

Biokemijska karakterizacija adenilosukcinat-sintetaze bakterije *Helicobacter pylori* eksperimentalnim i računalnim metodama

Bubić, Ante

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:217:625124>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ante Bubić

**BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
ADENILOSUKCINAT-SINTETAZE
BAKTERIJE *Helicobacter pylori*
EKSPERIMENTALNIM I RAČUNALNIM
METODAMA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:
prof. dr. sc. Branimir Bertoša
dr. sc. Ivana Leščić Ašler, zn. sur.

Zagreb, 2021.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ante Bubić

**BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF
ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE FROM
Helicobacter pylori USING EXPERIMENTAL AND
COMPUTATIONAL METHODS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:
Prof. Branimir Bertoša, PHD
Ivana Leščić Ašler, PHD

Zagreb, 2021

Ova disertacija izrađena je u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom prof. dr. sc. Branimira Bertoše i dr. sc. Ivane Lešćić Ašler, zn. sur. u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija kemije (smjer: biokemija) pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Računi su izvedeni na računalnom klasteru Isabella u sklopu Sveučilišnog računskog centra (SRCE) Sveučilišta u Zagrebu. Dio eksperimenata proveden je u Laboratoriju za strukturnu biologiju Sveučilišta u Grazu pod vodstvom prof. dr. sc. Tee Pavkov-Keller.

Ova disertacija financirana je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekata IP-2013-11-7423 i IP-2019-04-6764.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Mariji Luić što mi je pružila priliku za rad u području strukturne biologije.

Od sveg srca zahvaljujem svojim mentorima dr. sc. Ivani Leščić Ašler i prof. dr. sc. Branimiru Bertoši na znanju koje su mi prenijeli, savjetima koje u mi davali i velikoj pomoći prilikom izrade i pisanja ove disertacije. Ivana i Branimir, hvala vam na pristupačnosti, strpljenju, susretljivosti i podršci.

Veliko hvala dr. sc. Nives Ivić za preneseno znanje i stečeno iskustvo. Nives, hvala na predivnom prijateljstvu koje je proizašlo uz rad u Laboratoriju za kemijsku i biološku kristalografiju.

Veliko hvala prof. dr. sc. Tei Pavkov Keller na predivnom vodstvu i savjetima i druženju koje mi je pružila za vrijeme mog boravka u Grazu. Tea, hvala ti na svemu. Imamo strukturu!

Hvala svim kolegama Laboratorija za kemijsku i biološku kristalografiju na ugodnoj, vedroj i zabavnoj atmosferi.

Hvala Zrinki, Ani, Antoniji i Sari iz Laboratorija za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje na pomoći, savjetima, podršci i druženju.

Hvala Hrvatskoj zakladi za znanost što je omogućila financiranje ove disertacije.

Hvala svim mojim kolegama, a posebno Nives, Mirsadi i Anđeli što su mi dali krila da ovaj let bude što ljepši.

Zahvaljujem Urošu na divnim druženjima, predanom znanju i iskustvu. Uroš, hvala!

Zahvaljujem svim svojim predivnim prijateljima, posebno Toli, Duji, Marti, Eni, Sanji, Ursi i Frani i Goci što su uvijek uz mene, pa tako i kroz ovu disertaciju. Hvala vam!

Zahvaljujem svojoj obitelji, posebno svojoj majci. Mama, hvala!

Sadržaj

SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Cilj i hipoteza.....	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. <i>Helicobacter pylori</i>.....	3
2.1.1. Bakteriološke karakteristike.....	3
2.1.2. Patološki mehanizam djelovanja bakterije <i>H. pylori</i> na sluznicu želuca.....	3
2.1.3. Epidemiološke karakteristike	4
2.1.4. Posljedice infekcije bakterijom <i>H. pylori</i>	5
2.1.5. Dijagnostika i liječenje infekcije bakterijom <i>H. pylori</i>	5
2.1.6. Metabolizam purina kod bakterije <i>H. pylori</i>	6
2.2. Adenilosukcinat-sintetaza	7
2.2.1. Biokemijske značajke i fiziološka funkcija AdSS.....	7
2.2.2. Strukturne karakteristike.....	8
2.2.3. Mehanizam katalize AdSS.....	10
2.3. Teorijska osnova računalnih metoda	13
2.3.1. Molekularnaarna dinamika.....	13
2.3.2. Računalno određivanje energije vezanja metodom MM-PB(GB)SA	17
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. Materijali	20
3.2. Metode rada s mikroorganizmima	21
3.2.1. Uzgoj bakterijskih stanica.....	21
3.2.2. Transformacija bakterijskih stanica vektorom (plazmidnom DNA)	22
3.3. Metode manipulacije DNA.....	23
3.3.1. Unošenje histidinskog privjeska.....	23
3.3.1.1. Umnažanje vektora pET-21b(+)-HpPurA.....	23
3.3.1.2. Pročišćavanje PCR produkta	24
3.3.1.3. Fosforilacija i ligacija PCR produkta.....	25
3.3.1.4. Transformacija stanica ligacijskom smjesom	25
3.4. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje AdSS-a	26
3.4.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje konstrukta pET-21b(+)-HpPurA	26

3.4.1.1.	Prekomjerna ekspresija.....	26
3.4.1.2.	Liza bakterijskih stanica.....	26
3.4.1.3.	Pročišćavanje proteina kromatografskim tehnikama.....	27
3.4.2.	Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje konstrukta pET-21b(+)-HpPurA-His ₆	28
3.4.2.1.	Prekomjerna ekspresija.....	28
3.4.2.2.	Liza bakterijskih stanica.....	29
3.4.2.3.	Pročišćavanje proteina kromatografskim tehnikama.....	29
3.5.	Biokemijske i biofizičke metode za karakterizaciju pročišćene AdSS.....	30
3.5.1.	Određivanje koncentracije proteina.....	30
3.5.2.	Elektroforetske metode.....	31
3.5.3.	Određivanje aktivnosti AdSS-a standardnim testom.....	32
3.5.4.	Određivanje stabilnosti i optimuma djelovanja enzima prema pH-vrijednosti i temperaturi.....	32
3.5.5.	Određivanje kinetičkih parametara te inhibicija poznatim inhibitorima.....	33
3.5.6.	Testiranje inhibicije novo sintetiziranim spojevima.....	34
3.5.7.	Određivanje termodinamičkih parametara vezanja.....	34
3.6.	Rendgenska difrakcijska analiza.....	34
3.6.1.	Kristalizacija metodom difuzije para.....	34
3.6.2.	Difrakcija rendgenskog zračenja na monokristalu.....	36
3.6.3.	Procesiranje podataka i rješavanje kristalne strukture.....	36
3.7.	Računalne metode.....	37
3.7.1.	Simulacije slobodnog enzima AdSS iz bakterije <i>H. pylori</i>	37
3.7.2.	Simulacije enzima AdSS iz bakterije <i>H. pylori</i> u kompleksu s ligandima.....	37
3.7.3.	Simulacije enzima AdSS iz bakterije <i>H. pylori</i> u kompleksu s GTP-om i IMP-om.....	38
3.7.4.	Analiza geometrije i vodikovih veza.....	38
3.7.5.	Računanje slobodne energije MM-GBSA metodom.....	39
3.7.6.	Molekulsko uklapanje (eng. docking).....	39
§ 4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	40
4.1.	Karakterizacija AdSS iz bakterije <i>H. pylori</i>.....	40
4.1.1.	Bioinformatička analiza AdSS iz bakterije <i>H. pylori</i> i njena usporedba s AdSS iz drugih organizama.....	40
4.1.2.	Kloniranje, ekspresija i pročišćavanje divljeg tipa AdSS iz bakterije <i>H. pylori</i>	42
4.1.3.	Utjecaj pH i temperature na aktivnost i stabilnost AdSS iz bakterije <i>H. pylori</i>	43
4.1.4.	Kinetika enzimske reakcije AdSS iz bakterije <i>H. pylori</i>	45
4.1.5.	Inhibicija AdSS iz bakterije <i>H. pylori</i> hadacidinom.....	46
4.1.6.	Inhibicija AdSS iz bakterije <i>H. pylori</i> produktom.....	47
4.2.	Karakterizacija AdSS iz bakterije <i>H. pylori</i> s histidinskim privjeskom.....	48

4.2.1. Pročišćavanje AdSS-His ₆ iz bakterije <i>H. pylori</i> koristeći IMAC metodu.....	48
4.2.2. Utjecaj pH i temperature na stabilnost AdSS-His ₆ iz bakterije <i>H. pylori</i>	50
4.2.3. Kinetika enzimske reakcije AdSS-His ₆ iz bakterije <i>H. pylori</i>	51
4.2.4. Inhibicija AdSS-His ₆ iz bakterije <i>H. pylori</i> produktom.....	51
4.2.5. Inhibicija AdSS-His ₆ novo sintetiziranim analogima nukleobaza i riboze.....	52
4.3. Kristalna struktura adenilosukcinat-sintetaze iz bakterije <i>H. pylori</i>.....	53
4.3.1. Okruženje hadacidina u aktivnom mjestu AdSS-a.....	56
4.3.2. Okruženje GDP-a u aktivnom mjestu AdSS-a.....	57
4.3.3. Okruženje IMO-a u aktivnom mjestu AdSS-a.....	59
4.4. Rezultati simulacija molekulske dinamike.....	61
4.4.1. Promjena konformacije GTP vezujuće petlje prisustvom IMP-a.....	63
4.4.2. Stabilizacija IMP-a preko polarnih interakcija s R*135.....	68
4.4.3. Računanje energije vezanja MMGBSA.....	70
4.4.4. Molekulsko uklapanje (docking).....	74
§ 5. ZAKLJUČAK.....	76
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	77
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	80
§ 8. DODATAK.....	XVII
§ 9. ŽIVOTOPIS.....	XXV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA ADENILOSUKCINAT-SINTETAZE BAKTERIJE *HELICOBACTER PYLORI* EKSPERIMENTALNIM I RAČUNALNIM METODAMA

Ante Bubić

Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Adenilosukcinat-sintetaza (AdSS) je esencijalan enzim u biosintezi purina, i *de novo*, i reciklirajućim putem. U ovoj disertaciji je računalno i eksperimentalno karakterizirana AdSS iz bakterije *Helicobacter pylori* koja pripada skupini I kancerogena. Pročišćen je enzim sa i bez histidinskog privjeska na C-kraju. Za oba enzima su određeni specifična aktivnost, temperaturno i pH područje stabilnosti, te kinetički parametri prema supstratima i inhibitorima. Dobiveni rezultati ukazuju na to da dodani histidinski privjesak nema značajan utjecaj na funkciju enzima. Riješena kristalna struktura AdSS pri visokoj rezoluciji, korištena za karakterizaciju enzima računalnim metodama, otkriva stvaranje stabilnog međuprodukta 6'-fosforil-IMP u aktivnom mjestu enzima. Računalnim metodama identificirane su ključne interakcije za stabilizaciju supstrata u aktivnom mjestu. Analiza kristalne strukture i računalna karakterizacija interakcija proteina s ligandima ukazuju na veliku sličnost AdSS iz bakterije *H. pylori* s AdSS iz vrste *Escherichia coli*, stoga se može pretpostaviti i sličan mehanizam rada enzima.

(95 stranica, 45 slika, 14 tablica, 112 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: adenilosukcinat-sintetaza/ enzimska kinetika/ *Helicobacter pylori*/ histidinski privjesak/ kristalna struktura/ molekularna dinamika/

Mentori: prof. dr. sc. Branimir Bertoša i dr. sc. Ivana Lešćić Ašler, zn. sur.

Rad prihvaćen: 08.09.2021.

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
2. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
3. dr. sc. Sanja Tomić, zn. savj.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ADENYLOSUCCINATE SYNTHETASE FROM *HELICOBACTER PYLORI* USING EXPERIMENTAL AND COMPUTATIONAL METHODS

Ante Bubić

Laboratory for chemical and biological crystallography, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia

Adenylosuccinate synthetase (AdSS) is an essential enzyme in *de novo* and recycling pathway of purine biosynthesis. In this thesis, AdSS from bacterium *Helicobacter pylori*, a group I carcinogen, was characterized experimentally and computationally. Enzyme with and without histidine tag at the C-terminus was purified. Specific activity, temperature and pH stability range, and kinetic parameters toward substrates and inhibitors were determined for both enzymes. Obtained results indicate that the added histidine tag has no significant effect on enzyme function. Solved crystal structure at high resolution, used to characterize the enzyme computationally, reveals the formation of a stable intermediate 6'-phosphoryl-IMP in the active site. Computational methods were used to identify key interactions for stabilisation of substrates in the active site. Analysis of crystal structure and computational characterization of protein-ligand interactions indicate high similarity of *H. pylori* AdSS to *Escherichia coli* AdSS, therefore the similar molecular mechanism for this enzyme can be assumed.

(95 pages, 45 figures, 14 tables, 112 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: adenylosuccinate synthetase/ crystal structure/ enzyme kinetics/ *Helicobacter pylori*/ histidine tag/ molecular dynamics/

Supervisors: Dr. Branimir Bertoša, Professor and Dr. Ivana Lešćić Ašler, Research Associate

Thesis accepted: 08.09.2021.

Reviewers:

Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
Dr. Biserka Prugovečki, Professor
Dr. Sanja Tomić, Senior Scientist

§ 1. UVOD

Helicobacter pylori je Gram-negativni mikroaerofilni patogen koji se nastanjuje na sluznici želuca (eng. *gastric mucosa*).¹ Warren i Marshall su 1984. godine prvi identificirali *H. pylori* iz želučanog epitela kod pacijenata koji su bolovali od kroničnog gastritisa.² Ovaj patogen uzrokuje razne bolesti gastrointestinalnog trakta kao što su kronični gastritis, gastroezofagijalna refluksna bolest i čir na dvanaesniku. Ukoliko se kronična stanja ovakve infekcije ne liječe, može doći do razvoja adenokarcinoma želuca.^{3,4}

Bioinformatička analiza je pokazala da *H. pylori* posjeduje gene samo za proteine reciklirajućeg metaboličkog puta biosinteze purina, za razliku od čovjeka kod kojeg su prisutni *de novo* i reciklirajući put biosinteze purina. Purini i pirimidini su esencijalni za metabolizam i dijeljenje svih živih organizama, stoga su metabolički putevi njihove sinteze potencijalne mete od velikog interesa za razvoj novih terapeutika.^{5,6}

Adenilosukcinat-sintetaza, AdSS (EC 6.3.4.4.) katalizira kondenzacijsku reakciju inozin-monofosfata i L-aspartata uz hidrolizu gvanozin-trifosfata i magnezijeve ione, pri čemu nastaje adenilosukcinat kao glavni produkt.^{7,8} U sljedećem koraku adenilosukcinat-liaza cijepa prethodno nastali adenilosukcinat, pri čemu nastaje adenzin-monofosfat (AMP) kao glavni produkt te fumarat. Nastali AMP ponovno se može pretvoriti u IMP reakcijom deamidacije koju katalizira AMP-deaminaza. Ova tri enzima sudjeluju u kružnoj interkonverziji IMP-AMP.⁷ Enzim AdSS se nalazi na regulacijskom dijelu metaboličkog puta biosinteze purina i predstavlja potencijalnu metu za razvoj novih terapeutika. Kod ljudi postoje dvije izoforme AdSS, od kojih je jedna (bazična) dominantna u mišićima, a druga (kisela) u svim ostalim stanicama, isključujući eritrocite.⁷ Ova dva izoenzima su kodirani različitim genima, te su kao takvi također i različito regulirani.⁹ Kod bakterija je opažena samo jedna izoforma AdSS, koja je po svojstvima slična kiseloj izoformi kod eukariota.¹⁰ Prva poznata kristalna struktura AdSS je bila ona enzima iz bakterije *Escherichia coli*, riješena je 1993. godine. Do sada je riješeno preko 40 kristalnih struktura AdSS iz raznih organizama od kojih bakteriji *E. coli* pripadaju 24.

1.1. Cilj i hipoteza

Cilj istraživanja je eksperimentalna i računalna biokemijska karakterizacija enzima adenilosukcinat-sintetaze iz patogena *Helicobacter pylori*, kao i njegovog kompleksa s poznatim inhibitorom hadacidinom.

Biokemijska karakterizacija ovog enzima doprinijeti će novim saznanjima vezanim uz njegov mehanizam djelovanja, što u konačnici može omogućiti razvoj boljih i efikasnijih inhibitora kao potencijalnih terapeutika protiv ovoga patogena.

U svrhu ostvarivanja cilja istraživanja, prekomjerno su eksprimirane i pročišćene dvije varijante adenilosukcinat-sintetaze iz bakterije *H. pylori*: divlji tip i s histidinskim privjeskom na C-kraju. Za oba proteina određene su specifične aktivnosti, rasponi temperature i pH-vrijednosti u kojima su enzimi stabilni, te kinetičke konstante prema sva tri supstrata (L-aspartat, inozin-monofosfat i gvanozin-trifosfat).

Kako bi se opisale interakcije u aktivnom mjestu, izmjerene su konstante inhibicije za tri molekule: hadacidin, adenilosukcinat i gvanozin-difosfat. Ispitano je i postoji li inhibicijsko djelovanje niza derivata nukleobaza i riboze prema ovom enzimu. Također je riješena kristalna struktura enzima u kompleksu s ligandima.

Računalne metode korištene su u svrhu ispitivanja dinamike adenilosukcinat-sintetaze, samog enzima i u sustavu s različitim ligandima. Rezultati računalnih metoda uspoređeni su s eksperimentalnim rezultatima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. *Helicobacter pylori*

2.1.1. Bakteriološke karakteristike

Helicobacter pylori je mikroaerofilna, Gram negativna bakterija spiralnog oblika, dužine oko 3,5 µm i širine oko 0,5 µm. Ova bakterija je sporo rastući organizam koji se *in vitro* uzgaja na agaru od krvi (eng. *blood agar*), a ponekad i na Skirrowovom selektivnom mediju pri temperaturi od 37 °C u atmosferi s volumnim udjelom kisika od 5% u trajanju od tri do sedam dana.¹¹ Male prozirne kolonije uniformne veličine mogu se morfološki okarakterizirati na temelju svog tipičnog spiralnog oblika te bojanjem po Gramu. Bakterija posjeduje od dvije do sedam flagela, koje joj omogućuju bolju pokretljivost kroz viskozni medij. Ukoliko uvjeti rasta bakterije nisu idealni, *H. pylori* može stvarati kokoidne formacije. Takve čahuraste strukture omogućuju bakteriji da preživi određeni vremenski period van ljudskog tijela npr. u izmetu ili u vodi. Daljnja karakterizacija uključuje pozitivan test na određene enzime (katalaza, oksidaza, ureaza) koji su neophodni za životni ciklus ovog organizma i predstavljaju faktore virulencije.¹¹ Proteini bakterije *H. pylori* koji sudjeluju u virulenciji ili su dio mehanizma pojedinih faktora virulencije su poznati,^{12,13} te će u sljedećim poglavljima biti detaljnije opisani.

2.1.2. Patološki mehanizam djelovanja bakterije *H. pylori* na sluznicu želuca

Faktori koji omogućavaju bakteriji *H. pylori* preživljavanje i proliferaciju u epitelu želuca su pokretljivost, prijanjanje za sluznicu želuca te djelovanje enzima ureaze koji bakterija izlučuje.¹⁴ Djelovanjem ureaze dolazi do hidrolize uree u području lumena želuca pri čemu nastaje amonijak. Amonijak neutralizira želučanu kiselinu te dolazi do formacije obrambenog oblaka, što omogućuje bakteriji penetraciju u želučanu sluznicu.¹⁵ Unutar genskog klastera uree kod bakterije *H. pylori* postoji specifični gen *ureI* koji kodira kanale za ureu koji su ovisni o pH-vrijednosti (eng. *pH dependent urea channel*). Kada pH-vrijednost okoliša padne, urea-kanali omogućuju otpuštanje uree, pri čemu održavaju zadovoljavajuću unutarstaničnu pH-vrijednost, što omogućuje bakteriji rast u kiselom okolišu.¹⁶ Spiralni oblik bakterije, flagele te mukolitički enzimi omogućuju olakšan prolaz kroz mukozni sloj do površine

želučane sluznice.¹¹ Mucin na želučanoj sluznici služi kao zaštita protiv infekcije s bakterijom *H. pylori* jer fizički ograničava njeno kretanje kroz mukoznu barijeru.¹⁷ *H. pylori* se veže za epitelne stanice želuca preko specifične adhezije posredovane receptorom (eng. *receptor-mediated adhesion*).^{18,19} Vezanje bakterije *H. pylori* na epitelne stanice ovisno je o interakciji specifičnih površinskih adhezina bakterije *H. pylori* i specifičnih receptora na epitelnim stanicama. Kod nekih ljudi može doći do ekspresije pojedinih specifičnih receptora ili do povećanja broja receptora, što ih čini podložnijima prema infekciji ovim patogenom.²⁰ Uspješnu kolonizaciju ljudskog želuca ovom bakterijom može spriječiti djelovanje na jedan od prethodno navedenih faktora, na čemu se i temelji nekoliko pristupa liječenju.

Patofiziologiju infekcije bakterijom *H. pylori* te njene kliničke ishode treba promatrati kao kompleksne interakcije između domaćina i patogena. Ozljeda tkiva inducirana bakterijom *H. pylori* ovisi o bakterijskoj adheziji, otpuštanju bakterijskih enzima te drugih mikrobnih produkata koji uzrokuju oštećenja stanice. Bakterija *H. pylori* isključivo kolonizira gastrointestinalno tkivo, što upućuje na specifičnost prepoznavanja tipa stanica od strane bakterije.¹⁹ Pričvršćivanje bakterije je djelomično posredovano brojnim adhezинима i proteinima vanjske membrane.

Bakterija *H. pylori* koristi nekoliko enzima koji posredno ili neposredno izazivaju stanična oštećenja. Više od 5% ukupne mase proteina ove bakterije čini enzim ureaza.²¹ Ovaj enzim, kako je već rečeno, hidrolizira ureu pri čemu dolazi do stvaranja amonijeva klorida i monokloramina koji uzrokuju direktna oštećenja epitelnih stanica.¹⁵ Ureaza je ujedno i antigen koji aktivira imunološki sustav, što dovodi do stimulacije upalnih stanica, te na kraju, do indirektnih oštećenja tkiva.¹⁵ Bakterijske fosfolipaze mogu promijeniti fosfolipidni sastav želučane sluznice, te time mijenjaju površinsko trenje, hidrofobnost i permeabilnost sluznice.²² Bakterija *H. pylori* koristi enzim katalazu pri obrani od stanica imunosnog sustava. Katalaza djeluje kao obrana za bakteriju od toksičnih metabolita (vodikov peroksid i drugi oksidansi) koje luče aktivirani neutrofilni granulociti. Korištenjem ovog mehanizma obrane bakterija može preživjeti i proliferirati u upaljenoj i oštećenoj sluznici.²²

2.1.3. Epidemiološke karakteristike

Infekcija s bakterijom *H. pylori* je najčešća bakterijska infekcija kod ljudi, a studije koje provode analize genskih sljedova ukazuju da su ljudi bili inficirani ovom bakterijom već prije 58 000 godina.²³ U razvijenim zemljama, djeca su rijetko inficirana ovim patogenom prije

svoje desete godine, dok je prevalencija kod odraslih veća od 50 % prije 50-te godine života.^{24,25} Faktori rizika za infekciju s bakterijom *H. pylori* su povezani sa socioekonomskim statusom i životnim uvjetima u ranoj fazi života (gustoća naseljenosti, broj braće i sestara, dijeljenje kreveta i nedostatak pitke vode povezani su s većom akvizicijskom stopom prema infekciji).^{26,27,28}

Put prijenosa infekcije još je uvijek nepoznat.^{20,29} Smatra se da je najvjerojatniji osobni kontakt, fekalno-oralni ili oralno-oralni. Prema nekim izvješćima ovaj patogen je pronađen u mlijeku i želučanom tkivu ovce, što ukazuje na to je ovca njegov prirodni rezervoar. To bi objasnilo povećanu stopu infekcije kod pastira u usporedbi s njihovom braćom i sestrama.³⁰ Fekalno-oralni prijenos je moguć kada je pitka voda zagađena. U zagađenoj vodi ovaj patogen vijabilan je nekoliko dana. Djeca koja često plivaju u rijekama, izvorima, bazenima te piju vodu s izvora i jedu nekuhano povrće vjerojatnije će biti inficirana s bakterijom *H. pylori*.³¹

2.1.4. Posljedice infekcije bakterijom *H. pylori*

Kao posljedice infekcije s bakterijom *H. pylori* mogu se javiti kronični ili atrofični gastritis, koji prethodi nastanku želučanih tumora.^{32,33} Kod životinjskih modela pokazano je da infekcija s bakterijom *H. pylori* inducira adenokarcinom želuca,³⁴ a brojne su studije pokazale jasnu povezanost između infekcije s bakterijom *H. pylori* i adenokarcinoma želuca kod ljudi (za oba podtipa: intestinalni i difuzni).^{35,36} Prema svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, *H. pylori* je kancerogen skupine I.³⁷ U studiji Eurogast (rađena na 17 populacija iz 13 različitih zemalja: 11 europskih, SAD i Japan) zabilježeno je višestruko povećanje rizika od karcinoma želuca u populacijama zaraženim ovim patogenom u usporedbi s kontrolnom grupom.³⁸ Nadalje, u dvije meta-analize kohorte i kontrolne studije ustanovljeno je da infekcija s bakterijom *H. pylori* povećava rizik za razvoj adenokarcinoma čak dva puta.^{35,39}

2.1.5. Dijagnostika i liječenje infekcije bakterijom *H. pylori*

Nekoliko dijagnostičkih metodologija je dostupno za detekciju bakterije *H. pylori*. Invazivne metode koriste histologiju, kultiviranje i ureaza test na uzorcima tkiva kod pacijenata koji imaju indikaciju za gastroskopiju. Manje invazivne metode (indirektne) uključuju izdisajni ureaza test i test na antigene iz uzorka stolice. Indirektne metode se primjenjuju kod pacijenata koji nemaju indikaciju za endoskopski pregled. Također postoje i molekularne metode koje se usavršavaju, a ne samo da imaju potencijal brzo otkriti prisustvo bakterije *H.*

pylori već i detekciju mutacija, odnosno rezistenciju na određene antibiotike. Nove metode uključuju npr. γ -glutamilttransferaza-aktiviranu probu, koja bi se mogla koristiti za gastroskopije gornjeg abdomena.⁴⁰

Režim dobivene terapije ovisi o podneblju, osjetljivosti na lijek te nuspojavi samog lijeka. Dugi niz godina, a i danas, smjernice u liječenju infekcije bakterijom *H. pylori* najčešće uključuju trojnu terapiju koja je bazirana na klaritromicinu, inhibitoru protonske pumpe te amoksicilinu ili metronidazolu. Zbog pojave rezistentnih sojeva terapija bazirana na klaritromicinu zamjenjuje se četvornom terapijom baziranom na bizmutu. Takva terapija uključuje bizmut, klaritromicin, metronidazol ili tetraciklin te inhibitor protonske pumpe u periodu od 14 dana. Iako se pokazala efikasnom, četvorna terapija uzrokuje nuspojave izazvane bizmutom.^{40,41}

2.1.6. Metabolizam purina kod bakterije *H. pylori*

Nukleotidi su esencijalne molekule za sve žive organizme. U živim organizmima imaju različite funkcije: gradivni su elementi nukleinskih kiselina, molekule su za pohranu kemijske energije, kofaktori su za razne enzimske reakcije, signalne su molekule te metabolički regulatori. Prema heterocikličkom prstenu koji sadrže jednostavno ih možemo podijeliti u dvije skupine: purini i pirimidini. Metabolizam purina limitirajući je faktor rasta svih živih stanica, i eukariota i prokariota. Kod bakterija, brzina kojom bakterije proizvode gvanozin monofosfat (GMP) i adenozin monofosfat (AMP) je u korelaciji s brzinom njihovog rasta.⁴²

Za razliku od mnogih drugih patogenih bakterija, koje mogu živjeti u različitim okolišnim nišama, *H. pylori* može rasti jedino unutar svog domaćina. Bakterija *H. pylori* je bila prva bakterija kojoj su sekvencirana dva soja, što je omogućilo prvu široku bioinformatičku analizu genoma bakterijskih vrsta. Rezultati komparativnog sekvenciranja su ukazali na relativno mali genom (cca. 1,7 Mbp) s brojnim promjenama u metaboličkim putevima u usporedbi s ostalim bakterijskim vrstama.⁴³ Oportunistički patogeni poput bakterije *H. pylori* uglavnom zahtijevaju široki spektar gena kako bi mogli živjeti u više organizama, odnosno u različitom okolišu. To rezultira kompleksnijim metaboličkim putevima.⁵ Jedan od takvih metaboličkih puteva je i put biosinteze purinskih nukleotida. Bioinformatička je analiza genoma bakterije *H. pylori* utvrdila nedostatak gena za *de novo* sintezu purina, pa tako bakterija ovisi isključivo o reciklirajućem putu biosinteze purina.

Proučavanje i razumijevanje ovog metaboličkog puta kod bakterije *H. pylori* važno je jer otvara mogućnosti za razvoj novih terapija protiv ovog patogena.

2.2. Adenilosukcinat-sintetaza

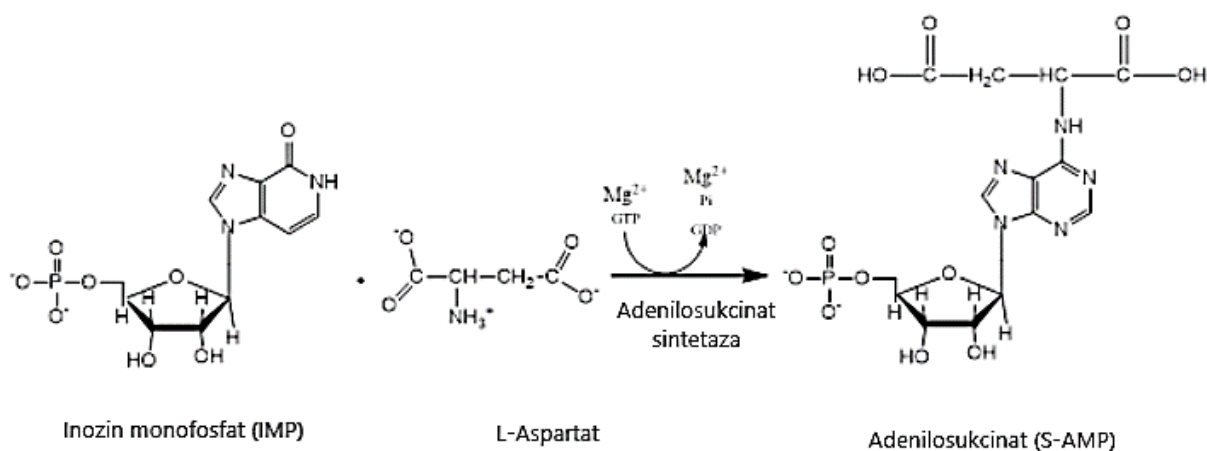
Adenilosukcinat-sintetaza (EC 6.3.4.4), AdSS, enzim je koji se nalazi u svim živim stanicama, osim zrelih eritrocita.⁴⁴ Pripada skupini ligaza, specifično N-C ligaza, i katalizira prvu reakciju biosinteze adenozin-monofosfata (AMP) preko sinteze adenilosukcinata iz L-aspartata i inozin-monofosfata (IMP) uz hidrolizu gvanozin-trifosfata (GTP) u prisustvu iona magnezija (slika 1). Drugi korak ka sintezi AMP-a katalizira enzim adenilosukcinat-liaza (AdSL) tvoreći AMP iz prethodno dobivenog adenilosukcinata. Kod kralježnjaka postoje dvije forme AdSS: tip L i tip M. Tip L je kisela forma enzima ($pI \sim 6$), dok je tip M bazična forma enzima ($pI \sim 9$). Tip L ima niži K_m prema IMP i viši K_m prema aspartatu u odnosu na tip M. Kisela forma AdSS enzima je prvenstveno uključena u biosintezu purina, dok je bazična forma uključena u nukleotidni ciklus purina.⁴⁵ Enzim AdSS kod bakterija prema svojim svojstvima nalikuje kiseloj formi ovog enzima kod eukariota.¹⁰ Ova sintetaza je ponajviše ispitivana kod bakterije *Escherichia coli*. AdSS *in vitro* smjesa je monomera (~ 47 kDa) i dimera (~ 94 kDa) s konstantom disocijacije dimera, K_d od $10 \mu\text{M}$. Istraživanje koje su proveli Rudolph i Fromm je pokazalo da je kinetički mehanizam AdSS kod bakterije *E. coli* nasumičan mehanizam brze ravnoteže (eng. *random rapid-equilibrium*) što je potvrđeno i za nekoliko drugih homologa AdSS.⁷ Do danas je poznato da je jedino kod AdSS iz praživotinje *Plasmodium falciparum* opažen kinetički mehanizam usmjerenog vezanja supstrata (eng. *ordered substrate binding*). Kako je ovaj enzim ključan u sintezi AMP-a, izuzetno je bitan kao potencijalna meta za razvoj novih lijekova protiv bakterije *H. pylori*.

2.2.1. Biokemijske značajke i fiziološka funkcija AdSS

Kao što je već spomenuto, AdSS je okarakterizirana iz raznih organizama, od bakterije *E. coli* do kralježnjaka. Reakcija koju ovaj enzim katalizira prikazana je shematski na slici 1. Vezno mjesto ove sintetaze izuzetno je specifično, što je i očekivano kod enzima koji se nalazi na regulacijskom putu metabolizma purina. Za razliku od AdSS sisavaca, kod određenih praživotinja (*Leishmania donovani* i *Trypanosoma cruzi*) AdSS ima neobičnu specifičnost prema određenim analogima IMP-a, npr. alopurinolu. Sekvencijalne reakcije AdSS i AdSL iz

alopurinola stvaraju AMP analog koji daljnjom fosforilacijom prelazi u ATP analog koji se ugrađuje u RNA što je toksično za ove protozoe. Alopurinol kod sisavaca nije supstrat stoga se ovaj spoj pokazao dobrim lijekom za tretiranje infestacija praživotinjama.⁴⁶

Promatramo li proteinsku sekvencu AdSS, možemo uočiti dvije konzervirane regije, od kojih je jedna izuzetno konzervirani oktapeptid: [QGF]-[WLCF]-G-D-E-[GA]-K-[GA] na N-kraju zadužen za vezanje GTP-a, dok druga: G-I-[GR]-P-X-Y-X(2)-K-X(2)-R uključuje aminokiselinu lizin koja je esencijalna za aktivnost ove sintetaze.⁴⁷ Mjesno-specifične mutacije u regiji bogatoj glicinima, odnosno: G12V, G15V, G17V, K18R kod AdSS iz bakterije *E. coli* su rezultirale značajnim padom katalitičke efikasnosti k_{cat}/K_m , dok je mutacija I19T povećala K_m za GTP-a za 160 puta u usporedbi s divljim tipom, ali nije utjecala na kinetičke parametre drugih supstrata (IMP, L-Asp). Kod AdSS iz bakterije *E. coli* vezanje GTP-a je efikasnije uz prisustvo hidrofobnih aminokiselina na poziciji 19, poput leucina, izoleucina i valina.

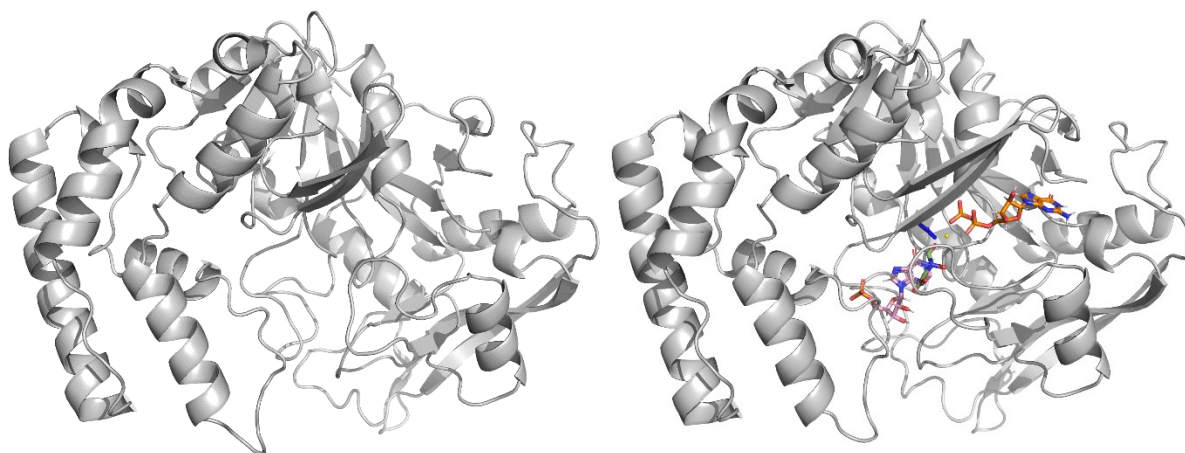


Slika 1. Shematski prikaz enzimske reakcije sinteze adenilosukcinata ovisne o GTP-u iz IMP-a i L-aspartata uz prisustvo iona magnezija. Reakciju katalizira enzim adenilosukcinat-sintetaza.

2.2.2. Strukturne karakteristike

Prema PDB bazi, do danas (ožujak 2021.) su riješene 44 kristalne strukture AdSS iz raznih organizama. Prva riješena kristalna struktura AdSS je ona enzima iz bakterije *E. coli* objavljena 1993. godine (PDB kod: 1ADE). Dominiraju kristalne strukture AdSS iz bakterije

E. coli (24), koja je ujedno i ponajviše opisana u literaturi. Kristalna struktura kompleksa AdSS i liganada (GDP, IMP, hadacidin-HDA, Mg^{2+}) detaljno opisuje aktivno mjesto ove sintetaze kod bakterije *E. coli* (PDB kodovi 1GIM i 1GIN). Na slici 2. prikazane su kristalne strukture AdSS iz bakterija *E. coli* sa i bez liganada.



Slika 2. Kristalna struktura AdSS iz *E.coli*. Lijevo je prikazana apo struktura (PDB kod: 1ADE), desno holo struktura (PDB kod: 1GIM). Sivom bojom je prikazan protein, GDP je prikazan štapićima – narančasto, IMO je prikazan štapićima – ružičasto, HDA je prikazan štapićima – zeleno. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje.

U kristalnoj strukturi AdSS iz *E.coli* (PDB kod: 1GIM) stvara se polarna interakcija GDP-a (preko atoma kisika α -fosfatne skupine) s bočnim ogrankom S414 te s dušikom iz peptidne veze K331. Endociklički i egzociklički dušik gvanina su u interakciji s bočnim ogrankom D333. β -fosfatna grupa je stabilizirana preko interakcija s dušikovim atomima iz peptidne veze (aminokiseline 15-17) uz elektrostatsku stabilizaciju s magnezijevim ionom. Bočni ogranak H41 preko dušika ostvaruje vodikovu vezu s kisikom iz β -fosfatne skupine.⁴⁸

Ono što je ključno u prepoznavanju molekule IMP od strane ove sintetaze u veznom mjestu za IMP je njegova 5'-fosfatna skupina. Stabilizirana je polarnim interakcijama preko bočnih ogranaka T129, T239 i N38, te preko bočnog ogranka R143 iz drugog monomera. Tri molekule vode posreduju u interakciji između 5'-fosfatne skupine IMP-a i proteina. Pokazano je da mutacije R143 u L143 ili u K143 uzrokuju porast u K_m vrijednosti za dva reda veličine, što ukazuje na važnost te aminokiseline za interakciju s molekulom IMP. Interakcije između IMP-a i bočnog ogranka T129 te karbonilne skupine okosnice (aminokiselina 126) su ključne

za stabilizaciju petlje koju tvore aminokiseline 120-130. Hipoksantinski dio molekule IMP stvara interakciju preko atoma dušika s kisikovim atomom bočnog ogranka Q224 i kisikovim atomom bočnog ogranka D13.^{48,49}

Hadacidin je kompetitivni inhibitor ove sintetaze obzirom na aspartat.⁵⁰ Koordinira magnezijev ion preko svoje *N*-formilne skupine te je u interakciji s dušikovim atomom iz okosnice proteina (aminokiselina 301). Karboksilna skupina stabilizira negativni naboj koji je smješten na *N*-kraju α -zavojnice.⁵¹ Kod svih apo-struktura ove sintetaze petlja koju čine aminokiseline 299-303 je neuređena, dok uz prisustvo hadacidina ta ista petlja zauzme uređenu strukturu sličnu jednom zaokretu α -uzvojnice. Aminokiseline u području od 299 do 302 su orijentirane prema karboksilnoj skupini hadacidina. Ove interakcije su komplementarne elektrostatskoj interakciji između te iste karboksilne skupine i bočnog ogranka R303.⁴⁸

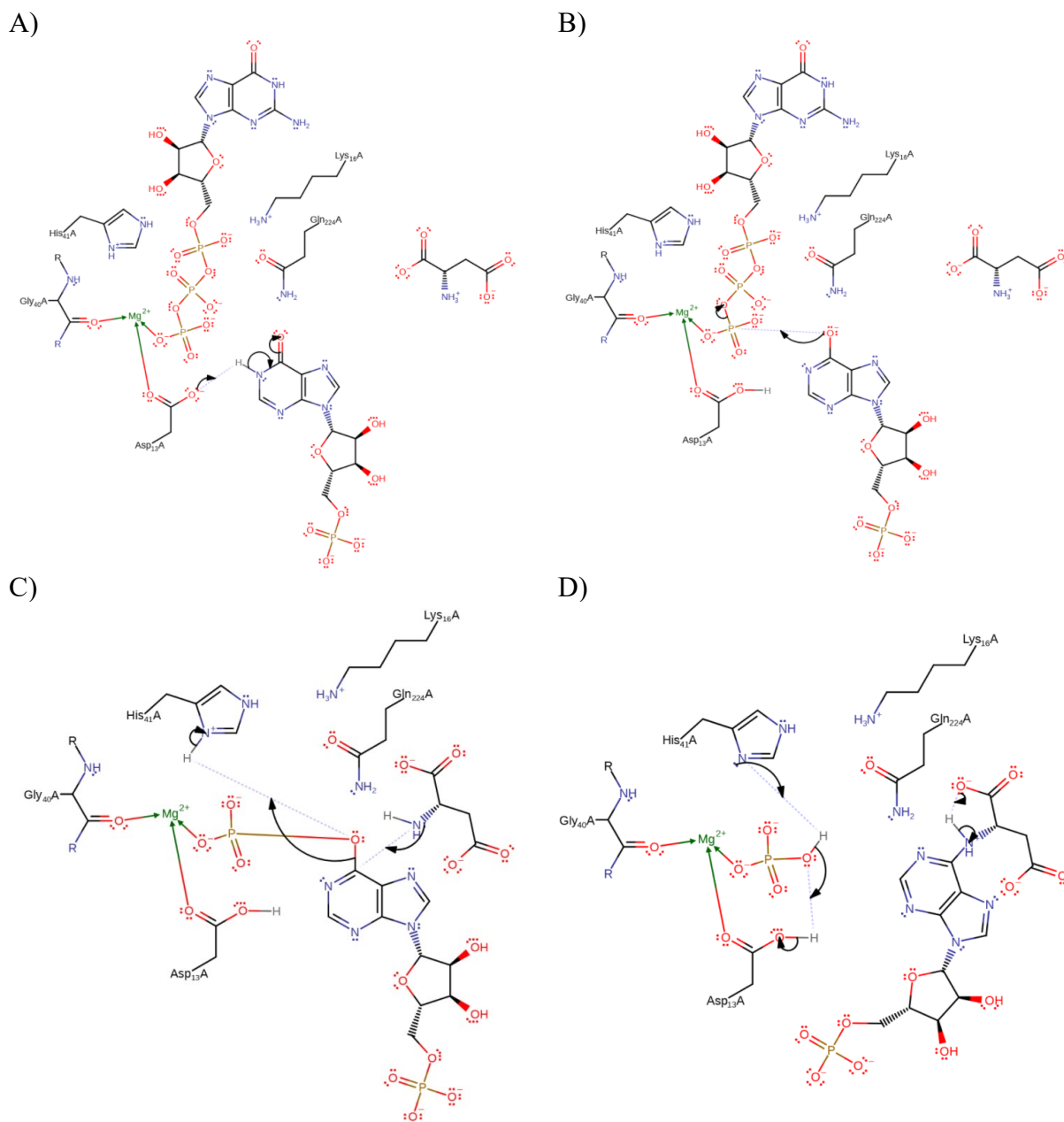
U okolini iona magnezija nalazimo sljedeće skupine čija je udaljenost od magnezijeva iona unutar 2,6 Å: karbonilna skupina iz okosnice aminokiseline 40, kisikovi atomi iz α - i β -fosforilne skupine GDP-a, kisik iz nitratne skupine te kisik iz *N*-formilne skupine hadacidina.⁴⁸

2.2.3. Mehanizam katalize AdSS

Analiza kinetike ustaljenog stanja pokazuje da enzim posjeduje sekvencijalni mehanizam kojeg u potpunosti karakterizira nasumično vezanje supstrata.⁵² U literaturi su predložena tri mehanizma enzimske katalize. Prvi predloženi mehanizam je usklađena reakcija u jednom koraku,⁵³ dok drugi predlaže dva koraka reakcije uz stvaranje 6'-fosforil-IMP-a kao intermedijera.^{54,55} Kao treći predlaže se mehanizam katalize u tri koraka gdje nastaje dodatni produkt između IMP i aspartata koji se fosforilira te na kraju razlaže na reakcijske produkte.⁵⁶ Korištenjem tehnike mjesne izmjene izotopa (eng. *positional isotope exchange*) pokazano je da je 6'-fosforil-IMP vjerojatni intermedijer u reakciji koju katalizira AdSS.⁵⁰

Choe i suradnici⁵⁷ predlažu reakcijski mehanizam, uspoređujući kristalne strukture kompleksa s divljim tipom te s mutantima AdSS iz bakterije *E. coli* kod kojeg u prvom koraku D13 djeluje kao baza pri čemu oduzima proton s molekule IMP. Posljedica deprotonacije molekule IMP je stvaranje oksianiona tautomerizacijom, dok je negativan naboj stabiliziran preko Q224 vodikovom vezom. Stabilizacija GTP-a ostvarena je vodikovom vezom preko H41 i elektrostatski preko magnezijeva iona (slika 3 A). U drugom koraku

aktivirani IMP se ponaša kao nukleofil. Dolazi do nukleofilnog napada na γ -fosfatnu skupinu GTP-a, pri čemu nastaje GDP i 6'-fosforil-IMP. Magnezijev ion i H41 stabiliziraju GTP kroz polarne interakcije, dok D13 i Q224 pridonose stabilizaciji aktiviranog IMP-a (slika 3 B). Treći korak je reakcija supstitucije, gdje se događa nukleofilni napad dušikovog atoma aminoskupine L-aspartata na ugljikov atom (C6) 6'-fosforil-IMP-a (slika 3 C). U ovom koraku se 6'-fosforil-IMP defosforilira, pri čemu je izlazna fosfatna skupina stabilizirana preko H41, dok D13 i Q224 stabiliziraju IMP. U zadnjem koraku (slika 3 D), H41 uzima proton s izlazeće fosfatne skupine, što rezultira deprotonacijom D13. Esencijalne aminokiseline za ovu reakciju su D13, H41 te Q224.



Slika 3. Mehanizam djelovanja adenilosukcinat-sintetaze. **A)** Aktivacija IMP preko oksianiona pomoću magnezijeva iona kao katalitičke baze. **B)** Nukleofilni napad aktiviranog IMP na γ -fosfatnu skupinu GTP-a. **C)** Nukleofilni napad L-aspartata na C6 atom intermedijera (6'-P-IMP). **D)** Povratni korak uz nastanak adenilosukcinata. (Preuzeto s <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/m-csa/entry/65/>, 14. 5. 2021.)

2.3. Teorijska osnova računalnih metoda

2.3.1. Molekularna dinamika

Simulacija molekularne dinamike, MD standardna je tehnika koja se koristi pri proučavanju bioloških i biokemijskih sustava, poput proteina i proteinskih kompleksa. Ovom metodom gibanje molekularnog sustava opisuje se klasičnom mehanikom korištenjem aproksimacije harmonijskog oscilatora pri čemu koordinate atoma evoluiraju u vremenu. Ukupna potencijalna energija je definirana kao suma svih veznih (energije istežanja veze, promjene valentnog kuta i torzijskog kuta) i neveznih doprinosa (elektrostatski i Van der Waalsov doprinos).

$$U(\vec{r})_{ukupna} = \sum U(\vec{r})_{vezna} + \sum U(\vec{r})_{nevezna} \quad (2.1)$$

Energijski doprinos veza, odnosno potencijal veza je definiran preko harmonijskog oscilirajućeg gibanja:

$$U(\vec{R})_{veze} = \frac{1}{2} \sum_{veze} K_b (r_{i,j} - r_0)^2 \quad (2.2)$$

gdje je $r_{i,j} = |\vec{r}_j - \vec{r}_i|$ udaljenost između atoma, r_0 je ravnotežna udaljenost, dok je K_b konstanta opruge.

Energijski doprinos kuta, odnosno kutni potencijal, opisuje kutno vibracijsko gibanje koje se događa između nekog (i,j,k) tripleta kovalentno vezanih atoma, te je definiran na sljedeći način:

$$U(\vec{R})_{kutovi} = \frac{1}{2} \sum_{kutovi} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (2.3)$$

gdje je θ kut u radijanima između dvaju vektora: $\vec{r}_{i,j} = \vec{r}_j - \vec{r}_i$ i $\vec{r}_{k,j} = \vec{r}_j - \vec{r}_k$, dok je θ_0 ravnotežni kut, a K_θ je konstanta opruge

Doprinosi energiji uslijed odstupanja torzijskih kutova od ravnotežnih vrijednosti opisani su izrazima:

$$U(\vec{R})_{torzija} = \sum_{diedrali} K_{\psi}(1 + \cos(n\Psi + \Phi)) \quad ; \quad n > 0 \quad (2.4)$$

$$U(\vec{R})_{torzija} = \sum_{imp} K_{\psi}(\Psi - \Phi)^2 \quad ; \quad n = 0 \quad (2.5)$$

Izraz 2.4 predstavlja potencijalnu energiju tzv. „pravog“ torzijskog kuta Ψ koga čine atomi u nizu (1-4) međusobno povezani kovalentnim vezama. Konstanta n pozitivan je broj te upućuje na periodičnost. Kada je $n > 0$, Φ predstavlja kutni pomak u fazi, a kada je $n = 0$, Φ predstavlja ravnotežni kut. K_{ψ} je konstanta sile.

Izraz 2.5 opisuje doprinos potencijalnoj energiji uslijed odstupanja atoma, koji čine konjugirani sustav, od ravnine. Tu je Ψ kut u radijanima između ravnine (i,j,k) koju tvore prva tri atoma i ravnine (j,k,l) koju čine zadnja tri sukcesivno vezana atoma (i,j,k,l) .

Sumiranjem izraza od (2.2) do (2.5) dobijemo vezni doprinos potencijalnoj energiji sustava:

$$U_{vezna} = U_{veze} + U_{kutovi} + U_{torzija} \quad (2.6)$$

odnosno:

$$U_{vezna} = \frac{1}{2} \sum_{veze} K_b(r_{i,j} - r_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{kutovi} K_{\theta}(\theta - \theta_0)^2 + K_{UB}(r_{ik} - r_{UB})^2 \\ + \sum_{diedrali} K_{\psi}(1 + \cos(n\Psi + \Phi)) + \sum_{imp} K_{\psi}(\Psi - \Phi)^2 \quad (2.7)$$

Nevezni doprinos potencijalnoj energiji uključuje Waalsov doprinos te elektrostatske interakcije između svih (i, j) parova atoma koji koje razdvajaju bar dvije kovalentne veze.

$$U_{nevezni} = U_{vdw} + U_{el} \quad (2.8)$$

U MD simulacijama, čak i uz upotrebu i brzih metoda evaluacije, računalno vrijeme predstavlja ograničavajući faktor. Waalsove interakcije predstavljaju sumu privlačnih

interakcija koje su rezultat nastajanja induciranih dipola i odbojnih interakcija koje proizlaze iz Paulijeve načela isključenja koje su proporcionalne s r^{-12} te brzo trnu. Jakosti ovih interakcija su relativno male u usporedbi s jakošću kovalentne veze. Unatoč tome, od izuzetnog su značaja i jedne su od fundamentalnih interakcija među atomima, odnosno molekulama. Za opis van der Waalsovih interakcija koristi se Lennard-Jonesov (2.9.) potencijal ili Buckinghamov potencijal (2.10.):

$$U_{vdW(L-J),ij} = (\varepsilon_{min}) \left[\left(\frac{A}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{B}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.9)$$

$$U_{vdW(B)} = Ae^{-Br_{ij}} - \frac{B}{r_{ij}^6} \quad (2.10)$$

Češće se koristi Lennard-Jones-ov u obliku:

$$U_{vdW(L-J)} = \sum_i \sum_j \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{0,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.11)$$

gdje r_{ij} predstavlja udaljenost atoma i i j , $r_{0,ij}$ je suma van der Waalsovih radijusa atoma i i j . Elektrostatski doprinos opisuje elektrostatsku interakciju točkastih naboja i dan je izrazom (2.12):

$$\sum_i \sum_j E_{el,ij} = \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon_r r_{ij}} \quad (2.12)$$

gdje su q_i i q_j naboji i -og i j -og atoma, a ε_0 predstavlja dielektričnu permitivnost vakuumu, ε_r predstavlja dielektričnu permitivnost medija, r_{ij} je udaljenost između naboja q_i i q_j .

Među najčešće korištenim poljima sila za simulaciju proteina su AMBER polja sila. Osim AMBER polja sila u modeliranju sustava koriste se i druga polja sila koja imaju izraze, odnosno uzimaju u obzir i dodatne doprinose kojima se može detaljnije opisati molekularni sustav. MD simulacijama mogu se okarakterizirati lokalne ili alosteričke konformacijske promjene te nevezne interakcije. Korištenjem klasičnih polja sila, ne može se opisati pucanje veze ili stvaranje nove kovalentne veze. Također, ne mogu se opisati kvantni efekti (npr. transfer elektrona). Provođenje MD simulacija uključuje rješavanje jednadžbi gibanja, pri čemu se najčešće koristi Newton-ova jednadžba gibanja dana izrazom (2.13). Preko polja sila definirana je potencijalna energija $U(\vec{R})$, gdje je $\vec{R} = \{\vec{r}_1, \vec{r}_2, \vec{r}_3, \dots, \vec{r}_N\}$ skup pojedinačnih pozicijskih vektora atoma $\vec{r}_1 = (x, y, z)$, a N predstavlja broj atoma u sustavu. Nadalje, sila koja djeluje na i -ti atom definirana je izrazima (2.13) i (2.14)

$$\vec{F}(\vec{r}_i) = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i(t)}{dt} \quad (2.13)$$

$$\vec{F}(\vec{r}_i) = -\nabla U(\vec{r}) \quad (2.14)$$

Rješenje ovih jednadžbi je vektor položaja $\vec{r}_i(t)$ te trenutačna brzina, $\vec{v}_i(t)$ za svaki i atom gdje je $i = 1, 2, \dots, N$.

Obzirom da ne postoji analitičko rješenje za niz jednadžbi gibanja atoma u makromolekularnom sustavu koriste se numeričke metode, kao što su npr. Verletov integracijski algoritam te leap-frog algoritam. Relativno je brz i precizan pri čemu su očuvani linearni i kutni moment. Vremenski je reverzibilan, te je stabilan kroz duže računanja.

Algoritam generira koordinate i brzine za svaki vremenski međukorak, Δt .

Položaj atoma se osvježava (eng. *updated*) za svaki međukorak Δt , prikazano izrazom (2.15):

$$\vec{r}_i(t+\Delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i(t)\Delta t + \frac{1}{2}\vec{a}_i(t)\Delta t^2 \quad (2.15)$$

gdje $r(t)$ predstavlja vektor položaja čestica, dok Δt predstavlja integracijski korak, a brzina $v(t)$ i akceleracija $a(t)$ su prva, odnosno druga derivacija vektora položaja $r(t)$ po vremenu u trenutku t . Brzina i akceleracija su također vektorske veličine. Vektori brzina i akceleracije dani su izrazom (2.16) i (2.17)

$$\vec{v}_i(t + \Delta t) = \vec{v}_i(t) + \frac{1}{2} [\vec{a}_i(t) + \vec{a}_i(t + \Delta t)] \Delta t \quad (2.16)$$

gdje je :

$$\vec{a}_i(t + \Delta t) = - \left(\frac{1}{m_i} \right) \nabla U(\vec{r}_i(t + \Delta t)) \quad (2.17)$$

Novo brzine u trenutku $(t + \Delta t)$ mogu se izračunati neposredno nakon što se izračuna sila u novom položaju definiranom vektorom $\vec{r}_i(t + \Delta t)$ zbog toga što su za izračun novih brzina potrebne prethodne i nove vrijednosti sila. Prednost ovoga algoritma je simultani izračun brzina i položaja.⁵⁸

Leap-frog algoritam računa vektor brzina u točki koji odgovara polovini vremenskog koraka $(t + \frac{\Delta t}{2})$. Zatim se izračunane brzine koriste za izračun novog vektora položaja. Izrazi 2.18 i 2.19.

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) \Delta t \quad (2.18)$$

$$\vec{v}_i \left(t + \frac{1}{2} \Delta t \right) = \vec{v}_i \left(t - \frac{\Delta t}{2} \right) + \vec{a}_i(t) \Delta t \quad (2.19)$$

Algoritam radi na način da položaji i akceleracije određuju za vremena $(t, t + \Delta t, t + 2\Delta t \dots)$, dok se brzine računaju za poluvremena $(t - \frac{\Delta t}{2}, t + \frac{\Delta t}{2}, t + \frac{3\Delta t}{2})$. Leap-frog i velocity-Verlet algoritam proizvest će iste trajektorije ako se uzmu identični polazni uvjeti.⁵⁸

2.3.2. Računalno određivanje energije vezanja metodom MM-PB(GB)SA

Metoda MMPB(GB)SA (eng. *Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann (Generalized Born) Surface Area*) predstavlja računalnu metodu za aproksimativno računanje promjene slobodne

Gibbsove energije između dva stanja sustava.⁵⁹ Često se koristi za istraživanje vezanja npr. ligand-protein,⁶⁰ DNA-protein ili protein-protein.⁶¹ Metode MMPBSA i MMGBSA su često korištene zbog prihvatljive razine točnosti u vidu relativne usporedbe vezanja strukturno sličnih molekula u vezno mjesto. Relativno su brze i mogu se primjeniti na različite sustave. Slobodna Gibbsova energija vezanja liganda na receptor odnosno u ligand-receptor kompleks, u nekom otapalu, $\Delta G_{vezano,aq}$ može se aproksimirati izrazom:

$$\Delta G_{vezano,aq} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{vezano,solv} - T\Delta S \quad (2.19)$$

gdje ΔE_{MM} predstavlja molekularno-mehaničku promjenu u energiji u plinskoj fazi, $\Delta G_{vezano,solv}$ predstavlja slobodnu energiju solvatacije, $-T\Delta S$ član predstavlja promjenu u entropiji nakon vezanja u kompleks.

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{kovalento} + \Delta E_{elektrostatski} + \Delta E_{vdW} \quad (2.20)$$

Izraz (2.20) obuhvaća energijske doprinose veznog, elektrostatskog te van der Waalsovog doprinosa slobodnoj Gibbsovoj energiji vezanja.

Dio Gibbsove energije uslijed desolvatacije dijela sustava (2.21) sastoji se od polarnog i nepolarnog člana:

$$\Delta G_{vezano,solv} = \Delta G_{polarno} + \Delta G_{nepolarno} \quad (2.21)$$

Kako bi izračun veznih afiniteta bio što bliže eksperimentalnim vrijednostima potrebno je u račun uključiti sve reprezentativne predstavnike ansambla promatranog sustava. MMPBSA računi provode se na što većem broju skupova konfiguracija uzorkovanih tijekom MD simulacija. Pri tomu su moguće dvije vrste pristupa: pristup koji se bazira isključivo na rezultatima simulacija kompleksa (eng. *single-trajectory approach*) te pristup u kome se koriste rezultati MD simulacija kompleksa, receptora i liganda (eng. *three-trajectory approach*).⁵⁹ Polarni solvatacijski doprinos slobodnoj Gibbsovoj energiji vezanja $\Delta G_{polarno}$ u izrazu (2.21) računa se koristeći Poisson-Boltzmannovu jednadžbu ili poopćenu Bornovu

metodu. Ovisno koji od ova dva pristupa se koristi, govorimo o MMPBSA ili MMGBSA. U prvom slučaju najčešće se koristi linearna aproksimacija Poisson-Boltzmann-ove jednačbe:

$$\nabla\varepsilon(\vec{r})\nabla\Phi(\vec{r}) - \kappa^2\Phi(\vec{r}) = -4\pi\rho(\vec{r}) \quad (2.22)$$

$$\kappa^2 = \frac{8\pi e^2 I_c}{\varepsilon_v k_B T} \quad (2.23)$$

gdje je I_c ionska jakost otopine, ε_v dielektrična konstanta otapala. Rješavanje jednačbe se provodi korištenjem numeričkih metode uz zadane rubne uvjete.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Standardne kemikalije:

Agaroz (Invitrogen), akrilamid/bis-akrilamid (*Sigma-Aldrich*), amonijev persulfat (*Sigma-Aldrich*), ampicilin (*Fermentas*), dimetilsulfoksid, DMSO (*Sigma-Aldrich*), etanol (*Kemika*), etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (*Kemika*), fenilmetilsulfonil fluorid, PMSF (*Sigma-Aldrich*), glicin (*Carl Roth*), N-(2-hidroksietil) piperazin-N'-2-etansulfonska kiselina, HEPES (*Sigma-Aldrich*), imidazol (*Carl Roth*), izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid, IPTG (*Ambion*), kloramfenikol (*Sigma-Aldrich*), Luria-Bertani medij (*Roth*), magnezijev klorid (*Carl Roth*), 2-merkaptioetanol (*Cytiva Life Sciences*), metanol (*Kemika*), N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin, TEMED (*Serva*), natrijev dihidrogenfosfat (*Carl Roth*), natrijev dodecilsulfat, SDS (*Carl Roth*), natrijev hidrogenfosfat (*Carl Roth*), natrijev klorid (*Kemika*), octena kiselina (*Kemika*), Tris (*Carl Roth*), tris-(2-karboksietil) fosfin hidroklorid, TCEP (*Carl Roth*)

Voda: mili Q - deionizirana voda niske vodljivosti proizvedena u sustavu za proizvodnju deionizirane vode *Millipore*

Proteinski i DNA standardi:

smjesa proteina poznate molekulske mase – LMW-SDS Marker Kit (*Cytiva Life Sciences*), smjesa DNA odsječaka poznate duljine – 1 kb DNA Ladder (*Solis Biodyne*), 100 bp DNA Ladder (*ThermoFisher*)

Boje: Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Cytiva Life Sciences*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Serva*), DNA Loading Dye (*Fermentas*), SYBRTM Safe (*Invitrogen*)

Kompleti:

kompleti za pročišćavanje DNA iz agaroznog gela – NucleoSpin® Extract II kit (*Macherey-Nagel*), Plasmid Miniprep Kit (*QIAGEN*); komplet za usmjerenu mutagenezu – Q5® Site-

Directed Mutagenesis Kit (*NEB*); kompleti kristalizacijskih otopina – JCSG+, Midas, Morpheus I, Morpheus II, Morpheus III, SG1Eco (*Molecular Dimensions*)

Početnice: početnice su servisno sintetizirane u tvrtkama *Invitrogen* i *Thermofisher*

Proteini i enzimi: 5x HOT FIRE Pol[®] Blend Master Mix Ready to Load (*Solis Biodyne*), DNaza I (*Sigma-Aldrich*), DpnI (*Thermofisher*), lizozim iz bjelanjaka jajeta (*Sigma-Aldrich*), NheI (*NEB*), Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (*Thermofisher*), Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix (*NEB*), T4 DNA Ligase (*NEB*), T4 Polynucleotide kinase (PNK) (*Thermofisher*), XhoI (*NEB*)

Bakterijske stanice: *Escherichia coli*, sojevi: BL21-CodonPlus(DE3)RIL (*Agilent Technologies*), DH5- α (*NEB*), XL-Gold[®] (*Agilent Technologies*)

Kolone i punila za kolone: FF Q-Sepharose (*Cytiva Life Sciences*), HisTrap[™] HP 5 mL (*Cytiva Life Sciences*), Ni-NTA agarozna (*Macherey-Nagel*), PD-10 (Sephadex G-25) (*Cytiva Life Sciences*), Sephacryl S-200 HR (*Cytiva Life Sciences*)

Supstrati i inhibitori: Hadacidin (Anji Biosciences), hidratna dinatrijeva sol inozin 5'-monofosfata, IMP (*Sigma-Aldrich*), hidratna natrijeva sol gvanozin 5'-trifosfata, GTP (*Sigma-Aldrich*), L-aspartat (Alfa Aesar), gvanozin 5'-difosfat GDP (*Sigma-Aldrich*), adenilosukcinat, S-AMP (*Sigma-Aldrich*)

3.2. Metode rada s mikroorganizmima

3.2.1. Uzgoj bakterijskih stanica

Za uzgoj i rad s bakterijama korišteni su tekući hranjivi mediji i krute hranjive podloge. Tekući hranjivi medij, LB (Luria-Bertani) pripremljen je otapanjem 25 g *Difco* praha (baktotripton ($\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$), ekstrakt kvasca ($\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$) i NaCl ($\gamma = 10 \text{ g L}^{-1}$) pH-vrijednost 7,0) u 1 L destilirane vode. Sterilizacija je postignuta autoklaviranjem pripremljenog medija u trajanju od 20 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 1,5 bar. U ohlađeni medij je dodan

seleksijski marker (antibiotik) u svrhu probira bakterijskih stanica. Ovisno o tipu otpornosti koriste se različiti antibiotici za selekciju bakterijskih stanica. Izvorna otopina ampicilina (eng. *Stock solution*) koncentracije 100 mg mL^{-1} je pripravljena otapanjem ampicilina u mili Q vodi te je ista filtrirana koristeći filter s veličinom pora od $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Konačna masena koncentracija ampicilina u hranjivom mediju iznosi $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Krute hranjive podloge su pripravljene kao i tekuće, uz dodavanje agara do masene koncentracije od 15 g L^{-1} , nakon sterilizacije se dodaje antibiotik do konačne masene koncentracije $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ kada je temperatura tako pripravljenog medija ispod $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Krute hranjive podloge su pripravljene u plastičnim Petrijevim zdjelama. Bakterijske stanice se naciepljuju na pripremljenu podlogu te razmazuju sterilnom ezom ili sterilnim staklenim kuglicama. Ovako naciepljene bakterije se uzgajaju na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u inkubatoru tijekom 16 sati. Uzgajanje bakterija u tekućem mediju zahtijevalo je naciepljivanje jedne kolonije s krute hranjive podloge te miješanje na rotacijskoj platformi pri 250 rpm i temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Vrijeme uzgoja ovisi o soju i daljnjem radu s bakterijama.

3.2.2. Transformacija bakterijskih stanica vektorom (plazmidnom DNA)

Korištene su dvije metode transformacije bakterijskih stanica: metoda toplinskog šoka te elektrotransformacija.

Metoda toplinskog šoka korištena je za transformaciju stanica *E. coli* sojeva DH5- α i XL-Gold[®]. U $50 \text{ }\mu\text{L}$ kemijski kompetentnih stanica dodano je $1\text{-}10 \text{ }\mu\text{L}$ DNA. Suspenzija stanica i DNA je inkubirana na ledu 15 minuta, potom su stanice izložene temperaturi od $42 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 45 sekundi te inkubirane na ledu dvije minute. U suspenziju je dodano $450 \text{ }\mu\text{L}$ LB medija te je slijedila inkubacija jedan sat na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ uz miješanje na rotacijskoj platformi brzinom od 400 rpm. Na krutu hranjivu podlogu LB/amp je naciepljeno $250\text{-}400 \text{ }\mu\text{L}$ prethodno inkubirane suspenzije stanica.

Metoda elektrotransformacije korištena je za stanice *E. coli* soja BL21-CodonPlus(DE3)RIL. U $50 \text{ }\mu\text{L}$ elektrokompetentnih stanica dodan je $1 \text{ }\mu\text{L}$ plazmidne DNA masene koncentracije $80\text{-}100 \text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$. Pripremljena suspenzija je prebačena u prethodno ohlađenu kivetu za elektroporaciju s razmakom elektroda od 2 mm . Električni puls je primijenjen korištenjem uređaja *Gene Pulser Xcell* primjenom napona $\sim 2,5 \text{ kV}$ u trajanju od pet milisekundi. Zatim je u kivetu dodan 1 mL LB medija te je takva suspenzija prebačena u

sterilnu epruvetu i inkubirana na 37 °C uz miješanje na rotacijskoj platformi brzinom od 400 rpm sat vremena. Na krutu hranjivu podlogu LB/amp naciepljeno je 100-500 µL prethodno inkubirane suspenzije stanica.

3.3. Metode manipulacije DNA

3.3.1. Unošenje histidinskog privjeska

Gen *HpPurA* (za nativni enzim AdSS) je ukloniran u *pET-21b(+)* plazmidnu DNA unutar višestrukog mjesta za kloniranje (eng. *Multiple Cloning Site, MCS*) omeđenog restrikcijским mjestima XhoI i NdeI (pripremljeno od strane dr. sc. Igora Stuparevića, PBF Zagreb)⁴⁴. Histidinski privjesak predstavlja šest do deset uzastopnih histidina povezanih kratkom spojnicom na jedan ili oba kraja proteina. Histidinski privjesak (6 His) je unesen na C-kraj enzima.

3.3.1.1. Umnažanje vektora *pET-21b(+)-HpPurA*

Vektor *pET-21b(+)* koji sadrži gen *HpPurA* u okviru čitanja T7 promotora je umnožen koristeći metodu obrnute lančane reakcije polimerazom (eng. *inverse polymerase chain reaction, invPCR*). Za reakciju su korištene specifične početnice (tablica 1) koje omeđuju plazmid na način da konačni konstrukt u istom okviru čitanja posjeduje histidinski privjesak od šest histidina.

Početnice su otopljene u sterilnoj milli Q vodi tako da im je koncentracija iznosila 100 µmol L⁻¹ te pohranjene na -20 °C. Koristeći prethodno pripremljene otopine početnica pripremljeno je razrjeđenje konačne koncentracije od 10 µmol µL⁻¹.

Tablica 1. Dizajnirane početnice za unošenje histidinskog privjeska na C– kraju konstrukta.

Početnica	Nukleotidni slijed
Nizvodna :	5'-TAGAAAAATCGTGTCTTCTC-3'
Uzvodna:	5'-CTCGAGCACCACCAC-3'

Za umnažanje gena korištena je polimeraza iz kompleta *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix 2X*. Sastav PCR reakcijske smjese i reakcijski uvjeti prikazani su u tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Sastav reakcijske otopine za umnažanje DNA.

Komponenta otopine	Radna koncentracija	V / μL
Mili Q voda		6,3
Master mix 2X ^a	2x	7,5
Nizvodna početnica ^b	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,5
Uzvodna početnica ^b	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,5
Kalup: <i>pET-21b(+)-HpPurA</i>	80 ng μL^{-1}	0,2
Σ		15

^a Master mix 2X sadrži sve potrebne komponente, osim kalupa i početnica.

^b Radne koncentracije početnica su pripremljene u sterilnoj mili Q vodi.

Tablica 3. Reakcijska shema i uvjeti.

Korak reakcije	Broj ciklusa	T / °C	t / s
Inicijalna denaturacija	1	95	30
Denaturacija	30	95	15
Sljepljivanje početnica	30	53	15
Ekstenzija	30	72	135
Završna ekstenzija	1	72	120

3.3.1.2. Pročišćavanje PCR produkta

Agarozni gel je pripremljen u mikrovalnoj pećnici otapanjem agaroze u TAE puferu (Tris baza ($c = 40 \text{ mmol L}^{-1}$), EDTA(Na)₂ ($c = 1 \text{ mmol L}^{-1}$), octena kiselina ($c = 20 \text{ mmol L}^{-1}$), pH-vrijednost 8,0) koncentracije 1 % w/v. Nakon što su svi reakcijski koraci završeni, reakcijska otopina je pročišćena elektroforetskom metodom na 1% w/v agaroznom gelu koji je nadslojen TAE puferom. Uzorak, nanesen u jažicu gela, je pripremljen miješanjem 2 μL reakcijske otopine s 2 μL SYBR Safe boje i 6 μL mili Q vode. Elektroforeza je provedena pri naponu od 115 V u trajanju od 45 minuta. Reakcijska smjesa je potom pročišćena koristeći komplet za pročišćavanje PCR produkta *NucleoSpin® Extract II kit* prema uputama proizvođača.

3.3.1.3. Fosforilacija i ligacija PCR produkta

Prethodno pročišćeni PCR produkt inkubiran je 30 minuta s T4 polinukleotid kinazom (PNK) na 37 °C. Sastav reakcijske smjese i reakcijski uvjeti prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Sastav reakcijske otopine za fosforilaciju PCR produkta.

Komponenta otopine	Radna koncentracija	V / μL
Pročišćeni PCR produkt		10,0
T4 DNA ligacijski pufer ^a	10x	2,0
T4 PNK ^b	10 U μL^{-1}	0,5
Mili Q voda		7,5
Σ		20,0

^a Sastav ligacijskog pufera: $c(\text{Tris-HCl}) = 400 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{MgCl}_2) = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{DTT}) = 100 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{ATP}) = 5 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 7,8 pri 25°C

^b Jedna jedinica (U) definirana je kao količina enzima koja prenosi 1 nmol γ -fosfata sa ATP molekule na 5'-OH DNA u 30 min pri 37 °C.

Reakcija fosforilacije je inaktivirana inkubacijom reakcijske smjese na temperaturi od 75 °C u trajanju od deset minuta. Zatim je smjesa inkubirana s 0,5 μL T4 DNA ligazom koncentracije 1000 CEU μL^{-1} (jedna CEU jedinica predstavlja količinu enzima potrebnu za 50 % ligaciju *HindIII* fragmenta lambda DNA u 30 minuta pri 16 °C) pri sobnoj temperaturi u trajanju od sat vremena. Reakcija je inaktivirana inkubacijom reakcijske smjese na 65 °C stupnjeva u trajanju od deset minuta. Potom je smjesa inkubirana 15 minuta s 0,5 μL *DpnI* koncentracije 10 U μL^{-1} (jedna jedinica (U) predstavlja količinu enzima potrebnu za razgradnju 1 μg pBR322 DNA (dam metiliran) u jedan sat pri 37°C u 50 μL preporučenog reakcijskog pufera) na 37 °C. Kao negativna kontrola je korištena smjesa pročišćenog DNA produkta koji je tretiran samo s *DpnI*.

3.3.1.4. Transformacija stanica ligacijskom smjesom

Bakterijske stanice XL-GOLD su transformirane ligacijskom smjesom metodom toplinskog šoka. Sutradan, s krute LB/amp ploče odabrano je šest kolonija. Svaka kolonija je sterilnim nastavkom nacijepljena u pet mililitara LB/amp tekuće hranjive podloge koja je potom inkubirana preko noći na temperaturi od 37 °C uz miješanje na rotacijskoj platformi pri brzini od 400 rpm.

Sljedeći dan su iz naraslih bakterijskih kultura izolirane plazmidne DNA. Za izolaciju plazmida je korišten komplet *Plasmid Miniprep Kit*. Izolacijski postupak proveden je prema uputama proizvođača, osim što je u zadnjem koraku plazmidna DNA eluirana sterilnom mili Q vodom. Izmjerena je koncentracija plazmidne DNA spektrofotometrijski na uređaju *NanoDrop 1000* pri valnoj duljini od 260 nm. Izolirani uzorci plazmidne DNA su servisno sekvencirani u tvrtki *Macrogen, Nizozemska*.

3.4. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje AdSS-a

3.4.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje konstrukta *pET-21b(+)-HpPurA*

3.4.1.1. Prekomjerna ekspresija

Za prekomjernu ekspresiju enzima AdSS korištene su bakterijske stanice *E. coli* soja BL21-CodonPlus(DE3)RIL. Konstrukt *pET-21b(+)-HpPurA* je elektrotransformacijskom metodom opisanom u poglavlju 3.2.2. unesen u stanice. Sutradan, s krute LB/amp ploče odabrana je jedna kolonija. Kolonija je sterilnim nastavkom nacijepljena u 50 mL LB/amp tekuće hranjive podloge koja je potom inkubirana na temperaturi od 37 °C uz miješanje pri brzini od 250 rpm preko noći – predkultura. Sljedećeg dana LB/amp tekuća hranjiva podloga nacijepljena je predkulturom u omjeru 1:50. Nacijepljene stanice su inkubirane na temperaturi od 37 °C uz miješanje pri brzini od 250 rpm. Prirast je praćen spektrofotometrijski, mjerenjem optičke gustoće medija (eng. *Optical density, OD₆₀₀*) pri valnoj duljini od 600 nm. Uzgoj je završen kada je vrijednost OD_{600} iznosila 0,5 – 0,7. Indukcija je postignuta dodavanjem IPTG-a konačne koncentracije 0,5 mmol L⁻¹. Ekspresija je provedena četiri sata pri temperaturi od 37 °C uz miješanje pri brzini od 250 rpm. Nakon završetka ekspresije, kultura stanica je centrifugirana 20 minuta na 5860×g pri 4 °C te je talog stanica pohranjen na -20 °C.

3.4.1.2. Liza bakterijskih stanica

Prethodno smrznuti talog stanica je izvagan te resuspendiran u puferu sastava: $c(\text{Na-PO}_4) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{EDTA}) = 2 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 6,5 u omjeru 1:5. Dodan je lizozim iz bjelanjka jajeta konačne masene koncentracije 1 mg mL⁻¹ i PMSF konačne masene koncentracije 150 μmol L⁻¹ te je suspenzija inkubirana 20 minuta. Stanice su razbijene sonikacijom koristeći uređaj *Ultrasonic Processor*. Sonikacija je provedena na ledu u trajanju od 4 minute pri 60% amplitude u intervalu od dva impulsa po sekundi. Nakon provedene sonikacije dodana je otopina *DNazal* konačne masene koncentracije 3,6 μg mL⁻¹ i

MgCl₂ konačne koncentracije 5 mmol L⁻¹, potom je smjesa inkubirana 20 minuta na rotacijskoj platformi uz lagano njihanje pri sobnoj temperaturi. Uzorak je potom centrifugiran pri 15800×g u trajanju od 20 minuta. Nakon centrifugiranja odvojen je supernatant u koji je dodan streptomycin sulfat konačne koncentracije 1,5% w/v uz inkubaciju na ledu u trajanju od 10 minuta. Uzorak je centrifugiran pri 15800×g 20 minuta, supernatant odvojen i korišten za daljnju obradu.

3.4.1.3. Pročišćavanje proteina kromatografskim tehnikama

Prvi korak u pročišćavanju bila je kromatografija ionske izmjene. Kao punilo korišten je kationski izmjenjivač SP-sefaroza (eng. *SP-Sepharose*). Volumen kolone je iznosio ~ 55 mL. Kolona je ekvilibrirana u puferu sastava: $c(\text{Na-PO}_4) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{EDTA}) = 2 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 6,5 s protokom od 1,3 ml min⁻¹. Tijekom kromatografije zadržan je isti protok, te su skupljane frakcije volumena ~ 4 mL. Nakon nanošenja uzorka (supernatant lizata stanica) na kolonu, ista je isprana s ~ 160 mL ekvilibracijskog pufera. Zatim je podignuta ionska jakost tako što je kolona isprana s ~ 120 mL pufera sastava: $c(\text{Na-PO}_4) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{EDTA}) = 2 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol L}^{-1}$, pH-vrijednost 6,5. Mjerena je apsorbanacija eluiranih frakcija pri valnoj duljini od 280 nm. Odabrane frakcije (koje sadrže enzim AdSS, što je provjereno elektroforezom) su spojene te koncentrirane u komorici za koncentriranje uz filter PM-30 do volumena koji je bio definiran idućim korakom pročišćavanja, gel filtracija.

Nakon kromatografije ionske izmjene korištena je gel filtracija s punilom od sefakrila S-200 (eng. *Sephacryl S-200*). Volumen kolone iznosio je 189 mL s dimenzijama 1,6×94,5 cm. Kolona je ekvilibrirana u puferu sastava: $c(\text{Tris-HCl}) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{NaCl}) = 150 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 8,5 s protokom od 0,22 mL min⁻¹. Isti pufer korišten je i tijekom kromatografije nakon nanošenja uzorka (volumen uzorka iznosio je 2,5 mL). Tijekom kromatografije zadržan je isti protok, te su skupljane frakcije volumena ~ 2,3 mL. Mjerena je apsorbanacija eluiranih frakcija pri valnoj duljini od 280 nm. Odabrane frakcije su spojene i koncentrirane u VivaSpin koncentradorima s isključenjem od 10 kDa do volumena koji je bio definiran idućim korakom pročišćavanja, izmjena pufera. Pufer je promijenjen koristeći gel filtracijsku kromatografiju s PD-10 kolonom (volumen kolone: 8,3 mL, volumen uzorka: 2,5 mL) koja je ekvilibrirana u puferu sastava: $c(\text{Tris-HCl}) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 8,5.

Sljedeći korak pročišćavanja je kromatografija ionske izmjene na FPLC uređaju (AKTA, Cytiva Life Sciences), koristeći kolonu anionskog izmjenjivača MonoQ GL 5/50. Volumen kolone je jedan mililitar. Kolona je ekvilibrirana s pet mililitara pufera sastava: $c(\text{Tris-HCl}) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 8,5 protokom od 1 mL min^{-1} . Proteini su eluirani linearnim gradijentom NaCl od 0 do 300 mmol L^{-1} (20 mL) te gradijentom NaCl od 300 do 1000 mmol L^{-1} (5 mL) u puferu sastava: $c(\text{Tris-HCl}) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 8,5. Volumen frakcije je iznosio jedan mililitar. Apsorbancija eluiranih frakcija pri valnoj duljini od 280 nm mjerena je u samom FPLC sustavu. Odabrane frakcije su spojene i koncentrirane u VivaSpin koncentratorima s isključenjem od 10 kDa do volumena koji je bio definiran idućim korakom pročišćavanja, izmjena pufera. Pufer je promijenjen koristeći gel-filtracijsku kromatografiju s PD-10 kolonom koja je ekvilibrirana u puferu sastava: $c(\text{HEPES}) = 20 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{DTT}) = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 7,0. Neposredno nakon izmjene pufera enzim je pohranjen na temperaturu od $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ za buduću upotrebu.

3.4.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje konstrukta *pET-21b(+)-HpPurA-His₆*

3.4.2.1. Prekomjerna ekspresija

Za prekomjernu ekspresiju AdSS-His₆ korištene su bakterijske stanice *E. coli* soja BL21-CodonPlus(DE3)RIL. Konstrukt *pET-21b(+)-HpPurA-His₆* je elektrotransformacijskom metodom unesen u stanice. Sutradan, s krute LB/amp ploče odabrana je jedna kolonija. Kolonija je sterilnim nastavkom naciepljena u 50 mL LB/amp tekuće hranjive podloge koja je potom inkubirana na temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$ uz miješanje pri brzini od 250 rpm preko noći – predkultura. Sljedećeg dana LB/amp tekuća hranjiva podloga naciepljena je predkulturom u omjeru 1:50. Naciepljene tikve su inkubirane na temperaturi od $37 \text{ }^\circ\text{C}$ uz miješanje pri brzini od 250 rpm. Rast je praćen spektrofotometrijski, praćenjem OD₆₀₀. Uzgoj je završen kada je vrijednost OD₆₀₀ iznosila između 0,5-0,7. Indukcija je postignuta dodavanjem IPTG-a konačne koncentracije $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Ekspresija je provedena preko noći pri temperaturi od $16 \text{ }^\circ\text{C}$ uz miješanje pri brzini od 160 rpm. Sutradan, kultura stanica je centrifugirana 20 minuta na $5860 \times g$ pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$ i talog stanica je pohranjen na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4.2.2. Liza bakterijskih stanica

Prethodno smrznuti talog je izvagan te resuspendiran u puferu sastava: $c(\text{Na-PO}_4) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 8,0 u omjeru 1:20. Razbijanje stanica je postignuto pomoću homogenizatora, uređaj *Avestin Emulsiflex C3*. Homogenizacija je provedena na hladnom pri pulsirajućem tlaku od 1500 Bar. Uzorak je potom centrifugiran pri $15800 \times g$ u trajanju od 20 minuta. Nakon centrifugiranja sakupljen je supernatant, potom filtriran koristeći filter promjera pora od $0,45 \mu\text{m}$.

3.4.2.3. Pročišćavanje proteina kromatografskim tehnikama

Filtrirani supernatant je inkubiran na ledu s 3 mL Ni-NTA smole, koja je prethodno ekvilibrirana u puferu sastava: $c(\text{Na-PO}_4) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{imidazol}) = 10 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 8,0. Nakon 30 minuta inkubirana smjesa je prebačena u plastičnu kolonu, kako bi se nadalje mogla koristiti gravitacijska metoda protoka (eng. *Gravity flow*). Nakon što je nanesena cijela inkubacijska smjesa, kolona je isprana s 10 mL pufera sastava: $c(\text{Na-PO}_4) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{imidazol}) = 20 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 8,0 kako bi se uklonili nespecifično vezani proteini. Elucija je postignuta izokratnim ispiranjem kolone s 10 mL pufera sastava: $c(\text{Na-PO}_4) = 50 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{imidazol}) = 300 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 8,0. Volumen frakcije je iznosio jedan mililitar. Odabrane frakcije su spojene i koncentrirane u Amicon® Ultra filters koncentradorima s isključenjem od 30 kDa (eng. *Cutoff*) do volumena koji je bio definiran idućim korakom pročišćavanja, gel filtracijska kromatografija.

Gel filtracija je provedena koristeći sustav FPLC te kolonu Sephacryl S-200HR volumena 120 mL i dimenzija 16/60. Kolona je ekvilibrirana u puferu sastava: $c(\text{HEPES}) = 20 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{NaCl}) = 150 \text{ mmol L}^{-1}$, pH-vrijednost 7,0. Protok je iznosio $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, dok je volumen uzorka iznosio 3,5 mL, a volumen frakcije iznosio dva mililitra. Neposredno nakon kromatografije enzim je koncentriran u Amicon® Ultra filters koncentradorima s isključenjem od 30 kDa te pohranjen na temperaturu od $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5. Biokemijske i biofizičke metode za karakterizaciju pročišćene AdSS

3.5.1. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina je određena koristeći dvije spektroskopske metode: određivanje koncentracije proteina po Bradfordu te određivanje koncentracije proteina temeljem teorijskog izračuna ekstinkcijskog koeficijenta.

Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradfordu⁶² temelji se na mjerenju apsorpcije zračenja pri valnoj duljini od 595 nm kompleksa proteina i boje Coomassie Brilliant Blue G-250. Reakcijska smjesa se sastoji od 0,1 mL proteinskog uzorka i 1 mL reagensa sastava: Coomassie Brilliant Blue G-250 ($\gamma = 0,1 \text{ g L}^{-1}$), fosfatna kiselina ($\varphi = 0,085$), etanol ($\varphi = 0,047$). Reakcijska smjesa je promiješana koristeći vrtložnu miješalicu te inkubirana 45 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon provedene inkubacije izmjerena je apsorpcija zračenja uzorka i slijepe probe spektrofotometrijski te je vrijednost apsorbanacije uzorka korigirana za vrijednost slijepe probe. Koristeći podatke dobivene mjerenjem i koeficijent nagiba krivulje umjeravanja (dobivena mjerenjem $A_{595\text{nm}}$ poznatih koncentracija albumina iz goveđeg seruma) možemo izračunati koncentraciju proteina u navedenom uzorku.

Koncentracija pročišćenog proteina mjerena je metodom teorijski izračunatog ekstinkcijskog koeficijenta zbog jednostavnosti i brzine izvedbe. Pri korištenju metode za određivanje koncentracije proteina temeljem teorijskog ekstinkcijskog koeficijenta, vrijednost navedenog je izračunata korištenjem primarnog slijeda aminokiselina uz pomoć alata ProtParam⁶³ te ista iznosi $38850 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$. Mjerena je apsorpcija zračenja pri valnoj duljini od 280 nm proteinskom uzorku volumena 1 do 2 μL . Netom prije mjerenja proteinskog uzorka, izmjerena je apsorbanacija slijepe probe (pufer bez proteina), koja je kasnije oduzeta od ukupne apsorbanacije proteinskog uzorka. Koristeći podatke dobivene mjerenjem i teorijski izračunat ekstinkcijski koeficijent možemo izračunati koncentraciju proteina u navedenom uzorku prema izrazu 3.1.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3.1)$$

gdje A predstavlja apsorbanaciju, ε predstavlja molarni ekstinkcijski koeficijent, c predstavlja molarnu koncentraciju, dok l predstavlja duljinu puta zračenja .

3.5.2. Elektroforetske metode

Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu, u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE)⁶⁴ korištena je za analizu čistoće proteinskih uzoraka tijekom pročišćavanja.

Horizontalna PAGE metoda je provedena na uređaju PhastSystem (*Cytiva Life Sciences*) prateći upute proizvođača (PhastSystem Technique File No. 111). Za samu izvedbu korišteni su gotovi 12,5% w/v SDS gelovi (PhastGel Homogeneous – 12.5), SDS pufer tamponi (PhastGel Buffer Strips - SDS), te proteinski markeri niske molekulske mase (LMW-SDS Marker Kit, 14,4 – 93,0 kDa). Prije postavljanja uzoraka na gel, isti su pomiješani s puferom sastava: $c(\text{Tris-HCl}) = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ pH-vrijednost 8,0, $c(\text{EDTA}) = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, 2,5% w/v SDS, 5% v/v β -merkaptotanol, bromfenol modriilo ($\gamma = 0,2 \text{ g L}^{-1}$) u omjeru 1:1 (v/v) te inkubirani pet minuta na 95°C. Elektroforeza je provedena pri temperaturi od 15 °C, 30 minuta do 70 AVh. Gel je obojan otopinom sastava: Coomassie Brilliant Blue R-250 ($\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$), octena kiselina ($\varphi = 0,10$), etanol ($\varphi = 0,30$) tako što je inkubiran u istoj 15 minuta uz lagano njihanje na temperaturi od 50°C. Višak boje je uklonjen inkubirajući gel u otopini sastava: octena kiselina ($\varphi = 0,10$), etanol ($\varphi = 0,30$) preko noći uz lagano njihanje.

Vertikalna PAGE metoda je provedena na uređaju Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio Rad) prateći upute proizvođača. Za izvedbu su pripremljeni 12,5% w/v SDS gelovi. Gel se sastojao od dvije komponente; sabijajuća komponenta gela (eng. *stacking gel*) $\sim \frac{1}{4}$ gela te razdvajajuća komponenta gela (eng. *resolving gel*) $\sim \frac{3}{4}$ gela. Za pripremu 12,5% razdvajajuće komponente pomiješano je: 2,08 mL otopine akrilamid/bisakrilamida u omjeru 29:1 ($\varphi = 0,30$), 1,20 mL 1,5 mol L⁻¹ Tris-HCl pH-vrijednost 8,8, 50 μL SDS ($w/v = 0,1$), 30 μL APS ($w/v = 0,1$), 3 μL TEMED-a, 1,65 mL mili Q vode. Nakon što se svi sastojci pomiješaju, a posljednji se doda TEMED otopina je izlivena između dvije staklene pločice te nadslojena destiliranom vodom. Nakon 45-60 minuta razdvajajuća komponenta je polimerizirala u gel, uklonjen je nadsloj vode. Pripremljena je sabijajuća komponenta miješanjem: 0,4 mL otopine akrilamid/bisakrilamida u omjeru 29:1 ($\varphi = 0,30$), 0,75 mL 0,5 mol L⁻¹ Tris-HCl pH-vrijednost 6,8, 30 μL SDS ($w/v = 0,1$), 20 μL APS ($w/v = 0,1$), 2 μL TEMED-a, 1,8 mL mili-Q vode. Sabijajuća komponenta je nadslojena na razdvajajuću već prethodno polimeriziranu komponentu. U izlivenu sabijajuću komponentu umetnut je plastični češalj kako bi se osiguralo oblikovanje jažica. Prije nanošenja na gel uzorci su pomiješani s puferom sastava: 125 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH-vrijednost 6,8, 4% SDS, 20% glicerola, 2% β -merkaptotanol, bromfenol modriilo ($\gamma = 0,2 \text{ g L}^{-1}$) u omjeru 1:1 (v/v) te inkubirani pet minuta na 95°C.

Elektroforeza je provedena pri konstantnom naponu od 180 V u puferu sastava: 25 mmol L⁻¹ Tris, 192 mmol L⁻¹ glicin, 0,1% SDS. Gel je obojan otopinom sastava: Coomassie Brilliant Blue R-250 ($\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$), octena kiselina ($\varphi = 0,10$), etanola ($\varphi = 0,30$) inkubacijom od 15 minuta uz lagano njihanje na temperaturi od 50°C. Višak boje je uklonjen kuhajući gel u kipućoj destiliranoj vodi cca. 15 minuta.

3.5.3. Određivanje aktivnosti AdSS-a standardnim testom

Aktivnost (U) AdSS-a je količina proizvedenog adenilosukcinata (u μmol) u jednoj minuti pri 25 °C. Specifična aktivnost ($U \text{ mg}^{-1}$) je normirana vrijednost aktivnosti (U) obzirom na masu enzima u mg. Za mjerenje aktivnosti korištena je spektrofotometrijska metoda. Metoda se temelji na mjerenju količine nastalog produkta pri valnoj duljini od 280 nm koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent adenilosukcinata⁵² od $1,17 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. U tablici 5 je prikazan sastav otopine za standardni test. Mjerena je apsorbancija u vremenskom intervalu od tri minute s frekvencijom mjerenja od svakih deset sekundi. Za provođenje testa korištena je kvarna kiveta. Volumen reakcijske smjese iznosi jedan mililitar. Uz gore opisano mjerenje kontrola je mjerena tako što je praćena promjena apsorbancije reakcijske smjese bez dodatka enzima.

Tablica 5. Sastav reakcijske otopine za provedbu standardnog testa

Komponenta otopine	Konačna koncentracija / mmol L ⁻¹
Magnezijev klorid	1
Inozin-monofosfat (IMP)	0,15
Gvanozin-trifosfat (GTP)	0,06
L-aspartat	5
HEPES pufer pH-vrijednosti 7,7	20

3.5.4. Određivanje stabilnosti i optimuma djelovanja enzima prema pH-vrijednosti i temperaturi

Za izvođenje testova stabilnosti i optimuma rada prema nekom svojstvu korišten je standardni test aktivnosti opisan u poglavlju 3.5.3. Optimum djelovanja prema temperaturi je određen tako što je mjerena aktivnost enzima u standardnoj reakcijskoj smjesi pri različitim vrijednostima temperature u rasponu od 25 do 70 °C. Temperaturna stabilnost ove sintetaze je mjerena tako što je enzim ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) u puferu sastava: 20 mmol L⁻¹ HEPES pH-

vrijednosti 7,7 inkubiran pri različitim temperaturama u rasponu od 25 do 50 °C u trajanju od jedan sat. Nakon inkubacije mjerena je aktivnost pojedine inkubacijske smjese, pri sobnoj temperaturi.

Prilikom izvođenja testova stabilnosti i optimuma djelovanja prema *pH* korišten je pufer sastava: $c(\text{borna kiselina}) = 40 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{fosforna kiselina}) = 40 \text{ mmol L}^{-1}$, $c(\text{octena kiselina}) = 40 \text{ mmol L}^{-1}$, dodavanjem NaOH ($c = 1 \text{ mol L}^{-1}$) je dobivena željena *pH*-vrijednost pufera (Britton-Robinson univerzalni pufer, BR pufer).⁶⁵ Za određivanje optimuma djelovanja prema *pH* mjerena je aktivnost enzima pri različitim *pH*-vrijednostima u rasponu od 5,0 do 9,0 (standardni HEPES pufer reakcijske smjese zamijenjen je BR puferom), dok je za mjerenje stabilnosti prema *pH*-vrijednosti enzim ($\gamma = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) inkubiran u BR puferu pri raznim *pH*-vrijednostima u rasponu od 5,0 do 9,5 u trajanju od sat vremena. Nakon inkubacije mjerena je aktivnost pojedine inkubacijske smjese, u standardnoj reakcijskoj smjesi pri sobnoj temperaturi.

3.5.5. Određivanje kinetičkih parametara te inhibicija poznatim inhibitorima

Kinetički parametri V_{\max} i K_m su određeni mjerenjem početnih brzina sinteze adenilosukcinata testom opisanim u poglavlju 3.5.3. Određivanje kinetičkih parametara provedeno je tako da su uzete koncentracije supstrata ispod i iznad očekivane K_m vrijednosti. Sva mjerenja su rađena u triplikatima. Kinetički parametri V_{\max} i K_m su određeni posebno prema svakom supstratu. Dok su mijenjane koncentracije jednog od supstrata, koncentracije ostalih supstrata su bile nepromijenjene i imale su vrijednost koncentracija standardnog testa. Koncentracijski raspon za IMP je bio od 7,5 do 225 $\mu\text{mol L}^{-1}$, za GTP je bio od 3 do 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a za aspartat je bio od 0,03 do 10 mmol L^{-1} .

Za testove inhibicije enzima korišteni su poznati inhibitor hadacidin, produkt adenilosukcinat i produkt GDP. Prilikom izvođenja testova inhibicije hadacidinom korištene su sljedeće tri koncentracije inhibitora: 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ i 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Mjerenje inhibicije hadacidinom je rađeno na način da je praćena kinetika djelovanja enzima prema aspartatu za svaku koncentraciju inhibitora. Prilikom izvođenja testova inhibicije produktom korištene su sljedeće tri koncentracije adenilosukcinata: 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ i 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, te koncentracije GDP-a: 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ i 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Mjerenje inhibicije produktom je rađeno na način da je praćena kinetika djelovanja enzima prema IMP-u za svaku koncentraciju adenilosukcinata, odnosno prema GTP-u za svaku koncentraciju GDP-a. Kao što je to napravljeno kod mjerenja kinetičkih parametara, testovi inhibicije su također

napravljeni u triplikatima. Kinetički parametri i parametri inhibicije su dobiveni nelinearnom regresijom podataka u programu GraphPad Prism 7.03.⁶⁶

3.5.6. Testiranje inhibicije novo sintetiziranim spojevima

Dobivena je serija spojeva (dr. sc. Biserka Žinić, IRB) (Dodatak: D-2.), derivata nukleobaza i riboze koji su potencijalni inhibitori AdSS. Zbog teže topivosti u vodi, dobiveni spojevi su otopljeni u DMSO-u pri koncentraciji od 10 mmol L⁻¹. Mjerena je aktivnost enzima standardnim testom uz dodatak pojedinog inhibitora konačne koncentracije 100 μmol L⁻¹. Proveden je i kontrolni test utjecaja DMSO-a na aktivnost enzima tako što je reakcijskoj smjesi (980 - 990 μL) dodano 10-20 μL DMSO-a. Enzimska aktivnost je mjerena kao što je opisano u poglavlju 3.5.3.

3.5.7. Određivanje termodinamičkih parametara vezanja

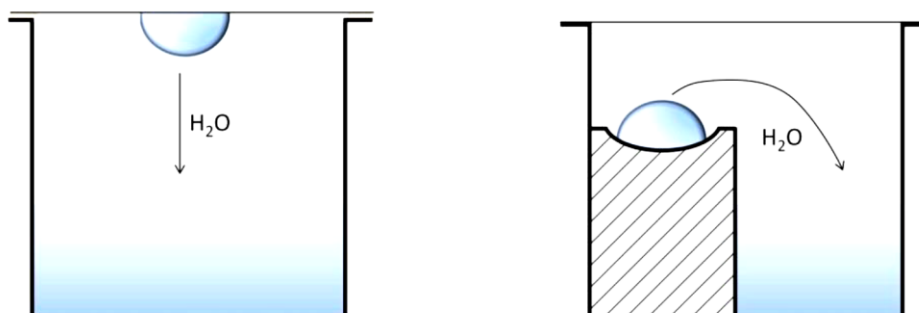
Termodinamički parametri su određeni u Laboratoriju za Strukturnu biologiju Sveučilišta u Grazu koristeći tehniku izotermalne titracijske kalorimetrije (ITC) na uređaju Nano ITC. Kako bi se mogli utvrditi termodinamički parametri vezanja, enzim je titriran ligandima. Enzim u puferu sastava: 20 mmol L⁻¹ HEPES, 50 mmol L⁻¹ NaCl, 1 mmol L⁻¹ MgCl₂, pH-vrijednost 7,0 u koncentracijskom području od 2 do 4 mg mL⁻¹ korišten je za izvođenje pokusa. Isti puferški sastav je korišten za pripremu otopina liganada, GTP-a, IMP-a i aspartata, te inhibitora hadacidina. Temperatura pri kojoj je titriran enzim je iznosila 25 °C, a brzina miješanja je iznosila 250 rpm. Titracije su rađene s proteinom AdSS-His₆. Za praćenje eksperimenata i obradu podataka korišteni su programski paketi implementirani s uređajem, Nano ITC Run Software v3.7.0 te NanoAnalyze v3.11.0.

3.6. Rendgenska difrakcijska analiza

3.6.1. Kristalizacija metodom difuzije para

U cilju određivanja kristalne strukture proteinskih makromolekula metodom difrakcije rendgenskog zračenja na monokristalu, prvo je potrebno kristalizirati protein tj. prirediti monokristal odgovarajuće veličine i kvalitete. Metoda difuzije para je najčešće korištena metoda u proteinskoj kristalografiji (slika 4), pri čemu su najčešće korištene metode sjedeće ili viseće kapi. Metoda se zasniva na difuziji para između kapljice (protein i kristalizacijska otopina najčešće u omjeru 1:1) i kristalizacijske otopine u rezervoaru zbog razlike u tlaku pare

nad otopinom. Difuzijom voda napušta kapljicu te se volumen kapljice smanjuje, a koncentracija proteina i precipitanta povećava, što može rezultirati stvaranjem kristalizacijskih klica tj. centara kristalizacije i u konačnici dobivanjem monokristala.



Slika 4. Shematski prikaz kristalizacije proteina metodom difuzije para. Lijevo je prikazana izvedba tehnike viseće kapi, a desno je prikazana izvedba tehnike sjedeće kapi. (Preuzeto iz doktorske disertacije Igora Sablića⁶⁷)

Kako bi se dobio uvid u ponašanje proteina prilikom kristalizacije i dobili uvjeti kristalizacije za dobivanje pogodnog monokristala, korišteni su komercijalno dostupni kristalizacijski uvjeti. Komercijalno dostupni kristalizacijski uvjeti su pakirani unutar kristalizacijskog kompleta (eng. *crystallization screen*) (najčešće se sastoji od 96 kristalizacijskih uvjeta). Kristalizacijski kompleti koji su korišteni za kristalizaciju AdSS-a su: Morpheus I, Morpheus II, Morpheus III, Midas, JCSG+ i SG1Eco.

Kristalizacija je provedena u Laboratoriju za Strukturnu biologiju Sveučilišta u Grazu koristeći robot za kristalizaciju Oryx8. Kristalizacija je postavljena pri sobnoj temperaturi. Kristaliziralo se metodom difuzije para, tehnikom sjedeće kapi. Za kristalizaciju su se koristile pločice *Swissci* koje su odmah nakon postavljanja kristalizacije zatvorene samoljepljivom trakom te pospremljene na 16°C. Za pretraživanje početnih kristalizacijskih uvjeta korišten je konstrukt AdSS-His₆. Korištene su tri koncentracije: 10, 15 i 25 mg mL⁻¹. Puffer u kojem je bio proteinski konstrukt bio je sastava: 20 mmol L⁻¹ HEPES, 150 mmol L⁻¹ NaCl, 0,05% β-merkaptetanola, pH-vrijednost 7,0. Proteinski konstrukt je prije kristalizacije pomiješan sa smjesom supstrata (GTP, IMP, MgCl₂) i inhibitora enzima (HDA), njihove konačne koncentracije su iznosile: 8,3 mmol L⁻¹ GTP, 25 mmol L⁻¹ IMP, 16,5 mmol L⁻¹ HDA, 166 mmol L⁻¹ MgCl₂. Volumen kristalizacijske otopine u rezervoaru je iznosio 35 μL,

a volumen kapi 1 μL (0,5 μL otopine proteina i 0,5 μL otopine za kristalizaciju). Rast kristala je praćen pomoću svjetlosnog mikroskopa, jednom dnevno.

3.6.2. Difrakcija rendgenskog zračenja na monokristalu

Proteinski kristali su vrlo osjetljivi na promjene uvjeta okoline, stoga je s istima potrebna brzina i pažljivost pri radu. Proteinski kristali sadrže veliki udio vode, da bi se izbjegla destrukcija kristala, potrebno je prije samog snimanja kristale smrznuti. Kristalima se dodaje krioprotektant (glicerol) te se smrzavaju u tekućem dušiku pri temperaturi od 100 K. Tako smrznuti kristali se čuvaju u posudama ispunjenima tekućim dušikom, a prebacuju se u struju pare tekućeg dušika netom prije izvođenja difrakcijskog eksperimenta. Difrakcijski podatci su sakupljani na sinkrotronu DESY/PETRA III (Hamburg, Njemačka) na liniji P11. Na liniji P11 valna duljina zračenja je iznosila 1.0332 Å te je snimljeno 720 difrakcijskih slika pri kutu oscilacije od 0,5° za konstrukt AdSS-His₆. Sakupljen je čitav skup podataka na pojedinom monokristalu, a za rješavanje je korišten skup sakupljen na kristalu najbolje kvalitete.

3.6.3. Procesiranje podataka i rješavanje kristalne strukture

Podatci dobiveni rendgenskom difrakcijom na monokristalu korišteni su za rješavanje strukture. Struktura je riješena metodom molekulske zamjene (eng. *Molecular Replacement, MR*). MR je računalna metoda kojom se računaju faze preko faza već poznate strukture. Za efikasno rješavanje strukture ovom metodom, proteini moraju biti slični primarnim slijedom više od 25%. Za procesiranje podataka tj. difrakcijskih slika korišten je program XDS⁶⁸, što je uključivalo indeksiranje i integriranje refleksa. Procesirani podatci su nadalje korišteni za rješavanje strukture i utočnjavanje modela. Skup od 5 % nasumično odabranih refleksa ne koristi se za utočnjavanje, već za izračunavanje vrijednosti R_{free} . Za rješavanje strukture metodom MR korišteni su programi MOLREP⁶⁹ te Phaser-MR⁷⁰. Nakon što je riješena struktura, model je izgrađen pomoću programa BUCCANEER⁷¹ i pomoću programa ARP/wARP^{72,73}. Dobiveni model je utočnjen koristeći programe REFMAC⁷⁴ i PHENIX⁷⁵. Za dodavanje molekula vode, liganada i iona korišten je program COOT⁷⁶, dok je za provjeru kvalitete utočnjavanja korišten program MolProbity⁷⁷. U zadnjim iteracijama utočnjavanja korištena je TLS parametrizacija, kako bi se dobilo što finije utočnjavanje. Za vizualizaciju su korišteni programi PyMol⁷⁸ i COOT⁷⁶.

3.7. Računalne metode

3.7.1. Simulacije slobodnog enzima AdSS iz bakterije *H. pylori*

Kristalografski određena struktura kompleksa AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* s ligandima korištena je kao polazna struktura za MD simulacije. Kristalografska struktura je obrađena tako da su svi ligandi uključujući i kristalografske vode uklonjeni iz strukture. Korištenjem H++ servera (<http://biophysics.cs.vt.edu/hppdetails.php>) struktura je protonirana na način da je ostvarena energijski optimalna mreža vodikovih veza. Enzim je parametriziran u amber polju sila ff14SB⁷⁹ koristeći program LEAP⁸⁰ koji je dio programskog paketa AMBER16⁸⁰. Enzim je smješten u krnji oktaedar ispunjen molekulama vode TIP3P modela. Dodani su natrijevi ioni⁸¹ kako bi se osigurala elektroneutralnost sustava. Primijenjeni su periodični rubni uvjeti (PBC). Optimizacija geometrije tj. minimizacija energije sustava odvijala se u pet ciklusa pri čemu se svaki ciklus sastojao od 5000 koraka. Prvih 1000 koraka je korišten algoritam najstrmijeg spusta, dok je preostalih 4000 koraka korišten algoritam konjugiranih gradijenata. Promjena položaja određenih atoma u sustavu je bila ograničena, primjenom harmoničkog potencijala s konstantom sile u iznosu od 100 kJ mol⁻¹ Å⁻¹. U prvom koraku gibanje svih atoma enzima bilo je ograničeno, u drugom koraku omogućeno je gibanje atoma vodika, a trećem koraku ograničenje gibanja je bilo na okosnicu enzima. Četvrti korak optimizacije ima ista ograničenja kao i prethodni uz konstantu sile u iznosu od 50 kJ mol⁻¹ Å⁻¹, dok u petom koraku optimizacije nisu prisutna nikakva ograničenja na gibanje enzima. Tako optimizirani sustav je tijekom 300 ps zagrijan s 0 na 310 K; temperatura u prvih 250 ps rasla je linearno s 0 na 310 K, dok je posljednjih 50 ps bila konstantna i iznosila 310 K. Sustav je grijan uz korištenje NVT ansambla. Slijedila je ekvilibracija i simulacije molekularne dinamike uz korištenje NPT ansambla u trajanju od 200 ns uz integracijski korak od 1 fs. Za regulaciju temperature korišten je Langevinov termostat,^{82,83} dok je za regulaciju tlaka korišten Berendsenov barostat⁸⁴.

3.7.2. Simulacije enzima AdSS iz bakterije *H. pylori* u kompleksu s ligandima

Kristalografski određena struktura kompleksa AdSS-a s ligandima iz bakterije *H. pylori* korištena je kao polazna struktura za MD simulacije. Ligandi koji su korišteni za simulaciju su isti oni pronađeni u riješenim kristalnim strukturama. Kod simulacije divljeg tipa korišteni su sljedeći ligandi: 6'-fosforil-inozin-monofosfat (IMO), gvanozin-difosfat (GDP), hadacidin (HDA), inozin-monofosfat (IMP,) gvanozin-trifosfat (GTP) te magnezijev ion. Svi korišteni

ligandi su izgrađeni koristeći program Maestro⁸⁵ te parametrizirani u GAFF^{86,87} polju sila koristeći program Antechamber^{86,87} i parmchk2 iz programskog paketa AMBER16. Enzim je parametriziran na isti način kao što je to opisano u poglavlju 3.7.1. Kompleks enzima s ligandima smješten je u simulacijsku kutiju, na način opisan u prethodnom poglavlju. Elektroneutralnost sustava za simulaciju kompleksa divljeg tipa s ligandima postignuta je dodatkom četiri natrijeva iona. Postupak optimizacije geometrije, ekvibracije sustava te parametri simulacije su isti kao što je to opisano u poglavlju 3.7.1.

3.7.3. Simulacije enzima AdSS iz bakterije *H. pylori* u kompleksu s GTP-om i IMP-om

Kristalografski određena struktura kompleksa AdSS-a iz bakterije *H. pylori* s ligandima korištena je kao model za pripremu polazne strukture kompleksa enzima i supstrata za MD simulaciju. Supstrati koji su korišteni za ovu simulaciju su: IMP, GTP te magnezijev ion. Supstrati su izgrađeni i parametrizirani kao što je to opisano u poglavlju 3.7.2. Enzim je parametriziran te je kompleks enzima s ligandima smješten u simulacijsku kutiju, na način opisan u poglavlju 3.7.1. Elektroneutralnost sustava za simulaciju kompleksa divljeg tipa sa supstratima postignuta je dodatkom četiri natrijeva iona. Postupak optimizacije geometrije, te ekvibracija sustava i parametri simulacije su isti kao što je to opisano u poglavlju 3.7.1.

3.7.4. Analiza geometrije i vodikovih veza

Svi geometrijski parametri kao i vodikove veze su analizirani koristeći modul cpptraj⁸⁸ iz programskog paketa AMBER16⁸⁰. Za dodatnu analizu i vizualizaciju vodikovih veza korišteni su programi Pymol⁷⁸ i VMD⁸⁹⁻⁹⁶. Geometrijski parametri koji su promatrani pri analizi trajektorija MD-a su: korijen srednjeg kvadrata odstupanja (eng. *root mean square deviation*, RMSD) definiran izrazom 3.1, korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (eng. *root mean square fluctuation*, RMSF) definiran izrazom 3.2 i radijus giracije, R_g definiran izrazom 3.3.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (r_i, A - r_i, B)}{N}} \quad (3.1)$$

$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum_{t,j}^T (x_i(t_j) - \bar{x}_i)}{T}} \quad (3.2)$$

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_i (r_i - r_{cm})^2}{N}} \quad (3.3)$$

Također, geometrijski parametar je i udaljenost pojedinih aminokiselina, gdje se gleda udaljenost između C_α atoma. Granične vrijednosti pri određivanju vodikovih veza su kut u iznosu od 135° te udaljenost u iznosu od $3,0 \text{ \AA}$.

3.7.5. Računanje slobodne energije MM-GBSA metodom

Za računanje energije vezanja liganda u kompleksu protein-ligand korištena je MM-GBSA metoda preko MMPBSA.py implementacije⁹⁷ za programski paket AMBER 16.⁸⁰ Energije su računane za skupove od 40 struktura generiranih u intervalima od 5 ns tijekom čitave produkcijske faze MD simulacija. Za izračun GB⁹⁸ (eng. *Generalized Born*) energija solvatacije korištena je ionsa jakost od $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$. Kod izračuna energija vezanja liganda rabljen je pristup jedne trajektorije (eng. *Single trajectory approach*). Entropijski doprinos je zanemaren u računu procjene slobodne energije.

3.7.6. Molekulsko uklapanje (eng. docking)

Molekulsko uklapanje (eng. *docking*) je računalna metoda koja se koristi za pronalazak načina vezanja liganda na receptora. Na proces vezanja malih molekula za protein i interakcije među njima utječu različiti entropijski i entalpijski faktori, stoga proces samog vezanja nije jednostavan.

Provedeno je molekulsko uklapanje (eng. *docking*) za predložene spojeve (Dodatak: D-1) koji su analozi hidantocidina, kompetitivnog inhibitora za AdSS prema IMP-u. Molekulsko uklapanje je provedeno koristeći program AutoDock Vina.⁹⁹ Za receptor korištena je riješena kristalna struktura AdSS iz bakterije *H. pylori*.

Trodimenzijske strukture liganda pripravljene su korištenjem programskog paketa Maestro. Središte trodimenzionalne rešetke je veličine $50 \times 50 \times 52 \text{ \AA}^3$ i smješteno je u aktivno mjesto enzima (IMP vezno mjesto), dok je razmak između čvorova rešetki iznosio $0,564 \text{ \AA}$. Dobiveni kompleksi su poredani na temelju najboljih rezultata i usporedbe s načinom vezanja prirodnog supstrata IMP-a (kristalna struktura).

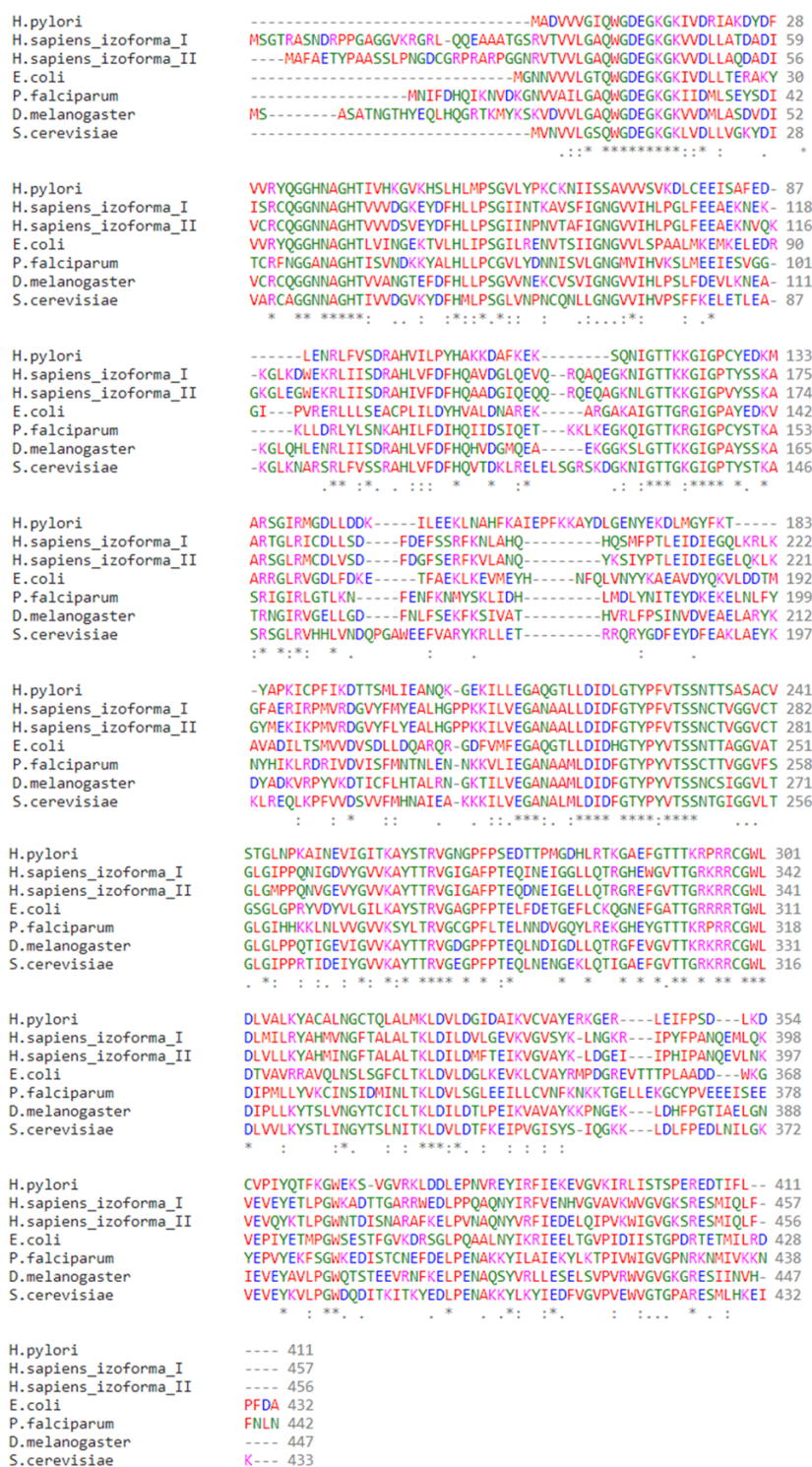
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Karakterizacija AdSS iz bakterije *H. pylori*

4.1.1. Bioinformatička analiza AdSS iz bakterije *H. pylori* i njena usporedba s AdSS iz drugih organizama.

Pretraživanjem baze podataka Swiss-Prot/TrEMBL (ožujak 2021.) prema ključnim riječima (adenylosuccinate synthetase) i (*helicobacter pylori*) dobiveno je šest unosa u bazi Swiss-Prot čije su sekvence i podatci uneseni na temelju sekvenci genoma¹⁰⁰ ove bakterije. Dodatnih 693 unosa je u bazi TrEMBL. Pristupni kod za AdSS iz bakterije *H. pylori* (soj ATCC 700392/26695) u UniProtKB je P56137. Količina podataka dostupna o ovom enzimu varira od organizma do organizma, no svakako treba istaknuti da je ova sintetaza najviše opisana kod bakterije *E. coli*.

Kako bi se dobio uvid u očuvanost, odnosno konzerviranost slijeda aminokiselina, primarne sekvence ove sintetaze su uspoređene između organizama. Za usporedbu je korišten programski alat Clustal ω . Organizmi čija je AdSS uspoređena s AdSS iz bakterije *H. pylori* su: *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *P. falciparum*, *Drosophila melanogaster*, te obje forme iz *Homo sapiens*. Na slici 5 prikazano je poravnanje više sekvenci (eng. *Multiple Sequence Alignment*). Na temelju poravnanja sekvenci AdSS-a iz više organizama uočena je visoka razina očuvanosti primarnog slijeda aminokiselina. Regije visoke očuvanosti obzirom na bakteriju *H. pylori* su u području aminokiselina: 9-20, 37-42, 118-127, 209-232, 262-265 te 287-297 (brojevi aminokiselina prema sekvenci AdSS iz bakterije *H. pylori*). Sve ove regije opisuju aktivno mjesto ovog enzima^{101,102} i za očekivati je tako visoku razinu očuvanosti aminokiselinskih sljedova kroz evoluciju.



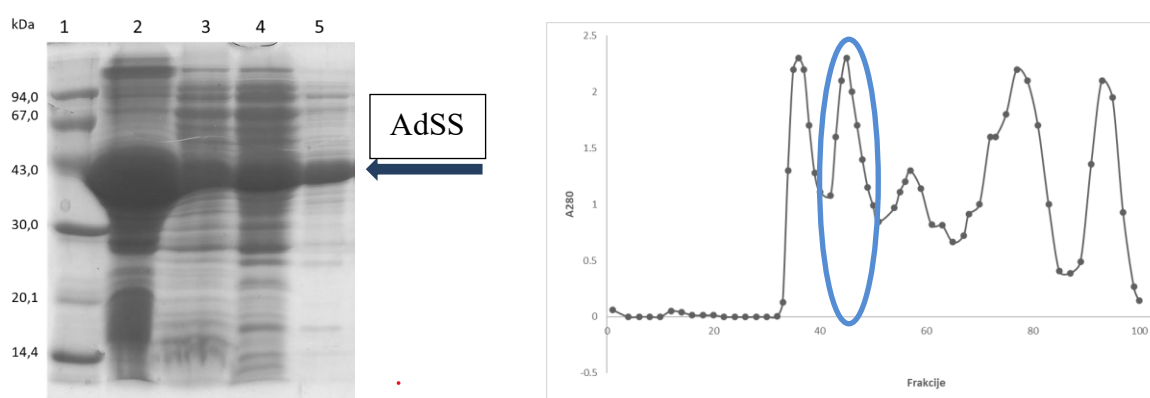
Slika 5. Poravnanje primarnih sekvenci AdSS-a iz različitih organizama, učinjeno programskim alatom Clustal ω . **Crveno** – male i hidrofobne aminokiseline, **plavo** – kisele aminokiseline, **ljubičasto** – bazične aminokiseline, **zeleno** – polarne aminokiseline. Simboli koncensusa: “*” – aminokiseline identične u svim sekvencama, “:” - očuvana zamjena “:” – djelomično očuvana zamjena.

AdSS iz bakterije *H. pylori* se sastoji od 411 aminokiselina. Molekularna masa AdSS iz bakterije *H. pylori* iznosi ~ 45,7 kDa (računato prema sekvenci),¹⁰³ dok teoretski *pI* iznosi 7,53. AdSS iz drugih organizama se po masi se ne razlikuju značajno, no teoretski izračunata *pI* vrijednost AdSS iz bakterije *E. coli* (~ 5,3) se razlikuje od one AdSS-a iz bakterije *H. pylori* (~7,5) za više od dvije *pH* jedinice.

4.1.2. Kloniranje, ekspresija i pročišćavanje divljeg tipa AdSS iz bakterije *H. pylori*

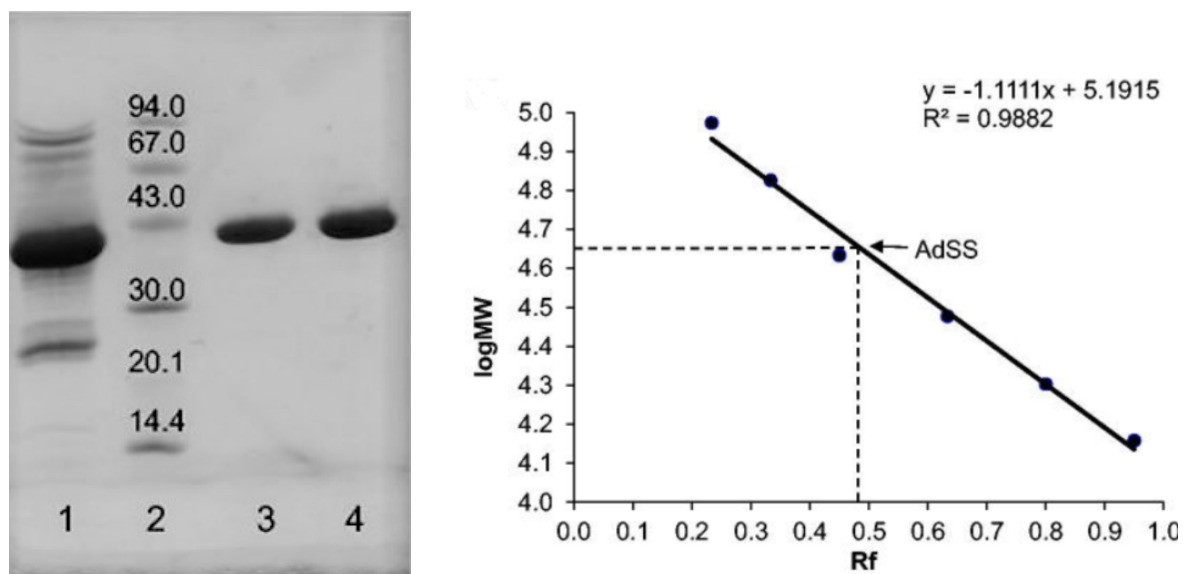
Gen *HpPurA* (1233 parova baza) koji kodira za enzim AdSS iz bakterije *H. pylori* ukloniran je u *pET-21b(+)* vektor unutar višestrukog mjesta za kloniranje (eng. *Multiple Cloning Site*) u okviru čitanja T7 promotora (pripravio: dr. sc. Igor Stuparević; PBF Zagreb). Gen je pripremljen bez dodatnih izmjena.

Tijekom izrade ove disertacije napravljeno je nekoliko uzgoja i pročišćavanja rekombinantne AdSS na način koji slijedi. Enzim je pročišćen u tri koraka pri čemu je korištena kationska kromatografija, gel-filtracija te anionska kromatografija. Nakon lize stanica dobiveni supernatant je prvo pročišćavan kationskom kromatografijom. Nakon kationske kromatografije bilo je potrebno dodatno pročititi uzorak, te je to urađeno koristeći gel-filtraciju kako bi se uklonili proteini veće i manje mase od AdSS (slika 6). Dobiven je relativno čist protein, no za potrebe daljnjih ispitivanja bilo je potrebno dodatno pročititi uzorak. Uzorak nakon gel filtracije (frakcije od 41 do 51) je pročišćen anionskom kromatografijom i tako je dobiven homogeni uzorak AdSS-a (slika 7).



Slika 6. Prikaz tijeka pročišćavanja divljeg tipa AdSS kationskom kromatografijom i gel-filtracijom. Lijevo – SDS elektroforeza; uzorci: 1 - proteini poznatih masa LMW-SDS Marker Kit (*Cytiva Life Sciences*), 2 – talog stanica nakon lize, 3 – supernatant nakon lize, 4 – uzorak

nakon kationske kromatografije, 5 – frakcija 45 nakon gel-filtracije. Desno – kromatogram gel-filtracije, plavi obruč predstavlja frakcije u kojima je prisutan AdSS.



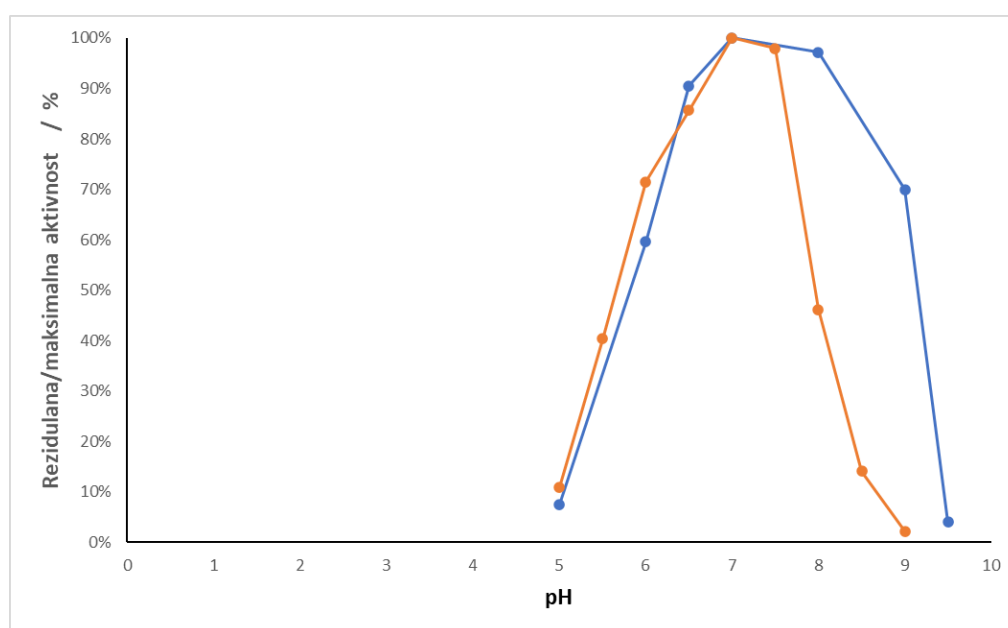
Slika 7. Prikaz tijeka pročišćavanja divljeg tipa AdSS anionskom kromatografijom. Lijevo – SDS elektroforeza; uzorci: 1 - uzorak nakon gel-filtracije, 2 - proteini poznatih masa LMW-SDS Marker Kit (*Cytiva Life Sciences*), 3 i 4 - frakcije nakon anionske kromatografije. Desno – kalibracijska krivulja lijevog gela (izračunata molekulska masa enzima ~44,6 kDa).

Vežanje enzima na anionski izmjenjivač ukazuje na to da je ukupan naboj proteina $\leq 7,5$. Teoretski *pI* AdSS-a iz bakterije *H. pylori* podosta je sličan *pI* vrijednosti AdSS-a iz *P. falciparum* (7,54). Zanimljivo, kod *P. falciparum* također nedostaje *de novo* put biosinteze purina kao i kod bakterije *H. pylori*. To ukazuje na to da se i *H. pylori* i *P. falciparum* oslanjaju na reciklirajući biosintetski put sinteze purina.^{44,104} Pročišćenoj AdSS je izmjerena specifična aktivnost spektrofotometrijski te je iznosila $1,0 \text{ U mg}^{-1}$.

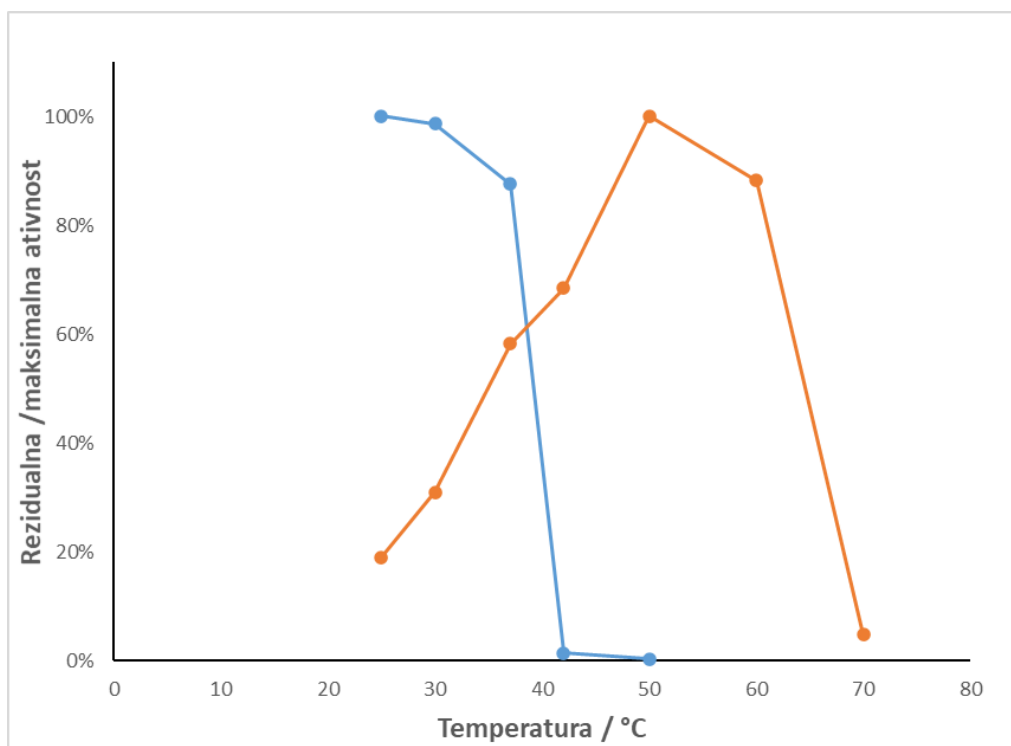
4.1.3. Utjecaj *pH* i temperature na aktivnost i stabilnost AdSS iz bakterije *H. pylori*

Kako bi se dodatno okarakterizirao pročišćeni AdSS rađeni su biokemijski testovi optimuma rada i stabilnosti prema *pH* i temperaturi. Dobiveni rezultati pokazuju da AdSS ima najveću aktivnost u danim uvjetima (poglavlje 3.5.3) pri *pH*-vrijednosti 7,0 (slika 8) i temperaturi od 50 °C (slika 9). Enzim je stabilan (zadržano $\geq 90 \%$ inicijalne aktivnosti) u području *pH*-vrijednosti od 6,5 do 8,5 pri 25 °C i u temperaturnom području od 25 °C do 37 °C pri *pH*-

vrijednosti 7,0. Pregledom dostupne literature pronađeno je malo podataka o stabilnosti i optimumu rada AdSS proteina. Većina AdSS proteina iz raznih organizama ima optimum rada u području pH-vrijednosti od 6,5 do 7,5.⁷ Također, pronađeno je da AdSS iz *P. falciparum* ima optimum rada u području pH-vrijednosti od 6,8 do 7,5.¹⁰⁴ Kako je poznato da temperaturnom optimumu doprinose dva procesa – porast aktivnosti te denaturacija proteina kao posljedica povećanja temperature,¹⁰⁵ visoki temperaturni optimum *H. pylori* AdSS (50°C) uz relativno nisku temperaturnu stabilnost se može objasniti vremenski kratkim (3 min) mjerenjem aktivnosti.



Slika 8. Utjecaj pH-vrijednosti na aktivnost (narančasto) i stabilnost (plavo) AdSS-a iz bakterije *H. pylori*.



Slika 9. Utjecaj temperature na aktivnost (narančasto) i stabilnost (plavo) AdSS-a iz bakterije *H. pylori*.

4.1.4. Kinetika enzimske reakcije AdSS iz bakterije *H. pylori*

Kinetički je enzim okarakteriziran tako što su mu određeni kinetički parametri K_m i V_{max} prema sva tri supstrata: GTP, IMP i Asp (tablica 6). Za svaki supstrat krivulja ovisnosti inicijalne brzine V_0 o koncentraciji supstrata prati Michaelis-Mentenin kinetički model. (Dodatak: D-Slika 2).

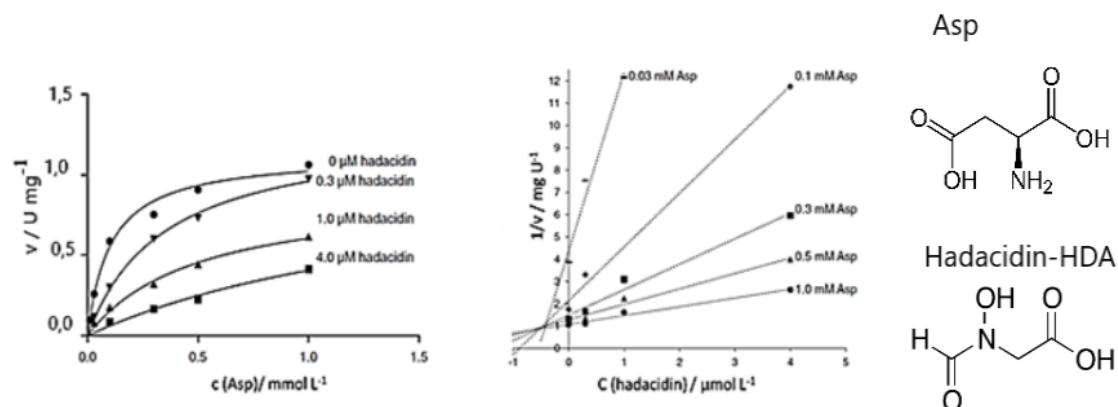
Tablica 6. Kinetički parametri AdSS iz bakterije *H. pylori* dobiveni ne linearnom regresijom Michaelis-Menteninog modela primijenjenog na eksperimentalno dobivene podatke.

Supstrat	Stalna koncentracija supstrata (mM)	K_m (μM)	V_{max} (U mg^{-1})
GTP	IMP – 0,15 Asp – 5,0	$8,7 \pm 0,6$	$1,418 \pm 0,023$
IMP	GTP – 0,06 Asp – 5,0	$40,1 \pm 2,9$	$1,456 \pm 0,036$
Asp	GTP – 0,06 IMP – 0,15	$125,4 \pm 7,7$	$1,103 \pm 0,016$

Usporedivši dobivene kinetičke parametre s literaturno poznatima uočava se sličnost s AdSS-om iz bakterije *E. coli* (GTP: 10-48 μM , IMP: 20-200 μM , Asp: 260-350 μM)⁴⁴ i bazičnom izoformom AdSS-a iz miša (GTP: 12 μM , IMP: 45 μM , Asp: 140 μM). AdSS iz *P. falciparum* (GTP: 18 μM , IMP: 23 μM , Asp: 1800 μM) i kisela izoforma AdSS-a iz miša (GTP: 15 μM , IMP: 12 μM , Asp: 950 μM) imaju značajnije veću K_m vrijednost za aspartat, dok su za preostale supstrate vrijednosti slične.^{7,44,106} Svakako je zanimljivo da je obrtni broj k_{cat} ($k_{cat} = \frac{v_{max}}{E_T}$) izuzetno nizak i iznosi 1 s^{-1} što čini ovaj enzim jednim od najsporijih enzima opisanih u literaturi. Obrtni broj je usporediv s AdSS proteinima iz drugih organizama, pa tako kod bakterije *E. coli* i parazita *P. falciparum* je toliko nizak da je u području brzine rasta bakterije, odnosno reproduktivnosti.¹⁰ S druge strane bazična izoforma kod miša pokazuje 4-5 puta veću vrijednost obrtnog broja za AdSS. Svi ovi podaci ukazuju na to da je AdSS jedan od ključnih enzima biosinteze purina, što je ujedno i limitirajući faktor rasta svih stanica, prokariota i eukariota.⁵

4.1.5. Inhibicija AdSS iz bakterije *H. pylori* hadacidinom

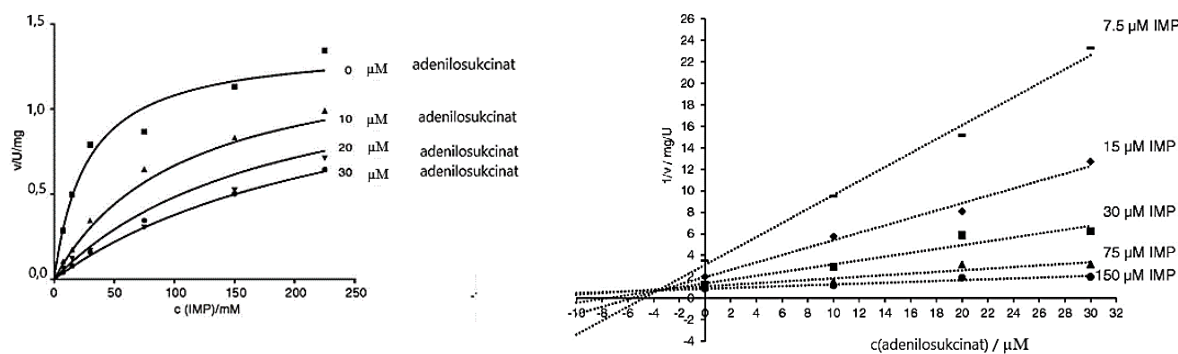
Hadacidin je jedan od produkata fermentacije gljivice *Penicillium frequentans*.¹⁰⁷ Literaturno je poznato da se aktivnost AdSS-a iz bakterije *E. coli* smanjuje prisustvom hadacidina.¹⁰ Prateći kinetiku ove sintetaze iz bakterije *H. pylori* uz prisustvo različitih koncentracija hadacidina u sustavu i na temelju dobivenih rezultata (slika 10 lijevo) utvrđeno je da ne dolazi do promjene u V_{max} obzirom na aspartat, dok K_m vrijednost raste s porastom koncentracije inhibitora. To ukazuje na inhibicijsko djelovanje hadacidina prema AdSS. Nadalje, linearizacija dobivenih podataka (slika 10 desno) potvrđuje da je hadacidin kompetitivni inhibitor prema aspartatu.⁴⁴ Konstanta inhibicije K_i iznosi $0,19 \pm 0,02 \mu\text{mol L}^{-1}$. Usporedivši literaturne podatke o inhibiciji AdSS enzima hadacidinom uočava se da je konstanta inhibicije za hadacidin najniža za AdSS iz bakterije *H. pylori*. Primjerice, K_i (hadacidin) za AdSS iz *Azotobacter vinelandii*¹⁰⁸ iznosi $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, dok za AdSS iz *Methanocaldococcus jannaschii* iznosi $10,5 \mu\text{mol L}^{-1}$.¹⁰⁶ Nadalje, prema pronađenim podacima u literaturi vrijednosti K_i (hadacidin) za AdSS iz bakterije *E. coli*⁵² se kreću od 1 do $4,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, dok za AdSS iz *P. falciparum* ta vrijednost iznosi $5,6 \mu\text{mol L}^{-1}$.¹⁰⁹



Slika 10. Inhibicija AdSS iz bakterije *H. pylori* hadacidinom, pri 25 °C u 20 mmol L⁻¹ HEPES pH-vrijednost 7,7 uz različite koncentracije aspartata. Lijevo – početna brzina v u ovisnosti o koncentraciji supstrata c . Desno – Dixonov prikaz (recipročna vrijednost početne brzine $1/v$ u ovisnosti o koncentraciji inhibitora c).

4.1.6. Inhibicija AdSS iz bakterije *H. pylori* produktom

Adenilosukcinat (S-AMP) je produkt enzimske reakcije na putu biosinteze AMP-a koju katalizira AdSS.⁸ S-AMP inhibira AdSS iz bakterije *H. pylori* pri čemu K_i iznosi $3,5 \pm 0,3$ $\mu\text{mol L}^{-1}$. Inhibicija AdSS-a produktom je potvrđena promatrajući kinetiku enzima uz prisustvo različitih koncentracija S-AMP-a (slika 11), gdje je pokazano da se S-AMP ponaša kao kompetitivni inhibitor prema IMP-u.⁴⁴ K_i (S-AMP) vrijednosti za AdSS iz bakterije *E. coli* ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$)⁵², *A. vinelandii* ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$)¹⁰⁸, *M. jannaschii* ($9,4 \mu\text{mol L}^{-1}$)¹⁰⁶ te *P. falciparum* ($29 \mu\text{mol L}^{-1}$)¹⁰⁹ su slične dobivenoj vrijednosti za AdSS iz bakterije *H. pylori* što ukazuje na to da je S-AMP potentni inhibitor AdSS enzima.



Slika 11. Inhibicija AdSS iz bakterije *H. pylori* adenilosukcinatom, pri 25 °C u 20 mmol L⁻¹ HEPES pH-vrijednost 7,7 uz različite koncentracije IMP-a. Lijevo – početna brzina v u

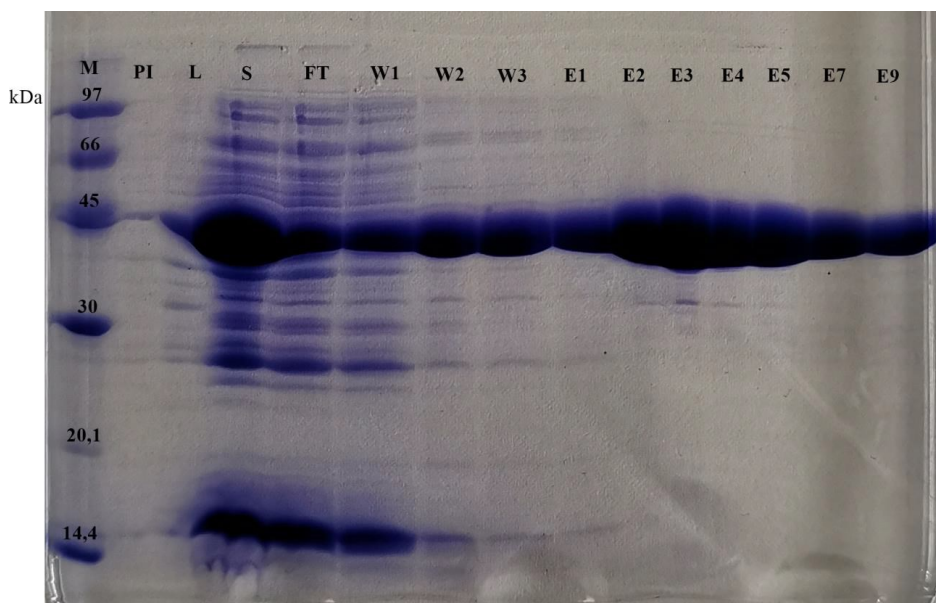
ovisnosti o koncentraciji supstrata c . Desno – Dixonov prikaz (recipročna vrijednost početne brzine $1/v$ u ovisnosti o koncentraciji inhibitora c).

4.2. Karakterizacija AdSS iz bakterije *H. pylori* s histidinskim privjeskom

U okviru cilja ovog doktorata, željelo se odrediti kristalnu strukturu proteina AdSS iz bakterije *H. pylori* metodom difrakcije rendgenskog zračenja na monokristalu, za što je prvi korak kristalizacija proteina. Za potrebe kristalizacijskih eksperimenata bilo je potrebno proizvesti i pročititi veće količine AdSS enzima. Stoga je enzim promijenjen tako da na C-kraju ima privjesak od šest uzastopnih histidina, kako bi pročišćavanje bilo efikasnije te prinos bolji. AdSS iz bakterije *H. pylori* do sada nije pročišćavana na ovaj način, i zbog toga je bilo potrebno usporediti biokemijske karakteristike s nativnim proteinom.

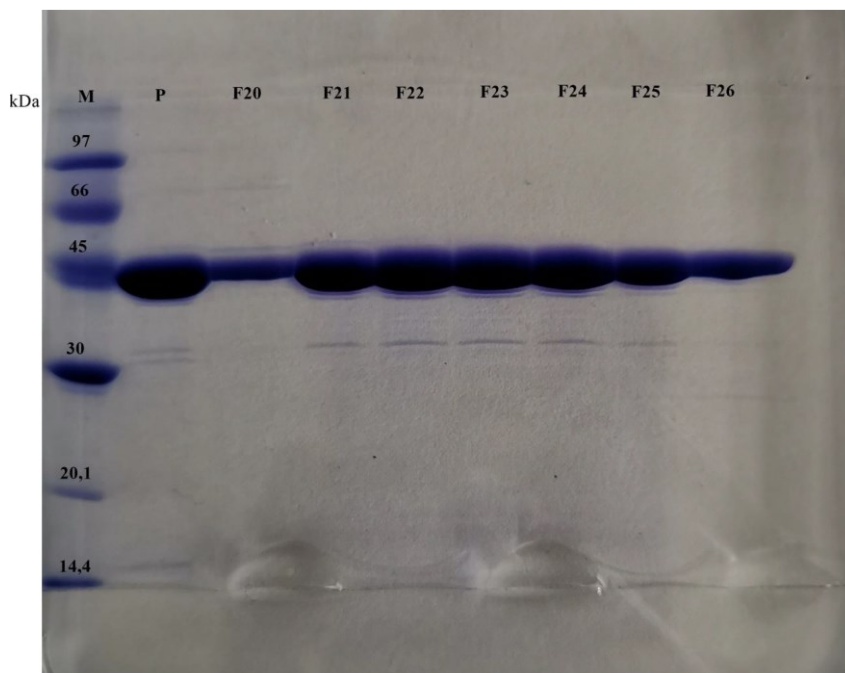
4.2.1. Pročišćavanje AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* koristeći IMAC metodu

Pročišćavanje metodom afinitetne kromatografije (eng. *Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC) je bilo efikasnije u usporedbi s pročišćavanjem AdSS bez afinitetnog privjeska, pri čemu je dobivena veća količina proteina visoke čistoće (detaljnije o postupku pročišćavanja IMAC metodom vidi u poglavlju 3.3.2, Materijali i metode). Nakon što je protein pročišćen ovom metodom, SDS-PAGE metodom je provjerena homogenost dobivenog proteinskog uzorka. Rezultati SDS-PAGE elektroforeze provedene nakon kromatografije na koloni Ni-NTA ukazuju na visoku čistoću proteinskih frakcija (slika 12). Kristalizacijski eksperimenti zahtijevaju izuzetno visoku čistoću proteinskih uzoraka, te su spojene frakcije (E3 i E4) dodatno pročišćene gel-filtracijom kako bi se uklonile degradacije i ostali nepoželjni artefakti.



Slika 12. Pročišćavanje AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* afinitetnom kromatografijom – SDS-elektroforeza. M – proteini poznatih masa LMW-SDS Marker Kit (*Cytiva Life Sciences*), PI – stanice prije indukcije, L – stanice nakon indukcije, S – supernatant nakon lize, FT – nevezna frakcija, W1-W3 – frakcije nakon ispiranja, E1-E9 – eluirane frakcije. (Preuzeto: *Diplomski rad, Ana Petek, 2020.*)

Rezultati dobiveni nakon provedene gel-filtracije (kromatogram: D-slika 1) ukazuju na visoku razinu čistoće proteinskog uzorka (slika 13). Spojene su frakcije 21 do 26, te je takav proteinski uzorak ugušćen te korišten za kristalizaciju i daljnje eksperimente.



Slika 13. Pročišćavanje AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* gel filtracijom – SDS-elektroforeza. M – proteini poznatih masa LMW-SDS Marker Kit (*Cytiva Life Sciences*), P – početni uzorak za gel-filtraciju, F20-F26 – frakcije dobivene gel-filtracijom. (Preuzeto: *Diplomski rad, Ana Petek, 2020.*)

4.2.2. Utjecaj pH i temperature na stabilnost AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori*

Kako bi se dodatno okarakterizirao pročišćeni AdSS-His₆ rađeni su biokemijski testovi stabilnosti prema pH-vrijednosti i temperaturi. Enzim je stabilan do oko 30 °C, dok pri višim temperaturama dolazi do smanjenja aktivnosti što ujedno ukazuje na smanjenje stabilnosti AdSS-His₆ konstrukta (Dodatak: D-slika 3).

Mjerenje preostale aktivnosti AdSS-a u ovisnosti o vremenu izvršeno je pri dvije različite temperature, 37 °C i 42 °C. AdSS-His₆ dulje zadržava veću stabilnost na 37 °C. Pri temperaturi od 37 °C polovina specifične aktivnosti se dostiže za 65 min, a pri temperaturi od 42 °C za 13 min. Podaci izmjereni za nativni AdSS pri 37 °C pokazuju da nativni AdSS ima višu aktivnost od obilježenog, odnosno da je stabilniji.¹¹⁰ (Dodatak: D-slika 4)

Područje pH-vrijednosti u kojem AdSS-His₆ pokazuje najveću stabilnost je između 6,5 i 7,5 pri čemu enzim zadržava oko 90% svoje početne aktivnosti (Dodatak: D-slika 5). Područja temperaturne i pH stabilnosti AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* (do 30 °C i pH 6,5-7,5) nešto su uža od onih kod nativnog AdSS iz bakterije *H. pylori* (do 37°C i pH 6,5-8,5).¹¹⁰

4.2.3. Kinetika enzimske reakcije AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori*

AdSS pročišćena na gore opisan način (poglavlje 4.1.7.) je korištena za mjerenje kinetičkih parametara kako bi se ustanovio utjecaj histidinskog privjeska na C-kraju na aktivnost proteina. Test aktivnosti je proveden i kinetički parametri određeni na prethodno opisan način (Materijali i metode: 3.4.3 i 3.4.5). Rezultati su navedeni u tablici 7.

Tablica 7. Kinetički parametri AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* dobiveni ne linearnom regresijom Michaelis-Menteninog modela primijenjenog na eksperimentalno dobivene podatke. (Preuzeto iz: *Diplomski rad*, Ana Petek, 2020.)

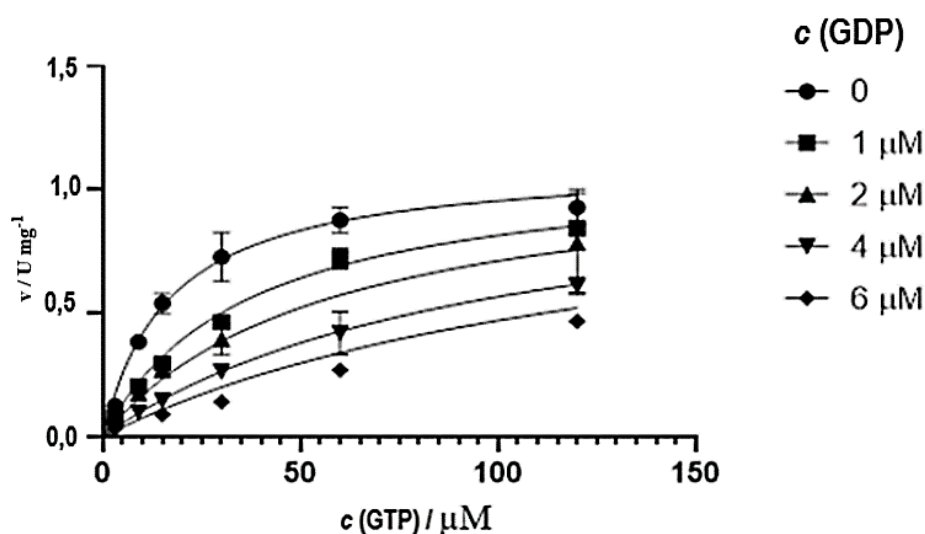
Supstrat	Stalna koncentracija supstrata (mM)	K_m (μ M)	V_{max} (U mg ⁻¹)
GTP	IMP – 0,15 Asp – 5,0	15,6 ± 1,9	1,103 ± 0,040
IMP	GTP – 0,06 Asp – 5,0	35,9 ± 4,6	0,956 ± 0,040
Asp	GTP – 0,06 IMP – 0,15	176,3 ± 18,9	0,894 ± 0,030

Izračunate K_m vrijednosti za konstrukt AdSS-His₆ ukazuju na to da najmanjim afinitetom enzim veže aspartat, a najvećim GTP. Dakle, potrebna je veća koncentracija aspartata u usporedbi s koncentracijom GTP-a i IMP-a da bi se postigla maksimalna brzina reakcije. Maksimalna brzina reakcije je približno ista za sva tri supstrata. Iako su parametri za AdSS-His₆ u skladu su s parametrima za divlji tip AdSS, vrijednosti konstanti K_m prema aspartatu i GTP-u su nešto veće za konstrukt AdSS-His₆. Uspoređujući vrijednosti V_{max} za oba konstrukta utvrđene su nešto manje vrijednosti za AdSS-His₆, no razlike nisu značajne. Na temelju dobivenih kinetičkih parametara se može isključiti da histidinski privjesak od šest uzastopnih histidina na C-kraju značajno utječe na aktivnost AdSS-a.

4.2.4. Inhibicija AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* produktom

Također je ispitivan utjecaj inhibicije produktom reakcije, GDP-om za konstrukt AdSS-His₆. Inhibicijski test je proveden pri četiri različite koncentracije GDP-a. Na temelju dobivenih podataka utvrđeno je da je GDP kompetitivni inhibitor prema GTP-u (slika 14.), što je u skladu s prethodno poznatim podacima iz literature.⁷ Molekula GDP inhibira enzim s konstantom inhibicije, K_i u iznosu od 0,9 μ mol L⁻¹. Povećanje koncentracije GDP-a u

reakcijskoj smjesi rezultira smanjenjem brzine reakcije, što znači da je potrebna veća količina supstrata, GTP-a kako bi se postigla maksimalna brzina, v_{\max} .



Slika 14. Inhibicija AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* GDP-om, pri 25 °C u 20 mmol L⁻¹ HEPES pH-vrijednost 7,7 uz različite koncentracije GTP-a. Početna brzina v u ovisnosti o koncentraciji supstrata c .

Literaturno je poznato da GDP djeluje inhibirajuće prema AdSS-u pri čemu se vrijednosti K_i protežu u rasponu od 5 do 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$.⁷ U usporedbi s AdSS-om iz bakterije *E. coli* (K_i je 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$)⁵² vidljivo je da GDP djeluje kao snažniji inhibitor na AdSS iz bakterije *H. pylori*. Također, dobivena konstanta inhibicije GDP-om usporediva je s konstantama inhibicije određenima za divlji tip AdSS iz bakterije *H. pylori* prema hadacidinu (kompetitivan inhibitor obzirom na L-aspartat, $K_i=0,19 \mu\text{mol L}^{-1}$) i adenilosukcinatu (produkt reakcije, kompetitivan inhibitor obzirom na IMP, K_i u iznosu od 3,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$).⁴⁴

4.2.5. Inhibicija AdSS-His₆ novo sintetiziranim analogima nukleobaza i riboze

Korištena je serija spojeva (Dodatak: D-2), derivata nukleobaza i riboze, dobivenih od dr. B. Žinić (IRB), te je uz njihovu prisutnost u reakcijskoj smjesi mjerena aktivnost enzima, kako bi se odredio njihov utjecaj na aktivnost AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori*. Spojevi su slabo topivi u vodi, stoga su matične otopine pripravljene tako što su dobiveni spojevi otopljeni u DMSO-u. Spoj DXVIII-53 je slabo topiv i u DMSO-u stoga je otapanje potpomognuto sonikacijom i grijanjem do 70 °C. Izmjerena aktivnost enzima uz prisustvo navedenih spojeva nije pokazala drastično smanjenje specifične aktivnosti (tablica 8). Naprotiv, većina ih je

pokazala povećanje specifične aktivnosti enzima, što bi ukazivalo na potencijalni aktivatorski efekt samog spoja prema AdSS. Prisustvo spoja DXVIII-53 dovodi do gotovo peterostrukog povećanja aktivnosti, no zbog slabe topivosti u vodi i DMSO-u ovaj spoj nije pogodan za daljnje ispitivanje njegovog djelovanja na enzim. Spoj XIX-60 je pokazao blagu inhibiciju u vidu smanjenja aktivnosti od oko 30% obzirom na standardnu aktivnost. Obzirom da testirani spojevi nisu pokazali inhibicijski utjecaj na AdSS, nisu nadalje razmatrani u ovoj radnji.

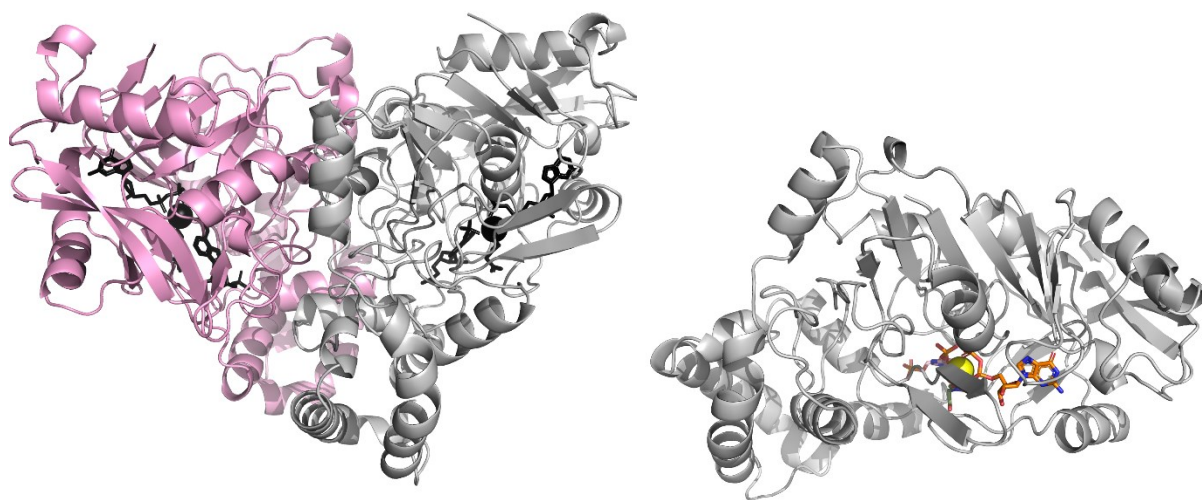
Tablica 8. Efekt testiranih spojeva na aktivnost AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori*.

Spoj	Specifična aktivnost (U mg ⁻¹)	Normirana aktivnost (%)
Pufer	0,8784	97
1% DMSO	0,9089	100
DR-2	1,7179	189
DXVIII-45	2,4484	269
DXVIII-51	1,5281	168
DXVIII-52	1,5762	173
DXVIII-53	3,4901	384
H.84	1,8638	205
XIX-60	0,6539	72
XX-75	1,2880	142

4.3. Kristalna struktura adenilosukcinat-sintetaze iz bakterije *H. pylori*

Dobiveni su monokristali AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* u više isprobanih uvjeta. Monokristal dobiven u uvjetima: 0,2 mol dm⁻³ litijevog citrata tetrahidrata, 20% w/V PEG 3350 pri 16°C snimljen je pri temperaturi od 100 K koristeći sinkrotronsko zračenje valne duljine od 1.033195 Å. Difrakcijski podatci su sakupljeni do rezolucije od 1.4 Å te su dobiveni podatci procesirani, a struktura je riješena metodom molekulske zamjene pri čemu je korištena kristalna struktura AdSS iz *Campylobacter jejuni* (PDB kod: 3R7T) kao model. Identičnost primarne sekvence AdSS iz *C. jejuni* je 51 % s AdSS iz bakterije *H. pylori*. Kristalna struktura je utočnjena iterativno do zadovoljavajućih statističkih parametara prikazanih u tablici 9. U asimetričnoj jedinici se nalazi monomer. On preko simetrijske

operacije drugoga reda (digira) s monomerom iz druge asimetrične jedinice čini dimer. Protein karakterizira središnja β -ploča, koja se sastoji od sedam β -vrpca, koju okružuju četiri poddomene. Poddomene se sastoje uglavnom od α -uzvojnica, dok se aktivno mjesto uglavnom sastoji od fleksibilnih regija tj. petlji. Na slici 15 lijevo prikazana je kristalna struktura AdSS iz bakterije *H. pylori*. Mjesto kontakta dvaju monomera (eng. *dimeric interface*) se nalazi distalno od aktivnog mjesta.



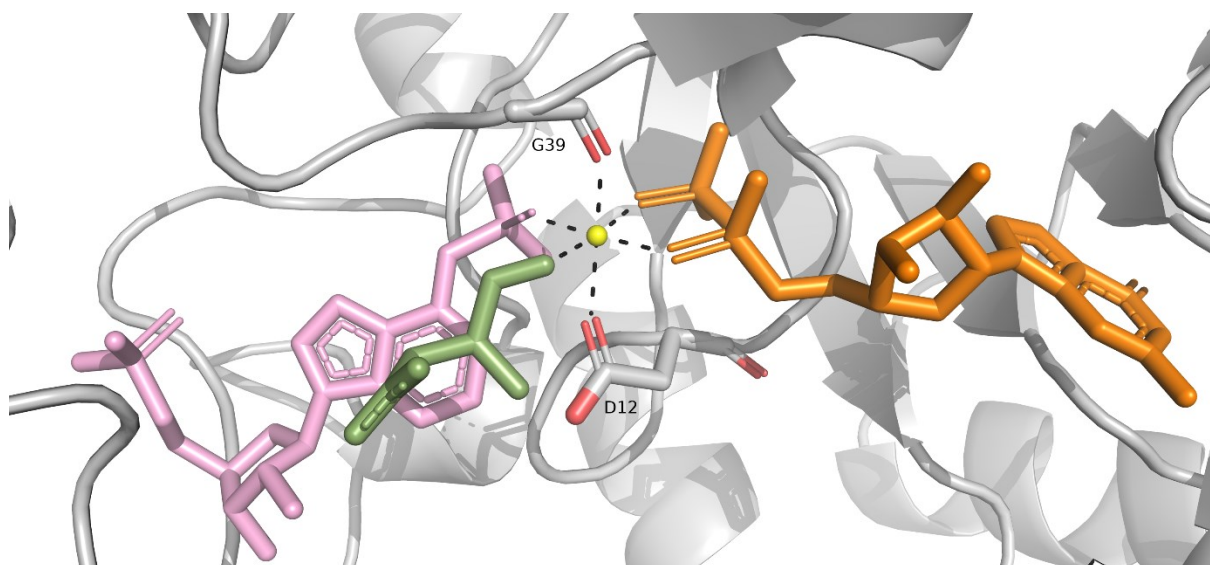
Slika 15. Struktura AdSS-a iz bakterije *H. pylori* određena kristalografski. Lijevo - dimer (monomeri su obojani ružičasto i sivo, ligandi crno). Desno - monomer (sivom bojom je prikazan protein, GDP je prikazan štapićima – narančasto, IMO je prikazan štapićima – ružičasto, HDA je prikazan štapićima – zeleno. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje).

Tablica 9. Statistika sakupljenih podataka i točnost modela riješene strukture AdSS iz bakterije *H. pylori*. Vrijednosti u zagradama odnose se na ljusku s najvećim razlučenjem.

PDB identifikacijski kod	6ZXQ
Kristalni parametri	
Razlučivanje / Å	48,46 – 1,40 (1,45 – 1,4)
Prostorna grupa	C 1 2 1
Parametri jedinične ćelije	
a, b, c / Å	120,71, 68,36, 68,83
α, β, γ / °	90,00, 121,11, 90,00
Matthews-ov koeficijent / Å ³ Da ⁻¹	2,61
Udio otapala / %	52,98
Svojstva podataka	
Kompletnost / %	99,10 (98,08)
Broj neovisnih refleksa	93429
I/σ	8,11 (1,11)
R_{merge}	0,1336 (1,49)
$CC_{1/2}$	0,995 (0,372)
Redundantnost	0,145 (1,616)
Wilson-ov B-faktor / Å ²	17,78
Utočnjavanje	
R/R_{free}	0,1510 / 0,1924
RMSD duljine veza / Å	0,006
Prosječan B faktor	26,28
Broj molekula u AJ	1
Broj atoma	
Protein	3198
Magnezijev ion	1
Molekule vode	454
Ramachandran-ov dijagram	
Najpovoljnija područja / %	98
Dopuštena područja / %	2
Nedopuštena područja / %	0

Većina riješenih kristalnih struktura AdSS dostupnih u PDB bazi podataka sadrži ligande vezane u aktivnom mjestu, bilo da su inhibicijske ili supstratne prirode. Kristalna struktura AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* u aktivnom mjestu sadrži vezane ligande: hadacidin (HDA), 6'-fosforil-IMP (IMO), gvanozin-difosfat (GDP) te magnezijev ion. Prisustvo IMO-a u aktivnom mjestu enzima ukazuje na to da se prvi korak reakcije odvio (transfer γ -fosfatne skupine GTP-a na karbonilni kisik IMP-a).

Magnezijev ion je oktaedarski koordiniran (slika 16) preko karbonilnog kisika G39 iz okosnice, karbonilnog kisika bočnog ogranka D12, karbonilnim kisikom HDA te kisicima fosfatnih skupina IMO-a i GDP-a.

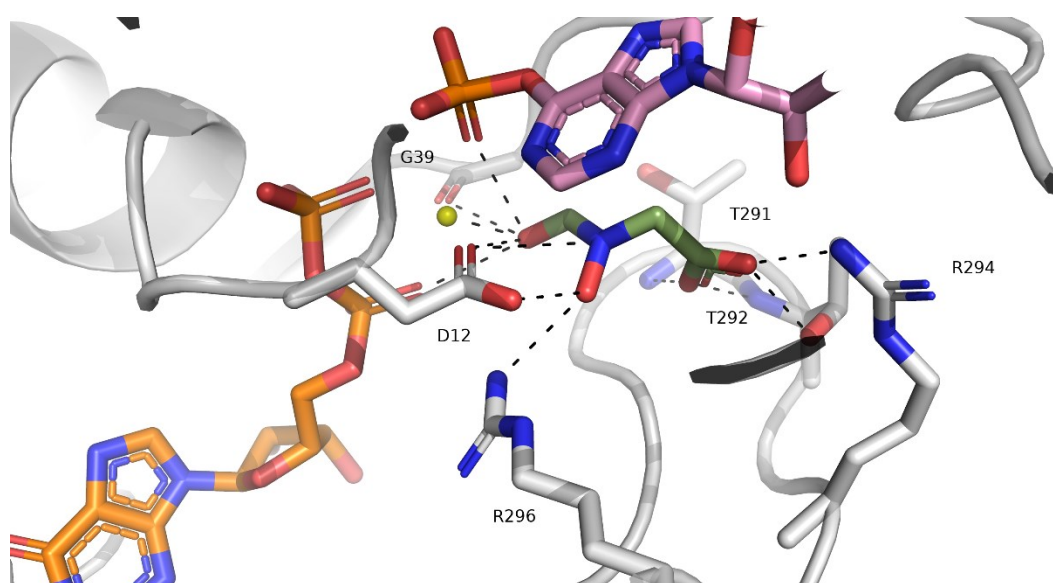


Slika 16. Prikaz koordinacije magnezija u aktivnom mjestu AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* u kristalnoj strukturi. Sivom bojom je prikazan protein, GDP je prikazan štapićima – narančasto, IMO je prikazan štapićima – ružičasto, HDA je prikazan štapićima – zeleno. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje.

4.3.1. Okruženje hadacidina u aktivnom mjestu AdSS-a

Za određivanje vodikovih veza korišteni su parametri standardnih postavki programa Pymol.⁷⁸ Karboksilna skupina hadacidina je stabilizirana vodikovom vezom preko bočnog ogranka R294 te vodikovom vezom preko bočnog ogranka T292 (slika 17). Kod AdSS iz bakterije *E. coli* ova interakcija je očuvana te ide preko T301. Dodatna stabilizacija

karboksilne skupine postiže se stvaranjem interakcija s treoninskom okosnicom (aminokiseline 291-292). Hidroksilna skupina koja se nalazi na aminskoj jezgri hadacidina stvara vodikovu vezu s bočnim ogrankom R296 i D12. Kod AdSS iz bakterije *E. coli* također je uočena očuvanost u interakcijama enzima s hadacidinom preko slijeda aminokiselina 299-302.⁴⁸ Kod AdSS iz bakterije *H. pylori* preostala karbonilna skupina molekule hadacidina stabilizirana je elektrostatski preko magnezijeva iona, kisika β -fosfatne skupine GDP-a i kisika 6'-fosfatne skupine IMO-a. Dodatnu elektrostatsku stabilizaciju postiže s bočnim ogrankom D12.

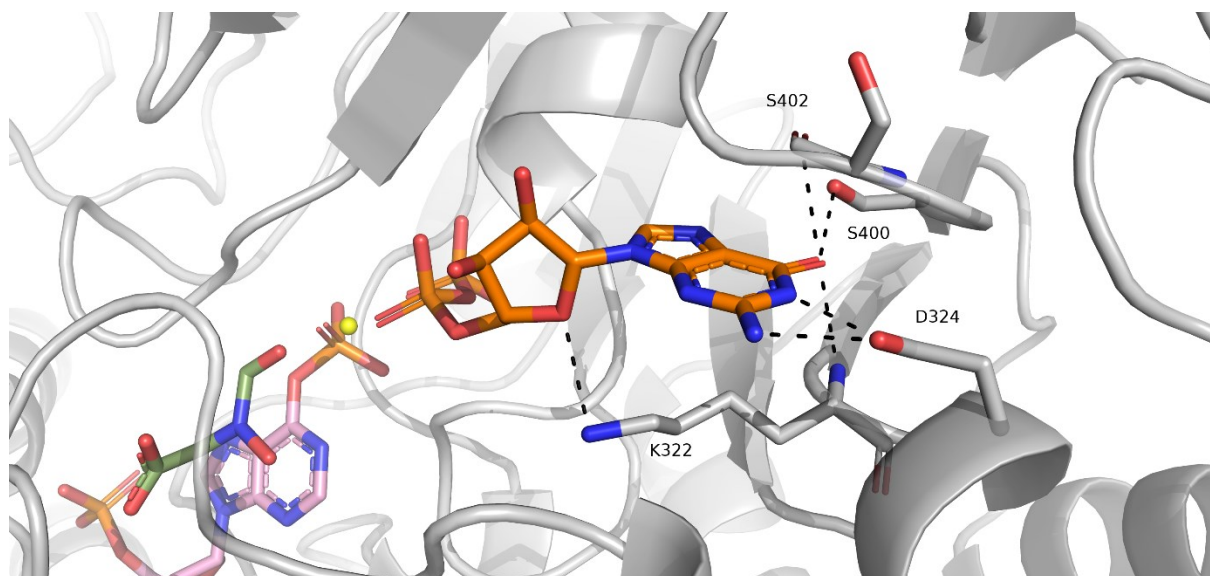


Slika 17. Prikaz smještanja HDA u aktivno mjesto AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* u kristalnoj strukturi. Sivom bojom je prikazan protein, GDP je prikazan štapićima – narančasto, IMO je prikazan štapićima – ružičasto, HDA je prikazan štapićima – zeleno. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje. Vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama.

4.3.2. Okruženje GDP-a u aktivnom mjestu AdSS-a

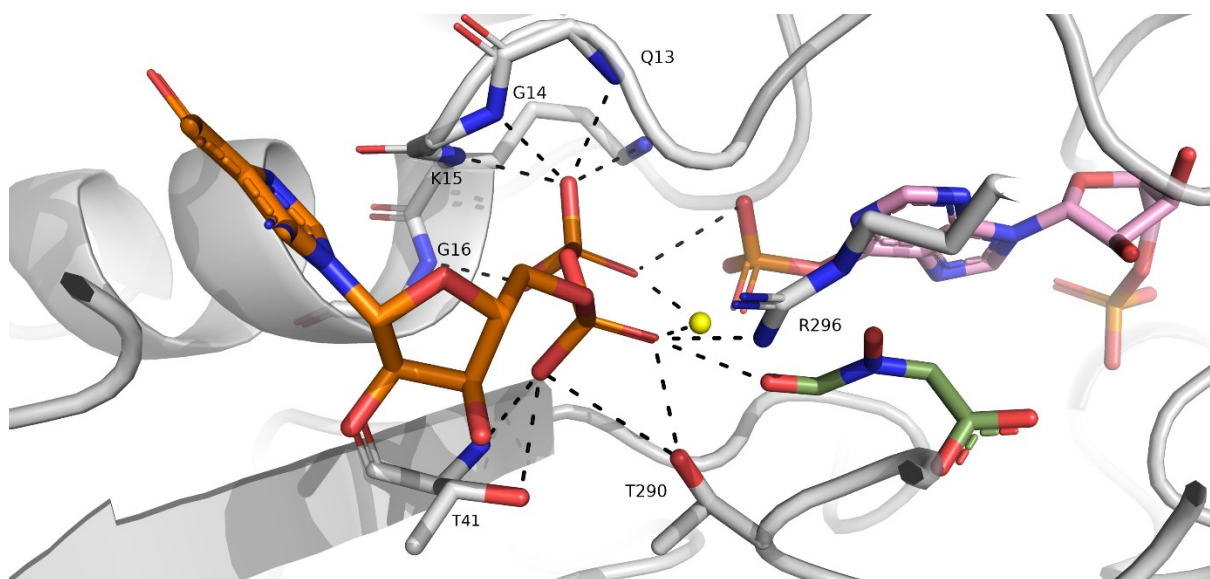
Gvaninski dio molekule GDP-a je stabiliziran vodikovim vezama preko bočnih ogranka S400 i D324. Kod AdSS-a iz bakterije *E. coli* te interakcije idu preko bočnog ogranka S414 te dušika iz peptidne veze D333 i fosfatne skupine GDP-a. Također, kod AdSS iz bakterije *H. pylori* karbonilna skupina GDP-a je stabilizirana interakcijama preko okosnice (aminokiseline

400-402). Šećerna komponenta tj. ribozni dio molekule stvara vodikovu vezu s bočnim ogrankom K322 (slika 18), dok ta interakcija kod AdSS iz bakterije *E. coli* ide preko K331. Kod AdSS iz bakterije *H. pylori* β -fosfatna skupina GDP-a stabilizirana je vodikovom vezom preko bočnog ogranka K15 i s okosnicom proteina (aminokiseline 13-16), a kod AdSS iz bakterije *E. coli* to su aminokiseline 15-17.⁴⁸ Dodatna stabilizacija postiže se elektrostatskim interakcijama preko magnezijeva iona i preko 6'-fosfatne skupine IMO-a.



Slika 18. Prikaz smještanja nukleozidnog dijela GDP-a u aktivno mjesto AdSS iz bakterije *H. pylori* u kristalnoj strukturi. Sivom bojom je prikazan protein, GDP je prikazan štapićima – narančasto, IMO je prikazan štapićima – ružičasto, HDA je prikazan štapićima – zeleno. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje. Vodikove veze prikazane su isprekidanim linijama.

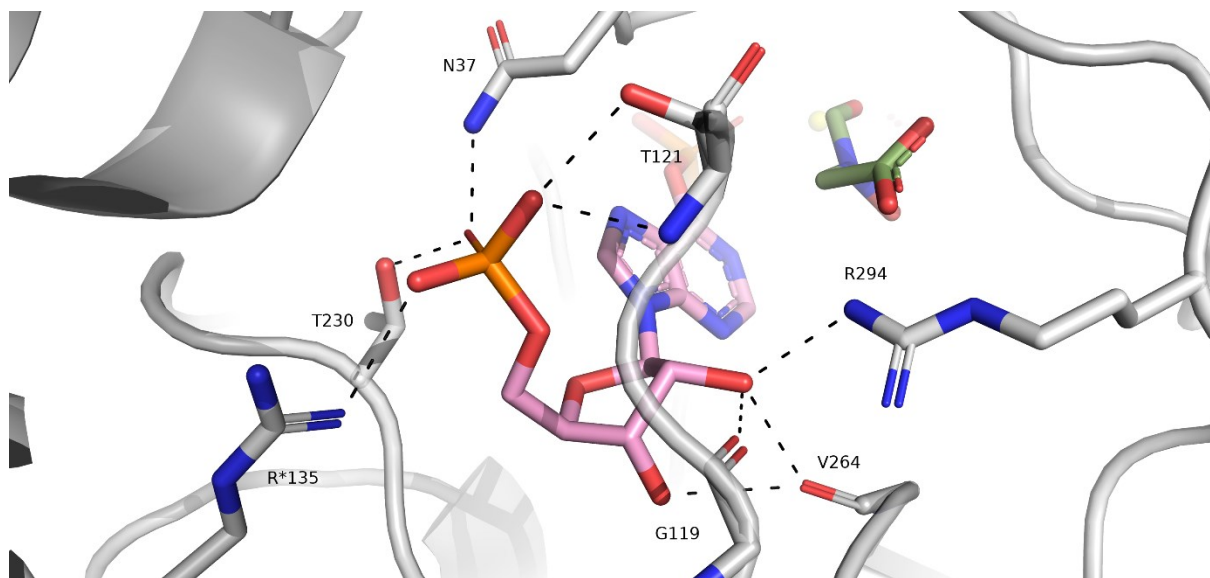
Kod AdSS iz bakterije *H. pylori* α -fosfatna skupina GDP-a (slika 19) je stabilizirana vodikovim vezama preko bočnih ogranaka T41, T290 i R296 uz elektrostatske interakcije s ionom magnezija. Dodatna elektrostatska stabilizacija dolazi od interakcije s kisikom bočnog ogranka D12 i karbonilnom skupinom hadacidina. Usporedbom AdSS iz bakterije *H. pylori* s kristalnom strukturom AdSS iz bakterije *E. coli* uočava se visoka očuvanost u strukturnom poravnanju, što je i za očekivati obzirom na veliku očuvanost aminokiselina u aktivnom mjestu.



Slika 19. Prikaz smještanja fosfatnih skupina GDP-a u aktivno mjesto AdSS iz bakterije *H. pylori* u kristalnoj strukturi. Sivom bojom je prikazan protein, GDP je prikazan štapićima – narančasto, IMO je prikazan štapićima – ružičasto, HDA je prikazan štapićima – zeleno. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje.

4.3.3. Okruženje IMO-a u aktivnom mjestu AdSS-a

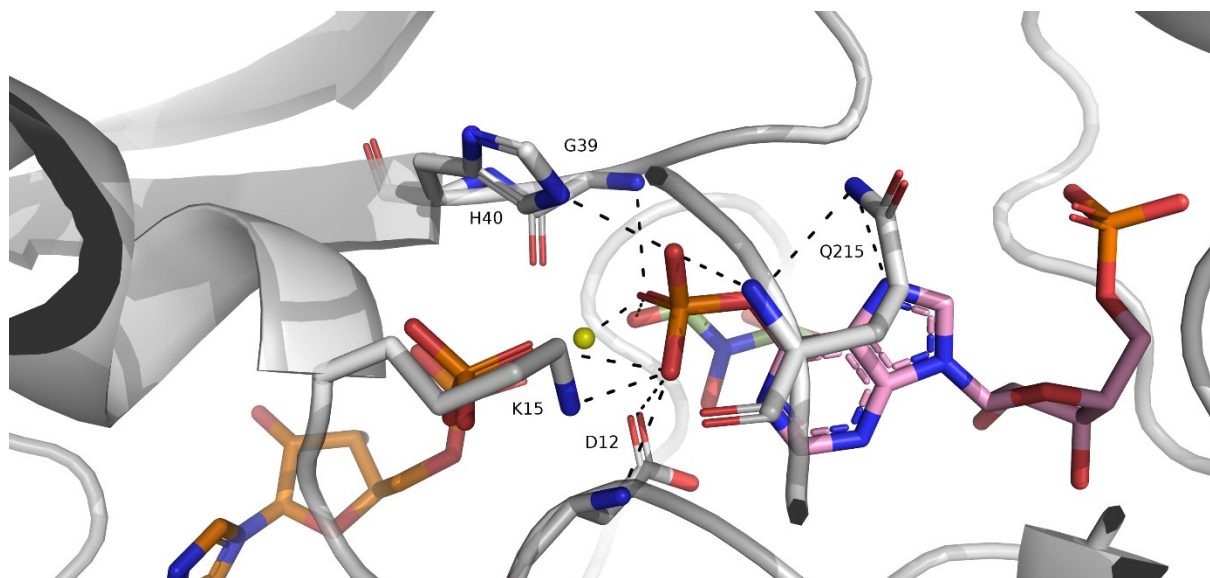
Molekula IMO u aktivno mjesto enzima smještena je tako da je α -fosfatna skupina stabilizirana vodikovim vezama preko bočnih ogranaka s argininom 135 drugog monomera (R*135), N37 i T121 (slika 20), dok je kod AdSS iz bakterije *E. coli* stabilizirana preko R*143, T129, T239 i N38.⁴⁸ Također, kod AdSS iz bakterije *H. pylori*, stabilizirana je preko okosnice T230 i T121 (T129, T239 kod AdSS iz bakterije *E. coli*). Kod AdSS iz bakterije *H. pylori* šećerna komponenta molekule je stabilizirana preko vodikovih veza s bočnim ogranakom R294 te okosnicom V264 i G119.



Slika 20. Prikaz smještanja α -fosfatne skupine IMO-a u aktivno mjesto AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* u kristalnoj strukturi. Sivom bojom je prikazan protein, IMO je prikazan štapićima – ružičasto, HDA je prikazan štapićima – zeleno. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje.

Stabilizacija 6'-fosforilne (slika 21) skupine postignuta je vodikovim vezama preko bočnog ogranka H40, K15, D12, Q215 i preko okosnice G39, D12, Q215. Kod AdSS iz bakterije *E. coli* ovaj dio molekule je stabiliziran preko interakcija s bočnim ogrankom Q224 i D13. Ta ista fosfatna skupina je dodatno stabilizirana elektrostatski preko magnezijeva iona, β -fosfatne skupine GDP-a te karbonilne skupine HDA.^{48,49}

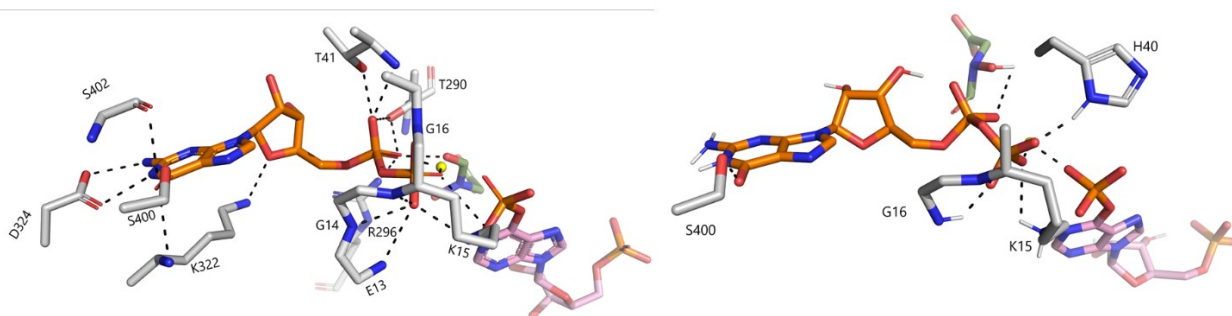
Za očekivati je da su interakcije očuvane zbog konzerviranosti aktivnog mjesta. Analiza aktivnog mjesta ukazuje na jako visoku očuvanost konformacija aktivnog mjesta s AdSS iz bakterije *E. coli*. Sličnost u kristalnoj strukturi s AdSS iz bakterije *E. coli* i sličnost u dobivenim kinetičkim parametrima sugerira na sličan mehanizam rada ove sintetaze.



Slika 21. Prikaz smještanja 6'-fosfatne skupine IMO-a u aktivno mjesto AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori* u kristalnoj strukturi. Sivom bojom je prikazan protein, IMO je prikazan štapićima – ružičasto, HDA je prikazan štapićima – zeleno. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje.

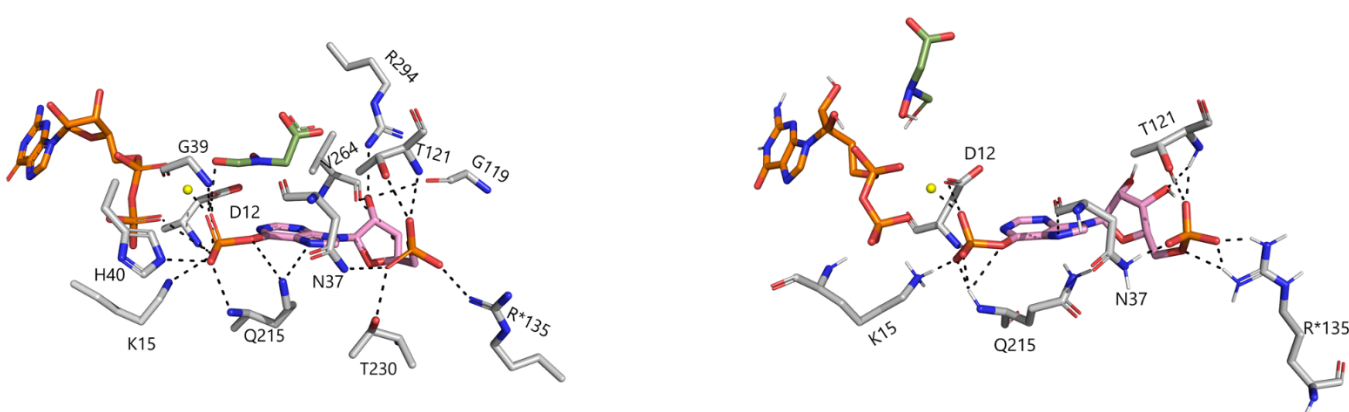
4.4. Rezultati simulacija molekulske dinamike

U svrhu dinamičke karakterizacije enzima, odnosno promatranja promjena u strukturnim svojstvima i interakcijama proteina i liganada, provedene su simulacije molekulske dinamike. Provedene su simulacije samog enzima, te simulacije kompleksa enzima s ligandima (IMO, IMP, GTP, HDA). U svim sustavima kompleksa prisutan je ion magnezija. Simuliran je dimer, a simulacijsko vrijeme pojedinog sustava je bilo 200 ns. Kako bi se usporedili rezultati analize kristalne strukture s rezultatima molekulske dinamike, simuliran je sustav kompleksa enzima i pripadajućih liganada definiranih u kristalu (IMO, HDA GDP i Mg²⁺). Vodikove veze između GDP-a i S400 (Dodatak: D-slika 8), K15, G16 (slika 22) su očuvane tijekom simulacija, te je također očuvana elektrostatska stabilizacija između β-fosfatne skupine GDP-a i iona magnezija. Nadalje, β-fosfatna skupina je stabilizirana preko bočnog ogranka H40. Smanjenje broja interakcija (vodikovih veza) tijekom simulacije u usporedbi s kristalnom strukturom posljedica je relaksacije sustava, odnosno smanjenja gustoće pakiranja i utjecaja otapala koje je tijekom simulacija bilo eksplicitno simulirano.



Slika 22. Prikaz vodikovih veza između GDP-a i AdSS iz bakterije *H. pylori* u kristalnoj strukturi – lijevo. Vodikove veze između GDP-a i enzima tijekom simulacija molekularne dinamike – desno. Sivom bojom je prikazan protein, GDP je prikazan štapićima – narančasto, IMO je prikazan štapićima – ružičasto, HDA je prikazan štapićima – zeleno. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje.

Utvrđena je očuvanost interakcije 6'-fosfatne skupine IMO-a (slika 23) preko vodikove veze s bočnim ogrankom K15 te preko okosnice Q215. Magnezijev ion elektrostatski stabilizira 6'-fosfatnu skupinu, a isti je elektrostatski stabiliziran preko bočnog ogranka D12. Stabilizacija hipoksantinskog prstena postignuta je očuvanošću vodikove veze s aminokiselinom N37 koja ujedno stabilizira α -fosfatnu skupinu IMO-a vodikovom vezom preko bočnog ogranka. Najveći doprinos stabilizaciji α -fosfatne skupine IMO-a postiže se vodikovom vezom preko bočnog ogranka arginina 135 iz drugog monomera (R*135) koja je također očuvana duž simulacije



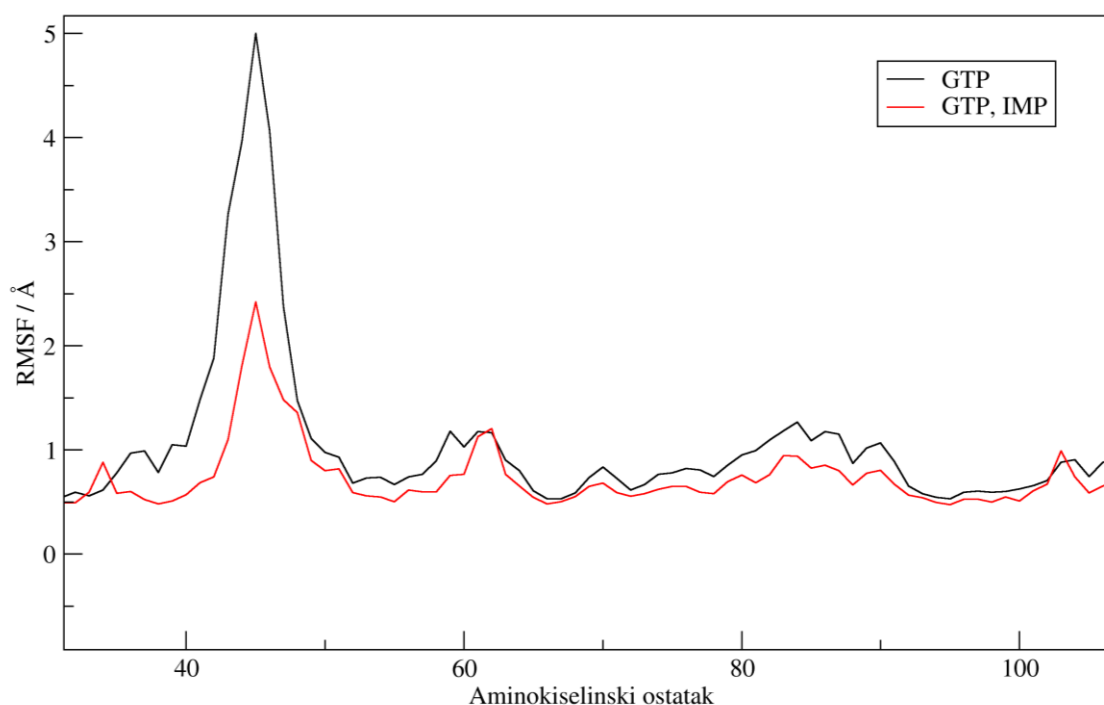
Slika 23. Prikaz vodikovih veza između IMO-a i AdSS iz bakterije *H. pylori* u kristalnoj strukturi – lijevo. Vodikove veze između IMO-a i enzima tijekom simulacija molekularne

dinamike – desno. Sivom bojom je prikazan protein, GDP je prikazan štapićima – narančasto, IMP je prikazan štapićima – ružičasto. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje.

Kako bi se dodatno proučila dinamička svojstva aktivnog mjesta AdSS iz bakterije *H. pylori* u interakciji s ostalim ligandima, modelirana su tri različita sustava: enzim – GTP, enzim – IMP, enzim – IMP – GTP. Prilikom analize, dobiveni rezultati su uspoređivani međusobno, unutar sustava te s apo sustavom.

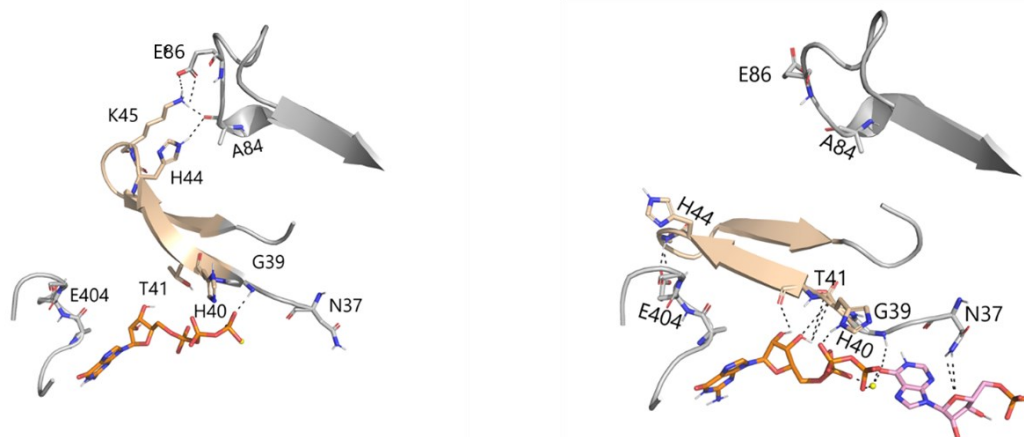
4.4.1. Promjena konformacije GTP vezujuće petlje prisustvom IMP-a.

Simulacije sustava enzim-GTP te enzim-IMP-GTP ukazuju na promjenu u ponašanju petlje u području aminokiselina 40-50. Petlja je u otvorenoj konformaciji (slika 25 lijevo) kada je IMP odsutan iz aktivnog mjesta. Otvorenu konformaciju opisuju interakcije u vidu vodikovih veza preko bočnog ogranka H44 s kisikom iz peptidne veze aminokiseline A84 (slika 28), dok bočni ogranak K45 stvara vodikovu vezu s bočnim ogranakom E86. Srednja vrijednost RMSF za petlju aminokiselina 40-50 iznosi 2,42 Å u odsutnosti IMP-a u aktivnom mjestu, dok ta vrijednost iznosi 1,234 Å kada je i IMP prisutan u aktivnom mjestu AdSS-a.

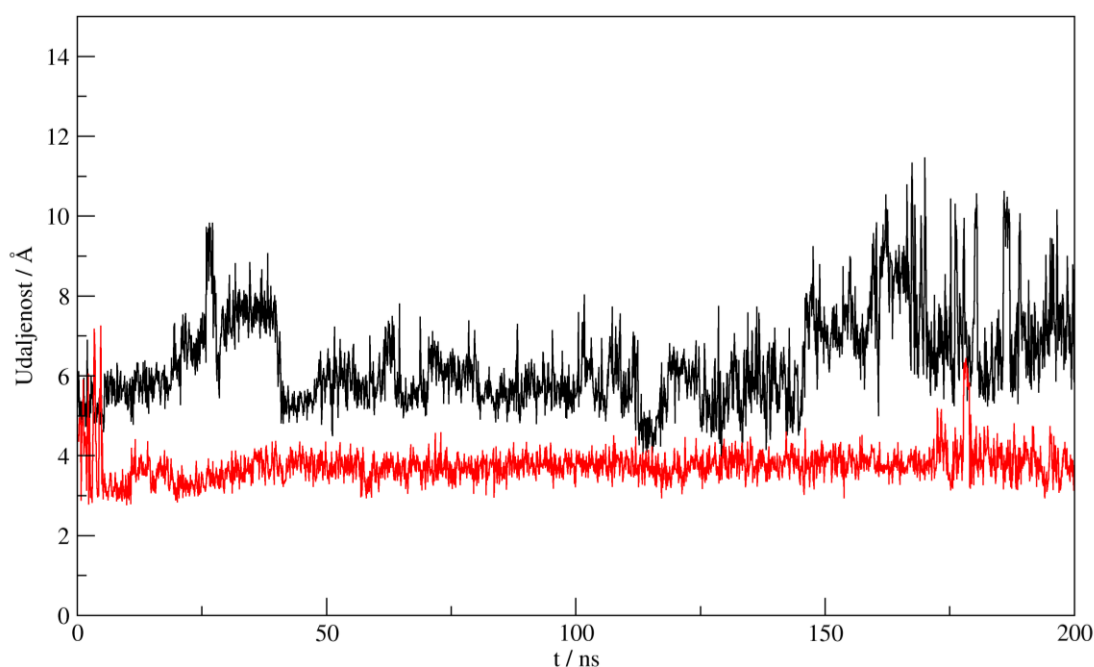


Slika 24. Prikaz RMSF aminokiselinskih bočnih ogranka GTP-vezujuće petlje (aminokiseline 40-50) duž simulacije u trajanju od 200 ns. Sustav enzim-GTP (crno), sustav enzim-IMP-GTP (crveno).

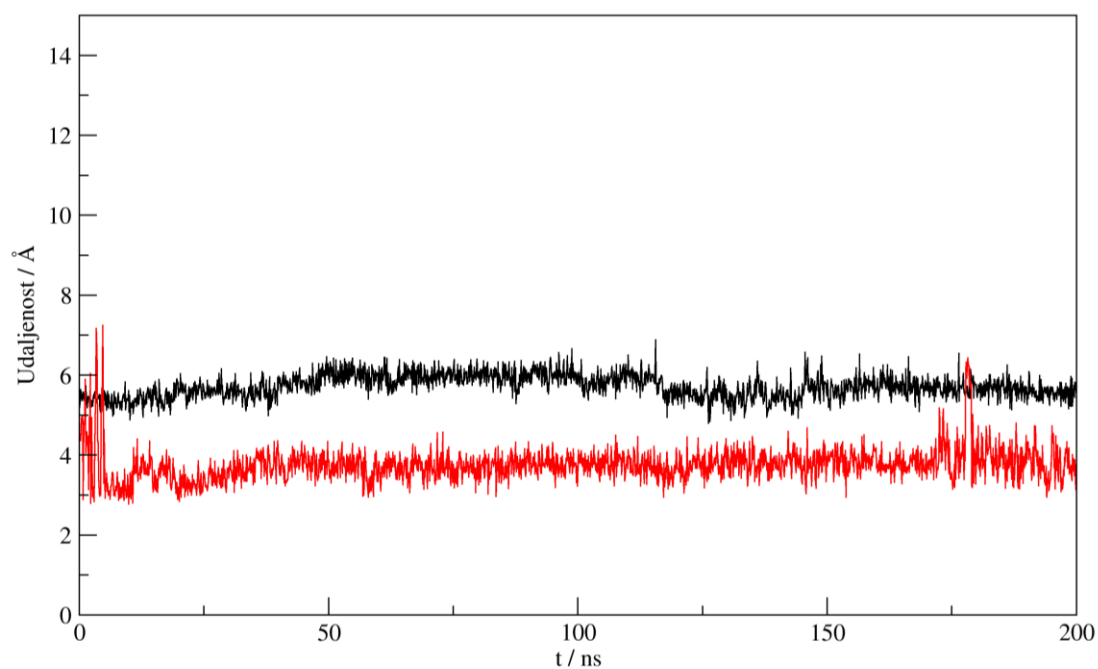
Vrijednosti RMSF (slika 24) upućuju na to da dolazi do gotovo dvostrukog smanjenja fluktuacije spomenute petlje kada je u aktivnom mjestu prisutan i IMP. To se dodatno može objasniti konformacijskom promjenom petlje, gdje petlja zauzima zatvorenu konformaciju (slika 25 desno). U literaturi je također pronađeno da prisustvo IMP-a u aktivnom mjestu inducira konformacijsku promjenu u navedenoj petlji.¹¹¹ Pronađena je mreža vodikovih veza koja utječe, odnosno vodi ka zatvorenoj konformaciji petlje, a proteže se uzvodno od N37. N37 stvara vodikovu vezu s riboznim dijelom IMP-a, dok G39 stvara vodikovu vezu preko okosnice s fosfatnom skupinom GTP-a (Dodatak: D-slika 7). Ove interakcije omogućuju stvaranje nizvodnih vodikovih veza preko H40 (slika 26) i T41 (slika 27) s β -fosfatnom skupinom GTP-a te stabilizaciju šećerne komponente preko vodikove veze T41 i OH-skupine riboze. Zatvorena konformacija zadržava se vodikovim vezama preko H44 i E404. Opisana mreža vodikovih veza djeluje sekvencijalno od N37 nizvodno uz petlju. Također tome ide u prilog to što je kod AdSS iz bakterije *E. coli* aminokiselina N38 (kod bakterije *H. pylori* N37) ključna u stabilizaciji prijelaznog stanja (IMO) – kinetički eksperimenti su pokazali da mutacija N38A smanjuje k_{cat} 200 puta bez utjecaja na K_m . Konačna zatvorena konformacija petlje u potpunosti stabilizira i pozicionira GTP u aktivno mjesto enzima. Rezultati i provedena analiza ukazuju da IMP sudjeluje u organizaciji aktivnog mjesta, što je također pronađeno u literaturi.¹¹¹ Štoviše, u zatvorenoj konformaciji navedena petlja (aminokiseline 40-50) dodatno stabilizira GTP, te na taj način GTP zauzima konformaciju pogodnu za transfer fosfatne skupine na 6'-O-IMP-a, što ujedno ide u i prilog tome da prisustvo IMP-a i GTP-a u aktivnom mjestu vodi ka brzom stvaranju stabilnog intermedijera, IMO.¹¹²



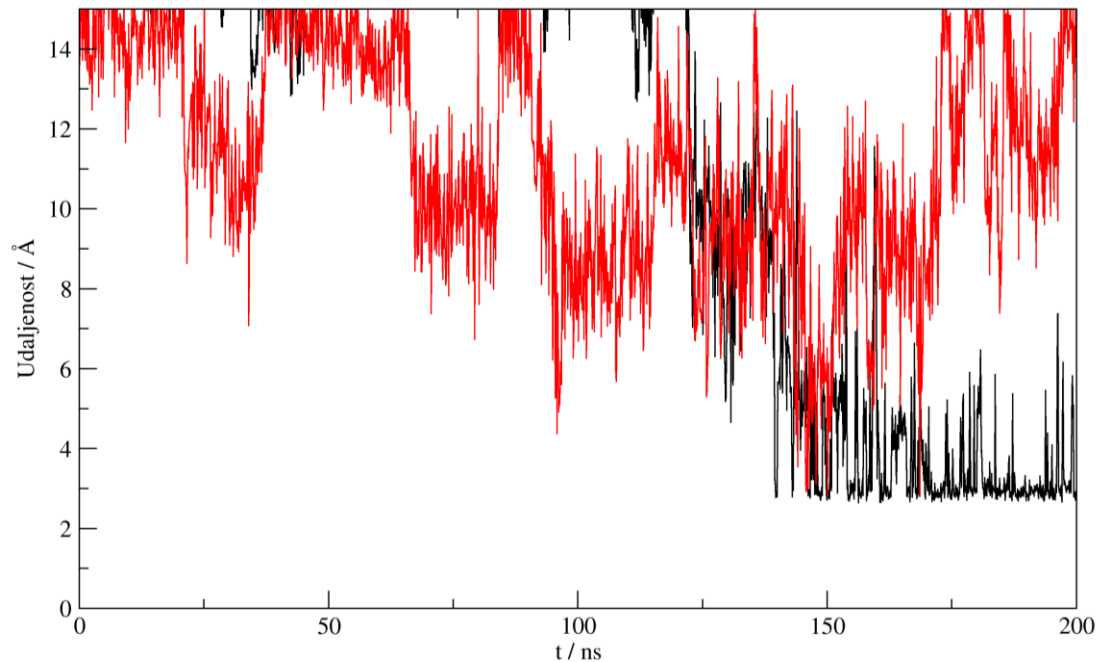
Slika 25. Prikaz promjene konformacije GTP-vezujuće petlje (aminokiseline 40-50), te interakcije koje ostvaruje u odsustvu (lijevo) i prisustvu IMP-a (desno). Sivom bojom je prikazan protein, GTP-vezujuća petlja je prikazana bež, GTP je prikazan štapićima – narančasto, IMP je prikazan štapićima – ružičasto. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje.



Slika 26. Udaljenost između bočnog ogranka H40 i kisika β -fosfatne skupine GTP-a tijekom simulacije od 200 ns. Sustav enzim-GTP (crno), sustav enzim-IMP-GTP (crveno).

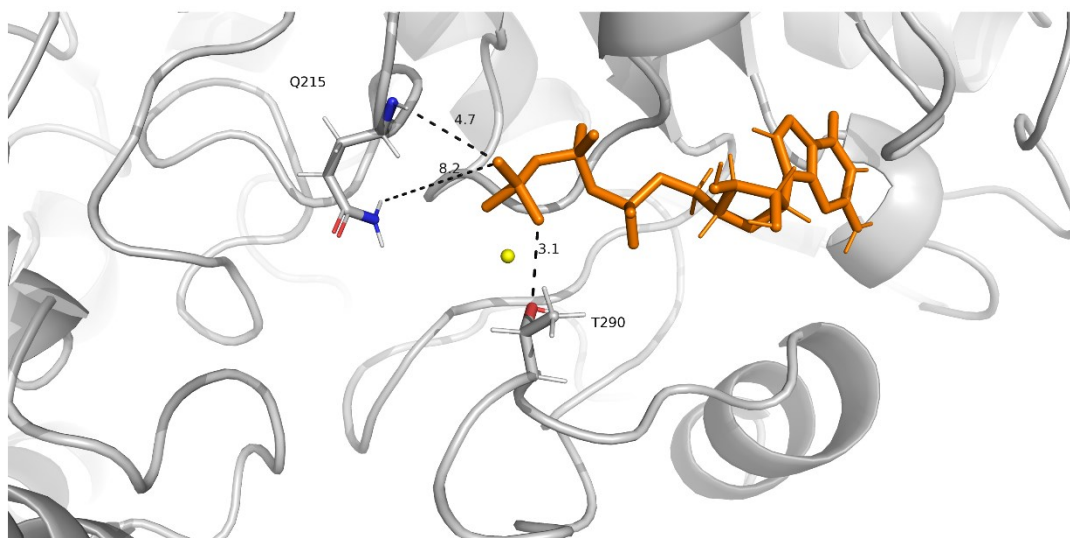


Slika 27. Udaljenost između bočnog ogranka T41 i kisika β -fosfatne skupine GTP-a tijekom MD simulacije od 200 ns. Sustav enzim-GTP (crno), sustav enzim-IMP-GTP (crveno).

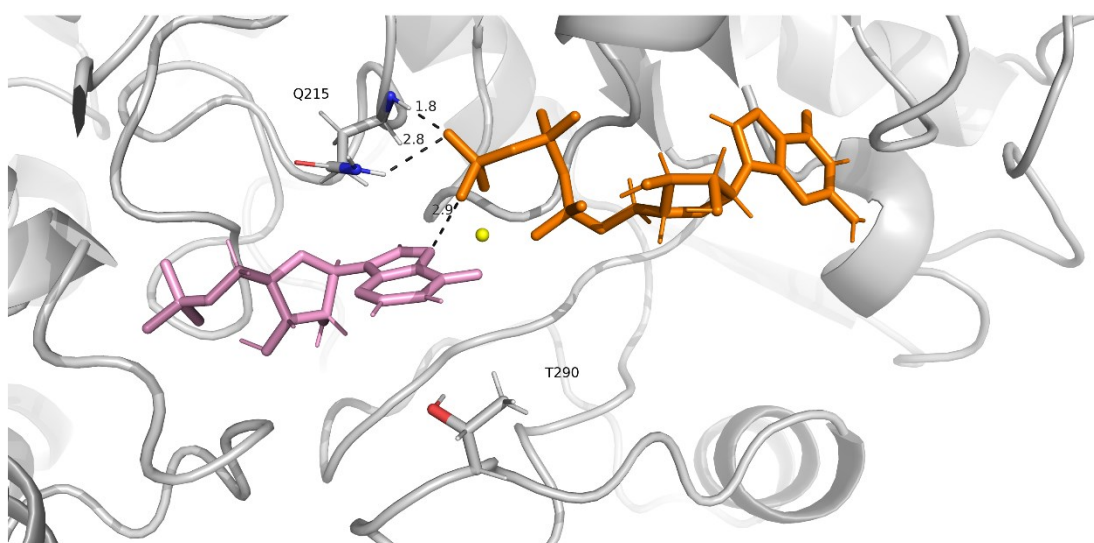


Slika 28. Udaljenost između bočnog ogranka H44 i kisika iz okosnice A84 skupine tijekom MD simulacije od 200 ns. Sustav enzim-GTP (crno), sustav enzim-IMP-GTP (crveno).

Simulacije sustava enzima samo s GTP-om ukazuju na to da je GTP smješten u aktivno mjesto tako što je γ -fosfatna skupina GTP-a stabilizirana vodikovom vezom preko T290 (slika 29). Nadalje simulacije sustava enzim-GTP uz prisustvo IMP-a pokazuju da GTP zauzima ispruženu konformaciju na način da je njegova γ -fosfatna skupina stabilizirana preko vodikovih veza s Q215 (slika 30). Dakle, promjena konformacije petlje (T290) dovodi do narušavanja vodikove veze između bočnog ogranka T290 i γ -fosfatne skupine, što je kompenzirano stvaranjem novih vodikovih veza preko Q215 i γ -fosfatne skupine GTP-a. Štoviše u ovakvoj konformaciji γ -fosfatna skupina GTP-a je stabilizirana preko tri vodikove veze, od kojih su dvije preko Q215, a jedna preko ekstracikličkog dušika IMP-a. Kako bi se detaljnije vidio utjecaj Q215 i njena važnost u stabilizaciji GTP-a preko stabilizacije γ -fosfatne skupine, računalno je pripremljen mutant Q215A na kojem je provedena računalna dinamika. Rezultati simulacija mutanta Q215A ukazuju da ne dolazi do značajnije promjene u stabilizaciji GTP-a zbog toga što je koordinacija γ -fosfatne skupine očuvana vodikovom vezom preko okosnice proteina, a ne funkcionalne skupine bočnog ogranka.



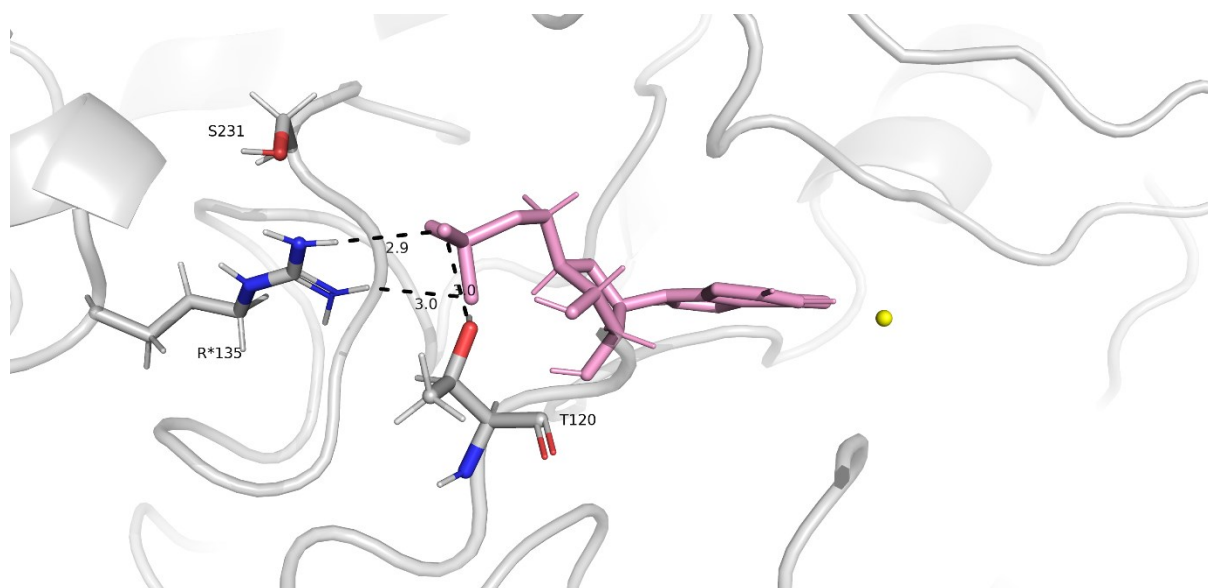
Slika 29. Prikaz stabilizacije γ -fosfatne skupine GTP-a vodikovom vezom preko bočnog ogranka T290. Sivom bojom je prikazan protein, GTP je prikazan štapićima – narančasto. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje.



Slika 30. Prikaz stabilizacije γ -fosfatne skupine GTP-a kada je IMP prisutan u aktivnom mjestu AdSS iz bakterije *H. pylori* preko vodikovih veza s Q215. Sivom bojom je prikazan protein, GTP je prikazan štapićima – narančasto, IMP je prikazan štapićima – ružičasto. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje.

4.4.2. Stabilizacija IMP-a preko polarnih interakcija s R*135.

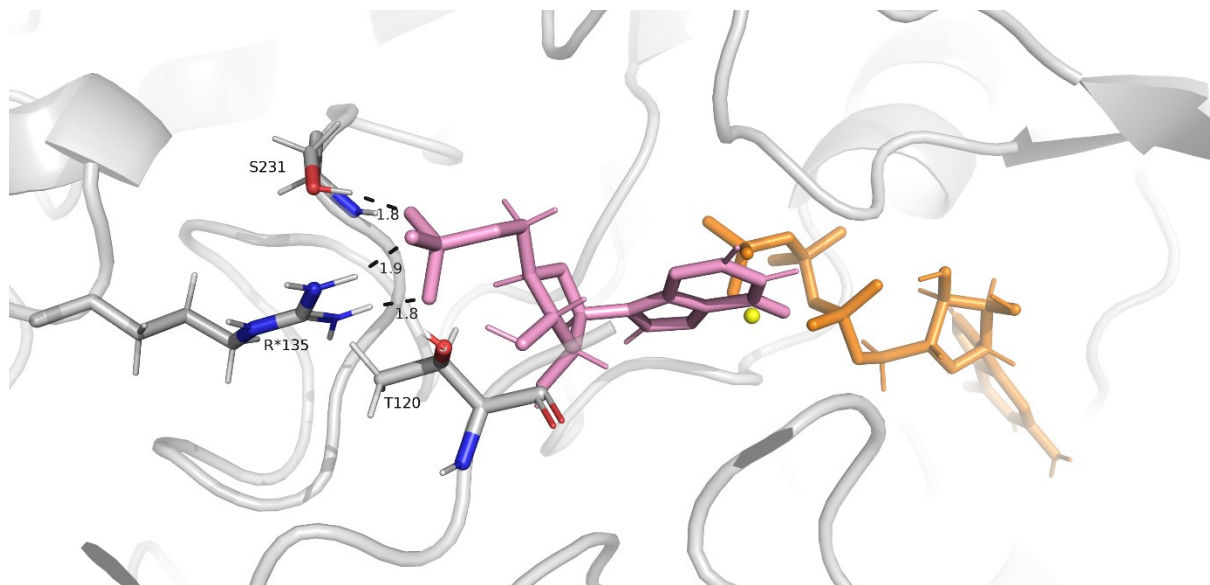
Kako bi se bolje okarakterizirala dinamika smještanja IMP-a provedena je molekulska dinamika na sustavima enzim-IMP bez i sa prisustvom GTP-a u aktivnom mjestu. Podatci dobiveni analizom sustava enzim-IMP ukazuju na to da je IMP smješten u aktivno mjesto tako što ostvaruje vodikove veze preko T120 i R135 iz drugog monomera (R*135) – slika 31.



Slika 31. Prikaz stabilizacije fosfatne skupine IMP-a u aktivnom mjestu AdSS iz bakterije *H. pylori* preko vodikovih veza s bočnim ogrankom R*135 i T120. Sivom bojom je prikazan protein, IMP je prikazan štapićima – ružičasto. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje.

Simulacije sustava enzim-IMP uz prisustvo GTP-a pokazuju da GTP dovodi do promjene konformacije IMP-a te narušavanja vodikove veze s bočnim ogrankom T120. To rezultira time da se IMP pozicionira dublje u aktivno mjesto gdje dolazi do povećanja stabilizacije α -fosfatne skupine tako što nastaju nove vodikove veze (slika 32) preko R*135 i S231 (Dodatak: D-slika 9). Nadalje, IMP je dodatno stabiliziran elektrostatskim interakcijama preko iona magnezija i γ -fosfatne skupine GTP-a. Kako preko IMP-a nastaje stabilni intermedijer 6'-fosforil-IMP, a u konačnici i produkt reakcije, ova stabilizacija α -fosfatne skupine smješta IMP u pogodnu konformaciju za prijenos fosfata s γ -fosfatne skupine GTP na 6-kisik IMP-a. Kako bi se utvrdila važnost ovih interakcija, računalno su pripremljeni mutanti S231A i dvostruki mutant S231A/R*135A te na njima provedena dinamika s ligandima IMP i GTP. Rezultati ukazuju da mutacija S231A nema značajan utjecaj na stabilizaciju α -fosfatne skupine te se IMP pozicionira tako da je α -fosfatna skupina stabilizirana preko vodikovih veza s bočnim ogrankom R135. Dok kod dvostrukog mutanta stabilizacija α -fosfatne skupine IMP-a opada uz odsustvo GTP-a, a uspostavlja se stabilizacija preko T121, no svakako manja nego kod divljeg tipa. U sustavu kada je uz IMP prisutan i GTP, efekt dvostruke mutacije se

smanjuje jer dolazi do jače stabilizacije hipoksantinskog dijela molekule IMP-a ponajviše elektrostatske prirode preko iona magnezija i fosfata GTP-a.

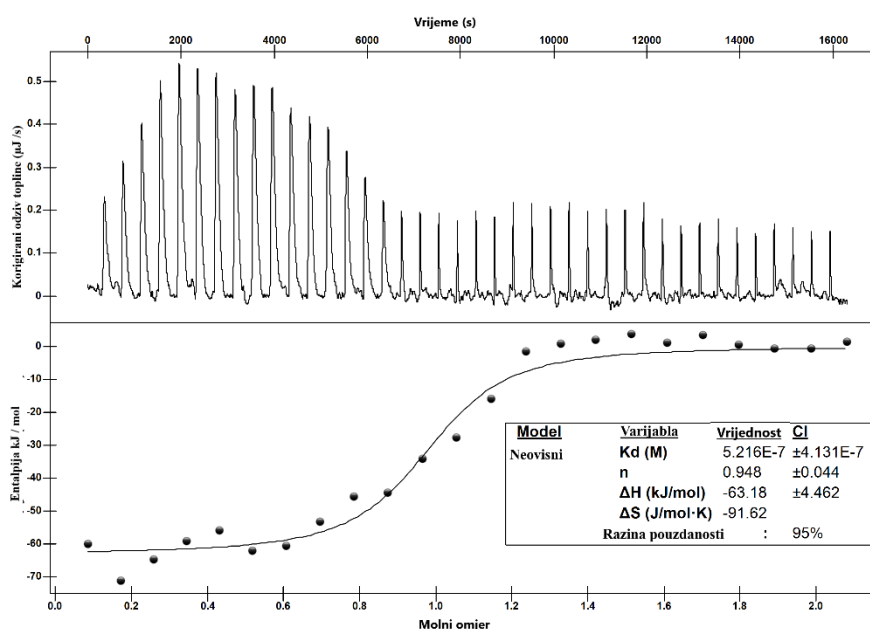


Slika 32. Prikaz stabilizacije fosfatne skupine IMP-a kada je GTP prisutan u aktivnom mjestu AdSS iz bakterije *H. pylori* preko vodikovih veza s R*135 i S231. Sivom bojom je prikazan protein, GTP je prikazan štapićima – narančasto, IMP je prikazan štapićima – ružičasto.

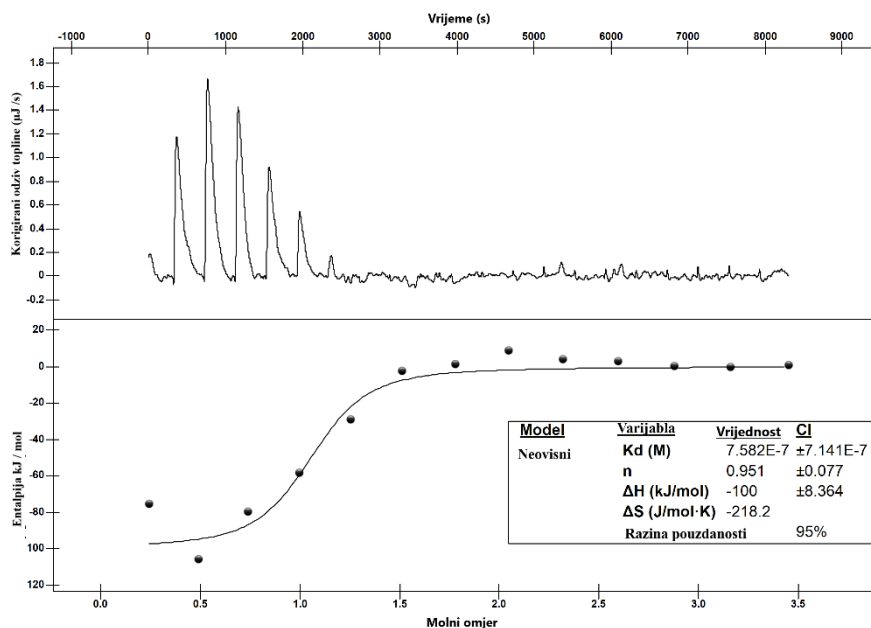
4.4.3. Računanje energije vezanja MMGBSA

Aktivno mjesto enzima je dodatno okarakterizirano računanjem energije vezanja liganada (IMP i GTP) u aktivno mjesto enzima u različitim sustavima. Dobiveni rezultati MMGBSA energija su uspoređivani s eksperimentalno određenim termodinamičkim parametrima dobivenim izotermalnom titracijskom kalorimetrijom, ITC. Eksperimentalno dobivene vrijednosti ukazuju na to da su entalpijski doprinosi podjednaki za oba liganda (IMP i GTP), vidi u tablici 11, izračunate MMGBSA energije su također za oba liganda (tablica 10) približno jednake. ITC titracijama su opisana još dva sustava: (enzim inkubiran s GTP-om titrirano IMP-om) i (enzim inkubiran s IMP-om titriran GTP-om) kako bi se moglo vidjeti utječe li jedan vezani ligand na vezanje drugoga. Dobiveni podaci ukazuju na to da dolazi do gotovo trostrukog smanjenja reakcijske entalpije vezanja kod sustava gdje je enzim prethodno inkubiran IMP-om, a potom titriran GTP-om. Također, dolazi do gotovo četverostrukog smanjenja reakcijske entalpije vezanja kod sustava gdje je enzim prethodno inkubiran s GTP-

om, a potom titriran IMP-om. Dobiveni podaci ukazuju da se GTP gotovo trostruko čvršće veže u aktivno mjesto enzima kada je enzim zasićen IMP-om (slika 33) te da se IMP gotovo četverostruko čvršće veže u aktivno mjesto kada je enzim zasićen GTP-om (slika 34). Dakle jakost vezanja jednog liganda se sinergistički povećava vezanjem drugog liganda. Izračunate MMGBSA energije ukazuju na suprotno (tablica 10). Izračunate vrijednosti MMGBSA energija za GTP uz prisustvo IMP-a ukazuju da dolazi do povećanja MMGBSA energije u odnosu na sustav bez prisustva IMP-a, no te vrijednosti su unutar pogreške metode. Dok vrijednosti MMGBSA energija za IMP uz prisustvo GTP-a ukazuju na povećanje MMGBSA energija gotovo šest puta, štoviše to ukazuje da je nepovoljnije vezanje IMP-a u aktivno mjesto kada je u aktivnom mjestu već prisutan GTP.



Slika 33. Titracija AdSS iz bakterije *H. pylori* GTP-om uz prethodnu inkubaciju s IMP-om uz termodinamičke parametre dobivene ITC-om.



Slika 34. Titracija AdSS iz bakterije *H. pylori* IMP-om uz prethodnu inkubaciju s GTP-om uz termodinamičke parametre dobivene ITC-om.

Tablica 10. Srednja vrijednost izračunatih MMGBSA energija.

Sustav	MMGBSA / kJ mol ⁻¹
Enzim + GTP	-155 ± 43
Enzim + IMP	-142 ± 26
Enzim-IMP + GTP	-86 ± 48
Enzim-GTP + IMP	-24 ± 30

Tablica 11. Vrijednosti entalpije određene ITC mjerenjima za divlji tip AdSS.

Sustav	ΔH / kJ mol ⁻¹
Enzim + GTP	-23 ± 2
Enzim + IMP	-27 ± 1
Enzim-IMP + GTP	-64 ± 4
Enzim-GTP + IMP	-100 ± 8

Računate su energije vezanja i za sustave mutanata kako bi se mogao okarakterizirati dodatno utjecaj mutacije na vezanje liganda. Dobivene vrijednosti MMGBSA energije (tablica 12) za mutant S231A ukazuju da mutacija ne utječe na vezanje IMP, što je u skladu s

analizom geometrije struktura uzorkovanih tijekom molekulske dinamičke simulacije, u kojima je α -fosfatna skupina IMP-a stabilizirana preko vodikovih veza s R*135 i T121.

Tablica 12. Izračunate energije vezanja metodom MMGBSA za mutant S231A.

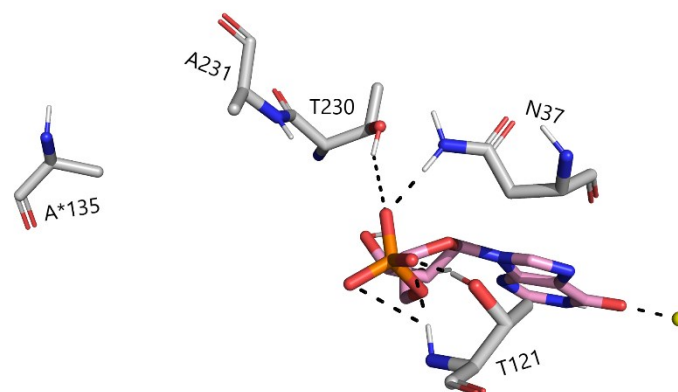
Sustav	MMGBSA / kJ mol ⁻¹
Enzim i IMP	-197 ± 26
Enzim-IMP i GTP	-150 ± 52

Također je računata MMGBSA energija za mutant Q215A kako bi se dodatno okarakterizirala uloga Q215 u stabilizaciji GTP-a. Izračunate MMGBSA energije (tablica 13) ukazuju da mutacija Q215A ne utječe na afinitet vezanja, što je također i potvrđeno rezultatima MD-a gdje su vodikove veze između Q215 i γ -fosfatne skupine očuvane i kod mutanta Q215A preko okosnice proteina.

Tablica 13. Izračunate energije vezanja metodom MMGBSA za mutant Q215A.

Sustav	MMGBSA / kJ mol ⁻¹
Enzim i GTP	-197 ± 47
Enzim-IMP i GTP	-102 ± 56

Također je računata MMGBSA energija za dvostruki mutant S231A/R*135A kako bi se vidio utjecaj mutacija na vezanje IMP-a u aktivno mjesto enzima. Izračunate MMGBSA energije (tablica 14) ukazuju na to da kod dvostrukog mutanta S213A/R*135A dolazi do drastičnog povećanja MMGBSA energije prema IMP-u u odnosu na divlji tip, što bi sugeriralo da je ova mutacija nepovoljna za vezanje IMP-a u aktivno mjesto. Gubitak vodikovih veza s R*135 djelomično se kompenzira preko vodikovih veza s T121 (slika 35). Također izračunata MMGBSA energija pokazuje da prisustvo GTP-a kompenzira efekt mutacije na vezanje IMP-a. Rezultati MD-a opisani u odlomku 4.3.2 su također u skladu s interpretacijom računatih MMGBSA energija za ovaj dvostruki mutant.



Slika 35. Stabilizacija α -fosfatne skupine IMP-a u dvostrukom mutantu R*135A/S231A. Sivom bojom je prikazan protein, IMP je prikazan štapićima – ružičasto. Magnezijev ion prikazan je kao sfera žute boje.

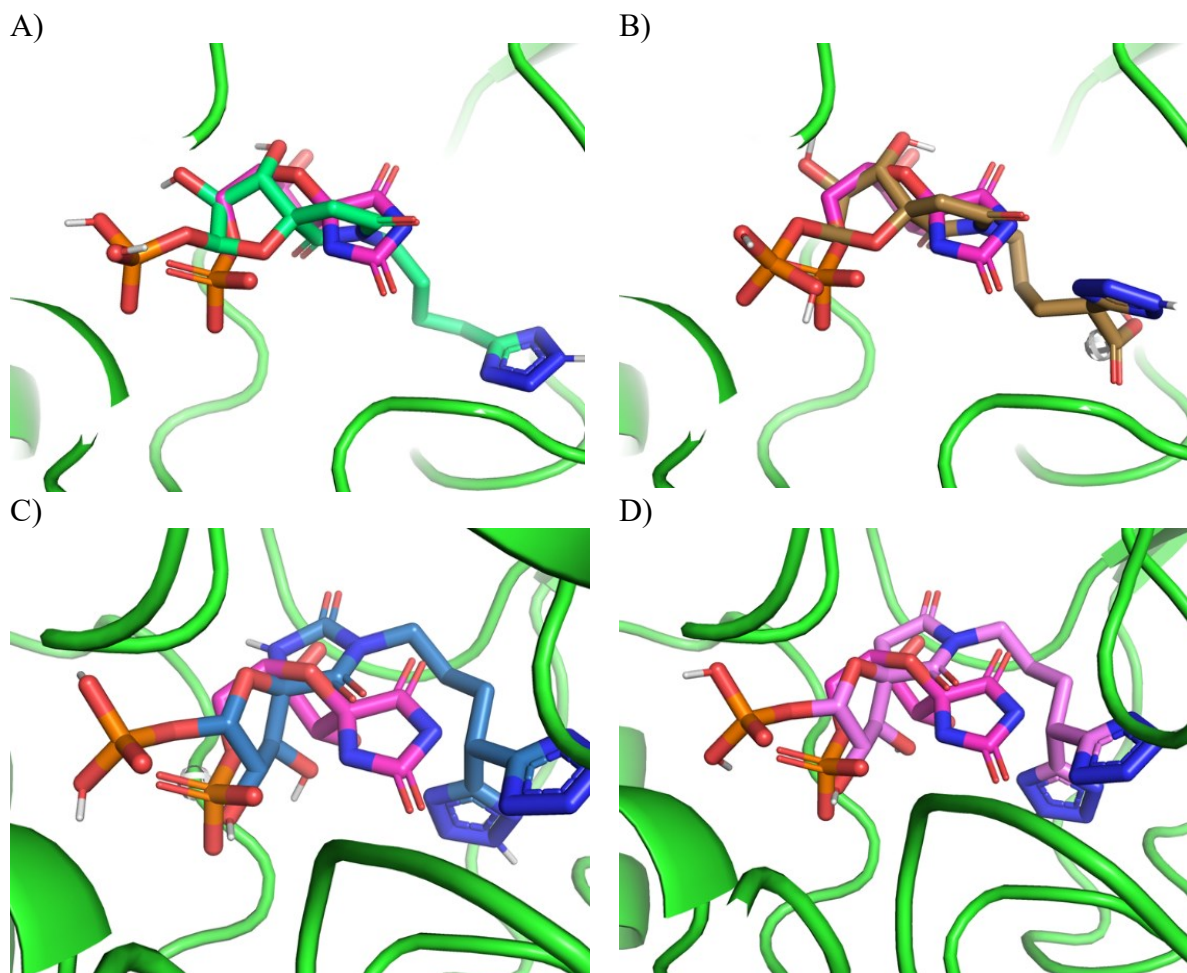
Tablica 14. Izračunate energije vezanja metodom MMGBSA za dvostruki mutant S231A/R*135A.

Sustav	MMGBSA / kJ mol^{-1}
Enzim i IMP	-3 ± 24
Enzim-GTP i IMP	-67 ± 47

4.4.4. Molekulsko uklapanje (docking)

Korištena je metoda molekulskog uklapanja za seriju spojeva (Dodatak: D-2) koji su analozi hidantocidina, kompetitivnog inhibitora AdSS prema IMP-u. Kompleksi dobiveni korištenjem AutoDock Vina programskog paketa su poredani na temelju najboljih rezultata (deset generiranih struktura kompleksa) i usporedbe s načinom vezanja prirodnog supstrata (IMP-a). Na temelju dobivenih rezultata i analize molekulskog uklapanja spojevi odabrani za daljnja ispitivanja su: PS6 (slika 35 A), PS8 (slika 35 B), PH7 (slika 35 C), PS7 (slika 35 D). U usporedbi s vezanjem hidantocidina u IMP-vezno mjesto (PDB: 1SOO), odabrani spojevi dodatno stabiliziraju enzim ostvarujući potencijalne polarne interakcije (vodikova veza) preko derivativnih funkcijskih skupina. To ukazuje na potencijalno bolji inhibicijski karakter u odnosu na hidantocidin. Svakako je potrebno dodatno računalno (MD) i eksperimentalno

okarakterizirati odabrane spojeve kako bi se dobio bolji uvid njihovog djelovanja na AdSS iz bakterije *H. pylori*.



Slika 36. Vežanje odabranih spojeva dobiveni molekulskim uklapanjem u aktivno mjesto enzima (vezno mjesto IMP-a) hidantocidin – magenta. A) spoj PS6 -zeleno B) spoj PS8 -smeđe C) spoj PH7 -plavo D) spoj PS7 -roza.

§ 5. ZAKLJUČAK

Adenilosukcinat-sintetaza iz bakterije *Helicobacter pylori* (AdSS) prekomjerno je eksprimirana u bakterijskim stanicama *Escherichia coli* te pročišćena ionskom kromatografijom i gel-filtracijom.

Adenilosukcinat-sintetaza iz bakterije *Helicobacter pylori* s histidinskim privjeskom na C-kraju (AdSS-His₆), prekomjerno je eksprimirana u bakterijskim stanicama *Escherichia coli* te pročišćena afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom.

Oba pročišćena enzima su karakterizirana obzirom na molekulsku masu, stabilnost i optimum djelovanja i ustanovljeno je da su im navedena svojstva slična. Na temelju određenih kinetičkih parametara prema sva tri supstrata, ustanovljeno je da nema značajne razlike između AdSS i AdSS-His₆. Određene su konstantne inhibicije poznatim inhibitorom i produktima reakcije AdSS: hadacidin ($K_i=0,19 \mu\text{mol L}^{-1}$), adenilosukcinat ($K_i=3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), GDP ($K_i=0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Priređeni su monokristali enzima AdSS-His₆ u kompleksu s ligandima (GTP, IMP, HDA, Mg) te je riješena kristalna struktura adenilosukcinat-sintetaze bakterije *H. pylori* u kompleksu pri rezoluciji od 1,4 Å. Usporedba s AdSS iz bakterije *E. coli* ukazuje na veliku sačuvanost aktivnog mjesta. Analizom dobivene strukture utvrđen je nastanak stabilnog intermedijera 6'-fosforil-IMP (IMO) u aktivnom mjestu enzima.

Simulacijama molekulske dinamike otkriveno je da prisustvom IMP-a u aktivnom mjestu dolazi do promjene konformacije GTP-vezujuće petlje (aminokiseline 40-50). Otkrivena je mreža vodikovih veza koja se proteže od N37 preko G39 nizvodno uz petlju pri čemu dolazi do stabilizacije molekule GTP-a.

Simulacije ukazuju da je pozicioniranje IMP-a dublje u aktivno mjesto postignuto stabilizacijom α -fosfatne skupine IMP-a vodikovim vezama s R*135 i S231. Računate MMGBSA za dvostrukog mutanta s R*135A i S231A ukazuju na esencijalnost interakcija između α -fosfatne skupine IMP-a s bočnim ogrankom R*135 i S231.

Rezultati molekularnog uklapanja otvaraju mogućnost daljnje karakterizacije AdSS-a te potencijalno nove inhibitore ove sintetaze.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

2-ME, 2-merkaptoetanol, β -merkaptoetanol

Å, ångström je fizikalna jedinica za duljinu; $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$

AMBER, Assisted Model Building and Energy Refinement

AMP, adenzin monofosfat

APS, amonijev persulfat

ATP, adenzin trifosfat

Bisakrilamid N,N'-metilenbisakrilamid

DMSO, dimetilsulfoksid

DNA, deoksiribonukleinska kiselina

dNTP, deoksinukleozid trifosfat

DTT, ditioteitol

EDTA, etilendiaminotetraoctene kiseline

GDP, gvanozin difosfat

GMP, gvanozin monofosfat

GTP, gvanozin trifosfat

HDA, hadacidin

HEPES, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina

IMAC, Immobilized metal ion affinity chromatography

IMO, 6'-fosforil IMP

IMP, inozin monofosfat

invPCR, inverzna lančana reakcija polimerazom

IPTG, izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid

LB, Luria-Bertani hranjiva podloga

LB/amp, LB hranjiva podloga s ampicilinom koncentracije $100 \mu\text{g mL}^{-1}$

MD, molekulska dinamika

miliQ, deionizirana voda niske vodljivosti proizvedena na sustavu za proizvodnju deionizirane vode *Millipore*

MMGBSA, metoda za izračun slobodne energije (eng. *molecular mechanics-Generalized Born surface area*)

Na-PO₄, fosfatni pufer (komponente H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻)

NPT, izotermno-izobarni ansambl

NVT, kanonski ansambl

PAGE, elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (eng. *polyacrylamide gel electrophoresis*)

PCR, lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

PDB, proteinska baza podataka (eng. *Protein Data Bank*)

PEG, polietilen-glikol

PMSF, fenilmetansulfonil-fluorid

R_g, radijus giracije

RMSD, korijen srednjeg kvadrata odstupanja (eng. *root mean square deviation*)

RMSD, korijen srednjeg kvadrata odstupanja (eng. *root mean square deviation*)

RMSF, korijen srednjeg kvadrata fluktuacija (eng. *root mean square fluctuation*)

rpm, broj okretaja po minuti (eng. *revolutions per minute*)

SDS, natrijev dodecilsulfat (eng. *sodium dodecyl sulphate*)

SHAKE, algoritam ograničavanja gibanja vodikovih atoma tijekom MD simulacija

TEMED, *N,N,N,N'*-tetrametilendiamin

TIP3P, modeli molekula vode u kojima su duljine veza i kutevi fiksirani, a elektrostatske interakcije definirane preko 3 točkasta naboja (eng. *transferrable intermolecular potential 3 point*)

Tris-HCl, Tris (hidroksimetil) aminometan hidrokloridni pufer

UV, ultraljubičasto zračenje

WT, divlji tip (eng. *wild type*)

POPIS AMINOKISELINA

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginska kiselina	Aps	D
Cistein	Cys	C
Fenilalanin	Phe	F
Glicin	Gly	G
Glutamin	Gln	Q
Glutaminska kiselina	Glu	E
Histidin	His	H
Izoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lizin	Lys	K
Metionin	Met	M
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Tirozin	Tyr	Y
Treonin	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Valin	Val	V

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. S. Nishiumi, M. Yoshida, i T. Azuma, *Microb. Pathog.* **109** (2017) 78–85.
2. B. J. Marshall, H. Royce, i D. I. Annear, *Microbios Lett.* **25** (1984) 83–88.
3. N. Figura, *Aliment. Pharmacol. Ther. Suppl.* **10** (1996) 79–96.
4. S. Ishaq, i L. Nunn, *Gastroenterol. Hepatol. from Bed to Bench* **8** (2015) S6–S14.
5. G. Liechti, i J. B. Goldberg, *J. Bacteriol.* **194** (2012) 839–854.
6. S. L. Hazell, i G. L. Mendz, *Helicobacter* **2** (1997) 1–12.
7. M. M. Stayton, F. B. Rudolph, i H. J. Fromm, *Curr. Top. Cell. Regul.* **22** (1983) 103–141.
8. M. B. Bass, H. J. Fromm, i M. M. Stayton, *Arch. Biochem. Biophys.* **256** (1987) 335–342.
9. O. M. Guicherit, B. F. Cooper, F. B. Rudolph, i R. E. Kellems, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 4488–4496.
10. R. B. Honzatko, M. M. Stayton, i H. J. Fromm, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. Part A Mech. Enzym. Action* **73** (1999) 57–102.
11. C. S. Goodwin, i B. W. Worsley, *Gastroenterol. Clin. North Am.* **22** (1993) 5–19.
12. J. C. Rain, L. Selig, H. De Reuse, V. Battaglia, C. Reverdy, S. Simon, G. Lenzen, F. Petel, J. Wojcik, V. Schächter, Y. Chemama, A. Labigne, i P. Legrain, *Nature* **409** (2001) 211–215.
13. P. B. Ernst, D. A. Peura, i S. E. Crowe, *Gastroenterology* **130** (2006) 188–206.
14. M. R. Amieva, i E. M. El-Omar, *Gastroenterology* **134** (2008) 306–323.
15. H. L. T. Mobley, *Aliment. Pharmacol. Ther. Suppl.* **10** (1996) 57–64.
16. D. L. Weeks, S. Eskandari, D. R. Scott, i G. Sachs, *Science (80-.)*. **287** (2000) 482–485.
17. M. Kawakubo, Y. Ito, Y. Okimura, M. Kobayashi, K. Sakura, S. Kasama, M. N. Fukuda, M. Fukuda, T. Katsuyama, i J. Nakayama, *Science (80-.)*. **305** (2004) 1003–1006.
18. H. L. T. Mobley, R. Hunt, M. Go, B. Dunn, J. Freston, A. Cutler, J. Goldstein, P. Ernst, D. Cave, i N. Vakil, *Am. J. Med.* **100** (1996) 2S-9S.
19. R. P. H. Logan, *Aliment. Pharmacol. Ther. Suppl.* **10** (1996) 3–15.
20. T. Wadstrom, S. Hirno, i T. Boren, *Aliment. Pharmacol. Ther. Suppl.* **10** (1996) 17–27.
21. L. T. Hu, i H. L. T. Mobley, *Infect. Immun.* **58** (1990) 992–998.

22. M. Nilius, i P. Malfertheiner, *Aliment. Pharmacol. Ther. Suppl.* **1** (1996) 65–71.
23. R. E. Pounder, i D. Ng, *Aliment. Pharmacol. Ther. Suppl.* **9** (1995) 33–39.
24. D. R. Cave, M. Go, A. Cutler, J. Goldstein, B. Dunn, H. Mobley, J. Barkin, B. Fennerty, R. Hunt, D. Peura, i R. Ganz, *Am. J. Med.* **100** (1996) 12S-17S.
25. B. Linz, F. Balloux, Y. Moodley, A. Manica, H. Liu, P. Roumagnac, D. Falush, C. Stamer, F. Prugnolle, S. W. Van Der Merwe, Y. Yamaoka, D. Y. Graham, E. Perez-Trallero, T. Wadstrom, S. Suerbaum, i M. Achtman, *Nature* **445** (2007) 915–918.
26. S. Perry, M. D. L. L. Sanchez, S. Yang, T. D. Haggerty, P. Hurst, G. Perez-Perez, i J. Parsonnet, *Emerg. Infect. Dis.* **12** (2006) 1701–1708.
27. R. H. Hunt, K. Sumanac, i J. Q. Huang, *Aliment. Pharmacol. Ther. Suppl.* **15** (2001) 51–59.
28. P. M. Webb, T. Knight, S. Greaves, A. Wilson, D. G. Newell, J. Elder, i D. Forman, *BMJ* **308** (1994) 750–753.
29. V. M. Riccardi, i J. I. Rotter, *Ann. Intern. Med.* **120** (1994) 1043–1045.
30. M. P. Dore, A. R. Sepulveda, H. El-Zimaity, Y. Yamaoka, M. S. Osato, K. Mototsugu, A. M. Nieddu, G. Realdi, i D. Y. Graham, *Am. J. Gastroenterol.* **96** (2001) 1396–1401.
31. N. Queralt, R. Bartolomé, i R. Araujo, *J. Appl. Microbiol.* **98** (2005) 889–895.
32. M. Siurala, K. Varis, i M. Wiljasalo, *Scand. J. Gastroenterol.* **1** (1966) 40–48.
33. K. Kimura, *Gastroenterology* **63** (1972) 584–592.
34. T. Watanabe, M. Tada, H. Nagi, S. Sasaki, i M. Nakao, *Gastroenterology* **115** (1998) 642–648.
35. J. Q. Huang, S. Sridhar, Y. Chen, i R. H. Hunt, *Gastroenterology* **114** (1998) 1169–1179.
36. L. E. Hansson, L. Engstrand, O. Nyrén, i A. Lindgren, *Gastroenterology* **109** (1995) 885–888.
37. U: IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.: (1994).
38. D. Forman, M. Coleman, G. De Backer, J. Elder, H. Moller, L. Cayolla da Motta, P. Roy, L. Abid, A. Tjonneland, H. Boeing, T. Haubrich, J. Wahrendorf, O. Manousos, H. Tulinius, H. Ogmundsdottir, D. Palli, F. Cipriani, A. Fukao, S. Tsugane, Y. Miyajima, W. Zatonski, J. Tyczynski, J. Calheiros, M. Primic Zakelj, M. Potocnik, P. Webb, T. Knight, A. Wilson, S. Kaye, J. Potter, D. G. Newell, i K. Hengels, *Lancet* **341** (1993) 1359–1362.
39. G. D. Eslick, L. L. Y. Lim, J. E. Byles, H. H. X. Xia, i N. J. Talley, *Am. J. Gastroenterol.*

- 94 (1999) 2373–2379.
40. E. A. Argueta, i S. F. Moss, *Curr. Opin. Gastroenterol.* **36** (2020).
 41. R. M. Zagari, S. Rabitti, L. H. Eusebi, i F. Bazzoli, *Eur. J. Clin. Invest.* **48** (2018).
 42. L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2903–2928.
 43. K. M. Sanders, T. A. Stern, P. T. O'gara, T. S. Field, S. L. Rauch, R. E. Lipson, i K. A. Eagle, *Psychosomatics* **33** (1992) 35–44.
 44. A. Bubić, N. Mrnjavac, I. Stuparević, M. Łyczek, B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska, M. Luić, i I. Lešćić Ašler, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **33** (2018) 1405–1414.
 45. Y. Matsuda, H. Ogawa, S. Fukutome, H. Shiraki, i H. Nakagawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78** (1977) 766–771.
 46. J. M. Boitz, R. Strasser, P. A. Yates, A. Jardim, i B. Ullman, *J. Biol. Chem.* **288** (2013) 8977–8990.
 47. M. Mercedes Silva, B. W. Poland, C. R. Hoffman, H. J. Fromm, i R. B. Honzatko, *J. Mol. Biol.* **254** (1995) 431–446.
 48. B. W. Poland, H. J. Fromm, i R. B. Honzatko, *J. Mol. Biol.* **264** (1996) 1013–1027.
 49. W. Wang, A. Gorrell, Z. Hou, R. B. Honzatko, i H. J. Fromm, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 16000–16004.
 50. M. B. Bass, H. J. Fromm, i F. B. Rudolph, *J. Biol. Chem.* **259** (1984) 12330–12333.
 51. R. B. Honzatko, i H. J. Fromm, *Arch. Biochem. Biophys.* **370** (1999) 1–8.
 52. F. B. Rudolph, i H. J. Fromm, *J. Biol. Chem.* **244** (1969) 3832–3839.
 53. R. W. Miller, i J. Buchanan, *J. Biol. Chem.* **237** (1962) 491–496.
 54. I. Lieberman, *J. Biol. Chem.* **223** (1956) 327–339.
 55. H. J. Fromm, *BBA - Biochim. Biophys. Acta* **29** (1958) 255–262.
 56. G. D. Markham, i G. H. Reed, *J. Biol. Chem.* **253** (1978) 6184–6189.
 57. J. Y. Choe, B. W. Poland, H. J. Fromm, i R. B. Honzatko, *Biochemistry* **38** (1999) 6953–6961.
 58. T. Tandarić, Računalno istraživanje mehanizma ireverzibilne inhibicije enzima monoamin-oksidge b, 2021.
 59. C. Wang, D. Greene, L. Xiao, R. Qi, i R. Luo, *Front. Mol. Biosci.* **10** (2018) A87.
 60. H. Y. Sun, T. J. Hou, i H. Y. Zhang, *Drug Discov. Today* **19** (2014) 1836–1840.
 61. M. Fuxreiter, C. Magyar, T. Juhász, Z. Szeltner, L. Polgár, i I. Simon, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **60** (2005) 504–512.

62. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **7** (1976) 248–254.
63. E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, i A. Bairoch, *The Proteomics Protocols Handbook* (2005).
64. U. K. Laemmli, *Nature* **227** (1970) 680–685.
65. H. T. K. Britton, i R. A. Robinson, *J. Chem. Soc.* **0** (1923) 1456–1462.
66. GraphPad Software Inc. San Diego CA, (bez dat.).
67. I. Sabljčić, Structural characterization of dipeptidyl peptidase III from the bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron* Strukturna karakterizacija dipeptidil-peptidaze III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*, 2018.
68. W. Kabsch, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66** (2010) 125–132.
69. A. A. Vagin, i M. N. Isupov, *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.* **57** (2001) 1451–1456.
70. A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, i R. J. Read, *J. Appl. Crystallogr.* **40** (2007) 658–674.
71. K. Cowtan, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **62** (2006) 1002–1011.
72. G. Chojnowski, K. Choudhury, P. Heuser, E. Sobolev, J. Pereira, U. Oezugurel, i V. S. Lamzin, *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **76** (2020) 248–260.
73. G. N. Murshudov, P. Skubák, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long, i A. A. Vagin, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67** (2011) 355–367.
74. A. A. Vagin, R. A. Steiner, A. A. Lebedev, L. Potterton, S. McNicholas, F. Long, i G. N. Murshudov, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60** (2004) 2184–2195.
75. D. Liebschner, P. V. Afonine, M. L. Baker, G. Bunkoczi, V. B. Chen, T. I. Croll, B. Hintze, L. W. Hung, S. Jain, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. D. Oeffner, B. K. Poon, M. G. Prisant, R. J. Read, J. S. Richardson, D. C. Richardson, M. D. Sammito, O. V. Sobolev, D. H. Stockwell, T. C. Terwilliger, A. G. Urzhumtsev, L. L. Videau, C. J. Williams, i P. D. Adams, *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **75** (2019) 861–877.
76. P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, i K. Cowtan, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66** (2010) 486–501.
77. N. W. Moriarty, P. A. Janowski, J. M. Swails, H. Nguyen, J. S. Richardson, D. A. Case, i P. D. Adams, *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **76** (2020) 51–62.
78. The PyMOL Molecular Graphics System, (2002).

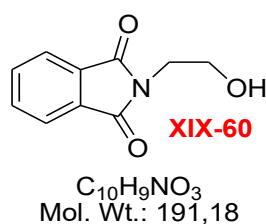
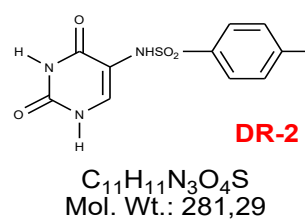
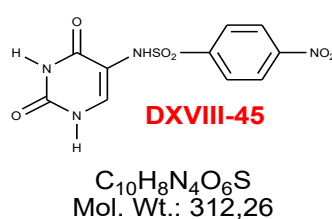
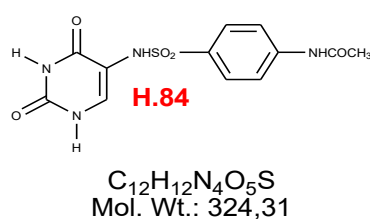
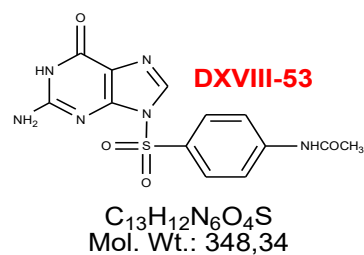
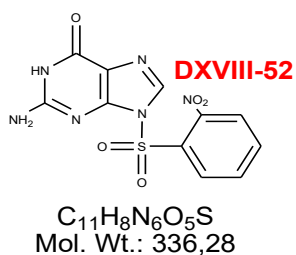
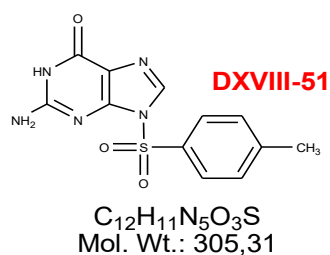
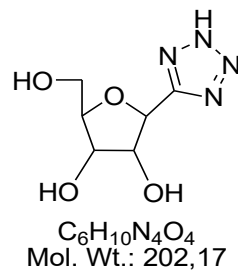
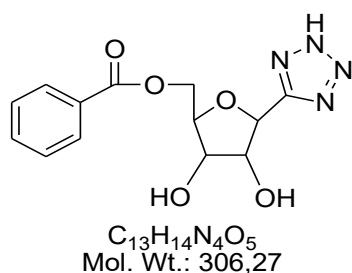
79. J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser, i C. Simmerling, *J. Chem. Theory Comput.* **11** (2015) 3696–3713.
80. D. A. Case, R. M. Betz, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham, T. A. Darden, R. E. Duke, T. J. Giese, H. Gohlke, A. W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K. M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H. T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C. L. Simmerling, W. M. Botello-Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, P. A. Kollman, (2016), i A. U. of F. California, (bez dat.).
81. D. A. Case, T. A. Darden, C. L. Cheatham, T. E. III Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, M. Crowley, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossváry, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, X. Wu, T. Brozell, S. R. Steinbrecher, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, D. H. Mathews, M. G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, i K. A., (2021) University of California.
82. R. L. Davidchack, R. Handel, i M. V. Tretyakov, *J. Chem. Phys.* **130** (2009).
83. R. L. Davidchack, T. E. Ouldridge, i M. V. Tretyakov, *J. Chem. Phys.* **142** (2015).
84. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Van Gunsteren, A. Dinola, i J. R. Haak, *J. Chem. Phys.* **81** (1984).
85. K. Zhu, T. Day, D. Warshaviak, C. Murrett, R. Friesner, i D. Pearlman, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **82** (2014) 1646–1655.
86. J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, i D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **56531** (2004) 1157–1174.
87. J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman, i D. A. Case, *J. Mol. Graph. Model.* **25** (2006) 247–260.
88. D. R. Roe, i T. E. Cheatham, *J. Chem. Theory Comput.* **9** (2013) 3084–3095.
89. W. Humphrey, A. Dalke, i K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **14** (1996) 33–38.
90. J. Stone, J. Gullingsrud, P. Grayson, i K. Schulten, u: 2001 ACM Symp. Interact. 3D Graph., J. F. Hughes, i C. H. Séquin (ur.): (ACM SIGGRAPH, New York, 2001), str. 191–194.
91. J. Eargle, D. Wright, i Z. Luthey-Schulten, *Bioinformatics* **22** (2006) 504–506.
92. J. Stone, An Efficient Library for Parallel Ray Tracing and Animation, Computer

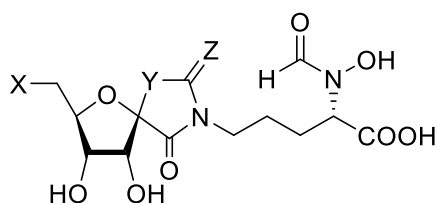
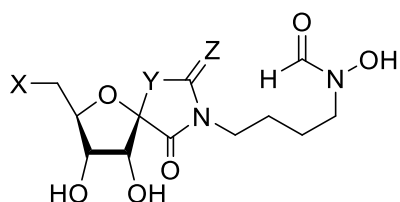
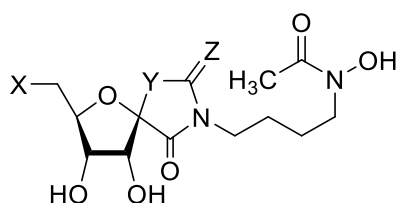
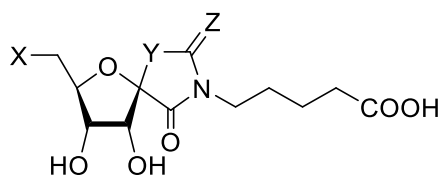
- Science Department, University of Missouri-Rolla, 1998.
93. D. Frishman, i P. Argos, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **23** (1995) 566–579.
 94. A. Varshney, F. P. Brooks, i W. V Wright, *IEEE Comput. Graph. Appl.* **14** (1994) 19–25.
 95. R. Sharma, M. Zeller, V. I. Pavlovic, T. S. Huang, Z. Lo, S. Chu, Y. Zhao, J. C. Phillips, i K. Schulten, u: (2000), str. 29–37.
 96. M. Sanner, A. Olsen, i J.-C. Spehner, *Fast and Robust Computation of Molecular Surfaces* (ACM, New York, 1995).
 97. B. R. Miller, T. D. McGee, J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke, i A. E. Roitberg, *J. Chem. Theory Comput.* **8** (2012) 3314–3321.
 98. A. Onufriev, D. Bashford, i D. A. Case, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **55** (2004) 383–394.
 99. R. Huey, G. M. Morris, i S. Forli, *Scripps Res. Inst. Mol.* (2012).
 100. J. F. Tomb, O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, i J. Craig Venter, *Nature* **388** (1997) 539–547.
 101. B. W. Poland, S. F. Lee, M. V. Subramanian, D. L. Siehl, R. J. Anderson, H. J. Fromm, i R. B. Honzatko, *Biochemistry* **35** (1996) 15753–15759.
 102. A. Gorrell, W. Wang, E. Underbakke, Z. Hou, R. B. Honzatko, i H. J. Fromm, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 8817–8821.
 103. M. R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel, i D. F. Hochstrasser, *Methods Mol. Biol.* **112** (1999) 531–552.
 104. R. Jayalakshmi, K. Sumathy, i H. Balaram, *Protein Expr. Purif.* **25** (2002) 65–72.
 105. J. S. Barton, *Biochem. Educ.* **7** (1979) 13–14.
 106. S. Mehrotra, i H. Balaram, *Biochemistry* **46** (2007) 12821–12832.
 107. E. A. Kaczka, C. O. Gitterman, E. L. Dulaney, i K. Folkers, *Biochemistry* **1** (1962) 340–343.
 108. G. D. Markham, i G. H. Reed, *Arch. Biochem. Biophys.* **184** (1977) 24–35.

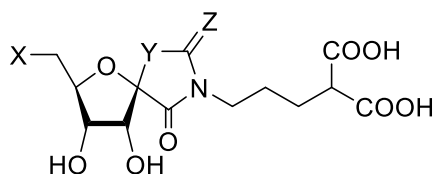
-
109. J. Raman, S. Mehrotra, R. P. Anand, i H. Balaram, *Mol. Biochem. Parasitol.* **138** (2004) 1–8.
110. A. Petek, Utjecaj afinitetnog privjeska na svojstva adenilosukcinat-sintetaze iz bakterije *Helicobacter pylori*, 2020.
111. Z. Hou, W. Wang, H. J. Fromm, i R. B. Honzatko, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 5970–5976.
112. V. Karnawat, S. Mehrotra, H. Balaram, i M. Puranik, *Biochemistry* **55** (2016) 2491–2499.

§ 8. DODATAK

D-1. Strukturne formule spojeva korištenih kao potencijalni inhibitori za AdSS iz bakterije *H. pylori*



D-2. Strukturne formule spojeva korištene za molekulska uklapanje.**H1** X = OH, Y = NH, Z = O**PH1** X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = O**T1** X = OH, Y = NH, Z = S**PT1** X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = S**S1** X = OH, Y = CH₂, Z = O**PS1** X = OPO(OH)₂, Y = CH₂, Z = O**H2** X = OH, Y = NH, Z = O**PH2** X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = O**T2** X = OH, Y = NH, Z = S**PT2** X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = S**S2** X = OH, Y = CH₂, Z = O**PS2** X = OPO(OH)₂, Y = CH₂, Z = O**H3** X = OH, Y = NH, Z = O**PH3** X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = O**T3** X = OH, Y = NH, Z = S**PT3** X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = S**S3** X = OH, Y = CH₂, Z = O**PS3** X = OPO(OH)₂, Y = CH₂, Z = O**H4** X = OH, Y = NH, Z = O**PH4** X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = O**T4** X = OH, Y = NH, Z = S**PT4** X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = S**S4** X = OH, Y = CH₂, Z = O**PS4** X = OPO(OH)₂, Y = CH₂, Z = O



H5 X = OH, Y = NH, Z = O

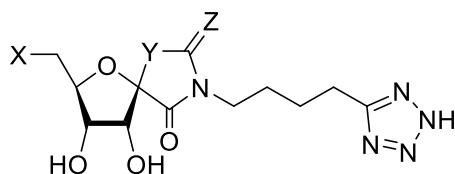
PH5 X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = O

T5 X = OH, Y = NH, Z = S

PT5 X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = S

S5 X = OH, Y = CH₂, Z = O

PS5 X = OPO(OH)₂, Y = CH₂, Z = O



H6 X = OH, Y = NH, Z = O

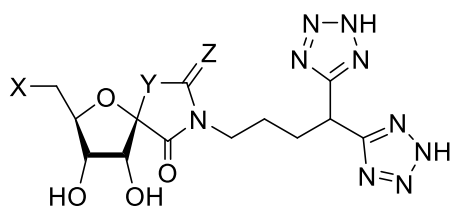
PH6 X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = O

T6 X = OH, Y = NH, Z = S

PT6 X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = S

S6 X = OH, Y = CH₂, Z = O

PS6 X = OPO(OH)₂, Y = CH₂, Z = O



H7 X = OH, Y = NH, Z = O

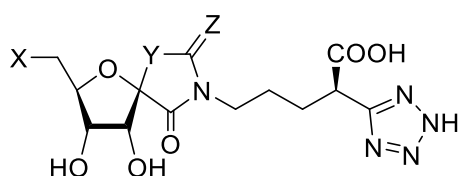
PH7 X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = O

T7 X = OH, Y = NH, Z = S

PT7 X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = S

S7 X = OH, Y = CH₂, Z = O

PS7 X = OPO(OH)₂, Y = CH₂, Z = O



H8 X = OH, Y = NH, Z = O

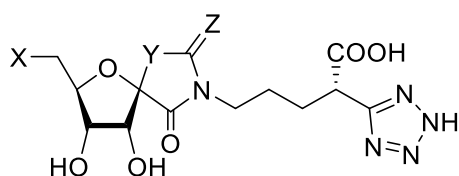
PH8 X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = O

T8 X = OH, Y = NH, Z = S

PT8 X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = S

S8 X = OH, Y = CH₂, Z = O

PS8 X = OPO(OH)₂, Y = CH₂, Z = O



H9 X = OH, Y = NH, Z = O

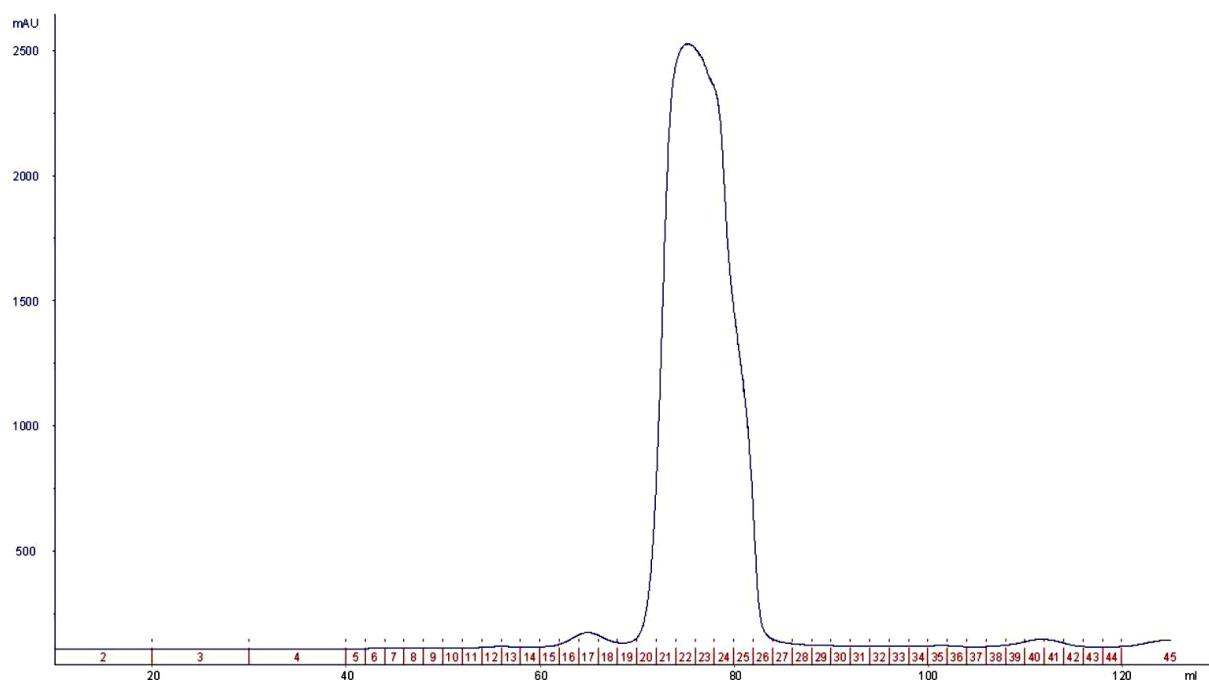
PH9 X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = O

T9 X = OH, Y = NH, Z = S

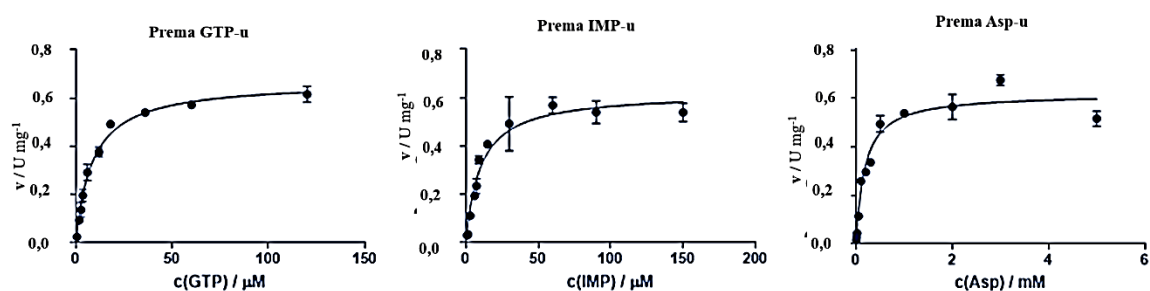
PT9 X = OPO(OH)₂, Y = NH, Z = S

S9 X = OH, Y = CH₂, Z = O

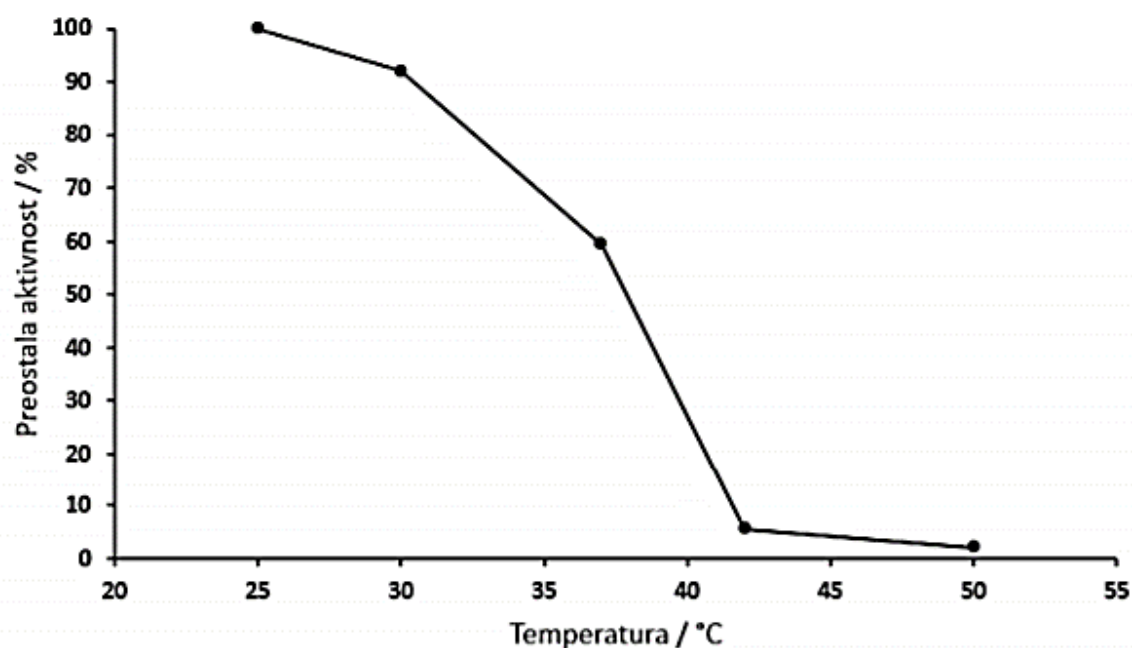
PS9 X = OPO(OH)₂, Y = CH₂, Z = O



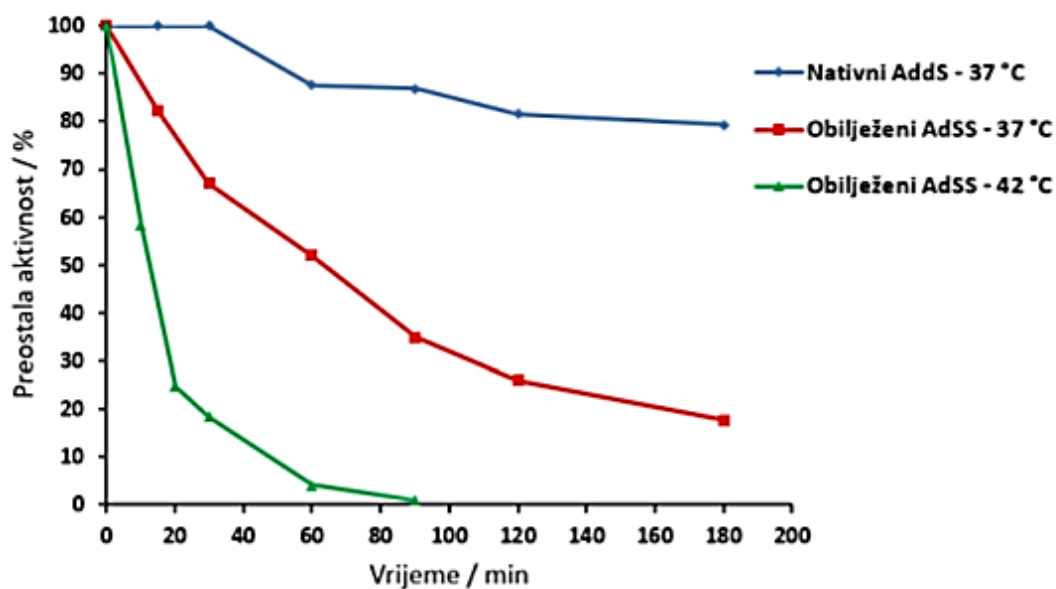
D-Slika 1. Kromatogram gel filtracije spojenih frakcija proteina E3 i E4 nakon afinitetne kromatografije AdSS-His₆ iz bakterije *H. pylori*. (Preuzeto: Ana Petek, *Diplomski rad*, 2020.)



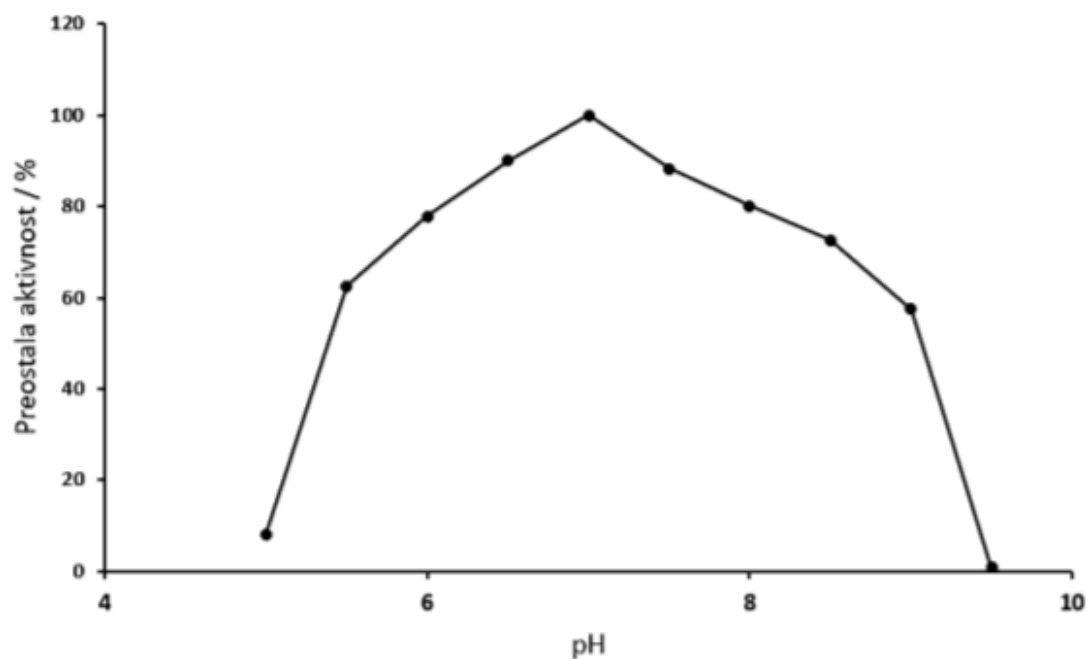
D-Slika 2. Ovisnost početne brzine reakcije AdSS iz bakterije *H. pylori* o koncentraciji supstrata dobiveni nelinearnom regresijom prema *Michaelis-Menteninom* modelu. lijevo-prema GTP-u, sredina-prema IMP-u, desno-prema Asp-u



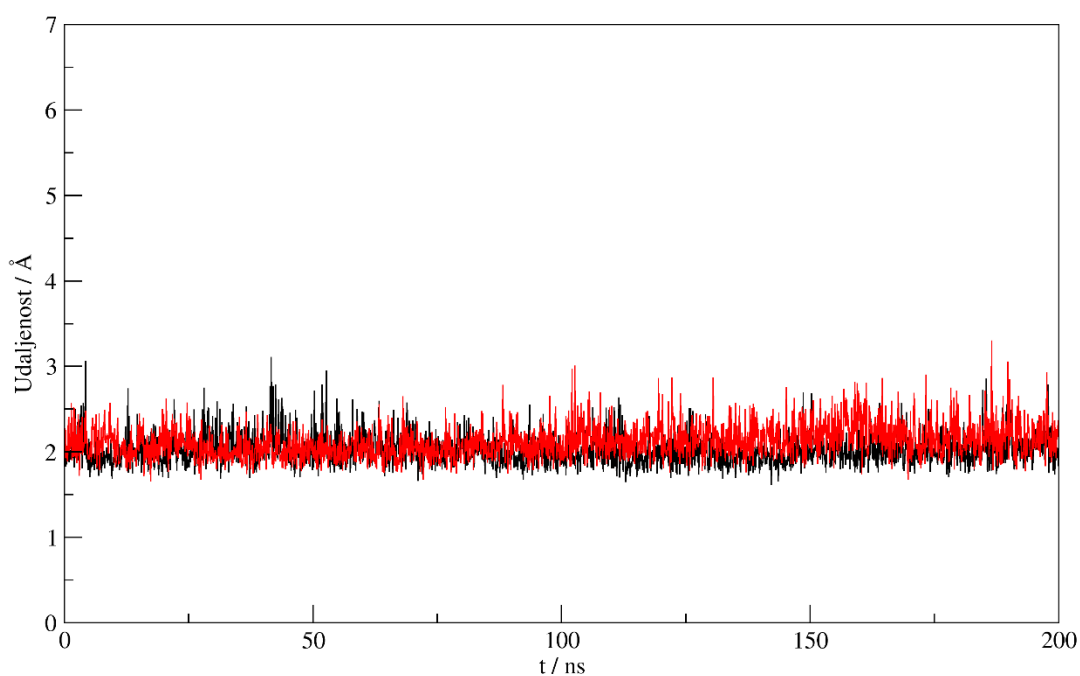
D-Slika 3. Utjecaj temperature na stabilnost AdSS obilježenog afinitetnim privjeskom (His)₆. (Preuzeto: *Diplomski rad, Ana Petek, 2020.*)



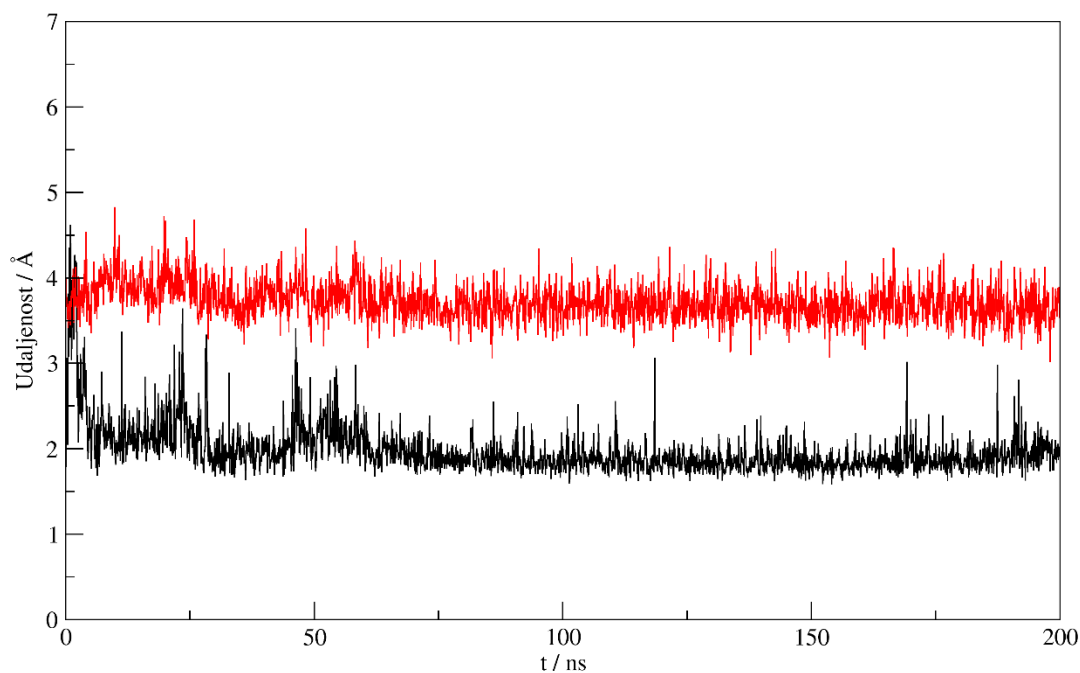
D-Slika 4. Aktivnost AdSS-a u ovisnosti o vremenu inkubacije pri dvjema različitim temperaturama. Plavom bojom označena je krivulja za nativni AdSS pri 37 °C, crvenom bojom je označena krivulja za obilježeni AdSS pri 37 °C i zelena boja označava obilježeni AdSS pri 42 °C (Preuzeto: *Ana Petek, Diplomski rad, 2020*)



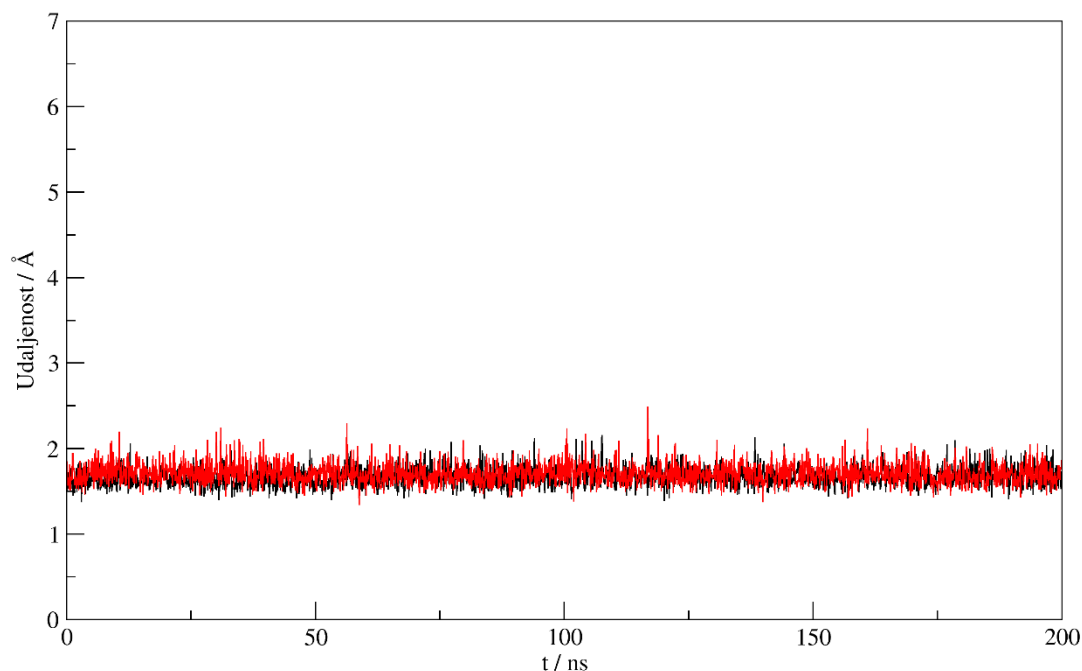
D-Slika 5. Utjecaj pH na stabilnost AdSS-a obilježenog afinitetnim privjeskom (His)₆. (Preuzeto: Ana Petek, *Diplomski rad*, 2020)



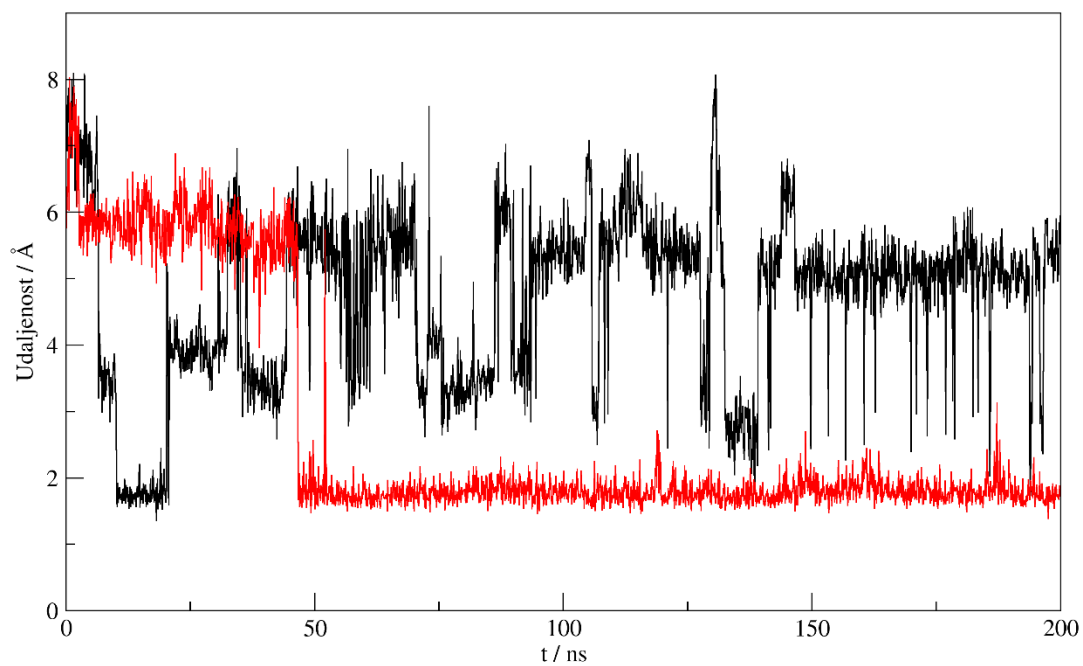
D-Slika 6. Vodikova veza između kisika GTP-a (O2B) i vodika G14 iz okosnice proteina. Crno – simulacija s GTP-om. Crveno – simulacija s GTP-om uz prisustvo IMP-a u aktivnom mjestu.



D-Slika 7. Vodikova veza između kisika GTP-a (O7) i vodika G39 iz okosnice proteina. Crno – simulacija s GTP-om. Crveno – simulacija s GTP-om uz prisustvo IMP-a u aktivnom mjestu.



D-Slika 8. Vodikova veza između kisika GTP-a (O6) i bočnog ogranka S400 iz okosnice proteina. Crno – simulacija s GTP-om. Crveno – simulacija s GTP-om uz prisustvo IMP-a u aktivnom mjestu.



D-Slika 9. Vodikova veza između α -fosfatne skupine IMP-a i bočnog ogranka S231 iz okosnice proteina. Crno – simulacija s IMP-om. Crveno – simulacija s IMP-om uz prisustvo GTP-a u aktivnom mjestu.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Ante Bubić

Datum rođenja: 14. ožujka, 1993.

Mjesto rođenja: Split, Hrvatska

Radno iskustvo:

2017.- danas Institut Ruđer Bošković, asistent, Zavod za fizičku kemiju, Laboratorij za kemijsku i biološku kristalografiju.

Školovanje:

2017.- danas Student na poslijediplomskom studiju, smjer biokemija

Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2014. - 2017. dipl. mag. kemije Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad: Analiza stabilnosti glikozilacije imunoglobulina G tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa, Mentor: prof. dr. sc. Gordan Lauc

Sudjelovanje u nastavi:

2017. - 2018. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

(Asistent na Zavodu za fizikalnu kemiju)

Znanstveno usavršavanje izvan Hrvatske:

Studeni 2019. – Ožujak 2020. Institute of Molecular Biosciences, Karl Franzens Sveučilište Graz, Austrija

Strani jezici:

Engleski

Članstva:

Hrvatsko kemijsko društvo

Hrvatska kristalografska zajednica

Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju

Nagrade i stipendije:

2019. - Nagrada za najbolje posterko priopćenje – Simpozij doktoranada PMF, Zagreb

Publikacije:

1. **A. Bubić**, N. Mrnjavac, I. Stuparević, M. Łyczek, B. Wielgus-Kutrowska, A. Bzowska, M. Luić, i I. Leščić Ašler, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **33** (2018) 1405–1414.

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. **A. Bubić**, Z. Štefanić, B. Bertoša, I. Leščić Ašler: “Adenylosuccinate synthetase from *Helicobacter pylori*: characterization of active site using x-ray diffraction and molecular dynamics simulations” - postersko priopćenje (2021) – 27HSKIKI, Lošinj, Hrvatska
2. **A. Bubić**, B. Bertoša, I. Leščić Ašler, M. Luić: “Experimental and in silico Characterization of Adenylosuccinate Synthetase from Pathogen *Helicobacter pylori*” - poster (2019) – Structural Bioinformatics (EMBL-EBI) Hinxton, UK
3. **A. Bubić**, B. Bertoša, I. Leščić Ašler, M. Luić: “Computational and Experimental Characterization of Adenylosuccinate Synthetase from *Helicobacter pylori*” - usmeno priopćenje (2019) – 26HSKIKI, Šibenik, Hrvatska
4. **A. Bubić**, I. Leščić Ašler, M. Luić: “Catalytic Properties of Adenylosuccinate Synthetase from Pathogen *Helicobacter pylori*” - poster (2018) – Ligand binding theory and practice (FEBS) – Nove Hrade, Češka