UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Davor OBRADOVIĆ

IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA TER KRISTALIZACIJA NOVE ACETILTRANSFERAZE IZ Mycobacterium smegmatis

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Davor OBRADOVIĆ

IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA TER KRISTALIZACIJA NOVE ACETILTRANSFERAZE IZ Mycobacterium smegmatis

DIPLOMSKO DELO Univerzitetni študij

ISOLATION, CHARACTERISATION AND CRYSTALLISATION OF THE NEW ACETYLTRANSFERASE FROM *Mycobacterium smegmatis*

GRADUATION THESIS University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije 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 biotehnologije je bil za mentorja diplomskega dela imenovan doc. dr. Hrvoje Petković, za somentorico dr. Marjetka Podobnik, za recenzenta doc. dr. Blaž Cigić ter za predsednico komisije prof. dr. Branka Javornik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Branka Javornik
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
Član:	doc. dr. Hrvoje Petković
	Acies Bio d.o.o.
Član:	dr. Marjetka Podobnik
	Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za biosintezo in
	biotransformacijo
Član:	doc. dr. Blaž Cigić
	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Davor Obradović

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

- DK UDK 602.4:577.112:543(043.2)=163
- KG proteomika/izolacija proteinov/acetiltransferaza/Msmeg_5458/mikobakterije/ *Mycobacterium smegmatis*/tuberkuloza/biokemijska karakterizacija/ karakterizacija proteinov/acetilacija/kristalografija/cAMP
- AV OBRADOVIĆ, Davor
- SA PETKOVIĆ, Hrvoje (mentor)/ PODOBNIK, Marjetka (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
- LI 2012
- IN IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA TER KRISTALIZACIJA NOVE ACETILTRANSFERAZE IZ Mycobacterium smegmatis
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XV, 74 str., 12 pregl., 30 sl., 2 pril., 72 vir.
- IJ S1
- JI sl/en
- AI Msmeg_5458 iz Mycobacterium smegmatis je bil identificiran kot prvi acetiltransferazni encim v mikobakterijah nasploh. Gre za protein z dvema domenama, prva je sposobna vezati cAMP, druga pa veže acetil koencim A. Vezava cAMP aktivira drugo domeno, ki posledično prenese acetilno skupino z AcCoA na proteinske substrate. Doslej sta bila odkrita dva različna substrata, univerzalni stresni protein (USP) Msmeg 4207 ter acetil-CoA sintaza. V patogeni sorodnici M. tuberculosis ortologa za substrat USP ni. Proučevanje fiziologije posameznih vrst in njihova primerjava nam počasi razkrivajo vzroke patogenosti in s tem smo korak bližje do potencialnega razvoja zdravila. Po prirejenem protokolu smo izrazili in očistili protein Msmeg 5458 WT cyc, gre za divji tip proteina brez vezanega liganda cAMP. Protein je na sobni temperaturi stabilen okoli 2 tedna, nato pa opazimo razpadanje, čemur vzrok bi lahko bila nestabilna struktura. S cirkularnim dikroizmom smo preverili stabilnost in sekundarno strukturo proteina, ugotovili smo, da je pretežno sestavljen iz alfa vijačnic, prisotne pa so tudi beta plošče. Z uporabo visokotlačne tekočinske kromatografije in z masne spektrometrije smo dokazali, da protein tipa WT cyc⁻ res nima vezanega cAMP-ja. Mutanta R95K (mutacija v cAMPvezavni domeni) izkazuje podoben rezultat, mutanta E234A (mutacija v acetiltransferazni domeni) pa ima okrnjeno vezavo acetil-CoA oz. koencima A. Z acetiltransferaznim testom smo testirali sposobnost acetilacije, potrdili smo, da je ta od cAMP-odvisna. Sposobnost acetilacije je pri mutantih spremenjena. Uspešno smo kristalizirali protein Msmeg_5458 WT cyc kot tudi mutanto R95K. S sinhrotronom smo pridobili zadovoljive difrakcijske slike, ki so predpogoj za izdelavo modela proteina.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN

- DC UDK 602.4:577.112:543(043.2)=163
- CX proteomics/protein isolation/acetyltransferase/Msmeg_5458/mycobacteria/ *Mycobacterium smegmatis*/tuberculosis/biochemical characterization/protein characterization/acetylation/crystallography/cAMP
- AU OBRADOVIĆ, Davor

Dn

- AA PETKOVIĆ, Hrvoje (supervisor)/ PODOBNIK, Marjetka (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotehnical Faculty, Biotechnology Studies
- PY 2012
- TY ISOLATION, CHARACTERISATION AND CRYSTALLISATION OF NEW ACETYLTRANSFERASE OF *Mycobacterium smegmatis*
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XV, 74 p., 12 tab., 30 fig., 2 ann., 72 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Msmeg 5458 from Mycobacterium smegmatis was characterized first as acetytransferase enzyme in mycobacteria. It is a protein containing two domains, first is capable of binding cAMP, the other binds acetyl coenzyme A. Binding of cAMP activates the other domain, which transferes acetyl group from AcCoA on protein substrates. So far, two different substrates have been discovered, first one is acetyl-CoA syntase, the other one is universal stress protein (USP) Msmeg_4207. In pathogenic cousin *M. tuberculosis* there is no USP ortholog. Studying physiology of individual species and their comparison slowly reveals reasons for pathogenesis and that brings us a step closer to developing a cure. Using adapted protocol we expressed and purified protein Msmeg_5458 WT cyc, it is a wild type protein without a ligand cAMP. Protein is visibly stable at room temperature for approximately 2 weeks and then begins to disintegrate, probably because of unstable structure. With circular dichroism we verified stability and secondary structure of protein, we determined that it is composed mainly of alpha helixes, though beta sheets are present. Using high performance liquid chromatography and mass spectrometry we proved, that protein WT cyc⁻ does not have a cAMP bind in the structure. A mutant R95K (a mutation in cAMP-binding domain) shows a similar result and a mutant E234A (a mutation in acetyltransferase domain) has downgraded ability to bind acetyl-CoA and CoA. With acetyltransferase test we tested the ability of proteins to acetylate, we confirmed that it is cAMP dependant. The acetyltransferase ability is changed in mutant proteins. We successfully crystallized protein Msmeg_5458 WT cyc⁻ and mutant R95K. Using sinchrotron we gained satisfying diffraction pictures, which are a prerequisite for building a model of a protein.

KAZALO VSEBINE

		str.
KLJUČ	NA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY W	ORDS DOCUMENTATION	IV
KAZAI	O VSEBINE	V
KAZAI	O PREGLEDNIC	VIII
KAZAI	LO SLIK	IX
KAZAI	O PRILOG	XI
OKRAJ	IŠAVE IN SIMBOLI	XII
SLOVA	RČEK	XV
1	UVOD	1
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2	CILJ RAZISKOVANJA	2
1.3	DELOVNE HIPOTEZE	3
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	NEKAJ O MIKOBAKTERIJAH IN TUBERKULOZI	3
2.2	cAMP IN MIKOBAKTERIJE	5
2.3	GNAT ACETILTRANSFERAZE	7
2.4	Msmeg_5458 IN NJEGOVA VLOGA	10
3	MATERIALI IN METODE	12
3.1	MATERIALI	12
3.1.1	Kemikalije	12
3.1.2	Laboratorijska oprema in potrošni material	13
3.1.3	Raztopine in pufri	15
3.1.4	Gojišča	16
3.1.5	Plazmidi	17
3.1.6	Bakterijski sevi	18
3.1.7	Encimi	18
3.1.7.1	TEV proteaza	18

3.2	PRIPRAVLJALNE METODE	19
3.2.1	Sterilizacija pufrov, raztopin, gojišč in materiala za delo z bakterijskimi	
	sevi	19
3.2.2	Transformacija bakterijskih sevov	19
3.2.3	Rast bakterijskih celic	20
3.2.4	Ločevanje trdno/tekoče in shranitev celic	21
3.2.5	Odtajanje in razbitje celic ter izolacija proteinov	21
3.2.6	Priprava nikljeve kolone	22
3.2.7	Prva stopnja čiščenja na Ni-NTA koloni	22
3.2.8	Cepitev His-repka in dializa	23
3.2.9	Druga stopnja čiščenje na Ni-NTA koloni	24
3.2.10	Koncentriranje pred gelsko filtracijo	24
3.2.11	Gelska filtracija	24
3.2.12	Določanje koncentracije in koncentriranje proteina	25
3.3	ANALITSKE METODE	27
3.3.1	NaDS-PAGE elektroforeza	27
3.3.2	Nativna elektroforeza	28
3.3.2.1	Priprava gela	28
3.3.2.2	Izvedba nativne elektroforeze	28
3.3.3	Prenos proteinov kristala iz gela na PVDF membrano in določanje N-	
	terminalne sekvence kristaliziranega proteina	29
3.3.4	Test stabilnosti proteinov	29
3.3.5	Merjenje cirkularnega dikroizma	29
3.3.6	Analiza ligandov vezanih na proteine	30
3.3.6.1	Priprava vzorcev	30
3.3.6.2	Reverzno fazna HPLC analiza	31
3.3.6.3	Masna spektrometrija	31
3.3.7	Test acetiltransferazne aktivnosti	32
3.3.8	Kristaliziranje proteina	33
3.3.8.1	Potek kristalizacije	33
3.3.8.2	Sejanje kristalov	35
3.3.8.3	Aditiv	35

PRILO	GE	
ZAHVA	LA	
7	VIRI	67
6	POVZETEK	65
5.2	SKLEPI	64
5.1	RAZPRAVA	58
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	58
4.7	KRISTALIZIRANJE PROTEINOV	53
4.6	ACETILTRANSFERAZNI TEST	52
	Msmeg_5458 PROTEINOV	47
4.5	ANALIZA VEZANIH LIGANDOV NA RAZLIČNIH OBLIKAH	
4.4	CIRKULARNI DIKROIZEM	47
4.3	TEST STABILNOSTI PROTEINA	46
4.2	RAST CELIC, IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTEINA	41
4.1	RAČUNALNIŠKA ANALIZA PROTEINA	38
4	REZULTATI	38
3.3.8.6	Izgradnja 3D-modela molekule	37
3.3.8.5	Merjenje sipanja X-žarkov na proteinskih kristalih	36
3.3.8.4	Zamrzovanje kristalov	36

KAZALO PREGLEDNIC

Seznam uporabljenih kemikalij in kompletov 1		
Seznam uporabljene laboratorijske opreme in potrošnega materiala		
Seznam uporabljenih raztopin in pufrov 1		
Seznam uporabljenih gojišč	16	
Seznam uporabljenih plazmidov	17	
Seznam uporabljenih celičnih sevov	18	
Koraki pri čiščenju nikljeve kolone	22	
Sestava reakcijske mešanice acetiltransferaznega testa 3		
Prisotnost ligandov v posameznih tipih proteina Msmeg_5458 5		
Shema reakcij v acetiltransferaznem testu	52	
Sestave kristalizacijskih plošč pri kristaliziranju proteina		
Msmeg_5458 R95K	54	
Sestave kristalizacijskih plošč pri kristaliziranju proteina		
Msmeg_5458 WT cyc ⁻	55	
	Seznam uporabljenih kemikalij in kompletov Seznam uporabljene laboratorijske opreme in potrošnega materiala Seznam uporabljenih raztopin in pufrov Seznam uporabljenih gojišč Seznam uporabljenih plazmidov Seznam uporabljenih celičnih sevov Koraki pri čiščenju nikljeve kolone Sestava reakcijske mešanice acetiltransferaznega testa Prisotnost ligandov v posameznih tipih proteina Msmeg_5458 Shema reakcij v acetiltransferaznem testu Sestave kristalizacijskih plošč pri kristaliziranju proteina Msmeg_5458 R95K Sestave kristalizacijskih plošč pri kristaliziranju proteina	

KAZALO SLIK

IX

str.

Slika 1:	Vloga cAMP pri mikobakterijah (Visweswariah, 2011)	7
Slika 2:	Topologija GNAT ohranjenih motivov predstavljena v obliki sekundarn	e
	zgradbe proteina (Vetting in sod., 2005)	8
Slika 3:	Nazor lizinske acetilacije (Brock, 2009)	9
Slika 4:	Shema metabolne poti, kjer je vključena acetiltransferaza Msmeg_5458 (X	u
	in sod., 2011)	11
Slika 5:	Proces pridobivanja proteina Msmeg_5458 WT cyc ⁻ (brez v vezaneg	a
	cAMP)	26
Slika 6:	CD spekter za alfa vijačnico, beta strukturo in naključno zvit protein (A	A
	Short Primer, 1996)	30
Slika 7:	Priprava rezervoarja kristalizacijske plošče (Kočevar in sod., 2007)	34
Slika 8:	Kristalizacijska plošča za pripravo 24 različnih rezervoarjev (24-well	• ,
	2011)	35
Slika 9:	Pribora pri zamrzovanju kristalov (Cascio in Sawaya, 2011; CryoLoop	• ,
	2011)	36
Slika 10:	Difrakcijska slika enega izmed kristalov WT cyc	37
Slika 11:	Filogenetsko drevo proteina Msmeg_5458 na podlagi podanih sekvenc	Z
	orodjem ClustalW	40
Slika 12:	Predvidena sekundarna struktura proteina Msmeg_5458 z označenim	a
	točkovnima mutacijama	40
Slika 13:	3-D modela cAMP-domene proteina Msmeg_5458	41
Slika 14:	3-D modela acetiltransferazne domene proteina Msmeg_5458	41
Slika 15:	NaDS-PAGE elektroforeza celic	42
Slika 16:	Kromatogrami pri prvem čiščenju z Ni-NTA kromatografijo	42
Slika 17:	NaDS-PAGE elektroforeza za zbrane frakcije po Ni-NTA kromatografiji	43
Slika 18:	NaDS-PAGE elektroforeza vzorcev pred in po dializi	44
Slika 19:	Kromatograma druge afinitetne kromatografije	45
Slika 20:	Gelska filtracija in slika elektroforeze vzorcev	45

Slika 21:	NaDS-PAGE elektroforeza koncentracijskega gela	
Slika 22:	Test stabilnosti proteina Msmeg_5458 cyc ⁻ pri 20 °C	
Slika 23:	Spekter cirkularnega dikroizma za proteine družine Msmeg_5458 pri 20 °C	47
Slika 24:	Analiza vezanih ligandov na proteinu Msmeg_5458 WT endo	48
Slika 25:	Analiza vezanih ligandov na proteinu Msmeg_5458 WT cyc	49
Slika 26:	Analiza vezanih ligandov na proteinu Msmeg_5458 R95K	50
Slika 27:	Analiza vezanih ligandov na proteinu Msmeg_5458 E234A	51
Slika 28:	Acetiltransferazni test proteinov družine Msmeg_5458	53
Slika 29:	Elektroforeza kristalov proteina Msmeg_5458 cyc ⁻ in slika PVDF	7
	membrane	56
Slika 30:	Kristali proteina Msmeg_5458 cyc ⁻	57

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Mapa plazmida pPROEX-HTa z označenimi nekaterimi pomembnejšimi mesti
- Priloga B: HPLC kromatograma kontrol

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Θ	eliptičnost
% (m/V)	masna koncentracija
% (V/V)	volumski odstotek
3'-AMP	3'-adenozin monofosfat
5'-AMP	5'-adenozin monofosfat
AC	adenilat ciklaza
ACS	acetil-koencim A sintaza
ADP	adenozin difosfat
AIDS	sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti
ak.	aminokislina
ang.	angleško
ATP	5'-adenozin trifosfat
A _x	absorbanca pri dani valovni dožnini x
Bp	število baznih parov
cAMP	3',5'-ciklični adenozin monofosfat
CD	cirkularni dikroizem
cGMP	3',5'-ciklični gvanozin monofosfat
CO ₂	ogljikov dioksid
CoA	koencim A
CRP	cAMP receptorski protein
DAPD	1,5-diaminopentan dihidroklorid
den.	denaturirani
DNK	deoksiribonukleinska kislina
E. coli	Escherichia coli
EC	ang. "Enzyme Commission number"
GNAT	GCN5-sorodne N-acetiltransferaze
HIV	humani imunodeficientni virus
k _{cat}	katalitična konstanta
kDa	kilo Dalton

K _m	Michaelis–Mentenova konstanta
LB	Luria Bertanijevo gojišče
M. smegmatis	Mycobacterium smegmatis
M. tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis
MALDI	ionizacija z desorbcijo ionov iz matriksa s pomočjo laserske svetlobe
	(ang. "matrix-assisted laser desorption/ionisation")
MDR-TB	multipli rezistenčni tuberkulozni sev
MQ	mili-Q voda, dodatno očiščena destilirana voda
MS	masna spektrometrija
\mathbf{NAD}^+	beta- nikotinamid adenin dinukleotid – oksidirana oblika
NADH	beta- nikotinamid adenin dinukleotid – reducirana oblika
NaDS	natrijev dodecil sulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS
Ni-NTA	nikelj - nitrilotriocetna kislina
OZ.	oziroma
PEG _x	polietilen glikol z molekulsko maso x
PVDF	poliviniliden fluorid
rcf	relativna centrifugalna sila
RF-HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo
TBA	Tris-borat-acetat
TEV	virus jedkanja tobaka (ang. "tobacco etch virus")
ΤΝΓ-α	tumorje-nekrotizirajoči faktor- α (ang. "tumor necrosis factor-alpha")
TOF	čas preleta (ang. "time-of-flight")
UPLC	tekočinska kromatografija ultra-visoke ločljivosti (ang. "ultra
	performance liquid chromatography")
USP	univerzalni stresni protein
UV	spekter ultravijolične svetlobe
VIS	spekter vidne svetlobe
vrt./min	vrtljaji na minuto
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (ang."World Health Organization")
β-ΜΕ	β-merkaptoetanol
3	ekstinkcijski koeficient

Okrajšave aminokislin:

А	Ala	alanin
С	Cys	cistein
D	Asp	asparaginska kislina
E	Glu	glutaminska kislina
F	Phe	fenilalanin
G	Gly	glicin
Н	His	histidin
Ι	Ile	izolevcin
Κ	Lys	lizin
L	Leu	levcin
М	Met	metionin
M N	Met Asn	metionin asparagin
M N P	Met Asn Pro	metionin asparagin prolin
M N P Q	Met Asn Pro Gln	metionin asparagin prolin glutamin
M N P Q R	Met Asn Pro Gln Arg	metionin asparagin prolin glutamin arginin
M N P Q R S	Met Asn Pro Gln Arg Ser	metionin asparagin prolin glutamin arginin serin
M N P Q R S T	Met Asn Pro Gln Arg Ser Thr	metionin asparagin prolin glutamin arginin serin treonin
M N Q R S T V	Met Asn Pro Gln Arg Ser Thr Val	metionin asparagin prolin glutamin arginin serin treonin valin
M N P Q R S T V W	Met Asn Pro Gln Arg Ser Thr Val Trp	metionin asparagin prolin glutamin arginin serin treonin valin triptofan

SLOVARČEK

cAMP	Ciklični 3',5'-adenozin monofosfat, eden izmed sekundarnih nukleotidnih sporočevalcev pri evkariontih in bakterijah.
Msmeg_5458	Acetiltransferaza iz <i>Mycobacterium smegmatis</i> , ki jo sestavljata cAMP-vezavna in acetiltransferazna domena. Prva regulira aktivnost slednje. Encim prenaša acetilno skupino iz acetil-koencima A na lizinski ostanek proteina Msmeg_4207 (Nambi in sod., 2010).
WT endo	Divji tip proteina Msmeg_5458 z vsemi vezanimi ligandi (CoA, acetil-CoA in cAMP).
WT cyc ⁻	Divji tip proteina Msmeg_5458 brez vezanega cAMP-ja. To je posledica izražanja proteina v sevu <i>E. coli</i> SP850, ki ne more tvoriti cAMP-ja zaradi izbrisane adenilat ciklaze.
Msmeg_4207	Protein, ki spada med univerzalne stresne proteine (USP proteini). Ti so prisotni v arhejah, bakterijah, glivah in rastlinah in sodelujejo v odzivu na stresne dejavnike ter domnevno pripomorejo k preživetju celice. Je <i>in vivo</i> substrat acetiltransferaze Msmeg_5458 (Nambi in sod., 2010).

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Tuberkuloza predstavlja pereč problem v svetu, saj zanjo vsako leto po ocenah umre skoraj dva milijona ljudi, kar tretjina prebivalcev planeta pa naj bi bila okužena s patogeno *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberculosis, 2010).

Tuberkuloza se je dolgo štela med bolezni tretjega sveta, s pojavom multipli-rezistentnih sevov mikobakterije se v moderni dobi (zaradi ekonomskih migracij, revščine v razvitejših državah, vojn itd.) te sevi tudi hitreje razširjajo. Zanimanje o vzroku in poteku bolezni na biokemijski ravni se je tako splošno povečalo. WHO organizacija si je celo zadala poslanstvo, da bolezen do leta 2050 izkorenini (Tuberculosis, 2010).

Raziskovanje fiziologije mikobakterij je pripeljalo do zanimivega odkritja, da za razliko od ostalih bakterij, mikobakterije izražajo dosti večjo količino cAMP-ja, ki je molekula, ki opravlja vlogo sekundarnega obveščevalca po vseh kraljestvih živih bitij. In zaradi višjih koncentracij cAMP zato seveda obstaja možnost, da cAMP igra pomembno vlogo v življenjskem ciklu mikobakterij (Shenoy in Visweswariah, 2006b).

Nambi in sod. (2010) so pred kratkim v mikobakterijah odkrili gen, ki kodira protein z dvema domenama: N-terminalno cAMP vezalno domeno ter C-terminalno domeno z acetiltransferazno funkcijo, ki pa se alosterično aktivira po vezavi cAMP na N-terminalno domeno. Torej govorimo o bakterijski cAMP odvisni acetil transferazi. Pri patogeni *M. tuberculosis* je ta encim kodiran z genom Rv0998, pri nepatogeni *Mycobacterium smegmatis* pa je njegov ortolog Msmeg_5458. To je prvi znani protein s tako domensko sestavo nasploh. Aminokislinska sekvenca cAMP vezalne domene uvršča to domeno v družino cAMP vezalnih proteinov kot je npr. proteinska kinaza A. Acetiltransferazna domena izkazuje podobnost z GNAT družino acetiltransferaz.

Nambi in sod. (2010) so pri svojih raziskavah odkrili, da je lahko celični substrat za Msmeg_5458 univerzalni stresni protein Msmeg_4207. Le ta je sicer tudi substrat za Rv0998 iz *M. tuberculosis*, medtem pa ko ortolog Msmeg_4207 v *M. tuberculosis* še ni znan.

Ker je izražanje rekombinantenga Msmeg_5458 veliko boljše od Rv0998, raziskave mehanizma delovanja acetiltransferaze v glavnem potekajo na encimu iz *M. smegmatis*. Zaradi visoke podobnosti med ortologi bi potem lahko tudi sklepali na način delovanja ortologa iz patogene bakterije. V ta namen so bile pripravljene tudi mutante proteina Msmeg_5458 na dveh različnih mestih; mutanta R95K, ki izkazuje zmanjšanje sposobnosti cAMP-vezave ter mutanta E234A, pri kateri se zmanjša acetiltransferazna aktivnost. Ravno tako sta bili pripravljeni dve rekombinantni obliki Msmeg_5458 divjega tipa, in sicer ena, ki ima že vezan cAMP in ena brez cAMP-ja.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Cilj diplomske naloge je izolirati protein Msmeg_5458 divjega tipa brez vezanega cAMPja (WT cyc⁻), ga biokemijsko okarakterizirati ter uspešno kristalizirati. Kristalizirati smo želeli tudi mutanto R95K.

Čeprav bomo biokemijsko karakterizacijo dejansko izvajali na vseh tipih proteina Msmeg_5458 (WT endo, WT cyc⁻ ter mutantama R95K in E234A) smo se za izvedbo izolacije odločili samo pri proteinu tipa WT cyc⁻, ker ta oblika na oddelku še ni bila izolirana, potek izolacije pa je zelo podoben kot pri drugih oblikah Msmeg_5458. Po izolaciji proteina WT cyc⁻ po prirejenem protokolu bomo izvajali test stabilnosti zvitja proteina skozi čas, kar bomo preverili s cirkularnim dikroizmom. Preverili bomo, kateri ligandi se vežejo na rekombinantni protein Msmeg_5458 divjega tipa (WT endo ter WT cyc⁻) in v njegove mutante (R95K in E234A). Sposobnost encimske katalize encima Msmeg_5458 in mutant z njegovim substratom Msmeg_4207 (USP protein) bomo posredno testirali z acetiltransferaznim testom. Tekom biokemijskih testov bomo skušali protein Msmeg_5458 brez vezanega cAMP-ja (WT cyc⁻) in mutanto R95K kristalizirati tako, da bomo iskali najboljše pogoje kristalizacije, ki jih bomo sproti optimizirali. Najlepše dobljene kristale bomo obsevali z X-žarki z namenom, da dobimo dovolj kakovostne difrakcijske slike, ki so potrebne za določitev tridimenzionalne strukture.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Msmeg_5458 WT cyc⁻ je protein, katerega stabilnost se spreminja skozi čas. Domnevamo, da po določenem času protein začne razpadati.

Protein je sestavljen iz dveh domen. Prva je cAMP-vezavna domena, druga je acetiltransferazna. Pri acetiltransferaznemu testu bi morali zaznati razliko v aktivnosti encima ob dodatku cAMP-ja.

Mutante proteina Msmeg_5458 imajo spremenjene lastnosti, ki se bodo izrazile tako v analizi vezanih ligandov kot v acetiltransferaznem testu.

Glede na dejstvo, da so na oddelku že uspešno kristalizirali Msmeg 5458_WT endo (divji tip z vsemi vezanimi ligandi), bomo z variiranjem podobnih pogojev kristalizacije uspešno kristalizirali tako Msmeg 5458_WT cyc⁻ kot mutanto R95K.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NEKAJ O MIKOBAKTERIJAH IN TUBERKULOZI

Mikobakterije so aerobne paličaste Gram pozitivne bakterije z visoko vsebnostjo gvanina/citozina (G+C) v genomu (62-70 %). Pri barvanju z rdečim fuksinom v kisloalkoholni raztopini se ne razbarvajo, za kar so vzrok kompleksi, ki nastanejo med barvilom in mikolno kislino (barvanje po Ziehl-Neelsen-u). Le-ta je ključna komponenta bakterijske stene, ki je pri mikobakterijah zelo kompleksna in dovršena (Wayne in Kubica, 1986). Za razliko od običajnih Gram pozitivnih bakterij z enim lipidnim dvoslojem, imajo mikobakterije dva (Hoffmann in sod., 2008).

Rod mikobakterij trenutno obsega preko 100 vrst. Razvrstitev poteka na podlagi razlik v sekvenci genoma, ki zapisuje 16S rRNA podenoto prokariontskih ribosomov. Metoda se uporablja za določevanje sorodnosti in izgradnjo filogenetskih dreves mikobakterij že več kot 20 let (Stahl in Urbance, 1990; Rogall in sod., 1990). Rod mikobakterij spada v deblo aktinobakterij, kamor na primer spadajo tudi rodovi *Rhodococcus, Corynebacterium* in *Nocardia*. Prvi identificirani predstavnik rodu je bil *M. leprae* (Hansen, 1874), kmalu je

sledil *M. tuberculosis* (Koch, 1882). Nekatere mikobakterije je na splošno težko gojiti, saj imajo dolgi regeneracijski čas (npr. *M. tuberculosis* okoli 18-20 ur), prve kolonije na trdnem gojišču so opazne šele po 10-28 dneh inkubacije. Poleg počasne rasti so lahko tudi patogene, kar zahteva uporabo posebne opreme in delo v laboratoriju z višjo varnostno stopnjo. V ta namen se za raziskovanje fiziologije in genetike mikobakterij najbolj uspešno zasidrala nepatogena vrsta *M. smegmatis*, ki se odraža tudi s hitrejšim regeneracijskim časom, ki je okoli 3 ure (Cook in sod., 2009).

Znano je, da so mikobakterije prisotne v različnih okoljih in so oportunistični patogeni, zato je njihova detekcija in identifikacija izrednega pomena. Najbolj znani patogeni so *M. tuberculosis*, *M. bovis* (povzročitelj tuberkuloze pri človeku oziroma govedu), *M. avium ssp. paratuberculosis* (povzročitelj paratuberkuloze pri prežvekovalcih in domnevno Crohnove bolezni pri ljudeh), *M. ulcerans* (Burulijev ulkus) in *M. leprae* (povzročitelj gobavosti, bolezen antičnih časov).

Tuberkuloza se takoj za AIDS-om trenutno uvršča med najbolj razširjene infekcijske bolezni. V svetu naj bi bilo okuženih skoraj tretjina prebivalcev (Tuberculosis, 2010). V letu 2009 je bilo ocenjeno 9,4 milijona novih okuženih primerkov, isto leto jih je zaradi bolezni umrlo 1,7 milijona. Med umrlimi je okoli 22 % HIV-pozitivnih, ta odstotek je mnogo višji v Afriki (80%). Ocenjuje se, da je okoli 250.000 ljudi bilo okuženih z MDR-TB (ang. "multi-drug resistant tuberculosis"), pri kateri se bolezen mora zdraviti z dražjimi antibiotiki rifampicin in izoniazid, ki imajo več stranskih učinkov (Global Tuberculosis Control, 2010). Bolezen je značilna predvsem za države tretjega sveta. Infekcija se začne, ko mikobakterije prodro v makrofage pljuč, razmnožujejo se v njihovih endosomih (Houben in sod., 2006; Sundaramurthy in Pieters, 2007). Okolje v makrofagih si bakterije podredijo sebi v prid, pri čemer naj bi imel cAMP pomembno vlogo (Agarwal in sod., 2009). Okužbo po pljučih in drugih organih prenašajo dendritične celice, vendar v njih samih je razmnoževanje bakterije onemogočeno (Herrmann in Lagrange, 2005). Za bolezen je značilen nastanek granuloma-tuberklov, gre za skupek skoncentriranih celic v ovoju (makrofagi, limfociti B in T, fibroblasti), s katerim želi imunski sistem omejiti širjenje mikroorganizma. Bakterije znotraj granuloma zaradi stresnih okoljskih dejavnikov (npr. pomanjkanje kisika) lahko preidejo v latentno fazo in tako posledično bolezen stagnira in pozneje spet izbruhne. Tkivo na lokalnih mestih razpada in tvori se novo, v pljučih prihaja do povezav z obstoječimi bronhiji, ob izkašljevanju pa je tako omogočen prenos bacilov na druge osebke (Grosset, 2003).

2.2 cAMP IN MIKOBAKTERIJE

Ciklični AMP (cAMP) je pomemben sekundarni obveščevalec tako v prokariontih kot v evkariontih (Botsford in Harman, 1992; Ohmori in Okamoto, 2004). Sodeluje v regulaciji fizioloških procesov kot je katabolna represija, sporulacija (Shenoy in sod., 2004) in vpliva na virulenco nekaterih vrst mikrobov iz rodov *Pseudomonas, Vibrio* in *Candida* (Antoni, 2000; Shenoy in Visweswariah, 2006a; Shenoy in Visweswariah, 2006b).

Za produkcijo cAMP so odgovorne adenilat ciklaze (AC), katerih repertoar in pestrost je pri mikobakterijah izrazita, kar nakazuje na pomembnost cAMP pri preživetju teh mikroorganizmov (McCue in sod., 2000). Medtem, ko imajo npr. *Escherichia coli, Streptomyces griseus, Corynebacterium glutamicum, Candida albicans* in *Cryptococcus neoformans* v genomu zapis za zgolj eno AC (Mallet in sod., 2000; Shenoy in sod., 2004; Klengel in sod., 2005; Cha in sod., 2010), jih je pri *M. tuberculosis* ocenjeno na vsaj 17 (Shenoy in sod., 2004). AC razvrščamo v šest razredov, AC mikobakterij in vseh evkariontov spadajo v tretji razred (Tang in sod., 1998).

Nekatere izmed ciklaz v *M. tuberculosis* imajo poleg ciklazne aktivnosti (iz ATP-ja tvori cAMP) še dodatno domeno preko katere je regulirana aktivnost dotične ciklaze. Regulacija lahko poteka na osnovi znotrajceličnih in zunajceličnih signalov (Hulko in sod., 2006). Dokazana je bila regulacija s pH, maščobnimi kislinami, koncentracijo CO₂ in kisika, koncentracijo glukoze. Na splošno velja, da je količina cAMP v *in vitro* gojenih mikobakterijah glede na ostale bakterije višja za okoli faktor sto (Padh in Venkitasubramanian, 1976; Rickman in sod., 2005; Shenoy in Visweswariah, 2006b; Barba in sod., 2010; Nambi in sod., 2010; Stapleton sod., 2010). Pri gojenju mikobakterij v prisotnosti makrofagov se produkcija cAMP poviša za faktor petdeset, kar nakazuje na pomembnost cAMP-ja pri patogenezi *M. tuberculosis* (Bai in sod., 2009). Povišana koncentracija cAMP naj bi v makrofagih povečala produkcijo TNF- α , kar posredno poveča verjetnost preživetja bakterije v celici (Agarwal in sod., 2009). Prav tako cAMP posredno preprečuje fuzijo fagosomov in lizosomov v makrofagih, kar dodatno podkrepi domnevno

o pomembnosti cAMP-ja pri rušenju gostiteljevega imunskega sistema (Lowrie in sod., 1975; Kalamidas in sod., 2006). Vpleten naj bi tudi v kemotakso mikobakterij, kar spada med zunajcelično komuniciranje (Aragwal in Bishai, 2009).

Znotraj celic mikobakterij pa se cAMP lahko veže na efektorske proteine, ki nadalje vplivajo na njihovo fiziologijo. Študije ocenjujejo vsaj deset takšnih proteinov pri *M. tuberculosis*. Doslej so okarakterizirali tri, Rv3676 in Rv1675c sta transkripcijska faktorja družine CRP-FNR (McCue in sod., 2000), Rv0998 pa regulira lizinsko acetilacijo proteina USP (Nambi in sod., 2010). Ortolog proteina Rv0998 pri *M. smegmatis* (Msmeg_5458) pa ima za primarni substrat acetil-CoA sintazo (Xu in sod., 2011). Nekateri ostali proteini so povezani s transportom cAMP preko membrane in esterazno aktivnostjo (McCue in sod., 2000; Shenoy in Visweswariah, 2006a). Najden je bil tudi protein Rv0805 (McCue in sod., 2000; Shenoy in Visweswariah, 2005) - gre za fosfodiesterazo, ki ima sposobnost razgradnje nekaterih cNMP (tudi cAMP) - vendar ob dejstvu, da do sedaj še ni bilo najdenega ortologa fosfodiesteraze v *M. smegmatis*, lahko predpostavljamo, da ima sekrecija cAMP pomembnejšo vlogo (Shenoy in Visweswariah, 2006).



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

2.3 GNAT ACETILTRANSFERAZE

Acetiltransferaze so transferaze (pod EC klasifikacijo 2.3.1), ki prenašajo acetilno skupino (preferenčno acetil-CoA) na tarčne substrate. Mednje uvrščamo tudi veliko družino GCN5sorodnih N-acetiltransferaz (GNAT acetiltransferaz), prisotne so tako v evkariontih kot prokariontih. V vseh kraljestvih živih bitij so jih našteli že preko 10.000, razdeljene so v več skupin (Vetting in sod., 2005). Prva skupina GNAT acetiltransferaz je bila odkrita v bakterijah, ki so bile odporne na antibiotika gentamicin in kanamicin (Davies in Wright, 1997). Zaradi njihove sposobnosti, da acetilirajo določene amino skupine v aminoglikozidih so jih poimenovali aminoglikozid acetiltransferaze. Kljub nizki homologiji sekvenc znotraj skupine, se je izkazalo, da imajo nekaj skupnega: štiri aminokislinske motive na območju 100-120 aminokislinskih ostankov (Shaw in sod., 1993). Le-te pa so zelo podobne histon acetiltransferazam (imenovane tudi lizin acetiltransferaze), med katere se prva uvršča GCN5 iz kvasovke (Berger in sod., 1992; Brownell in sod., 1996). Od tod izhaja tudi ime velike družine GNAT. Vsi člani družine GNAT izkazujejo strukturno ohranjen vzorec (Slika 2), sestavljen iz prej omenjenih aminokislinskih motivov sekundarne strukture. Razlike med strukturami GNAT članov so najbolj očitne na N- in C-terminalnem koncu.



Slika 2: Topologija GNAT ohranjenih motivov predstavljena v obliki sekundarne zgradbe proteina (Vetting in sod., 2005)

Valji so α -vijačnice, puščice so β -plošče (A). Spodaj (B) je prikazanih 15 združenih GNAT predstavnikov, očitna je strukturna podobnost v ohranjenih motivih, razlike so predvsem v N- in C-terminalnih koncih.

Acetilacija proteinov lahko poteče kotranslacijsko na N^{α} - koncu ali pozneje na ε -amino skupini lizina. Prva je ireverzibilna in se zgodi na N-terminalnem koncu pri okoli 85% evkariontskih proteinov (Polevoda in Sherman, 2000), slednja pa naj bi bila pomembna posttranslacijska modifikacija (Glozak in sod., 2005). Z vezavo acetila na amino skupino se nevtralizira pozitivni naboj lizina, kar posledično vpliva na interakcije z ostalimi proteini (Slika 3).

Pomen lizinske acetilacije kot posttranslacijske modifikacije je bil preučevan predvsem v evkariontih. Znano je, da je nadzor transkripcije v jedru povezan z acetilacijo histonov (Allfrey in sod., 1964; Grunstein, 1997), prav tako pa so že dokazali pomembno vlogo acetilacije pri regulaciji metabolnih encimov v jetrih človeka (Zhao in sod., 2010). Raziskovanj v prokariontih na to temo je bilo doslej manj. Zadnje študije pa vendarle trdijo, da acetilacija v prokariontih prav tako pomembna kot ostale postmodifikacije proteinov. Tako so ugotovili, da acetilacija stimulira glikolizo in inhibira glukoneogenezo in nadzira preklop na glioksilatni ciklus pri organizmu *Salmolella enterica* (Wang in sod., 2010). Njen vpliv so proučevali tudi v *E. coli* (Zhang in sod., 2010), ugotovili so, da večina acetiliranih encimov v pogojih hipoksije spada med metabolne encime in translacijske regulatorje, kar nakazuje na pomembnost acetilacije v regulaciji energetskega metabolizma. Nekaj izmed omenjenih acetiliranih proteinov je tudi proteinov stresa (ang. "*universal shock proteins*"). Zanimivo je, da so pri *Mycobacterium tuberculosis* dokazali, da se USP proteini ekspresirajo predvsem v hipoksičnih pogojih (O'Toole in Williams, 2003).



Slika 3: Nazor lizinske acetilacije (Brock, 2009) KAT: lizin acetiltransferaza, KDAC: lizin deacetilaza

2.4 Msmeg_5458 IN NJEGOVA VLOGA

Msmeg_5458 iz *M. smegmatis* (in njegov ortolog Rv0998 iz *M. tuberculosis*) je doslej edina identificirana N-acetiltransferaza s cAMP-vezavno domeno v mikobakterijah (Nambi in sod., 2010). Nambi in sod. (2010) so pokazali, da ima Msmeg_5458 dve domeni, prva je cAMP- vezavna domena, ki veže cAMP, prav tako pa je sposobna do neke mere vezati cGMP. Omenjena domena regulira aktivnost druge domene v tem proteinu, acetiltransferazne domene. Ta protein je sposoben acetilirati vsaj dva različna substrata, to sta Msmeg_4207, ki je USP protein (Nambi in sod., 2010) in acetil-CoA sintazo oz. ACS (Xu in sod., 2011). Podatki nakazujejo pomembno vlogo proteina Msmeg_5458 pri uravnavanju znotrajceličnega metabolizma preko acetilizacije.

Do aktivacije acetiltransferaze torej lahko pride ob zadostni koncentraciji cAMP, ki se zviša na primer v fagolizosomih; proces okužbe z *M. tuberculosis* (Agarwal in sod., 2009). Ko se bakterijska celica znajde v tem kislem, z nutrienti osiromašenem okolju, mora, da preživi, upočasniti metabolizem. Z acetilacijo ACS encima, ni več *de novo* sinteze acetil-CoA z omenjenim encimov. S padcem koncentracije kisika se sinteza acetil-CoA še dodatno zmanjša na račun deaktivacije piruvat in izocitrat dehidrogenaze zaradi povišane količine NADH (Hansford, 1976). Protein ACS se ponovno aktivira ob deacetilaciji, ki jo lahko izvrši deacetilaza (Rv1151c pri *M. tuberculosis* oz. Msmeg_5175 pri *M. smegmatis*) ob zadostni koncentraciji NAD⁺. Pri teh pogojih (malo hranil, kisika, nizek pH) je edini vir acetil-CoA oksidacija maščobnih kislin. Inaktivacija ACS pa verjetno še ni zadosten pogoj, da se mikroorganizem preneha razmnoževati in preide v latentno fazo (Xu in sod., 2011). Gre torej za dovršen sistem nadzora nad energetskim metabolizmom, saj so vpleteni kar trije metaboliti: cAMP, acetil-CoA in NAD⁺/NADH; njih koncentracija pa je odvisna od stanja celice in razmer v okolju (slika 4).



Slika 4: Shema metabolne poti, kjer je vključena acetiltransferaza Msmeg_5458 (Xu in sod., 2011) AC= adenilat ciklaza, PAT= acetiltransferaza (Msmeg_5458), ACS= acetil-CoA sintaza

Drugi znani substrat acetiltransferaze Msmeg_5458 je univerzalni stresni protein (USP) Msmeg_4207, čigar funkcija še ni znana (Nambi in sod., 2010). Ortolog tega USP-ja v patogeni *M. tuberculosis* ni znan, kar pa še ne ovrže vloge acetiltransferaze Rv0998 kot posrednika med regulatorjem energetskega metabolizma in aktivacijo določenih proteinov stresa. *In vitro*, Rv0998 acetilita tudi Msmeg_4207 (Nambi in sod., 2010). Pred odkritjem USP proteinov v nepatogeni *M. smegmatis* so smatrali, da so proteini stresa unikatni za *M. tuberculosis* in ostale patogene mikobakterije (Tyagi in Sharma, 2002). Obstajajo pa raziskave, ki podpirajo domnevo o pomembnosti USP proteinov (npr. Rv2623) pri preživetju mikobakterij in pri razvoju latentne oblike tuberkuloze (Drumm in sod., 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 1: Seznam uporabljenih kemikalij in kompletov

Proizvajalec	Kemikalije
Aldrich Chemistry	DAPD - 1,5-diaminopentan dihidroklorid
Bio-Rad	Akrilamid, Bis-akrilamid, Coomassie Brilliant Blue R-250, Precision Plus Protein unstained standards (161-0363)
Difco	Agar, Bacto tripton, kvasni ekstrakt, tripton,
Gold Biotechnology	Ditiotreitol (DTT), izopropil β-D-tiogalaktozid (IPTG), tiamin pirofosfat (TPP)
Hampton Research	Polietilenglikol 3350 (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, ocetna kislina, 100-odstotni etilenglikol
Quiagen	Polnilo kolon Ni-NTA Superflow, Ni-NTA Superflow Fast Flow
Riegel	96-odstotni etanol
Sasol Wax	Vazelin Vaselinum Album
Sigma Aldrich	α-ketoglutarat dehidrogenaza, α-ketoglutarat v natrijevi soli (α-ketoglutarat), β- merkapto-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, kanamicin, Antifoam 289, bromfenol modro, citronska kislina, dikalijev hidrogen fosfat, etilendiamino tetraocetna kislina (EDTA), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), glicin, gvanidinijev hidroklorid, imidazol, kalijev hidrogenfosfat trihidrat, L-glutation reduciran, natrijev citrat, natrijev dihidrogenfosfat, natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, natrijev hidroksid, natrijev klorid, nikljev sulfat

3.1.2 Laboratorijska oprema in potrošni material

Preglednica 2: Seznam uporabljene laboratorijske opreme in potrošnega materiala

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: Type JA-10 in Type JA-20
Belimed	Pomivalno dezinfekcijski stroj: LA180
Bio-Rad	Elektroforezni sistem: 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 in 1 mm) Stojalo za vlivanje gelov Držalo za gel, glavniček za žepe
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, programsko orodje Unicorn 5.20 Kolona XK 16/20 Kromatografska kolona: Superdex 200 10/300 GL (volumen 120 ml; dimenzije 1,6×60 cm) 150 ml zanka za FPLC sistem
Gilson	Pipete: 0,2–2 µl, 2–20 µl, 20–100 µl, 20–200 µl, 200–1000 µl
H+P Labortechnik GmbH	Parni sterilizator: Varioklav
Hellma	Kiveta s premerom 10,00 mm, model QS

se nadaljuje

1	1	•		•
nad	al	jev	an	16

Proizvajalec	Laboratoriiska oprema	
TTOIZVajaiet	Silikonizirana stekelca za kristalizacijo s premerom 18 mm	
Hampton Research	Zanke za lovljenje kristalov: CryoLoop 0,1–0,2 mm, 0,2–0,3 mm, 0,4-0,5 mm	
	Viale: CrystalCap Vial Kristalizacijski pladenj	
Heat Systems- Ultrasonics inc. Hettich Zentrifugen	Sonikator: Sonicator 385 Centrifugi: Rotina 35 R in Rotina 28 R	
Hewlett Packard	Spektrofotometer: Diode Array Spectrophotometer Peltierjev element: Peltier Temperature Control Acessory 89090A	
Invitrogen	Elektroforezni sistem: XCell SureLock Mini-Cell Sistem za prenos proteinov iz gela na PVDF membrano: iBlot® Dry Blotting System	
	Stresalnik za gojenje kultur: IS-200K	
Kambič	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 10K NMWL Sistem za ultrafiltracijo Amicon Microcone Ultracel YM-10 Filtri za sterilno filtracijo Millex-GP, 0,22 µm pore 25 mm nitrocelulozni membranski filtri z 0,22 in 0,45 µm porami Vakuumska 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 tehtnica: Sartorius analytic	
Sigma-Aldrich	Kolona za HPLC Supelcosil [®] LC-8-DB HPLC Column.	
Spearlab	penasti krio-posodi: Small Foam Dewar in Tall Foam Dewar	
Spectrum Laboratories	dializno črevo: Spectra/Por 1 Dialysis Membrane (6-8 kDa, širina 40 mm,	
Techno Plastic Produtcs	5 ml-, 10 ml- 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	Q-TOF Premier masni spektrometer	

3.1.3 Raztopine in pufri

Preglednica 3: Seznam uporabljenih raztopin in pufrov

Pufer/raztopina	Sestavine ter priprava
Fosfatni pufer (500 ml), pH 7,5	11,5 g KH ₂ PO ₄ (kalijev dihidrogenfosfat) in 62,7 g K ₂ HPO ₄ ×6H ₂ O (dikalijev hidrogenfosfat heksahidrat).
Pufer za resuspendiranje in shranjevanje celic <i>E. coli</i> SP850 (100 ml)	50 mM Tris (2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol) pH 8,0 in 100 mM NaCl in 5 % (V/V) glicerola. Pufer smo umerili na pH 8,0.
Pufer za resuspendiranje in shranjevanje celic <i>E. coli</i> BL21(DE3) endo (100 ml)	50 mM Tris pH 7,5 in 250 mM NaCl in 10 % (V/V) glicerola. Pufer smo umerili na pH 7,5.
Ni-NTA pufer za nanos proteina (500 ml)	50 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM imidazola pH 8,0, 5 mM $\beta\text{-ME}^*$ in 10 % (V/V) glicerola.
Ni-NTA pufer za spiranje kolone (250 ml)	50 mM Tris pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazola pH 8,0, 5 mM $\beta\text{-ME}^*$ in 10 % (V/V) glicerola.
Ni-NTA pufer za elucijo proteina (250 ml)	50 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 300 mM imidazola pH 8,0, 5 mM $\beta\text{-ME}^*$ in 10 % (V/V) glicerola.
Dializni pufer (3 l)	50 M Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM $\beta\text{-ME}^*$ in 10 % (V/V) glicerola.
Pufer za gelsko kromatografijo GF200 (1 l)	50 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 2 mM $\beta\text{-ME}^*$ 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 (1 l)	25 mM Tris in 192 mM glicina. Pufer smo umerili na pH 8,8 s 6 M NaOH.
5-kratni vzorčni pufer za nativno elektroforezo	312,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50 % (V/V) glicerola in 0,05 % (V/V) bromfenol modro.
Raztopina za vizualizacijo proteinskih lis na gelu za nativno elektroforezo (40ml)	20 ml 0,1% (w/V) raztopine Coomassie Blue R-250 barvila, 20 ml 20% (V/V) ocetne kisline.
Raztopina za razbarvanje gela za nativno elektroforezo (40ml)	20 ml 30 % (V/V) etanola, 20 ml 10% (V/V) ocetne kisline.
Raztopina za vizualizacijo proteinskih lis na PVDF membrani (50 ml)	0,05 g Coomassie Blue R-250 barvila, 25 ml metanola, 250µl ocetne kisline, MQ voda do 50 ml.
Raztopina za razbarvanje proteinskih lis na PVDF membrani	50 ml MQ vode, 50 ml metanola
	se nadaljuje

nadaljevanje

Pufer/raztopina	Sestavine ter priprava
Mobilne faze pri HPLC	Mobilna faza A: raztopina 20mM NH4H2PO4 (amonijev dihidrogen fosfat) s pH 6,2. Mobilna faza B: mobilna faza A z 20 % (V/V) metanola.
Založne raztopine za kristalizacijo (vsaka po 50 ml)	50 % (m/V) PEG3350; 1 M Bis-Tris s pH 5,5 oziroma 6,5; 5 M NaCl; 2 M MgCl2; 2 M CaCl2;
Raztopina za pripravo nanašalnega gela pri nativni elektroforezi (4 ml za 4 gele)	2,3 ml MQ vode, 0,65 ml 30 % raztopine akrilamida (prop-2-en- amid)/bis-akrilamida, 1 ml 0,5 M Tris pH 6,8; 40 μ l (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ (APS: amonijev persulfat), 8 μ l Temed-a (tetrametil-etilen-diamin)
Raztopina za pripravo ločevalnega gela pri nativni elektroforezi (7,5 ml za 4 gele)	2,5 ml MQ vode, 3 ml 30 % raztopine akrilamida/bis-akrilamida, 1,9 ml 1,5 M Tris pH 8,8; 75 μ l APS-a (amonijev persulfat), 7,5 μ l Temed-a (tetrametil-etilen-diamin)
Krio-raztopine (500µl)	0.1M Bis Tris 6,5, 0.22 M NaCl, 40mM MgCl2, 2 % (V/V) DAPD (diaminopentan dihidroklorid), 20-25 % (V/V) PEG (polietilenglikol) 3350 in 5 %, 10 %, 15 %, 20 % ali bodisi 25 % (V/V) 100-odstotnega etilenglikola.

* β -ME smo v pufer ali raztopino dodali tik pred uporabo

3.1.4 Gojišča

Preglednica 4: Seznam uporabljenih gojišč

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 se doda 15 g/l agarja in po ohlajevanju na 50 °C še ustrezni antibiotik (ampicilin končne koncentracije 100 μ g/ml za LBA gojišče, dodatno še kanamicin končne koncentracije 30 μ g/ml za LBAK gojišče). Gojišče se razlije v petrijevke.
Bogato gojišče (ang. "Terrific broth") (TB)	2,4 % (m/V) kvasnega ekstrakta, 1,2 % (m/V) triptona, 0,4 % (V/V) glicerola. Napolnimo z destilirano vodo.
Vegetativno gojišče za indukcijo rasti bakterijskih celic <i>E. coli</i> BL21(DE3) (za 50 ml)	45 ml TB gojišča, 5 ml fosfatnega pufra, 100 μ l ampicilina založne koncentracije 50 mg/ml.
Produkcijsko gojišče za rast bakterij <i>E. coli</i> BL21(DE3) (za 1 l)	900 ml TB gojišča, 100 ml fosfatnega pufra, 2 ml ampicilina založne koncentracije 50 mg/ml, 3-4 kapljice protipenilca Antifoam 289

1 1	•	•
nadal	ievan	e

Gojišče	Sestavine in priprava raztopin
Vegetativno gojišče za indukcijo rasti bakterijskih celic <i>E. coli</i> SP850 (za 50 ml)	45 ml TB gojišča, 5 ml fosfatnega pufra, 100 μl ampicilina založne koncentracije 50 mg/ml, 50 μl kanamicina založne koncentracije 30 mg/ml.
Produkcijsko gojišče za rast bakterij <i>E. coli</i> SP850 (za 1 l)	900 ml TB gojišča, 100 ml fosfatnega pufra, 2 ml ampicilina založne koncentracije 50 mg/ml, 1 ml kanamicina založne koncentracije 30 mg/ml, 3-4 kapljice protipenilca Antifoam 289

3.1.5 Plazmidi

Preglednica 5: Seznam uporabljenih plazmidov

Plazmid/fragment	Opis
pPROEX Hta- msmeg 5458 WT (konc. 150 ng/ml)*	Plazmidni vektor z zapisom za lacI (laktozni represor), za ampicilinsko rezistenco, za protein Msmeg_5458 WT s His-repkom (regulacija s trc promotorjem).
pPROEX Hta- msmeg 5458 R95K (konc. 250 ng/ml)*	Isto kot zgornji, le da gre za mutiran protein Msmeg_5458 R95K.

*Department of Molecular Reproduction, Development and Genetics, Indian Institute of Science, India

V osnovi gre pri obeh primerih za isti plazmid, razlika je le v vstavljeni sekvenci v multiplo mestu za kloniranje (v prvem primeru je vstavljen zapis za divji tip proteina Msmeg_5458, v drugem pa njegova mutanta). Restrikcijska encima uporabljena za vstavitev sekvence proteina sta bila BamHI (izoliran iz organizma *Bacillus amyloliquifaciens*) in NotI (*Nocardia otitidiscaviarum*). Ekspresija heterolognega proteina je pod nadzorom *trc* promotorja. Gre za hibridni promotor med *lac* in *trp* promotorjema, ki omogoči 15-30 % akumulacijo ekspresiranega proteina glede na vse celične proteine. V plazmid je vključen tudi gen za *lacI*, ki zapisuje represorski protein LacR, ki prepreči konstitutivno prepisovanje genov pod nadzorom *lac* (tudi *trc*) promotorja. Do prepisa vstavljenega fragmenta lahko pride le ob dodatku IPTG-ja. V plazmid je prav tako vključen gen *bla* (zapisuje beta-laktamazo) za rezistenco na antibiotik ampicilin. Ta vključek omogoči, da preživijo le tiste celice, ki vsebujejo plazmid in ga prepisujejo. Pomemben vključek je dodan zapis za His-repek, ki se nahaja na N-terminalnem koncu vstavljenega fragmenta. Prav tako je vključena prepoznavna sekvenca za TEV proteazo,

nahaja se med His-repkom in proteinom. Histidinski repek (običajno vsebuje 6 histidinov zapored) omogoči enostavno očiščenje heterolognega proteina na primer z uporabo Ni-NTA kromatografije. Plazmid mora imeti sposobnost samoreplikacije, kar omogoči začetno mesto podvojevanja (ori), izolirano iz plazmida pBR322. (priloga A)

3.1.6 Bakterijski sevi

Preglednica 6: Seznam uporabljenih celičnih sevov

Sev	Genotip
E. coli SP850*	Hfr(PO1), λ ⁻ , e14 ⁻ , relA1, spoT1, ΔcyaA1400(::kan), thi ⁻ 1
E. coli BL21(DE3)*	F^{-} ompT gal dcm lon hsdS _B (r_{B}^{-} m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

*Zbirka sevov na Kemijskem inštitutu

E. coli BL21 (DE3) izvira iz seva *E. coli* B834. Že dolga leta se uporablja za ekspresijo heterolognih proteinov. Ima namreč mutacijo v ompT genu (proteaza VII), kar posledično zmanjša proteolizo izraženega proteina. V kromosom je vstavljen tudi λ profag, ki nosi zapis za T7 RNA polimerazo in lacI^q (prekomerno izražanje represorskega proteina LacR).

E. coli SP850 ima izbrisane zapise za adenilat ciklaze, kar onemogoča tvorbo cikličnega adenozin monofosfata (cAMP). Na isto mesto je vstavljen gen za kanamicinsko odpornost (Shah in Peterkofsky, 1991). Oba seva spadata v 1. varnostni razred, saj dolgoletne izkušnje kažejo, da nimata negativnih vplivov na zdravje človeka, živali in rastlin ter na okolje.

3.1.7 Encimi

3.1.7.1 TEV proteaza

Zapis za ta encim izvira iz genoma virusa jedkanja tobaka (ang. "*tobacco etch virus*" - TEV). Katalizira reakcijo cepitve histidinskega repka na rekombinantnih proteinih ali peptidih, ki imajo za histidinskim repkom vstavljeno značilno sekvenco, ki jo cepi TEV proteaza. Ta sekvenca je Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser), cepitev pa izvede med Gln

in Gly/Ser. Namen histidinskih repkov je lažja ločba proteina ali peptida, ker ti preko njih reagirajo z nikljem na Ni-NTA koloni. Sama proteaza ima tudi omenjen histidinski podaljšek, kar pa po opravljeni funkciji olajša njeno naknadno ločitev z Ni-NTA kromatografijo od proteinske mešanice, kateri smo s cepitvijo že odstranili histidinske repke. Pri delu smo uporabljali raztopino že izolirane in očiščene TEV proteaze s koncentracijo 3 g/l (pripravili na oddelku na Kemijskem institutu).

3.2 PRIPRAVLJALNE METODE

3.2.1 Sterilizacija pufrov, raztopin, gojišč in materiala za delo z bakterijskimi sevi

Pufre, raztopine in gojišča za rast bakterij in material za delo z bakterijskimi sevi smo sterilizirali za v avtoklav primerni steklovini po standardnem postopku (121 °C, 20 min, $1,2 \times 10^5$ Pa). Toplotno občutljive raztopine in pufre za kromatografije smo filtrirali skozi filtre z velikostjo por 0,22 µm. Raztopine ali pufre, ki niso bili uporabljeni pri kromatografiji in niso bili namenjeni za rast bakterij pa smo filtrirali skozi filtre z velikostjo por 0,45 µm.

3.2.2 Transformacija bakterijskih sevov

Transformacija se tukaj nanaša na prevzem DNK molekule (v našem primeru plazmida) iz okolja v bakterijske celice. Kompetentne celice *E. coli* BL21 (DE3) smo transformirali s plazmidom pPROEX HTA-msmeg_5458 R95K, kompetentne *E. coli* SP850 pa s plazmidom pPROEX HTA-msmeg_5458 WT. Razlika izhaja iz potrebe po različno izraženih proteinih. Pri prvem primeru smo želeli proizvesti mutiran protein, pri drugem pa nespremenjen protein brez vezanega kofaktorja cAMP. Zato smo za slednji primer potrebovali celice, ki niso sposobne tvoriti cAMP-ja (*E. coli* SP850). Princip metode je bil enak za oba tipa sevov, razlika je v izbiri plazmida za določen sev bakterij in uporabljenih gojiščih za prekonočno inkubacijo:

Kompetentne celice (shranjene na -70 °C, volumen 100 µl) in plazmid (shranjen na 4 °C) smo prestavili v posodo z ledom za 10 minut. Celicam smo nato dodali 1 µl raztopine plazmida in mešanico pustili na ledu 30 minut. Nato je sledil temperaturni šok za 1 minuto pri 42 °C. Celice smo takoj zatem odstavili za 3 minute na led in potem dodali 200 µl tekočega LB gojišča. Epruveto s transformiranimi celicami smo prestavili v rotacijski stresalnik za 1 uro na 37 °C in 150 vrt./min. Po eni uri smo celice razmazali po površini trdnega gojišča LBA v označeni petrijevki. Le-to smo nato prestavili v inkubator na 37 °C za eno noč. Tu moram poudariti, da smo za rast celic *E. coli* SP850 uporabili trdno gojišče LBA z dodanim kanamicinom (LBAK gojišče). Metodo smo izvedli aseptično ob gorilniku in uporabili sterilizirani material.

3.2.3 Rast bakterijskih celic

Po prekonočni inkubaciji petrijevk smo sterilno z ezo prestavili zrasle bakterijske kolonije (uporabili smo praktično vse kolonije) v vegetativno gojišče volumna 50 ml, čigar namen je zadostna namnožitev bakterij za produkcijsko gojišče. Erlenmajerico z vcepkom celic smo inkubirali 2 uri na 37 °C v stresalniku pri 180 vrt./min.

Nato smo 10 ml zgoščene kulture celic iz vegetativnega gojišča aseptično prestavili v produkcijsko gojišče (1L). Le-to smo z dodanim vcepkom prestavili na 37 °C v stresalnik in ga nastavili na 180 vrt./min. Skupno smo pripravili 4 l (4 x 11) produkcijskega gojišča. Rast bakterijskih celic smo posredno redno spremljali z merjenjem optične gostote aseptično odvzetih vzorcev. Ko je le-ta dosegla vrednost okoli OD 1,0 (po približno 4 urah) smo erlenmajerice odvzeli iz stresalnika in jih ohladili na ledu, da se je pomnoževanje celic ustavilo. Stresalnik smo ta čas pustili ohlajati do 16 °C za *E. coli* BL21(DE3), oziroma do 20 °C za *E. coli* SP850. Ko se je stresalnik primerno ohladil, smo erlenmajericam dodali še primerno količino izopropil β-D-tiogalaktozida (IPTG: 0,5 mM končne koncentracije za *E. coli* BL21(DE3) ter 0,4 mM za *E. coli* SP850). IPTG inducira ekspresijo heterolognega proteina. Inducirano produkcijsko gojišče s celicami smo inkubirali 18 ur na 180 vrt./min. Nizke temperature (16 ali 20 °C), smo uporabili, ker se pri nižji temperaturi proteini bolj pravilno zvijajo in posledično je manjša verjetnost da pride do denaturacije proteinov (Baneyx, 1999; Jevnikar, 2007). Posledica uporabe nižjih
temperatur izražanja proteinov v bakterijah pa je lahko izražanje manjših količin proteina, kar je pa pri nas ni predstavljalo problema.

3.2.4 Ločevanje trdno/tekoče in shranitev celic

Po rasti prekonočne kulture smo gojišče s celicami prestavili v centrifugirke, ki smo jih centrifugirali na 5000 vrt./min 15 minut pri 4 °C (centrifuga J2-HS Centrifuge, Beckman). Celice so se med centrifugiranjem trdno oprijele dna centrifugirk, zato smo supernatant lahko enostavno odlili. Sledilo je raztapljanje celic v pufru za resuspendiranje in shranjevanje celic. Paziti smo morali, da smo s pufrom dovolj dobro sprali stene centrifugirk, da je bila izguba celic in s tem količina našega proteina čim manjša. Vse to smo delali na ledu, vendar ni več potrebe po aseptičnem delu. Skupni volumen celične mase z dodanim pufrom je znašal okoli 60 ml. Celično kašo smo na koncu prestavili v vrečko, ki smo jo zamrznili v tekočem dušiku in jo nato prestavili v zamrzovalnik na -80 °C. Glicerol, ki je komponenta pufra za shranjevanje, ugodno vpliva na integriteto celične membrane tekom zamrzovanja (Hollander in Nell, 1954; Morrison, 1977).

3.2.5 Odtajanje in razbitje celic ter izolacija proteinov

Ko smo potrebovali celice, smo jih iz zamrzovalnika (-80 °C) prestavili v hladno sobo (4 °C) za čez noč, da so se počasi talile na ledu. Naslednje jutro smo jih nadalje odtajali na ledu pri sobni temperaturi. Kašo smo prelili v čašo in celicam dodali raztopino fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF) v končni koncentraciji 2 mM. Le-ta deluje kot inhibitor serinskih proteaz, kar posledično zmanjša proteolizo proteinov po razbitju celic pri soniciranju. Soniciranje smo izvajali na napravi Sonicator 385 (Heat Systems- Ultrasonics inc.) 2-krat po 21 minut z vmesnimi presledki. Konica sonicifikatorja se je nahajala vsaj 1 cm nad dnom čaše, ki smo jo umestili v led. Program naprave je zaznovan tako, da je za vsako sekundo soniciranja, dve sekundi premora, da se celični lizat ne bi pregreval. Amplituda je bila nastavljena na 38 %. Lizat smo prelili v centrifugirke in smo jih pred samim centrifugiranjem uravnotežili. Centrifugiranje je potekalo pri 17.000 vrt./min pri 4 °C za 35 minut. Med centrifugiranjem se večji deli razbitih celic sesedejo. Supernatant, ki vsebuje raztopljene proteine, vključno s tarčnim, smo prelili v čisto čašo in dodali 1 M

imidazol pH 8,0 do končne koncentracije 10 mM (kot pufri za nanos pri Ni-NTA kromatografiji). Vsebino čaše smo prefiltrirali skozi filter s 0,45 µm porami z namenom, da odstranimo večje delce, ki bi morebiti lahko poškodovali nikljevo kolono.

3.2.6 Priprava nikljeve kolone

Pred samo uporabo smo morali kolono XK 16/20, napolnjeno z Ni-NTA nosilcem (10 ml) regenerirati. S tem ji povečamo kapaciteto vezave in podaljšamo rok delovanja. Postopek čiščenja sledi naslednjim korakom:

Preglednica 7: Koraki pri čiščenju nikljeve kolone.

Korak	Raztopina	Volumen
1	0,5 M EDTA	10 ml
2	6 M gvanidinijev hidroklorid	20 ml
3	0,1 M NaOH	10 ml
4	20 % etanol	50 ml
5	0,2 M NiSO ₄ *	20 ml

^{*}kolono smo po spirananju z NiSO₄ pustili čez noč v hladni sobi do uporabe

Pred in po vsakem koraku smo kolono sprali še s 5-kratnim volumnom kolone (50 ml) MQ vode.

3.2.7 Prva stopnja čiščenja na Ni-NTA koloni

Sledilo je čiščenje heterologno izraženega proteina na Ni-NTA koloni. Gre za vrsto afinitetne kromatografije, pri kateri je princip ločevanja specifična vezava histidinskega repka na nikljeve ione, ki so preko nitriloocetne kisline (NTA) vezani na nosilec v koloni, v tem primeru so to agarozna zrnca. Nikelj reagira s proteinom preko dušikovih atomov imidazolnih skupin v His-repku. Prosti imidazol, ki ga uporabljamo pri tovrstni kromatografiji v pufru za spiranje vezanih proteinov, je ligand sposoben vezave z nikljevim ionom in torej lahko kompetitivno izpodrine vezane proteine in jih tako spere s kolone. Višja kot je njegova koncentracija, več vezanih proteinov s His-repki lahko izpodrine z vezavnega mesta. (Hochuli in sod., 1988)

Kolona s 150 ml rezervoarjem za nanos proteina je bila priključena na kromatografski sistem Äkta FPLC, preko katerega smo uravnavali parametre pri ločevanju. Ker je instrument pri sobni temperaturi, smo rezervoar ovili z vrečko z ledom, da bi ohladili proteinski vzorec in ga s tem bolj stabilizirali. Pred nanosom proteinov smo sistem očistili z 20 % etanolom, nato pa še z MQ. Kolono smo pred samim nanosom vzorca spirali najprej z MQ vodo in nato še s pufrom za nanos, in sicer s 50 ml (vsaj pet volumnov kolone) vsakega. Pretok smo nastavili na 2 ml/min, pritisk v koloni pa nikakor ni smel preseči varnostne meje 1,0 MPa.

Ko smo opravili čiščenje, smo lahko naložili vzorec v rezervoar, ki je povezan s kolono. Pri nanosu vzorca smo pretok smo zmanjšali na 1 ml/min. Vzorec, ki je prihajal s kolone, smo začeli zbirati, ko smo zaznali prve proteine (detektor se nahaja na spodnjem koncu Ni-kolone in meri absorbanco pri 280 nm), ki so predstavljali nevezane proteine, med katerimi naj ne bi bilo tarčnega. Sledilo je spiranje s pufrom za spiranje, ki vsebuje že višjo koncentracijo imidazola (20 mM). Tu se sperejo proteini z nespecifično vezavo na nikljeve ione (še vedno proteini brez His-repka). Nazadnje sledi spiranje s pufrom za elucijo, ki vsebuje zadosti imidazola (v našem primeru 300 mM), da spere vse specifično vezane proteine (s His-repkom). Frakcije proteinov, spranih s kolone smo tako zbrali v tri različne čaše: nanos (po spiranju s pufrom za nanos), pred-eluat (po pufru za spiranje) in eluat (po pufru za elucijo). Prisotnost proteinov iz vsake frakcije smo preverili z NaDS-PAGE elektroforezo. Kolono in sistem smo po uporabi sprali z MQ vodo in nato še z 20 % etanolom.

3.2.8 Cepitev His-repka in dializa

Dializa je postopek ločevanja skozi pore v membrani na podlagi velikosti, sila izhaja iz razlike v koncentracijskem gradientu. Pri tem postopku smo želeli odstraniti imidazol in zmanjšati ionsko jakost raztopine, v kateri se je protein nahajal.

Pred dializo smo z elektroforezo preverili prisotnost tarčnega proteina v zgoraj omenjenih treh frakcijah po Ni-NTA ločbi. Odločili smo se, da bomo združili pred-eluat in eluat iz prve afinitetne kromatografije, saj je bilo razvidno, da je količina proteina v prvem še zmeraj precejšnja. Omenjeni frakciji smo združili in nato v dializno črevo dodali še 8 ml

TEV proteaze, tako da je skupni volumen znašal okoli 70 ml. Dializa je potekala v dializnem pufru preko noči pri 4 °C. Naslednji dan smo preverili uspešnost cepitve na NaDS-PAGE elektroforezi.

3.2.9 Druga stopnja čiščenja na Ni-NTA koloni

Po dializi smo vzorec iz dializnega čreva prefiltrirali skozi filter s 0,45 µm porami. Drugo čiščenje na nikljevi koloni je namenjeno dodatnemu očiščenju, kjer naj bi odstranili odcepljene His-repke oziroma potencialno necepljene proteine in TEV proteazo, ki tudi ima (necepljivi) His-repek. Potek te metode je enako kot pri točki 3.2.7.. Razlika je v tem, da se tarčni protein tokrat nahaja v prvi in drugi frakciji (po spiranju s pufrom za nanos in pufrom za spiranje), neželeni proteini in peptidi pa v tretji frakciji (po spiranju s pufrom za elucijo).

3.2.10 Koncentriranje pred gelsko filtracijo

Zbrani frakciji v 3.2.9. smo pred uporabo gelske kromatografije koncentrirali z namenom, da smo zmanjšali volumen nanosa na kolono. Koncentriranje je potekalo z uporabo sistema Amicon Ultra 15. Sistem vsebuje filtrno membrano, ki omejuje prehod molekulam, večjim od 10 kDa. V ta namen smo uporabili centrifugo Rotina 35 R oz. Rotina 28 R (Hettich Zentrifugen) za 15 minut na 3600 rcf pri 4 °C. Od skupnega volumna okoli 90 ml smo vzorec uspešno koncentrirali na 3,1 ml. Vmes smo preverjali, da ni prihajalo do obarjanja, kar se vidi po motnosti raztopine. Centrifugirko smo spravili na led preko noči v hladno sobo, naslednji dan je sledila gelska filtracija.

3.2.11 Gelska filtracija

Metoda omogoča ločevanje biomolekul na podlagi velikosti in oblike. Stacionarna faza kolone Superdex 200 10/300 GL je sestavljena iz povezanih molekul dekstrana in agaroze, oblikovanih v zrna povprečnega premera 13 μ m. Omogoča ločevanje molekul v območju od 10 do 600 kDa.

Gelsko kromatografijo smo prav tako kot afinitetno izvajali na AKTA-FPLC napravi. Najprej smo sistem sprali v 20 % etanolu, nato v MQ vodi in še v pufru za gelsko kromatografijo z vsaj dvema volumnoma kolone. Vzorec iz centrifugirke smo v sistem dodajali postopoma, in sicer v mešanici 200 µl raztopine proteina s 300 µl pufra za gelsko. Skupaj je bilo za 17 takih mešanic. Pretok smo naravnali na 0,5 ml/minuto, največji dovoljeni pritisk je znašal 1,5 MPa. Vsak tako nanešen vzorec smo zbirali v frakcije po 0,5 ml. Frakcije, pri katerih je bila koncentracija proteina najvišja (posredno merjenje preko UV detektorja pri 280 nm), smo zbrali skupaj in jih hranili na ledu. Po končani kromatografiji smo združene frakcije do koncentriranja shranili na -80 °C.

3.2.12 Določanje koncentracije in koncentriranje proteina

Koncentracijo proteina smo v zbranih frakcijah določili spektrofotometrično z merjenjem absorbcije vzorca pri 280 nm ter jo izračunali po Beer-Lambertovem zakonu, iz enačbe:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \qquad \dots (1)$$

 ε je ekstinkcijski koeficient (M⁻¹ cm⁻¹), *l* je dolžina poti skozi kiveto (1 cm), *A* pa se nanaša na izmerjeno absorbanco merjenega vzorca in mora biti pod vrednostjo 0,8, da linearnost še velja. Ekstinkcijski koeficient proteina smo določili teoretično s programom ProtParam preko baze ExPASy (http://expasy.org/tools/protparam.html). Dobili smo vrednost 30.940 M⁻¹ cm⁻¹ oziroma 0,826 g/l za 0,1 % vodno raztopino. Vzorec iz združenih frakcij smo morali redčiti 4-krat, da smo prišli v ustrezen razpon absorbance (0,3-0,8). Povprečno vrednost smo uporabili za izračun koncentracije. Ker smo želeli protein skoncentrirati do koncentracije okoli 30 mg/ml, smo izračunali kolikšen mora biti skupni volumen koncentrata. Dobili smo vrednost 2,62 ml. Merili smo na UV-VIS spektrofotometru Agilent 8453, Chemstation software (Agilent technologies) pri 280 nm in uporabljali smo kiveto Hellma. Koncentriranje proteina smo izvajali v sistemu Amicon Ultra-15 pri 3600 rcf na 4 °C in sicer postopoma, saj smo preverjali, da ne bi prišlo do obarjanja proteina. Ko smo protein primerno skoncentrirali, smo ga porazdelili v mikrocentrifugirke na alikvote (26-krat po 50 µl in 38-krat po 27 µl). Le-te smo shranili na -80 °C, ostanek pa porabili za analizo koncentracijskega gela (NaDS-PAGE elektroforeza).



Slika 5: Proces pridobivanja proteina Msmeg_5458 WT cyc⁻ (brez v vezanega cAMP)

3.3 ANALITSKE METODE

3.3.1 NaDS-PAGE elektroforeza

Gre za metodo ločevanja proteinov zgolj na podlagi njihove molekulske mase v poliakrilamidnem gelu. Detergent natrijev dodecil sulfat (NaDS) s sulfatnimi skupinami obda protein in mu spremeni neto naboj. Ker so vsi proteini po takem negativno nabiti, potujejo proti pozitivno nabiti anodi na podlagi razlike v napetosti. Krajši proteini potujejo hitreje. (Weber in Osbourne, 1969)

Preden smo proteinske vzorce nanesli na gel (NuPAGE[®] Novex[®] 4-12% Bis-Tris Gel), smo jih morali ustrezno pripraviti. Običajno smo raztopino proteina redčili s pufrom za gelsko kromatografijo in dodali 3-5 µl vzorčnega pufra NuPAGE[®] LDS Sample Buffer (4X), ki obteži nanašalni vzorec. Mešanico skupnega volumna manj kot 25 µl smo denaturirali 8 minut pri 80°C. Medtem smo pripravili elektroforezni pufer, tako da smo založno raztopino 20-krat redčili z MQ vodo (NuPAGE[®] MES SDS Running Buffer).

Proteinske vzorce smo centrifugirali pri 5000 vrt./min za par minut, da so se zadosti posedli, nakar smo jih prenesli na gel. Prav tako smo v enega izmed žepov gela dodali 5 µl standarda molekulskih mas Precision Plus Protein (unstained standards Bio-Rad 161-0363). Elektroforezo smo izvajali v elektroforezni celici Xcell SureLock[®] (Invitrogen) pri napetosti 200 V, toku 125 mA (250 mA za 2 gela) za 45 minut. Sledilo je čiščenje gela, ki smo ga pred tem odstranili iz celice, v MQ vodi 3-krat po 5 minut. Nato smo v kotliček z gelom dolili okoli 40 ml barvila SimplyBlue[™] SafeStain za vizualizacijo proteinskih lis. Kotliček smo pol ure rahlo stresali na stresalniku, nakar smo gel spet spirali v MQ vodi, da smo dobili lepšo razvidnost lis na gelu. Ko se je gel dovolj spral, smo ga slikali, označili in shranili v plastični foliji v hladno sobo.

Postopek NaDS-PAGE elektroforeze se je pri očiščenih proteinskih kristalih razlikoval le v tem, da je denaturacija potekala dlje časa (35 minut) pri nekoliko višji temperaturi (85 °C). Če smo želeli proteinske lise prestaviti na PVDF membrano, gela nismo barvali.

Postopek NaDS-PAGE elektroforeze pri analizi vzorca celic iz gojišča je poseben po tem, da zahteva daljšo denaturacijo (60 min) in centrifugiranje (10 min).

3.3.2 Nativna elektroforeza

Princip nativne elektroforeze se v osnovi razlikuje od NaDS-PAGE elektroforeze po tem, da omogoča ločevanje tako po velikosti, obliki in naboju proteinov. Tu namreč ni prisotnega nobenega detergenta, ki bi porušil strukturo in spremenil neto naboj proteina in tako vplival na potek ločbe.

3.3.2.1 Priprava gela

Pred izvedbo elektroforezo smo pripravili 4 gele debeline 0,75 mm z 12% zamreženostjo ločevalnega gela in 5% zamreženostjo nanašalnega gela. Najprej smo sestavili stojalo za vlivanje gelov in vstavili stekelca. Pripravili smo raztopino za nanašalni in ločevalni gel. Pomembno je, da tetrametiletilendiamin (Temed) dodamo tik pred vlivanjem med stekelcema, saj se ob dodatku le-tega začne raztopina zamreževati in tvori se gel. Med stekelca smo tako najprej dolili raztopino za ločevalni pufer približno do 2 cm pod rob stekelc. Počakali smo 15 minut, da se je gel dovolj strdil, nakar smo do vrha dotočili MQ vodo in stojalo prekrili z aluminijasto folijo. Po naslednjih 15 minutah smo s filter papirjem odmočili vodo in do konca roba stekelc dolili raztopino za nanašalni gel. Vanjo smo zarinili glavniček, ki poskrbi za tvorbo žepkov na vrhu gela. Po 10 minutah se ta dovolj strdi, da glavniček lahko odstranimo. Tvorjene gele smo sprali z MQ vodo in jih s stekelci vred ovili v mokro papirnato brisačo in shranili v hladilnik na 4 °C do uporabe.

3.3.2.2 Izvedba nativne elektroforeze

Priprava vzorcev za nativno elektroforezo seveda ne vključuje denaturacije vzorcev. Raztopino proteina smo primerno redčili, običajno z 10 µl pufra za gelsko kromatografijo in dodali 4 µl 5-kratnega vzorčnega pufra v vsak vzorec. Vzorce smo za kakšno minuto centrifugirali pri 5000 vrt./min in jih nato nanesli v žepke gela. Nativno elektroforezo smo izvajali v elektroforeznem sistemu Mini Protean III (Bio-Rad) v hladni sobi v pufru za nativno elektroforezo. Ločba je potekala pri napetosti 90 V, toku 130 mA približno 3 ure, oziroma dokler nismo opazili uhajanje barvila bromfenol modro s spodnjega dela gela. Gel smo nato barvali 8 minut v pufru za vizualizacijo proteinskih lis. Sledilo je odstranjevanje preostalega barvila v pufru za razbarvanje gela enkrat 15 min, drugič pa 45 min. Oba pufra smo pred uporabo segreli na 50 °C. Gel smo nato lahko fotografirali in shranili v hladno sobo.

3.3.3 Prenos proteinov kristala iz gela na PVDF membrano in določanje Nterminalne sekvence kristaliziranega proteina

Ko nam je uspelo kristalizirati protein Msmeg_5458 WT cyc⁻, smo želeli preveriti, če so kristali proteinski in če ni protein razpadel, preden je uspel kristalizirati. Iz kapljice, kjer so se nahajali kristali, smo odvzeli in očistili okoli 5 kristalčkov. Naredili smo NaDS-PAGE elektroforezo za kristale po že opisanem postopku (točka 3.3.1). Dobljen gel smo omočili in opravili prenos proteinskih lis na PVDF membrano z napravo iBlot[®] Dry Blotting System po navodilih proizvajalca (Invitrogen). Po končanem prenosu smo PVDF membrano barvali v kadički na stresalniku eno minuto v raztopini za vizualizacijo proteinskih lis, razbarvali pa v času osmih minut v raztopini za razbarvanje proteinskih lis na PVDF membrano. Membrano smo potlej omočili v MQ vodi in posušili. Vidne proteinske lise smo s skalpelom previdno izrezali in poslali na N-terminalno določanje aminokislinskega zaporedja na oddelek za molekularne in biomedicinske znanosti, inštitut Jožefa Štefana k dr. Adrijani Leonardi.

3.3.4 Test stabilnosti proteinov

S testom preverjamo stabilnost proteina na 20 °C skozi čas (vzorce smo zbirali do 6. tedna), ki je pomemben podatek za kristalizacijo, saj le ta poteka pri sobni temperaturi lahko tudi več tednov oziroma mesecev. Iz shranjene mikrocentrifugirke, ki je bila v temi, smo v časovnih presledkih odvzeli 3 µl raztopine proteina koncentracije 30 mg/ml in ga shranili na -20 °C do izvedbe testa. Analiza poteka z izvedbo nativne in NaDS-PAGE elektroforeze po že zgoraj opisanima postopkoma.

3.3.5 Merjenje cirkularnega dikroizma

Cirkularni dikroizem (CD) je vrsta spektroskopije pri kateri merimo razliko med absorbcijo levosučno in desnosučno polarizirane svetlobe pri različnih valovnih dolžinah.

Razlika, pozitivna ali negativna, se imenuje eliptičnost. CD-spekter prikazuje eliptičnost v odvisnosti od valovnih dolžin. Iz CD-spektra proteina lahko ugotovimo, kolikšen delež aminokislin zavzema sekundarno zgradbo vijačnice α , β -strukture oziroma naključnega zvitja.



Slika 6: CD spekter za alfa vijačnico, beta strukturo in naključno zvit protein (A Short Primer..., 1996) Proteine družine Msmeg_5458 (divji tip WT endo, WT cyc⁻ in mutanti R95K ter E234A) smo pripravili v raztopini 20 mM pufra Tris pH 7,5 s koncentracijo med 0,1-0,2 mg/ml. Merili smo v 200 μl kiveti debeline 1,0 mm pri 20 °C s CD spektrofotometrom Chirascan (Applied Photophysics) pri valovnih dolžinah od 190 do 280 nm. Za vsak protein smo meritev izvedli 3-krat, povprečje je predstavljeno v rezultatih.

3.3.6 Analiza ligandov vezanih na proteine

Pri tej metodi ugotavljamo prisotnost vezanih ligandov v proteinu Msmeg_5458. Analizirali smo oba divja tipa WT endo in WT cyc⁻ ter mutanti R95K in E234A.

3.3.6.1 Priprava vzorcev

Za analizo proteinskih vzorcev s HPLC in masno spektroskopijo (MS) smo morali le-te primerno redčiti in pripraviti. Izhodno 0,8 mM (ustreza 30 mg/ml za Msmeg_5458)

koncentracijo proteinskih vzorcev smo razredčili v MQ vodi do koncentracije 200 μ M v 150 μ l volumna (37 μ l raztopine proteina v 113 μ l MQ vode). Vzorce smo eno uro kuhali na 100 °C. Med kuhanjem protein denaturira in v raztopino se sprostijo vsi vezani ligandi. Sledila je ultrafiltracija s sistemom Amicon Microcone YM-10 za 30 minut pri 4 °C in 13.600 rcf v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf). S filtracijo odstranimo protein od supernatanta, kjer so sproščeni ligandi. Po prvem centrifugiranju smo izmerili volumen filtrata, ga prestavili nad filtrno membrano centrifugirk, dodali MQ vodo do skupne vrednosti 150 μ l in ponovno centrifugirali pri istih pogojih. Centrifugirke smo do uporabe shranili na -20 °C. Na podoben način (fazo ultrafiltracije smo spustili, ker v njih ni bilo proteina) smo pripravili kontrolne vzorce, ki so zajemali 200 μ M koncentracijo cAMP-ja, koencima A in acetil-CoA.

3.3.6.2 Reverzno fazna HPLC analiza

HPLC kromatografija je najpogosteje in najširše uporabljana kromatografska metoda. Pri HPLC kromatografiji z reverzno fazo stacionarno fazo predstavlja organosiloksanska porozna površina, kot mobilno fazo pa se uporablja vodne raztopine metanola, acetonitrila ali tetrahidrofurana. Bolj polarne molekule iz kolone eluirajo prej (Kočevar in sod., 2007)

Metodo smo izvajali na sistemu Agilent 1100 series HPLC na koloni Supelcosil[®] LC-8-DB s pretokom 1 ml/min pri tlaku 91 barov. Elucija ligandov je potekala z mobilno fazo, ki je bila ustrezna mešanica dveh raztopin: 35 % raztopine A in 65 % raztopine B (mobilne faze pri HPLC, stran 16). Detektor je meril pri valovni dolžini 254 nm. Na kolono smo nanašali 50 μ l proteinskih in kontrolnih vzorcev in 10 μ l slepih vzorcev koncentracije 0,5 mM (koencim A, acetil CoA, mešanica koencima A in acetil CoA, cAMP, denaturirani cAMP). Slednje smo pripravili v 20 mM raztopini NH₄H₂PO₄ s pH 6,2.

3.3.6.3 Masna spektrometrija

Masna spektrometrija (MS) je tehnika, pri kateri vzorec ioniziramo, nato pa merimo prisotnost ionov z različnim razmerjem med maso in nabojem (m/z) ter njihovo relativno zastopanost. Analizo smo izvajali s pomočjo dr. Dušana Žigona v centru za masno spektrometrijo na inštitutu Jožefa Štefana na masnem spektrometru Waters-Micromass Q-

TOF Premier. Gre za kvadrupolni, ortogonalno pospešeni tandemski masni spektrometer z analizatorjem na čas preleta ionov (Tof). Spektrometer je opremljen z ionskima izviroma pri atmosferskem tlaku ter tekočinskima kromatografoma UPLC in nanoUPLC. (Center za..., 2011) Uporabili smo negativni ionski izvir in UPLC kolono Acquity UPLC BEH C18. Injicirali smo po 5 μ l vzorca. Pretok je bil naravnan na 0,2 ml/min. Mobilna faza pri tekočinski kromatografiji je v desetih minutah gradientno naraščala od 0,1 % (V/V) mravljinčne kisline do 100 % acetonitrila.

3.3.7 Test acetiltransferazne aktivnosti

Pri tem encimskem testu preverjamo sposobnost encima iz družine Msmeg_5458 (divja tipa WT endo in WT cyc⁻ ter obe mutanti R95K in E234A), da acetilira svoj substrat, v tem primeru USP protein (Msmeg_4207). Divji tip encima je sposoben prenesti acetilno skupino iz acetil-CoA na substrat, regulacija aktivnosti poteka preko cAMP-vezavne domene. (Nambi in sod., 2010) V testu se izvedeta dve reakciji, druga je sklopitvena za prvo:

acetil-CoA + USP (Msmeg_4207) + Msmeg_5458 = CoA + acetiliran USP

 $CoA + NAD^{+} + \alpha \text{-ketoglutarat} + \alpha \text{-ketoglutarat} \text{ dehidrogenaza} = \text{sukcinil } CoA + NADH + CO_2 + H^{+}$

Komponenta	Končna koncentracija (mM)
NAD^+	0,2
TPP	0,2
MgCl ₂	5
α-ketoglutarat	2,4
acetil-CoA	0,05
cAMP (pogojno)	1
DTT	1
α-ketoglutarat dehidrogenaza	$0,03U^{*}$
Msmeg_5458	200 nM
USP (MSmeg_4207)	50 nM

Preglednica 8: Sestava reakcijske mešanice acetiltransferaznega testa

^{*}U je enota za aktivnost encima, 1 U =1 μ mol (reagiranega substrata) min⁻¹

Pripravili smo reakcijsko mešanico volumna 150 µl z vsemi komponentami razen proteina Msmeg_5458 in njegovega substrata USP. Mešanica je bila pripravljena v TBA pufru in nato inkubirana 5 minut na 25 °C, da se vzpostavijo ustrezni reakcijski pogoji. Po preteku 5 minut smo dodali substrat USP in protein Msmeg_5458. Sposobnost acetilacije substrata USP smo merili v 10 mm kiveti posredno preko tvorbe NADH produkta, ki smo ga spektrofotometrično zaznali pri 340 nm. Merjenje je potekalo kontinuirno od začetka reakcije v kvarčni kiveti s sistemom Agilent 8453 (Agilent Technologies). Z dodatkom komponente cAMP smo preverili vpliv na spremembo aktivnosti acetiltransferaze Msmeg_5458. Kot kontrolo smo pripravili mešanico brez proteina Msmeg_5458. Vsako meritev smo ponovili trikrat.

3.3.8 Kristaliziranje proteina

3.3.8.1 Potek kristalizacije

Za pripravo proteinskega kristala potrebujemo zadostno količino dovolj čistega proteina (več kot 95%) v koncentrirani raztopini (npr. 5-100 mg/ml). Postopek kristalizacije temelji na tem, da iz koncentrirane raztopine proteina odstranjujemo vodo, topljenec (protein) pa se pri tem odlaga v obliki kristala. Če vodo odstranjujemo prehitro, se lahko namesto kristala pojavi amorfna oblika. Ali se bo tvoril kristal ali ne, je odvisno še od mnogih drugih dejavnikov, kot so vrsta in koncentracija pufra ter njegov pH, temperatura ali pa vsebnost pomožnih snovi. Običajno je za uspešno kristalizacijo potrebno preizkusiti več deset ali več sto različnih kombinacij naštetih dejavnikov. Kristalizacijo smo izvajali s tehniko viseče kapljice, pri kateri kapljica koncentrirane raztopine proteina visi na stekelnem pokrovu posodice z raztopino z nižjim osmoznim tlakom. Ker je parni tlak v kapljici večji kot v spodnji raztopini, vodni hlapi izhlapevajo iz kapljice. V primernih razmerah v kapljici na stekelcu nastane kristal. Za snemanje difrakcijskega vzorca zadošča že 0,1 mm velik kristal. (Kočevar in sod., 2007)



Slika 7: Priprava rezervoarja kristalizacijske plošče (Kočevar in sod., 2007)

Proces priprave zaobjema več zaporednih korakov. Najprej pripravimo kristalizacijsko ploščo: dodamo plastelin v notranje robove pokrova, apliciramo vazelin z injekcijo na robove rezervoarjev, pripravimo raztopine rezervoarjev ali pa dodamo že pripravljene kristalizacijske pufre (primerni za začetno iskanje osnovnih pogojev kristalizacije) ter ploščo nato stresamo 10 minut pri minimalnih obratih (do 120 vrt./min), da se vsebina rezervoarja dobro premeša. Sledi priprava proteina. Potrebno količino zamrznjenih vzorcev odtalimo na ledu, običajno smo za pripravo ene plošče potrebovali okoli 40 ml proteina koncentracije 30 mg/ml. Na vsak stekelni pokrov smo namreč nanesli tri različne kapljice: prva z nespremenjeno koncentracijo proteina, druga s polovično (15 mg/ml), tretja pa je kontrolna (brez proteina). Polovično koncentracijo proteina smo pripravili tako, da smo letega ustrezno redčili v pufru GF200 za gelsko kromatografijo, v katerem je vzorec shranjen. Pripravljene vzorce proteinov smo centrifugirali 10 minut pri 13.600 rcf pri 4 °C zato, da se morebiti prisotne oborine posedejo na dno epruvete. Priprava visečih kapljic je potekala v kristalizirnici, kjer je konstantna temperatura 20 °C. Na vsak stekleni pokrov smo nanesli po 1 µl pripravljenih raztopin proteina in kontrolo ter vsaki tako dobljeni kapljici smo dodali 1 µl raztopine iz pripadajočega rezervoarja. Pogojno smo kapljicam dodali tudi 0,5 µl aditiva DAPD in 0,5 µl sejalne raztopine kristalov (poglavje 3.3.8.2 in 3.3.8.3.). Tako pripravljen stekleni pokrov smo obrnjenega postavili nad ustrezen rezervoar kristalizacijske plošče. Pripravljeno ploščo smo postavili v omaro za kristalizacijo na 20 °C in sproti smo beležili spremembe.



Slika 8: Kristalizacijska plošča za pripravo 24 različnih rezervoarjev (24-well..., 2011)

3.3.8.2 Sejanje kristalov

Z namenom, da dobimo lepše in večje kristale, je v nekaterih primerih (kristaliziranje Msmeg_5458 R95K) potrebno v kapljico dodati tudi raztopino za sejanje kristalov. Gre za raztopino, z zdrobljenimi sicer še neidealnimi kristali iz že obstoječe kapljice, ki v sveže pripravljeni kapljici delujejo kot nukleacijska jedrca, okoli katerih se začne zbirati protein iz raztopine, kar pripomore pri tvorbi kristala boljše morfologije. Raztopina za sejanje kristalov se pripravi tako, da se že zrasle najprimernejše kristale iz določene kapljice odvzame in zameša v približno 150 μ l raztopine rezervoarja iz katerega izhajajo. S plastičnim batkom ročno zdrobimo kristale v epruveti in pripravimo redčitveno vrsto take raztopine. Pri kristaliziranju proteina Msmeg_5458 R95K so v poštev prišle redčitve vse od 10⁻² do 10⁻⁷. Kadar prva raztopina za sejanje kristalov pri kristalizaciji nekega proteina izhaja iz druge vrste sicer podobnega proteina (ang. *"cross-seeding"*), je potrebno izvesti več serij sejanj. S tem zelo zmanjšamo verjetnost, da je v rastočem kristalu prisoten tudi protein iz izvorne raztopine za sejanje kristalov.

3.3.8.3 Aditiv

Aditiv DAPD (1,5-diaminopentan dihidroklorid) se je izkazal v predhodnih poskusih, da pripomore pri tvorbi lepših kristalov. Običajno smo dodali po 0,5 μ l 10 % (m/V) DAPD-ja v vsako kapljico, tako da je bila končna koncentracija okoli 2 %.

3.3.8.4 Zamrzovanje kristalov

Kristale, ki so izkazovali pravilne robove in so bili primernih dimenzij, smo zamrznili v tekočem dušiku, kjer so bili shranjeni v vialah vse do slikanja na sinhrotronu. Pred samim zamrzovanjem je potrebno pripraviti krio-raztopine. To so raztopine, ki preprečujejo tvorbo kristalov ledu v kristalu proteina oziroma okoli njega. Krio-raztopine vsebujejo nekoliko višjo koncentracijo soli kot rezervoar, iz katerega je zrasel kristal, ter krioprotektant, kar kristal zaščiti pred poškodbami tekom zamrzovanja. Raztopine smo pripravili z naraščajočo vsebnostjo etilen glikola kot krioprotektanta v našem primeru, vsaka naslednja ga je vsebovala za pet odstotkov več (od 5 do 25 %). Želene kristale smo z zanko za lovljenje kristalov posamično prestavljali v kapljice krio-raztopin z zmeraj višjo vsebnostjo etilen glikola. Iz zadnje kapljice smo ga nato prestavili v posodo s tekočim dušikom, kjer smo ga z nastavljivo zanko vred vstavili v vialo. Te smo shranili v transportne krio-posode (slika 9).



Slika 9: Pribora pri zamrzovanju kristalov (Cascio in Sawaya, 2011; CryoLoop..., 2011) Držalo za zanko s kristalom se potisne v krio vialo in zamrzne (A), zanka s kristalom pod povečavo (B).

3.3.8.5 Merjenje sipanja X-žarkov na proteinskih kristalih

Za določitev tridimenzionalne strukture kristaliziranih proteinov moramo izmeriti sipanje X-žarkov (rentgenske svetlobe) na proteinskih kristalih. X-žarki se sipajo na elektronih snovi, skozi katero prodirajo, in če je to urejena struktura kristala, ta sipana svetloba ustvari specifičen difrakcijski vzorec, ki ga posnamemo z elektronskim detektorjem. S

pomočjo serije teh uklonskih slik lahko določimo strukturo proteina v kristalu. Meritve so potekale na sinhrotronu Elettra (Sincrotrone Trieste S.C.p.A. di interesse nazionale, Trst, Italija) z elektroni energije 12,86 keV in pri temperaturi 100 K.



Slika 10: Difrakcijska slika enega izmed kristalov WT cyc-

3.3.8.6 Izgradnja 3D-modela molekule

Pri obdelavi podatkov iz difrakcijskega vzorca najprej izmerimo intenziteto in položaj lis. Nato ugotovimo dimenzije osnovne celice in kristalni sistem. Osnovna celica je najmanjša ponavljajoča se enota v kristalu. Glede na njene dimenzije in kote poznamo sedem kristalnih sistemov. S kompleksnimi matematičnimi operacijami, ki vključuje Fourierjevo transformacijo, izračunamo karto elektronske gostote. Pri tem si pomagamo z matematičnimi algoritmi, ki so vgrajeni v specializirane računalniške programe. Karta elektronske gostote nam kaže, v katerih delih osnovne kristalne celice se nahajajo elektroni. Če je difrakcijski vzorec posnet dovolj natančno, da izračunamo elektronske gostote bolj natančno od 0,3 nm (3 angstreme), lahko iz oblik elektronskih gostot in znane sekvence proteina prepoznamo aminokisline in njihov položaj v 3D-zgradbi. (Kočevar in sod., 2007)

Izgradnja 3D-modela ne spada več v sklop te diplomske naloge.

4 **REZULTATI**

4.1 RAČUNALNIŠKA ANALIZA PROTEINA

Določiti smo molekulsko maso proteina (ProtParam), ki znaša 36.847,5 g/mol za 333 aminokislin, kolikor jih protein Msmeg_5458 vsebuje. Poiskali smo (Blast) ortologe proteina Msmeg_5458 pri sorodnih vrstah, poravnava je bila izvedena z orodjem ClustalW. Vsa so dostopna preko strežnika Expasy (http://expasy.org/). S prozorno je označena cAMP-vezavna domena (ak. 38-124), s sivo pa acetiltransferazna domena (ak. 207-290). Z rumeno sta označeni mutaciji R95K in E234A (Nambi in sod., 2010):

Μ.	bovis	MDGIAELTGARVEDLAGMDVFQGCPAEGLV	30
М.	tuberculosis	MDGIAELTGARVEDLAGMDVFQGCPAEGLV	30
М.	marinum	MDIFAGCAAQDLM	13
М.	paratuberculosis	MAGLTGARADELATMDIFAGCPAEDLA	27
М.	avium	MAGLTGARADELATMDIFAGCPAEDLA	27
М.	leprae	MAGSWQCGHCESCASPLGPRDIAVVELIADRAEEFAAMDIFRGLPAEDLM	50
М.	vanbaalenii	MSGLTAVRADDLAALTVFDGISVEALV	27
М.	gilvum	MTAVRADDLAGLAVFDGIAIEALV	24
М.	smegmatis	MAELTEVRAADLAALEFFTGCRPSALE	27
		: .* * . *	
м.	bovis	SLAASVQPLRAAAGQVLLRQGEPAVSFLLISSGSAEVSHVGDDGVAIIAR	80
м.	tuberculosis	SLAASVQPLRAAAGQVLLRQGEPAVSFLLISSGSAEVSHVGDDGVAIIAR	80
м.	marinum	PLAARLAPLRAAAGQILMRQGEQAVSFLLISSGSAEVIHVGDDGVVIVEQ	63
м.	paratuberculosis	PLARRLRPLRAPAGQVLMRQGEQAVEFLLISSGSAEVKHVGDDGVVITEH	77
м.	avium	PLARRLRPLRAPAGQVLMRQGEQAVEFLLISSGSAEVKHVGDDGVVITEH	77
м.	leprae	SVAVSVEPVIAAAGEVLMQQGEQAVSFLLISSGNVEVRRVDDDGAVIVGQ	100
м.	vanbaalenii	PLAAQLRPLTAAAGQVLMQQGELAVSFLLIGSGRAEVVHGGDDGHDTVAE	77
м.	gilvum	PLAAQLRPLTAVAGQVLMQQGELAVSFLLIGSGRAEVTHTGEDGHDTVAV	74
М.	smegmatis	PLATQLRPLEAEPGQVLIRQGDPALTFMLIESGRVQVSHAVADGPPIVLD	77
		.:* : *: * .*::*::*: *: *:** ** .:* : **	
м.	bovis	ALPGMIVGEIALLRDSPRSATVTTIEPLTGWTGGRGAFATMVHIPGVGER	130
м.	tuberculosis	ALPGMIVGEIALLRDSPRSATVTTIEPLTGWTGGRGAFATMVHIPGVGER	130
м.	marinum	ALPGMIVGEIALLRNVPRTATVTTVEPLTGWIGGTDAFDLMVHIPGIMDR	113
м.	paratuberculosis	TSPGMIVGEIALLRDIPRTATVTTAQPLTGWTGDTEAFASMVHIPGVMPR	127
м.	avium	TSPGMIVGEIALLRDIPRTATVTTAQPLTGWTGDTEAFASMVHIPGVMPR	127
м.	leprae	ASHGMIIGEIALLRDGRRTATVITTEPLTGWVGDIDAFAQMVQIPSITRR	150
М.	vanbaalenii	LTAGLIVGEIALLRDAPRTATVVATEPLTGWVGGREAFATMLDVPGMMDR	127
м.	gilvum	LEPGLIVGEIALLRDAARTATVVATEPLTGWVGGREAFATMLDVPGMMDK	124
М.	smegmatis	IEPGLIIGEIALLRDAP <mark>R</mark> TATVVAAEPVIGWVGDRDAFDTILHLPGMFDR	127
		::*****: *:*** : :*: ** *. ** ::.:*.:	

Μ.	bovis	$\tt LLRTARQRLAAFVSPIPVRLADGTQLMLRPVLPGDRERTVHGHIQFSGET$	180
Μ.	tuberculosis	LLRTARQRLAAFVSPIPVRLADGTQLMLRPVLPGDRERTVHGHIQFSGET	180
Μ.	marinum	LVRTVRQRLAAFITPIPVPLRDGTQLMLRPVLPGDSERTVHGHVHFSSET	163
Μ.	paratuberculosis	LLRTVRQRLAAFITPIPIQVRDGTHLLLRPVLPGDSERTVHGHIHFSSDT	177
Μ.	avium	LLRTVRQRLAAFITPIPIQVRDGTHLLLRPVLPGDSERTVHGHIHFSSDT	177
Μ.	leprae	LLLTVRQRLAAFITPIPVQLRDGTHLMLRPVLPGDTERSLRGHVRFSRET	200
Μ.	vanbaalenii	LVRTARQRVAAFVTPVPVEMRDGTVLYLRPVLPGDVERTVGGPVEFSSET	177
Μ.	gilvum	LVRTARQRLAAYITPIPVQVRDGTVLYLRPVLPGDIERTTSGQVEFSSET	174
Μ.	smegmatis	LVRIARQRLAAFITPIPVQVRTGEWFYLRPVLPGDVERTLNGPVEFSSET	177
		*: .***:**::*:*: * : ******************	
м.	bovis	LYRRFMSARVPSPALMHYLSEVDYVDHFVWVVTDGSDPVADARFVRDE	228
М.	tuberculosis	LYRRFMSARVPSPALMHYLSEVDYVDHFVWVVTDGSDPVADARFVRDE	228
Μ.	marinum	IYRRFMSARVPDLAMMHYLSEVDYVDHFVWVMVDGSDPVADARFIRDS	211
Μ.	paratuberculosis	LYRRFMSPRLPTPALMHYLSEVDYVDHFVWVVTDGADPVADARFVRDE	225
Μ.	avium	LYRRFMSPRLPTPALMHYLSEVDYVDHFVWVVTDGADPVADARFVRDE	225
Μ.	leprae	LYLRFMSARAPSDELMHYLSEVDYVDHFVWVVTDGGDPVADARFVRDE	248
Μ.	vanbaalenii	LYRRFQSVRSPSKSLLAYLFEVDYLDHFVFVLTEGPDGPVVADVRFVREE	227
Μ.	gilvum	LYRRFQSVRSPTRSLMAYLFEVDYLDHFVFVLTEGVDGPVVADVRFVRDE	224
Μ.	smegmatis	LYRRFQSVRKPTRALLEYLFEVDYADHFVWVMTEGALGPVIADARFVREG	227
		:* ** * * * :: ** **** *** <mark>*:*:.:* . :**.**</mark> :*:	
М.	bovis	TDPTVAEIAFTVADAYQGRGIGSFLIGALSVAARVDGVERFAARMLSDNV	278
М.	tuberculosis	TDPTVAEIAFTVADAYQGRGIGSFLIGALSVAARVDGVERFAARMLSDNV	278
Μ.	marinum	VDPTVAEIAFTVADAYQGKGIGSFLIGALAVAARVDGVARFSARMLADNL	261
Μ.	paratuberculosis	NDPTVAEIAFTVADAYQGRGIGTFLISALSIAAEVDGIERFSARMLSDNV	275
Μ.	avium	NDPTVAEIAFTVADAYQGRGIGTFLISALSIAAEVDGIERFSARMLSDNV	275
Μ.	leprae	SDPTLAEIAFTVADAYQGRGVGNFLISALSIAAHVNGVNRFSARMLTDNG	298
Μ.	vanbaalenii	HRSEQAEIAFIVADAYQGRGIGTFLMGAISVAAGYDGVQRFTARVLSENY	277
Μ.	gilvum	KNPAEAEIAFIVGDAYQHRGVGTLLMAAISVAAASDGVQRFTARVLTDNY	274
M.	smegmatis	HNATMA E VAFTVGDDYQGRGIGSFLMGALIVSANYVGVQRFNARVLTDNM	277
м.	bovis	PMRTIMDRYGAVWQREDVGVITTMIDVPGPGELSLGREMVDQINRVARQV	328
М.	tuberculosis	PMRTIMDRYGAVWQREDVGVITTMIDVPGPGELSLGREMVDQINRVARQV	328
Μ.	marinum	PMRTIMDRHGAVWQREDVGVITTVIDVPGPRDLGFGREMAGQIRRVARQV	311
Μ.	paratuberculosis	PMRAIMDRYGAVWQREDIGVITTVIDVPHRRDLPFRKHEADEIRRVARQV	325
Μ.	avium	PMRAIMDRYGAVWQREDIGVITTVIDVPHRRDLPFRKHEADEIRRVARQV	325
Μ.	leprae	PMRAIMDHHGAVWRRYDVGVITTVIDVPRQRDLIIGRAMADQIAGVVRQV	348
Μ.	vanbaalenii	AMRSILDRFGAVWERDDLGVVTTEIPVPEVGELGLSHELVTQIRGLARQV	327
Μ.	gilvum	AMRAILDRFGARW RDDLGVVVTEIAVPPVKDLPLSRELADQIRAVTRQA	324
М.	smegmatis	AMRKIMDRLGAVWVREDLGVVMTEVDVPPVDTVPFEPELIDQIRDATRKV	327
		<u>** *:*:</u> * *:**: * : ** : : : : : : : :	
м.	bovis	IEAVG-	333

м.	tuberculosis	IEAVG-	333
м.	marinum	IEAVS-	316
м.	paratuberculosis	IETVG-	330

м.	avium	IETVG-	330
М.	leprae	IGAVG-	353
М.	vanbaalenii	IRAAG-	323
М.	gilvum	VRAVG-	329
М.	smegmatis	IRAVSQ	333



Slika 11: Filogenetsko drevo proteina Msmeg_5458 na podlagi podanih sekvenc z orodjem ClustalW

Sekundarno strukturo proteina smo skušali predvideti s pomočjo strežnika PredictProtein, ki uporablja več različnih orodij (Rost in sod., 2004). Dostopen je na spletu (http://www.predictprotein.org/). Rezultat nakazuje, da je protein Msmeg_5458 mešanica α -vijačnic (več kot 35 %) in β -plošč (30 %). Predvidena razdelitev je sledeča (rdeče: α -vijačnica, rumeno: β -plošča):



Slika 12: Predvidena sekundarna struktura proteina Msmeg_5458 z označenima točkovnima mutacijama

Za napoved terciarne strukture smo uporabili orodje Swiss model workspace, ki je dostopno preko strežnika Expasy. Rezultat navaja dve različni strukturi (sliki 13 in 14). Prva naj bi bila najbolj podobna cAMP-vezavni domeni (27 % aminokislinske identičnosti), druga pa acetiltransferazni (22 % aminokislinske identičnosti).



Slika 13: 3-D modela cAMP-domene proteina Msmeg_5458 Struktura (vključene aminokisline od 8. do 128. Mesta) je izračunana na podlagi podenote kinaze A (oznaka 2qcsB v PDB), s katero si protein deli 27,42 % identičnosti aminokislinske sekvence.



Slika 14: 3-D modela acetiltransferazne domene proteina Msmeg_5458 Struktura (vključene aminokisline od 153. do 298. mesta) je izračunana na podlagi acetiltransferaze iz *Sulfolobus solfataricus* (oznaka 3f8kA v PDB), s katero si protein deli 22,6 % identičnosti aminokislinske sekvence.

4.2 RAST CELIC, IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTEINA

Pred in po produkcijski fazi, to je pred in po dodatku IPTG-ja, smo iz gojišč odvzeli po 1 ml vzorcev celic. Vzorci vsebujejo sev bakterije *E. coli BL21(DE3)* v primeru produkcije Msmeg_5458 R95K ali *E. coli SP850* za Msmeg_5458 WT cyc⁻. Produkcijski fazi sta se vršili pri različni temperaturi (16 oziroma 20 °C). Vzorce celic smo analizirali z NaDS PAGE elektroforezo.



Slika 15: NaDS-PAGE elektroforeza celic 1-vzorec pred in 2- po indukciji z IPTG za produkcijo mutante R95K pri 16 °C ter 3-vzorec pred in 4- po indukciji z IPTG za produkcijo WT cyc⁻ pri 20 °C; S- standard molekulskih mas; z elipsama je označen protein Msmeg_5458.

Sledila je izolacija in čiščenje proteina Msmeg_5458 WT cyc⁻ z afinitetno kromatografijo.



Slika 16: Kromatogrami pri prvem čiščenju z Ni-NTA kromatografijo A-spiranje s pufrom za nanos (zbiramo frakcijo z oznako *nv* od 10-140 ml), B- spiranje s pufrom za spiranje (oznaka *pE* od 10-50 ml), C- spiranje s pufrom za elucijo (oznaka *E* od 8-30 ml).

Vzorce zbranih frakcij iz afinitetne kromatografije smo analizirali z NaDS-PAGE elektroforezo.



Slika 17: NaDS-PAGE elektroforeza za zbrane frakcije po Ni-NTA kromatografiji N-vzorec pred nanosom na kolono, nv- vzorec frakcije sprane s pufrom za nanos (slika 16A), pEvzorec frakcije sprane s pufrom za spiranje (slika 16B), E- vzorec frakcije sprane s pufrom za elucijo (slika 16C), S- standard molekulskih mas; z elipsama je označen protein Msmeg_5458.

Po prvem čiščenju z nikljevo kolono smo opravili dializo, kjer smo z uporabo TEV proteaze odcepili His-repke našemu proteinu. Kot je bilo že omenjeno, smo pred dializo pred-eluat (pE) in eluat (E) združili.



Slika 18: NaDS-PAGE elektroforeza vzorcev pred in po dializi TEV- proteaza TEV (8 μl), pred- vzorec pred dializo, po- vzorec po dializi, S- standard molekulskih mas.

Na sliki je opazno, da je del proteinov Msmeg_5458 razpadlih, saj na gelu (slika 18) lahko razločimo N- in C-terminalni del proteina. Razlaga je podana v diskusiji.

Sledilo je drugo čiščenje na nikljevi koloni, kjer smo želeli odstraniti cepljene His-repke in TEV proteazo.





Po opravljenem drugem čiščenju z afinitetno kromatografijo smo koncentrirani združeni prvi frakciji (nevezana frakcija in pred-eluat), kjer se naš protein mora nahajati, nanesli na gelsko kolono.



Slika 20: Gelska filtracija in slika elektroforeze vzorcev A: gelska filtracija na koloni Superdex 200 10/300 GL, B: NaDS-PAGE elektroforeza po opravljeni gelski kromatografiji, zbrane so frakcije 35, 36 in 37 so označene z okvirjem.

S pomočjo kromatograma in slike elektroforeze smo se odločili, da združimo frakcije, ki so hkrati izkazovale čistost in najvišjo vsebnost proteina (frakcije 35, 36 in 37). Zbrane frakcije smo koncentrirali in shranili po opisanem postopku v točki 3.2.12. Naredili smo tudi koncentracijski gel, kjer kvalitativno ocenimo količino proteina. Prav tako kot na sliki 18, je tudi na sliki 20B opaziti več lis, manjši lisi sta razpadna produkta proteina, razlaga je podana v diskusiji.



Slika 21: NaDS-PAGE elektroforeza koncentracijskega gela 1-44 μg proteina, 2-21 μg, 3-15 μg, 4-7,5 μg, 5-3 μg, 6-1,5 μg, S- standard molekulskih mas.

4.3 TEST STABILNOSTI PROTEINA

S testom smo preverili stabilnost proteina Msmeg_5458 WT cyc⁻ skozi čas. Izvedli smo tako NaDS-PAGE kot nativno elektroforezo.



Slika 22: Test stabilnosti proteina Msmeg_5458 cyc⁻ pri 20 °C Test je bil opravljen z NaDS-PAGE (levo) in z nativno (desno) elektroforezo; 1- dan izolacije proteina, 2- po treh dneh, 3- po sedmih dneh, 4- po štirinajstih dneh, 5- po sedemnajstih dneh, 6po enaindvajsetih dneh, 7- po osemintridesetih dneh, 8- po dvainštiridesetih dneh, S- standard molekulskih mas.

4.4 CIRKULARNI DIKROIZEM

S cirkularnim dikroizmom smo analizirali vsebnost elementov sekundarne strukture ter stabilnost te strukture pri izoliranih oblikah Msmeg_5458.



Slika 23: Spekter cirkularnega dikroizma za proteine družine Msmeg_5458 pri 20 °C

4.5 Analiza vezanih ligandov na različnih oblikah Msmeg_5458 proteinov

Sledijo rezultati analize s HPLC in MS, s katerimi smo preverili, kateri ligandi se vežejo na različne oblike proteinov družine Msmeg_5458. Kontrole za HPLC analizo so prikazane v prilogi B. Eksperiment je opisan v poglavju 3.3.6.







Slika 25: Analiza vezanih ligandov na proteinu Msmeg_5458 WT cyc⁻
HPLC kromatogram (A) in masni spektrogram (B) imata (1- koencim A in 3- acetil koencim A, * odcepljen fosfat na acetil koencimu A) označene prepoznane ligande.



Slika 26: Analiza vezanih ligandov na proteinu Msmeg_5458 R95K
HPLC kromatogram (A) in masni spektrogram (B) imata (1- koencim A in 3- acetil koencim A, * odcepljen fosfat na acetil koencimu A) označene prepoznane ligande.



Slika 27: Analiza vezanih ligandov na proteinu Msmeg_5458 E234A HPLC kromatogram (A) in masni spektrogram (B) imata (1- koencim A, 2- cAMP in 3- acetil koencim A) označene prepoznane ligande.

	koencim A	acetil koencim A	cAMP
WT endo	+	+	+
WT cyc ⁻	+	+	
R95K	+	+	
E234A	(+)	(+)	+

Preglednica 9: Prisotnost ligandov v posameznih tipih proteina Msmeg_5458

+ znak predstavlja prisotnost komponente v reakciji

(+) znak predstavlja zmanjšano prisotnost komponente v reakciji

Opazimo, da tip WT cyc⁻ dejansko nima vezanega cAMP-ja, mutanta R95K ga pa ni sposobna vezati. Pri mutanti E234A smo na kromatogramu opazili vrhova, ki bi ustrezala acetil CoA in CoA, vendar njuna prisotnost na MS ni potrjena. Sklepamo, da ima slednja mutanta okrnjeno vezavo omenjenih dveh ligandov.

4.6 ACETILTRANSFERAZNI TEST

Spodnja preglednica predstavlja shemo štirih različnih izvedenih reakcij.

	acetil koencim A	cAMP	USP	Msmeg_5458
kontrola 1	+			
kontrola 2	+	+	+	
meritev 1	+		+	+
meritev 2	+	+	+	+

Preglednica 10: Shema reakcij v acetiltransferaznem testu

+ znak predstavlja prisotnost komponente v reakciji

Slika 28 spodaj posredno (sprememba absorbance A_{340} na sekundo) odraža spremembo v hitrosti reakcije pri različnih pogojih. Te spremembe so za različne proteine družine Msmeg_5458 podane v stolpcih, ki torej predstavljajo povprečne koeficinte dobljenih premic (torej gre za povprečje treh paralelnih ponovitev istega poskusa).



Slika 28: Acetiltransferazni test proteinov družine Msmeg_5458

Že na prvi pogled je očitno, da imata mutanti spremenjene lastnosti; mutanta R95K ne izkazuje odvisnosti od cAMP-ja, mutanta E234A pa ima dokaj zmanjšano acetiltransferazno aktivnost. Podrobneje je razloženo v diskusiji.

4.7 KRISTALIZIRANJE PROTEINOV

Namen je bil kristalizirati protein Msmeg_5458 WT cyc⁻ in mutanto R95K, kar nam je tudi po mnogih poskusih uspelo. Skupaj je bilo narejeno čez 40 kristalizacijskih plošč, kar predstavlja skoraj 1.000 različnih kristalizacijskih pogojev.

Najprej smo se lotili kristalizacije mutante. Začeli smo s komercialno dostopnimi kristalizacijskimi raztopinami (Hampton Research) : Index Screen, Natrix Screen, Peg Ion screen I, Peg Ion screen II, Salt RX screen in Memb Fac. Ker se noben ni izkazal za uspešnega, smo se odločili, da bomo prevzeli pogoje kristalizacije od že uspešno kristaliziranega divjega tipa Msmeg_5458 WT endo. Pogoji kristalizacije za WT endo so bili: Bis Tris pH 6,5; 0,2 M NaCl; 30 mM CaCl₂; 21 % PEG in 2 % DAPD. Odločitev se je

izkazala za pravilno, vendar je za uspešno kristalizacijo mutante bilo potrebno sejanje kristalov. Kot kristalizacijska jedrca smo uporabili kristale divjega tipa WT endo. S spreminjanjem koncentracije polietilen glikola, soli in pH pufra ter ponavljajočim sejanjem z dobljenimi kristali mutante nam je uspelo dobiti primerne kristale za merjenje sipanja X-žarkov.

Kristalizacijska	Dufor Coli	$\mathbf{DEC} \left(0 / \mathbf{m} / \mathbf{V} \right)$	aditiv DAPD	Seeding
plošča			(% m/V)	(plošča/redčitev)
	Index 1 in 2	-	-	
	Natrix			
	PEG ion 1 in 2			
	Salt Rx 1 in 2			
(skupaj 16 komercialnih)	MembFac			
1	BT* 5,5; 0,2 M NaCl; 30mM CaCl ₂	15, 17, 19, 21	2	SeMet 16.6.10 -2 do -7
2	BT 6,5; 0,2 M NaCl, 30mM CaCl ₂	15, 17, 19, 21	2	SeMet 16.6.10 -2 do -7
3	BT 6,5; 0.2 M NaCl, 30mM CaCl ₂	19, 21, 23, 25	2	R95K (plošča 2) -4 do -9
4	BT 6,5; 0.2 M NaCl; 30mM MgCl ₂	19, 21, 23, 25	2	R95K (plošča 2) -4 do -9
5	BT 6,5; 0.2 M NaCl, 30mM MgCl ₂	19, 21, 23, 25	2	R95K (plošča 2) -3 do -8
6	BT 6,5; 0.2 M NaCl; 30mM CaCl ₂	19, 21, 23, 25	2	R95K (plošča 5) -3 do -8
7	BT 6,5; 0.2 M NaCl; 30mM MgCl ₂	19, 21, 23, 25	2	R95K (plošča 5) -4 do -9
8	BT 6,5; 0.2 M NaCl; 30mM MnCl ₂	19, 21, 23, 25	2	R95K (plošča 5) -4 do -9
9	BT 6,5; 0.2M NaCl; 30mM MgCl ₂	18, 20, 21, 23	2	R95K (plošča 4) od -2 do -5 s ponavljanji

Preglednica 11: Sestave kristalizacijskih plošč pri kristaliziranju proteina Msmeg_5458 R95K

*BT se tukaj nanaša na pufer Bis Tris z dopisanim pH-jem.

Kristalizacija Msmeg_5458 WT cyc⁻ se je izkazala še za hitrejšo, kajti ugotovili smo, da ne zahteva uporabe sejanja kristalov. Prav tako kot pri mutanti, smo začeli s pogoji uporabljenimi pri kristaliziranju WT endo. Z optimizacijo zgoraj omenjenih pogojev smo dobili nekaj primernih kristalov.

Kristalizacijska plošča	Pufer,Soli	PEG (% m/V)	Aditiv DAPD (% m/V)
1	BT* 6,5; 0.2 M NaCl, 30mM	15, 17, 19, 21,	2 (za unatiai)
1	MgCl ₂	23, 25	2 (2g. visuel)
2	BT 5,5; 0.2 M NaCl, 30mM	15, 17, 19, 21,	2 (za vrstici)
2	MgCl ₂	23, 25	2 (2g. visuei)
3	BT 5,5; 0.2 M NaCl, 30mM	15, 17, 19, 21,	2 (za vretici)
5	MgCl ₂	23, 25	2 (2g. visuei)
4	BT 6,5; 0.2 M NaCl; 30mM	15, 17, 19, 21,	2 (zg. vrstici)
+	MgCl ₂	23, 25	2 (2g. visuei)
5	BT 6,5; 0.2 M NaCl	12, 14, 15, 16,	2
5	10, 30, 60, 100mM MgCl ₂	18, 20	2
6	BT 5,5; 0.2 M NaCl,	19, 20, 21, 22,	2
0	10, 30, 60, 100 mM MgCl ₂	23, 24	2
7	BT 6,5; 0.2 M NaCl,	19, 20, 21, 22,	2
,	60, 100, 150, 200mM MgCl ₂ 23, 24	23, 24	2
8	BT 6,5; 0.2 M NaCl,	19, 20, 21, 22,	5
0	60, 100, 150, 200mM MgCl ₂	23, 24	5
9	BT 6,5; 0.2 M NaCl,	20, 21, 22, 23,	2
,	20, 40, 60, 80mM MgCl ₂	24, 25	2
10	BT 6,5; 0.2 M NaCl,	20, 21, 22, 23,	5
10	20, 40, 60, 80mM MgCl ₂	24, 25	5

Preglednica 12: Sestave kristalizacijskih plošč pri kristaliziranju proteina Msmeg_5458 WT cyc-

*BT se tukaj nanaša na pufer Bis Tris z dopisanim pH-jem.

Pri mutanti R95K nam je po omenjenem postopku uspelo pripraviti in zamrzniti skupaj 16 kristalov (iz plošč 4, 5, 7 in 9), vsi so zrastli pri istih pogojih: Bis Tris pH 6,5; 0.2 M NaCl; 30mM MgCl₂; PEG 20±2 % (m/V), aditiv DAPD 2 % (m/V). Vsi kristali so zrastli v roku dveh tednov, pod stereo mikroskopom smo prve zametke opazili že tretji dan.

Pri proteinu Msmeg_5458 WT cyc⁻ nam je uspelo zamrzniti 6 kristalov (iz plošč 1, 3, 6, 7 in 9). Zrastli so pri nekoliko različnih pogojih: Bis Tris pH 5,5 ali 6,5; 0,2 M NaCl; 10-200

mM MgCl₂; PEG 21±2 % (m/V), aditiv DAPD 2 % (m/V). Najbolj opazna razlika v primerjavi s kristaliziranjem mutante je predvsem koncentracija magnezijevega klorida, ki v primeru WT cyc⁻ bolj niha. Kristali so se začeli pojavljati po okoli štirih dneh, rasli so do okoli treh tednov.

Nekaj kristalov proteina WT cyc⁻ smo odvzeli iz plošč in jih analizirali z NaDS-PAGE elektroforezo.



Slika 29: Elektroforeza kristalov proteina Msmeg_5458 cyc⁻ in slika PVDF membrane NaDS-PAGE elektroforeza z daljšo denaturacijo odvzetih kristalov cyc⁻ (A) in slika PVDF membrane po barvanju (B). Odvzeti so bili kristali različnih kristalizacijskih plošč: plošči 5 in 7 (A) ter plošči 8 in 9 (B). Kristali namenjeni za določanje N-terminalne sekvence proteinskih lis (oznaki X in Y) so izkazovali lepše oblike.

Proteinski lisi X in Y (slika 29B) smo poslali na določevanje N-terminalne sekvence. Začetni aminokislinski sekvenci sta za obe lisi enaki: G A M D P. Pripadata sekvenci, ki se nahaja neposredno pred sekvenco za protein Msmeg_5458 (priloga A).




Slika 30: Kristali proteina Msmeg_5458 cyc⁻ Primer neprimernih igličastih kristalov v kapljici (levo) in geometrijsko pravilno izoblikovanega (desno). Premer kapljice znaša okoli 2 mm.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Protein Msmeg_5458 iz *M. smegmatis* je zelo zanimiv protein. Nambi in sod. (2010) so pokazali, da gre za prvo znano acetiltransferazo, katere encimska aktivnost je alosterično regulirana preko vezave sekundarne sporočevalne molekule cAMP na cAMP vezalno domeno. Njihove raziskave so pokazale, da je *in vivo* substrat tega encima USP protein Msmeg_4207. Ker pa ortologa tega proteina v *M. tuberculosis* ni oziroma ni bil najden, so Xu in sod. (2011) sklepali, da mora protein imeti še kakšen drugi substrat. Logično se je namreč zdelo, da mora obstajati substrat za protein Rv0998 iz *M. tuberculosis*, ki je ortolog proteina Msmeg_5458. Z nekoliko drugačnim pristopom jim je uspelo izolirati »alternativni« substrat proteina Msmeg_5458. Odkril so, da Msmeg_5458 lahko acetilira acetil-CoA sintazo (Rv3667) iz *M. tuberculosis*. To je encim, ki je odgovoren za tvorbo acetil-CoA, prenašalca acetilne skupine in pomembnega intermediata primarnega metabolizma.

Nambi in sod. (2010) so ugotovili, da se cAMP vezalna domena pri Msmeg_5458 nahaja na N-terminalnem koncu (označena od 8. do 124. Aminokisline, stran 38), sledi ji acetiltransferazna domena (označena od 207. do 291. aminokisline, stran 39). S primerjavo proteinskih zaporedij proteina Msmeg_5458 z ortologi najbolj sorodnih vrst dobimo osnovno filogenetsko drevo. Zanimivo je, da že na podlagi primerjave aminokislinske sekvence enega proteina dobimo dokaj točno predstavo o razdelitvi mikobakterij (slika 11). Rezultat namreč pokaže, da je *Mycobacterium smegmatis* najbolj sorodna vrstama *M. gilvum* in *M. vanbaalenii*. Naštete vrste so hitrorastoče in nepatogene mikobakterije. Na drugi strani so bolj oddaljene vrste (*M. marinum, M. bovis, M. tuberculosis, M. avium, M. paratuberculosis* in *M. leprae*), ki so vse počasi rastoče in potencialno patogene.

Sekundarno strukturo proteina smo skušali določiti teoretično z uporabo orodij dostopnih preko strežnika PredictProtein. Rezultati nakazujejo (slika 12), da je protein Msmeg_5458 sestavljen tako iz α -vijačnic, β -plošč in naključnih zvitij. Prevladovale naj bi vijačnice (več kot 35 %), kar se opazi tudi na CD spektru (slika 23). CD spekter smo določili na vseh

tipih proteina Msmeg_5458 (na divjem tipu WT endo, na WT cyc⁻ in obeh mutantah R95K ter E234A). Spektri so praktično enaki. To je bilo tudi pričakovano, saj se sekundarna struktura proteina bistveno ne spremeni, tudi če vključimo točkovne mutacije. Kot prvo je razvidno, da so vsi proteini obdržali enako sekundarno strukturo tekom izolacije. Prav tako je razvidno, da imajo proteini spekter, ki je tipičen za proteine z visoko vsebnostjo α -vijačnic. To se sklepa na podlagi prisotnosti lokalnega maksimuma krivulje pri valovni dolžini 190 nm in dveh lokalnih minimumov pri valovnih dolžinah ~210 nm in ~220 nm.

Določevanje terciarne strukture proteina Msmeg_5458 cyc⁻ je že izven ciljev te diplomske naloge, vendar smo z določenimi orodji (Swiss model workspace) skušali predvideti 3Dmodel. Rezultat je podan v obliki ločenih modelov obeh domen, ki sestavljata protein (cAMP vezalna ter AC domena), vsak skuša prikazati najbolj optimalno konfiguracijo makromolekule za svojo domeno. Tako prvi model (Slika 13) predvidi strukturo cAMP domene proteina, drugi model pa acetiltransferazno domeno (Slika 14). Opazimo lahko, da imata oba modela skupaj pretežno α -vijačnice in nekaj β -plošč, kar potrjuje rezultate predikcije sekundarne strukture in CD spektrov proteinov.

Rast celic, ki je predkorak izolacije proteinov, smo izvajali na dveh različnih sevih E. coli. Mutanto R95K smo gojili v E. coli BL21(DE3), Msmeg_5458 WT cyc⁻ pa v E. coli SP850. Prvi sev se že zelo dolgo uporablja kot ekspresijski sistem heterolognih proteinov, drugega pa odlikuje odsotnost gena za adenilat ciklazo, kar ima za posledico odsotnost cAMP-ja v bakterijski celici. Seva smo gojili pri različnima temperaturama, obe sta nizki. Razlika v količini vseh izraženih proteinov je lahko posledica različnih sevov bakterije (slika 15). Protein Msmeg_5458 cyc⁻ je sicer po zaporedju enak divjemu tipu, vendar ker v strukturi nima prisotnega liganda cAMP, sklepamo, da njegova odsotnost lahko vpliva na tridimenzionalno obliko proteina. Prav tako je razvidno, da se količina heterolognih proteinov (mutante R95K in Msmeg_5458 WT cyc⁻) močno poviša po indukciji z IPTGjem, kar je logično. Nadalje smo se ukvarjali samo z izolacijo proteina WT cyc⁻, ki se je začela s čiščenjem na nikljevi koloni. Prisotnost proteina Msmeg 5458 po čiščenju smo pričakovali zgolj po spiranju s pufrom za elucijo (oznaka E), vendar je iz Slika 17 razvidno, da se le-ta nahaja tudi v ostalih zbranih frakcijah. Prvi vzorec z oznako N je vzorec po razbitju in centrifugiranju celic, v tem se nahajajo vsi celični proteini. Vzorec z oznako nv vsebuje vse sprane proteine po spiranju s pufrom za nanos. Teoretično bi se tu morali nahajati vsi proteini, ki se niso sposobni vezati z nikljevo kolono. Presenečeni smo bili, ko smo zaznali močno liso velikosti okoli 37 kDa, ki bi lahko bila naš protein Msmeg_5458 WT cyc⁻. V praksi se to lahko zgodi, če kolona ni sposobna vezati vseh proteinov oz. je teh preprosto preveč. V pred-elutatu (oznaka pE) lahko prav tako opazimo proteinsko liso velikosti 37 kDa, ki bi lahko bila naš protein. Po spiranju s pufrom za spiranje dobimo eluat (oznaka E), v katerem bi se moral nahajati samo protein Msmeg_5458 WT cyc⁻, ki ima His repek. Močna proteinska lisa velikosti 37 kDa potrjuje to domnevo, prisotni pa sta še dodatni lisi, ki sta se pojavili tudi v pred-eluatu. Vzorec po dializi in hkratnem cepljenju s TEV proteazo se od vzorca pred dializo (slika 18) razlikuje po zamiku močne lise velikosti okoli 37 kDa in srednje proteinske lise ter po pojavu dodatne lise zelo majhne velikosti (pod 10 kDa). Prav tako je moč zaznati prisotnost TEV proteaze v vzorcu po dializi, vendar sta lisi encima zelo bledi, saj je v tem vzorcu ta protein zelo razredčen. Najmanjša lisa (pod 10 kDa) je lahko samo odcepljen His repek. Do zamika prej omenjenih lis pride zaradi zmanjšanja velikosti na račun odcepljenega His repa na N-terminalnem koncu proteina. Zamika pri najmanjši lisi (pred dializo) ni opaziti. To pomeni, da gre za protein/del proteina, ki nima His repka, ki bi se lahko odcepil. Če bi ta lisa (lisa brez zamika) predstavljala svojevrsten protein, je ne bi smeli opaziti, saj bi se tak protein odstranil tekom afinitetne kromatografije in ga v frakciji eluata ne bi bilo. Sklepamo lahko samo, da gre za del večjega proteina. Manjši lisi sta po tej dejstvih lahko samo kosa večjega proteina, to je proteina Msmeg 5458 WT cyc⁻. Srednja lisa je Nterminalni del večjega proteina, saj vsebuje His-repek, ki se tekom dialize odstrani, manjša lisa pa je C-terminalni del, ki se tekom dialize ne spremeni. C-terminalni kos se drži večjega N-terminalnega kosa proteina. To potrjuje slika gelske kromatografije (Slika 20), saj oba kosa opazimo v vseh zbranih frakcijah (35, 36 in 37). Če bi bila kosa fizično ločena, bi prišla iz kolone ob različnih pretočenih volumnih, saj sta dosti manjša. Poleg tega pa vsota mas obeh kosov (Slika 29) ustreza masi proteina Msmeg_5458 WT cyc⁻. Sedaj torej vemo, da protein Msmeg 5458 WT cyc⁻ deloma razpade na dva kosa, ki ju pogoji kromatografije ne uspejo ločiti. Vprašati se še moramo, zakaj protein sploh razpade. Sliki NaDS-PAGE in nativne elektroforeze pri testu stabilnosti (Slika 22) nekoliko pojasnita stvar. Opazimo namreč, da je protein po nativni elektroforezi ohranjen in manjših kosov ni opaziti. Stanje je enako približno dva tedna (do vzorca 4), potem se pa tudi pri nativni elektroforezi pojavljajo dodatne lise, gre za razpadne produkte proteina. Iz teh rezultatov je moč trditi, da protein obdrži tridimenzionalno strukturo, vendar pa očitno pogoji NaDS-PAGE elektroforeze privedejo do razpada na manjša kosa. Ali je kriva povišana temperatura pri pripravi vzorcev ali prisotnost denaturanta (NaDS), ki oslabi vezi med kosoma? Verjetno oboje. Vzrok je pa lahko tudi to, da odsotnost cAMP-ja vpliva na strukturo proteina, ki bi bila ob prisotnosti le-tega drugačna. Spremenjena 3D-oblika proteina (spremenjena alosterična konfiguracija) je morda občutljivejša na kemijskofizikalne spremembe, ki povzročijo razcep nestabilnih peptidnih vezi, ki so sicer (ob vezanem cAMP-ju) močnejše. Več časa poteče, več je razpadnih produktov. Daljše obdobje poveča verjetnost cepitve peptidnih vezi na določenih dostopnih mestih. Ker smo tekom izolacije zelo verjetno odstranili vse peptidaze (na gelih in kromatogramu jih ni moč zaznati), je lahko vzrok razpada tekom časa kemijsko-fizikalne narave (temperatura, pH, reducent β -merkapto-etanol,...). Obstaja pa tudi druga razlaga, zakaj se pojavita manjša kosa na slikah NaDS-PAGE elektroforez. Morda pa dejansko pride do cepitve določene količine proteina tekom razbitja celic kljub dodatku inhibitorja serinskih proteaz. Inhibitor PMSF namreč ne inhibira vseh serinskih proteaz. Razcepljena kosa se ob pogojih kromatografije držita skupaj, tekom priprave in izvedbe NaDS-PAGE elektroforeze pa se fizično ločita.

Naslednji korak je bil odkriti kateri ligandi se vežejo v strukturo proteinov družine Msmeg_5458 (mutanti R95K in E234A ter WT endo in WT cyc⁻) in kako se to pozna na acetiltransferaznem testu. Rezultati HPLC analiz in masne spektrometrije nam nakazujejo, da je WT endo sposoben vezati cAMP, acetil-CoA in CoA (Slika 24). Protein WT cyc⁻ (Slika 25) in mutanta R95K (Slika 26) imata dokaj podoben rezultat. Pri obema opazimo, da se cAMP ni vezal. Mutanta ga ni sposobna vezati zaradi mutacije na ključnem mestu, tip WT cyc⁻ pa ni imel dostopnega cAMP-ja, saj ga celica ni mogla proizvesti. Prav tako se opazi razlika v razmerju med acetil-CoA in CoA. Medtem ko je pri WT cyc⁻ in mutanti R95K približno enako, je pri WT endo pomaknjeno v prid acetil-CoA. Za to je verjetno kriva spremenjena konfiguracija proteina ob vezanem ligandu. Mutanta E234A (Slika 27) obdrži zmožnost vezave cAMP-ja, okrnjena pa je vezava acetil-/koencima A. Ti rezultati se navezujejo na acetiltransferazni test (Slika 28). Meritve kontrol so praktično enake. V kontroli 2 je prisoten substrat USP in cAMP. Do tvorbe NADH-ja pride tudi tu, očitno so bili prisotni reakcijski pogoji, ki so omogočali kemično acetilacijo USP proteina tudi brez

encima Msmeg 5458. Da do povišanja acetilacije USP-ja ob dodatku cAMP-ja pride pri WT endo in WT cyc⁻ je logično, enaki odstotki zgolj potrdijo dejstvo (39 in 40 %). Razlagamo si tako, da pri tipu WT endo nimajo vsi proteini vezanega cAMP-ja, dodatek le-tega v reakcijsko mešanico pa torej še dodatno pospeši reakcijo. Povišanje (za 7 %) je dosti zmanjšano pri mutanti R95K, saj ta mutanta ni sposobna vezati cAMP-ja. Zanimivo pri mutanti E234A pride do močnega povišanja acetilacije ob dodatku cAMP-ja (62 %), vendar je acetilacija v primerjavi z WT endo dosti manjša (približno tretjina vrednosti). Aminokislina E234 naj bi delovala kot baza, ki pomaga pri deprotonaciji lizinskega ostanka K104 v proteinu USP. Deprotonacija omogoči nukleofilni napad acetil-CoA, tvori se intermediat, ki razpade v produkte (Tanner in sod., 1990), ti so v našem primeru acetiliran USP in CoA. Mutanta E234A zgubi sposobnost deprotonacije in ima zato dosti zmanjšano sposobnost acetilacije. Stopnja sposobnosti acetilacije WT cyc⁻ glede na WT endo v prisotnosti cAMP-ja je nekoliko manjša (72 %), saj imajo nekateri proteini WT endo ob začetku reakcije že vezan cAMP in so sposobni vršiti reakcijo takoj. Najbolj preseneča in bega nas rezultat mutante R95K, ki nakazuje nasploh veliko stopnjo acetilacije (v primerjavi z WT endo znaša kar 92 %). Očitno sposobnost acetilacije ostane, vendar nam ni jasno, zakaj je ta tako visoka. Dobljeni odstotki služijo zgolj interpretaciji tega testa.

Eden zadnjih ciljev je bil uspešno kristalizirati protein Msmeg_5458 WT cyc⁻ in mutanto R95K. Zanimivo je, da smo si morali pri kristalizaciji mutante pomagati z uporabo sejanj kristalov, kar pri kristaliziranju WT cyc⁻ ni bilo potrebno. Prav tako se nekoliko razlikujejo pogoji, pri katerih so nastali kristali WT cyc⁻. Domnevamo lahko, da je že majhna sprememba v sekvenci proteina zadostna, da se spremeni oblika proteina in s tem kristalizacijski pogoji. Upoštevati moramo namreč dejstvo, da WT cyc⁻ nima vezanega cAMP-ja, ki verjetno vpliva na obliko proteina. Seveda pa ne moremo zanemariti dejstva, da gre za dve različni izolaciji iz različnih sevov *E. coli*, kar ima lahko določen vpliv na kristalizacijo.

Odločili smo se, da za protein WT cyc⁻ z NaDS-PAGE elektroforezo preverimo pristnost proteinskih kristalov in njihovo stabilnost v kristalni strukturi. Prav tako smo odvzeli nekaj kristalov, katerih dobljene proteinske lise smo izrezali iz PVDF membrane (Slika 29) in jih poslali na določanje N-terminalne sekvence. Dobljeni začetni aminokislinski sekvenci sta

bili iz obeh združenih lis (A in B) enaki: G A M D P. Sekvenca pripada ostanku cepitvene sekvence, ki ima skupaj osem aminokislin pred dejansko prvo N-terminalno aminokislino proteina WT cyc⁻ (priloga A). S tem smo dokazali, da je to res protein Msmeg_5458 WT cyc⁻. Prav tako smo S prostodostopnim programom GelAnalyzer (http://www.gelanalyzer.com) ocenili molekulske mase obarvanih proteinskih lis (Slika 29 levo). Izkaže se, da bi molekulska masa spodnjih dveh lis dobro ustrezala masi srednje, to je našega proteina. Najvišja lisa (~75 kDa) je najverjetneje dimer proteina Msmeg_5458 (dva proteina Msmeg_5458 vezana skupaj z nekovalentnimi vezmi). Druga lisa z vrha (~58 kDa) po masi ustreza masi dimera, ki je skrajšan za en C-terminalni del (za ~17 kDa). Dodatna podpora trditvi je znana N-terminalna začetna sekvenca. Sklepamo lahko torej, da gre za isti protein, vendar z različno povezanami/razcepljenimi podenotami.

Na sinhrotronu v Trstu smo z X-žarki obsevali kristale mutante R95K. Difrakcijske slike (slika 10) bodo služile kot osnova za določitev tridimenzionalne strukture proteina Msmeg_5458.

5.2 SKLEPI

- Izvedli smo rast sevov *E. coli* BL21(DE3) in SP850, s katerima smo heterologno ekspresirali mutanto Msmeg_5458 R95K oz. Msmeg_5458 WT cyc⁻.
- Uspešno smo izolirali in očistili protein Msmeg_5458 WT cyc⁻ do koncentracije 30 mg/ml, ki je primerna za kristaliziranje proteina.
- Protein WT cyc⁻ smo analizirali z orodji dostopnimi na spletu. Določili smo mu molekulsko maso, predvideli smo sekundarno in terciarno strukturo. Sekvenco proteina smo primerjali z ortologi in ga umestili v taksonomsko drevo.
- S cirkularnim dikroizmom smo preverili podobnost sekundarnih struktur proteinov družine Msmeg_5458. Izkazalo se je, da so sestavljeni večinoma iz α-vijačnic, prisotne so tudi β-plošče.
- S HPLC analizo in masno spektrometrijo smo dokazali, da divji tip WT endo veže cAMP, acetil-CoA in CoA. WT cyc⁻ nima vezanega cAMP-ja. Mutanta R95K zgubi sposobnost vezave cAMP-ja, mutanta E234A pa ima okrnjeno vezavo acetil-CoA oz. CoA.
- Rezultati analize vezanih ligandov se dokaj skladajo z rezultati acetiltransferaznega testa. Protein WT cyc⁻ ima nekoliko manjšo stopnjo acetilacije glede na WT endo (slednji ima že nekaj cAMP vezanega), mutanta E234A pa ima zmanjšano sposobnost acetilacije za vsaj tretjino. Mutanta R95K praktično ne izkazuje povečanja acetilacije ob dodatku cAMP-ja, njena nasploh visoka zmožnost acetiliranja substrata pa ostaja nepojasnjena.
- S testom stabilnosti proteinov pri sobni temperaturi smo pokazali, da je protein Msmeg_5458 WT cyc- na začetku stabilen, razpadanje na sobni temperaturi opazimo po približno dveh tednih.
- Uspelo nam je kristalizirati tako mutanto R95K kot WT cyc⁻. Razlika v načinu in pogojih kristalizacije nakazuje, da že majhne spremembe v aminokislinski sekvenci lahko vplivajo na tvorbo proteinskih kristalov.
- Na slikanju s sinhrotronom v Trstu smo pridobili difrakcijske slike kristala mutante R95K. Slike so primerne za izdelavo 3D-modela proteina.

6 POVZETEK

Z odločitvijo organizacije WHO, da do leta 2050 izkorenini tuberkulozo, veliko laboratorijev po svetu intenzivno proučuje fiziologijo mikobakterij nasploh. Že dolgo je znano, da mikobakterije vsebujejo nenavadno veliko količino sekundarnega obveščevalca cAMP. Njegovo vlogo so pripisovali različnim funkcijam, vsi se strinjajo, da ima pomemben vpliv na preživetje bakterij v stresnem okolju, ki ga gostiteljska celica zagotovo predstavlja. Glede na to, da prispeva svoj del k patogenosti določenih vrst, mnoge zanima, kateri proteini so udeleženi v tej kaskadi. Kot eden izmed nepatogenih predstavnikov tega rodu se je uveljavil Mycobacterium smegmatis, ki se odlikuje tudi z dokaj hitrim regeneracijskim časom in preučevanje procesov na tej nepatogeni mikobakteriji lahko olajša raziskave na patogenih. Ne dolgo tega je bil pri M. smegmatis odkrit acetiltransferazni protein Msmeg 5458, čigar ortologi se nahajajo tudi v ostalih (tudi patogenih) mikobakterijah. Posebnost proteina je v tem, da ima poleg acetiltransferazne domene, ki je odgovorna za prenos acetilne skupine na substrat, tudi cAMP vezavno domeno, ki alosterično regulira aktivnost acetilacije. Doslej sta bila odkrita dva različna substrata proteina Msmeg_5458, gre za acetil-CoA sintazo in univerzalni stresni protein (USP) Msmeg_4207. Domneva se, da je Msmeg_5458 eden izmed regulatorjev primarnega metabolizma in del kaskadne poti odziva na stres.

Za proučevanje načina delovanja in strukture Msmeg_5458 proteina je bilo pripravljenih več različic proteina: dve mutanti R95K in E234A ter protein brez vezanega cAMP-ja (WT cyc⁻). Cilj naloge je bil pridobiti zadostno količino heterologno ekspresiranega proteina Msmeg_5458 WT cyc⁻, ki smo ga želeli kristalizirati. Izražanje proteina je potekalo v *E. coli*. Z uporabo afinitetne in gelske kromatografije smo protein očistili. Analize smo izvajali z gelsko elektroforezo, masno spektrometrijo, HPLC analizo, cirkularnim dikroizmom in preprostim encimskim kinetičnim testom (acetiltransferazni test). Opravljene laboratorijske analize so pokazale, da imata mutanti R95K in E234A okrnjeno vezavo ligandov, kar vpliva na njuno sposobnost acetilacije. Pri mutanti E234A je ta okoli 3-krat manjša, mutanta R95K pa ne izkazuje odvisnosti aktivnosti od cAMP-ja. Z mutantama lažje proučujemo funkcijo domen proteina Msmeg_5458. Z uporabo bioinformacijskih orodij smo skušali predvideti sekundarno in terciarno strukturo proteina. Dobljene predikcije bi nam bile v pomoč, če bi se dejansko lotili izgradnje modela

proteina. Želeli smo pridobiti primerne kristale mutante R95K in tipa WT cyc⁻, kar nam je z določenimi tehnikami, kot je uporaba sejanja kristalov pri mutanti R95K tudi uspelo. Sipanje X-žarkov na kristalih mutante R95K smo merili na sinhrotronu v Trstu, difrakcijske slike pa bodo poslužile kot osnova za izdelavo tridimenzionalnega modela proteina. Izgradnja modela ne spada več v sklop te diplomske naloge.

7 VIRI

- 24-well cell culture plate, flat-bottom with lid. 2011. BD Biosciences. http://www.bdbiosciences.com/ptProduct.jsp?prodId=363593&catyId=776811&page=p roduct (18.11.2011)
- A short primer on circular dichroism. 1996. Birkbeck college. http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/assignments/A1/CD_info.html (18.11.2011)
- Agarwal N., Lamichhane1 G., Gupta R., Nolan S., Bishai R.W. 2009. Cyclic AMP intoxication of macrophages by a *Mycobacterium tuberculosis* adenylate cyclase. Nature, 460: 98-102
- Allfrey V.G., Faulkner R., Mirsky A.E. 1964. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 51: 786–794
- Antoni F.A. 2000. Molecular diversity of cyclic AMP signalling. Frontiers in Neuroendocrinology, 21, 2: 103-132
- Aragwal N., Bishai W.R. 2009. cAMP signaling in *Mycobacterium tuberculosis*. Indian Journal of Experimental Biology, 47: 393-400
- Bai G., Schaak D.D., McDonough K.A. 2009. cAMP levels within *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG increase upon infection of macrophages. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 55: 68–73
- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology, 10, 5: 411-421
- Barba J., Alvarez A.H., Flores-Valdez M.A. 2010. Modulation of cAMP metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* and its effect on host infection. Tuberculosis, 90: 208–212

- Berger S.L., Pina B., Silverman N., Marcus G.A., Agapite J., Regier J.L., Triezenberg S.J., Guarente L. 1992. Genetic isolation of ADA2: A potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. Cell, 70, 2: 251–265
- Botsford J.L., Harman, J.G. 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. Microbiological Reviews, 56: 100-122
- Brent M.M., Iwata A., Carten J., Zhao K., Marmorstein R. 2009. Structure and biochemical characterization of protein acetyltransferase from *Sulfolobus solfataricus*. Jornal of Biological Chemistry, 284: 19412-19419
- Brock T. Protein acetylation: much more than histone acetylation. 2009. Cayman Chemical. http://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2152 (18.11.2011)
- Brownell J.E., Allis C.D. 1995. An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena macronuclei*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 92, 14: 6364–6368
- Cascio D., Sawaya M.R. 2011. Cryo-crystallography and data collection. Institute for genomics and proteomics. http://people.mbi.ucla.edu/sawaya/m230d/Data/data.html (18.11.2011)
- Center za masno spektrometrijo. 2011. Inštitut Jožefa Štefana. http://sl.environment.si/struktura-odseka/center-za-masno-spektrometrijo (18.11.2011)
- Cha P.H., Park S.Y., Moon M.W., Subhadra B., Oh T.K., Kim E. 2010. Characterization of an adenylate cyclase gene (cyaB) deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Applied Microbiology and Biotechnology, 85: 1061–1068
- CryoLoop[™] 10 micron. 2011. Hampton Research. http://hamptonresearch.com/product_detail.aspx?cid=24&sid=136&pid=380 (18.11.11)

- Cook G.M., Berney M., Gebhard S., Heinemann M., Cox. A.R., Danilchanka O., Niederweis M. 2009. Physiology of *Mycobacteria*. Advances of Microbial Physiology, 55: 81-184
- Davies J., Wright G.D. 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. Trends in Microbiology, 5, 6: 234–240
- 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
 Pathogens, 5, 5: 1-13
- Global tuberculosis control. 2010. Ženeva, World health organization: 218 str. http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf (18.11.2011)
- Glozak M.A., Sengupta N., Zhang X., Seto E. 2005. Acetylation and deacetylation of nonhistone proteins. Gene, 363: 15–23
- Grosset J. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* in the extracellular compartment: an underestimated adversary. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47, 3: 833-836
- Grunstein M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. Nature, 389: 349-352
- Hansen G.H.A. 1874. Undersøgelser angående spedalskhedens årsager. Norsk Magazin Laegevidenskaben, 4: 1-88
- Hansford R.G. 1976. Studies on the effects of coenzyme A-SH: Acetyl coenzyme A, nicotinamide adenine dinucleotide: reduced nicotinamide adenine dinucleotide, and adenosine diphosphate: adenosine triphosphate ratios on the interconversion of active and inactive pyruvate dehydrogenase in isolated rat heart mitochondria. Jornal of Biological Chemistry, 251, 18: 5483-5489

- Herrmann J-H., Lagrange P-H. 2005. Cellules dendritiques et *Mycobacterium tuberculosis*: Qui est le cheval de Troie? Pathologie Biologie, 53, 1: 35-40
- Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. 1988. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. Biotechnology 6, 11: 1321–1325
- Hoffmann C., Leis A., Niederweis M., Plitzko J.M., Engelhardt H. 2008. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105, 10: 3963–3967
- Hollander D.H., Nell E.E. 1954. Improved Preservation of *Treponema pallidum* and other bacteria by freezing with glycerol. Applied and Environmental Microbiology, 2: 164-170
- Houben NG E., Nguyen L., Pieters J. 2006. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. Current Opinion in Microbiology, 9, 1: 76-85
- Hulko M., Berndt F., Gruber M., Linder J.U., Truffault V., Schultz A. 2006. The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. Cell, 126: 929–940
- Jevnikar Z. 2007. Ekspresijski sistemi. V: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 67-112
- Kalamidas S.A., Kuehnel M.P., Peyron P., Rybin V., Rauch S., Kotoulas O.B. 2006. cAMP synthesis and degradation by phagosomes regulate actin assembly and fusion events: consequences for mycobacteria. Journal of Cell Science, 119: 3686–3694
- Kim C, Cheng C.Y, Saldanha S.A, Taylor S.S. 2007. PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. Cell, 130, 6: 1032-1043
- Klengel T., Liang W.J., Chaloupka J., Ruoff C., Schroppel K., Naglik J.R. 2005. Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. Current Biology, 15: 2021–2026

Koch R. 1882. Die aetiologie der tuberculose. Berl. klin. Wochenschr., 19: 221-230

- Kočevar N., Kreft S., Obermajer N. 2007. Identifikacija in karakterizacija bioloških zdravil ter analiza bioloških vzorcev. V: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 135-184
- Lowrie D.B., Jackett P.S., Ratcliffe N.A. 1975. *Mycobacterium microti* may protect itself from intracellular destruction by releasing cyclic AMP into phagosomes. Nature, 254: 600–602
- Mallet, L., Renault, G., and Jacquet, M. 2000. Functional cloning of the adenylate cyclase gene of *Candida albicans* in *Saccharomyces cerevisiae* within a genomic fragment containing five other genes, including homologues of CHS6 and SAP185. Yeast, 16: 959–966
- McCue L.A., McDonough K.A., Lawrence C.E. 2000. Functional classification of cNMPbinding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*. Genome Research, 10: 204-219
- Morrison D.A. 1977. Transformation in *Escherichia coli*: Cryogenic preservation of competent cells. Journal of Bacteriology, 132, 1: 349-351
- Nambi S., Basu N., Visweswariah S.S. 2010. cAMP regulated protein lysine acetylases in mycobacteria. The Journal of Biological Chemistry, 285, 32: 24313–24323
- Ohmori M., Okamoto S. 2004. Photoresponsive cAMP signal transduction in cyanobacteria. Photochemical & Photobiological Sciences, 3, 6: 503-511
- O'Toole R., Williams H.D. 2003. Universal stress proteins and *Mycobacterium tuberculosis*. Research in Microbiology, 154, 6: 387-392
- Padh H., Venkitasubramanian T.A. 1976. Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in mycobacteria. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 13: 413–414
- Polevoda B., Sherman F. 2000. N-alpha -terminal acetylation of eukaryotic proteins. Jornal of Biological Chemistry, 275: 36479–36482

- Rickman L., Scott C., Hunt D.M., Hutchinson T., Menendez M.C., Whalan R. 2005. A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the rpfA gene coding for a resuscitation promoting factor. Molecular Microbiology, 56: 1274–1286
- Rogall T., Flohr T., Böttger E.C. 1990. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. Microbiology, 136, 9: 1915-1920
- Rost B., Yachdav G., Liu J. 2004. The PredictProtein server. Nucleic Acids Research, 32: 321-326
- Shah S., Peterkofsky A. 1991. Characterization and generation of *Escherichia coli* adenylate cyclase deletion mutants. Journal of Bacteriology, 173, 10: 3238-3242
- Shaw K.J., Rather P.N., Hare R.S., Miller G.H. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycosidemodifying enzymes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 57, 1: 138–163
- 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*. Competative and Functional Genomics, 5, 1: 17-38
- Shenoy A.R., Capuder M., Draskovič P., Lamba D., Visweswariah S.S., Podobnik M. 2007. Structural and biochemical analysis of the Rv0805 cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Molecular Biology, 365: 211–225
- Shenoy A.R., Sreenath N., Podobnik M., Kovačevič M., Visweswariah S.S. 2005. 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. 2006a. Mycobacterial adenylyl cyclases: Biochemical diversity and structural plasticity. FEBS letters, 580, 14: 3344-3352
- Shenoy A.R., Visweswariah S.S. 2006b. New messages from old messengers: cAMP and mycobacteria. Trends in Microbiology, 14, 12: 543-550
- Stahl D.A., Urbance J. W. 1990. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. Journal of Bacteriology, 172, 1: 116-124
- Stapleton M., Haq I., Hunt D.M., Arnvig K.B., Artymiuk P.J., Buxton R.S., Green J. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* cAMP receptor protein (Rv3676) differs from the *Escherichia coli* paradigm in its cAMP binding and DNA binding properties and transcription activation properties. The Journal of Biological Chemistry, 285: 7016– 7027
- Sundaramurthy V., Pieters J. 2007. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. Microbes and Infection, 9, 14-15: 1671-1679
- Tang W.J., Yan S., Drum C.L. 1998. Class III adenylyl cyclases: regulation and underlying mechanisms. Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research, 32: 137– 151
- Tuberculosis. 2010. Ženeva, World health organization. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/ (18.10.2011)
- Tyagi J.S., Sharma D. 2002. Mycobacterium smegmatis and tuberculosis. Trends in Microbiology, 10, 2: 68–69
- Vetting M.W., Carvalho L.P., Yu M., Hegde S.S., Magnet S., Roderick S.R., Blachard J.S. 2005. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. Archives of Biochemistry and Biophysics, 433: 212–226

- Visweswariah S.S. 2011. Cyclic AMP in mycobacteria. V: Mycobacteria: Physiology, metabolism and pathogenesis – back to the basics (J4). Vancouver, British Columbia, 15-20 january 2011. Sherman D.R., Ehrt S. (ur.). Silverthorne, Keystone symposia: 1-29
- Wang Q., Zhang Y., Yang C., Xiong H., Lin Y., Yao J., Li H., Xie L., Zhao W., Yao Y., Ning Z.-B., Zeng R., Xiong Y., Guan K.-Y., Zhao S., Zhao G.-P. 2010. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. Science, 327, 5968: 1004-1007
- Wayne L.G., Kubica G. 1986. The mycobacteria. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, 2: 1435-1457
- Weber K., Osborn M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Jornal of Biological Chemistry, 244, 16: 4406-4412
- Xu H., Hegde S.S., Blanchard S.J. 2011. Reversible acetylation and inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* acetyl-coa synthetase is dependent on cAMP. Biochemistry, 50, 26: 5883-5892
- 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 & 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, 5968: 1000-1004

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem dr. Marjetki Podobnik, da me je sprejela v laboratorij za biosintezo in biotransformacijo na Kemijskem inštitutu, kjer sem lahko opravljal diplomsko delo. Hvala Vam za vse mesece potrpežljivosti, za razumevanje in pomoč.

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Hrvoju Petkoviću, da je prevzel mentorstvo.

Zahvala gre tudi doc. dr. Blažu Cigiću za hitro, vendar korektno popravo diplomske naloge.

Ne smem pozabiti na osebje na Kemijskem inštitutu, njihova nesebičnost mi je zelo olajšala delo. Hvala dr. Katji Rebolj, dr. Urški Dermol, Maji Capuder.

Zahvaljujem se dr. Dušanu Žigonu (Center za masno spektrometrijo, Inštitut Jožef Štefan, Ljubljana) za pomoč pri izvedbi masne spektroskopije.

Zahvaljujem se prof. dr. Sandhyi S. Visweswariah (Bangalor, Indija) za plazmidno DNK in čudovito predavanje o proteinu Msmeg_5458.

Hvala prijateljem Kristijanu, Omarju in Blažu, s katerimi sem skupaj delal na istem oddelku. Medsebojna pomoč in druženje študentov naredi delo prijetnejše.

Zahvaljujem se tudi ostalim prijateljem in sošolcem, s katerimi sem delil študentska leta.

Posebna zahvala gre družini, ki me je ves čas podpirala in stala ob strani.

In konec koncev hvala vsemu Stvarstvu, da je privedlo do nastanka te diplomske naloge.

PRILOGE

Priloga A: Mapa plazmida pPROEX-HTa z označenimi pomembnejšimi mesti (izvzeto iz strani www.lablife.org). Mapa je predelana s programom GENtle (Manske M. GENtle V 1.9.4. 2003, University of Cologne).



lacI: zapis za represorski protein LacR; amp: zapis za beta-laktamazo

Transkripcija se prične za trc promotorjem s sekvenco:

His repek se torej prepiše in omogoči vezavo proteina na Ni-NTA koloni. Po cepitvi s TEV proteazo (prepozna cepitveno mesto ENLYFQG) ostane sekvenca:

G A M D P E F K (nato protein)

Gre torej ravno za 8 aminokislin, ki se nahajajo pred dejansko sekvenco proteina Msmeg_5458. Prvih pet smo zaznali pri določanju N-terminalne sekvence proteinskih lis.

Priloga B: HPLC kromatograma kontrol. Prva slika prikazuje kontrolo za temperaturno obdelani cAMP (den. cAMP), druga pa za acetil CoA in CoA.

