

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Omar NANEH

**IZOLACIJA, BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA
TER KRISTALIZACIJA UNIVERZALNEGA
STRESNEGA PROTEINA IZ *Mycobacterium smegmatis***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Omar NANEH

**IZOLACIJA, BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA TER
KRISTALIZACIJA UNIVERZALNEGA STRESNEGA PROTEINA IZ
*Mycobacterium smegmatis***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ISOLATION, BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND
CRYSTALLIZATION OF THE UNIVERSAL STRESS PROTEIN
FROM *Mycobacterium smegmatis***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biosintezo in biotransformacijo na Kemijskem inštitutu (Ljubljana), Centru za masno spektroskopijo, Odsek za znanosti o okolju, Inštitut Jožef Štefan (Ljubljana) in v multidisciplinarnem laboratoriju Elettra Sincrotrone Trieste S.C.p.A. di interesse nazionale (Trst, Italija).

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o dodiplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Tom Turk, za somentorico dr. Marjetka Podobnik, za recenzenta prof. dr. Gregor Anderluh ter za predsednika komisije prof. dr. David Stopar.

Mentor: prof. dr. Tom Turk

Somentorica: dr. Marjetka Podobnik

Recenzent: prof. dr. Gregor Anderluh

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Gregor Anderluh

Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za biosintezo in biotransformacijo

Član: dr. Marjetka Podobnik

Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za biosintezo in biotransformacijo

Član: prof. dr. Tom Turk

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Omar Naneh

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
 DK 577.112:579.22:548.73 (043)=163.6
 KG proteomika/izolacija proteinov/univerzalni stresni proteini/USP/Msmeg_4207/
 mikobakterije/*Mycobacterium smegmatis*/tuberkuloza/biokemijska
 karakterizacija/karakterizacija proteinov/acetilacija/kristalografija/cAMP
 AV NANEH, Omar
 SA TURK, Tom (mentor)/ PODOBNIK, Marjetka (somentorica)/ ANDERLUH,
 Gregor (recenzent)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
 mikrobiologije
 LI 2011
 IN IZOLACIJA, BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA TER KRISTALIZACIJA
 UNIVERZALNEGA STRESNEGA PROTEINA IZ *Mycobacterium smegmatis*
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP XVII, 80 str., 11 pregl., 36 sl., 6 pril., 102 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Msmeg_4207 je protein bakterije *Mycobacterium smegmatis* in spada v skupino
 univerzalnih stresnih proteinov (USP). Zapise za te proteine in njihove domene
 srečamo pri številnih organizmih, njihovo funkcijo pa povezujejo z zaščito pri
 celičnem stresu in virulenci nekaterih patogenih bakterij. Protein Msmeg_4207 je
 substrat acetiltransferaze Rv0998 pri *Mycobacterium tuberculosis* in njenem
 ortologu Msmeg_5458 pri *M. smegmatis*. Vloga USP-ja Msmeg_4207 je v takšni
 reakciji edinstvena. Omenjena Rv0998 in Msmeg_5458 imata vezavno domeno za
 sekundarno obveščevalno molekulo 3',5'-ciklični adenin monofosfat (cAMP), ki je
 podobna domenam sesalskih encimov vključenih v uravnavanje nekaterih
 pomembnih celičnih reakcij, poleg tega pa acetiltransferaze pri bakterijah
 uravnavajo nekatere znotrajcelične procese. Izdelali smo protokol, s katerim smo
 pridobili zadostno količino Msmeg_4207 in Msmeg_4207 označenega s selenom za
 določitev nekaterih biokemijskih značilnosti. Ugotovili smo, da je struktura
 proteina sestavljena tako iz alfa kot iz beta sekundarnih struktur. Masa njegove
 monomerne podenote ustreza 14 kDa, v nativni strukturi proteina pa se te podenote
 združujejo v tetramere. Takšna struktura je pri sobni temperaturi skozi čas stabilna,
 verjetno pride le do oslabitve zunanjih vezi med aminokislinami. Preučili smo tudi
 stopnjo reakcije acetilacije Msmeg_4207 z Msmeg_5458, ki je najvišja v
 prisotnosti cAMP, ter z masno spektrometrijo in visokotlačno tekočinsko
 kromatografijo ugotovili, da USP ne vsebuje majhnih nukleotidnih molekul kot je
 cAMP. Za določitev terciarne strukture z merjenjem sipanja X-žarkov smo
 ugotovili razmere pri katerih Msmeg_4207 kristalizira, s sinhrotronom pa pridobili
 uklonsko sliko kristalov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC 577.112:579.22:548.73 (043)=163.6
 CX proteomics/protein isolation/universal stress proteins/USP/Msmeg_4207/
 mycobacteria/*Mycobacterium smegmatis*/tuberculosis/biochemical
 characterization/protein characterization/acetylation/crystallography/cAMP
 AU NANEH, Omar
 AA TURK, Tom (supervisor)/ PODOBNIK, Marjetka (co-advisor)/ ANDERLUH,
 Gregor (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
 Microbiology
 PY 2011
 TY ISOLATION, BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND
 CRYSTALLIZATION OF THE UNIVERSAL STRESS PROTEIN FROM
Mycobacterium smegmatis
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XVII, 80 p., 11 tab., 36 fig., 6 ann., 102 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Msmeg_4207, synthesized by *Mycobacterium smegmatis*, belongs to a group of
 universal stress proteins (USP). USPs or conserved USP domains are present in
 many organisms. Their function is associated with cell stress respond and virulence
 of certain pathogenic bacteria. Protein Msmeg_4207 is a substrate for acetyl
 transferase Rv0998 of *Mycobacterium tuberculosis* and its ortholog Msmeg_5458
 of *M. smegmatis*. This reaction shows a unique role of USP. Abovementioned
 Rv0998 and Msmeg_5458 contain secondary messenger 3',5'-cyclic adenosine
 monophosphate (cAMP) binding domain, that shows similarities to domains of
 mammalian enzymes involved in the regulation of some important cell reactions.
 Furthermore bacterial acetyl transferases regulate some intracellular processes. We
 developed a protocol by which we obtained sufficient amount of Msmeg_4207 and
 selenomethionine labeled Msmeg_4207 for the determination of some biochemical
 characteristics of this protein. We found that the structure of the protein consists of
 both, alpha and beta secondary structures. Molecular mass of its monomer
 corresponds to 14 kDa and in the native structure of protein subunits combine into a
 tetramer. Protein structure is also stable at room temperature over time and in the
 structure probably occurs only a weakening of external links of amino acids. We
 confirmed that the rate of acetylation of Msmeg_4207 by Msmeg_5458 is increased
 in the presence of cAMP. By mass spectrometry and high-performance liquid
 chromatography we found, that Msmeg_4207 does not contain small nucleotide
 molecules such as cAMP. For tertiary structure determination by measuring the X-
 ray diffraction we found the crystallization conditions of Msmeg_4207 and with
 synchrotron radiation we obtained diffraction image of protein crystals.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
SLOVARČEK	XVII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKOBAKTERIJE	3
2.1.1 Povzročitelji tuberkuloze pri človeku in njihovo raziskovanje	3
2.1.2 cAMP pri mikobakterijah	4
2.2 UNIVERZALNI STRESNI PROTEINI	6
2.2.1 Odkritje, razširjenost in vloga	6
2.2.2 USP-ji v patogenih mikroorganizmih	9
2.2.3 USP-ji in mikobakterije	11
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIAL	14
3.1.1 Kemikalije	14
3.1.2 Večkomponentne raztopine, pufri in založne raztopine za kristalizacijo	15
3.1.3 Gojišča in mediji za rast bakterijskih celic	17
3.1.4 Laboratorijska oprema	18
3.1.5 DNA	21

3.1.6	Bakterijski sevi	21
3.1.7	Encimi	22
3.1.7.1	TEV proteaza	22
3.1.7.2	Msmeg_5458	22
3.2	METODE	23
3.2.1	Preparativne metode	23
3.2.1.1	Sterilizacija raztopin, gojišč in steklovine	23
3.2.1.2	Regeneracija, čiščenje in shranjevanje kromatografskih kolon	23
3.2.1.2.1	Ni-NTA kolona	23
3.2.1.2.2	Kolona za gelsko kromatografijo	24
3.2.1.3	Produkcija Msmeg_4207	24
3.2.1.3.1	Transformacija kompetentnih celic s plazmidno DNA	24
3.2.1.3.2	Izražanje rekombinantnega proteina in shranjevanje produkta postopka	25
3.2.1.3.3	Ekstrakcija topnih proteinov	25
3.2.1.4	Izolacija in čiščenje proteinov	26
3.2.1.4.1	Ni-NTA kromatografija raztopine proteinov	26
3.2.1.4.2	Dializa in cepitev s TEV proteazo	27
3.2.1.4.3	Ni-NTA kromatografija dializata	28
3.2.1.4.4	Koncentriranje proteinov s centrifugiranjem	28
3.2.1.4.5	Gelska kromatografija	28
3.2.1.4.6	Ocenjevanje koncentracije očiščenega proteina	29
3.2.1.4.7	Ultrafiltracija eluata gelske kromatografije in shranjevanje čistega proteinskega koncentrata	29
3.2.1.5	Produkcija, izolacija in čiščenje selenometioninskega derivata Msmeg_4207	30
3.2.2	Analitske metode	30
3.2.2.1	Analiza aminokislinskega zaporedja Msmeg_4207	30
3.2.2.2	Elektroforezne metode	31
3.2.2.2.1	NaDS-PAGE elektroforeza	31
3.2.2.2.2	Nativna elektroforeza	31
3.2.2.3	Preučevanje stabilnosti proteina	32
3.2.2.4	Molekulska masa proteina	32

3.2.2.5	Merjenje cirkularnega dikroizma	33
3.2.2.6	Analiza prisotnosti vezanih ligandov	34
3.2.2.6.1	Analiza z masno spektrometrijo	35
3.2.2.6.2	Analiza s HPLC	35
3.2.2.7	Encimska reakcija z acetiltransferazo	35
3.2.2.8	Kristalizacija, preverjanje in shranjevanje kristalov proteina	37
3.2.2.8.1	Kristalizacija proteina	37
3.2.2.8.2	Preverjanje pristnosti kristalov	41
3.2.2.8.3	Shranjevanje kristalov	42
3.2.2.8.4	Merjenje sipanja X-žarkov	42
4	REZULTATI	43
4.1	ANALIZA AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA	43
4.2	PRODUKCJA, IZOLACIJA IN ČIŠČENJE	44
4.2.1	Ni-NTA kromatografija raztopine proteinov	45
4.2.2	Dializa in cepitev s TEV proteazo	46
4.2.3	Ni-NTA kromatografija dializata	47
4.2.4	Gelska kromatografija	48
4.3	OPREDELITEV BIOKEMIJSKIH LASTNOSTI Msmeg_4207	49
4.3.1	Stabilnost	49
4.3.2	Molekulska masa	51
4.3.3	Merjenje cirkularnega dikroizma proteinske raztopine	52
4.3.4	Preverjanje prisotnosti vezanih ligandov pri Msmeg_4207	53
4.3.5	Encimska reakcija z acetiltransferazo	55
4.4	KRISTALIZACIJA, PREVERJANJE IN SHRANJEVANJE KRISTALOV PROTEINA	57
4.4.1	Kristalizacija proteina in shranjevanje kristalov	57
4.4.2	Preverjanje pristnosti kristalov	60
4.5	MERJENJE SIPANJA X-ŽARKOV	61
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	62
5.1	RAZPRAVA	62
5.2	SKLEPI	66
6	POVZETEK	67

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Odvisnost izražanja različnih USP-jev <i>M. tuberculosis</i> od stresnih razmer (Hingley-Wilson in sod., 2010: 238).	11
Preglednica 2: Uporabljene kemikalije in komercialno dostopni kompleti.	14
Preglednica 3: Stestavine pufrov, večkomponentnih raztopin in založnih raztopin, ki smo jih uporabljali pri delu.	15
Preglednica 4: Gojišča, ki smo jih uporabljali pri delu.	17
Preglednica 5: Uporabljena laboratorijska oprema.	18
Preglednica 6: Uporabljena bakterijska seva.	21
Preglednica 7: Raztopine, njihove koncentracije in količine, ki smo jih uporabili pri različnih stopnjah regeneracije Ni-NTA kolon.	24
Preglednica 8: Lastnosti topljencev z znanimi molekulskimi masami, ki smo jih uporabili za umeritev kolone.	33
Preglednica 9: Koncentracije dodanih komponent osnovi reakcijske mešanice pri posamezni reakciji.	37
Preglednica 10: Povprečne začetne hitrosti reakcij pri analizi reakcije z acetiltransferazo in njihove relativne napake.	55
Preglednica 11: Primerjave hitrosti različnih reakcij pri encimski reakciji z acetiltransferazo in njihova relativna napaka.	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Vloga cAMP pri mikobakterijah (Visweswariah, 2011: 27).	5
Slika 2: Filogenetski odnosi med različnimi USP-ji pri <i>E. coli</i> (Gustavsson in sod., 2002: 108).	6
Slika 3: Vloga različnih USP-jev pri <i>E. coli</i> (Nachin in sod., 2005: 6271).	7
Slika 4: Kristalni strukturi USP-jev. A – kristalna struktura MJ0577 (Zarembinski in sod., 1998: 15190). V strukturi je opaziti dve molekuli ATP in dva Mg ²⁺ iona; B – kristalna struktura UspA dimerov pri <i>H. influenzae</i> (Sousa in McKay, 2001: 1136).	8
Slika 5: Primerjava aminokislinskih zaporedij MJ0577 pri <i>M. jannaschii</i> (1MJH) in UspA pri <i>H. influenzae</i> (1JMV) s programom ClustalW2.	9
Slika 6: Struktura Rv2623 znotraj katere sta ATP in Mg ²⁺ (Drumm in sod., 2009: 7) (PDB dostopna koda 3CIS).	12
Slika 7: Motiv v aminokislinskih zaporedjih, ki je pomemben za vezavo ATP v nekaterih USP-jih <i>M. tuberculosis</i> (O'Toole in Williams, 2003: 389).	12
Slika 8: CD spektri različnih sekundarnih struktur proteinov (Kelly in sod., 2005: 121).	34
Slika 9: Shema reakcije z acetiltransferazo in spektrofotometričnega merjenja spremembe koncentracije NADH.	36
Slika 10: Shematska ilustracija faznega diagrama pri proteinski kristalizaciji (Chayen in Saridakis, 2008: 150).	38
Slika 11: Kristalizacija s tehniko viseče kapljice.	39
Slika 12: Oprema za kristalizacijo.	40
Slika 13: Zanka za lovljenje kristalov CryoLoop (Hampton Research).	42
Slika 14: Filogenetski odnosi med aminokislinskim zaporedjem Msmeg_4207 in njemu najbolj podobnimi zaporedji pridobljenimi z algoritmom BLAST.	43
Slika 15: Kristalna struktura USP-ja pri <i>Nitrosomonas europaea</i> (PDB dostopna koda 2PFS).	44
Slika 16: Napoved 3D strukture monomerne domene Msmeg_4207 na podlagi strukture proteina TTHA0895.	44

Slika 17: Kromatograma centrifugiranega in filtriranega celičnega homogenata (Ni-NTA kolona) pri izolaciji Msmeg_4207.	45
Slika 18: NaDS-PAGE elektroforeza vzorcev prvih faz produkcije, izolacije in čiščenja Msmeg_4207.	45
Slika 19: NaDS-PAGE elektroforeza vzorcev cepljenja s proteazo TEV in dialize raztopine z Msmeg_4207.	46
Slika 20: Kalibracijski graf za določanje molekulske mase s puščico označenih proteinov na sliki 19.	47
Slika 21: Kromatogram dializata na Ni-NTA koloni pri Msmeg_4207.	48
Slika 22: Kromatogram Msmeg_4207 na koloni Superdex 200.	48
Slika 23: NaDS-PAGE elektroforeza gelske kromatografije ultrafiltrata pri čiščenju Msmeg_4207.	49
Slika 24: Nativna elektroforeza vzorcev pridobljenih pri stabilnostnem testu.	50
Slika 25: NaDS-PAGE elektroforeza vzorcev pridobljenih pri stabilnostnem testu.	50
Slika 26: Kromatogram proteinov s standardnimi masami (A) v primerjavi s kromatogramom proteina Msmeg_4207 (B) na koloni Superdex 200 10/300 GL.	51
Slika 27: Kalibracijski graf za določanje molekulske mase Msmeg_4207 s kolono Superdex 200 10/300GL.	52
Slika 28: CD spekter Msmeg_4207 pri koncentraciji 0,1 – 0,2 mg/mL.	53
Slika 29: Masna spektrometrija Msmeg_4207.	54
Slika 30: HPLC analiza raztopine Msmeg_4207 v primerjavi z mešanico nukleotidnih molekul cAMP, 5'AMP in 3'AMP ter mešanico 5'AMP in 5'GMP.	55
Slika 31: Reakcija z acetiltransferazo – časovna odvisnost koncentracije nastalega NADH.	56
Slika 32: Različni načini reakcije raztopine proteinskega koncentrata proteina na različne kristalizacijske razmere.	58
Slika 33: Analiza deležev posameznih ocen kvalitete kapljic pri kristalizaciji z visečo kapljico.	59
Slika 34: Kristali, ki smo jih zamrznili.	60
Slika 35: NaDS-PAGE elektroforeza kristalov.	60

Slika 36: Sipanje X-žarkov na kristalu proteina SeMet Msmeg_4207 posneto v multidisciplinarnem laboratoriju Elettra Sincrotrone Trieste S.C.p.A. di interesse nazionale (Trst, Italija).

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Mapa plazmida pPROEX-HTb z označenimi nekaterimi pomembnejšimi mesti.
- Priloga B: Nukleotidno zaporedje gena *msmeg_4207* in aminokislinsko zaporedje produkta tega gena.
- Priloga C: Sestava kristalizacijskih raztopin kompleta Peg Ion screen (Hampton research).
- Priloga D: Sestava in razporeditev komponent kristalizacijskih raztopin v vsakem rezervoarju na optimizacijskih ploščicah A, B, C, D.
- Priloga E: Sestava in razporeditev komponent kristalizacijskih raztopin v vsakem rezervoarju na optimizacijskih ploščicah E, F, G, H.
- Priloga F: Poravnava aminokislinskih zaporedij nekaterih USP-jev.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

β -ME	β -merkaptetanol
ϵ	Ekstinkcijski koeficient
% (m/V)	Utežni odstotek
% (V/V)	Volumski odstotek
3'AMP	3'-adenozin monofosfat
5'AMP	5'-adenozin monofosfat
5'GMP	5'-gvanozin monofosfat
A	Absorbanca pri določeni valovni dolžini
A ₂₅₄	Absorbanca pri valovni dolžini 254 nm
A ₂₈₀	Absorbanca pri valovni dolžini 280 nm
A ₆₀₀	Absorbanca pri valovni dolžini 600 nm
ang.	Angleško
ATP	Adenozin-5'-trifosfat
Bis-Tris	2,2-bis(hidroksietil)-imino-tris(hidroksimetil)-metan
Bis-Tris propan	1,3-bis(tris(hidroksimetil)metilamino)propan
bp	Bazni par
cAMP	3',5'-ciklični adenozin monofosfat
CD	Cirkularni dikroizem
cGMP	3',5'-ciklični gvanozin monofosfat
cNMP	Ciklični nukleotidni monofosfati
CoA	Koencim A
Da	Dalton, enota za molekulsko maso
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamino tetraocetna kislina
FPLC	Hitra proteinska tekočinska kromatografija
HCl	Vodikov klorid
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HPLC	Visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. "high pressure liquid

	chromatography")
IPTG	Izopropil β -D-tiogalaktozid
K_{av}	Porazdelitveni koeficient
kDa	Kilo Da (1000 Da)
krio-raztopina	Raztopina za spiranje kristalov pred zamrzovanjem v tekočem dušiku
LB	Luria Bertanijevo gojišče
logMr	Logaritem molekulske mase
mA	Mili A (0,001 A)
MALDI	Ionizacija z desorbcijo ionov iz matriksa s pomočjo laserske svetlobe (ang. "matrix-assisted laser desorption/ionisation")
<i>M. jannaschii</i>	<i>Methanococcus jannaschii</i>
MRSA	Na metacilin odporni stafilokoki <i>Staphylococcus aureus</i> (ang. "metacillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ")
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MQ	Mili-Q voda, dodatno očiščena destilirana voda
NaCl	Natrijev klorid
NAD^+	β -nikotinamid adenin dinukleotid hidrat
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NaDS	Natrijev dodecil sulfat
NaDS-PAGE	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS
NaH_2PO_4	Natrijev fosfat
NaOH	Natrijev hidroksid
$NH_4H_2PO_4$	Amonijev dihidrogen fosfat
Ni-NTA kolona	Nikelj-nitilotriocetna kovinsko-afinitetna kolona
NTA	Nitilotriocetna kislina
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Fosfatni pufer
PEG3350	Polietilenglikol 3350
pH	Negativni desetiški logaritem koncentracije ionov H_3O^+
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluorid

ppGpp	Gvanozin tetrafosfat
rcf	Radialna centrifugalna sila (ang. "radial centrifugal force")
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> serotip Enteritidis
TBA pufer	Tris-borat-acetatni pufer
TEV	Virus jedkanja tobaka (ang. "tobacco etch virus")
Tof	Čas preleta (ang. "time-of-flight")
TPP	Tiamin pirofosfat
Tris	2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol
Tris-HCl	Tris-hidroklorid
USP	Univerzalni stresni protein
UV	Ultraviočno
V _b	Volumen stacionarne faze kolone
V _e	Elucijski volumen
VIS	Vidni spekter
V _o	Ničelni volumen (ang. "void volume")
vrt./min	Vrtljaji na minuto

SLOVARČEK

USP	Univerzalni stresni proteini z domenami velikimi od 140 do 160 aminokislin, ki so široko razširjene med arhejami, bakterijami, rastlinami in glivami, ne najdemo pa jih pri človeku. Pri bakterijah je njihovo izražanje močno ojačano v stresnem okolju, predvidevajo pa, da pripomorejo k preživetju celice.
Msmeg_4207	USP, ki ga najdemo pri <i>Micobacterium smegmatis</i> . Njegova struktura in funkcija še nista poznani in je substrat nekaterih mikobakterijskih acetiltransferaz, katerih aktivnost je regulirana z medceličnimi komunikacijskimi molekulami.
cAMP	Ciklični adenzin 3',5'-adenozin monofosfat, eden izmed cikličnih nukleotidov, ki so najpomembnejši sekundarni nukleotidni sporočevalci pri evkariontih in bakterijah.
Msmeg_5458	Acetiltransferaza, ki prenaša acetilno skupino iz acetil-koencima A na lizinski ostanek Msmeg_4207, aktivnost tega encima pa je odvisna od koncentracije cAMP.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Proteinski produkt gena Msmeg_4207 iz *Mycobacterium smegmatis* spada v družino univerzalnih stresnih proteinov oziroma USP (ang. »Universal Stress Proteins«), ki so skupni nekaterim pripadnikom vseh treh domen organizmov. Sinteza teh proteinov je pri bakterijah močno povečana v stresnih situacijah kot npr. ob pomanjkanju hranil, izpostavljenosti visoki temperaturi, nekaterim antibiotikom... Patogeni organizmi, med drugim tudi povzročiteljica tuberkuloze, *Mycobacterium tuberculosis*, se s takšnimi okoliščinami srečajo v tkivih ali celicah gostitelja, zato ni presenetljivo, da so ugotovili povezave med njihovo virulenco in izražanjem teh stresnih proteinov.

Omenjena bakterija *M. tuberculosis* predstavlja resno grožnjo zdravju ljudi, predvsem zaradi možnosti prikrite okužbe. Prav vpletanju v medcelično signalizacijo gostitelja s cikličnimi nukleotidi pa gre pripisati uspešnost dolgotrajnega ohranjanja v okuženem organizmu. Med drugim pa je od teh signalnih molekul odvisno tudi delovanje bakterijskih aciltransferaz, ki pri acilaciji kot substrat uporabljajo USP Msmeg_4207. Takšna encima pa najdemo tako pri nepatogeni *M. smegmatis* (Msmeg_5458) kot pri patogeni *M. tuberculosis* (Rv0998).

Nepatogena *M. smegmatis* je zelo uporaben model za analizo fiziologije in regulacije mikobakterijskih genov. Boljše poznavanje lastnosti in delovanja USP pa ponuja razumevanje teh proteinov tudi pri invazivnih vrstah.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

V raziskovalnem delu bomo izdelali in izvedli protokol za izražanje proteina Msmeg_4207 v *E. coli* ter pripravo čistega proteina v čim večjih količinah. Nativni obliki proteina bomo poskušali določiti velikost potencialnih homo-oligomernih oblik v raztopini. Preverjali bomo tudi stabilnost proteina v različnih razmerah ter morebitno vezavo cikličnih nukleotidov oziroma drugih manjših molekul v strukturo proteina. Ker je ta USP substrat za aciltransferazo Msmeg_5458, bomo raziskali njegovo biokemijsko obnašanje pri

encimskih reakcijah. Poiskali bomo optimalne razmere za kristalizacijo tega proteina, potrdili prisotnost pravega proteina v kristalih ter merili sipanje X-žarkov na teh kristalih.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Monomerne enote USP-jev so relativno majhne (14 kDa), v organizmih pa so znane dimerne in tudi tetramerne oblike USP-jev. Predpostavljamo da je tudi mikobakterijski USP oligomer, velikost monomerne podenote pa je podobna monomernim enotam drugih USP-jev.
- Zaradi ravnotežja med različnimi oligomeri v vzorcu lahko morebitna heterogenost predstavlja težave pri kristalizaciji, zato predpostavljamo, da bomo morali poiskati pravilne razmere za kristalizacijo v čim večjem spektru kemijske sestave, ter jih tudi optimizirati, da bodo zrasli kristali kvalitetne zgradbe.
- Analize drugih bakterijskih USP-jev so razkrile prisotnost tako alfa vijačnic kot beta ploskev, zato predvidevamo, da je tudi protein Msmeg_4207 sestavljen iz kombinacije obeh struktur.
- Nekateri znani USP-ji vežejo nukleotide, za Msmeg_4207 pa predpostavljamo, da ti v strukturi niso prisotni, kar pa bomo preverili.
- Raziskovani USP je substrat acetiltransferaze, katere aktivnost je odvisna od prisotnosti cikličnih nukleotidov (cAMP). Zato predvidevamo, da bo do boljše acetilacije prišlo z dodajanjem cAMP reakcijski zmesi.

Glavni namen raziskovalnega dela je torej opredeliti čim več biokemijskih in biofizikalnih značilnosti proteina Msmeg_4207 za pojasnitev vlog in karakteristik USP-jev v organizmih, predvsem pa v *M. tuberculosis*. Podatkovni izplen te osnovne raziskave bi lahko pripomogel k razumevanju teh proteinov vključno s farmacevtskim ali medicinskim pomenom za zmanjšanje virulence pri patogenih bakterijah *in vivo*, saj predstavljajo dobre tarče za razvoj zdravil.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKOBakterije

V rod *Mycobacterium* uvrščamo več kot 100 vrst, ki spadajo v skupino bakterij z visokim deležem gvanina in citozina v genomu. Gre za plevmorfne, obligatno aerobne, negibljive bakterije, ki pogosto izkazujejo filamentozno morfologijo. Znane so po edinstveni komponenti lipidnega dvosloja – mikolni kislini. Rod obsega patogene, pogojno patogene in nepatogene vrste, kamor spada večina. Kljub temu pa so etiološki povzročitelji nekaterih bolezni kot npr. tuberkuloze, gobavosti, Johnove bolezni in Burulijevega ulkusa (Shenoy in Visweswariah, 2006). Pri ugotavljanju virulence, obstojnosti v gostitelju in ostalih lastnosti patogenih vrst pa nam k boljšemu razumevanju teh mehanizmov dostikrat pomagajo nepatogene vrste.

2.1.1 Povzročitelji tuberkuloze pri človeku in njihovo raziskovanje

Bakterije vrste *M. tuberculosis* so povzročitelji tuberkuloze, ene najhujših infekcijskih bolezni človeštva. Letno zaradi te bolezni umre več kot 2 milijona ljudi (Kaufmann, 2001), po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO, 2007) predvidevajo, da je prikrito ali kronično okužena več kot tretjina svetovnega prebivalstva. Bakterije se največkrat prenašajo s kapljičnim prenosom pri kašljanju. Novi gostitelj kapljice inhalira, v alveolah pa makrofagi fagocitirajo bakterijske celice. Znotraj njih se te potem intravakuolarno podvajajo in spreminjajo koncentracije signalnih molekul (cikličnih nukleotidov) gostiteljske celice s čimer si prilagodijo okolje za rast in delitev (Holen in sod., 1996; Schmelzle in sod., 2004). Okuženi makrofagi skupaj z neokuženimi in celicami T tvorijo večjedrne celice velikanke, Langhansove celice, iz njih pa se skupaj z epiteloidnimi celicami, fibroblasti in limfociti razvijejo okrogli granulomi iz epiteloidnih celic – tuberkli. Bakterijske celice so znotraj takšnih struktur podvržene številnim stresnim dejavnikom, med drugim tudi pomanjkanju kisika (Canetti, 1955 cit. po Hingley-Wilson in sod., 2010; Russel in sod., 1955 cit. po Hingley-Wilson in sod., 2010; Imboden in Schoolnik, 1998), zaradi česar preidejo v stanje v katerem so metabolno neaktivne in se ne delijo – Waynovo stanje (Wayne in Sohaskey, 2001). Takrat gostitelj ne kaže kliničnih znakov bolezni,

bakterija pa se v telesu ohrani dlje časa, možnosti za prenos na nove gostitelje pa so večje (Parrish in sod., 1998; Honer zu Bentrup in Russell, 2001).

Bakterije *M. tuberculosis* je težko raziskovati, saj imajo dolg generacijski čas (24 ur), uvrščamo pa jih tudi med zelo nevarne biološke dejavnike skupine 3. Nasprotno od *M. tuberculosis* pa so bakterije *M. smegmatis* hitrorastoče (generacijski čas je le od 3 do 4 ure), so saprofilne in nepatogene. Imajo tudi nekaj skupnih genov, ki so homologni genom za virulentne faktorje *M. tuberculosis* (Berthet in sod., 1998; Camacho in sod., 1999). Zato Gomez in sod. (1998), Reytrat in Kahn (2001) ter Zahrt in sod., (2001) menijo, da *M. smegmatis* predstavlja dober model za raziskovanje značilnosti patogenih mikobakterij.

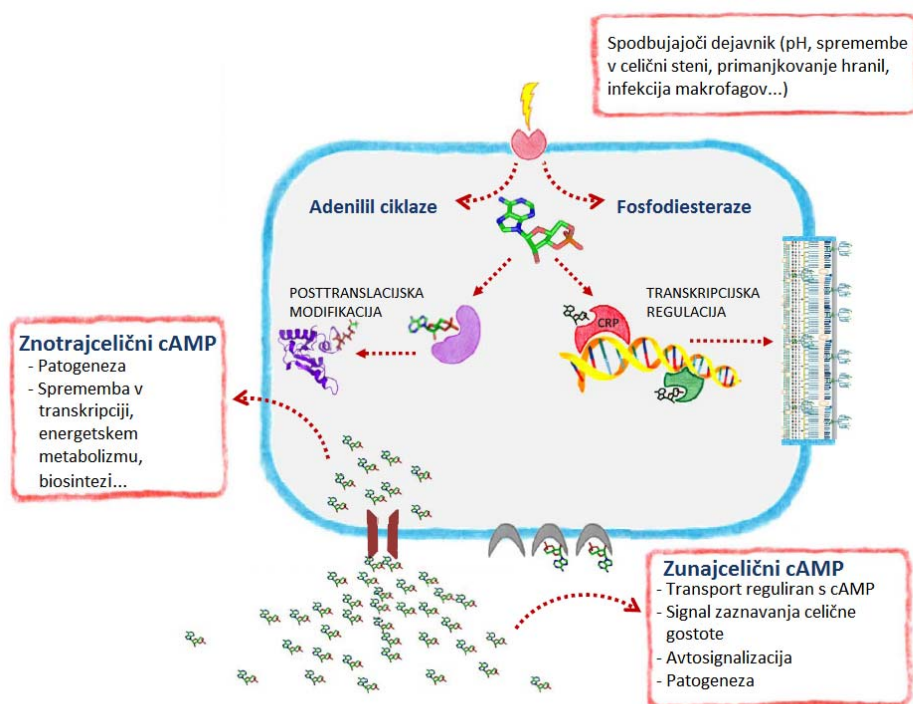
2.1.2 cAMP pri mikobakterijah

Ciklični nukleotidni monofosfati (cNMP), med katere spadata 3',5'-ciklični adenzin monofosfat (cAMP) in 3',5'-ciklični gvanozin monofosfat (cGMP), so pomembne sekundarne obveščevalne molekule pri evkariontskem medceličnem sporazumevanju. Tako npr. povečana koncentracija cAMP v makrofagih sproži spremembo izražanja mediatorjev imunskega odziva (Servillo in sod., 2002; Johannessen in Moens, 2007). Zato so se pri nekaterih bakterijskih patogenih razvile virulentne strategije, ki se vpletajo v sporazumevanje med gostiteljevimi celicami. Sem prištevamo tudi bakterijske encime, kot so ciklaze in fosfodiesteraze, ki spreminjajo koncentracijo cAMP (Baker in Kelly, 2004; Sands in Palmer, 2008).

Molekule cAMP iz ATP pri mikobakterijah sintetizirajo adenilil ciklaze razreda III (Danchin, 1993; Shenoy in Visweswariah, 2004). Aktivacija sinteze s ciklazami poteče npr. pri spremembi pH (Linder in sod., 2002; Tews in sod., 2005; Shenoy in sod., 2005a), spremembi koncentracije bikarbonata in/ali CO₂ (Cann in sod., 2003; Linder in sod., 2004), njihova aktivnost pa je verjetno odvisna tudi od alosteričnega uravnavanja (Sinha in sod., 2005) (slika 1). Po drugi strani pa vlogo cepitve cAMP opravljajo fosfodiesteraze (Soderling in Beavo, 2000) (slika 1). Posebnost mikobakterijskih genomov je v tem, da imajo veliko število genov, ki kodirajo nukleotidne ciklaze. Tako npr. pri vrsti *M. tuberculosis* srečamo 16 nukleotidnih ciklaz (Shenoy in sod., 2004), v nasprotju s tem

pa so do zdaj identificirali le eno fosfodiesterazo, ki jo kodira gen *rv0805* (Shenoy in sod., 2005b).

Možno je, da patogene bakterije po fagocitozi z makrofagi s cAMP direktno zastrupijo gostiteljsko celico in s tem prilagodijo okolje znotraj celice in tkiva (Agarwal in sod., 2009). Hkrati pa ti ciklični nukleotidi služijo tudi komunikaciji med bakterijskimi celicami in regulaciji pomembnih bioloških procesov, kar pojasnjuje njihovo prisotnost tudi v nepatogenih vrstah (Dass in sod., 2008) (slika 1). Po navedbah Nambi-ja in sod. (2010) sta, tako acetiltransferaza Rv0998 pri *M. tuberculosis* kakor tudi njen ortolog Msmeg_5458 pri *M. smegmatis* verjetno pomembna mediatorja biokemijskih procesov v omenjenih bakterijah, njuna aktivnost pa je močno odvisna od cAMP. Navajajo tudi, da sta oba proteina sestavljena iz dveh domen: domene, ki veže cNMP, kar omogoči alosterično aktivacijo sosednje, acetiltransferazne domene. Slednja z acetilacijo posttranslacijsko modificira (acetilira) ε amino skupino lizinskega ostanka USP-ja Msmeg_4207 (Nambi in sod., 2010).



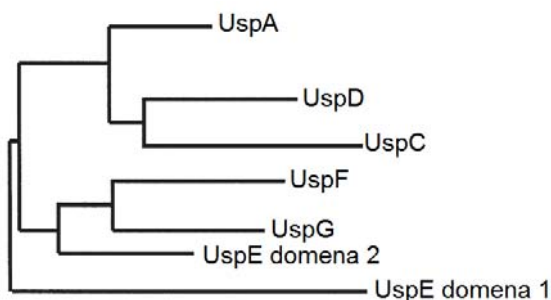
Slika 1: Vloga cAMP pri mikobakterijah (Visweswariah, 2011: 27).

2.2 UNIVERZALNI STRESNI PROTEINI

2.2.1 Odkritje, razširjenost in vloga

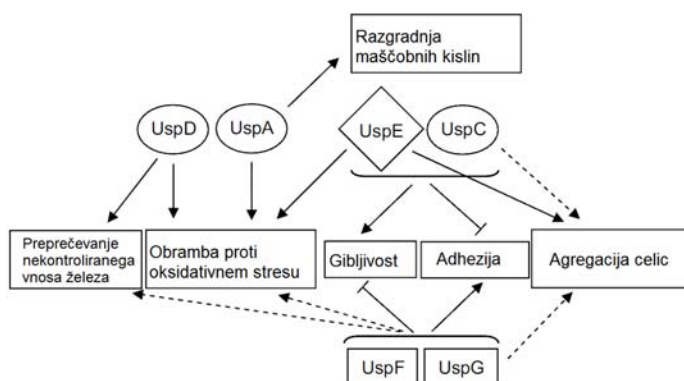
Z raziskovanjem regulacije izražanja genov v stresnih razmerah pri sevu bakterije *E. coli* K-12 so Van Bogelen in sod. (1990) ugotovili, da noben izmed takrat znanih ključnih regulatorjev stresnega odziva ne uravnava izražanja takrat še neznanega proteina proteina C13.5. Pri omenjenih bakterijah pa so kljub temu razmere kot npr. pomanjkanje aminokislin, ogljika, dušika, fosfata, sulfata, izpostavljanje vročini, oksidantom, težkim kovinam, etanolu, UV svetlobi ipd., močno spodbudile njegovo izražanje. V stacionarni fazi je bilo to celo tako močno, da je predstavljal enega izmed najbolj pogostih proteinov v celicah (Nyström in Neidhardt, 1992; 1993; 1994). Mutante z delecijo gena za ta protein pa niso preživele razmer, pri katerih je prišlo do poškodb DNA ali do zgoraj omenjenih omejevanj rasti (Nyström in Neidhardt, 1994). To je bil tudi glavni vzrok, da so ti raziskovalci preimenovali protein C13.5 v univerzalni stresni protein A (UspA).

Gustavsson in sod. (2002) so pri primerjavi podobnosti nukleotidnih zaporedij pokazali, da je poleg *uspA* pri *E. coli* prisotnih več podobnih genov, ki pripadajo t.i. *usp* družini – *uspC*, *uspD*, *uspE*, *uspF*, *uspG* (slika 2). Gen *uspB* ne spada v to družino (Gustavsson in sod., 2002). Vse proteine, ki jih kodirajo omenjeni geni, z izjemo proteina UspE, so razvrstili v dve poddružini. UspE je izjema, ker je heterodimer (Kvint in sod., 2003) saj ima skupne lastnosti domen obeh poddružin (Gustavsson in sod., 2002). Zato se Nachin in sod. (2008) strinjajo, da bi bilo najbolje razvrstiti obe domeni v dve novi poddružini.



Slika 2: Filogenetski odnosi med različnimi USP-jji pri *E. coli* (Gustavsson in sod., 2002: 108).

Nachin in sod. (2005) so v svoji raziskavi ugotovili da imajo omenjeni USP-ji pri *E. coli* več vlog (slika 3). Tako sta npr. UspA in UspD pomembna za preživetje v oksidativnih razmerah. UspD tudi preprečuje prekomeren vnos železa v celice, s tem pa so te manj občutljive na antibiotik streptonigrin, ki poveča smrtnost celic s preveliko količino prostega železa. Ugotovili so tudi, da mutante brez genov *uspC* in *uspE* ne sintetizirajo flagelarnega motorja in so zato negibljive, mutante brez genov *uspF* in *uspG* pa so bolj gibljive. Iz tega sledi, da UspC in UspE pripomorejo k večji gibljivosti celic, po drugi strani pa preprečujejo tvorbo medceličnih agregatov. Raziskave tudi omenjajo, da UspA inducira razgradnjo maščobnih kislin (Farewell in sod., 1996) in da so UspA, UspC, UspD ter UspE potrebni za od RecA-odvisno zaščito DNA in popravljalne mehanizme (Diez in sod., 2000). Na podlagi vseh teh in podobnih vlog, se raziskovalci strinjajo, da imajo USP-ji izrazito vlogo pri virulenci *E. coli*, ko so bakterijske celice v stresnem okolju (Nachin in sod., 2005).

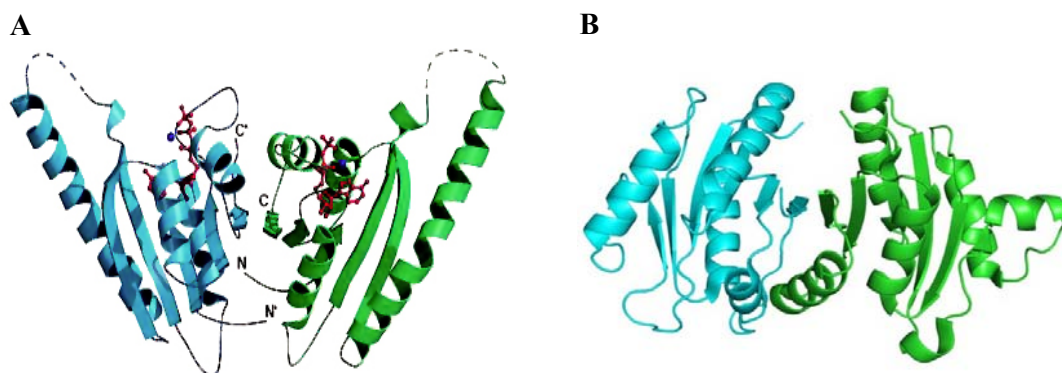


Slika 3: Vloga različnih USP-jev pri *E. coli* (Nachin in sod., 2005: 6271). Črta s koncem v obliki T za razliko od puščice pomeni negativen učinek na določen pojav, moč učinka na pojav pa je izražena s polno ali črtkano črto.

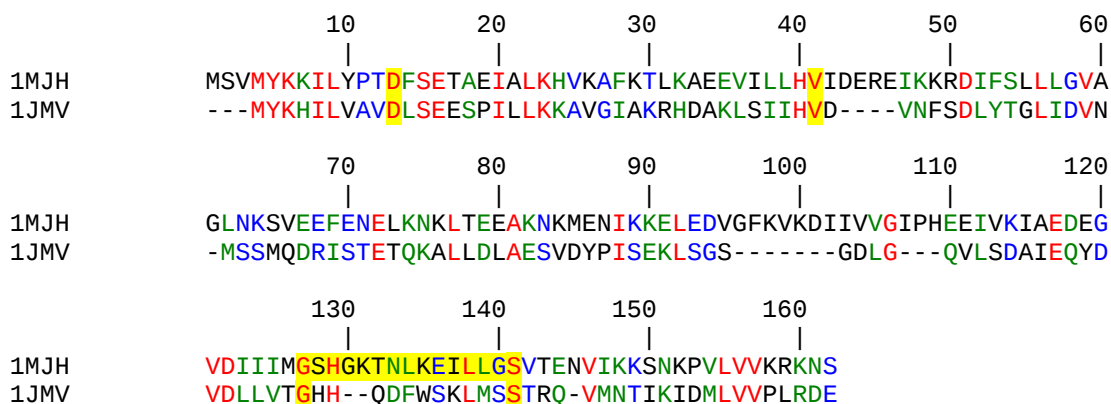
Primerjava nukleotidnega zaporedja *uspA* z zaporedji v podatkovnih zbirkah je razkrila, da obstaja zelo veliko število organizmov s podobnimi zaporedji, ta pa združujemo v UspA superdružino (Kvint in sod., 2003). Tako so isti raziskovalci odkrili, da gene teh proteinov ali pa njihovih ohranjenih domen najdemo v genomih drugih prokariotov, arhej in celo evkariotov, zaporedja pa so lahko v organizmu velikokrat ponovljena – tudi do 14-krat, kot npr. pri rodu arhej *Halobacterium*. Na podlagi evlucijskih analiz pa Aravind in sod. (2002) celo predvidevajo, da je domena UspA proteina del večje proteinske strukturne

družine, ki pa direktno izvira iz genoma univerzalnega skupnega prednika vseh modernih oblik življenja.

Prva razrešena struktura proteina, ki pripada UspA superdružini, je bil homodimeren protein MJ0577 (PDB dostopna koda: 1MJH) arheje *Methanococcus jannaschii*, katerega monomer veže en magnezijev ion in ATP, vendar pa zanj še ni ugotovljena vloga v celici (Zarembinski in sod., 1998) (slika 4). Isti raziskovalci so tudi ugotovili, da so aspartat na mestu 13, valin na mestu 14 in motiv G-2X-G-9X-G(S/T) ključni za vezavo ATP, kljub temu pa še vedno ni pojasnjena vloga vezave. Sousa in McKay (2001) sta nato kristalizirala še (PDB dostopna koda: 1JMV) in ugotovila, da je v raztopini ta protein v dimerni obliki in ne veže nukleotidov (slika 4). UspA iz *H. influenzae* v aminokislinskem zaporedju nima motiva (G-2X-G-9X-G(S/T)), omenjeni aminokislini pa najdemo na istih mestih kot pri MJ0577 (slika 5).



Slika 4: Kristalni strukturi USP-jev. A – kristalna struktura MJ0577 (Zarembinski in sod., 1998: 15190). V strukturi je opaziti dve molekuli ATP in dva Mg²⁺ iona; B – kristalna struktura UspA dimerov pri *H. influenzae* (Sousa in McKay, 2001: 1136).



Slika 5: Primerjava aminokislinskih zaporedij MJ0577 pri *M. jannaschii* (1MJH) in UspA pri *H. influenzae* (1JMV) s programom ClustalW2 (Larkin in sod., 2007). Motiv in aminokisline, ki so pomembne za vezavo ATP so označene z rumeno barvo. Opazimo, da je v zaporedju 1JMV le delno ohranjen motiv za vezavo ATP aminokisline pa srečamo na istih mestih.

2.2.2 USP-ji v patogenih mikroorganizmih

Kot smo že omenili, je vloga USP-jev močno povezana z virulenco, zato so ti proteini največ pozornosti pritegnili z izražanjem pri patogenih mikroorganizmih.

Na antibiotik zadnje izbire metacilin in na številne druge antibiotike odporni stafilokoki *Staphylococcus aureus* (MRSA, ang. "metacillin-resistant *Staphylococcus aureus*") predstavljajo resno grožnjo zdravju ljudi, zato skušajo raziskovalci poiskati nove metode in učinkovine s katerimi bi bila onemogočena ali pa vsaj oslABLJENA njihova patogenost. V eni izmed takšnih raziskav so Jenkins in sod. (2011) pokazali, da je izražanje UspA proteina pri omenjenih stafilokokih močno oslABLJENO, če je v gojišču prisoten med, ki ga čebele pridelajo ob paši na rastlini *Leptospermum scoparium* (manuka) in je znan po svojem antibakterijskem delovanju. Celice se pri teh pogojih niso mogle deliti, bile so bolj občutljive in so hitro umirale. Zato predvidevajo, da bi pri teh bakterijah prav omejevanje izražanja UspA proteina povečalo njihovo občutljivost na antibiotike.

Patogena bakterija *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip Enteritidis je pereč zdravstveni problem v razvitem svetu, eden glavnih virov okužb pa so kokošja jajca s kontaminirano notranjostjo (Gantois in sod., 2009). Ugotovili so, da se gena *uspA* in *uspB*

pri omenjeni bakteriji močno izražata, ko je v tkivu ovarijev (Gantois in sod., 2008), močan induktor tega pojava pa je beljak (Raspoet in sod., 2011). V tej raziskavi so ugotovili, da mutante brez omenjenih genov v primerjavi z divjim tipom manj pogosto okužijo kokošji reproduktivni trakt. Isti raziskovalci domnevajo, da telesna temperatura piščancev (42 °C), primanjkovanje hranil v ovariju, visok pH, primanjkovanje železa in antibakterijske snovi vplivajo na aktivacijo genov za USP. Bakterije so manj virulentne brez njih.

Vse nakazuje tudi na to, da imajo USP proteini pomembno vlogo v patogenih bakterijah, ki tvorijo biofilme. *Pseudomonas aeruginosa* je oportunist, ki je pogost povzročitelj bolnišničnih infekcij, okužb ran in opeklin in tudi dominantni patogen cistične fibroze (Van Delden in sod., 1998; Koch in sod., 2000; Lyczak in sod., 2002). Pomembna faktorja pri infekciji sta rast bakterij v biofilmih, ki predstavlja zaščito pred antibiotiki in gostiteljevim imunskim sistemom (Hassett in sod., 1996; Costerton in sod., 1999; Singh in sod., 2000) in tvorba biofilmom podobnih mikrokolonij v mikroaerofilnem ali anaerobnem okolju v mukusu (Worlitzsch in sod., 2002). V anaerobnem okolju v tleh ali sedimentih *P. aeruginosa* pridobiva energijo v procesu denitrifikacije z oksidacijo nitrata ali nitrita (Palleroni, 1984; Zumft, 1997) ali pa s fermentacijo arginina (Vander Wauven in sod., 1984) in piruvata (Eschbach in sod., 2004). Slednja dva tipa pridobivanja energije sta značilna pri okužbah bolnikov (Eschbach in sod., 2004). Z analizo proteoma celic gojenih v anaerobnih razmerah so Schreiber in sod. (2006) opisali močno izražanje USP-jev PA3309 in PA4352. Mutante brez gena za prvi protein so imele znižano stopnjo preživetja pri fermentaciji piruvata. Zaenkrat še ni znano, kakšna je natančna funkcija obeh proteinov, Boes in sod. (2006) pa se strinjajo, da sta zagotovo pomembna pri ohranjanju bakterije v gostitelju predvsem pri cistični fibrozi. Pomembnost USP-jev za preživetje so poudarili tudi Chen in sod. (2006) pri preučevanju patogene bakterije ustne votline *Porphyromonas gingivalis*. Izražanje genskega zapisa homolognega zapisu gena *uspA* je bilo močnejše pri nastanku biofilma, mutante brez gena v primerjavi z divjim tipom pa so počasneje rastle v prisotnosti tetraciklina in pri suboptimalni temperaturi.

2.2.3 USP-ji in mikobakterije

M. tuberculosis ima kar deset različnih USP-jev, ki so prisotni tudi v več kopijah, šest od teh pa je del DosR regulona, skupine genov, katerih izražanje je močno ojačano, ko so bakterijske celice v makrofagih (Park in sod., 2003; Schnappinger in sod., 2003). Ugotovili so, da se sinteza teh USP-jev različno inducira pri nizki koncentraciji kisika (Bacon in sod., 2004), povečani koncentraciji dušikovega monoksida (Voskuil in sod., 2003; Ohno in sod., 2003), z mitomicinom C in UV svetlobo (Boshoff in sod., 2003), palmitinsko kislino in vodikovim peroksidom (Schnappinger in sod., 2003) ter pri nizkem pH (Fisher in sod., 2002) (preglednica 1).

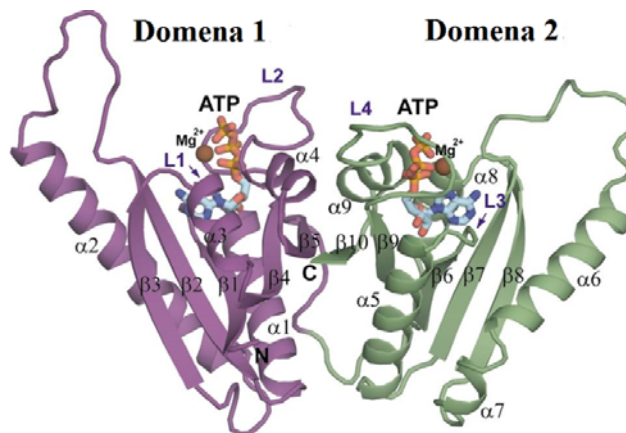
Preglednica 1: Odvisnost izražanja različnih USP-jev *M. tuberculosis* od stresnih razmer (Hingley-Wilson in sod., 2010: 238). Oznake: (+) – inducirano izražanje, (–) – reprimirano izražanje.

Stresni dejavnik	Inducirani USP				
	Rv1636	Rv1996	Rv2005c	Rv2026c	Rv2028c
Nizka konc. O ₂		(+)	(+)		(+)
NO		(+)	(+)		(+)
Palmitinska kislina	(+)				
H ₂ O ₂	(+)		(+)	(+)	(+)
UV svetloba/Mitomicin C	(+)		(+)	(+)	(+)
Nizek pH					(–)

Stresni dejavnik	Inducirani USP				
	Rv2319c	Rv2623	Rv2624	Rv3134	Rv1028
Nizka konc. O ₂		(+)	(+)	(+)	
NO		(+)	(+)	(+)	
Palmitinska kislina					
H ₂ O ₂	(+)		(+)	(+)	(+)
UV svetloba/Mitomicin C	(+)		(+)	(+)	(+)
Nizek pH				(–)	(+)

Gen *rv2623* je pri stresu eden izmed najmočnejše induciranih genov DosR regulona (Ohno in sod., 2003; Park in sod., 2003; Voskuil in sod., 2003). Poleg ojačanega izražanja v bakterijah gojenih pri nizki koncentraciji kisika so podoben pojav opazili v fagocitiranih bakterijah (Monahan in sod., 2001) in bakterijah v pljučih kronično inficiranih miši (Shi in sod., 2003). Drumm in sod. (2009) so ugotovili, da USP Rv2623 regulira rast celic *M. tuberculosis* in da je nujno potreben pri povzročanju kronične infekcije gostitelja.

Domnevajo, da je njegova funkcija verjetno odvisna od ATP, saj so, podobno kot pri MJ0557, v njegovem aminokislinskem zaporedju ugotovili prisotnost motiva G-2X-G-9X-G(S/T), v kristalni strukturi proteina pa opazili ATP (slika 6). Ta motiv je prisoten tudi pri aminokislinskih zaporedjih preostalih USP-jev *M. tuberculosis* (O'Toole in Williams, 2003; Drumm in sod., 2009) (slika 7).



Slika 6: Struktura Rv2623 znotraj katere sta ATP in Mg^{2+} (Drumm in sod., 2009: 7) (PDB dostopna koda 3CIS).



Rv1636	GNVGLSTIAGRLLGS	
Rv2028c	GAIGVHHFRPERVGS	
Rv2624c	GSVGIGRYASSILGS	
Rv3134c	GSVGLDHVRGRR-GS	
Rv1996	GYRGQGAVAGALLGS	GSHGRGGFPGMHLGS
Rv2005c	GSSGRGALARGLLGS	GSHGRGGLTGMLLGS
Rv2026c	GSQGMGALGRLLLS	GSHGRGGFSGMLLGS
Rv2623	GCLGSGRWPGRLLGS	GSRGGGYAGMLVGS
MJ0577	GSHGKTNLKEILLGS	
UspA	GHH--QDFWSKLMSS	

Slika 7: Motiv v aminokislinskih zaporedjih, ki je pomemben za vezavo ATP v nekaterih USP-jih *M. tuberculosis* (O'Toole in Williams, 2003: 389). Pri štirih je prisoten tudi v obeh kopijah zapisov za USP-je. Ta motiv najdemo v zaporedju proteina MJ0577, ki ga pa ni v zaporedju proteina UspA pri *H. influenzae*.

Hingley-Wilson in sod. (2010) so skušali določiti vlogo USP-jev Rv1996, Rv2005c, Rv2026c in Rv2028c na podoben način kot so to naredili raziskovalci pri *E. coli*. Kljub

temu, da so različni dejavniki močno ojačali izražanje teh USP-jev, pa v stresnih razmerah niso ugotovili sprememb v celični rasti, virulenci ali preživetju mutant *M. tuberculosis* brez zapisov za USP-je. Nasprotno pa Drumm in sod. (2009) navajajo, da ni razlike v rasti divjega tipa celic in mutante z delecijo gena *rv2623*. Raziskovalci torej še niso prišli do jasnega zaključka in zaenkrat lahko le predvidevajo, da so ti proteini pri *M. tuberculosis* le funkcionalno odvečni ali pa še ne poznamo jasne vloge kot pri USP-jih *E. coli*.

Nambi in sod. (2010) so opisali pojav acetilacije USP proteina Msmeg_4207 pri *M. smegmatis* z ortolognima acetiltransferazama Msmeg_5458 iz *M. smegmatis* in Rv0998 iz *M. tuberculosis*. Ugotavljajo, da je v teh dveh proteinih domena, ki veže cAMP, strukturno podobna regulatorni domeni podenote sesalske protein kinaze A. Ti proteini pa regulirajo številne celične procese v stresnem okolju, med rastjo in razvojem, direktno so vpleteni tudi v nadzor celične smrti in pomembni pri ohranjanju celičnega spomina (Taylor in sod., 2004). Ker se USP in acetiltransferaza združujeta v stabilne komplekse, predvidevajo, da je Msmeg_4207 v bakterijski celici regulator proteinske acetilacije (Nambi in sod., 2010). Izkazalo se je, da je aktivnost velikega števila proteinov, ki so del centralnih metabolnih poti, regulirana prav z reakcijo acetilacije (Yang in Seto, 2008; Zhao in sod., 2010). Pri *E. coli* so ti proteini metabolni encimi, transkripcijski in translacijski regulatorji in proteini odziva na stres (Zhang in sod., 2009). Nambi in sod. (2010) še vedno preučujejo dejansko funkcijo mikobakterijskih acetiltransferaz kakor tudi proteina Msmeg_4207.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 2: Uporabljene kemikalije in komercialno dostopni kompleti.

Proizvajalec	Kemikalije
Amersham Pharmacia Biotech	Kalibracijski standardi za gelsko kromatografijo: Low Molecular Weight Calibration Standards (kimotripsinogen A, ovalbumin, albumin), High Molecular Weight Calibration Standards (aldolaza, feritin)
Bio-Rad	Akrilamid, bis-akrilamid, barvilo Coomassie Brilliant Blue R-250, standardi znanih molekulskih mas Precision Plus Protein Unstained Standards (161-0363)
Difco	Agar, Bacto tripton, kvasni ekstrakt, tripton
Gold Biotechnology	Ditiotreitol (DTT), izopropil β -D-tiogalaktozid (IPTG)
Hampton Research	Polietilenglikol 3,350 (PEG3350), kristalizacijski pufri: Index Screen, Memb Fac, Natrix Screen, Peg Ion screen I, Peg Ion screen II, Salt RX screen
Invitrogen	Poliakrilamidni geli NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gel 1,0 mm 10 jamic, SimplyBlue™ SafeStain za vizualizacijo proteinskih lis na poliakrilamidnem gelu, pufer za obtežitev in barvanje vzorcev proteina pri gelski elektroforezi NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X), elektroforezni pufer NuPAGE® MES SDS Running Buffer
Merck	37-odstotna klorovodikova kislina, metanol, očetna kislina, 100-odstotni etilenglikol
Quiagen	Polnilo kolon Ni-NTA Superflow, Ni-NTA Superflow Fast Flow
Riegel	96-odstotni etanol
Sasol Wax	Vazelin Vaselinum Album

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 2: Uporabljene kemikalije in komercialno dostopni kompleti.

Proizvajalec	Kemikalije
Sigma Aldrich	α -ketoglutarat dehidrogenaza, α -ketoglutarat v natrijevi soli (α -ketoglutarat), β -merkapt-etanol (β -ME), β -nikotinamid adenin dinukleotid hidrat (NAD^+), 2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol (Tris), 2,2-bis(hidroksietil)-imino-tris(hidroksimetil)-metan (Bis-Tris), 1,3-bis(tris(hidroksimetil)metilamino)propan (Bis-Tris propan), absolutni etanol, acetil-koencim A v natrijevi soli (acetil-CoA), agaroza, amonijev acetat, amonijev nitrat, amonijev dibazični citrat, amonijev sulfat, ampicilin, Antifoam 289, bromfenol modro, citronska kislina, dikalijev hidrogen fosfat, etilendiamino tetraacetna kislina (EDTA), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), glicin, gvanidinijev hidroklorid, imidazol, kalijev hidrogenfosfat trihidrat, natrijev citrat, natrijev dihidrogenfosfat, natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, natrijev hidroksid, natrijev klorid, nikljev sulfat, reduciran L-glutation

3.1.2 Večkomponentne raztopine, pufri in založne raztopine za kristalizacijo

Preglednica 3: Sestavine pufrov, večkomponentnih raztopin in založnih raztopin, ki smo jih uporabljali pri delu.

Pufer/večkomponentna raztopina in količina	Sestavine in priprava
Fosfatni pufer (500 mL)	11,5 g KH_2PO_4 in 81,8 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$.
Pufer za resuspendiranje celic (50 mL)	50 mM Tris pH 8,0 in 150 mM NaCl. Pufer smo umerili na pH 8,0.
Pufer za resuspendiranje in shranjevanje celic (50 mL)	50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl in 10 % (V/V) glicerola. Pufer smo umerili na pH 8,0.
Ni-NTA pufer za nanos proteina (500 mL)	50 mM Tris pH 8,0, 250 mM NaCl, 10 mM imidazol pH 8,0, 5 mM β -ME in 10 % (V/V) glicerola.
Ni-NTA pufer za spiranje kolone (250 mL)	50 mM Tris pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol pH 8,0, 5 mM β -ME in 10 % (V/V) glicerola.
Ni-NTA pufer za elucijo proteina (250 mL)	50 mM Tris pH 8,0, 250 mM NaCl, 300 mM imidazol pH 8,0, 5 mM β -ME in 10 % (V/V) glicerola.

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 3: Sestavine pufrov, večkomponentnih raztopin in založnih raztopin, ki smo jih uporabljali pri delu.

Pufer/večkomponentna raztopina in količina	Sestavine in priprava
Dializni pufer (3 L)	50 M Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM β -ME in 10 % (V/V) glicerola.
Pufer za gelsko kromatografijo (500 mL)	50 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl, 2 mM DTT in 10 % (V/V) glicerola.
TBA pufer (50 mL)	100 mM natrijev acetat, 50 mM Bis-Tris in 50 mM Tris pH 7,5.
Pufer za nativno elektroforezo	25 mM Tris in 192 mM glicin. Pufer smo umerili na pH 8,8 s 6 M NaOH.
5-kratni vzorčni pufer za nativno elektroforezo (10 mL)	312,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50 % (V/V) glicerola in 0,05 % (V/V) bromfenol modrega.
Pufer za vizualizacijo proteinskih lis na gelu za nativno elektroforezo (1 L)	1 g Coomassie Blue R-250 barvila, 450 mL metanola, 450 mL MQ in 100 mL očetne kisline.
Pufer za razbarvanje gela za nativno elektroforezo (1 L)	100 mL metanola, 100 mL očetne kisline.
Raztopina soli za minimalno gojišče (1 L)	28 g $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, 8 g KH_2PO_4 , 4 g $(NH_4)_2SO_4$, 1 g natrijevega citrata in 0,4 g $MgSO_4 \times 7H_2O$.
Raztopina aminokislin za minimalno gojišče (1 L)	0,2 mg/mL aminokislin: alanin, arginin, aspargin, asparginat, cistein, glutamat, glutamin, glicin, histidin, prolin, serin, triptofan, tirozin.
	0,5 mg/mL aminokislin: izolevcin, levcin, lizin, fenilalanin, treonin in valin.
Fosfatni pufer (PBS pufer) (1 L)	0,2 g kalijevega klorida, 1,44 g dinatrijevega hidrogenfosfata, 0,24 g kalijevega dihidrogenfosfata in 8,76 g natrijevega klorida.
Založne raztopine za kristalizacijo (vsaka po 50 mL)	0,5 % (m/V) PEG3350; 2 M NaH_2PO_4 ; 2 M amonijev sulfat; 2 M amonijev dibazični citrat; 0,5 M citrat; 0,5 M Bis-Tris propan; 2 M amonijev acetat; 1 M Bis-Tris; 2 M NaCl.

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 3: Sestavine pufrov, večkomponentnih raztopin in založnih raztopin, ki smo jih uporabljali pri delu.

Pufer/večkomponentna raztopina in količina	Sestavine in priprava
Mobilne faze pri HPLC	Mobilna faza A: raztopina $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pH 6,2 (uravnano z amonijakom). Mobilna faza B: mobilna faza A z 20 % (V/V) metanola.
Krio-raztopine (500 μL)	Krio-raztopine 1: 0,24 M amonijev dibazični citrat, 25 % (V/V) 0,5-odstotne (m/V) raztopine PEG3350 in 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % ter bodisi 30 % (V/V) 100-odstotnega etilenglikola. Krio-raztopine 2: 0,23 M amonijev acetat, 25 % (V/V) 0,5-odstotne raztopine PEG3350, 0,11 M Bis-Tris in 5 %, 10 %, 15 %, 20 % ter bodisi 25 % (V/V) 100-odstotnega etilenglikola. Krio-raztopine 3: 0,23 M amonijev acetat, 26 % (V/V) 0,5-odstotne raztopine PEG3350, 0,11 M Bis-Tris in 5 %, 10 %, 15 %, 20 % ter bodisi 25 % (V/V) 100-odstotnega etilenglikola.

Razen če ni drugače navedeno, smo mešanice do ustreznega volumna dopolnili z MQ (Mili-Q voda, dodatno očiščena destilirana voda).

3.1.3 Gojišča in mediji za rast bakterijskih celic

Preglednica 4: Gojišča, ki smo jih uporabljali pri delu.

Gojišče	Sestavine in priprava raztopin
Luria Bertanijevo gojišče (LB)	0,5 % (m/V) kvasnega ekstrakta, 1 % (m/V) triptona in 1 % (m/V) NaCl. Za pripravo trdnega gojišča smo dodali 15 mg/mL agarja in po ohlajevanju na 50 °C še ustrezni antibiotik. Gojišče smo nato razlili v petrijevke.
Bogato gojišče (ang. Terrific broth) (TB)	2,4 % (m/V) kvasnega ekstrakta, 1,2 % (m/V) triptona, 0,4 % (V/V) glicerola.
Selektivno gojišče za indukcijo rasti (za 50 mL)	45 mL TB gojišča, 5 mL fosfatnega pufra, 100 μL ampicilina.

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 4: Gojišča, ki smo jih uporabljali pri delu.

Gojišče	Sestavine in priprava raztopin
Selektivno gojišče za rast (1 L)	900 mL TB gojišča, 100 mL fosfatnega pufra, 2 mL ampicilina izhodne koncentracije 50 mg/mL.
Minimalno gojišče	200 mL raztopine soli, 200 mL raztopine aminokislin, 8 mL tiamina, 8 mL timina, 16 mL raztopine glukoze, 2 mL ampicilina, 560 mL avtoklavirane vode, 3 kapljice raztopine Antifoam 289 in 50 mg selenometionina dodanega tik pred kultivacijo.

Razen če ni drugače navedeno, smo mešanice do ustreznega volumna dopolnili z MQ.

3.1.4 Laboratorijska oprema

Preglednica 5: Uporabljena laboratorijska oprema.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Agilent Technologies	UV-VIS spektrofotometer: Agilent 8453, UV-Visible Chemstation software HPLC sistem: Agilent 1100 series HPLC
Air Liquide	Transportni krio-posodi (dewar): Voyageur 5, Voyageur 12
Applied Photophysics	CD spektrofotometer: Chirascan
BD Bioscience Falcon	Kristalizacijske plošče: 24-well Cell Culture Plate
Beckman	Centrifuga: Beckman J2-HS Centrifuge Rotorja: JA-10 in JA-20
Belimed	Pomivalno dezinfekcijski stroj: LA180
Bio-Rad	Vertikalni elektroforezni sistem Mini Protean III Stekelca za vlivanje gelov za elektroforezo: Mini-Protean 3 Short Plates, Mini-Protean 3 Spacer Plates (0,75 mm)

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 5: Uporabljena laboratorijska oprema.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Biosan	Termični blok: CH-100 Namizni stresalnik: MiniShaker PSU 2T
Brand	Pipeta: Accu-jet pro
Elma	Ultrasonična kopel za degaziranje raztopin: Transsonic 460
Eppendorf	Centrifuga: Eppendorf Centrifuge 5415R Avtomatska pipeta: ResearchPro 0,5–10 µL
GE Healthcare	Kromatografski sistem Äkta FPLC: črpalke P-920, monitor UPC-900, injektorski vijak NV-907, omejevalnik pretoka Flow Restrictor PR-902, zbiratelj frakcij Fraction Collector Frac-920, računalniško programsko orodje Unicorn 5.20 Kolona XK16/20 Kromatografska kolona: Superdex 200 10/300 GL 150 mL zanka za FPLC sistem
Gilson	Pipete: 0,2–2 µL, 2–20 µL, 20–100 µL, 20–200 µL 200–100 µL
H+P Labortechnik GmbH	Parni sterilizator: Varioklav
Hampton Research	Silikonizirana stekelca za kristalizacijo s premerom 18 mm Najlonsk zanke za lovljenje kristalov: CryoLoop 0,1–0,2 mm, 0,2–0,3 mm Kristalizacijske vial: CrystalCap Vial Kristalizacijski pladenj
Heat Systems- Ultrasonics inc.	Sonikator: Sonicator 385
Hettich Zentrifugen	Centrifugi: Rotina 35 R in Rotina 28 R
Hewlett Packard	Spektrofotometer: Diode Array Spectrophotometer Peltierjev element: Peltier Temperature Control Accessory 89090A
Invitrogen	Elektroforezni sistem: XCell SureLock Mini-Cell

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 5: Uporabljena laboratorijska oprema.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Kambič	Stresalnik za gojenje kultur: IS-200K Avtoklav Laboratorijski sušilnik-sterilizator SP-250 C Inkubator I-115
Mettler Toledo	pH meter: Seven easy
Milipore	Sistem za pridobivanje demineralizirane vode: RiOs 16 Sistem za pridobivanje visokoprečiščene in demineralizirane vode: MQ R6 Koncentrator Amicon Ultra 15 30K NMWL Sistem za ultrafiltracijo Microcon Ultracel YM-10 Filtri za sterilno filtracijo Millex-GP, 0,22 µm pore Nitrocelulozni membranski filtri s premerom 25 mm in 0,22 ter 0,45 µm porami Vakumska črpalka za filtracijo Vacuum Pump XF54 230 50
Nikon	Stereomikroskop: Nikon SMZ1500
Olympus	Fotoaparat za slikanje gelov: SP-550UZ
Pharmacia	FPLC naprava za regeneracijo kolon s črpalkami P-500 in monitorjem Liquid Chromatography Controller LCC-500 plus 50 mL-zanka za FPLC sistem Vir napetosti pri nativni elektroforezi: Electrophoresis Power Supply EPS 500/400
Sartorius	Analitska tehnica: Sartorius analytic
Sigma-Aldrich	Kolona za HPLC Supercosil® LC-8-DB HPLC Column.
Spearlab	Penasti krio-posodi: Small Foam Dewar in Tall Foam Dewar
Spectrum Laboratories	Dializna cev: Spectra/Por 1 Dialysis Membrane (6–8 kDa, širina 40 mm, premer 25,5 mm)

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 5: Uporabljena laboratorijska oprema.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Techno Plastic Products	5 -, 10- in 25-mL serološke pipete
Tehtnica Železniki d.o.o.	Precizna tehtnica: Exacta 300 EB in Exacta 610 EB Magnetno mešalo Rotamix 550MMH
Volpi AG	Vir dodatne svetlobe pri mikroskopiranju Intralux 4100
Waters-Micromass	Masni spektrometer Q-TOF Premier

3.1.5 DNA

V plazmidni ekspresijski vektor pPROEX-HTb (priloga A), je bil za *trc* promotorjem ligiran gen *msmeg_4207* (priloga B). Promotor je hibridni in vsebuje –35 regijo *trp* promotorja in –10 regijo *lac* promotorja, indukcija izražanja pa poteka kemijsko z dodajanjem IPTG (izopropil β -D-tiogalaktozid). N-terminalni del gena *msmeg_4207* je bil dodatno modificiran tako, da je kodiral histidinski afinitetni repek (zaporedje šestih histidinov) in cepitveno mesto za proteazo TEV (ENLYFQG). Repek in cepitveno mesto sta bila ločena še z zaporedjem, ki kodira 7 aminokislin (DYDIPTT). Celotno dodatno nukleotidno zaporedje kodira zaporedje aminokislin s skupno molekulsko maso okoli 3 kDa. Plazmidni konstrukt pPRO-Msmeg_4207 smo dobili iz laboratorija prof. dr. Sandhye S. Visweswariah (Department of Molecular Reproduction, Development and Genetics, Indian Institute of Science, Bangalor, Indija).

3.1.6 Bakterijski sevi

Preglednica 6: Uporabljena bakterijska seva.

Sev	Genotip	Vir
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Zbirka sevov na Kemijskem inštitutu (Ljubljana)
<i>E. coli</i> SP850 <i>cyc</i> ⁻	Hfr(PO1) λ <i>e14</i> <i>relA1</i> <i>spoT1</i> Δ <i>cyaA1400</i> (:: <i>kan</i>) <i>thi1</i> <i>cyc</i> ⁻	Zbirka sevov na Kemijskem inštitutu (Ljubljana)

BL21 (DE3) je široko uporabljan sev za produkcijo rekombinantnih proteinov (Daegelen in sod., 2009). Celice vsebujejo lizogeni fag DE3 z genom, ki kodira T7 RNK polimerazo. Ta je pod kontrolo promotorja *lacUV5*, tako da je za njeno izražanje potreben induktor IPTG. Prednosti tega seva za uporabo pri rekombinantni tehnologiji je več. Med drugim ne vsebuje zapisov za nekatere proteaze kot npr. proteazo zunanje celične membrane, OmpT. Pomanjkanje teh encimov pa zmanjša možnost razgradnje v celici izraženih heterolognih proteinov. Sev SP850 cys- pa nima zapisov za adenilat ciklaze (Shah in Peterkofsky, 1991). Takšne celice zato ne sintetizirajo cAMP.

Ker seva nista patogena, ju po direktivi evropskega parlamenta in sveta o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu (Direktiva..., 2000) uvrščamo v skupino bioloških dejavnikov 1.

3.1.7 Encimi

3.1.7.1 TEV proteaza

Zapis za ta encim izvira iz genoma virusa jedkanja tobaka (tobacco etch virus - TEV). TEV proteaza je znana po specifičnosti za proteolitsko cepitev znotraj zaporedja aminokislin ENLYFQ(G/S) v polipeptidih oz. proteinih. Cepitev poteče med aminokislinama Q in G ali pa med Q in S. Zato se veliko uporablja pri cepitvi histidinskega afinitetnega repka rekombinantnih proteinov ali peptidov. Namen repkov je lažja ločitev proteina ali peptida, ker ti preko njih interagirajo z nikljem na Ni-NTA koloni. Sama proteaza je tudi klonirana tako, da ima omenjen histidinski podaljšek, kar pa po opravljeni funkciji olajša njeno naknadno ločitev z Ni-NTA kromatografijo od proteinske mešanice, vendar pa nima zaporedja s cepitvenim mestom, da ne pride do samocepitve. Pri delu smo uporabljali raztopino v našem laboratoriju pripravljenega proteina s koncentracijo 0,5–1,0 mg/mL.

3.1.7.2 Msmeg_5458

Nambi in sod. (2010) so biokemijsko opredelili dva mikobakterijska proteina, ki izkazujeta acetiltransferazno aktivnost. Eden izmed njiju je Msmeg_5458 iz *M. smegmatis*, ki

katalizira reakcijo prenosa acetilne skupine na amino skupino lizinskega ostanka USP proteina Msmeg_4207. Ta biološki proces je nadzorovan s cAMP, ki se veže na ohranjeno N-terminalno domeno encima.

Pri merjenju acetiltransferazne aktivnosti smo uporabili dve že očiščeni in koncentrirani proteinski raztopini Msmeg_5458 s koncentracijo 30 mg/mL, ki sta bili izolirani iz kultur dveh različnih sevov *E. coli* BL21 (DE3) in *E. coli* SP850 *cyc*⁻. Celice slednjega nimajo gena za edino adenilil ciklazo v *E. coli*, tako da rekombinantni protein Msmeg_5458 *cyc*⁻ izoliran iz kulture teh celic nima vezanih molekul cAMP.

3.2 METODE

3.2.1 Preparativne metode

3.2.1.1 Sterilizacija raztopin, gojišč in steklovine

Ves material za gojenje bakterij in pufre smo predhodno sterilizirali po standardnih postopkih. Temperaturno občutljive snovi tako, da smo jih prefiltrirali skozi filter Millex-GP (Millipore) s premerom por 0,22 µm, vse ostalo pa z 20-minutno sterilizacijo v avtoklavu z vlažno toploto pri 121 °C in tlaku $1,2 \cdot 10^5$ Pa.

3.2.1.2 Regeneracija, čiščenje in shranjevanje kromatografskih kolon

3.2.1.2.1 Ni-NTA kolona

Regeneracijo smo izvajali pred vsako proteinsko izolacijo in tako skušali odstraniti vse nečistoče iz kolone ter na nosilec ponovno vezati nikljeve ione. Postopek smo izvajali s pomočjo FPLC sistema (Pharmacia). Pred in med vsako stopnjo smo kolono spirali s 50 mL MQ pri pretoku 2 mL/min, spiranje z ostalimi raztopinami pa je potekalo pri pretoku 1 mL/min. Stopnje so opisane v spodnji preglednici (preglednica 7).

Preglednica 7: Raztopine, njihove koncentracije in količine, ki smo jih uporabili pri različnih stopnjah regeneracije Ni-NTA kolon.

Stopnja	Raztopina	Koncentracija	Količina raztopine (mL)
1	EDTA	0,5 M	10
2	gvanidinijev hidroklorid	6 M	20
3	NaOH	0,1 M	10
4	etanol	20 % (V/V)	50
5	NiSO ₄	0,2 M	20

Kolono smo pri 4 °C namakali v raztopini NiSO₄ do dneva uporabe. Takrat smo jo sprali s 50 mL MQ in nato še s 50 mL Ni-NTA pufra za nanos proteina.

3.2.1.2.2 Kolona za gelsko kromatografijo

Pri redni in skrbni uporabi kolone Superdex 200 ni bilo potrebno izvajati posebnih postopkov čiščenja. Pred nanosom vzorcev smo jo sprali le z 48 mL pufra za gelsko kromatografijo. Po uporabi smo jo spirali še s 30 mL MQ in nato s 30 mL 20-odstotnega (V/V) etanola in jo shranili pri 4 °C do naslednje uporabe. Če pa so se na kolono adsorbirale nečistoče, smo jo spirali s 25 mL 0,5 M NaOH pri pretoku 0,5 mL/min, nato pa še z vsaj 25 mL destilirane vode pri pretoku 25 mL/min. Čisto kolono smo shranili pri 4 °C v 20-odstotnem etanolu.

3.2.1.3 Produkcija Msmeg_4207

3.2.1.3.1 Transformacija kompetentnih celic s plazmidno DNA

Že pripravljenih 100 µL kompetentnih celic *E. coli*, shranjenih pri 70 °C, smo 10 minut odtajevali na ledu, dodali 1 µL plazmidne DNA (koncentracija od 80 do 100 ng/mL) in inkubirali v enakih temperaturnih razmerah še dodatnih 30 minut. Nato smo izvedli toplotni šok v termobloku pri 42 °C. Sledilo je dodajanje 200 µL gojišča LB in enourna inkubacija na rotacijskem stresalniku pri 150 vrt./min. Suspenzijo smo nato v celoti

razmazali na selekcijsko gojišče (hranilni agar LB z dodanim ampicilinom v koncentraciji 100 µL/mL) ter inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.2.1.3.2 Izražanje rekombinantnega proteina in shranjevanje produkta postopka

S sterilno plastično cepilno zanko smo postrgali kolonije transformiranih celic ter jih prenesli v 50 mL tekočega selektivnega gojišča za indukcijo rasti. Kulturo smo 2 uri stresali pri 37 °C in 180 vrt./min. 1 mL tako pripravljene bakterijske suspenzije smo dodali 1 L svežega gojišča za rast, ki je vseboval ampicilin. Na ta način smo pripravili skupno 4 L gojišča z rekombinantnimi celicami v štirih različnih erlenmajericah (volumen posamezne erlenmajerice je bil 3 L). Kulture smo stresali pri 37 °C in 180 vrt./min ter sproti merili absorbanco pri 600 nm s pomočjo spektrofotometra Diode Array Spectrophotometer (Hewlett Packard) dokler gostota celic ni dosegla vrednosti absorbance med 1,1 in 1,2. Nato smo vsebine erlenmajeric ohladili na ledu do temperature ~20 °C, dodali induktor izražanja rekombinantnega proteina – IPTG, v končni koncentraciji 0,5 mM, in stresali 20 ur pri 20 °C in 180 vrt./min. Pred indukcijo in po zaključeni gojitvi smo v mikrocentrifugirke odvzeli 1 mL kulture za preverjanje nivoja izražanja proteina. Vzorca smo 15 minut centrifugirali pri 5000 vrt./min pri 4 °C s pomočjo centrifuge J2-HS Centrifuge (Beckman) odstranili supernatant, usedlino ponovno suspendirali v 150 µL pufra za resuspendiranje celic in ju shranili pri –20 °C. Za preverjanje nivoja izražanja Msmeg_4207 z NaDS-PAGE elektroforezo smo uporabili po 10 µL obeh shranjenih vzorcev.

Po končani rasti smo bakterijsko kulturo centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 5000 vrt./min in usedlino ponovno suspendirali v 40 mL pufra za resuspendiranje celic. Suspenzijo smo shranili v plastično vrečko, jo zmrznili v tekočem dušiku in do izolacije shranili pri –80 °C.

3.2.1.3.3 Ekstrakcija topnih proteinov

Zmrznjeno suspenzijo bakterijskih celic smo odtalili na ledu, vsebino vrečke prelili v čašo in dodali inhibitor serinskih proteaz PMSF do končne koncentracije 2 mM. Bakterijski material smo homogenizirali z ultrazvočno dezintegracijo z veliko potopno sondo sonikatorja Sonicator 385 (Heat Systems- Ultrasonics Inc.) s premerom konice 13 mm.

Program, ki je trajal 7 minut z eno sekundo trajajočim pulzom, presledkom dveh sekund in 38-odstotno amplitudo, smo dvakrat ponovili. Pri postopku smo vzorec hladili na ledu da smo preprečili denaturacijo proteinov.

Po soniciranju smo v mikrocentrifugirko odvzeli 10 µL vzorca in ga shranili pri –20 °C do preverjanja z NaDS-PAGE elektroforezo. Nato smo celično kašo centrifugirali 45 minut pri 12000 vrt./min, supernatant prelili v čašo ter dodali 1 M raztopino imidazola s pH 8,0 do končne koncentracije 10 mM. Mešanico smo nato prefiltrirali v 150 mL-zanko za FPLC skozi filter z 0,45 µm- porami ter odvzeli 10 µL vzorca. Shranili smo ga pri –20 °C do preverjanja z NaDS-PAGE elektroforezo.

3.2.1.4 Izolacija in čiščenje proteinov

Ločevanje, izolacija in čiščenje je potekalo v več stopnjah in na več načinov za pridobitev čim bolj homogenega in čistega tarčnega proteina. Pri tem smo uporabljali tako afinitetno kromatografsko metodo z imobiliziranim nikljem, dializo za razsoljevanje in gelsko kromatografijo.

3.2.1.4.1 Ni-NTA kromatografija raztopine proteinov

Kot že rečeno je to afinitetna kromatografija, princip ločevanja pa temelji na specifični afiniteti posamezne molekule do ligandov vezanih na nosilec. V tem primeru je nosilec agaroz (Sephacrose®), na katero je vezan ligand – nitrilotriocetna kislina (NTA). Negativno nabit del NTA molekule veže nikljeve katione, na katere pa se nato vežejo proteinske molekule preko vezi z dušikovimi atomi, ki so v stranskih skupinah histidinov. Ti prostorsko ležijo drug blizu drugega in tako kelirajo nikljeve ione. Nekateri proteini dejansko vsebujejo take skupke histidinov že v njihovi nativni obliki, v večini primerov pa jih dodamo s pomočjo histidinskih afinitetnih repkov na N-terminalni del proteinske strukture.

Kolona s kromatografskim medijem kot tudi 150 mL-zanka za nanos vzorca sta bili priključeni na kromatografski sistem Äkta FPLC (GE Healthcare), s katerim smo uravnavali parametre pri ločevanju. Kromatografski sistem smo najprej očistili z 20-

odstotnim etanolom, nato pa še z MQ. Ker je bila kolona z Ni-NTA shranjena v 20-odstotnem etanolu, smo tudi njo pred uporabo spirali s pretokom 2 mL/min s 50 mL MQ in nato še s 50 mL Ni-NTA pufrom za nanos proteina.

Nanos vzorca iz zanke na kolono je potekal pri pretoku 1 mL/min, nato pa smo povečali pretok na 2 mL/min. Po padcu absorbcije raztopine smo nanašalni pufer nadomestili z Ni-NTA pufrom za spiranje kolone in ohranjali pretok 2 mL/min. Nazadnje je s pretokom 2 mL/min potekalo še spiranje kolone z Ni-NTA pufom za elucijo proteina. Ta vsebuje višjo koncentracijo imidazola, ki tekmuje z vezanim proteinom za koordinacijska mesta na nikljevem kationu. Pri vseh treh korakih smo zbirali eluat s povišano absorpcijsko vrednostjo v ohlajeno čašo na ledu, ter tako razdelili izhodno mešanico proteinov na tri dele: nanos, predelucija in elucija. Vsebnost proteinov v vseh treh vzorcih smo preverili z NaDS-PAGE elektroforezo 10 µL vzorca nanosa, 15 µL predelucije in 5 µL elucije.

3.2.1.4.2 Dializa in cepitev s TEV proteazo

Pri dializi manjše molekule prehajajo skozi pore dializne cevi v smeri koncentracijskega gradienta. Zato smo to tehniko uporabili za zmanjšanje ionske jakosti in odstranitev imidazola iz proteinske suspenzije.

Eluatu iz prejšnje točke, ki je vseboval tarčni protein, smo dodali 4 mL raztopine TEV proteaze. Vse skupaj smo nato prelili v dializno cev Spectra/Por 1 Dialysis Membrane (Spectrum Laboratories), ki zadrži molekule večje od 6–8 kDa ter sistem prenesli v 3 L ohlajenega dializnega pufru. Po 12 urah dialize in cepitve pri 4 °C smo odvzeli 10 µL-vzorec in preverili uspeh cepitve z NaSDS-PAGE elektroforezo. Ker cepitev ni bila zadostna, smo v sistem za dializo dodali še 2 mL raztopine TEV proteaze. Po pretečenih 4 urah smo ponovili odvzem in analizo vzorca ter dodali še 2 mL raztopine proteaze v dializno cev. V istih razmerah smo vzorec inkubirali še 12 ur. Po 28 urah dialize ter cepitve vzorca s proteazo smo ga ponovno nanесли na Ni-NTA nosilec.

3.2.1.4.3 Ni-NTA kromatografija dializata

Cilj te kromatografije je bil ločitev Msmeg_4207 proteina z odstranjenim zaporedjem s histidinskim afinitetnim repkom od proteaze TEV in ostalih proteinov. Dializiran vzorec smo prelili v 50 mL-zanko FPLC sistema ter jo priključili na predhodno očiščen sistem z Ni-NTA kolono. Postopek čiščenja, spiranja nevezanih in vezanih proteinov ter shranjevanja eluata smo izvedli po opisu v točki 3.2.1.4.1. Očiščen Msmeg_4207 protein se je spral kot nevezana frakcija.

3.2.1.4.4 Koncentriranje proteinov s centrifugiranjem

Pri tem postopku gibalne sile delcev v raztopini niso odvisne od koncentracijskega gradienta kot pri dializi. Delci, ki so manjši od por filtra v koncentradorju, pri centrifugiranju prehajajo skozi filtrirno membrano zaradi povečane sile gravitacije. S to metodo protein tudi koncentriramo. Uporabili smo na ledu ohlajen sistem za filtracijo Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices s porami, ki prepuščajo molekule manjše od 3 kDa. Centrifugiranje približno 64 mL vzorca po zadnji Ni-NTA kromatografiji je potekalo pri 3600 rcf in 4 °C v centrifugah Rotina 35 R ali Rotina 28 R (Hettich Zentrifugen) do končne prostornine 3,5 mL v več korakih, ko smo postopoma dodajali vzorec in preverjali, da se ne bi protein obarjal zaradi povišanja koncentracije. Koncentriran protein smo nato shranili v 12 mL- centrifugirki pri –80 °C do naslednje stopnje čiščenja.

3.2.1.4.5 Gelska kromatografija

Pri tem tipu kromatografije pride do porazdelitve med stacionarno in mobilno fazo zaradi različne velikosti molekul v vzorcu. Tako še dodatno ločimo tarčni protein od ostalih zaradi različnih hitrosti potovanja delcev skozi kolono.

Uporabljali smo že napolnjeno kolono z gelom Superdex 200 10/300 GL, ki ima prečno povezane dekstranske molekule z agarozo in območjem frakcioniranja molekul z molekulskimi masami od 10 do 600 kDa. Kolono smo pred kromatografijo povezali na prečiščen sistem za FPLC in jo spirali s 24 mL pufru za gelsko kromatografijo s pretokom

0,5 mL/min. Hkrati smo proteinski koncentrat (prejšnja točka) odtajali na ledu in po 700 µL alikvotov (enakih delov) 10 minut centrifugirali pri 4 °C in 13200 vrt./min v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf). Z injekcijsko brizgo smo po 500 µL supernatanta nanesti na kolono, vzdrževali pretok 0,5 mL/min in zbirali frakcije po 0,5 mL. Prisotnost in čistost proteinov v zbranih frakcijah smo analizirali z NaDS-PAGE elektroforezo. Najbolj čiste in koncentrirane raztopine smo združili v skupno centrifugirko, do nadaljnega dela pa shranili pri –80 °C.

3.2.1.4.6 Ocenjevanje koncentracije očiščenega proteina

S pomočjo Lambert-Beerovega zakona (1), pri čemer je absorbanca raztopine (A) enaka produktu ekstinkcijskega koeficienta (ϵ), dolžine poti žarka skozi raztopino (l) in koncentracije raztopine (c), smo določili vrednost koncentracije proteinov v raztopini združenih frakcij gelske kromatografije.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad \dots(1)$$

Absorbcijo UV svetlobe pri 280 nm smo merili v kvarčni kiveti širine 1 mm s pomočjo UV-VIS spektrofotomera Agilent 8453, UV-Visible Chemstation software (Agilent Technologies). Meritev smo 4-krat ponovili ter za pravo vrednost absorbcije izbrali povprečno vrednost dobljenih rezultatov. Tak način merjenja je absoluten in zelo neprecizen ampak hiter in namenjen grobi ocenitvi proteinske koncentracije pod pogojem, da poznamo molarni ekstinkcijski koeficient proteina (ϵ) pri 280 nm. Določili smo ga s pomočjo orodja ProtParam (Gasteiger in sod., 2005) in je za protein Msmeg_4207 enak 2980 M⁻¹cm⁻¹ oz. 0,213 mg/mL za 0,1-odstotno raztopino.

3.2.1.4.7 Ultrafiltracija eluata gelske kromatografije in shranjevanje čistega proteinskega koncentrata

Za koncentriranje proteinov smo uporabili sisteme Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices podobno, kot je opisano v točki 3.2.1.4.4. 14 mL raztopine, ki smo ji določili koncentracijo proteinov, smo tako koncentrirali do volumna ~1,6 mL. Po 26 µL koncentrata smo alikvotirali v 30, po 52 µL pa v 13 mikrocentrifugirk. Očiščeno,

koncentrirano in razporejeno proteinsko raztopino smo shranili pri -80°C , ostanek pa uporabili za preverjanje z NaDS-PAGE elektroforezo.

3.2.1.5 Produkcija, izolacija in čiščenje selenometioninskega derivata Msmeg_4207

Celoten postopek je potekal podobno kot pri produkciji in izolaciji Msmeg_4207, le da smo spremenili nekatere gojitvene medije in izvedbo stopenj rasti celic. Namesto 4 L gojišča za rast z rekombinantnimi celicami smo pripravili le 2 L. Kulturo smo inkubirali pri 37°C in 180 vrt./min dokler gostota celic merjena pri A_{600} ni dosegla vrednosti 1,0. Nato smo suspenzijo centrifugirali 15 minut pri 4°C in 5000 vrt./min, odstranili supernatant, usedlino pa ponovno suspendirali v 100 mL PBS pufra. Mešanico smo zopet centrifugirali v enakih razmerah, odstranili supernatant in celice suspendirali v 20 mL minimalnega gojišča. To smo potem razdelili med štiri erlenmajerice z 1 L gojišča in inkubirali 1 uro pri 37°C in 180 vrt./min. Vsebinsi vsake erlenmajerice smo dodali še IPTG do končne koncentracije 0,4 mM in stresali 20 ur pri 20°C in 180 vrt./min. Izolacijo, čiščenje in preverjanje prisotnosti proteina smo v celoti izvajali podobno kot pri Msmeg_4207. Čisti proteinski koncentrat smo razdelili na enake dele po 26 μL v enajst, po 52 μL pa v šest mikrocentrifugirk in jih shranili pri -80°C .

3.2.2 Analitske metode

3.2.2.1 Analiza aminokislinskega zaporedja Msmeg_4207

Najbolj podobna aminokislinska zaporedja smo poiskali v javno dostopnih zbirkah podatkov z algoritmom BLAST – blastp (Altschul in sod., 1990). Sorodstvena razmerja smo pridobili z orodjem Blast Tree View (Altschul, 1993) z Neighbor-Joining metodo (Saitou in Nei, 1987) in jih predstavili s programskim orodjem TreeView (Page, 1996).

Za napoved 3D strukture Msmeg_4207 na podlagi homologije in pridobitev sorodnih struktur smo uporabili strežnik Phyre (Kelley in Sternberg, 2009). Za ugotavljanje prisotnosti motiva in aminokislin pomembnih pri vezavi ATP pa smo uporabili orodje ClustalW2 (Larkin in sod., 2007).

3.2.2.2 Elektroforezne metode

Pri ločevanju molekul v električnem polju smo uporabili dve metodi: potovanje molekul proteina skozi poliakrilamidno membrano v denaturacijskih in nativnih razmerah.

3.2.2.2.1 NaDS-PAGE elektroforeza

Ta metoda ločuje proteine in proteinske podenote glede na njihove molekulske mase (Laemmli, 1970). Anionski detergent natrijev dodecilsulfat (NaDS) denaturira in obda proteinske molekule z negativnim nabojem. Te v električnem polju potujejo proti anodi, hitrost njihovega potovanja pa je obratno sorazmerna z njihovo velikostjo.

Ustrezno redčene proteinske vzorce v mikrocentrifugirkah smo obtežili in obarvali tako, da smo jih zmešali s 3 μ L nanašalnega pufra NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X). Nato smo jih segrevali v termobloku pri 80 °C in sicer 15 minut pri testu stabilnosti proteina skozi čas, 45 minut pri analizi pristnosti kristalov in 10 minut pri ostalih analizah. Po segrevanju smo vzorce 10 minut centrifugirali pri 13200 vrt./min v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf) ter jih poleg standardov znanih molekulskih mas Precision Plus Protein Unstained Standards nanegli v žepke poliakrilamidnega gela NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gel, ki je bil vpet v komplet XCell SureLock Mini-Cell. Kontinuirno elektroforezo smo 50 minut izvajali pri konstantni napetosti 200 V in začetnem toku 125 mA v 5-odstotni raztopini 20-kratnega elektroforeznega pufra NuPAGE® MES SDS Running Buffer redčenega v MQ. Takoj po končani elektroforezi smo gele 3-krat po 5 minut splakovali v MQ in nato še stresali 30 minut v barvilu SimplyBlue™SafeStain za vizualizacijo proteinskih lis. Večjo kontrastnost lis na barvanem gelu smo dosegli z namakanjem v MQ preko noči.

3.2.2.2.2 Nativna elektroforeza

Pri tehniki nendenaturacijske oz. native gelske elektroforeze pride do ločevanja proteinov in njihovih podenot glede na velikost, naboj in obliko, saj pore v akrilamidnem gelu in električno polje vplivajo na hitrost gibanja molekul.

Vzorci smo ustrezno redčili s pufrom za gelsko kromatografijo, jim dodali 5 µL 5-kratnega vzorčnega pufru za nativno elektroforezo in 10 minut centrifugirali pri 13200 vrt./min v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf). Nanesli smo jih na že pripravljen gel debeline 0,75 mm, ki je imel dve različno zamreženi fazi – zbiralni gel s 5-odstotno zamreženostjo in ločevalni gel z 12-odstotno zamreženostjo. Elektroforezo smo izvajali 180 minut z vertikalnim elektroforeznim sistemom Mini Protean III (Bio-Rad) v pufru za nativno elektroforezo pri 4 °C in konstantni napetosti 90 V.

3.2.2.3 Preučevanje stabilnosti proteina

Z NaDS-PAGE elektroforezo in nativno elektroforezo smo skušali ugotoviti, ali prihaja do sprememb v osnovni strukturi proteina v kolikor je ta dlje časa izpostavljen sobni temperaturi.

Raztopino čistega proteina s koncentracijo 30 mg/mL smo 20 dni inkubirali pri 20 °C. Pri tem smo dvakrat po 1 µL odvzeli takoj prvi dan in nato še tretji, šesti, deseti, trinajsti, sedemnajsti in dvajseti dan. Po odvzemu smo vzorce takoj shranili pri –20 °C do dneva analize. Takrat smo vzorcem dodali po 19 µL istega pufru, ki smo ga uporabili pri gelski kromatografiji in raztopine analizirali z elektroforeznimi metodami kot je navedeno v točki 3.2.2.2.

3.2.2.4 Molekulska masa proteina

Molekulsko maso proteina smo ocenjevali z analitsko ločitveno kromatografijo s pomočjo sistema Äkta FPLC (GE Healthcare) na katerega je bila vezana kolona Superdex 200 10/300 GL. Pri tem postopku smo gelsko kolono kalibrirali z elucijskimi volumni topljencev z znanimi molekulskimi masami in velikostmi (proteinski standardi, preglednica 8). Za vsak topljenec posebej smo po Laurentu in Killandru (2) (Laurent in Killander, 1964) iz elucijskega volumna (V_e), prostega volumna (V_o) in volumna stacionarne faze (V_b) izračunali porazdelitvene koeficiente (K_{av}):

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_b - V_o) \quad \dots(2)$$

Na podlagi izračunanih vrednosti smo narisali umeritveno krivuljo, ki prikazuje odvisnost porazdelitvenega koeficienta od logaritma molekulske mase kalibracijskih topljencev, iz nje pa določili molekulsko maso proteina.

Pripravili smo po 1,5 mL raztopin standardnih proteinov s pufrom za gelsko elektroforezo v mikrocentrifugirkah v koncentracijah kot jih omenja spodnja preglednica (preglednica 8) in jih 10 minut centrifugirali pri 4 °C in 13200 vrt./min v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf), da smo se znebili nečistoč. Medtem smo kolono pripravili kot je zapisano v točki 3.2.1.2.2.

Preglednica 8: Lastnosti topljencev z znanimi molekulskimi masami, ki smo jih uporabili za umeritev kolone.

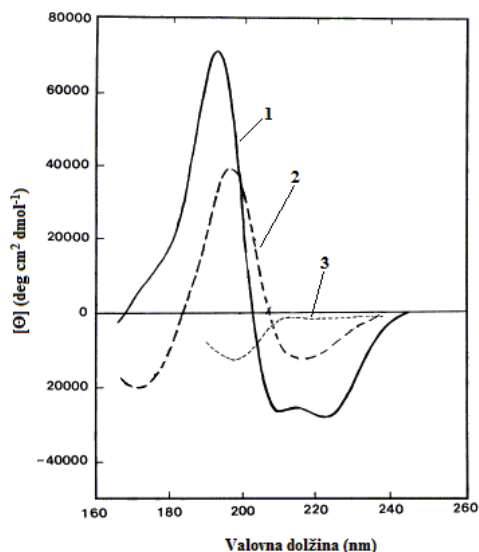
Kalibracijski topjenec	Molekulska masa (kDa)	Koncentracija (mg/mL)
Lizocim	14,7	3
Kimotripsinogen A	25	1
Ovalbumin	43	1
Goveji serumski albumin	67	2,6
Aldolaza	158	2,4
Feritin	440	4,5

Po 500 µL centrifugirane raztopine vsakega topljenca smo s siringo nanesli na kolono in 48 minut zbirali podatke o eluciji pri pretoku 0,5 mL/min. Analizo smo za vsak topjenec dvakrat ponovili. Nazadnje smo na podoben način analizirali tudi sveže pripravljeno raztopino proteina Msmeg_4207 s koncentracijo 0,1 mg/mL.

3.2.2.5 Merjenje cirkularnega dikroizma

Cirkularni dikroizem (CD) je spektroskopska tehnika za preučevanje proteinske strukture v raztopini. Podaja informacijo o neenakomerni absorpciji levo in desno orientirane polarizirane svetlobe optično aktivnih molekul, kamor spadajo tudi proteini. Tako lahko glede na absorpcijski spekter (odmik polarizirane svetlobe) preučujemo prisotnost strukturnih motivov v makromolekuli kot so npr. alfa vijačnice, beta ploskve in neurejene strukture (slika 8). Zaradi peptidnih vezi lahko zaznamo absorpcijske maksimume v

daljšem območju UV svetlobe, ki obsega valovne dolžine od 178 do 250 nm, celoten absorpcijski spekter proteina pa je seštevek spektrov njegovih strukturnih elementov.



Slika 8: CD spektri različnih sekundarnih struktur proteinov (Kelly in sod., 2005: 121). Oznake: 1 – alfa vijajnica, 2 – beta ploskev, 3 – neurejena struktura.

CD spektre smo posneli s CD spektrofotometrom Chirascan (Applied Photophysics) pri 20 °C, konstantnem toku dušika in valovnih dolžinah od 190 do 280 nm s sekundnim korakom po 0,5 nm. Pri tem smo uporabili kiveto dolžine 1 mm in volumnom 200 μ L, koncentracija vzorcev Msmeg_4207 pa je bila 0,1–0,2 mg/mL.

3.2.2.6 Analiza prisotnosti vezanih ligandov

Prisotnost vezanih ligandov v proteinu smo analizirali z masno spektrometrijo in HPLC. Koncentrat proteina (30 mg/mL) Msmeg_4207, ki je bil shranjen pri –80 °C, smo odtajali na ledu. V mikrocentrifugirki smo pripravili 150 μ L 200 μ M proteinske raztopine, jo 1 uro denaturirali pri 100 °C in nato centrifugirali 10 minut pri 13200 vrt./min v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf). Supernatant smo odpipetirali v rezervoar centrifugirnega sistema za ultrafiltracijo Microcon Ultracel YM-10 z membrano, ki pri centrifugiranju prepušča molekule manjše od 10 kDa. Vse skupaj smo prenesli v filtrirno centrifugirko. Sledilo je 30-minutno centrifugiranje pri 13200 vrt./min in 4 °C v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf), merjenje volumna retentata v filtrirni

centrifugirki in dopolnjevanje manjkajočega volumna z dodajanjem MQ v rezervoar. Postopek s centrifugiranjem in dopolnjevanjem z MQ smo ponavljali dokler nismo pridobili 150 μ L filtrirane raztopine, ki smo jo shranili pri -20°C .

3.2.2.6.1 Analiza z masno spektrometrijo

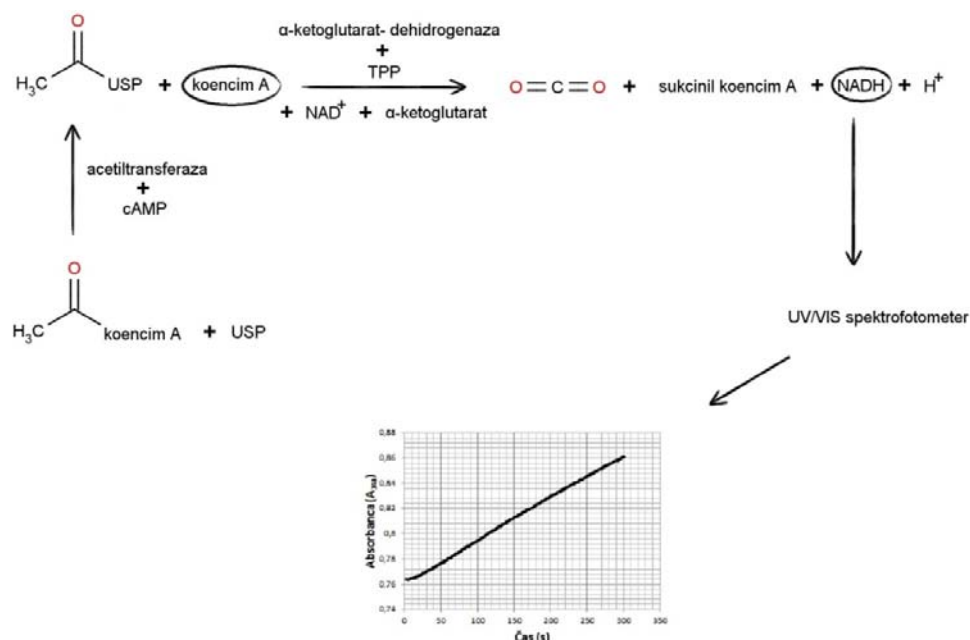
Analizo mas komponent v raztopini filtrata iz prejšnje točke smo izvedli v sodelovanju z dr. Dušanom Žigonom, Center za masno spektrometrijo, Inštitut Jožef Štefan (Ljubljana). Delo je potekalo na tekočinskem kromatografu nanoUPLC in kvadrupolnem, ortogonalno pospešenem tandemskem masnem spektrometru z analizatorjem na čas preleta ionov (Tof) z anionskim izvirom MALDI ter pri atmosferskem tlaku. Injicirali smo po 5 μ L vzorca z nosilnim medijem 0,1 % (V/V) format in analizirali pri pretoku 0,2 mL/min.

3.2.2.6.2 Analiza s HPLC

Pri tej metodi smo uporabljali tekočinski kromatograf visoke ločljivosti, Agilent 1100 series HPLC, s kolono Supercosil[®] LC-8-DB HPLC Column (Sigma-Aldrich), pri pretoku 1 mL/min in tlaku 9100 kPa, za hitro, analitsko in preparativno ločitev proteinov in organskih spojin. Posamezne komponente vzorcev (filtrat iz točke 3.2.2.6) smo eluirali z hkratnim mešanjem večkomponentnih raztopin 35 % mobilne faze A (raztopina $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 6,2) in 65 % mobilne faze B (mobilna faza A z 20 % (V/V) metanola) in merili absorbanco pri 254 nm.

3.2.2.7 Encimska reakcija z acetiltransferazo

Nambi in sod. (2010) so v svoji raziskavi opisali spektrofotometrično merjenje stopnje acetilacije USP v reakcijski mešanici. Na podoben način (slika 9) smo merili aktivnost z že predhodno izoliranimi acetiltransferazami (Msmeg_5458 in Msmeg_5458 *cyc*⁻) in proteinom, ki je bil del naše raziskave, Msmeg_4207.



Slika 9: Shema reakcije z acetiltransferazo in spektrofotometričnega merjenja spremembe koncentracije NADH. Acetiltransferaza Msmeg_5458 katalizira prenos acetilne skupine iz acetil-koencima A na USP (Msmeg_4207). Koencim A pa igra vlogo v drugi reakciji, ki jo katalizira α -ketoglutarat-dehidrogenaza. Produkti le-te so CO₂, sukcinil koencim A in NADH + H⁺. Reakcija poteka s koencimom tiamin pirofosfatom (TPP).

Acetiltransferaza v odvisnosti od cAMP v reakcijski mešanici katalizira prenos acetilne skupine iz molekule acetil-koencima A. Poleg acetiliranega USP proteina pri tem nastaja tudi koencim A, ki je skupaj z NAD⁺ in α -ketoglutaratom, substrat v novi reakciji. Pri tej nastanejo sukcinil-koencim A, NADH in CO₂. Katalizira jo α -ketoglutarat-dehidrogenaza s koencimom tiamin pirofosfatom. Stopnjo acetilacije lahko določamo s kontinuiranim spektrofotometričnim merjenjem produkcije NADH pri 340 nm.

Reakcijska mešanica (150 μ L) je v osnovi vsebovala 0,2 mM NAD⁺, 0,2 mM TPP, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2,4 mM α -ketoglutarata, 50 μ M acetil-koencima A, 0,03 encimskih enot α -ketoglutarat-dehidrogenaze in 50 mM TBA pufra. Pred dodatkom Msmeg_4207 ali pufra za gelsko kromatografijo v primeru slepe meritve, acetiltransferaze in cAMP smo vse ostale komponente 5 minut inkubirali pri 25 °C. Po dodatku omenjenih komponent smo nato 5 minut spremljali aktivnost pri 340 nm v kvarčni kiveti širine 1 mm z UV-VIS spektrofotometrom Agilent 8453 (Agilent Technologies). Preučili smo aktivnost obeh

oblik acetiltransferaze v različnih koncentracijah in v prisotnosti ali odsotnosti Msmeg_4207 ter cAMP (preglednica 9). Vsako meritev reakcije smo ponovili trikrat, nastalo koncentracijo NADH pa določili iz Beer-Lambertovega zakona (1), pri čemer smo upoštevali, da je vrednost ekstinkcijskega koeficienta NADH enaka $6230 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Preglednica 9: Koncentracije dodanih komponent osnovi reakcijske mešanice pri posamezni reakciji.

Reakcija	Koncentracija dodane komponente (mM)			
	Msmeg_5458	Msmeg_5458 cyc-	Msmeg_4207	cAMP
1	0	0	0	0
2	0	0	0,05	1
3	0,0002	0	0,05	0
4	0,0002	0	0,05	1
5	0	0,0002	0,05	0
6	0	0,0002	0,05	1

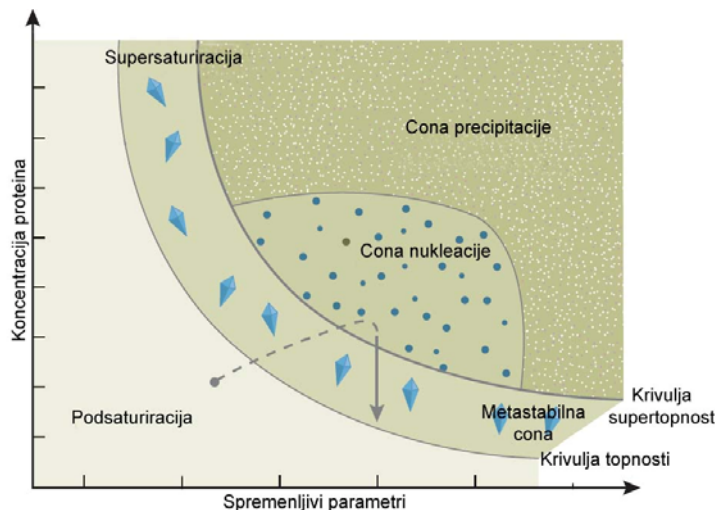
3.2.2.8 Kristalizacija, preverjanje in shranjevanje kristalov proteina

3.2.2.8.1 Kristalizacija proteina

Vsakemu sistemu, ki se premika proti ravnovesju, se povečuje stopnja nereda oz. entropija. Hkrati pa pride do tendence po znižanju proste Gibbsove entalpije sistema. To je posledica nastajanja kemijskih vezi in interakcij, ki zagotavljajo negativno prosto energijo. Združevanje molekul v trdno mrežo zato zmanjša njihovo mobilnost in prostostne stopnje, kar je pa razlog tvorbe kristalov. Stabilnejše kot so vezi, nižja je prosta energija sistema, kristali pa so pravilnejših oblik.

Proteini so kot vse druge makromolekule zapleteni fizikalno-kemijski sistemi. Njihove značilnosti se spreminjajo v odvisnosti od temperature, pH, ionske moči, ligandov, homogenosti in čistosti raztopine, količine vzorca, njihove topnosti... Za pridobitev informacije o njihovi strukturi s pomočjo merjenja sipanja X-žarkov jih je potrebno kristalizirati, kristali, ki jih pridobimo, pa morajo biti dovolj veliki in čim bolj pravilnih oblik (monokristali). Zato kristalizacija makromolekul zahteva sistematično iskanje točke ustrezne koncentracije proteina v raztopini in fizikalno-kemijskih razmer okolja kjer pride do tvorbe kristalov (slika 10). Chayen in Saridakis (2008) se strinjata, da zaenkrat še ni

korelacije med razmerami za uspešno kristalizacijo proteinov določene proteinske družine in kvaliteto njihovih kristalov.

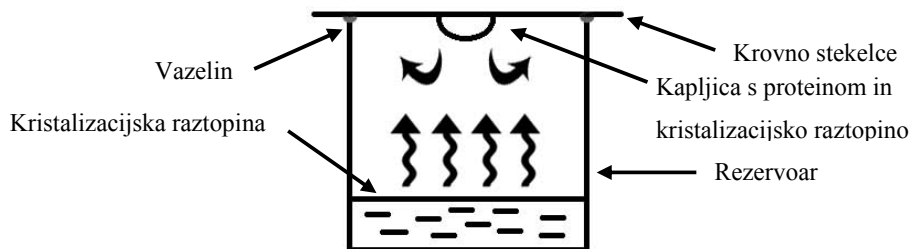


Slika 10: Shematska ilustracija faznega diagrama pri proteinski kristalizaciji (Chayen in Saridakis, 2008: 150). Med spremenljive parametre uvrščamo pH, temperatura, ionska moč... Puščica nakazuje pot do nukleacije in metastabilne cone, ko je koncentracija spremenljivega parametra ravno pravišnja za kristalizacijo proteina. Krivulja topnosti predstavlja območje, kjer je koncentracija proteina v raztopini enaka njegovi koncentraciji v kristalih. Krivulja supertopnosti pa ločuje razmere pri katerih pride do spontane nukleacije ali fazne separacije ali precipitacije ter kristalizacije.

Proteinski kristali nastajajo ob prenasičenju raztopine proteinov (supersaturacija), kar lahko dosežemo z obarjalnimi sredstvi kot so anorganske soli, organska topila, linearni polimeri (polietilenglikol)... Obstaja več načinov pridobivanja proteinskih kristalov, najpogostejši med njimi je kristalizacija s parno difuzijo (Chayen in Saridakis, 2008), kjer je proteinska raztopina v viseči ali sedeči kapljici v razmerju 1:1 s kristalizacijsko raztopino. V primeru metode z visečo kapljico (slika 11), ki smo jo uporabili za kristalizacijo Msmeg_4207, stekelce s kapljico mešanice vzorca proteina ter kristalizacijske tekočine položimo nad rezervoar s kristalizacijsko raztopino. Ta sistem mora biti nepredušno zaprt.

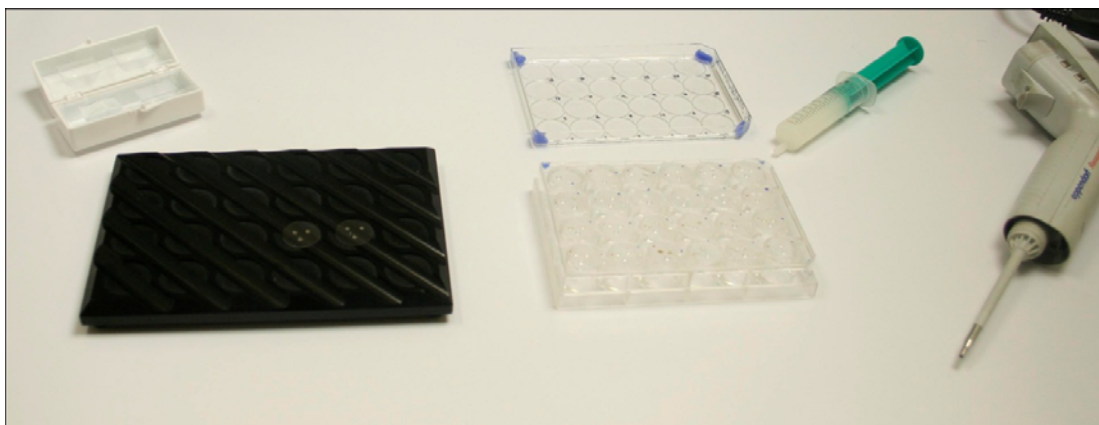
Vzpostavi se koncentracijski gradient, voda prehaja iz kapljice, kjer je koncentracija kristalizacijske raztopine manjša, iz rezervoarja pa v njo morebitna dodatna topila. Pri tem lahko pride do spreminjanja koncentracije proteina in ionov v kapljici in do supersaturacije

ali obarjanja. Kristalizacijske raztopine vsebujejo kombinacijo pufrov (za uravnavanje pH), soli (za ionsko jakost) ter obarjalnih sredstev (soli v visokih koncentracijah, polietilenglikol, razni alkoholi...). Primer kompleta kristalizacijskih raztopin je v prilogi (priloga C).



Slika 11: Kristalizacija s tehniko viseče kapljice. Puščice označujejo izmenjavo topil med kapljico in rezervoarjem.

Koncentrat Msmeg_4207 ali SeMet Msmeg_4207 smo 10 minut odtajevali na ledu, ga po potrebi redčili s pufrom v katerem smo protein predhodno izolirali in centrifugirali 10 minut pri 13200 vrt./min in 4 °C v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf). V vsak rezervoar ploščic za gojitev tkivnih kultur 24-well Cell Culture Plate (BD Bioscience Falcon) smo dodali po 0,5 mL določene kristalizacijske raztopine, na robove rezervoarja nanesli vazelin, na robove pokrova ploščice pa plastelin. V kolikor smo sami pripravili kristalizacijsko raztopino iz različnih komponent, smo pokrite ploščice 45 minut pred dodajanjem proteina stresali na namiznem stresalniku MiniShaker PSU 2T (Biosan), da je bila raztopina bolj homogena.



Slika 12: Oprema za kristalizacijo. Od leve proti desni: silikonizirana stekelca na kristalizacijskem pladnju s tremi 2 µL- kapljicami, za kristalizacijo pripravljena ploščica za gojitev tkivnih kultur, brizga z vazelinom in avtomatska pipeta za nanos kapljic.

Silikonizirana stekelca za kristalizacijo (Hampton Research) smo razporedili po kristalizacijskem pladnju (Hampton Research), nanje odpipetirali po eno kapljico z 1 µL pufra za gelsko kromatografijo, v katerem je shranjen protein, in po 2 kapljici z 1 µL proteinske raztopine. Prva kapljica je predstavljala negativno kontrolo, v drugi je bila koncentracija proteina 15 mg/mL v tretji pa 30 mg/mL. Vsaki kapljici smo nato dodali po 1 µL raztopine iz rezervoarja pod njo, ter nato stekelce s kapljicami položili na rezervoar. Stik med stekelcem in rezervoarjem smo zlepili z vazelinom. Ko smo namestili vsa stekelca, smo ploščico zaščitili še s pokrovom in inkubirali v temi pri 21 °C. S stereomikroskopom Nikon SMZ1500 smo dnevno pregledovali in ocenjevali rezultate kristalizacije po lestvici: 1 – kapljica brez tvorbe; 2 – fazna separacija; 3 – precipitacija; 5 – sferuliti; 6 – igličasti kristali; 7 – ploščati tanki kristali; 8 – pravilne, debele kristalne tvorbe; 9 – večje in pravilne kristalne tvorbe. Ocenjevanje je potekalo kvalitativno in čeprav podvrženo subjektivni oceni, je vseeno pripomoglo k izbiri razmer za optimizacijsko kristalizacijo, izbiri kristalov za zamrzovanje in tudi k primerjanju deleža nastajanja in obarjanja kristalov po dnevih izpostavljanja proteinskega koncentrata različnim kristalizacijskim razmeram.

Samo pri kristalizaciji proteina Msmeg_4207 smo uporabili komercialno dostopne komplete raztopin (Hampton Research): Index Screen, Memb Fac, Natrix Screen, Peg Ion screen I, Peg Ion screen II in Salt RX screen. Na ta način smo preverili kristalizacijo v 384

različnih raztopinah pri dveh koncentracijah proteina. Za izvedbo optimizacijske kristalizacije pa smo sami posebej pripravili založne raztopine komponent tistih kristalizacijskih raztopin, ki so predstavljale okolje za nastanek največjih in najbolj urejenih kristalov. Te smo nato razporedili v jamice novih ploščic (optimizacijske ploščice) in jih ustrezno redčili s sveže pripravljeno MQ, naprej pa delali kot je omenjeno v prejšnjem odstavku. Razporeditev in sestava kristalizacijske raztopine v vsakem rezervoarju pri različnih ploščicah je opisana v prilogah (prilogi D in E). Sprva smo za kristalizacijo Msmeg_4207 uporabili vse ploščice razen D, E in G (opis v omenjenih prilogah). Po pozitivnih rezultatih (nastanku velikih in pravih kristalnih tvorb) pa še vse ploščice razen A in C pri kristalizaciji SeMet Msmeg_4207 (opis v omenjenih prilogah).

3.2.2.8.2 Preverjanje pristnosti kristalov

Če bi prišlo do obarjanja in kristalizacije neproteinskih komponent v raztopini v rezervoarju, bi verjetno opazili nespecifične tvorbe v kontrolni kapljici. Vseeno pa smo pristnost nastalih kristalov (vsebnost proteina in morebitne spremembe zaradi spontane proteolize v kapljici) v kapljicah s proteinom skušali potrditi še z NaDS-PAGE elektroforezo. V kolikor kristali ne bi bili proteinskega izvora, na elektroforetskem gelu ne bi opazili lis, ki prikazujejo potovanje denaturirane komponente proteina v električnem polju. Na takšen način smo preverili kristale iz kapljic z Msmeg_4207 iz rezervoarjev 19 ploščice A in 17 ploščice C ter SeMet Msmeg_4207 iz rezervoarja 9 ploščice D (priloga D).

Za elektroforezo smo kristale pripravili tako, da smo na silikonizirano stekelce odpipetirali 5 kapljic po 5 μ L raztopine iz rezervoarja, kjer smo opazili kristale. Te smo pod stereomikroskopom z zanko za lovljenje kristalov CryoLoop (Hampton Research) (slika 13) spirali s prenašanjem iz ene kapljice v drugo. Zadnjo 5 μ L- kapljico smo odpipetirali v mikrocentrifugirko, dodali še 10 μ L MQ in suspendirali kristale. Nato smo sledili postopku za NaDS_PAGE elektroforezo, opisanem v točki 3.2.2.2.1.

3.2.2.8.3 Shranjevanje kristalov

Kristale, za katere smo menili, da so največji in imajo najbolj pravilne robove ter ploskve, smo zamrznili v tekočem dušiku do merjenja sipanja X-žarkov na sinhrotronu. Na silikonizirana stekelca smo odpipetirali po 5 μ L ustreznih krio-raztopin. Pod stereomikroskopom smo z zanko za lovljenje kristalov prenašali kristale iz ene raztopine v drugo v smeri naraščajoče koncentracije etilenglikola, ki je bil v tem primeru krio-komponenta (preprečuje nastanek ledu v kapljici). Ko smo prenesli kristal v zadnjo kapljico (s od 25 do 30-odstotnim (V/V) etilenglikolom), smo ga ujeli z zanko ter vse skupaj zamrznili pri $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (tekoči dušik). Vse smo nato prestavili v stekleničko za zamrzovanje CrystalCap Vial (Hampton Research), na ta način shranjen protein pa potopili v tekoč dušik v transportni krioposodi Voyageur 12 (Air Liquide).



Slika 13: Zanka za lovljenje kristalov CryoLoop (Hampton Research). Oznake: A – zanka na paličici, B – v sliki A s puščico označena zanka pod stereomikroskopom.

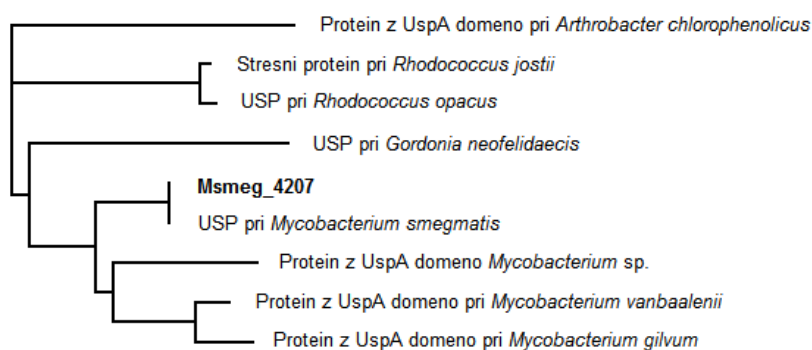
3.2.2.8.4 Merjenje sipanja X-žarkov

Sipanje X-žarkov smo merili v mednarodnem multidisciplinarnem laboratoriju Elettra (Sincrotrone Trieste S.C.p.A. di interesse nazionale, Trst, Italija) na liniji žarkov XRD1. Za analizo sipanja kristala označenega s selenom smo uporabljali metodo Single Wavelength Anomalous Dispersion (SAD) z valovno dolžino X-žarka 12,86 keV in pri temperaturi 100 K. Posneli smo sipanje v kotu 360° , eno sliko na eno stopinjo.

4 REZULTATI

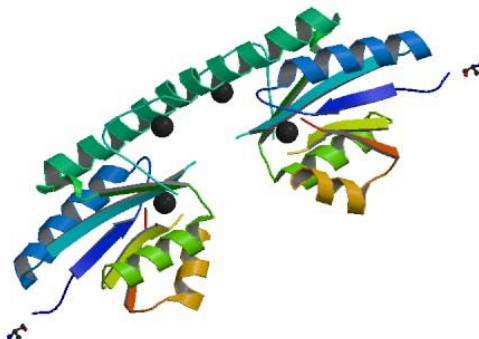
4.1 ANALIZA AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA

Z analizo sorodnosti aminokislinskega zaporedja Msmeg_4207 z algoritmom BLAST smo ugotovili, da je zaporedje najbolj sorodno zaporedjem USP iz družine UspA proteinov pri nekaterih mikobakterijah kot tudi pri nekaterih drugih bakterijah z visokim deležem gvanina in citozina (slika 14).



Slika 14: Filogenetski odnosi med aminokislinskim zaporedjem Msmeg_4207 in njemu najbolj podobnimi zaporedji pridobljenimi z algoritmom BLAST.

Z uporabo strežnika Phyre smo pridobili najbolj sorodne strukture proteinov. Vse so pripadale družini univerzalnih stresnih proteinov. Tako so najvišjo identičnost izkazali hipotetični protein TTHA0895 *Thermus thermophilus* (29 % identičnost), hipotetični protein Rv1636 *M. tuberculosis* (22 % identičnost), kristalna struktura proteina bakterije *Nitrosomonas europaea* (21 % identičnost) (slika 15) in kristalna struktura proteina Rv2623 *M. tuberculosis* (19 % identičnost). Ta protein ima v strukturi vezno tudi ATP molekulo (slika 6). S primerjavo aminokislinskih zaporedji nekaterih USP-jev z zaporedjem Msmeg_4207 s programom ClustalW2 smo preverili, ali ta protein vsebuje ohranjen motiv in aminokislino, ki so ključni pri vezavi ATP (priloga F). Obe aminokislini nista prisotni, ohranjen pa je le del pomembnega motiva. Podobno kot UspA pri *H. influenzae*, ki ne veže ATP na 4 mestu v motivu nima aminokislino gvanin. Iz tega sledi, da Msmeg_4207 verjetno ne veže molekul ATP.



Slika 15: Kristalna struktura USP-ja pri *Nitrosomonas europaea* (PDB dostopna koda 2PFS). V strukturi dimera pa so tudi vidni kloridni ioni (črne kroglice).



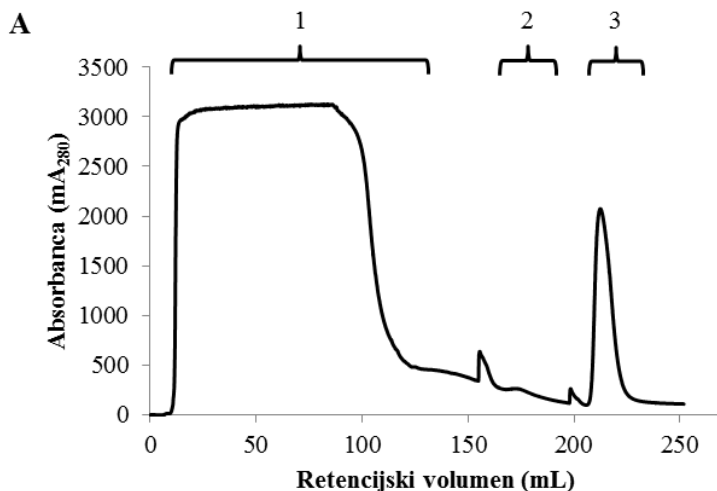
Slika 16: Napoved 3D strukture monomerne domene Msmeg_4207 na podlagi strukture proteina TTHA0895. Pri tem smo uporabili strežnik Phyre (Kelley in Sternberg, 2009).

4.2 PRODUKCIJA, IZOLACIJA IN ČIŠČENJE

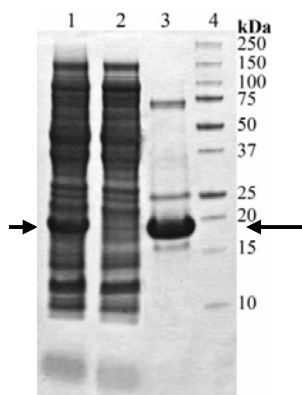
V tem poglavju so opisani rezultati, ki smo jih dobili s produkcijo, izolacijo in čiščenjem proteina Msmeg_4207 brez selenometionina. Pri izolaciji proteina s selenometioninom (SeMet Msmeg_4207) gre za enak postopek zato smo dobili enake rezultate, a le manjši končni volumen izolata.

4.2.1 Ni-NTA kromatografija raztopine proteinov

S preučevanjem absorbcije centrifugirane in filtrirane celičnega homogenata in zbiranja eluata pri Ni-NTA kromatografiji smo pridobili 3 proteinske frakcije (slika 17).



Slika 17: Kromatograma centrifugiranega in filtriranega celičnega homogenata (Ni-NTA kolona) pri izolaciji Msmeg_4207. Shranili smo eluat: 1 – od 10 do 135 mL, 2 – od 164 do 191 mL in 3 – od 206 do 232 mL.



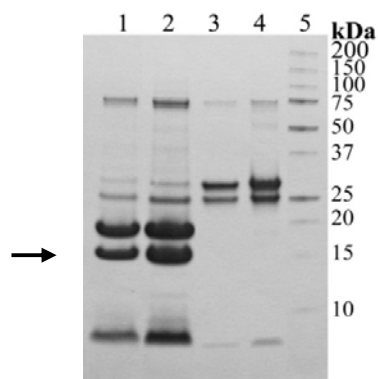
Slika 18: NaDS-PAGE elektroforeza vzorcev prvih faz produkcije, izolacije in čiščenja Msmeg_4207. Na gel smo nanесли: 1 – vzorec centrifugiranega in filtriranega celičnega homogenata pred kromatografijo, 2 – vzorec iz raztopine na Ni-NTA kolono nevezanih proteinov (frakcija 1 na sliki 17), 3 – vzorec iz raztopine na Ni-NTA kolono vezanih proteinov (frakcija 3 na sliki 17), 4 – standardi. Mase standardov so označene na desni strani. Puščici označujeta lisi z velikostjo 17 kDa.

Z NaDS-PAGE elektroforetsko analizo prve in tretje frakcije po Ni-NTA kromatografiji supernatanta (centrifugiran in filtriran celični homogenat) smo določili tisto, ki vsebujejo največ tarčnega proteina (slika 18).

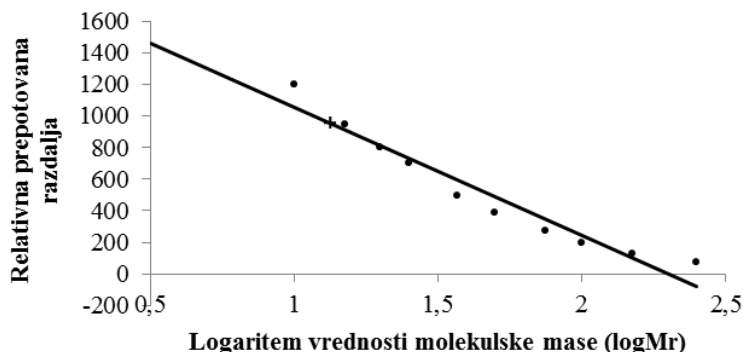
S pomočjo elektroforetskega vzorca proteinskih lis smo določili, da je molekulska masa proteina, ki smo ga izolirali v največji koncentraciji enaka približno 17 kDa.

4.2.2 Dializa in cepitev s TEV proteazo

Z NaDS-PAGE elektroforezo smo analizirali produkte pri postopku dialize in cepljenja s TEV proteazo ter jih primerjali z raztopino proteaze (slika 19).



Slika 19: NaDS-PAGE elektroforeza vzorcev cepljenja s proteazo TEV in dialize raztopine z Msmeg_4207. Vzorci na gelu: 1 – po 12 urah dialize, 2 – po 28 urah dialize, 3, 4 – raztopina proteaze, 5 – standardi. Puščica označuje prepotovano razdaljo proteinov, ki ustrezajo molekularni masi Msmeg_4207.

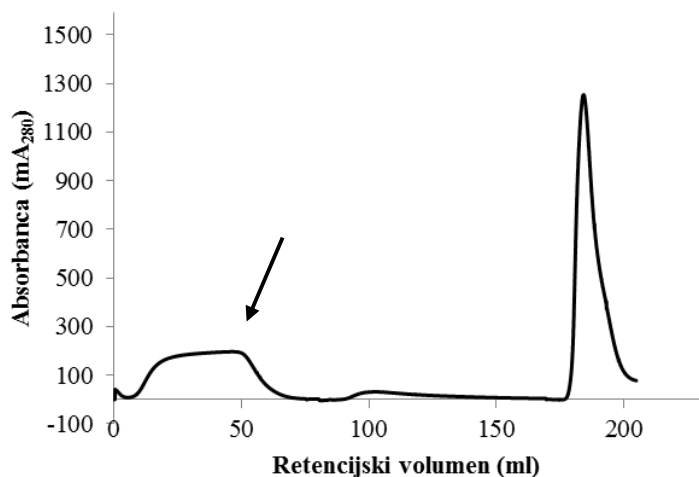


Slika 20: Kalibracijski graf za določanje molekulske mase s puščico označenih proteinov na sliki 19. Točke prikazujejo odvisnost relativne prepotovane razdalje standardov od logaritma vrednosti njihovih molekulskih mas. Križec prikazuje vrednost molekulske mase, ki ustreza prepotovani razdalji na novo nastalega produkta z velikostjo okoli 14 kDa ki ustreza masi USP-ja Msmeg_4207.

Ugotovili smo, da je pri cepljenju prišlo do nastanka dveh produktov. Za manjšega (na dnu gela) smo predvidevali, da gre za odcepljeno zaporedje s histidinskim repkom. Za večjega pa, da gre za USP, saj se molekulska masa (določitev s kalibracijskim grafom na sliki 20) ujema s teoretično molekulsko maso 14 kDa. Ta podatek smo pridobili z analizo aminokislinskega zaporedja Msmeg_4207 (priloga B) s pomočjo orodja ProtParam (Gasteriger in sod., 2005).

4.2.3 Ni-NTA kromatografija dializata

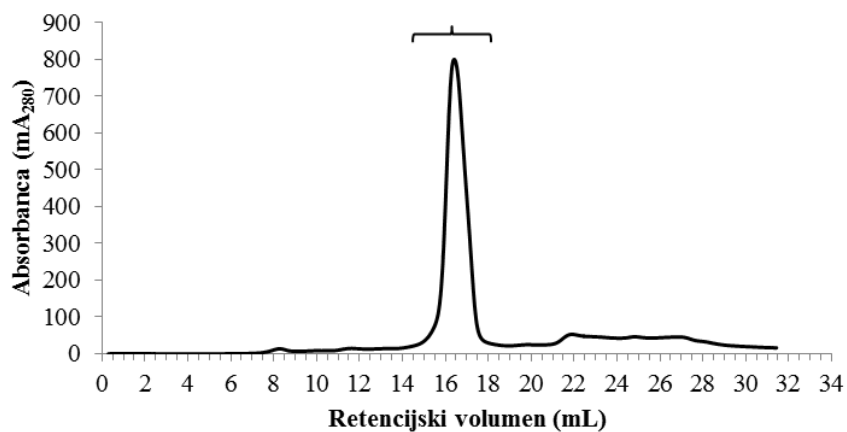
Z izvedbo Ni-NTA kromatografije dializata in analizo absorbcije raztopine smo zopet pridobili tri frakcije (slika 21). Prvo smo koncentrirali z ultrafiltracijo.



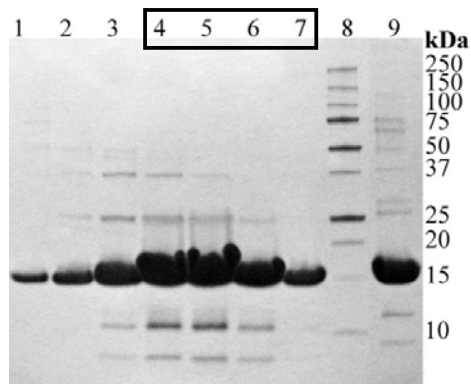
Slika 21: Kromatogram dializata na Ni-NTA koloni pri MsMeg_4207. Puščica označuje eluat od 11 do 75 mL, ki smo ga v naslednjem koraku koncentrirali z ultrafiltracijo.

4.2.4 Gelska kromatografija

Približno 3,5 mL ultrafiltrata z MsMeg_4207 smo po 500 μ L z gelsko kromatografijo frakcionirali (slika 22), z NaDS-PAGE kromatografijo pa preverili koncentracijo proteinov v frakcijah z najvišjo absorbcijo.



Slika 22: Kromatogram MsMeg_4207 na koloni Superdex 200. Z NaDS-PAGE kromatografijo smo preučili 0,5 mL frakcije od 14,5 mL do 18,0 mL (slika 23), ki so na sliki tudi označene.



Slika 23: NaDS-PAGE elektroforeza gelske kromatografije ultrafiltrata pri čiščenju Msmeg_4207. Na gelu so frakcije: 1 – od 14,5 do 15,0 mL, 2 – od 15,0 do 15,5 mL, 3 – od 15,5 do 16,0 mL, 4 – od 16,0 do 16,5 mL, 5 – od 16,5 do 17,0 mL, 6 – od 17,0 do 17,5 mL, 7 – od 17,5 do 18,0 mL. in 8 – standardi ter 9 – izvorni vzorec, ki smo ga nanegli na kolono. Pravokotnik na sliki označuje združene frakcije, ki smo jih uporabili v nadaljnjem postopku.

Po analizi elektroferograma smo se odločili, da zberemo 500 μ L frakcije z retencijskim volumnom od 15,5 mL do 17,5 mL pri izolaciji Msmeg_4207 in od 15 mL do 17 mL pri izolaciji SeMet Msmeg_4207. Na ta način smo dobili okrog 14 mL raztopine Msmeg_4207 s koncentracijo 3,4 mg/mL. Po ultrafiltraciji je bil volumen te proteinske raztopine s koncentracijo okoli 30 mg/mL 1580 μ L. Po izolaciji in čiščenju SeMet Msmeg_4207 pa smo dobili okrog 9 mL proteinske raztopine s koncentracijo 1,6 mg/mL. Z ultrafiltracijo smo to raztopino koncentrirali do 600 μ L in približne koncentracije 30 mg/mL.

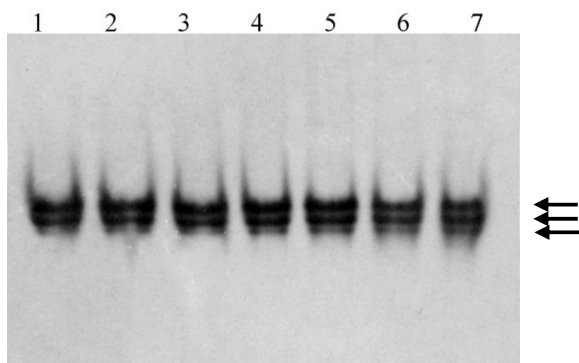
4.3 OPREDELITEV BIOKEMIJSKIH LASTNOSTI Msmeg_4207

4.3.1 Stabilnost

Stabilnost Msmeg_4207 smo testirali pri sobni temperaturi čez daljše časovno obdobje in preverili z nativno in NaDS-PAGE elektroforezo.

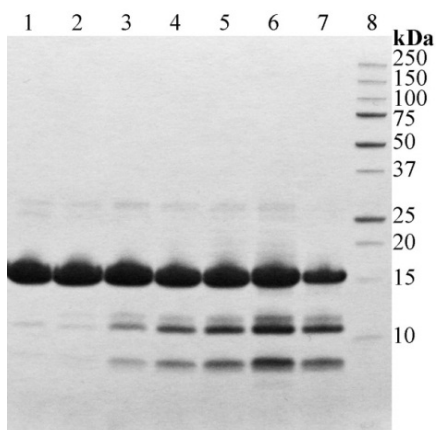
Pri nativni elektroforezi smo opazili, da na gelu vsak vzorec da tri lise (slika 24) ne glede na čas inkubacije proteina. Tudi debelina in položaj teh lis se ne spreminja s časom. Tako

lahko predpostavimo, da se celotna oblika proteinov ni spremenila v raztopini pri sobni temperaturi tudi še po 20-dneh.



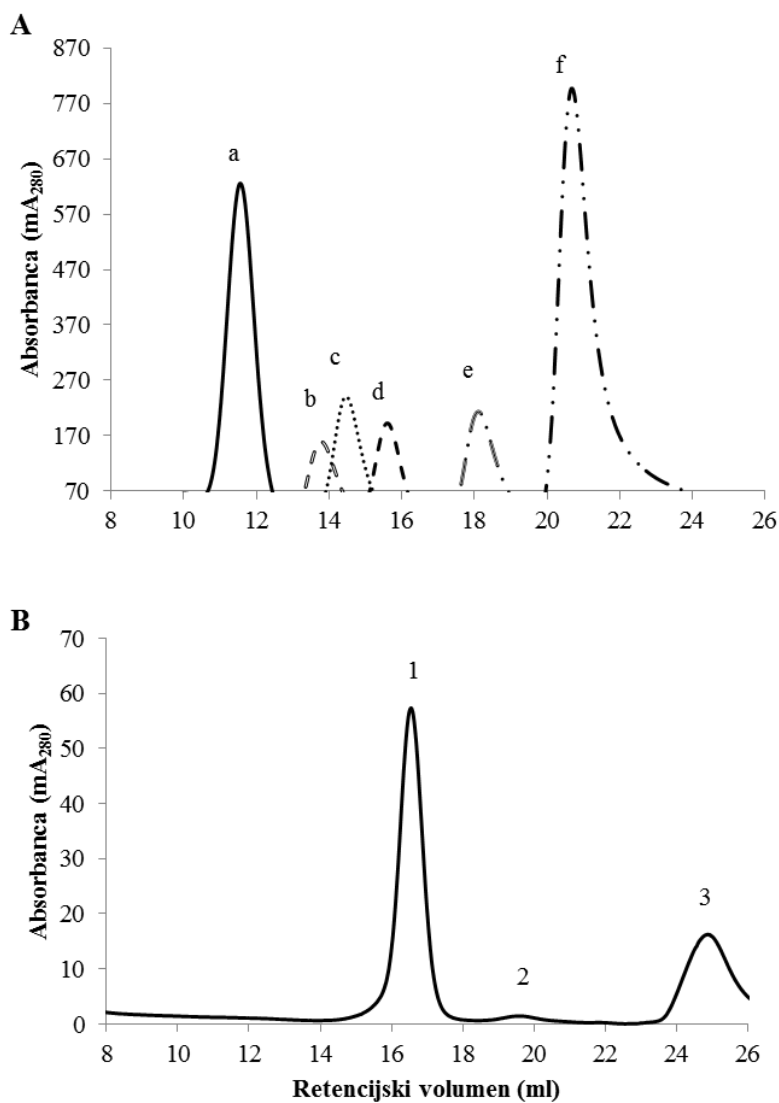
Slika 24: Nativna elektroforeza vzorcev pridobljenih pri stabilnostnem testu. Vzorci: 1 – 1. dan, 2 – 3. dan, 3 – 6. dan, 4 – 10. dan, 5 – 13. dan, 6 – 17. dan, 7 – 20. dan. S puščicami so označene tri lise.

Drugače pa je bilo, ko smo opravili NaDS-PAGE vzorcev (slika 25). Dlje časa ko smo protein izpostavljali sobni temperaturi, bolj intenzivne so bile lise manjše od 14 kDa, kar verjetno predstavlja pojav spontane proteolize v vzorcih.

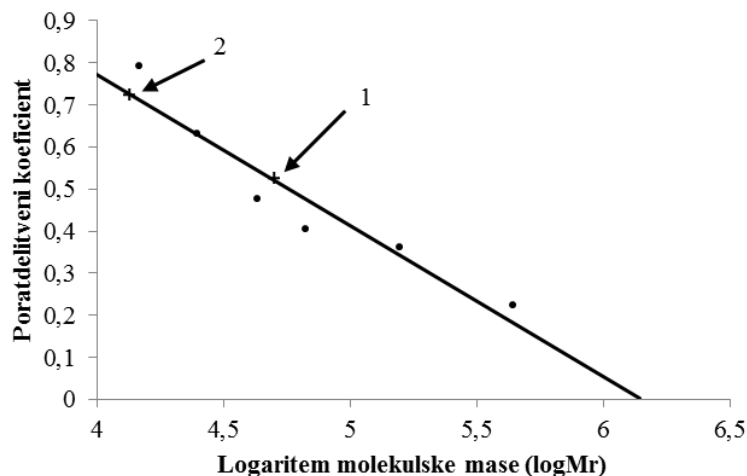


Slika 25: NaDS-PAGE elektroforeza vzorcev pridobljenih pri stabilnostnem testu. Vzorci: 1 – prvi dan, 2 – tretji dan, 3 – šesti dan, 4 – deseti dan, 5 – trinajsti dan, 6 – sedemnajsti dan, 7 – dvajseti dan.

4.3.2 Molekulska masa



Slika 26: Kromatogram proteinov s standardnimi masami (A) v primerjavi s kromatogramom proteina Msmeg_4207 (B) na koloni Superdex 200 10/300 GL. Oznake: a – feritin (440 kDa), b – aldolaza (158 kDa), c – goveji serumski albumin (67 kDa), d – ovalbumin (43 kDa), e – kimotripsinogen A (25 kDa), f – lizocim (14,7 kDa), 1 – Msmeg_4207, ki ustreza masi tetramera, 2 – Msmeg_4207, ki ustreza masi monomera, 3 – produkti razgradnje oz. male molekule iz pufra.

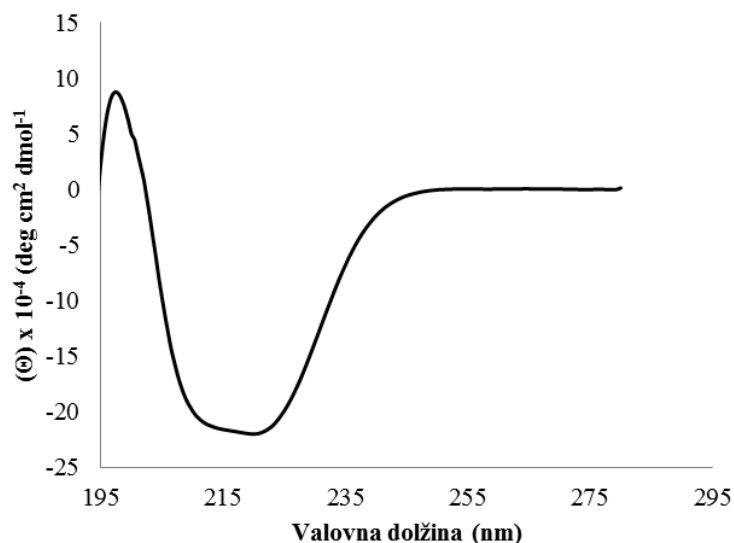


Slika 27: Kalibracijski graf za določanje molekulske mase Msmeg_4207 s kolono Superdex 200 10/300GL. Točke prikazujejo odvisnost relativne prepotovane razdalje standardov od logaritma vrednosti njihovih molekulskih mas. Točka 2 označuje območje, kjer je vrednost molekulske mase 13,5 kDa, ki ustreza monomerni obliki Msmeg_4207, točka 1 pa 51 kDa, kar pa ustreza tetramerni obliki Msmeg_4207.

Z analizo aminokislinskega zaporedja Msmeg_4207 (priloga B) s pomočjo orodja ProtParam (Gasteiger in sod., 2005) smo ugotovili, da molekulska masa monomerne oblike proteina znaša 13959,9 Da. Iz umeritvene krivulje (slika 27), ki smo jo pridobili iz porazdelitvenih koeficientov vsakega topljenca z znano molekulsko maso, pa smo ugotovili, da smo v največji meri izolirali proteine velike okoli 13,5 kDa in 51 kDa. V kolikor je nativna oblika proteina tetramerna, znaša izračunana molekulska masa 55839,6 Da. Vse to se tudi približno ujema s podatki iz točke 4.2.2, v kateri smo tudi iz elektroforetskega gela določili maso proteina, ki znaša okoli 14 kDa.

4.3.3 Merjenje cirkularnega dikroizma proteinske raztopine

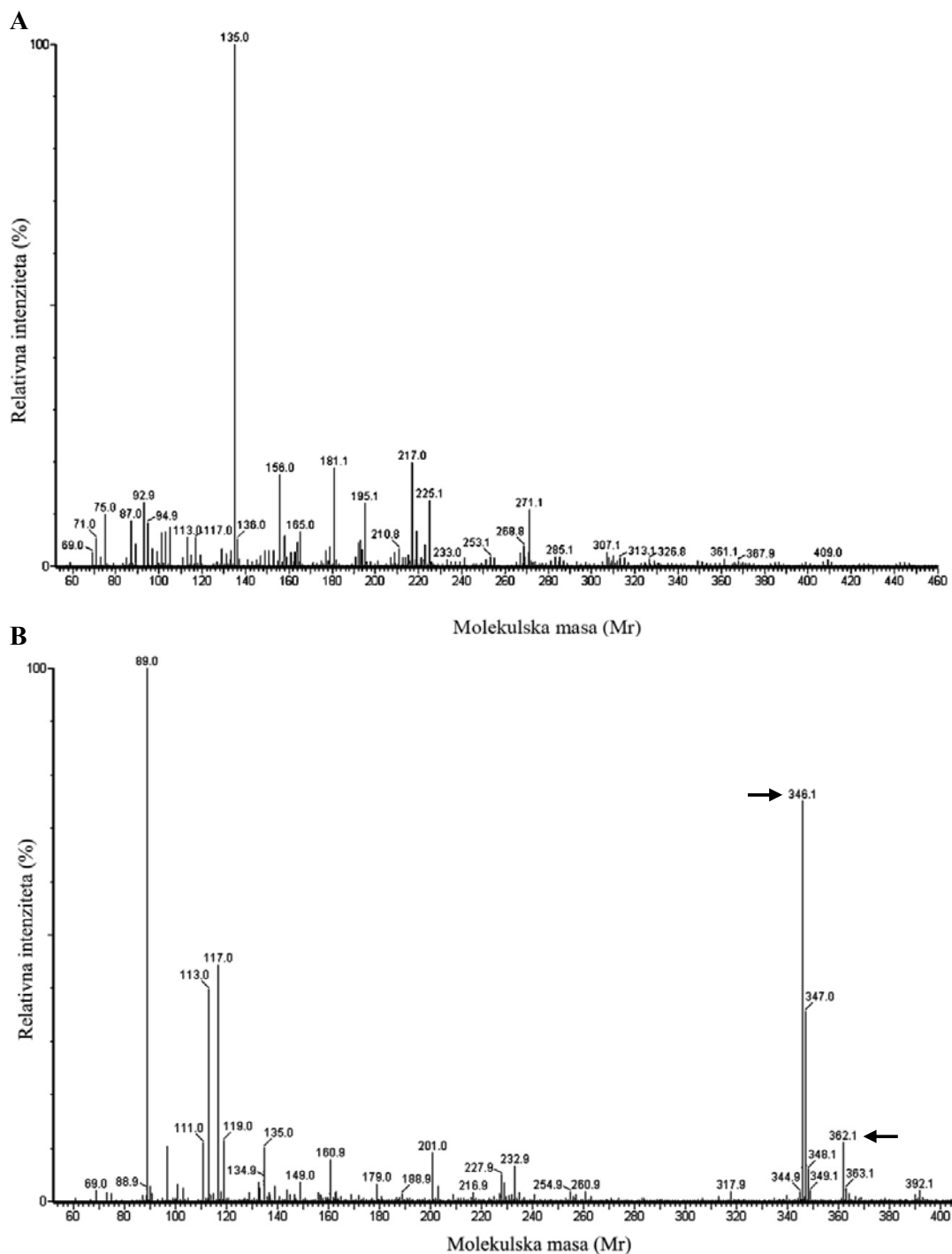
CD spekter predstavlja seštevek absorpcijskih spektrov alfa, beta in neurejenih struktur. Rezultate smo prikazali kot povprečno vrednost treh meritev. Na spodnji sliki (slika 28) je razvidno, da je struktura proteina po večini urejena in ima mešan delež alfa in beta vijačnic.



Slika 28: CD spekter Msmeg_4207 pri koncentraciji 0,1 – 0,2 mg/mL.

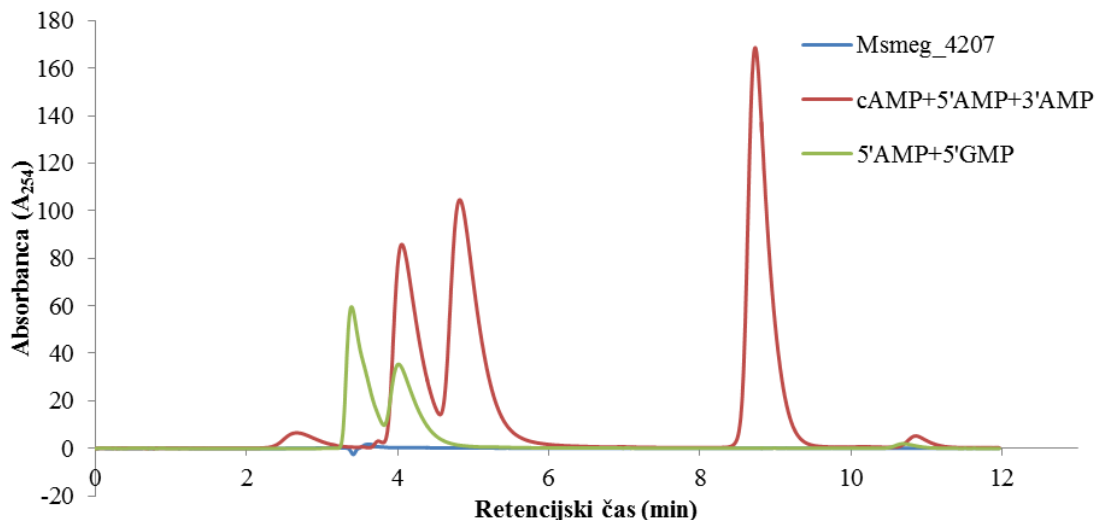
4.3.4 Preverjanje prisotnosti vezanih ligandov pri Msmeg_4207

Ker nekatere družine USP-jev vsebujejo vezane majhne molekule, smo to preverili tudi pri Msmeg_4207. V ta namen smo denaturirali protein. Pri tem naj bi se z njega sprostile vse potencialne nekovalentno vezane molekule. Tak vzorec (supernatant) smo nato analizirali z masno spektrometrijo in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) ter primerjali z nekaterimi standardnimi molekulami (ciklični nukleotidi, linearni nukleotidi ipd.). Pri masni spektrometriji smo pridobili kromatogram odvisnosti relativne prisotnosti molekul v raztopini od razmerja med maso in nabojem (slika 29). Iz te slike smo ugotovili, da niso prisotne nobene izmed potencialnih molekul cikličnih nukleotidov, nukleotidnih monofosfatov ali nukleotidnih difosfatov, oz. molekul pomembnih pri medcelični komunikaciji. Vseeno pa lahko opazimo močan signal molekule z molsko maso v deprotonirani obliki okoli 135,0 g/mol, kar pa je verjetno nečistoča v sistemu, saj tej ne ustreza molekulska masa nobene komponente pufru v katerem je bil protein shranjen (pufer za gelsko kromatografijo) in je premajhna za katerikoli ciklični nukleotid, nukleotidni monofosfat ali difosfat.



Slika 29: Masna spektrometrija Msmeg_4207. A – masni spekter supernatanta denaturiranega proteina, B – standardni masni spekter raztopine, ki vsebuje adenzin monofosfat in gvanozin monofosfat (označujeta puščici). Molska masa prvega v deprotoniranem stanju znaša okoli 346 g/mol, drugega pa 362 g/mol.

Za potrditev rezultatov masne spektrometrije smo raztopino analizirali tudi s HPLC. Ta prav tako potrjuje domnevo o odsotnosti nukleotidnih ligandov v Msmeg_4207 (slika 30).



Slika 30: HPLC analiza raztopine Msmeg_4207 v primerjavi z mešanico nukleotidnih molekul cAMP, 5'AMP in 3'AMP ter mešanico 5'AMP in 5'GMP.

4.3.5 Encimska reakcija z acetiltransferazo

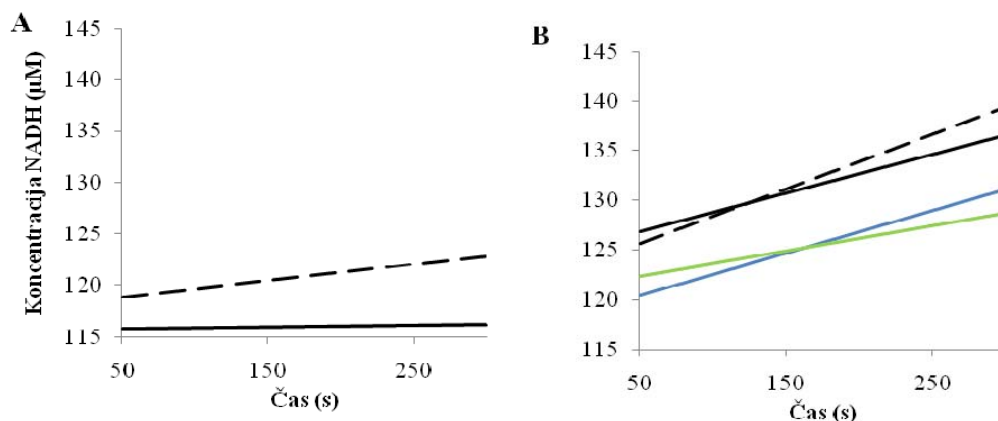
Rezultat reakcije je strnjen v spodnji preglednici (preglednica 10) in sliki (slika 31).

Preglednica 10: Povprečne začetne hitrosti reakcij pri analizi reakcije z acetiltransferazo in njihove relativne napake. Prisotnost posameznih komponent v reakcijski mešanici je označena z: (+) – je prisotna in (-) – ni prisotna.

Reakcija	Msmeg_5458	Msmeg_5458 cyc-	Msmeg_4207	cAMP	Povprečna začetna hitrost – v_0 (nM/s)	Relativna napaka
1	-	-	-	-	1,8	± 0,2
2	-	-	+	+	16,1	± 0,1
3	+	-	+	-	38,8	± 0,1
4	+	-	+	+	55,2	± 0,0
5	-	+	+	-	25,5	± 0,1
6	-	+	+	+	43,1	± 0,0

Do nastanka NADH je prišlo že v reakcijski mešanici, ki ni vsebovala Msmeg_5458 (reakcija 2), kar nakazuje, da do manjšega acetiliranja USP lahko pride tudi s kemijsko reakcijo brez prisotnosti encima. V reakcijski mešanici z Msmeg_5458, cAMP in

Msmeg_4207 (reakcija 4) je bila začetna hitrost najvišja. Hitrosti reakcij 5 in 6 pa kažejo, da je aktivnost acetiltransferaze močno odvisna od prisotnosti cAMP. Kakor Nambi in sod. (2010) smo potrdili katalitično sposobnost od cAMP odvisne acetilacije Msmeg_5458.



Slika 31: Reakcija z acetiltransferazo – časovna odvisnost koncentracije nastalega NADH. A – polna črta prikazuje spreminjanje koncentracije NADH po 50 sekundah pri reakciji 1, črtkana pa pri reakciji 2. B – črna črtkana črta prikazuje spreminjanje koncentracije NADH po prvih 50 sekundah pri reakciji 3, črna pri reakciji 4, modra pri reakciji 5, zelena pa pri reakciji 6.

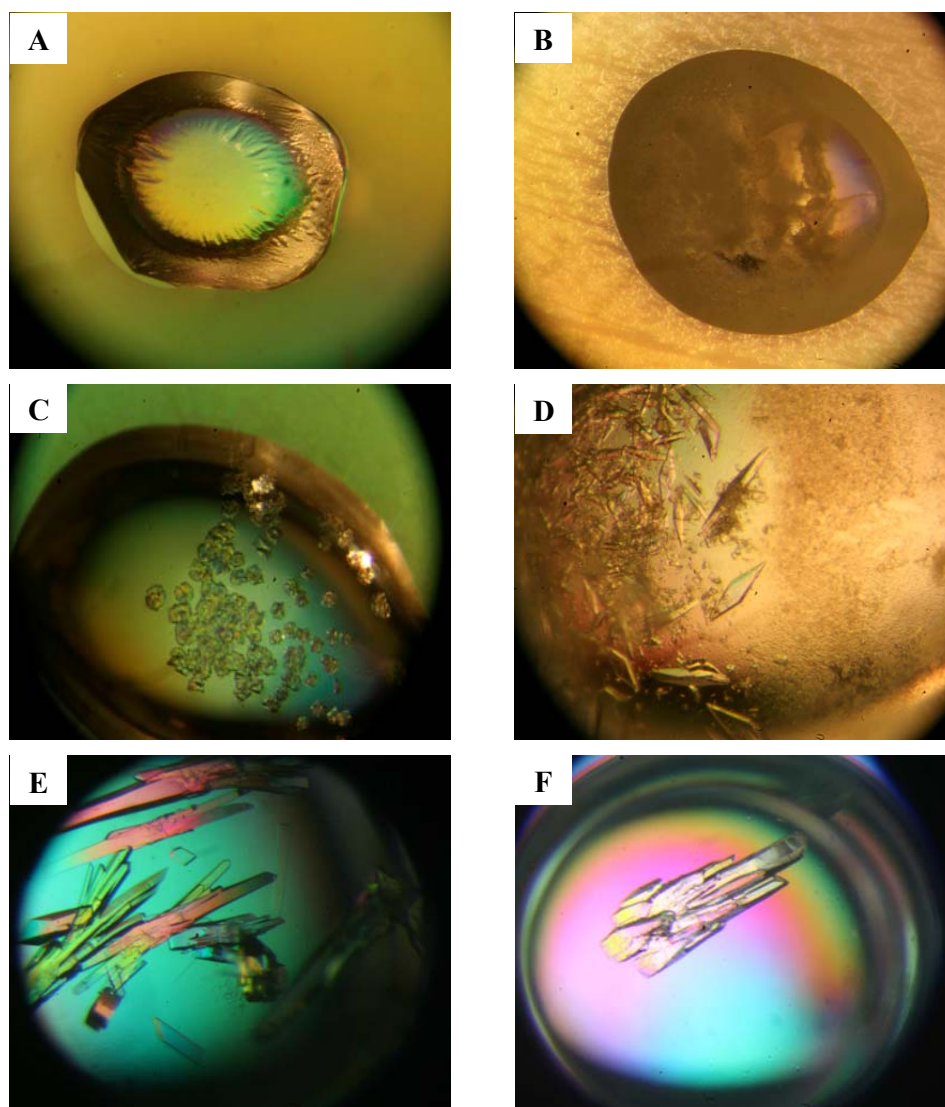
Preglednica 11: Primerjave hitrosti različnih reakcij pri encimski reakciji z acetiltransferazo in njihova relativna napaka.

Primerjalne reakcije	Razmerje hitrosti	Relativna napaka
2 proti 1	9,1	± 0,3
3 proti 2	2,4	± 0,1
3 proti 5	1,5	± 0,2
4 proti 2	3,4	± 0,1
4 proti 3	1,4	± 0,1
4 proti 5	2,2	± 0,1
4 proti 6	1,3	± 0,0
6 proti 5	1,7	± 0,1

4.4 KRISTALIZACIJA, PREVERJANJE IN SHRANJEVANJE KRISTALOV PROTEINA

4.4.1 Kristalizacija proteina in shranjevanje kristalov

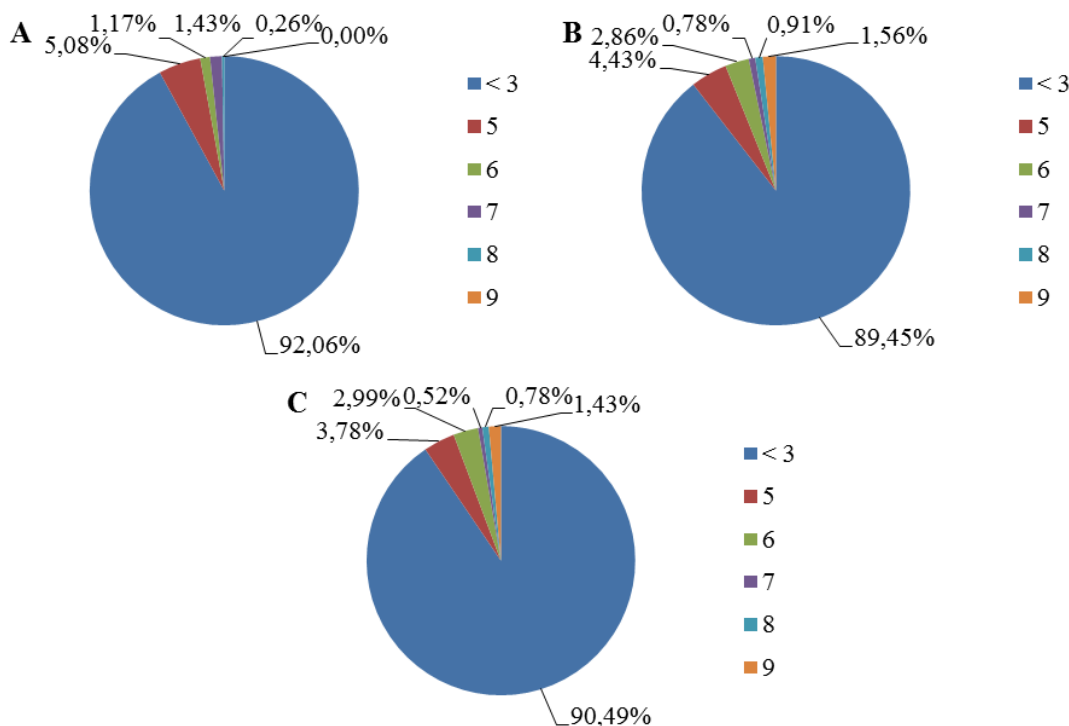
Iskanje pravih kristalizacijskih razmer je podobno iskanju igle v kupu sena (Chayen in Saridakis, 2008). Kljub temu in dejstvu, da produkta gena Msmeg_4207 še niso nikoli kristalizirali, je prišlo do nastanka kristalov z vsemi komercialnimi kompleti v vsaj eni kristalizacijski raztopini. Spremljali smo »razvoj kristalov« – nastanek kristalov iz oborjene raztopine, kapljice s fazno separacijo ali čiste, prosojne raztopine in raztapljanje oz. staranje kristalov, ko so njihovi robovi postali nepravilni in ploskve nagubane (slika 32).



Slika 32: Različni načini reakcije raztopine proteinskega koncentrata proteina na različne kristalizacijske razmere. Posamezne slike: A – fazna separacija raztopine Se-Met Msmeg_4207 (rezervoar 3 na ploščici G); B – oborina raztopine Se-Met Msmeg_4207 (rezervoar 5 na ploščici B); C – sferuliti Se-Met Msmeg_4207 (rezervoar 5 na ploščici G); D – nastajanje kristalov iz oborine v raztopini z Msmeg_4207 (rezervoar 14 na ploščici B); E – kristali Msmeg_4207 raztopini 38, kompleta Peg Ion II; F – kristal Msmeg_4207 (rezervoar 5 na ploščici H).

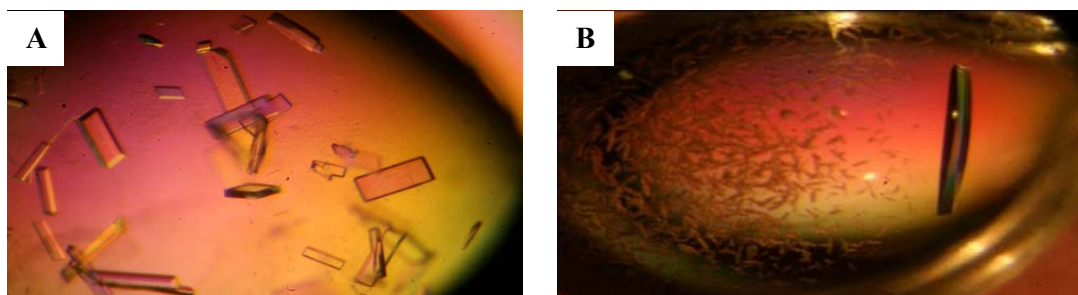
Izmed 768 razmer za kristalizacijo (384 kristalizacijskih raztopin s proteinom v dveh koncentracijah) je bila uspešnost kristalizacije okrog 10 %. Po prvih treh dneh kristalizacije je največkrat prišlo do nastanka preprostih kristalnih tvorb, kot npr. sferulitov in igel. Po več kot šestih dneh pa so se pričele pojavljati tudi večje strukture s pravilnejšimi

robovi, velik delež le-teh pa je že po devetih dneh razpadel na manjše kristale ali pa se je oboril.



Slika 33: Analiza deležev posameznih ocen kvalitete kapljic pri kristalizaciji z visečo kapljico. Oznake legend: < 3 – čista, prosojna kapljica, fazna separacija ali nastanek oborine; 5 – sferuliti; 6 – igličasti kristali; 7 – ploščati tanki kristali; 8 – pravilne kristalne strukture; 9 – večje in pravilne kristalne strukture. Deleži ocen glede na dobo izpostavljanja proteinskega koncentrata kristalizacijskim razmeram: A – po treh dneh; B – po šestih dneh; C – po devetih dneh.

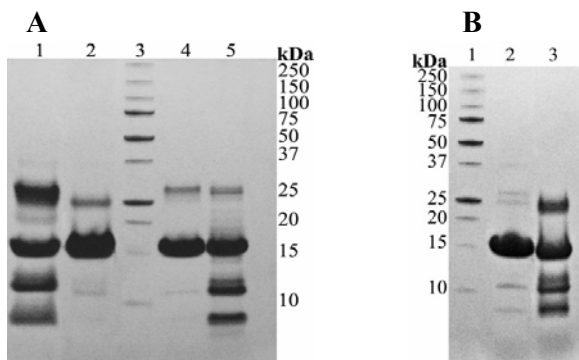
Kljub očitnemu zmanjšanju deleža največjih in najbolj pravilnih kristalov (ocenjenih z 8 in 9), kar nakazuje zgornja slika (slika 33), pa so bili kristali, ki so najdlje razvijali (npr. iz oborine) najprimernejši za zamrzovanje. Tako smo zamrznili tri kristale Msmeg_4207, ki so iz oborine nastali šele po 13 dneh. Do kristalizacije dveh je prišlo v 12 rezervoarju ploščice B in 6 rezervoarju iste ploščice (priloga D). Pri vseh treh smo pri zamrzovanju uporabili zanko velikosti od 0,1 do 0,22 mm. S pomočjo zanke velikosti od 0,4 do 0,5 mm pa smo zamrznili kristal proteina SeMet Msmeg_4207, ki je po 9 dneh inkubacije nastal v rezervoarju 12 ploščice D vendar pa je pri prenašanju iz ene krio-raztopine v drugo po robovih rahlo razpokal.



Slika 34: Kristali, ki smo jih zamrznili. A – kristali v kapljici v rezervoarju 6 ploščice B; B – kristal v kapljici v rezervoarju 12 ploščice D.

4.4.2 Preverjanje pristnosti kristalov

Z NaDS-PAGE elektroforezo smo dobili rezultate, ki so potrdili, da kristale sestavljajo proteinske in ne mineralne komponente, saj je prišlo do pojava proteinskih lis na elektroforetskem gelu pri analizi kristalov iz rezervoarjev 18 ploščice A in 17 ploščice C ter s selenom označenim proteinom iz rezervoarja 9 ploščice D.



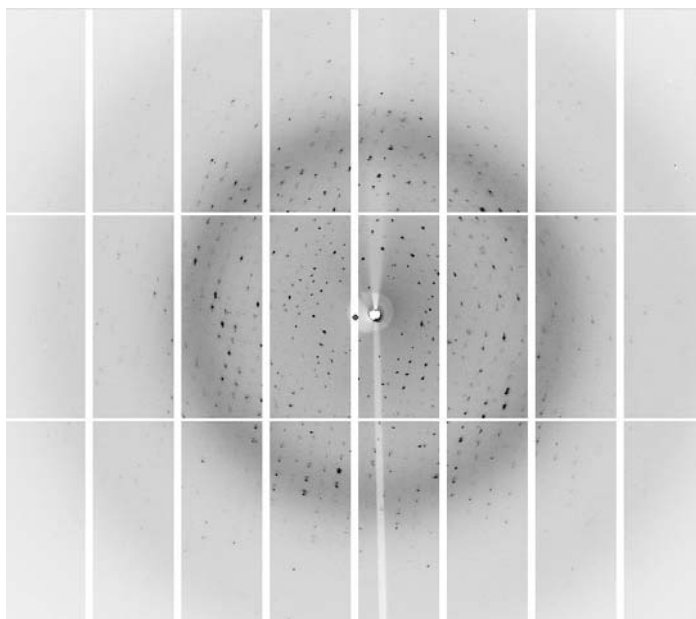
Slika 35: NaDS-PAGE elektroforeza kristalov. A: 1 – kristal Msmeg_4207 iz rezervoarja 18 ploščice A, 2 – kristal Msmeg_4207 iz rezervoarja 17 ploščice C, 3 – standardi, 4 – vzorec prvega dne pri stabilnostnem testu, 5 – vzorec dvajsetega dne pri stabilnostnoem testu; B: 1 – standardi, 2 – koncentrat raztopine SeMet Msmeg_4207, 3 – kristal SeMet Msmeg_4207 iz rezervoarja 9 ploščice D.

Na sliki gelov (slika 35) opazimo, da so prepotovane razdalje lis kristalov proteinov iz rezervoarja 18 ploščice A in rezervoarja 9 ploščice D podobne prepotovanim razdaljam lis vzorca zadnjega dne pri preverjanju stabilnosti proteina. Razporeditev lis raztopljenega kristala iz rezervoarja 17 ploščice C pa je podoben razporeditvi lis sveže proteinske

raztopine. Takšna dejstva kažejo, da razmere kristalizacije kot tudi izpostavljanje proteina sobni temperaturi, vplivajo na zgradbo proteina, kar se pa kaže v heterogenosti raztopine denaturiranega proteina. Pomembno pa je tudi izpostaviti, da pri vseh vzorcih opazimo liso, ki ustreza nekaj več kot 26 kDa, ki je pa na prejšnjih elektroforetskih gelih in pri gelski kromatografiji nismo zaznali. Ta masa ustreza dimerni obliki Msmeg_4207. Verjetno so bile razmere denaturacije prešibke in niso povzročili popoln razpad oligomerov.

4.5 MERJENJE SIPANJA X-ŽARKOV

Sipanje nekaj kristalov Msmeg_4207 smo preverili na sinhrotronu. Uklonska slika (slika 36) je pokazala, da gre za proteinski kristal, da pa ni idealne strukture, ker so lise na sliki razcepljene in resolucija sipanja relativno slaba. Vzrok takšnega sipanja je lahko neidealno obnašanje proteina pri kristalizaciji, še neidealne razmere kristalizacije ali pa problemi pri samem zamrzovanju. Vsekakor pa so ti rezultati dobra osnova za nadaljnjo optimizacijo dejavnikov, ki vplivajo na nastanek in rasti kristalov ter snemanja sipanja X-žarkov. Ta postopek je v teku in je izven obsega moje diplomske naloge.



Slika 36: Sipanje X-žarkov na kristalu proteina SeMet Msmeg_4207 posneto v multidisciplinarnem laboratoriju Elettra Sincrotrone Trieste S.C.p.A. di interesse nazionale (Trst, Italija).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Dandanes je v javnih podatkovnih zbirkah shranjenih več kot 12 milijonov unikatnih proteinskih zaporedij, kar je skoraj dvakrat več kot leta 2008 (NCBI, 2011). Kljub hitremu razvoju strukturne genomike, vede o preučevanju celotne kodirajoče DNA organizma na podlagi ugotavljanja terciarne strukture produktov genov (Chayen in Saridakis, 2008), pa je določenih le okoli 69000 proteinskih struktur, kar pa je približno 20000 več kot leta 2008 (PDB, 2011). S pomočjo poznavanja proteinskih struktur pa lahko bolj natančno predvidimo njihovo funkcijo v celici ter mehanizem delovanja (Zarembinski in sod., 1998).

O USP-jih je zelo malo znanega. Največ podatkov o tovrstnih proteinih izvira iz raziskav z bakterijo *E. coli* (O'Toole in Williams, 2003). Prav ti so sprožili val odkritij pri patogenih organizmih zaradi, kot se zdi, pomembne vloge pri virulenci (Nachin in sod., 2005). Vendar pa natančne funkcije, s katerimi bi določili nove tarče za boj proti boleznim, še niso znane. Podobno je tudi pri *M. tuberculosis*, ki povzroča eno najhujših bolezni človeštva. Ker pa je te bakterije zaradi sposobnosti za hitro, učinkovito in ohranjajočo okužbo izjemno težko preučevati, se kot modelni organizem namesto nje velikokrat uporablja sorodno, a nepatogeno vrsto *M. smegmatis*.

Nambi in sod. (2010) so pri raziskovanju od cAMP odvisne acetiltransferaze iz *M. tuberculosis* (Rv0998) in njenega ortolga pri *M. smegmatis* (Msmeg_5458) ugotovili, da je naravni substrat encima iz *M. smegmatis* USP Msmeg_4207. Ta protein smo si izbrali kot predmet raziskovanja tega diplomskega dela. Izbrani protein podobno acetilira tudi Rv0998, vendar je zanimivo, da je reakcija z Rv0998 veliko bolj odvisna od cAMP kakor v primeru Msmeg_5458 (Nambi in sod., 2010). Naravni substrat za Rv0998, ki bi ga kodiral gen v genomu *M. tuberculosis* oz. ortologu Msmeg_4207, pa še ni znan.

Zaporedje aminokislin prevedeno iz genskega zapisa za Msmeg_4207 se je izkazalo za najbolj sorodno proteinom z domenami, ki jih uvrščamo v superdružino UspA (slika 14). S poravnavo aminokislinskih zaporedji v zaporedju Msmeg_4207 nismo ugotovili prisotnosti

aminokislin, ki so pomembne za vezavo ATP molekul (priloga F). Prav tako je vezavni motiv za to molekulo le delno ohranjen.

Iz poznanih kristalnih struktur USP-jev je razvidno, da te molekule vsebujejo tako alfa kot beta sekundarne strukturne elemente. Na osnovi homologije aminokislinskega zaporedja Msmeg_4207 z drugimi USP proteini smo s pomočjo strežnika Phyre napovedali, da Msmeg_4207 verjetno vsebuje takšno mešano strukturo iz alfa vijačnic in beta ploskev (slika 16). Z merjenjem optične aktivnosti proteinske raztopine s cirkularnim dikroizmom pa smo to domnevo tudi potrdili, saj CD spekter predstavlja seštevek absorpcijskih spektrov alfa, beta in neurejenih struktur (slika 28).

Geni za USP-je večinoma kodirajo majhne proteine, kjer je velikost monomerne oblike od 14 do 15 kDa, razen če niso v tandemu na eni polipeptidni verigi (Kvint in sod., 2003). V večini primerov najdemo USP kot homodimere, določili pa so tudi že kristalne strukture homotetramerov (Nachin in sod., 2008). Zato smo tudi preverjali, ali Msmeg_4207 tvori oligomere z več različnimi podenotami. Tako bi homodimerna oblika Msmeg_4207 imela maso približno 28 kDa, homotetramerna pa okoli 56 kDa. Rezultati vseh NaDS-PAGE elektroforez očiščenega Msmeg_4207 so pokazali, da ima monomerna enota proteina v raztopini molekulska maso približno 14 kDa, kar se tudi ujema s teoretično molekulsko maso, ki smo jo pridobili z računalniškim orodjem. Najbolj preprost, zadovoljivo hiter in natančen način za določevanja molekulske mase nativnih makromolekul je analitska ločitvena kromatografija (Winzor in sod. 2003). S to metodo smo določili, da v raztopini največji delež molekul Msmeg_4207 obstaja v obliki tetramera s približno molekulsko maso 51 kDa, zasledili pa smo tudi manjši delež monomera (le nekaj odstotkov) (slika 26). Po rezultatih izračunavanja mas globularnih proteinov od 10 do 150 kDa s Sephadex gelsko kromatografijo pa lahko pride do $\pm 10\%$ odstopanja od prave vrednosti (Andrews, 1964; Andrews, 1965). Vrednost, do katere smo prišli, pa je za $\sim 9\%$ manjša od napovedane mase homotetramernega proteina, zato lahko kljub napaki upravičeno predvidevamo, da se enote Msmeg_4207 združujejo v tetramerne molekule. Kljub temu bi bilo rezultat dobro potrditi še z masno spektrometrijo ali merjenjem statičnega sipanja svetlobe, s čimer bi verjetno tudi pojasnili prisotnost več (treh) lis pri nativni elektroforezi proteina (slika 24), ki verjetno predstavljajo ravnotežno prehajanje med tetramerno,

dimerno in monomerno obliko v raztopini. Glede na nespremenjeno pozicijo lis na gelu pri nativni elektroforezi smo tudi ugotovili, da se nativna struktura Msmeg_4207 še po dvajsetih dneh inkubacije pri sobni temperaturi ni spremenila. Zanimivo pa smo pri analizi istih vzorcev opazili spremembe skozi čas v intenziteti in številu lis na gelu pri NaDS-PAGE elektroforezi (slika 25). Z daljšim izpostavljanjem proteina sobni temperaturi verjetno pride do cepitve vezi v izpostavljenih delih strukture (npr. gibljivih zankah), kar pa očitno ne povzroči razpada celotne molekule kot je opaziti pri elektroforezi pri nativnih razmerah. Denaturacijske razmere v primeru NaDS-PAGE elektroforeze povzročijo razpad strukture proteina na več manjših polipeptidnih enot. Podobno fragmentacijo proteina smo opazili tudi pri denaturacijski gelski elektroforezi vzorcev kristalov (točka 4.2.2). Ti kristali so nastajali približno enako dolgo v različnih raztopinah, vendar pa so si slike vzorcev na NaDS-PAGE gelih različne glede na uporabljene razmere kristalizacije. Tako je slika vzorca kristalov Msmeg_4207, ki so zrastle v 0,24 M PEG3350 in 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ podobna sliki na gelu kristala SeMet Msmeg_4207, ki je zrastle v 0,23 M PEG3350, 0,1 M Bis-Tris in 0,2 amonijevega acetata (slika 35). Oba pa sta podobna elektroforetski sliki proteina, ki smo ga 20 dni inkubirali pri sobni temperaturi. Nasprotno pa je slika gela kristala Msmeg_4207 iz raztopine z 0,25 M PEG3350, 0,1 M Bis-Tris in 0,2 amonijevim acetatom podobna elektroforetski sliki vzorca, ki smo ga analizirali že prvi dan. Na podlagi tega bi bila le drugačna koncentracija polietilenglikola vodilo v destabilizacijo nekaterih vezi proteina, vendar pa tega ne moremo trditi z gotovostjo. Informacija bi bila verjetno zelo koristna za sestavljanje krio-raztopin za ohranjanje čim bolj pravilne strukture pri zamrzovanju kristalov in nato pridobivanja natančnejših rezultatov s sipanjem X-žarkov. Pri elektroferogramih kristalov pa opazimo tudi liso, ki ustreza molekulski masi okrog 28 kDa, kar so verjetno dimeri proteina Msmeg_4207. Predvidevamo da ni prišlo do popolnega razpada oligomera zaradi prešibkih denaturacijskih razmer.

Msmeg_4207 je substrat acetiltransferaze Msmeg_5458, katere aktivnost je odvisna od cAMP (Nambi in sod., 2010). Do manjše stopnje acetilacije USP-ja je prišlo že v odsotnosti acetiltransferaze, kar je možna posledica spontane kemijske reakcije v prisotnosti acetil-CoA, ki je donor acetilne skupine v raztopini. Najvišjo aktivnost divjega tipa tega encima smo opazili, ko smo dodali oba, tako substrat Msmeg_4207 kot aktivator cAMP, vendar pa je bil encim aktiven tudi v odsotnosti cAMP, čeprav v nekoliko manjši

meri (približno 0,7-krat manj). Ta aktivnost morda izvira iz prisotnosti določene populacije molekul Msmeg_5458, ki v svoji strukturi že vsebujejo vezan cAMP, saj so bile izolirane iz celic *E. coli*, ki lahko producirajo cAMP. Da pa je delovanje tega encima močno odvisno od koncentracije cAMP, pa potrjuje nižja aktivnost te acetiltransferaze v primeru ko je bila izolirana iz seva *E. coli*, ki nima ciklaz (cyc⁻). Če smo v reakcijsko mešanico dodali ciklični nukleotid, se je aktivnost povečala za približno 1,7-krat.

Z masno spektrometrijo in HPLC pa smo potrdili, da Msmeg_4207 spada med tiste USP-je, ki ne vežejo pomembnih molekul za komunikacijo/signalizacijo, kot so cAMP, cGMP pa tudi ne nukleotidnih monofosfatov in difosfatov. Ker na masnem spektru mas nismo opazili prisotnosti niti ADP in AMP, ki bi lahko bila razpadna produkta ATP, ker sam protein nima značilnega vezavnega zaporedja za ATP, menimo, da Msmeg_4207 ne veže ATP. S HPLC bi bilo to domnevo dobro potrditi, vendar pa bi takšna analiza zahtevala drugačne razmere za analizo prisotnosti ATP od tiste, ki smo jo uporabili v naši raziskavi.

Določitev strukture proteinov z metodo sipanja X-žarkov temelji na študiji uklonske slike žarkov na kristalih. Ko se valovna dolžina X-žarka približa valovni dolžini, kjer pride do prehoda elektronov na višji nivo, se spremeni jakost sipanja in tudi faza sipane radiacije. Za vsak uklon pa je potrebno določiti fazni kot. Iz izmerjene intenzitete uklona lahko določimo velikost vala žarka, ne pa tudi faze, zaradi česar se srečamo s faznim problemom. Selenu lahko v difrakcijski sliki najdemo položaj, kar predstavlja rešitev omenjenega problema. Zato je vgradnja takšnega težkega atoma v kristal proteina standardna metoda za določitev faze. Tako smo pri delu vzporedno z Msmeg_4207 s podobnim protokolom izolirali tudi Msmeg_4207 označen s selenom (SeMet Msmeg_4207), vendar v manjši količini. Kljub temu pa je bila ta dovoljšnja za uspešno kristalizacijo.

Trenutno je v bazi proteinov Protein Data Bank (PDB) enaindvajset kristalnih struktur USP-jev iz trinajstih različnih organizmov. Ena pripada proteinu *M. tuberculosis* (Rv2623), katerega aminokislinsko zaporedje je drugačno od Msmeg_4207, nobena struktura pa ne pripada bakteriji *M. smegmatis*, tako da bi bila struktura Msmeg_4207 kot substrata za acetiltransferazo prva. Z očiščenim proteinom smo uspeli dobiti številne kristale obeh, Msmeg_4207 in SeMet Msmeg_4207, in merjenje sipanja X-žarkov na njih je dejansko pokazalo, da gre za proteinske kristale (slika 36). Ker pa kvaliteta sipanja ni

najboljša, bo potrebno postopek priprave kristalov izboljšati, bodisi na nivoju večje kvalitete oz. stabilnosti samega proteina, bodisi v sestavi kristalizacijske raztopine in postopka zamrzovanja kristalov.

Poznavanje funkcije USP-jev pri patogenih vrstah predstavlja izjemen mikrobiološki, farmacevtski in medicinski potencial. To velja tudi za proteine, kot je Msmeg_4207, ki so substrati za bakterijske encime. Ti imajo podobno uravnano delovanje kakor nekateri sesalski proteini, ki so pomembni pri medcelični komunikaciji in nadzoru znotrajceličnega dogajanja.

5.2 SKLEPI

- Pri delu smo uspeli izdelati protokol za izolacijo in očiščenje USP Msmeg_4207 iz *M. smegmatis* in ga dobili v večjih količinah primernih za raziskovanje. Podoben protokol smo uporabili pri izolaciji enakega proteina označenega s selenom (SeMet Msmeg_4207) in se je prav tako izkazal za uspešnega. Količina pridobljenega proteina je bila zadostna za njegovo kristalizacijo.
- Molekulska masa monomerne enote Msmeg_4207 je velika okrog 14 kDa. Poleg te smo potrdili tudi domnevo, da se podenote tega proteina povezujejo v tetramerno strukturo.
- Na podlagi merjenja cirkularnega dikroizma proteina v raztopini je Msmeg_4207, kot smo predvidevali, sestavljen tako iz alfa kot beta struktur.
- Msmeg_5458 katalizira prenos acetilne skupine iz acetil-COA, hitrost reakcije pa je odvisna od cAMP.
- Msmeg_4207 v svoji strukturi ne vsebuje nukleotidov (cikličnih in necikličnih nukleotidnih monofosfatov in difosfatov), ki sodelujejo v signalizaciji.
- Pri izpostavljanju Msmeg_4207 sobni temperaturi se stabilnosti notranjih vezi v proteinski strukturi spreminjaj, vendar ne pride do razpada native oblike proteina.
- Protein je mogoče kristalizirati. Kljub oligomernosti tvori kristale v velikem številu različnih kristalizacijskih razmer.
- Kristali sipajo rentgenske žarke, vendar pa je potrebno pripravo kristalov še optimizirati, da bomo lahko določili tridimenzionalno molekulsko strukturo.

6 POVZETEK

Zaradi določenih značilnosti predstavljajo bakterije vrste *M. smegmatis* dober model za raziskovanje nekaterih značilnosti patogenih mikobakterij med katere prištevamo povzročitelja tuberkuloze, *M. tuberculosis*. Pri eni izmed takšnih raziskav so ugotovili, da mikobakterijski acetiltransferazi (Rv0998 pri *M. tuberculosis* in Msmeg_5458 pri *M. smegmatis*), katerih aktivnost je odvisna od sekundarnega nukleotidnega obveščevalca cAMP, acetilirata protein Msmeg_4207 bakterije *M. smegmatis*.

Msmeg_4207 spada v skupino univerzalnih stresnih proteinov (USP), katerih zapise za posamezne domene najdemo tako pri prokariotih in arhejah kakor tudi pri evkariotih. Ti proteini imajo različne, pri večini organizmov še nedoločene funkcije. Pri mnogih se izražajo v stresnem okolju, pri nekaterih patogenih pa jih povezujejo z virulenco. Acetilacija z mikobakterijskimi acetiltransferazami je prvi tovrsten proces povezan z USP-ji. Njihovo delovanje je močno odvisno od koncentracije cAMP, podenota, ki veže ta ciklični nukleotid pa je podobna domeni encimov vključenih v regulacijo pomembnih celičnih reakcij pri sesalcih.

O USP-jih je zelo malo znanega, o Msmeg_4207 pa skoraj nič. Cilj te diplomske naloge je bil pridobiti nekaj informacij o biokemijski naravi tega proteina in tako prispevati k splošnem znanju o teh proteinih. Zato smo izdelali protokol, s katerim smo izolirali dovolj Msmeg_4207 za raziskave o stabilnosti proteina, njegovi molekularni masi, optični aktivnosti, preverjanju prisotnosti manjših nukleotidnih ligandov in kristalizaciji proteina. Ugotavljali smo tudi stopnjo acetilacije tega proteina z omenjeno acetiltransferazo Msmeg_5458 v odvisnosti od cAMP. S podobnim protokolom smo izolirali tudi protein, ki smo ga predhodno označili s selenom za merjenje sipanja X-žarkov proteinskih kristalov s sinhrotronom.

Z analizo aminokislinskega zaporedja smo predvideli, da strukturo Msmeg_4207 sestavljajo tako alfa kot beta sekundarni strukturni elementi. To smo potrdili z merjenjem cirkularnega dikroizma (optične aktivnosti) proteinske raztopine. Monomerne enote USP-jev so velike okoli 14 kDa kar velja tudi za monomerne enote Msmeg_4207. Nekatere podenote USP-jev se združujejo v oligomerne strukture, mi smo opazili, da je za

Msmeg_4207 značilno združevanje v tetramere. V samih strukturah pa ni majhnih nukleotidnih molekul. Nativna struktura proteina je v sobnih razmerah stabilna dlje časa, med tem verjetno pride le do oslabitve vezi v izpostavljenih delih molekul. Do podobnega pojava pride tudi pri kristalizaciji. Pokazali smo, da je protein mogoče kristalizirati, nastanejo veliki stabilni kristali, katerih kakovost pa zaenkrat ne zadostuje za določitev natančne tridimenzionalne strukture z metodo sipanja X-žarkov. Msmeg_4207 dejansko predstavlja substrat acetiltransferaze Msmeg_5458, katerega delovanje pa je, kot smo pokazali, močno odvisno od koncentracije cAMP v okolju encima.

Delo predstavlja temeljno raziskavo s katero smo dobili nekatere nove informacije o bakterijskih USP-jih in unikatnem USP-ju Msmeg_4207.

7 VIRI

- Agarwal N., Lamichhane G., Gupta R., Nolan S., Bishai W. 2009. Cyclic AMP intoxication of macrophages by a *Mycobacterium tuberculosis* adenylate cyclase. *Nature*, 460: 98-102
- Altschul S.F. 1993. A protein alignment scoring system sensitive at all evolutionary distances. *Journal of Molecular Evolution*, 36: 290-300.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Evolution*, 215: 403-410
- Andrews P. 1964. Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochemical Journal*, 91: 222-233
- Andrews P. 1965. The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochemical Journal*, 96: 595- 606
- Aravind L., Anantharaman V., Koonin E.V. 2002. Monophyly of class I aminoacyl tRNA synthetase, USPA, ETPF, photolyase, and PP-ATPase nucleotide-binding domains: implications for protein evolution in the RNA world. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 48: 1-14
- Bacon J., James B.W., Wernisch L., Williams A., Morley K.A., Hatch G.J., Mangan J., Hinds J., Stoker N.G., Butcher P.D., Marsh P.D. 2004. The influence of reduced oxygen availability on pathogenicity and gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 84: 205-217
- Baker D.A., Kelly J. M. 2004. Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Molecular Microbiology*, 52: 1229-1242
- Berthet F.-X., Lagranderie M., Gounon P., Laurent-Winter C., Ensergueix D., Chavarot P., Thouron F., Maranghi E., Pelicic V., Portnoi D., Marchal G., Gicquei B. 1998. Attenuation of virulence by disruption of *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene. *Science*, 282: 759-762

- Boes N., Schreiber K., Härtig E., Jaensch L., Schobert M. 2006. The *Pseudomonas aeruginosa* universal stress protein PA4352 is essential for surviving anaerobic energy stress. *Journal of Bacteriology*, 188, 18: 6529-6538
- Boshoff H.I., Reed M.B., Barry C.E. 3rd, Mizrahi V. 2003. DnaE2 polymerase contributes to *in vivo* survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, 113: 183-193
- Camacho L.R., Ensergueix D. Perez E., Gicquel B., Guilhot C. 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular Microbiology*, 34: 257-267
- Canetti G.M.D. 1955. The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man: histonacteriology and its bearing on the therapy of pulmonary tuberculosis. New York, Springer: 226 str. Cit. po: Hingley-Wilson S.M., Loughheed K.E.A., Ferguson K., Leiva S., Williams H.D. 2010. Individual *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein homologues are dispensable in vitro. *Tuberculosis*, 90: 236-244
- Cann M.J., Hammer A., Zhou J., Kanacher T. 2003. A defined subset of adenylyl cyclases is regulated by bicarbonate ion. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 35033-35038
- Chayen N.E., Saridakis E. 2008. Protein crystallisation: from purified protein to diffraction-quality cristal. *Nature Methods*, 5, 2: 147-153
- Chen W., Honma K., Sharma A., Kuramitsu H. 2006. A universal srress protein of *Porphyromonas gingivalis* is involved in stress responses and biofilm formation. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews Microbiology Letters*, 264: 15-21
- Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322
- Daegelen P., Studier F.W., Lenski R.E., Cure S., Kim J.F. 2009. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, 394: 634-643

- Danchin A. 1993. Phylogeny of adenylyl cyclases. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*, 27: 109-162
- Dass B.K., Sharma R., Shenoy A.R., Mattoo R., Visweswariah S.S. 2008. Cyclic AMP in mycobacteria: characterization and functional role of the Rv1647 ortholog in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 190: 3824-3834
- Diez A., Gustavsson N., Nyström T. 2000. The universal stress protein A of *Escherichia coli* is required for resistance to DNA damaging agents and is regulated by a RecA/FtsK-dependent regulatory pathway. *Molecular Microbiology*, 36: 1494-1503
- Direktiva Evropskega parlamenta in Sveta z dne 18. septembra 2000 o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu. 2000. Uradni list Evropske unije, 43, L262: 21-45
- Drumm J.E., Mi K., Bilder P., Sun M., Lim J., Bielefeldt-Ohmann H., Basaraba R., So M., Zhu G., Tufariello J.M., Izzo A.A., Orme I.M., Almo S.C., Leyh T.S., Chan J. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein Rv2623 regulates bacillary growth by ATP-binding: requirement for establishing chronic persistent infection. *PLOS Pathogenes*, 5, 5: e1000460. doi:10.1371/journal.ppat.1000460: 13 str.
- Eschbach M., Schreiber K., Trunk K., Buer J., Jahn D., Schobert M. 2004. Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *Journal of Bacteriology*, 186: 4596-4604
- Farewell A., Diez A.A., DiRusso C.C., Nyström T. 1996. Role of the *Escherichia coli* FadR regulator in stasis survival and growth phase-dependent expression of the *uspA*, *fad*, and *fab* genes. *Journal of Bacteriology*, 178: 6443-6450
- Fisher M.A., Plikaytis B.B., Shinnick T.M. 2002. Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *Journal of Bacteriology*, 184: 4025-4032

- Gantois I., Ducatelle R., Pasmans F., Haesebrouck F., Van Immerseel F. 2008. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis genes induced during oviduct colonization and egg contamination in laying hens. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 6616-6622
- Gantois I., Ducatelle R., Pasmans F., Haesebrouck F., Gast R., Humphrey T.J., Van Immerseel F. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews*, 33: 718-738
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server.V: The Proteomics Protocols Handbook. Walker J.M. (ed.). New Jersey, Humana Press: 571-607
- Gomez M.L., Doukhan G.N., Smith I. 1998. *sigA* is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology*, 29: 617-628
- Gustavsson N., Diez A.A., Nyström T. 2002. The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage. *Molecular Microbiology*, 43: 107-117
- Hassett D. J. 1996. Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. *Journal of Bacteriology*, 178: 7322-7325
- Hingley-Wilson S.M., Loughheed K.E.A., Ferguson K., Leiva S., Williams H.D. 2010. Individual *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein homologues are dispensable in vitro. *Tuberculosis*, 90: 236-244
- Holen I., Gordon P.B., Strømhaug P.E., Seglen P.O. 1996. Role of cAMP in the regulation of hepatocytic autophagy. *European Journal of Biochemistry*, 236: 163-170
- Honer zu Bentrup K., Russell D.G. 2001. Mycobacterial persistence: Adaptation to a changing environment. *Trends in Microbiology*, 9: 597-605
- Imboden P., Schoolnik G.K. 1998. Construction and characterization of a partial *Mycobacterium tuberculosis* cDNA library of genes expressed at reduced oxygen tension. *Gene*, 213: 107-117

- Jenkins R., Burton N., Cooper R. 2011. Effect of manuka honey on the expression of universal stress protein A in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37: 373-376
- Johannessen M., Moens U. 2007. Multisite phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) by a diversity of protein kinases. *Frontiers in Bioscience*, 12: 1814-1832
- Kaufmann S.H. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology*, 1: 20-30
- Kelley L.A., Sternberg M.J.E. 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, 4: 363-371
- Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C. 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751: 119-139
- Koch C., Hoiby N. 2000. Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Respiration*, 67: 239-247
- Kvint K., Nachin L., Diez A., Nyström T. 2003. The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 140-145
- Lablife. 2011. Product Search. Cambridge, Lablife: database.
www.lablife.org
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948
- Laurent T.C., Killander J. 1964. A theory of gel filtration and its experimental verification. *Journal of Chromatography*, 14: 317-330

- Linder J.U., Hammer A., Schultz J.E. 2004. The effect of HAMP domains on class IIIb adenylyl cyclases from *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Biochemistry*, 271: 2446-2451
- Linder J.U., Schultz A., Schultz J.E. 2002. Adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* has an autoinhibitory N-terminal domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 15271-15276
- Lyczak J. B., Cannon C. L., Pier G. B. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 194-222
- Monahan I.M., Betts J., Banerjee D.K., Butcher P.D. 2001. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology*, 147: 459-471
- Nachin L., Brive L., Persson K.-C. Svensson P., Nyström T. 2008. Heterodimer formation within universal stress protein classes revealed by an *in silico* and experimental approach. *Journal of Molecular Biology*, 380: 340-350
- Nachin L., Nannmark U., Nyström T. 2005. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion and motility. *Journal of Bacteriology*, 187, 18: 6265-6272
- Nambi S., Basu N., Visweswariah S.S. 2010. cAMP-regulated Protein Lysine Acetilases in Mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 32: 24313-24323
- NCBI. 2011. Reference Sequences: genomes transcripts proteins. Bethesda, NCBI Reference Sequences: database
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>
- Nyström T., Neidhardt F.C. 1992: Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 6: 3187-3198

- Nyström T., Neidhardt F.C. 1993. Isolation and properties of a mutant of *Escherichia coli* with an insertional inactivation of the *uspA* gene, which encodes a universal stress protein. *Journal of Bacteriology*, 175: 3949-3956
- Nyström T., Neidhardt F.C. 1994. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Molecular Microbiology*, 11: 537-544
- Ohno H., Zhu G., Mohan V.P., Chu D., Kohno S., Jacobs W.R. Jr, Chan J. 2003. The effects of reactive nitrogen intermediates on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular Microbiology*, 5: 637-648
- O'Toole R., Williams H.D. 2003. Universal stress proteins and *Mycobacterium tuberculosis*. *Research in Microbiology*, 154: 387-392
- Page R. D. M. 1996. Treewiew: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358
- Palleroni N.J. 1984. Family I. *Pseudomonaceae*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Krieg N. R., Holt J.G. (eds.). Baltimore, The Williams and Wilkins Co.: 141-219
- Park H.D., Guinn K.M., Harrell M.I., Liao R., Voskuil M.I., Tompa M., Schoolnik G.K., Sherman D.R. 2003. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 48: 833-843
- Parrish N.M., Dick J.D., Bishai W.R. 1998. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*, 6: 107-112
- PDB. 2011. RCSB PDB Statistics. Piscataway, RCSB Protein Data Bank: 1 str.
http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=general_information/pdb_statistics/index.html
- Raspoet R., Gantois I., Devloo R., Martel A., Haesebrouck F., Pasmans F., Ducatelle R., Van Immerseel F. 2011. *Salmonella* Enteritidis universal stress protein (usp) gene expression is stimulated by egg white and supports oviduct colonisation and egg

contamination in laying hens. Veterinary Microbiology:
doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.047: 5 str. (v tisku)

Reyrat J.M., Kahn D. 2001. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? Trends in Microbiology, 9, 10: 472-474

Russel W.F., Dressler S.H., Middlebrook G., Denst J. 1955. Implications of the phenomenon of open cavity healing for the chemotherapy of pulmonary tuberculosis. American Review of Tuberculosis, 71: 441-446. Cit. po: Hingley-Wilson S.M., Loughheed K.E.A., Ferguson K., Leiva S., Williams H.D. 2010. Individual *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein homologues are dispensable in vitro. Tuberculosis, 90: 236-244

Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4: 406-425.

Sands W.A., Palmer T.M. 2008. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. Cellular Signaling, 20: 460-466

Shah S., Peterkofsky A. 1991. Characterization and generation of *Escherichia coli* adenylate cyclase deletion mutants. Journal of Bacteriology, 173, 10: 3238-42

Schmelzle T., Beck T., Martin D.E., Hall M.N. 2004. Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. Molecular and Cellular Biology, 24: 338-351

Schnappinger D., Ehrt S., Voskuil M.I., Liu Y., Mangan J.A., Monahan I.M., Dolganov G., Efron B., Butcher P.D., Nathan C., Schoolnik G.K. 2003. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. Journal of Experimental Medicine, 198: 693-704

Schreiber K., Boes N., Eschbach M., Jaensch L., Wehland J., Givskov M., Bjarnsholt T., Hentzer M., Schobert M. 2006. Anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* by pyruvate fermentation requires an Usp-type stress protein. Journal of Bacteriology, 188: 659-668

- Servillo G., Della Fazia M.A., Sassone-Corsi P. 2002. Coupling cAMP signaling to transcription in the liver: pivotal role of CREB and CREM. *Experimental Cell Research*, 275: 143-154
- Shenoy A.R., Sivakumar K., Krupa A., Srinivasan N., Visweswariah S.S. 2004. A survey of nucleotide cyclases in Actinobacteria: unique domain organization and expansion of the class III cyclase family in *Mycobacterium tuberculosis*. *Comparative and Functional Genomics*, 5: 17-38
- Shenoy A.R., Sreenath N., Mahalingam M., Visweswariah S.S. 2005a. Characterization of phylogenetically distant members of the adenylyl cyclase family from mycobacteria: Rv1647 from *M. tuberculosis* and its ortholog ML1399 from *M. leprae*. *Biochemical Journal*, 387: 541-551
- Shenoy A.R., Sreenath N., Podobnik M., Kovačević M., Visweswariah S.S. 2005b. The Rv0805 gene from *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase: biochemical and mutational analysis. *Biochemistry*, 44: 15695-15704
- Shenoy A.R., Visweswariah S.S. 2004. Class III nucleotide cyclases in bacteria and archaeobacteria: lineage-specific expansion of adenylyl cyclases and a dearth of guanylyl cyclases. *FEBS Letters*, 561: 11-21
- Shenoy A.R., Visweswariah S.S. 2006. New messages from old messengers: cAMP and mycobacteria. *Trends in Microbiology*, 14, 12: 543-550
- Shi L., Jung Y.J., Tyagi S., Gennaro M.L., North R.J. 2003. Expression of Th1- mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 241-246
- Singh P. K., Schaefer A. L., Parsek M. R., Moninger T. O., Welsh M. J., Greenberg E. P. 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, 407:762-764

- Sinha S.C., Wetterer M., Sprang S.R., Schultz J.E., Linder J.U. 2005 Origin of asymmetry in adenylyl cyclases: structures of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1900c. *EMBO Journal*, 24: 663-673
- Soderling S.H., Beavo J.A. 2000. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 12: 174-179
- Sousa M.C., McKay D.B. 2001. Structure of the universal stress protein of *Haemophilus influenzae*. *Structure*, 9, 1135-1141
- Taylor S.S., Yang J., Wu J., Haste N.M., Radzio-Andzelm E., Anand G. 2004. PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1697: 259-269
- Tews I., Findeisen F., Sinning I., Schultz A., Schultz J.E., Linder J.U. 2005. The structure of a pH sensing mycobacterial adenylyl cyclase holoenzyme. *Science*, 308: 1020-1023
- Van Bogelen R.A., Hutton M.E., Neidhardt F.C. 1990. Gene-protein database of *Escherichia coli* K-12: Edition 3. *Electrophoresis*, 11: 1131-1166
- Van Delden C., Iglewski B. H. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 4: 551-560
- Vander Wauven C., Piérard A., Kley-Raymann M., Haas D. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *Journal of Bacteriology*, 160: 928-934
- Visweswariah S.S. 2011. Cyclic AMP in mycobacteria. V: *Mycobacteria: Physiology, metabolism and pathogenesis – back to the basics*. J4. Vancouver, British Columbia, 15-20 jan. 2011. Sherman D.R., Ehrt S. (eds.). Silverthorne, Keystone Symposia: 29 str.
- Voskuil M.I., Schnappinger D., Visconti K.C., Harrell M.I., Dolganov G.M., Sherman D.R., Schoolnik G.K. 2003. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *Journal of Experimental Medicine*, 198: 705-713

- Wayne L.G, Sohaskey C.D. 2001. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. Annual Review of Microbiology, 55: 139-163
- WHO. 2007. Global tuberculosis control: surveillance, planning, and financing (2007.376). Geneva, Switzerland: World Health Organization Press: 270 str.
- Winzor D.J. 2003. Analytical exclusion chromatography. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 56: 15-52
- Worlitzsch D., R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K. C. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J. R. Yankaskas, S. Randell, R. C. Boucher, and G. Doring. 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. Journal of Clinical Investigation, 109: 317-325
- Yang X. J., Seto E. 2008. Lysine acetylation: Codified crosstalk with other posttranslational modifications. Molecular Cell, 31: 449-461
- Zahrt T.C., Song J., Siple J., Deretic V. 2001. Mycobacterial FurA is a negative regulator of catalase-peroxidase gene katG. Molecular Microbiology, 39: 1174-1185
- Zarembinski T.I., Hung L.-W., Mueller-Dieckmann H.-J., Kim K.-K., Yokota H., Kim R., Kim S.-H. 1998. Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: A test case of structural genomics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 15189-15193
- Zhang J., Sprung R., Pei J., Tan X., Kim S., Zhu H., Liu C.F., Grishin N.V., Zhao Y. 2009. Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. Molecular and Cellular Proteomics, 8: 215-225
- Zhao S., Xu W., Jiang W., Yu W., Lin Y., Zhang T., Yao J., Zhou L., Zeng Y., Li H., Li Y., Shi J., An W., Hancock S. M., He F., Qin L., Chin J., Yang P., Chen X., Lei Q., Xiong Y., Guan K.L. 2010. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. Science, 327: 1000-1004

Zumft W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 533-616

ZAHVALA

Z veseljem se spomnim na vse, brez katerih to delo nikakor ne bi nastalo. Le na takšen način opazim, koliko ramen me nesebično podpira na poti doseganja ciljev.

Zato bi se iskreno zahvalil svoji somentorici dr. Marjetki Podobnik. Omogočila mi je opravljanje diplomskega dela in ob tem ves čas stala ob strani, me spodbujala in nudila pomoč tudi pri pomembnih odločitvah, ki niso bile del dela. Nenehna dostopnost, temeljitost in potrpežljivost pri odgovarjanju na nešteto mojih, tudi nesmiselnih vprašanj in mnenj, ki so se žal včasih večkrat ponovila, kažejo na neprecenljivo izkušnjo, ki sem jo pridobil v tem letu. Ob Vaši pomoči sem izkusil veselje ob raziskovanju in ugotovil, da to mora resnično postati stalnica mojega življenja!

Zahvaljujem se tudi mentorju prof. dr. Tomu Turku za podporo, pomoč pri delu, dostopnost in za izjemno hiter, kritičen ter temeljit pregled diplome.

Zahvaljujem se prof. dr. Gregorju Anderluhu za recenzijo diplomske naloge.

Zahvaljujem se Maji Capuder in mladi raziskovalki Urški Dermol za uvajanje in pomoč pri načrtovanju dela, seznanjanju z novimi tehnikami ter osvajanju postopkov pri delu z napravami, za katere sem na začetku menil, da imajo vse preveč cevčic, stekleničk, gumbov, številčk in zamaškov.

Zahvaljujem se dr. Dušanu Žigonu (Center za masno spektrometrijo, Inštitut Jožef Štefan, Ljubljana) za razlage osnovnih principov masne spektroskopije in pomoči pri izvedbi le-te.

Zahvaljujem se doc. dr. Gregorju Gunčarju (Katedra za biokemijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana) za predstavitev delovanja sinhrotrona, pridobitvi difrakcijske slike in krajšanju čakanja na rezultate sipanja kristalov. Naporna noč v laboratoriju je ostala prijeten spomin na iskanje vzporednih vesolj po sinhrotronu!

Zahvaljujem se prof. dr. Sandhyi S. Visweswariah (Bangalor, Indija) za plazmidno DNA in izčrpno predstavitev o univerzalnih stresnih proteinih in acetiltransferazah.

Zahvaljujem se Boštjanu Trpinu za prečudovite fotografije kristalov.

Zahvaljujem se Blažu Bakalarju za pomoč pri preparativnih metodah.

Celotnemu osebju Laboratorija za biosintezo in biotransformacijo se zahvaljujem za dobro voljo, ki je ni zmanjkalo in pomoč pri delu ter iskanju kot se zdi samo meni skritih kemikalij, flomastrov, mojega laboratorijskega dnevnika, pomembnih rezultatov, mobitela...

Zahvaljujem se Davorju Obradoviču in Kristijanu Tkalcu za popoldansko strokovno premlevanje skozi dan pridobljenih informacij z inštituta, ki se je večkrat zavleklo pozno v noč in preraslo v razmišljanje o reševanju sveta. Brez vaju delo na inštitutu ne bi bilo tako zabavno!

Zahvaljujem se tudi ostalim prijateljem in sošolcem, zaradi katerih so bila moja študijska leta tako komplicirana.

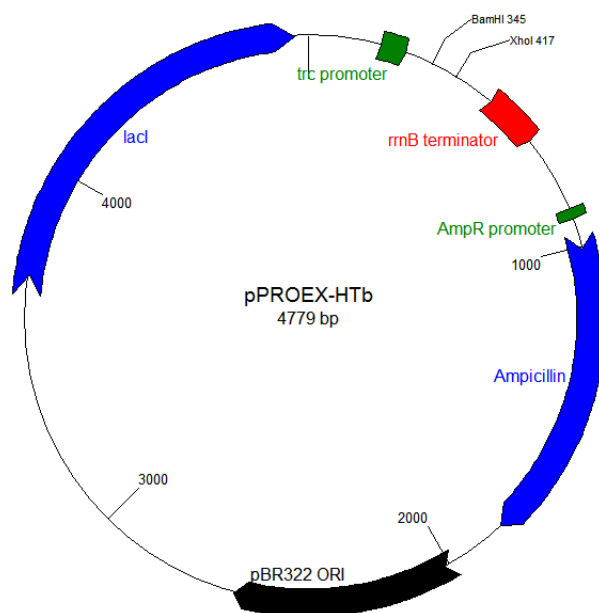
Zahvaljujem se staršem Desi in Zouhairu, sestrama Radiji in Samiri ter nečaku Galu, brez katerih ne bi bil to kar sem.

Posebno pa bi se rad zahvalil Tamari za ljubezen, potrpežljivost in srečo.

PRILOGE

Priloga A

Mapa plazmida pPROEX-HTb z označenimi nekaterimi pomembnejšimi mesti (Lablife, 2011). Obdelava s programom GENTle (Manske M. GENTle V 1.9.4. 2003, University of Cologne).



Priloga B

Nukleotidno zaporedje gena *msmeg_4207* in aminokislinsko zaporedje produkta tega gena.

Nukleotidno zaporedje:

```
GTGATCGTGGTCGGTTACAGCGCGGACCCGTTCCGGCCGGGCCGCGTCGAGCACGGGATCGAAGAGGCCAAAC
GGCGTGACACCGGCCTGCTGGTGATCAATGCGACCGCGGGTGACGCGTACGTCGACGCGCGGTTTCGCGCGGTC
GGGCGAGGTCCATGACGTCGAGGCGCACCTGCAGGACAGCGGTGTACCGTTCGAGATCCGCCAACCCGTCGGG
GTGGACGCGACCGAGGAACTGCTCACGGCCATGGACAGCCCGGACGCCGAACTGCTGGTGATCGGCATCCGCC
ACCGCAATCCCGTGGGGAAGCTGCTGCTCGGCAGCGTGGCCAGCGGTTGCTGCTGGAATGTCCCAAACCTGT
GCTCGCGGTCAAGCCACATGGGTTCTGA
```

Aminokislinsko zaporedje:

```
MIIVGYSDPFGRAAVEHGIEEAKRRDTGLLVINATAGDAYVDARFARSGEVHDVEAHLQDSGVPFEIRQPVG
VDATEELLTAMDSPDAELLVIGIRHRNPVGKLLLGSAQRLLECPKPVLA VKPHGF
```

Priloga C:

Sestava kristalizacijskih raztopin kompleta Peg Ion screen (Hampton research).

Št.	Sol	Koncentracija (M)	Precipitirajoče sredstvo	Koncentracija (% (m/V))
1	Natrijev fluorid	0,2	PEG 3350	20
2	Kalijev fluorid	0,2	PEG 3350	20
3	Amonijev fluorid	0,2	PEG 3350	20
4	Litijev klorid	0,2	PEG 3350	20
5	Magnezijev klorid heksahidrat	0,2	PEG 3350	20
6	Natrijev klorid	0,2	PEG 3350	20
7	Kalcijev klorid dihidrat	0,2	PEG 3350	20
8	Kalijev klorid	0,2	PEG 3350	20
9	Amonijev klorid	0,2	PEG 3350	20
10	Natrijev jodid	0,2	PEG 3350	20
11	Kalijev jodid	0,2	PEG 3350	20
12	Amonijev jodid	0,2	PEG 3350	20
13	Natrijev tiocianat	0,2	PEG 3350	20
14	Kalijev tiocianat	0,2	PEG 3350	20
15	Litijev nitrat	0,2	PEG 3350	20
16	Magnezijev nitrat heksahidrat	0,2	PEG 3350	20
17	Natrijev nitrat	0,2	PEG 3350	20
18	Kalijev nitrat	0,2	PEG 3350	20
19	Amonijev nitrat	0,2	PEG 3350	20
20	Magnezijev format dihidrat	0,2	PEG 3350	20
21	Natrijev format	0,2	PEG 3350	20
22	Kalijev format	0,2	PEG 3350	20
23	Amonijev format	0,2	PEG 3350	20
24	Litijev acetat dihidrat	0,2	PEG 3350	20
25	Magnezijev acetat tetrahidrat	0,2	PEG 3350	20
26	Cinkov acetat dihidrat	0,2	PEG 3350	20
27	Natrijev acetat trihidrat	0,2	PEG 3350	20
28	Kalcijev acetat hidrat	0,2	PEG 3350	20
29	Kalijev acetat	0,2	PEG 3350	20
30	Amonijev acetat	0,2	PEG 3350	20
31	Litijev sulfat monohidrat	0,2	PEG 3350	20
32	Magnezijev sulfat heptahidrat	0,2	PEG 3350	20
33	Natrijev sulfat dekahidrat	0,2	PEG 3350	20
34	Kalijev sulfat	0,2	PEG 3350	20
35	Amonijev sulfat	0,2	PEG 3350	20
36	Natrijev tartrat dibazični dihidrat	0,2	PEG 3350	20
37	Kalijev natrijev tartrat tetrahidrat	0,2	PEG 3350	20
38	Amonijev dibazični tartrat	0,2	PEG 3350	20
39	Natrijev fosfat monobazični monohidrat	0,2	PEG 3350	20
40	Natrijev fosfat dibazični dihidrat	0,2	PEG 3350	20

se nadaljuje

nadaljevanje

Št.	Sol	Koncentracija (M)	Precipitirajoče sredstvo	Koncentracija (% (m/V))
41	Kalijev monobazični fosfat	0,2	PEG 3350	20
42	Kalijev dibazični fosfat	0,2	PEG 3350	20
43	Amonijev monobazični fosfat	0,2	PEG 3350	20
44	Amonijev dibazični fosfat	0,2	PEG 3350	20
45	Litijev citrat tribazični tetrahidrat	0,2	PEG 3350	20
46	Natrijev citrat tribazični dihidrat	0,2	PEG 3350	20
47	Kalijev citrat tribazični monohidrat	0,2	PEG 3350	20
48	Amonijev dibazični citrat	0,2	PEG 3350	20

Priloga D

Sestava in razporeditev komponent kristalizacijskih raztopin v vsakem rezervoarju na optimizacijskih ploščicah A, B, C, D. Komponente: PEG – PEG3350, NF – NaH₂PO₄ x H₂O, ADC – amonijev dibazični citrat, BT – Bis-Tris (pH 5,5), AA – amonijev acetat.

Ploščica in koncentracija (M) posamezne komponente v določenem rezervoarju										
	A		B		C			D		
Št. rezervoarja	PEG	NF	PEG	ADC	PEG	BT	AA	PEG	BT	AA
1	0,14	0,16	0,14	0,16	0,17	0,08	0,16	0,19	0,09	0,18
2	0,16	0,16	0,16	0,16	0,19	0,08	0,16	0,21	0,09	0,18
3	0,18	0,16	0,18	0,16	0,21	0,08	0,16	0,23	0,09	0,18
4	0,2	0,16	0,2	0,16	0,23	0,08	0,16	0,25	0,09	0,18
5	0,22	0,16	0,22	0,16	0,25	0,08	0,16	0,27	0,09	0,18
6	0,24	0,16	0,24	0,16	0,27	0,08	0,16	0,29	0,09	0,18
7	0,14	0,18	0,14	0,18	0,17	0,09	0,18	0,19	0,1	0,2
8	0,16	0,18	0,16	0,18	0,19	0,09	0,18	0,21	0,1	0,2
9	0,18	0,18	0,18	0,18	0,21	0,09	0,18	0,23	0,1	0,2
10	0,2	0,18	0,2	0,18	0,23	0,09	0,18	0,25	0,1	0,2
11	0,22	0,18	0,22	0,18	0,25	0,09	0,18	0,27	0,1	0,2
12	0,24	0,18	0,24	0,18	0,27	0,09	0,18	0,29	0,1	0,2
13	0,14	0,2	0,14	0,2	0,17	0,1	0,2	0,19	0,11	0,22
14	0,16	0,2	0,16	0,2	0,19	0,1	0,2	0,21	0,11	0,22
15	0,18	0,2	0,18	0,2	0,21	0,1	0,2	0,23	0,11	0,22
16	0,2	0,2	0,2	0,2	0,23	0,1	0,2	0,25	0,11	0,22
17	0,22	0,2	0,22	0,2	0,25	0,1	0,2	0,27	0,11	0,22
18	0,24	0,2	0,24	0,2	0,27	0,1	0,2	0,29	0,11	0,22
19	0,14	0,22	0,14	0,22	0,17	0,11	0,22	0,19	0,12	0,24
20	0,16	0,22	0,16	0,22	0,19	0,11	0,22	0,21	0,12	0,24
21	0,18	0,22	0,18	0,22	0,21	0,11	0,22	0,23	0,12	0,24
22	0,2	0,22	0,2	0,22	0,23	0,11	0,22	0,25	0,12	0,24
23	0,22	0,22	0,22	0,22	0,25	0,11	0,22	0,27	0,12	0,24
24	0,24	0,22	0,24	0,22	0,27	0,11	0,22	0,29	0,12	0,24

Priloga E

Sestava in razporeditev komponent kristalizacijskih raztopin v vsakem rezervoarju na optimizacijskih ploščicah E, F, G, H. Komponente: PEG – PEG3350, BT – Bis-Tris (pH 5,5), AA – amonijev acetat, BTP – Bis-Tris propan, CT – citrat, NA – NaCl, AS – amonijev sulfat.

Ploščica in koncentracija (M) posamezne komponente v določenem rezervoarju											
Št. rezervoarja	E			F			G			H	
	PEG	BT	AA	PEG	BTP	CT	PEG	BT	NA	PEG	AS
1	0,19	0,1	0,18	0,1	0,03	0,03	0,17	0,08	0,16	0,14	0,16
2	0,21	0,1	0,18	0,12	0,03	0,03	0,19	0,08	0,16	0,16	0,16
3	0,23	0,1	0,18	0,14	0,03	0,03	0,21	0,08	0,16	0,18	0,16
4	0,25	0,1	0,18	0,16	0,03	0,03	0,23	0,08	0,16	0,2	0,16
5	0,27	0,1	0,18	0,18	0,03	0,03	0,25	0,08	0,16	0,22	0,16
6	0,29	0,1	0,18	0,2	0,03	0,03	0,27	0,08	0,16	0,24	0,16
7	0,19	0,1	0,2	0,1	0,04	0,04	0,17	0,09	0,18	0,14	0,18
8	0,21	0,1	0,2	0,12	0,04	0,04	0,19	0,09	0,18	0,16	0,18
9	0,23	0,1	0,2	0,14	0,04	0,04	0,21	0,09	0,18	0,18	0,18
10	0,25	0,1	0,2	0,16	0,04	0,04	0,23	0,09	0,18	0,2	0,18
11	0,27	0,1	0,2	0,18	0,04	0,04	0,25	0,09	0,18	0,22	0,18
12	0,29	0,1	0,2	0,2	0,04	0,04	0,27	0,09	0,18	0,24	0,18
13	0,19	0,1	0,22	0,1	0,05	0,05	0,17	0,1	0,2	0,14	0,2
14	0,21	0,1	0,22	0,12	0,05	0,05	0,19	0,1	0,2	0,16	0,2
15	0,23	0,1	0,22	0,14	0,05	0,05	0,21	0,1	0,2	0,18	0,2
16	0,25	0,1	0,22	0,16	0,05	0,05	0,23	0,1	0,2	0,2	0,2
17	0,27	0,1	0,22	0,18	0,05	0,05	0,25	0,1	0,2	0,22	0,2
18	0,29	0,1	0,22	0,2	0,05	0,05	0,27	0,1	0,2	0,24	0,2
19	0,19	0,1	0,24	0,1	0,06	0,06	0,17	0,11	0,22	0,14	0,22
20	0,21	0,1	0,24	0,12	0,06	0,06	0,19	0,11	0,22	0,16	0,22
21	0,23	0,1	0,24	0,14	0,06	0,06	0,21	0,11	0,22	0,18	0,22
22	0,25	0,1	0,24	0,16	0,06	0,06	0,23	0,11	0,22	0,2	0,22
23	0,27	0,1	0,24	0,18	0,06	0,06	0,25	0,11	0,22	0,22	0,22
24	0,29	0,1	0,24	0,2	0,06	0,06	0,27	0,11	0,22	0,24	0,22

Priloga F:

Poravnava aminokislinskih zaporedij nekaterih USP-jev. PDB oznake proteinov: 1JMV – UspA pri *H. influenzae*, 1MJH – MJ0577 pri *M. jannaschii*, 1TQ8 – Rv1636 pri *M. tuberculosis*, 1WJG – TTHA0895 pri *Thermus thermophilus*. Pomembne aminokisline in področje za vezavo ATP so označeni z rumeno, pomembne aminokisline motiva pa z zeleno.

				
	5	15	25	35
Msmeg_4207	-----	-----MI	VVGYSADPFG	RAAVEHGIEE
1JMV:	-----	-----MYKHI	LVAVDLSEES	PILLKKAVGI
1MJH:	-----	-----MSVMYKKI	LYPTDFSETA	EIALKHVKAF
1TQ8:	MGHHHHHHGG	HMSLSAYKTV	VVGTDGSDSS	MRAYDRAAQI
1WJG:	-----	-----MFKTI	LLAYDGSEHA	RRAAEVAKAE
				
	45	55	65	75
Msmeg_4207	AKRRDTGLLV	INATAG----	----DAYVDA	RFARSGE---
1JMV:	AKRHDAKLSI	IHVDVN----	--FSDLYTG-	LIDVNMSSMQ
1MJH:	KTLKAEVIL	LHVIDER--E	IKKRDIFSL	LGAVGLNKS
1TQ8:	AGAD-AKLII	ASAYLPQHED	ARAADILKDE	SYKVTGTAPI
1WJG:	AEAHGARLIV	VHAYEP----	--VPDYLGE	FFEEALRRRL
				
	85	95	105	115
Msmeg_4207	---VHDVEAH	LQDSGVPFEI	-----	----RQPVGV
1JMV:	DRISTETQKA	LLDLAESVDY	PIS-----	---EKLSGSG
1MJH:	EEFENELKNK	LTEEAKNKME	NIKKELEDVG	FKVKDIIVVG
1TQ8:	YEILHDAKER	AHNAGAKNVE	-----	----ERPIVG
1WJG:	ERAEGVLEEA	RALTGVPKED	-----	----ALLLEG
				
	125	135	145	155
Msmeg_4207	DATEELLTAM	DSPDAELLVI	GIRHRNPVGK	LLLGSVAQRL
1JMV:	DLGQVLSDAI	EQYVDLLVT	GHH--QDFWS	KLMSS-TRQV
1MJH:	IPHEEIVKIA	EDEGVDIIM	GSHGKTNLKE	ILLGSVTENV
1TQ8:	APVDALVNLA	DEEKADLLV	GNVGLSTIAG	RLLGSVPANV
1WJG:	VP AEAILQAA	RAEKADLIVM	GTRGLGALGS	LFLGSQSQRV
				
	165	175		
Msmeg_4207	LLECPKPVLA	VKPHGF--		
1JMV:	MNTIKIDMLV	VPLRDE--		
1MJH:	IKKSNKPVLV	VKRKNS--		
1TQ8:	SRRAKVDVLI	VHTTEGGS		
1WJG:	VAEAPCPVLL	VR-----		