

Karakterizacija proteinskih kompleksa proteina SSB

Kostelac, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:603412>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

ANJA KOSTELAC

Karakterizacija proteinskih kompleksa proteina SSB

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu genetiku na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Dušice Vujaklije, više znanstvene suradnice. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Posebno se zahvaljujem neposrednoj voditeljici dr. sc. Vlatki Godinić Mikulčić na stručnom vodstvu, korisnim savjetima i pruženom znanju, strpljenju, susretljivosti i poklonjenom vremenu te nadasve prijateljskoj atmosferi tijekom izrade ovog rada.

Željela bih uputiti zahvale mentorici dr. sc. Dušici Vujakliji na stručnom vodstvu.

Zahvaljujem se dr. sc. Ivi Crnolatu na ustupljenom vremenu i trudu tijekom izrade ovog eksperimentalnog dijela rada.

Posvećujem ovaj rad mojoj obitelji.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Karakterizacija proteinskih kompleksa proteina SSB

Anja Kostelac

Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu,
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Streptomiceti predstavljaju najbrojniji rod unutar koljena Actinobacteria. Bakterija *Streptomyces coelicolor* A3(2) je modelni organizam za proučavanje procesa stanične diferencijacije i proizvodnje antibiotika kod bakterija. Genom ove bakterije ima dva gene, *ssbA* i *ssbB* za proteine koji vežu jednolančanu molekulu DNA (SSB), a sudjeluju u različitim procesima metabolizma DNA. Također ima i dva gena, *hupA* i *hupS*, koji kodiraju za proteine HU. Ovi proteini su združeni s nukleoidom i važni su za očuvanje strukture i integriteta DNA unutar stanice. Protein HU je potencijalni proteinski partner proteina SsbA. U ovom je radu, proteini SsbA i HupS prekomjerno su eksprimirani u heterolognom domaćinu, bakteriji *Escherichia coli* u svrhu pročišćavanja veće količina proteina. Za potrebe ispitivanja kompleksa SSB:HU ispitane su interakcije protein-DNA proteina SsbA i SsbB s jednolančanom DNA. Rezultati su pokazali da protein SsbB ima prosječno dva puta veći afinitet prema j1DNA nego protein SsbA, te da nastajanje kompleksa SsbB:j1DNA ne ovisi značajnije o prisutnosti soli u odnosu na kompleks SsbA:j1DNA. Pokazano je da je nastajanje kompleksa SsbA:HU spontana reakcija s visokom konstantom disocijacije i da je vođena hidrofobnim interakcijama. Interakcija između proteina SsbA i HU se ostvaruje bez prisustva j1DNA, dok se konformacijska promjena uočava samo na proteinu HU.

Rad sadrži: 74 stranice, 40 slika, 11 tablica, 106 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Streptomyces coelicolor*, protein SSB, protein HU, jednolančana DNA, interakcije

Voditelj: Dr. sc. Dušica Vujaklija, viša znanstvena suradnica

Suvoditelj: Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.
Dr. sc. Sunčica Bosak, doc.
Dr. sc. Ana Previšić, doc.

Rad prihvaćen: 31. 01. 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Characterisation of SSB protein complexes

Anja Kostelac

Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb,
Roosevelt square 6, 10000 Zagreb

Streptomyces are the largest genus of Actinobacteria. *Streptomyces coelicolor* A3(2) is a model organism for the study of bacterial differentiation and antibiotic production. This bacterium has two genes, *ssbA* and *ssbB*, encoding single-stranded DNA binding proteins (SSBs) which participate in various processes of DNA metabolism. It also possesses two genes, *hupA* and *hupS*, encoding nucleoid-associated HU proteins which are involved in maintaining DNA integrity in the cell. In previous study we identified HU protein as a potential SSB protein partner. In this study, SsbA and HupS proteins were overexpressed in heterologous host, *Escherichia coli* and a large amount of proteins was purified for further analyses. In order to characterise complex SsbA:HU, protein-DNA interactions were analysed between proteins SsbA and SsbB and single-stranded DNA (ssDNA). The results showed protein SsbB has two-fold increased affinity with ssDNA compared to protein SsbA and that formation of SsbB:ssDNA is less salt dependent compared to SsbA:ssDNA. This study showed that formation of SsbA:HU complex is a spontaneous reaction with high dissociation constant, which is driven by hydrophobic interactions. Protein-protein interactions between SsbA and HU are formed without the presence of ssDNA, whereas conformational changes were observed only for HU protein.

The thesis has 74 pages, including 40 figures, 11 tables, 106 references, original in Croatian

Thesis deposited in the Central biological library

Key words: *Streptomyces coelicolor*, SSB protein, HU protein, single-stranded DNA, interactions

Supervisor: Dr. sc. Dušica Vujaklija, Sen. Res. Assoc.

Cosupervisor: Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.
Dr. sc. Sunčica Bosak, Asst. Prof.
Dr. sc. Ana Previšić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 31. 01. 2019.

Popis kratica

APS	amonijev persulfat
BSA	albumin iz seruma goveda
dNTP	deoksiribonukleotid
DEAE	dietilaminoetil
DMSO	dimetil sulfoksid
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EMSA	elektroforeza zaostajanja u gelu, metodom pomaka fragmenta DNA u gelu tijekom elektroforeze
EtBr	3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinijev bromid (etidijev bromid)
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
jlDNA	jednolančana molekula DNA
kpb	broj parova baza x 1000
LB	Luria-Bertani (hranjiva podloga)
Ni-NTA agarozna	agarozna supstituirana nikal-nitilotriocetenom kiselinom
nt	nukleotid
PCR	lančana reakcija polimerazom
pb	parovi baza nukleotida
SDS-PAGE	denaturirajuća elektroforeza u gelu poliakrilamida u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata
SDS	natrijev dodecilsulfat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamin
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan

Sadržaj

1. Uvod	1
1. 1. Općenito o streptomicetima	1
1. 1. 1. <i>Streptomyces coelicolor</i>	2
1. 1. 2. Kromosom i genetički elementi streptomiceta	2
1. 1. 2. 1. Replikacija genoma bakterija roda <i>Streptomyces</i>	3
1. 2. DNA-vezujući proteini	4
1. 2. 1. Protein SSB	6
1. 2. 1. 1. Proteini SSB bakterije <i>S. coelicolor</i>	9
1. 2. 2. Protein HU	11
1. 2. 2. 1. Proteini HU bakterije <i>S. coelicolor</i>	14
1. 3. Proteinske interakcije	14
1. 3. 1. Metode ispitivanja proteinskih interakcija <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>	15
1. 3. 1. 1. Sustav dvaju hibrida (kvašćevih i bakterijskih)	15
1. 3. 1. 2. Tandemsko afinitetno pročišćavanje spregnuto spektrometrijom masa	16
1. 3. 1. 3. Fluorescencijska spektrofotometrija	17
1. 3. 1. 4. Izotermalna titracijska kalorimetrija	19
1. 3. 1. 5. Spektroskopija kružnog dikroizma	20
2. Cilj	22
3. Materijali i metode	23
3. 1. Materijali	23
3. 1. 1. Standardne kemikalije	23
3. 1. 2. Komercijalni kompleti	23
3. 1. 3. Enzimi i pripadajući puferi	23
3. 1. 4. Ostali materijali	23
3. 1. 5. Standardi	23
3. 1. 6. Boje	23
3. 1. 7. Sastojci LB hranjive podloge	24
3. 1. 8. Otopine	24
3. 1. 8. 1. Puferi	24
3. 1. 9. Oligonukleotidi	27
3. 1. 10. Plazmidni vektori	28
3. 1. 11. Bakterijski sojevi	29
3. 2. Metode	29
3. 2. 1. Metode rada s makromolekulama DNA	29
3. 2. 1. 1. Kloniranje gena <i>hu</i> bakterije <i>S. coelicolor</i>	29
3. 2. 1. 1. 1. Umnažanje gena <i>hu</i> pomoću preparativnog PCR-a	29
3. 2. 1. 1. 2. Cijepanje krajeva gena <i>hu</i> bakterije restrikcijским endonukleazama	30
3. 2. 1. 1. 3. Ligacija gena <i>hu</i> s vektorom pQE30	30
3. 2. 1. 1. 4. Transformacija kemijski kompetentnih stanica <i>E. coli</i>	30
3. 2. 1. 1. 5. PCR na bakterijskim kolonijama (engl. <i>colony PCR</i>)	31
3. 2. 1. 1. 6. Izolacija plazmidne DNA iz prekoćne kulture bakterijskih stanica <i>E. coli</i>	31
3. 2. 1. 1. 7. Agarozna gel elektroforeza	32
3. 2. 1. 1. 8. Sekvenciranje DNA	32
3. 2. 1. 1. 9. Mjerenje koncentracije makromolekula DNA	32
3. 2. 2. Metode rada s proteinima	32
3. 2. 2. 1. Pročišćavanje proteina	32
3. 2. 2. 1. 1. Sinteza proteina HU i SsbA u heterolognom sustavu bakterije <i>E. coli</i>	32
3. 2. 2. 1. 2. Afinitetno pročišćavanje proteina na Ni-NTA agarozu	33
3. 2. 2. 1. 3. Pročišćavanje proteina ionskom izmjenom na DEAE-celulozi	33
3. 2. 2. 1. 4. Denaturirajuća elektroforeza u gelu poliakrilamida u prisutnosti natrijevog deodecil-sulfata (SDS-PAGE)	34
3. 2. 2. 1. 5. Koncentriranje proteina u otopini	34
3. 2. 2. 1. 6. Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrom	35
3. 2. 2. 1. 7. Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu	35

3. 2. 3. Ispitivanje protein-protein i protein-DNA interakcija	36
3. 2. 3. 1. Ispitivanje protein-DNA interakcija	36
3. 2. 3. 1. 1. Određivanje najmanje duljine λDNA koju vežu proteini SSB metodom elektroforeze zaostajanja u gelu	36
3. 2. 3. 1. 2. Određivanje najmanje duljine λDNA koju vežu proteini SSB metodom fluorimetrijskom spektrofotometrijom	37
3. 2. 3. 2. Ispitivanje protein-protein interakcija	38
3. 2. 3. 2. 1. Ispitivanje interakcija proteina HU i SsbA fluorimetrijskom spektrofotometrijom	38
3. 2. 3. 2. 2. Ispitivanje interakcija proteina HU i SsbA metodom izotermalne titracijske kalorimetrije	39
3. 2. 3. 2. 3. Ispitivanje interakcija proteina HU i SsbA metodom spektroskopije kružnog dikroizma	39
3. 2. 3. 2. 3. 1. Izmjena pufera	39
4. Rezultati	40
4. 1. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju gena <i>hu</i> u uvjetima <i>in vivo</i>	40
4. 2. Pročišćavanje proteina bakterije <i>S. coelicolor</i> eksprimiranih u heterolognom domaćinu bakteriji <i>E. coli</i>	41
4. 2. 1. Pročišćavanje proteina HU afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu	41
4. 2. 2. Pročišćavanje proteina SsbA afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu i ionskom izmjenom na DEAE-celulozi	43
4. 3. Ispitivanje protein-DNA interakcija	44
4. 3. 1. Ispitivanje interakcija DNA i proteina metodom elektroforeze zaostajanja u gelu	44
4. 3. 1. 1. Određivanje najmanje duljine λDNA koju vežu proteini SsbA i SsbB	44
4. 3. 1. 2. Ispitivanje interakcija proteina SsbA i HU u prisustvu λDNA	47
4. 3. 2. Ispitivanje interakcija DNA i proteina metodom fluorimetrijske spektrofotometrije	50
4. 3. 2. 1. Određivanje najmanje duljine λDNA koju veže proteini SsbA i SsbB	50
4. 3. 2. 2. Ispitivanje utjecaja proteina HU na kompleks SsbA:DNA	56
4. 4. Ispitivanje protein-protein interakcija	57
4. 4. 1. Ispitivanje interakcija proteina SsbA i HU metodom fluorimetrijske spektrofotometrije	57
4. 4. 2. Ispitivanje interakcija proteina SsbA i HU metodom izotermalne titracijske kalorimetrije	58
4. 4. 3. Ispitivanje interakcija proteina SsbA i HU metodom spektroskopije kružnog dikroizma	59
5. Rasprava	61
5. 1. Protein-DNA interakcije	61
5. 2. Protein-protein interakcije	63
6. Zaključak	65
7. Literatura	66
7. 1. Literaturni izvori	66
7. 2. Mrežni izvori	72
8. Životopis	74
9. Prilozi	I

1. Uvod

1. 1. Općenito o streptomicetima

Streptomiceti su aerobne Gram-pozitivne bakterije porodice *Streptomycetaceae*. Vrste ovog roda su najčešće prisutne u tlu, ali i u ostalim ekološkim nišama. Vrste unutar roda *Streptomyces* se klasificiraju po različitim kriterijima: fiziološkim (proizvodnja primarnih i sekundarnih metabolita, korištenje različitih izvora ugljika i dušika), morfološkim (boja i oblik micelija, građa stanične stijenke) te genetičkim (nukleotidni sljedovi 16S rRNA) (Williams i sur. 1983). Navedeni rod bakterija javio se prije 450 milijuna godina kao jedan od prvih saprofitskih rodova bakterija (Chater 2006). Metabolizam streptomiceta se dijeli na primaran i sekundaran. Primaran metabolizam predstavlja enzimatske procese u stanici odgovorne za stanični rast, preživljenje i proizvodnju stanične energije. Sinteza produkata primarnog metabolizma odvija se tijekom rasta stanica. Sekundarni metabolizam je, za razliku od primarnog, odgovoran za proizvodnju neesencijalnih spojeva koji se sintetiziraju u kasnijoj fazi prilikom iscrpljivanja hranjiva. Najpoznatiji sekundarni metaboliti streptomiceta su antibiotici od kojih veliki broj ima komercijalnu primjenu (Berdy 1985). Oko 75% prirodnih antibiotika proizvode streptomiceti zbog čega ovaj rod filamentoznih bakterija ima veliki biološki potencijal (Chater 2006). Po kemijskoj strukturi ti antibiotici su različiti: peptidni antibiotici (aktinomicin D, tiostrepton), poliketidi (eritromicin, kandicidin, tetraciklin), β -laktami (cefamicin C) i aminoglikozidi (kanamicin, neomicin, streptomycin) (Kieser i sur. 2000). Nadalje, u sekundarne metabolite spadaju i različiti pigmenti koji daju karakterističnu boju bakterijskim kolonijama. Sekundarni metaboliti se sintetiziraju pri ulasku u stacionarnu fazu u tekućem mediju, dok se na krutoj podlozi (agru) sintetiziraju paralelno s morfološkom diferencijacijom (Bibb i Hesketh 2009). Životni ciklus ovih bakterija je složen te se sastoji kod većine streptomiceta od nekoliko vrlo dobro definiranih stadija (**Slika 1**).

koji pripadaju u regulatorne (12,3%) i transportne (7,8%) gene te gene za razgradnju vanstaničnih tvari (10,5%) (Bentley i sur. 2002). Genom ove bakterije pripada u skupinu genoma s vrlo visokom udjelom GC parova baza - 72,1% (*Escherichia coli* 50.8%, *Bacillus subtilis* 42%, *Sacharomyces cerevisiae* 38%) (Bentley i sur. 2002, Muto i Osawa 1987).

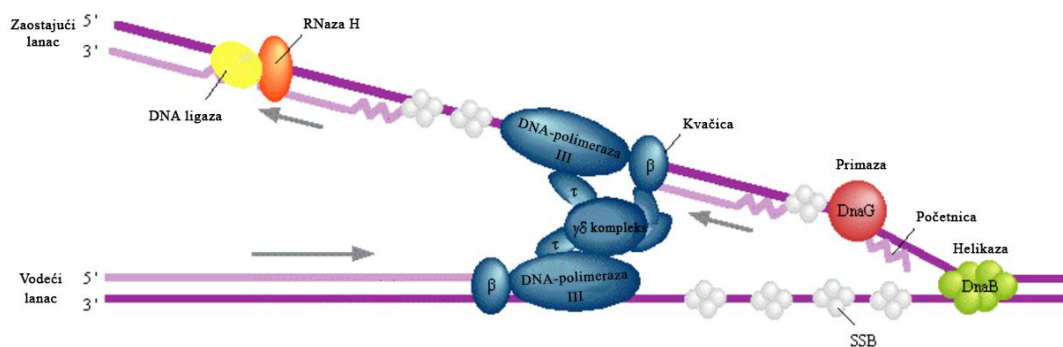
Genom na krajevima ima duge obrnuto ponavljajuće sljedove (duljine 24-600 kpb) te se na slobodnim 5'- krajevima nalaze kovalentno vezani proteini (engl. *terminal proteins*, TP) (Huang i sur. 1998). Replikacija streptomicetnog genoma se odvija dvosmjerno iz izvorišta replikacije *oriC* koji se nalazi u sredini kromosoma (Zakrzewska-Czerwinska i Schrempf 1992). Plazmidi streptomiceta mogu biti linearni i kružni. Linearni plazmidi (duljine 10-600 kpb), kao i genom, imaju obrnuto ponavljajuće sljedove i proteine vezane na 5'- kraju molekule DNA (Yang i sur. 2002).

1. 1. 2. 1. Replikacija genoma bakterija roda *Streptomyces*

Učinkovita replikacija DNA zahtijeva usklađeno djelovanje mnoštva proteina. Replisom bakterija roda *Streptomyces* je kompleks proteina koji uključuje enzime DNA-polimerazu I i III, primazu, helikazu, ligazu, topoizomerazu I i II te proteine SSB (engl. *single-stranded binding protein*) i inicijacijske proteine. Replikacija streptomicetnog genoma započinje vezanjem molekula DnaA-ATP na točno određena mjesta unutar slijeda *oriC*. Vezanje proteina DnaA na izvorište replikacije pomažu proteini skupine DNA-vezujućih proteina tipa II. Denaturacija heliksa DNA unutar slijed *oriC* je pripomognuta kompleksom DnaA-ATP. Nakon toga, proteini DnaB se vežu na jednolančane lance razmotanog heliksa DNA. Helikazna aktivnost proteina DnaB još više razmotava DNA kako bi mogla započeti replikacija genoma. Tijekom replikacije DnaB putuje u smjeru 5'- na 3'- u oba lanca. Kako se DNA odmotava, tako postaje jednolančana. JIDNA teži ponovnom sparivanju komplementarnih lanaca pa zbog toga proteini SSB vežu jIDNA. DNA-giraza (DNA-topoizomearza II) tijekom odmotavanja DNA smanjuje torzijske napetosti koje su uzrokovane odvijanjem heliksa. Nakon toga, sinteza lanaca započinje sintezom RNA početnice pomoću enzima primaze (DnaG). DNA-polimeraza III veže se na mjesto RNA početnice te započinje sintezu novih lanaca DNA. Sinteza vodećeg lanca se događa neprekinuto, bez zastajkivanja replikacijske mašinerije. Međutim, sinteza zaostajućeg lanca se ne događa neprekinuto nego je potrebna vrlo usklađena koordinacija proteina DnaB i DnaG, te posebice DNA-polimeraze III. DNA-polimeraza istovremeno neprekinuto sintetizira vodeći lanac te Okazakijeve fragmente zaostajućeg lanca. Ovom procesu pomaže dio holoenzima DNA-polimeraze III, β -kvačica, koja pravovremeno smješta DNA-polimerazu III na oba lanca koordinirajući DNA sintezu. Paralelno sa sintezom DNA, DNA-polimeraza I popunjava praznine u novosintetiziranoj DNA te izrezuje RNA početnice kako bi ih ponovno sintetizirala (Nelson i Cox 2005, Yao i O'Donnell 2010, <https://www.genome.jp/kegg->

bin/show_pathway?org_name=sco&mapno=03030&mapscale=&show_description=hide)

(Slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz replikacije streptomocetnog genoma (preuzeto iz:

https://www.genome.jp/keggbin/show_pathway?org_name=sco&mapno=03030&mapscale=&show_description=hide).

1. 2. DNA-vezujući proteini

DNA-vezujući proteini su sveprisutni proteini koji imaju ključnu ulogu u većini staničnih procesa (Christova 2013). Ovi proteini imaju dvije važne stanične funkcije: sudjelovanje u organizaciji i kondenzaciji genomske DNA te regulaciji procesa kao što su transkripcija, replikacija te rekombinacija (Meyer i Laine 1990). Najpoznatiji primjeri DNA-vezujućih proteina su transkripcijski faktori koji svojim vezanjem molekule DNA na specifičnim sljedovima DNA reguliraju ekspresiju gena. Represor Lac je primjer transkripcijskog faktora koji regulira unos i katabolizam laktoze u stanicama *E. coli* (Nelson i Cox 2005). Uz transkripcijske faktore, proteini združeni s nukleoidom te različiti proteini tijekom replikacije i transkripcije su također primjeri DNA-vezujućih proteina.

DNA-vezujući proteini posjeduju DNA-vezujuće domene koje imaju afinitet prema jednolančanoj ili dvolančanoj molekuli DNA. DNA-vezujuće domene proteina su relativno male domene¹ (60-90 aminokiselina), a terciarna struktura tih je domena prostorno mala. Većina DNA-vezujućih proteina tvori interakcije s velikim utorom molekule DNA. Molekula DNA je negativno nabijena zbog fosfatnih skupina (PO_4^{3-}) pa su tako pozitivno nabijene aminokiseline one koje tvore interakcije (asparagin, glutamin, glutamat, lizin i arginin). Također, aminokiseline triptofan, tirozin i fenilalanin tvore interakcije s bazama nukleotida pomoću vlastitih aromatskih prstena. DNA-vezujući proteini su skupina proteina koja stupa u interakciju s molekulom DNA pomoću elektrostatskih interakcija (engl. *salt bridges*), dipolnih interakcija (vodikove veze), entropijskih efekata (hidrofobne interakcije) te privlačnih sila

¹ Proteinska domena (fold ili supersekundarna struktura) je strukturna jedinica koja se smata neovisno o ostatku proteina, a ima i različitu funkciju od ostatka polipeptidnog lanca (Nelson i Cox 2005).

(slaganje baza). Ove intramolekulske sile doprinose različitom afinitetu vezanja proteina s DNA - specifično ili nespecifično s obzirom na nukleotidni slijed. Što su međumolekulske sile između proteina i molekule DNA jače i snažnije, to je kompleks protein:DNA stabilniji, a i specifičniji s obzirom na nukleotidni slijed (Nelson i Cox 2005, <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-protein-interaction-analysis.html>).

Prema Rohs i sur. (2010), mehanizam interakcija između proteina i molekule DNA može biti dvojak - prepoznavanje baza te prepoznavanje oblika. Model prepoznavanja baza se temelji na svojstvima nukleotida (baza) te baznim parovima. Ovaj mehanizam uključuje stvaranje vodikovih veza između aminokiselina i baza, aminokiselina i vode, baza i vode te hidrofobnih veza. Ovakvo specifično prepoznavanje s obzirom na slijed se najčešće događa u velikom utoru DNA. Prepoznavanje oblika se temelji na strukturi određenog slijeda nukleotida pa tako različite strukture molekule DNA kao što je promjena širine malog utora i sl. potrebne kako bi protein prepoznao okosnicu molekule DNA.

Najpoznatiji strukturni motivi² DNA-vezujućih proteina su zavojnica-okret-zavojnica (engl. *helix-turn-helix*, HTH), cinkovi prsti (engl. *zinc finger*), leucinski zatvarač (engl. *leucine zipper*), bazična zavojnica-okret-zavojnica (engl. *basic helix-loop-helix*, bHLH), oligomer-vezujuća domena (engl. *oligomer-binding fold*, OB) te homeodomena. U prokariota, najpoznatiji strukturni motivi DNA-vezujućih proteina su HTH, krilata zavojnica (engl. *winged helix*, WH), krilata zavojnica-okret-zavojnica (engl. *winged helix-turn-helix*) te β -vrpca (engl. β ribbon) (Nelson i Cox 2005, Huffman i Brennan 2002).

Molekularne tehnike kojima se najčešće ispituje vezanje proteina na molekulu DNA u uvjetima *in vitro* su metoda otiska stopala (engl. *a DNase footprinting assay*), metoda pomaka fragmenta DNA u gelu tijekom elektroforeze (engl. *electrophoretic mobility shift assay*, EMSA), metoda southwestern, kvašćev sustav jednog hibrida (engl. *yeast one-hybrid assay*, Y1H), metoda izlaganja peptida na fagu (engl. *phage display*), metoda bliske ligacije (engl. *proximity ligation assay*, PLA) i metoda prijenosa rezonancije fluorescencije (engl. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET). Biofizičke metode koje se sve češće koriste su spektrometrija kružnog dikroizma (engl. *circular dichroism*, CD), izotermalna titracijska kalorimetrija (engl. *isothermal titration calorimetry*, ITC), mikroskopija atomske sile (engl. *atomic force microscopy*, AFM), nuklearna magnetska rezonancija (eng. *nuclear magnetic resonance*, NMR) te rezonancija površinskih plazmona (engl. *surface plasmon resonance*, SPR). Molekularna tehnika kojom se

² Motiv je način smatanja sekundarne strukture proteina (uočen u najmanje dva različita proteina), koji može uključivati samo dio ili cijeli polipeptidni lanac (Nelson i Cox 2005).

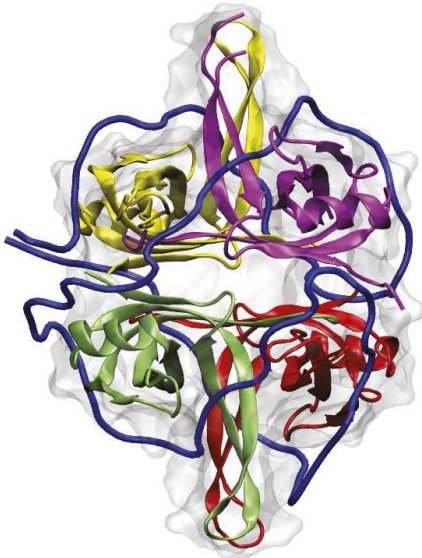
ispituje vezanje proteina na molekulu DNA u uvjetima *in vivo* je najčešće imunoprecipitacija kromatina (engl. *chromatin immunoprecipitation*, ChIP). Na kraju, mogu se i upotrijebiti različite metode u uvjetima *in silico* (<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/methods-detecting-protein-dna-interactions.html>).

1. 2. 1. Protein SSB

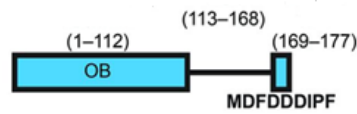
Protein SSB (engl. *single-stranded DNA-binding protein*, SSB) je esencijalan protein prokariotskih i eukariotskih stanica (Meyer i Laine 1990). Ovaj protein sudjeluje u replikaciji, popravku i rekombinaciji molekule DNA u svim organizmima (Wold 1997). Iako su proteini SSB pronađeni kod različitih organizama, unatoč niskoj homologiji nukleotidnih sljedova većina bakterijskih proteina ima sačuvanu strukturu i biološku ulogu (Štefanić i sur. 2007). Osim što je uloga proteina SSB da sudjeluje u stabilizaciji jDNA, ovi protein ostvaruju i interakcije s mnogim staničnim proteinima čime pomažu lokalizaciji proteinskih partnera ili moduliraju njihove aktivnosti. Svojstvo proteina SSB da tvori interakcije i s DNA i s proteinima je esencijalno za stanicu. Eubakterijski SSB vežu jDNA visoko-kooperativno što uzorkuje nakupljanje velikih količina proteina SSB na jDNA što je nužno za pravilnu replikaciju. Broj gena *ssb* na genomima različitih bakterijskih vrsta se jako razlikuje te seže od jednog pa do 24 gena koji kodiraju za protein SSB (Paradžik i sur. 2016).

Većina prokariotskih proteina SSB su homotetrameri. Struktura proteina SSB je najbolje proučena u modelnom organizmu bakteriji *E. coli* (**Slika 4 A**). Svaki se monomer proteina SSB bakterije *E. coli* (molekulska masa 19 kDa) sastoji od tri dijela: N-terminalne oligomer-vezujuće domene, C-terminalna regije (engl. *intrinsically disordered linker*, IDL), te C-kraja proteina koji je bogat aminokiselinama s kiselim bočnim ogrankom (**Slika 4 B**).

A)



B)



Slika 4. A) Trodimenzionalna struktura proteina SSB bakterije *E. coli*. Protein SSB je homotetramer koji ima simetriju prostorne grupe C 1 2 1. Protein SSB je kristaliziran u kompleksu s jIDNA duljine 70 nt. jIDNA smjera 5'- do 3'- tvori interakcije s monomerima proteina SSB u smjeru žutog, ljubičastog, zelenog i crvenog označenog monomera (preuzeto iz: Suksombat i sur. 2015).

B) Prikaz domena monomera proteina SSB bakterije *E. coli*: DNA-vezujuća domena (oligomer-vezujuća domena), C-terminalna regija IDL te kiseli vrh sastavljen od devet aminokiselina (MDFDDDIPF) (preuzeto iz: Kozlov i sur. 2015, Waldman i sur. 2016).

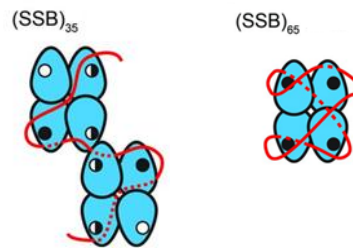
N-terminalna oligomer-vezujuća domena sudjeluje u oligomerizaciji proteina SSB. Navedena je domena prisutna u strukturi velikog broja proteina koji imaju afinitet prema oligosaharidima ili oligonukleotidima (Murzin 1993). Oligomer-vezujuća domena je građena od pet antiparalelnih β -ploča koje tvore bačvu (Dickey i sur. 2013). Aminokiseline navedene domene tvore interakcije s jIDNA pomoću elektrostatskih interakcija te interakcija slaganja baza s fosfodieterskom ovojnicom te bazama nukleotida. U vezanju jIDNA u proteinu SSB bakterije *E. coli* sudjeluju aminokiseline Phe60, His55, Trp54 te Trp40. Vezana jIDNA je dodatno stabilizirana argininima koji se nalaze na površini proteina. Protein SSB veže jIDNA s velikim afinitetom (K_d iznosi $0,01 \text{ nmol dm}^{-3}$ u prisutnosti soli koncentracije 200 mmol dm^{-3}) te disocira sporo ($0,0059 \text{ s}^{-1}$) (Maffeo i Aksimentiev 2017). U bakteriji *Bacillus subtilis* pokazano je da fosforilacija tirozin-kinazama na bočnom ogranku Tyr82 povećava afinitet za jIDNA 200 puta. Bakterija *E. coli* ima u svojoj strukturi ukupno četiri tirozina, dok su Tyr78 i Tyr98 strukturno najbliži Tyr82 bakterije *B. subtilis*. Sukladno tome, smatra se da su Tyr78 i Tyr98 bakterije *E. coli* također podložni fosforilaciji (Mijaković i sur. 2006).

C-kraj (SSB-Ct) proteina SSB važan je za ostvarivanje interakcija s proteinskim partnerima. Ove interakcije protein SSB ostvaruju pomoću C-kraja koji sadrži očuvane kisele i hidrofobne segmente. Takav se slijed ponekad naziva i kiseli vrh (engl. *acidic tip*), a kod bakterije *E. coli* sadrži očuvani aminokiselinski slijed Asp-Phe-Asp-Asp-Asp-Ile-Pro-Phe (MDFDDDIPF). Ispitivanja su pokazala da ciljane mutacije Pro i Phe u Ser, utječu na preživljenje i fenotip bakterijske stanice *E. coli* iz čega se zaključilo da SSB-Ct vrlo bitan za normalnu funkciju stanice (Shereda i sur. 2008). Delecija C-kraja uzrokuje letalan fenotip (Costes i sur. 2010). C-kraj ima ulogu i u određivanju najkraće duljine jIDNA koju veže protein SSB (Huang i Huang 2014). Povrh svega, kiseli vrh kompetira za DNA-vezno mjesto svog proteina SSB te tvori slabe interakcije s oligomer-vezujućom domenom (Kozlov i sur. 2015)

Prije C-kraja nalazi se regija suštinske neuređenosti, tj. regija IDL (Bianco i sur. 2017). Regija IDL je vrlo varijabilna (Dunker i sur. 2001) s obzirom na aminokiselinski slijed proteina SSB, što znači da nije očuvana te je jedinstvena za svaku bakteriju. Nedavno je utvrđeno kako regija IDL kod bakterije *E. coli* posjeduje poliprolinsku uzvojniju tipa II (PPII) i motive PXXP (prolin - X - X - prolin) te GGX (glicin - glicin - X). Motiv PXXP veže OB-domene interakcijskih partnera. Pošto i sam protein posjeduje oligomer-vezujuću domenu, vezanjem regije IDL na oligomer-vezujuću domenu susjednog tetramera SSB, postiže se veća kooperativnost i stabilnost strukture SSB:DNA. Upravo fleksibilnost regije IDL omogućava interakcije između proteina SSB (Bianco i sur. 2017).

S obzirom na način vezanja jIDNA, u bakteriji *E. coli* mogu nastati tri različita kompleksa SSB:DNA. Odnosno, tetramer protein SSB veže jIDNA na tri različita načina. Ova tri načina vezanja DNA ovise o monovalentnoj koncentraciji soli, koncentraciji iona Mg^{2+} te prisutnosti poliamina, spermina i spermidina (Shereda i sur. 2008). Tri oblika proteinskih kompleksa SSB:jIDNA pri 25 °C su: $(SSB)_{35}$, $(SSB)_{56}$ i $(SSB)_{65}$, gdje broj označava broj nukleotida dT vezanih oko jednog tetramera proteina (Bujalowski i sur. 1988). U kompleksu sa 65 vezanih nukleotida SSB tvori interakcije s jIDNA preko sva četiri monomera, a u kompleksu s 35 vezanih nukleotida sa samo dva monomera proteina SSB (**Slika 5**). Navedeni oblici kompleksa SSB:jIDNA mogu reverzibilno prelaziti jedan u drugi pa tako promjenom koncentracije soli i koncentracije proteina s obzirom na jednolančani ligand prelaze iz jednog oblika kompleksa u drugi (Bujalowski i Lohman 1986). Delecija slijeda SSB-Ct utječe na relativnu stabilnost kompleksa $(SSB)_{65}$ i $(SSB)_{35}$ (Shereda i sur. 2008). Oblik kompleksa $(SSB)_{65}$ je prisutan kada je koncentracija soli veća od 200 mmol dm^{-3} (Shereda i sur. 2008). Oblik kompleksa $(SSB)_{35}$ se preferira kada je omjer SSB/jIDNA u korist proteina. U kompleksu $(SSB)_{35}$ protein SSB se veže visokom kooperativnošću na jIDNA tvoreći niz proteina na jIDNA. Kooperativnost vezanja jIDNA ovisi o duljini i aminokiselinskom sastavu regije IDL te prisutnosti kiselog vrha (Kozlov

i sur. 2015). U kompleksu $(SSB)_{65}$ protein SSB se veže s niskom kooperativnošću na jIDNA slabo tvoreći niz proteina na jIDNA (Shereda i sur. 2008). Smatra se da spomenuti model vezanja i stvaranja nakupina daje naznaku mehanizma proteina SSB prilikom replikacije DNA. Na kraju, zaključuje se da protein SSB sva tri načina vezanja jIDNA koristi prilikom različitih stadija održavanja stabilnosti genoma i da ovakvi prijelazi između oblika kompleksa služe kako bi se različiti proteinski partneri vezali ovisno stadiju staničnog metabolizma (Suksombat i sur. 2015).



Slika 5. Shematski prikaz tetramera proteina SSB bakterije *E. coli* (plavo) s vezanom jIDNA (crveno) u obliku kompleksa $(SSB)_{35}$ i $(SSB)_{65}$. Oblik kompleksa $(SSB)_{35}$ je prikazan s dva tetramera proteina SSB kako bi se predočila kooperativnost procesa vezanja DNA. JIDNA okružuje tetramer proteina SSB. Oblik kompleksa $(SSB)_{65}$ ima sva četiri DNA-vezna mjesta u oligomer-vezujućoj domeni zauzeta (crni krug), dok u obliku kompleksa obliku kompleksa $(SSB)_{35}$ jedno je vezno mjesto oligomer-vezujuće domene u potpunosti zauzeto (crni krug), dva su djelomično zauzeta (djelomično crni krug) dok je jedno mjesto potpuno slobodno (bijeli krug) (preuzeto iz: Kozlov i sur. 2015, Waldman i sur. 2016).

Neki od proteinskih partnera koji tvore interakciju s proteinom SSB su: DNA-polimeraza III, primaza, topoizmoreza III, RecG, RecJ, RecO, RecQ, PriA, PriB, PriC, egzonukleaza I, uracil-DNA-glikozilaza, DNA-polimeraza II, DNA-polimeraza V te egzonukleaza IX. Protein SSB pomaže nastajanju nukleofilamena proteina RecA (Wu i sur. 2017).

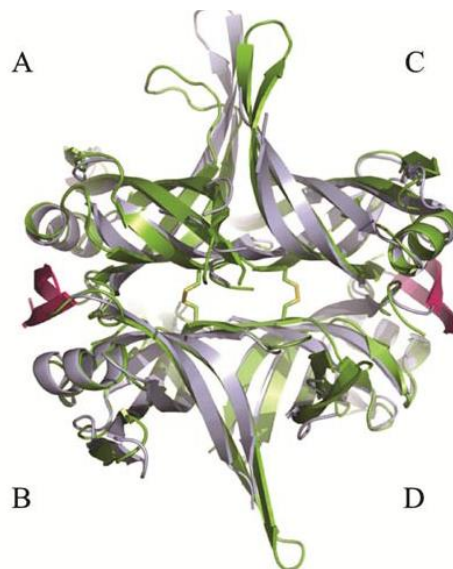
Zanimljivo je uočiti da su proteini slični proteinu SSB s obzirom na funkciju (vezanje jIDNA) pronađeni i kod virusa herpes simpleks 1 (Mapelli i sur. 2005). Povrh svega, mitohondriji eukariotskih stanica u svojem genomu također sadrže zasebnu kopiju gena *ssb* (Tiranti i sur. 1993).

1. 2. 1. 1. Proteini SSB bakterije *S. coelicolor*

S. coelicolor sadrži dva gena *ssbA* i *ssbB* (engl. *single-strand binding protein A, B*) koji kodiraju za dva paralogna proteina SsbA i SsbB. Delecija gena *ssbB* uzrokuje nepravilno razdvajanje kromosoma tijekom sporulacije (Paradžik i sur. 2013). Oba gena se nalaze na sredini fizičke mape bakterijskog kromosoma, na dijelu genoma koji nije podložan čestim delecijama i gdje se nalaze mnogi esencijalni geni. Gen *ssbA* (oznaka lokusa SCO3907) kodira za protein od 199 aminokiselina (Uniprot pristupni broj Q9X8U3), dok gen *ssbB* (oznaka lokusa SCO2683)

kodira za protein od 156 aminokiselina (Unioprot pristupni broj Q9KYI9). Oba aminokiselinska slijeda su 35% identična. Očuvana primarna struktura se nalazi u prvih 110 aminokiselina. Taj očuvani dio aminokiselinskog slijeda tvori oligomer-vezujuću domenu koja je zaslužna za vezanje jLDNA. Proteinski sljedovi se razlikuju u regiji C-kraja, odnosno regiji IDL i kiselom vrhu. C-terminalnu regiju proteina SsbA čini 89 aminokiselina, dok istu regiju proteina SsbB čini 50 aminokiselina. Protein SsbA poput većine proteina SSB ima vrlo konzerviran slijed N-kraja, kiseli vrh. Nasuprot tome, protein SsbB ne sadrži navedeni aminokiselinski slijed (Paradžik i sur. 2013, Shereda i sur. 2008).

Proteini SsbA i SsbB su homotetrameri. U dijelu koji je vidljiv u modelu, trodimenzionalna struktura oba proteina je vrlo slična uz manje razlike (**Slika 6**). Kristalna struktura proteina SsbA je otkrila da su dva monomera, za razliku od proteina SSB bakterije *E. coli*, povezana dodatnom β kvačicom (engl. *β clamps*) koja pridonosi stabilnosti samog proteina (Štefanić i sur. 2007). Prema literaturi, mehanizam kvačice je karakteristika proteina kod Gram-pozitivnih bakterija čiju su genomi bogati GC parovima baza. Za razliku od trodimenzionalne strukture proteina SSB bakterije *E. coli* koja ima sferičan oblik, strukture proteina SsbA i SsbB imaju elipsoidni oblik (Raghunathan i sur. 1997). Kristalna struktura proteina SsbB, za razliku od strukture proteina SsbA, nema povezana dva monomera β -kvačicom, nego s dva disulfidna mosta (Paradžik i sur. 2013).

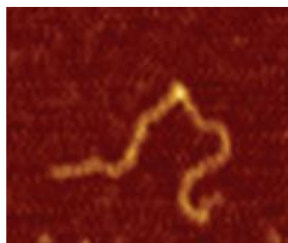


Slika 6. Preklopljene kristalne strukture proteina SsbB (zeleno) i SsbA (sivo). Monomeri proteina su označeni A, B, C i D. Disulfidni mostovi proteina SsbB koji povezuju dva monomera su prikazani kao žuti štapići, dok je β -kvačica proteina SsbA prikazana kao ružičasta vrpca (preuzeto iz: Paradžik i sur. 2013).

1. 2. 2. Protein HU

Protein HU (engl. *histon-like protein*) je DNA-vezujući protein čija je glavna uloga u bakterijskoj stanici čuvanje integriteta genoma. Ovaj je protein prisutan kod većine eubakterija i arheja, a sudjeluje u procesima replikacije, rekombinacije, popravka, genskoj regulaciji te u pakiranju molekule DNA (genoma) (Grove 2011, Wojtuszewski i sur. 2011). Prema Mukherjee i sur. (2008), smatra se da protein HU povećava stabilnost i onemogućava denaturaciju pri višim temperaturama. HU je jedan od najbrojnijih bakterijskih proteina koji ima mogućnost savijanja DNA (Gruber 2004). Ovaj protein pripada obitelji proteina koji sudjeluju u stvaranju strukture DNA, što znači da HU stabilizira i još dodatno pakira bakterijske nukleoproteinske komplekse (Wojtuszewski i sur. 2011). Takvi kompleksi su analogni eukariotskom kromatinskom vlaknu.

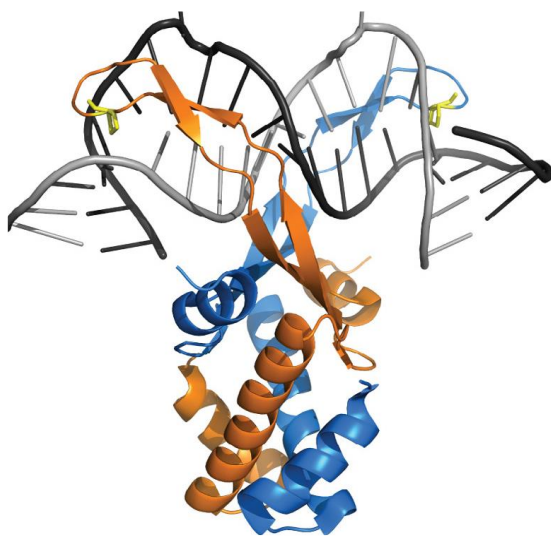
Protein HU pripada skupini proteina zvanih proteinska obitelj HU/IHF (engl. *integration host factor*), tj. DNA-vezujući proteini tipa II. Također, ovaj se protein nekada svrstava u proteine združene s nukleoidom (eng. *nucleoid associated proteins*, NAP). NAP-ovi su vrlo mali proteini kojih ima vrlo velika količina u stanici (30000 monomera/stanica), a najpoznatiji primjeri proteina ove skupine, uz HU, su H-NS (engl. *histone-like nucleoid-structuring protein*), IHF (engl. *integration host factor*), Dps (engl. *DNA binding proteins from starving cells*) te FIS (engl. *factor for inversion stimulation*) (Grove 2011, Gruber 2004). Za razliku od transkripcijskih faktora koji često vežu DNA kao monomeri ili dimeri, proteini združeni s nukleoidom se vežu kooperativno u velikom broju (Atlung i Hansen 2002). Protein HU se naziva 'histonu sličan protein' jer funkcijom nalikuje na eukariotske histone. Uloga proteina HU je smanjivanje krutosti molekule B-DNA te smanjivanje negativne superzavijenosti kako bi se omogućila kondenzacija molekule DNA pomoću superzavoja (Grove 2011, Guo i Adhya 2007). Prema Rouviere-Yaniv i sur. (1979), jedan od prvih dokaza kondenzacije molekule DNA pomoću proteina HU je povećanje debljine molekule DNA, u prisutnosti proteina HU, s 20 na 60 Å. Prema van Noortu i sur. (2004), protein HU uzrokuje savijanja molekule DNA čak do 140° (**Slika 7**).



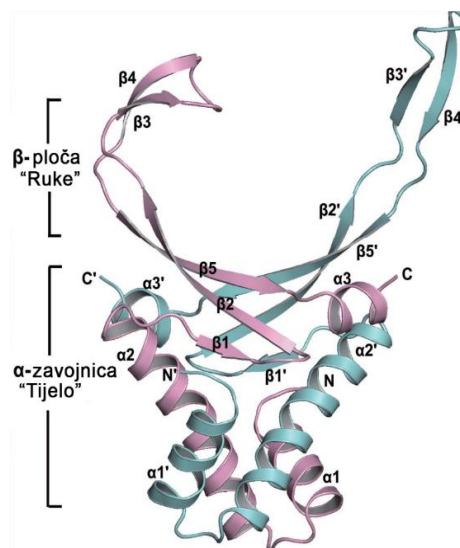
Slika 7. Fotografija dobivena mikroskopom atomske snage proteina HU koji uvodi savijanja DNA. Dvolančana DNA duljine 1000 parova baza inkubirana s 18 nmol dm⁻³ HU (1 dimer proteina HU naprema 92 parova baza DNA). Savijanje DNA molekule je iznosilo između 105° i 139° (preuzeto iz: van Noort i sur. 2004).

Protein HU bakterije *E. coli* potiče inicijaciju odmatanja zavojnice DNA u izvorištu replikacije *oriC* interakcijom s N-terminalnim krajem proteina DnaA te stabilizacijom oligomera DnaA (Chodavarapu i sur. 2008). Nadalje, pokazano je da protein HU štiti bakteriju *Helicobacter pylori* od staničnog stresa (Wang i sur. 2012). Bakterija koja ima deleciju gena *hu* je vijabilna jer se funkcija proteina HU može kompenzirati povećanom ekspresijom gena DNA-giraze i topoizomeraze I (Bensaid i sur. 1996, Malik i sur. 1996). Gen koji kodira za protein HU je pronađen i u genomu kloroplasta nekih algi. Homolog gena *hu* je pronađen u mitohondrijima kvasca *S. cerevisiae* (Caron i sur. 1979, Grove 2011).

Ovaj DNA-vezujući protein je vrlo mali, bazičan i temperaturno stabilan protein. Stabilnost proteina ovisi o koncentraciji soli te u uvjetima 1 mol dm⁻³ NaCl iznosi 60-72 °C (Boyko i sur. 2016). Bakterija *E. coli* posjeduje dva paraloga gena koji kodiraju za proteine HU - *hupA* i *hupB*. Gen *hupA* kodira za polipeptidni lanac Hu α , a gen *hupB* kodira za polipeptidni lanac Hu β . Homodimer Hu β 2, odnosno HupB nema svojstvo kompaktnog smatanja DNA, za razliku od Hu α 2 i Hu α β (Claret i Rouviere-Yaniv 1997). U uvjetima *in vitro* protein HU može postojati kao homodimer Hu α 2, Hu β 2 ili heterodimer Hu α β . Homo- ili heterodimeri ovog proteina imaju istu ulogu samo u različitim fazama rasta. U uvjetima *in vivo* tijekom faze eksponencijalnog rasta bakterija prisutni su samo dimeri Hu α 2 i Hu α β . U stacionarnoj fazi rasta većinom je prisutan samo heterodimer Hu α β koji je nužan za preživljenje bakterije nakon duljeg perioda gladi. Kristalna struktura Hu α β bakterije *E. coli* slična Hu α 2 iz istog organizma te homodimere iz organizama *Thermotoga maritima*, *Bacillus stearothermophilus* i *Anabaena* (Guo i Adhya 2007). α i β polipeptidni lanac se razlikuju u 70% aminokiselina. Svaki se lanac sastoji od tri α -zavojnice i pet β -ploča. Protein HU, kao dimer, ima šest α -zavojnica i deset β -ploča. Raspodjelom i organizacijom navedenih motiva sekundarne strukture, struktura proteina HU se može opisati kao tijelo sastavljeno od α -zavojnica te ruke sastavljene od β -ploča (Kim i sur. 2014, Swinger i sur. 2003) (**Slika 8**). Smatra se da β -ploče s pozitivno nabijenim aminokiselinskim bočnim ograncima (bazični aminokiseline 50-80, npr. aminokiselinski bočni ogranci lizina, arginina) tvore interakcije s malim utorom heliksa DNA dok se dva prolina (Pro63 u bakteriji *Bacillus subtilis*) interkaliraju u DNA što uzrokuje nagla i oštra savijanja molekule (**Slika 9**). Dio proteina HU koji tvori interakcije s molekulom DNA naziva se β -ruke (engl. *β arms*) (Grove i Saavedra 2002, Swinger i sur. 2003). Vrlo dobro očuvan Lys3 je vrlo bitan za vezanje DNA (Grove i Saavedra 2002). Iako protein HU sadrži motiv HTH, on ne sudjeluje u interakcijama s molekulom DNA.



Slika 8. Protein HU svojim 'rukama' (tzv. β -ruka) veže mali utor heliksa DNA i interkalira se pomoću prolina. Lizin i arginin β -ruke pomažu stabilizaciji kompleksa Hu:DNA (preuzeto iz: Grove i Saavedra 2002, Gruber 2004).



Slika 9. Tridimenzionalna struktura dimera HU bakterije *Staphylococcus aureus* ima šest α -zavojnica ($\alpha 1-3, \alpha 1'-3'$) i deset β -ploča ($\beta 1-5, \beta 1'-5'$). Tijelo protein HU čine α -zavojnice, a ruke β -ploče. Fleksibilnost β -ruku (Arg55 u bakteriji *S. aureus*) određuje mehanizam prepoznavanja i vezanja DNA (preuzeto iz: Kim i sur. 2014).

Protein HU bakterije *E. coli* veže oko 9 parova baza (po monomeru) u malom utoru heliksa DNA (Broyles i Pettijohn 1986). Različiti bakterijski proteini HU vežu molekule DNA različitim afinitetom (Grove 2011). Jedan superzavoj molekule DNA bakterije *E. coli* omotan oko oktamera HU sadrži 64-68 parova baza (Guo i Adhya 2007). HU može tvoriti strukturu oktamera koja bi se u stanici potencijalno mogli udružiti u filamentozne nakupine oko kojih bi se DNA mogla omotati (Guo i Adhya 2007, van Noort i sur. 2004).

Konstante disocijacije kompleksa HU i dvolančane, ili jednolančane DNA, ili dvolančane RNA te hibrida DNA/RNA su ovisne o koncentraciji soli. Rezultati su pokazali kako je vezanje proteina HU na molekulu DNA nespecifično i s malim afinitetom. Specifičnosti vezanja proteina HU na molekulu DNA pridonose dodatni proteini koji potencijalno mijenjaju konformaciju DNA (Kobryn i sur. 1999). Vezanje proteina HU na dvolančanu DNA je kooperativno, za razliku od vezanja na jLDNA (Kamashev i sur. 2008). Pomoću *ChiP-seq* analize je dokazano da protein HU veže veliki broj različitih molekula RNA - tRNA, mRNA i rRNA (Macvanin i sur. 2012). Protein HU bakterije *Mycobacterium tuberculosis* fosforiliran je na aminokiselinama Thr65 i Thr74 ne veže molekulu DNA (Gupta i sur. 2014). Sastav baza također utječe na vezanje proteina HU pa se tako afinitet vezanja jLDNA smanjuje od poli(dG), nasumični GC, poli(dC), poli(dT) i poli(dA) (Kamashev i sur. 2008).

1. 2. 2. 1. Proteini HU bakterije *S. coelicolor*

S. coelicolor sadrži dva paraloga - *hupA* te *hupS*. Protein HupA (molekulska masa dimera 21 kDa, Uniprot pristupni broj P0A3H5) dijeli 40% sličnosti u aminokiselinskom slijedu s proteinom HupB bakterije *E. coli*. Protein HupS (molekulska masa 22 kDa, Uniprot pristupni broj P0A3H7) ima N-terminalni rep niske kompleksnosti koji sadrži slijed bogat lizinom i alaninom. Takvi slijedovi ostvaruju jače interakcije s molekulom DNA nego HupA, a istovremeno štite DNA od štetnih hidroksilnih radikala nastalih Fentonovom reakcijom (Takatsuka i sur. 2011). Navedeni polilizinski slijedovi slični su aminokiselinske repove (slijed (S/T)PKK) eukariotskih histona H1 (Grove 2011). HupA je protein združen s nukleoidom tijekom vegetativnog rasta, dok je protein HupS pronađen tijekom rasta sporogenih zračnih hifa i nastajanja spora. HupS, prema tome, ima ulogu u kondenzaciji kromosoma spora (Salerno i sur. 2009). Kristalne strukture proteina HupA i HupS iz *S. coelicolor* nisu razriješene (**Prilog 1**).

1. 3. Proteinske interakcije

Stanica je kompleksan biološki sustav koji istovremeno odgovara na različite podražaje. Proteini čine ključne makromolekule staničnog sustava. Ovaj kompleksan sustav odgovara na podražaje okoline promjenom stanične koncentracije ovisno o fazi staničnog ciklusa. Unatoč svojoj ulozi, proteini često ne djeluju sami (bez liganda, partnera). Prema tome, vrlo je čest slučaj interakcije proteina s partnerom, posebice proteinskim partnerom. Protein-protein interakcije su ciljane i specifične interakcije između dva proteina (de las Rivas i Fontanillo 2010). Identifikacija proteinskih interakcija (interaktoma) pomaže boljem razumijevanju staničnih puteva. Smatra se da skoro svi stanični procesi zahtijevaju preciznu koordinaciju interakcija različitih molekula unutar stanice (Goebels 2014).

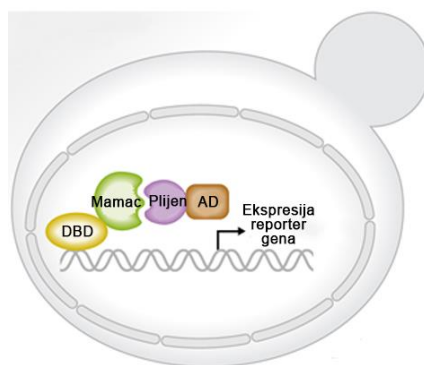
Interakcije između dva proteina mogu biti stabilne i nestabilne (nepostojane), jake i slabe te posredne i neposredne. Proteini se prepoznaju i tvore interakcije kroz kombinaciju hidrofobnog efekta, tvorbe vodikovih veza te van der Waalsovih sila (Reichmann i sur. 2007). Što je više ostvarenih interakcija između dva proteina, to je njihov afinitet vezanja veći. Vezna se mjesta obično nalaze na površini strukture proteina (Goebels 2014). Ovakve interakcije ovise o mnoštvu različitih čimbenika kao što su afinitet proteina prema drugom proteinu, koncentracija samih proteina, prisutnost ostalih liganda, prisutnost različitih soli te kovalentne modifikacije proteina. Biološki efekti nastanka interakcije mogu biti promjena kinetičkih svojstva enzima, konformacije proteina, nastanak novog veznog mjesta, inaktivacija ili degradacija proteina te regulatorna uloga u uzvodnim ili nizvodnim signalnim putevima (Goebels 2014).

1. 3. 1. Metode ispitivanja proteinskih interakcija *in vivo* i *in vitro*

Metode proučavanja interakcija između proteina dijelimo na metode za proučavanje velikog broja interakcija (visokoprotočne) i metode za proučavanje pojedinačnih interakcija. Kvalitativne metode za proučavanja velikog broja interakcija uključuju sustav dvaju kvašćevih hibrida (engl. *yeast two hybrid*, Y2H), sustav bakterijskih hibrida (engl. *bacterial two hybrid*, B2H), transfer fluorescentne energije rezonancijom (engl. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET) te tandemsko afinitetno pročišćavanje spregnuto spektrometrijom masa (engl. *tandem affinity purification - mass spectrometry*, TAP-MS). Kvalitativne metode za proučavanje pojedinačnih interakcija uključuju gel-filtraciju, metodu EMSA te supročišćavanje afinitetnom kromatografijom (engl. *pull down assay*). Kvantitativne metode za proučavanje pojedinačnih interakcija uključuju metode ravnotežnu dijalizu, metoda rezonancije površinskih plazmona (engl. *surface plasmon resonance*, SPR), izotermalnu titracijsku kalorimetriju te mikrotermoforezu (engl. *microscale thermophoresis*, MST). Ovim se metodama mogu proučavati stabilne i nestabilne interakcije. Ispitivanje nestabilnih interakcija se pospješuje unakrsnim povezivanjem (engl. *crosslinking*) dva potencijalna proteinska partnera čime se interakcija stabilizira te omogućava identifikaciju protein partnera.

1. 3. 1. 1. Sustav dvaju hibrida (kvašćevih i bakterijskih)

Sustav dvaju kvašćevih hibrida se temelji na činjenici da se transkripcijski aktivator GAL4 može razdvojiti na dva fragmenta: N-terminalni dio koji ima DNA-vezujuću domenu (engl. *DNA-binding domain*, DBD), te C-terminalnog dio koji ima aktivacijsku domenu. Želi li se ispitati interakcija dvaju proteina od interesa, jedan se protein fuzionira s DBD domenom (tzv. protein mamca), a drugi s aktivacijskom domenom (tzv. protein plijen). Ukoliko postoji interakcija proteina mamca s proteinom plijenom, dolazi i do rekonstrukcije funkcionalnog transkripcijskog aktivatora GAL4. Transkripcijski aktivator GAL4 DNA-veznom domenom se veže na svoje promotorsko mjesto te aktivacijskom domenom potiče vezanje RNA-polimeraze koja dovodi do transkripcije nizvodnog gena pokazatelja (**Slika 10**). Gen pokazatelj može biti enzim β -galaktozidaza koji razgrađuje metabolit 5-brom-4-klor-hidroksiindolil- β -D-galaktopiranozidazu (X-gal), uslijed čega nastaje plavo obojenje stanica kvasaca u kojima je došlo do interakcije dvaju proteina. Nadalje, auksotrofni markeri (LEU2, HIS3, ADE2, URA3, LYS2) se također često koriste kao geni pokazatelji (Nelson i Cox 2005, Snider i sur. 2015).



Slika 10. Shematski prikaz sustava dvaju kvašćevih hibrida (preuzeto iz: Snider i sur. 2015).

Zbog potencijalnih lažnih negativnih i pozitivnih rezultata ispitivanja interakcija prokariotskih proteina sustavom Y2H, napravljen je sustav pogodan za prokariote. Sustav dvaju bakterijskih hibrida se temelji na činjenici da se katalitička domena enzima adenilat-ciklaze bakterije *Bordetella pertussis* može razdvojiti na dva fragmenta: T25 i T18. Oba fragmenta su katalitički neaktivna ukoliko nisu u interakciji. Kao i u sustavu dvaju kvašćevih hibrida, jedan se protein fuzionira s domenom T25, a drugi s domenom T18. Ukoliko postoji interakcija proteinskih partnera, dolazi i do rekonstrukcije funkcionalne katalitičke domene. U prisutnosti ATP-a, ovaj enzim sintetizira cAMP koji se zajedno s proteinom CRP (engl. *cAMP receptor protein*) veže na odgovarajuće promotorsko mjesto. Sukladno tome, dolazi do ekspresije nizvodnog gena pokazatelja (<https://www.creative-biolabs.com/bacterial-two-hybrid-b2h-service.html>).

1. 3. 1. 2. Afinitetno pročišćavanje spregnuto spektrometrijom masa

Supročišćavanje afinitetnom kromatografijom (eng. *pull-down assay*) je metoda u uvjetima *in vitro*. Ova se metoda primjenjuje za ispitivanje protein-protein interakcija na kromatografskoj koloni, a vrlo je pogodna za ispitivanje stabilnih i/ili jakih interakcije između interaktanata. Metoda supročišćavanja se temelji na proteinskom paru mamac - plijen (engl. *bait - prey*). Protein mamac je protein eksprimiran u ekspresijskom vektoru s fuzijskim privjeskom, što znači da se mamac veže na kromatografsku kolonu velikim afinitetom. Plijen je protein koji se eksprimira s gena u ekspresijskom vektoru ali bez proteinskog privjeska. Pošto protein plijen nema proteinski privjesak, protein plijen će se vezati na koloni samo ako je vezan protein mamac. Prema tome, ako postoji interakcija između proteina mamca i plijena, na koloni će biti vezani protein mamac u interakciji s protein plijenom. Nakon elucije s afinitetne kolone, frakcije se analiziraju pomoću SDS-PAGE. U svrhu supročišćavanja proteina koriste se različiti privjesci (**Tablica 1**). (Bauer i Kuster 2003, Brymora i sur. 2004, Kaiser i sur. 2011).

Tablica 1. Uobičajeni fuzijski privjesci s pripadajućim ligandima (preuzeto iz: <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/pull-down-assays.html>).

Proteinski privjesak	Ligand
glutation-S-transferaza	glutation
heksahistidin	Ni-NTA agaroz
biotin	streptavidin

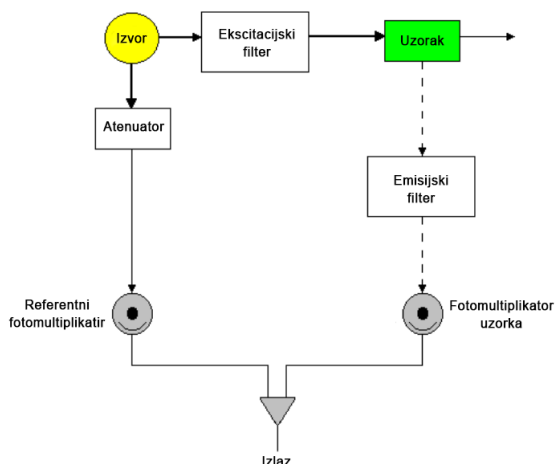
Tandemsko afinitetno pročišćavanje je brza metoda pročišćavanja proteina u nativnim uvjetima u stanicama različitih bioloških sustava poput kvasca *S. cerevisiae*, bakterije *E. coli* te humanim staničnim linijama (Collins i Choudhary 2008). Ova metoda, spregnuta spektrometrijom masa, se koristi za identifikaciju proteinskih kompleksa. Metoda se temelji na fuziji privjeska TAP s N- ili C-krajem ciljnog proteina i unosa takvog konstrukta u organizam domaćina. Prva metoda koristila je privjesak TAP koji se sastoji od dva dijela: imunoglobulin G (IgG) vezne domene proteina A (ProtA), mjesta cijepanja proteaze TeV i kalmodulinskog veznog peptida (engl. *calmodulin binding peptide*, CBP). Ova metoda se temelji na pročišćavanju proteina od interesa na dvije kromatografske kolone čime se postižu kvalitetniji rezultati. Proteinski ekstrakt, u kojem je nadeksprimiran fuzijski protein, nanosi se na afinitetnu kolonu koja se sastoji od zrnca imobiliziranih s IgG. Protein ProtA ima vrlo visoki afinitet za IgG pa se tako samo nadeksprimiran fuzijski protein veže za kolonu. Korištenjem proteaze TeV pocijepa se veza između proteina ProtA i CBP-a te se eluat, koji sada sadrži fuzijski protein zajedno sa svojim potencijalnim partnerima, nanosi na drugu afinitetnu kolonu imobiliziranu kalmodulinskim zrcima s ionima Ca^{2+} . Elucija proteinskih kompleksa od interesa postiže se pomoću EGTA ili EDTA koja veže ione Ca^{2+} . Na kraju, proteinski kompleksi se mogu analizirati pomoću SDS-PAGE-a, analizom po westernu a proteinski interaktanti identificiraju se pomoću spektrometrijom masa.

1. 3. 1. 3. Fluorescencijska spektrofotometrija

Metoda fluorescencijske spektrofotometrije se temelji na Stokesovom pomaku, odnosno na svojstvu fluorescencije. Stokesov pomak je fenomen koji opisuje molekulu (fluorofor) koja primi fotone svjetlosti određene valne duljine. Elektroni takve molekule postaju pobuđeni te odlaze u pobuđeno stanje. Nakon par nanosekundi, elektroni se vraćaju u početno stanje emitirajući fotone svjetlosti. Ta svjetlost je manje valne duljine nego valna duljina apsorbirane svjetlosti

(<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch0>)

4s07.html). Ovaj se opisani fenomen koristi prilikom rada fluorimetrijskog spektrofotometra (**Slika 11**). Aromatske aminokiseline triptofan, tirozin i fenilalanin se koriste u navedene svrhe.



Slika 11. Shematski prikaz fluorimetrijske spektrofotometrije. Izvor svjetlosti emitira bijelu svjetlost koja se propušta kroz monokromator ili ekscitacijski filter. Tu se bijela svjetlost selektira i postaje svjetlost samo jedne valne duljine. Takva se monokromatska svjetlost propušta kroz uzorak kojeg apsorbira. Elektroni fluorofora uzorka postaju pobuđeni te nakon toga se vraćaju u osnovno stanje tijekom kojeg se oslobađa svjetlost samo nekih valnih duljina. Oslobođena svjetlost se propušta monokromator ili emisijski filter čime se postiže selekcija svjetlosti određene valne duljine (preuzeto iz: <https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/lumin3.htm>).

Fluorimetrijska spektrofotometrija može se koristiti za proučavanje, između ostalog, protein-protein te protein-DNA interakcija. Ako jedan od proteina od interesa posjeduje aromatske aminokiseline, a drugi protein nema fluorescentna svojstva takav se proteinski par može ispitati ovom metodom (Nelson i Cox 2005). Što se više aminokiselina s velikim intenzitetom fluorescencije nalazi u jednom od ispitivanih proteina, to je i osjetljivost ove metode veća (**Tablica 2**). Ukoliko postoji interakcija između dva potencijalna proteinska partnera, dolazi do promjene konformacije proteina, a time i razmještaja aromatskih aminokiselina u prostoru. Fluorescencija aromatskih aminokiselina, posebice triptofana, ovisi o okolini te aminokiseline (npr. izlaganje otapalu) (Lakowicz 2006). Prema tome, postojanje interakcije između dva proteina ili proteina i DNA potvrđuje se promjenom intenziteta fluorescencije kompleksa u usporedbi s intenzitetom fluorescencije samog proteina koji posjeduje aromatske aminokiseline.

Tablica 2. Svojstva aromatskih aminokiselina koje se koriste u metodi fluorescencijske spektrofotometrije prilikom ispitivanja protein-protein interakcija (preuzeto iz: <https://www.biotek.com/resources/application-notes/peptide-and-amino-acid-quantification-using-uv-fluorescence-in-synergy-ht-multi-mode-microplate-reader/>).

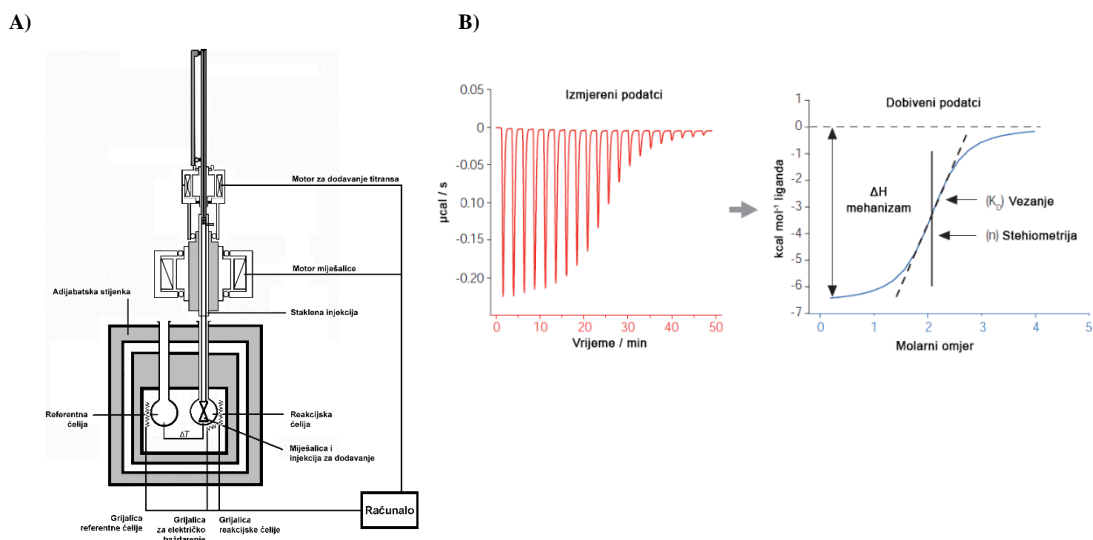
Aminokiselina	Valna duljina apsorbancije / nm	Valna duljina fluorescencije / nm
Triptofan (W)	280	348
Tirozin (Y)	274	303
Fenilalanin (F)	257	282

Na svojstvu fluorescencije molekula (fluorecencije različitih fuzijskih privjesaka) temelje se i ostale metode za ispitivanja proteinskih interakcija koje uključuju metodu FRET, PLA te komplementacijsku metodu bimolekularne fluorescencije (engl. *bimolecular fluorescence complementation assay*, BiFC) i bimolekularne luminiscencije (engl. *bimolecular luminescence complementation assays*, BiLC) (Velasco-Garcia i Vargas-Martínez 2012).

1. 3. 1. 4. Izotermalna titracijska kalorimetrija

Izotermalna titracijska kalorimetrija je metoda kojom se mogu ispitivati različiti procesi interakcija i različita međudjelovanja kao što su protein-protein, male molekule-protein, protein-DNA te enzimski kinetika i aktivnost antitijela (Liang 2008). Izotermalnom titracijskom kalorimetrijom moguće je odrediti termodinamičke reakcijske veličine kao što su reakcijska entalpija, entropija i konstanta ravnoteže. Reakcijska entalpija i entropija mogu se odrediti i drugim analitičkim metodama, iz ovisnosti konstante ravnoteže o temperaturi, što zahtijeva izvedbu većeg broja eksperimenata. Velika osjetljivost titracijskih kalorimetara i direktno određivanje termodinamičkih parametara reakcije čine izotermalnu kalorimetriju često korištenom metodom u kemiji i biologiji. Metoda se temelji na titraciji supstrata s ligandom u reakcijskoj ćeliji pri uvjetima konstantne temperature. Ligand se dodaje postupno u malim obrocima na dobro zasićenu površinu sa supstratom. Ukoliko dođe do interakcije liganda sa supstratom, mala količina topline se primi ili otpusti sve dok se reakcija ne uravnoteži. Takav se postupak ponavlja sve dok se supstrat u potpunosti ne zasiti s ligandom. U metodi izotermalne titracijske kalorimetrije toplinski efekt reakcije nastoji se poništiti istom količinom topline s obzirom na referentnu ćeliju, koja se u kalorimetar uvodi preko grijaćih i hladećih električkih elemenata (**Slika 12 A**). Uređaj bilježi snagu uloženu za poništenje reakcije liganda i supstrata. Iz navedenih podataka o uloženoj snazi uređaja mogu se izračunati konstanta asocijacije liganda sa supstratom (K_a), stehiometrija reakcije te termodinamičke vrijednosti promjene entalpije (ΔH), entropije (ΔS) te slobodne Gibbsove energije (ΔG) za navedenu reakciju (<http://biochem.cores.ucla.edu/instrumentation/bioanalytical/itc200/>) (**Slika 12 B**). Prednost

ove metode tijekom ispitivanja interakcija proteina je da se proteini ne trebaju obilježavati i imobilizirati jer to često utječe na konformaciju proteina i interakciju, ali i postojanje te jačinu interakcije (Liang 2008).



Slika 12. A) Shematski prikaz uređaja za izotermalnu titracijsku kalorimetriju.

B) Slika pokazuje podatke (prvi graf, tzv. termogram) čija se površina integrira kako bi se takvi podatci predočili u Wisemanovom prikazu (drugi graf, tzv. izoterma). Iz posljednjeg grafičkog prikaza može se odrediti entalpija (ΔH), konstanta asocijacije (K_a) te stehiometrija reakcije. Termodinamičke veličine entropije (ΔS) te slobodne Gibbsove energije (ΔG) se dobivaju iz ovisnosti $\Delta G = RT \ln K_a$ te $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ (Nelson i Cox 2005, preuzeto iz: <http://biochem.cores.ucla.edu/instrumentation/bioanalytical/itc200/>).

1. 3. 1. 5. Spektroskopija kružnog dikroizma

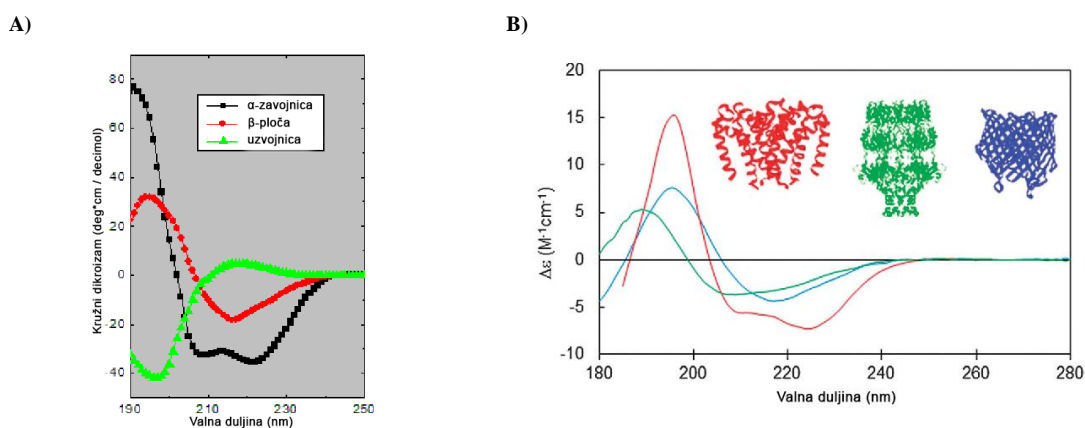
Proteini su kiralne molekule³. Zbog svojeg svojstva zakretanja svjetla mogu se koristiti različite metode prilikom ispitivanja proteina. Jedna od takvih metoda je i spektroskopija kružnog dikroizma. Spektroskopija kružnog dikroizma je kvantitativna spektroskopska metoda kojom se, između ostalog, u biokemiji određuje sekundarna struktura peptida, prati proces smatanja proteina i udio pravilnog smotanog proteina, ali i interakcije potencijalnih proteinskih partnera (Nelson i Cox 2005). Pomoću ove metode se može odrediti kako se mijenja sekundarna struktura proteina s obzirom na temperaturu, vrijednosti pH okoline ili prisutnost ostalih liganada te proteinskih interaktora. Ova metoda može dati strukturne, kinetičke i termodinamičke vrijednosti o ispitivanoj makromolekuli.

Spektroskopija kružnog dikroizma se temelji na premisi strukturne asimetrije molekule koja uzrokuje različitu apsorpciju lijevog i desno zakrenutog polariziranog svjetla. Ta se razlika apsorpcije svjetla naziva kružnim dikroizmom. Metoda mjerenja CD spektra se provodi pri

³ Kiralna molekula je molekula koja ima asimetrični centar (kiralni atom ili kiralni centar) i, zbog toga, može postojati u dva oblika, odnosno enantiomera.

svjetlosti valnih duljina iz područja vidljivog te ultraljubičastog spektra. CD spektar dalekog ultraljubičastog spektra (178-260 nm) potječe od amida proteinske okosnice (uzrokovano intrinzičnim promjenama proteina), dok CD spektar (260-350 nm) bliskog ultraljubičastog spektra potječe od aromatskih i prostetičkih grupa (uzrokovano ekstrinzičnim promjenama proteina). Ako je apsorbancija lijevo polariziranog svjetla veća od apsorbancije desnog polariziranog svjetla, tada je CD signal pozitivan, i obrnuto (<https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/CD%20spectroscopy.pdf>).

Iz grafičkog prikaza razlike molarnih ekstinkcijskih koeficijenata⁴ lijevog od desnog polariziranog svijetla s obzirom na valnu duljinu može se odrediti udio α -zavojnica i β -ploča u pojedinom proteinu, ali i proteinskom kompleksu (**Slika 13 A i B**). Naime, promjene položaja u prostoru prostetičkih i aromatskih grupa su uzrokovane proteinskim interakcijama. Prema tome, prilikom ispitivanja interakcija proteina ovom metodom prate se promjene spektra koje su proporcionalne količini stvorenih proteinskih kompleksa (Greenfield 2004).



Slika 13. A) Motivi sekundarne strukture posjeduju karakterističan oblik CD spektra što se koristi i za određivanje sekundarne strukture proteina (Nelson i Cox 2005). CD spektar α -zavojnica posjeduje karakterističan pad apsorbancije 208-222 nm i rast apsorbancije do 250 nm. CD spektar β -ploče posjeduje maksimum apsorbancije na 195 nm te minimum pri 218 nm. Ove dvije vrste sekundarnih struktura imaju različitu strukturu od one nasumične zavojnice (preuzeto iz: <https://www.ap-lab.com/circular-dichroism-services-cd-spec>).

B) CD spektar proteina različite sekundarne strukture. Crveni protein se sastoji samo od α -zavojnica, zeleni samo od β -ploča, dok je plavi protein sastavljen od α -zavojnica i β -ploča. Oblici spektra jednog α -zavojnica i proteina sastavljenog od α -zavojnica vrlo slični oblikom (isto vrijedi i za β -ploče i protein sastavljen sam od takvih elemenata sekundarne strukture). Plavi protein nema oblik CD spektra karakterističan samo za neki od elemenata sekundarne strukture (preuzeto iz: <https://www.semanticscholar.org/paper/Circular-dichroism-spectroscopy-of-membrane-Miles-Wallace/0b2dce5a7fdbcf0e7a86af4ce7921fb3e0d/figure/0>).

⁴ Prema Beer-Lambertovom zakonu, apsorbancija je proporcionalna molarnoj koncentraciji analita, putu svjetla i molarnom ekstinkcijskom koeficijentu (Nelson i Cox 2005).

2. Cilj

Dosadašnja istraživanja (Paradžik, Filić, Vujaklija) proteinskih partnera proteina SsbA bakterije *S. coelicolor* metodom tandemskog afinitetnog pročišćavanja spregnutog spektrometrijom masa kao i rezultate analize elulata spektrometrijom masa nakon afinitetnog supročišćavanja pokazala su da je protein HU jedan od potencijalnih partnera proteina SsbA.

Protein SSB je uključen u sve procese metabolizma DNA, ima važnu ulogu u replikaciji, popravku i rekombinaciji molekule DNA. Protein HU je zaslužan za integritet bakterijskog genoma ali sudjeluje i u regulaciju ekspresije gena, te replikaciji i rekombinaciji. Oba proteina su vrlo zastupljena u stanici, i oba vežu molekulu DNA.

Iz svega navedenog, hipoteza ovog rada je da proteini SsbA i HU (HupA) ostvaruju interakcije koje će se moći detaljnije istražiti u uvjetima *in vitro*. Također je pretpostavljeno da je za potrebe ispitivanja kompleksa SSB:HU, potrebno i detaljno analizirati uvjete vezanja proteina SsbA i SsbB za jednolančanu molekulu DNA.

Prema tome, cilj istraživanja je bio:

- a) Optimiziranje uvjeta pročišćavanja proteina SsbA i HU bakterije *Streptomyces coelicolor* u heterolognom domaćinu bakteriji *E. coli*, te pripremanje dovoljne količine pročišćenih proteina za nastavak istraživanja.
- b) Određivanje najmanje duljine jednolančane molekule DNA koju veže protein SsbA i SsbB u uvjetima *in vitro* metodom pomaka fragmenta DNA u gelu tijekom elektroforeze i pomoću fluorescencijske spektrofotometrije, te određivanje kako proteini te SsbA i HU međudjeluju u prisutnosti molekula DNA.
- c) Ispitivanje protein-protein interakcija između proteina SsbA i HU u uvjetima *in vitro* metodom pomaka fragmenta DNA u gelu tijekom elektroforeze te biofizikalnim metodama fluorescencijske spektrofotometrije, izotermalne titracijske kalorimetrije i spektroskopije kružnog dikroizma.

3. Materijali i metode

3. 1. Materijali

3. 1. 1. Standardne kemikalije

Akrilamid/bisakrilamid (30:1, 29%) (*BioRad*), amonijev sulfat (*Kemika*), ampicilin (*Sigma*), APS (*Promega*), β -merkaptoetanol (*Sigma*), borna kiselina (*Kemika*), ditioneitol (DTT) (*Sigma*), DMSO (*Sigma*), EDTA (*Sigma*), etanol (*Kemika*), EtBr (*Boehringer Mannheim*), fenilmetansulfonil fluorid (PMSF) (0,5 mg ml⁻¹) (*Life Technologies*), glicerol (*Sigma*), glicin (*Sigma*), imidazol (*Sigma*), izopropanol (*Kemika*), kalcijev klorid (*Kemika*), kalijev klorid (*Kemika*), kanamicin (*Sigma*), kloridna kiselina (*Kemika*), magnezijev klorid (*Kemika*), magnezijev sulfat (*Kemika*), natrijev klorid (*Kemika*), natrijeva lužina (*Kemika*), octena kiselina (*Kemika*), polietilenglikol (PEG) 3350 i 6000 (*Serva*), SDS (*Sigma*), Syber Gold (*Invitrogen*), TEMED (*Sigma*), Tris (*Sigma*), Tween 20 (*Sigma*).

3. 1. 2. Komercijalni kompleti

QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) za izolaciju plazmida, QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) za izolaciju DNA iz gelova agaroze, Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent za detekciju signala analize po westernu (*GE Healthcare*).

3. 1. 3. Enzimi i pripadajući puferi

Restriksijska endonukleaza BamHI (*ThermoFisher*) (10 jedinica μ l⁻¹), deoksiribonukleaza (DNaza) (*Sigma*) (2 mg ml⁻¹), pufer za cijepanje s restriksijskim endonukleazama FastDigest (*ThermoFisher*), restriksijska endonukleaza HindIII (*ThermoFisher*) (10 jedinica μ l⁻¹), Phusion DNA-polimeraza (*ThermoFisher*) (2 jedinice μ l⁻¹), pufer za Phusion DNA-polimerazu za GC bogate kalupe (*ThermoFisher*), T4 DNA-ligaza (*New England Biolabs*) (2 jedinice μ l⁻¹), pufer za T4 DNA-ligazu (*New England Biolabs*).

3. 1. 4. Ostali materijali

Φ X174 (*New England Biolabs*) (2 mg ml⁻¹), BSA (*BioRad*), dNTP smjesa (*Biolabs*), IPTG (*ITW Reagents*), Ni-NTA agarozna (*Qiagen*), DEAE-celuloza (*Serva*).

3. 1. 5. Standardi

Wide Range DNA ladder (*ThermoFisher*), Precision Plus Protein Unstained Standards (*BioRad*).

3. 1. 6. Boje

Bromfenol plavo (*Serva*), Coomassie Brilliant Blue G-250, Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Sigma*), ksilencijanil fluorofosfat (*Serva*).

3. 1. 7. Sastojci LB hranjive podloge

Agar (*Becton, Dickinson and Company*), kvaščev ekstrakt (*Liofilchem*), natrijev klorid (NaCl) (*Kemika*), tripton (*Becton, Dickinson and Company*).

3. 1. 8. Otopine

Agarozna boja
(10x koncentrirana otopina)

$c = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ EDTA pH= 8,0
 $\varphi = 50\%$ glicerol
0,4% (w/v) bromfenol plavo
0,4% (w/v) ksilencijanол fluorofosfat

Boja za nanošenje uzoraka i praćenje
elektroforeze proteina
(4x koncentrirana otopina)

$c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ β -merkaptоetanol
 $c = 0,25 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH = 6,8
 $\gamma = 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ bromfenol plavo
 $\gamma = 50 \text{ g dm}^{-3}$ SDS
 $\varphi = 25\%$ glicerol

Coomassie Brilliant Blue za bojanje SDS
gelova

$\varphi = 0,25\%$ Coomassie Brilliant Blue R-250
 $\varphi = 45\%$ etanol
 $\varphi = 10\%$ octena kiselina

Boja za nanošenje uzoraka na nativne gelove

$\varphi = 50\%$ glicerol
0,1% (w/v) bromfenol plavo
0,1% (w/v) ksilencijanол fluorofosfat

Bradfordov reagens

$\gamma = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$ Coomassie Brilliant Blue G-250
 $\varphi = 5\%$ etanol
 $\varphi = 8,5\%$ fosfatna kiselina

3. 1. 8. 1. Pufferi

5x KCM puffer za transformaciju bakterija

$c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ kalcijev klorid
 $c = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ kalijev klorid
 $c = 250 \text{ mmol dm}^{-3}$ magnezijev klorid

Pufer TAE (za elektroforezu nukleinskih kiselina u gelu agaroze)	$c = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ EDTA $c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ octena kiselina $c = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris pH = 8,0
Pufer pufer D (za EMSA-u)	$c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ natrijev klorid $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH = 8,0
Pufer TB (za EMSA-u)	$c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ borna kiselina $c = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris pH = 8,0
Pufer za SDS-PAGE elektroforezu	$c = 192 \text{ mmol dm}^{-3}$ glicin $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris $\gamma = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ SDS pH = 8,3
4x pufer za gel za razdvajanje (za SDS-PAGE)	$c = 1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris $\gamma = 4 \text{ mg ml}^{-1}$ SDS pH = 8,8
4x pufer za gel za sabijanje (za SDS-PAGE)	$c = 1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris $\gamma = 4 \text{ mg ml}^{-1}$ SDS pH = 6,8
Pufer za odbojavanje (za SDS-PAGE)	$\varphi = 10\%$ 2-izopropanol $\varphi = 10\%$ octena kiselina

Puferi za pročišćavanje proteina s privjeskom (His)₆ na Ni-NTA agarozu

Pufer za sonikaciju (lizu) stanica (pufer A) $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ imidazol
 $c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ magnezijev klorid
 $c = 600 \text{ mmol dm}^{-3}$ natrijev klorid
 $c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH = 7,5
 $\varphi = 10\%$ glicerol

Pufer za ispiranje (pufer B) $c = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$ imidazol
 $c = 300 \text{ mmol dm}^{-3}$ natrijev klorid
 $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH = 7,5
 $\varphi = 10\%$ glicerol

Pufer za eluciju proteina (pufer C) $c = 300 \text{ mmol dm}^{-3}$ imidazol
 $c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ natrijev klorid
 $c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH = 7,5
 $\varphi = 10\%$ glicerol

Puferi za pročišćavanje proteina s privjeskom (His)₆ na DEAE-celulozi

Pufer za ispiranje (pufer A₁) $c = 24 \text{ mmol dm}^{-3}$ natrijev klorid
 $c = 8 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH = 7,5

Pufer za čišćenje kolone $c = 400 \text{ mmol dm}^{-3}$ natrijev klorid
 $c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH = 7,5

Puferi za fluorimetrijsku spektrofotometriju

Pufer $c = 30$ ili 300 mmol dm^{-3} natrijev klorid
 $c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH = 7,5

Pufer za spektrometriju kružnog dikroizma

Pufer $c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ amonijev sulfat
 $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ Na-fosfatni pufer pH = 7,0

3. 1. 9. Oligonukleotidi

Tablica 3. Popis korištenih PCR početnica.

Naziv oligonukleotida	Slijed (5' → 3')	Svrha
5Bam F hu	GAGAGGATCCATGAACCGCAGT GAGCTG	uzvodna početnica korištena za izolaciju gena <i>hu</i> s genomske DNA i provjeru ugradnje u vektor pQE30
3Hind R hu	GAGACAAGCTTCTACTTGCCCT TGGCGGCTTC	uzvodna početnica korištena za izolaciju gena <i>hu</i> s genomske DNA i provjeru ugradnje u vektor pQE30

Restriksijska mjesta s odgovarajućim stršećim krajevima su obojana, start kodoni označeni su žuto. BamHI

– G▼GATCC, HindIII - A▼AGCTT.

Tablica 4. Popis korištenih oligonukleotida u ispitivanjima metodom EMSA.

Naziv oligonukleotida	Slijed (5' → 3')
HisCBP F (72 nt)	CCGGAATTCGGAGGACTCGCGATGCATCACCATCACCATCACGAA CTAAAGAGAAGATGGAAAAAGAATTTC
(dT) ₁₅	TTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₁₆	TTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₁₇	TTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₁₈	TTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₁₉	TTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₂₀	TTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₂₁	TTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₂₂	TTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₂₃	TTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₂₄	TTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₂₅	TTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₃₀	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₃₅	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₄₅	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
(dT) ₅₅	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTT

3. 1. 11. Bakterijski sojevi

Bakterijski soj *Escherichia coli* XL1

Bakterijski soj XL1-Blue (*Agilent Technologies*) je korišten za kloniranje (umnažanje) plazmidne DNA. Genotip soja je: *endA1 gyrA96 thi⁻¹ hsdR17 supE44 recA1 relA1 lac* [F'*proAB⁺ lacI^q ZAM15 Tn10* (Tet^r)]. Gen *recA* odgovoran je za rekombinaciju i popravak molekule DNA. Njegovom mutacijom onemogućena je homologna rekombinacija čime se osigurava stabilnost transformirane DNA. Mutacijom gena *endA1* (endonukleaza I) izbjegnuta je nespecifična razgradnja DNA, a mutacija gena *lacI^qZAM15* omogućava α -komplementaciju s amino-krajem β -galaktozidaze kodirane u pUC vektorima (tzv. plavo-bijela selekcija). Ovaj je soj otporan na antibiotik tetraciklin (<https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/genetic-markers>).

3. 2. Metode

3. 2. 1. Metode rada s makromolekulama DNA

3. 2. 1. 1. Kloniranje gena *hu* bakterije *S. coelicolor*

3. 2. 1. 1. 1. Umnažanje gena *hu* pomoću preparativnog PCR-a

U svrhu umnažanja gena *hu* na temelju genomske DNA *S. coelicolor* korištena je metoda PCR. PCR smjesa volumena 100 μ l se sastojala od 20 μ l 5x pufera Phusion GC s 7,5 mmol dm⁻³ MgCl₂, 10 μ l genomske DNA bakterije *S. coelicolor* (razrijeđenje 1:100, koncentracija 11 ng μ l⁻¹), 0,8 μ l 25 mmol dm⁻³ smjese dNTP-ova, 1 μ l Phusion DNA-polimeraze (2,5 jedinica μ l⁻¹), 5 μ l 10 μ mol dm⁻³ početnice 5Bam F *hu*, 5 μ l 10 μ mol dm⁻³ početnice 3Hind R *hu* i 58,2 μ l ReH₂O. Reakcijski uvjeti navedeni su u **Tablici 9**.

Tablica 9. Uvjeti reakcije preparativnog PCR-a u svrhu umnažanja gena *hu*.

Korak	Temperatura / °C	Trajanje ciklusa	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	5 min	1
Denaturacija		20 s	25
Vezanje početnice na kalup	72	45 s	
Produljenje lanca			

Ovim postupkom su dobiveni fragmenti PCR, odnosno odsjeci DNA s tupim krajevima. Umnoženi fragmenti DNA su analizirani agaroznom gel elektroforezom te pročišćeni pomoću kompleta QIA Gel Extraction Kit tako što se skalpelom pod UV-lampom izrezao dio gela koji je sadržavao umnoženi fragment DNA (produkt PCR). Izrezani dio gela je stavljen u plastičnu tubicu i dodano je QG pufera u volumenu koji je odgovarao tri volumena gela. Gel je otapan 10

min na 50 °C. Smjesa je prebačena u kolonu za vezanje DNA iz spomenutog kompleta i centrifugirana 1 min na 10000 x g. Sve što je prošlo kroz kolonu u epruveticu za sakupljanje je bačeno. U kolonicu je dodan volumen izopropanola koji je odgovarao jednom volumenu gela. Kako bi se odstranili zaostali komadići agaroze, na kolonu je dodano 0,5 ml QG pufera i centrifugirano 1 min na 10000 x g. Iz epruvetice za sakupljanje odstranjen je eluat QG pufera i dodano je 750 µl pufera PE u kolonu te je ponovljeno centrifugiranje 1 min na 10000 x g. Iz epruvetice za sakupljanje odstranjen je eluat PE pufera i ponovljeno je centrifugiranje 1 min na 10000 x g. Kolona je premještena u čistu Ependorf epruveticu i 35 µl ReH₂O je pažljivo nanoseno iznad kolone ne dotičući pri tome površinu punila kolone. Uzorak je inkubiran 30 min i nakon toga centrifugiran 1 min na 10000 x g, otopini s eluiranim uzorkom DNA je određena koncentracija pročišćene DNA.

3. 2. 1. 1. 2. Cijepanje krajeva gena *hu* bakterije restrikcijским endonukleazama

Kako bi se dobiveni umnoženi gen *hu* mogao ugraditi u vektor pQE30, pročišćeni fragmenti DNA s tupim krajevima su razgrađeni s restrikcijским endonukleazama BamHI i HindIII, a reakcijska smjesa od 50 µl se sastojala od 43 µl pročišćenog fragmenta DNA s tupim krajevima (oko 1,1 µg), 5 µl pufera 10x FastDigest te 0,5 µl BamHI. Reakcijska smjesa je inkubirana 1 sat na 37 °C, a inaktivacija je trajala pola sata na 80 °C. Nakon toga, u inaktiviranu reakciju je dodano 1 µl HindIII. Nakon razdvajanja smjese na agaroznoj gel elektroforezi i pročišćavanja DNA, dobiveni su ljepljivi krajevi gena *hu* bakterije *S. coelicolor*. Vektor pQE30 je cijepan na isti način kao i fragment DNA. U navedenu reakciju je bilo dodano 40 µl vektora (oko 1,2 µg). Pocijepani fragment DNA i vektor su bili pročišćeni na način opisan u poglavlju 3. 2. 1. 1. 1. Pročišćeni fragment DNA je korišten za ligaciju u vektor pQE30.

3. 2. 1. 1. 3. Ligacija gena *hu* s vektorom pQE30

Ligacijska smjesa volumena 20 µl se sastojala od 3,2 µl vektora pQE30 (100 ng vektora u smjesi), 1,5 µl gena *hu* (40 ng inserta u smjesi), 2 µl 10x pufera za T4 DNA-ligazu, 0,5 µl T4 DNA-ligaze i 10 µl ReH₂O. Ligacija se odvijala 2 sata na sobnoj temperaturi s miješanjem uz stalno miješanje pri 500 okretaja/min. Inaktivacija je trajala 10 min na 65 °C. Paralelno su napravljene kontrolne reakcije bez DNA-ligaze i fragmenta DNA te bez DNA-ligaze. Vektor s genom *hu* je unesen u kompetentne stanice *E. coli* XL1 na način kako je opisano u poglavlju 3. 2. 1. 1. 4.

3. 2. 1. 1. 4. Transformacija kemijski kompetentnih stanica *E. coli*

Prekonoćna kultura stanica razrijeđena je u 100 ml LB-a (omjer 1:100) te je inkubirana 2,5 sata na 37 °C do vrijednosti optičke gustoće OD₆₀₀ = 0,6. Kultura je nakon toga centrifugirana 20 min na Amersham Ultrospec 2100Pro pri 3500 x g pri 10 °C. Talog stanica je resuspendiran u 4 ml pufera TSB. Vektori s genima od interesa uneseni su u kemijski kompetentne stanice *E.*

coli u svrhu njihovog umnažanja i ekspresije. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 200 μl se sastojala od 10 μl ligacijske smjese, 20 μl 5x KCM pufera, 100 μl kompetentnih stanica *E. coli* XL1 i 70 μl ReH_2O . Smjesa je inkubirana 30 minuta na ledu, zatim 10 minuta na sobnoj temperaturi i nakon toga je dodano 800 μl medija LB i inkubirano 1 sat na 37 $^{\circ}\text{C}$. Bakterijska suspenzija je centrifugirana 3 min na 8000 x g i supernatant je odvojen od taloga. Talog je resuspendiran u 100 μl LB medija. 100 μl bakterijske suspenzije naciepljeno je na krutu LB podlogu s dodatkom odgovarajućeg antibiotika.

3. 2. 1. 1. 5. PCR na bakterijskim kolonijama (engl. colony PCR)

Reakcijska smjesa bakterija transformiranih s konstruktom pQE30-ssbA sadržavala je 4 μl 5x pufera Phusion GC s 7,5 mmol dm^{-3} MgCl_2 , 0,16 μl 25 mmol dm^{-3} smjese dNTP-ova, 1 μl 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ 5Bam F hu početnice, 1 μl 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ 3Hind R hu početnice, 0,16 μl Phusion DNA-polimeraze (2,5 jedinica μl^{-1}) i 13,7 μl ReH_2O . Transformirane bakterije su unesene vrhom sterilnog nastavka u reakcijsku smjesu. Reakcijski uvjeti navedeni su u **Tablici 10**.

Tablica 10. Uvjeti reakcije PCR na bakterijskim kolonijama transformiranih konstruktom pQE30-hu.

Korak	Temperatura / $^{\circ}\text{C}$	Trajanje ciklusa	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	5 min	1
Denaturacija		10 s	25
Vežanje početnice na kalup	72	45 s	
Produljenje lanca			

3. 2. 1. 1. 6. Izolacija plazmidne DNA iz prekončne kulture bakterijskih stanica *E. coli*

Plazmidna DNA izolirana je iz bakterijskih stanica pomoću komercijalnog kompleta QIAprep Spin Miniprep Kit. Dva obroka od 900 μl prekončne kulture je centrifugirano na 10000 x g tijekom 3 min na sobnoj temperaturi. U talog je dodano 250 μl pufera P1 te je smjesa resuspendirana. U resuspendiranu smjesu dodano je 250 μl pufera P2 za lizu bakterijskih stanica i ručno promiješan dok otopina nije postala plava i prozirna. Inkubacija je trajala 5 min. Nakon toga, dodano je 350 μl pufera N3 te je smjesa ručno promiješana, a otopina je postala bezbojna. Uzorak je centrifugiran 10 min na 10000 x g. Supernatant je dekantiran u QIAprep spin koloni i centrifugiran 1 min na 10000 x g. Nevezana frakcija se odstranila. Kolona je isprana s 500 μl pufera PB te ponovno centrifugirana 1 min na 10000 x g. Kolona je isprana sa 750 μl pufera PE te ponovno centrifugirana 1 min na 10000 x g. Nakon toga, uzorak je dodatno centrifugiran kao u prethodnom koraku. QIAprep spin kolona je premještena u čistu plastičnu tubicu i dodano je 50 μl redestilirane vode s ciljem elucije plazmidne DNA s kolone. Uzorak je inkubiran 30 min i centrifugiran 1 min na 10000 x g.

3. 2. 1. 1. 7. Agarozna gel elektroforeza

Za određivanje veličine fragmenta DNA i plazmida i izolaciju fragmenata DNA za potrebe kloniranja korištena je metoda razdvajanja DNA u gelu. Agarozni gelovi pripremljeni su otapanjem agaroze 1% (w/v) na temperaturi vrenja u puferu TAE u kojeg je prethodno dodan etidijev bromid do koncentracije $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$. Prije nanošenja uzoraka DNA u uzorak se dodalo $1 \mu\text{l}$ agarozne boje (25 mg ksilencijanolo fluorofosfata i 25 mg bromfenol plavo otopljeno u 7 ml $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ EDTA (pH = 8,0) i 3 ml glicerola). Elektroforeza je provedena u puferu TAE u električnom polju jakosti $8-10 \text{ V cm}^{-1}$ tijekom 45 minuta pri 120 V. Vizualizacija fragmenata DNA, zbog interkaliranja etidijevog bromida u DNA, provodi se promatranjem gela na transiluminatoru ($\lambda = 312 \text{ nm}$).

3. 2. 1. 1. 8. Sekvenciranje DNA

Sekvenciranje molekula DNA naručeno je u servisu za sekvenciranje *MacroGen*, Južna Koreja. Za potrebe sekvenciranja u servis je slano oko $6 \mu\text{l}$ vektora s ugrađenim insertom koncentracije $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ i $4 \mu\text{l}$ odgovarajuće početnice koncentracije $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Rezultati sekvenciranja su obrađeni mrežnim alatima *BLASTn* i *BLASTp*

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

3. 2. 1. 1. 9. Mjerenje koncentracije makromolekula DNA

Koncentracije DNA određene su spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na uređaju NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*). Rezultati mjerenja su apsorpcijski spektri i koncentracija uzorka nukleinske kiseline izražena u $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$, a izračunata pomoću apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm i odnosa u kojem $A_{260} = 1$ odgovara $50 \mu\text{g DNA}$.

3. 2. 2. Metode rada s proteinima

3. 2. 2. 1. Pročišćavanje proteina

3. 2. 2. 1. 1. Sinteza proteina HU i SsbA u heterolognom sustavu bakterije *E. coli*

Rekombinantni konstrukti pQE30-ssbA (laboratorijska zbirka) i pQE30-hu (konstruiran tijekom izrade ovog diplomskog rada) su transformirani u kemijski kompetentnu bakteriju *E. coli* XL1. Stanice su uzgajane preko noći pri $30 \text{ }^\circ\text{C}$ uz stalno miješanje pri 200 okretaja/min, a prekonocne kulture su presađene u svježi medij LB (omjer 1:50) te uzgajane tri sata u ukupno 2 l medija LB na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ u prisutnosti ampicilina u konačnoj koncentraciji $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ do vrijednosti optičke gustoće $\text{OD}_{600} = 0,6-0,7$. Nakon toga su stanice inducirane IPTG-om (konačne koncentracije 1 mmol dm^{-3}) i uzgajane još 3 sata na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ uz stalno miješanje pri 200 okretaja/min. Stanice su centrifugirane 20 minuta na $3500 \times g$ pri $10 \text{ }^\circ\text{C}$ (uređaj Heraeus Multifuge 3 S-R), zatim je medij odstranjen i talog je ispran s 15 ml pufera A i ponovo

centrifugiran 20 minuta na 3500 x g. Talog je zamrznut, a stanice su ujedno pohranjene i zamrznute u glicerolskoj kulturi.

3. 2. 2. 1. 2. Afinitetno pročišćavanje proteina na Ni-NTA agarozima

U svrhu brzog i jednostavnog pročišćavanja, proteini su prekomjerno eksprimirani s histidinskim privjeskom na N-kraju u vektoru pQE30. Kao kromatografsko punilo korištena je Ni-NTA agaroz. NTA je vezana na 4 od ukupno 6 veznih mjesta u koordinacijskoj sferi iona nikla, dok se na preostala 2 vezna mjesta vežu histidini iz histidinskog privjeska. Protein se s kolone eluira imidazolom koji je strukturno sličan bočnom ogranku histidina, te se umjesto histidina veže na nikal. Propuštanjem smjese proteina kroz kolonu, na nju će se vezati samo onaj protein koji specifično veže imobilizirani ligand, dok će svi ostali proteini proći kroz kolonu.

Talog zamrznutih stanica (dobiven iz 0,5 dm³ bakterijske kulture) resuspendiran je u 10 ml pufera A, te su dodani PMSF (konačne koncentracije 1 mmol dm⁻³) i deoksiribonukleaza (konačna koncentracija 0,5 µg µl⁻¹). Stanice su sonicirane na ledu u 3 ciklusa, svaki u trajanju od dvije minute, između kojih je bila pauza od 1 min (uređaj Cole Parmer Ultrasonic processor). Dobiven stanični ekstrakt je centrifugiran 45 min na 15000 x g pri 10 °C i talog je izdvojen. Afinitetno pročišćavanje supernatanta je izvedeno sljedećim postupkom: 2 ml suspenzije Ni-NTA agaroze je prebačeno u kolonu i kolona je isprana s 20 ml ReH₂O. Nakon toga kolona je uravnotežena s 20 ml pufera za lizu (pufer A). Nanesen je uzorak supernatanta (stanični ekstrakt) na kolonu te je kolona ispirana više puta s po 5 ml pufera A. Prisutnost proteina u eluatima tijekom afinitetnog pročišćavanja je praćeno reakcijom po Bradfordu (poglavlje 3. 2. 1. 7.). Nakon toga, dodavano je po 5 ml pufera za ispiranje (pufer B) (koncentracija imidazola 30 mmol dm⁻³). Proteini koji su se vezali heksahistidinskim privjeskom na Ni-NTA agarozu eluirani su puferom za eluciju (pufer C) u frakcijama od 4 ml (koncentracija imidazola 300 mmol dm⁻³). Za daljnju analizu taloga metodom SDS-PAGE stanični talog je nakon centrifugiranja resuspendiran u jednakom volumenu vode. Taj se alikvot smatrao uzorkom taloga te je zajedno s eluatima, supernatantom i frakcijama nevezanih proteina analiziran metodom SDS-PAGE.

3. 2. 2. 1. 3. Pročišćavanje proteina ionskom izmjenom na DEAE-celulozi

U svrhu pročišćavanja proteina SsbA nakon afinitetnog pročišćavanja na Ni-NTA agarozima, proteini su dodatno pročišćeni na DEAE-celulozi. Ovo pročišćavanje se temelji na ionskoj prirodnoj stacionarnoj fazi kromatografske kolone i analita. DEAE-celuloza je anionski izmjenjivač, dok je protein SsbA (pI = 4,0) negativno nabijen zbog pufera u kojem je razrijeđen (pH = 7,5). Propuštanjem smjese proteina kroz kolonu, na nju će se vezati samo one molekule koje su negativno nabijene (kao i protein SsbA), dok će svi ostali slučajno zaostali proteini proći

kroz kolonu. Primijenjen je sljedeći postupak: 1 ml 50%-tne otopine DEAE-celuloza je prebačeno u kolonu i kolona je isprana s 20 ml ReH_2O . Nakon toga kolona je uravnotežena s 20 ml pufera A₁. Naneseni su razrijeđeni eluati na kolonu te nakon toga 30 ml pufera A₁. Protein SsbA je eluiran s po 4 ml pufera za eluciju sve dok se s kolone nije eluirao protein. Kolona je pročišćena s 50 ml pufera za čišćenje u svrhu elucije zaostale DNA. Kolona je pohranjena u 20%-tnom etanolu. Eluati, talog, supernatant i frakcija nevezanih proteina su analizirani metodom SDS-PAGE.

3. 2. 2. 1. 4. Denaturirajuća elektroforeza u gelu poliakrilamida u prisutnosti natrijevog deodecil-sulfata (SDS-PAGE)

Za analizu uzoraka proteina korištena je metoda SDS-PAGE. SDS je negativno nabijen detergent koji se veže za hidrofobne dijelove proteina što dovodi do razdvajanja proteina na pojedinačne polipeptidne lance i maskiranja njihovog neto naboja. SDS se ravnomjerno veže na protein pa je omjer naboja i mase kod svih proteina u uzorku isti, te se oni razdvajaju samo na temelju svoje molekulske mase.

Priprema gela: između dviju staklenih ploča u uspravnom položaju do 4/5 volumena izliven je gel za razdvajanje priređen dodatkom APS-a do konačne koncentracije $0,7 \mu\text{g ml}^{-1}$ i TEMED do konačnog volumnog udjela 0,05% u otopinu sastava: akrilamid/bisakrilamid ($\varphi = 0,4$), $0,375 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl (pH = 8,8) i SDS (4 mg ml^{-1}). Gel je nadsvođen destiliranom vodom čime je poravnat gornji rub gela za razdvajanje. Nakon 30 min voda je izlivena te je izliven gel za sabijanje dodavanjem APS do konačne koncentracije $0,7 \mu\text{g ml}^{-1}$ i TEMED do konačnog volumnog udjela 0,05% u otopinu sastava: akrilamid/bisakrilamid ($\varphi = 0,16$), $0,125 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl (pH = 6,8) i SDS (4 mg ml^{-1}). Uzorci proteina se nanose na gel pomiješani s 1/4 volumena boje za nanošenje uzoraka i praćenje elektroforeze proteina. Prije nanošenja na gel proteini su denaturirani inkubiranjem na $98 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 5 min. Elektroforeza je provedena prvih 30 min na 110 V, a nakon toga na 180 V dok boja za nanošenje uzoraka i praćenje elektroforeze proteina nije otputovala do kraja gela. Nakon elektroforeze gel je inkubiran 20 min u otopini Coomassie Brilliant Blue za bojanje SDS gelova na rotacijskoj platformi. Gel je potom odbojan u vodi te, nakon toga, u puferu za odbojavanje (za SDS-PAGE) 45 min.

3. 2. 2. 1. 5. Koncentriranje proteina u otopini

Nakon elucije s afinitetne kolone eluati su koncentrirani ultrafiltracijom u centrikonima Amicon Ultra centrifugal filters (*Milipore*) (pore 10 kDa i 30 kDa). Molekulska masa proteina SsbA iznosi 20870 Da. Protein je tetramer pa molekulska masa iznosi $4 \times 20870 \text{ Da}$, odnosno 83480 Da. Molekulska masa proteina HU iznosi 10818 Da. Protein je dimer pa molekulska masa iznosi $2 \times 10818 \text{ Da}$, odnosno 21636 Da. Za koncentriranje proteina SsbA korišten je centrikon s porama 30 kDa koji kroz membranu propušta samo molekule manje od 30 kDa pa se u

centrikonu koncentrirao protein, dok su se sve ostale molekule uzorka mase manje od 30 kDa prošle kroz membranu u Falcon epruvetu. Za koncentriranje proteina HU korišten je centrikon s porama 10 kDa koji na membrani propušta samo molekule manje od 10 kDa pa se u centrikonu koncentrirao protein, dok su se sve ostale molekule uzorka mase manje od 10 kDa prošle kroz membranu u Falcon epruvetu. Koncentrirani proteini su pohranjeni na -80 °C.

3. 2. 2. 1. 6. Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrom

Koncentracija proteina određena je mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 280 nm pomoću spektrofotometra NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*). Volumen uzoraka nanošenih na postolje iznosio je 2 μ l. Molarni apsorpcijski koeficijent, molekulska masa proteina i izoelektrična točka izračunati su pomoću mrežnog alata *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>) (**Tablica 11**). Koncentracija ispitivanog proteina izražena je u mg ml^{-1} .

Tablica 11. Molekulska masa monomera proteina (M_r), molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) te izoelektrična točka (pI). Navedene vrijednosti vrijede za monomere navedenih proteina (<https://web.expasy.org/protparam/>).

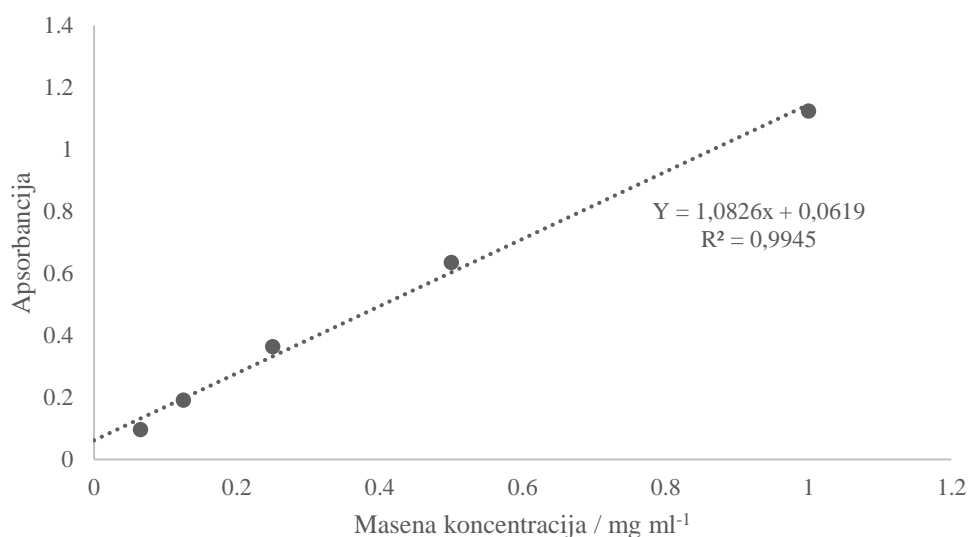
Protein	Duljina / broj aminokiselina	M_r / Da	ϵ / $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	pI
HU	93	9851,22	1490	9,45
HU + fuzijski privjesak His ₆	101	10818,20	1490	9,45
SsbA	199	19906,61	33460	5,27
SsbA + fuzijski privjesak His ₆	207	20873,58	23490	6,23

3. 2. 2. 1. 7. Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu

Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu primijenjeno je za općenite svrhe kao što je procjena prisutnosti proteina i/ili koncentracije proteina nakon elucije. Koristi se Bradfordov reagens odnosno kisela otopina boje Coomassie Brilliant Blue G-250 koja ima maksimum apsorbancije pri valnoj duljini od 465 nm. Molekule boje su u anionskom obliku i vežu se sulfonskim skupinama uglavnom za arginin, histidin i lizin, ali i za tirozin, triptofan i fenilalanin jer osim elektrostatskih interakcija, za vezanje boje i proteina u kompleks važne su hidrofobne i Van der Waalsove interakcije. Prilikom vezanja boje za protein, maksimum se pomiče na valnu duljinu od 595 nm.

Ova se metoda koristila prilikom određivanja prisutnosti proteina u frakcijama nakon kromatografija na kolonama Ni-NTA agaroze te DEAE-celuloza. U te svrhe praćeno je plavo obojenje Bradfordovog reagensa u mikrotitarskoj ploćici što je upućivalo na prisutnost proteina u frakciji. Reakcije su se sastojale od 70 μ l Bradfordovog reagensa i 7 μ l ispitivanog uzorka.

U svrhu određivanja toćne koncentracije proteina, mjerena je apsorbancija uzorka pri valnoj duljini od 595 nm. Prvo je izmjerena apsorbancija proteinskog standarda BSA (2 mg ml⁻¹) te njegovih serijskih razrjeđenja s ciljem određivanja baždarnog pravca (**Slika 15**). Nakon toga su napravljena serijska razrjeđenja proteina od interesa kojima je također određena apsorbancija. Uzorci su se sastojali od 1 ml Bradfordova reagensa i 20 μ l ispitivanog proteina te su bili inkubirani 10 min prije mjerenja apsorbancije. Koncentracija uzoraka proteina SsbA i HU određena je linearnom regresijom iz baždarnog pravca BSA. Dobivene koncentracije su u skladu s odrećenom vrijednosti koncentracije proteina spektrofotometrom.



Slika 15. Ovisnost apsorbancije uzorka proteina pri valnoj duljini od 595 nm o masenoj koncentraciji. Prikazan je baždarni pravac na temelju nekoliko koncentracija proteina BSA koji se koristio za odrećivanje koncentracije proteina od interesa pomoću Bradfordovog reagensa. Jednadžba pravca je navedena na slici.

3. 2. 3. Ispitivanje protein-protein i protein-DNA interakcija

3. 2. 3. 1. Ispitivanje protein-DNA interakcija

3. 2. 3. 1. 1. Odrećivanje najmanje duljine jIDNA koju vežu proteini SSB metodom elektroforeze zaostajanja u gelu

Nukleinske kiseline i proteine moguće je analizirati elektroforezom u gelu poliakrilamida pri nedenaturirajućim (nativnim) uvjetima. Pri nedenaturirajućoj elektroforezi mobilnost molekula ovisi i o njihovom naboju, obliku i velićini. Naboj proteina odrećen je pH vrijednošću pufera koji se koristi pri elektroforezi i izoelektrićnom toćkom proteina. Ovom metodom moguće je

proučavati vezanje proteina i drugih makromolekula, odnosno nukleinskih kiselina, stoga je ova metoda korištena za proučavanje vezanja SsbA ili SsbB i jDNA. Slobodna molekula DNA putuje brže od kompleksa protein:DNA u gelu poliakrilamida.

U svrhu analize kompleksa SSB:jDNA korištena je u većini slučajeva elektroforeza u gelu poliakrilamida. Nukleinske kiseline i proteini se u tim uvjetima razdvajaju na gelu prema njihovoj masi, naboju i obliku. Svi korišteni proteini bili su razrijeđeni u puferu D. Pripremljeni gelovi poliakrilamida bili su sljedećeg sastava: ukupni sadržaj akrilamida i bis-akrilamida iznosi $T = 5,5\%$, a umreženje $C = 3,3\%$. Polimerizacija gela potaknuta je APS-a do konačne koncentracije $0,7 \mu\text{g ml}^{-1}$ i TEMED-a do konačnog volumnog udjela $0,05\%$. Nakon polimerizacije gela, gel je spojen na izvor istosmjerne struje napona 50 V kako bi se pripremio za elektroforezu u trajanju od 30 min . Pufer u gelu i pufer za elektroforezu odgovaraju sastavom puferu $0,5x \text{ TB}$. Elektroforeza se provodila 1 sat pri 50 V . Vizualizacija nukleinskih kiselina u gelu poliakrilamida ostvarena je inkubacijom gela 12 min u $1x$ otopini boje Syber Gold otopljene u puferu $1x \text{ TB/TA}$. Ovom metodom bojanja mogu se vizualizirati uzorci pobudom svijetla valne duljine 495 nm .

3. 2. 3. 1. 2. Određivanje najmanje duljine jDNA koju vežu proteini SSB metodom fluorimetrijske spektrofotometrije

U eksperimentima titracije mjerena je intrinzična fluorescencija triptofana proteina SSB i način na koji se intrinzična fluorescencija mijenja nakon interakcije s molekulom DNA. Protein SsbA u svojoj primarnoj strukturi posjeduje dvadeset triptofana po tetrameru, dok protein SsbB u svojoj primarnoj strukturi posjeduje dvanaest triptofana po tetrameru. Promjena intenziteta fluorescencije (odnosno smanjenje fluorescencije) smjese proteina SSB i molekule DNA, u odnosu na intenzitet fluorescencije proteina SSB, je bio dokaz nastajanja kompleksa SSB:DNA.

U kvarcnu kivetu volumena $400 \mu\text{L}$ (*Agilent Technologies*) pipetirano je $400 \mu\text{L}$ otopine uzorka proteina ili pufera. Uzorci su bili inkubirani na $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Valna duljina pobude bila je 295 nm . Emisijski spektri uzoraka pufera za fluorimetrijsku spektrofotometriju, SsbA, SsbB, smjese SsbA i jDNA te SsbB i jDNA su snimani u rasponu od 305 do 450 nm . Koncentracija proteina SsbA (400 nmol dm^{-3}) i SsbB (500 nmol dm^{-3}) bila je konstantna dok se u smjesu dodavalo po $2 \mu\text{l}$ jDNA. Koncentracija oligonukleotida je iznosila $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ za mjerenja proteina SsbA i SsbB pri $300 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ te $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ za mjerenja proteina SsbB pri 30 mmol dm^{-3} soli. Uzorci su snimani u duplikatu te je izračunata aritmetička sredina. Za snimanje spektara korišten je spektrofotometar *Agilent Technologies Cary Eclipse* i pripadajući računalni program *Scan*. Veličina prore za pobude i emisije bila je $10,0 \text{ nm}$, a brzina snimanja 120 nm/min . Spektri kompleksa SSB:jDNA korigirani su s obzirom na razrjeđenje odgovarajućeg

proteina s istovjetnim obrocima pufera. Svi podaci obrađeni su pomoću programa *GraphPad Prism 5.0*.

Smanjenje intenziteta fluorescencije je bilo modelirano prema Stern-Volmer jednadžbi linearnom regresijom: $\frac{F^0}{F} = 1 + K_{sv} * [Q]$, gdje je F intenzitet fluorescencije mjenog uzorka, K_{sv} Stern-Volmer konstanta te $[Q]$ ravnotežna koncentracija liganda (interaktanta, jIDNA). Intenziteti fluorescencije titracije proteina s oligonukleotidom su bili korigirani na intenzitet fluorescencije titracije proteina s puferom.

Također, napravljena je krivulja vezanja liganda kao rezultat mjerenja intenziteta fluorescencije proteina. K_d je izračunat nelinearnom regresijom (metodom 'specifično vezanje s jednim veznim mjestom - Hillov nagib') prema jednadžbi: $1 - \frac{F}{F^0} = \frac{B_{max} * [Q]^h}{K_d^h + [Q]^h}$, gdje je K_d ravnotežna konstanta vezanja, B_{max} maksimum specifičnog vezanja te h Hillova konstanta.

3. 2. 3. 2. Ispitivanje protein-protein interakcija

3. 2. 3. 2. 1. Ispitivanje interakcija proteina HU i SsbA metodom fluorimetrijske spektrofotometrije

Interakcija proteina HU i SsbA analizirana je fluorimetrijskom spektrofotometrijom mjerenjem intrinzične fluorescencije triptofana u proteinu SsbA. Analizirana je promjena u intenzitetu fluorescencije SsbA nakon interakcije s proteinom HU. U našem ispitivanju korišteno je svojstvo proteina SsbA (tetramer) da u svojoj primarnoj strukturi posjeduje dvadeset triptofana, dok protein HU ne sadrži niti jedan. Prema tome, promjena intenziteta fluorescencije smjese proteina SsbA i HU, u odnosu na intenzitet fluorescencije proteina SsbA dokaz je nastajanja kompleksa SsbA:HU.

U kvarcnu kivetu pipetirano je 400 μ L otopine uzorka. Uzorci su bili inkubirani na 20 °C. Valna duljina pobude bila je 295 nm. Emisijski spektri uzoraka pufera, SsbA, HU i kompleksa SsbA:HU snimani su u rasponu od 305 do 550 nm. Svaki uzorak je sniman u triplikatu. Koncentracija SsbA bila je konstantna (200 nmol dm⁻³), dok je količina proteina Hu varirana (koncentracija 5-1500 nmol dm⁻³). Veličina proreza pobude i emisije su bili redom 10-10 nm i 5-20 nm, a brzina snimanja je bila 300 nm/min. Spektri kompleksa SsbA:HU korigirani su s obzirom na pripadni emisijski spektar proteina HU odgovarajuće koncentracije. K_d je izračunat nelinearnom regresijom (metodom 'specifično vezanje - jedno vezno mjesto') prema jednadžbi:

$\frac{F}{F^0} = \frac{B_{max} * x}{K_d + x} + c$, gdje je F intenzitet fluorescencije, K_d ravnotežna konstanta vezanja, B_{max}

maksimum specifičnog vezanja, x koncentracija liganda (interaktanta) koji tvori interkciju s proteinom koji fluorescira, a c odsječak na osi ordinata.

3. 2. 3. 2. 2. Ispitivanje interakcija proteina HU i SsbA metodom izotermalne titracijske kalorimetrije

Otopine proteina HU (1 mmol dm^{-3}) i SsbA ($30 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) su pripremljene degaziranjem 15 min u uređaju Degassing Station TA. Degazirani protein SsbA nanesen je u ćeliju uređaja *Malvern MicroCal VP-ITC*, dok je protein HU nanesen u štrcaljku. Pokretanjem uređaja štrcaljka je umetnuta u ćeliju. Temperatura sustava je bila $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon završetka snimanja podaci su bili obrađeni u računalnom programu *Malvern MicroCal*. Određeni su parametri konstante disocijacije (K_d), promjene entalpije (ΔH), promjene entropije (ΔS), promjene slobodne Gibbsove energije (ΔG) i molarnog omjera proteina HU koji se veže na jednu molekulu SsbA (N).

3. 2. 3. 2. 3. Ispitivanje interakcija proteina HU i SsbA metodom spektroskopije kružnog dikroizma

Pripremljeni su proteini HU i SsbA koncentracije $25 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, odnosno $20 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$. Analiza kružnog dikroizma je provedena na uređaju J-810 (*Jasco*) u tzv. kvarcnoj sendvič kiveti volumena $50 \text{ } \mu\text{L}$, duljina puta zrake kroz uzorak $0,01 \text{ cm}$ (*Agilent Technologies*). Postavke programa su bile sljedeće: spektar je sniman od $460\text{-}190 \text{ nm}$ (svakih $0,2 \text{ nm}$) pri temperaturi od $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Prvotno je snimljen uzorak $40 \text{ } \mu\text{L}$ pufera, zatim $40 \text{ } \mu\text{L}$ proteina HU, $40 \text{ } \mu\text{L}$ proteina SsbA te smjesa $20 \text{ } \mu\text{L}$ proteina HU i $20 \text{ } \mu\text{L}$ proteina SsbA. Analiza podataka je napravljena u računalnom programu *GraphPad 5,0* unošenjem vrijednosti spektra za protein SsbA, protein HU te smjesu proteina SsbA i HU, kao i zbroj spektara za proteine SsbA i HU. Razlika oblika spektra smjese proteina SsbA i HU i zbroja spektara za proteine SsbA i HU indicira postojanje interakcije između dva ispitivana proteina. Podaci su bili određeni nelinearnom regresijom metode jednog veznog mjesta (engl. *one set of sites*) Nadalje, mrežnim programom *Dichroweb* (Whitmore i Wallace 2008) je analizirana sekundarna struktura ispitivanih proteina te proteina HU nakon interakcije s proteinom SsbA.

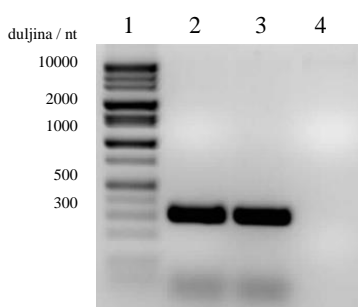
3. 2. 3. 2. 3. 1. Izmjena pufera

Kako bi se spektrometrijom kružnog dikroizma dobili što vjerniji rezultati, koncentriranim proteinima SsbA i HU trebalo je izmijeniti pufer u kojem su koncentrirani u puferu za spektrometriju kružnog dikroizma (poglavlje 3. 1. 8. 1.). Izmjena u navedeni pufer je napravljena pomoću kolonice za odsoljavanje (Zeba Spin Desalting Columns, *Thermo Scientific*). Kolonice su prvo uravnotežene s četiri obroka po $300 \text{ } \mu\text{L}$ pufera za CD, a nakon svakog nanošenja novog obroka pufera kolonice su centrifugirane 1 min na $1500 \times g$. Nakon toga je nanoseno $120 \text{ } \mu\text{L}$ proteina te su kolonice centrifugirane 2 min na $1500 \times g$. Proteini su centrifugiranjem prošli kroz kolonu te se eluirali u novu epruveticu u željenom puferu.

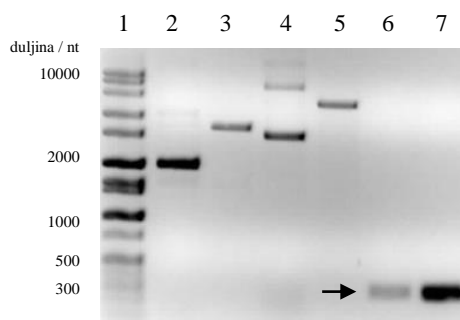
4. Rezultati

4. 1. Konstrukcija rekombinantnih plazmida za ekspresiju gena *hu* u uvjetima *in vivo*

Preparativni PCR je korišten u svrhu umnažanja gena *hu* s genomske DNA *S. coelicolor*. Nakon provedbe reakcije PCR opisane u poglavlju 3. 2. 1. 1. 1., dobiveni fragmenti PCR analizirani su pomoću agarozne gel elektroforeze (**Slika 16**). Kako bi umnoženi odsječci DNA imali ljepljive krajeve za ligaciju s vektorom, preko noći su razgrađeni enzimima BamHI i HindIII (**Slika 17**) kako je navedeno u poglavlju 3. 2. 1. 1. 2. Prije ligacije u vektor, fragmenti DNA i vektor pQE30, su pročišćeni prema protokolu navedenom u poglavlju 3. 2. 1. 1. 1.



Slika 16. Preparativno umnožavanje gena *hu* nakon reakcije PCR na kalupu genomske DNA bakterijske *S. coelicolor* za izolaciju DNA iz gela. 1 – marker *Wide Range DNA ladder*, 2-3 – fragment DNA (300 pb), 4 – negativna kontrola (reakcija PCR bez početnica).

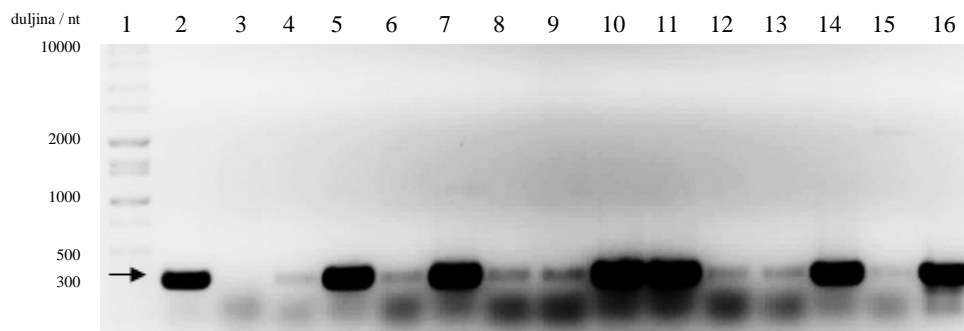


Slika 17. Agarozna gel elektroforeza nakon cijepanja umnoženog fragmenta DNA i vektora pQE30. 1 – marker *Wide Range DNA ladder*, 2 – kružan vektor pQE30 (3461 pb), 3 – vektor pQE30 cijepan BamHI/HindIII (3424 pb), 4 – kružni vektor pET28 (5369 pb), 5 – pET28 cijepan BamHI/HindIII (5344 pb), 6-7 – fragment DNA cijepan BamHI/HindIII (293 pb).

Prema **Slici 16 i 17** reakcija PCR je bila vrlo specifična i rezultirala je dobrim prinosom željenog produkata. Fragmenti DNA dobiveni umnažanjem gena *hu* su imali željenu veličinu (293 pb).

Nakon toga, kemijski kompetentne stanice *E. coli* XL1 su transformirane vektorom pQE30-*hu* metodom opisanom u poglavlju 3. 2. 1. 1. 4. Ovaj rekombinantni vektor ima gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin te su transformirane stanice nacijepljene na ploče LB koje sadrže

ampicilin. Bakterijske kolonije su uzgajane na 37 °C preko noći. Vektor pQE30 nema svojstvo za plavo-bijelu selekciju stoga je za provjeru pozitivnih kolonija, odnosno kolonija čije stanice sadrže konstrukt pQE30-hu korištena metoda PCR-a na bakterijskim kolonijama. Nasumično je odabrano 13 kolonija na kojima je proveden PCR na bakterijskim kolonijama. Reakcijske smjese i uvjeti reakcije PCR navedeni su u poglavlju 3. 2. 1. 1. 5. Nakon reakcije PCR uzorci su analizirani pomoću elektroforeze. Od 13 analiziranih kolonija bilo je 4 pozitivnih (kolonije broj 1, 4, 6, 9, 10, 13 željena veličina fragmenta DNA je označena strelicom) (**Slika 18**).



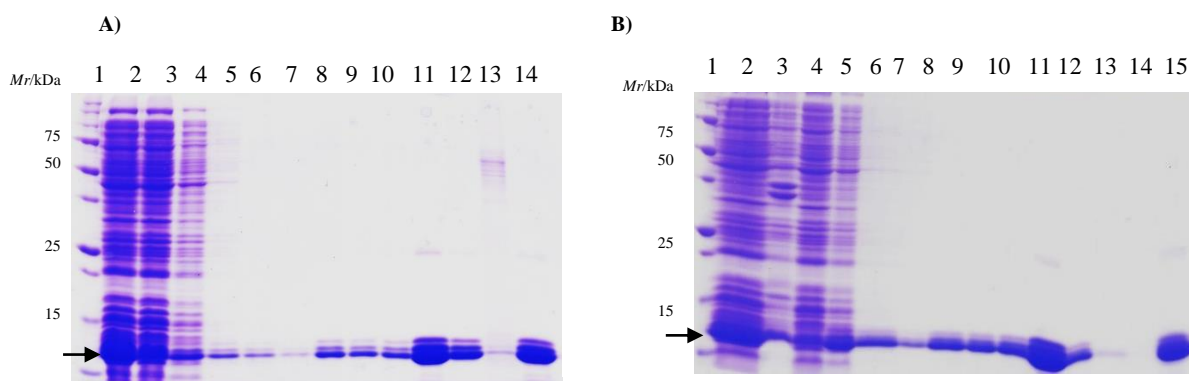
Slika 18. Agarozna gel elektroforeza nakon reakcija PCR na kolonijama transformiranih s pQE30-hu. 1 – marker *Wide Range DNA ladder*, 2-14 – produkti reakcija PCR 1.-13. kolonije, 15 – negativna kontrola (reakcija PCR bez kalupa DNA), 16 – pozitivna kontrola (gen *hu*).

Na temelju agarozne gel elektroforeze potvrđena je uspješna ugradnja gena *hu* odgovarajuće veličine u vektor pQE30 u točno određeno mjesto u vektoru (**Slika 18**). Za daljnju provjeru konstrukta sekvenciranjem je uzeta kolonija broj 16. Plazmid s fragmentom DNA izoliran iz kolonije broj 16 bio je sekvenciran obostrano početnicama 5Bam F *hu* i 3Hind R *hu*. Sravnjivanjem sekvenci gena *hu* nukleotidnih baza podataka i sekvence dobivene sekvenciranjem fragmenta DNA u pročišćenom vektoru pQE30-hu potvrđeno je da ugrađeni fragment DNA je gen *hu* željene veličinu i odgovarajućeg slijeda nukleotida.

4. 2. Pročišćavanje proteina bakterije *S. coelicolor* eksprimiranih u heterolognom domaćinu bakteriji *E. coli*

4. 2. 1. Pročišćavanje proteina HU afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu

Pročišćavanje proteina HU se temeljilo na karakteristici konstrukta pQE30-hu koji ispred gena *hu* (ugrađenog u višestruko mjesto za kloniranje) sadrži heksahistidinski slijed (privjesak). Heksahistidinski privjesak prisutan na N-kraju proteina HU omogućuje njegovo vezanje na kolonu Ni-NTA. Postupak kromatografije je opisan u poglavlju 3. 2. 2. 1. 2.



Slika 19. Analiza eluata pomoću elektroforeze u gelu poliakrilamida nakon kromatografije na koloni Ni-NTA agaroze. Položaj proteina HU je označen strelicom. Proteinske vrpce su obojane otopinom Coomassie Brilliant Blue.

A) Prva serija pročišćavanja. 1 – marker *Precision Plus Protein Unstained Standards*, 2 – supernatant nakon soniciranja, 3 – talog nakon soniciranja, 4 – frakcija nevezanih proteina, 5 – 1. frakcija proteina nakon ispiranja kolone puferom A, 6 – 2. frakcija proteina nakon ispiranja kolone puferom A, 7 – 7. frakcija proteina nakon ispiranja kolone puferom A, 8 – 1. frakcija proteina nakon ispiranja kolone puferom B, 9 – 2. frakcija proteina nakon ispiranja kolone puferom B, 10 – frakcija početnog eluata, 11 – 1. frakcija elucije, 12 – 2. frakcija elucije, 13 – 3. frakcija elucije, 14 – koncentriran eluat.

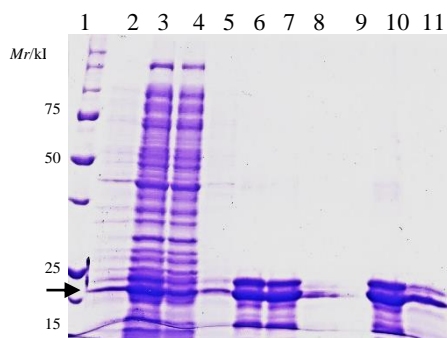
B) Druga serija pročišćavanja. Skupljeni su uzorci ispranih i eluiranih proteina prve serije pročišćavanja te su pročišćeni još jednom kroz kolonu. 1 – marker *Precision Plus Protein Unstained Standards*, 2 – supernatant nakon soniciranja, 3 – frakcija nevezanih proteina, 4 – 1. frakcija proteina nakon ispiranja kolone puferom A, 5 – 2. frakcija proteina nakon ispiranja kolone puferom A, 6 – 3. frakcija proteina nakon ispiranja kolone puferom A, 7 – 7. frakcija proteina nakon ispiranja kolone puferom A, 8 – 1. frakcija proteina nakon ispiranja kolone puferom B, 9 – 2. frakcija proteina nakon ispiranja kolone puferom B, 10 – frakcija početnog eluata, 11 – 1. frakcija elucije, 12 – 2. frakcija elucije, 13 – 3. frakcija elucije, 14 – koncentriran eluat.

Prema **Slici 19** usporedbom jažica taloga i supernatanta nakon soniciranja (A, jažice 2 i 3) uočava se da je veliki dio proteina HU topljiv i pogodan za vezanje na kromatografsku kolonu. Zbog velike količine eksprimiranog proteina, jedan dio proteina HU se uopće nije vezao na kolonu ili se isprao puferom A koji je sadržavao 10 mmol dm^{-3} imidazola. (A, jažica 4 i B, jažica 3). U frakcijama proteina koji su bili isprani s kolone puferom A (A, jažice 5-7, i B, jažice 4-7) uočavaju se nespecifični proteini koji nisu imali heksahistidinski privjesak. Nakon toga, kolona je isprana puferom B koji je sadržavao 30 mmol dm^{-3} imidazola (A, B jažice 8-9). Ovim su se postupkom eluirali proteini koji su bili jačim silama vezani na kolonu. Moguće je da ti proteini u svojoj primarnoj strukturi imaju slijed od više histidina ili su se elektrostatskim silama vezali za matriks kolone. U frakcijama eluiranih proteina (A, B jažice 10-12,14) vidljiva je uspješna elucija proteina HU s heksahistidinskim privjeskom postignuta primjenom pufera koji sadrži 300 mmol dm^{-3} imidazola. S obzirom na količinu proteina HU u početnom staničnom ekstraktu (B, usporedba proteinskih vrpca jažica 2 i 14) pročišćavanje se smatra vrlo uspješnim te nije bila potrebna optimizacija ovog postupka.

4. 2. 2. Pročišćavanje proteina SsbA afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu i ionskom izmjenom na DEAE-celulozi

Postupak pročišćavanja proteina SsbA je bio istovjetan postupku opisanom za protein HU, zbog heksahistidinskog privjeska na N-kraju proteina SsbA koji se zbog toga vezao na stacionarnu fazu kromatografske kolone Ni-NTA agaroze. Nakon toga, eluati su podvrgnuti ionskoj izmjeni na anionskom izmjenjivaču DEAE-celulozi kako bi se eluati dodatno pročistili od zaostajućih proteina i DNA. Postupak kromatografije je opisan u poglavljima 3. 2. 2. 1. 2. i 3. 2. 2. 1. 3.

Usporedbom jažica taloga i supernatanta nakon soniciranja (**Slika 20**, jažice 2 i 3) uočava se da je veliki dio proteina SsbA topljiv i pogodan za eluciju. Zbog velike količine eksprimiranog proteina, dio proteina SsbA se uopće ni nije vezao na kolonu te se isprao s kolone u frakciji nevezanih proteina (jažica 4). U frakcijama ispranih proteina iz supernatanta nakon sonikacije stanica (jažica 5) uočavaju se nespecifični proteini koji nisu imali heksahistidinski privjesak, a isprali su se puferom A koji je sadržavao 10 mmol dm^{-3} imidazola. U frakciji (jažica 6), vidljiva je uspješna elucija proteina SsbA. Eluati s kolone Ni-NTA agaroze su direktno (bez izmjene pufera) nanoseni i zatim pročišćeni pomoću kolone DEAE-celuloze. DEAE-celuloza je anionski izmjenjivač. Protein SsbA je negativno nabijena molekula u puferu za pročišćavanje ($\text{pH} = 7,5$). Međutim, u uvjetima koji su primijenjeni u ovom eksperimentu proteina SsbA se nije vezao na kolonu već je pročišćavanje postignuto samo propuštanjem kroz kolonu DEAE-celuloze pri čemu su se na kolonu vezali nespecifični proteini i molekule DNA. Tako pročišćeni protein SsbA (jažica 7) je koncentriran u centrikonu, u puferu C₁, kako je opisano u poglavlju 3. 2. 2. 1. 5. Ovakvim se postupkom kromatografije postigla vrlo velika količina pročišćenog proteina SsbA (jažica 10-11).



Slika 20. Analiza eluata pomoću elektroforeze u gelu poliakrilamida nakon kromatografije na koloni Ni-NTA agaroze i DEAE-celuloze. Položaj proteina SsbA je označen strelicom. Proteinske vrpce su obojane otopinom Coomassie Brilliant Blue. 1 – marker *Precision Plus Protein Unstained Standards*, 2 – talog nakon soniciranja, 3 – supernatant nakon soniciranja, 4 – frakcija nevezanih proteina kolone Ni-NTA agarozu, 5 – 1. frakcija proteina nakon ispiranja kolone Ni-NTA agarozu puferom A, 6 – ukupan eluat kolone Ni-NTA agarozu, 7 – frakcija nevezanih proteina kolone DEAE-celuloze, 8 – frakcija proteina ispranih s 300 mmol dm^{-3} NaCl kolone DEAE-celuloze, 9 – frakcija proteina ispranih s 500 mmol dm^{-3} NaCl kolone DEAE-celuloze, 10 – koncentriran protein SsbA, 11 – razrijeđenje koncentriranog proteina SsbA u omjeru 1:5.

4. 3. Ispitivanje protein-DNA interakcija

4. 3. 1. Ispitivanje interakcija DNA i proteina metodom elektroforeze zaostajanja u gelu

4. 3. 1. 1. Određivanje najmanje duljine jLDNA koju vežu proteini SsbA i SsbB

U svrhu određivanja najmanje duljine jLDNA koju vežu proteini SsbA i SsbB, prvo je napravljeno sravnjenje aminokiselinskih sljedova proteina SsbA i SsbB (**Slika 21**). Ovom je analizom utvrđeno da protein SsbB nema kiseli vrh za razliku od proteina SsbA, što je bilo bitno uočiti kako bi se rezultati ovog poglavlja sukladno time i tumačili.

```
SsbA  MAGETVITVVGNLVDDPELRFTPSGAAVAKFRVASTPRTFDRQTNEWKDGESLFLTCVW  60
SsbB  -MNETMICAVGNVATPVVFDLANGP-SVRFRLAVTARYWDREKNAWTDGHTNFFTWWAN  58
      .**:* .***;. *:* .* .:***:* * * :***.* *.**.: *:* .

SsbA  RQAAENVAESLQGRVIVQGRKQRSYEDREGVKRTVYELDVDEVGASLRSATAKVTKT  120
SsbB  RQLATNAGSLAVGDPVVVQGRKVRTD-VREGQSRTSADIDAVAIGHDLARGTAAFRRT  117
      ** * .: * * * :***** * : *** .** :*: .:* .** .:*

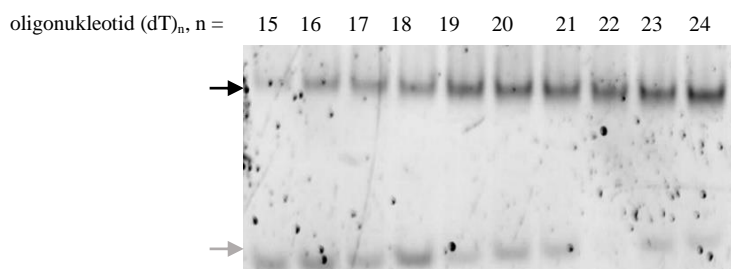
SsbA  SGQGRGGQGGYGGGGGGQGGGGWGGGPGGGQGGGAPADDPWATGGAPAGGQGGGGQGG  180
SsbB  ARTEAST-----SPPRPEPNWEV-PAGGTPGEPVPEQRDP---VPVG-----  156
      : . . . : . * ** * . * : * . * *

SsbA  GGWGGGSGGGGYSDEPPF  199
SsbB  -----  156
```

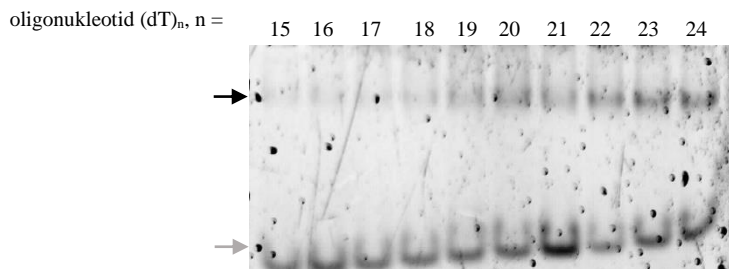
Slika 21. Sravnjivanje aminokiselinskih sljedova proteina SsbA i SsbB mrežnim programom *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

U slijedećim koracima je korištena metoda EMSA kao što je opisano u poglavlju 3. 2. 3. 1. 1., gdje su ligandi bili oligonukleotidi poli(dT) različitih duljina (**Tablica 4**). Rezultati ovih ispitivanja prikazani na **Slici 22** pokazuju kako protein SsbA pri uvjetima 30 ili 180 mmol dm⁻³ NaCl vežu sve ponuđene jLDNA (bez obzira na veličinu), ali s različitim afinitetom. Primjećuje se da povećanje koncentraciji soli u reakciji smanjuje afinitet vezanja (nespecifičnost interakcija) molekule DNA i proteina (usporedba jačine vrpce kompleksa protein:jLDNA (označeno tamnom strelicom) i disociranih jLDNA na oba gela (označeno svijetlom strelicom).

A) 30 mmol dm⁻³ NaCl



B) 180 mmol dm⁻³ NaCl



Slika 22. Kompleksi SsbA:λDNA razdvojeni metodom EMSA. Pufer za stvaranje kompleksa sastoji se od pufera D, konačne koncentracije Tris-HCl (pH = 7,5) 5 mmol dm⁻³, te pufera TA, konačne koncentracije Tris-HCl (pH = 7,5) 42 mmol dm⁻³ i octene kiseline 20 mmol dm⁻³. Omjer množinskih koncentracija [protein SsbA] : [oligonukleotid] iznosi 1 : 3.

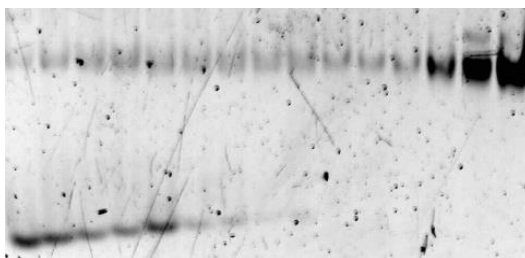
A) Kompleksi SsbA:λDNA razdvojeni u uvjetima 30 mmol dm⁻³ NaCl.

B) Kompleksi SsbA:λDNA razdvojeni u uvjetima 180 mmol dm⁻³ NaCl.

Dalje je analiziran i niz reakcija kako bi se utvrdio afinitet vezanja proteina SsbA s oligonukleotidima u puno širem rasponu duljina (17-75 nt) i pri ionskoj jakosti od 100 mmol dm⁻³ NaCl kako bi se usporedili rezultati prethodnog eksperimenta. Eksperiment je također ponovljen s oligonukleotidima istog raspona, ali pri visokoj ionskoj jakosti, 350 mmol dm⁻³ NaCl (**Slika 23**). Na gelovima B (**Slika 22**) i A (**Slika 23**) je vidljivo kako protein SsbA kod 180 mmol dm⁻³ i oligonukleotida duljine 19 ± 1 povećava afinitet za λDNA, dok je pri nižim solima (100 mmol dm⁻³ NaCl) protein SsbA učinkovitije vezao i nešto kraće oligonukleotide (17-18 nt). Pri 350 mmol dm⁻³ NaCl, vidljivo je kako protein SsbA učinkovito veže samo veće oligonukleotide (45 ± 10 nt) (**Slika 23, B**).

A) 100 mmol dm⁻³ NaCl

oligonukleotid (dT)_n, n = 17 18 19 20 21 22 23 24 25 30 35 45 55 65 75



B) 350 mmol dm⁻³ NaCl

oligonukleotid (dT)_n, n = 17 18 19 20 21 22 23 24 25 30 35 45 55 65 75



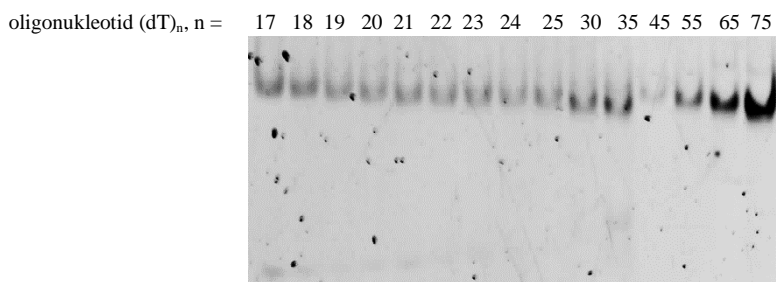
Slika 23. Kompleksi SsbA:jDNA razdvojeni metodom EMSA. Pufer za stvaranje kompleksa sastoji se od pufera D, konačne koncentracije Tris-HCl (pH = 7,5) 17 mmol dm⁻³, te pufera TA, konačne koncentracije Tris-HCl (pH = 7,5) 47 mmol dm⁻³ i octene kiseline 23 mmol dm⁻³. Omjer množinskih koncentracija [protein SsbA] : [oligonukleotid] iznosi 2 : 1.

A) Kompleksi SsbA:jDNA razdvojeni u uvjetima 100 mmol dm⁻³ NaCl.

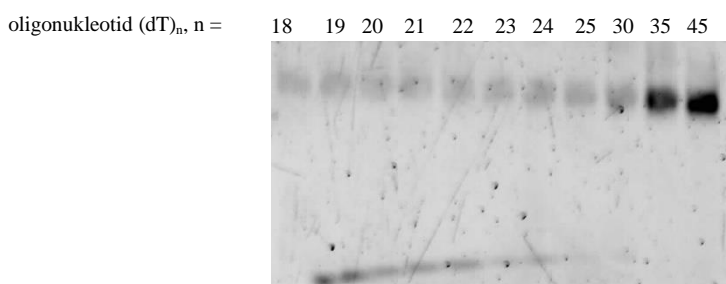
B) Kompleksi SsbA:jDNA razdvojeni u uvjetima 350 mmol dm⁻³ NaCl.

Afinitet vezanja proteina SsbB, prikazan je na **Slici 24**. U uvjetima 130 mmol dm⁻³ NaCl protein SsbB veže sve duljine oligonukleotida i to vjerojatno istim afinitetom, dok se i u strožim uvjetima od 300 mmol dm⁻³ NaCl vide puno jači signali (**Slika 24 B**) kompleksa SsbB:jDNA u odnosu na kompleks SsbA:jDNA.

A) 130 mmol dm⁻³ NaCl



B) 300 mmol dm⁻³ NaCl



Slika 24. Kompleksi SsbB:jDNA razdvojeni metodom EMSA. Pufer za stvaranje kompleksa sastoji se od pufera D, konačne koncentracije Tris-HCl (pH = 7,5) 17 mmol dm⁻³, te pufera TA, konačne koncentracije Tris-HCl (pH = 7,5) 47 mmol dm⁻³ i octene kiseline 23 mmol dm⁻³. Omjer množinskih koncentracija [protein SsbB] : [oligonukleotid] iznosi 2 : 1.

A) Kompleksi SsbB:jDNA razdvojeni u uvjetima 130 mmol dm⁻³ NaCl.

B) Kompleksi SsbB:jDNA razdvojeni u uvjetima 300 mmol dm⁻³ NaCl.

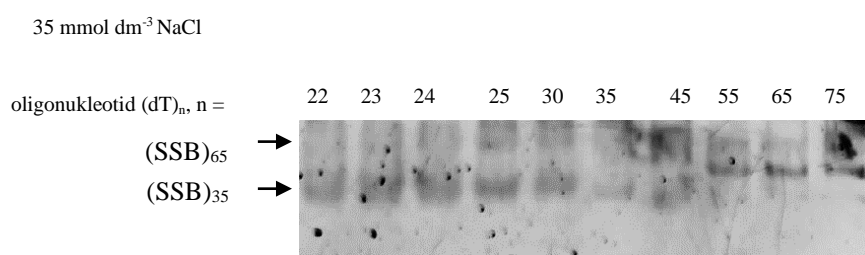
Zaključno, afinitet vezanja proteina SsbA prema jDNA se smanjuje pri višim koncentracijama soli; u takvim uvjetima protein SsbA veže učinkovitije dulje molekule jDNA. Nasuprot tome, strožiji uvjeti ionske jakosti puno manje utječu na afinitet vezanja proteina SsbB za jDNA.

4. 3. 1. 2. Ispitivanje interakcija proteina SsbA i HU u prisustvu jDNA

Iako je prethodnim ispitivanjima (Filić, Paradžik, Vujaklija) pokazano da proteini SsbA i HU ostvaruju interakcije, no do sada nije bilo poznato ostvaruju li se ove protein-protein interakcije samo u prisustvu molekula DNA. U svrhu razlučivanja prirode interakcije, proveden je niz elektroforeza zaostajanja u gelu kako bi se istražio utjecaj proteina HU na kompleks SsbA:jDNA. Trebalo je istražiti utjecaj proteina HU na ravnotežu vezanja proteina SsbA s jDNA.

Makromolekule na kojima je istraživano međudjelovanje proteina SsbA i HU bila je jDNA duljine 35 i 65 nukleotida. Iz literaturnih navoda (poglavlje 1. 2. 1.) poznato je da protein SSB bakterije *E. coli* veže jDNA duljina 35 i 65 nt tako da se jDNA veže s dvije oligomer-vezujuće

domene, tj. stvara se oblik vezanja (SSB)₃₅, ili s četiri domene oligomer-vezujuće domene tetramera proteina SSB, stvara se oblik vezanja (SSB)₆₅. Prema tome, prvotno je bio cilj ispitati uočavaju li se oblici vezanja (SSB)₃₅ i (SSB)₆₅ i kod proteina SsbA bakterije *S. coelicolor*. Prema **Slici 25** kada je proteina SsbA osam puta u odnosu na jIDNA intenzitet signala oblika vezanja (SSB)₃₅ je dominantan oblik do duljine 45 nukleotida, dok se za duže oligonukleotide preferentno uočava oblik vezanja (SSB)₆₅. Prema tome, oblik vezanja (SSB)₆₅ je dominantan oblik vezanja samo kada je proteina SsbA osam puta više od jIDNA i kada je duljina jIDNA veća od 55 nt (duljine 55-75 nt). Sukladno svemu navedenom, zaključuje se da ravnoteža između kompleksa (SsbA)₃₅ i (SsbA)₆₅ bakterije *S. coelicolor* ovisi o duljini dostupne jIDNA, što je u skladu s uočenim ponašanjem proteina SSB bakterije *E. coli*.

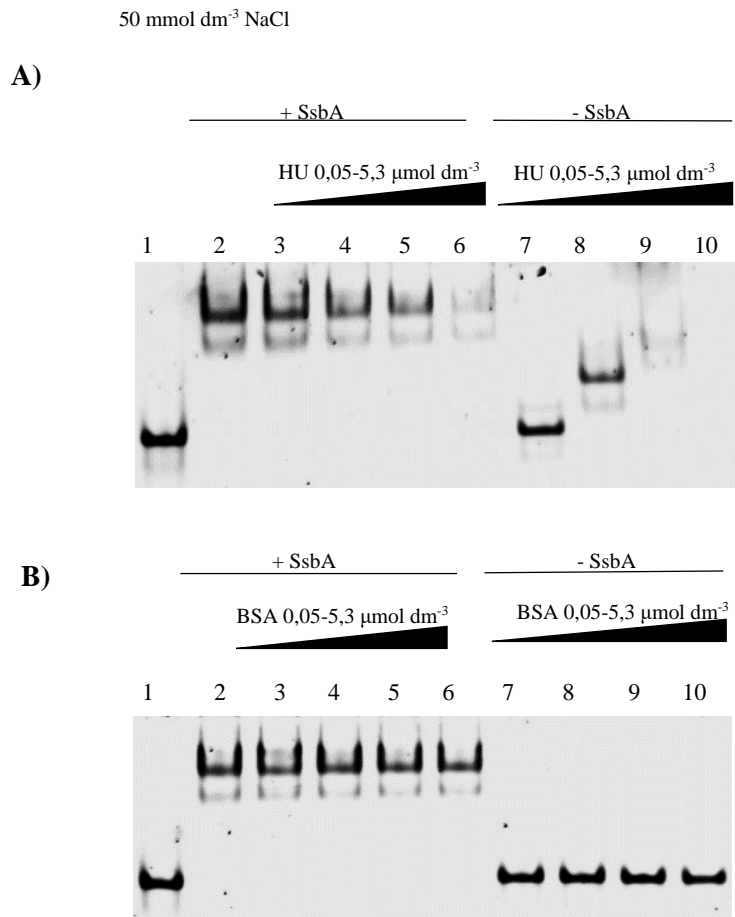


Slika 25. Kompleksi protein:DNA razdvojeni metodom EMSA. Pufer za stvaranje kompleksa sastoji se od pufera D, konačne koncentracije Tris-HCl (pH = 7,5) 5 mmol dm⁻³, te pufera TA, konačne koncentracije Tris-HCl (pH = 7,5) 40 mmol dm⁻³ i octene kiseline 20 mmol dm⁻³. [protein SsbA] : [oligonukleotid] = 8 : 1. Gornja strelica označava model vezanja (SSB)₆₅, a gornja (SSB)₃₅.

Nakon početnih ispitivanja modela vezanja SSB:jIDNA, analiziran je utjecaj proteina HU na ravnotežu kompleksa SsbA:jIDNA, gdje je jIDNA bila duljine 72 nt (**Tablica 4**, HisCBP F). Kako bi se istražilo ima li protein HU u reakcijskim smjesama samo stabilizirajuću (nespecifičnu) ulogu stabilizacije kompleksa SsbA:jIDNA ili posjeduje specifičnu ulogu preko interakcija s proteinom SsbA i/ili molekulom jIDNA, u ispitivane reakcije je dodan protein BSA umjesto proteina HU. BSA je protein molekulske mase 66 kDa koji se često u biokemiji koristi u svrhu sprečavanja nespecifičnih interakcija. Prema tome reakcije s proteinom BSA korištene su kao negativne kontrole u svrhu uspoređivanja reakcija s proteinom HU.

Prema **Slici 26** u uvjetima 50 mmol dm⁻³ NaCl kada je proteina SsbA osam puta više nego jIDNA i nema proteina HU, protein SsbA preferentno veže jIDNA u modelu vezanja (SSB)₆₅, iako je prisutan i oblik (SSB)₃₅ (A, jažica 2). Dodavanjem proteina HU u rastućim koncentracijama od 0,05 do 1,7 μmol dm⁻³ (A, jažice 3-5) uočava se da je intenzitet oba kompleksa sve manji. Kada se postigne množinski omjer HU : SsbA > 4 : 1, kompleks više ne ulazi u pore gela (jažica 6). Istovjetne reakcije s proteinom BSA ne pokazuju ovakve promjene te se zaključuje da BSA ne veže protein SsbA. Također se može primijetiti da pri istim rastućim

koncentracijama samog proteina HU (A, jažice 7-10) bez prisutnosti proteina SsbA dolazi do vezanja većeg oligonukleotidnog slijeda što mu je koncentracija veća. Ovakav trend se također ne primjećuje s proteinom BSA na gelu B, jažicama 7-10.



Slika 26. Kompleksi protein:DNA razdvojeni metodom EMSA. Pufer za stvaranje kompleksa sastoji se od pufera D, konačne koncentracije Tris-HCl (pH = 7,5) 5 mmol dm⁻³, te pufera TA, konačne koncentracije Tris-HCl (pH = 7,5) 40 mmol dm⁻³ i octene kiseline 20 mmol dm⁻³. Omjer množinskih koncentracija [protein SsbA] : [oligonukleotid] iznosi 8 : 1. Koncentracija proteina SsbA je konstantna (1,3 μmol dm⁻³).

A) Pri rastućim koncentracijama proteina HU 0,05-5,3 μmol dm⁻³.

B) Pri rastućim koncentracijama proteina BSA 0,05-5,3 μmol dm⁻³.

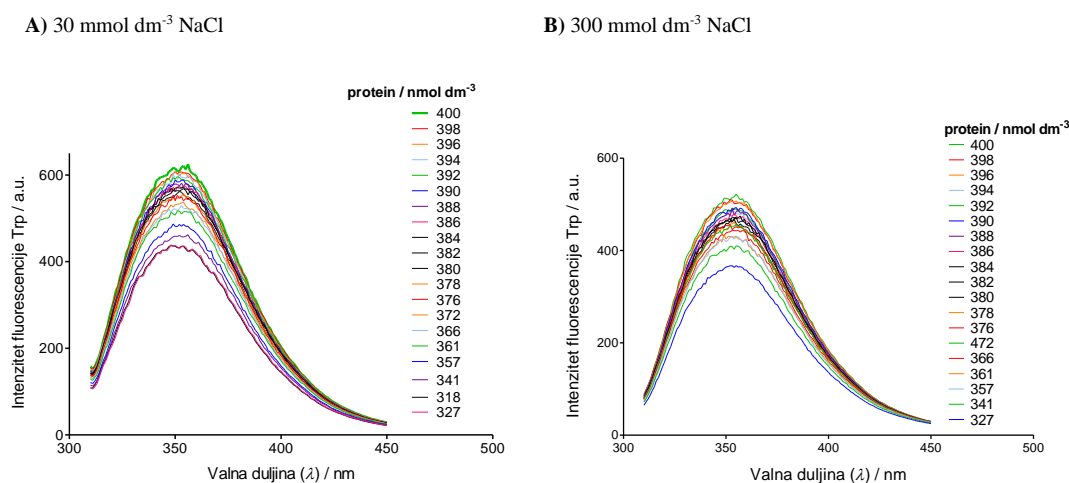
Iz svih rezultata se zaključuje da protein HU ima specifičnu ulogu u prisustvu kompleksa SsbA:jDNA. Nastavak ispitivanja je proveden u poglavlju 4. 3. 2. 2.

4. 3. 2. Ispitivanje interakcija DNA i proteina metodom fluorimetrijske spektrofotometrije

4. 3. 2. 1. Određivanje najmanje duljine jLDNA koju veže proteini SsbA i SsbB

Fluorimetrijska spektrofotometrija je kvantitativna metoda koja omogućuje kvantitativno mjerenje konstante vezanja proteina na ligand (u ovom slučaju različite koncentracije ili duljine oligonukleotida). Za razliku od fluorimetrijske spektrofotometrije, metoda EMSA je kvalitativna metoda. Svrha ovog dijela rada je bila kvantifikacija jačine interakcije proteina SsbA te SsbB s jLDNA.

Kako bi se optimizirala metoda svakoj seriji mjerenja titracije prvo je mjenjen intenzitet fluorescencije proteina SsbA i SsbB tijekom razrjeđivanja (titracije) s po 2 μl pufera za fluorescencijsku spektrofotometriju 3. 2. 3. 1. 2. (Slika 27). Usporedbom krivulja smanjenja fluorescencije proteina SsbA razrjeđivanjem puferom, uočava se kako se intenzitet fluorescencije nešto više smanjuje pri 30 mmol dm^{-3} NaCl, za razliku od fluorescencije pri 300 mmol dm^{-3} NaCl. Također, početni intenzitet fluorescencije proteina SsbA je veći uvjetima niže ionske jakosti.

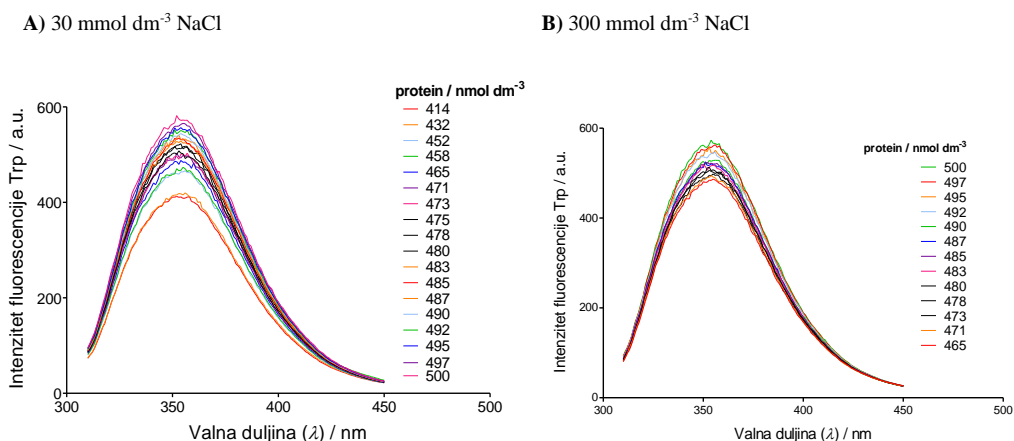


Slika 27. Emisijski spektri proteina SsbA u puferu za fluorimetrijsku spektrofotometriju pri temperaturi 20 °C i valnoj duljini pobude 295 nm. Koncentracija proteina SsbA je prikazana na slici uz emisijske spektre.

A) Emisijski spektar proteina SsbA u uvjetima 30 mmol dm^{-3} NaCl.

B) Emisijski spektar proteina SsbA u uvjetima 300 mmol dm^{-3} NaCl.

Usporedbom krivulja smanjenja intenziteta fluorescencije proteina SsbB razrjeđivanjem puferom, uočava se sličan efekt kao i kod proteina SsbB (Slika 28).

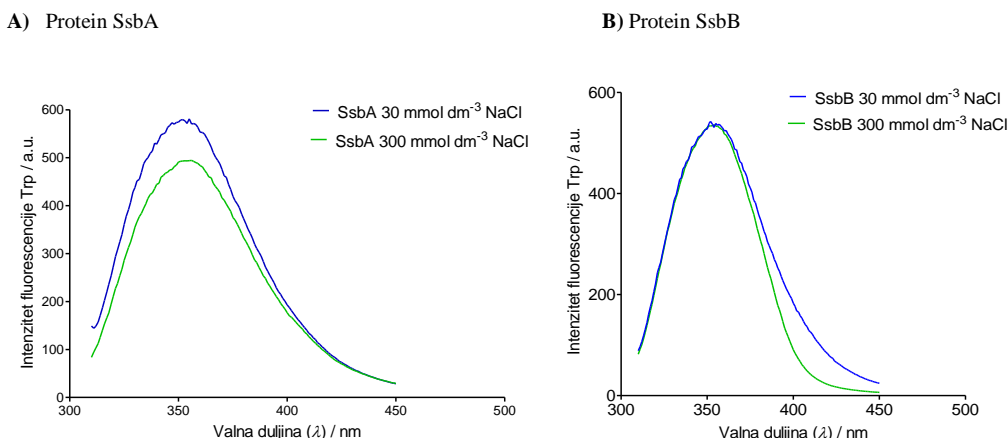


Slika 28. Emisijski spektri proteina SsbB u puferu za fluorimetrijsku spektrofotometriju pri temperaturi 20 °C i valnoj duljini pobude 295 nm. Koncentracija proteina SsbB je prikazana na slici uz emisijske spektre.

A) Emisijski spektar proteina SsbB u uvjetima 30 mmol dm⁻³ NaCl.

B) Emisijski spektar proteina SsbB u uvjetima 300 mmol dm⁻³ NaCl.

Temeljem rezultata **Slika 27** i **28** provedena je statistička analiza te su izračunati medijani intenziteta fluorescencije proteina SsbA i SsbB. Zaključeno je da stabilnost proteina SsbA ovisi o ionskoj jakosti reakcije, za razliku od proteina SsbB (**Slika 29**).



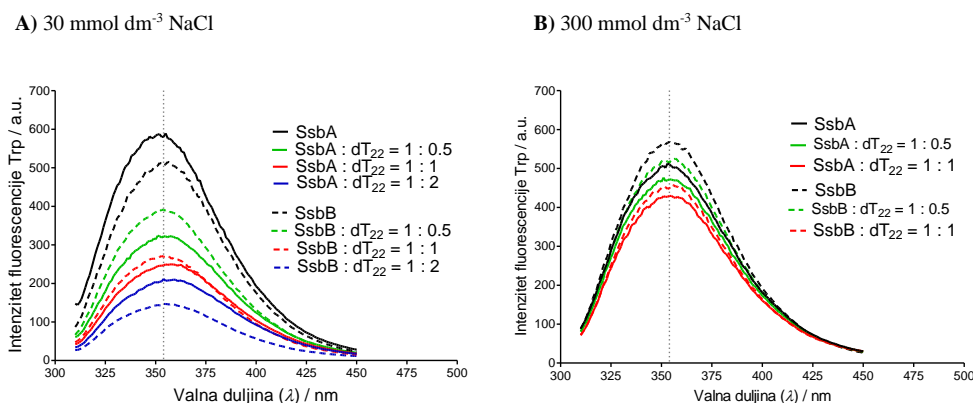
Slika 29. Emisijski spektri medijana kompleksa SSB:jDNA u puferu za fluorimetrijsku spektrofotometriju pri temperaturi 20 °C i valnoj duljini pobude 295 nm.

A) Emisijski spektar medijana kompleksa SsbA:jDNA i SsbB:jDNA u uvjetima 30 mmol dm⁻³ NaCl.

B) Emisijski spektar medijana kompleksa SsbA:jDNA i SsbB:jDNA u uvjetima 300 mmol dm⁻³ NaCl.

Nakon toga, mjeren je intenzitet fluorescencije proteina tijekom titracije s oligonukleotidima kako je opisano u poglavlju 3. 2. 3. 1. 2. (prikazana je titracija samo s dT₂₂, **Slika 30**). Titracijom proteina SsbA s jDNA dT₂₂ pri 30 mmol dm⁻³ NaCl uočava se da intenzitet fluorescencije se postepeno smanjuje što je više oligonukleotida u reakciji (A, pune linije). Isto se uočava i kod proteina SsbB (A, isprekidane linije). Pri većoj ionskoj jakosti od 300 mmol dm⁻³ NaCl (B),

uočava se nešto manji pad intenziteta fluorescencije za oba proteina. Maksimum titracije za oba tipa krivulja je uočen pri 353,93 nm (prikazano na slikama kao okomica).

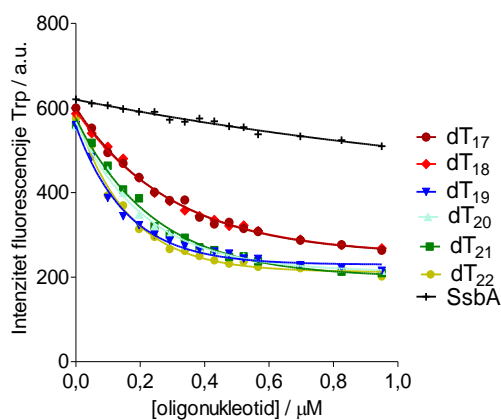
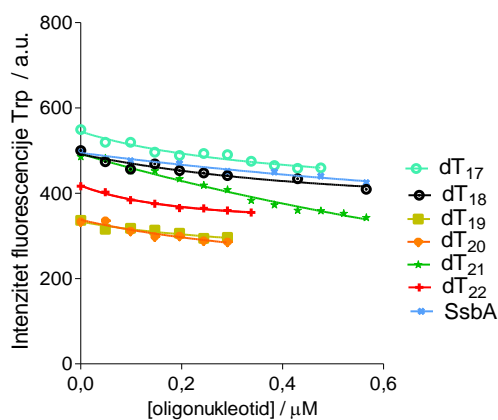


Slika 30. Emisijski spektri kompleksa SsbA:jDNA (puna linija) i SsbB:jDNA (isprekidana linija) u puferu za fluorimetrijsku spektrofotometriju pri temperaturi 20 °C i valnoj duljini pobude 295 nm. Molarni omjeri jDNA i tetramera proteina u kompleksu su prikazani na slici uz emisijske spektre.

A) Emisijski spektar kompleksa SsbA:jDNA i SsbB:jDNA u uvjetima 30 mmol dm⁻³ NaCl.

B) Emisijski spektar kompleksa SsbA:jDNA i SsbB:jDNA u uvjetima 300 mmol dm⁻³ NaCl.

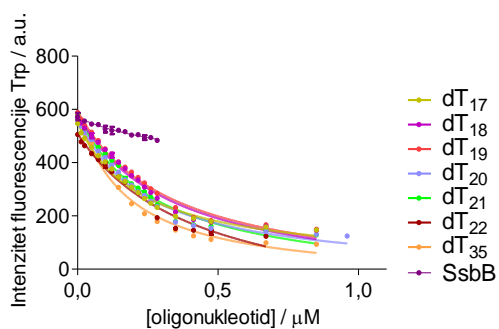
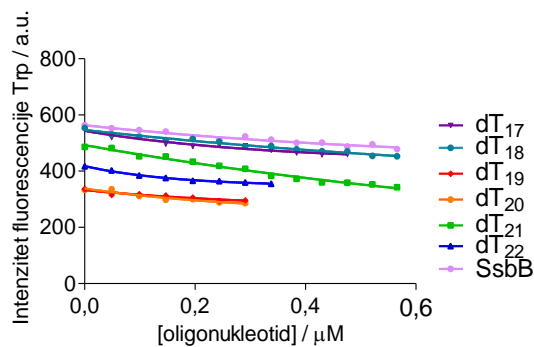
Zatim su određene krivulje intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini maksimuma od 353,93 nm u ovisnosti o duljini oligonukleotida (**Slika 31** i **32**). Na tim se grafičkim prikazima vrlo dobro uočava stalan trend smanjenja intenziteta fluorescencije uzorka proteina tijekom titracija s oligonukleotidom ili puferom. Kako je već uočeno na **Slici 31**, prilikom titracije proteina SsbA oligonukleotidima dolazi do naglijeg smanjenja intenziteta fluorescencije u puferu s 30 mmol dm⁻³ NaCl, za razliku od pufera s 300 mmol dm⁻³ NaCl (**Slika 31 A** i **B**). Isto se primjećuje u titraciji proteina SsbB s oligonukleotidima (**Slika 32 A** i **B**). Nadalje, uočava se da je titracija oba proteina oligonukleotidima opisana nelinearnom regresijom, dok je samo razrjeđivanje proteina (titracija proteina puferom) opisno pravcem (linearna regresija), što je i očekivano.

A) 30 mmol dm⁻³ NaClB) 300 mmol dm⁻³ NaCl

Slika 31. Intenzitet fluorescencije kompleksa SsbA:jDNA pri valnoj duljini 353,93 nm u ovisnosti o duljini oligonukleotida u reakcijskoj smjesi pri temperaturi 20 °C.

A) Intenzitet fluorescencije kompleksa SsbA:jDNA prilikom titracije različitim duljinama oligonukleotida u uvjetima 30 mmol dm⁻³ NaCl.

B) Intenzitet fluorescencije kompleksa SsbA:jDNA prilikom titracije različitim duljinama oligonukleotida u uvjetima 300 mmol dm⁻³ NaCl.

A) 30 mmol dm⁻³ NaClB) 300 mmol dm⁻³ NaCl

Slika 32. Intenzitet fluorescencije kompleksa SsbB:jDNA pri valnoj duljini 353,93 nm u ovisnosti o duljini oligonukleotida u reakcijskoj smjesi pri temperaturi 20 °C.

A) Intenzitet fluorescencije kompleksa SsbB:jDNA prilikom titracije različitim duljinama oligonukleotida u uvjetima 30 mmol dm⁻³ NaCl.

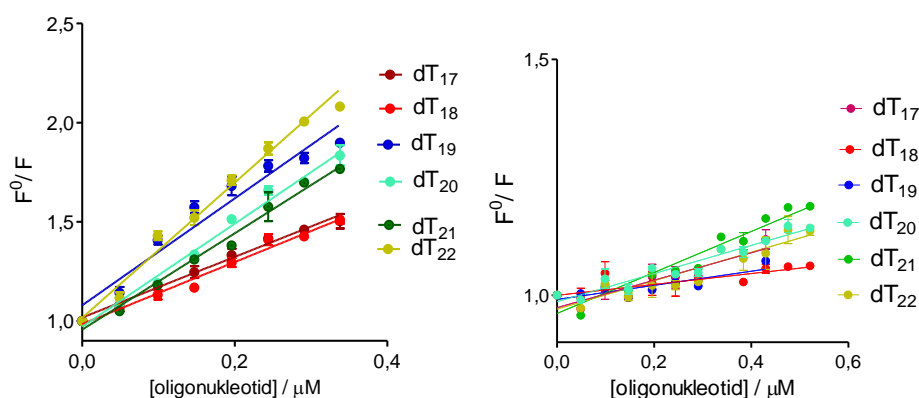
B) Intenzitet fluorescencije kompleksa SsbB:jDNA prilikom titracije različitim duljinama oligonukleotida u uvjetima 300 mmol dm⁻³ NaCl.

Iz navedenih podataka, pri valnoj duljini od 353,93 nm izračunat je omjer F_0/F iz kojeg je preko Stern-Volmerove jednadžbe, određena konstanta K_{sv} linearnom regresijom. Iz grafičkog prikaza linearizacije Stern-Volmer jednadžbe na **Slici 33** uočava se da je titracijom proteina SsbA pri uvjetima 30 mmol dm⁻³ NaCl vrijednost K_{sv} manja pri titraciji kraćim

oligonukleotidima, a veća pri titraciji duljim oligonukleotidima. Titracijom istog proteina pri uvjetima $300 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ vrijednost K_{sv} ima sličan trend vrijednosti kao pri $30 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$. Usporedbom pravaca pri uvjetima 30 mmol dm^{-3} i $300 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ uočava se da su vrijednosti K_{sv} za red veličine veće pri manjoj ionskoj jakosti. Nadalje, standardne pogreške za vrijednosti K_{sv} su manje pri $30 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ nego pri većoj ionskoj jakosti.

A) $30 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$

B) $300 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$



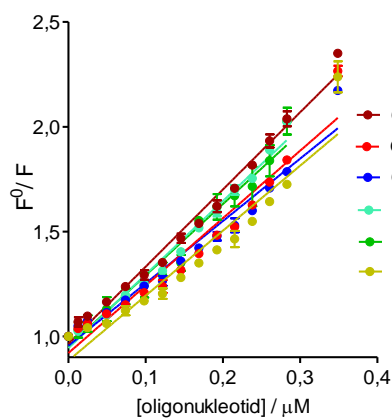
Slika 33. Stern-Volmer linearizacija smanjenja intenziteta fluorescencije kompleksa SsbA:jDNA u ovisnosti o duljini oligonukleotida. Ovisnost omjera početnog intenziteta fluorescencije proteina SsbA i fluorescencije kompleksa SsbA:jDNA pri temperaturi $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i valnoj duljini pobude 295 nm o koncentraciji oligonukleotida u reakcijskoj smjesi.

A) Smanjenje intenziteta fluorescencije kompleksa SsbA:jDNA u ovisnosti o duljini oligonukleotida u uvjetima $30 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$.

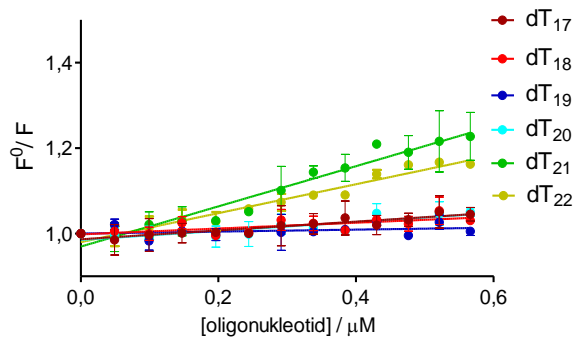
B) Smanjenje intenziteta fluorescencije kompleksa SsbA:jDNA u ovisnosti o duljini oligonukleotida u uvjetima $300 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$.

Titracijom proteina SsbB pri uvjetima $30 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ vrijednost K_{sv} je vrlo ujednačena, za razliku od proteina SsbA pri istim uvjetima (**Slika 34**). Titracijom u uvjetima $300 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ vrijednost K_{sv} varira ovisno o duljini oligonukleotida (B). Vrijednost K_{sv} pri manjoj ionskoj jakosti je za red veličine veća nego pri većoj ionskoj jakosti. Uočava se da su vrijednosti K_{sv} i proteina SsbA i SsbB za red veličine veće pri $30 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$. Nadalje, standardne pogreške su manje za vrijednosti K_{sv} pri manjoj ionskoj jakosti nego pri većoj ionskoj jakosti NaCl.

A) 30 mmol dm⁻³ NaCl



B) 300 mmol dm⁻³ NaCl



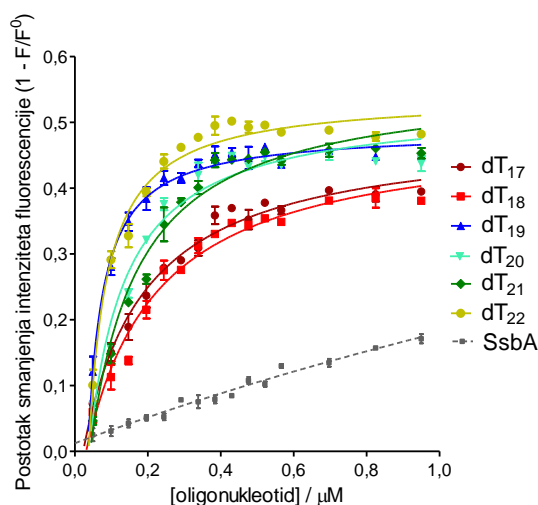
Slika 34. Stern-Volmer linearizacija smanjenja intenziteta fluorescencije kompleksa SsbB:jDNA u ovisnosti o duljini oligonukleotida. Ovisnost omjera početnog intenziteta fluorescencije proteina SsbB i fluorescencije kompleksa SsbB:jDNA pri temperaturi 20 °C i valnoj duljini pobude 295 nm o koncentraciji oligonukleotida u reakcijskoj smjesi.

A) Smanjenje intenziteta fluorescencije kompleksa SsbB:jDNA u ovisnosti o duljini oligonukleotida u uvjetima 30 mmol dm⁻³ NaCl.

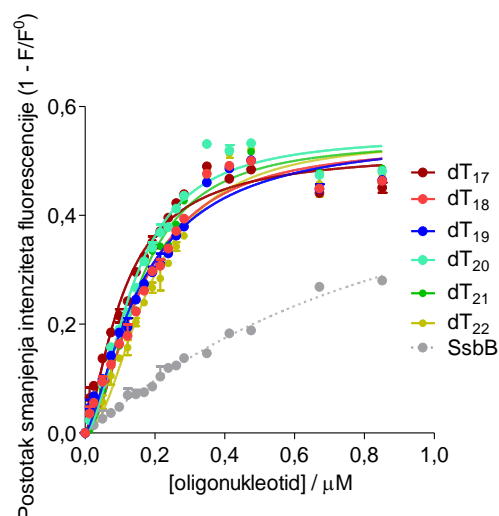
B) Smanjenje intenziteta fluorescencije kompleksa SsbB:jDNA u ovisnosti o duljini oligonukleotida u uvjetima 300 mmol dm⁻³ NaCl.

Konstanta disocijacije kompleksa SSB:jDNA je izračunata nelinearnom regresijom iz krivulje vezanja (Hillova krivulja) (**Slika 35**). Izračunate vrijednosti K_d kompleksa SsbA:oligonukleotid su veće nego proteina SsbB što ukazuje na to da protein SsbB jače veže DNA pripadne veličine. Također, uočava se da protein SsbB veže sve ispitane oligonukleotide sličnim afinitetom, za razliku od proteina SsbA što je u skladu s rezultatima metode EMSA (**Slika 23 i 24**).

A) Protein SsbA



B) Protein SsbB



Slika 35. Krivulja zasićenja kompleksa SSB:jDNA različitim duljinama oligonukleotidima u uvjetima 30 mmol dm⁻³ NaCl.

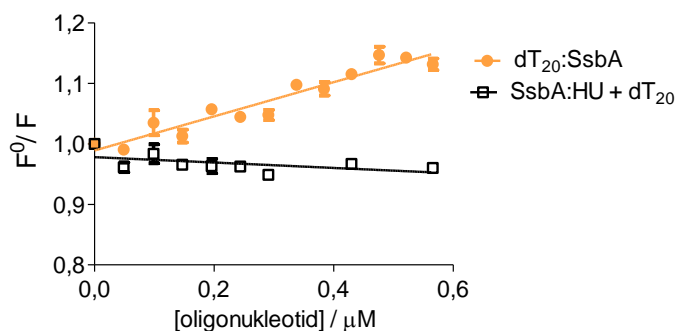
A) Ovisnost postotka smanjenja intenziteta fluorescencije kompleksa SsbA:jDNA o duljinama nukleotida u uvjetima 30 mmol dm⁻³ NaCl.

B) Ovisnost postotka smanjenja intenziteta fluorescencije kompleksa SsbB:jDNA o duljinama nukleotida u uvjetima 30 mmol dm⁻³ NaCl.

Ovim mjerenjima je pokazano za sastav otopine, posebice koncentracija soli u reakcijskoj smjesi, utječe na interakcije proteina SSB i jDNA. U uvjetima veće ionske jakosti (300 mmol dm⁻³ NaCl) interakcije oligonukleotida i proteina su slabije u usporedbi s uvjetima niže ionske jakosti (30 mmol dm⁻³ NaCl). Kao i u poglavlju 4. 3. 1. 1. zaključuje se da veća koncentracija soli smanjuje interakcije jDNA i proteina SSB.

4. 3. 2. 2. Ispitivanje utjecaja proteina HU na kompleks SsbA:DNA

Kako bi se dodatno analizirali dobiveni rezultati poglavlja 4. 3. 1. 2., proteinski kompleks SsbA:HU je titriran oligonukleotidom dT₂₀ i uspoređen s titracijom proteina SsbA istim oligonukleotidom s ciljem da se istraži razlika u intenzitetu fluorescencije proteina SsbA. Napravljena je Stern-Volmer linearizacija (**Slika 36**) te je uočeno kako intenzitet fluorescencije titracije kompleksa SsbA:HU vrlo slabo opada što je više oligonukleotida u suvišku. Za razliku od toga, titracijom proteina SsbA oligonukleotidom dT₂₀ intenzitet fluorescencije pada. Zaključuje se kako protein SsbA ne može vezati jDNA kada je u kompleksu SsbA:HU, te da se nastanak stabilnog kompleksa SsbA:HU ostvaruje bez prisutnosti DNA.



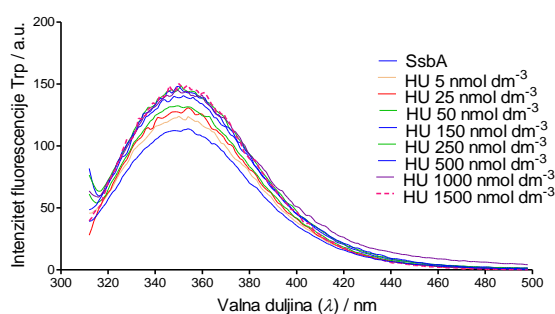
Slika 36. Stern-Volmer linearizacija smanjenja intenziteta fluorescencije proteina SsbA u uvjetima 300 mmol dm^{-3} NaCl. Ovisnost omjera početne fluorescencije kompleksa i mjerene fluorescencije kompleksa (pri temperaturi $20 \text{ }^\circ\text{C}$ i valnoj duljini pobude 295 nm o koncentraciji oligonukleotida dT_{20} u reakcijskoj smjesi.

4. 4. Ispitivanje protein-protein interakcija

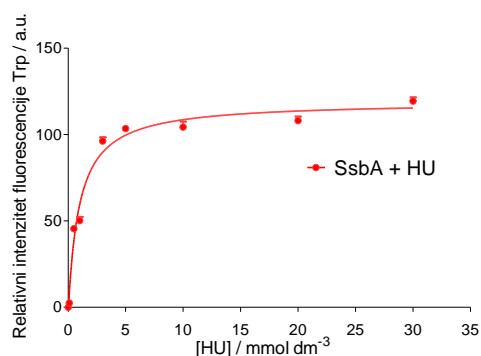
4. 4. 1. Ispitivanje interakcija proteina SsbA i HU metodom fluorimetrijske spektrofotometrije

Interakcija kompleksa SsbA:HU je zatim istraživana direktno, praćenjem promjene intenziteta fluorescencije proteina SsbA titracijom s proteinom HU, (**Slika 37 A**). Maksimum intenziteta fluorescencije se uočava pri $353,03 \text{ nm}$, a intenzitet fluorescencije proteina SsbA se smanjuje s porastom koncentracije proteina HU što potvrđuje njihovu interakciju. Nakon toga, napravljena je nelinearna regresija maksimuma relativnih intenziteta fluorescencije kako bi se dobila krivulja zasićenja (**Slika 37 B**). Dobivena vrijednost K_d je iznosila $(0,9546 \pm 0,2034) \mu\text{mol dm}^{-3}$, gdje je vrijednost R^2 $0,9820$ (pri $20 \text{ }^\circ\text{C}$).

A)



B)



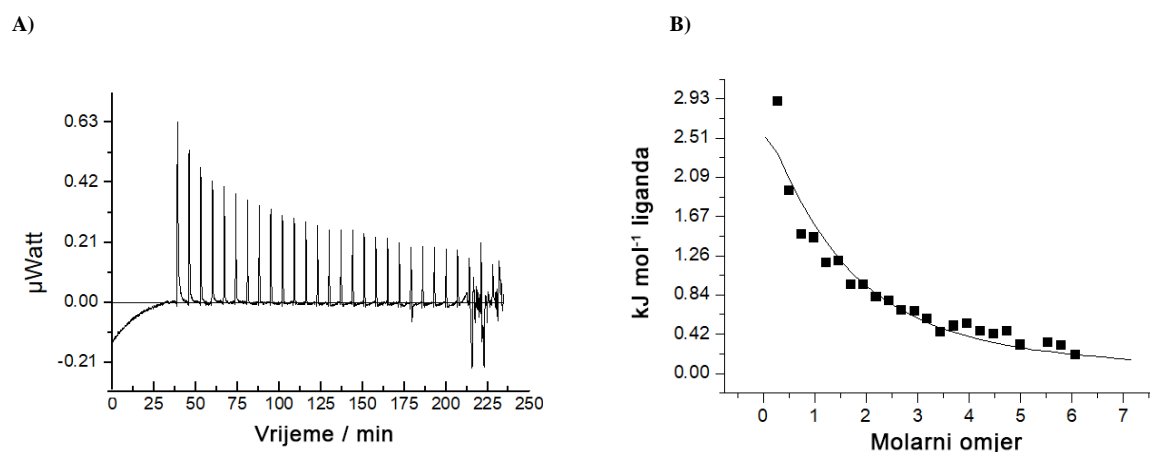
Slika 37. A) Emisijski spektri kompleksa SsbA:HU u puferu za fluorimetrijsku spektrofotometriju pri temperaturi $20 \text{ }^\circ\text{C}$ i valnoj duljini pobude 295 nm . Koncentracija proteina HU u reakciji je prikazana na slici uz emisijske spektre. Koncentracija proteina SsbA je konstantna (200 nmol dm^{-3}).

B) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije kompleksa SsbA:HU o koncentraciji proteina HU pri valnoj duljini $353,03 \text{ nm}$.

4. 4. 2. Ispitivanje interakcija proteina SsbA i HU metodom izotermalne titracijske kalorimetrije

Sljedeća biofizička metoda korištena u svrhu karakterizacije kompleksa SsbA:HU bila je izotermalna titracijska kalorimetrija⁵. Mjerenja su bila provedena prema uputama u poglavlju 3. 2. 3. 2. 5.

Pripremljeni su proteini u koncentracijama: SsbA 30 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ te HU 1000 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Titracijska krivulja pokazuje da se nakon dodavanja obroka proteina HU od 10 μl u ćeliju s proteinom SsbA ulaže velika toplina tijekom vezanja, koja se smanjuje sljedećim obrocima dodavanja proteina HU što ukazuje na postepeno zasićenje proteina SsbA proteinom HU (**Slika 38 A**). Prema tome, reakcija je endotermna. Iz iznosa entalpije koji je bio jako pozitivan zaključuje se kako je cijeli proces titracije vođen hidrofobnim interakcijama (**Slika 38 B**). Dobivene termodinamičke vrijednosti pri 25 °C su iznosile: $K_d = (2,35 \pm 0,14) \mu\text{mol dm}^{-3}$, $N = 0,986 \pm 0,021$, $\Delta H = (6622 \pm 482) \text{ J mol}^{-1}$, $\Delta S = 105 \text{ J mol}^{-1}$ te $\Delta G = -24,6 \text{ kJ mol}^{-1}$.



Slika 38. Grafički prikazi rezultata dobivenih metodom izotermalne titracijske kalorimetrije.

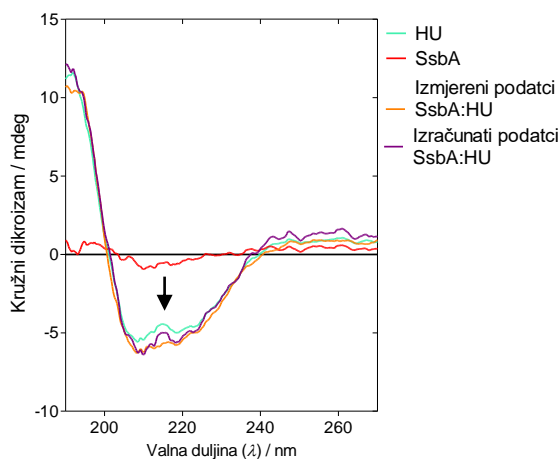
A) Ovisnost veličine DP (diferencijalna razlika snage mjerene i referentne ćelije koja se utroši na održavanje istovjetne temperature mjerne i referentne ćelije) o vremenu. Drugim riječima, ovaj grafički prikaz pokazuje kako se mijenjala entalpija titracije ovisno o dodavanju obroka proteina HU od 10 μl u ćeliju s proteinom SsbA.
B) Ovisnost entalpije o molarnom omjeru proteina SsbA/ HU.

⁵ Suradnja s dr. sc. I. Crnolatcom (Laboratorij za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, ZOKB, IRB).

4. 4. 3. Ispitivanje interakcija proteina SsbA i HU metodom spektroskopije kružnog dikroizma

U svrhu praćenja konformacijskih promjena proteina SsbA i HU nakon ostvarivanja interakcije, korištena je spektroskopija kružnog dikroizma⁶. Mjerenja su napravljena prema uputama u poglavlju 3. 2. 3. 2. 6. Svi dobiveni rezultati su prikazani u **Prilogu 2**.

Prvo su izmjereni spektri za svaki istraživani protein. Prema obliku dobivenog spektra na **Slici 39**, uočava se da je protein SsbA ponajprije sastavljen od β -ploča, a protein HU od α -zavojnica. U spektru proteina HU uočavaju se dva minimuma (negativna eliptičnost) pri 210 i 220 nm, s lokalnim maksimumom (povećana negativna eliptičnosti) pri 215 nm. Smjesa proteina SsbA i HU ima oblik vrlo sličan spektru samog proteina HU, osim što se razlikuje u dijelu najveće negativne eliptičnosti. Izmjereni i izračunati podaci se najviše razlikuju oblikom spektra u lokalnom maksimumom pri 215 nm (označeno strelicom). Usporedbom izmjerenih i izračunatih spektara moguće je dobiti informaciju o interakciji dvaju proteina. Naime, ukoliko nema interakcija između proteina SsbA i HU spektar kompleksa SsbA:HU bi izgledao kao zbroj vrijednosti oba spektra (kao krivulja izračunatih podataka). U slučaju interakcije ova dva proteina, spektar bi se morao razlikovati od izračunatog spektra (izmjereni podatci). Uočava se da je izmjereni spektar različit od izračunatog, odnosno nema izražen lokalni maksimum pri 215 nm kao izračunati spektar čime se potvrđuje protein-protein interakcija proteina SsbA i HU.

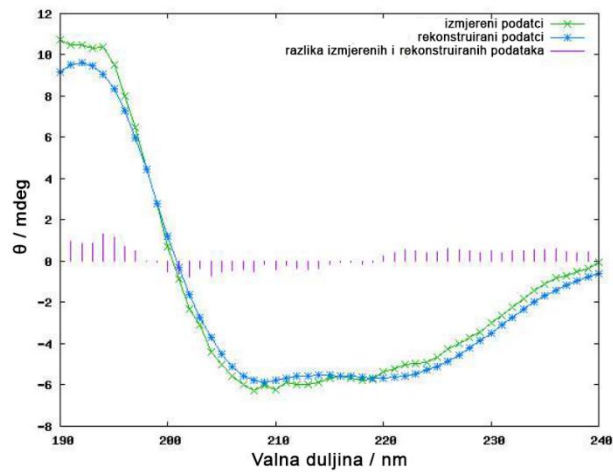


Slika 39. Ovisnost interakcije proteina SsbA i HU na temelju izmjerenih i izračunatih podataka kružnog dikroizma o valnoj duljini svjetlost.

Nadalje, isti podatci su obrađeni i računalnim alatom *Dichroweb* kako bi se razlučila sekundarna struktura kompleksa SsbA:HU. Kumulativan spektar kompleksa SsbA:HU je modeliran prema modelu SELCON3, iako je najbolji rezultat bio prikazan modelom CONTIN (**Slika 40**). Prema

⁶ Suradnja s dr. sc. I. Crnolatcom (Laboratorij za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, ZOKB, IRB).

modelu SELCON3, kompleks SsbA:HU se sastojao od 17,9% α -zavojnica, 33,7% β -ploča i ostatka neuređenih sekundarnih struktura.



Slika 40. Spektar proteina SsbA i HU izmjeren spektroskopijom kružnog dikroizma. Zelena krivulja prikazuje izmjerene podatke, plava krivulja rezultate dobivene modeliranjem po modelu SELCON3 SP175. Roze oznake označavaju mjesta odstupanja izmjerenih i modeliranih podataka. U ovom slučaju, razlika izmjerenih i modeliranih podataka je vrlo mala.

Prema svim prikazanim rezultatima, može se zaključiti da je spektar kompleksa SsbA:HU različit od spektra samog proteina HU i proteina SsbA, čime se potvrđuje postojanje interakcija između oba navedena proteina.

5. Rasprava

5. 1. Protein-DNA interakcije

Jedan od ciljeva ovog rada bio je analizirati uvjete vezanja proteina SsbA i SsbB za jednolančanu molekulu DNA. Za početak, interakcija proteina SsbA i SsbB s jDNA je istražena u ovisnosti o koncentraciji NaCl. Naime, bakterije prilagođavaju unutarstaničnu koncentraciju soli (iona kao što su K^+ i Cl^-) s obzirom na vanstaničnu osmolarnost. Koncentracija iona u citoplazmi bakterija se kreće od 10-300 mmol dm^{-3} (<http://book.bionumbers.org/what-are-the-concentrations-of-different-ions-in-cells/>). S obzirom na ovaj navedeni raspon ionskih jakosti, poznato je kako se i protein prilagođavaju novonastalim uvjetima. Prema literaturnim navodima, afiniteti vezanja jDNA bakterijskih proteina SSB mijenjaju u ovisnosti o ionskoj jakosti (Bujalowski i sur. 1988, Huang i Huang 2014). Tako su i naši inicijalni rezultati, ali i manji broj eksperimenata pokazali da ionska jakost utječe i na afinitet vezanja jDNA paralognih proteina SsbA i SsbB bakterije *S. coelicolor* (Paradžik i sur. 2013). Međutim, do ove studije nisu napravljene detaljne analize niti ispitana svojstva vezanja ovih proteina za različite duljine oligonukleotida. Tijekom ovog rada, metodom EMSA istražen je afinitet vezanja proteina SsbA i SsbB za jDNA u velikom rasponu (15-75 nt). Uočeno da pri nižoj koncentraciji soli u reakciji vezanja protein SsbA veže sve duljine jDNA, ali različitim afinitetom, odnosno njegov afinitet vezanja se povećava kako se povećavaju duljine jDNA. Nasuprot tome, pri većim koncentracijama soli protein SsbA veže učinkovitije samo dulje molekule jDNA. Kod proteina SsbB koncentracije soli nisu imale tako značajan utjecaj na njegov afinitet vezanja jDNA. Pri nižim ili značajno većim koncentracijama soli protein SsbB veže jDNA puno učinkovitije i manje selektivno s obzirom na duljinu jDNA u odnosu na protein SsbA.

Prema literaturnim navodima najkraća jDNA koju veže protein SSB iz različitih bakterijskih organizmima iznosi (u pb): *E. coli* 35 ± 2 pri 1 mmol dm^{-3} NaCl, *Mycobacterium tuberculosis* 16 ± 1 pri 50 mmol dm^{-3} NaCl, *Helicobacter pylori* 25 ± 2 pri 300 mmol dm^{-3} te *Klebsiela pneumoniae* 26 ± 2 , *Salmonella enterica* 21 ± 2 i *Pseudomonas aeruginosa* 29 ± 2 pri 100 mmol dm^{-3} NaCl (Bujalowski i sur. 1988, Chan i sur. 2009, Huang i Huang 2014, Purnapatre i Varshney 1999). Usporedbom rezultata ovog rada s literaturnim podatcima, može se zaključiti da se protein SsbA *S. coelicolor* ponaša kao protein SSB bakterije *Mycobacterium tuberculosis*, što nije neočekivano uzimajući u obzir njihovu strukturnu sličnost (Štefanić i sur. 2009). I protein SsbB se ponaša slično kao protein SSB bakterije *M. tuberculosis*, no treba uzeti u obzir da se on u svojoj kvartarnoj strukturi ne razlikuje značajnije od SsbA. Ipak treba imati na umu kako ovaj protein veže veći raspon duljina jDNA i to s većim afinitetom, bez obzira na prisutnost soli. Mogući razlog tome je sama struktura proteina SsbB; naime usporedbom domena proteina SsbA i SsbB uočava se da protein SsbB ne posjeduje kiseli vrh (sравnjenje aminokiselinskih sljedova je prikazano na **Slici 21**). Naime, utvrđeno je kako se aminokiselinski

slijed na C-kraju proteina SSB (kiseli vrh) veže za oligomer-vezujuću domenu što utječe na interakcije između proteina SSB i DNA (Kozlov i sur. 2015). S obzirom na izostanak kiselog vrha kod proteina SsbB moguće je da baš to svojstvo osigurava ovom protein učinkovitije vezanje jDNA.

Nadalje, korištena je metoda fluorimetrijske spektrofotometrije kako bi se detaljnije ispitali kvalitativni rezultati dobiveni metodom EMSA. Rezultati fluorimetrijske spektrofotometrije dali su kvantitativne podatke o tome koliko je triptofan (koji je važan za vezanje) proteina SsbA i SsbB pristupačan jDNA. Kao što je pokazano, što je veća konformacijska promjena prilikom vezanja proteina SsbA i SsbB s jDNA to je vrijednost K_{sv} veća. Položaji triptofana u proteinima SsbA i SsbB su navedeni u **Prilogu 3**. Rezultati su pokazali da intenzitet fluorescencije pri većoj ionskoj jakosti manje slabi, a vrijednost K_{sv} je za red veličine manji pri ovim uvjetima u usporedbi s nižom ionskom jakosti. Ovaj rezultat objašnjava slabije vezanje proteina SSB i jDNA u većim koncentracijama soli. Naime, povećanjem ionske jakosti reakcije, slabe i interakcije triptofana i slobodnih oligonukleotida. Usporedbom vrijednosti K_d kompleksa SSB:oligonukleotid, zaključeno je da protein SsbB ima veći afinitet za jDNA u usporedbi s proteinom SsbA za prosječno dva puta (u uvjetima 30 mmol dm⁻³ NaCl). Prema Paradžik i sur. (2013), konstanta asocijacije proteina SsbA s (dT)₃₅ je iznosila 0,12 μmol dm⁻³, a proteina SsbB s (dT)₃₅ 0,01 μmol dm⁻³. Prema tom radu, pokazano je da protein SsbB ima deset puta veći afinitet od proteina SsbA (u uvjetima 10 mmol dm⁻³ MgCl₂). Smatra se da je razlika u rezultatima proizašla i iz činjenice da su u ovom radu intenziteti fluorescencije korigirani na razrjeđenje. Što se tiče interpretacije krivulja zasićenja, iste su napravljene po Hillovoj jednadžbi (poglavlje 4. 3. 2. 1.). U našim analizama je pokazano da je vrijednost koeficijenta h za sva mjerenja između 1,4-1,8. U slučaju kada je Hillov koeficijent h veći od jedan, vezanje liganda na protein se smatra kooperativnim procesom. Prema tome se zaključuje da je vezanje jDNA na proteine SsbA i SsbB kooperativan proces. Ovi rezultati su potkrepljeni literaturnim navodima u kojima je opisano da su u modelu vezanja (SSB)₃₅ dva od četiri vezna mjesta proteina SSB bakterije *E. coli* kooperativno vežu jDNA (Kozlov i sur. 2015).

Iz svega navedenog, rezultati su pokazali kako protein SsbA ima svojstvo „razlikovanja“ koje će duljine vezati ovisno o ionskoj jakosti, dok to svojstvo nije tako izraženo kod proteina SsbB. Možda upravo ova svojstva imaju važnu biološku ulogu. Naime, može se pretpostaviti kako se ovisno o ionskoj jakosti citoplazme u hifama bakterije *S. coelicolor* modulira sposobnost paralognih proteina SsbA i SsbB da vežu jDNA različitih duljina. Pri uvjetima optimalnim za rast vegetativnih hifa više se eksprimira protein SsbA (Paradžik i sur. 2013). Koncentracije soli se možda u hifama mijenjaju kada bakterija *S. coelicolor* dođe u hipertonične uvjete okoliša ili kao odziv na neke stresne stanične procese, poput nedostataka hranjiva, hipoksije, pa čak i tijekom reprodukcije faze kada streptomiceti počinju stvarati spore. Tada se i stanični proteini

moraju prilagoditi povećanoj unutarstaničnoj koncentraciji soli. Naši rezultati ukazuju kako protein SsbB u takvim uvjetima ima sposobnost učinkovitijeg vezanja jIDNA. Protein SsbA je esencijalan stanični protein kojem možda upravo u specifičnim staničnim uvjetima protein SsbB je pomaže, odnosno osigurava nesmetano izvođenje nekih specifičnih staničnih procesa. Drugim riječima, ako dođe do povećanja osmolarnosti citoplazme, SsbA više ne može istim afinitetom vezati jIDNA kao u uobičajenim uvjetima, već mu pomaže SsbB (veći afinitet prema jIDNA od SsbA) kako bi sačuvao integritet genoma. Sličan su zaključak primijetili i Singh i sur. (2018) u čijem je radu zaključeno da je ekspresija proteina SsbB bakterije *Mycobacterium smegmatis* povećana u uvjetima hipoksije i povećanog intenziteta UV svjetla. Prema tome, sinteza proteina SsbB potiče se u ekstremnijim životnim uvjetima okoliša.

5. 2. Protein-protein interakcije

Drugi cilj ovog rada bio je potvrditi prethodne rezultate grupe da proteini SsbA i HU (HupA) ostvaruju interakcije što je detaljno istraženo različitim biofizikalnim metodama *in vitro*⁷. Podatci dobiveni izotermalnom titracijskom kalorimetrijom su pokazali sljedeće: vezanje proteina HU na protein SsbA je endoteran proces, s pozitivnim vrijednostima entalpije i entropije. Proces nastajanja interakcija između proteina SsbA i HU je entropijski vođen proces. To znači da hidrofoban efekt ima glavnu ulogu u stvaranju interakcija. Velika većina protein-protein interakcija je vođena hidrofobnim efektom (Keskin i sur. 2008). Termodinamski podatci slobodne Gibbsove energije potvrđuju da je nastajanje kompleksa SsbA:HU spontan događaj tijekom kojeg dolazi do vrlo značajnih konformacijskih promjena. Podatci su ukazivali da se proteinski partneri vežu u molarnom omjeru 1 : 1. Vrijednost $K_d = (2,35 \pm 0,14) \mu\text{mol dm}^{-3}$ dobivena metodom izotermalne titracijske kalorimetrije ukazuje na to da interakcija proteina SsbA i HU pripada skupini slabih do srednje jakih interakcija. Vrijednost $K_d = (0,9546 \pm 0,2034) \mu\text{mol dm}^{-3}$ dobivena metodom fluorimetrijske spektrofotometrije je vrlo slična vrijednosti dobivenoj metodom izotermalne titracijske kalorimetrije. Obje vrijednosti K_d imaju smisla u staničnim uvjetima u kojima stanična koncentracija proteina HU iznosi do 10 mmol dm^{-3} (Gruber 2004), a proteina SSB $0,05\text{-}0,3 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (Meyer i Laine 1990). Neodgovoreno ostaje pitanje kada i kako dolazi do povećane ekspresije jednog od proteinskih interaktora kako bi se ostvarila stanična koncentracija veća od vrijednosti konstante disocijacije. Povrh svega, podatci dobiveni spektrometrijom kružnog dikroizma su pokazali da spektar proteina SsbA vrlo malo pridonosi spektru kompleksa SsbA:HU. Tijekom interakcije s proteinom SsbA konformacijska promjena se događa na proteinu HU povećanjem udjela β -ploča za 7% te smanjenjem udjela α -zavojnica za 5%.

⁷ Suradnja s dr. sc. I. Crnolatcom (Laboratorij za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, ZOKB, IRB).

Cjelokupni rezultati naše grupe potvrđuju ostvarivanje interakcija između proteina SsbA i HU. Prema Kumar i sur. (2016) proteinski homolozi proteina HU i SsbA bakterije *E. coli*, HupA i SSB, tvore protein-protein interakcije što je detektirano visokoprotlačnom pretragom. Povrh svega, podatkovna baza *String* je predvidjela na temelju računalnih algoritama vođena radom na *E. coli* koju su objavili Kumar i sur. (2016) da protein Hup1, odnosno HU, i protein Ssb2, odnosno SsbA, tvore interakcije u bakteriji *S. coelicolor* (**Prilog 4**). Prema tome, u ovom diplomskom radu je prvi puta detaljnije biofizikalno ispitan navedeni proteinski kompleks SsbA:HU. S obzirom da nije poznato kada se ostvaruje, odnosno ne zna se točan staničan kontekst u kojem se dešavaju ove proteinske interakcije potrebna su dodatna ispitivanja kako bi se rasvijetlili procesi kompleksa SsbA:HU.

6. Zaključak

- Metodama rekombinantne DNA tehnike gen *hu* bakterije *Streptomyces coelicolor* je uspješno ugrađen u ekspresijski vektor.
- Prekomjerno eksprimirani protein SsbA i HU su pročišćeni iz topljivih frakcija lizata bakterijskih stanica *E. coli* afinitetnom kromatografijom i kromatografijom ionske izmjene.
- Ispitani su uvjeti ostvarivanja kompleksa proteina SsbA i SsbB s jIDNA.
 - Pri nižoj koncentraciji soli protein SsbA veže sve duljine jIDNA (ali različitim afinitetom), a pri višim koncentracijama soli protein SsbA veže učinkovitije samo dulje molekule jIDNA.
 - Kod proteina SsbB koncentracije soli nisu imale značajan utjecaj na njegov afinitet vezanja jIDNA
 - Protein SsbB ima prosječno dva puta veći afinitet prema jIDNA nego protein SsbA.
 - Hillove krivulje pokazuju da je vezanje jIDNA na proteine SsbA i SsbB kooperativan proces.
- Ispitana je protein-protein interakcija proteina SsbA i HU.
 - Interakcija proteina SsbA i HU je spontan proces, vođen hidrofobnim interakcijama. Konformacijska promjena se događa na proteinu HU tijekom nastajanja kompleksa SsbA:HU.
 - Vrijednost K_d (SsbA:HU) je relativno visoka vrijednost i iznosi prosječno $1,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$, što je i očekivano s obzirom na staničnu koncentraciju oba interaktanta.
 - Nastajanje kompleksa SsbA:HU se ostvaruje bez prisustva jIDNA. Protein HU ne može vezati jIDNA kada je jIDNA prethodno zasićena proteinom SsbA.

7. Literatura

7. 1. Literaturni izvori

- Anderson A. S., Wellington E. M. H. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 797-814.
- Atlung T., Hansen F. G. 2002. Effect of different concentrations of H-NS protein on chromosome replication and the cell cycle in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **184**, 1843-1850.
- Bauer A., Kuster B. 2003. Affinity purification-mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry* **270**, 570–578.
- Bensaid A., Almeida A., Drlica K., Rouviere-Yaniv J. 1996. Cross-talk between topoisomerase I and HU in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **256**, 292-300.
- Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeno-Tarraga A. M., Challis G. L. , Thomson N. R., James K. D., Harris D. E., Quail M. A., Kiese H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C. W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C. H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O’Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M. A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B. G., Parkhill J., Hopwood D. A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature* **417**, 141–147.
- Berdy J. 1985. Screening, classification and identification of microbial products: Verral M. S., *Discovery and Isolation of Microbial Products*, 9–31. Ellis Horwood, Chichester, UK.
- Bianco P. R., Pottinger S., Tan H. Y., Nguyenduc T., Rex K., Varshney U. 2017. The IDL of *E. coli* SSB links ssDNA and protein binding by mediating protein–protein interactions. *Protein Science* **26**, 227–241.
- Bibb M., Hesketh A. 2009. Analyzing the regulation of antibiotic production in *Streptomyces*: *Methods in Enzymology*, 93-116. Elsevier, New York, SAD.
- Borodina I., Krabben P., Nelsen J. 2005. Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) metabolism. *Genome Research* **15**, 820–829.
- Boyko K. M., Rakitina T. V., Korzhenevskiy D. A., Vlaskina A. V., Agapova Y. K., Kamashev D. E., Kleymentov S. V., Popov V. O. 2016. Structural basis of the high thermal stability of the histone-like HU protein from the mollicute *Spiroplasma melliferum* KC3. *Scientific Reports* **6**, 36366.
- Broyles S. S., Pettijohn D. 1986. Interaction of the *Escherichia coli* HU protein with DNA. Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered DNA helical pitch. *Journal of Molecular Biology* **187**, 47-60.
- Brymora A., Valova V. A., Robinson P. J. 2004. Protein-protein interactions identified by

pull-down experiments and mass spectrometry. *Current Protocols in Cell Biology* **17**, poglavlje 17.5.

- Bujalowski W., Lohman T. M. 1986. *Escherichia coli* single-strand binding protein forms multiple, distinct complexes with single stranded DNA. *Biochemistry* **25**, 7799–7802.
- Bujalowski W., Overman L. B., Lohman T. M. 1988. Binding mode transitions of *Escherichia coli* single strand binding protein-single-stranded DNA complexes. Cation, anion, pH, and binding density effects. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 4629-4640.
- Bystrykh L. V., Fernández-Moreno M. A., Herrema J. K., Malpartida F., Hopwood D. A., Dijkhuizen L. 1996. Production of actinorhodin-related “blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology* **178**, 2238–2244.
- Caron F., Jacq C. Rouviere-Yaniv J. 1979. Characterization of a histone-like protein extracted from yeast mitochondria. *PNAS* **76**, 4265–4269.
- Chan K. W., Lee Y. J., Wang C. H., Huang H., Sun Y. J. 2009. Single-stranded DNA-binding protein complex from *Helicobacter pylori* suggests an ssDNA-binding surface. *Journal of Molecular Biology* **388**, 508-519.
- Chater K. F. 2006. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **361**, 761–768.
- Chodavarapu S., Felczak M. M., Yaniv J. R., Kaguni J. M. 2008. *Escherichia coli* DnaA interacts with HU in initiation at the *E. coli* replication origin. *Journal of Molecular Biology* **67**, 781-792.
- Christova R. 2013. Detecting DNA–protein interactions in living cells - CHIP approach. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* **91**, 101-133.
- Claret L., Rouviere-Yaniv Y. 1997. Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival. *Journal of Molecular Biology* **273**, 93-104.
- Collins M. O., Choudhary J. S. 2008. Mapping multiprotein complexes by affinity purification and mass spectrometry. *Current Opinion in Biotechnology* **19**, 324–330.
- Costes A., Lecointe F., McGovern S., Quevillon-Cheruel S., Polard P. 2010. The C-terminal domain of the bacterial SSB protein acts as a DNA maintenance hub at active chromosome replication forks. *PLoS Genetics* **6**, mrežno izdanje.
- de las Rivas J., Fontanillo C. 2010. Protein–protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks. *PLoS Computational Biology* **6**, mrežno izdanje.
- Dickey T. H., Altschuler S. E., Wuttke D. S. 2013. Single-stranded DNA-binding proteins: multiple domains for multiple functions. *Cell* **21**, 1074–1084.
- Dunker A. K., Lawson J. D., Brown C. J., Williams R. M., Romero P., Oh J. S., Oldfield C.

- J., Campen A. M., Ratliff C. M., Hipps K. W., Ausio J., Nissen M. S., Reeves R., Kang C., Kissinger C. R., Bailey R. W., Griswold M. D., Chiu W., Garner E. C., Obradovic Z. 2001. Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **19**, 26-59.
- Goebels F. 2014. Classification of protein protein interactions, doktorska disertacija. Tehničko sveučilište München, München, Njemačka.
 - Greenfield N. J. 2004. Circular dichroism analysis for protein-protein interactions. *Methods in Molecular Biology* **261**, 55-78.
 - Grove A. 2011. Functional evolution of bacterial histone-like HU proteins. *Current Issues in Molecular Biology* **13**, 1-12.
 - Grove A., Saavedra T. C. 2002. The role of surface-exposed lysines in wrapping DNA about the bacterial histone-like protein HU. *Biochemistry* **41**, 7597-7603.
 - Gruber S. 2004. Multilayer chromosome organization through DNA bending, bridging and extrusion. *Current Opinion in Microbiology* **22**, 102-110.
 - Guo F., Adhya S. 2007. Spiral structure of *Escherichia coli* HU $\alpha\beta$ provides foundation for DNA supercoiling. *PNAS* **104**, 4309–4314.
 - Gupta M., Sajid A., Sharma K., Ghosh S., Arora G., Singh R., Nagaraja V., Tandon V., Singh Y. 2014. HupB, a nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis*, is modified by serine/threonine protein kinases *in vivo*. *Journal of Bacteriology* **196**, 2646-2657.
 - Hardisson C., Manzanal M. B., Salas J. A., Suarez J. E. 1978. Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *Journal of General Microbiology* **105**, 203-214.
 - Hopwood D. A. 1999. Forty years of genetics with *Streptomyces*: From *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology* **145**, 2183-2202.
 - Huang C. H., Lin Y. S., Yang Y. L., Huang S. W., Chen C.W. 1998. The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Molecular Microbiology* **28**, 905-916.
 - Huang Y., Huang C. 2014. C-terminal domain swapping of SSB changes the size of the ssDNA binding site. *BioMed Research International* **2014**, mrežno izdanje.
 - Huffman J. L., Brennan R. G. 2002. Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Current Opinion in Structural Biology* **12**, 98-106.
 - Kaiser P., Meierhofer D., Wang X., Huang L. 2008. Tandem affinity purification combined with mass spectrometry to identify components of protein complexes. *Methods in Molecular Biology* **439**, 309–326.
 - Kamashev D., Balandina A., Mazur A. K., Arimondo P. B., Rouviere-Yaniv J. 2008. HU binds and folds single-stranded DNA. *Nucleic Acids Research* **36**, 1026–1036.
 - Keskin O., Gursoy A., Ma B., Nussinov R. 2008. Principles of protein-protein interactions:

what are the preferred ways for proteins to interact?. American Chemical Society, zasebno izdanje.

- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A. 2000. Practical *Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Kim D. H., Im H., Jee J. G., Jang S. B., Yoon H. J., Kwon A. R., Kang S. M., Lee B. J. 2014. β -Arm flexibility of HU from *Staphylococcus aureus* dictates the DNA-binding and recognition mechanism. *Acta Crystallographica Section D: Biological Christalography* **70**, 3273-3289.
- Kobryn K., Lavoie B. D., Chaconas G. 1999. Supercoiling-dependent site-specific binding of HU to naked Mu DNA. *Journal of Molecular Biology* **289**, 777-784.
- Kozlov A. G., Weiland E., Mittal A., Waldman V., Antony E., Fazio N., Pappu R. V., Lohman T. M. 2015. Intrinsically disordered C-terminal tails of *E. coli* single-stranded DNA binding protein regulate cooperative binding to single-stranded DNA. *Journal of Molecular Biology* **427**, 763-774.
- Kumar A., Beloglazova N., Bundalovic-Torma C., Phanse S., Deineko V., Gagarinova A., Musso G., Vlasblom J., Lemak S., Hooshyar M., Minic Z., Wagih O., Mosca R., Aloy P., Golshani A., Parkinson J., Emili A., Yakunin A. F., Babu M. 2016. Conditional epistatic interaction maps reveal global functional rewiring of genome integrity pathways in *Escherichia coli*. *Cell Report* **14**, 648-661.
- Lakowicz J.R. 2006. Protein Fluorescence. Springer, Boston, SAD.
- Liang Y. 2008. Applications of isothermal titration calorimetry in protein science. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **40**, 565-576.
- Macvanin M., Edgar R., Cui F., Trostel A., Zhurkin V., Adhya S. 2012. Noncoding RNAs binding to the nucleoid protein HU in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **194**, 6046–6055.
- Maffeo C., Aksimentiev A. 2017. Molecular mechanism of DNA association with single-stranded DNA binding protein. *Nucleic Acids Research* **45**, 12125-12139.
- Malik M., Bensaid A., Rouviere-Yaniv J., Drlica K. 1996. Histone-like protein HU and bacterial DNA topology: suppression of an HU deficiency by gyrase mutations. *Journal of Molecular Biology* **256**, 66-76.
- Mapelli M., Panjikar S., Tucker P. A. 2005. The crystal structure of the herpes simplex virus 1 ssDNA-binding protein suggests the structural basis for flexible, cooperative single-stranded DNA binding. *Journal of Molecular Chemistry* **280**, 2990-2997.
- Meyer R. R., Laine P. S. 1990. The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Microbiolgy Review* **54**, 342-380.
- Mijaković I., Petranović D., Maček B., Čepo T., Mann M., Davies J., Jensen P. R., Vujaklija D. 2006. Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine.

Nucleic Acids Research **34**, 1588-1596.

- Mukherjee A., Sokunbi A. O., Grove A. 2008. DNA protection by histone-like protein HU from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. Nucleic Acids Research **36**, 3956-3968.
- Murzin A. G. 1993. OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. EMBO Journal **12**, 861-867.
- Muto A., Osawa S. 1987. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. PNAS **84**, 166-169.
- Nelson D., Cox M. 2005. Lehninger: Principles of biochemistry, četvrto izdanje. Macmillan, New York, SAD.
- Paradžik T., Filić Ž., Vujaklija D. 2016. Variations in amino acid composition in bacterial single stranded DNA-binding proteins correlate with GC content. Periodicum Biologorum **118**, 385-397.
- Paradžik T., Ivić N., Filić Ž., Manjasetty B. A., Herron P., Luić M., Vujaklija D. 2013. Structure-function relationships of two paralogous single-stranded DNA-binding proteins from *Streptomyces coelicolor*: implication of SsbB in chromosome segregation during sporulation. Nucleic Acids Research **41**, 3659-3672.
- Purnapatre K., Varshney U. 1999. Cloning, over-expression and biochemical characterization of the single-stranded DNA binding protein from *Mycobacterium tuberculosis*. European Journal of Biochemistry **264**, 591-598.
- Raghunathan S., Ricard C. S., Lohman T. M., Waksman G. 1997. Crystal structure of the homo-tetrameric DNA binding domain of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein determined by multiwavelength X-ray diffraction on the selenomethionyl protein at 2.9-Å resolution. PNAS **94**, 6652-6657.
- Reichmann D., Rahat O., Cohen M., Neuvirth H., Schreiber G. 2007. The molecular architecture of protein-protein binding sites. Current Opinion in Structural Biology **17**, 67-76.
- Rohs R., Jin X., West S. M., Joshi R., Honig B., Mann R. S. 2010. Origins of specificity in protein-DNA recognition. Annual Review of Biochemistry **79**, 233-269.
- Rouviere-Yaniv J., Yaniv M., Germond J. E. 1979. *E. coli* DNA binding protein HU forms nucleosomelike structure with circular double-stranded DNA. Cell **17**, 265-274.
- Salerno P., Larsson J., Bucca G., Laing E., Smith C.P., Flardh K. 2009. One of the two genes encoding nucleoid-associated HU proteins in *Streptomyces coelicolor* is developmentally regulated and specifically involved in spore maturation. Journal of Bacteriology **191**, 6489-6500.
- Shereda R. D., Kozlov A. G., Lohman T. M., Cox M. M., Keck J. L. 2008. SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes. Critical Reviews in Biochemistry

and Molecular Biology **43**, 289-318.

- Singh A., Vijayan M., Varshney U. 2018. Distinct properties of a hypoxia specific paralog of single stranded DNA binding (SSB) protein in mycobacteria. *Tuberculosis* **108**, 16-25.
- Snider J., Kotlyar M., Saraon P., Yao Z., Jurisica I., Štagljar I. 2015. Fundamentals of protein interaction network mapping. *Molecular Systems Biology* **11**, 848.
- Suksombat S., Khafizov R., Kozlov A. G., Lohman T. M., Chemla Y.R. 2015. Structural dynamics of *E. coli* single-stranded DNA binding protein reveal DNA wrapping and unwrapping pathways. *Elife* **25**, mrežno izdanje.
- Swinger K. K., Lemberg K. M., Zhang Y., Rice P. A. 2003. Flexible DNA bending in HU–DNA cocrystal structures. *EMBO Journal* **22**, 3749–3760.
- Štefanić Z., Vujaklija D., Luić M. 2009. Structure of the single-stranded DNA-binding protein from *Streptomyces coelicolor*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **65**, 974-979.
- Takatsuka M., Osada-Oka M., Satoh E. F., Kitadokoro K., Nishiuchi Y., Niki M., Inoue M., Iwai K., Arakawa T., Shimoji Y., Ogura H., Kobayashi K., Rambukkana A., Matsumoto S. 2011. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by Fenton reaction: *PLoS One* **6**, mrežno izdanje.
- Tiranti V., Rocchi M., DiDonato S., Zeviani M. 1993. Cloning of human and rat cDNAs encoding the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (SSB). *Gene* **126**, 219–225.
- van Noort J., Verbrugge S., Goosen N., Dekker C., Dame R. T. 2004. Dual architectural roles of HU: formation of flexible hinges and rigid filaments. *PNAS* **101**, 6969–6974.
- Velasco-Garcia R., Vargas-Martinez R. 2012. The study of protein–protein interactions in bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **58**, 1241–1257.
- Waldman V. M., Weiland E., Kozlov A. G., Lohman T. M. 2016. Is a fully wrapped SSB–DNA complex essential for *Escherichia coli* survival?. *Nucleic Acids Research* **44**, 4317-4329.
- Wang G., Lo L. F., Maier R. J. 2012. A histone-like protein of *Helicobacter pylori* protects DNA from stress damage and acids host colonization. *DNA Repair* **11**, 733–740.
- Wang S. J., Chang H. M., Lin Y. S., Huang C. H., Chen C. W. 1999. *Streptomyces* genomes: circular genetic map from the linear chromosomes. *Microbiology* **145**, 2209-2220.
- Whitmore L., Wallace B. A. 2008. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392-400.
- Williams S. T., Goodfellow M., Aldersoni G., Wellington E. N. H., Sneath P. H. A., Sackin M. J. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology* **129**, 1743-1813.
- Wojtuszewski K., Hawkins M. E., Cole J. L., Mukerji I. 2001. HU binding to DNA: evidence

for multiple complex formation and DNA bending. *Biochemistry* **40**, 2588-2598.

- Wold M. S. 1997. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual Review of Biochemistry* **66**, 61-92.
- Wu H. Y., Lu C. H., Li H. W. 2017. RecA-SSB interaction modulates RecA nucleoprotein filament formation on SSB-wrapped DNA. *Scientific Reports* **7**, mrežno izdanje.
- Yang C. C., Huang C. H., Li C. Y., Tsay Y. G., Lee S. C., Chen C. W. 2002. The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins. *Molecular Microbiology* **43**, 297-305.
- Yao N. Y., O'Donnell M. 2010. SnapShot: The Replisome. *Cell* **141**, 1088.
- Zakrzewska-Czerwinska J., Schrepf H. 1992. Characterization of an autonomously replicating region from the *Streptomyces lividans* chromosome. *Journal of Bacteriology* **174**, 2688-2693.

7. 2. Mrežni izvori

- <http://www.addgene.org> (pristupljeno 1.2.2019.)
- <https://www.ap-lab.com/circular-dichroism-services-cd-spec> (pristupljeno 21.6.2018.)
- <http://biochem.cores.ucla.edu/instrumentation/bioanalytical/itc200/> (pristupljeno 21.6.2018.)
- <https://www.biotek.com/resources/application-notes/peptide-and-amino-acid-quantification-using-uv-fluorescence-in-synergy-ht-multi-mode-microplate-reader/> (pristupljeno 22.6.2018.)
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> (pristupljeno 20.6.2018.)
- https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (pristupljeno 20.6.2018.)
- <http://book.bionumbers.org/what-are-the-concentrations-of-different-ions-in-cells/> (pristupljeno 10.10.2018.)
- <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/CD%20spectroscopy.pdf> (pristupljeno 20.6.2018.)
- <https://www.creative-biolabs.com/bacterial-two-hybrid-b2h-service.html> (pristupljeno 15.12.2018.)
- http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/c_h04s07.html (pristupljeno 21.6.2018.)
- <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (pristupljeno 10.10.2018.)

- https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=sco&mapno=03030&mapscale=&show_description=hide (pristupljeno 20.6.2018.)
- <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/genetic-markers> (pristupljeno 1.2.2019.)
- <https://web.expasy.org/protparam/> (pristupljeno 12.3.2018.)
- <https://www.semanticscholar.org/paper/Circular-dichroism-spectroscopy-of-membrane-Miles-Wallace/0b2dce5a7fdbcf0e73cb43a86af4ce7921fb3e0d/figure/0> (pristupljeno 21.6.2018.)
- <https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/lumin3.htm> (pristupljeno 21.6.2018.)
- <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/methods-detecting-protein-dna-interactions.html> (pristupljeno 20.6.2018.)
- <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-protein-interaction-analysis.html> (pristupljeno 20.6.2018.)
- <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/pull-down-assays.html> (pristupljeno 20.6.2018.)

8. Životopis

Anja Kostelac je rođena 10. ožujka 1994. u Zagrebu. Uspješno je završila zagrebačku prirodoslovno-matematičku XV. gimnaziju (MIOC), matematičko-informatički smjer. U rujnu 2013. godine je upisala preddiplomski studij molekularne biologije na PMF, Zagreb. Tri godine kasnije, upisala je diplomski studij molekularne biologije. Područje daljnjeg interesa je biokemija. Posjeduje znanje švedskog jezika (B2 razina) kao i C1 razinu engleskog jezika potvrđenu CAE certifikatom. U slobodno vrijeme pohađa satove joge i volontira u KSET-u.

Posterska priopćenja i predavanja

- VBC Student Symposium, Beč, Exploring the interactions of SSB proteins with single-stranded DNA, 2018.
- Simpozij studenata kemije, Zagreb, Priprema humane seril-tRNA-sintetaze i tRNA^{Ser} za analizu mistranslacije serinskih kodona, 2016.

Sudjelovanje na konferencijama i tečajevima

- Međunarodna ljetna škola, Institute of Molecular Biology, Mainz, Njemačka, 2018.
- 15th Symposium of Microbial Aquatic Ecology, Zagreb, 2017.
- Radionica 'The quickest way to characterize proteins with just a tiny amount of sample', Nanotemper, Zagreb, 2018
- Radionica masene spektrometrije, BIOCentar, Zagreb, 2016.

Nagrade i stipendije

- Pohvala dekanice prof. dr. sc. Aleksandre Čišmežije za najboljeg studenta diplomskog studija molekularne biologije (2018.)
- Stipendija Sveučilišta u Zagrebu za najbolje studente (2017., 2018.)
- Priznanje *magna cum lauda* za završen preddiplomski studij molekularne biologije (2017.)
- Dobitnica Rektorove nagrade s Katarinom Belačić za rad 'Priprema humane seril-tRNA-sintetaze i tRNA_{Ser} za analizu mistranslacije serinskih kodona' (2016.)

Neobavezne sveučilišne aktivnosti

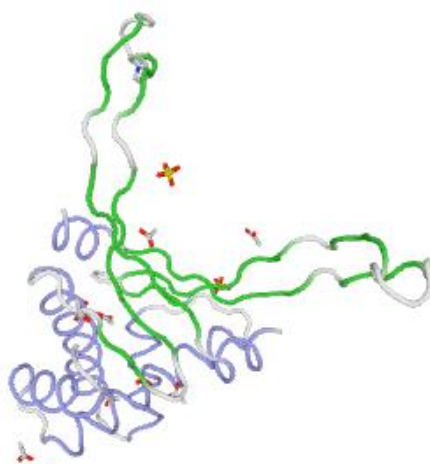
- Aktivno sudjelovanje na Noći biologije (2014., 2015., 2017.) i Otvorenim danima Kemijskog odsjeka (2014.)
- Demonstrator na praktičnom dijelu kolegija Mikrobiologija ekosustava (2015., 2017.)

9. Prilozi

Prilog 1. Modeliranje aminokiselinskih sljedova proteina HupA i HupS bakterije *S. coelicolor* mrežnim alatom *SwissProt*.

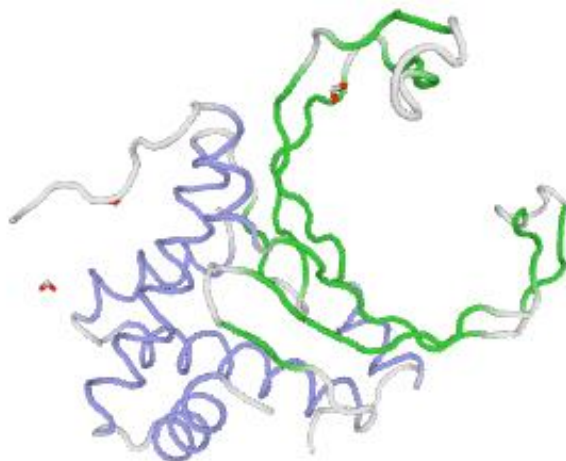
Mrežnim računalnim alatom *SwissProt* modeliran je aminokiselinski slijed proteina HupA i HupS (https://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelling_interactive). Rezultati pretrage su pokazali da je protein HU bakterije *Lactococcus lactis* strukturom najsličniji proteinu HupA bakterije *S. coelicolor* (A), dok je protein HU bakterije *Mycobacterium tuberculosis* strukturom najsličniji proteinu HupS bakterije *S. coelicolor* (B).

A)



Aminokiselinski slijed	MANKQDLIAEVAAKTGLIKKDKSEKAVNAFGEVVTEFLAKGKQVLIIGFGTFETREARAAREGRNPQTGEAIKIAAT	75
Lanac A	MANKQDLIAEVAAKGLIKKDKSEKAVNAFGEVVTEFLAKGKQVLIIGFGTFETREARAAREGRNPQTGEAIKIAAT	75
Lanac B	MANKQDLIAEVAAKGLIKKDKSEKAVNAFGEVVTEFLAKGKQVLIIGFGTFETREARAAREGRNPQTGEAIKIAAT	75
Aminokiselinski slijed	VVFAFKGKALKDAVK	91
Lanac A	VVFAFKGKALKDAVK	91
Lanac B	VVFAFKGKALKDAVK	91

B)



Aminokiselinski slijed	MNKAELIDVLTQKLGSDRRQATAAENVVDIIVRAVHKGDSVITIGFVGFQRRRAARVARNPRTGETVVKKPTSVPAFR 80
Lanac A	MNKAELIDVLTQKLGSDRRQATAAENVVDIIVRAVHKGDSVITIGFVGFQRRRAARVARNPRTGETVVKKPTSVPAFR 80
Lanac B	MNKAELIDVLTQKLGSDRRQATAAENVVDIIVRAVHKGDSVITIGFVGFQRRRAARVARNPRTGETVVKKPTSVPAFR 80

Aminokiselinski slijed	PGAQFKAVVSGAQRLEPAEG 99
Lanac A	PGAQFKAVVSGAQRLEPAEG 99
Lanac B	PGAQFKAVVSGAQRLEPA-- 97

Slika I. Predikcija trodimenzionalne strukture proteina HU bakterije *S. coelicolor*. Plavi dijelovi aminokiselinskog slijeda označavaju dijelove slijeda koji imaju sekundarnu strukturu α -zavojnice, dok zeleni dijelovi aminokiselinskog slijeda označavaju dijelove slijeda koji imaju sekundarnu strukturu β -ploče.

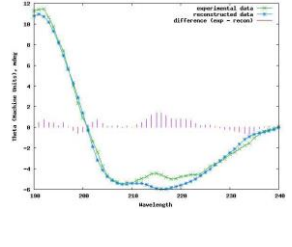
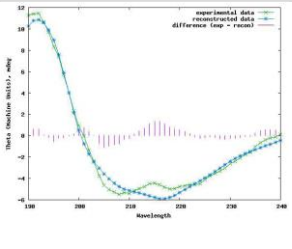
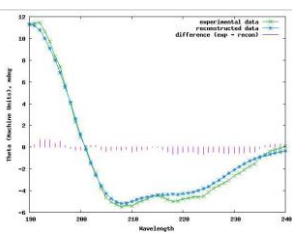
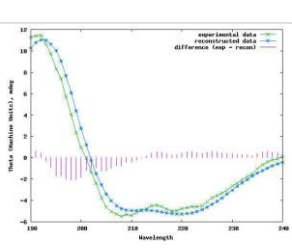
A) Protein HupA prema modelu proteina HU bakterije *Lactococcus lactis*. Svrnjnjeje proteinskog slijeda proteina HupA i sljedova proteina HU (sljedovi prema kojoj su razriješene dvije trodimenzionalne strukture) bakterije *Lactococcus lactis*. Uočava se da predikcija strukture proteina HupA bakterije *S. coelicolor* posjeduje tri α -zavojnice i pet β -ploča.

B) Protein HupS prema modelu proteina HU bakterije *Mycobacterium tuberculosis*. Svrnjnjeje proteinskog slijeda proteina HupS i sljedova proteina HU (sljedovi prema kojoj su razriješene dvije trodimenzionalne strukture) bakterije *Mycobacterium tuberculosis*. Uočava se da predikacija strukture proteina HupS bakterije *S. coelicolor* posjeduje tri α -zavojnice i pet β -ploča. N-terminalni slijed niske kompleksnosti bogat lizinom i alaninom nije uključen u ovu predikciju zbog svoje fleksibilnost.

Prilog 2. Analiza podataka spektroskopije kružnog dikroizma alatom *Dichroweb*

Analizom podataka dobivenih spektroskopijom kružnog dikroizma računalnim alatom *Dichroweb*, dobiveni su skupovi rezultata ovisno o metodi i referentnom setu podataka. Prikazani su rezultati analize sekundarne strukture navedenih proteina te kompleksa (stupci α -zavojnica, β -ploča, okreti i neuređeno) i grafički prikazi predviđenih i dobivenih podataka.

Tablica I. Analiza rezultata smjese proteina SsbA i HU spektroskopijom kružnog dikroizma.

Metoda	α -zavojnice /%	β -ploče / %	Okreti / %	Neuređeno / %	Rezultati
CONTIN SMP 180	0,168	0,335	0,112	0,385	
CONTIN REF 7	0,177	0,290	0,182	0,351	
SELCON3 REF175	0,222	0,294	0,125	0,308	
SELCON3 REF4	0,099	0,333	0,178	0,345	

Prilog 3. Pozicija triptofana u aminokiselinskom slijedu proteina SSB

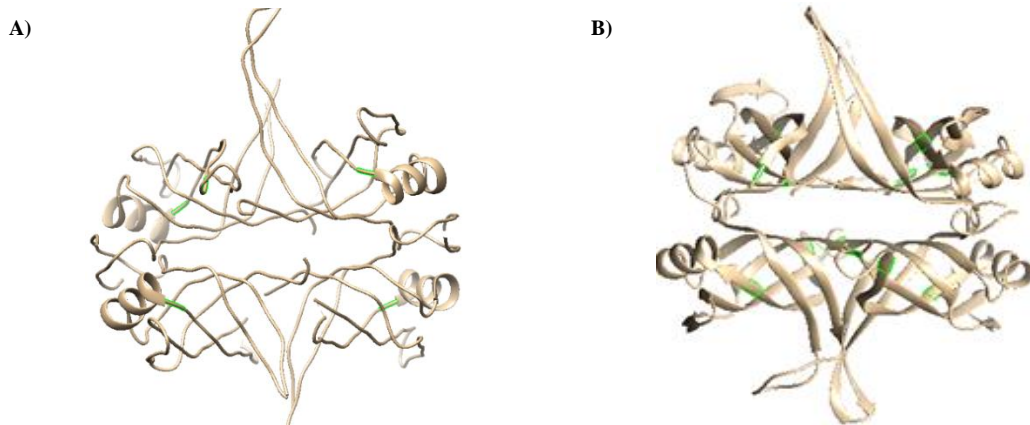
Protein SsbA posjeduje pet triptofana u strukturi monomera. Četiri od pet triptofana (**W**) proteina SsbA se nalaze u fleksibilnom dijelu proteina (podcrtani aminokiselinski označavaju slijedove koji se ne vide u modelu dobivenom rentgenskom strukturnom analizom).

MAGETVITVVG^NLVDDPELRFTPSGA^AAKFRVASTPRTFDRQTNE^WKDGESLFLTCSV^WRQ
AAENVAESLQ^RGM^RVIVQ^GRLKQRSYEDREGVKRTVYELDVDEVGASLRSATAKVT^KTS^QQ

GRGGQGGYGGGGGGQGGGGWGGGPGGGQOGGGAPADDPWATGGAPAGGQOGGGGQGGG
GWGGGSGGGGGYSDEPPF

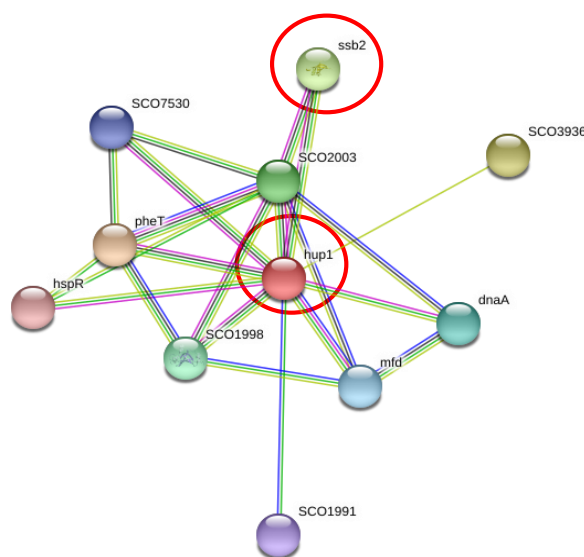
Protein SsbB posjeduje tri triptofana u strukturi monomera. Sva tri triptofana proteina SsbB se nalaze u jednoj β -ploči.

MRGSHHHHHHGSMEIMICAVGNVATTPVFRDLANGPSVRFRLAVTARYWDREKNAWTDG
HTNFFTVWANRQLATNASGLAVGDPVVVQGRCLKVRTDVREGQSRTSADIDAVAIGHDLARG
TAAFRR



Slika II. Kristalne strukture proteina SSB bakterije *S. coelicolor* je i položaj triptofana unutar kristalne rešetke. A) Unutar tetramera proteina SsbA, vidi se trodimenzionalni položaj samo pet od mogućih šesnaest triptofana (obilježeno zeleno). Svi anotirani triptofani se nalaze na površini proteina. B) Unutar tetramera proteina SsbB, vidi se trodimenzionalni položaj svih dvanaest triptofana (obilježeno zeleno). Svi triptofani se nalaze na površini proteina.

Prilog 4. Predikcija protein-protein interakcije proteina SsbA i HU podatkovnom bazom *String*.



Slika III. Anotirani proteinski partneri proteina HU (Hup1) bakterije *S. coelicolor* (preuzeti iz: <https://string-db.org/>).