kristalu.

Tablica 2. Čimbenici koji utječu na rast proteinskih kristala. Preuzeto i prilagođeno iz McPherson (2009).

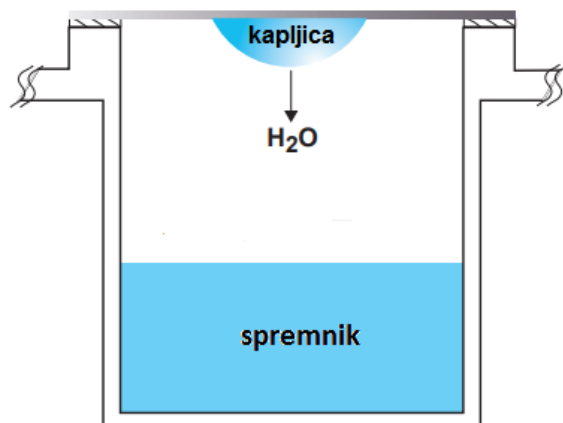
| Fizikalni                                   | Kemijski                                   | Biokemijski                       |
|---|--|-----------------------------------|
| 1. Temperatura                              | 1. pH vrijednost                           | 1. Čistoća makromolekule          |
| 2. Površina                                 | 2. Vrsta precipitanta                      | 2. Ligandi, inhibitori, efektori  |
| 3. Gravitacija                              | 3. Koncentracija precipitanta              | 3. Posttranslacijske modifikacije |
| 4. Tlak                                     | 4. Ionska snaga                            | 4. Izvor makromolekule            |
| 5. Vrijeme                                  | 5. Specifični ioni                         | 5. Proteoliza/hidroliza           |
| 6. Vibracije/zvukovi/mehaničke perturbacije | 6. Stupanj prezasićenosti                  | 6. Kemijske modifikacije          |
| 7. Elektrostatsko/magnetsko polje           | 7. Reduktivna/oksidativna svojstva okoliša | 7. Genetičke modifikacije         |
| 8. Dielektrična svojstva matičnice          | 8. Koncentracija makromolekule             | 8. Simetričnost makromolekule     |
| 9. Viskoznost matičnice                     | 9. Metalni ioni                            | 9. Stabilnost makromolekule       |
| 10. Konstanta ravnoteže                     | 10. Deterdženti/surfaktanti                | 10. Izolelektrična točka          |
| 11. Homogena i heterogena nukleacija        | 11. Nečistoće                              | 11. Starost uzorka                |

### 1.3.3. Svojstva makromolekulskih kristala

Makromolekulski kristali sadrže prosječno 50 % otapala, ali ova vrijednost može varirati od 25 do 90 % ovisno o tipu makromolekule (Matthews, 1968). Kako se kristali snimaju na niskim temperaturama, da bi se izbjeglo njihovo pucanje uslijed stvaranja leda, potrebno je vodu zamijeniti nekim krioprotektantom (primjerice glicerol). To se radi namakanjem kristala u otopini krioprotektanta. No, upravo zbog velike količine otapala i postojanja vodenih kanala između proteinskih molekula, proteini zadržavaju svoju dinamičnost, odnosno biokemijske karakteristike kao primjerice enzimsku aktivnost čak i u kristalu (Finney 1977).

Kristali makromolekula su zbog velikog udjela vode puno osjetljiviji od kristala malih molekula na promjene pH vrijednosti i temperature, stoga se metode započinjanja nukleacije i

rasta kristala razlikuju. Metoda korištena za dobivanje kristala u ovom radu je metoda strujanja para korištenjem tehnike viseće kapi. U ovoj metodi se kapljica koja sadrži pročišćeni protein, pufer i precipitant ostavi da se uravnoteži s otopinom u spremniku koja sadrži isti pufer i precipitant u većoj koncentraciji (Slika 12). Na taj način je omogućeno postupno povećavanje koncentracije proteina u kapljici, što može inducirati nastanak kristala.



Slika 12. Metoda kristalizacije makromolekula strujanjem para tehnikom viseće kapi. Preuzeto i prilagođeno s [https://hamptonresearch.com/documents/growth\\_101/3.pdf](https://hamptonresearch.com/documents/growth_101/3.pdf)

#### 1.3.4. *Seeding* metoda

Ako spontano u prezasićenoj otopini ne dolazi do nastanka stabilnih nukleusa, kristalizaciju je ponekad moguće pokrenuti metodom korištenja klica (engl. *seeding*) - dobivenih od kristala iz kapljica u kojima su oni prethodno nastali. Prema veličini kristala korištenih za *seeding*, razlikujemo dva tipa ove metode: *seeding* pomoću makrokristala - pogodnih za manipulaciju pod mikroskopom, te *seeding* sa mikrokristalima - dodatkom sitnih kristala pomoću otopine.

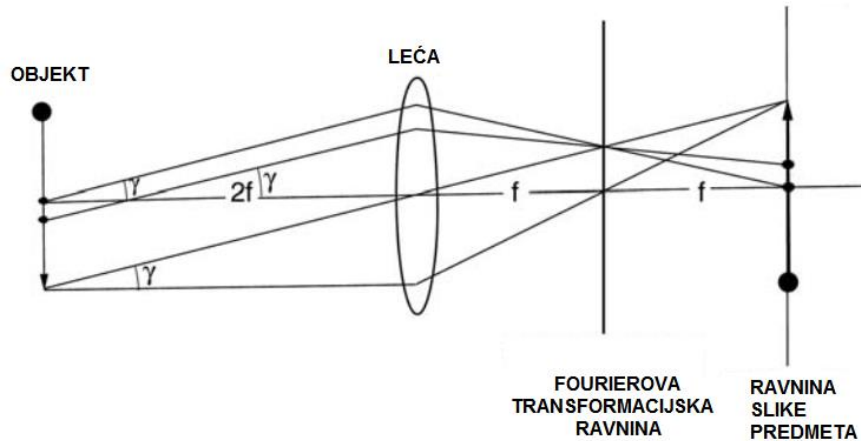
### 1.4. Određivanje kristalne strukture proteina

Rendgenska kristalografija omogućava određivanje strukture molekula na atomskoj razini. Poznavanje trodimenzijske strukture proteina ključno je za razumijevanje njegove funkcije. Nadalje, iz struktura proteina i njegovih kompleksa (bilo s drugim proteinima ili s malim molekulama kao što su supstrati i inhibitori) saznajemo kako proteini interagiraju međusobno, vidimo njihove konformacijske promjene, te možemo dobiti informacije o mehanizmu njihovog djelovanja. U proteinskoj kristalografiji najčešće se koriste rendgenske zrake valnih duljina od 0.5 do 3 Å. Osobita je prednost korištenja baš tih valnih duljina što su reda veličine međuatomskih razmaka te zato omogućavaju da se razluče detalji na atomskoj razini. Slaganje proteinskih molekula u kristal primarno služi pojačavanju difrakcijskog signala koji bi dala samo jedna molekula.

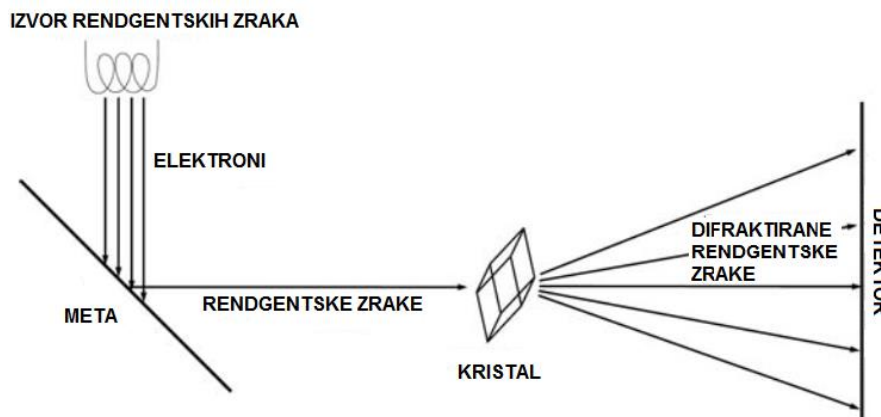
### 1.4.1. Difrakcija rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu

Rendgenske zrake prolaze kroz kristal i raspršuju se na elektronskim oblacima atoma. No, za razliku od vidljive svjetlosti, za raspršeno rendgensko zračenje ne postoji leća koja može zrake na analogni način fokusirati kako bismo dobili sliku (Slika 13). Dio uloge leće preuzima sam kristal na način da daje difrakcijski uzorak iz kojeg se onda matematičkim postupkom, poznatim pod nazivom Fourierova transformacija, može dobiti slika predmeta.

a)

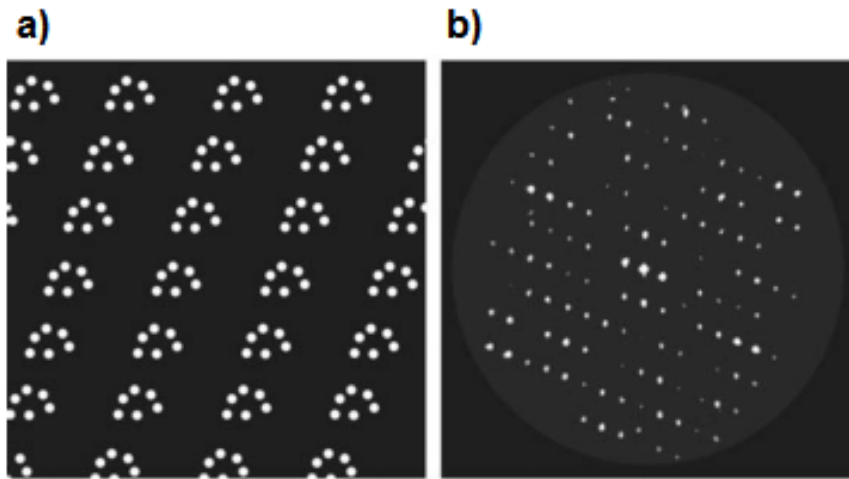


b)



Slika 13. Pod a) je prikazano stvaranje difrakcijskog uzorka (Fourierova transformacija) pomoću leće s fokalnom udaljenošću  $f$ . Zrake svjetlosti koje se raspršuju pod istim kutom (označenim s grčkim slovom  $\gamma$ ) s obzirom na ravninu objekta s kojeg se raspršuju, konvergiraju na Fourierovoj ili transformacijskoj ravnini. Pod b) je prikazan nastanak rendgenskog zračenja te difrakcija zračenja na kristalu. Rendgenske zrake nastaju udarom elektrona u metu u čijem je sastavu čisti metal (npr. bakar). Dobiveno monokromatsko, paralelno zračenje se usmjeri prema kristalu te se na detektoru prikupe podaci o difrakcijskom uzorku. Preuzeto i prilagođeno iz McPherson (2009).

Zbog pravilnog rasporeda molekula u kristalu i njihovog periodičnog ponavljanja, prolazak rendgenskih zraka kroz kristal dati će difrakcijski uzorak u obliku niza točaka (koje nazivamo refleksi) u različitim smjerovima. Refleksi su diskretno raspoređeni zbog toga što raspršene rendgenske zrake konstruktivno interferiraju samo u smjerovima koji su definirani s periodičnošću kristalne rešetke, u ostalim smjerovima dolazi do destruktivne interferencije i gašenja signala (Slika 14).

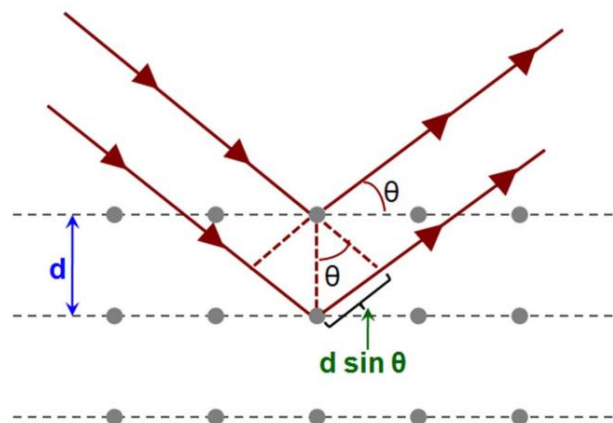


Slika 14. Pod a) je prikazano periodično ponavljanje diskretnog seta točaka (predstavlja atome u molekuli). Pod b) je prikazan optički difrakcijski uzorak slike pod a). Preuzeto iz McPherson (2009).

Uvjet konstruktivne interferencije je da razlika puteva dvaju zraka koje se reflektiraju od dviju različitih ravnina u kristalu bude jednaka cjelobrojnom umnošku valnih duljina rendgenskog zračenja. Matematički je to iskazano kroz fundamentalnu relaciju u kristalografiji, Braggov zakon, koji glasi:

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

gdje je  $\lambda$  valna duljina ulaznog vala,  $d_{hkl}$  je razmak između tzv. Millerovih ravnina  $hkl$ , a  $\theta$  je iznos ulaznog i izlaznog kuta zrake. Do konstruktivne interferencije dolazi samo ako je  $n$  cijeli broj (Slika 15). Svaki difrakcijski maksimum je stoga posljedica konstruktivne interferencije svih valova raspršenih na svim atomima u kristalu. Skup Millerovih ravnina indeksa  $(hkl)$  presijeca osi jedinične ćelije  $a$ ,  $b$  i  $c$  u točkama  $a/h$ ,  $b/k$  i  $c/l$ . Udaljenost među tim Millerovim ravninama iznosi  $d_{hkl}$ .



Slika 15. Prikaz Braggovog zakona. Preuzeto i prilagođeno s [http://reference.iucr.org/dictionary/Main\\_Page](http://reference.iucr.org/dictionary/Main_Page).

Kao konačni rezultat difrakcijskog mjerenja dobiva se niz intenziteta za svaki pojedini skup Millerovih ravnina ( $I_{hkl}$ ) za sve cjelobrojne indekse  $h$ ,  $k$  i  $l$ . Intenzitet svakog pojedinog refleksa izravno ovisi o rasporedu elektronske gustoće u kristalu, a samim time i o položajima atoma. Svaki intenzitet koji dobivamo u difrakcijskom eksperimentu je proporcionalan kvadratu amplitude tzv. strukturnog faktora ( $I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2$ ). Strukturni faktor je kompleksna veličina ( $F_{hkl} = |F_{hkl}|e^{i\varphi(hkl)}$ ), koja ima svoju amplitudu koju možemo dobiti iz eksperimentalnih intenziteta te fazu  $\varphi(hkl)$ , koju ne možemo mjeriti. Za rekonstrukciju elektronske gustoće Fourierovom transformacijom, potrebna je vrijednost oba dijela strukturnog faktora, a nažalost informacija o fazi svakog refleksa nedostaje. To je osnova za tzv. problem faze u kristalografiji (engl. *phase problem*). Različiti načini rješavanja tog problema čine veliki dio posla kod određivanja strukture molekula iz difrakcijskog mjerenja.

#### 1.4.2. Rješavanje problema faze

Iako se situacija s problemom faze čini na prvi pogled gotovo bezizlazna, jer uz to što fazu za svaki refleks ne znamo ona k tome nosi i veći dio informacije o položajima atoma nego amplituda, postoje ipak različite metode rješavanja. Neke od njih su metoda molekulske zamjene (engl. *molecular replacement*), izomorfna zamjena (engl. *isomorphous replacement*), anomalna disperzija (engl. *anomalous dispersion*) te direktne metode (engl. *direct methods*). Molekulska zamjena je metoda koja se koristi za rješavanje problema faze u biološkim makromolekulama. Ona sve više dobiva na značaju kako broj određenih struktura raste. Za određivanje faza nepoznate strukture koristi se poznata struktura (model) nekog homolognog proteina (moguće iz drugog organizma). Za uspješnost ove metode presudna je sličnost



sekvence proteina modela i proteina kojeg pokušavamo riješiti. Računa se da je za uspješno korištenje ove metode potrebna sličnost u sekvenci od minimalno 25-30 %. Kod metode molekulske zamjene se nastoji pronaći položaj (rotacija i translacija) molekule modela u jediničnoj ćeliji proteina čija je struktura nepoznata. Taj je položaj moguće pronaći usporedbom difrakcijskih uzoraka iz eksperimenta i difrakcijskog uzorka nekog određenog položaja molekule modela. Onda kada se oni podudaraju znači da je pravi položaj molekule pronađen. Tada se kao faze uzimaju one koje se mogu izračunati iz položaja molekule modela. Informacije o razlikama među strukturama dobiju se iz intenziteta koji su eksperimentalno izmjereni. Zbog postojanja ogromnog broja mogućih položaja i rotacija u jediničnoj ćeliji (pretraga u prostoru od šest parametara) metoda molekulske zamjene je vrlo računalno zahtjevna. Postoje međutim načini da se taj šesterodimenzijski problem razbije na dva trodimenzijska (tzv. rotacijska i translacijska funkcija).

### **1.4.3. Simetrija kristala**

Kristal definiramo kao uređenu strukturu u kojoj se molekule odnosno atomi periodički ponavljaju u tri nekomplanarna smjera u prostoru. Osnovna ponavljajuća jedinica kristala je jedinična ćelija. Jedinična ćelija se dobije primjenom simetrijskih operacija na asimetričnu jedinicu.

Slaganje molekula u kristale, s obzirom na simetriju, moguće je na 230 načina, tzv. prostornih grupa. Sve prostorne grupe nisu podjednako zastupljene. Pošto su proteini kiralne molekule jer su sve prirodne aminokiseline L kiralnosti, ne mogu kristalizirati u prostornim grupama koje sadrže elemente simetrije koji mijenjaju kiralnost (kao npr. centar inverzije, zrcalna ravnina itd.). Time zapravo ostaje samo 65 mogućih prostornih grupa za proteine.

### **1.5. Cilj istraživanja**

Cilj istraživanja bio je provjeriti utjecaj vezanja fosfata na promjenu konformacije aktivnih mjesta enzima PNP iz bakterije *H. pylori*. Naime, kako je pretpostavljeno da je mehanizam djelovanja *Hp*PNP sličan mehanizmu PNP-a iz *E. coli*, zatvorena konformacija aktivnog mjesta potrebna je da bi došlo do katalize (Koellner i sur. 2002). Vjeruje se da molekula fosfata, kao jedan od dva supstrata PNP-a, prilikom vezanja dovodi do konformacijske promjene (zatvaranja) aktivnog mjesta (Štefanić i sur. 2017). Međutim, to do sada nije pokazano u nezavisnom eksperimentu u kojem bi bili uklonjeni mnogobrojni drugi čimbenici, koji također mogu utjecati na te promjene. Stoga je dizajniran eksperiment u kojem su se kristali apoenzima sa svim aktivnim mjestima u otvorenoj konformaciji namakali u otopinama s postupno sve većim koncentracijama fosfata kako bi se utvrdilo dovodi li to do

konformacijskih promjena, te kojim redoslijedom. Ovakvo istraživanje do sada nije bilo napravljeno na kristalima nastalim u istoj kapljici, što je nužno zbog smanjivanja broja vanjskih čimbenika koji mogu utjecati na kristalizaciju proteina. Također, cilj je bio usporediti rezultate s prethodno riješenim strukturama proteina PNP sa i bez fosfata vezanog u aktivnom mjestu. Očekivalo se da rezultati istraživanja doprinesu boljem razumijevanju mehanizma katalize enzima *Hp*-PNP, što je preduvjet i za dizajn novih inhibitora ovog enzima.

## 2. Materijali i metode

### 2.1. Materijali

#### Standardne kemikalije

Agar-agar (*Carl Roth, Kobe I*), akrilamid - bisakrilamid (*Sigma Aldrich*, 30% otopina, 29:1), albumin goveđeg seruma (*Serva*), ampicilin (*Carl Roth, Cellpure*,  $\geq 99,0\%$ ), bromfenol plavo (*Merck*), Coommasie Brilliant Blue G-250 (*Carl Roth*), Coommasie Brilliant Blue R-250 (*Carl Roth*), dinatrij hidrogenfosfat (*Sigma Aldrich*), etanol (*Kemika*, 96%), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Sigma Aldrich*), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF, *Sigma Aldrich*), glicerol (*Kemika*, destilirani), inozin (*Sigma Aldrich*, min. 99%), izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG, *Sigma Aldrich*), klorovodična kiselina (konc.) (*Kemika*), LB medij - Luria (*Carl Roth*), lizozim (*Sigma Aldrich*, from chicken egg white,  $\geq 90\%$ ) metanol (*Kemika*, min. 99,8%), natrijev azid (*Fluka*,  $\geq 99,0\%$ ), natrijev dihidrogenfosfat (*Sigma Aldrich*), natrijev dodecil sulfat (SDS) (*Carl Roth*), natrijev klorid (*Kemika*), amonijev persulfat (APS) (*Sigma Aldrich*, for electrophoresis,  $\geq 98,0\%$ ), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*SIGMA Life Science*,  $\geq 99,5\%$ ), octena kiselina (*Kemika*), polietilen glikol 800 (PEG 800) (*Sigma Aldrich*), polipropilen glikol 400 (PPG 400) (*Sigma Aldrich*), tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Thermo Scientific*,  $\geq 99\%$ ), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (*Carl Roth*), voda (redestilirana),  $\beta$ -merkaptoetanol (*SIGMA Life Science*), 7-metilgvanozin (sintetiziran u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, Institut Ruđer Bošković, metodom preuzetom iz Jones i Robins (1963).

#### Ostali materijali

Kvarcni pijesak. Punilo za kromatografiju anionske izmjene (*Q-Sepharose Fast Flow anion-exchange resin, GE Healthcare*), punilo za afinitetnu kromatografiju (*Sepharose-Formycina, Bzowska i sur. 1998*).

## 2.2. Metode

### 2.2.1. Eksperimentalne metode

#### 2.2.1.1. Pročišćavanje proteina

Prilikom izolacije, protein želimo dobiti u koncentraciji u rasponu od 10 do 50 g L<sup>-1</sup> (McPherson 2009) te što veće čistoće i homogenosti molekula. Za vrijeme planiranja eksperimenta i samog eksperimentalnog postupka, potrebno je paziti da ne dođe do promjene

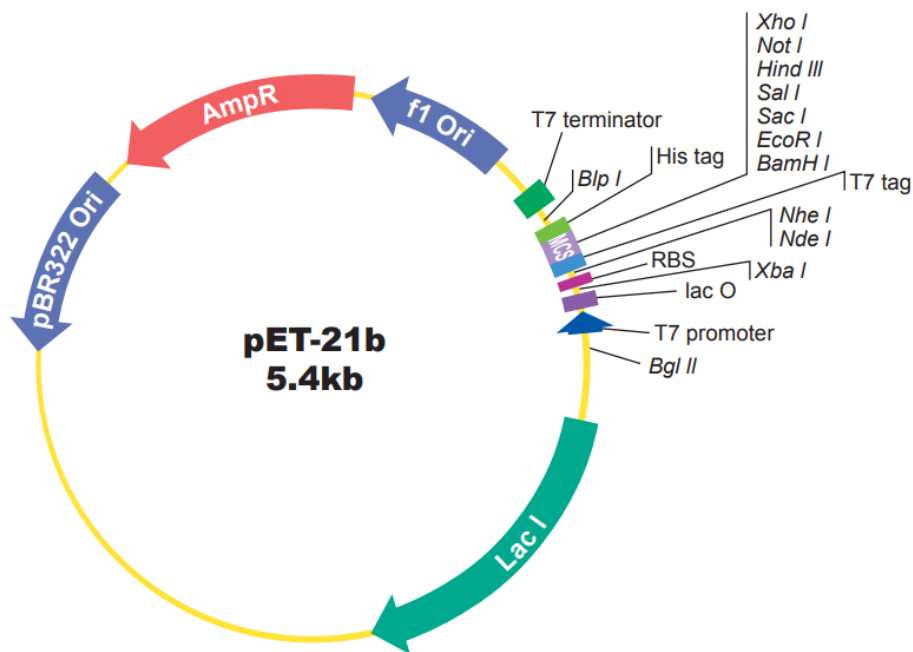
u kemijskom sastavu proteina kako u fazi ekspresije tako i prilikom pročišćavanja. Svi postupci pročišćavanja izvode se u hladnoj sobi na +4°C.

#### **2.2.1.1.1. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom**

Za dobivanje veće količine nekog bakterijskog proteina najčešće se koristi modelni organizam *E. coli*, u ovom slučaju bakterijski soj BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Ovaj soj sadrži gen za T7-RNA-polimerazu integriran u bakterijski kromosom pod kontrolom inducibilnog promotora *lacUV5* i ne eksprimira aktivne proteaze *lon* i *ompT*, zbog čega je pogodan za prekomjernu ekspresiju proteina induciranu dodatkom IPTG-a (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid).

Bakterijske stanice se transformiraju metodom elektroporacije. Elektroporacija je jedna od metoda unošenja strane molekule DNA u bakterijske stanice. Zasniva se na kratkotrajnom povećanju propusnosti stanične stijenke bakterije prilikom izlaganja bakterija električnom pulsu. Koriste se tzv. elektrokompentne stanice čija je glavna karakteristika da su dobro isprane od hranjivog medija odnosno konkretno soli koje sadrži medij kako prilikom primjene električnog pulsa ne bi došlo do električnog pražnjenja.

Plazmid u koji je ugrađen željeni gen obično sadrži rezistenciju na neki antibiotik što omogućava selektivno rast samo transformiranih bakterija u mediju s antibiotikom. U ovom slučaju je korišten plazmid iz serije vektora pET21 s ugrađenim genom *deoD* iz soja 26695 bakterije *H. pylori* (koji kodira za protein *Hp-PNP*) – HP26695deoDpET21b. Korištena svojstva pET21 vektora su inducibilna ekspresija pomoću IPTG-a te ampicilinska rezistencija (Slika 16).



Slika 16. Bakterijski plazmidni vektor iz serije pET-21. Preuzeto i prilagođeno s <https://www.genscript.com/gsfiles/vector-map/bacteria/pET-21b.pdf>

U svim daljnjim postupcima korišten je LB medij-*Luria (Carl Roth)* u koncentraciji od  $25 \text{ g L}^{-1}$ . Za dobivanje krutog hranjivog medija LBA (hranjivi medij Luria-Bertani s agarom), dodan je agar u masenoj koncentraciji  $15 \text{ g L}^{-1}$ . Hranjivi mediji su prije upotrebe sterilizirani autoklaviranjem (20 min,  $120^\circ\text{C}$ , uređaj *Vapour-Line*, VWR). Nakon hlađenja dodan je antibiotik ampicilin do konačne masene koncentracije  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Postupci koji uključuju rad s bakterijama i medijima LB/LBA podrazumijevaju rad uz upaljeni plamenik (u sterilnim uvjetima).

U  $50 \mu\text{L}$  elektrokompetentnih bakterija je dodano  $2 \mu\text{L}$  plazmidne DNA – HP26695deoDpET21b (koncentracije  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) te je plazmidna DNA dobro resuspendirana. Dobivena suspenzija je zatim prebačena u prethodno ohlađenu kivetu za elektroporaciju širine 2 mm. Za elektroporaciju je korišten uređaj *GenePulser Xcell*, Bio-Rad. Na suspenziji je primijenjen puls od  $2,5 \text{ kV cm}^{-1}$  (korištenjem proizvođačevog protokola za *E. coli* pod nazivom *Bacterial 1*). Bakterije su zatim resuspendirane u 1 mL tekućeg LB medija (bez dodanog antibiotika u LB medij) i uzgajane jedan sat na  $37^\circ\text{C}$  uz aeraciju protresanjem pri 350 rpm (*Thermomixer comfort*, Eppendorf). Zatim je suspenzija centrifugirana dvije minute na  $1000 \times g$  (*Centrifuge 5415R*, Eppendorf). Supernatant se ukloni pipetom, a stanični talog resuspendira u  $100 \mu\text{L}$  LB medija i nanese ezom na LBA ploču (prethodno je dodan ampicilin u koncentraciji od  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). Ploča se ostavi u inkubatoru na  $37^\circ\text{C}$  preko noći (otprilike 15 sati). Idući dan ploča se stavi u frižider na  $4^\circ\text{C}$  kako bi se usporio rast bakterijskih stanica.

#### **2.2.1.1.2. Priprema prekonocne kulture**

Prethodno je pripremljeno 50 mL tekućeg medija LB. Nakon što je medij steriliziran u autoklavu (*Vapor-Line, VWR*) i ohlađen, dodan je ampicilin u koncentraciji od 100 mg L<sup>-1</sup>. Zatim je odabrana jedna kolonija s LBA ploče te prenesena ezom u medij s ampicilinom koji je nakon toga inkubiran na 37°C uz potresanje od 220 rpm (*SSI3 SHEL LAB Benchtop Shaking Incubator*) na oko 15 sati (prekonocna kultura).

#### **2.2.1.1.3. Ekspresija proteina**

Prethodno je pripremljeno 500 mL tekućeg medija LB u tikvama od 2 L. Nakon što je medij steriliziran u autoklavu (*Vapor-Line, VWR*) i ohlađen, dodan je ampicilin u konačnoj koncentraciji od 100 mg L<sup>-1</sup>. 10 mL prekonocne kulture je dodano u tikvu s 500 mL tekućeg medija LB. Bakterije su zatim uzgajane na 37°C, pri 220 rpm (*SSI3 SHEL LAB Benchtop Shaking Incubator*), dok se ne postigne optička gustoća u rasponu od 0,4 - 0,6 pri valnoj duljini od 600 nm (OD<sub>600</sub>). Navedena optička gustoća indikator je da se stanice *E. coli* nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta u kojoj stanice dostižu maksimalnu brzinu rasta. Zatim se inducira ekspresija proteina PNP s inducibilnog promotora dodatkom 0,5 mmol L<sup>-1</sup> IPTG-a. Bakterije se uzgajaju preko noći (oko 15 sati) na 37°C i s potresanjem od 130 rpm. Nakon toga se suspenzija centrifugira 20 minuta na 5000 × g i 4°C (*Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Thermo Scientific*). Dobiveni supernatant se odlije te se talozi pohrane na -20°C.

#### **2.2.1.1.4. Ekstrakcija proteina**

Ekstrakciju proteina potrebno je raditi na ledu kako bi ne bi došlo do denaturacije samih proteina. Prethodno dobiveni talog bakterijskih stanica se izvaže te se prema izvaganjoj masi odredi koliko je potrebno dodati pufera za lizu. Eksperimentalno je određeno da se najbolji ishod dobije kada se 1 g bakterijskih stanica resuspendira u 5 mL pufera za lizu (0.1 mol L<sup>-1</sup> Tris (tris(hidroksimetil)-aminometan), 2 mmol L<sup>-1</sup> EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), 10% glicerol, 50 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, pH = 7,6). Radi lakšeg resuspendiranja taloga moguće je kratko intenzivno promiješati smjesu (*Mini Shaker, Fisher Scientific*).

Nakon toga, doda se 1 g L<sup>-1</sup> lizozima, te 0,02 g L<sup>-1</sup> PMSF-a (fenilmetilsulfonil fluorid) i smjesa se inkubira 30 minuta na ledu. Smjesu je potrebno protresti na početku i svakih desetak minuta. Lizozim je enzim koji katalizira reakciju cijepanja bakterijske stijenke čime se pospješuje izolacija proteina. PMSF je inhibitor serinskih proteaza i dodaje se kako bi sprječavao razgradnju proteina spomenutim proteazama.

Iduće slijedi razbijanje stanica ultrazvukom odnosno sonikacija (*Labsonic*, postavke: cycle=1, amplitude=80) oko deset puta po trideset sekundi s pauzama između soniciranja od oko trideset do šezdeset sekundi, ovisno o tome koliko se smjesa zagrijava. Što se smjesa više zagrijava, potrebno je napraviti veću pauzu između soniciranja. U pauzama ju je potrebno držati na ledu.

Zatim se smjesa centrifugira na  $50\,000 \times g$ , 20 minuta i  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*Avanti J-E* centrifuga, *Beckman Coulter*). Supernatant se potom odlije u posebnu posudu.

#### **2.2.1.1.5. Pročišćavanje proteina kromatografijom u koloni**

Odabir kromatografske metode koja se koristi ovisi primarno o proteinu koji se želi izolirati (njegovim biofizičkim svojstvima) i potrebnoj čistoći proteina. U ovom radu su korištena dva tipa kromatografije u koloni: kromatografija anionske izmjene i afinitetna kromatografija. Kromatografija anionske izmjene se zasniva na odjeljivanju supstanci prema njihovom naboju. Posjeduje pozitivno nabijenu stacionarnu fazu koja iz mobilne faze veže proteine sa sveukupnim negativnim nabojem. Ovaj prvi korak omogućava uklanjanje dijela proteina s ukupnim negativnim nabojem pri pH 7,6 (PNP ima sveukupni pozitivan naboj) kako bi idući korak bio što učinkovitiji. Afinitetna kromatografija se zasniva na visokom afinitetu makromolekula za određene kemijske skupine. Za vezanje proteina PNP kao specifična kemijska skupina vezana na stacionarnu fazu koristi se formicin A (Slika 7b). Formicin A je inhibitor proteina PNP zbog nepostojanja N-glikozidne veze između šećernog i nukleotidnog ostatka (umjesto C-N veze, ovdje se nalazi C-C veza), te stoga omogućuje njegovo specifično pročišćavanje. Za uklanjanje proteina sa kolone koristi se pufer s inozinom koji je supstrat za protein PNP, koji ima veći afinitet za inozin (Slika 4c), nego za formicin A u odabranim uvjetima, što nam omogućava skidanje proteina s kolone.

Kao punilo za kromatografiju anionske izmjene korištena je *Q-Sepharose Fast Flow anion-exchange resin* (*GE Healthcare*), dalje u tekstu nazivana Q-Sepharose, a za afinitetnu kromatografiju *Sepharose 6B* sa vezanim formicinom A (FA), dalje u tekstu nazivana Sepharose-FA (dobivena od suradnika iz Poljske, iz laboratorija pod vodstvom prof. dr. Bzowska; pripremljene prema postupku opisanom u Bzowska i sur. (1998)).

Dimenzije kolone korištene za kromatografiju anionske izmjene su slijedeće:  $1,6\text{ cm} \times 28,0\text{ cm}$  (promjer  $\times$  visina), volumen – 56,3 mL, a kolone korištene za afinitetnu kromatografiju:  $0,9\text{ cm} \times 20,9\text{ cm}$  (promjer  $\times$  visina), volumen – 17,8 mL.

#### **2.2.1.1.6. Filtriranje pufera korištenih u kromatografiji**

Pufere je potrebno profiltrirati kako bi se riješili nečistoća koje bi potencijalno mogle usporiti protok na kromatografskim kolonama. Korišteni su filter papiri veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (*Whatman membranes filters mixed cellulose ester*) te metoda filtriranja pomoću vakuuma.

#### **2.2.1.1.7. Pakiranje kromatografskih kolona**

Kolone se pakiraju na dalje opisani način. Prvo se s prvim korištenim puferom (u slučaju Q-Sepharose kolone Pufer A, sastava 0,1 mol L<sup>-1</sup> Tris, 2 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, 10 % glicerol, pH = 7,6, a u slučaju Sepharose-FA Pufer 1 sastava 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris, pH = 7,6) kolona napuni do 10% visine kolone pri čemu treba paziti da ne zaostane zraka u odvodnoj cjevčici, te ispod membrane na izlazu iz kolone. Zatim se na dno ubaci malo kvarcnog pijeska kako punilo ne bi začepilo membranu na izlazu iz kolone pri čemu treba pripaziti da ne ostane zraka na kvarcnom pijesku. Nakon toga je potrebno povezati kolonu odvodnom cjevčicom na peristaltičku pumpu za održavanje protoka tijekom kromatografije. U kolonu treba polagano uliti punilo kako se ne bi podignuo kvarcni pijesak s dna. Na kraju uključiti peristaltičku pumpu. Punjenje kolone se radi pod većim pritiskom (veći protok) nego kromatografija kako bi se punilo dobro sleglo. Kolonu treba provjeravati svakih 15 minuta dok se punilo ne sabije. Kada se veći dio slegne potrebno je ukloniti višak punila ako ga ima, potom spojiti dovodnu cijev kolone na tikvicu s prvim puferom koji se koristi. Potrebno je da prođu otprilike 3 volumena kolone Pufera 1 kroz Sepharosu-FA odnosno 3 volumena Pufera A u slučaju kolone Q-Sepharose da bi se kolona ekvilibrirala. Nakon toga pritisak na peristaltičkoj pumpi se smanji za otprilike 1/4, na oko 55 mL h<sup>-1</sup> kod Q-Sepharose kolone te oko 28 mL h<sup>-1</sup> u slučaju Sepharose-FA kolone. Brzina protoka kroz kolonu ovisi o tipu kromatografije koja se radi. Primjerice za afinitetnu kromatografiju želimo sporiji protok kako bi protein PNP imao veće šanse specifično se vezati za kolonu.

#### **2.2.1.1.8. Kromatografija na koloni Q-Sepharose**

Za kromatografiju na koloni Q-Sepharose korištena su dva pufera, Pufer A, sastava 0,1 mol L<sup>-1</sup> Tris, 2 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, 10 % glicerol, pH = 7,6, te Pufer B, sastava istog kao i Pufer A uz dodatak 1 mol L<sup>-1</sup> NaCl. Nakon pripreme, pufere je potrebno profiltrirati.

Za početak je kolonu potrebno ekvilibrirati s tri do pet volumena kolone s Puferom A. Zatim se dobiveni proteinski ekstrakt pomiješa s istim volumenom Pufera A. Tako dobiveni razrijeđeni proteinski ekstrakt se nanese na kolonu na način da se prvo ukloni višak pufera iznad punila (pazeći da punilo ne presuši) a zatim tek nanese uzorak te spoji na dovodnu cjevčicu prema posudi s ostatkom uzorka. Prikupljaju se frakcije volumena po želji, u ovom



slučaju po 5 mL. Nakon što sav uzorak uđe u kolonu, potrebno je ponovno kolonu spojiti na Pufer A (na prethodno opisani način) te pričekati da prođu još tri volumena kolone pufera. Potom se Pufer A zamijeni Puferom B na način kako je prethodno opisano i za zamjenu Pufera A s uzorkom. Potrebno je propustiti oko tri volumena kolone Pufera B kako bi se promjenom ionske jakosti s kolone otpustili proteini koji su se prethodno vezali na nju. Prethodno iskustvo u Laboratoriju za kemijsku i biološku kromatografiju pokazalo da se protein *Hp-PNP* ne veže na kolonu Q-Sepharose stoga sa kolone izlazi u frakcijama dobivenim ispiranjem kolone Puferom A.

Odabranu proteinsku frakciju s kolone Q-Sepharose je potrebno prije nanošenja na kolonu Sepharose FA centrifugirati 20 minuta na  $12100 \times g$  (*Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Thermo Scientific*) zbog mogućih nečistoća.

#### **2.2.1.1.9. Kromatografija na koloni Sepharose-FA**

Za kromatografiju na koloni Sepharose - FA korištena su 4 različita pufera. Pufer 1 sastava -  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris, pH = 7,6; Pufer 2 sastava -  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris,  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl, pH = 8,0; Pufer 3 sastava -  $50 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  (fosfatni pufer),  $4 \text{ mmol L}^{-1}$  inozin, pH = 7,6 (inozin je potrebno dodati neposredno prije upotrebe); Pufer 4 sastava -  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  natrijev acetat,  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl, pH = 4,5. Nakon pripreme, pufer je potrebno profiltrirati.

Prvo je kolonu potrebno ekvilibrirati s tri do pet volumena Pufera 1. Potom se proteinska frakcija koja sadrži *Hp-PNP* dobivena s kolone Q-Sepharose nanese na kolonu Sepharose-FA. Nakon što čitav uzorak uđe u kolonu potrebno je ponovno kolonu spojiti na Pufer 1 i isprati ju s tri volumena kolone Pufera 1. Skupljaju se frakcije volumena 2,3 mL uz brzinu prolaska na peristaltičkoj pumpi od oko  $28 \text{ mL L}^{-1}$ . Potom se s dva volumena kolone Pufera 2 uklone nespecifično vezani proteini s kolone promjenom ionske jakosti i pH. Izmjena pufera se radi na način kako je opisano u poglavlju 2.2.1.1.8. Zatim se specifično vezani protein ispere s kolone pomoću dva volumena Pufera 3. Pufer 3 sadrži inozin, supstrat za protein PNP te dolazi do uklanjanja proteina s formicina A vezanog na punilo. Nakon toga je potrebno s Puferom 2 dodatno isprati kolonu s otprilike deset volumena kolone.

Za slijedeću upotrebu potrebno je regenerirati kolonu na način da se ispere sa sedam volumena kolone Pufera 4. Pufer 4 ima veću ionsku jakost i niži pH od prethodno korištenih pufera. Kolona se čuva u Puferu 1 s dodatkom natrijevog azida (0,02 %  $\text{NaN}_3$ ).

#### **2.2.1.1.10. Mjerenje apsorbancije frakcija dobivenih elucijom s kolona Q-Sepharose i Sepharose-FA**

Za detektiranje frakcija u kojima se nalazi najveća količina sveukupnih proteina koristi se spektrofotometrijska metoda mjerenja apsorbancije na 280 nm (maksimum apsorbancije za sve proteine) u kvarcnoj kivetu korištenjem lampe D2 (deuterijeva lampa, valna duljina zračenja od 190 do 370 nm) (*M501 Single Beam Scanning UV/VIS Spectrophotometer (Camspec Ltd.)*).

Frakcije dobivene elucijom Puferom 3 s kolone Sepharose-FA analizirala sam metodom po Bradfordu (Bradford 1976) (opisano u poglavlju 2.2.1.1.11.), zbog toga što inozin apsorbira pri 280 nm.

#### **2.2.1.1.11. Metoda za određivanje koncentracije proteina po Bradfordu**

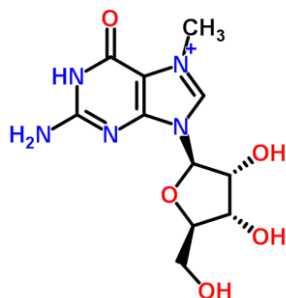
Za određivanje koncentracije proteina u različitim fazama pročišćavanja je korištena metoda po Bradfordu (Bradford 1976). U 100  $\mu\text{L}$  prema potrebi razrijeđenog uzorka potrebno je dodati 1 mL Bradfordovog reagensa. Sastav Bradfordovog reagensa je slijedeći: 0,01% (w/v) *Comassie Brilliant Blue G-250*, 4,7% (w/v) etanol, 8,5% (w/v) fosfatna kiselina. Smjesu je zatim potrebno intenzivno promiješati (*Mini Shaker, Fisher Scientific*) te inkubirati 45 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se na spektrofotometru *M501 Single Beam Scanning UV/VIS Spectrophotometer (Camspec Ltd.)* na lampi W (halogena lampa sa žarnom niti od volframa, valna duljina zračenja od 320 do 1100 nm) pri 595 nm izmjeri apsorbancija (u staklenim kivetama). Kao slijepa proba je korištena redestilirana voda ili pufer u kojem se proteinski ekstrakt nalazi. Koncentracija proteina je računata prema baždarnom pravcu koji je pripremljen mjerenjem apsorbancije pri 595 nm za otopine različite (poznate) koncentracije albumina goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA).

Koncentracija proteina u završnoj fazi pročišćavanja je mjerena i na uređaju *BioDrop-Duo (BioDrop)*. Za računanje koncentracije korišten je ekstinkcijski koeficijent za protein *Hp-PNP* dobiven pomoću alata *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>, pristupljeno sa UniProt kodom P56463) pri 280 nm,  $\epsilon = 13410 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (dobiven pod pretpostavkom da su svi cisteini u proteinu reducirani).

#### **2.2.1.1.12. Mjerenje aktivnosti proteina PNP**

Mjerenjem aktivnosti proteina PNP tijekom pročišćavanja zapravo pratimo relativnu učinkovitost pročišćavanja. Pomoću specifične aktivnosti po miligramu proteina možemo kontinuirano pratiti povećanje specifične aktivnosti prilikom svakog idućeg koraka pročišćavanja kao i potencijalno zaostajanje veće količine proteina u prethodnim koracima.

Kako bi se mjerila aktivnost enzima, može se pratiti nestajanje reaktanta ili nastajanje produkta reakcije. U ovom slučaju je praćeno nestajanje 7-metilgvanozina ( $m^7\text{Guo}$ ), analoga gvanozina (Slika 17).



Slika 17. Struktura molekule 7-metilgvanozina.

Preuzeto s <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.393054.html>

Mjerenje aktivnosti proteina PNP izvodi se na uređaju M501 *Single Beam Scanning UV/VIS Spectrophotometer* (Camspec Ltd.) pri 260 nm korištenjem lampe D2 u kvarcnoj kiveti, na sobnoj temperaturi (25°C). Na 260 nm se nalazi maksimum apsorbancije  $m^7\text{Guo}$ . Pripravi se otopina konačnih koncentracija 0,05 mol L<sup>-1</sup> Hepes (*N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina), pH = 7,0 zatim 0,05 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (fosfatni pufer), pH = 7,0 te 0,1 mmol L<sup>-1</sup> supstrata  $m^7\text{Gua}$ . Apsorbancija slijepe probe se izmjeri prije nego što se doda supstrat.

Nakon što se doda uzorak proteina, apsorbancija se mjeri svakih 15 sekundi kroz iduće tri minute.

Iz dobivene razlike u apsorbanciji i koncentracije proteina dobivene metodom po Bradfordu izračuna se specifična aktivnost uzorka. Specifična aktivnost izražava se kao količina utrošenog supstrata u mikromolima po minuti i po miligramu proteina, u odabranim uvjetima ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  ili U  $\text{mg}^{-1}$ ).

#### 2.2.1.1.13. Natrijev dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza (SDS - PAGE)

Elektroforetska pokretljivost proteina ovisi o njihovom omjeru mase i naboja. Natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) se u elektroforezi koristi kako bi maskirao naboj polipeptidnih lanaca tako da elektroforetsko kretanje u gelu ovisi samo o relativnoj molekularnoj masi polipeptida. Većina proteina veže 1,4 g SDS po gramu proteina. Također, SDS denaturira i disocira proteine što pridonosi boljem razdjeljivanju na osnovi mase s obzirom da pokretljivost u električnom polju ovisi i o obliku polipeptida.

Za SDS-PAGE elektroforezu korišten je sustav za vertikalnu elektroforezu *SE-250 MightySmall* (GE Healthcare). Dimenzije gela su bile slijedeće: visina – 10 cm, širina – 8 cm,

debljina – 0,7 cm. Sastojao se od sabirnog i razdjelnog dijela pri čemu je razdjelni dio duljine od oko 8,5 cm. Razdjelni dio sadržavao je 12,5 %, a sabirni 4% poliakrilamida (akrilamid : bisakrilamid = 30% (w/v) : 0,8% (w/v) ). Kao standard sam koristila LMW-SDS Marker Kit (*GE Healthcare*) (engl. *low molecular weight*, LMW). Uzorak se pomiješa u omjeru 1:1 s puferom slijedećeg sastava: 0,125 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0,14 mol L<sup>-1</sup> SDS, 20% (v/v) glicerol, 2% (v/v) 2-merkaptoetanol te 0,03 mmol L<sup>-1</sup> bromfenol plavo. S obzirom da se ovdje radilo o vertikalnoj elektroforezi, u pufer je bilo potrebno dodati glicerol kako bi uzorak bolje ušao u jažice, te kako bi elektroforeza time bila bolje razlučivosti. Sastav elektrodnog pufera bio je 0,025 mol L<sup>-1</sup> Tris, 0,192 mol L<sup>-1</sup> glicin, 35 μmol L<sup>-1</sup> SDS, pH 8,3. Sastav poliakrilamidnog gela za odvajanje bio je 0,375 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8,8, 35 μmol L<sup>-1</sup> SDS, 0,05% amonijev persulfat (APS) te 12,5% otopina akrilamida. Sastav gela za sabijanje bio je 0,125 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6,8, 35 μmol L<sup>-1</sup> SDS, 0,05% amonijev persulfat (APS) te 4% otopina akrilamida. Reakcija polimerizacije oba gela započinje dodatkom 0,033% tetrametiletilendiamina (TEMED).

#### **2.2.1.1.14. Bojanje gelova s bojom *Coomassie Brilliant blue R-250***

Gelove sam inkubirala oko 10 minuta na 50°C na tresilici u otopini slijedećeg sastava: 30% (v/v) metanol, 10% (v/v) octena kiselina te 1 g L<sup>-1</sup> boje *Coomassie Brilliant blue R-250*. Zatim sam ih odbojavala u otopini 30% (v/v) metanola i 10% (v/v) octene kiseline. Odbojavanje se izvodilo oko 10 minuta (prema potrebi i duže) na 50°C.

#### **2.2.1.1.15. Ugušćivanje proteina**

Protein je potrebno dobiti u koncentraciji od najmanje 10 g L<sup>-1</sup> kako bi kristalizacija bila moguća. Za ugušćivanje su korišteni koncentratori *Vivaspin 2, 10 kDa MWCO Hydrosart (Sartorius)*, koji omogućuju zadržavanje svih čestica većih od 10 kDa. Otopinu proteina potrebno je centrifugirati u intervalima od 10 minuta na 5090 × g i 4 °C (*Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Thermo Scientific*). Nakon svakog centrifugiranja potrebno je ukloniti otopinu koja je prošla kroz membranu (ultrafiltrat).

Manje volumene otopine je moguće ugustiti pomoću uređaja *DNA 120 SpeedVac Concentrator (Thermo Fisher Scientific)*. Potrebno je paziti da se radi u kraćim intervalima s obzirom da dolazi do zagrijavanja, također potrebno je u pauzama ohladiti otopinu proteina na ledu.

### 2.2.1.1.16. Dijaliza pročišćenog proteina

S obzirom da se skidanje proteina s kolone Sepharose-FA radi dodatkom supstrata, potrebno je supstrat na kraju ukloniti. To se radi dijalizom prema puferu  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris,  $\text{pH} = 7,6$ . Pufer je potrebno profiltrirati nakon pripreme. Koristi se sustav za dijalizu *Tube-O-DIALYZER - Micro Dialysis System (G-Biosciences)*, s graničnom vrijednošću molekulske mase molekula u iznosu od 8 kDa (molekule molekulske mase manje od 8 kDa mogu proći kroz membranu). Uzorak se nanese u sustav za dijalizu te stavi na plutajuću spužvu u otopinu pufera. Dijaliza se radi na  $+4^\circ\text{C}$  u otprilike 200 mL pufera uz konstantno miješanje otopine magnetom, uz tri promjene pufera (dva puta nakon dva sata i preko noći).

### 2.2.1.2. Kristalizacija proteina

#### 2.2.1.2.1. Postavljenje kristalizacija

Prethodno su pronađeni uvjeti (engl. *screening*) za kristalizaciju proteina PNP korištenjem slijedećih otopina: prva otopina sadrži  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  Tris-HCl, 10% (w/v) polietilen glikola (PEG ) 8000 te 0,02%  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{pH} = 7,0$  (dalje u tekstu označena kao JCSG\_B8) (*screening* ploča: *JCSG-plus screen, Molecular dimensions, Newmarket, UK*, kapljica B8 uz modifikaciju da nije dodan magnezij klorid); druga otopina sadrži  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  imidazola, 40 % (w/v) polipropilen glikol (PPG ) 400 te 0,02 %  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{pH} = 7,0$  (dalje u tekstu označena kao MIDAS\_B7) (*screening* ploča: *MIDAS screen, Molecular dimensions, Newmarket, UK*, kapljica B7) (Štefanić i sur. 2017).

Kristalizacija se radi metodom strujanja para, tehnikom viseće kapi, u *Linbro* pločama (*Jena Bioscience*). Rubovi svih bunarića se premažu silikonskom masti (*Baysilicone-Paste, GE Bayer Silicone*). Unutar bunarića se stavi 700  $\mu\text{L}$  pufera za kristalizaciju. Zatim se na silikonska stakalca (*Siliconized Glass Circle Cover Slides, 22 mm, Hampton Research*) nanese 1  $\mu\text{L}$  uzorka pročišćenog proteina *Hp*-PNP i 1  $\mu\text{L}$  pufera za kristalizaciju. Silikonska stakalca se koriste zbog toga što smanjuju površinsku napetost tekućine te su posljedično nanasene kapljice manje raspršene na stakalcu. Stakalca se zatim prilijepe na bunariće koristeći pincetu. Na samom kraju je potrebno provjeriti pod lupom da li su hermetički zatvoreni kako bi sustav mogao postignuti ravnotežu unutar samog bunarića (između kapljice i pufera za kristalizaciju unutar bunarića).

Prva serija kristalizacija je sadržavala 12 bunarića s prvim (JCSG\_B8, bez magnezija, na položajima na ploči: A od 1 do 6 i B od 1 do 6) i 12 s drugim (MIDAS\_B7, na položajima na ploči: C od 1 do 6 i D od 1 do 6) puferom za kristalizaciju, pri čemu je koncentracija korištenog proteina PNP bila  $11,61 \text{ g L}^{-1}$ .

Druga serija kristalizacija je sadržavala 12 bunarića s prvim (JCSG\_B8, bez magnezija, na položajima na ploči: A od 1 do 6 i B od 1 do 6) i 8 s drugim (MIDAS\_B7, na položajima na ploči: C od 1 do 6 i D 1 i 2) puferom za kristalizaciju, pri čemu je koncentracija korištenog proteina PNP bila  $14,49 \text{ g L}^{-1}$ .

Objekti ploče su inkubirane na  $18^\circ \text{C}$ .

#### **2.2.1.2.2. Metoda korištenja klica (engl. *seeding*)**

Drugi dan nakon postavljanja prve serije kristalizacija, metoda korištenja klica je primijenjena u kapima: A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, tako da su dotaknute metalnom iglicom, koja je bila umočena u kapljicu u kojoj su već prethodno nastali kristali (iz ploče koja je postavljena prilikom ranijih kristalizacija, otprilike godinu dana ranije).

#### **2.2.1.2.3. Namakanje kristala u otopinama različitih koncentracija fosfata**

Pripremljene su otopine  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  (fosfatni pufer) koncentracija  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $6,25 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $3,125 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $1,56 \text{ mmol L}^{-1}$  te  $0,78 \text{ mmol L}^{-1}$  u uvjetima otopina u kojima su nastali kristali.

Proteini su namakani u otopinama s fosfatom na dva načina. Prvo, namakanjem kristala direktno u pripravljenu otopinu fosfata oko jednu minutu nakon čega je slijedilo smrzavanje kristala u tekućem dušiku. Drugi način je uključivao dodavanje  $0,5 \text{ }\mu\text{L}$  otopina različitih koncentracija fosfata (jedne za drugom, počevši od najmanje) u kapljicu s nastalim kristalima te zatim inkubaciju oko jedne minute nakon svakog dodavanja fosfata. Nakon svakog dodavanja fosfata, po jedan kristal iz kapljice, ili ako je riječ o većim kristalima, odlomljeni dio kristala se izvadi iz kapljice i zamrzne u tekućem dušiku.

Zbog nedovoljnog broja nastalih kristala, za ovaj eksperiment su također korišteni i kristali *Hp*-PNP prethodno pripremani u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju.

#### **2.2.1.3. Snimanje kristala na sinkrotronu i na uređaju za rendgensku difrakciju**

Podaci na kristalima prikupljani su na rendgenskom difrakcijskom uređaju *Xcalibur Nova R* (Institut Ruđer Bošković, Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju) koristeći bakreno zračenje valne duljine  $1,54 \text{ \AA}$ , te na sinkrotronu *Elettra* u Trstu na valnoj duljini od  $1,0 \text{ \AA}$ .

## 2.2.2. Računalne metode

### 2.2.1.2. Određivanje i utočnjavanje struktura

Proteinske strukture određene su iz podataka snimljenih na sinkrotronu *Elettra* metodom molekulske zamjene koristeći kao model već prije određenu strukturu proteina *Hp*-PNP iz kliničkog izolata bakterije *H. pylori* (PDB kod 5MX4). Eksperimentalni podaci su indeksirani i reducirani programom XDS (Kabsch 2010) i iMOSFLM (Powell i sur. 2017). Strukture su određene metodom molekulske zamjene upotrebom programa MOLREP (Vagin i Teplyakov 1997), a nakon toga utočnjavanje je provedeno programom Phenix (phenix.refine; Adams i sur. 2010) u iterativnom postupku s korekcijama u programu za vizualizaciju struktura COOT (Emsley i Cowtan (2004). Za vizualizaciju i pripremu slika korišten je računalni program PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrodinger, LLC*).

## 3. Rezultati

### 3.1. Pročišćavanje proteina

#### 3.1.1. Apsorbancije frakcija dobivenih s kolona Q-Sepharose i Sepharose-FA

Pročišćavanje proteina *Hp*-PNP je rađeno u dvije serije (kako bi se dobila količina proteina dovoljna za kristalizacije), ovdje su prikazani samo rezultati prve serije budući da su rezultati druge serije pročišćavanja bili analogni onima od prve serije.

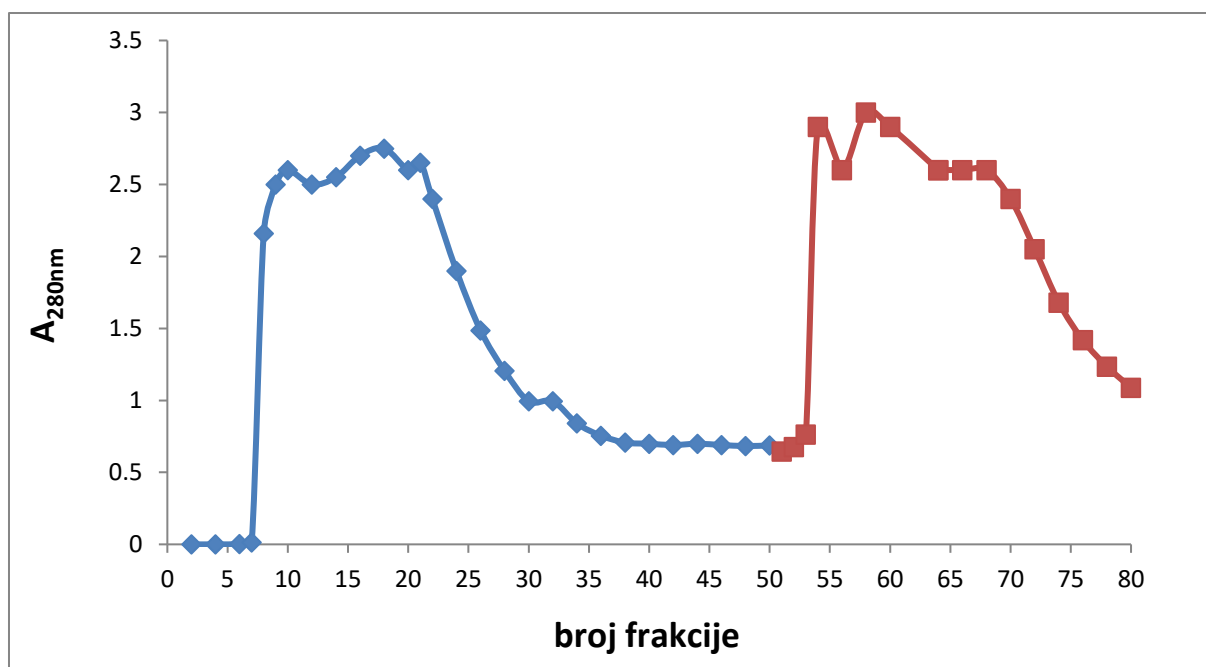
Nakon uspješne transformacije bakterijskih stanica te ekspresije i ekstrakcije proteina, slijedilo je pročišćavanje *Hp*-PNP proteina dvjema kromatografskim metodama, kromatografijom anionske izmjene (na koloni Q-Sepharose) te afinitetnom kromatografijom (na koloni Sepharose-FA). Dobivena masa ekstrakta proteina koji se nanosio na kolonu Q-Sepharose je bila 459,34 mg (koncentracija 6,562 mg mL<sup>-1</sup>; volumen 70 mL (vrijednosti dobivene metodom po Bradfordu)).

Tijek pročišćavanja na kromatografiji anionske izmjene prikazan je na Slici 18. Mjerenjem apsorbancije na 280 nm, pokazalo se da frakcije od 8 do 32<sup>1</sup> (eluirane Puferom A) sadržave najveću količinu proteina zbog čega su spojene i pripremljene za pročišćavanje dalje na koloni Sepharose-FA (frakcije su odabrane zato što je prethodno iskustvo u Laboratoriju za kemijsku i biološku kromatografiju pokazalo da se protein *Hp*-PNP ne veže na kolonu Q-Sepharose). Ukupni volumen je bio nešto manji od teoretski očekivanog, 107 mL umjesto 125 mL (skupljane su frakcije po 5 mL). Obrazloženje toga je nedovoljna preciznost uređaja korištenog za prikupljanje frakcija.

---

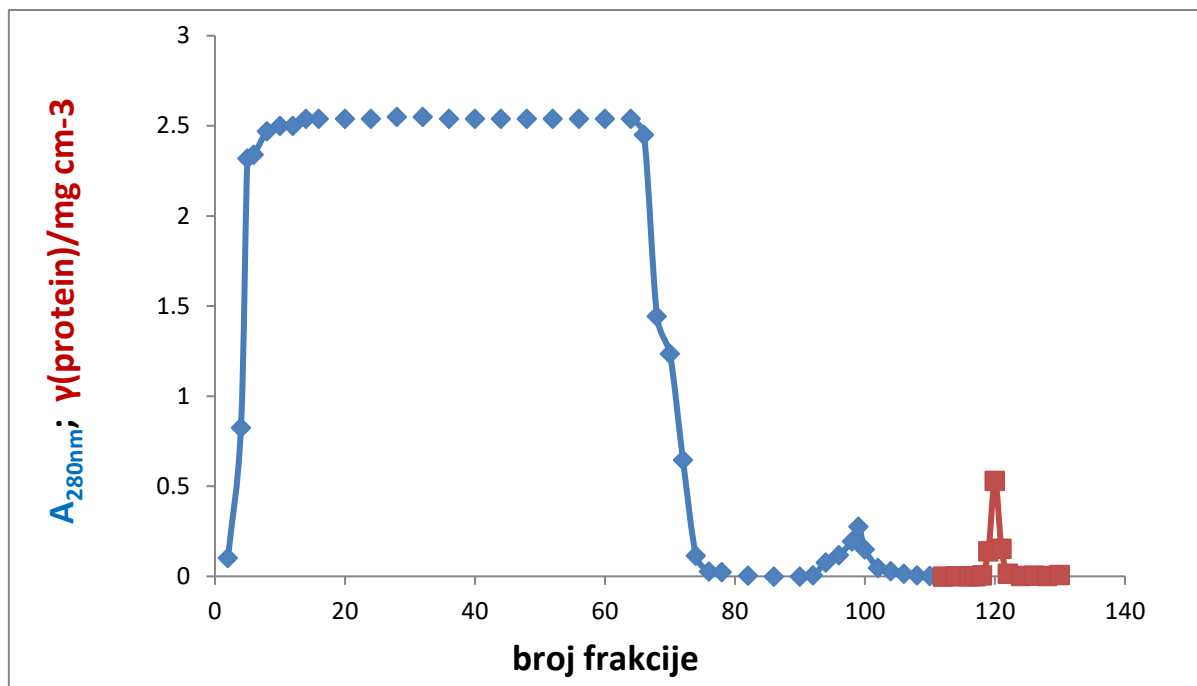
<sup>1</sup>Vrijednosti A<sub>280nm</sub> iznad 2,0 nisu pouzdane, ali za ovu svrhu nije bila toliko bitna preciznost nego samo lokalizacija proteinskih pikova.





Slika 18. Kromatogram pročišćavanja proteina *Hp*-PNP na koloni Q-Sepharose. Plavom bojom su označene frakcije dobivene ispiranjem kolone s Puferom A, a crvenom bojom frakcije dobivene ispiranjem s Puferom B.

Tijek pročišćavanja na afinitetnoj kromatografiji prikazan je na Slici 19. Ispiranjem kolone s Puferom 1 se ukloni najveći udio proteina, ostatak nespecifično ipak vezanih proteina se ukloni pomoću Pufera 2. Najveća količina proteina *Hp*-PNP je dobivena u frakcijama 119-121 dobivenim ispiranjem Sepharose-FA kolone s Puferom 3 (sastav pufera je naveden u poglavlju 2.2.1.1.9.).



Slika 19. Kromatogram pročišćavanja proteina *Hp*-PNP na koloni Sepharose-FA. Plavom bojom su označene frakcije dobivene ispiranjem kolone Sepharose-FA s Puferom 1 i Puferom 2, a crvenom bojom frakcije dobivene ispiranjem s Puferom 3.

### 3.1.2. Sažetak pročišćavanja proteina *Hp*-PNP

U Tablici 3. naveden je sažetak pročišćavanja proteina *Hp*-PNP u različitim fazama pročišćavanja. Oko 60% proteina *Hp*-PNP izgubilo se tijekom ugušćivanja i dijalize. S obzirom da su dobivene koncentracije proteina bile preniske, ugušćivanje je ponovljeno korištenjem uređaja *DNA 120 SpeedVac Concentrator*. Konačno dobivena koncentracija proteina *Hp*-PNP je bila oko  $11,61 \text{ mg mL}^{-1}$  (u nešto manje od  $100 \text{ }\mu\text{L}$ ) (*BioDrop-Duo, SERVA*).

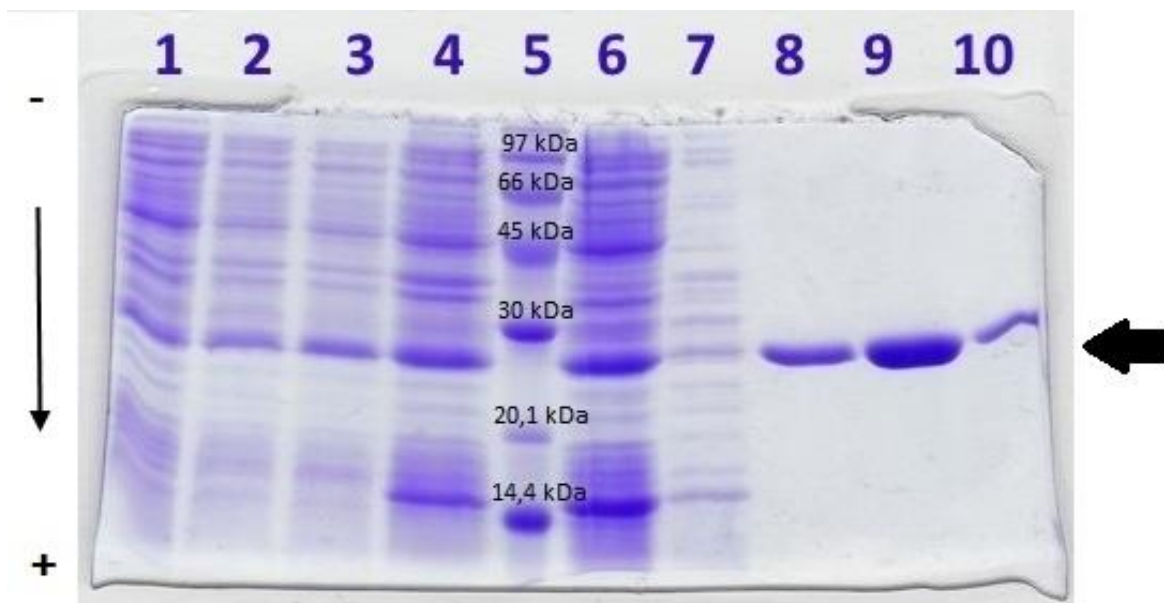
Tablica 3. Sažetak pročišćavanja proteina *Hp*-PNP. Koncentracije su izmjerene metodom po Bradfordu (1976).

| Uzorak   | Volumen/<br>mL    | Koncentracija<br>proteina/mg<br>mL <sup>-1</sup> | Masa<br>proteina/mg | Specifična<br>aktivnost<br>/ $\mu\text{mol}$<br>$\text{min}^{-1}$ $\text{mg}^{-1}$ | Ukupna<br>aktivnost/<br>$\mu\text{mol min}^{-1}$ | Prinos<br>/ % | Faktor<br>čišćenja |
|--|-------------------|--|---------------------|--|--|---------------|--------------------|
| Početni<br>uzorak za<br>kolonu Q-<br>Sepharse                      | 70,00             | 6,56   | 459,20              | 0,10   | 45,92  | 100,00        | 1,00               |
| Početni<br>uzorak za<br>kolonu<br>Sepharse-<br>FA                  | 107,00            | 0,76   | 81,32               | 0,33   | 26,84  | 58,44         | 3,30               |
| Frakcije<br>eluirane s<br>kolone<br>Sepharse-<br>FA s<br>Puferom 3 | 6,00              | 0,48   | 2,88                | 5,93   | 17,08  | 37,19         | 59,30              |
| Pročišćeni<br>protein<br>nakon<br>ugušćivanja<br>i dijalize        | 182 $\mu\text{L}$ | 5,22   | 0,95                | 8,73   | 8,28   | 18,06         | 87,30              |

Zamijetio se porast specifične aktivnosti tijekom pročišćavanja. Aktivnost frakcija dobivenih ispiranjem kolone Q-Sepharse s Puferom B je bila niska u obje serije pročišćavanja (u prvoj seriji:  $0,032 \mu\text{g min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ), što je značilo da je udio proteina *Hp*-PNP vezanog na kolonu Q-Sepharse bio mali. U frakcijama dobivenim ispiranjem Sepharse-FA kolone s Puferom 1 gotovo da uopće nije dolazilo do razgradnje supstrata, što znači da se sva količina *Hp*-PNP u uzorku vezala na kolonu Sepharse-FA.

### 3.1.3. SDS-PAGE

Čistoća proteina tijekom pročišćavanja je provjerena i SDS-PAGE elektroforezom na 12,5 % akrilamid/bisakrilamid gelu. Na Slici 20 prikazana je slika gela obojanog bojom *Coomassie Brilliant Blue R-250* s uzorcima iz različitih faza pročišćavanja proteina *Hp*-PNP (*SE-250 Mighty Small* (GE Healthcare) sustav za elektroforezu, elektroforeza je trajala 47 minuta pri konstantnoj jakosti struje od 25 mA). Strelicom je označen položaj monomera *Hp*-PNP proteina, teoretske molekulske mase 25,786 kDa što odgovara i položaju na gelu.



Slika 20. Gel dobiven nakon razdvajanja proteina SDS-PAG elektroforezom obojen bojom *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Lokacija *Hp-PNP* proteina je prikazana sa strelicom. 1 - stanice prije dodatka IPTG-a, 2 - stanice nakon dodatka IPTG-a, 3 i 4 - talog razbijenih stanica nakon ekstrakcije proteina, 5 - standardi molekulskih masa, 6 - početni uzorak za kromatografiju na koloni Q-Sepharose, 7 - početni uzorak za kromatografiju na koloni Sepharose-FA, od 8 do 10 - frakcije 119-121 dobivene ispiranjem kolone Sepharose-FA Puferom 3.

Na Slici 20 ekspresija proteina *Hp-PNP* nije bila zamjetno veća nakon dodatka IPTG-a. Također, činilo se da je velika količina proteina zaostala u talogu nakon centrifugiranja proteinskog ekstrakta. No, sa sigurnošću se može reći da je u konačnici protein bio dobro pročišćen, što se vidi u jažicama označenim brojevima od 8 do 10.

### 3.2. Kristalizacija proteina *Hp-PNP*

Iz prve serije kristalizacija opisane u poglavlju 2.2.1.2.1., nakon nekoliko mjeseci nastali su kristali iz uvjeta MIDAS\_B7. To je bilo donekle neočekivano s obzirom na prethodne rezultate, u kojima su kristali nastali u JCSG\_B8 uvjetima, a nisu se pojavili u MIDAS\_B7 uvjetima. (Štefanić i sur. 2017; Narczyk i sur. 2018).

U kapljici na položaju D5 nastalo je nekoliko dovoljno velikih kristala koji su zatim namakani u šest otopina različitih koncentracija fosfata u MIDAS\_B7 uvjetima (prva metoda u poglavlju 2.2.1.2.3.). Odabrane su sljedeće koncentracije fosfata: 100 mmol L<sup>-1</sup>, 50 mmol L<sup>-1</sup>, 25 mmol L<sup>-1</sup>, 12,5 mmol L<sup>-1</sup>, 6,5 mmol L<sup>-1</sup>, 3,1 mmol L<sup>-1</sup>.

U kapljici na položaju D2 nastalo je također nekoliko kristala koji su namakani drugom metodom navedenom u poglavlju 2.2.1.2.3. U ovom slučaju, jedan kristal je zamrznut kao

kontrolni (bez namakanja u otopini fosfata), a drugi su namakani u kapljici u koju se postupno dodavao fosfat pri čemu su konačne koncentracije fosfata za svaki pojedini kristal bile sljedeće: 0,25 mmol L<sup>-1</sup>, 0,59 mmol L<sup>-1</sup>, 1,11 mmol L<sup>-1</sup>, 2,01 mmol L<sup>-1</sup> i 3,51 mmol L<sup>-1</sup>.

U kapljici na položaju C1 nastala su dva kristala, jedan je smrznut kao kontrolni a drugi je namakan jednu minutu u otopini fosfata koncentracije 16,67 mmol L<sup>-1</sup>.

Kao što je već spomenuto, zbog nedovoljnog broja nastalih kristala, za ovaj eksperiment su također korišteni i kristali proteina *Hp*-PNP prethodno pripremljeni u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju u jednakim uvjetima kristalizacije i s istim metodama opisanim u ovom radu.

Iz kapljice D5 kristali (prethodno dobiveni) su provučeni kroz sljedeće koncentracije fosfata u uvjetima MIDAS\_B7: 100 mmol L<sup>-1</sup>, 50 mmol L<sup>-1</sup>, 25 mmol L<sup>-1</sup> i 12,5 mmol L<sup>-1</sup>; iz kapljice D3 (u koju je dodavan prethodno i formicin B u koncentraciji od 15 mmol L<sup>-1</sup>; formicin B je inhibitor PNP-a strukturno sličan formicinu A) su prvo tri kristala provučena kroz 100 mmol L<sup>-1</sup>, 50 mmol L<sup>-1</sup>, 25 mmol L<sup>-1</sup> nakon čega su zamrznuti, a zatim su, nakon tri tjedna dijelovi tih kristala koji su zaostali u kapljicama fosfata u uvjetima MIDAS\_B7, također zamrznuti. U ovim dvjema kapljicama je prethodno (prije kristalizacije) protein *Hp*-PNP već bio inkubiran s fosfatom u koncentraciji 0,75 mmol L<sup>-1</sup>, no s obzirom da je riječ o niskoj koncentraciji u odnosu na one u koje su kristali nakon toga dodavani, to nije uzeto u obzir.

Svi navedeni kristali su zamrznuti koristeći tekući dušik i snimljeni na sinkrotronu.

U kapljici C4 je nastao jedan veći trokutasti kristal. Razlomljen je na tri dijela, jedan je odvojen za kontrolu a druga dva su namakana u 100 mmol L<sup>-1</sup> i 50 mmol L<sup>-1</sup> otopini fosfata u MIDAS\_B7 uvjetima. Ovi kristali su snimljeni na rendgenskom difraktometru Institutu Ruđer Bošković, te naknadno i na sinkrotronu.

Koncentracija fosfata u otopinama pripremljenim drugom metodom navedenom u poglavlju 2.2.1.2.3 je djelomično aproksimacija s obzirom da je točan volumen kapljice u koju je dodavana otopina fosfata nepoznat, odnosno nešto manji od početnog 2 μL zbog kristalizacijske metode strujanja para.

### **3.3. Određivanje strukture**

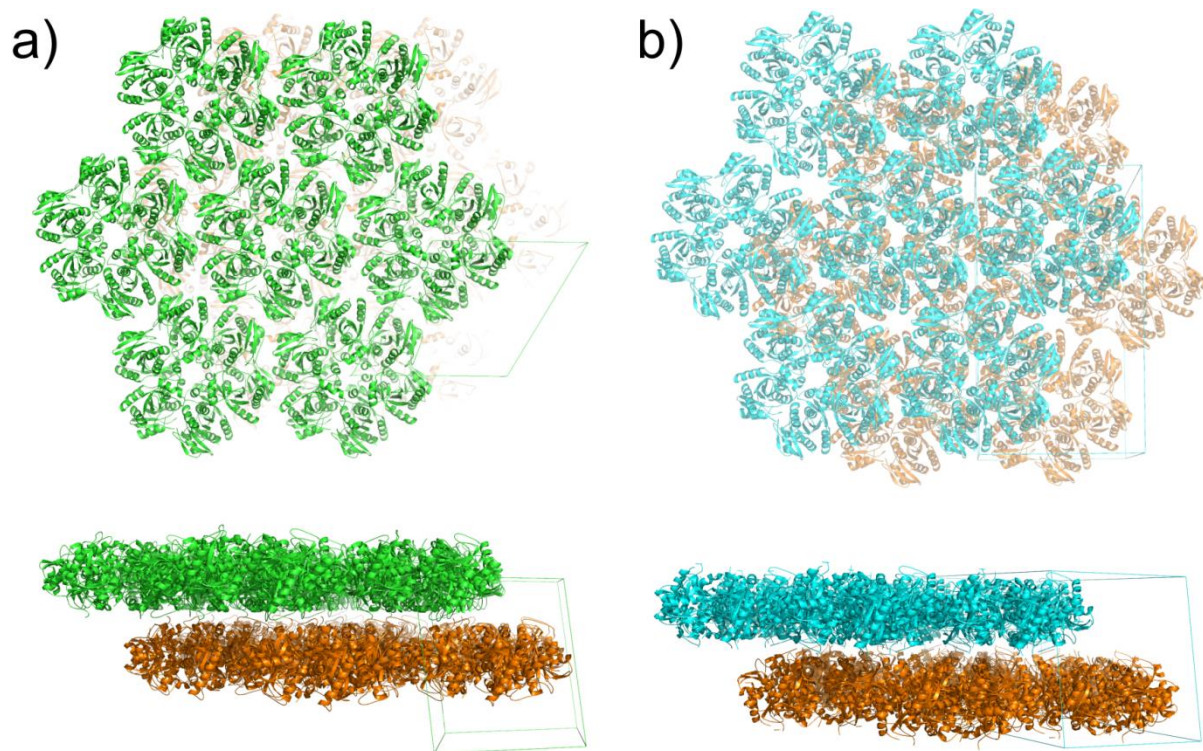
Od 14 kristala koji su uspješno pripremljeni za ovaj diplomski rad i 8 koji su prethodno kristalizirani u konačnici su uspješno određene dvije strukture. To je posljedica toga što je kvaliteta difrakcije bila takva da se većina podataka prikupljenih na sinkrotronu nije mogla uspješno indeksirati i dalje procesirati. Kristali su pokazivali izuzetno visoku mozaičnost, tj.

svojstvo da se jedan refleks „razmazao“ na nekoliko uzastopnih difrakcijskih slika. Prva struktura (dalje u tekstu nazivana struktura 1) je dobivena iz prethodno postavljene kapljice i prethodno nastalih kristala u  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  otopini fosfata u uvjetima MIDAS\_B7 (kapljica u koju prethodno nije dodavan formicin B). Druga struktura (dalje u tekstu nazivana struktura 2) je dobivena iz kristala iz kapljice na položaju D2, namakanog drugom metodom iz poglavlja 2.2.1.2.3. u  $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$  otopini fosfata u uvjetima MIDAS\_B7. Karakteristike riješenih struktura te statistički podaci o utočnjavanju su navedeni u Tablici 5. Obje strukture su vizualizirane u programu PyMOL što je i prikazano na slikama od 21 do 25. Na slikama 22, 23 i 25 diferencijalne mape elektronskih gustoća,  $2F_o-F_c$  i  $F_o-F_c$ , prikazane su plavom i crvenom bojom (diferencijalne mape se računaju tako da su im koeficijenti zapravo razlike u između opaženih, engl. *observed*, i izračunatih, engl. *calculated*, amplituda strukturnih faktora). Mapa  $2F_o-F_c$  prikazuje područja gdje elektronska gustoća proizlazi iz opaženih amplituda, dok elektronska gustoća  $F_o-F_c$  pokazuje područja u koje treba sagraditi djelove modela koji nedostaju. U Tablici 5 naveden je broj polarnih kontakata fosfata iz različitih lanaca prema aminokiselinskim ostacima u strukturi 1 proteina Hp-PNP (dobiveno sa Slike 24).

Tablica 4. Podatci rendgenske strukturne analize i statistike utočnjavanja za strukturu 1 i strukturu 2.

|  | Struktura 1                           | Struktura 2              |
|--|---------------------------------------|--------------------------|
| Valna duljina/ Å   | 1,0                                   | 1,0                      |
| Rezolucija/ Å  | 46,76 - 2,2 (2,28 - 2,2) <sup>†</sup> | 38,24 - 2,1 (2,17 - 2,1) |
| Prostorna grupa  | <i>C</i> 2                            | <i>P</i> 1               |
| Kristalni sustav   | monoklinski                           | triklinski               |
| Jedinična ćelija   |                                       |                          |
| Dimenzije/ ( <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> /(Å))            | 162,09 93,52 96,13                    | 93,36 93,31 95,27        |
| Kutevi ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ /(°))                 | 90 100,38 90                          | 92,58 97,87 120,06       |
| Ukupni broj refleksa   | 245080 (32185)                        | 209293 (21618)           |
| Broj jedinstvenih refleksa                                   | 66612 (6030)                          | 120766 (8935)            |
| Multiplicitet  | 3,2 (3,2)                             | 1,7 (1,0)                |
| Kompletnost podataka (%)                                     | 91,8 (84,5)                           | 75,7 (55,8)              |
| Srednja vrijednost <i>I</i> /sigma( <i>I</i> )               | 3,9 (1,4)                             | 3,7 (1,0)                |
| Wilsonov B-faktor  | 19,02                                 | 18,09                    |
| <i>R</i> <sub>merge</sub>                                    | 0,22 (0,80)                           | 0,15 (0,67)              |
| Utočnjavanje   |                                       |                          |
| Ukupan broj refleksa korištenih za utočnjavanje              | 66534 (6013)                          | 120744 (8927)            |
| Broj refleksa korišten za dobivanje <i>R</i> <sub>free</sub> | 1998 (180)                            | 1975 (148)               |
| <i>R</i> <sub>work</sub>                                     | 0,18 (0,25)                           | 0,23 (0,29)              |
| <i>R</i> <sub>free</sub>                                     | 0,25 (0,35)                           | 0,33 (0,38)              |
| Broj nevodikovih atoma                                       | 11490                                 | 22022                    |
| Broj makromolekula   | 10782                                 | 21413                    |
| Broj liganda   | 135                                   | 75                       |
| Broj aminokiselinskih ostataka                               | 1388                                  | 2770                     |
| RMS (veze)   | 0,05                                  | 0,01                     |
| RMS (kutovi)   | 0,96                                  | 1,17                     |
| Ramachandran povoljni (%)                                    | 96                                    | 92                       |
| Ramachandran dopušteni (%)                                   | 3,7                                   | 6,7                      |
| Ramachandran nedopušteni (%)                                 | 0,15                                  | 1,3                      |
| Rotamer nedopušteni (%)                                      | 2,8                                   | 4,3                      |
| Srednji B-faktor   | 23,77                                 | 20,78                    |
| B-faktor za makromolekule                                    | 23,65                                 | 20,88                    |
| B-faktor za ligande  | 30,76                                 | 21,02                    |
| B-faktor za otapalo  | 24,35                                 | 16,61                    |

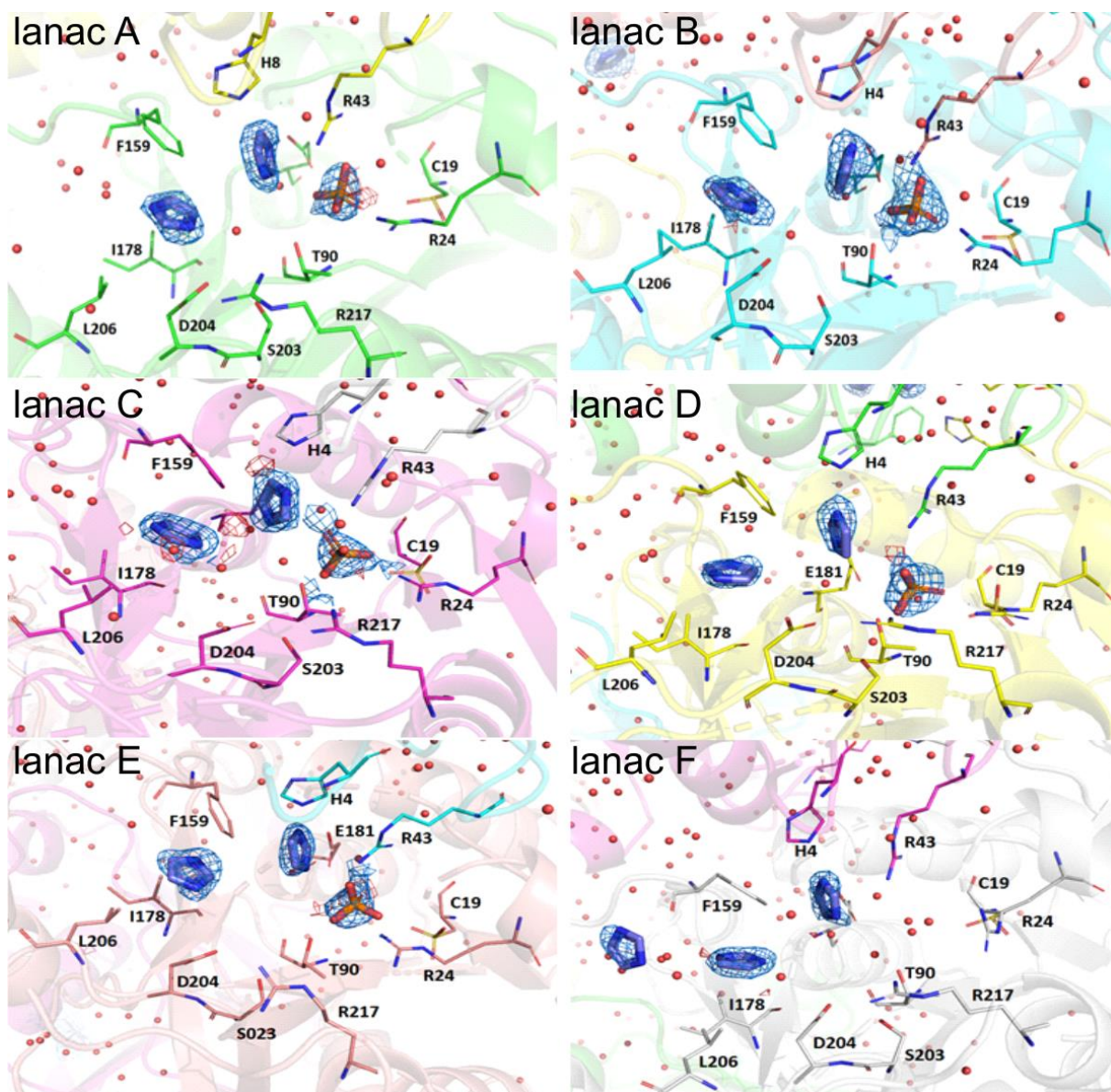
<sup>†</sup>Podaci u zagradi se odnose na ljusku najviše rezolucije



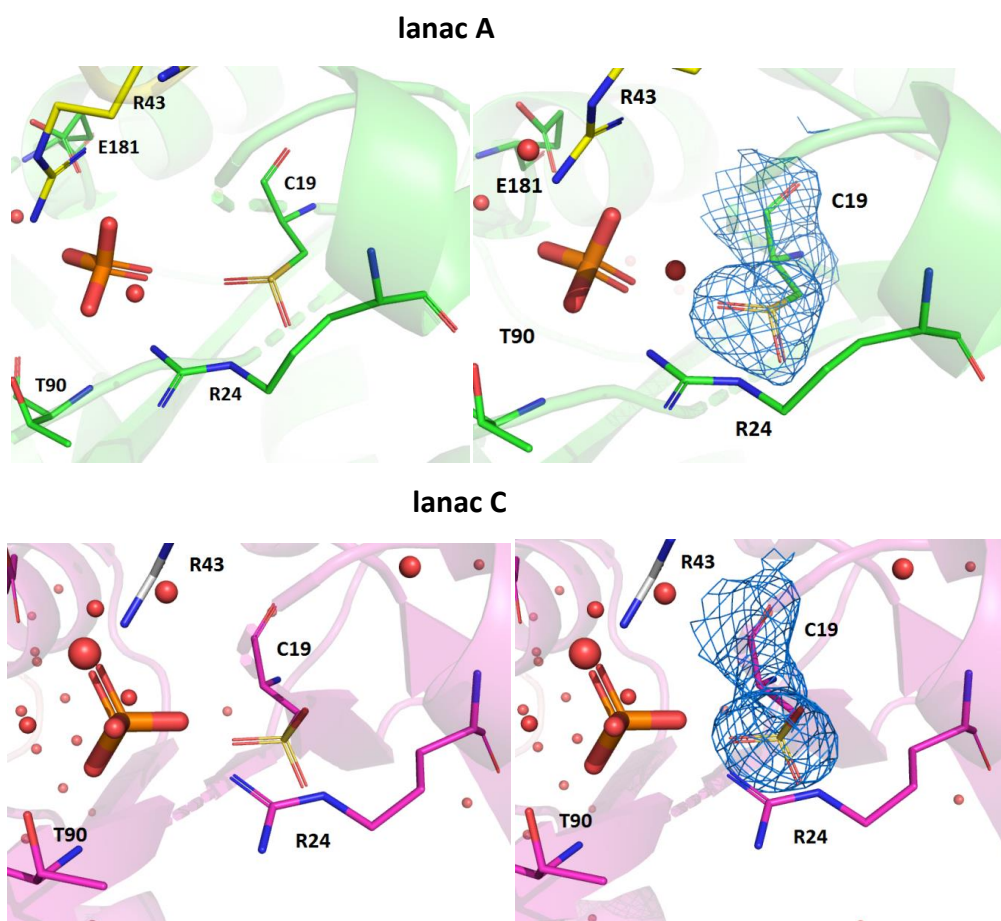
Slika 21. Prikaz slaganja heksamera u kristalu u strukturi 1, pod a) i strukturi 2 pod b). Vidljivo je da se u oba slučaja kristalno pakiranje ostvareno kao slaganje slojeva. U svakom sloju heksameri proteina se pakiraju u približno heksagonsku planarnu slagalinu, što je omogućeno oblikom samog proteina.

Relativno malo kristalnih kontakata između slojeva omogućava „klizanje“ i dovodi do nepotpune uređenosti kristala, a time i do slabije difrakcije.





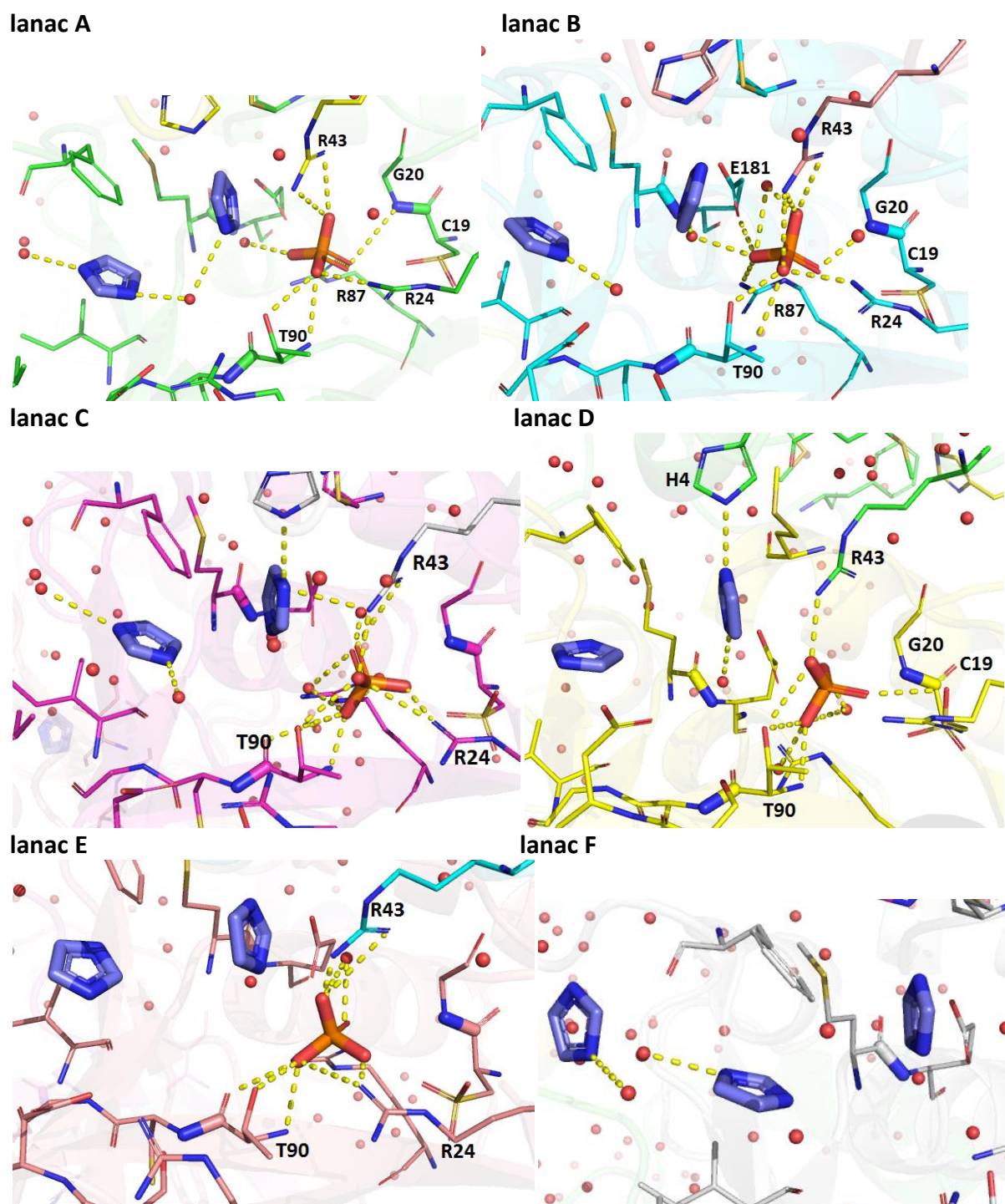
Slika 22. Prikaz aktivnih mjesta proteina *Hp*-PNP u Strukturi 1. Ključne aminokiseline koje čine aktivno mjesto su prikazane štapićastim prikazom i označene kraticama. Plavom bojom je prikazana mapa elektronske gustoće ( $2F_o-F_c$  mapa na razini od  $1\sigma$ ), a crvenom također mapa elektronske gustoće ( $F_o-F_c$  mapa na razini od  $3\sigma$ ). Zbog jasnoće prikaza elektronska gustoća oko aminokiseline i oko molekula vode je izostavljena. Molekule vode su prikazane kao crvene sfere. Aminokiseline koje u pojedino aktivno mjesto dolaze iz drugog monomera u dimeru su prikazane bojom različitom od ostatka aktivnog mjesta. U aktivnim mjestima lanaca A, B, C, D i E došlo je do vezanja fosfata te dviju molekula imidazola, dok je u aktivnom mjestu lanca F došlo do vezanja tri molekule imidazola.



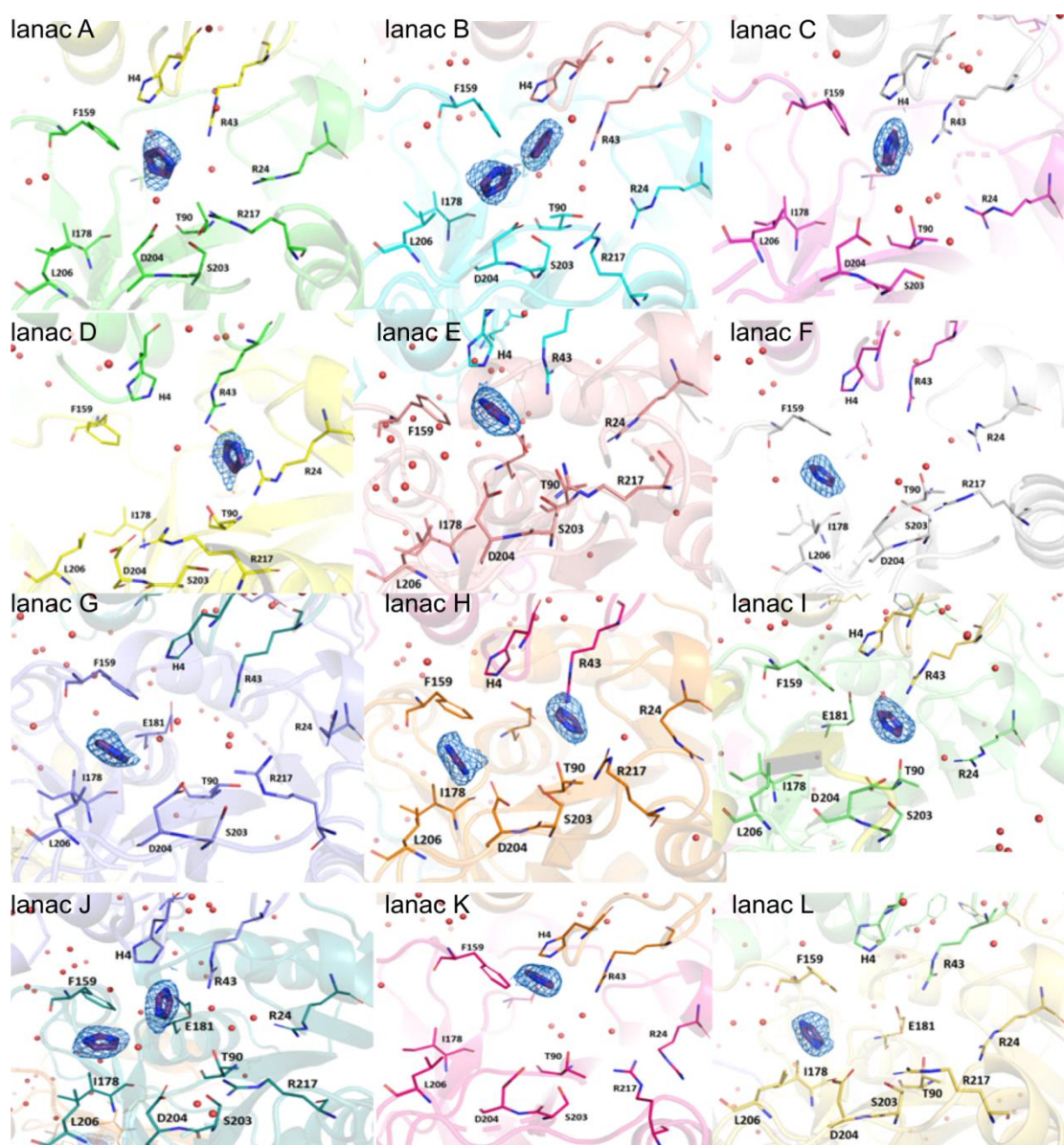
Slika 23. Prikaz oksidiranih cisteina u lancu A i C u strukturi 1. Na lijevom panelu prikazani su samo oksidirani cisteini a na desnom uz oksidirane cisteine i mape elektronske gustoće  $2F_o-F_c$  na razini od  $1\sigma$  (prikazana je plavom bojom). Ključne aminokiseline koje čine aktivno mjesto su prikazane štapićastim prikazom i označene kraticama. Zbog jasnoće prikaza elektronska gustoća oko aminokiselina i oko molekula voda je izostavljena. Molekule vode su prikazane kao crvene sfere. Aminokiseline koje u pojedino aktivno mjesto dolaze iz drugog monomera u dimeru su prikazane bojom različitom od ostatka aktivnog mjesta.

Tablica 5. Broj polarnih kontakata fosfata iz različitih lanaca prema aminokiselinskim ostacima u strukturi 1 proteina *Hp*-PNP.

|                | R24 | R43 | T90 | R87 | C19/G20 | E181 | H2O |
|----------------|-----|-----|-----|-----|---------|------|-----|
| <b>Lanac A</b> | 1   | 2   | 2   | 1   | 1       | -    | 1   |
| <b>Lanac B</b> | 1   | 2   | 2   | 1   | 1       | 1    | 3   |
| <b>Lanac C</b> | 2   | 2   | 4   | -   | -       | -    | 3   |
| <b>Lanac D</b> | -   | 1   | 3   | -   | 1       | -    | 2   |
| <b>Lanac E</b> | 2   | 2   | 3   | -   | -       | -    | 2   |



Slika 24. Prikaz aktivnih mjesta u strukturi 1. Žutom bojom su označeni polarni kontakti koje ligandi ostvaruju s vodom i aminokiselinskim ostacima. Označene su one aminokiseline s kojima ligandi ostvaruju kontakte. Molekule vode prikazane su prikazane kao crvene sfere. Točan broj kontakata koje fosfati ostvaruju je naznačen u Tablici 5.



Slika 25. Prikaz aktivnih mjesta proteina *Hp*-PNP u strukturi 2. Ključne aminokiseline koje čine aktivno mjesto su prikazane štapičastim prikazom i označene kraticama. Plavom bojom je prikazana mapa elektronske gustoće ( $2F_o-F_c$  mapa na razini od  $1\sigma$ ), a crvenom mapa elektronske gustoće ( $F_o-F_c$  mapa na razini od  $3\sigma$ ). Zbog jasnoće prikaza data je samo elektronska gustoća oko molekula imidazola. U svim aktivnim mjestima se nalazi po jedna (lanci A, C, D, E, F, G, I, K i L) ili po dvije molekule inozina (lanci B, H i J). Molekule vode prikazane su kao crvene sfere. Aminokiseline koje su različite boje od ostatka aktivnog mjesta dolaze iz drugog monomera unutar jednog dimera.

## 4. Rasprava

Objekte strukture u ovom radu određene su metodom molekulske zamjene koristeći kao model strukturu proteina *Hp*-PNP iz kliničkog izolata bakterije *H. pylori* (PDB kod 5MX4). Struktura 1 pripada u monoklinskoj prostornoj grupi *C* 2 s kristalografskim osima  $a = 162,1$  Å,  $b = 93,5$  Å,  $c = 96,1$  Å i kutem  $\beta = 100,4^\circ$ . Struktura 2 pripada u triklinskoj prostornoj grupi *P* 1 s kristalografskim osima  $a = 93,4$  Å,  $b = 93,3$  Å,  $c = 95,3$  Å i kutovima  $\alpha = 92,6^\circ$ ,  $\beta = 97,9^\circ$  i  $\gamma = 120,6^\circ$ . Podaci o difrakcijskim eksperimentima i utočnjavanju struktura su dati u Tablici 4. Struktura 1 u asimetričnoj jedinici kristala sadrži jedan heksamer, dok struktura 2 sadrži dva simetrijski nezavisna heksamera.

U strukturi 1 dobivenoj namakanjem kristala proteina *Hp*-PNP u 50 mmol L<sup>-1</sup> otopini fosfata došlo je do vezanja fosfata u 5 od 6 aktivnih mjesta no, suprotno očekivanjima, nije došlo do zatvaranja aktivnog mjesta odnosno pomicanja zavojnice H8 prema aktivnom mjestu (Slika 22). To je u ovom radu prvi put primijećeno među dosad riješenim strukturama proteina *Hp*-PNP. U proteinu PNP iz proteina *E. coli* je već jednom također primijećen isti slučaj, u strukturi PDB koda 3OOH (Sadrži tri heksamera u asimetričnoj jedinici kristala, u svakom heksameru su dva aktivna mjesta u zatvorenoj te četiri u otvorenoj konformaciji, a sva aktivna mjesta sadrže molekulu fosfata) (Mikleušević i sur. 2011). Na mjestu vezanja riboznog ostatka i purinske baze došlo je do vezanja imidazola (jednog od sastojaka MIDAS\_B7 kristalizacijskih uvjeta) u svim strukturama. U strukturi 1 se još nalaze molekule imidazola na lokacijama izvan aktivnog mjesta u blizini površine proteina, te jedna u samom središtu heksamera.

Zanimljivo je da je u ovoj strukturi došlo i do oksidacije bočnog lanca Cys19 koji se u nalazi u blizini aktivnog mjesta (Slika 22 i Slika 23) u -SO<sub>2</sub><sup>-</sup> (A, B i E) ili u -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (cistein oksidiran u cisteinsku kiselinu) (C, D i F). To je nedvojbeno vidljivo u povećanju oblaka elektronske gustoće na kraju cisteina (Slika 23). Ovakva promjena aminokiseline koja je u neposrednoj blizini veznog mjesta fosfata može u velikoj mjeri utjecati na njegovo vezanje. Ova oksidacija je mogući uzrok drugačijeg smještanja fosfata u aktivnom mjestu, a može biti i razlog što usprkos vezanju fosfata nije došlo do zatvaranja aktivnog mjesta.

U strukturi 1 molekule imidazola većinom nisu koordinirane aminokiselinama, već uglavnom ostvaruju polarne kontakte s jednom ili dvije molekule vode (Slika 24). Samo u lancima C i D po jedan imidazol ostvaruje vodikove veze s His4 (iz lanca D) te s His4 i Asp43 (iz lanca C). Polarni kontakti fosfata prema aminokiselinskim ostacima naznačeni su u Tablici 5. Kontakti su ostvarivani s bočnim lancima aminokiselina osim u slijedećim slučajevima kada ostvaruju

kontakte peptidnom vezom: jedna vodikove veza iz lanaca C i E sa Thr90, koja ostvaruje kontakt s kisikom iz peptidne veze; jedna vodikova veza iz lanaca A i B, koja ostvaruje kontakt s dušikom iz peptidne veze Cys19; te po jedna veza iz lanaca A, B, C, D i E, koja ostvaruje kontakt s dušikom iz peptidne veze Thr90. Fosfati sveukupno najviše vodikovih veza ostvaruju s aminokiselinama Thr90, Asp43 i molekulama vode. Svi polarni kontakti su dosad već zamijećeni u drugim strukturama proteina *Hp*-PNP (Štefanić i sur. 2017; Narczyk i sur. 2018).

U strukturi 2 dobivenoj namakanjem kristala proteina *Hp*-PNP u 0,25 mmol L<sup>-1</sup> otopini fosfata nije došlo do vezanja fosfata u aktivno mjesto. No, u svim aktivnim mjestima se nalazi po jedna (lanci A, C, D, E, F, G, I, K i L ) ili po dvije molekule imidazola (lanci B, H i J) (imidazol je jedan od sastojaka MIDAS\_B7 kristalizacijskih uvjeta) što je i prikazano na Slici 25.

Tijekom rješavanja ovih struktura postojale su statističke naznake u podacima da je u strukturama došlo do srastanja (eng. *twinning*). Srastanje je moguće u kristalima kada jedinična ćelija ima višu simetriju nego što je ima sama prostorna grupa. Posljedica srastanja je djelomično ili čak potpuno preklapanje refleksa iz više kristalnih domena. Problem je onda refleksne različitih rešetki prepoznati i razdvojiti. Posljedica toga je da se može činiti da protein kristalizira u većoj simetriji od one u kojoj se zapravo nalazi. Dodatni problem je što je udio različitih rešetki nepoznat (Rupp 2009).

U slučaju prostorne grupe *C* 2 (u kojoj je riješena struktura 1) dodatnu komplikaciju stvara činjenica da je omjer *a* i *b* stranice približno jednak  $\sqrt{3}$  ( $\frac{162,1}{93,5} = 1,733 \sim \sqrt{3} = 1,732$ ). To dovodi do toga da je gledano okomito na ravninu *ab* u kristalu pakiranje približno jednako heksagonskom. To je posljedica toga što su molekule proteina približno heksagonskog oblika i slažu se jedna do druge u ravninu koja je paralelna ravnini *ab* kristala (Slika 21). Ovakve kristalne patologije mogu znatno otežati, pa i potpuno onemogućiti pronalaženje prave simetrije i indeksiranje difrakcijskog uzorka kristala, a time i samo određivanje strukture. Upravo ovo je vjerojatan razlog neuspješnog procesiranja ostalih difrakcijskih podataka na ovim kristalima.

Strukture 1 i 2 pokazuju da je do vezanja fosfata došlo pri koncentraciji od 50 mmol L<sup>-1</sup>, a nije došlo pri nižim koncentracijama. Elektronska gustoća na mjestu vezanja fosfata je nedovoljna da bi ukazala da se fosfat veže u punoj zaposjednutosti (engl. *occupancy*). Na žalost, podatke prikupljene pri koncentracijama fosfata između ovih krajnjih vrijednosti nije bilo moguće procesirati zbog već navedenih problema. Isto tako je moguće da je vrijeme koje su kristali

proveli u namakanju, a koje je bilo ograničeno radom na jednoj te istoj kapljici, bilo prekratko za puno vezanje fosfata. To može biti povezano i sa znatnim utjecajem ionske jakosti na konstante vezanja fosfata u aktivno mjesto (Narczyk i sur. 2018), a do tih se saznanja došlo tek nedavno. U budućim eksperimentima svakako bi trebalo nastojati dobiti kristale iz kristalizacijskih uvjeta u kojima nema imidazola ili drugih spojeva koji utječu na ionsku jakost.

Jedan od razloga zbog kojih je kristalne strukture u ovom radu bilo toliko problematično za odrediti leži u posebnosti njihovih pakiranja, koja su u slučaju ove dvije strukture, donekle analogna iako u dvije različite prostorne grupe (Slika 21). Naime, kristalno pakiranje se može opisati kao slaganje heksamera u približno heksagonsku ravninsku rešetku što je posljedica samog oblika heksamera. Tada se takvi dvodimenzionalni slojevi slažu jedan na drugi ali je međusobni posmak slojeva različit kod dvaju struktura, što ukupno vodi na dvije različite prostorne grupe,  $P 1$  i  $C 2$ . Postoji mogućnost da je smicanje slojeva u različitim smjerovima relativno termodinamski blizu na energetske skali, te da to dovodi do postojanja ove dvije prostorne grupe, ali i neuređenosti što je onemogućilo procesiranje ostalih prikupljenih podataka.

## 5. Zaključak

Cilj istraživanja opisanih u ovom radu bio je praćenje uloge fosfata na konformacijske promjene aktivnih mjesta proteina *Hp*-PNP. Mišljenje je da vezanje fosfata u aktivno mjesto dovodi do njegovog zatvaranja (a pretpostavka je da samo u zatvorenim mjestima može doći do katalize ovim enzimom), ali utjecaj samog fosfata nije se do sada mogao odvojiti od utjecaja mnogobrojnih drugih čimbenika. Usprkos mnogim poteškoćama kod određivanja struktura u ovom radu, ustanovljeno je da je u strukturi 1 došlo do vezanja fosfata ali to nije dovelo do zatvaranja aktivnog mjesta, suprotno dosadašnjem mišljenju i saznanjima iz već otprije određenih struktura proteina *Hp*-PNP. U strukturi 2, pri nižoj koncentraciji fosfata, nije došlo do vezanja fosfata u aktivno mjesto već samo do vezanja molekula imidazola iz kristalizacijskih uvjeta. U obje strukture sva aktivna mjesta su ostala otvorena. U strukturi 1 je došlo i do vezanja dviju molekula imidazola uz fosfat u aktivnom mjestu. U ovoj strukturi je također došlo do oksidacije bočnog lanca Cys19 u  $-SO_2^-$  (u tri lanca) ili  $-SO_3^-$  (u tri lanca). Oksidacija bi mogla imati utjecaj na zatvaranje aktivnog mjesta s obzirom da se oksidirani cistein nalazi u blizini aktivnog mjesta i veznog mjesta za fosfat. Način slaganja heksamera u slojevima u oba kristala kao i efekt *twinning*-a u strukturi 1 vrlo su vjerojatno imali utjecaj na pojavu komplikacija prilikom indeksiranja refleksa, određivanja jedinične ćelije i prostorne grupe, a u konačnici i na kvalitetu dviju riješenih struktura.



## 6. Literatura

Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. i Zwart, P. H. (2010): PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D*, **66(2)**: 213–221.

Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248–254.

Bzowska, A., Luić, M., Schröder, W., Shugar, D., Saenger, W. i Koellner, G. (1995): Calf spleen purine nucleoside phosphorylase: purification, sequence and crystal structure of its complex with an N(7)-acycloguanosine inhibitor. *FEBS Letters*, **367(3)**: 214–218.

Bzowska A., Kazimierczuk, Z. i Seela, F. (1998): 7-Deazapurine 2'-deoxyribofuranosides are noncelavable competitive inhibitors of *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase (PNP), *Acta Biochimica Polonica*, **45**: 755–768.

Bzowska, A., Kulikowska, E. i Shugar, D. (1993): Linear free energy relationships for N(7)-substituted guanosines as substrates of calf spleen purine nucleoside phosphorylase. Possible role of N(7)-protonation as an intermediary in phosphorolysis. *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences*, **48**: 803–811.

Bzowska, A., Kulikowska, E. i Shugar, D. (2000): Purine nucleoside phosphorylases: Properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacology and Therapeutics*, **88(3)**: 349–425.

Cao, L. i Yu, J. (2015): Effect of *Helicobacter pylori* infection on the composition of gastric microbiota int he development of gastric cancer. *Gastrointestinal Tumors*, **2(1)**: 14–25.

Correa, P., Haenszel, W., Cuello, C., Tannenbaum, S. i Archer, M. (1975): A model for gastric cancer epidemiology. *The Lancet*, **2**: 58–59.

Emsley, P. i Cowtan K. (2004): Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D*, **60(12)**: 2126–2132.

Finney J.L. (1977): The organization and function of water in protein crystals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **278(959)**: 3–32.

Gasbarrini, A., Franceschi, F., Tartaglione, R., Landolfi, R., Pola, P. i Gasbarrini, G. (1998): Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. *The Lancet*, **352(9131)**: 878.

Jones, J.W. i Robins, R.K. (1963): Purine nucleosides. III. Methylation studies of certain naturally occurring purine nucleosides, *Journal of the American Chemical Society*, **85**: 193–201.

Kabsch W. (2010): XDS. *Acta Crystallographica Section D*, **66(2)**: 125–132.

Kierdaszuk, B., Modrak-Wójcik, A. i Shugar, D. (1997): Binding of phosphate and sulfate anions by purine nucleoside phosphorylase from *E. coli*: ligand-dependent quenching of enzyme intrinsic fluorescence. *Biophysical Chemistry*, **63**: 107–118.

Kline, P. C. i Schramm V. L. (1993): Purine nucleoside phosphorylase. Catalytic mechanism and transition-state analysis of the arsenolysis reaction. *Biochemistry*, **32(48)**: 13212–13219.

Koellner G., Bzowska A., Wielgus-Kutrowska B., Luić M., Steiner T., Saenger W. i Stepieński J. (2002): Open and closed conformation of the *E. coli* purine nucleoside phosphorylase active center and implications for the catalytic mechanism. *The Journal of Molecular Biology*, **315**: 351–371.

Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M. i Kuipers, E. J. (2006): Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, **19(3)**: 449–490.

Liechti, G. i Goldberg, J. B. (2012): *Helicobacter pylori* relies primarily on the purine salvage pathway for purine nucleotide biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, **194(4)**: 839–854.

Luić, M. i Štefanić, Z. (2016): Can crystal symmetry and packing influence the active site conformation of homohexameric purine nucleoside phosphorylases?. *Croatica Chemica Acta*, **89(2)**: 1–6.

Matthews, B.W. (1968): Solvent content of protein crystals. *The Journal of Molecular Biology*, **33(2)**: 491–487.

Marais, A., Mendz, G. L., Hazell, S. L. i Mégraud, F. (1999): Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63(3)**: 642–674.

Marshall, B. J. i Warren, J. R. (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet*, **323(8390)**: 1311–1315.

Mbulaiteye, S.M., Hisada, M. i El-Omar, E.M. (2009): *Helicobacter pylori* associated global gastric cancer burden. *Frontiers in Bioscience*, **14**: 1490–1504.

McPherson A. (2009): *Introduction to macromolecular crystallography*. JohnWiley & Sons, Inc.

Mégraud, F. (2012): The challenge of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: The comeback of bismuth-based quadruple therapy. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, **5(2)**: 103–109.

Menz, G. L., Shepley, A. J., Hazell, S. L. i Smith, M. A (1997): Purine metabolism and the microaerophily of *Helicobacter pylori*. *Archives of Microbiology*, **168**: 448–456.

Miklešević, G., Štefanić, Z., Narczyk, M., Wielgus-Kutrowska, B., Bzowska, A. i Luić, M. (2011): Validation of the catalytic mechanism of *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase by structural and kinetic studies. *Biochimie*, **93(9)**: 1610–1622.

Monzón, H., Forné, M., Esteve, M., Rosinach, M., Loras, C., Espinós, J. C., Viver, J. M., Salas, A. i Fernández-Bañares, F. (2013): *Helicobacter pylori* infection as a cause of iron

deficiency anaemia of unknown origin. *World Journal of Gastroenterology*, **19(26)**: 4166–4171.

Morris, A. i Nicholson, G. (1987): Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *The American Journal of Gastroenterology*, **82**: 192–199.

Nedenskov, P. (1994): Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 3450–3453.

Narczyk, M., Bertoša, B., Papa, L., Vuković, V., Lešćić-Ašler, I., Wielgus-Kutrowska, B., Bzowska, A., Luić M. i Štefanić, Z. (2018): *Helicobacter pylori* purine nucleoside phosphorylase shows new distribution patterns of open and closed active site conformations and unusual biochemical features. *The FEBS Journal*, (DOI: 10.1111/febs.14403, *u tisku*).

O' Toole, P. W., Lane, M. C. i Porwollik, S. (2000): *Helicobacter pylori* motility. *Microbes and Infection*, **2(10)**: 1207–1214.

Perez-Perez, G. I., Rothenbacher D. i Brenner H. (2004): Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, **9**: 1–6.

Pounder, R. E. i Ng, D (1995): The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **9**: 33–39.

Powell, H. R., Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O. i Leslie, A. G. W. (2017): Integrating macromolecular X-ray diffraction data with the graphical user interface iMosflm. *Nature Protocols*, **12**: 1312–1325.

Rupp B. (2009): *Biomolecular Crystallography*. Garland Science, str. 384–394.

Safavi, M., Sabourian, R. i Foroumadi A.(2016): Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current and future insights. *The World Journal of Clinical Cases*, **4(1)**: 5–19.

Schreiber, S., Bücker, R., Groll, C., Garten, D., Scheid, P., Gatermann, S., Josenhans, C., Bu, R., Azevedo-vethacke, M., Friedrich, S. i Suerbaum, S. (2005): Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen *in vivo*. *Infection and Immunity*, **73(3)**: 1–7.

Solnick, J. V. i Schauer, D. B. (2001): Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, **14(1)**: 59–97.

Stingl, K., Altendorf, K. i Bakker, E. P. (2002): Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis?. *Trends in Microbiology*, **10(2)**: 70–74.

Suzuki, H., Warren, R. i Marshall, B. (2016): *Helicobacter pylori*. Springer.

Štefanić, Z., Mikleušević, G., Luić, M., Bzowska, A. i Leščić Ašler, I. (2017): Structural characterization of purine nucleoside phosphorylase from human pathogen *Helicobacter pylori*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **101**: 518–526.

Štefanić, Z., Mikleušević, G., Narczyk, M., Wielgus-Kutrowska, B., Bzowska, A. i Luić, M. (2013): Still a long way to fully understanding the molecular mechanism of *Escherichia coli* purine nucleoside phosphorylase. *Croatica Chemica Acta*, **86(1)**: 117–127.

Sycuro, L. K., Pincus Z., Gutierrez K. D., Biboy, J., Stern, A. C., Vollmer, W. i Salama N. (2010): Relaxation of peptidoglycan cross-linking promotes *Helicobacter pylori*'s helical shape and stomach colonization. *Cell*, **141(5)**: 822–833.

Testerman, T. L. i Morris, J. (2014): Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, **20(36)**: 12781–12808.

Vagin, A. i Teplyakov, A. (1997): MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of Applied Crystallography*, **30**: 1022–1025.

Yoshiyama, H. i Nakazawa, T. (2000): Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus, *Microbes and Infection*, **2(1)**: 55–60.

Wielgus-Kutrowska, B., Bzowska, A., Tebbe, J., Koellner, G. i Shugar, D. (2002): Purine nucleoside phosphorylase from *Cellulomonas sp.*: Physicochemical properties and binding of substrates determined by ligand-dependent enhancement of enzyme intrinsic fluorescence, and by protective effects of ligands on thermal inactivation of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1597(2)**: 320–334.

Woese, C. R. (1987): Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, **52(2)**: 221–271.

<https://web.expasy.org/protparam/> (pristupljeno 01.05.2017. sa UniProt kodom P56463 )

[https://hamptonresearch.com/documents/growth\\_101/3.pdf](https://hamptonresearch.com/documents/growth_101/3.pdf) (pristupljeno 14.01.2018.)

[http://reference.iucr.org/dictionary/Main\\_Page](http://reference.iucr.org/dictionary/Main_Page) (pristupljeno 14.01.2018.)

<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6544.html> (struktura guo, pristupljeno 16.01.2018.)

[http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.54923.html?rid=332a118d-1501-4516-9f2c-03a6fd78ae17&page\\_num=0](http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.54923.html?rid=332a118d-1501-4516-9f2c-03a6fd78ae17&page_num=0) (struktura ado, pristupljeno 16.01.2018.)

[http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21258279.html?rid=c8faa6df-dc47-47ca-bd32-4291511490ac&page\\_num=0](http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21258279.html?rid=c8faa6df-dc47-47ca-bd32-4291511490ac&page_num=0) (struktura ino, pristupljeno 16.01.2018.)

## 7. Životopis

Rođena sam u Zagrebu 12. 01. 1994. godine. U Zadru sam 2012. godine završila Gimnaziju Jurja Barakovića, opći smjer. Iste godine sam na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala Preddiplomski studij molekularne biologije. Prvostupničku diplomu sam stekla 2015. godine izradom završnog rada pod nazivom: „Triptofan-sintaza: multienzimski kompleks s intramolekulskim tunelom“, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ite Gruić Sovulj. Iste godine sam nastavila studij upisom Diplomskog studija molekularne biologije. U periodu od studenog 2015. do veljače 2017. godine, zajedno s kolegicom Andreom-Hloušek Kasun, volontirala sam na Zavodu za biokemiju, Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, te smo pod vodstvom doc. dr. sc. Morane Dulić izradile rad za natječaj za Rektorovu nagradu pod naslovom “Najmanji analog tRNA<sup>Leu</sup> koji se može uspješno aminoacilirati leucil-tRNA-sintetazom”. Rad je predan na natječaj u akademskoj godini 2016./2017., a u srpnju 2017. godine smo dobile Rektorovu nagradu u kategoriji individualnog znanstvenog i umjetničkog rada.