Purinska nukleozidna fosforilaza iz soja 26695 bakterije Helicobacter pylori: ekspresija, pročišćavanje i karakterizacija

Gucunski, Karolina

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:325692

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Karolina Gucunski

PURINSKA NUKLEOZIDNA FOSFORILAZA IZ SOJA 26695 BAKTERIJE *HELICOBACTER PYLORI*: EKSPRESIJA, PROČIŠĆAVANJE I KARAKTERIZACIJA

Diplomski rad

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

Zagreb, 2018. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Marije Luić i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Ivane Leščić Ašler. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Enzimi purinskog reciklirajućeg ciklusa iz *Helicobacter pylori* i *Escherichie coli* (7423).

Sadržaj

SAŽETAK ..... **IX**
ABSTRACT ..... **XI**
§ 1. UVOD **1**
1.1.1. Cilj rada *2*
§ 2. LITERATURNI PREGLED **3**
2.1. Helicobacter pylori **3**
2.1.1. Postavljanje dijagnoze i liječenje *3*
2.1.2. Karakteristike bakterije *4*
2.1.3. Raznolikost sojeva Helicobacter pylori *5*
2.2. Purinska nukleozidna fosforilaza, PNPaza **6**
2.2.1. Podjela purinskih nukleoizdnih fosforilaza *9*
2.2.2. Purinska nukleozidna fosforilaza iz bakterije Escherichia coli *10*
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **12**
3.1. Materijali **12**
3.1.1. Standardne kemikalije *12*
3.1.2. Boje *12*
3.1.3. Enzimi i enzimski supstrati *12*
3.1.4. Sastojci tekućih i krutih mikrobioloških hranjivih medija *12*
3.1.5. Punila za kromatografske kolone *13*
3.1.6. Bakterijski sojevi za prekomjernu ekspresiju *13*
3.1.7. Plazmid *13*
3.2. Priprema tekućih i krutih hranjivih medija **13**
3.3. Transformacija bakterijskih stanica *Escherichie coli* rekombinantnim plazmidom **13**
3.4. Optimizacija uvjeta prekomjerne ekspresije **14**
3.5. Prekomjerna ekspresija purinske nukleozidne fosforilaze **15**
3.6. Priprema pufera za pročišćavanje proteina **16**
3.7. Pročišćavanje proteina iz stanične kulture **17**
3.7.1. Ekstrakcija proteina iz stanica *17*
3.7.2. Anionska izmjenjivačka kromatografija *17*
3.7.3. Afinitetna kromatografija *18*
3.8. Elektroforetsko razdvajanje proteina **18**
3.8.1. Priprema gelova i uzoraka za elektroforezu *19*

3.8.2. Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) 20
3.8.3. Izoelektrično fokusiranje 20
3.9. Odsoljavanje i koncentriranje proteina 20
3.10. Gel-filtracija 21
3.11. Određivanje koncentracije proteina 22
3.11.1. Bradfordova metoda 22
3.12. Enzimska aktivnost purinske nukleozidne fosforilaze 22
3.12.1. Određivanje kinetičkih parametara 23
3.12.2. Utjecaj temperature i pH na stabilnost i aktivnost purinske nukleozidne fosforilaze 23
3.13. Kristalizacija purinske nukleozidne fosforilaze 24
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 26
4.1. Usporedba proteinskih sekvenci 26
4.2. Određivanje teorijske izoelektrične točke 27
4.3. Ekspresija i pročišćavanje purinske nukleozidne fosforilaze 27
4.4. Gel-filtracija 35
4.5. Enzimska aktivnost 36
4.6. Utjecaj temperature i pH na stabilnost i aktivnost purinske nukleozidne fosforilaze 39
4.7. Kristalizacija i struktura purinske nukleozidne fosforilaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori* 42
§ 5. ZAKLJUČAK 45
§ 6. POPIS OZNAKA I KRATICA 46
§ 7. LITERATURNI IZVORI 47
§ 8. ŽIVOTOPIS LIII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PURINSKA NUKLEOZIDNA FOSFORILAZA IZ SOJA 26695 BAKTERIJE *HELICOBACTER PYLORI*: EKSPRESIJA, PROČIŠĆAVANJE I KARAKTERIZACIJA

Karolina Gucunski

Cilj ovog rada je pročišćavanje, karakterizacija i kristalizacija enzima purinske nukleozidne fosforilaze (PNPaza) iz bakterije *Helicobacter pylori*. PNPaza katalizira reverzibilno fosforolitičko cijepanje glikozidne veze ribo- i deoksiribonukleozida, u prisutnosti fosfata kao sekundarnog supstrata u svrhu nastajanja purinske baze i riboze(deoksiriboze)-1-fosfata. Neophodan je enzim kod sinteze purina iz metaboličkog otpada, jedinog aktivnog puta za sintezu purina u bakteriji *H. pylori*. Optimizirana je ekspresija PNPaze u bakteriji *Escherichia coli*. Prekomjerno eksprimirana PNPaza je pročišćena anionskom izmjenjivačkom kromatografijom i afinitetnom kromatografijom na koloni s vezanim inhibitorom. Aktivnost pročišćenog enzima ispitana je spektrofotometrijski uz različite primarne supstrate. Određeni su kinetički parametri i ispitana je ovisnost aktivnosti PNPaze o pH i temperaturi reakcijske smjese. Postavljeni su eksperimenti kristalizacije s pročišćenim enzimom metodom difuzije para u visećoj kapi u različitim uvjetima.
(52 stranice, 16 slika, 8 tablica, 50 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: afinitetna kromatografija s vezanim inhibitorom, anionska izmjenjivačka kromatografija, *Helicobacter pylori*, kinetički parametri, kristalizacijske probe, purinska nukleozidna fosforilaza

Mentor: dr sc. Marija Luić, znanstvena savjetnica IRB, naslovni red. prof.
Neposredni voditelj: dr. sc. Ivana Leščić Ašler, znanstvena suradnica IRB
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
2. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
3. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
4. dr sc. Marija Luić, znanstvena savjetnica IRB, naslovni red. prof.

Zamjena: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Datum diplomskog ispita: 28. rujna 2018.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE FROM BACTERIUM *HELICOBACTER PYLORI* STRAIN 26695: EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERISATION

Karolina Gucunski

The goal of this thesis is to purify, characterise and crystallise purine nucleoside phosphorylase (PNPase) from *Helicobacter pylori*. PNPase catalyses reversible phosphorolytic cleavage of glycoside bond of ribo- and deoxyribonucleosides, in the presence of phosphate as a secondary substrate to produce purine base and ribose(deoxyribose)-1-phosphate. It is required for purine synthesis through salvage pathway, the only active pathway for purine synthesis in *H. pylori*. The optimal conditions were found for recombinant expression of PNPase in *Escherichia coli*. Overexpressed PNPase was subsequently purified by anionic exchange chromatography and affinity chromatography on the column with the inhibitor bound. The activity of the purified enzyme was tested spectrophotometrically with different primary substrates. The kinetic parameters were determined as well as the change of PNPase activity with pH and temperature. The hanging drop vapour diffusion method was applied for crystallisation of the purified enzyme.
(52 pages, 16 figures, 8 tables, 50 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb
Keywords: afinity chromatography with bound inhibitor, anionic exchange chromatography, *Helicobacter pylori*, kinetic parameters, crystallization probes, purine nucleoside phosphorylase
Mentor: Dr. Marija Luić, Adjunct. Full Professor
Assistant mentor: Dr. Ivana Leščić Ašler, Research Associate
Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
Reviewers:

1. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
3. Dr. Biserka Prugovečki, Full Professor
4. Dr. Marija Luić, Adjunct. Full Professor

Substitute: Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor
Date of exam: 28. September 2018.

§ 1. UVOD

Gen *deoD* kodira enzim purinska nukleozidna fosforilaza (PNPaza) koji reverzibilno katalizira fosforolizu purinskih nukleozida. Purinska nukleozidna fosforilaza se sveprisutno eksprimira u stanicama i tkivu sisavaca. Genetske mutacije u PNPazi često uzrokuju nedostatak eksprimiranog enzima što rezultira defektnim imunitetom posredovanim T stanicama, ali također mogu utjecati i na imunost B stanica i odgovore antitijela.

Purinska nukleozidna fosforilaza katalizira reverzibilnu fosforolizu purinskih nukleozida (prvenstveno inozina i gvanozina kod ljudi) kako bi se dobila odgovarajuća purinska baza i riboza-1-fosfat u prisutnosti anorganskog ortofosfata (P_i). PNPaza je enzim metaboličkog puta razgradnje purina, koji funkcionira u sklopu razgradnog mehanizma, čime se stanicama omogućuje sinteza purinskih nukleozida iz već postojećih purinskih baza izbjegavanjem sinteze baza koja zahtijeva veći utrošak energije. Fosforoliza se preferira zbog povezivanja reakcije PNPaze s oksidacijom purinske baze pomoću ksantin-oksidaze ili fosforibozilacije purinske baze pomoću hipoksantin-gvanin-fosforibosil-transferaze (HGPRT). S druge strane, sinteza nukleozida je termodinamički preferirana naspram fosforolize.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) je gram-negativna bakterija, patogen ljudskog probavnog sustava. Ova bakterija koristi isključivo razgradni metabolički put za sintezu purinskih nukleozida. Smatra se kako bi se sprječavanjem ključnih enzima razgradnog mehanizma moglo zaustaviti širenje dotične bakterije. Jedan od ključnih enzima ovog metaboličkog puta je purinska nukleozidna fosforilaza (PNPaza).

Bakterija *H. pylori* prolazi kroz različite dijelove želuca i dvanaesnika čovjeka, u kojima stvara upalu što se povezuje s pojavom većine želučanih tegoba, pa čak i zloćudnih promjena na želucu. Više od 50% cjelokupne populacije ljudi nosi ovu bakteriju, ali valja naglasiti kako se u otprilike 80% zaraženih osoba ne pojavljuju nikakvi simptomi. U ostalih se razvija gastritis i čir na želucu, a u manjem broju ljudi i tumor želuca. Kako postoji cijeli niz različitih sojeva *H. pylori*, za ishod infekcije važno je kojim je sojem osoba inficirana. Za klinički ishod zaraze uzrokovane bakterijom *H. pylori* ključni su proteini CagA, VacA i PAI tipa 4 sekretorni sustav, koji se nalaze u PAI-slijedu genoma. Za eradikaciju bakterije

primjenjuju se različiti protokoli kombiniranog liječenja, koji su za dobar dio pacijenata zadovoljavajući, no problem su sojevi *H. pylori* otporni na postojeće antibiotike.

1.1.1. Cilj rada

Cilj ovog istraživanja je pročišćavanje, biokemijska karakterizacija i kristalizacija purinske nukleozidne fosforilaze (PNPaze) iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori*, kao prvog koraka u detaljnoj karakterizaciji interakcija PNPaze s potencijalnim inhibitorima. Naime, očekuje se da bi se inhibiranjem PNPaze moglo utjecati na inhibiciju tj. rast same bakterije. Pokaže li se ovo točnim, purinska nukleozidna fosforilaza bi mogla postati nova meta za razvoj lijekova u istrebljivanju ovog patogena.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. *Helicobacter pylori*

Bakterija *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) je otkrivena 1979. godine, a par godina kasnije, 1983., znanstvenici Robin Warren i Barry J. Marshall su je uspješno izolirali. [1] Nobelova nagrada za otkriće bakterije *H. pylori* im je dodijeljena tek 2005. godine. Ustanovili su kako se bakterija pojavljuje u ljudi s kroničnim gastritisom i čirom na želucu, dok se u prošlosti smatralo kako ova stanja nisu potencirana mikroorganizmima.[2] Bakterija obitava u raznim dijelovima želuca i dvanaesnika gdje uzrokuje upalu povezanu s pojavom većine želučanih tegoba, uključujući i zloćudne promjene na želucu. [3, 4, 5]

2.1.1. Postavljanje dijagnoze i liječenje

Bakterija *H. pylori* uzrokuje čitav niz bolesti kao što su gastritis, peptički ulkus, karcinom želuca i limfom niskog stupnja.[3] Infekcija može biti dvojaka, ili asimptomatska ili se pak može evidentirati različitim stupnjem dispepsije. [1, 6] Dijagnoza se postavlja pomoću ureja izdisajnog testa, odnosno detekcijom obogaćenja izotopom $^{13}CO_2$ u izdahnutom zraku i pregledom endoskopski dobivenih bioptata. Naime, izdisajni test je neinvazivna metoda i temelji se na svojstvu bakterije da razgrađuje ureju na ugljikov dioksid i amonijak uz enzim ureazu. Kod provođenja testa pacijent popije vodenu otopinu ureje obogaćenu izotopom ugljika ^{13}C. U prisutnosti bakterije, ureja će se razgraditi, a oslobođeni metaboliti će ući u krvotok te će se nakon određenog vremena ugljikov dioksid izdahnuti. Povećani udio izotopa ugljika u izdisaju, u obliku ugljikovog dioksida, dokaz je prisutnosti bakterije.

Liječenje se provodi kombinacijom lijekova koja uključuje inhibitor protonske crpke (npr. omeprazol), koji povećava želučani pH i povećava učinkovitost antibiotika, te dva antibiotika kao što su primjerice klaritromicin i metronidazol. [7] Moguća je i dodatna terapija, kod koje se uz već spomenute lijekove koristi i teški metal bizmut zbog njegove izrazite antibakterijske aktivnosti.[8,9]

Statistika nije sklona zemljama u razvoju u kojima stanovništvo obolijeva pretežito u djetinjstvu te im *H. pylori* uzrokuje kronične infekcije. [10, 11] U Sjedinjenim Američkim Državama infekcija rijetko nastaje u djetinjstvu, ali se broj inficiranih povećava ovisno o dobi stoga je već 50% stanovništva u dobi od 60 godina inficirano. Infekcija je češća u afroamerikanaca i hispanoamerikanaca, kod kojih je i do 90% populacije zaraženo. [12]
Bakterija se razvija u raznim izlučevinama kao što su stolica, pljuvačka i zubni plak, što dokazuje kako je prijenos oralno-oralni ili feko-oralni. [13] Infekcija se najčešće širi u skupinama kao što su članovi porodice ili skrbničke institucije. Gastroenterolozi i medicinsko osoblje su izloženi visokom riziku od infekcije zato što se bakterija prenosi i neadekvatno dezinficiranim medicinskim priborom kao što je endoskop.

2.1.2. Karakteristike bakterije

Helicobacter pylori je gram-negativan bacil, duljine oko 3 μm, a promjera oko 0,5 μm. Bakterija je mikroaerofilna. Dioba se odvija četiri do šest puta u jednom satu, a bakterija se prestaje dijeliti pri pH 3,5. Bakterija može imati i do 6 bičeva za pokretanje kroz mukozu stijenke želuca (slika 2.1). Kako bi preživjela u kiselom pH želuca bakterija se svojim bičevima ukopava u mukozu stijenke želuca i potom se negativnom (u odnosu na pH) kemotaksijom pomiče dublje u stijenku želuca sve do epitelnih stanica na čije se membrane veže adhezinima.[14]

Sojevi *H. pylori* se mogu podijeliti u dvije glavne skupine prema mjestu kolonizacije. Prva, gastrička skupina, može kolonizirati želudac, dok druga, negastrička skupina, kolonizira probavni trakt.

Bakterija nema sve sintetske puteve, među ostalim ne može sintetizirati određene aminokiseline kao što su fenilalanin, metionin, leucin, izoleucin, arginin, histidin i valin. Uz to, *H. pylori* nema *de novo* sintetski put purina već se oslanja na razgradni metabolizam. Sintetizira brojne enzime, od kojih je veoma važna ureaza koja je jedan od čimbenika koji bakteriji omogućuju preživljavanje u kiselom pH želuca. Ureaza razgrađuje želučanu ureju na CO_2 i amonijak koji se pretvara u NH_4^+ i neutralizira želučanu kiselinu. Amonijak je toksičan za epitelne stanice, i zajedno s drugim produktima *H. pylori*, uključujući i proteaze, citotoksin A (VacA) i različite fosfolipaze, oštećuje stanice.

Slika 2.1. Bakterija *Helicobacter pylori* pod elektronskim mikroskopom. Slika preuzeta iz literaturnog izvora [15]

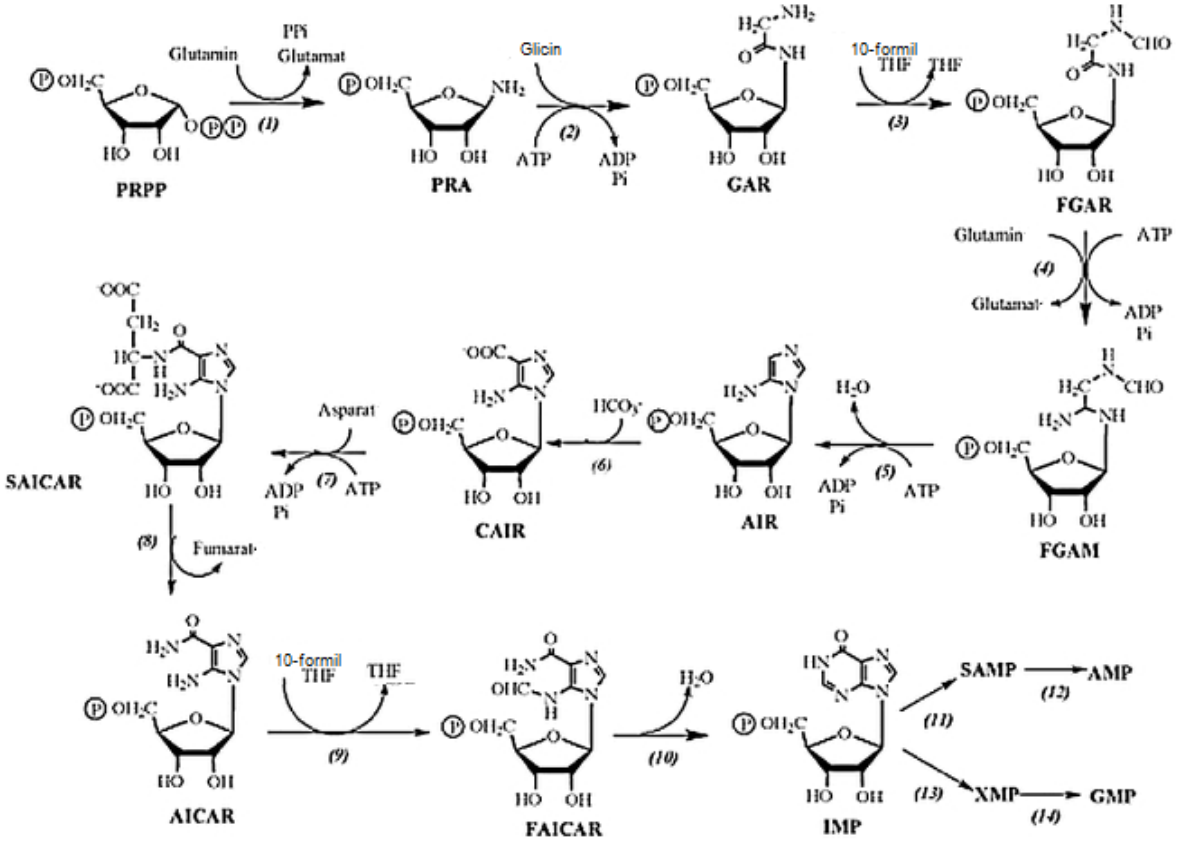
2.1.3. Raznolikost sojeva Helicobacter pylori

Genom *H. pylori* sekvenciran je 1997. godine. [16] Dvije godine kasnije, *H. pylori* je postala prva bakterija za koju su objavljene i uspoređene potpune sekvence genoma dvaju različitih bakterijskih izolata. Tako je dokazano kako je čak oko 7% genoma specifično za određeni bakterijski soj. Time je potvrđena već otprije poznata genetska raznolikost sojeva. Vjerojatno je primarni razlog raznolikosti rekombinacija bakterijskih gena u prirodnim uvjetima. Rekombinacija je djelomice nastala kao posljedica sposobnosti sojeva da se koriste ogoljelom homolognom DNA koja je oslobođena pomoću bakterijske lize iz okoliša. To im omogućuje međusobno razmjenjivanje nasljednog sadržaja.

Pojedini sojevi *H. pylori* su veoma različiti u brojnim genima, što se odnosi i na gene koji kodiraju za enzime ureaza, flagelin, VacA i CagA proteine. Ipak, aktivno je specifično klonalno grupiranje u raznim dijelovima svijeta ranije poznato kao razlika u distribuciji vacA i cagA gen-pozitivnih sojeva u Aziji i u Sjevernoj Americi te Europi. Velika je mogućnost kako ova specifičnost odgovara prilagodbi bakterije određenoj etničkoj grupi stanovništva. Time je omogućeno klonalno širenje sojeva otpornih na antibiotike jer otpornost pruža evidentnu evolucijsku prednost rezistentnim sojevima. Dodatan razlog za izrazitu raznolikost genoma određenih sojeva u ovom slučaju može biti i selekcijski pritisak antimikrobne terapije.[7, 17]

2.2. *Purinska nukleozidna fosforilaza, PNPaza*

Tokom prolaska vremena i evolucijske prilagodbe na život u organizmu čovjeka, bakterija *H. pylori* izgubila je gene za enzime potrebne u metaboličkom putu *de novo* (slika 2.2) biosinteze purinskih nukleozida (stoga se za njihovu sintezu oslanja isključivo na razgradni metabolički put (engl. *salvage pathway*). Smatra se da bi inhibicija ključnih enzima navedenog puta mogla zaustaviti rast ove bakterije i biti interesantna meta za razvoj novih lijekova protiv *H. pylori*.[18, 19]

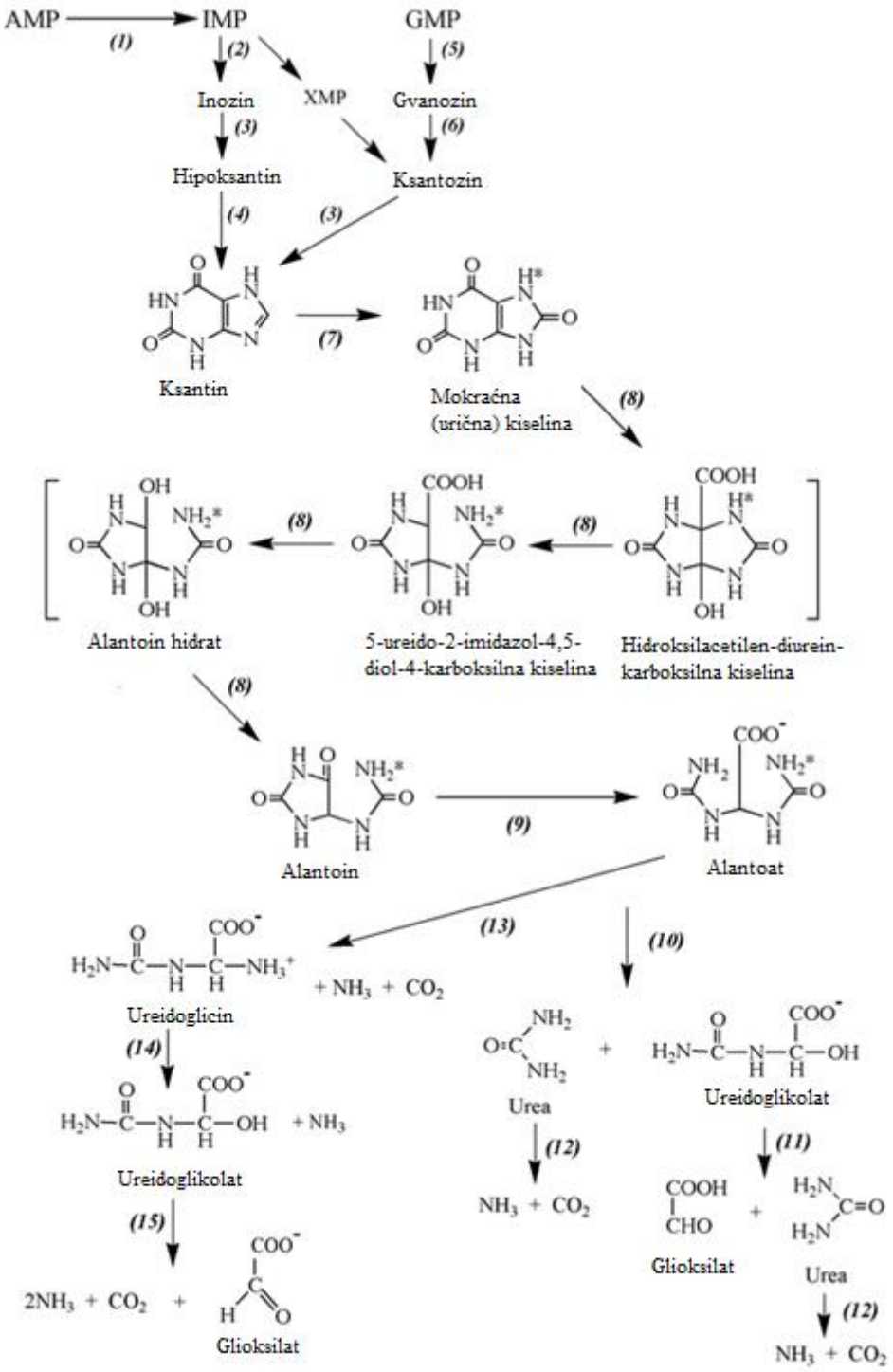


Slika 2.2. *De novo* biosintetski put u biljkama. Enzimi su redom označeni: (1) amidna fosforiboziltransferaza, (2) GAR-sintetaza, (3) GAR-formil-transferaza, (4) FGAM-sintetaza, (5) AIR-sintetaza, (6) AIR-karboksilaza, (7) SAICAR-sintetaza, (8) adenilosukcinat-liaza, (9) AICAR-formil-transferaza, (10) IMP-ciklohidrolaza, (11) SAMP-sintetaza, (12) adenilosukcinaza, (13) IMP-dehidrogenaza, (14) GMP-sintetaza. Slika preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru [20].

Jedan od ključnih enzima u razgradnom metaboličkom putu biosinteze purina, koji bi se u tu svrhu mogao inhibirati, je purinska nukleozidna fosforilaza, PNPaza. Ovaj enzim katalizira fosforilitičko cijepanje N-glikozidne veze između purinske baze i pentoze u ribonukleozidima i deoksiribonukleozidima, kao i reverznu reakciju kojom iz (2'-deoksi)riboza-1-fosfata i slobodne purinske baze nastaje odgovarajući nukleozid, uz oslobađanje fosfata (slika 2.3). [17, 21]

Purinska nukleozidna fosforilaza (PNPaza) je sveprisutni enzim bitan za razgradnju purinskih nukleozida. Purinski nukleozidi mogu biti sintetizirani uz pomoć *de novo* ili razgradnog (engl. *salvage pathway*) mehanizma. *De novo* put stvara strukture prstenastog oblika iz jednostavnih prethodnika kao što su CO_2, glicin i glutamin. Razgradni, pak, mehanizam ponovno koristi purinske baze. Inozin-monofosfat (IMP) je središnji proizvod u oba puta u metabolizmu purina i središnji je za interkonverziju adeninskih i gvaninskih nukleotida. [17, 22] Ovi metabolički putovi purina odgovorni su za pravilnu ravnotežu između proizvodnje defosforiliranih purina i detoksikacije daljnjom degradacijom na mokraćnu kiselinu.

Helicobacter pylori je odlično prilagođena za život u želucu čovjeka. O tome svjedoči činjenica da se poslije prihvaćanja za epitelne stanice stijenke želuca, bakterijske stanice, pomoću enzima ureaze, stvaraju amonijak i hidrogenkarbonatne anione kojima neutraliziraju kiselu sredinu u kojoj se nalaze. Nedostatak većine enzima potrebnih za biosintezu nukleotida *de novo* putem se može razjasniti adekvatnom prilagodbom ovog patogena na život u ljudskom organizmu; u okolišu u kojem je dostupna dovoljna količina dušičnih baza za recikliranje iz metaboličkog otpada biokemijski put *de novo* sinteze nije nužan za preživljavanje te je tijekom evolucije došlo do gubitka odgovarajućih gena.[23, 24]



Slika 2.3. Biosintetski put katabolizma u biljkama od inozina i gvanozina do ugljikovog monoksida i ureje. Enzimi su redom prikazani: (1) AMP-deaminaza, (2) IMP-dehidrogenaza, (3) 5'-nukleotidaza, (4) inozin-gvanozin-nukleozidaza, (5) gvanozin-deaminaza, (6) gvanin-deaminaza, (7) ksantin-dehidrogenaza, (8) urikaza, (9) alantoinaza, (10) alantoikaza, (11) ureidoglikolat liaza, (12) ureaza, (13) alantoin-deaminaza, (14) ureidoglicin-amidohidrolaza, (15) ureidoglikolat-hidrolaza. Slika preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru [20].

2.2.1. Podjela purinskih nukleoizdnih fosforilaza

Proteini purinske nukleozidne fosforilaze se prema molekulskoj masi mogu podijeliti u dvije glavne skupine: homotrimeri s malom molekulskom masom od ~80-100 kDa i homoheksameri s velikom molekulskom masom od ~110-160 kDa. Prva skupina je izolirana iz eukariota (uglavnom sisavaca) te pojedinih mikroorganizama kao što je *Cellulomonas sp*. Ovu skupinu karakterizira kataliza 6-oksopurina i njihovih nukleozida, te pojedinih analoga. Druga skupina enzima je specifična za brojne bakterijske vrste koje mogu koristiti i 6-oksopurine i 6-aminopurine, te njihove nukleozide i brojne analoge.[25]

Bez obzira na ovo, razne purinske nukleozidne fosforilaze ne uklapaju se u gore navedenu podjelu. Takve fosforilaze mogu imati znatno drugačiji broj podjedinica. Npr., u *Bacillus stearothermophilus* postoje dvije različite PNPaze od kojih je jedna dimer, a druga tetramer. [26] Nadalje, mogu imati netipičnu relativnu molekulsku masu pa tako PNPaza iz bakterija roda *Cellulomonas* je homotrimer s relativnom molekulskom masom od 114 kDa; ili drugačiju specifičnost prema supstratima.[27, 28]

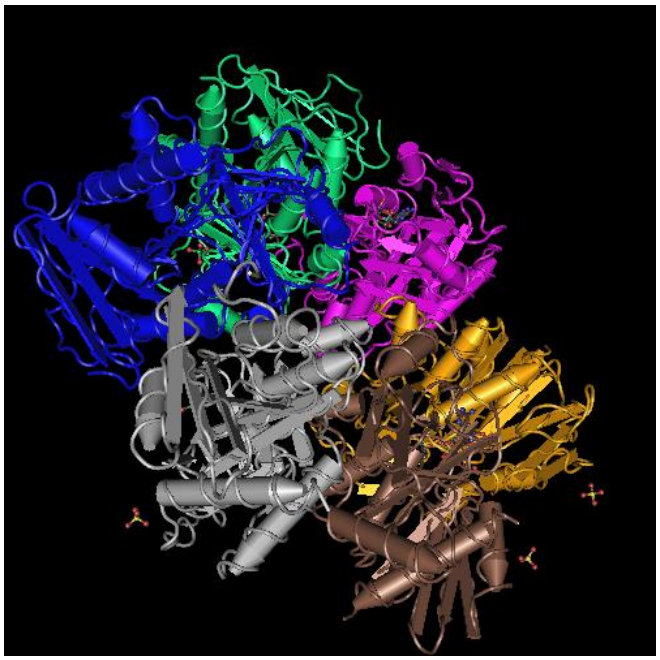
Ne smije se zanemariti činjenica da je dio istraživanja na proteinima PNPaze proveden prije nekoliko desetljeća kada su za određivanje relativne molekulske mase i broja podjedinica korištene metode koje se u 21. stoljeću mogu smatrati nepreciznima pa čak i zastarjelima, poput elektroforeze i gel-filtracije. U nekim slučajevima bi nemogućnost jednoznačnog svrstavanja pojedinih PNPaza u prvu ili drugu skupinu mogla biti posljedica pogrešnih informacija dostupnih o proteinu.

Za pouzdaniju klasifikaciju ovih fosforilaza i njihovo bolje razumijevanje idealno bi bilo ponoviti navedena istraživanja koristeći kristalografiju za konačnu potvrdu proteinske strukture i sekvenciranje za potvrdu pripadnosti prvoj ili drugoj skupini PNPaza. Najbolje istraženi predstavnik purinskih nukleozidnih fosforilaza velike relativne molekulske mase je PNPaza iz bakterije *E. coli*. [29 - 31] Po svojstvima je slična drugim proteinima te skupine, a tako i PNPazi iz bakterije *H. pylori*, s kojom dijeli i značajnu sličnost u aminokiselinskom slijedu (50 % identičnosti, 70 % sličnosti u slijedovima).

2.2.2. Purinska nukleozidna fosforilaza iz bakterije *Escherichia coli*

Purinska nukleozidna fosforilaza iz bakterije *E. coli* je protein u obliku diska, čija debljina iznosi ~60 Å, a promjer ~100 Å. Središnja šupljina proteina ima promjer od ~20 Å. Struktura ovog homoheksamera se s obzirom na položaj podjedinica može bolje opisati kao trimer dimera. [17] Naime, po dva monomera u strukturi okrenuta su jedan prema drugome i zajednički grade dva aktivna mjesta blizu površine proteina, jedno s gornje i jedno s donje strane enzima. Aktivno mjesto jednog monomera upotpunjuju His4 i Arg43 drugog monomera i obratno. Monomeri su u heksamer povezani vodikovim vezama i hidrofobnim interakcijama, pri čemu su interakcije unutar dimera jače od interakcija između pojedinih dimera.[32]

Svi monomeri imaju isti aminokiselinski slijed i svaki je građen od 238 aminokiselina. Značajne sekundarne strukture uključuju 8 α-zavojnica i središnju β-ploču miješanog paralelnog i antiparalelnog karaktera sačinjenu od 8 lanaca, koja zajedno s devetim lancem stvara β-bačvu (slika 2.4). Svako aktivno mjesto PNP sadrži tri vezna mjesta: za fosfat, ribozu i purinsku bazu. [16]



Slika 2.4. Struktura purinske nukleozidne fosforilaze iz bakterije *E.coli*. Slika preuzeta s literaturnog izvora [33]

Vezno mjesto za fosfat najudaljenije je od površine proteina i pozitivno je nabijeno. Vezanje fosfata se ostvaruje preko elektrostatskih interakcija i/ili vodikovih veza u kojima sudjeluju atomi N iz Gly20 i Ser90, Nη iz Arg24, Arg87 i Arg43 (koji pripada susjednom monomeru) te Oγ iz Ser90. Fosfat također ostvaruje interakcije s 2'-OH i 3'-OH skupinama, te 4'-kisikom riboze. [34]

Vezno mjesto za ribozu nalazi se između veznih mjesta za fosfat i purinsku bazu. Osim navedenih interakcija s fosfatom, riboza preko 2'-OH skupine stupa u kontakt s Nη iz Arg87, N iz Met180 i Oε iz Glu181; preko 3'-OH skupine i 4'-kisika također sa Oε iz Glu181 i Oγ iz Ser90. 5'-OH skupina riboze ostvaruje interakcije s His4 iz susjednog monomera. Također su aminokiseline Val178, Glu179, Met180 i Phe159 uključene u ostvarivanje hidrofobnih interakcija s ribozom. Vezno mjesto za purinsku bazu nalazi se na površini proteina. Baza s proteinom ostvaruje prvenstveno nespecifične π-π i hidrofobne interakcije u koje su uključene aminokiseline Phe159, Tyr160, Val178, Met 180 i Leu206. Mogućnost ostvarivanja pojedinih vodikovih veza znatno ovisi o funkcionalnim skupinama prisutnim na vezanoj purinskoj bazi, međutim vodikove veze nisu toliko značajne za vezanje purina kao u slučaju vezanja fosfata ili riboze. [16, 35, 36]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Akrilamid (*Sigma*), amonijev persulfat, APS (*Serva*), dinatrijev hidrogen fosfat (*Sigma*), ditiotreitol, DTT (*Sigma*), etilendiaminotetraoctena kiselina, EDTA (*Sigma*), fenilmetilsulfonil fluorid, PMSF (*Sigma*), fosforna kiselina (*Kemika*), glicerol (*Kemika*), N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina, HEPES (*Sigma*), izopropil-β-tiogalaktopiranozid, IPTG (*Sigma*), litijev sulfat (*Sigma*), magnezijev klorid (*Sigma*), N,N'-metilenbisakrilamid (*Merck*), metanol (*Kemika*), natrijev acetat (*Kemika*), natrijev citrat (*Sigma*), natrijev dodecilsulfat, SDS (*Merck*), natrijev dihidrogen fosfat (*Sigma*), natrijev klorid (*Kemika*), octena kiselina (*Kemika*), polietilen glikol 400, PEG 400 (*Sigma*), polietilen glikol 8000, PEG 8000 (*Sigma*), polietilen glikol 1000, PEG 1000 (*Sigma*), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin, TEMED (*Serva*), Tris(hidroksimetil)aminometan, Tris (*Sigma)*

3.1.2. Boje

Coomassie Brilliant Blue R-250 *(Merck)*, Coomassie Brilliant Blue G-250 *(Merck)*, bromfenolsko plavilo *(Serva)*

3.1.3. Enzimi i enzimski supstrati

Albumin goveđeg seruma (*Serva*), inozin (*Sigma*), ksantin oksidaza (*Sigma*), lizozim (*Sigma*), 7-metilgvanozin (sintetiziran na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu), purinska nukleozidna fosforilaza iz kliničkog izolata bakterije *Helicobacter pylori* (pripremljena na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu).

3.1.4. Sastojci tekućih i krutih mikrobioloških hranjivih medija

Agar (*Becton, Dickinson and Company*), ampicilin (*Sigma*), LB medij (*Carl Roth GmbH*)

3.1.5. Punila za kromatografske kolone

Sefakril S-200 (*GE Healthcare*), Q-Sefaroza (*GE Healthcare*), sefaroza s formicinom A (pripremljena na Institutu u Varšavi, Poljska, pod vodstvom prof. dr. A. Bzowske).[31]

3.1.6. Bakterijski sojevi za prekomjernu ekspresiju

Escherichia coli BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (*Agilent Technologies*)

3.1.7. Plazmid

Gen *deoD* za purinsku nukleozidnu fosforilazu je izoliran iz genomske DNA *Helicobacter pylori* (soj 26695) i ugrađen u ekspresijski plazmid pET21b. Rezultirajući rekombinantni plazmid, pET21b-HP26695*deoD*, pripremljen je na Institutu Ruđer Bošković, u Zagrebu.

3.2. Priprema tekućih i krutih hranjivih medija

Bogata LB (Luria-Bertani) hranjiva podloga je otopljena u destiliranoj vodi do konačne koncentracije 5 g dm^{-3} ekstrakta kvasca, 10 g dm^{-3} triptona i 10 g dm^{-3} NaCl. Krute hranjive podloge su pripremljene dodavanjem agara (γ = 18 g dm^{-3}) tekućoj hranjivoj podlozi. Hranjive podloge su sterilizirane autoklaviranjem 20 min pri 121 ˚C. Kada se hranjive podloge ohlade (ispod 60 ˚C), dodaje se ampicilin početne koncentracije 100 mg cm^{-3}, kojemu konačna radna koncentracija u mediju iznosi 100 μg cm^{-3}. Krute hranjive podloge se izlijevaju u Petrijeve zdjelice do pola svog volumena, pazeći da se ne stvore mjehurići, te se ostave na sobnoj temperaturi da se skrutnu.

3.3. Transformacija bakterijskih stanica *Escherichie coli* rekombinantnim plazmidom

Elektroporacija je metoda koja se koristi za transformaciju bakterijskih stanica stranom, rekombinantnom DNA, pri čemu su bakterije izložene visokom naponu u trajanju od nekoliko milisekundi. Time dolazi do povećanja permeabilnosti i provodljivosti plazmatske membrane, zbog čega nastaju pore u membrani kroz koje može proći rekombinantna DNA.

Elektrokompetentni bakterijski soj *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL je transformiran rekombinantnim plazmidom pET21b-HP26695*deoD*.

U 50 μl bakterijskih stanica je dodano 2 μl (približno 100 ng) plazmida te je dobivena suspenzija prenesena u prethodno ohlađenu kivetu za elektroporaciju, pri čemu je kiveta tijekom cijelog postupka na ledu. Elektroporacija je izvedena u uređaju *Bio-Rad Gene Pulser Xcell*, pri naponu od 2,5 kV za kivete širine 2 mm. Vremenska konstanta, koja ukazuje na uspješnost elektroporacije, iznosi 5,0 ms. Otpor iznosi 200 Ω, a kapacitet kondenzatora iznosi 25 μF.

Po završetku elektroporacije dolazi do postepenog zatvaranja pora nakon čega bakterije nastavljaju s rastom. Stanice su resuspendirane u 1 ml LB medija (bez ampicilina) i premještene u Eppendorf epruvetu od 1,5 ml. Dobivena suspenzija je inkubirana pri 37 ˚C tijekom 1 h uz potresanje od 350 rpm. Inkubacija je provedena na uređaju *Eppendorf Thermomixer Comfort*. Bakterijska suspenzija je nanešena i razmazana ezom na Petrijeve zdjelice s krutom hranjivom LB podlogom i ampicilinom (γ = 100 μg cm^{-3}) i inkubirana 16 sati pri 37 ˚C.

3.4. Optimizacija uvjeta prekomjerne ekspresije

Prije proizvodnje veće količine purinske nukleozidne fosforilaze, ispitano je nekoliko različitih uvjeta prekomjerne ekspresije. Bakterijske kolonije dobivene transformacijom resuspendirane su u 50 ml LB medija s ampicilinom (γ = 100 μg cm^{-3}) i inkubirane tijekom 16 sati pri 37 ˚C uz potresanje pri 250 rpm. Uzeto je 10 ml prekonoćne kulture, dodano u 500 ml LB medija s ampicilinom (γ = 100 μg cm^{-3}) te inkubirano pri 37 ˚C i uz potresanje pri 250 rpm do vrijednosti optičke gustoće stanica od 0,5 pri 600 nm (OD_{600}).

Optička gustoća je mjerena na uređaju *Camspec M501*. Duljina optičkog puta iznosi 1 cm, a kao slijepa proba je korišten LB medij. Dobivena kultura je podijeljena u alikvote od 50 ml. U svaki alikvot dodan je IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid) za indukciju ekspresije, te je svaki alikvot podvrgnut različitim ekspresijskim uvjetima kako je prikazano u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Optimiziranje ekspresijskih uvjeta.

Alikvot	Temperatura / ˚C	Aeracija (rpm)	*c* (IPTG) / mmol dm^{-3}	Vrijeme / h
1	37	250	0,5	4
2	37	250	1,0	4
3	37	250	0,25	4
4	37	250	0,5	16
5	37	130	0,5	4
6	37	130	0,5	16
7	18	130	0,5	16
8	18	130	1,0	16
9	18	130	0,25	16

Po završetku probne ekspresije, stanice su centrifugirane pri 5000×g, tijekom 20 minuta i pohranjene pri -20 ˚C. Stanice su zatim razbijene kako je opisano u poglavlju 3.7.1, te su analizirane na SDS-PAGE (poglavlje 3.8.2) i izmjerena im je koncentracija proteina i specifična aktivnost prema supstratu m^{7}Guo (poglavlje 3.11).

3.5. Prekomjerna ekspresija purinske nukleozidne fosforilaze

Bakterijske kolonije dobivene transformacijom su resuspendirane u 50 ml LB medija s ampicilinom (γ = 100 μg cm^{-3}) i inkubirane tijekom 16 sati pri 37 ˚C uz potresanje pri 220 rpm. Uzeto je po 10 ml dobivene kulture te podijeljeno u tikvice koje sadrže po 500 ml LB medija s ampicilinom (γ = 100 μg cm^{-3}).

Kulture su inkubirane pri 37 ˚C i uz potresanje pri 250 rpm do optičke gustoće stanica (OD_{600}) od 0,6. Pohranjeno je 1 ml kulture prije indukcije ekspresije za daljnja ispitivanja. Potom su stanice inducirane dodatkom 0,5 mmol dm^{-3} IPTG-a, a stanične kulture su inkubirane pri 37 ˚C uz potresanje pri 130 rpm tijekom 16 h.

Po završetku prekomjerne ekspresije, pohranjeno je 1 ml kulture za daljnja ispitivanja. Stanice su centrifugirane pri 5000×g, tijekom 20 min i pohranjene pri -20 ˚C.

3.6. Priprema pufera za pročišćavanje proteina

Eksprimirani protein se iz proteinskog ekstrakta dobivenog razbijanjem stanica pročišćava anionskom izmjenjivačkom i afinitetnom kromatografijom. U tu svrhu su pripremljeni puferi sljedećih sastava:

PUFER A (*pH* = 7,6):

c (Tris) = 100 mmol dm^{-3}

c (EDTA) = 2 mmol dm^{-3}

φ (glicerol) = 10 %

PUFER B (*pH* = 7,6):

c (Tris) = 100 mmol dm^{-3}

c (EDTA) = 2 mmol dm^{-3}

φ (glicerol) = 10 %

c (NaCl) = 0,5 mol dm^{-3}

PUFER C (*pH* = 7,6):

c (Tris) = 100 mmol dm^{-3}

c (EDTA) = 2 mmol dm^{-3}

φ (glicerol) = 10 %

c (NaCl) = 1 mol dm^{-3}

PUFER A1 (*pH* = 7,6):

c (Tris) = 50 mmol dm^{-3}

PUFER B1 (*pH* = 8,0):

c (Tris) = 100 mmol dm^{-3}

c (NaCl) = 0,5 mol dm^{-3}

PUFER C1 (*pH* = 7,6):

c (Na-PO_4) = 50 mmol dm^{-3}

c (Inozin) = 4 mmol dm^{-3}

PUFER D1 (*pH* = 4,6):

c (CH_3COONa) = 100 mmol dm^{-3}

c (NaCl) = 0,5 mol dm^{-3}

Puferi su prije korištenja profiltrirani kroz filter papir s porama veličine 0,45 μm i deaerirani.

3.7. Pročišćavanje proteina iz stanične kulture

3.7.1. Ekstrakcija proteina iz stanica

Ultrazvučnim valovima se razaraju stanične membrane pri čemu se mehanička energija prenosi probom. Razbijanje stanica je obavljeno na uređaju LabsonicM (Sartorius) uz sondu promjera 2 mm.

Talog stanica dobiven u prethodnom koraku je resuspendiran u 45 ml pufera za lizu (*pH* = 7,6) sljedećeg sastava:

c (Tris) = 100 mmol dm^{-3}

c (EDTA) = 2 mmol dm^{-3}

φ (glicerol) = 10 %

c (NaCl) = 0,5 mol dm^{-3}

γ (lizozim) = 1 mg cm^{-3}

γ (fenilmetilsulfonil fluorid, PMSF) = 0,02 mg cm^{-3}

Dobivena suspenzija je lagano promiješana i ostavljena 30 min na ledu. Potom je sonicirana 10 puta po 30 s uz stanke od 30 s. Suspenzija je centrifugirana 20 min pri 50 000×g i +4 ˚C (*Avanti J-E* centrifuga, *Beckman Coulter*). Supernatant je prebačen u novu epruvetu, a 50 µl je ostavljeno za daljnja ispitivanja. Talog većih dijelova stanice je resuspendiran u puferu A i pohranjen pri temperaturi 4˚C.

3.7.2. Anionska izmjenjivačka kromatografija

Anionska izmjenjivačka kromatografija se temelji na razdvajanju i pročišćavanju proteina na temelju njihovog naboja. Na kruti polimerni nosač kovalentno su vezane pozitivno nabijene skupine koje su u interakciji s ionima suprotnog naboja. Prolaskom uzorka kroz kolonu, negativno nabijene molekule uzorka istiskuju one vezane na nosač i vežu se za pozitivno nabijene ione nosača. Povećanjem ionske jakosti ili smanjenjem *pH* vrijednosti elucijskog pufera negativni ioni pufera istiskuju vezane proteine.

Supernatant iz prethodnog koraka je pomiješan s jednakim volumenom (42,5 ml) pufera A. Kolona, Q-sefaroza (engl. Q-Sepharose Fast Flow) dimenzija 16 × 25,5 cm (~51 ml), je ekvilibrirana s 5 volumena kolone (VK) pufera A (~250 ml) nakon čega je nanesen pripremljeni uzorak. Nakon ulaska uzorka, na kolonu je naneseno 3 VK pufera A (~150 ml)

za ispiranje nevezanih proteina, 3 VK pufera B (~150 ml) za eluaciju, te 3 VK pufera C (~150 ml) za eluaciju čvrsto vezanih proteina. Frakcije su skupljane u alikvotima po 5 ml pri 4 ˚C uz protok od 62 ml/h. Kolona je po završetku isprana s 3 VK (~150 ml) pufera A.

3.7.3. Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija se temelji na visokom afinitetu ciljne molekule prema specifičnom ligandu koji je imobiliziran na čvrstom punilu. Prolaskom uzorka kroz kolonu protein od interesa ostvaruje specifičnu interakciju s vezanim ligandom, dok se ostale molekule mobilne faze ispiru s kolone. Reakcijom ciljnog proteina s drugim kompetitirajućim ligandom, protein se ispire s kolone.

Kolona sefaroza-formicin A ima kovalentno vezan inhibitor purinskih nukleozidnih fosforilaza, formicin A. Time je omogućeno specifično vezanje purinske nukleozidne fosforilaze. Ciljni protein ima veći afinitet prema inozinu nego formicinu A zbog čega je moguće eluiranje proteina s kromatografske kolone inozinom.

Dimenzije kolone su 1,6×14 cm (~28 ml). Ekvilibrirana je s 5 VK (~140 ml) pufera A1 nakon čega je uzorak nanesen na kolonu. Potom je kolona isprana s 2 VK (60 ml) pufera A1 i 2 VK (60 ml) pufera B1. Ciljni protein je eluiran s kolone puferom C1 (2 VK). Kolona je isprana s 10 VK (280 ml) pufera B1 i regenerirana sa 7 volumena (200 ml) pufera D1. Kolona je po završetku isprana s 3 VK (~90 ml) pufera A1. Frakcije su skupljane u alikvotima po 2,3 ml pri 4 ˚C uz protok od 30 ml/h.

3.8. Elektroforetsko razdvajanje proteina

Elektroforeza je metoda razdvajanja i analize makromolekula i njihovih fragmenata ovisno o njihovoj masi i naboju. Razdvajanje proteina se može izvoditi u nativnim i denaturirajućim uvjetima kod kojih se za denaturaciju proteina koristi natrijev dodecilsulfat (SDS) pri čemu se narušava struktura proučavanih proteina. Proteini u prisustvu SDS-a postaju negativno nabijeni, te se elektroforezom u poliakrilamidnom gelu pod utjecajem električnog polja razdvajaju samo prema veličini.

3.8.1. Priprema gelova i uzoraka za elektroforezu

Poliakrilamidni gelovi se izlijevaju u priređeni stalak prema uputama proizvođača za Hoefer MightySmall SE250. Pripremljeni gel za razdvajanje se po dodatku TEMED-a brzo izlijeva u kalup te se pipetom dodaje sloj redestilirane vode. Nakon što gel polimerizira, što traje oko sat vremena, voda se odlijeva i dodaje se gel za sabijanje u koji se odmah umetne češljić za izradu jažica za nanošenje uzoraka. Sastav otopina za pripremanje 10 ml gela za razdvajanje (12,5%) i 2 ml gela za sabijanje (4%) je prikazan u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Sastav smjesa poliakrilamidnog gela.

	Gel za razdvajanje (12,5%) *V* (komponenta)	Gel za sabijanje (4%) *V* (komponenta)
akrilamid/bisakrilamid (T = 29 %, C = 1 %)	4,167 ml	0,268 ml
c (Tris) = 1,5 mol dm^{-3}, *pH*=8,8	2,5 ml	/
c (Tris) = 0,5 mol dm^{-3}, *pH*=6,8	/	0,5 ml
w (SDS) = 10 %	0,1 ml	0,02 ml
Deionizirana voda	3,2 ml	1,2 ml
w (amonijev persulfat, APS) = 10 %	50 μl	10 μl
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED)	3,3 μl	1,0 μl

Uzorcima za SDS-PAGE dodan je koncentrirani (2x) pufer za nanošenje na gel u omjeru 1:1. Pufer sadrži 4% SDS, 20% glicerol, 0,02% bromfenolsko plavilo, 0,2 mol dm^{-3} ditiotreitol (DTT), 0,125 mol dm^{-3} Tris uz *pH* = 6,8. Dobivene otopine su zagrijane na termobloku 7 min pri 97 ˚C.

3.8.2. Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu je provođena na uređaju Hoefer MightySmall SE250 45-50 minuta uz konstantnu jačinu struje od 25 mA tijekom cijele elektroforeze.

Denaturirajuća elektroforeza je provedena i na uređaju *PhastSystem, GE Healthcare*, prema uputama proizvođača. Korišteni proteinski marker je PageRuler (*ThermoFisher Scientific*) ili LMW-SDS Marker Kit (*GE Healthcare*). Za usporedbu je uz proteinski marker korišten i pročišćeni uzorak purinske nukleozidne fosforilaze iz kliničkog izolata bakterije *Helicobacter pylori* (HP PNP-Zg) pripremljen na Institutu Ruđer Bošković.

Po završetku elektroforeze proteini su vizualizirani bojenjem otopinom *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) koja sadrži 0,1 % CBB R-250, 30 % metanola i 10 % octene kiseline. Gel je stavljen u plastičnu posudu i preliven otopinom za bojenje (oko 5 volumena gela). Nakon 15 minuta bojanja uz lagano miješanje na 50 ˚C, otopina za bojenje je uklonjena te je gel ispran kipućom destiliranom vodom kako bi se uklonio višak boje. Gel je odbojavan oko 30 minuta na tresilici u kipućoj vodi, uz nekoliko izmjena vode.

3.8.3. Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje je metoda razdvajanja različitih molekula prema njihovim izoelektričnim točkama (*pI*). Elektroforeza je provedena na poliakrilamidnom gelu *PhastGel IEF – 3-9* uz linearni pH gradijent, na uređaju *PhastSystem, GE Healthcare* prema uputama proizvođača uz markere Broad *pI* Kit, *pH* 3–10 (*GE Healthcare*). Za ovu metodu analize nije potrebna prethodna obrada uzorka.

3.9. Odsoljavanje i koncentriranje proteina

Purinska nukleozidna fosforilaza dobivena afinitetnom kromatografijom se nalazi u eluacijskom puferu C1. Reakcijom fosfata i inozina iz elaucijskog pufera kataliziranom PNPazom nastaje hipoksantin i α-D-riboza-1-fosfat. Produkte enzimski katalizirane reakcije iz pufera je potrebno ukloniti kako ne bi utjecali na ispitivanja enzimske aktivnosti, kristalizacijske eksperimente i dr. Stoga je ciljni protein preveden u pufer 50 mmol dm^{-3} Tris, *pH* = 7,6.

Uzorak PNPaze je koncentriran ultrafiltracijom uz kolonu *Vivaspin 2, Sartorius* (MCWO = 10 kDa). Uzorak proteina je nanešen na membranu kolone i centrifugiran 10 minuta pri 6500×g i 4 ˚C. Postupak je ponovljen 3 puta do volumena 220 µl. Potom je uzorak stavljen u Tube-O-Dialyzer (*G-Biosciences*) i dijaliziran prema 100 ml pufera 50 mmol dm^{-3} Tris (pH=7,6) uz 3 izmjene pufera u trajanju od 1 sata, 2,5 sata i 17 sati. Konačni volumen uzorka iznosi 470 µl.

3.10. Gel-filtracija

Gel-filtracija je nedestruktivna vrsta razdjelne kromatografije pri kojoj se odjeljivanje molekula temelji na njihovim različitim molekulskim masama. Molekule veće od pora punila kromatografske kolone brže silaze jer prolaze između čestica, dok se male molekule zadržavaju u porama. Dakle, što je molekula manja to je sporije gibanje niz kolonu. Osim za odvajanje molekula na temelju različite molekulske mase, gel-filtracija se koristi i za određivanje iste. Pri tome se konstruira baždarni pravac za molekule poznate molekulske mase propuštene kroz kromatografsku kolonu.

Za određivanje molekulske mase je korišteno punilo Sefakril S-200 koje je pogodno za odjeljivanje molekula relativnih molekulskih masa od $5 \cdot 10^3$ do $2{,}5 \cdot 10^5$. Kolona dimenzija 1,6 × 94,5 cm (V ~190 ml) je ekvilibrirana s 570 ml pufera (pH = 7,4) sljedećeg sastava:

c (Tris) = 10 mmol dm^{-3}

c (NaCl) = 0,2 mol dm^{-3}

Na gel-filtracijsku kolonu je nanešeno 2,5 ml odsoljenog i ukoncentriranog uzorka purinske nukleozidne fosforilaze (γ = 1,68 mg cm^{-3}). Potom se kroz kolonu propuštao pufer prethodno navedenog sastava. Skupljano je 100 frakcija po 2,3 ml uz protok od 7,6 ml/h.

Kromatografska kolona je prethodno kalibrirana proteinskim markerima koji uključuju kimotripsinogen A (25 kDa), albumin goveđeg seruma (67 kDa), kvaščevu alkoholnu dehidrogenazu (150 kDa), katalazu (232 kDa) i plavi dekstran (2000 kDa). Eluacijski volumen proteinskih markera je određen mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 280 nm.

3.11. Određivanje koncentracije proteina

Frakcijama skupljanim tijekom pročišćavanja određivana je koncentracija ukupnih proteina mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 280 nm. Ispitivanja su rađena na uređaju *Camspec M-501*.

3.11.1. Bradfordova metoda

Pripremljenim uzorcima proteina nakon svakog koraka pročišćavanja, odsoljavanja i koncentriranja određivana je koncentracija metodom po Bradfordu. [38] Metoda po Bradfordu je spektroskopska kolorimetrijska metoda kojom se mjeri ukupna koncentracija proteina u otopini. U kiseloj otopini boja *Coomassie brilliant blue G-250* se veže na proteine što dovodi do pomaka maksimuma apsorbancije. Za određivanje koncentracije proteina prethodno je potrebno izraditi baždarni dijagram. U tu svrhu se koristi otopina albumina goveđeg seruma (engl. bovine serum albumin, BSA) koncentracije γ =1 mg cm^{-3}. Bradfordov reagens se sastoji od γ = 100 mg dm^{-3} *Coomassie brilliant blue G-250*, 5 % etanola i 8,5 % fosforne kiseline. Uzorku proteina je dodana deionizirana voda do volumena od 100 µl i 1 ml Bradfordovog reagensa. Otopine različitih koncentracija BSA za baždarni dijagram su pripremljene na isti način kao i uzorci. Ugušćeni uzorci proteina prethodno su dodatno razrijeđeni kako bi apsorbancija bila unutar linearnog područja baždarnog dijagrama. [38] Za slijepu probu je pomiješano 100 µl deionizirane vode i 1 ml Bradfordovog reagensa. Dobivene otopine su inkubirane 45 min pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija uzoraka je mjerena pri valnoj duljini od 595 nm na uređaju *Camspec M-501*.

3.12. Enzimska aktivnost purinske nukleozidne fosforilaze

Enzimska aktivnost purinske nukleozidne fosforilaze je ispitivana spektrofotometrijski na uređaju *Camspec M-501*. Specifična enzimska aktivnost je izražena kao broj enzimskih jedinica koje kataliziraju reakciju 1 µmol supstrata u 1 minuti po miligramu proteina, u danim uvjetima. Reakcijska smjesa (*pH*=7,0) za praćenje enzimske aktivnosti je, uz primarni supstrat, sadržavala 50 mmol dm^{-3} HEPES i 50 mmol dm^{-3} fosfatnog pufera koji služi kao izvor fosfata, sekundardnog supstrata. Kao primarni supstrati korišteni su 7-metilgvanozin (m^{7}Guo) i inozin (Ino).

Enzimska aktivnost uz m^7Guo je praćena spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 260 nm, te uz Ino pro valnoj duljini od 300 nm uz dodatak ksantin-oksidaze (u svaku reakcijsku smjesu je dodavano po 1 µl ksantin oksidaze (1 U mg^{-1}) koncentracije 5 mg cm^{-3}). Reakcijom purinske nukleozidne fosforilaze i inozina nastaje hipoksantin, koji pak uz ksantin-oksidazu prelazi u ksantin čija se apsorbancija prati pri 300 nm. Sva mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi (25 ˚C). Dodatkom uzorka PNPaze u reakcijsku smjesu započinje reakcija i dolazi do promjene apsorbancije što se prati tijekom 3 minute. Sva ispitivanja su rađena u triplikatima. Ekstinkcijski koeficijenti su prikazani u tablici 3.3.

Tablica 3.3. Koncentracije nukleozida korištenih u ispitivanju enzimske aktivnosti i njihova spektralna svojstva

Nukleozid	c / mmol dm^{-3}	λ_{max} / nm	ε_{max} / mol^{-1} dm^3 cm^{-1}	λ_{obs} / nm	$\Delta\varepsilon$ / mol^{-1} dm^3 cm^{-1}
Inozin	0,1	249	12300	300	+9600
m^7Guo	0,1	258	8500	260	-4600

3.12.1. Određivanje kinetičkih parametara

Enzimska reakcija purinske nukleozidne fosforilaze uz nukleozid uključuje i fosfat. Pri kinetičkim ispitivanjima mijenjana je koncentracija nukleozidnog supstrata, dok je koncentracija fosfata bila konstantna pri 50 mmol dm^{-3}. Kinetičke konstante, K_M i V_{max} su određene nelinearnom regresijom Michaelis-Menten jednadžbe u programu GraphPad Prism 7:

$$v_0(c_0) = \frac{v_{\max} c_0}{c_0 + K_m}$$

3.12.2. Utjecaj temperature i pH na stabilnost i aktivnost purinske nukleozidne fosforilaze

Utjecaj temperature i pH na stabilnost i aktivnost purinske nukleozidne fosforilaze je ispitan spektrofotometrijski uz inozin kao supstrat, pri čemu je u reakcijsku smjesu dodana ksantin-oksidaza. Mjerenja su obavljena na UV-VIS spektrofotometru *Cary 50*.

Standardna reakcijska smjesa (1 ml) sadrži 50 mmol dm^{-3} HEPES (pH = 7,0), 50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer (pH = 7,0), 0,5 mmol dm^{-3} inozin i ksantin oksidazu (1 µl ksantin

oksidaze (1 U mg^{-1}) koncentracije 5 mg cm^{-3}). Koncentracija purinske nukleozidne fosforilaze u reakcijskoj smjesi iznosi 0,13 μg cm^{-3}. Reakcija započinje dodavanjem PNPaze. Za ispitivanje temperaturnog utjecaja na aktivnost PNPaze u već navedenoj reakcijskoj smjesi, enzimska aktivnost je mjerena u temperaturnom rasponu od 20 do 80 ˚C. Temperaturna stabilnost je ispitana dodavanjem 10 μl purinske nukleoidne fosforilaze (γ = 0,13 mg cm^{-3}) u 90 μl HEPES (*pH* = 7,0) koncentracije 50 mmol dm^{-3} . Smjesa je inkubirana 1 sat pri različitim temperaturama u rasponu od 20 do 80 ˚C. Dodano je 2 μl inkubacijske smjese u 1 ml standardne reakcijske smjese te je rezidualna aktivnost praćena pri 25 ˚C.

Reakcijska smjesa (1 ml) za testiranje utjecaja pH na aktivnost purinske nukleozidne fosforilaze uz 1 μl ksantin-oksidaze sadrži i 0,5 mmol dm^{-3} inozin te 0,13 μg cm^{-3} PNPazu u Britton-Robinsonovom univerzalnom puferu (BR pufer) [39] u rasponu *pH* vrijednosti od 2 do 12 pri 25 ˚C. Utjecaj pH na stabilnost je ispitan dodavanjem 10 μl purinske nukleozidne fosforilaze (γ = 0,13 mg cm^{-3}) u 90 μl BR pufera i inkubiranjem smjese pri *pH* vrijednostima u rasponu od 2 do 12 pri 25 ˚C. Rezidualna aktivnost je mjerena nakon 2 sata inkubacije dodavanjem 2 μl inkubacijske smjese u 1 ml standardne reakcijske smjese. Sva ispitivanja su rađena u triplikatima.

3.13. Kristalizacija purinske nukleozidne fosforilaze

Ukoncentrirani i odsoljeni uzorak purinske nukleozidne fosforilaze je upotrebljen za dobivanje kristala metodom difuzije para u visećoj kapi pri različitim uvjetima. [40] Za kristalizacijske eksperimente je korištena LINBRO ploča s 24 spremnika, a u svaki spremnik je dodano 700 μl pripremljenih kristalizacijskih otopina. Viseće kapljice su pripravljene miješanjem 1 μl otopine proteina i 1 μl kristalizacijske otopine na stakalcu koje je potom okrenuto i položeno na spremnik (rubovi su premazani silikonskom masti kako bi se dobio zatvoreni sustav).

Uzorak za kristalizaciju je otopina proteina koncentracije 11,0 mg cm^{-3}, ukoncentrirana i odsoljena u 50 mmol dm^{-3} Tris, *pH*=7,6. Svi kristalizacijski eksperimenti su izvođeni pri 18 ˚C.

24 kristalizacijske otopine su podijeljene u 4 skupine koje imaju različiti sastav. Unutar skupine se mijenja koncentracija tj. volumen pojedinog sastojka. Navedene količine za dobivanje 5 ml pojedine kristalizacijske otopine su prikazane u tablici 3.4.

Tablica 3.4 Sastav kristalizacijskih otopina

Broj skupine	Komponente i početne koncentracije	V_1 / μl	V_2 / μl	V_3 / μl	V_4 / μl	V_5 / μl	V_6 / μl
1	c (Li_2SO_4) = 2 mol dm^{-3}	500	500	500	500	500	500
	c (CH_3COONa, pH=4,5) = 1 mol dm^{-3}	500	500	500	500	500	500
	φ (PEG 400) = 41 %	2050	2200	2350	2500	2650	2800
	H_2O	1950	1800	1650	1500	1350	1200
2	c ($MgCl_2$) = 2 mol dm^{-3}	500	500	500	500	500	500
	c (Tris, pH = 7,0) = 1 mol dm^{-3}	500	500	500	500	500	500
	w (PEG 8000) = 40 %	750	1000	1250	1500	1750	2000
	H_2O	3250	3000	2750	2500	2250	2000
3	c (Tris, pH = 8,0) = 1 mol dm^{-3}	500	500	500	500	500	500
	φ (2-metilpentan-2,4-diol) = 31 %	1550	1700	1850	2000	2150	2300
	H_2O	2950	2800	2650	2500	2350	2200
4	c (Li_2SO_4) = 2 mol dm^{-3}	500	500	500	500	500	500
	c (Na_2HPO_4 + $C_3H_5O(COONa)_3$, pH = 4,2) = 1 mol dm^{-3}	500	500	500	500	500	500
	w (PEG 1000) = 40 %	1750	2125	2500	2875	3250	3625
	H_2O	2250	1875	1500	1125	750	375

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Usporedba proteinskih sekvenci

Uspoređivane su dvije sekvence, purinska nukleozidna fosforilaza iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori* (jedinstvena identifikacijska oznaka: P56463) i PNPaza iz kliničkog izolata *H. pylori* pacijenta Kliničkog bolničkog centra Zagreb (jedinstvena identifikacijska oznaka: AIM49265.2).

Poravnane su proteinske sekvence uz proteinski BLAST pri NCBI-ju (National Center for Biotechnology Information).'*Query*' sekvenca je sekvenca iz soja 26695, a '*subject*' je sekvenca iz kliničkog izolata. Sekvenca između spomenute dvije je rezultantna sekvenca dobivena poravnanjem, gdje su unešene praznine (engl. *gaps*) itd. Proteinske sekvence bi se mogle još usporediti i programom Clustal, ali u ovom slučaju to nije potrebno jer se uspoređuju samo 2 relativno kratke sekvence.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
479 bits(1234)	1e-179	Compositional matrix adjust.	229/233(98%)	233/233(100%)	0/233(0%)

```
Query  1    MTPHINAKIGDFYPQCLLCGDPLRVSYIAKKFLQDAKEITNVRNMLGFSGKYKGRGISLM  60
            MTPHINAKIGDFYPQCLLCGDPLRVSYIAKKFLQDAKEITNVRNMLGFSGKYKG+GISLM
Sbjct  1    MTPHINAKIGDFYPQCLLCGDPLRVSYIAKKFLQDAKEITNVRNMLGFSGKYKGKGISLM  60

Query  61   GHGMGIASCTIYVTELIKTYQVKELLRIGTCGAISPKVGLKDIIMATGASTDSKTNRVRF  120
            GHGMGIASCTIYVTELIKTYQVKELLRIGTCGAISPKVGLKDIIMATGASTDSKTNRVRF
Sbjct  61   GHGMGIASCTIYVTELIKTYQVKELLRIGTCGAISPKVGLKDIIMATGASTDSKTNRVRF  120

Query  121  LNHDLSATPDFELSLRAYQTAKRLGIDLKVGNVFSSDFFYSFETHAFDLMAKYNHLAIEM  180
            LNHDLSATPDFELSLRAYQTAKRLGIDLK+GNVFSSDFFYSFETHAFDLMA+YNHLAIEM
Sbjct  121  LNHDLSATPDFELSLRAYQTAKRLGIDLKIGNVFSSDFFYSFETHAFDLMAQYNHLAIEM  180

Query  181  EAAGLYATAMELNAKALCLCSVSDHLITKEALSPKERVESFDNMIILALEMMS  233
            EAAGLYATAMELNAKALCLCSVSDHLITKEALSPKER+ESFDNMIILALEMMS
Sbjct  181  EAAGLYATAMELNAKALCLCSVSDHLITKEALSPKERIESFDNMIILALEMMS  233
```

Slika 4.1. Poravnanje sekvenci purinske nukleozidne fosforilaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori* i PNPaze iz kliničkog izolata bakterije *Helicobacter pylori* uz proteinski BLAST pri NCBI-ju. Crveno su označene razlike u primarnom aminokiselinskom slijedu.

Iz slike 4.1. je vidljivo da se spomenute dvije sekvence u primarnom slijedu razlikuju tek u 4 aminokiseline što objašnjava slična svojstva ovih proteina. PNPaza iz bakterije *E. coli* je po svojstvima slična PNPazi iz bakterije *H. pylori*, s kojom dijeli i značajnu sličnost u

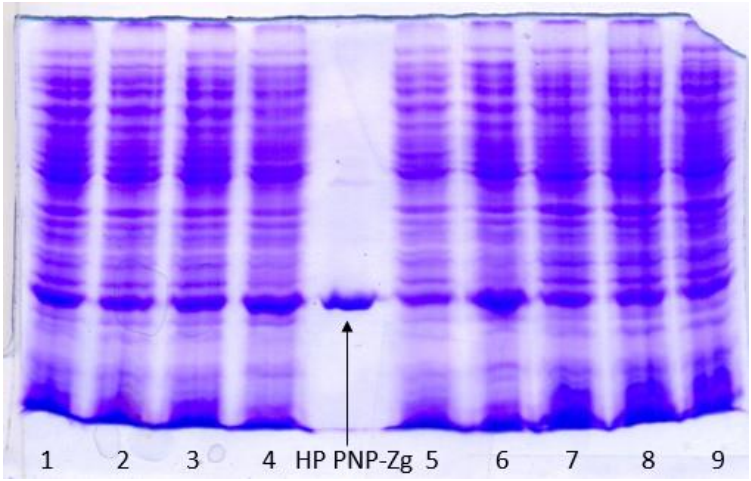
aminokiselinskom slijedu (50 % identičnosti, 70 % sličnosti u slijedovima), te su očuvana vezna mjesta za supstrate i katalitičke aminokiseline.

4.2. Određivanje teorijske izoelektrične točke

Na stranici http://web.expasy.org/compute_pi/ unesen je identifikacijski broj purinske nukleozidne fosforilaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori*, P56463. Teorijska izoelektrična točka je određena komputacijskim metodama na temelju primarne sekvence proteina i iznosi 8,15. Ova vrijednost je za pola pH jedinice viša od teorijske izoelektrične točke PNPaze kliničkog izolata bakterije *Helicobacter pylori*, koja iznosi 7,61. Ipak, obje vrijednosti su u bazičnom pH području za razliku od PNPaze iz bakterije *E. coli* koja ima teorijsku izoelektričnu točku pri pH 5,40.

4.3. Ekspresija i pročišćavanje purinske nukleozidne fosforilaze

Ekspresija purinske nukleozidne fosforilaze je opisana u eksperimentalnom dijelu. No, prije proizvodnje veće količine proteina optimizirani su uvjeti ekspresije. Nakon transformacije stanica bakterije *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL plazmidom pET21b-HP26695*deoD* i inkubacije bakterijske kulture do odgovarajuće optičke gustoće, ispitivani su različiti uvjeti ekspresije mijenjanjem temperature, aeracije, koncentracije IPTG-a i trajanja. Uspješnost probne ekspresije je ispitana SDS-PAGE elektroforezom. Za kontrolu je korištena pročišćena purinska nukleozidna fosforilaza iz kliničkog izolata bakterije *Helicobacter pylori* (HP PNP-Zg).



Slika 4.2. Optimiziranje uvjeta prekomjerne ekspresije purinske nukleozidne fosforilaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori* eksprimirane u *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Jažice 1-9 odgovaraju ispitivanim ekspresijskim uvjetima 1-9 opisanima u eksperimentalnom dijelu. HP PNP-Zg, purinska nukleozidna fosforilaza iz kliničkog izolata bakterije *H. pylori* je označena strelicom.

Razina ekspresije proteina čini se znatno veća pri ekspresijskim uvjetima 4 i 6 (slika 4.2). Određena je masa taloga stanica, koncentracija proteina metodom po Bradfordu i specifična aktivnost PNPaze uz m^7Guo kako bi se odabrali optimalni uvjeti (tablica 4.1).

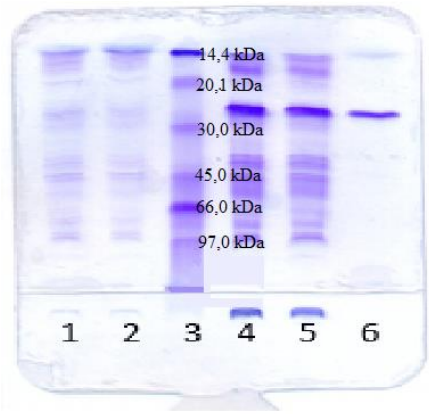
Tablica 4.1. Određivanje mase staničnog taloga, koncentracije proteina i specifične aktivnosti PNPaze uz m^7Guo za alikvote proteinskih ekstrakta dobivenih probnim ekspresijama

Alikvot	**Masa staničnog taloga / g**	**Koncentracija proteina / mg cm^{-3}**	**Specifična aktivnost / U mg^{-1}**
1	0,3814	6,412	0,0267
2	0,4580	6,608	0,0225
3	0,3756	6,849	0,0235
4	0,3252	7,668	0,0200

5	0,5157	6,103	0,0240
6	0,4965	6,542	0,0287
7	0,5354	9,489	0,0215
8	0,5740	9,589	0,0175
9	0,5803	9,286	0,0150

Ekspresijski uvjeti pri nižim temperaturama su pokazali veći prinos proteina, ali ne i veću specifičnu aktivnost PNPaze. Prekonoćna ekspresija je rezultirala većom količinom proteina. Ostali uvjeti nisu značajno utjecali na prinos niti specifičnu aktivnost PNPaze. Ekspresijski uvjeti pod brojem 6 (37 ˚C, 130 rpm, 0,5 mmol dm^{-3}, 16 h) su odabrani za proizvodnju veće količine PNPaze zbog zadovoljavajućeg prinosa proteina i najveće specifične aktivnosti.

Proizvodnja većih količina purinske nukleozidne fosforilaze je rađena iz kolonija nastalih transformacijom. Prekomjerna ekspresija proteina je provedena prema optimalnim uvjetima potvrđenima probnom ekspresijom. Uspješnost ekspresije je ispitana SDS-PAGE 12,5% (*PhastSystem*) elektroforezom. Za kontrolu su korišteni purinska nukleozidna fosforilaza iz kliničkog izolata bakterije *H. pylori* (HP PNP-Zg) i proteinski marker, LMW-SDS marker.



Slika 4.3. Prekomjerna ekspresija purinske nukleozidne fosforilaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori* eksprimirane u *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Jažice 1 i 2 su

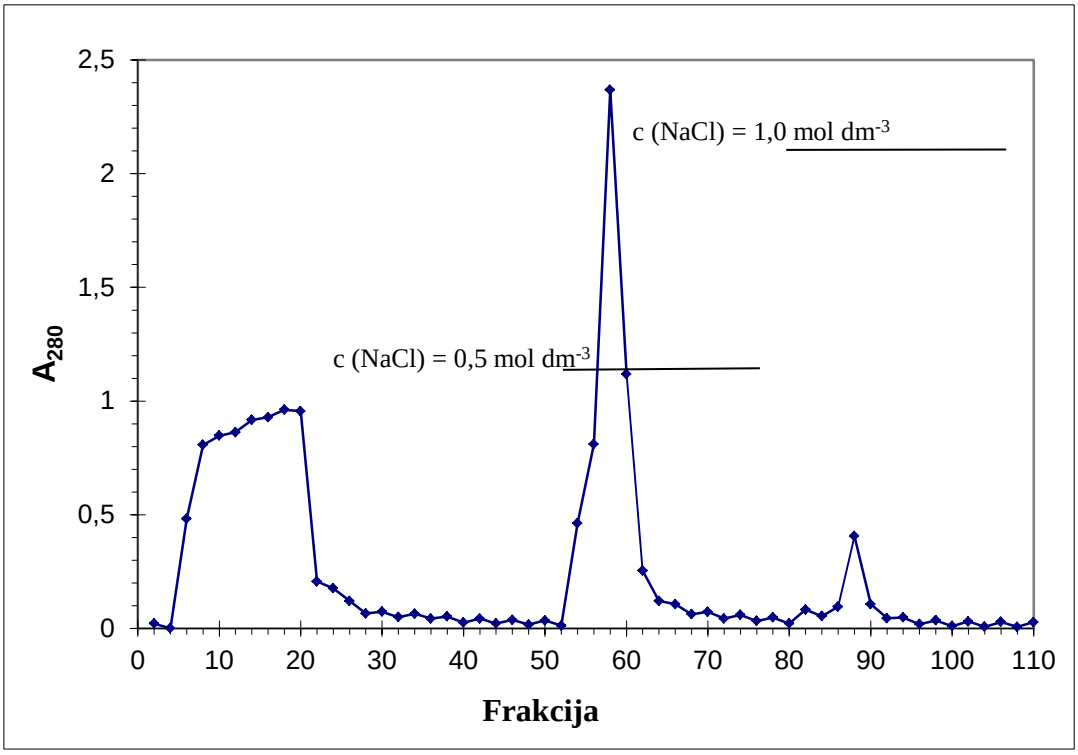
bakterijske kulture prije, a 4 i 5 poslije ekspresije. U jažici 3 je proteinski marker, a u jažici 6 HP PNP-Zg.

Prekomjerna ekspresija pri navedenim uvjetima se pokazala uspješnom (slika 4.3). Vrpce jakog intenziteta u jažicama 4 i 5 su u ravnini vrpce za HP PNP-Zg i odgovaraju po molekulskoj masi purinskoj nukleozidnoj fosforilazi iz soja 26695 bakterije *H. pylori*. Teorijska molekulska masa PNP-aze iz soja 26695 iznosi 25,8 kDa, dok eksperimentalna molekulska masa određena elektroforezom iznosi 26,2 kDa. Dobivena razlika se može objasniti dopuštenim odstupanjem mjerenja.

Proteinski ekstrakti dobiveni prethodnim korakom su pripremljeni za pročišćavanje anionskom izmjenjivačkom kromatografijom uz uvjete opisane u eksperimentalnom dijelu. Apsorbancija dobivenih frakcija spektrofotometrijski je mjerena pri 280 nm.

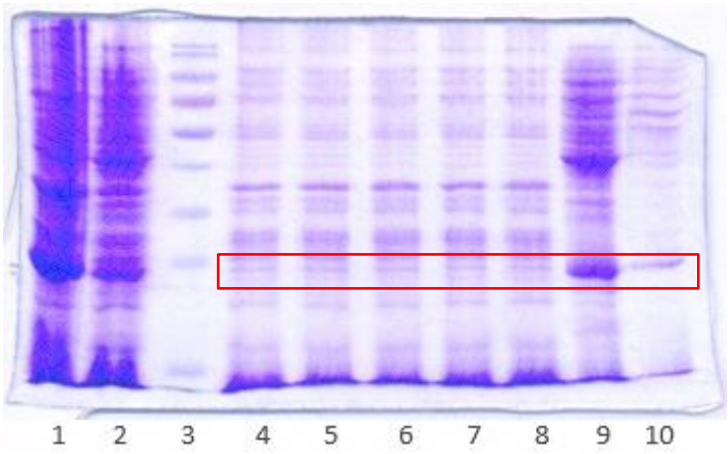
Purinskoj nukleozidnoj fosforilazi je određena teorijska izoelektrična točka koja iznosi 8,15 što znači da će ciljni protein izaći s kolone u nevezanim frakcijama, prije dodavanja pufera za eluaciju s većim udjelom soli. Naime, proteini s izoelektričnom točkom nižom od pH pufera (7,6) će imati negativni naboj, te će se vezati za kolonu, dok će proteini s višim izoelektričnim točkama, pri danoj *pH* vrijednosti, biti pozitivno nabijeni te se neće vezati. Povećanjem ionske jakosti pufera ispiru se vezani proteini s anionske izmjenjivačke kolone.

Izoelektrična točka za purinsku nukleozidnu fosforilazu je određena i izoelektričnim fokusiranjem uz *pI* standarde i iznosi ~8,45. Stoga je zaključeno da se PNPaza sigurno nalazi u prvih 30 frakcija.



Slika 4.4. Kromatogram anionske izmjenjivačke kromatografije proteinskog ekstrakta iza sonikacije stanica na Q-sefarozi.

Na slici 4.4 je vidljiv široki pik koji obuhvaća frakcije 8-20 u kojima se nalazi ciljni protein, ali također je uočen i oštar pik između frakcija 58 i 60. Stoga su uspješnost pročišćavanja i navedene frakcije ispitane SDS-PAGE elektroforezom.

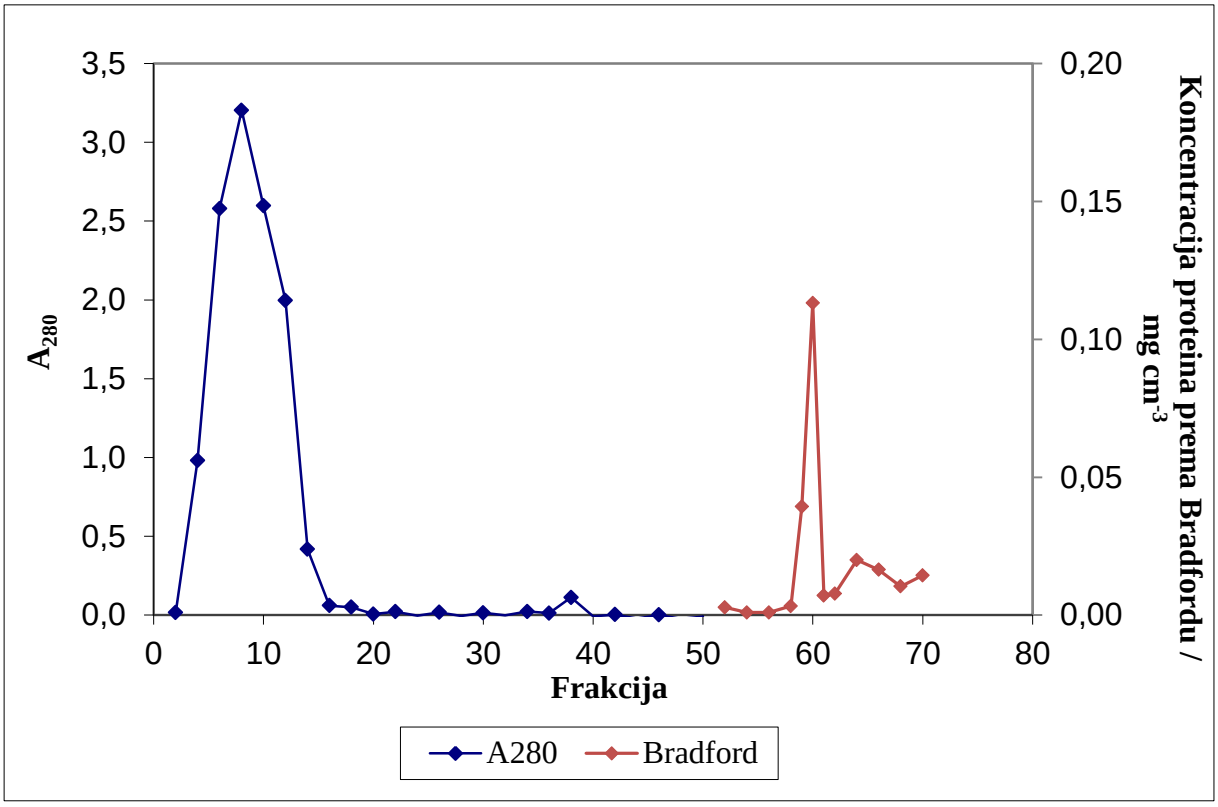


Slika 4.5. Pročišćavanje purinske nukleozidne fosforilaze anionskom izmjenjivačkom kromatografijom na Q-sefarozi. Jažica 1 – stanični talog nakon lize bakterijskih stanica, jažica

2 – proteinski ekstrakt, jažica 3 – proteinski marker PageRuler, jažice 4-8 – nevezane frakcije na Q-sefarozi redom 10, 12, 14, 16 i 18, jažice 9 i 10 – vezane frakcije na Q-sefarozi 58 i 60. Crveno označeno je ciljni protein u ispitivanim frakcijama.

Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu pokazala je neočekivani rezultat. Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu pokazuje da je purinska nukleozidna fosforilaza izašla u vezanim i nevezanim frakcijama. Dio ciljnog proteina je zaostao u staničnom talogu što znači da je došlo do stvaranja inkluzijskih tijela ili sonikacija nije bila potpuna zbog čega je PNPaza vjerojatno ostala u stanicama koje su istaložene zajedno s ostalim staničnim dijelovima. Osim toga, u analiziranim frakcijama 10-18 ne vidi se istaknuta proteinska vrpca molekulske mase koja bi odgovarala PNPazi. S druge strane, u analiziranim frakcijama 58 i 60 proteinska vrpca molekulske mase ~25,0 kDa jasno je vidljiva.

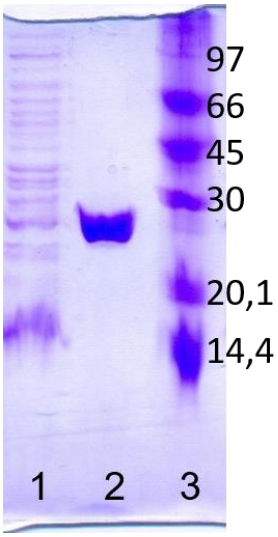
Kako bi se odredilo nalazi li se ciljni protein u frakcijama ispranima s kolone puferom A ili u onima eluiranima s kolone puferom B, u svim frakcijama je mjerena aktivnost prema supstratu m^7Guo. Frakcije 10-18 su pokazale aktivnost prema supstratu, a frakcije 58 i 60 nisu, stoga su frakcije 10-18 spojene i pripremljene za afinitetnu kromatografiju. Kako bi se identificirao inaktivni protein relativne molekulske mase ~25,0 kDa vezan na kolonu Q-sefaroze, i frakcije 58-60 su također spojene i pripremljene za afinitetnu kromatografiju.



Slika 4.6. Kromatogram afinitetne kromatografije frakcija proteina nevezanih na Q-sefarozu na sefarozi-formicin A.

Tijekom afinitetne kromatografije, u frakcijama proteina eluiranih puferima A1 i B1 koncentracija proteina određivana je mjerenjem apsorbancije pri 280 nm. U frakcijama proteina eluiranih puferom C1 to nije bilo moguće budući da pufer C1 sadrži inozin i/ili produkt reakcije PNPaze - hipoksantin, a oba spoja apsorbiraju na valnoj duljini od 280 nm. Stoga je koncentracija proteina u frakcijama eluiranima puferom C1 određena metodom po Bradfordu. Svim frakcijama određivana je aktivnost prema supstratu m^7Guo. Pokazalo se da se većina proteina iz početnog uzorka za ovu kromatografiju nije vezala na kolonu (slika 4.6), dok se manji dio proteina vezao. Vezani dio proteina pokazao je aktivnost prema m^7Guo, dok nevezani nije.

Čistoća vezanih proteina provjerena je na SDS-PAGE (slika 4.7). Pokazalo se da je navedenim postupkom PNPaza iz soja 26695 bakterije *H. pylori* pročišćena do homogenosti, 93,82 puta, bez gubitka ukupne količine aktivnosti (tablica 4.2). Specifična aktivnost konačnog uzorka PNPaze iznosila je 9,647 U mg^{-1}.



Slika 4.7. Provjera čistoće purinske nukleozidne fosforilaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori* na SDS-PAGE. Jažica 1 – početni uzorak za afinitetnu kromatografiju na koloni sefaroze-formicin A, jažica 2 – pročišćena PNPaza, jažica 3 – proteinski marker.

Tablica 4.2. Pročišćavanje purinske nukleozidne fosforilaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori*.

Uzorak	**Volumen / ml**	**Koncentracija proteina / mg ml^{-1}**	**Ukupan sadržaj proteina / mg**	**Specifična aktivnost prema m^{7}Guo / U mg^{-1}**	**Ukupna aktivnost / U**	**Prinos / %**	**Faktor čišćenja**
Početni uzorak za Q-Sefarozu FF	86	4,595	395,2	0,103	40,639	100,00	1,00
Frakcije eluirane startnim puferom sa Q-Sefaroze FF	115	0,462	53,1	0,629	33,401	82,19	6,12
Početni uzorak za Sefarozu-formicin A	73	0,706	51,5	0,702	36,154	88,96	6,83
Frakcije eluirane puferom C1 sa Sefaroze-formicin A	21	0,242	5,0	9,647	48,391	119,08	93,82

Frakcije 58-60 (proteini vezani na kolonu Q-sefaroze) s anionske izmjenjivačke kromatografije također su nanesene na kolonu sefaroze-formicin A i afinitetna kromatografija je provedena u istim uvjetima kao što je gore opisano. Samo izrazito mala količina proteina vezala se na kolonu u ovom postupku, a SDS-PAGE je pokazala izrazitiju proteinsku vrpcu relativne molekulske mase ~25,0 kDa u frakcijama nevezanima na ovu kolonu.

Proteinske vrpce navedene molekulske mase su izrezane iz poliakrilamidnog gela i dane na identifikaciju masenom spektrometrijom u Laboratorij za spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Pročišćena PNPaza (slika 4.7, jažica 2) identificirana je kao DEOD_HELPY (purinska nukleozidna fosforilaza iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori*). Mala količina proteina vezanih na kolonu sefaroze-formicin A u afinitetnoj kromatografiji frakcija 58-60 sa anionske izmjenjivačke kromatografije identificirana je kao DEOD_ECOBW (purinska nukleozidna fosforilaza iz soja K12 bakterije *Escherichia coli*), dok je izrazita proteinska vrpca u uzorku nevezanom na kolonu u ovoj afinitetnoj kromatografiji identificirana također kao DEOD_HELPY. Rezultati masene spektrometrije, zajedno s mjerenjima aktivnosti PNPaze ukazuju na to da je prilikom ekspresije ciljnog proteina došlo do inaktivacije (vjerojatno nepravilnim smatanjem) većeg dijela PNPaze, koji je stoga pokazao neočekivano ponašanje (nevezanje na afinitetnu kolonu, te izostanak aktivnosti prema m^7Guo). Za buduća pročišćavanja ovog proteina trebalo bi ispitati i druge uvjete ekspresije.

4.4. Gel-filtracija

Homotrimeri PNPaza male molekulske mase (~ 80-100 kDa) su specifični za 6-okso purine i njihove nukleozide, dok homoheksameri PNPaza velike molekulske mase (~ 110-160 kDa) pokazuju veći raspon specifičnosti prema supstratima, pa tako uz već spomenute 6-okso purine primaju i 6-amino purinske nukleozide kao supstrate.

Konstruiran je baždarni pravac za proteine poznate molekulske mase. Eluacijski volumen proteinskih markera, kao i PNPaze, je određen mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 280 nm. Gel-filtracijom je potvrđeno da je purinska nukleozidna fosforilaza iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori* odista homoheksamer (~142 kDa), te da po molekulskoj masi pripada skupini tipičnih bakterijskih PNPaza s velikom molekulskom masom.

4.5. Enzimska aktivnost

Katalizirana reakcija ima nižu energiju aktivacije u odnosu na reakciju bez katalizatora. Enzimi su biološki katalizatori koji snižavaju energetsku barijeru tj. energetsku razinu kompleksa enzima i supstrata. Kinetiku enzimske reakcije su početkom 20. stoljeća proučavali L. Michaelis i M. Menten te su izveli sljedeću, Michaelis-Menten, jednadžbu:

$$v_0(c_0) = \frac{v_{\max} c_0}{c_0 + K_m}$$

Konstanta K_m (Michaelisova konstanta) označava afinitet enzima prema supstratu, te ovisi o pH i temperaturi. v_{max} označava maksimalnu brzinu reakcije, v_0 početnu brzinu reakcije, a c_0 koncentraciju supstrata.[41]

U svrhu ispitivanja kinetičkih svojstava fosforolize purinske nukleozidne fosforilaze kao prirodni supstrat korišten je inozin, a kao sintetički supstrat m^7Guo. Kako svi mehanizmi katalize PNPaza uključuju nukleozid i fosfat, kao varijabilni supstrat korišteni su spomenuti nukleozidi, dok je koncentracija fosfata bila konstantna i iznosila 50 mmol dm^{-3}.

Mjerenja specifične aktivnosti purinske nukleozidne fosforilaze su pokazala da enzim ima različitu supstratnu specifičnost prema 6-okso purinskim nukleozidima (m^7Guo i Ino). Aktivnosti su slične vrijednostima opaženima kod PNPaza iz *E. coli* i kliničkog izolata *H. pylori*, što vjerojatno proizlazi iz visoke identičnosti primarnih slijedova aminokiselinskih ostataka, ali i sličnih struktura aktivnih mjesta te aminokiselina koje sudjeluju u reguliranju enzimske reakcije (tablica 4.3).

Tablica 4.3. Enzimska aktivnost PNPaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori*. Aktivnost je ispitana prema 6-okso purinskim nukleozidima (m^7Guo i Ino). Izvori podataka za PNPaze iz *E. coli* [42] i kliničkog izolata *H. pylori* [43] su navedeni u literaturnim izvorima.

	Supstrat	Koncentracija supstrata / mmol dm^{-3}	Specifična aktivnost / U mg^{-1}
PNPaza iz soja 26695 *H. pylori*	Ino	0,5	130,3 ± 6,7
	m^7Guo	0,45	17,3 ± 1,4
PNPaza iz *E. coli*	Ino	0,5	103,2 ± 4,0

	m^7Guo	0,4	21,4 ± 1,6
PNPaza iz kliničkog izolata *H. pylori*	Ino	0,5	142,3 ± 4,2
	m^7Guo	0,45	23,1 ± 1,8

Određeni su kinetički parametri fosforolize purinske nukleozidne fosforilaze uz prirodni supstrat inozin, i sintetički supstrat m^7Guo uz konstantnu koncentraciju fosfata (50 mmol dm^{-3}), prikazano u tablici 4.4. Proučavanjem aktivnosti prema navedenim supstratima utvrđena je odlična aproksimacija Michaelis-Menten modela koji je opisan Michaelisovom kontantom, K_m, i maksimalnom brzinom, V_{max}. Slično ponašanje je primjećeno i kod purinske nukleozidne fosforilaze iz *E. coli* gdje je, također, Michaelis-Menten kinetika bila prikladna za opisivanje kinetičkog mehanizma kod kojeg su nukleozidi bili varijabilni supstrati.

Tablica 4.4 . Kinetički parametri PNPaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori* prema 6-okso purinskim nukleozidima (m^7Guo i Ino) uz konstantnu koncentraciju fosfata (50 mmol dm^{-3}) dobiveni nelinearnom regresijom Michaelis-Menten modela u programu GraphPad Prism 7. Izvori podataka za PNPazu iz kliničkog izolata *H. pylori* su neobjavljeni rezultati dobiveni u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju Instituta Ruđer Bošković.

	Varijabilni supstrat	K_m / μmol dm^{-3}	V_{max} / U mg^{-1}
PNPaza iz soja 26695 *H. pylori*	Ino	38,9 ± 3,1	54,4 ± 4,9
	m^7Guo	94,3 ± 2,9	101,4 ± 7,8
PNPaza iz kliničkog izolata *H. pylori*	Ino	76,4 ± 5,4	147,8 ± 1,6
	m^7Guo	131,5 ± 5,8	22,8 ± 0,4

Michaelisova konstanta je kod PNPaze iz soja 26695 *H. pylori* znatno niža za inozin naspram m^7Guo, što bi moglo ukazivati na to da je inozin bolji supstrat, tj. da se bolje veže u aktivno mjesto ovog enzima. Međutim, i maksimalna brzina je niža za inozin, što je povezano s manjom efikasnošću ovog enzima prema inozinu. Naprotiv tome, K_m vrijednost PNPaze iz kliničkog izolata *H. pylori*, je veća uz m^7Guo, dok je maksimalna brzina uz Ino i do 7 puta

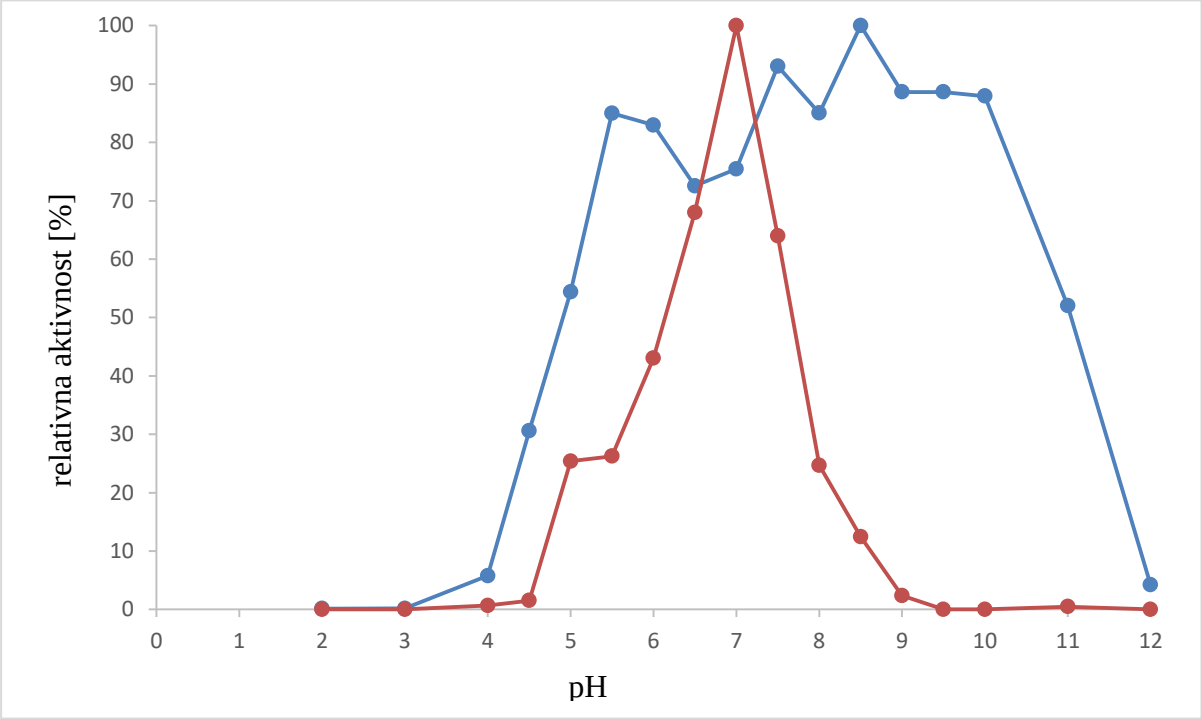
veća nego uz m^7Guo, što bi upućivalo da je inozin ipak preferirani supstrat za ovaj enzim. Iako purinska nukleozidna fosforilaza iz *E. coli* ima slične K_m vrijednosti za oba nukleozida (36 μmol dm^{-3} za m^7Guo i 32 μmol dm^{-3} za Ino), maksimalna brzina je i do 4 puta veća uz inozin. [16, 42] Prema kinetičkim parametrima (odnosu između dva ispitivana supstrata), PNPaza iz *E. coli* nešto je sličnija PNPazi iz kliničkog izolata *H. pylori*. Navedeni rezultati upućuju na manje razlike u vezanju supstrata u aktivna mjesta ovih enzima, koje bi mogle biti identificirane određivanjem 3D-strukture PNPaze iz soja 26695 *H. pylori* u kompleksu sa supstratom ili inhibitorom.

4.6. Utjecaj temperature i *pH* na stabilnost i aktivnost purinske nukleozidne fosforilaze

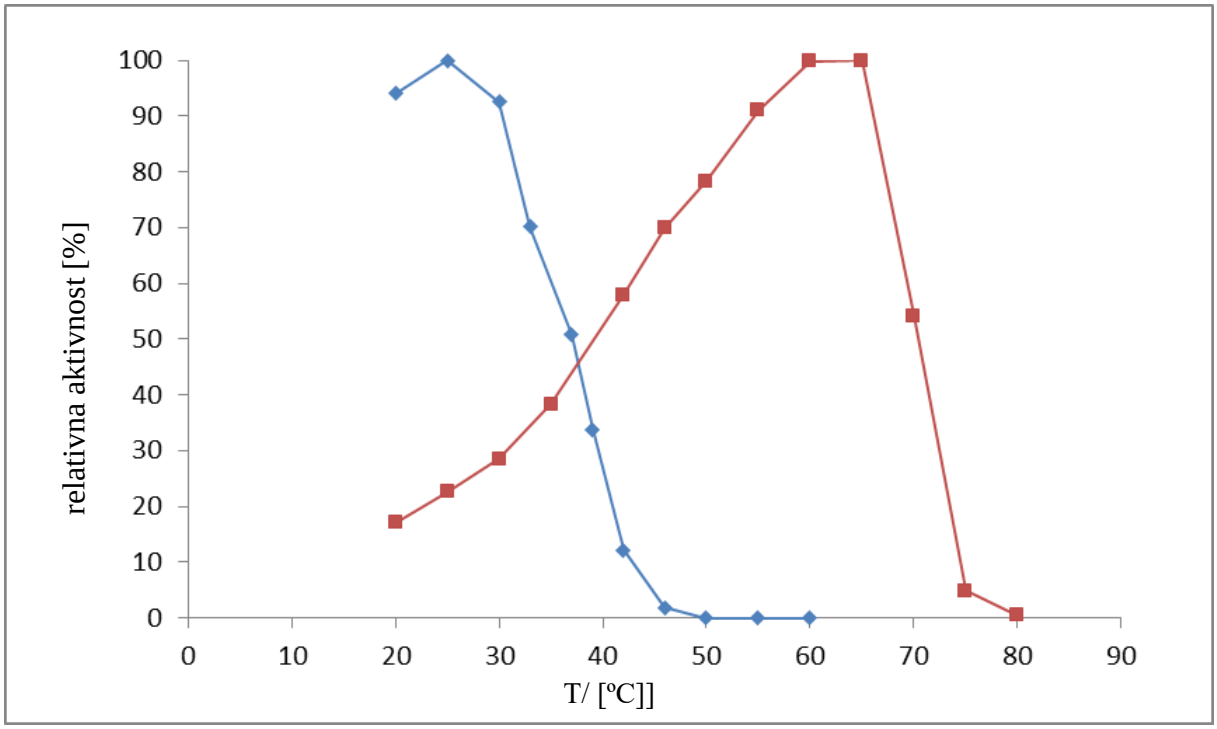
Utjecaj temperature i pH na stabilnost i aktivnost purinske nukleozidne fosforilaze je ispitan spektrofotometrijski uz inozin kao supstrat, pri čemu je u reakcijsku smjesu dodana ksantin-oksidaza.

Purinska nukleozidna fosforilaza je pokazala najveću aktivnost prema inozinu u *pH* području između 7 i 8, s najvećom vrijednosti pri *pH* ~ 7,5. PNPaza je stabilna u *pH* području između 6 i 10 pri temperaturi od 25 ˚C pri čemu je zadržano preko 80% početne aktivnosti enzima (slika 4.8).

Purinska nukleozidna fosforilaza je pokazala najveću aktivnost prema inozinu pri temperaturi između 60 i 70 ˚C pri *pH* 7,0. No, inkubacijom PNPaze pri 60 ˚C i *pH* 7,0 kroz 1 sat, nije primjećena aktivnost prema ovom primarnom supstratu. PNPaza iz soja 26695 bakterije *H. pylori* je stabilna 1 sat pri temperaturama do ~37 ˚C nakon čega dolazi do postepene inaktivacije i potpunog gubitka aktivnosti pri 60 ˚C (slika 4.9).



Slika 4.8. Utjecaj *pH* na stabilnost i aktivnost purinske nukleozidne fosforilaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori*. Označeno crvenom bojom je relativna aktivnost, a plavom stabilnost PNPaze.



Slika 4.9. Utjecaj temperature na stabilnost i aktivnost purinske nukleozidne fosforilaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori*. Označeno crvenom bojom je relativna aktivnost, a plavom stabinost PNPaze.

Uzimajući u obzir utjecaj temperature i *pH* na enzimsku stabilnost i aktivnost, purinska nukleozidna fosforilaza iz soja 26695 *H. pylori* je slična drugim karakteriziranim bakterijskim PNPazama. Iznimka su, naravno, enzimi iz ekstremofila, kao što je PNPaza iz *Aeropyrum pernix* koja je potpuno stabilna u pH rasponu 3-11 i čak 100 °C, te optimalno aktivna pri *pH* 5,0 i 100 °C. [44] Primjerice, PNPaze iz *E. coli* i *Salmonella typhimurium* su optimalno aktivni prema inozinu pri *pH* 7,5. [45] Pokazano je da je optimalna temperatura za PNPazu iz *E. coli* približno 60 °C, dok je potpuni gubitak aktivnosti pri 65 °C. Dokazana je i temperaturna stabilnost PNPaze iz *Pseudoalteromonas* sp. Bsi590 do 40 °C. [46]

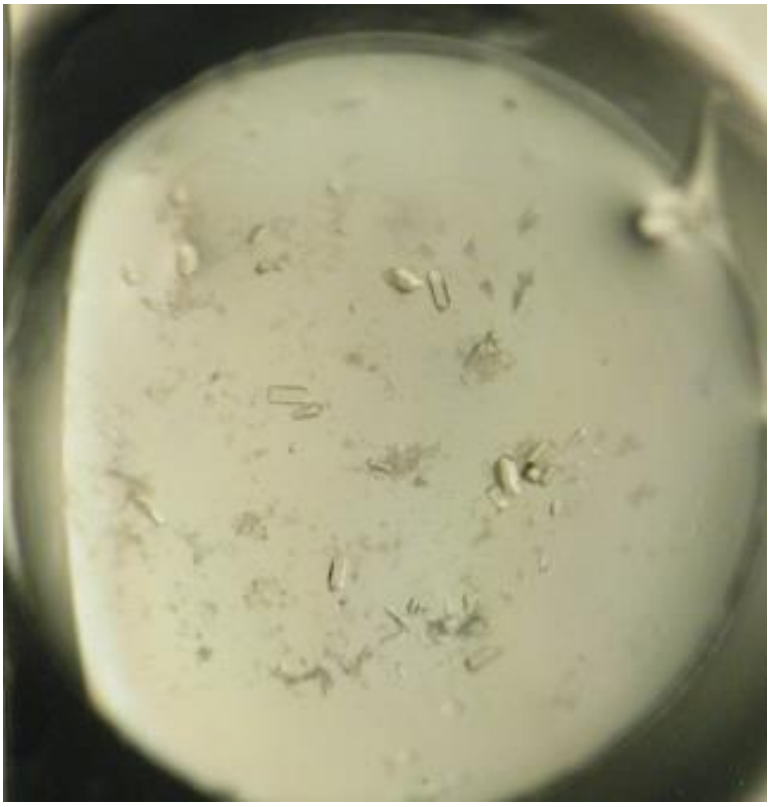
Purinska nukleozidna fosforilaza iz *Bacillus halodurans* je više prilagođena višim temperaturama, te je optimalno aktivna pri *pH* 7,0 i 70 ° C, a stabilna u *pH* rasponu 5,7-8,4 i temperaturnom rasponu 32-74 °C. [47]

Relativno blagi i neutralni optimalni uvjeti djelovanja za PNPazu iz *H. pylori* vjerojatno odražavaju specifične životne uvjete ovog patogenog organizma. Iako živi u

izrazito kiselom okruženju želuca, *H. pylori* je sposobna stvoriti vlastitu "mikroklimu" s optimalnim životnim uvjetima.[48] Proizvodnjom ureaze, koja katalizira hidrolizu ureje uz nastanak amonijaka, *H. pylori* može zadržati neutralni *pH* vlastite citoplazme te stoga podnosi kisele uvjete u želucu.

4.7. Kristalizacija i struktura purinske nukleozidne fosforilaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori*

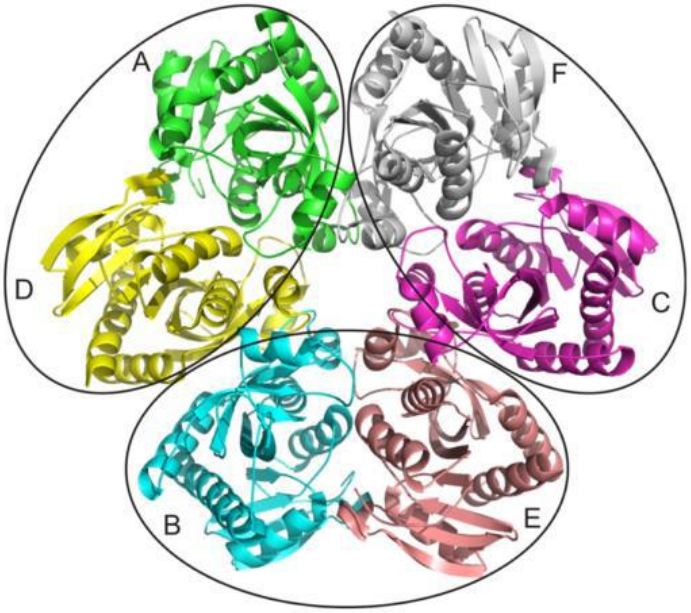
Ukoncentrirani i odsoljeni uzorak purinske nukleozidne fosforilaze je upotrebljen za dobivanje kristala metodom difuzije para u visećoj kapi pri različitim uvjetima. Prethodno su provedena inicijalna ispitivanja brojnih uvjeta za kristalizaciju PNPaze iz soja 26695 bakterije *H. pylori*. Uvjeti koji su se pokazali kao najbolji optimizirani su u ovom radu. Kristali su dobiveni pri prvom setu uvjeta (opisano u poglavlju 3.13.) te su prikazani na slici 4.10.



Slika 4.10. Kristali purinske nukleozidne fosforilaze dobiveni u prvom setu uvjeta

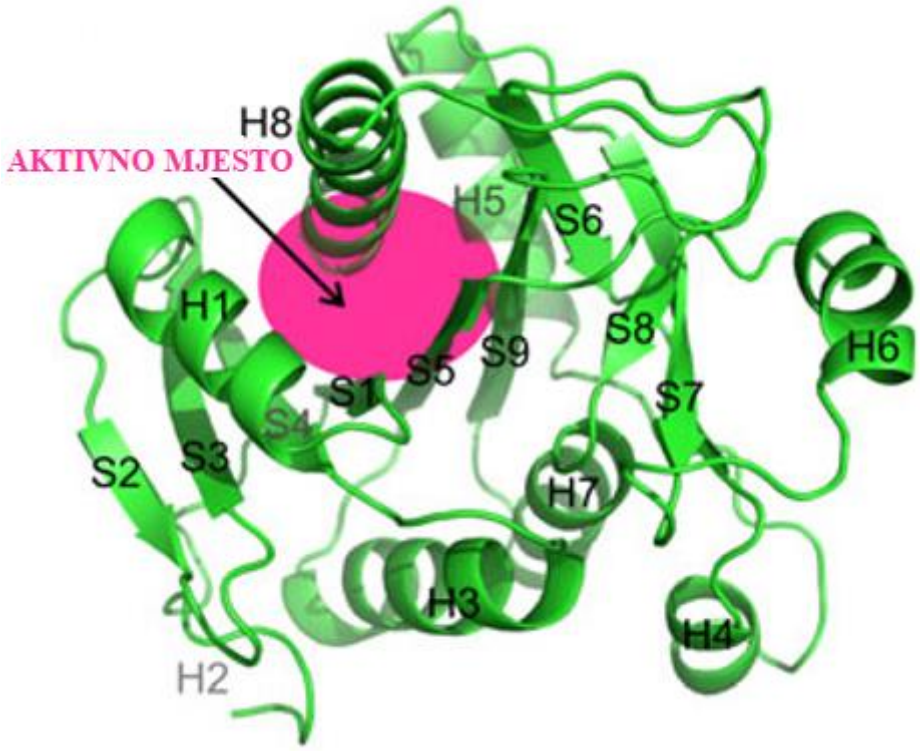
Po završetku eksperimentalnog dijela ovog Diplomskog rada, kristalografska snimanja i rješavanja strukture purinske nukleozidne fosforilaze su obavile kolege iz Laboratorija za kemijsku i biološku kristalografiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. [49]

Purinska nukleozidna fosforilaza je homoheksamerni protein koji se sastoji od 6 identičnih monomera. Svaki se sastoji od 233 aminokiselinska ostatka te ima molekulsku masu ~25,8 kDa. PNPaza ima oblik diska čiji promjer iznosi ~100 Å, kao i širinu od 40 Å (slika 4.11).



Slika 4.11. Heksamerna struktura tipičnih bakterijskih PNPaza velike molekulske mase. Po dva monomera se spajaju u dimere, a slaganjem tri dimera nastaje heksamer. Slika preuzeta iz literaturnog izvora [50].

Aminokiseline His4 i Arg43 iz jednog monomera upotpunjuju aktivno mjesta drugog monomera u dimeru. Zrcaljenjem pojedinih monomera za 180° nastaju dimeri u kojima svaki monomer pruža drugome aminokiselinske ostatke potrebne za nastanak aktivnog mjesta. Rotacijom dimera za 120° oko glavne osi dolazi do stvaranja heksamera koji je stoga trimer dimera (slika 4.11.). Svaki monomer PNPaze se sastoji od jedne β-ploče u središnjem dijelu i osam α-zavojnica oko β-ploče. Svaka β-ploča sadrži devet β-lanaca od kojih lanci S5-S9 čine β-bačvu. Aktivna mjesta monomera se nalaze između β-lanaca S5 i S9 s jedne strane te α-zavojnica H1 i H8 s druge (slika 4.12). [49]



Slika 4.12. Struktura monomera purinske nukleozidne fosforilaze iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori*. Slika preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru [49].

§ 5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog diplomskog rada purinska nukleozidna fosforilaza (PNPaza) iz soja 26695 patogene bakterije *Helicobacter pylori* je pročišćena, biokemijski karakterizana te su dobiveni kristali enzima.

Uvjeti ekspresije PNPaze u *E. coli* su optimizirani i provjereni SDS-PAGE elektroforezom ekstrakta staničnih proteina, te mjerenjima koncentracije ukupnih proteina i aktivnosti PNPaze. Odabrani su optimalni uvjeti ekspresije te je PNPaza prekomjerno eksprimirana.

PNPaza je uspješno pročišćena anionskom izmjenjivačkom i afinitetnom kromatografijom uz vezani inhibitor formicin A čime je dobivena elektroforetski čista PNPaza. Identitet dobivenog produkta dodatno je provjeren masenom spektrometrijom. Masenom spektrometrijom i mjerenjima PNPazne aktivnosti je potvrđeno da se dio PNPaze iz soja 26695 bakterije *H. pylori* eksprimirao inaktivan (vjerojatno zbog lošeg smatanja). U budućnosti bi trebalo ispitati druge uvjete ekspresije ovog enzima. Gel-filtracijom je potvrđeno da je purinska nukleozidna fosforilaza iz soja 26695 bakterije *Helicobacter pylori* doista homoheksamer (~142 kDa).

Mjerenja aktivnosti purinske nukleozidne fosforilaze su pokazala da enzim ima različitu supstratnu specifičnost prema 6-okso purinskim nukleozidima (m^7Guo i Ino). Aktivnosti su slične vrijednostima opaženima kod PNPaza iz *E. coli* i kliničkog izolata *H. pylori*, što vjerojatno proizlazi iz visoke identičnosti primarnih slijedova aminokiselinskih ostataka, ali i sličnih struktura aktivnih mjesta, te aminokiselina koje sudjeluju u reguliranju enzimske reakcije. Očekivano, kinetičke konstante za ova tri enzima također su se pokazale sličnima.

Strukturni podaci ne objašnjavaju u potpunosti kooperativnost i prijenos informacije među monomerima. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se potvrdio mehanizam reakcije, ali i otkrili odgovarajući inhibitori ove PNPaze. Inhibiranjem PNPaze bi se mogao usporiti rast same bakterije. Pokaže li se ovo točnim, PNPaza bi mogla postati nova meta za razvoj lijekova u istrebljivanju ovog patogena.

§ 6. POPIS OZNAKA I KRATICA

Å – Angstrom (1 Å = 10-10 m)

APS – amonijev persulfat

ATP – adenozin trifosfat

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

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

FA – formicin A

GTP – gvanozin trifosfat Guo – gvanozin

HEPES – N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina

IMP – inozin monofosfat

Ino – inozin

IPTG – izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid

hranjivi medij LB – Luria-Bertani hranjivi medij

hranjivi medij LBA – Luria-Bertani hranjivi medij s agarom

LMW – engl. low molecular weight

m^7Guo – 7-metilgvanozin

OD600 – optička gustoća pri 600 nm (engl. *optical density*)

PAGE – elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (engl. *polyacrylamide gel electrophoresis*)

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

PDB – engl. Protein Data Bank

PEG – polietilen glikol

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid

PNPaza – purinska nukleozidna fosforilaza

rpm – engl. rounds per minute

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

TEMED – tetrametiletilendiamin

Tris – tris(hidroksimetil)-aminometan

U – broj enzimskih jedinica koje kataliziraju redukciju 1 µmol supstrata u 1 minuti po miligramu proteina (engl. unit)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

[1] J. R. Warren, B. Marshal, Unidentified Curved Bacilli on Gastric Epithelium in Active Chronic Gastritis, Lancet 321 (1984) 1273 – 1275

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

[3] J. Pavelić, *Helicobacter pylori*: infekcija, genetika, liječenje. Osvrt, Medix 109/110, (2014) 113.

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

[5] D. Makola, J. Krenitsky, C. R. Parrish, Enteral feeding in acute and chronic pancreatitis, Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am. 17 (2007) 747-64

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

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

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

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

[10] F. Franceschi, R. M. Genta, A. R. Sepulveda, Gastric mucosa: long-term outcome after cure of Helicobacter pylori infection, J. Gastroenterol. 37 (Suppl. 13) (2002) 17-23

[11] M. F. Go, Natural history and epidemiology of Helicobacter pylori infection, Alimentary Pharmacology & Therapeutics 16 (2002) 3-15

[12] F. Franceschi, G. Zuccalà, D. Roccarina, A.F. Gasbarrini, Clinical effects of Helicobacter pylori outside the stomach, Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology 11(4) (2014) 234-42

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

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

[15] http://www.visionfromfeeling.com/microscopic.html

[16] J. F. Tomb, O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty: The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori, Nature 388 (1997) 539-54

[17] A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar, Purine nucleoside phosphorylase: properties, functions and clinical aspects, Pharmacol. Ther. 88 (2000) 349-425

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

[19] E. M. Bennett, R. Anand, P. W. Allan, A. E. Hassan, J. S. Hong, D. N. Levasseur, D. T. McPherson, W. B. Parker, J. A. Secrist 3rd, E. J. Sorscher et al. Designer gene therapy

using an Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase/prodrug system. Chem Biol 10 (2003) 1173–1181

[20] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3243375/?log$=activity

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

[22] I. Thiele, D. Vo Thuy, N. D. Price, B. Palsson, Expanded Metabolic Reconstruction of Helicobacter pylori (iIT341 GSM/GPR): an In Silico Genome-Scale Characterization of Single- and Double-Deletion Mutants, J Bacteriol; 187(16) (2005) 5818–5830

[23] C. R. Woese, Bacterial evolution. Microbiological Reviews, 52(2) (1987) 221–271

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

[25] S. Tan, L. S. Tompkins, M. R. Amieva, Helicobacter pylori usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. Plos Pathog. 5 (5) (2009) 1-13

[26] N. Hori, M. Watanabe, Y. Yamazaki, Y. Mikami, Purification and Characterization of Thermostable Purine Nucleoside Phosphorylase of Bacillus stearothermophilus JTS 859. Agric. Biol Chem. 53, (1989) 2205

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

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

[29] A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar, Formycins A and B and some analogues: selective inhibitors of bacterial (Escherichia coli) purine nucleoside phosphorylase. Biochim Biophys Acta; 1120(3) (2000) 239-47

[30] J. Lee, S. Filosa, J. Bonvin, S. Guyon, R. A. Aponte, J. L. Turnbull, Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Purine Nucleoside Phosphorylase from Escherichia coli, Protein Expr. Purif. 22 (2001) 180-188

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

[32] E. M. Bennett, C. Li, P. W. Allan, W. B. Parker, S. E. Ealick, Purine nucleoside phosphorylase. Structural Basis for Substrate Specificity of Escherichia coli Purine Nucleoside Phosphorylase, The Journal of Biological Chemistry, 278 (47) (2003) 47110-47118

[33] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbimage.fcgi?type=1&unm=1&uid=4TTI

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

[35] A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar, Linear free energy relationships for N(7)substituted guanosines as substrates of calf spleen purine nucleoside phosphorylase.

Possible role of N(7)-protonation as an intermediary in phosphorolysis. Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences, 48 (1993) 803–811

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

[38] M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem 72 (1976) 248 –54

[39] H. T. K. Britton, R. A. Robinson, Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal, J. Chem. Soc., (1931) 1456–1462

[40] A. McPherson, Introduction to macromolecular crystallography. JohnWiley & Sons, Inc. (2009)

[41] I. H. Segel, Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-state Enzyme Systems, John Wiley & Sons, New York (1993)

[42] G. Mikleušević, Z. Štefanić, M. Narczyk, B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska, M. Luić, Validation of the catalytic mechanism of Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase by structural and kinetic studies, Biochimie 93 (2011) 1610-1622

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

[44] S. Zhu, D. Song, C. Gong, P. Tang, X. Li, J. Wang, G. Zheng, Biosynthesis of nucleoside analogues via thermostable nucleoside phosphorylase, Appl. Microbiol. Biotechnol. 97 (2013) 6769-6778

[45] K. F. Jensen, P. Nygaard, Purine Nucleoside Phosphorylase from Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Purification and Some Properties, Eur. J. Biochem. 51 (1975) 253-265

[46] X. Li, X. Jiang, H. Li, D. Ren, Purine nucleoside phosphorylase from Pseudoalteromonas sp. Bsi590: molecular cloning, gene expression and characterization of the recombinant protein, Extremophiles 12 (2008) 325–333

[47] D. F. Visser, F. Hennessy, K. Rashamuse, M. E. Louw i D. Brady, Cloning, purification and characterisation of a recombinant purine nucleoside phosphorylase from Bacillus halodurans Alk36, Extremophiles 14 (2010) 185-192

[48] D. Scott, D. Weeks, K. Melchers i G. Sachs: The life and death of Helicobacter pylori, Gut 43 (1998) 856-860

[49] M. Narczyk, B. Bertoša, L. Papa, V. Vuković, I. L. Ašler, B. WielgusKutrowska, A. Bzowska, M. Luić, Z. Štefanić, *Helicobacter pylori* purine nucleoside phosphorylase shows new distribution patterns of open and closed active site conformations and unusual biochemical features, FEBS Journal 285(7) (2018) 1305-1325

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

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Karolina Gucunski

Datum rođenja: 10.07.1990.

Mjesto rođenja: Osijek

Obrazovanje

1997-2005	Osnovna škola Franje Krežme, Osijek
2005-2009	Prirodoslovno-matematička gimnazija, Osijek
2009-2013	Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2013-2018	Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja, aktivnosti i priznanja

2004 Državno natjecanje iz kemije

2005 Državno natjecanje iz kemije

2007 Državno natjecanje iz kemije

2008 Državno natjecanje iz kemije

2009 Američko natjecanje u programiranju (American Computer Science League)

2011 Demonstrature iz praktikuma Opće kemije

2014 Simpozij studenata kemije

2015 MST radionica

2015 Radionice i predavanja „Bioinformatics methods in genomics“

2015 Radionice Cirkularni Dikroizam

2015 Europski kristalografski kongres, ECM29 (2 postera)

2015 Europska kristalografska škola (1 poster)