

# Strukturna karakterizacija Nudix hidrolaze iz amebe *Dictyostelium discoideum*

---

Vlašić, Ana

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:217:322098>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-21**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Ana Vlašić

**Strukturalna karakterizacija Nudix hidrolaze iz  
amebe *Dictyostelium discoideum***

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Marije Luić i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Igora Sablića. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović.

## Zahvale

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Mariji Luić na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju na Institutu Ruđer Bošković. Hvala prof.dr.sc. Dubravki Matković-Čalogović na spremnosti u rješavanju komplikacija vezanih za moj diplomski (i završni) rad. Općenito, hvala Zavodu za opću i anorgansku kemiju, super ste!

Hvala svima koji su tu bili u svakom trenutku prilikom izrade ovog diplomskog rada te na satima i satima mentorstva i savjeta... Ponajviše, Igoru i Zrinki na svemu što su me naučili i na satima rada na mom diplomskom radu, bez vas ne bi ga niti bilo. Hvala još jednom Igoru na svemu što me naučio o kristalografiji, kemiji i životu... Bio mi je užitak raditi sa vama, a svoju ljubav prema poslu prenijeli ste podučavanjem i na mene.

Hvala svim mojim prijateljima (svi se ovdje pronađite, ne stignem vas sve nabrojati!!) koji su uvijek bili tu za mene. Hvala mojoj velikoj obitelji i prijateljima koji su oduvijek vjerovali u mene i na podršci tijekom studiranja, najbolji ste.

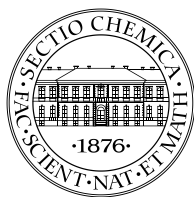
Dinko, hvala na svemu... <3

## Sadržaj

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>2</b>
2.1. <i>Ameba Dictyostelium discoideum</i> .....	2
2.2. Nudix hidrolaze .....	4
2.3. Izopentenil-difosfat-izomeraza.....	7
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1. Materijali i metode</b> .....	<b>10</b>
3.1.1. <i>Kemikalije</i> .....	10
3.1.2. <i>Instrumenti</i> .....	10
<b>3.2. Pročišćavanje divljeg tipa i mutanta proteina E82A</b> .....	<b>11</b>
3.2.1. <i>Prekomjerna ekspresija proteina</i> .....	11
3.2.2. <i>Liza bakterijskih stanica</i> .....	12
3.2.3. <i>Kromatografske metode</i> .....	13
3.2.3.1. <i>Afinitetna kromatografija</i> .....	13
3.2.3.2. <i>Gel-filtracija</i> .....	15
<b>3.3. Biokemijske metode za karakterizaciju pročišćenog proteina</b> .....	<b>16</b>
3.3.1. <i>Određivanje koncentracije proteina</i> .....	16
3.3.2. <i>Gel elektroforeza u denaturirajućim uvjetima</i> .....	17
3.3.3. <i>Određivanje fosfatazne aktivnosti proteina</i> .....	18
<b>3.4. Kristalografske metode</b> .....	<b>19</b>
3.4.1. <i>Kristalizacija metodom strujanja para</i> .....	19
3.4.2. <i>Optimizacija kristalizacijskih uvjeta</i> .....	20

---

3.4.3. Metoda mikrosijanja za kristalizaciju proteina .....	21
3.4.4. Kokristalizacija i namakanje kristala .....	22
3.4.5. Testiranje difrakcije i prikupljanje podataka .....	23
3.4.6. Procesiranje podataka i rješavanje kristalne strukture.....	24
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>25</b>
4.1. Vizualizacija rezultata pročišćavanja proteina .....	25
4.2. Vizualizacija fosfatazne aktivnosti divljeg tipa i mutanta E82A .....	26
4.3. Optimizacija kristalizacije.....	27
4.4. Rješavanje kristalnih struktura.....	29
4.5. Strukturna karakterizacija proteina.....	31
4.5.1. Divlji tip.....	31
4.5.2. Kompleks mutanta E82A sa supstratom .....	32
4.5.3. Usporedba kristalnih struktura.....	34
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>37</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>38</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>40</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>VIII</b>



Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

**Kemijski odsjek****SAŽETAK****STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA NUDIX HIDROLAZE IZ AMEBE *Dictyostelium discoideum***

Ana Vlašić

Istraživanje biljnih dipeptidil-peptidaza III (DPP III) rezultiralo je neočekivanom spoznajom da postoji enzim s dvije funkcionalne domene (Nudix i DPP III), koji usto pokazuje i atipičnu aktivnost Nudix hidrolaza prema supstratu izopentenil-difosfatu (IPP). U svrhu strukturne karakterizacije Nudix domene ovog interesantnog enzima, a na temelju značajne sličnosti primarnih struktura, za istraživanje je odabrana Nudix hidrolaza iz amebe *Dictyostelium discoideum* (DdNudix). Nudix hidrolaze pripadaju nadporodici hidrolitičkih  $Mg^{2+}$ -ovisnih enzima koji djeluju kao fosfataze ili pirofosfohidrolaze.

Divlji tip i neaktivni mutant E82A DdNudix, obilježeni histidinskim privjescima, prekomjerno su eksprimirani u bakteriji *Escherichia coli*, te pročišćeni afinitetnom kromatografijom i gel filtracijom. Optimizirani su uvjeti kristalizacije proteina DdNudix. Metodom anomalnog raspršenja riješena je struktura divljeg tipa proteina obilježenog selenometioninom do razlučivanja od 2,4 Å. Metodom molekulske zamjene riješena je struktura mutanta proteina E82A sa supstratom IPP do razlučivanja od 1,6 Å. Detaljnom strukturnom analizom ustanovljene su sličnosti i razlike s Nudix hidrolazama kao i s izopentenil-difosfat-izomerazama.

(41 stranica, 21 slika, 3 tablice, 35 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: Nudix hidrolaze, izopentenil-difosfat-izomeraze, *Dictyostelium discoideum*, kristalna struktura, metoda SAD, metoda molekulske zamjene

Mentor: dr. sc. Marija Luić, znanstvena savjetnica, IRB i nasl. red. prof. PMF

Neposredni voditelj: dr. sc. Igor Sabljčić, viši stručni suradnik

Nastavnik: prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović

Ocjenitelji:

1. dr. sc. Marija Luić, znanstvena savjetnica, 2. izbor, IRB i nasl. red. prof. PMF
  2. prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, Prirodoslovno-matematički fakultet
  3. izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević, Prirodoslovno-matematički fakultet
- Zamjena: prof. dr. sc. Biserka Prugovečki, Prirodoslovno-matematički fakultet

Datum diplomskog ispita: 18. rujna 2018.



University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF NUDIX HYDROLASE FROM THE AMOEBA *Dictyostelium discoideum*

Ana Vlašić

The investigation of plant dipeptidyl peptidase III (DPP III) led to an unexpected discovery, the existence of an enzyme with dual function (Nudix and DPP III), which also shows the atypical Nudix hydrolase activity against the isopentenyl diphosphate (IPP) substrate. For the purpose of structural characterization of the Nudix domain of this interesting enzyme, and based on the significant similarity of primary structures, Nudix hydrolase from amoeba *Dictyostelium discoideum* (DdNudix) was selected for this study. Nudix hydrolases are members of superfamily of hydrolytic  $Mg^{2+}$ -dependent enzymes acting as phosphatases or pyrophosphohydrolases.

The wild type and inactive E82A mutant DdNudix, labeled with histidine tags, were over-expressed in *Escherichia coli* bacteria and purified by affinity chromatography and gel filtration. The conditions for crystallization of DdNudix protein were optimized. Using anomalous scattering, the structure of the selenomethionine labeled wild-type protein was resolved up to the resolution of 2.4 Å. Structure of the protein mutant, E82A, in complex with IPP substrate was solved with the molecular replacement method up to the resolution of 1.6 Å. Detailed structural analysis revealed similarities and differences of Nudix hydrolases as well as isopentenyl diphosphate isomerases.

(41 pages, 21 figures, 3 tables, 35 references, original in Croatian)

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

Keywords: Nudix hydrolase, isopentenyl diphosphate isomerase, *Dictyostelium discoideum*, crystal structure, SAD method, molecular replacement method

Mentor: Dr. Marija Luić, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute

Assistant mentor: Dr. Igor Sabljčić, Senior Associate, Ruđer Bošković Institute

Supervisor Prof. Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Faculty of Science, Univ. of Zagreb

Reviewers:

1. Prof. Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Faculty of Science, Univ. of Zagreb
  2. Dr. Marija Luić, Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute
  3. Assoc. Prof. Dr. Sanda Rončević, Faculty of Science, Univ. of Zagreb
- Substitute: Prof. Dr. Biserka Prugovečki, Faculty of Science, Univ. of Zagreb

Date of exam: September 18<sup>th</sup>, 2018.



## § 1. UVOD

Poticaj za ovaj diplomski rad iznikao je nakon otkrića dvojne enzimске aktivnosti Nudix-dipeptidil-peptidaze III (skraćeno Nudix-DPP III), biljnog enzima iz mahovine (*Physcomitrella patens*) i uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*)<sup>1</sup>. Iz samog naziva jasno je da ovaj enzim sadrži dvije domene: Nudix domenu fosfatazne aktivnosti i DPP III kao dipeptidil-peptidaznu domenu. Ispitivanjem rekombinantnih proteina utvrđena je atipična supstratna aktivnost Nudix domene proteina, čiji supstrat je izopentenil-difosfat.<sup>2</sup> Sličnost primarnih struktura navedenih biljnih Nudix hidrolaza s izopentenil-difosfat-izomerazom sugerira da ovaj atipični enzim vjerojatno ima i specifičnu strukturu. Stoga se pristupilo njihovom rješavanju kristalne strukture Nudix-DPP III proteina. No, cjelokupni protein nije bilo moguće kristalizirati, a razdvajanje Nudix i DPP III domena nije bilo uspješno.<sup>2</sup> U potrazi za sličnim proteinom koji ne sadrži DPP III domenu, sekvencom Nudix domene iz uročnjaka *Arabidopsis thaliana* pretražena je baza podataka NCBI *GenBank*<sup>3</sup>. Nađeno je desetak sekvenci u organizmima kao što su bakterije i jednostanični eukarioti, a koje su dovoljno slične Nudix domeni proteina Nudix–DPP III kako bi se mogle smatrati homologima. Međutim većini od njih nije određena potpuna sekvenca ili su organizmi bili nedovoljno istraženi pa je odabir organizma bio ograničen na jednostavnije organizme kojima je genomska sekvenca u potpunosti određena i čiji su životni ciklusi dobro poznati. Odabrana je sekvenca iz modelnog organizma *Dictyostelium discoideum* dostupna u bazi podataka UniProt<sup>4</sup> pod pristupnim kodom Q55D56, koja opisuje protein od 201 aminokiseline molekulske mase 22 864 daltona (Da). On je 33 % identičan s Nudix domenom iz proteina Nudix-DPP III mahovine *Physcomitrella patens*, dok je 35 % identičan onoj proteina iz uročnjaka *Arabidopsis thaliana*.

Cilj ovog rada bila je strukturna karakterizacija divljeg tipa Nudix hidrolaze iz amebe *Dictyostelium discoideum* i kompleksa s ugrađenim supstratom. Namjera je bila na temelju riješene kristalne strukture objasniti kako su u jednom proteinu uklopljene strukturne karakteristike koje ovaj enzim, izopentenil-difosfat-fosfohidrolaza, dijeli s Nudix hidrolazama (katalitički aktivni ostaci u fosfataznoj reakciji) i s izopentenil-difosfat-izomerazama (vezno mjesto supstrata izopentenil-difosfata).

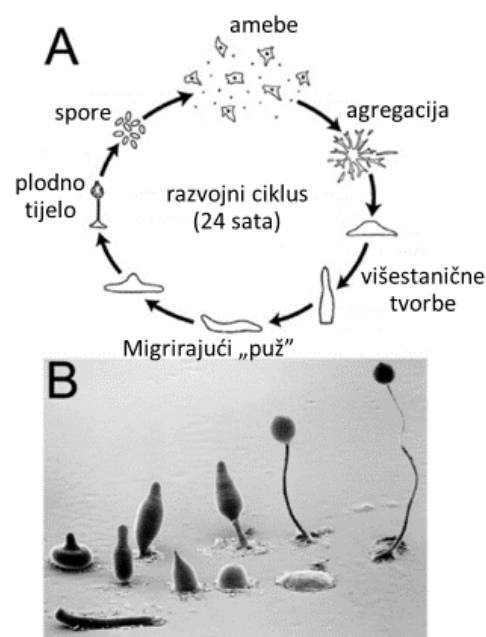
## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Ameba *Dictyostelium discoideum*

*Dictyostelium discoideum* je jednostanični eukariot, takozvana društvena ameba, prvi puta opisana 1935. godine.<sup>5</sup> Živi u različitim vrstama tla poput tropskih regija, pustinja, prašuma, umjerenih šuma i slično. U usporedbi s drugim jednostavnim eukariotima sadrži velik broj gena (približno 12500) i pokazuje složenije ponašanje. Izmjena između jednostaničnog i višestaničnog stadija života čine ga idealnim za proučavanje genetskih promjena koje su se događale između ta dva stadija života.<sup>6,7</sup>

Filogenetskom analizom *Dictyostelium* je smješten u grani odmah nakon razdvajanja biljaka i životinja.<sup>6</sup> Taksonomiju ovog zanimljivog organizma je vrlo teško odrediti pa je svrstavana u nekoliko rodova i obitelji, a nekada je svrstavana u gljive (otuda zastarjeli naziv „sluzava plijesan“) jer se hrani apsorpcijom hrane. Taksonomija je ovdje navedena prema taksonomskom istraživanju<sup>8</sup> u siječnju 2018. godine: carstvo *Protozoa* (praživotinje), koljeno *Mycetozoa*, razred *Dictyosteliomycetes*, red *Dictyosteliales*, porodica *Dictyosteliaceae*, rod *Dictyostelium* i vrsta *Dictyostelium discoideum*.

Ovaj organizam većinom postoji kao haploidna jednostanična ameba, međutim može oblikovati i višestaničnu strukturu kada su uvjeti u kojima se razmnožava ograničeni hranjivim tvarima (slika 1).<sup>9</sup> Stanice u neposrednoj blizini se privlače stvarajući agregacijske nakupine kao odgovor na signalizaciju cAMP-om (ciklički adenzin-monofosfat). Iz nakupine stanica odvaja se migrirajući „puž“. Tijekom migracije s jednog na drugo mjesto na podlozi ostaje trag proteina i ugljikohidrata pa od tuda i naziv sluzava plijesan. Približno 100 000 stanica oblikuje višestanične tvorbe koje se preoblikuju u plodno tijelo sastavljeno od milijun stanica. Potrebna je veliki broj stanica na jednom mjestu da bi došlo do prekomjernog dijeljenja i oblikovanja plodnog tijela. Velik broj stanica čine samo dvije vrste stanica: one koje oblikuju spore i one koje čine stabljiku.<sup>7</sup> Stanice koje čine stabljiku štite spore i prolaze kroz programiranu staničnu smrt tijekom razvoja. Spore u povoljnim uvjetima prokljuju u jednostanične amebe.<sup>6,7,9</sup>



Slika 1. Životni ciklus *Dictyostelium discoideum*. (A) Shematski prikaz 24-satnog razvojnog ciklusa. (B) Fotografija elektronskim mikroskopom prikazuje različito oblikovane strukture tijekom razvoja. Prilagođeno prema izvoru.<sup>9</sup>

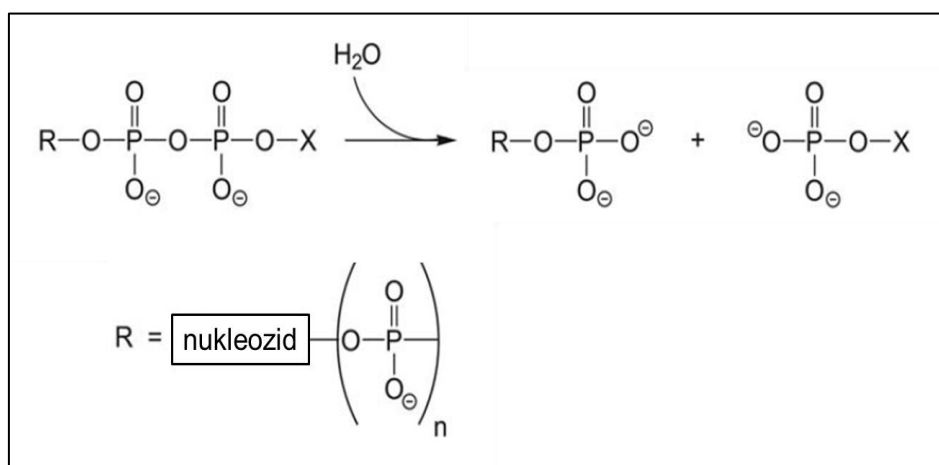
*Dictyostelium* ima mnogo značajki koje ga čine zanimljivim sustavom za znanstvena istraživanja. Model je za rješavanje temeljnih pitanja stanične i razvojne biologije zbog izvrsne pristupačnosti s genetičkog i biokemijskog stajališta. Proučavaju se i razni stanični procesi poput razvoja, oblikovanja i funkcije citoskeleta, citokineze, fagocitoze, kemotaksije te transdukcije signala.<sup>6,7,10</sup>

Višestanični stadij organizma čini ga izvrsnim sustavom za proučavanje regulacije enzima, diferencijacije stanica i stanične signalizacije tijekom razvoja.<sup>7</sup> Tijekom vegetativne faze jednostanična ameba hrani se fagocitozom bakterija, što pruža izvrstan model za proučavanje fagocitoze (procesa kojim stanice zahvaćaju druge stanice ili čestice te probavljaju njihove dijelove) i mehanizama bakterijskih zaraza. Organizam se istražuje kod raznih ljudskih bolesti kao i za mehanizme djelovanja lijekova i biokemijskih puteva koji dovode do otpornosti na određene lijekove. Mehanizmi djelovanja nekoliko lijekova razjašnjeni su istraživanjem ove amebe. Poznati su brojni ortolozi gena koji su odgovorni za bolesti kod ljudi čije funkcije još nisu razjašnjene, a prisutne su u genomu amebe. Istraživanja na ovom organizmu bila su ključna u pronalasku lijekova koji inhibiraju resorpciju kostiju a koji se koriste u liječenju osteoporozе.

Također se istražuje u svrhu problema u liječenju raka kao što je otpornost na kemoterapijska sredstva, a provode se i detaljnija istraživanja biokemijskih putova cisplatine koja se koristi u liječenju kemoterapijom.<sup>6</sup>

## 2.2. Nudix hidrolaze

Članovi Nudix nadporodice su najčešće hidrolaze koje razgrađuju razne supstrate s pirofosfatnom skupinom (slika 2).<sup>11</sup> Ovi enzimi sveprisutni su u eukariotima, bakterijama, arhejama i virusima.<sup>12</sup> Sam naziv Nudix je akronim koji objašnjava da ove fosfataze kataliziraju razgradnju supstrata **nukleozid-difosfata** vezanog na skupinu **X**, no taj naziv dan je kada nije bilo poznato da supstrat nužno sadrži pirofosfatnu skupinu, a ne nukleozidnu skupinu.<sup>13</sup> Postoji velik broj supstrata poput difosfata, trifosfata, dinukleozida, difosfoinozitolnih polifosfata, nukleozidnih šećera, RNA kapa, NADH, koenzima A i mnogih drugih, pa je moguća gruba podjela na nukleozidne i nenukleozidne supstrate.<sup>12</sup>

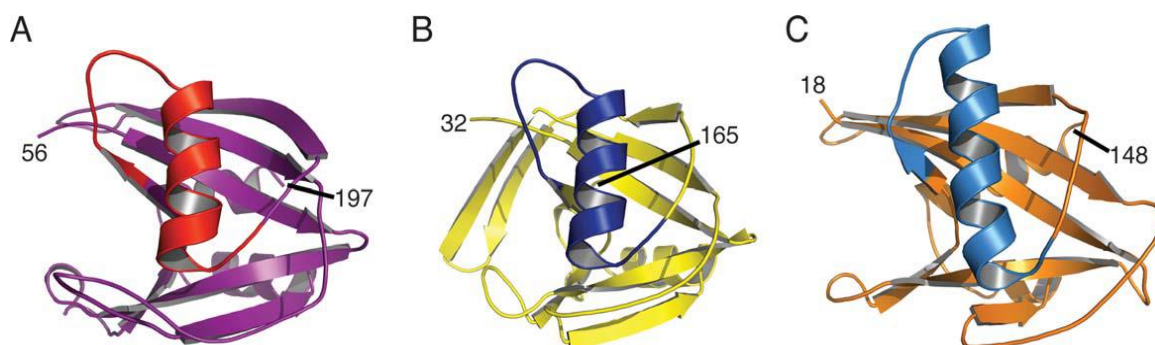


Slika 2. Reakcija koju kataliziraju Nudix hidrolaze. R mogu biti razne skupine, većinom nukleozidni supstrati s jednom do četiri fosfatne skupine. X skupina može biti fosfatni ion ili skupina slična R.<sup>11</sup>

Članovi Nudix nadporodice koji nisu Nudix hidrolaze mogu se podijeliti u tri bitne skupine: izopentenil-difosfat-izomeraze (IDI), MutY-slične adenin/gvanin (A/G) specifične adenin glikozilaze te neenzimske domene.<sup>11</sup> Neki autori koriste naziv Nudix nadporodica samo za Nudix hidrolaze, a drugi i ove tri skupine smatraju Nudix sličnim proteinima. Iz tih razloga predloženo je korištenje naziva Nudix klan za sve proteine s Nudix načinom smatanja.<sup>2,11</sup>

Većina članova porodice Nudix hidrolaza sadrži visoko očuvani karakteristični slijed od 23 aminokiseline (*Nudix box*) GX<sub>5</sub>EX<sub>7</sub>REUXEEXGU, gdje X označava bilo koju aminokiselinu, U alifatski hidrofobni ostatak poput izoleucina, leucina ili valina, a istaknuti katalitički ostatak Glu najčešće ima bitnu ulogu u mehanizmu reakcije.<sup>11</sup> Ova sekvenca oblikuje strukturu petlja-zavojnica-petlja (*loop-helix-loop*) s primarnom funkcijom vezanja jednog ili više esencijalnih dvovalentnih kationa koji usmjeravaju (orijentiraju) difosfatnu skupinu supstrata Nudix hidrolaza.<sup>11,14</sup> Supstratna specifičnost definirana je bočnim lancima i motivima u drugim dijelovima strukture, a ne u samom *Nudix box*-u.<sup>11</sup> Postoje brojne varijacije u mjestu napada na supstrat u položaju katalitičke baze (Glu može biti smješten i izvan *Nudix* motiva), te različit broj dvovalentnih kationa uključenih u katalizu, najčešće Mg<sup>2+</sup> ili rjeđe Mn<sup>2+</sup>.<sup>12</sup>

Na slici 3 prikazana je skupina Nudix klana (neenzimska skupina nije uspoređena). Na slici 3A dana je struktura predstavnika porodice Nudix hidrolaza iz bakterije *Escherichia coli* čiji je supstrat ADP-riboza-difosfat. Članovi IDI porodice i A/G skupine (slika 3B i 3C) nemaju tipičan *Nudix box* motiv koji se sastoji od 23 aminokiseline i oblikuje strukturu petlja-zavojnica-petlja. Također, svi proteini Nudix klana sadrže Nudix način smatanja (*fold*) tj.  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  sendvič.



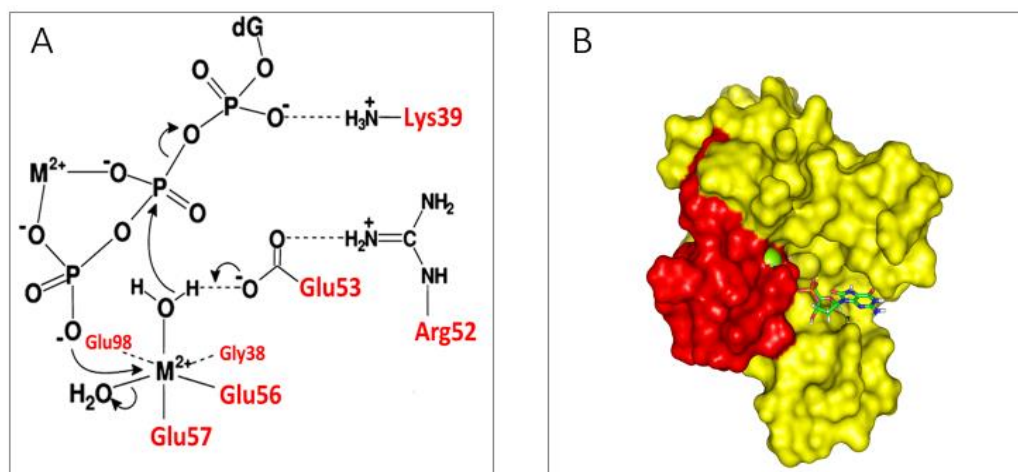
Slika 3. Usporedba skupina Nudix klana; prikazani su tipični predstavnici, a dijelovi proteina su naznačeni brojevima. (A) Porodica Nudix hidrolaza: ADP-riboza-difosfataza iz bakterije *E. coli* (PDB<sup>15</sup> kod: 1KHZ). (B) Porodica izopentenil-difosfat-izomeraza: izopentenil-difosfat-izomeraza iz *E. coli* (PDB kod: 1NFS). (C) Porodica adenin-gvanin specifične adenin glikozilaze: ljudska A/G-specifična adenin glikozilaza (PDB kod: 1X51). Drugačijom bojom istaknut je slijed od 23 aminokiseline (*Nudix box*) strukture petlja-zavojnica-petlja.<sup>11</sup>

Nudix hidrolaze tipično su mali proteini (16 – 25 kDa), ali ukoliko su veći onda sadrže dodatne domene koje imaju drugu katalitičku ili veznu funkciju.<sup>11</sup> Broj gena za Nudix proteine u prokariotima i jednostavnim eukariotima iznosi između 0 i 30, a kod sisavaca oko 24. Na primjer, genom čovjeka sadrži 18, a biljke poput *Arabidopsis thaliana* sadrže 28 Nudix

hidrolaza.<sup>2</sup> Neke skupine Nudix hidrolaza imaju „housecleaning“ funkciju odnosno uklanjaju iz stanice potencijalno štetne metabolite, te kontroliraju nakupljanje međuprodukata i njihovu dostupnost u biokemijskim putevima, no to nije specifično za sve članove Nudix porodice.<sup>12</sup>

Mehanizam djelovanja Nudix hidrolaza u fosfataznoj reakciji često je specifičan za pojedini protein i ovisi o mnogo faktora. Na mehanizam utječu očuvane aminokiseline, te njihov položaj u 3D-strukturi, oblik i veličina supstrata, broj dvovalentnih kationa i slično. Također, vrlo je teško sa sigurnošću odrediti svaki korak mehanizma. Ovdje je naveden primjer pirofosfohidrolaze MutT iz *E. coli* za koju je mehanizam detaljno istražen (slika 4A), kako bi se objasnio općeniti mehanizam djelovanja Nudix hidrolaza.<sup>14</sup>

MutT je monomerni protein koji se sastoji od 129 aminokiselinskih ostataka i katalizira hidrolizu nukleozid- i deoksinukleozid-trifosfata (NTP) do nukleozid-monofosfata (NMP) i anorganskog pirofosfata, a najbolji supstrat je 8-okso-dGTP. Ovom enzimu su za aktivnost potrebna dva dvovalentna kationa ( $Mg^{2+}$  ili  $Mn^{2+}$ ). Jedan kation vezan je bidentantno na  $\beta$  i  $\gamma$  fosfatne skupine NTP supstrata, a drugi je heksakoordiniran s Gly38, Glu56, Glu57 i Glu98 (ili Glu53, ovisno je li supstrat NTP vezan za kation) i dvije molekule vode. Esencijalna katalitička aminokiselina Glu53 je opća baza koja čini molekulu vode nukleofilnijom, što omogućava napad na fosfatnu skupinu.<sup>14</sup> Supstrat je vezan na površini enzima dok je magnezijev kation koordiniran aminokiselinama iz *Nudix box* motiva (slika 4B).



Slika 4. (A) Mehaniizam djelovanja Nudix hidrolaze MutT iz *E. coli* prikazan tako da su aminokiselinski ostaci obojani crveno, od kojih su pojedini dio *Nudix box*-a:

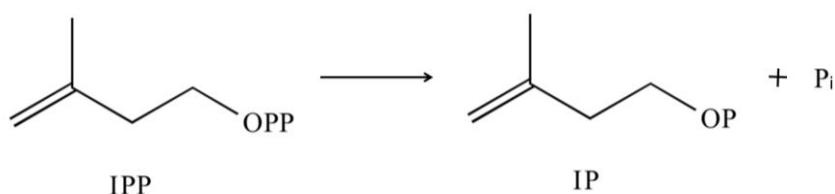
$G^{38}X_5EX_7R^{52}E^{53}UXE^{56}E^{57}XGU$ . (B) Prikaz površine kompleksa MuT sa supstratom u

veznom mjestu. Zelenom kuglicom prikazan je magnezijev kation, a crvenom *Nudix box*

(PDB kod: 1ppx).<sup>2,14</sup>

Jedan od primjera Nudix hidrolaza koje imaju nenukleozidne supstrate je nedavno opisana izopentenil-difosfat-fosfohidrolaza iz biljaka.<sup>2</sup> Riječ je o multidomenskom proteinu nazvanom Nudix-dipeptidil-peptidaza III, a okarakterizirani su homolozi iz biljaka *Arabidopsis thaliana* i *Physcomitrella patens*. Izopentenil-difosfat je supstrat fosfatazne reakcije Nudix domene, što je potvrđeno mutacijom tipičnog glutamata iz *Nudix box* motiva (mutant E92A), čime je u potpunosti inaktiviran enzim. Ovakva (atipična) Nudix hidrolaza ima homologe među Nudix hidrolazama i izopentenil-difosfat-izomerazama, te ima očuvane bitne funkcionalne ostatke iz obje vrste enzima.<sup>1,2</sup>

Kao predmet ovog diplomskog rada odabran je homolog takve Nudix domene iz organizma *Dictyostelium discoideum*. Prethodno je u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekularno modeliranje, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković (LBPM, IRB), potvrđeno da protein ima fosfataznu aktivnost prema izopentenil-difosfatu (slika 5).

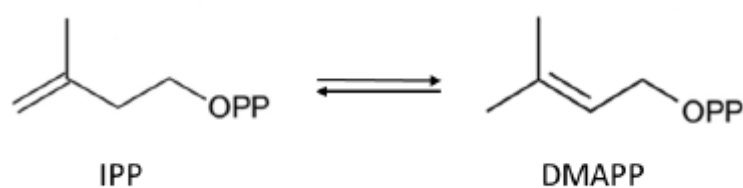


Slika 5. Reakcija hidrolaze supstrata izopentenil-difosfata (IPP) djelovanjem DdNudix proteina produkti su izopentenil-fosfat (IP) i pirofosfat (Pi).

### 2.3. Izopentenil-difosfat-izomeraza

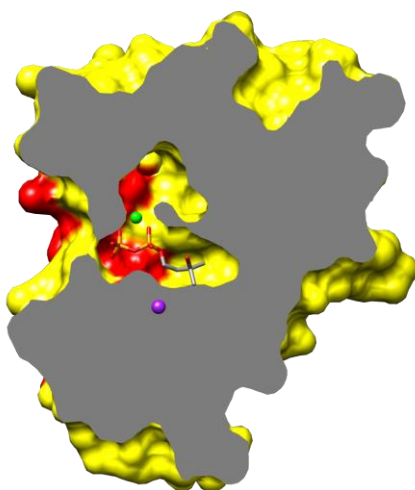
Izopentenil-difosfat-izomeraza (IDI) je enzim koji katalizira izomerizaciju izopentenil-difosfata (IPP) i dimetilalil-difosfata (DMAPP) (slika 6). Ova reakcija je ključna za sintezu svih izoprenoida, određuje brzinu sinteze ostalih metabolita (*rate-limiting step*) i prisutna je u svim organizmima osim nekih parazita.<sup>16</sup> Reakciju kataliziraju dva nesrodna enzima: tip 1 (IDI1), monomer klasificiran kao Nudix klan protein, i tip 2 (IDI2) tetramer ovisan o nukleotidnom faktoru. Ovdje je zanimljiv samo IDI tip 1, jer pripada u istu strukturnu klasu kao i Nudix hidrolaze.





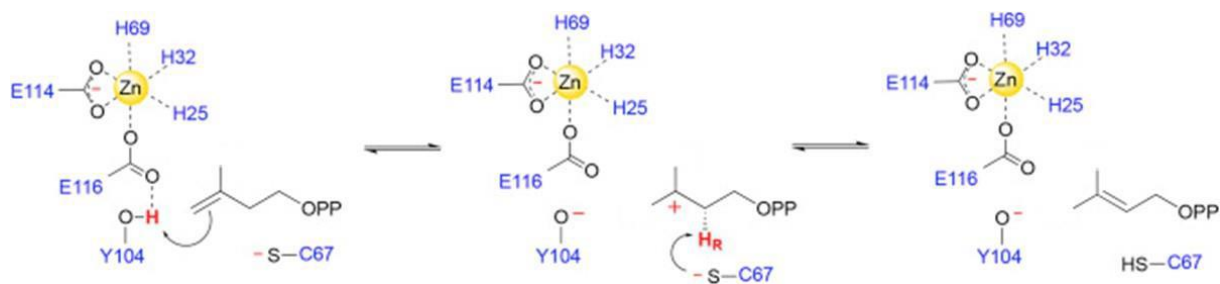
Slika 6. Reakcija koju katalizira izopentenil-difosfat-izomeraza premještanjem dvostruke veze iz izopentenil-difosfata (IPP) u dimetilalil-difosfat (DMAPP).

Iako je način smatanja IDI sličan onome Nudix hidrolaza (slika 3), izomeraze nemaju očuvane katalitičke ostatke *Nudix box*-a bitne za hidrolitičku aktivnost. No *Nudix box* motiv unatoč tome zadržava sposobnost vezanja magnezijevog iona.  $Mg^{2+}$  u IDI, jednako kao u Nudix hidrolazama, smješta difosfatnu skupinu, koja je zajednička karakteristika supstrata Nudix hidrolaza i IDI.<sup>11</sup> Za razliku od hidrolaza, supstrat se u izomerazi veže u supstratni džep, a ne na površini enzima (slika 7). U šupljini se nalazi ion cinka koordiniran s tri histidinska i dva glutamatna ostatka, i nije ekvivalentan nijednom kationu u dosad opisanim Nudix hidrolazama.<sup>16</sup>  $Zn^{2+}$  je bitan za smatanje proteina i pravilno smještanje katalitičkih ostataka. Jedini katalitički ostatak kojem je dokazana uloga u mehanizmu reakcije je cisteinski ostatak koji deprotonira međuprodukt (slika 7).



Slika 7. Vezno mjesto izopentenil-difosfata u *E. coli* IDI (PDB: 1ppv) nalazi se u zaštićenoj šupljini enzima. Crveno je označen motiv *Nudix box*, zelenom kuglicom ion magnezija, a ljubičastom ion cinka.<sup>2</sup>





Slika 8. Mehanizam reakcije izopentenil-difosfat-izomeraze na primjeru *E. coli* IDI. Kao međuprodukt reakcije nastaje karbokation.<sup>2</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

#### 3.1.1. Kemikalije

**Standardne kemikalije:** Tris, natrijev dodecilsulfat (SDS), akrilamid/bisakrilamid, PEG 3350 (*Fluka Biochemika*); amonijev sulfat, kalijev fosfat, magnezijev klorid, natrijev klorid, magnezijev sulfat, cinkov sulfat, fosfatna kiselina, octena kiselina, natrijev acetat trihidrat, izopentenil-difosfat (IPP), izopentenil-fosfat (IP) (*Sigma-Aldrich*); agaroza (*Invitrogen*); ampicilin, izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) (*Fermentas*); N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), amonijev persulfat (APS),  $\beta$ -merkaptetoetanol (*GE Healthcare*); NaCl, imidazol (*Carl Roth*); tekući dušik (*Messer*); agar, poliakrilamid 30 %, Luria-Bertani medij (*Difco Laboratories*); EDTA, etanol, metanol, octena kiselina, litijev klorid (*Kemika*).

**Proteinski standard:** standardi za veličinu od 10 kDa do 180 kDa, *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*).

**Boja:** *Coomassie Brilliant Blue R-250* (*Serva*).

**Komplet:** *Malachite Green Phosphate Detection Kit* (*R&D Systems*).

**Proteini i enzimi:** lizozim iz bjelanjka jajeta, DNaza I (*Sigma-Aldrich*).

**Stanice:** *Escherichia coli*, soj BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (*Stratagene*).

**Kolone i punilo za kolone:** PD-10, *HiPrep 16/60*, *Sephacryl S-200 High Resolution* (*GE Healthcare Bio-Sciences AB*); Ni-NTA agaroza (*Qiagen*).

**Materijali korišteni u kristalizaciji:** okrugla silikonizirana pokrovna stakalca promjera 22 mm, VDX ploče s 24 spremnika, keramičke kuglice - *Seed Bead* (*Hampton Research*).

#### 3.1.2. Instrumenti

**Uredaji za elektroforezu:** *Mini Protean II Electrophoresis Cell* (*BioRad*)

**Spektrofotometar:** *BioDrop Duo* (*BioDrop*)

**Uredaj za elektroporaciju:** *Gene Pulser Xcell* (*BioRad*) u *Gene Pulser Cuvette* za *E. coli*

**Pribor za filtriranje:** nitrocelulozni filter veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  – *Whatman* (*GE Healthcare*)

**Centrifugalni sistem za koncentriranje:** *Vivaspin II (Sartorius)*

**Uređaj za autoklaviranje:** *Vapour-Line (VWR)*

**Termoblok:** *Eppendorf Thermomixer R (Thermo Fisher Scientific)*

**Rotacijske platforme:** *InnOva 4300 (Marshall scientific)* i *Shaking incubator (Shel Lab)*

**Centrifuge:** *Sorvall RC-5B (Sorvall)*, *Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf)*

**Ultrazvučni dezintegrator:** *Ultrasonic processor (Cole Parmer)*

**Uređaj za ljuljanje:** *VIBROMIX 203 EVT (Tehtnica)*

**Sustav za brzu tekućinsku kromatografiju proteina:** *FPLC, Äkta (Pharmacia)*

**Pumpa korištena za kromatografiju:** *Peristaltic Pump P-1 (GE Healthcare)*

**Vrtložna miješalica:** *Vortex (Fisher Scientific)*

## 3.2. Pročišćavanje divljeg tipa i mutanta proteina E82A

### 3.2.1. Prekomjerna ekspresija proteina

Prekomjerna ekspresija divljeg tipa proteina Nudix hidrolaze iz amebe *Dictyostelium discoideum* (DdNudix) izvedena je u elektrokompetentnim stanicama bakterije *Escherichie coli* soja BL21-CodonPlus(DE3)-RIL.

Za uzgoj bakterijskih kultura koje su potrebne za ekspresiju proteina pripravljene su krute i tekuće hranjive podloge Luria-Bertani (LB). Tekuća LB hranjiva podloga pripravljena je otapanjem 25 g *Difco* praha (baktotripton  $\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$ , ekstrakt kvasca  $\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$  i NaCl  $\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$  pH 7,0) u 1 L destilirane vode, te je sterilizirana autoklaviranjem 20 minuta na 120 °C i tlaku od 1,5 atm. Jednakim postupkom pripravljena je kruta LB hranjiva podloga s dodatkom agara do koncentracije 15 g L<sup>-1</sup> u koju je nakon sterilizacije (u vruću otopinu maksimalne temperature 60 °C) dodan ampicilin konačne koncentracije 100 µg mL<sup>-1</sup> (LB/amp). Ovako pripravljena otopina LB/amp prelivena je u plastične Petrijeve zdjelice.

Elektroporacija bakterijskih stanica provedena je na uređaju *Gene Pulser Xcell (BioRad)* koristeći ohlađenu sterilnu kivetu za elektroporaciju (*Gene Pulser Cuvette* za *E. coli*) s razmakom elektroda od 0,2 cm. Elektroporacija je jedna od metoda transformacije to jest unošenja strane DNA (plazmidne DNA) u bakterijsku stanicu. Transformacija je provedena s 50 µL bakterijske suspenzije u koju je prethodno dodan 1 µL plazmida pLATE31 koji sadrži kodirajući gen za DdNudix s histidinskim privjeskom na karboksilnom kraju proteina (dobiven iz LBPM, IRB) uz napon od 2,5 kV u trajanju od 5 milisekundi. Nakon elektroporacije, u

kivetu je dodan 1 mL LB tekuće hranjive podloge, a potom je cijeli sadržaj kivete prebačen u sterilnu epruvetu i inkubiran 1 sat na 37 °C pri 350 okretaja u minuti (*rounds per minute*, rpm). Alikvoti suspenzija stanica od 200 µL i 400 µL nacijepljeni su na dvije krute LB/amp podloge i inkubirani na 37 °C preko noći. Sutradan, s jednom bakterijskom kolonijom narasloj na krutoj LB/amp podlozi, nacijepljeno je 50 mL tekuće LB/amp podloge koja je potom inkubirana preko noći na 37 °C pri 250 rpm. Uzgoj stanica proveden je u dvije tikvice od 2 L dodatkom 500 mL LB/amp tekuće podloge i 10 mL prekonoćne kulture u svaku tikvicu koje su inkubirane na 37 °C pri 250 rpm. Rast bakterijskih stanica praćen je mjerenjem turbiditeta pri valnoj duljini od 600 nm. Nakon tri sata pri optičkoj gustoći između 0,6 i 0,7, rast bakterija zaustavljen je hlađenjem bakterijske suspenzije na 4 °C. U ohlađenu bakterijsku suspenziju je dodano 500 µL otopine metala sastava: 1 mol dm<sup>-3</sup> MgSO<sub>4</sub> i 10 mmol dm<sup>-3</sup> ZnSO<sub>4</sub>, tako da konačna koncentracija Mg<sup>2+</sup> kationa iznosi 1 mmol dm<sup>-3</sup> i Zn<sup>2+</sup> kationa 10 µmol dm<sup>-3</sup>. Prekomjerna ekspresija proteina inducirana je dodatkom izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG) do konačne koncentracije 1 mmol dm<sup>-3</sup>. Ekspresija je provedena inkubacijom 20 sati na 18 °C pri 130 rpm. Nakon završetka ekspresije, kulture stanica su centrifugirane (*Sorvall RC-5B*) 20 minuta pri 5860 g (6000 rpm) na 4 °C. Supernatant je ukolonjen, a talog stanica izvagan, te pohranjen na -20 °C.

### 3.2.2. Liza bakterijskih stanica

Iz taloga stanica potrebno je izdvojiti ciljani protein, što je postignuto navedenim metodama: sonificiranje, centrifugiranje, afinitetna kromatografija i gel-filtracija. Prvo je potrebno razoriti stanične stijenke za što postoje razne kemijske i fizikalne metode poput osmotske lize, sonificiranja, enzimske razgradnje i slično. U tu svrhu u ovom radu korištena je kombinacija metoda kemijske razgradnje i sonificiranja. Nakon razaranja staničnih stijenki, centrifugiranjem se razdvoji netopljivi dio u obliku taloga (stanična membrana, stanična stijenka, DNA, agregati proteina, inkluzijska tijela) od topljivog dijela koji se nalazi u supernatantu (topljivi proteini, soli, peptidi). U posljednjem koraku iz supernatanta izdvaja se željeni protein različitim kromatografskim metodama.

Talog stanica u kojem je prethodno ekspimiran divlji tip proteina DdNudix (4,78 g) odmrznut je na ledu i resuspendiran u 20 mL pufera za lizu sastava: 50 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, 300 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 10 mmol dm<sup>-3</sup> imidazol, pH 8,0. Zatim je u priređenu homogenu suspenziju stanica dodana otopina lizozima do konačne koncentracije 100 µg mL<sup>-1</sup>, te je

inkubirano 45 minuta na ledu uz povremeno miješanje. Stanice su potom razorene ultrazvučnim dezintegratorom na ledu (*Ultrasonic processor* sonda promjera 5 mm) dva puta po 90 sekundi sa stankom za miješanje otopine. Nakon sonifikacije suspenziji je dodana otopina DNaze za razgradnju DNA do konačne koncentracije  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  koja je potom inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi uz lagano ljuhanje. Lizat je centrifugiran 45 minuta na  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  pri 14 500 g nakon čega je dobiveni supernatant filtriran kroz filter papir veličine pora  $0,45 \mu\text{m}$ . Pripremljeni supernatant podvrgnut je dalje pročišćavanju metodom afinitetne kromatografije.

Prethodno opisanim postupkom, uz minimalne razlike, provedena je i liza stanica mutanta proteina E82A. Talog stanica je dobiven (iz LBPMM-a, IRB), u kojem je prethodno prekomjerno eksprimiran protein s jednom točkastom mutacijom, gdje je glutaminska kiselina na položaju 82 zamijenjena alaninom. Talog stanica mase 1,87 g resuspendiran je u 12,5 mL pufera za lizu te obrađen lizozimom na jednak način kao što je prethodno opisano za divlji tip proteina. Sonifikacija je produžena na četiri ciklusa po 3 minute između kojih je suspenzija dobro promiješana. Stanični lizat je obrađen DNazom, centrifugiran i profiltriran kako je prethodno opisano.

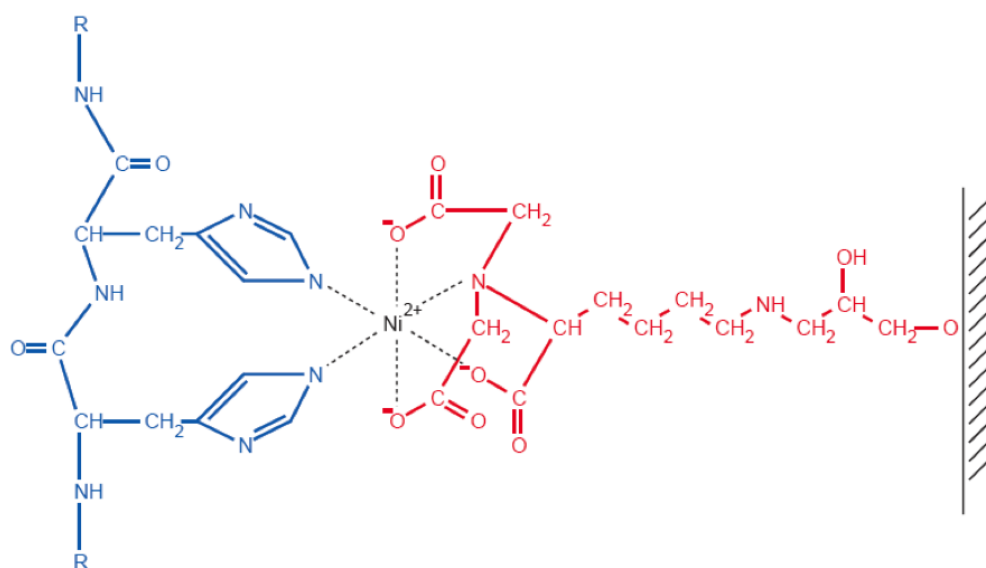
U oba slučaja, za divlji tip i mutant E82A, prije centrifugiranja su uzeti alikvoti od  $100 \mu\text{L}$  staničnog lizata koji su zasebno centrifugirani u istim uvjetima kao i ostatak staničnog lizata. Nakon centrifugiranja, supernatant je odvojen, a talog je resuspendiran u  $100 \mu\text{L}$  mili Q vode. Dobiveni uzorci su korišteni za analizu topljivosti proteina metodom elektroforeze u 12 % poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima.

### 3.2.3. Kromatografske metode

#### 3.2.3.1. Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija je metoda odvajanja makromolekula temeljena na specifičnim interakcijama između receptora i liganda. Za uspješno pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom potrebna je visoko specifična interakcija proteina i molekule koja se upotrebljava kao mamac. Međutim, često nije poznata takva molekula pa se modificira protein dodatkom afinitetnog privjeska.<sup>17</sup> Postoje različiti afinitetni privjesci, a najčešće upotrebljavan u biokemiji je histidinski privjesak koji se sastoji od nekoliko uzastopnih histidina na amino ili karboksilnom kraju proteina. Metoda se zasniva na interakciji histidinskog privjeska i imobiliziranog nosača kompleksa  $\text{Ni}^{2+}$  s nitrilotriocetnom kiselinom (Ni-NTA) pa se često naziva IMAC metoda (*immobilized metal ion affinity chromatography*). NTA je tetradentatni

kelirajući agens koji zauzima četiri koordinacijska mjesta metala nikla (II) imobilizirajući ga u kromatografskom nosaču. Od ukupno šest koordinacijskih mjesta na središnjem metalnom centru, dva su slobodna za specifično afinitetno vezanje histidinskog bočnog ogranka (slika 9).<sup>18</sup> Protein koji je obilježen histidinskim privjeskom se čvrsto veže na kromatografski nosač dok ostali proteini prolaze kroz kolonu. Protein se eluira s nosača dodatkom imidazola koji zbog većeg afiniteta prema metalnom centru Ni(II) istiskuje prethodno vezani protein. Metoda je visoko učinkovita, visoko specifična, brza i relativno neosjetljiva na pravilno smatanje proteina i ionsku jakost.



Slika 9. Shematski prikaz interakcija ostataka histidinskog privjeska proteina (plavo) i nosača kompleksa Ni(II)-nitrilotrioctene kiseline (crveno) vezane na agarozu (prikazano kosim crtama).<sup>18</sup>

U svrhu pročišćavanja proteina DdNudix, divljeg tipa i mutanta E82A, pripremljena je kolona promjera 0,9 centimetara s 1 mL Ni-NTA nosača. Nosač je ispran s 15 mL mili Q H<sub>2</sub>O i s 15 mL pufera za lizu (tablica 1), te uravnotežen s 25 mL pufera za lizu (tablica 1). Prethodno dobiveni lizat nanesen je na kolonu prilikom čega je sakupljena nevezana frakcija. Nakon nanošenja uzorka, nosač je ispran s 6 mL pufera za ispiranje (tablica 1) prilikom čega su sakupljene tri frakcije volumena 2 mL. Protein od interesa eluiran je s 15 mL pufera za eluiranje (tablica 1), prilikom čega je sakupljeno 10 frakcija od 0,5 mL. Nakon završenog pročišćavanja, u svrhu čuvanja kolone, kolona je isprana s 5 mL pufera za čišćenje kolone (tablica 1) te s 20 mL mili Q H<sub>2</sub>O i konačno s 15 mL 20 % etanola. Sve frakcije sakupljane su u mikroepruветama ohlađenim na ledu. Pročišćavanje je provedeno na sobnoj temperaturi uz pomoć pumpe

(*Peristaltic Pump P-1, GE Healthcare*) s konstantnim protokom od  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Svi korišteni puferi kao i deionizirajuća voda su prethodno filtrirani kroz filter veličine pora  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  i deairirani.

Tablica 1. Sastav pufera korištenih za pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografskom.

	liza	ispiranje	elucija	čišćenje
$c(\text{Tris-HCl}) / \text{mmol dm}^{-3}$	50	50	50	50
$c(\text{NaCl}) / \text{mmol dm}^{-3}$	300	300	300	300
$c(\text{imidazol}) / \text{mmol dm}^{-3}$	10	20	300	500
pH	8,0	8,0	8,0	8,0

### 3.2.3.2. Gel-filtracija

Gel filtracija je kromatografska metoda koja se zasniva na odjeljivanju komponenata na temelju veličine molekula tj. isključenjem po veličini. Kromatografsko punilo se sastoji od poroznog materijala kao što su polimer dekstrana (*Sephadex*), agarosa (*Sepharose*) ili poliakrilamid (*Sephacryl*). Ovisno o korištenom punilu, možemo razdvojiti različite veličine molekula. Prolaskom kroz kolonu velike molekule (npr. biološke makromolekule poput proteina) ne ulaze u sve pore punila te se kreću brže od manjih molekula koje ulaze u veći broj pora. Na temelju navedenog principa, moguće je odijeliti proteine od onečišćenja sakupljanjem eluata u frakcije.<sup>17</sup>

Za potrebe kristalizacijskih eksperimenata, divlji tip proteina dodatno je pročišćen gel-filtracijom pomoću sustava za tekućinsku kromatografiju proteina (*Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC, Äkta Pharmacia*) na koloni *HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution*. Prije nanošenja uzorka kolona je isprana s destiliranom vodom i uravnotežena sa standardnim puferom sastava: Tris-HCl  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$ , NaCl  $20 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pH 7,4. Na kolonu je nanoseno 2 mL uzorka dobivenog sakupljanjem četiri frakcije s najvećom koncentracijom proteina nakon afinitetne kromatografije. Protein je eluiran standardnim puferom pri protoku od  $0,75 \text{ mL min}^{-1}$  i sakupljane su frakcije volumena 2,5 mL. Tijek pročišćavanja praćen je UV detektorom pri valnoj duljini od 280 nm.

Metoda gel-filtracije je korištena i za izmjenu pufera u proteinskim frakcijama mutanta E82A. U tu svrhu korištena je kolona PD-10 (*GE Healthcare Bio-Sciences AB*), koja je

prethodno ispirana s mili Q H<sub>2</sub>O te uravnotežena standardnim puferom. Na kolonu je naneseo 2,5 mL proteinskog uzorka, dobivenog nakon afinitetne kromatografije, koji je eluiran s 3,5 mL standardnog pufera.

Dobiveni čisti uzorci proteina divljeg tipa i mutanta E82A su ugušćeni do željene koncentracije uređajem *Vivaspin*, alikvotirani i pohranjeni na -80 °C.

### 3.3. Biokemijske metode za karakterizaciju pročišćenog proteina

#### 3.3.1. Određivanje koncentracije proteina

U ovom radu korištene su dvije metode za određivanje koncentracije proteina: kvalitativno Bradfordovim<sup>19</sup> testom i kvantitativno metodom Warburg-Christians<sup>20</sup>. Metoda po Bradfordu temelji se na reakciji proteina i boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* u kiselom mediju. Uslijed vezanja boje na određene aminokiseline u proteinima, najčešće arginin, dolazi do pomaka maksimuma apsorbanacije sa 465 nm na 595 nm. Također, prilikom vezanja boje na protein dolazi do vidljive promjene iz smeđeg obojenja otopine u plavu. Metoda se široko primjenjuje zbog svoje jednostavnosti, brzine kao i širokog opsega intenziteta obojenja ovisno o koncentracije proteina. Vrlo se često koristi i kao kvantitativna metoda za koju je potrebno prethodno odrediti baždarni pravac. Bradfordov kvalitativni test proveden je u porculanskim jažicama dodatkom 1 μL uzorka proteina iz pojedine frakcije u 100 μL Bradfordova reagensa sastava: boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* ( $\gamma = 0,1 \text{ g L}^{-1}$ ), etanol ( $\varphi = 0,047$ ) i fosfatna kiselina ( $\varphi = 0,085$ ).

Koncentracija proteina određivana je kvantitativnom metodom Warburg-Christians mjerenjem apsorbanacije 1 μL uzorka na mikrovolumnom spektrofotometru *BioDrop*. Za računanje koncentracije korišten je molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent iznosa  $30\,035 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^{-3} \text{ cm}^{-1}$ , određen pomoću programa *ProtParam*.<sup>21</sup> Odabrana je kvantitativna metoda Warburg-Christians obzirom da je određivanje koncentracije kraće nego li metodom po Bradfordu, a prethodno je utvrđeno da obje metode daju isti rezultat. Koncentracija proteinskih uzoraka, divljeg tipa i mutanta E82A, određivana je nakon svakog koraka pročišćavanja kao i tijekom ugušćivanja. Prije mjerenja apsorbanacije proteinskog uzorka, izmjerena je apsorbanacija pufera u kojem se nalazi proteinski uzorak koja je potom oduzeta od apsorbanacije proteinskog uzorka. Koncentracija je izračunata prema sljedećoj jednadžbi:

$$c(\text{proteina}) = (1,55 A_{280}) - (0,76 A_{260})$$



Koncentracija proteina za svaki uzorak je mjerena minimalno tri puta, a kao konačna koncentracija je uzeta srednja vrijednost triju mjerenja.

### 3.3.2. Gel elektroforeza u denaturirajućim uvjetima

Za vizualizaciju proteinskih frakcija tijekom i nakon pročišćavanja proteina, korištena je elektroforeza proteina u denaturirajućim uvjetima. Elektroforetsko odjeljivanje proteina provodi se u električnom polju unutar poliakrilamidnog gela koji služi kao molekularno sito. Denaturacija proteina postiže se dodatkom natrijevog dodecil-sulfata (*sodium dodecyl sulphate*, SDS) u proteinski uzorak kao i u gel, te dodatkom  $\beta$ -merkaptetanola koji reducira disulfidne veze, i kratkim zagrijavanjem na 95 °C. Proteini obrađeni na ovaj način ponašaju se kao da svi imaju isti oblik i jednak omjer naboja i mase. Tijekom elektroforeze male molekule se brže kreću kroz gel.<sup>17</sup> Proteinskim uzorcima se dodaje boja bromfenol modriilo za praćenje toka elektroforeze kao i glicerol koji zbog velike viskoznosti omogućuje lakši ulazak uzorka u jažicu gela.

Čistoća frakcija provjeravana je SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom (*polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) na sustavu *Mini Protean II Electrophoresis Cell*. Pripremljeni su gelovi dimenzija 80 × 70 × 0,75 mm sastavljeni od gornjeg gela za sabijanje visine oko 20 mm i donjeg gela za razdvajanje visine oko 60 mm. Za pripremu gela za razdvajanje pipetirano je 2,08 mL otopine akrilamida:bisakrilamida u omjeru 29:1 ( $\varphi = 0,30$ ), 1,25 mL 1,5 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pufera pH 8,8, 50  $\mu$ L SDS-a ( $\gamma = 100$  g L<sup>-1</sup>), 25  $\mu$ L APS-a ( $\gamma = 100$  g L<sup>-1</sup>), 1 mL TEMED-a i 1,6 mL deionizirane vode. Tako pripremljena otopina (donji dio) izlivena je između dvije staklene ploče razmaka 0,75 mm i nadslojena destiliranom vodom. Nakon polimerizacije gela, oko 45 minuta, uklonjena je destilirana voda te dodana otopina gela za sabijanje pripremljenog pipetiranjem 0,268 mL akrilamid:bisakrilamida u omjeru 29:1 ( $\varphi = 0,30$ ), 0,5 mL 0,5 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pufera pH 6,8, 20  $\mu$ L SDS-a ( $\gamma = 100$  g L<sup>-1</sup>), 10  $\mu$ L APS-a ( $\gamma = 100$  g L<sup>-1</sup>), 1  $\mu$ L TEMED-a i 1,2 mL deionizirane vode. U izliveni gel za sabijanje umetnut je češalj za oblikovanje jažica, te je sustav inkubiran na sobnoj temperaturi do polimerizacije gela, oko 30 minuta. Uzorci su prije nanošenja na gel pomiješani u omjeru 1:1 s otopinom sastava 0,5 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pufera pH 6,8, SDS ( $\gamma = 100$  g L<sup>-1</sup>), 2- $\beta$ -merkaptetanol ( $\varphi = 0,05$ ), glicerol ( $\varphi = 0,10$ ) i bromfenol modriilo ( $\gamma = 0,02$  g L<sup>-1</sup>), nakon čega su inkubirani 5 minuta na 95 °C u termobloku (*Eppendorf Thermomixer*). Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 2

minute te nanese u jažice gela. Također, na gel je nanese 2  $\mu\text{L}$  proteinskih standarda (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*) koji prikazuje veličine od 10 kDa do 180 kDa.

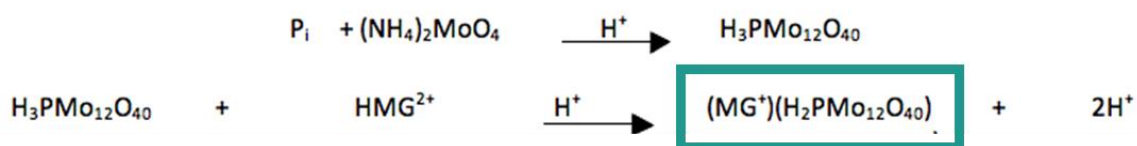
Elektroforeza je provedena u puferu sastava: 0,025 mol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 8,3, 0,192 mol  $\text{L}^{-1}$  glicin i SDS ( $\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$ ), pri stalnom naponu od 180 V. Za vizualizaciju proteinskih vrpca, gelovi su bojani 20 minuta na 45 °C uz lagano ljujanje u otopini sastava: boja *Coomassie Brilliant Blue R-250* ( $\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$ ), metanol ( $\varphi = 0,30$ ) i octena kiselina ( $\varphi = 0,10$ ). Višak boje uklonjen je inkubiranjem gela 3 sata na 45 °C uz lagano ljujanje u otopini sastava metanola ( $\varphi = 0,30$ ) i octene kiseline ( $\varphi = 0,10$ ). Gelovi su nakon odbojenja pohranjeni u Petrijevu zdjelicu s destiliranom vodom te fotografirani za analizu.

### 3.3.3. Određivanje fosfatazne aktivnosti proteina

Fosfatazna aktivnost enzima ispitivana je u puferu koncentracije 10 mmol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl, 1 mmol  $\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , pH = 7,6 uz 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  supstrat IPP. Reakcija je započeta dodatkom enzima i provedena je 10 minuta na temperaturi od 37 °C. Ukupni volumen reakcije iznosio je 100  $\mu\text{L}$ . Reakcija je zaustavljena dodatkom 25  $\mu\text{L}$  5 mM EDTA i pohranjena na ledu do detekcije.

Fosfatazna aktivnosti proteina praćena je detekcijom fosfatnog iona uporabom komercijalnog seta *Malachite Green Phosphate Detection Kit (R&D Systems)*. Obzirom da u reakciji enzima i supstrata IPP-a nastaju IP i anorganski fosfat, najjednostavnije je pratiti nastajanje fosfatnog iona. To je moguće kolorimetrijskom reakcijom u kojoj nastaje zeleno obojenje zbog prisutnosti kompleksa fosfata, molibdata i bojila malahitno zeleno (slika 10). Kompleks je stabilan u kiselim uvjetima pa je detekcija produkta diskontinuirana od same enzimske reakcije. Detekcija je provedena tako da je 50  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese u jažici mikrotitarske pločice pomiješano s 10  $\mu\text{L}$  reagensa A, koji sadrži otopinu amonijevog molibdata u sumpornoj kiselini. Pri tome dolazi do nastanka kompleksa fosfata i molibdata. Nakon 10 minuta na sobnoj temperaturi, smjesi je dodano 10  $\mu\text{L}$  zeleno-plavog reagensa B, koji sadrži oksalat malahitnog zelenog stabiliziran polivinil-alkoholom. Reakcijska smjesa se tada oboji žuto, a u prisutnosti fosfata tijekom 20 minuta pojavljuje se malahitno zelena boja kompleksa fosfata, molibdata i bojila malahitno zeleno. Ukoliko u reakcijskoj smjesi nema fosfata, žuta boja izbledi. Test je iznimno osjetljiv na tragove fosfata u otopinama, pa je nužno koristiti čiste kemikalije i izbjegavati fosfatni pufer za rad s enzimom. Kontrolne probe uključivale su reakcije smjese samo enzima i samo supstrata, kako bi se provjerilo da ne sadrže fosfat u količinama koje bi mogle ometati kvantifikaciju fosfata u enzimskoj reakciji. Za

kvantifikaciju korištene su otopine različitih koncentracija  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  kao baždarna krivulja u rasponu od 0 do  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , uz mjerenje apsorbancije otopine pri 620 nm.



Slika 10. Reakcije prilikom detekcije fosfata: u prvoj reakciji nastaje kompleks fosfata i molibdata u kiseloj otopini koji vezanjem protonirane forme bojila malahitno zeleno ( $\text{HMG}^{2+}$ ) nastaje kompleks karakteristične malahitno zelene boje.

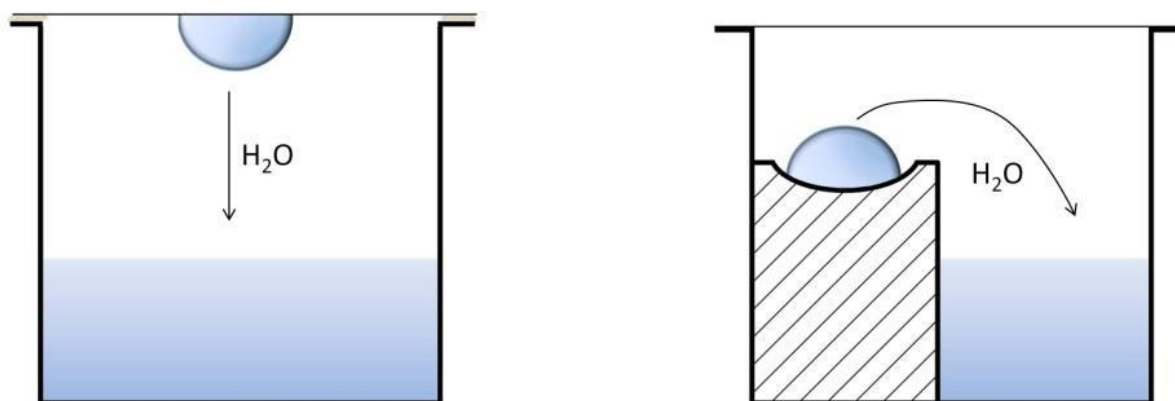
### 3.4. Kristalografske metode

#### 3.4.1. Kristalizacija metodom strujanja para

Kristalizacija je proces nastajanja kristala iz zasićene otopine hlađenjem ili smanjenjem količine otapala u otopini. Obzirom da je kristalizacija proteina, zbog njihove veličine i nestabilnosti, vrlo nepovoljan proces, u kristalizacijsku otopinu, osim proteinske otopine, dodaju se različite kemijske tvari. Prije svega, kristalizacijska otopina sastoji se od pufera, koji omogućuje točno podešavanje pH otopine u kojoj je protein stabilan. Osim pufera, kristalizacijska otopina najčešće sadrži neku sol i precipitant. Kako bi se pospješila kristalizacija također se mogu dodati i različiti deterdženti. Obzirom da nije moguće predvidjeti u kojem uvjetu će protein kristalizirati, testiraju se različiti komercijalno dostupni kompleti od kojih se najčešće svaki sastoji od 96 različitih kristalizacijskih otopina.<sup>22</sup> Navedeni komercijalni kompleti osmišljeni su na temelju kristalizacijskih uvjeta u kojim su prethodno kristalizirani proteini priloženi u PDB.

Najčešće korištena metoda za kristalizaciju proteina je metoda difuzija para koja se izvodi tehnikama viseće kapi (*hanging drop*) i sjedeće kapi (*sitting drop*) (slika 11). U tehnici viseće kapi, korištenoj u ovom radu, na silikonizirano stakalce se postavi kap volumena od 2 do  $5 \mu\text{L}$  koja se sastoji od proteinske otopine pomiješane s jednakim volumenom otopine iz spremnika. Silikoniziranim stakalcem s kapi se poklopi spremnik s otopinom što čini zatvoreni sustav. Zbog niže koncentracije kemijskih tvari u kapi nego u spremniku dolazi do strujanja para vode iz kapi u spremnik. Strujanjem vode, koncentracija proteina i precipitanta u kapi polako raste dok otopina ne postane zasićena. Ukoliko su zadovoljeni uvjeti za kristalizaciju, u takvoj otopini dolazi do nukleacije, te započinje rast kristala.

U izradi ovog rada tehnika viseće kapi izvođena je u VDX pločama s 24 spremnika na 18 °C. Volumen pufera u spremniku iznosio je 1000  $\mu\text{L}$ , a kap je pripremljena miješanjem 1  $\mu\text{L}$  otopine proteina i 1  $\mu\text{L}$  otopine iz spremnika. Tijek kristalizacije praćen je mikroskopom jednom dnevno prva tri dana, nakon toga 1-2 puta tjedno.



Slika 11. Shematski prikaz metode strujanja para tehnikom viseće kapi (lijevo) i sjedeće kapi (desno) za kristalizaciju proteina.<sup>23</sup>

#### 3.4.2. Optimizacija kristalizacijskih uvjeta

Prethodno je u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju, Zavod za fizičku kemiju, Institut Ruđer Bošković (LKBK, IRB) napravljen kristalizacijski eksperiment s divljim tipom proteina DdNudix i komercijalno dostupnim kompletima: *Index*, *PEGS Suite*, *JBS Wizard 1&2 HTS*, *JCSG core* i *NEXTAL cryo*. Dobiveni su kristali u nekoliko uvjeta, ali nisu difraktirali do zadovoljavajućeg razlučivanja. U ovom radu su optimizirana tri uvjeta; uvjet A: 0,2 mol dm<sup>-3</sup> LiCl, 20 % PEG 3350 (*PEGS Suite E4*), uvjet B: 0,1 mol dm<sup>-3</sup> NaAc x 3 H<sub>2</sub>O, 25 % PEG 3350, pH 4,5 (*Index D5*), uvjet C: 0,2 mol dm<sup>-3</sup> K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 20 % PEG 3350 (*PEGS Suite H5*).

Prethodno su svi metionini u divljem tipu proteina DdNudix zamijenjeni selenometioninom (pročišćeni proteinski uzorak je dobiven iz LBPM-a, IRB). Kristalizacijski eksperimenti su postavljeni s navedenim uzorkom koncentracije 15 mg mL<sup>-1</sup> u kristalizacijskom uvjetu A. Na silikonizirano stakalce nanese su različite kombinacije volumena proteina i otopine iz spremnika uz variranje volumena pufera u spremniku od 500 do 1000  $\mu\text{L}$ .

Optimizacija uvjeta A, B i C provedena je s divljim tipom proteina koncentracije 15 i 23,1 mg mL<sup>-1</sup>. Otapanjem krutina u mili Q H<sub>2</sub>O pripravljene su sljedeće otopine: 40 % polietilenglikol 3350 (PEG 3350), 1 mol dm<sup>-3</sup> LiCl, 1 mol dm<sup>-3</sup> CH<sub>3</sub>COONa (NaAc) i 1 mol dm<sup>-3</sup> K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Sve otopine su filtrirane kroz filter veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ . S navedenim otopinama

priređeni su puferi za optimizaciju kristalizacijskih uvjeta (tablica 2). Kristalizacija je postavljena na način opisan u prethodnom poglavlju.

Tablica 2. Sastav pufera za optimizaciju kristalizacijskih uvjeta A,B i C. U svakome retku varirana je samo jedna komponenta kristalizacijske otopine, ostale su konstantne.

Uvjet	Konstantne komponente	Varirana komponenta	1	2	3	4	5	6
A	20 % PEG 3350	$c(\text{LiCl})/\text{mol dm}^{-3}$	0,17	0,18	0,19	0,21	0,22	0,23
	0,2 mol dm <sup>-3</sup> LiCl	% PEG	18	19	20	21	22	23
B	25 % PEG 3350 pH 4,5	$c(\text{NaAc})/\text{mol dm}^{-3}$	0,07	0,08	0,09	0,10	0,11	0,12
	0,1 mol dm <sup>-3</sup> NaAc pH 4,5	% PEG	22	23	24	26	27	28
	0,1 mol dm <sup>-3</sup> NaAc 25 % PEG 3350	pH*	4,90	5,05	5,13	5,17	5,32	5,39
C	20 % PEG 3350	$c(\text{K}_3\text{PO}_4)/\text{mol dm}^{-3}$	0,17	0,18	0,19	0,21	0,22	0,23
	0,2 mol dm <sup>-3</sup> K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	% PEG	18	19	20	21	22	23

\* pH je podešen s octenom kiselinom

Kristalizacijski eksperimenti s mutantom E82A napravljeni su nakon optimizacije provedene s divljim tipom proteina u uvjetu koji se pokazao najuspješnijim.

### 3.4.3. Metoda mikrosijanjanja za kristalizaciju proteina

Za poboljšanje nukleacije upotrijebljena je metoda mikrosijanjanja (*microseeding*). Otopina za mikrosijanjanje pripravljena je miješanjem kapi u kojoj su prethodno narasli sitni kristali i 20 µL otopine iz spremnika sastava: 0,1 mol dm<sup>-3</sup> CH<sub>3</sub>COONa pH 4,5, 23 % PEG 3350, u daljnjem tekstu skraćenog naziva B\_opt. Automatskom pipetom pod mikroskopom je sve prebačeno u polipropilensku mikroeprovetu s keramičkom kuglicom (*Seed Bead, Hampton Research*), te je dodano još 30 µL pufera B\_opt. Sadržaj mikroeprove snažno je promiješan 5 minuta na vrtložnoj miješalici te je u dobivenu kristalnu suspenziju dodano još 450 µL pufera B\_opt, čime je dobivena koncentrirana (1x) otopina za mikrosijanjanje. Serijskim razrjeđenjem otopine za mikrosijanjanje s puferom B\_opt pripremljene su 10x i 100x razrijeđene otopine za mikrosijanjanje.

Također, pripremljena su sljedeća razrjeđenja otopina za mikrosijanje: 250x (200  $\mu\text{L}$  100x razrijeđene otopine za mikrosijanje i 300  $\mu\text{L}$  pufera B\_opt ), 500x (250  $\mu\text{L}$  250x razrijeđene otopine za mikrosijanje i 250  $\mu\text{L}$  B\_opt pufera), 750x (333  $\mu\text{L}$  500x razrijeđene otopine za mikrosijanje i 167  $\mu\text{L}$  pufera B\_opt ) i 1000x (375  $\mu\text{L}$  750x razrijeđene otopine za mikrosijanje i 125  $\mu\text{L}$  pufera B\_opt). Tako priređene otopine korištene su za kristalizaciju divljeg tipa proteina i mutanta E82A. Kristalizacijski eksperiment, u kojima je korištena metoda mikrosijanja provedeni su tako da se kap sastojala od 1  $\mu\text{L}$  razrijeđene otopine za mikrosijanje (10x, 100x, 250x, 500x, 750x, 1000x) i 1  $\mu\text{L}$  otopine proteina, a u spremnik je dodano 1000  $\mu\text{L}$  pufera B\_opt. Otopine za mikrosijanje su čuvane na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.4. Kokristalizacija i namakanje kristala

Tehnike kokristalizacije i namakanja kristala korištene su u svrhu dobivanja kristala kompleksa proteina DdNudix sa supstratom izopentenil-difosfatom (IPP) ili produktom izopentenil-fosfatom (IP). Tehnika kokristalizacije temelji se na kristalizaciji proteina u prisustvu supstrata gdje prvo nastaje kompleks proteina i supstrata koji onda kristalizira. S druge strane, namakanje kristala se temelji na dobivanju kristala proteina bez vezanog supstrata koji se potom inkubiraju u otopini koja sadrži supstrat. Tijekom namakanja kristala, s obzirom na veliki udio otapala u kristalu, supstrat može ući u kristalnu rešetku i vezati se na protein.

Otopine IP-a i IPP-a potrebne za kokristalizaciju pripravljene su otapanjem krutina u puferu B\_opt uz zagrijavanje 20 sekundi u termobloku na  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ovako su pripravljene po dvije otopine IP-a i IPP-a koncentracija  $2,5\text{ mmol dm}^{-3}$  i  $5,1\text{ mmol dm}^{-3}$ . Odabrane koncentracije su približno tri i šest puta više od konačnih koncentracija proteina u kapi tijekom kristalizacijskog eksperimenta koje iznose  $0,79\text{ mmol dm}^{-3}$  za divlji tip i  $0,92\text{ mmol dm}^{-3}$  za mutant E82A. Kokristalizacijski eksperimenti s divljim tipom proteina su pripremljeni s dvije kapi iznad spremnika koji je sadržavao 1000  $\mu\text{L}$  uvjeta A. Prva kap je priređena miješanjem 1  $\mu\text{L}$  otopine proteina koncentracije  $18\text{ mg mL}^{-1}$  s 1  $\mu\text{L}$  otopine IP-a više koncentracije, a u drugoj kapi je korištena otopina IP-a niže koncentracije. Na jednak način je postavljen kokristalizacijski eksperiment s mutantom E82A koncentracije  $21\text{ mg mL}^{-1}$ , ali umjesto otopina IP-a korištene su otopine IPP-a.

Osim opisanog kokristalizacijskog eksperimenta pripremljen je još jedan eksperiment u kojem su korištene nove otopine IP-a konačne koncentracije  $33,7\text{ mmol dm}^{-3}$  i IPP-a konačne

koncentracije  $37 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Navedene otopine priređene su na jednak način kao što je prethodno opisano, ali su otopljeni u puferu B\_opt u koji je prethodno dodan  $\text{MgCl}_2$  do konačne koncentracije  $150 \text{ mmol dm}^{-3}$  ( $830 \text{ }\mu\text{L}$  pufera B\_opt i  $170 \text{ }\mu\text{L}$  otopine  $\text{MgCl}_2$  koncentracije  $882 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Kokristalizacijski eksperiment pripremljen je s proteinom koji je prethodno inkubiran na ledu 5 minuta s otopinom supstrata ili produkta u omjeru 1:1. Kristalizacijska kap je sadržavala  $1 \text{ }\mu\text{L}$  pripremljene proteinske otopine i  $1 \text{ }\mu\text{L}$  250x razrijeđene otopine za mikrosijanje.

Otopine IP-a i IPP-a korištene za namakanje kristala proteina pripremljene su otapanjem krutina u puferu B\_opt pufer uz zagrijavanje 20 sekundi u termobloku na  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pripremljene su otopine IP-a koncentracije  $60 \text{ mmol dm}^{-3}$  i IPP-a koncentracije  $75 \text{ mmol dm}^{-3}$  koje su po potrebi razrjeđivane puferom B\_opt. Kristali divljeg tipa proteina namakani su u otopinama IP-a konačnih koncentracija  $7,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $30 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $60 \text{ mmol dm}^{-3}$  u trajanju od 1, 5 i 10 minuta i 1, 24 i 48 sati. Kristali mutanta E82A namakani su u otopinama IPP-a konačnih koncentracija  $7,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $37,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $75 \text{ mmol dm}^{-3}$  s istim vremenima inkubacije kao i za divlji tip. Inkubacije su provedene brzim prebacivanjem jediničnih kristala iz kapi u kojoj su nastali u otopinu IP-a odnosno IPP-a volumena 2-4  $\mu\text{L}$ . Otopine IP-a ili IPP-a postavljene su na istom silikoniziranom stakalcu pored kapi u kojoj je narastao kristal. Nakon premještanja kristala, kristalizacijski uvjet je ponovno hermetički zatvoren. Stabilnost kristala tijekom inkubacije je praćena mikroskopom. S obzirom da otopine u kojima su namakani kristali nisu krioprotektanti, kristali su nakon inkubacije kratko inkubirani u otopini krioprotektanta, pripremljenoj miješanjem pufera B\_opt i PEG-a 3350 ( $\gamma = 50 \%$ ) u volumnom omjeru 1:1, te zamrznuti u tekućem dušiku.

#### 3.4.5. Testiranje difrakcije i prikupljanje podataka

Rendgenska difrakcija kristala je testirana na laboratorijskom difraktometru *Xcalibur Nova R*, s bakrenom rendgenskom cijevi, na valnoj duljini zračenja  $1,5418 \text{ \AA}$  (LKBK, IRB). Na istom su instrumentu testirane kristalizacijske otopine kako bi se utvrdilo jesu li krioprotektanti. Također je prikupljeno nekoliko skupova podataka difrakcije kristala.

Ostali skupovi podataka prikupljeni su na sinkrotronu *Elettra* (Trst, Italija) na liniji 5.2R. Skup podataka prikupljen na kristalu dobivenom s divljim tipom proteina obilježenim selenometioninom prikupljen je pri valnoj duljini od  $0,9786 \text{ \AA}$ . Navedena valna duljina je odabrana jer se nalazi kod apsorpcijskog maksimuma atoma selenija (malo je kraće valne

duljine od praga) što je neophodno za mjerenje anomalnog signala koji je poslije korišten za rješavanje strukture. U tu svrhu snimljeno je 360 difrakcijskih slika pri oscilacijskom kutu  $1^\circ$ . Ostali skupovi podataka, prikupljeni na kristalima dobivenim u kokristalizacijskim eksperimentima kao i kristalima koji su namakani u IP-u ili IPP-u, prikupljeni su pri valnoj duljini od  $1,000 \text{ \AA}$ . Za svaki skup podataka je prikupljeno 360 difrakcijskih slika pri oscilacijskom kutu  $1^\circ$ .

Svi skupovi podataka prikupljeni su u struji dušika na temperaturi od 100 K.

#### 3.4.6. Procesiranje podataka i rješavanje kristalne strukture

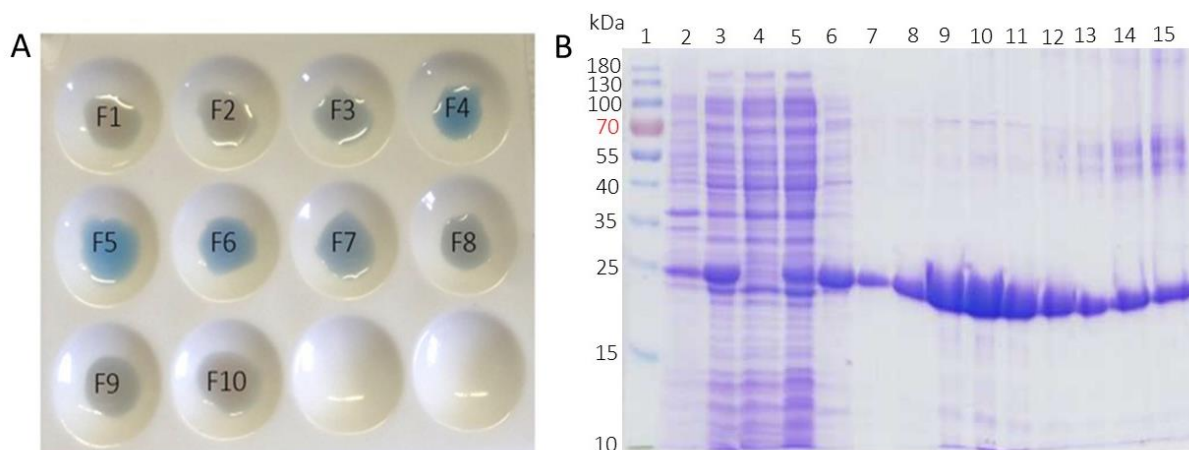
Struktura divljeg tipa proteina obilježenog selenometioninom (SeMet) određena je metodom anomalnog raspršenja na jednoj valnoj duljini (*single-wavelength anomalous dispersion*, SAD). Prikupljeni skupovi podataka su indeksirani i reducirani programom XDS.<sup>24</sup> Potom su podaci spojeni i skalirani programom Aimless,<sup>25</sup> a za rješavanje problema faza korišten je programski paket Crank2.<sup>26</sup> Dobiveni model utočnjen je programom Phenix. Program COOT<sup>27</sup> korišten je za vizualizaciju i ručno utočnjavanje modela. Programi Phenix<sup>28</sup> i COOT<sup>27</sup> su naizmjenice korišteni za daljnje utočnjavanje iterativnim postupkom. Molekule vode dodane su automatski programom Phenix,<sup>28</sup> a zatim su u programu COOT<sup>27</sup> ručno odbačene molekule vode koje ne stvaraju vodikove veze s proteinom ili međusobno. Osim molekula vode, u model su ručno dodani svi metalni ioni. Nakon što je riješen problem faza, sve sljedeće strukture riješene su metodom molekulske zamjene programom MOLREP<sup>29</sup> koristeći strukturu riješenu SAD metodom kao model. Prilikom rješavanja strukture kompleksa mutanta E82A sa supstratom IPP, model supstrata izgrađen je pomoću programa eLBOW<sup>30</sup> s SMILES zapisom priređenim na internet stranici *Online Smiles Translator and Structure File Generator*<sup>31</sup>. Za vizualizaciju kristalnih struktura i izradu slika korišteni su programi COOT<sup>27</sup> i PyMOL<sup>32</sup>.



## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Vizualizacija rezultata pročišćavanja proteina

Uzgojem stanica te prekomjernom ekspresijom proteina dobiveno je 4,78 mg biomase koja sadrži divlji tip proteina i 1,87 mg biomase koja sadrži mutant E82A. U oba slučaja bakterijske stanice su lizirane, a topiva frakcija je podvrgnuta pročišćavanju na Ni-NTA koloni. Tijek pročišćavanja praćen je kvantitativnim Bradfordovim testom u porculanskim jažicama (slika 12A). Frakcije koje sadrže protein, kao i frakcije koje su sačuvane tijekom liziranja stanica su vizualizirane SDS-PAGE elektroforezom na 12 % bisakrilamidnom gelu (slika 12B).

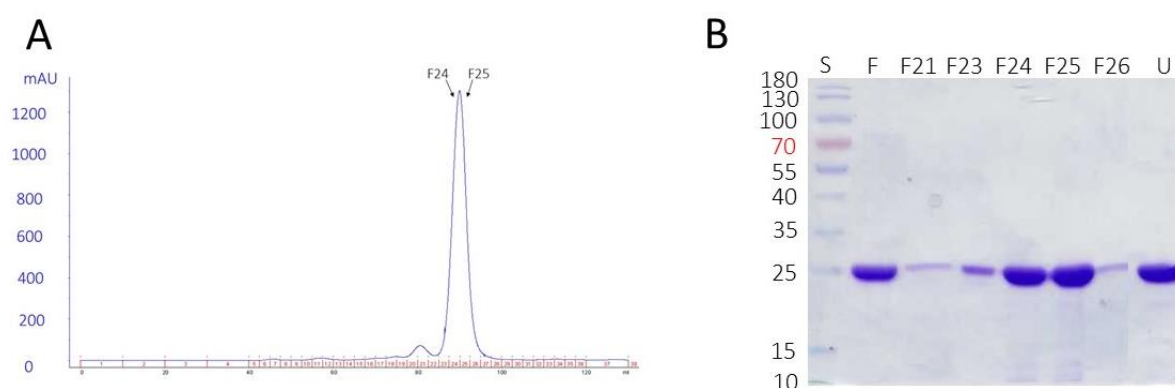


Slika 12. (A) Fotografija Bradfordovog testa u porculanskim jažicama nakon afinitetnog pročišćavanja na Ni-NTA koloni divljeg tipa proteina. (B) SDS gel elektroforeza divljeg tipa proteina na 12 % poliakrilamidnom gelu. Uzorci u jažicama su: 1 – proteinski standard, 2 – stanični lizat (topiva frakcija), 3 – stanični talog (netopiva frakcija), 4 – nevezana frakcija; od 5 do 7 – frakcije ispiranja, od 8 do 15 – frakcije eluiranja.

Analizom dobivenog gela utvrđeno je da je prekomjerna ekspresija bila uspješna jer sve frakcije sadrže vidljivu vrpcu neposredno ispod 25 kDa koja odgovara proteinu DdNudix. Usporedbom debljine proteinske vrpce proteina DdNudix u topivoj i netopivoj frakciji uočeno je da se u talogu nalazi više proteina DdNudix nego li u topljivoj frakciji. To ukazuje da liziranje stanica nije bilo potpuno uspješno ili da tijekom ekspresije protein formira inkluzijska tijela. Tijekom razbijanja stanica mutanta E82A, sonifikacija je produžena s dva ciklusa po 90 sekundi na četiri

ciklusa. Produženje sonifikacije je rezultiralo boljim razbijanjem stanica i većom količinom pročišćenog proteina. Nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom, svim frakcijama koje sadrže protein određena je koncentracija Warburg-Christianovom metodom. Ukupno je pročišćeno 14 mg proteina divljeg tipa i 31 mg mutanta E82A.

Frakcije divljeg tipa proteina koje sadrže najviše proteina, F4-F7, su spojene i dodatno pročišćene gel-filtracijom na FPLC-u. Analizom kromatograma i vizualizacijom frakcija SDS-PAGE elektroforezom (slika 13), utvrđeno je da proteinski uzorak ne sadrži agregate proteina DdNudix. Proteinski uzorak je jednako homogen prije i nakon gel-filtracije. Obzirom da gel-filtracijom nije dobiven bitno čišći uzorak divljeg tipa proteina, uzorak mutanta E82A nije pročišćavan gel-filtracijom. Za potrebe kristalizacijskih eksperimenata frakcije divljeg tipa proteina, dobivene nakon gel-filtracije, ugušćene su do  $23,1 \text{ mg mL}^{-1}$ , a frakcije mutanta E82A, dobivene nakon afinitetne kromatografije, odsoljene su i ugušćene do  $18,0 \text{ mg mL}^{-1}$ .



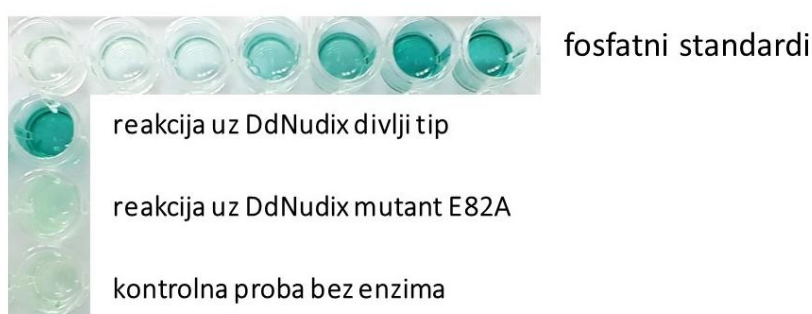
Slika 13. (A) Kromatogram pročišćavanja aktivnog tipa proteina DdNudix gel filtracijom. (B) SDS elektroforeza divljeg tipa proteina na 12 % poliakrilamidnom gelu; S – proteinski standard, F – frakcija nakon afinitetnog pročišćavanja i prije dodatnog pročišćavanja gel filtracijom; F21, F23, F24, F25 i F26 – frakcije dobivene gel-filtracijom; U – ugušćene frakcije nakon oba pročišćavanja.

#### 4.2. Vizualizacija fosfatazne aktivnosti divljeg tipa i mutanta E82A

Nudix hidrolaze sadrže karakteristični slijed od 23 aminokiseline tzv. *Nudix box* slijeda  $\text{GX}_5\text{EX}_7\text{REUXEEXGU}$  gdje U označava alifatski hidrofobni ostatak aminokiseline, a X bilo koju aminokiselinu. U aktivnom tipu proteina DdNudix *Nudix box* se nalazi od aminokiseline Gly67 do Leu89.

tipični <i>Nudix box</i>	GXXXXXXXXXXXXXXXXREUXEEXGU
DdNudix <i>Nudix box</i>	GHI EAGMNSKETAIK <b>E</b> LFEELGL

Kao i ostale Nudix hidrolaze, DdNudix *Nudix box* motiv sadrži aminokiselinski ostatak Glu82 (označeno crveno u slijedu) za koji je pretpostavljeno da je katalitički. Stoga je zamijenjena glutaminska kiselina u alanin na mjestu 82. Prema očekivanju, pokazano je da mutant E82A nema fosfataznu aktivnost. Čak i u suvišku enzima, uz koncentraciju proteina 1000 puta veću od one divljeg tipa, koncentracija fosfata u reakcijskoj smjesi jednaka je kao u kontrolnoj reakciji bez enzima (rezultati nisu prikazani), to jest odgovara koncentraciji fosfata u uzorku supstrata IPP-a. Kvalitativni rezultat prikazan je na slici 14.

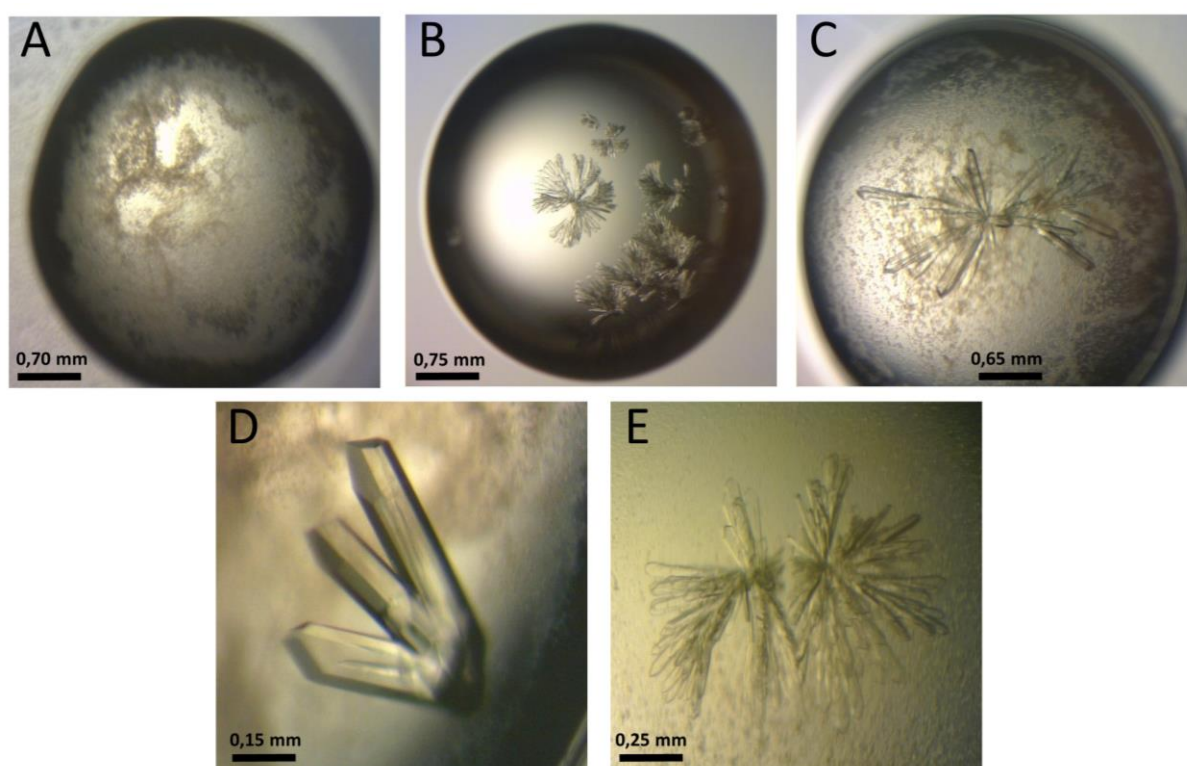


Slika 14. Kvalitativni prikaz rezultata fosfataznog testa aktivnosti. U prvom redu nalaze se otopine fosfatnih standarda (koncentracija 0, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 i 100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ). U drugom redu, uz 0,25  $\mu\text{g}$  divljeg tipa enzima, reakcija je potpuna i sav IPP ( $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) je razgrađen. U trećem i četvrtom redu nema karakteristične malahitno zelene boje u reakcijskoj smjesi, jer čak niti 250  $\mu\text{g}$  proteina mutanta E82A ne hidrolizira IPP, i boja otopine jednaka je onoj u koju nije dodan enzim.

### 4.3. Optimizacija kristalizacije

Kristalizacija divljeg tipa proteina DdNudix provedena je u uvjetima: A, B i C kao što je opisano u eksperimentalnom dijelu. Tijekom optimizacije otkriveni su uvjeti kristalizacije ovog proteina. Varijacijom volumena kristalizacijskog uvjeta u spremniku, od 500 do 1000  $\mu\text{L}$ , utvrđeno je da to ne utječe na kristalizaciju pa je korišten volumen od 1000  $\mu\text{L}$ . Tijekom optimizacije korištene su dvije koncentracije proteina, 15 i 23,1  $\text{mg mL}^{-1}$ , i uočeno je da su veći kristali dobiveni korištenjem uzorka niže koncentracije proteina. Osim koncentracije proteinskog uzorka, za kristalizaciju je bio nužan omjer proteina i kristalizacijskog uvjeta. Testirani su različiti omjeri proteina i pufera u kapi od kojih je najpovoljniji bio 1:1. Kristali

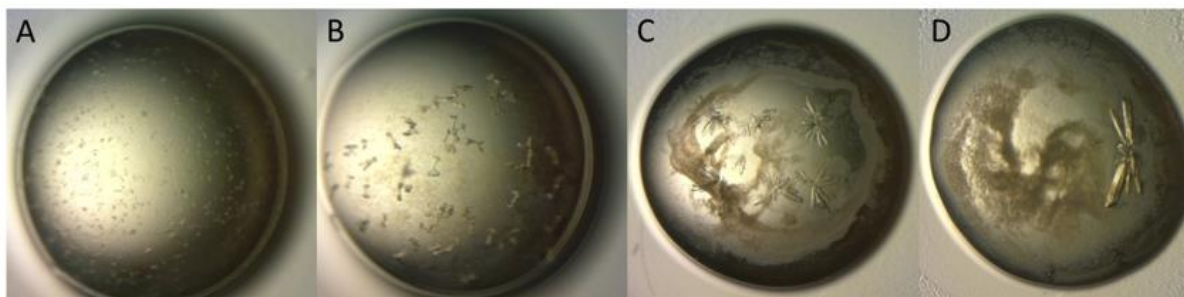
divljeg tipa proteina rastu nakon dodatka precipitirajuće otopine što je vidljivo nakon nekoliko sati (slika 15A). U uvjetima A kristali su rasli dva tjedna, dok su u uvjetima B narasli već nakon nekoliko dana. U uvjetima C nisu dobiveni kristali, a kapi su bistre više od dva mjeseca. Kristali dobiveni u uvjetima A su većinom bili igličasti sraslaci, nepovoljni za mjerenje intenziteta difraktiranog zračenja (slika 15B). U uvjetima B narasli su najveći kristali, a najljepši kristal dobiven je u uvjetu B<sub>opt</sub> sastava: 0,1 mol dm<sup>-3</sup> CH<sub>3</sub>COONa pH 4,5 i 23 % PEG 3350 (slika 15C). Optimizacijom je utvrđeno da je najpovoljniji kristalizacijski uvjet proteina DdNudix sljedeći: 1000 μL uvjeta B<sub>opt</sub> u spremniku i volumen kapi od 2 μL (1 μL otopine proteina koncentracije 15 mg mL<sup>-1</sup> i 1 μL uvjeta B<sub>opt</sub>).



Slika 15. (A) Precipitirajuća otopina bez kristala proteina. (B) Kristali divljeg tipa proteina u uvjetu A. (C) Najbolji kristali divljeg tipa proteina u uvjetu B<sub>opt</sub>. (D) Kristali mutanta proteina E82A B<sub>opt</sub>. (E) Kristali divljeg tipa proteina obilježenog selenometioninom.

Iako su najveći kristali dobiveni u uvjetu B<sub>opt</sub>, ponavljanje kristalizacije u tom uvjetu nije uvijek bilo uspješno. U svrhu dobivanja velike količine kristala, potrebne za eksperimente namakanja, pripremljeni su različiti kristalizacijski eksperimenti metodom mikrosijanjanja opisanom u poglavlju 3.4.3. U navedenim eksperimentima korištene su otopine za mikrosijanjanje razrijeđene 1x, 10x, 100x, 250x, 500x, 750x i 1000x. Najbolji kristali dobiveni su u

razrijeđenijim otopinama za mikrosijanje (slika 16). Zadovoljavajuće veličine kristala dobivene su i s 500x, 750x i 1000x razrijeđenim otopinama za mikrosijanje, međutim nisu u svakoj kapi narasli kristali kao što je bio slučaj za 250x razrijeđenu otopinu. Stoga je za daljnju kristalizaciju divljeg tipa korištena 250x razrijeđena otopina za mikrosijanje.



Slika 16. Kristali narasli u otopinama za mikrosijanje: 1x , 10x , 100x, 250x u uvjetu B\_opt.

Kristalizacija mutanta E82A provedena je isto kao što je opisano za divlji tip s 250x razrijeđenom otopinom za mikrosijanje, što je rezultiralo uspješnom kristalizacijom (slika 15D). Kristali su također dobiveni u eksperimentima kokristalizacije divljeg tipa enzima s produktom IP kao i mutanta E82A sa supstratom IPP. Kristali su dobiveni i s nižim i s višim koncentracijama produkta ili supstrata.

Obzirom da je kristalizacija divljeg tipa proteina obilježenog selenometioninom završena prije optimizacije kristalizacijskih uvjeta, dobiveni su kristali samo u uvjetu A (slika 15E). Kap je sadržavala 1  $\mu\text{L}$  SeMet uzorka koncentracije 15  $\text{mg mL}^{-1}$  i 1  $\mu\text{L}$  otopine uvjeta A.

#### 4.4. Rješavanje kristalnih struktura

Na sinkrotronu je testirana moć difrakcije deset kristala dobivenih s proteinskim uzorkom DdNudix obilježenim selenometioninom. Odabran je kristal koji je najbolje difraktirao i sakupljen s njime cjelokupni skup podataka pri valnoj duljini 0,9786 Å do razlučivanja 2,4 Å. Analizom dobivenih podataka programom XDS,<sup>24</sup> signal anomalnog raspršenja prisutan je do razlučivanja 3,6 Å što je bilo dovoljno za rješavanje strukture SAD metodom. Zbog nedostatka elektronske gustoće u modelu ručno su obrisani bočni ogranci: Glu26, Lys27, Glu55, Lys81, Glu160, Asn161, Asp172, Lys173, Lys176 i Asn201, kao i prva aminokiselina Met1. Tako riješena struktura divljeg tipa korištena je kao model u rješavanju svih ostalih struktura metodom molekulske zamjene.



Na laboratorijskom difraktometru testirana je difrakcija kristala dobivenih u kokristalizacijskom eksperimentu divljeg tipa proteina i IP-a koncentracije  $2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $5,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Testirani kristali nisu difraktirali do razlučivanja potrebnog za rješavanje strukture te nije sakupljen niti jedan skup eksperimentalnih podataka. U kokristalizacijskom eksperimentu mutanta E82A s IPP-om koncentracije  $2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , dobiven je jedan dobar skup podataka do razlučivanja  $2,2 \text{ \AA}$ . Na kristalima dobivenim namakanjem divljeg tipa proteina odnosno mutanta E82A u otopini IP odnosno IPP, sakupljeni su skupovi podataka razlučivanja od  $2,2 \text{ \AA}$  do  $3 \text{ \AA}$ . Riješene su strukture iz svih sakupljenih skupova podataka, međutim niti u jednom slučaju u kristalnu strukturu nije bila ugrađena molekula IP ili IPP.

Kristali dobiveni u kokristalizacijskim eksperimentima divljeg tipa i mutanta E82A proteina s IPP i IP viših koncentracija u prisutstvu  $\text{MgCl}_2$  snimljeni su na sinkrotronu. Sakupljen je skup podataka divljeg tipa s IP-om do razlučivanja  $1,8 \text{ \AA}$ , ali u strukturi nije bio ugrađen produkt IP. Na kristalu mutanta E82A s IPP-om dobiven je skup podataka do razlučivanja  $1,6 \text{ \AA}$ . Zbog nedostatka elektronske gustoće u modelu nedostaju bočni ogranci aminokiselina u A lancu: Glu160, Lys176 i Asn201, a u B lancu: Glu160, Asp172 i Lys173, kao i prva aminokiselina Met1 u oba lanca.

Od svih riješenih struktura za detaljnu analizu odabrane su dvije strukture za koje su statistike podataka i utočnjavanja modela prikazane u tablici 3. Na temelju razlučivanja odabrana je struktura divljeg tipa proteina obilježena selenometioninom i struktura kompleksa mutanta E82A s vezanim supstratom IPP. Prilikom vezanja supstrata promijenio se kristalni sustav iz više simetrije u nižu. Divlji tip proteina kristalizira u rompskoj prostornoj grupi  $P2_12_12_1$  s jednom molekulom u jediničnoj ćeliji, a kompleks s IPP-om u monoklinskoj  $P2_1$  prostornoj grupi s dvije molekule u jediničnoj ćeliji. Vezanjem supstrata u protein dolazi do njegove stabilizacije na što ukazuju B-faktori, udio otapala i razlučivanje.

Tablica 3. Statistika sakupljenih podataka i točnosti modela riješenih struktura. Vrijednosti u zagradama odnose se na ljusku s najvećim razlučivanjem.

	Divlji tip SeMet DdNudix	Kompleks sa supstratom (IPP)
Razlučivanje / Å	2,4	1,6
Prostorna grupa	$P2_12_12_1$	$P2_1$
Parametri jedinične ćelije		
$a, b, c$ / Å	39,54, 55,48, 90,11	39,95, 52,34, 87,36
$\alpha, \beta, \gamma$ / °	90, 90, 90	90, 92,79, 90
Udio otapala / %	43,14	38,53
Kompletnost / %	100 (99,9)	99,9 (90)
Broj neovisnih refleksa	12 263	47 816
$I/\sigma(I)$	16,7 (3,9)	16,9 (1,8)
$R_{\text{merge}}$	0,112 (0,655)	0,074 (0,91)
$CC_{1/2}$	0,999 (0,90)	0,999 (0,68)
Redundantnost	12,8 (13)	6,7 (6,2)
Wilson-ov B-faktor / Å <sup>2</sup>	28,4	16,3
<b>Utočnjavanje</b>		
$R / R_{\text{free}}$	0,22/0,24	0,17/0,22
RMSD duljine veza / Å	0,002	0,006
Prosječan $B$ faktor	33,6	20,7
Broj molekula u AJ	1	2
Broj atoma		
Protein	1567	1602+1608
Cinkov ion	1	1+1
Magnezijev ion	0	1+2
Molekule vode	126	513
Supstrat (IPP)	0	1+1
Ramachandran-ov dijagram		
Najpovoljnija područja / %	99,49	99,24
Dopuštena područja / %	0,51	0,25
Nedopuštena područja / %	0	0,51

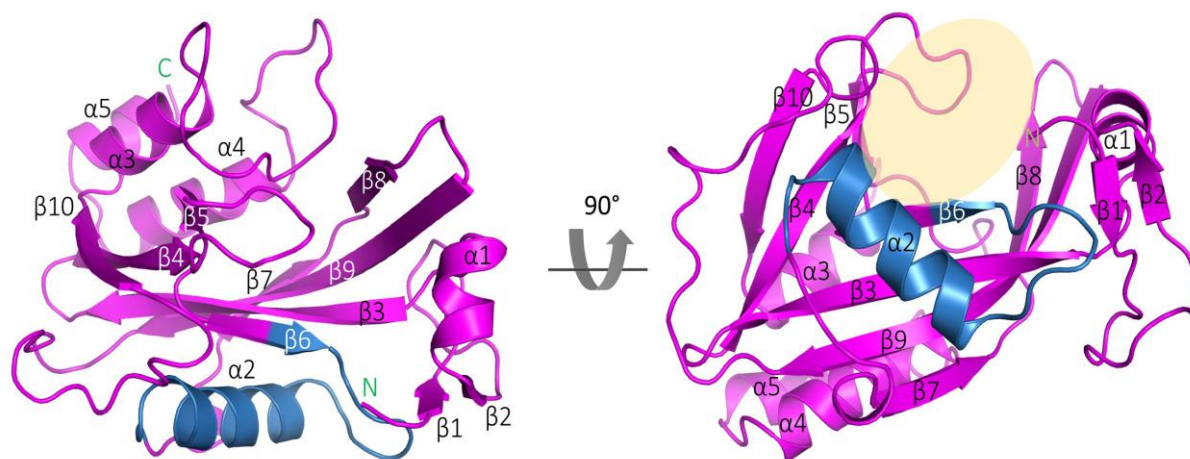
#### 4.5. Strukturna karakterizacija proteina

U ovom poglavlju prikazana je analiza dviju struktura, divljeg tipa i kompleksa mutanta E82A sa supstratom izopentenil-difosfatom, odvojeno i usporedno.

##### 4.5.1. Divlji tip

Struktura divljeg tipa proteina DdNudix sadrži karakteristični  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  strukturni motiv kao i očuvani *Nudix box* motiv petlja-zavojnica-petlja (slika 17). Molekule s takvom tercijskom strukturom pripadaju strukturnoj klasi (*fold*) Nudix hidrolaza. Struktura se sastoji od pet  $\alpha$ -zavojnica i deset  $\beta$ -vrpca koje su povezane petljama (*loops*). U središnjem dijelu proteina nalaze

se tri  $\beta$ -ploče u kojima su  $\beta$ -vrpce međusobno povezane antiparalelno, izuzev  $\beta$ -vrpaci  $\beta 3$  i  $\beta 9$  koje su paralelne.



Slika 17. Struktura divljeg tipa proteina DdNudix. Oznakama od  $\beta 1$  do  $\beta 10$  označene su  $\beta$ -vrpce, a  $\alpha 1$  do  $\alpha 5$  označene su  $\alpha$ -zavojnice. C označava karboksilni a N amino kraj proteina.

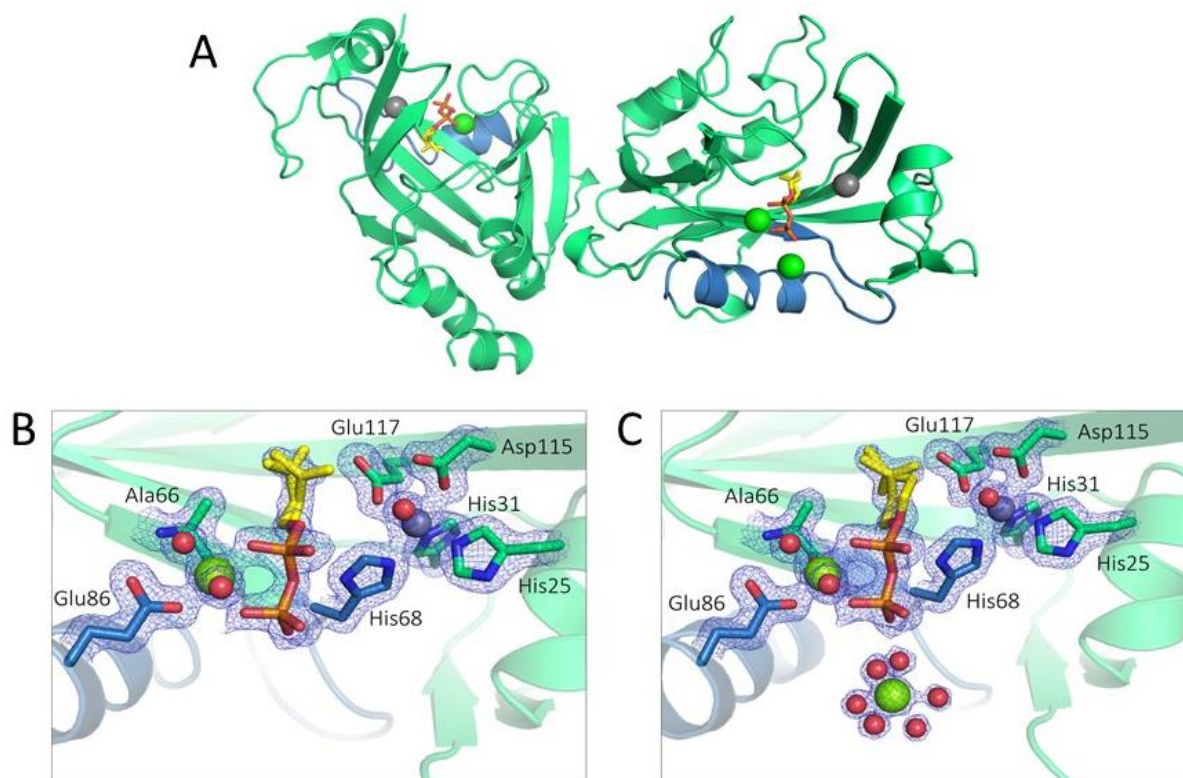
Plavom bojom označen je *Nudix box* motiv. Žutom bojom označeno je vezno mjesto supstrata.

#### 4.5.2. Kompleks mutanta E82A sa supstratom

Razumijevanje mehanizma reakcije zahtjeva strukturu sa supstratom u veznom mjestu enzima. Stoga je kristaliziran inaktivni mutant E82A u kompleksu sa supstratom IPP. Dobivena kristalna struktura sastoji se od dvije molekule proteina u asimetričnoj jedinici (slika 18A), lanac A i lanac B. U obje molekule u veznom mjestu uočena je elektronska gustoća u koju je ugrađen supstrat. Tijekom utočnjavanja utvrđeno je da se izoprenoidni dio supstrata veže u dvije konformacije (slika 18B i C).

Nudix hidrolaze su metaloenzimi. Strukturni motiv *Nudix box* veže jedan dvovalentni kation poput  $Mg^{2+}$  ili  $Mn^{2+}$ . U ovoj strukturi, molekula A sadrži jedan magnezijev kation heksakoordiniran s aminokiselinama Ala66 i Glu86 (monodentatno) iz *Nudix boxa*, dvije molekule vode te po jednom interakcijom s  $\alpha$ -i  $\beta$ -fosfatom (slika 18B). Molekula B sadrži dva magnezijeva kationa, prvi je identičan prethodno opisanom dok je drugi koordiniran sa šest molekula vode i nalazi se u blizini  $\beta$ -fosfata (slika 18C). Prvi kation  $Mg^{2+}$  se nalazi između  $\alpha$ -i  $\beta$ -fosfata na mjestu gdje bi trebalo doći do pucanja veze i hidrolize izopentenil-difosfata na izopentenil-fosfat i fosfat (slika 5).





Slika 18. (A) Struktura inaktivnog tipa proteina DdNudix E82A s ugrađenim supstratom IPP.

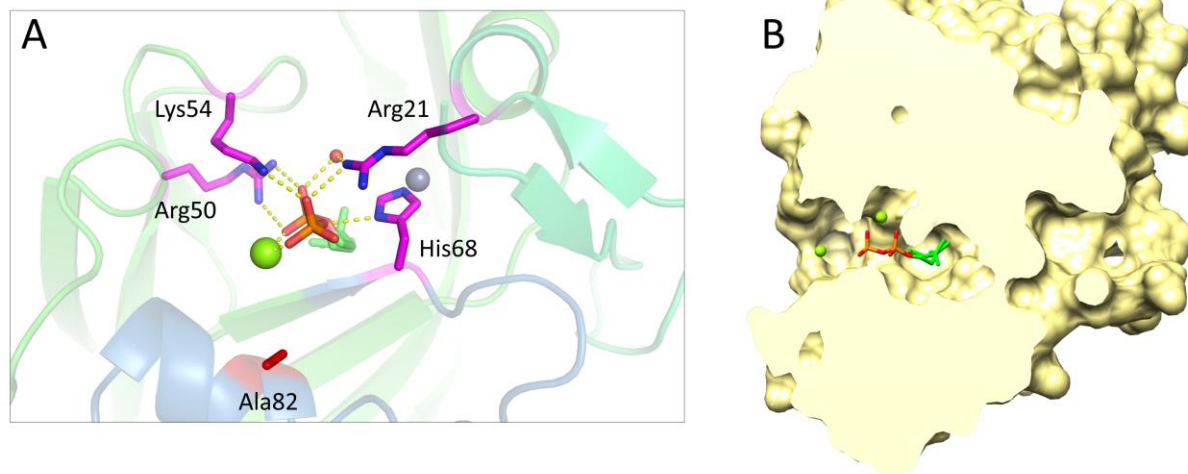
(B) Uvećani prikazi koordinacije metala u molekuli A. (C) Uvećani prikazi koordinacije metala u molekuli B. Štapićima su prikazani aminokiselinski ostaci koji koordiniraju katione.

Plavom mrežom je prikazana elektronska gustoća. Zelenim kuglicama označeni su ioni magnezija, sivom ioni cinka, a crvenom molekule vode.

Dodatno, obje molekule sadrže i kation  $Zn^{2+}$  koordiniran s aminokiselinskim ostacima His25, His31, His68, Asp115 i Glu117, te molekulom vode. Cinkov kation jednako je koordiniran u obje podjedinice. (slika 18B i C).

Difosfatna skupina supstrata ostvaruje osam vodikovih veza u aktivnom mjestu, a izopentenilni (C5) dio smješten je u šupljinu (slika 19A). Kation  $Mg^{2+}$  vezan je s jedne strane difosfatne skupine na kisikove atome  $\alpha$ - i  $\beta$ -fosfata.  $\alpha$ -fosfat ostvaruje interakcije s bočnim ogrankom Arg50 (dvije interakcije) i s molekulom vode, a  $\beta$ -fosfat s Lys54 i Arg21. Bočni ogranak His68 ostvaruje interakciju s premošćujućim atomom kisika difosfatne skupine. Bitno

je naglasiti da je aminokiselina Glu82 zamjenjena s Ala82, te postoji mogućnost malih promjena prilikom vezanja supstrata u divljem tipu.



Slika 19. (A) Prikaz interakcija difosfatne skupine supstrata IPP-a. (B) Presjek proteina s veznim mjestom supstrata. Zelenim kuglicama označeni su oni magnezija, sivom ioni cinka, a crvenom molekula vode. Prikaz je pripremljen programima PyMol i Chimera.<sup>32,33</sup>

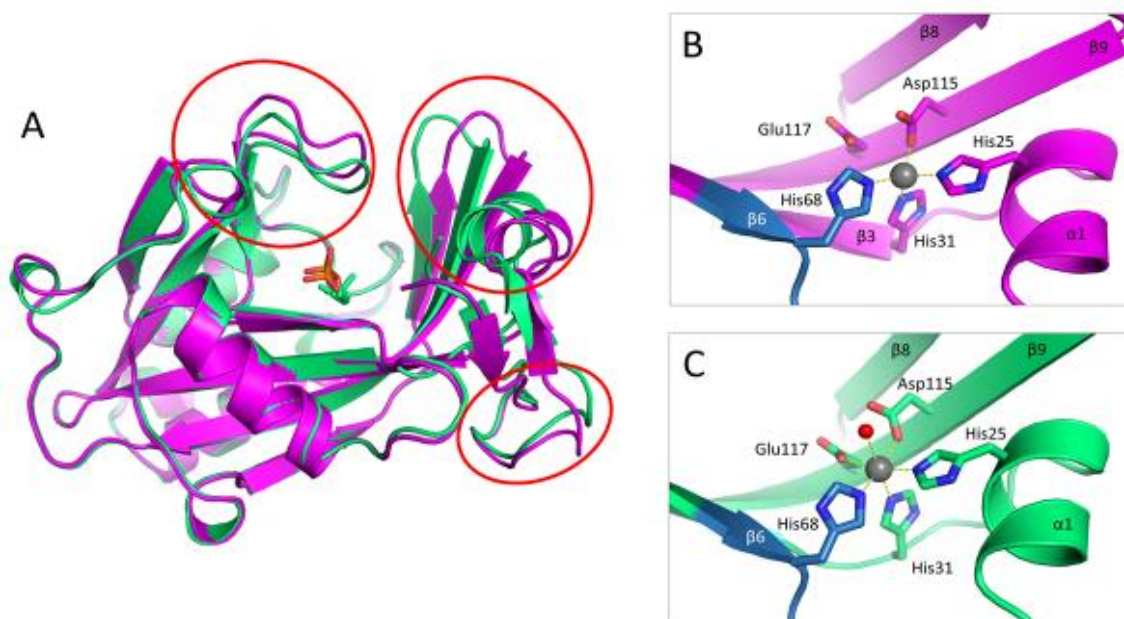
Šupljina u koju se veže supstrat IPP definirana je aminokiselinskim ostacima: Val33, Val34, His35, Ser56, Asn57, Asp62, Ile63, Ala66, Tyr102, Lys104, Ser106, Leu108, Tyr113, Asp115, Glu117, Ala165, Pro166 i Leu167. Šupljina je mala te se može pretpostaviti da su drugi eventualni supstrati ove Nudix hidrolaze građeni od malog broja ugljikovih atoma, vjerojatno ne veće od C10, vezane na difosfat (slika 19B).

Gotovo svi aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju kationa i supstrata očuvani su u biljnim Nudix-DPP III.<sup>2</sup> Unatoč malom postotku sličnosti (oko 35 %) s biljnim Nudix-DPP III, ovaj rezultat upućuje da je DdNudix uistinu njihov homolog.

#### 4.5.3. Usporedba kristalnih struktura

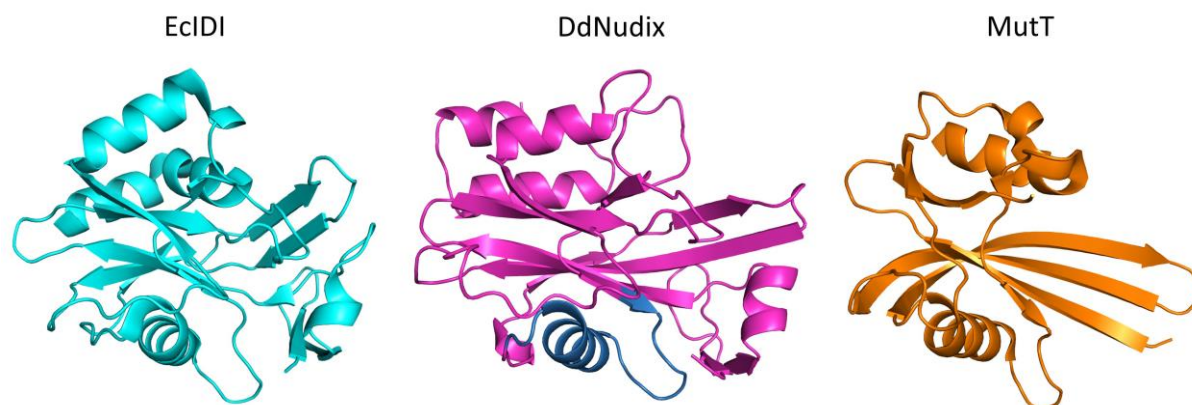
Preklapanjem divljeg tipa proteina i jedne molekule kompleksa s IPP-om, određen je korijen srednje kvadratne pogreške (*root mean square deviation*, RMSD) koji iznosi 0,4 Å za molekulu A, a 0,5 Å za molekulu B. Prilikom vezanja supstrata na protein dolazi do pomaka u dijelovima molekule za 7°, izračunato pomoću DynDom (*Protein Domain Motion Analysis*).<sup>34</sup> Najveća strukturna promjena vidljiva je u tri regije označene crvenim elipsama na slici 20A. Dakle, zbog vezanja supstrata dolazi do blagog zatvaranja strukture, što rezultira promjenom koordinacije

cinka iz četiri u šest. U kompleksu proteina s vezanim IPP-om oko cinka dolazi do dodatne interakcije s Glu117 i molekulom vode (slika 20B i C).



Slika 20. (A) Preklopljene strukture proteina DdNudix s vezanim i bez vezanog supstrata. (B) Mjesto za vezanje cinkovog iona u proteinu divljeg tipa. (C) Mjesto za vezanje cinkovog iona u kompleksu mutanta E82A sa supstratom. Ružičastom bojom prikazana je struktura divljeg tipa DdNudix a zelenom struktura kompleksa.

Pretraživanjem proteinske baze podataka (PDB)<sup>15</sup> pomoću servera PDBeFold<sup>35</sup>, pronađeno je da se kristalna struktura proteina DdNudix najbolje preklapa s izopentenil-difosfat-izomerazom iz *E. coli*. Dobiveni rezultat je neočekivan obzirom da je potvrđena hidrolazna aktivnost istraživanog proteina. Preklapanje proteina DdNudix bilo je uspješno samo s kristalnim strukturama proteina IDI iz *E. coli* (RMSD vrijednost približno 2,2 Å). S druge strane, preklapanjem kristalne strukture DdNudix s MutT, tipičnim predstavnikom Nudix hidrolaza iz *E. coli*, nije bilo uspješno (slika 21). Preklapanje nije bilo moguće zbog velikih razlika u sekundarnim strukturnim elementima iako je tercijalna struktura slična ( $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  sendvič). Dodatnim pretraživanjem nije pronađena nijedna struktura Nudix hidrolaze s kojom bi preklapanje DdNudix bilo moguće. Navedena analiza potvrđuje kako je DdNudix atipična Nudix hidrolaza.



Slika 21. Usporedba 3D-struktura izopentenil-difosfat-izomeraze iz *E.coli* (PDB kod: 2vnq), DdNudix iz *D.discoideum* i MutT iz *E.coli* (PDB kod: 3a6s). Plavom bojom prikazan je *Nudix box* motiv u strukturi DdNudix.

Osim strukturne klase, i druge karakteristike strukture proteina DdNudix upućuju na sličnosti s IDI. Kao IDI, DdNudix veže jedan ion magnezija i jedan ion cinka. Ovako vezan ion cinka do sada nije opisan u strukturama Nudix hidrolaza. Svi aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u koordinaciji  $Mg^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  su homologni onima s tom funkcijom u izomerazi, kao i ostaci koji sudjeluju u vezanju difosfatne skupine. Pronađene su i sličnosti s Nudix hidrolazama kao što je očuvana katalitički neophodna aminokiselina Glu82. Osim Glu82, DdNudix sadrži očuvani *Nudix box* motiva karakteristične sekundarne strukture, petlja-zavojnica-petlja.

Kristalne strukture proteina DdNudix riješene u ovom diplomskom radu upućuju na neočekivani zaključak da su izopentenil-difosfat-fosfohidrolaze, to jest Nudix hidrolaze koje hidroliziraju IPP, nastale evolucijom iz izopentenil-difosfat-izomeraze. Zaključno, ovdje prikazani rezultati značajan su doprinos razumijevanju djelovanja biljnih proteina Nudix-DPP III, što je i bio cilj rada. Nove spoznaje omogućuju daljnja detaljnija istraživanja katalitičkog mehanizma ovih enzima.

## § 5. ZAKLJUČAK

Divlji tip i mutant E82A proteina Nudix hidrolaze iz amebe *Dictyostelium discoideum* (DdNudix) su uspješno pročišćeni i kristalizirani.

Usporedbom riješene kristalne strukture divljeg tipa DdNudix s kristalnim strukturama izopentenil-difosfat-izomeraza dostupnim u proteinskoj bazi podataka, utvrđena je iznimna međusobna sličnost (RMSD između 2,1 Å i 2,5 Å). S druge strane, nije moguće preklapanje sa strukturama Nudix hidrolaza zbog velikih razlika u sekundarnoj strukturi proteina.

Kristalne strukture sadrže očuvani *Nudix box* motiv karakteristične sekundarne strukture, petlja-zavojnica-petlja. Unutar slijeda nalazi se katalitički neophodna glutaminska kiselina na položaju 82, čijom je zamjenom u alanin protein potpuno inaktivan.

Analizom dobivene strukture kompleksa proteina DdNudix sa supstratom izopentenil-difosfatom utvrđeno je da se supstrat veže u šupljinu, što je karakteristično za izopentenil-difosfat-izomeraze. Iako je potvrđena fosfatazna aktivnost, navedeni supstrat je atipičan za Nudix hidrolaze, a tipičan za izopentenil-difosfat-izomeraze.

Sve navedeno upućuje da je DdNudix hidrolaza nastala evolucijom iz izopentenil-difosfat-izomeraze. Ove spoznaje omogućuju daljnja detaljnija istraživanja ovih enzima.



## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

2-ME	2-merkaptoetanol, $\beta$ -merkaptoetanol
Å	ångström je fizikalna jedinica za duljinu; $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$
AJ	asimetrična jedinica unutar jedinične ćelije
APS	amonijev persulfat
Bisakrilamid	<i>N,N'</i> -metilenbisakrilamid
B_opt	kristalizacijski uvjet sastava: $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ CH}_3\text{COONa}$ pH 4,5, 23 % PEG 3350
cAMP	ciklički adenozin-monofosfat
DdNudix	Nudix hidrolaza iz amebe <i>Dictyostelium discoideum</i>
DMAPP	dimetilalil-difosfat
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DNaza I	deoksiribonukleaza I iz goveđe gušterače tip IV
dNTP	deoksinukleozid-trifosfat
DPP III	dipeptidil-peptidaza III
DTT	ditioteitrol
EDTA	etilendiaminotetraoctene kiseline
IDI	izopentenil-difosfat-izomeraza
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPP	izopentenil-difosfat
IP	izopentenil-fosfat
P <sub>i</sub>	pirofosfat
kDa	kilodalton, jedinica koja odgovara $1000 \text{ g mol}^{-1}$ (IUPAC)
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani hranjiva podloga
LB/amp	LB hranjiva podloga s ampicilinom koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$
mili Q	deionizirana voda niske vodljivosti ( $< 10 \mu\text{S}$ ) proizvedena na sustavu za proizvodnju deionizirane vode <i>Millipore</i>
NTA	nitrilotrioctena kiselina

---

Nudix	akronim od nukleozid-difosfat vezan na skupinu X
8-okso-dGTP	8-okso-2'-deoksigvanozin-5'-trifosfat
PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu ( <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
PDB	proteinska baza podataka ( <i>Protein Data Bank</i> )
PEG	polietilen-glikol
RMSD	korijen srednjeg kvadrata odstupanja ( <i>root mean square deviation</i> )
rpm	broj okretaja po minuti ( <i>revolutions per minute</i> )
SDS	natrijev dodecilsulfat ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametilendiamin
Tris	tris-(hidroksimetil)-aminometan

**Aminokiseline i njihovi simboli:**

glicin	Gly (G)
alanin	Ala (A)
valin	Val (V)
leucin	Leu (L)
izoleucin	Ile (I)
metionin	Met (M)
prolin	Pro (P)
fenilalanin	Phe (F)
triptofan	Trp (W)
serin	Ser (S)
treonin	Thr (T)
asparagin	Asn (N)
glutamin	Gln (Q)
tirozin	Tyr (Y)
cistein	Cys (C)
lizin	Lys (K)
arginin	Arg (R)
histidin	His (H)
asparaginska kiselina	Asp (D)
glutaminska kiselina	Glu (E)

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. Z. Karačić, B. Vukelić, G.H. Ho, I. Jozić, I. Sućec, B. Salopek-Sondi, M. Kozlović, S.E. Brenner, J. Ludwig-Müller i M. Abramić, *Biol. Chem.* **398** (2017) 101-112.
2. Z. Karačić, Biokemijska karakterizacija hidrolaze s dvojnomo enzimskom aktivnošću iz mahovine *Physcomitrella patens*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 1-24.
3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (datum pristupa 20.08.2018)
4. <https://www.uniprot.org> (datum pristupa 12.7.2018)
5. K.B. Raper, *J. Agricul. Res.* **50** (1935) 135-147.
6. P. Gaudet, P. Fey i R. Chisholm, *Cold Spring Harbor Protocols* **2008** (2008) 1-11.
7. P. Schaap, *Development* **138** (2011) 387-396.
8. <http://www.catalogueoflife.org/> (datum pristupa 5.08.2018)
9. M.A. Myre, *J. Biomed. Sci.* **19** (2012) 41.
10. <http://dictybase.org> (datum pristupa 2.07.2018)
11. J.R. Srouji, A. Xu, A. Park, J.F. Kirsch i S.E. Brenner, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **85** (2017) 775-811.
12. A. McLennan, *Cell. Mol. Life Sci.* **63** (2006) 123-143.
13. A.G. McLennan, *Cell. Mol. Life Sci* **70** (2013) 373-385.
14. A. Mildvan, Z. Xia, H. Azurmendi, V. Saraswat, P. Legler, M. Massiah, S. Gabelli, M. Bianchet, L.-W. Kang i L. Amzel, *Arch. Biochem. Biophys.* **433** (2005) 129-143.
15. <https://www.rcsb.org> (datum pristupa 12.05.2018)
16. K. Berthelot, Y. Estevez, A. Deffieux i F. Peruch, *Biochimie* **94** (2012) 1621-1634.
17. J. Berg, J. Tymoczko i L. Stryer, *Biochemistry*, Preveli Weygand Đurašević, I., Jernej, B., Kućan, Ž. Zagreb: Školska knjiga (2013) 125-129.
18. [http://www.chem.uky.edu/courses/che554/6\\_AffinityChro/QIAexpressionist.pdf](http://www.chem.uky.edu/courses/che554/6_AffinityChro/QIAexpressionist.pdf) (datum pristupa 15.08.2018)
19. M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254.
20. O. Warburg i W. Christian, *Biochem. Z.* **310** (1941) 384-421.
21. <https://web.expasy.org/protparam/> (datum pristupa 18.08.2018)



22. B. Rupp. *Biomolecular crystallography: principles, practice, and application to structural biology*. Garland Science, 2009, str. 100-113.
23. I. Sabljčić, Strukturna karakterizacije dipeptidil-peptidaze III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2010, str. 24-46.
24. W. Kabsch, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **66** (2010) 125-132.
25. P.R. Evans i G.N. Murshudov, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **69** (2013) 1204-1214.
26. S.R. Ness, R.A. de Graaff, J.P. Abrahams i N.S. Pannu, *Structure* **12** (2004) 1753-1761.
27. P. Emsley, B. Lohkamp, W.G. Scott i K. Cowtan, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **66** (2010) 486-501.
28. P.D. Adams, P.V. Afonine, G. Bunkóczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.-W. Hung, G.J. Kapral i R.W. Grosse-Kunstleve, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **66** (2010) 213-221.
29. A. Vagin i A. Teplyakov, *J. Appl. Crystallogr.* **30** (1997) 1022-1025.
30. N.W. Moriarty, R.W. Grosse-Kunstleve i P.D. Adams, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **65** (2009) 1074-1080.
31. <https://cactus.nci.nih.gov/translate/> (datum pristupa 28.08.2018)
32. <https://sourceforge.net/projects/pymol/> (datum pristupa 15.08.2018)
33. E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng i T.E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **25** (2004) 1605-1612.
34. <http://fizz.cmp.uea.ac.uk/dyndom/> (datum pristupa 25.08.2018)
35. E. Krissinel i K. Henrick, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **60** (2004) 2256-2268.

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Ana Vlašić

Datum rođenja: 18. siječnja 1994.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

2000–2008 Osnovna škola Augusta Šenoje, Zagreb

2008–2012 IX. gimnazija, Zagreb

2012–2016 Preddiplomski sveučilišni studij kemije  
Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Sveučilište u  
Zagrebu, Zagreb

### Nagrade i priznanja

2017 Rektorova nagrada za SiSK (organizacijski odbor četiri godine)  
Simpozij studenata kemičara

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2013–2018 „Otvoreni dan kemije“, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički  
fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb