

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATALIJA POTARIĆ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATALIJA POTARIĆ
**IZOLACIJA BAKTERIJSKEGA ENCIMA
D-ASPARTAT LIGAZA IN BIOLOŠKO VREDNOTENJE
NJEHOVIH POTENCIALNIH ZAVIRALCEV**

**ISOLATION OF BACTERIAL ENZYME
D-ASPARTATE LIGASE AND BIOLOGICAL EVALUATION
OF ITS POTENTIAL INHIBITORS**

Magistrsko delo
Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2017

Potarić N., Izolacija bakterijskega encima D-aspartat ligaza in biološko vrednotenje njegovih potencialnih zaviralcev. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, Laboratorijska biomedicina, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Anamarije Zega, mag. farm. Izolacija in kristalizacija proteina D-aspartat ligaza sta bili narejeni na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo (Ljubljana), encimski testi pa na Inštitutu za biokemijo (Ljubljana).

Komisija za zagovor:

Predsednik: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm.

Mentorica: izr. prof. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

Članica: doc. dr. Urša Pečar Fonović, univ. dipl. biol.

ZAHVALA

Ni dovolj samo vedeti; znanje je treba tudi uporabljati.

Ni dovolj hoteti, treba je tudi narediti.

[Johann Wolfgang von Goethe]

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Anamarija Zega, mag. farm., za strokovno podporo, svetovanje in temeljit pregled magistrske naloge.

Zahvalo želim izreči doc. dr. Gregorju Guncarju, univ. dipl. kem., za dobre delovne pogoje na FKKT in dr. Katji Hrovat Arnež, univ. dipl. mikrobiol. za vodenje in vso potrebno pomoč pri opravljanju praktičnega dela.

Zahvaljujem se prof. dr. Juretu Stojanu, dr. med., za pomoč pri eksperimentalnem delu in za to, da sem lahko opravljala praktično delo na Inštitutu za biokemijo.

Hvala tudi dr. Heleni Barreteau iz IBBMC, Universite de Paris-Sud, Orsay, Francija, za substrat UM5K.

Hvala prijateljicam Jasni, Katji in Patriciji za prijaznost, spodbudo in dobro voljo.

Posebej bi se rada zahvalila svojim najbližjim in njim posvečam svojo magistrsko nalogo: mami, atiju in bratu Blažu. Vam se iz srca zahvaljujem za stalno podporo, prijaznost, ljubezen in razumevanje. Hvala, da mi stojite ob strani in ne dovolite, da bi kdarkoli podvomila o sebi in svojih sposobnostih.

Potarić N., Izolacija bakterijskega encima D-aspartat ligaza in biološko vrednotenje njegovih potencialnih zaviralcev. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, Laboratorijska biomedicina, 2017

Izjava

Izjavljam, da je magistrska naloga rezultat samostojnega raziskovalnega dela pod mentorstvomizr. prof. dr. Anamarije Zega, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	3
KAZALO SLIK	5
KAZALO TABEL	6
POVZETEK	8
ABSTRACT	9
SEZNAM OKRAJŠAV	11
1 UVOD	14
1.1 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE.....	14
1.1.1 Mehanizmi delovanja protimikrobnih učinkovin na bakterijske celice.....	15
1.1.2 Rezistenca bakterij na protimikrobne učinkovine	15
1.1.2.1 Mehanizmi rezistence bakterij na protimikrobne učinkovine	15
1.1.3 Vzroki za razvoj bakterijske rezistence in njene posledice.....	16
1.2 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA IN PEPTIDOGLIKAN	17
1.2.1 Gram pozitivne bakterije.....	17
1.2.2 Gram negativne bakterije	17
1.2.3 Zgradba peptidoglikana.....	18
1.2.4 Biosinteza peptidoglikana	19
1.2.4.1 Sinteza prekurzorjev v citoplazmi.....	19
1.2.4.2 Vezava prekurzorjev na lipidni prenašalec in prenos prekurzorjev preko citoplazemske membrane.....	20
1.2.4.3 Polimerizacija osnovne enote peptidoglikana v periplazmi – transpeptidacija	21
1.3 D-ASPARTAT LIGAZA	21
1.3.1 ATP-vezavno mesto bakterijskih encimov kot potencialno tarčno mesto za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin.....	23
1.4 ZAVIRALCI ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA	24
1.4.1 Encimska kinetika.....	24
2 NAMEN DELA	26
2.1 PRIPRAVA ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA	26
2.2 POSKUS KRISTALIZACIJE ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA	26
2.3 ISKANJE NOVIH ZAVIRALCEV ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA.....	27

3	MATERIALI IN METODE	28
3.1	IZOLACIJA ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA	28
3.1.1	Material	28
3.1.1.1	Kemikalije	28
3.1.1.2	Gojišča za rast bakterijskih celic	28
3.1.1.3	Raztopine in pufri za izolacijo in kristalizacijo encima D-aspartat ligaza	29
3.1.1.4	Laboratorijska oprema	29
3.1.1.5	DNA (plazmid)	30
3.1.1.6	Bakterijski sevi	31
3.1.1.7	Encimi	32
3.1.1.8	Elektroforezni standardi	33
3.1.2	Preparativne metode	33
3.1.2.1	PCR bakterijskih kolonij (<i>angl. colony PCR</i>) z zniževanjem temperature prileganja začetnih oligonukleotidov (<i>angl. touch down PCR</i>)	33
3.1.2.2	Agarozna elektroforeza	34
3.1.2.3	Transformacija	35
3.1.2.4	Izolacija in analiza rekombinantnega proteina	36
3.2	TESTI ENCIMSKE AKTIVNOSTI <i>IN VITRO</i>	43
3.2.1	Material	43
3.2.1.1	Kemikalije	43
3.2.1.2	Laboratorijska oprema	43
3.2.1.3	Strukture testiranih zaviralcev encima DNA giraza B	44
3.2.2	Encimski testi	44
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	47
4.1	IZOLACIJA ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA	47
4.2	POSKUS KRISTALIZACIJE ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA	57
4.3	TEST ENCIMSKE AKTIVNOSTI <i>IN VITRO</i>	58
5	SKLEP	62
6	LITERATURA IN VIRI	65
7	PRILOGE	70

KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava zgradbe gram pozitivne in gram negativne bakterije.	18
Slika 2: Prikaz variabilnih prečnih verig v gram pozitivnih bakterijah.	19
Slika 3: Sinteza peptidoglikana.	21
Slika 4: Reakcija, ki jo katalizira encim D-aspartat ligaza.	22
Slika 5: Vključitev D-aspartata v peptidoglikanski prekursor v bakteriji <i>E. faecium</i>	23
Slika 6: Zaviralec encima D-aspartat ligaza.	24
Slika 7: Michaelis-Mentenov graf aktivnosti encima v odvisnosti od koncentracije substrata.	25
Slika 8: Vektor pE-SUMOstar Amp.	31
Slika 9: Avtoindukcija.	32
Slika 10: Elektroforezni standardi.	33
Slika 11: Prikaz šaržne metode (levo) in uporabljena kristalizacijska plošča (desno).	43
Slika 12: Agarozna elektroforeza.	48
Slika 13: FPLC 1.	49
Slika 14: FPLC 2.	49
Slika 15: NaDS PAGE – 1. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza pred postopkom dialize.	53
Slika 16: NaDS PAGE – 2. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza pred postopkom dialize.	53
Slika 17: NaDS PAGE – 1. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza po cepitvi z encimom peptidaza SUMO.	54
Slika 18: NaDS PAGE – 2. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza po cepitvi z encimom peptidaza SUMO.	54
Slika 19: NaDS PAGE – 3. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza po cepitvi z encimom peptidaza SUMO.	55
Slika 20: Gelska filtracija s kolono Superdex 200 10/30 GL – 2. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza.	57
Slika 21: Gelska filtracija s kolono Superdex 75 10/30 G1 – 3. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza.	57
Slika 22: Rezultati kristalizacijskih poskusov (od prazne kapljice do pojava močne oborine – skrajno desno).	58

Slika 23: Odvisnost absorbance NADH v odvisnosti od dodanega volumna NADH pri 340 nm.	58
Slika 24: Absorpcijski spektri NADH izmerjeni pri različnih koncentracijah NADH pri 340 nm.	59
Slika 25: Časovni potek oksidacije NADH v različnih reakcijskih razmerah pri 340 nm. ...	59
Slika 26: Časovni potek oksidacije NADH v prisotnosti različnih koncentracij encima D-aspartat ligaza pri 340 nm.	60
Slika 27: Odvisnost začetnih hitrosti oksidacije NADH v reakciji nastanka heksapeptida iz pentapeptida in D-asparaginske kisline pri različnih volumnih encima D-aspartat ligaza. ...	60
Slika 28: Katalitična aktivnost encima D-aspartat ligaza (kontrolna krivulja) in zaviralna aktivnost spojin 1 in 3 izmerjena pri 340 nm.	61

KAZALO TABEL

Tabela I: Kemikalije.....	28
Tabela II: Gojišča za rast bakterijskih celic.	28
Tabela III: Raztopine in pufri za izolacijo in kristalizacijo encima D-aspartat ligaza.	29
Tabela IV: Laboratorijska oprema.	29
Tabela V: Reakcijska mešanica za verižno reakcijo s polimerazo.	34
Tabela VI: Protokol pomnoževanja zapisa za pE–SUMO z verižno reakcijo s polimerazo.	34
Tabela VII: Kemikalije uporabljene pri testih encimske aktivnosti.	43
Tabela VIII: Laboratorijska oprema.	43
Tabela IX: Strukture izbranih ATP kompetitivnih zaviralcev encima DNA giraza B.	44
Tabela X: Koncentracije komponent reakcijske mešanice, potrebne za izvedbo encimskega testa aktivnosti D-aspartat ligaze, s končnim volumnom 300 μ L.....	45
Tabela XI: Koncentracije komponent reakcijske mešanice, potrebne za izvedbo detekcijske reakcije, s končnim volumnom 300 μ L.	46
Tabela XII: Koncentracije in volumni komponent, potrebni za izvedbo testa katalitične aktivnosti encima D-aspartat ligaza brez in z zaviralcem, s končnim volumnom 150 μ L.	46
Tabela XIII: Proces priprave encima D-aspartat ligaza.	47
Tabela XIV: Koncentracija vzorca eluata fuzijskega proteina po nanosu na FPLC pred dializo pri treh poskusih izolacije encima D-aspartat ligaza.	49

Tabela XV: Koncentracija fuzijskega proteina po postopku dialize pri treh poskusih izolacije encima D-aspartat ligaza.	51
Tabela XVI: Rezultati cepitve fuzijskega proteina z encimom peptidaza SUMO pred nanosom na kolono IMAC (pri različnih temperaturah in časovnih intervalih) pri treh poskusih izolacije encima D-aspartat ligaza.	51
Tabela XVII: Rezultati cepitve fuzijskega proteina z encimom peptidaza SUMO po nanosu na kolono IMAC (pri različnih temperaturah in časovnih intervalih) pri treh poskusih izolacije encima D-aspartat ligaza.	52
Tabela XVIII: Rezidualna aktivnost (RA) zaviralcev encima D-aspartat ligaza.....	61

POVZETEK

Odkritja zdravilnih učinkovin za zdravljenje mikrobnih infekcij, so s seboj prinesla tudi negativne posledice, na primer razvoj bakterijske rezistence. Pojavila se je nuja po razvoju protibakterijskih učinkovin, ki bi z novimi mehanizmi delovanja vplivale na že znane oz. neznane tarče.

Ena izmed najpomembnejših lastnosti, ki bakteriji omogoča preživetje, je mehansko odporna bakterijska celična stena, ki se nahaja na zunanji strani citoplazemske membrane. Tako rigidno strukturo zagotavlja večini bakterij makromolekula peptidoglikana, ki jo sestavljajo ponavljajoče se enote sladkornih in peptidnih molekul. Ker je integriteta celične stene za bakterijo nujno potrebna za preživetje, so molekule vključene v biosintezo peptidoglikana, potencialne tarče za razvoj novih protibakterijskih učinkovin.

V magistrski nalogi smo preučevali bakterijski encim D-aspartat ligaza, ki je vpleten v zadnje faze biosinteze peptidoglikana. Raziskovalno delo smo začeli z optimizacijo izolacije D-aspartat ligaze in najprej izvedli transformacijo plazmida pE-SUMO z zapisom za bakterijski encim D-aspartat ligaza v gostiteljske celice *Escherichia coli* sev BL21[DE3]pLysS. Uspešna transformacija bakterijskih celic in ekspresija rekombinantnega proteina, sta nam omogočili izolacijo tarčnega encima po dveh različnih protokolih. Rekombinantni encim smo izolirali s kovinsko afinitetno kromatografijo in gelsko filtracijo, čistost in stabilnost proteina pa smo vrednotili z izvajanjem poliakrilamidne gelske elektroforeze ob prisotnosti natrijevega dodecilsulfata.

Dejstvo, da encim D-aspartat ligaza za svoje delovanje potrebuje molekulo ATP, smo izkoristili pri določanju katalitične aktivnosti encima. Uporabili smo spektrofotometrično metodo, ki temelji na merjenju padca absorbance pri valovni dolžini 340 nm oz. meri porabo NADH, ki je sorazmerna količini porabljenega ATP.

Ker 3D struktura encima D-aspartat ligaza, ki bi omogočila strukturno podprto načrtovanje njegovih zaviralcev še ni znana, smo izoliranemu, katalitično aktivnemu encimu skušali poiskati optimalne pogoje za kristalizacijo. Postopek ni bil uspešen. ATP-vezavno mesto D-aspartat ligaze predstavlja potencialno tarčo za razvoj novih zaviralcev. Z rešetanjem manjše knjižnice ATP kompetitivnih zaviralcev encima DNA giraza B smo skušali najti spojino, ki bi predstavljala izhodišče za načrtovanje strukturno novega tipa zaviralcev našega tarčnega encima. Dve spojini sta se izkazali za šibka zaviralca encima D-aspartat ligaza.

Ključne besede: bakterijska rezistenca, peptidoglikan, D-aspartat ligaza.

ABSTRACT

The discovery of the active substances for the treatment of microbial infections, brought also negative consequences with them, such as the development of the bacterial resistance. There was a necessity for the development of antibacterial agents with new mechanisms of action which would affect already known or unknown targets.

One of the most important properties, which allows bacteria to survive, is the mechanical strength of the bacterial cell wall, which is located on the outside of the cytoplasmic membrane. For most of bacteria, this rigid structure provides a macromolecule of peptidoglycan, which consists of repeating units of sugar and peptide molecules. Since the integrity of the cell wall of the bacteria is necessary for survival, molecules involved in the biosynthesis of peptidoglycan, represent potential targets for the development of the new antibacterial agents.

In this master thesis the bacterial enzyme D-aspartate ligase has been studied, which is involved in the final stages of the peptidoglycan biosynthesis. The research work starts with optimizing the isolation of the D-aspartate ligase and we have performed the transformation of the plasmid pE-SUMO coding for the bacterial enzyme D-aspartate ligase into the host cells *Escherichia coli* strain BL21 [DE3] pLysS. The successful transformation of the bacterial cells and the expression of the recombinant protein has enabled the isolation of the target enzyme according to two different protocols. The recombinant enzyme has been isolated, using metal affinity chromatography and gel filtration, the purity and stability of protein has been evaluated with the implementation of the sodium dodecyl sulfate PAGE electrophoresis.

The fact that the D-aspartate ligase action requires a molecule of ATP, which we use in determining the catalytic activity of the enzyme. We have used a spectrophotometric method based on the measurement of the fall in absorbance at a wavelength of 340 nm or the measurement of the consumption of NADH, which is proportional to the amount of the consumed ATP.

Since the 3D structure of the enzyme, which would allow the structure-aided design of its inhibitors, is not known, to isolated, catalytically active enzyme, we have tried to find the optimal conditions for crystallization. The process has not been successful.

Potarić N., Izolacija bakterijskega encima D-aspartat ligaza in biološko vrednotenje njegovih potencialnih zaviralcev. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, Laboratorijska biomedicina, 2017

ATP-binding site of D-aspartate ligase represents a potential target for the development of the new inhibitors. By screening of small libraries of ATP competitive inhibitors of the enzyme DNA gyrase B, we have tried to find the goal, the compound to be the starting point for the design of the structurally new type inhibitors our target enzyme. Two compounds have been shown to be weak inhibitors of the enzyme D-aspartate ligase.

Key words: bacterial resistance, peptidoglycan, D-aspartate ligase.

SEZNAM OKRAJŠAV

A	absorbanca
AK	aminokislina
APS	amonijev persulfat
Asl _{fm}	D-aspartat ligaza iz bakterije <i>Enterococcus faecium</i>
ATP	adenozin trifosfat
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CoA	koencim A
D-AAT	D-aminotransferaza
DAP	diaminopimelinska kislina
Ddl	D-alanil-D-alanin ligaza
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilen-diamin-tetraocetna kislina
ESBL	enterobakterije, ki izločajo širokospektralne betalaktamaze (<i>angl. extended spectrum beta-lactamase</i>)
FPLC	tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (<i>angl. fast protein liquid chromatography</i>)
FtsW	flipaza
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GlmM	fosfoglukozamin mutaza
GlmS	glukozamin-6-folat sintaza
GlmU	bifunkcionalni protein; glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in <i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza
IMAC	imobilizirana kovinsko-afinitetna kromatografija (<i>angl. immobilized metal ion affinity chromatography</i>)
IPTG	izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid
LB	Luria Bertani
M	molska masa

MCS	poliklonsko mesto (<i>angl. <u>multi cloning site</u></i>)
MDR sevi	multirezistentni sevi (<i>angl. <u>multi drug resistant</u></i>)
MQ	mili Q voda, dodatno očiščena destilirana voda
MRAB	večkratno odporne gramnegativne nefermentativne bakterije – <i>Acinetobacter baumannii</i> (<i>angl. <u>multidrug-resistant A. baumannii</u></i>)
MraY	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-pentapeptid fosfotransferaza
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>angl. <u>metylicin resistant S. aureus</u></i>)
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruvil transferaza
MurB	UDP- <i>N</i> - acetilenopiruvilglukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuraminska kislina: L-alanin-ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin: D-glutamat-ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamat:2,6-diaminopimelinatna ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-mezodiaminopimelinat D-alanil-D-alanin ligaza
MurG	<i>N</i> -acetilglukozamin transferaza
MurI	glutamat recemaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NADH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NADS PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
OD	optična gostota (<i>angl. <u>optical density</u></i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl. <u>polymerase chain reaction</u></i>)
PDB	podatkovna zbirka struktur proteinov (<i>angl. <u>protein data bank</u></i>)
PEP	fosfoenolpiruvat
PRSP	proti penicilinu visoko odporni <i>Streptococcus pneumoniae</i> (<i>angl. <u>penicillin resistant S. pneumoniae</u></i>)

RA	rezidualna aktivnost
RNA	ribonukleinska kislina
SUMO	protein SUMO (<i>angl. small ubiquitin-related modifier</i>)
TEMED	tetraetilmetilendiamin
t-RNA	prenašalna ribonukleinska kislina
UDP	uridin difosfat
Ulp1	peptidaza SUMO (<i>angl. ubiquitin like specific protease 1</i>)
UM5K	UDP-MurNAc-pentapeptid
UTP	uridin trifosfat
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> z zmanjšano občutljivostjo za vankomicin (<i>angl. vancomycin-intermediate S. aureus</i>)
VRE	proti vankomicinu odporni enterokoki (<i>angl. vancomycin-resistant Enterococcus faecium in faecalis</i>)
VRSA	<i>S. aureus</i> z zmanjšano občutljivostjo za vankomicin (<i>angl. vancomycin-resistant S. aureus</i>)
ε	ekstincijski koeficient
γ	masna koncentracija

1 UVOD

Protimikrobna zdravila so ena najuspešnejših oblik zdravljenja v zgodovini. Njihovo odkritje in klinična uporaba v 20. stoletju sta pomenila revolucijo v medicini. Znatno so prispevala k obvladovanju nalezljivih bolezni, ki so bile in so ponekod še vedno med vodilnimi vzroki človeške obolevnosti in umrljivosti. (1, 2)

Obdobja razvoja antibiotičnega zdravljenja bakterijskih infekcij zaznamujejo imena številnih znanstvenikov. Začetna opažanja antibioze med mikroorganizmi so pripeljala do odkritja naravnih protibakterijskih učinkovin in do razvoja sintetičnih zdravil. Leta 1928 je Alexander Fleming odkril, da rast bakterij iz rodu *Staphylococcus* (*S. aureus*) zavira gliva iz rodu *Penicillium* (*P. notatum*). Izolirano učinkovino s protibakterijskimi lastnostmi so pozneje poimenovali penicilin. Pomembno odkritje je bilo prvo sintezno protimikrobno zdravilo salvarsan za zdravljenje spolno prenosljive bolezni sifilisa, ki ga je razvil nemški znanstvenik Paul Ehrlich. Velik prelom je prinesel Gerhard Domagk s prvim komercialno dostopnim sintetiziranim zdravilom prontosil, za katero je v letu 1939 prejel tudi Nobelovo nagrado. (1)

Z odkritjem protimikrobnih učinkovin je lastni obrambni mehanizem telesa dobil močnega zaveznika, hkrati pa sta masovna proizvodnja in klinična uporaba naravnih in sintetičnih antibiotikov pripeljali do danes najbolj perečega problema: razvoja rezistence bakterij na protimikrobne učinkovine. (1)

1.1 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Vsakodnevno se zoperstavljamo različnim povzročiteljem bolezni (bakterijam, parazitom, virusom, glivam). Tako izraz protimikrobno zajema širok spekter farmacevtskih učinkovin, vsem pa je skupna lastnost »selektivne« toksičnosti, kar pomeni, da delujejo toksično na patogene organizme, na gostitelja pa imajo minimalni učinek. (3, 4)

Za zdravljenje bakterijskih okužb se uporabljajo antibiotiki oz. kemoterapevtiki. Kemoterapevtik je sintezna učinkovina, antibiotik pa naravni produkt mikroorganizmov oz. polysintezni derivat, ki zavira razmnoževanje drugih mikroorganizmov ali jih uničuje (baktericidno oz. bakteriostatično delovanje protimikrobnih učinkovin). (4)

1.1.1 Mehanizmi delovanja protimikrobnih učinkovin na bakterijske celice

Glede na mehanizem delovanja ločimo protibakterijske učinkovine, ki delujejo na različne celične strukture bakterij:

1. zaviranje biosinteze celične stene (npr. β -laktami in njihovi derivati, vankomicin, bacitracin, glikopeptidi, fosfomicin in D-cikloserin);
2. zaviranje biosinteze znotrajceličnih beljakovin (npr. makrolidi, aminoglikozidi, kloramfenikol, tetraciklini, linkozamidi, fusidična kislina);
3. zaviranje sinteze nukleinskih kislin neposredno (npr. kinoloni, sulfoni, rifamicin in nitroimidazol) oz. posredno prek reakcij, povezanih z biosintezo esencialnih aminokislin in vitaminov – folna kislina (npr. sulfonamidi, trimetoprim);
4. oviranje funkcije citoplazemske membrane – razgradnja fosfolipidnega dvosloja in vpliv na spremembo prepustnosti bakterijske celične membrane ali na aktivni transport (npr. valinomycin, gramicidin, daptomicin in polimiksini). (4–7)

1.1.2 Rezistenca bakterij na protimikrobne učinkovine

Protibakterijske učinkovine so se izkazale za uspešne za nadzor bakterijskih okužb, vendar se je kmalu izkazalo, da so bakterije hitro prilagodljivi mikroorganizmi, in posledica tega je bil pojav bakterijske rezistence oz. odpornosti bakterij na protimikrobne učinkovine. Razvoj odpornosti pri bakteriji *S. aureus* s produkcijo encima β -laktamaza je na primer hitro zmanjšala uporabnost penicilina za zdravljenje nevarnih stafilokoknih infekcij. Problem bakterijske rezistence so reševali s sintezniimi modifikacijami že obstoječih protimikrobnih učinkovin in z odkrivanjem novih. Ti poskusi so bili na začetku uspešni, vendar je kljub temu hitro postalo jasno, da bo razvoj novih protibakterijskih učinkovin težko sledil sposobnosti bakterij za razvoj rezistence. (8, 10, 11)

1.1.2.1 Mehanizmi rezistence bakterij na protimikrobne učinkovine

Načina, kako se bakterija izogne protibakterijskim učinkom, sta dva. Odpornost je posledica mutacij (intrinzični tip), ki se zgodijo evolucijsko ali pa bakterija pridobi rezistenco s pomočjo druge bakterije (ekstrinzični tip). Sposobnost bakterijskih celic, da se hitro delijo, pripelje do genetskih sprememb (inverzije, duplikacije, delecije), ki bakteriji omogočijo proizvodnjo encimov za inaktivacijo protibakterijskih učinkovin (npr. β -

laktamaze, acetiltransferaze, fosforilaze) ali odstranijo/spremenijo tarčo na katero naj bi protibakterijska učinkovina delovala. Mutacije lahko spremenijo permeabilnost membrane, kar omogoči bakteriji, da prepreči protibakterijski učinkovini vstop v celico (npr. porini), ali pa bakterija razvije mehanizme črpanja, ki antibiotik odstranijo iz celice, še predno ta doseže svoj cilj (npr. G⁺ in G⁻ bakterije proti tetraciklinom). (6, 7, 9) Pridobljen tip odpornosti je značilen le za nekatere seve posamezne bakterijske vrste ali rodu. Najpomembnejši mehanizem za širjenje rezistence je **konjugacija** s plazmidi, v katere je vključen gen za rezistenco, pri čemer se krožna molekula DNA prenese med celicami skozi pilus. Drugi mehanizmi za prenos genov za odpornost so **transpozicija** (lastnost nekaterih fagov, ki so sposobni mobilizacije DNA znotraj genoma; med plazmidoma, plazmid–kromosom) oz. **transformacija** (vključevanje proste DNA iz okolja v kromosom). (4, 7, 9) Virusi so še en mehanizem za prenos lastnosti odpornosti med bakterijami (**transdukcija**). V tem primeru bakteriofag ob izstopu iz gostiteljske celice s seboj »odnese« tudi del bakterijskega genoma in ga pozneje vgradi v genom druge gostiteljske celice. (10)

1.1.3 Vzroki za razvoj bakterijske rezistence in njene posledice

Ker protibakterijske učinkovine ne delujejo le na tarčne patogene bakterije, ampak na vse, ki so nanje občutljive, vsako jemanje protibakterijskih učinkovin povečuje možnosti za razrast rezistentnih bakterij. Uporaba protibakterijskih učinkovin pa ne povečuje odpornosti bakterij le s selekcijo, temveč tudi vzpodbuja mikroorganizme k modifikaciji obrambnih mehanizmov, kar vodi k nastanku večkratno odpornih bakterijskih sevov (sevi MDR). (12, 13) Med njimi so najbolj znani sevi MRSA (proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus*), VISA (*Staphylococcus aureus* z zmanjšano občutljivostjo za vankomicin) in VRSA (*Staphylococcus aureus* z zmanjšano občutljivostjo za vankomicin), PRSP (proti penicilinu visoko odporni *Streptococcus pneumoniae*), VRE (proti vankomicinu odporni enterokoki), ESBL (enterobakterije – *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, ki izločajo širokospektralne laktamaze beta) in sevi MRAB (večkratno odporne gram negativne nefermentativne bakterije – *Acinetobacter baumannii*). (12) Bakterijska rezistenca je tudi posledica čezmerne uporabe in zlorabe protibakterijskih učinkovin, še posebej v zdravstvu. To se rešuje z različnimi ukrepi, npr. doslednim preprečevanjem nepravilne in neustrezne uporabe antibiotikov (pomembna je doza antibiotika in čas terapije), z nadzorom okužb v bolnišnicah (higiena rok in kontaktna

izolacija bolnikov), in z razvojem zanesljivih laboratorijskih metod molekularne diagnostike za odkrivanje odpornih bakterijskih sevov (masna spektrometrija, mikromreže, pretočna citometrija, sekvenciranje nove generacije). (14, 15, 16)

1.2 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA IN PEPTIDOGLIKAN

Bakterije so enocelični organizmi, katerih zgradba je veliko preprostejša od zgradbe evkariontske celice. Posamezne celične strukture (genetski material, ribosomi) niso obdane z membrano in prosto ledbijo v citoplazmi celice. Za preživetje bakterije je zelo pomembna dobra zaščita. Obdaja jo kompleksna struktura, sestavljena iz polprepustne fosfolipidne membrane (gradniki so fosfatidil etanolamin, fosfatidil glicerol, fosfatidilserin in kardiolipin) in visoko strukturirane ter mehansko zelo odporne celične stene. Ta sodeluje pri celični delitvi, preprečuje, da bi sprememba okoliškega tlaka v hipotoničnem okolju privedla do razpada bakterijske celice, ohranja obliko celice ter nudi obrambo pred vplivi okolja (npr. zaščita pred mehanskimi poškodbami ali razgradnjo z gostiteljevimi encimi). Vse to omogoča rigidna struktura peptidoglikana. Celične stene bakterij se med sabo razlikujejo po zgradbi, zato bomo v nadaljevanju ločili bakterije na gram pozitivne in gram negativne. (11, 17, 19)

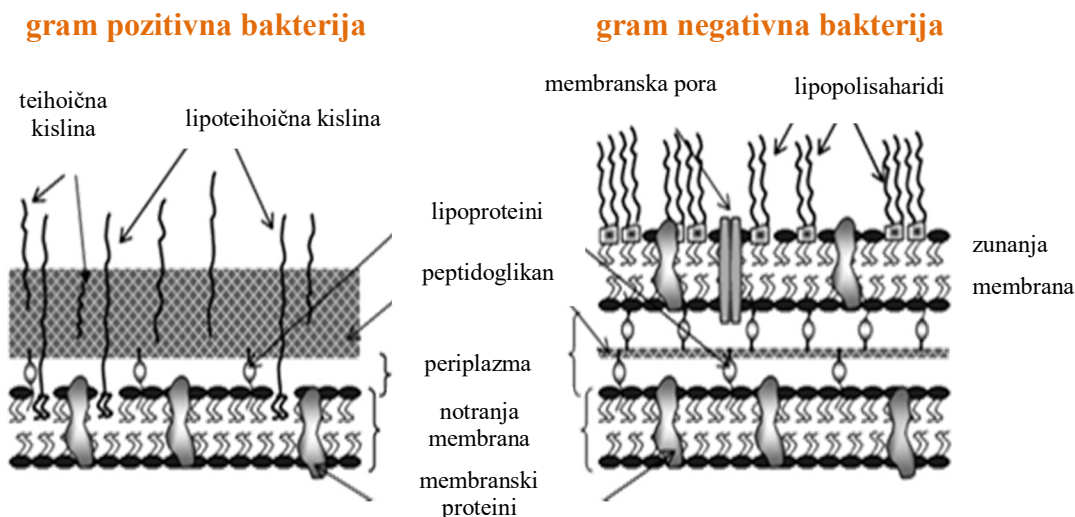
1.2.1 Gram pozitivne bakterije

Celična stena gram pozitivnih bakterij je sestavljena iz več kot 40 plasti peptidoglikana, kar predstavlja približno 20–80 nm debeline. Približno 60-odstotkov mase celične stene pa predstavljajo v peptidoglikan umeščeni dolgi anionski polimeri (npr. teihoična in lipoteihoična kislina), ki dajejo negativni naboj celotni površini bakterijske celice in imajo pomembno vlogo v homeostazi kationov kot kelator, saj uravnavajo koncentracije kovinskih ionov, ki so potrebni za delovanje mnogih encimov vključenih v biosintezo peptidoglikana (slika 1). (18, 19)

1.2.2 Gram negativne bakterije

Pri gram negativnih bakterijah imamo za celično membrano sloj peptidoglikana, ki je veliko tanjši (3–8 nm) od tistega pri gram pozitivnih bakterijah. Vsebuje le do štiri sloje, prav tako ne vsebuje teihoične kisline. Vendar pa ključno zaščitno funkcijo tvori dvoslojna

zunanja membrana, sestavljena iz lipidov, lipopolisaharidov in proteinov – porinov (slika 1). (18, 19)



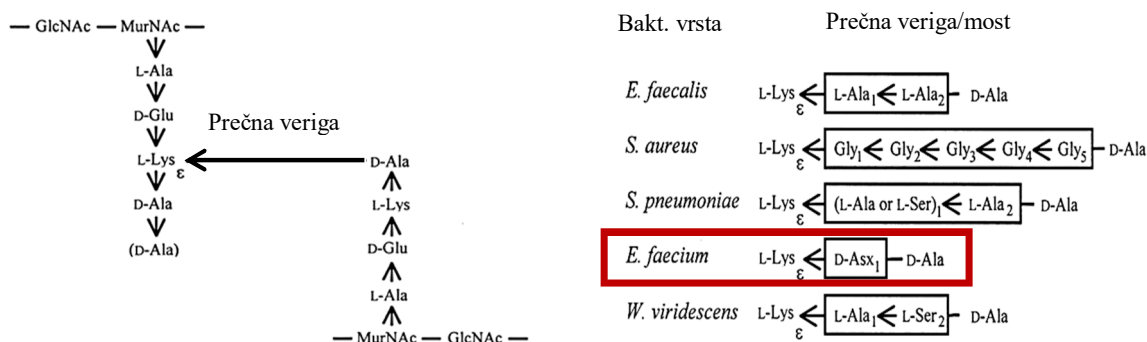
Slika 1: Primerjava zgradbe gram pozitivne in gram negativne bakterije. (Prirejeno po Vadillo et al., 2011) (19)

1.2.3 Zgradba peptidoglikana

Peptidoglikan (murein) je polimer z veliko molekulsko maso, sestavljen iz sladkornih in aminokislinskih podenot. Sladkorni del tvorita izmenjujoča se disaharida *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) in njegov derivat *N*-acetilmuraminska kislina (MurNAc), v katerem je na atomu C-3 z estrsko vezjo pripeta mlečna kislina (2-hidroksipropanojska kislina), povezana z 1,4- β -glikozidno vezjo. Na MurNAc so glede na tip bakterije specifično vezane štiri aminokislino (AK). Tetrapeptid je sestavljen iz L-alanina (L-Ala), D-glutaminske kisline (D-Glu) in D-alanina (D-Ala); razlike se pojavijo v četrti AK. Gram pozitivna bakterija vsebuje lizin (Lys), gram negativna pa *mezo*-diaminopimelinsko kislino, ki nastopa kot prekursor pri sintezi Lys. Prečna kovalentna povezava posameznih peptidoglikanskih enot vodi k nastanku stabilne rigidne makromolekulske mreže, ki pa je odvisna od števila premreženih peptidnih verig. Peptidna vez nastaja med karboksilno skupino ($-\text{COOH}$) četrte AK D-Ala ene glikanske verige in prosto amino skupino ($-\text{NH}_2$) tretje AK (Lys oz. *mezo*-diaminopimelinske kisline) druge glikanske verige. (17, 20, 21)

V bakteriji *Escherichia coli*, glavni predstavnici gram negativnih bakterij, so prečne povezave zgrajene iz peptidne vezi med D-Ala in *mezo*-diaminopimelinsko kislino posameznih peptidoglikanskih vlaken (slika 2). Za gram pozitivne bakterije je značilna variabilna prečna veriga, ki se razlikuje od posamezne bakterijske vrste. Tako

peptidoglikansko mrežo v bakteriji *S. aureus* povezuje veriga sestavljena iz petih glicinov (Gly), pri enterokoku, bakteriji *Enterococcus faecium*, pa tvori značilen most ena AK, D-asparaginska kislina (D-Asp) (slika 2). (20, 21) Encim, ki katalizira reakcijo pripenjanja D-aspartata v peptidoglikanski prekursor v bakteriji *E. faecium*, se imenuje D-aspartat ligaza, in temu encimu se bomo natančneje posvetili v nadaljevanju magistrske naloge. (25)



Slika 2: Prikaz variabilnih prečnih verig v gram pozitivnih bakterijah. (Prirejeno po Bouhss et al., 2001) (22)

1.2.4 Biosinteza peptidoglikana

Razlike med bakterijsko in človeško celico so na nivoju celične organizacije in strukture. Pomembno strukturno lastnost bakterij tako predstavlja celična stena. Za bakterijo specifični encimi, ki sodelujejo pri biosintezi peptidoglikana, ponujajo nove možnosti za razvoj nujno potrebnih protibakterijskih učinkovin. (23)

Sinteza peptidoglikana je zapleten proces in poteka v več stopnjah:

1. sinteza prekurzorjev (pentapeptida in derivatizacija UDP-sladkorjev) v citoplazmi,
2. prenos prekurzorjev preko membrane z lipidnim prenašalcem,
3. polimerizacija osnovne enote peptidoglikana v periplazmi – transpeptidacija.

1.2.4.1 Sinteza prekurzorjev v citoplazmi

Sintezo prekurzorjev v citoplazmi razdelimo v nize štirih reakcij. (slika 4)

A. Sinteza uridil-difosfat-*N*-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) iz fruktoze-6-fosfata.

Sinteza peptidoglikana se začne, ko AK glutamin (Gln) donira amino skupino na sladkor fruktozo-6-fosfat. Sledi reakcija med nastalim glukozamin-6-fosfatom in acetil CoA, pri čemer nastane *N*-acetil-glukozamin-6-fosfat. Po izomerizaciji *N*-acetil-glukozamin-1-fosfat reagira z uridin trifosfatom (UTP). Med reakcijo se sprostijo anorganski pirofosfat

(PPi) in nastane prvi prekurzor UDP-GlcNAc. Encimi, ki katalizirajo omenjene reakcije so amidotransferaze GlmS, GlmU in GlmM. (23)

B. Nastanek UDP-*N*-acetilmuraminske kisline (UDP-MurNAc) iz UDP-GlcNAc.

Prvo stopnjo katalizira encim MurA, in sicer pride do prenosa enolpiruvata iz fosfoenolpiruvata (PEP) na 3-hidroksilni konec UDP-GlcNAc, v drugem delu encim MurB reducira enolno skupino do laktoilne skupine. (23)

C. Nastanek UDP- MurNAc pentapeptida.

V tem koraku nastopajo štirje bistvenimi encimi, imenovani Mur ligaze. Ti katalizirajo peptidno vez z L-Ala (MurC), D-Glu (MurD), *mezo*-diaminopimelinsko kislino ali L-Lys (MurE) in dipeptidom D-Ala-D-Ala (MurF) na skupino D-laktoil iz UDP-MurNAc. Mur ligaze potrebujejo za svoje delovanje energijo ATP. (21, 23)

D. Sinteza dveh D-AK.

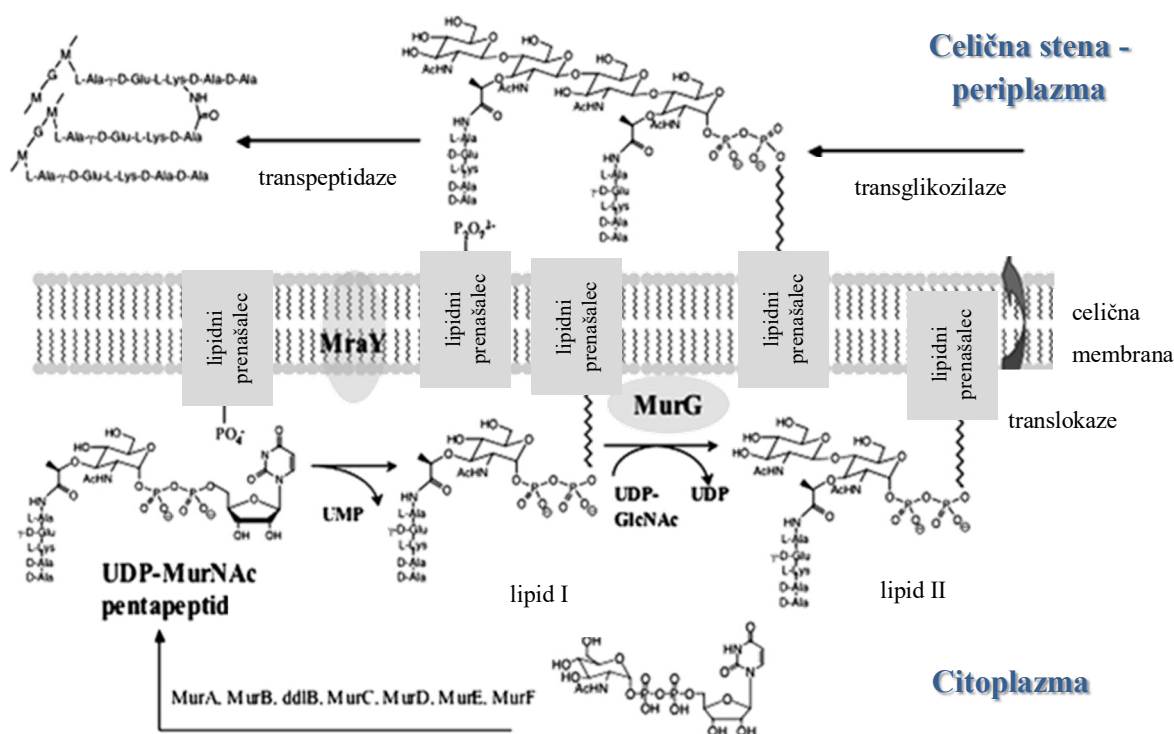
Biosintezo peptidoglikana v plazmi vključujejo različni substrati, kot so acetil-CoA, UTP, PEP, NADPH, ATP in L-AK, nekateri med njimi pa so bolj specifični (D-Ala, D-Ala-D-Ala in D-Glu). Reakcijo racemizacije D-Ala iz AK L-Ala katalizira od piridoksal-5-fosfata odvisen encim alanin racemaza. Za sintezo dipeptida D-Ala-D-Ala je potrebna D-alanil-D-alanin ligaza (Ddl); za nastanek D-Glu pa sta odgovorna dva encima: glutamat racemaza (MurI), ki katalizira interkonverzijo D in L-enantiomera Glu in D-aminotransferaza (D-AAT), ki pretvori β -ketoglutarat v D-Glu ob hkratni pretvorbi D-Ala v piruvat. (23)

1.2.4.2 Vezava prekurzorjev na lipidni prenašalec in prenos prekurzorjev preko citoplazemske membrane

Druga faza biosinteze poteka v citoplazemski membrani, kjer nalogo opravi lipidni prenašalec. Najprej se veže z molekulo UDP-MurNAc pentapeptidom (encim MraY) in tvori tako imenovani lipid I. Na lipid I se prek 1,4- β -glikozidne vezi veže GlcNAc, kar katalizira *N*-acetilglukozamin transferaza (MurG). Nastali lipid II se s pomočjo encima flipaza (FtsW) premesti preko membrane v periplazmo celice, kjer se vgradi v obstoječo glikansko verigo. Reakcijo imenujemo transglikozilacija. Prenasalna molekula se nato vrne v membrano. (slika 3) (20, 23)

1.2.4.3 Polimerizacija osnovne enote peptidoglikana v periplazmi – transpeptidacija

V zadnji stopnji sinteze, ki poteka v periplazmi, bakterijska celica poskrbi za ustrezno premreženost peptidnih verig nastajajočega peptidoglikana. Encimi, ki to omogočajo, se imenujejo transpeptidaze. Reakcija poteče med prostim aminom tretje AK – Lys in D-Ala na četrtem položaju druge peptidne verige, ki je vezana na muraminsko kislino, hkrati pa se peptidna vez med D-alaninskima ostankoma pretrga in odcepi se terminalni D-Ala. Sproščena energija se porabi za tvorbo prečne vezi. (slika 3) (20, 23)



Slika 3: Sinteza peptidoglikana. Sinteza prekurzorjev (pentapeptida in derivatizacija sladkorjev UDP) v citoplazmi, prenos prekurzorjev preko membrane z lipidnim prenašalcem, polimerizacija osnovne enote peptidoglikana v periplazmi – transpeptidacija. (Prirejeno po Fang et al., 2006) (24)

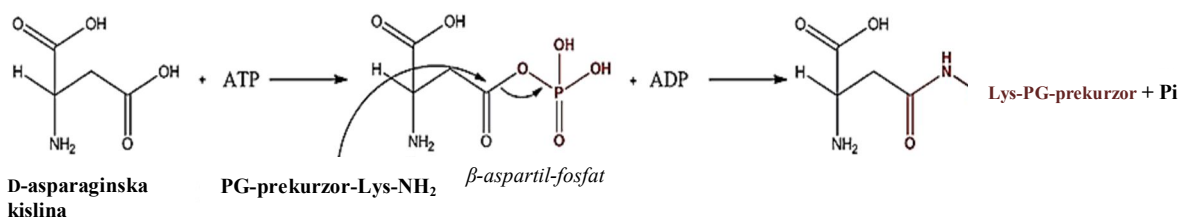
1.3 D-ASPARTAT LIGAZA

D-aspartat ligaza (Asl_{fm}) je zadnji odkriti encim, vključen v sintezo peptidoglikana, in katalizira tvorbo kovalentne peptidne vezi v gram pozitivnih bakterijah. (25)

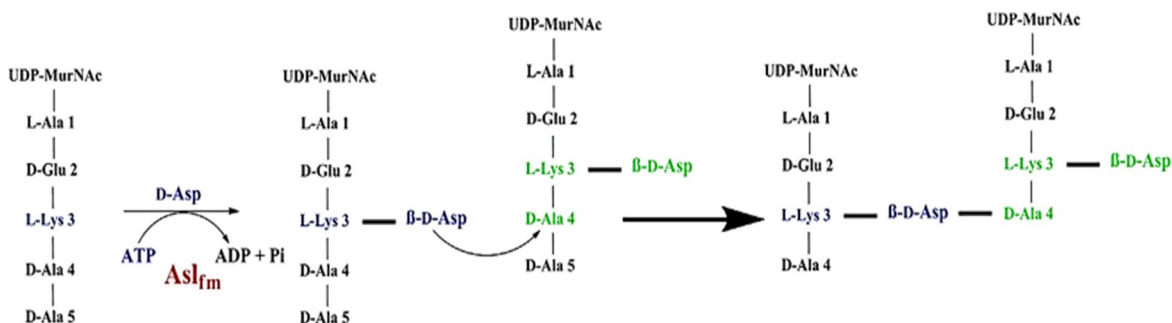
Patogene gram pozitivne bakterije, ki pripadajo rodovom stafilokokov, streptokokov in enterokokov, imajo na ϵ -amino skupino L-Lys peptidne verige peptidoglikanskih vlaken pripet mostiček iz aminokislin (L-alanil- γ -D-glutamil-L-lizil-D-alanil-D-alanin), ki

peptidoglikanska vlakna prečno premreži. Značilno je, da se struktura te stranske aminokislinske verige znotraj iste bakterijske vrste ne spreminja, medtem ko za sestavo med posameznimi bakterijskimi vrstami to ne velja; ta lahko vsebuje 1–5 aminokislinskih preostankov. Da se L-AK in Gly pripnejo na peptidoglikanski prekursor, jih je treba aktivirati. Aktivacija poteka z encimi aminoacil-tRNA sintetazami (neribosomalne peptidiltransferaze). Encimi iz družine FEM, ki so odgovorni za pripenjanje petih Gly v *S. aureus* (FmhB, FemA, FemB) ali dodajanje dveh molekul L-Ala v *Enterococcus faecalis* (BppA1 in BppA2) ali L-Ala v peptidoglikanski prekursor v bakteriji *Weissella viridescens* (FemX) ali dipeptidov L-Ser-L-Ala ali L-Ala-L-Ala v *S. pneumoniae* (MurM, MurN), so že znani in raziskani. (21) Do danes pa je zelo malo znanega o vključitvi D-AK v peptidoglikan. Za razliko od L-AK, je za D-AK, torej za D-Asp, dokazano, da ne potrebujejo omenjene aktivacije, ampak se v peptidoglikanski prekursor vgrajujejo z ligazno reakcijo. Encim D-aspartat ligaza iz bakterije *E. faecium*, prej imenovane *Streptococcus faecalis*, ki aktivira D-asparaginsko kislino (D-Asp) in jo poveže z ϵ -amino skupino L-Lys³ UDP-MurNAc pentapeptida, so prvič izolirali in opisali leta 1972. Gen za omenjeni encim so identificirali približno 30 let pozneje z metodo reverznega genetskega pristopa, istega leta je bila z radioaktivnim testom določena tudi katalitična aktivnost encima D-aspartat ligaza *in vivo* in s pomočjo metode tandemске masne spektroskopije tudi struktura heksapeptidnega produkta. (25, 27)

Pri vgradnji substrata D-Asp v stransko verigo peptidoglikana sodelujeta encim aspartat racemaza in D-aspartat ligaza. S pomočjo encima aspartat racemaze se L-Asp pretvori v D-Asp. V reakcijo vstopa molekula ATP, ki z encimom D-aspartat ligaza aktivira β -karboksilno skupino D-Asp. Nastali intermediat β -aspartil fosfat v naslednjem koraku napade ϵ -amino skupino Lys prekursorja UDP-N-acetilmuramil pentapeptida. Eliminira se fosfat in tvori se amidna vez. (slika 4) V zadnjem koraku sinteze premreženje peptidoglikanskih vlaken katalizirajo D, D-transpeptidaze. (slika 5) (21, 25)



Slika 4: Reakcija, ki jo katalizira encim D-aspartat ligaza. (Prirejeno po Škedelj et al., 2013) (27)



Slika 5: Vključitev D-aspartata v peptidoglikanski prekursor v bakteriji *E. faecium*. (Prirejeno po Bellais et al., 2006) (25)

Za encime je značilno, da lahko reagirajo samo z omejenim številom substratov (substratna specifičnost) in katalizirajo samo določene reakcije (specifičnost delovanja). Raziskave so dokazale, da že majhne spremembe na substratu D-asparaginska kislina, kot so podaljšanje stranske verige (D-Glu), zamenjava α -amino skupine s hidroksilno skupino (D-jabolčna kislina) ali zamenjava α -karboksilne skupine z CONH₂ (D-izoasparagin), niso primerne za delovanje encima D-aspartat ligaza. (25, 27)

1.3.1 ATP-vezavno mesto bakterijskih encimov kot potencialno tarčno mesto za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin

D-aspartat ligaza iz multirezistentne bakterije *E. faecium* je nova potencialna tarča za razvoj protibakterijskih zdravilnih učinkovin. Čeprav so strukturne značilnosti encima še vedno slabo poznane, je na podlagi predhodno znanih dejstev o aminokislinskem zaporedju in katalitičnem mehanizmu reakcij potrjeno, da D-aspartat ligaza spada v naddružino ATP-grasp encimov. (25, 27)

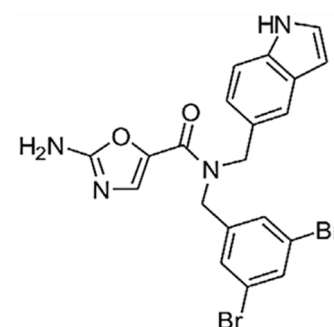
V skupino, ki za svoje delovanje potrebuje molekulo ATP, uvrščamo približno desetino od vseh do zdaj že znanih encimov. Encimi, ki v svojem aktivnem centru vsebujejo ATP-vezavno mesto se med sabo razlikujejo po strukturi ali po mehanizmu reakcije. Delimo jih v naddružine, in ena izmed že omenjenih je naddružina encimov ATP-grasp. Encimi, ki so jih med prvimi umestili v to naddružino so biotin karboksilaza, D-Ala-D-Ala ligaza, glutation sintaza, karbamoil fosfat sintetaza, urea amidolaza, tubulin-tirozin ligaza in sukcinil CoA sintetaza. (25, 27) Encimi ATP-grasp so predstavniki razreda ligaz, ki za katalizo nove vezi potrebujejo energijo molekule ATP, ali predstavniki kinaz, ki pripenjajo fosfatno skupino na AK serin (Ser), treonin (Thr) ali tirozin (Tyr), njihova dejavnost pa je

odvisna od cikličnega AMP (cAMP) v celici. V bakterijski celici so predstavniki ATP-grasp ligaz encimi, ki sodelujejo pri sintezi peptidoglikana (D-aspartat ligaza, D-alanil-D-alanin ligaza), sintezi glutationa (glutation sintetaza) in njegovih modifikacijah (glutationil spermidin sintetaza), sintezi polipeptida cianoficina (cianoficin sintetaza) in peptidnih antibiotikov (butirozin, bacilizin). (28, 29)

ATP-vezavno mesto bakterijskih encimov je zanimivo tarčno mesto za načrtovanje protibakterijskih učinkovin, vendar je ciljanje tega mesta zaradi problema doseganja selektivnosti na bakterijske sisteme, razmeroma slabo izkoriščeno. Poleg tega morajo biti ATP kompetitivni zaviralci bakterijskih encimov zmožni tekrovati z visoko koncentracijo ATP v bakterijski celici (0,6–18 mM), ki je podobna kot v človeški celici (1–10 mM). Kljub strukturnim razlikam med ATP-vezavnimi mesti je bilo dokazano, da z dobrim poznavanjem strukture encimov, selektivnost na bakterijskih in evkariontskih encimih lahko dosežemo. (26)

1.4 ZAVIRALCI ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA

Prvi zaviralci encima D-aspartat ligaza so bili odkriti z rešetanjem knjižnice že znanih kompetitivnih zaviralcev ATP bakterijskih encimov iz naddružine ATP-grasp in z optimizacijo zadetkov z računalniškim modeliranjem. Najboljšemu zaviralcu so izmerili konstanto inhibicije $K_i = 3 \mu\text{M}$, s kinetičnimi in termodinamskimi študijami pa so potrdili, da se veže v ATP-vezavno mesto. (slika 6) (27)



Slika 6: Zaviralec encima D-aspartat ligaza. (Prirejeno po Škedelj et al., 2013) (27)

1.4.1 Encimska kinetika

V telesu potekajo skoraj vse reakcije pod vplivom encimov. Funkcija encimov je kataliza biokemijskih reakcij, delujejo pa tako, da znižajo aktivacijsko energijo za pretvorbo substratov v produkte. To področje obravnava encimska kinetika. Encimi uravnavajo hitrost in smer teh reakcij, pri čemer se sami ne porabljajo in se trajno ne spremenijo. Merjenje aktivnosti oz. hitrosti encima ponazarja enačba spreminjanja hitrosti substrata/produkta v časovni enoti. (31, 32) Dejavniki, ki vplivajo na aktivnost encimov so:

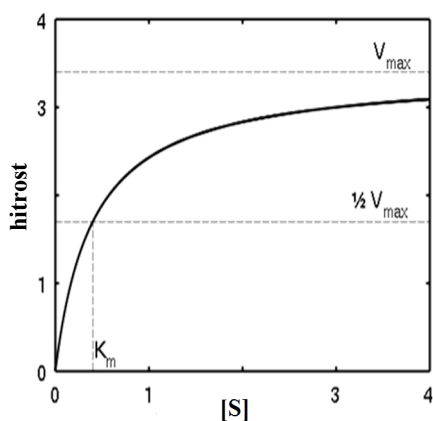
1. pH

Večina encimov ima optimalen pH, pri katerem je njihova aktivnost največja (tisti, ki delujejo v kislem, niso aktivni v bazičnem). Vrednosti pH, ki so večje ali manjše od optimuma, zmanjšajo ali uničijo aktivnost encimov. (31, 32)

2. Temperatura

Vsak encim ima temperaturni optimum, maksimum in minimum. Aktivnost encimov narašča sorazmerno s temperaturo, vendar lahko presežena optimalna temperatura spremeni strukturo encima in ta spremeni svojo naravo (denaturira). Zaradi tega encim začasno ali trajno izgubi svojo katalitično sposobnost. (31, 32)

3. Količina substrata



Z naraščajočo koncentracijo substrata raste aktivnost encimov, ki doseže maksimum pri koncentraciji substrata, pri kateri so zasedeni vsi aktivni centri encima. Če se potem koncentracija substrata še večja, aktivnost encima ne narašča več. (slika 7) (31, 32)

Slika 7: Michaelis-Mentenov graf aktivnosti encima v odvisnosti od koncentracije substrata. Enačba, ki opisuje hiperbolično obliko krivulje: $V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$, pri čemer konstanta K_m definira koncentracijo substrata pri polovični maksimalni hitrosti encimske reakcije. (Prirejeno po Wikipedia) (33)

4. Zaviralci

Na encimsko aktivnost lahko vplivamo z modulatornimi molekulami, ki encimsko aktivnost zmanjšajo. Zaviralce delimo na ireverzibilne in reverzibilne, reverzibilne encimske zaviralce pa nadalje razdelimo na kompetitivne, nekompetitivne in akompetitivne.

Ireverzibilni zaviralec se kovalentno veže na funkcionalno skupino AK in trajno inaktivira encim. Pri reverzibilni nekompetitivni inhibiciji se lahko substrat in zaviralec vežeta na molekulo encima hkrati, vendar na različni aktivni mesti. Mehanizem akompetitivnega zaviralca je podoben nekompetitivnemu mehanizmu delovanja; razlikuje se po tem, da se veže le na kompleks encim-substrat. Kompetitivni zaviralci so ponavadi podobni substratu in se vežejo v aktivno mesto encima, kadar substrat ni vezan. (30, 31, 32)

2 NAMEN DELA

Bakterijska rezistenca je eden večjih zdravstvenih problemov, zato mora farmacevtska industrija razvijati nove protimikrobne učinkovine. Ena od strategij v boju z bakterijsko rezistenco je načrtovanje protibakterijskih učinkovin z delovanjem na nove neizkoriščene tarče. D-aspartat ligaza, ki sodeluje v končnem procesu prečnega premreženja peptidoglikanskih vlaken pri bakteriji *E. faecium*, je še neraziskano področje, saj njena 3D struktura ni znana, poleg tega pa je iz literature znanih le nekaj tipov zaviralcev tega encima. V okviru magistrske naloge bomo skušali optimizirati postopek izolacije tako, da bo ob koncu postopka izoliran encim katalitično aktiven in primeren za postopek kristalizacije. Z reševanjem manjše knjižnice spojin, zaviralcev bakterijskega encima DNA giraza B, ki se vežejo v ATP-vezavno mesto, bomo skušali najti spojino, ki bi bila lahko izhodiščna točka za načrtovanje strukturno novih tipov zaviralcev D-aspartat ligaza in v prihodnosti morda tudi novih protibakterijskih učinkovin.

2.1 PRIPRAVA ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA

V prvi fazi magistrskega dela bomo izolirali encim D-aspartat ligaza. Izolacijo bomo začeli na stopnji transformacije plazmida pE-SUMO z zapisom za bakterijski encim D-aspartat ligaza v gostiteljske celice *E. coli* sev BL21[DE3]pLysS. Uspešnost transformacije bomo preverili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) bakterijskih kolonij in agarozno elektroforezo. Pripravili bomo avtoinducibilne bakterijske kulture in izolirali encim z imobilizirano kovinsko afinitetno (IMAC) in gelsko kromatografijo. Uspešnost izolacije in morebitne denaturacije ali cepitve encima bomo v celotnem postopku preverjali s poliakrilamidnogelsko elektroforezo ob navzočnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS PAGE). Naš cilj bo optimizacija pogojev za cepitev encima s peptidazo SUMO in postopka koncentriranja.

2.2 POSKUS KRISTALIZACIJE ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA

Ker 3D struktura D-aspartat ligaze še ni znana, bomo izoliranemu encimu z izkazano katalitično aktivnostjo skušali poiskati optimalne kristalizacijske pogoje.

2.3 ISKANJE NOVIH ZAVIRALCEV ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA

Z *in vitro* encimskim testom, ki temelji na sklopljeni reakciji z encimoma laktat dehidrogenazo in piruvat kinazo, bomo preizkusili katalitično aktivnost pripravljenega encima in biološko ovrednotili majhno serijo že znanih ATP kompetitivnih zaviralcev bakterijskega encima DNA giraza B kot potencialne zaviralce D-aspartat ligaze.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZOLACIJA ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA

3.1.1 Material

3.1.1.1 Kemikalije

Tabela I: Kemikalije.

Reagent	Proizvajalec
ampicilin	Fisher Scientific
kloramfenikol	Acros Organic
imidazol, glukoza, NaHPO ₄ ×2H ₂ O, tris(hidroksimetil)aminometan, agaroz, N-Z amin, NH ₄ Cl, β-merkaptotanol, bromfenol modro, natrijev dodecilsulfat (NaDS)	Sigma Aldrich
NaCl, KH ₂ PO ₄ , očetna kislina	Gram-Mol
IMAC Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare
amonijev persulfat (APS), tetraetilmetilendiamin (TEMED)	Serva
glicerol	Fisher Chemical
MgSO ₄	Honeywell Riedel-de Haen
α-laktoza monohidrat	Fisher Chemical
glicin	Fisher Scientific
barvilo Coomassie Brilliant Blue, akrilamid:bisakrilamid (37,5:1)	Fermentas
proteinski standard (unstained protein molecular weight marker), ditiotreitol (DTT)	Thermo Scientific

3.1.1.2 Gojišča za rast bakterijskih celic

Tabela II: Gojišča za rast bakterijskih celic.

Gojišče	Sestavine raztopin
tekoče Luria Bertanijevo gojišče (LB) brez antibiotikov	kvasni ekstrakt, NaCl, tripton, deionizirana voda
trdno LB gojišče z antibiotiki	kvasni ekstrakt, NaCl, agar, tripton, deionizirana voda, ampicilin, kloramfenikol
neinducibilno minimalno gojišče za gojenje bakterij; metil-α-D-glukopiranozid (MDG)	19,1 ml dH ₂ O, 40 μL 1 M MgSO ₄ , 250 μL 40-odstotne glukoze, 200 μL 25-odstotnega aspartat, 400 μL 50× M, 20 μL ampicilina, 20 μL kloramfenikola
avtoinducibilno gojišče ZY (Z = 1-odstotni N-Z amin, Y = 0,5-odstotni kvasni ekstrakt)	40 g protein hidrolizat N-Z amina (encim tripton), 20 g kvasnega ekstrakta, 4 000 mL dH ₂ O (gojišče razdelimo v 8×383 mL)
50×M (1×M = 50 mM PO ₄ , 50 mM NH ₄ Cl, 5 mM Na ₂ SO ₄)	80 mL dH ₂ O, 17,75 g Na ₂ HPO ₄ , 17 g KH ₂ PO ₄ , 13,4 g NH ₄ Cl, 3,55 g Na ₂ SO ₄
50×5052 (5052 = 0,5-odstotni glicerol, 0,05-odstotna glukoza, 0,2-odstotna α-laktoza)	73 mL dH ₂ O, 250 g glicerola, 2,5 g glukoze, 10 g α-laktoza monohidrata
mešanica avtoinducibilnih gojišč = ZYM-5052	383 ml gojišča ZY, 800 μL 1M MgSO ₄ , 8 mL 50×5052, 8 mL 50×M, 400 μL ampicilina, 400 μL kloramfenikola

3.1.1.3 Raztopine in pufri za izolacijo in kristalizacijo encima D-aspartat ligaza

Tabela III: Raztopine in pufri za izolacijo in kristalizacijo encima D-aspartat ligaza.

Pufer/raztopina	Sestavine raztopin
tris acetatni pufer ali TAE	tris/acetat/EDTA – že pripravljen
nanašalni pufer za agarozno elektroforezo	25-odstotno bromfenolmodro markersko barvilo, 25-odstotno ksilencianol markersko barvilo, 15-odstotni fikol tip 4000, 120 mM EDTA
pufer za resuspendiranje in shranjevanje celic pri -80 °C	500 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 20 mM imidazol, pH 7,4
10× elektroforezni pufer za NaDS PAGE (pred uporabo smo razredčili 1:10)	30 g Tris/HCl, 144 g glicina, 10 g SDS, 1 L dH ₂ O
nanašalno barvilo z reducentom za PAGE	1 M Tris/HCl, 2-odstotni NaDS, 0,1-odstotni bromfenol modro in 10-odstotni glicerol, 14,3 M β-merkaptoetanol, dH ₂ O, pH 6,8
raztopina za barvanje poliakrilamidnega gela s Coomassie brilliant blue	10-odstotna očetna kislina, 60-odstotni metanol, 2,5 g Coomassie brilliant blue
raztopina za razbarvanje poliakrilamidnega gela	30-odstotni absolutni etanol, 10-odstotna očetna kislina
raztopina za pripravo 12,5-odstotnega ločitvenega gela (5 mL)	2,14 mL dH ₂ O, 1,25 mL Tris/HCl, 1,57 mL 40-odstotni akrilamid/bisakrilamid (37,5:1), 50 μL 10-odstotni NaDS, 7,5 μL TEMED, 15 μL 10-odstotni APS, pH 8,8
raztopina za pripravo 4-odstotnega koncentracijskega gela (5 mL)	4×769 mL dH ₂ O, 2×625 mL Tris/HCl, 625 μL 40-odstotni akrilamid/bisakrilamid (37,5:1), 50 μL 10-odstotni NaDS, 7,5 μL TEMED, 15 μL 10-odstotni APS, pH 6,8
vezavni pufer za imobilizirano kovinsko-afinitetno kromatografijo – IMAC (1. in 2. poskus izolacije encima)	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 20 mM imidazol, pH 7,4
vezavni pufer IMAC (3. poskus izolacije encima)	200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 20 mM imidazol, 10-odstotni glicerol, pH 8,0
elucijski pufer IMAC	500 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 300 mM imidazol, pH 7,4
dializni pufer (v 1. in 2. poskusu izolacije encima)	150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 8,0
dializni pufer (v 3. poskusu izolacije encima)	200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 10-odstotni glicerol, 1 mM DTT, pH 8,0
pufer za gelsko kromatografijo (v 2. poskusu izolacije encima)	200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 5-odstotni glicerol, pH 8,0
pufer za gelsko kromatografijo (v 3. poskusu izolacije encima)	200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 10-odstotni glicerol, pH 8,0
kristalizacijski pufri Structure Screens 1 (MD1-01) in 2 (MD1-02)	V prilogi B
kristalizacijski pufri PACT premier MD 1 – 29	

3.1.1.4 Laboratorijska oprema

Tabela IV: Laboratorijska oprema.

Laboratorijska oprema	Ime	Proizvajalec
stresalnik za gojenje kultur (37 °C, 20 °C)	IS 200 K	NetWise Kambič
inkubator (37 °C)	BD	Binder GmbH
tehnica (analitska in precizna)	WLC 2A/A2 PL83-S	Radwag Mettler Toledo
magnetno mešalo	FB15045	Fisher Scientific
centrifuge	PicoFugeTM GmCLab 5180 R	Stratagene Gilson

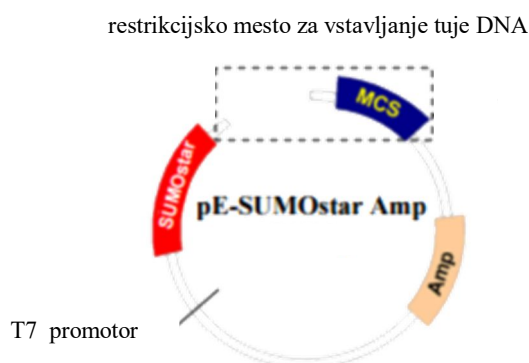
2 rotorja	5424 5415 R Sorvall RC 6+ Fiberlite™ F21-8 × 50y Fiberlite™ F10-4 × 1000 LE×	Eppendorf Thermo Scientific Thermo Scientific
sistem za pridobivanje dodatno očiščene demineralizirane vode (MQ)	Milli-Q	Millipore
aparatus za PCR	GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystem
laboratorijska oprema za agarozno elektroforezo	B1, B1A	Owl Separation Systems
laboratorijska oprema za PAGE: elektroforezna kadička, stekla za vlivanje gelov za elektroforezo, stojalo za vlivanje gelov, glavniček za žepe	Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad
vibracijsko mešalo	Vibromix 10	Tehnica
sistem za slikanje gelov – transiluminator	MiniBIS Pro	DNR Bio-Imaging Systems
vir napetosti za elektroforezne kadičke (agarozna elektroforeza)	EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech
namizni stresalnik	Orbit™ LS	LabNet
pipete: 0,5–10 µL 10–100 µL 100–1000 µL	Research	Eppendorf
centrifugirke (15 mL, 50 mL)	/	VWR
digestorij	SecuFlow	Waldner
pH meter	Seven Easy	Mettler Toledo
sonifikator	Labsonic 2000	B. Braun
vakumska črpalka za filtracijo	vacuum gas pump	VWR
25 mm nitrocelulozni membranski filtri z 0,22 in 0,45 µm porami	Minisart® NML	Startorius
dializna membrana	/	Sigma Aldrich
črpalka za IMAC	FH30 Compact Pump Systems	Thermo Scientific
kromatografski sistem FPLC	AKTA FPLC System Incl Datastation & Frac 920	Amersham Biosciences
UV-vis spektrofotometer	NanoDrop 2000 c Libra S12	Thermo Scientific Biochrom
kolona za gelsko kromatografijo	SUPERDEX 200 10/30 GL (volumen 24 ml)	GE HealthCare
kolona za gelsko kromatografijo	SUPERDEX 75 10/30 GL (volumen 24 ml)	GE HealthCare
kolona za IMAC	HiTrap FF	GE HealthCare
ultrafilter (15 mL, 0,5 mL)	Amicon Ultra	Millipore
kristalizacijske plošče	MRC Under Oil Crystallization Plate	Molecular dimensions
aparatus za avtomatsko pipetiranje	Ari Art Robbins Crystal Gryphon	Dunn Labortechnik GmbH
polarizacijski mikroskop	Leica MZ 75	Leica
inkubator kristalizacijskih plošč	Rubarth Apparate	Rumed

3.1.1.5 DNA (plazmid)

Eden najpogosteje uporabljenih gostiteljev, tj. bakterija *E. coli*, ni primeren za izražanje nekaterih rekombinantnih proteinov. Da bi izboljšali ekspresijo, povečali stabilnost in

omogočili pravilno zvitje ter topnost rekombinantnega proteina, smo za ekspresijo encima D-aspartat ligaza uporabili fuzijski sistem SUMO. (34, 35)

Vektor pE-SUMO je krožni plazmid, ki vsebuje selekcijsko mesto z zapisom za rezistenco na ampicilin ali kanamicin, mesto začetka podvajanja DNA, zaporedje, ki kodira polihistidinski afinitetni podaljšek (zaporedje šestih histidinov) in protein SUMO ter klonirno mesto (multi cloning site – MCS), kamor vstavimo želeni fragment. (slika 8) (35, 36) Zaporedje, ki kodira polihistidinski podaljšek po ekspresiji omogoča učinkovito čiščenje, fuzijski protein pa nato cepimo z encimom peptidaza SUMO.



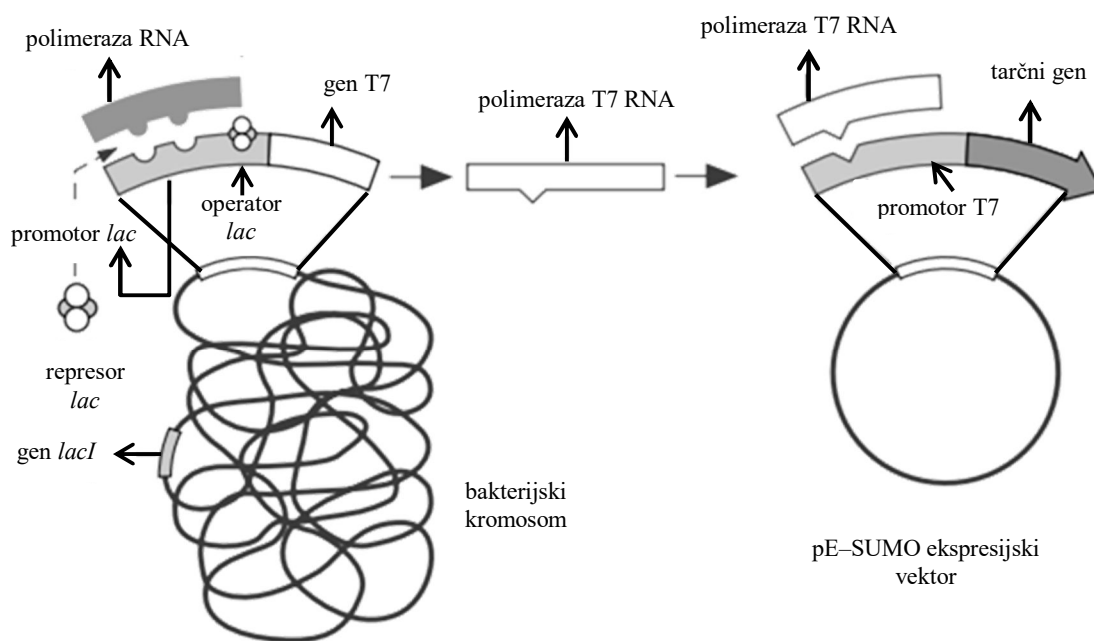
Slika 8: Vektor pE-SUMOstar Amp. Plazmid je sestavljen iz selekcijskega mesta z zapisom za rezistenco na antibiotik, mesta začetka podvajanja DNA, zaporedja, ki kodira polihistidinski afinitetni podaljšek in protein SUMO ter klonirnega mesta (multi cloning site – MCS), kamor vstavimo želeni fragment. (Prirejeno po LifeSensors) (34)

Zaporedje rekombinantnega vektorja je v prilogi A.

3.1.1.6 Bakterijski sevi

Bakterije vrste *E. coli* spadajo med fakultativne anaerobe in so najpogosteje uporabljeni gostitelji za izražanje rekombinantnih proteinov. Za izražanje encima D-aspartat ligaza smo uporabili sev BL21[DE3]pLysS. Ekspresijski sev BL21 ima z uvedbo mutacij utišane endogene proteaze (proteazi Ion in OmpT), kar omogoča lažje izražanje in zmanjša verjetnost razgradnje heterolognih proteinov. Navzočnost profaga λ DE3 z zapisom, ki kodira polimerazo T7 RNA, je potrebna za ekspresijo genov na vektorju. Polimeraza RNA *E. coli* je pod nadzorom promotorja *lacUV5*, ki je inducibilen z izopropil- β -D-tiogalaktozidom (IPTG) oz. laktozo. Kadar v celici ni induktorja, je represor *lac* vezan na promotor *lac* in v celici ne prihaja do prepisa genov za polimerazo T7 in posledično

tarčnega proteina. Obratno se zgodi, ko dodamo induktor in omogočimo vezavo polimeraze RNA *E. coli* na promotor *lac*. Za boljšo regulacijo imajo uporabljene celice vstavljen še plazmid pLysS, ki vsebuje zapis za lizocim T7 in rezistenco na antibiotik kloramfenikol. Lizocim T7 je naravni zaviralec polimeraze T7 RNK, razgradi jo, kar pomeni, da je transkripcija gena, kontroliranega s promotorjem T7, skoraj popolnoma zavrta, dokler ne dodamo induktorja. (slika 9) (36, 48)



Slika 9: Avtoindukcija. Kontrola genov *lac* je odvisna od navzočnosti laktoze. Transkripcija vseh genov se začne, ko laktoza inaktivira represor *lac* in omogoči vezavo encima polimeraza RNA na specifično mesto na DNA, *t. i.* promotor. Pri vezavi polimeraze T7 na promotor T7 ekspresijskega vektorja pride do izražanja tarčnega gena. (Prirejeno po Novagen, 2006) (37)

3.1.1.7 Encimi

1. **Peptidaza SUMO – Ulp1** (*angl. ubiquitin like specific protease 1*); je proteazni encim, izoliran iz glive *Saccharomyces cereviae*. Sodeluje v procesu maturacije SUMO propeptida, kjer hidrolizira peptidno vez α v zaporedju Gly-Gly-Ala-Thr-Tyr na C-končnem delu in v procesu njegove dekonjugacije od rekombinantnega proteina. V tem primeru peptidaza katalizira cepitev peptidne vezi ϵ med C-končnim Gly zrelega SUMO proteina (-Gly-Gly) in ϵ -amino skupino Lys tarčnega proteina. (39, 40) Na N-končni del peptidaze je vezan polihistidinski podaljšek, kar omogoča enostavno čiščenje z afinitetno kromatografijo. Cepitveni pogoji, pri katerih peptidaza SUMO

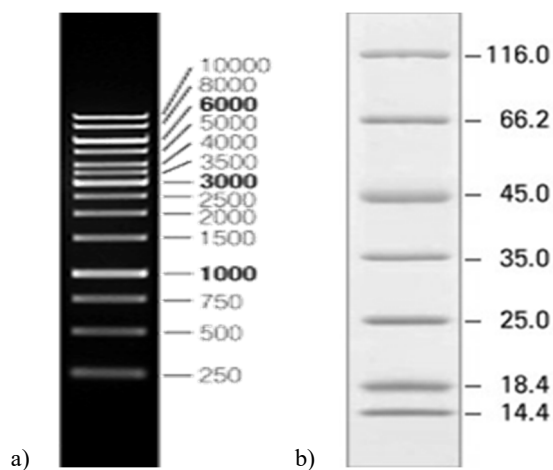
ohrani katalitično aktivnost so: 150–300 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 6–10, 1 mM DTT, temperaturni interval 4–30 °C. (36, 38)

2. **Polimeraza GoTaq green**; omogoča večjo občutljivost in dolžino pomnoženih fragmentov kot konvencionalna polimeraza Taq DNA. (41)

3.1.1.8 Elektroforezni standardi

Elektroforezni standardi, ki so bili uporabljeni pri delu (slika 10):

- GeneRuler DNA Ladder 250–10 000 bp
- Unstained Protein Molecular Weight Marker



Slika 10: Elektroforezni standardi. a) Standard GeneRuler 1 kbp DNA Ladder na 1-odstotnem agaroznem gelu z velikostmi standardov v bp (bazni par). (42) b) Proteinski standard; Unstained Protein MW Marker na 12,5-odstotnem poliakrilamidnem gelu ob navzočnosti NaDS z velikostmi standardov v kDa. (43)

3.1.2 Preparativne metode

3.1.2.1 PCR bakterijskih kolonij (*angl. colony PCR*) z zniževanjem temperature prileganja začetnih oligonukleotidov (*angl. touch down PCR*)

Metoda temelji na pomnožitvi produktov reakcije PCR neposredno iz bakterijskih kolonij, kar omogoča hitro iskanje bakterijskih kolonij na trdnem gojišču s ciljem, da detektiramo tiste, ki imajo vstavljene plazmide z želenim zaporedjem DNA, *t. i.* pozitivne kolonije. Princip »touch down« se uporabi z namenom, da se poveča količina specifičnih produktov reakcije. Zmanjšanje nespecifičnih produktov dosežemo tako, da v ciklih pomnoževanja spreminjamo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov. Začetna temperatura

prileganja je višja od T_m (temperatura tališča) začetnih oligonukleotidov, zadnja temperatura prileganja pa nižja od T_m začetnih oligonukleotidov. (44, 45) Proces pomnoževanja je sestavljen iz treh stopenj: denaturacija matrične DNA, pripenjanje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje DNA. Tak cikel reakcij smo ponovili 30-krat, število kopij DNA pa je z vsakim ciklom eksponentno naraščalo. Reakcijo smo izvedli v mikrocentrifugirkah, v katerih smo zmešali matrično DNA (bakterijska kolonija z vstavljenim plazmidom pE–SUMO z zapisom za bakterijski encim D-aspartat ligaza), začetna oligonukleotida (pomnožujeta zaporedje za protein SUMO in bakterijski encim D-aspartat ligaza), GoTaq Green Master Mix. (tabela V, tabela VI)

Tabela V: Reakcijska mešanica za verižno reakcijo s polimerazo.

Komponenta	Volumen (μL)
GoTaq Green Master Mix (Green Taq DNA polimeraza, dNTP, MgCl_2 , modro in rumeno barvilo, ki omogočata spremljanje napredka med elektroforezo)	6,25
začetni oligonukleotid 5'	1
začetni oligonukleotid 3'	1
DNA (=bakterijska kolonija z vstavljenim plazmidom)	0,2
dH_2O	4,05
Σ	12,5

Tabela VI: Protokol pomnoževanja zapisa za pE–SUMO z verižno reakcijo s polimerazo.

1. začetna denaturacija	95 °C	2 min
2. denaturacija	95 °C	30 s
3. prileganje začetnih oligonukleotidov	56 °C → 45 °C	30 s
4. podaljševanje verige	72 °C	1 min
5. dokončanje sinteze	72 °C	7 min
6. zaustavitev sinteze	4 °C	∞

3.1.2.2 Agarozna elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je metoda, ki omogoča ločevanje negativno nabitih fragmentov DNA. Molekule zaradi svojega naboja potujejo v električnem polju od katode (–) proti anodi (+), zamreženost gela pa omogoči ločevanje molekul po velikosti. (46)

Po končani reakciji PCR smo produkte nanесли na 1-odstotni agarozni gel (0,5 g agaroze smo raztopili v 50 ml $1\times$ pufru TAE). Vzorčkom smo predhodno dodali $6\times$ nanašalni pufer, ki poveča viskoznost vzorcev, da se ti lažje usedejo na dno žepka. Elektroforeza je potekala v puferskem sistemu TAE (tris-acetat-EDTA) 30 minut pri napetosti 90 V.

Pomnoženo DNA smo detektirali z interkelatorjem etidijevim bromidom, ki po obsevanju z UV svetlobo fluorescira oranžno svetlobo valovne dolžine 590 nm. Gel smo skenirali z UV-vis transiluminatorjem MiniBIS Pro, ki nam omogoči vizualizacijo gela in shranjevanje ter obdelavo slik na računalniku.

3.1.2.3 Transformacija

3.1.2.3.1 Transformacija plazmida pE-SUMO z zapisom za encim D-aspartat ligaza

Transformacija je postopek, pri katerem v kompetentne bakterijske celice vnesemo tujo rekombinantno DNA z ustreznimi selekcijskimi markerji, ki omogočajo rast le celicam, ki so prejele plazmid, v našem primeru, celice, ki so rezistentne na ampicilin. Transformacijo smo izvajali na ledu, da bi ohranili kompetentnost celic. Celice *E. coli* sev BL21[DE3]pLysS smo odmrznili in jim dodali plazmidno DNA. Inkubirali smo jih 30 minut na ledu in med tem časom segreli vodo za toplotni šok pri točno 42 °C. Ta korak spodbudi odpiranje por v membrani bakterije, kar omogoči pospešeno sprejemanje plazmida. Epruvete z vzorcem smo za 45 sekund pomočili v vodo in jih nato 2 minuti inkubirali na ledu. Dodali smo 800 µL sterilnega tekočega gojišče LB in jih v inkubatorju stresali 90 minut pri 150 obr/min pri 37 °C. Po inkubaciji smo 100 µL bakterijske transformacijske mešanice s sterilno spatulo po Drigalskem enakomerno razmazali po površini agarnih plošč LB z antibiotikoma ampicilinom in kloramfenikolom. Navzočnost ustreznega antibiotika v gojišču povzroči selekcijo, ki omogoči rast le bakterijam z vstavljenim plazmidom. Uspešnost transformacije smo preverili z agarozno elektroforezo. (47) Bakterije smo inkubirali čez noč pri 37 °C.

3.1.2.3.1 Avtoindukcija – izražanje rekombinantnih proteinov

Naslednji dan smo v 20 mL minimalnega gojišča MDG z antibiotikoma ampicilinom in kloramfenikolom nacepili bakterijsko kolonijo, jo pokrili s parafilmom in jo čez noč inkubirali v stresalniku pri 150 obr/min pri 37 °C. Naslednji dan smo avtoinducibilnemu gojišču ZYM-5052 dodali 1 000× redčeno preko nočno bakterijsko kulturo iz gojišča MDG ter jo znova inkubirali na stresalniku 6 ur pri 150 obr/min pri 37 °C in inkubacijo nadaljevali čez noč pri 20 °C. Bakterije so se ustrezno namnožile, ko smo opazili, da je gojišče motno. Rast bakterij smo spremljali na UV-vis spektrofotometru z merjenjem

optične gostote pri 600 nm. Kulturo smo prelili v centrifugirke in centrifugirali 20 minut pri 6 000 obr/min pri 4 °C. Supernatant smo zavrgli in delo nadaljevali na ledu. Celično usedlino smo resuspendirali v ustreznem pufru in bakterijsko suspenzijo razdelili v plastične centrifugirke ter jo zamrznili na –80 °C.

3.1.2.4 Izolacija in analiza rekombinantnega proteina

Celoten postopek izolacije je potekal v več stopnjah in z uporabo različnih metod. Metode, ki smo jih izvajali so bile centrifugiranje, filtracija, ultrafiltracija, dializa, kovinsko afinitetna in gelska kromatografija.

3.1.2.4.1 Odtajanje in razbitje celic ter ekstrakcija topnega fuzijskega proteina

Suspenzijo bakterijskih celic smo vzeli iz zamrzovalnika, jo na ledu odtalili in prelili v čašo. Postopek sonifikacije, ultrazvočnega razbitja celic, smo izvajali 9-krat po 5 minut z 2-minutnim premorom, ki smo ga izkoristili za rahlo mešanje suspenzije na ledu ter tako preprečili pregretje vzorca in denaturacijo proteinov. Ultrazvočno sondo smo obrisali z etanolom in konico potopili 1 cm pod površino. Vzorec se ni smel peniti, saj bi nam lahko to oborilo protein. Ko vzorec ni bil več viskozen, smo suspenzijo prelili v centrifugirke in jo centrifugirali 20 minut pri 150 000 obr/min pri 4 °C. Za analizo z NaDS PAGE smo v eno mikrocentrifugirko odvzeli vzorec peleta celic, v drugo pa odpipetirali supernatant, ki je vseboval topne proteine, vključno z našim, in ga shranili pri –20 °C. Preostali pelet celic smo zavrgli, supernatant pa prefiltrirali najprej skozi filter velikosti por 0,45 µm in nato 0,2 µm, da smo odstranili vse nečistoče, ki bi poškodovale kolono IMAC.

3.1.2.4.2 Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija 1 – pred cepitvijo z encimom peptidaza SUMO

Za čiščenje rekombinantnih proteinov se pogosto uporablja afinitetna kromatografija z imobiliziranim kovinskim ionom – IMAC. Ta tip kromatografije je podvrsta afinitetne kromatografije, ki temelji na specifičnih bioloških interakcijah med kovinskimi ioni in imidazolnimi skupinami histidina. Gensko spremenjen protein ima vgrajen označevalec – histidinski podaljšek z afiniteto do nikljevih ionov, kar omogoča hitro in selektivno izolacijo. Proteini, ki vsebujejo več zaporednih histidinskih ostankov, se zadržijo na

matriksu kromatografske kolone, elucijo pa izvedemo bodisi s spremembo pH pufra ali z dodajanjem prostega imidazola, ki izpodrine na kolono vezane proteine. (49, 51)

Pred začetkom uporabe smo v 20-odstotnem etanolu shranjeno nikelj afinitetno kolono sprali najprej z 10–15 ml dodatno očiščene demineralizirane vode (destilirana voda MQ) in nato še s prefiltriranim vezavnim pufrom, ki vsebuje 20 mM imidazol, da smo preprečili nespecifične interakcije vezave proteinov na kolono. V prvi stopnji izolacije smo vzorec supernatanta s tarčnim proteinom s pomočjo črpalke FH30 Compact Pump Systems nanegli na nikelj afinitetno kolono. Kolona veže približno 40 mg proteina. Nanos vzorca na kolono je potekal pri pretoku 0,8 mL/min.

Da smo lahko eluirali tarčni protein s kolone, smo uporabili sistem tekočinske kromatografije za hitro ločevanje proteinov – FPLC. Črpalke se nahajajo v 20-odstotnem etanolu, zato smo celotni sistem najprej očistili z destilirano vodo MQ, nato pa smo skozi črpalko A spustili 40 ml vezavnega pufra, ki je s kolone spral nespecifične produkte (proteine brez histidinskega podaljška). Sledilo je spiranje kolone z elucijskim pufrom skozi črpalko B, ki je vseboval 300 mM imidazol in je spral specifično vezane proteine, vključno z našim. Ko smo opazili porast absorbance, smo usmerili eluat v mikrocentrifugirke, kjer smo zbirali frakcije po 1,2 mL. Parametri kromatografskega sistema za nanos vzorca so bili pretok, 1 mL/min in tlak, 0,6 Pa, ki je skozi elucijo naraščal ter prevodnost, ki jo je ustvarjala zadostna koncentracija soli. Po uporabi smo kolono in sistem FPLC sprali z destilirano vodo MQ in 20-odstotnim etanolom. Mikrocentrifugirke, v katerih so se nahajali eluati z najvišjo absorbanco, smo združili ter izmerili skupno absorbanco na UV-vis spektrofotometru NanoDrop pri valovni dolžini 280 nm. Sledili sta dializa in cepitev s peptidazo SUMO.

3.1.2.4.3 Dializa

Dializa je postopek ločevanja snovi skozi polprepustno celulozno membrano v smeri koncentracijskega gradienta. Molekule vode ter ioni oz. molekule topljencev z majhno molekularno maso lahko prehajajo iz dializnega črevesa v zunanjo raztopino, beljakovine pa, ker so večje od por, ostanejo v dializnem črevesu. (50)

Dializo smo izvedli z namenom razsoljevanja proteina in odstranitve imidazola, ki lahko negativno vpliva na aktivnost encima peptidaza SUMO. Dializno črevo smo napolnili z raztopino vzorca, ga na straneh dobro stisnili in speli z plastičnimi sponkicami ter potopili

v 2 L dializnega pufru. Pogoje za uspešno izolacijo in čistost našega proteina smo želeli doseči že v času dialize, zato smo koncentracijo soli med poskusi spreminjali. V prvem in drugem poskusu izolacije smo uporabili 150 mM NaCl in 20 mM Tris/HCl, pH 8, v tretjem poskusu pa smo 200 mM NaCl in 20 mM Tris/HCl, pH 8 dodali še 10-odstotni glicerol ter 1 mM DTT. Prehod topljencev je hitrejši, kadar dosežemo večjo koncentracijsko razliko; mi smo jo zagotovili z mešanjem z magnetnim mešalom. Dializa je potekala pri 4 °C čez noč oz. 16 ur.

3.1.2.4.4 Cepitev z encimom peptidaza SUMO in optimizacija danega postopka

Po dializi smo vzorec iz dializnega črevesa prelili v ustrezno centrifugirko in ga centrifugirali 15 minut pri 150 000 obr/min pri 4 °C. Pri tem so se posedli morebiti oborjeni delci našega proteina, količino preostalega proteina v supernatantu pa smo znova izmerili na UV-vis spektrofotometru NanoDrop. V prvem poskusu izolacije smo skušali optimizirati pogoje cepitve, zato smo celotni vzorec razdelili na tri dele. V vsak vzorec smo dodali 50× redčeno koncentracijo encima peptidaza SUMO ($\gamma = 16$ mg/ml) in 1 mM DTT ter pustili, da je cepitev potekala 2 uri pri 30 °C, čez noč pri 4 °C in prav tako čez noč pri sobni temperaturi. Po cepitvi smo vzorce nanesti na kolono IMAC. Hkrati smo shranili posamezne vzorce za poznejšo analizo z NaDS PAGE.

3.1.2.4.5 Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija 2 – po cepitvi s peptidazo SUMO

Cilj drugega nanosa vzorca na kolono IMAC je bil ločiti protein D-aspartat ligaza od histidinskega podaljška in proteina SUMO ter encima peptidaza SUMO. Da smo preprečili zamašitev kolone, smo vzorce centrifugirali 10 minut pri 5 000 obr/min pri 4 °C in jih hranili na ledu. Sledilo je spiranje kolone z destilirano vodo MQ ter vezavnim pufrom, zatem smo nanesti vzorec. Naš protein smo zbirali v čašo, na kolono pa sta preko polihistidinskega podaljška ostala vezana protein SUMO in peptidaza SUMO, ki smo ju eluirali s pretokom 5 mL elucijskega pufru skozi kolono. Med posameznimi vzorci, ki so bili izpostavljeni različnim pogojem cepitve, je bilo treba kolono spirati s 5 mL destilirano vodo MQ in 10 mL vezavnega pufru. Vzorce smo ponovno centrifugirali pri istih pogojih kot pred nanosom na kolono ter jim izmerili absorbanco. Vzorce smo shranili za analizo z NaDS PAGE.

3.1.2.4.6 Koncentriranje encima D-aspartat ligaza

Za koncentriranje proteinov poznamo več metod: dializo, precipitacijo/izsoljevanje z amonijevim sulfatom, kromatografijo in ultrafiltracijo skozi celulozno membrano. (53) S postopkom ultrafiltracije smo poskusili pridobiti večjo koncentracijo izoliranega proteina D-aspartat ligaza. Pred nanosom vzorca v ultrafilter je bilo treba membrano prepojit z destilirano vodo MQ in pufrom, v katerem je bil protein po dializi (150 mM NaCl in 20 mM Tris/HCl, pH 8 oz. 200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 10-odstotni glicerol, pH 8). Koncentriranje z ultrafiltrom Amicon Ultra 15 je potekalo pri 4 °C pri 5 000 obr/min 15 minut, pri čemer so delci, ki so bili manjši od por filtra (3 kDa), prehajali skozi membrano. Zaradi motnosti raztopine, ki je kazala na obarjanje proteina, smo se odločili, da bomo v nadaljevanju poskusili s postopnim koncentriranjem 500 µL proteina v ultrafiltru Amicon Ultra 0,5. Vzorec smo centrifugirali 5 minut pri 16 000 obr/min pri 4 °C in jih do nanosa na gelsko kolono shranili pri -20 °C.

3.1.2.4.7 Gelska izključitvena kromatografija (gelska filtracija)

Gelska izključitvena kromatografija je ločevalna tehnika, s katero glede na velikost por v koloni med sabo ločujemo manjše molekule od večjih. Deluje kot molekularno sito, skozi katero se delci ločujejo z različno velikostjo. Pri nanosu vzorca stopajo v pore manjše molekule, ki potujejo skozi kolono dlje časa kot večje, kajti te se eluirajo prve. (54)

Uporabljali smo kolono Superdex 200 10/300 GL oz. kolono Superdex 75 10/300 GL. Pred začetkom kromatografskega postopka, smo ustrezno pripravili celotni sistem FPLC in tudi samo kolono, ki se shranjuje v 20-odstotnem etanolu pri 4 °C. Najprej smo aparat AKTA explorer 10 skozi črpalko A spirali s 50 mL prefiltriranega pufra s sestavo 200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, 5-odstotni oz. 10-odstotni glicerol, pH 8. Nato smo gelsko kolono skozi črpalko B ekvilibrirali z istim pufrom. Da pri nanosu vzorca ne bi prišlo do zamašitve kolone, smo centrifugirali vzorec pri maksimalnem številu obratov (21 000 obr/min) 10 minut pri 4 °C. Parametri, po katerih smo eluirali naš vzorec v frakcijah po 1,3 mL, so bili: pretok 0,4 mL/min in tlak 1,4 MPa, ki je ob eluciji proteina porastel. Frakcije, pri katerih smo zaznali signal, smo združili in izmerili absorbanco na UV-vis spektrofotometru NanoDrop. Po končani gelski filtraciji, smo kolono sprali z destilirano vodo MQ in jo znova shranili v 20-odstotnem etanolu pri 4 °C.

3.1.2.4.8 Kvantitativna ocena izoliranega proteina na UV-vis spektrofotometru NanoDrop

Nukleinske kisline, proteini in nekatere druge biološke molekule absorbirajo svetlobo UV spektra, zato lahko UV-vis spektrofotometrijo izkoriščamo za merjenje njihovih koncentracij. Nukleinske kisline imajo najvišjo absorbanco pri valovni dolžini 260 nm, medtem ko smo absorbanco proteinov merili pri 280 nm. (55)

Koncentracijo proteina smo med celotnim postopkom izolacije in čiščenja preverjali na UV-vis spektrofotometru NanoDrop. Aparat smo kalibrirali na začetno vrednost 0 (slepi vzorec je bila destilirana voda MQ), nato smo nanj odpipetirali 2 μ L vzorca. Za preračun koncentracije smo uporabili:

$$A = \varepsilon \times c \times l \longrightarrow \gamma(g/L) = c \times M$$

Enačba 1: Beer-Lambertov zakon in izračun koncentracije.

$l = 1$ cm; fuzijski protein $\varepsilon = 57\,440$ $\text{lcm}^{-1}/\text{mol}$, $M = 61\,842$ g/mol; Asl_{fin} $\varepsilon = 55\,950$ l/molcm , $M = 49\,450$ g/mol

3.1.2.4.9 Poliakrilamidna gelska elektroforeza ob navzočnosti NaDS

Čistost in stabilnost proteina smo vrednotili z NaDS PAGE, vrsto elektroforeze, ki s pomočjo elektroforetskega nosilca – poliakrilamidnega gela – deluje kot molekularno sito: različno zadržuje vzorec glede na velikost in obliko. Proteinskemu vzorcu pri analizi z NaDS PAGE najprej dodamo detergent natrijev dodecilsulfat, ki se nespecifično veže na protein, proteinske molekule denaturira in jih negativno nabije. Ta korak omogoči, da se elektroforezna gibljivost v električnem polju opravi le zaradi zamreženosti gela in je mobilnost proteinov v poliakrilamidnem gelu odvisna izključno od njihove mase. Stopnja zamreženosti gela lahko vpliva na hitrost potovanja molekul: manjše molekule hitreje potujejo skozi pore gela, večje molekule pa počasneje. Poleg vzorca nanašamo na gel tudi proteinski standard, s katerim ocenimo molekulsko maso proteina. (45, 55)

Za izvedbo potrebujemo dva različno zamrežena gela. Zgornji, koncentracijski gel je manj zamrežen in omogoči, da se molekule, ki jih nanesemo v žepek skoncentrirajo na enak začetni položaj in enakomerno prehajajo v spodnji, ločevalni gel, namenjen ločbi proteinov. Delo smo opravljali v laminarju, saj je amonijev persulfat (APS) močan oksidant in je škodljiv za zdravje. Polimerizacija akrilamida:bisakrilamida je katalizirana z ustreznim razmerjem tetrametiletildiamina (TEMED) in APS-a. (55) Posamezne komponente smo zmešali v čaši in tekoč gel vlili med tesnjena stekelca. Najprej smo vlili

ločevalni gel, nanj pa dolili dH₂O, da smo izravnali površino gela in preprečili izsuševanje. Po 30 minutah, ko se je gel strdil, smo dH₂O odlili in dolili še koncentracijski gel, v katerega smo vstavili glavniček z 10 zobci. Po končani reakciji polimerizacije smo zobce odstranili in gel zavili v vlažno papirnato brisačo ter ga shranili pri temperaturi 4–8 °C. Na gel smo nanесли volumen vzorcev, preračunan za 5–6 µg zelenega proteina (izjema je vzorec iz minimalnega gojišča MDG). Za izračun volumna na gel nanesenih vzorcev smo uporabili enačbo:

$$V (mL) = m/Y$$

Enačba 2: Izračun volumna na poliakrilamidni gel nanesenih vzorcev.

Vzorec iz minimalnega gojišča MDG smo pripravili po naslednjem postopku: v hladilniku shranjeno bakterijsko kulturo smo prenesli v mikrocentrifugirko in jo centrifugirali na 3 000 obr/min 5 minut. Supernatant smo zavrgli, pelet celic pa resuspendirali v dH₂O. Ponovno smo sonificirali in centrifugirali, tokrat pri 10 000 obr/min. Obdržali smo supernatant. Vsem vzorcem smo dodali 1× nanašalni pufer. Vzorce smo pred izvedbo elektroforeze inkubirali v vreli vodi, kar je povzročilo denaturacijo proteinov in enakomeren negativni naboj okoli njih. Elektroforeza je potekala v kadički, kamor smo vstavili gela ter ju prekrili z 1× NaDS pufrom, pri toku 35 mA in maksimalni napetosti. Po končani elektroforezi je sledila detekcija tarčnih proteinov z barvilom Coomassie Brilliant Blue. Barvilo je hidrofobno in se raztaplja v etanolu. Predno smo barvilo uporabili za barvanje gelov, smo 20 ml barvne raztopine razredčili z 20 ml 20-odstotne očetne kisline in jo zlili v stekleno petrijevko. V barvilu prisotna očetna kislina (negativni naboj) je omogočila vezavo barvila na pozitivno nabite AK (lizin, arginin in histidin) in protein se je obarval modro. Gele smo inkubirali na stresalniku 30–45 minut, nato smo barvilo odlili, jih rahlo sprali z dH₂O ter jih za nadaljnjih 30 minut prenesli v raztopino za razbarvanje (30-odstotni etanol, 10-odstotna očetna kislina). Gele smo dodatno razbarvali v dH₂O čez noč in jih naslednji dan skenirali z UV-vis transiluminatorjem MiniBIS Pro.

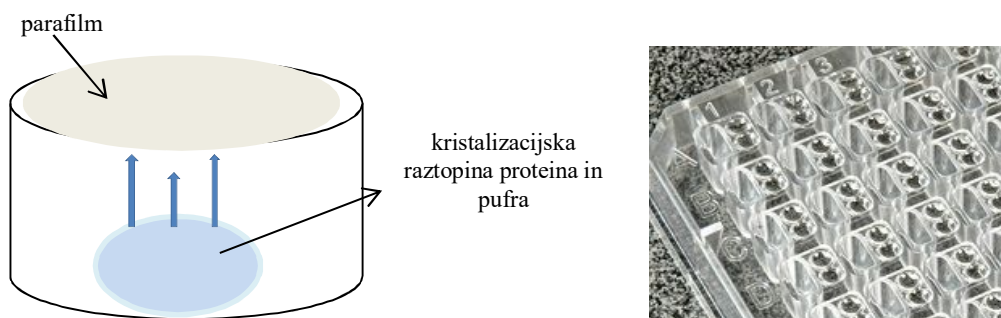
3.1.2.4.10 Kristalizacija

Pri nastanku kristala prihaja do fazne spremembe tekoče v trdno, in da dobimo kristale katere koli spojine, tudi najpreprostejše (npr. kristali NaCl), moramo doseči stanje prenasičenosti. Za molekule je to termodinamsko nestabilno stanje, ob vračanju v stabilno

stanje pa del topljenca tvori medmolekulske vezi, prihaja do urejanja atomov v prostoru, kar se kaže kot nastanek kristalinične (urejeno stanje – kristali) ali amorfne faze (neurejeno stanje – oborina). (57, 58) Proces določevanja 3D strukture makromolekul z rentgensko difrakcijo delimo na: pripravo in čiščenje proteina (pri večini proteinov zadostuje koncentracija 5–10 mg/mL), kristalizacijo proteina – nukleacijo, rast in ustavitev rasti kristala, zbiranje podatkov – snemanje difrakcijskega vzorca in določevanje 3D strukture proteina. Uspešen kristalizacijski proces se začne pri izbiri ustreznega ekspresijskega sistema in nastanka rekombinantnega proteina z visokim nivojem izražanja, topnosti, kristalizabilnosti itd. Potek in končni rezultat tega procesa sta nato odvisna od fizikalnih, kemijskih in biokemijskih lastnosti, med katerimi so najpomembnejše čistost proteina (odsotnost pomožnih kofaktorjev, zaviralcev, kovinskih ionov) in njegova koncentracija, izoelektrična točka, koncentracija in tip v pufri navzoče soli, pH pufra, temperatura, gostota in viskoznost raztopine, tip površine, električno in magnetno polje, vibracije, čas itd. Ti parametri vplivajo na topnost proteina, zmožnost nastanka ugodnih medmolekulskih kontaktov ter strukturo proteina. Vzorec proteina skoncentriramo in zmešamo s komercialno dostopnim kristalizacijskim pufrom, ki ga sestavljajo precipitant – najpogosteje sol (npr. amonijev sulfat) ali organska molekula (npr. (poli)etilen glikol) – snovi s puferskimi lastnostmi ter dodatki, kot so detergenti, organska topila itd. Najpogosteje uporabljene tehnike, s katerimi lahko dosežemo stanje prenasičenosti, so difuzija preko hlapov (viseča kapljica, sedeča kapljica ali sendvič-kapljica) in šaržne metode (*angl. batch methods*). (57, 58) Da dobimo ustrezne kristale proteina moramo običajno preizkusiti veliko različnih kristalizacijskih pogojev. Za kristalizacijo se uporabljajo kristalizacijske plošče v formatu z 48 ali 96 luknjicami, postopki priprave so lahko avtomatizirani, kar nam omogoči delo z minimalno količino vzorca, hkrati pa prihranimo čas in material.

Kristalizacijski postopek smo začeli pri odmrznenju in centrifugiranju proteinskega vzorca (21 000 obr/min, 10 minut pri 4 °C). Izvajali smo ga na ploščah s 96 luknjicami (A–H, 1–12), ki se znotraj delijo na 3. Na začetku smo s pipeto v vsako od podluknjic nanegli 30 µL pripravljenega kristalizacijskega pufra (priloga B), nato pa v sosednjo s kristalizacijskim robotom dodali 0,15 µL proteina ter 0,15 µL pufra iz prve. Uporabili smo šaržno metodo, pri kateri raztopino proteina zmešamo s kristalizacijskim pufrom, kapljico pa nato prekrijemo s plastjo parafilma, da preprečimo evaporizacijo. (slika 11)

Protein smo skušali skristalizirati 2-krat po enakem postopku priprave, spremenili smo le pufirske pogoje (1. structure screen 1 – MD1-01, structure screen 2 – MD1-02 in 2. PACT premier™ – MD1-29). Inkubacija je potekala v inkubatorju za kristalizacijske plošče Molecular Dimensions pri 21 °C tri tedne. S stereomikroskopom smo dnevno/tedensko spremljali rezultate in jih kvalitativno ocenili z oznakami: (0) prazna kapljica; (1) smet, npr. vlakno tkanine; (2–4) različne stopnje obarjanja ter kristalinična, amorfna in gelatinozna oborina; (5) ločitev faz; (6) sferuliti; (7) igličasti oz. paličasti kristali; (8) ploščice oz. ploščati kristali; (9) kristali, ki so izrazito rasli v vseh treh dimenzijah. (57)



Slika 11: Prikaz šaržne metode (levo) in uporabljena kristalizacijska plošča (desno).

3.2 TESTI ENCIMSKE AKTIVNOSTI *IN VITRO*

3.2.1 Material

3.2.1.1 Kemikalije

Tabela VII: Kemikalije uporabljene pri testih encimske aktivnosti.

Reagent	Proizvajalec/vir
UM5K	IBBMC, Universite de Paris-Sud, Orsay, Francija
dimetilsulfoksid (DMSO)	Fluka
D-aspartat, ADP, ATP, NADH, fosfoenolpiruvat (PEP), piruvat kinaza (PK)	Sigma Aldrich
laktat dehidrogenaza (LDH)	Roche

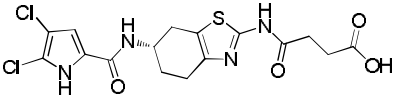
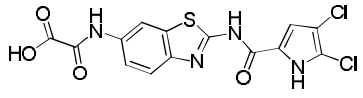
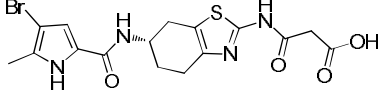
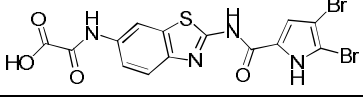
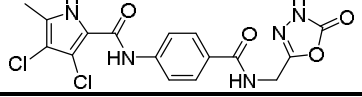
3.2.1.2 Laboratorijska oprema

Tabela VIII: Laboratorijska oprema.

Oprema	Proizvajalec
UV-vis spektrofotometer dual beam s Peltierjevim členom za termostatiranje	Perkin-Elmer Lambda 45
pipete	Ependorf
tehtnica (natančnost 0,01 mg)	Mettler

3.2.1.3 Strukture testiranih zaviralcev encima DNA giraza B

Tabela IX: Strukture izbranih ATP kompetitivnih zaviralcev encima DNA giraza B.

Zap. št. Spojine	Oznaka spojine	Struktura spojine	Molska masa (g/mol)
<u>1</u>	THT-19		431,29
<u>2</u>	KMG-15		399,20
<u>3</u>	TCF-4b		441,30
<u>4</u>	KMG-9		488,11
<u>5</u>	NNS-30		410,21

3.2.2 Encimski testi

Po uspešni izolaciji bakterijskega encima D-aspartat ligaza smo z encimskim testom *in vitro* najprej ovrednotili katalitično aktivnost pripravljenega encima D-aspartat ligaza, nato pa še določili zaviralno aktivnost izbranih ATP kompetitivnih zaviralcev encima DNA giraza B. Testirane zaviralce DNA giraze B smo izbrali v knjižnjici spojin Fakultete za farmacijo. Pripravljene spojine so bile raztopljene v DMSO, v končni koncentraciji 250 μ M. Metoda, s katero smo ocenjevali reakcijske spremembe, je UV-vis spektrofotometrija. Za izvedbo encimskega testa smo uporabljali fotometrično kiveto ($l = 1$ cm) in UV-vis spektrofotometer Perkin-Elmer Lambda 45, dual beam s Peltierjevim členom za termostatanje pri 37 °C.

V večini encimskih testov sodeluje večje število substratov, kofaktorjev, aktivatorjev in reagentov za stabilizacijo encima in jih dodajamo v encimsko reakcijo zaporedoma, vse do zadnje komponente, ki reakcijo sproži. (60) D-aspartat ligaza katalizira od ATP odvisno tvorbo peptidne vezi med karboksilno skupino D-Asp in ϵ -amino skupino L-Lys na tretjem mestu substrata UDP-MurNAc pentapeptida (UM5K). Encimski test za vrednotenje katalitične aktivnosti našega encima je temeljil na reakciji, v kateri je bila regeneracija hidroliziranega ATP sklopljena z oksidacijo NADH. Reakcijski zmesi, ki je vsebovala Tris/HCl puffer, pH 8, $MgCl_2$, PEP, NADH, D-Asp in ATP, smo dodali UM5K in zmes

encimov LDH in PK ter jo 3–5 minut inkubirali na 37 °C. (tabela X) Z merjenjem absorbance smo začeli ob dodatku zadnje komponente, encima D-aspartat ligaza v reakcijo. Spremljali smo padec absorbance zaradi oksidacije NADH pri valovni dolžini 340 nm, ki je proporcionalen količini hidroliziranega ATP.

Reakcija testa encimske aktivnosti encima D-aspartat ligaza *in vitro*:

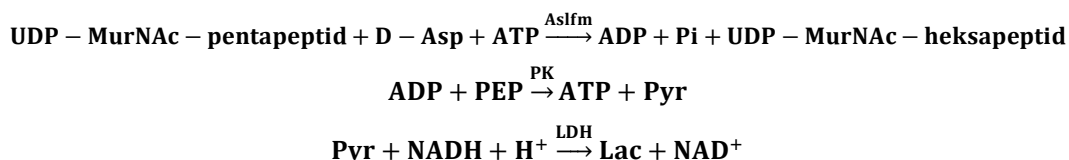


Tabela X: Koncentracije komponent reakcijske mešanice, potrebne za izvedbo encimskega testa aktivnosti D-aspartat ligaze, s končnim volumnom 300 µL.

Reakcijska mešanica	Končna koncentracija (mM)	Volumen (µL)
MgCl ₂ (1 M)	50	15
PEP (20 mM)	2	30
ATP (10 mM)	1	30
NADH (50 mM)	1	6
D-Asp (10 mM)	1	30
UM5K (0,02 M)	0,5	7,5
zmes encimov LDH in PK	-	10
Tris/HCl (0,5 M, pH 8)	-	prilagojeno končnemu volumnu
	Končna koncentracija (µM)	
Asl _{fm} (39 µM)	2,6	20
	5,2	40
	10,4	80
	15,6	120

Zanesljivost meritev encimskih testov smo zagotovili s kalibracijo aparata, izvedbo slepe reakcije (komponente reakcijske mešanice brez encima D-aspartat ligaza) in detekcijske reakcije, ki v encimski reakciji z D-aspartat ligazo predstavlja regeneracijski sistem. UV-vis spektrofotometer smo kalibrirali z različnimi koncentracijami NADH in detektirali spremembo absorbance v odvisnosti od dodane koncentracije NADH. V reakciji detekcije sodelujejo le substrati regeneracijskega sistema. Regeneracijski sistem sestavljata PEP in encim PK, ki pretvori PEP do piruvata ob tem pa se ADP pretvori nazaj do ATP. Nastali piruvat se z encimom LDH pretvori do laktata in ob tem se oksidira molekula NADH. (tabela XI) Pomembno je, da so encimi detekcijske reakcije (LDH in PK) navzoči v presežku in da ti pogoji ne omejujejo katalitične aktivnosti osnovnega encima (D-aspartat ligaza).

Reakcija detekcije:

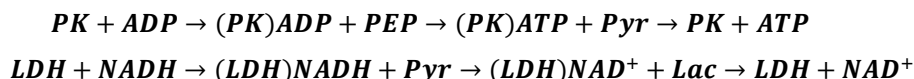


Tabela XI: Koncentracije komponent reakcijske mešanice, potrebne za izvedbo detekcijske reakcije, s končnim volumnom 300 μ L.

Reakcijska mešanica	Končna koncentracija (mM)	Volumni (μ L)
MgCl ₂ (1 M)	50	15
PEP (20 mM)	2	30
NADH (50 mM)	1	6
ADP (0,1 M)	1	3
zmes encimov LDH in PK	-	10
Tris/HCl (0,5 M, pH 8)	-	236
Σ	-	300

Ob dodatku zaviralcev v reakcijsko zmes se katalitična aktivnost encima D-aspartat ligaza zniža, zato je količina hidroliziranega ATP manjša v primerjavi s kontrolo brez zaviralca. Delovanje zaviralcev izrazimo z rezidualno aktivnostjo (RA), ki predstavlja razmerje med katalitično aktivnostjo encima ob dodatku zaviralca in v njegovi odsotnosti, v našem primeru pri 250 μ M koncentraciji zaviralca. (tabela XII)

Tabela XII: Koncentracije in volumni komponent, potrebni za izvedbo testa katalitične aktivnosti encima D-aspartat ligaza brez in z zaviralcem, s končnim volumnom 150 μ L.

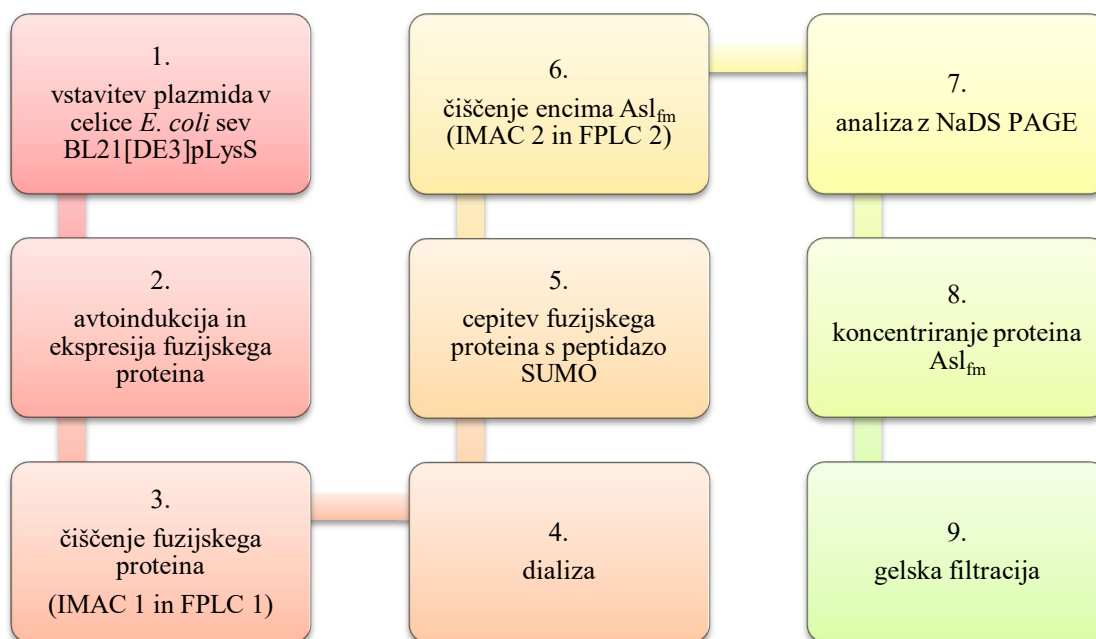
Reakcijska mešanica	Končna koncentracija	Kontrola (μ L)	Zaviralec (μ L)
MgCl ₂ (1 M)	50 Mm	7,5	7,5
PEP (20 mM)	1 mM	7,5	7,5
NADH (1 mM)	0,1 mM	15	15
D-Asp (10 mM)	1 mM	15	15
ATP (10 mM)	1 mM	15	15
Σ		119,8	119,8
UM5K (0,02 M)	0,5 mM	3,7	3,7
DMSO	5 %	7,5	3,75
zaviralec (10 mM)	250 μ M	0	3,75
zmes encimov LDH in PK	-	10	10
Tris/HCl (0,5 M, pH 8)	198 mM	59,8	59,8
3–5 minutna inkubacija pri sobni temperaturi, nato smo dodali encim D-aspartat ligaza.			
Asl _{fm} (87 μ M)	5,2 μ M	9	9
Σ		150	150

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 IZOLACIJA ENCIMA D-ASPARTAT LIGAZA

Postopek priprave encima D-aspartat ligaza je potekal v osmih korakih. Rezultate postopka, morebitne težave in rešitve bomo predstavili v nadaljevanju. (tabela XIII)

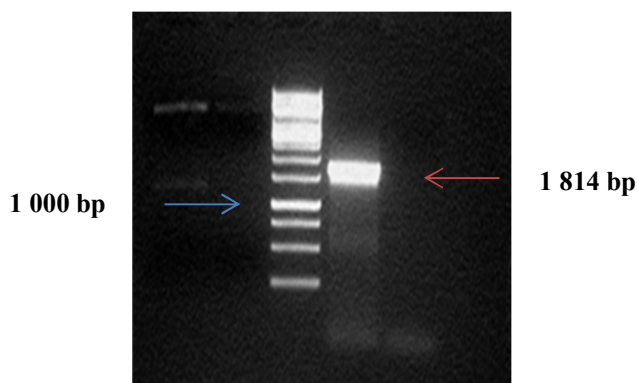
Tabela XIII: Proces priprave encima D-aspartat ligaza.



1. Vstavitev plazmida pE–SUMO v gostiteljske celice *E. coli* sev BL21[DE3]pLysS.

Postopek izolacije tarčnega encima smo začeli na stopnji transformacije plazmida pE–SUMO z zapisom za bakterijski encim D-aspartat ligaza v gostiteljske celice *E. coli* sev BL21[DE3]pLysS. Glavni dejavniki, ki so pripomogli k uspešni transformaciji, so bili delo na ledu za dobro kompetentnost celic, zagotavljanje aseptičnega okolja, primerna temperatura za toplotni šok in uporaba pravega antibiotika za uspešno selekcijo. Uspešnost transformacije smo potrdili z izvedbo PCR bakterijskih kolonij in agarozne elektroforeze. Naš cilj je bil detektirati tiste bakterijske kolonije, ki imajo vstavljene plazmide z ustreznim zapisom.

Rezultati so prikazani na sliki 12.



Slika 12: Agarozna elektroforeza. Na 1-odstotni agarozni gel smo od leve proti desni nanegli Gene Ruler 1 kb DNA Ladder standard in vzorec DNA. Modra puščica kaže velikost standarda 1 000 bp, rdeča puščica prikazuje pomnoženo zaporedje za protein SUMO in bakterijski encim D-aspartat ligaza velikosti 1 814 bp. Elektroforeza je potekala v puferskem sistemu TAE 30 minut pri napetosti 90 V.

2. Avtoindukcija in ekspresija fuzijskega proteina.

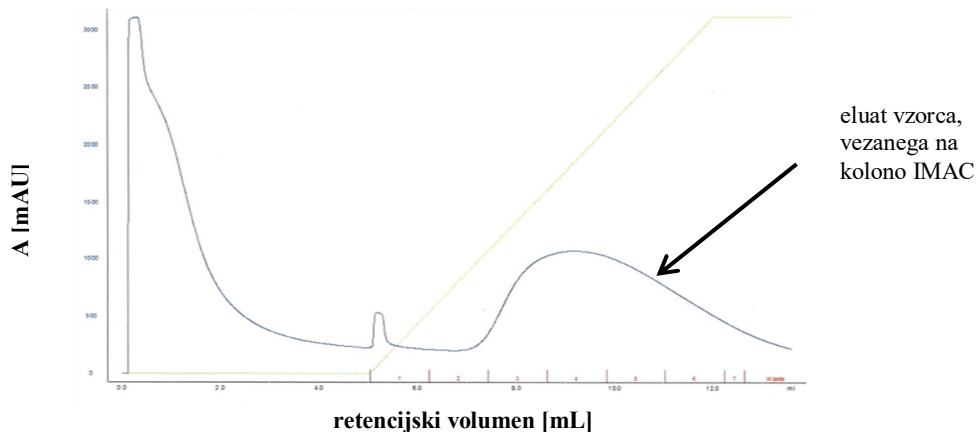
Transformaciji bakterijskega encima D-aspartat ligaza v gostiteljske celice je sledila avtoindukcija. Na tej stopnji smo s pripravo ustreznih avtoinducibilnih gojišč želeli doseči izražanje rekombinantnega fuzijskega proteina. S povečevanjem koncentracije celic se je povečevala motnost gojišča. 20× redčeni avtoinducirani bakterijski kulturi smo merili optično gostoto pri valovni dolžini 600 nm. Želene vrednosti so bile med 0,3 in 0,6. Pripravljeno bakterijsko suspenzijo smo do uporabe shranili pri -80°C .

3. Čiščenje fuzijskega proteina (IMAC in FPLC).

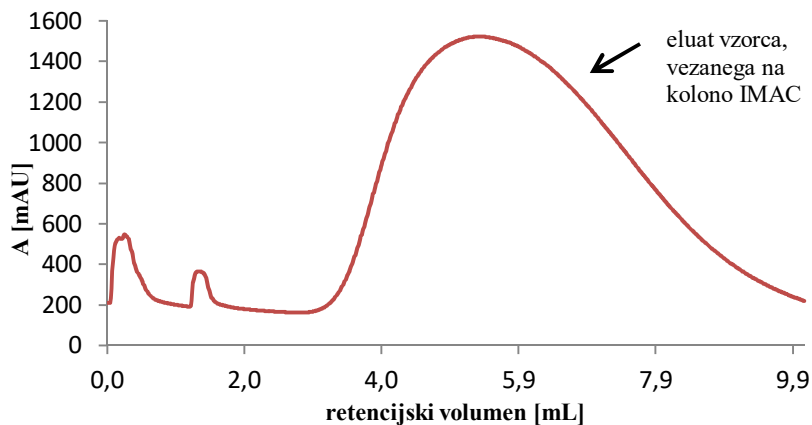
V vseh treh poskusih odtajanja in razbitja celic ter ekstrakcije topnega fuzijskega proteina smo morali paziti, da ne bi prihajalo do denaturacije proteina. Delo je zato ves čas potekalo na ledu, v premorih med ultrazvočno obdelavo vzorca pa smo z rahlim mešanjem suspenzije skušali preprečiti pregretje vzorca. Zbrali smo frakcijo lizata, topno frakcijo in vzorec peleta celic za nadaljno analizo z NaDS PAGE. (slika 15, slika 16)

Pomemben korak pri izolaciji proteina je bil nanos na kolono IMAC. Na črpalko FH30 Compact Pump Systems smo pritrdili kolono, pri tem pa smo morali paziti, da ni prišlo do vnosa zraka. V prvem poskusu izolacije je pri nanosu vzorca fuzijskega proteina na kolono IMAC prišlo do vnosa zraka, kar je povzročilo penjenje. Posledica je bila izguba proteina, zračni mehurčki pa lahko v takem primeru poškodujejo tudi kolono. Sledila je elucija vzorca s kolone z uporabo sistema FPLC. Mikrocentrifugirke v katerih so bili eluati s

najvišjo absorpcijsko vrednostjo smo združili ter izmerili absorbanco pri 280 nm. Postopek smo izvedli 3-krat po istem protokolu in prikazani rezultati so ponovljivi. (slika 13, slika 14, tabela XIV) Zbrane vzorce nevezane in sprane frakcije smo shranili za analizo z NaDS PAGE. (slika 15, slika 16)



Slika 13: FPLC 1. Elucija rekombinantnega fuzijskega proteina po nanosu na kolono IMAC in sistem FPLC pri prvem poskusu izolacije encima D-aspartat ligaza. Na sliki je označen porast absorbance eluata vzorca vezanega na kolono IMAC, pri 280 nm.



Slika 14: FPLC 2. Elucija rekombinantnega fuzijskega proteina po nanosu na kolono IMAC in sistem FPLC pri drugem in tretjem poskusu izolacije encima D-aspartat ligaza. Na sliki je označen porast absorbance eluata vzorca, vezanega na kolono IMAC, pri 280 nm.

Tabela XIV: Koncentracija vzorca eluata fuzijskega proteina po nanosu na FPLC pred dializo pri treh poskutih izolacije encima D-aspartat ligaza.

	Volumen eluata (mL)	Absorbanca ($\lambda = 280 \text{ nm}$)	Koncentracija (g/L)
Izolacija 1	5	2,0	2,1
Izolacija 2	6	3,0	3,2
Izolacija 3	5,5	2,5	2,7

4. Optimizacija dializnega pufru.

Za korak cepitve fuzijskega proteina z encimom peptidaza SUMO, ki se je nahajal v pufru 500 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 20 mM imidazol, pH 7,4, je bilo treba zamenjati puferske pogoje, s katerimi bi zmanjšali koncentracijo soli in odstranili imidazol. Za ta namen smo v vseh treh poskusih izolacije uporabili metodo dialize.

Pri čiščenju proteina je pomembno, da ostane topen in aktiven med celotnim procesom. Dejavnike, ki smo jih morali upoštevati pri optimizaciji puferskega sistema, so bili ustrezen pH, sol, reducenti in stabilizatorji. Vpliv pH na stabilnost proteina v raztopini se kaže prek elektrostatskega naboja na njegovi površini. Pri pripravi dializata se izogibamo skrajnih vrednosti pH in vrednosti pH, ki je enak izoelektrični točki proteina (neto naboj je nevtralen), ker prihaja do agregacije. (59) Izoelektrična točka encima D-aspartat ligaza je 5,45, zato smo pripravljali pufre pH 7,4–8,0. Glavne sile, ki stabilizirajo 3D strukturo proteina, so hidrofobne interakcije med stranskimi skupinami nepolarnih AK. Dodatek soli lahko stabilizira ali destabilizira protein; da bi dosegli boljšo stabilnost proteina smo skušali optimizirati koncentracijo soli in pri tem upoštevali dejstvo, da bi lahko previsoka koncentracija soli zaradi *t. i.* termodinamsko neugodnih pogojev (v razvitem proteinu hidrofobne AK ne morejo tvoriti H-vezi z vodo, ni stabilizirajočih interakcij med vodo in stranskimi skupinami polipeptidne verige) pripeljala do precipitacije proteina. (59, 60)

Priporočena koncentracija soli za optimalno stabilizacijo proteina je 150–500 mM NaCl. Višja koncentracija soli preprečuje nespecifične interakcije med proteinom in kolono IMAC, vendar smo morali upoštevati tudi dejstvo, da je aktivnost peptidaze SUMO optimalna pri pogojih 150–300 mM NaCl. Koncentracijo soli 150 mM smo uporabili 2-krat. Med procesom priprave encima D-aspartat ligaza v prvem in drugem poskusu izolacije, smo prišli do zaključka, da se protein izgublja, in zato smo v tretjem poskusu pripravili dializni pufer z 200 mM NaCl.

Prejšnje raziskave kažejo, da je protein D-aspartat ligaza najbolj obstojen v pufru z dodatkom stabilizatorja 50-odstotnega glicerola, še posebej pri večdnevem shranjevanju. (27) Mi smo v stopnji dialize dodali 10-odstotni glicerol šele v tretjem poskusu izolacije, večje koncentracije pa nismo uporabili zaradi prevelike viskoznosti, ki bi pozneje lahko otežila avtomatiziran proces kristalizacije proteina.

Dodatek reducenta 1 mM DTT je koristil tako stabilnosti encima D-aspartat ligaza, kot tudi katalitični aktivnosti encima peptidaza SUMO.

Dializni pufer je v prvih dveh poskusih vseboval 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 8, v tretjem poskusu smo spremenili pogoje (200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 8, 10-odstotni glicerol, 1 mM DTT) in izkazalo se je, da dializni pufer 3 omogoča boljše topnost in stabilnost proteina. (tabela XV)

Tabela XV: Koncentracija fuzijskega proteina po postopku dialize pri treh poskusih izolacije encima D-aspartat ligaza.

	Volumen vzorca (ml)	Absorbanca ($\lambda = 280$ nm)	Koncentracija (g/L)
Izolacija 1	5	1,5	1,6
Izolacija 2	6	2,5	2,7
Izolacija 3	4	2,9	3,1

5. Cepitev fuzijskega proteina z encimom peptidaza SUMO.

Izolacijo smo nadaljevali s cepitvijo fuzijskega proteina z encimom peptidaza SUMO. Najugodnejše pogoje cepitve poznamo (pufer 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 8, 10-odstotni glicerol in 1 DTT, 30 °C, 1 ura), hkrati pa priporočila dopuščajo možnost optimizacije danega postopka za vsak encim posebej. Zato smo si za cilj prve izolacije encima D-aspartat ligaza postavili nalogo, da poiščemo primerne pogoje za naš tarčni protein, ki bodo hkrati združljivi s stabilnostjo encima D-aspartat ligaza in časovnim prihrankom. Za doseg dobrega rezultata cepitve smo spreminjali temperaturo in čas inkubacije. V skladu z rezultati v prvem poskusu izolacije smo se odločili za pogoj cepitve pri temperaturi 30 °C in dveurnem intervalu. (tabela XVI) S ponovitvijo temperaturne optimizacije cepitve tarčnega encima s peptidazo še v drugem poskusu izolacije smo želeli potrditi svojo odločitev.

Tabela XVI: Rezultati cepitve fuzijskega proteina z encimom peptidaza SUMO pred nanosom na kolono IMAC (pri različnih temperaturah in časovnih intervalih) pri treh poskusih izolacije encima D-aspartat ligaza.

	Absorbanca ($\lambda = 280$ nm)			Koncentracija (g/L)		
	poskus 1	poskus 2	poskus 3	poskus 1	poskus 2	poskus 3
Sobna T čez noč (16 h)	1,5	1,0	-	1,6	1,1	-
4 °C čez noč (16 h)	1,0	1,3	-	1,1	1,4	-
30 °C 2 h	1,1	3,4	3,2	1,2	3,6	3,4

6. Čiščenje tarčnega proteina D-aspartat ligaza.

Za kritičen korak po cepitvi z encimom peptidaza SUMO se je izkazal nanos vzorca na kolono IMAC. (Tabela XVII) Koncentracija encima D-aspartat ligaza je pred izvedbo kovinsko afinitetne kromatografije občutno višja kot po nanosu. Pomembni dejavniki, od katerih je bila odvisna stabilnost našega encima pri nanosu na kolono, so bili zagotavljanje ustrezne koncentracije soli ali stabilizatorja glicerola v vzorcu, delo na ledu, navzočnost zraka v koloni in (ne)ustrezni pretok vzorca skozi kolono.

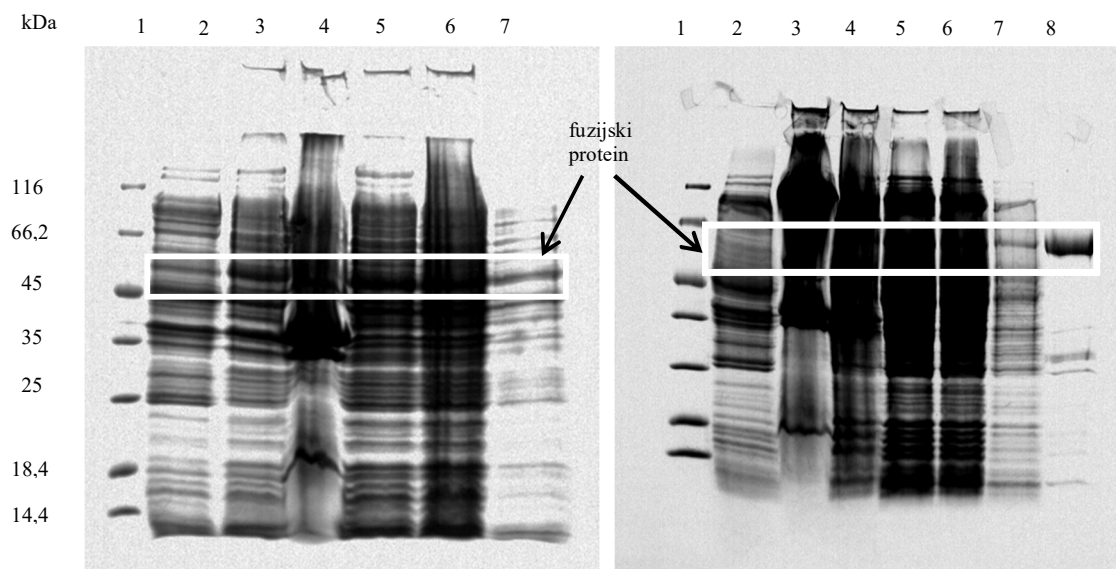
Tabela XVII: Rezultati cepitve fuzijskega proteina z encimom peptidaza SUMO po nanosu na kolono IMAC (pri različnih temperaturah in časovnih intervalih) pri treh poskusih izolacije encima D-aspartat ligaza.

	Absorbanca $Asl_{fm}(\lambda = 280 \text{ nm})$			Koncentracija $Asl_{fm} \text{ (g/L)}$		
	poskus 1	poskus 2	poskus 3	poskus 1	poskus 2	poskus 3
Sobna T čez noč (16 h)	0,5	-	-	0,4	-	-
4 °C čez noč (16 h)	0,5	-	-	0,4	-	-
30 °C 2 h	0,6	1,9	1,5	0,5	1,7	1,3

7. Analiza z NaDS PAGE.

Analizirali smo kakovost indukcije, ultrazvočne obdelave vzorca, vezave in elucije vezanega fuzijskega proteina na kolono IMAC. Na gel smo nanесли vzorec:

- standarda,
- MDG (tj. vzorec gojišča, kjer se protein še ne izraža)
- lizata (tj. vzorec po sonifikaciji, ki združuje topno in netopno frakcijo; preverjali smo raven izražanja proteina),
- topne frakcije (tj. vzorec supernatanta, kjer se nahaja naš protein; pokaže nam, ali je ekspresija uspešna),
- peleta celic (tj. usedlina celic po centrifugiranju; preverimo, ali je vzorec dobro sonificiran),
- nevezane frakcije (tj. frakcija, ki ostane po prvem nanosu na kolono IMAC, pred cepitvijo z encimom peptidaza SUMO; preverimo ali je bila kapaciteta kolone presežena),
- sprane frakcije (tj. vzorec nespecifično vezanih proteinov na koloni IMAC, po nanosu na sistem FPLC). (slika 16)



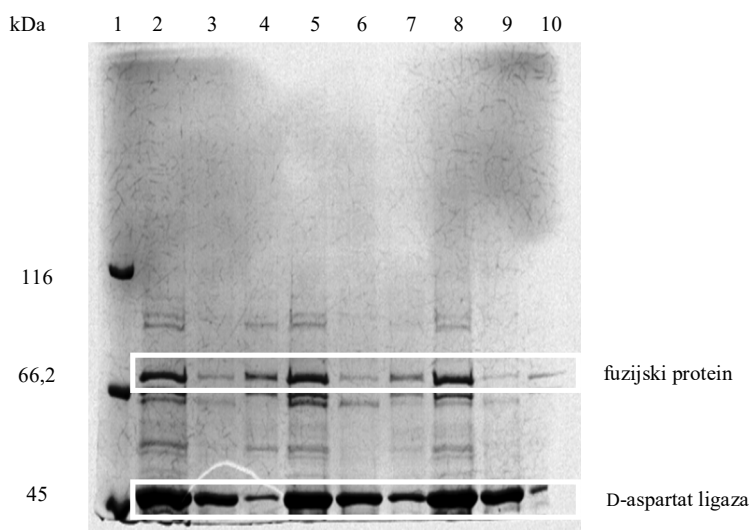
Slika 15: NaDS PAGE – 1. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza pred postopkom dialize. 1. standard Unstained protein MW marker, 2. vzorec iz gojišča MDG, 3. lizat, 4. pelet celic, 5. topna frakcija, 6. nevezna frakcija, 7. sprana frakcija. Velikost fuzijskega proteina je 62 kDa. Elektroforeza je potekala pri toku 35 mA in maksimalni napetosti.

Slika 16: NaDS PAGE – 2. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza pred postopkom dialize. 1. standard Unstained protein MW marker, 2. vzorec iz gojišča MDG, 3. lizat, 4. pelet celic, 5. topna frakcija, 6. nevezna frakcija, 7. sprana frakcija, 8. frakcija fuzijskega proteina pred cepitvijo z encimom peptidaza SUMO po nanosu na kolono IMAC. Velikost fuzijskega proteina je 62 kDa. Elektroforeza je potekala pri toku 35 mA in maksimalni napetosti.

V drugem poskusu izolacije encima D-aspartat ligaza smo na gel za primerjavo dodali osmi vzorec – očiščen fuzijski rekombinantni protein pred cepitvijo z encimom peptidaza SUMO. (slika 16) Iz slike je zelo težko razvidno, na katerih mestih se nahaja rekombinantni fuzijski protein, saj se je gel pri barvanju s Coomassie Brilliant Blue premočno obarval, lahko pa s pomočjo osmega vzorca sklepamo o položaju.

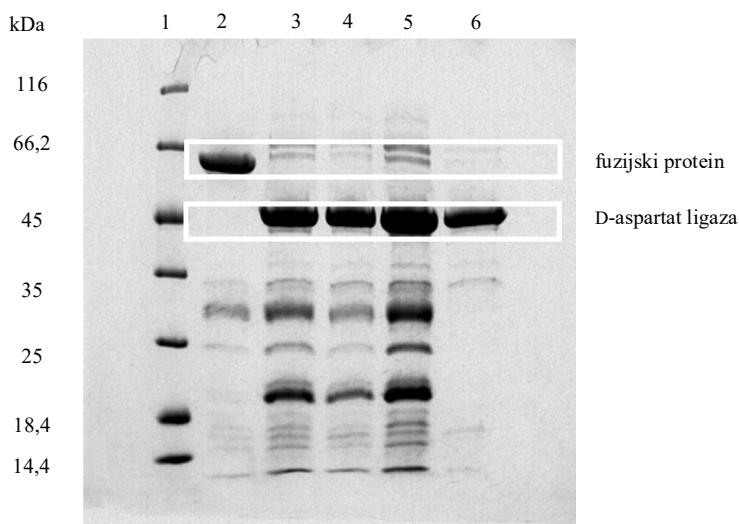
V nadaljevanju prikazujemo na gelih kakovost cepitve fuzijskega proteina z encimom peptidaza SUMO in kakovost izvedb kovinsko afinitetne kromatografije po cepitvi. (slika 17, slika 18, slika 19)

Med pripravo 12,5-odstotnega gela na sliki 17 je prišlo do napake. Po rezultatih sklepamo, da gel ni bil dovolj zamrežen, kajti v enakem časovnem intervalu kot smo opravljali ostale analize, so molekule manjše od 45 kDa prepotovale daljšo razdaljo in se izločile iz gela.



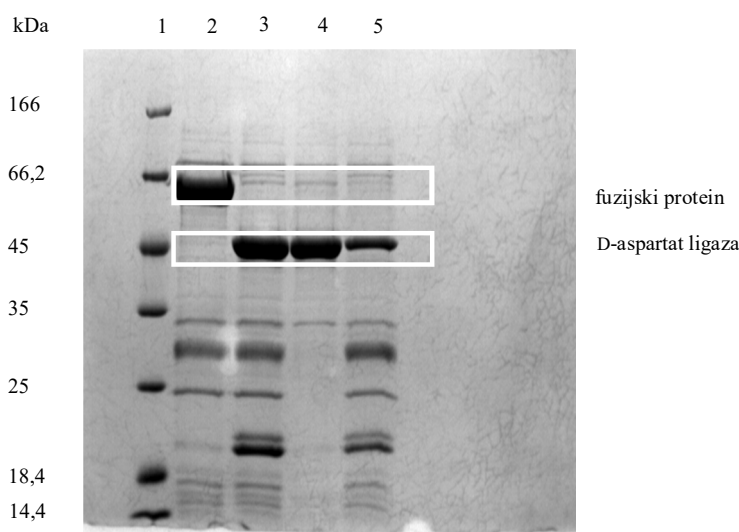
Slika 17: NaDS PAGE – 1. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza po cepitvi z encimom peptidaza SUMO.

1. standard Unstained protein MW marker, 2. vzorec po cepitvi z encimom peptidaza SUMO pri 30 °C 2 h pred nanosom na kolono IMAC, 3. vzorec po nanosu na kolono IMAC (cepitev pri 30 °C), 4. vzorec eluata proteina SUMO (cepitev pri 30 °C), 5. vzorec po cepitvi z encimom peptidaza SUMO pri 4 °C čez noč pred, nanosom na kolono IMAC, 6. vzorec po nanosu na kolono IMAC (cepitev pri 4 °C), 7. vzorec eluata proteina SUMO (cepitev pri 4 °C), 8. vzorec po cepitvi z encimom peptidaza SUMO pri sobni temperaturi čez noč, pred nanosom na kolono IMAC, 9. vzorec po nanosu na kolono IMAC (cepitev pri sobni T), 10. vzorec eluata proteina SUMO (cepitev pri sobni T). Velikost encima D-aspartat ligaza je 49 kDa, velikost fuzijskega proteina je 62 kDa. Elektroforeza je potekala pri toku 35 mA in maksimalni napetosti.



Slika 18: NaDS PAGE – 2. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza po cepitvi z encimom peptidaza SUMO.

1. standard Unstained protein MW marker, 2. vzorec pred cepitvijo z encimom peptidaza SUMO, 3. vzorec po cepitvi z encimom peptidaza SUMO pri 30 °C 2 h, pred nanosom na kolono IMAC, 4. vzorec po cepitvi z encimom peptidaza SUMO pri 4 °C čez noč, pred nanosom na kolono IMAC, 5. vzorec po cepitvi z encimom peptidaza SUMO pri sobni T čez noč, pred nanosom na kolono IMAC, 6. vzorec po cepitvi z encimom peptidaza SUMO pri 30 °C 2 h, po nanosu na kolono IMAC. Velikost encima D-aspartat ligaza je 49 kDa, velikost fuzijskega proteina je 62 kDa. Elektroforeza je potekala pri toku 35 mA in maksimalni napetosti.



Slika 19: NaDS PAGE – 3. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza po cepitvi z encimom peptidaza SUMO.

1. standard Unstained protein MW marker, 2. vzorec pred cepitvijo z encimom peptidaza SUMO, 3. vzorec po cepitvi s peptidazo SUMO pri 30 °C 2 h, pred nanosom na kolono IMAC, 4. vzorec po cepitvi s peptidazo SUMO pri 30 °C 2 h, po nanosu na kolono IMAC, 5. vzorec eluata proteina SUMO po cepitvi s peptidazo SUMO pri 30 °C 2 h. Velikost encima D-aspartat ligaza je 49 kDa, velikost fuzijskega proteina je 62 kDa. Elektroforeza je potekala pri toku 35 mA in maksimalni napetosti.

Rezultat vzorca eluata proteina SUMO na sliki 19 potrjuje trditev, da je bila uporaba dializnega pufra v tretjem poskusu najboljša izbira, saj je cepitev (30 °C 2 h) uspešnejše potekla in ne zaznavamo lise preostalega fuzijskega proteina, kot pri gelu na sliki 17.

6. Koncentriranje encima D-aspartat ligaza.

Za nadaljnje raziskovanje je bilo treba izoliran in očiščen encim D-aspartat ligaza skoncentrirati. Postopka koncentriranja smo se lotili v 2. in 3. poskusu izolacije. Uporabljali smo dva tipa ultrafiltrrov, Amicon Ultra 15 in Amicon Ultra 0,5.

Sprva smo uporabili Amicon Ultra 15 in centrifugirali celoten volumen vzorca ($A = 1,9$) pri pogojih 5 000 obr/min, 4 °C, 15 minut. Opazili smo zamotnitev raztopine in izmerili absorbanco skoncentriranega alikvota ($A = 2,4$). Zaradi minimalnega porasta smo sklepali, da koncentriranje celotne količine proteina ni učinkovit način, zato smo v vseh nadaljnjih poskusih uporabili Amicon Ultra 0,5. Prvih 500 μL vzorca ($V = 4,5$ mL) nam je uspelo skoncentrirati na 90 μL z absorbanco 5,0. V drugem poskusu smo dosegli volumen 50 μL in absorbanco 5,8. Vzorec se je začel zaradi prenasičenosti obarjati, zato smo vzorca združili ($V = 140$ μL), izmerili skupno absorbanco ($A = 7,2$, $\gamma = 6,4$ g/L) in ga do uporabe shranili pri -80 °C. 3 mL smo koncentrirali pri enakih

pogojih, le da smo postopek izvajali v paralelah. Da ne bi prišlo do denaturacije encima smo koncentriranje prekinili, ko smo dosegli vrednosti absorbance med 5,0 in 6,0. Končne volumne smo združili ($V = 860 \mu\text{L}$), izmerili absorbanco skoncentriranega vzorca ($A = 4,9$, $c = 87 \mu\text{M}$, $\gamma = 4,3 \text{ g/L}$) in $500 \mu\text{L}$ neskoncentriranega vzorca ($A = 2,2$, $c = 39 \mu\text{M}$, $\gamma = 1,9 \text{ g/L}$) in ju do uporabe shranili pri -80°C . Ugotovili smo, da je protein bolj stabilen v manjšem ultrafiltru, vendar nismo dosegli želenih koncentracij ($> 10 \text{ mg/mL}$).

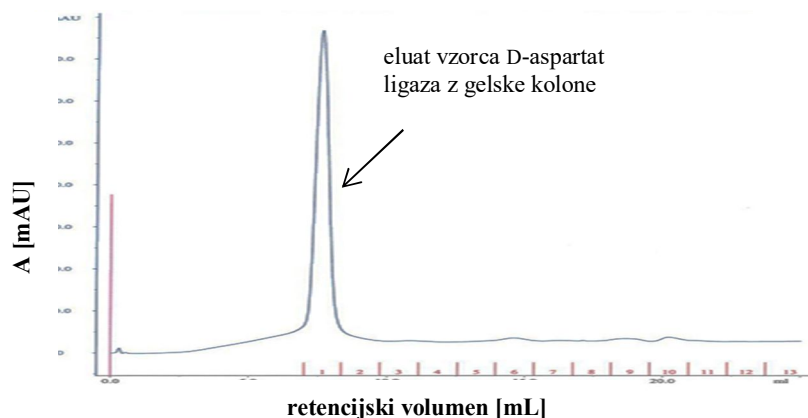
Pufer 200 mM NaCl , 20 mM Tris/HCl , $\text{pH } 8$, 10% -odstotni glicerol, v katerem se je protein nahajal v tretjem poskusu izolacije, je omogočil, da je bilo koncentriranje bolj uspešno. Spremenili smo tudi postopek izvedbe. Koncentrirali smo v enem ultrafiltru Amicon Ultra $0,5$ in vsake 3 minute dodali novih $200 \mu\text{L}$ vzorca. Na koncu smo združili skoncentrirane vzorce ($V = 500 \mu\text{L}$), izmerili skupno absorbanco ($A = 6,4$, $\gamma = 5,7 \text{ g/L}$) in do uporabe shranili pri -80°C .

Skoncentrirane vzorce encima smo nadalje čistili s postopkom gelske filtracije, nato pa jih uporabili pri testih aktivnosti in inhibicijskih testih z izbranimi spojinami ter nazadnje pri kristalizaciji.

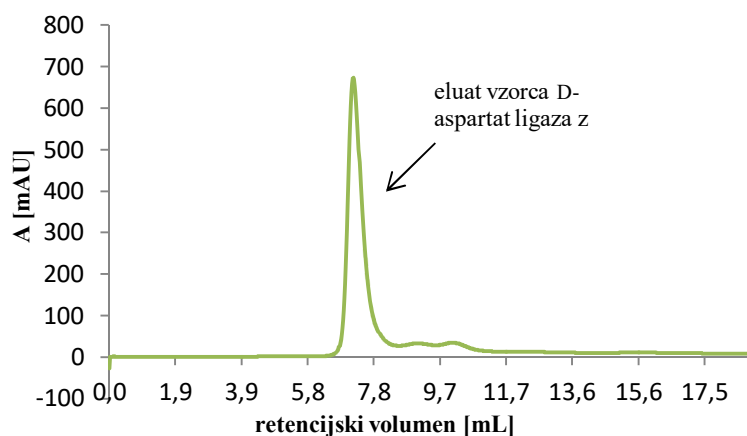
7. Gelska filtracija.

Zaradi nizke ločljivosti (otežena ločba podobnih molekul) smo metodo gelske filtracije uporabili v zadnjem koraku čiščenja. V tem koraku smo želeli očistiti tarčni protein D-aspartat ligaza od preostalih nečistoč v vzorcu, ki bi pozneje še lahko vplivale na njegovo stabilnost in katalitično aktivnost.

Na sistem FPLC smo prvič nanesti $50 \mu\text{L}$ in drugič $200 \mu\text{L}$ vzorca. Z rezultati gelske izključitvene kromatografije nismo bili zadovoljni v nobenem primeru, kajti celoten vzorec se je eluiral v začetnih 8 mL praznega volumna. Iz rezultata poskusa smo sklepali, da se tvori agregat proteina, ki je večji od por gelske kolone, hkrati pa nam ni uspelo ločiti morebiti navzoče oligomerne oblike od monomerne oblike zvitja. (slika 20, slika 21)



Slika 20: Gelska filtracija s kolono Superdex 200 10/30 GL – 2. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza. Na sliki je označena elucija encima D-aspartat ligaza po nanosu na gelsko kolono. Porast absorbance smo izmerili pri 280 nm.

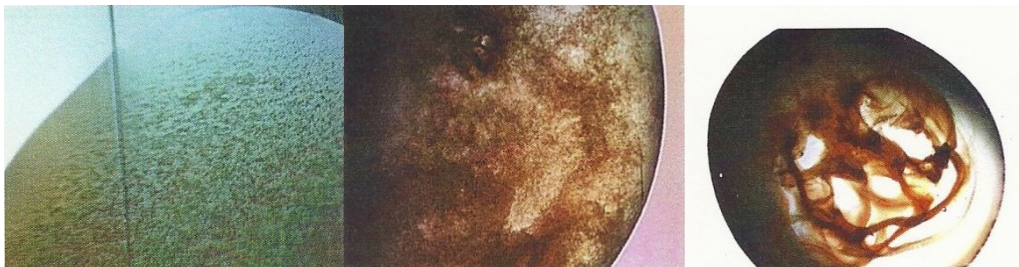


Slika 21: Gelska filtracija s kolono Superdex 75 10/30 G1 – 3. poskus izolacije encima D-aspartat ligaza. Na sliki je označena elucija encima D-aspartat ligaza po nanosu na gelsko kolono. Porast absorbance smo izmerili pri 280 nm.

4.2 POSKUS KRISTALIZACIJE ENCI MA D-ASPARTAT LIGAZA

Predno smo nastavili kristalizacijske raztopine smo se odločili, da bomo v obeh primerih močnejše skoncentrirali protein, saj nam je to zagotavljalo večje možnosti za nastanek kristalov (v večini primerov zadostuje koncentracija proteina 5–10 mg/mL). Koncentrirali smo le v enem ultrafiltru in postopno dodajali vzorec, kar se je izkazalo za najučinkovitejšo tehniko. Za prvi poskus kristalizacije encima D-aspartat ligaza smo uporabili skoncentrirani vzorec z $\gamma = 9,6$ mg/mL, za drugi poskus kristalizacije pa vzorec z $\gamma = 10,8$ mg/mL. Iskanje kristalizacijskih pogojev se je izkazalo za zahtevnejše delo kot smo sprva pričakovali. Z uporabo komercialnih kristalizacijskih kompletov Structure Screens 1 (MD1-01) in 2 (MD1-02) ter PACT premier™ MD 1 – 29 smo preizkusili 2-krat 96 različnih puferskih pogojev, ki pa niso ustrezali za kristalizacijo zelenega proteina. V kristalizacijski raztopini v nobenem poskusu ni prišlo do nastanka kristalov, en mesec smo

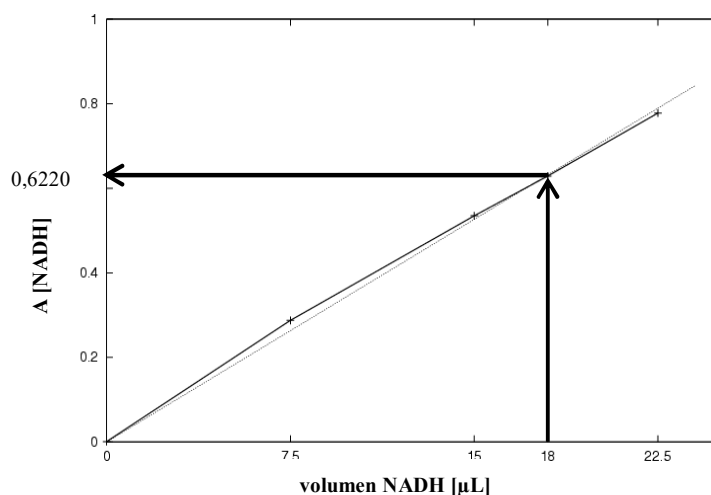
s polarizacijskim mikroskopom spremljali in opazovali le nastanek kristalizacijske oborine. (slika 22)



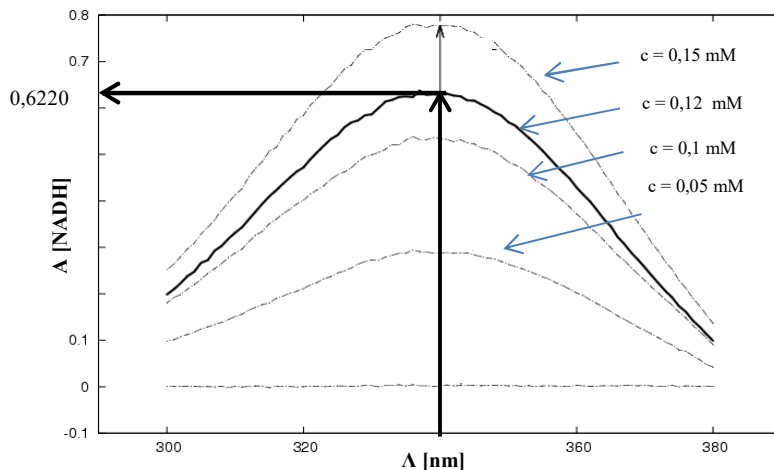
Slika 22: Rezultati kristalizacijskih poskusov (od prazne kapljice do pojava močne oborine – skrajno desno). (57)

4.3 TEST ENCIMSKE AKTIVNOSTI *IN VITRO*

Izoliranemu bakterijskemu encimu D-aspartat ligaza smo pred poskusom kristalizacije preverili katalitično aktivnost s spektrofotometričnim encimskim testom, ki temelji na sklopljeni reakciji z encimoma laktat dehidrogenazo in piruvat kinazo, pozneje pa še določili zaviralno aktivnost izbranih ATP kompetitivnih zaviralcev encima DNA giraza B. Da so bile naše meritve zanesljive, smo UV-vis spektrofotometer pri 37 °C kalibrirali na končno koncentracijo NADH 0,1 mM. Uporabili smo kiveto volumna 150 μL ($l = 1 \text{ cm}$). S pomočjo 1 mM NADH smo določili povezavo med koncentracijo NADH in absorbanco. Z grafom smo prikazali absorpcijski spekter oksidacije NADH pri različnih koncentracijah NADH pri 340 nm. (slika 23, slika 24)



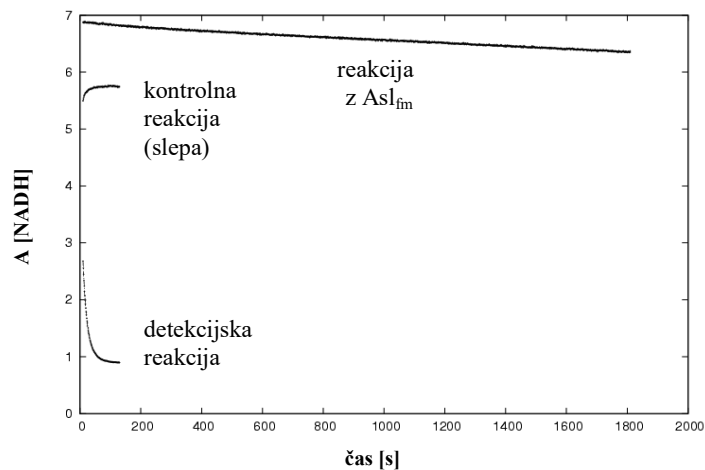
Slika 23: Odvisnost absorbance NADH v odvisnosti od dodanega volumna NADH pri 340 nm. Molarni absorpcijski koeficient NADH je $6\,220 \text{ Lcm}^{-1}/\text{mol}$, začetna koncentracija NADH je 1 mM, končna koncentracija NADH pri 18 μL je 0,0001 M.



Slika 24: Absorpcijski spektri NADH izmerjeni pri različnih koncentracijah NADH pri 340 nm.

$\epsilon = 6\,220 \text{ Lcm}^{-1}/\text{mol}$, $l = 1 \text{ cm}$, začetna koncentracija NADH je 1 mM, končna koncentracija NADH pri 7,5 μL je 0,05 mM, pri 15 μL je 0,1 mM, pri 30 μL je 0,2 mM, pri 45 μL je 0,3 mM, pri 60 μL je 0,4 mM, pri 75 μL je 0,5 mM, pri 90 μL je 0,6 mM, pri 105 μL je 0,7 mM, pri 120 μL je 0,8 mM, pri 135 μL je 0,9 mM, pri 150 μL je 1,0 mM, končni volumen je 150 μL .

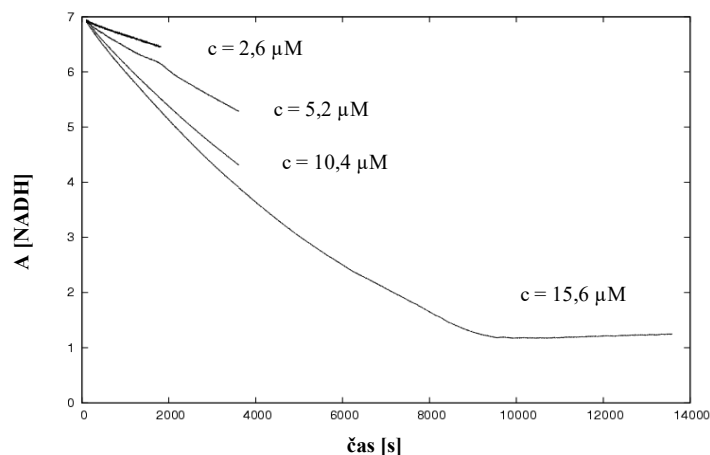
Ko smo UV-vis spektrofotometer umerili na želeno vrednost, smo pred izvedbo encimskega testa katalitične aktivnosti encima D-aspartat ligaza z eksperimentoma kontrolne encimske reakcije (slepa – encimska reakcije brez encima D-aspartat ligaza) in detekcijske reakcije izločili verjetnost, da bi sprememba absorbance pri 340 nm prikazovala morebitne druge reakcije v vzorcu, mi pa bi to opazili kot lažno katalitično aktivnost encima D-aspartat ligaza. (slika 25)



Slika 25: Časovni potek oksidacije NADH v različnih reakcijskih razmerah pri 340 nm. V reakciji detekcije in reakciji slepe so koncentracije reagentov NADH in ADP (ATP) 1 mM, koncentracija PEP je 2 mM, koncentracija MgCl_2 je 50 mM, volumen mešanice encimov LDH in PK je 10 μL . Končni volumen je 300 μL .

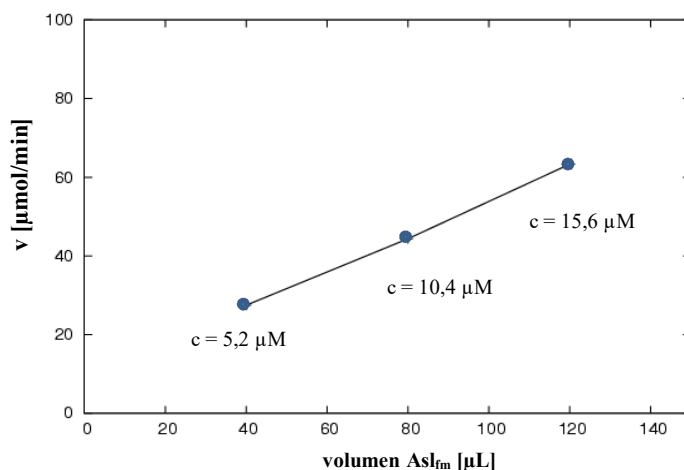
Reakcija z encimom AsI_{fm} ponazarja časovni potek oksidacije NADH v navzočnosti 15,6 μM encima AsI_{fm} , v končnem volumnu 300 μL . Koncentracije reagentov ostajajo enake kot pri detekcijski reakciji.

Vzorcu encima D-aspartat ligaza s koncentracijo $39 \mu\text{M}$ smo s spektrofotometričnim testom preverili katalitično aktivnost. Graf na sliki 26 prikazuje padec absorbance NADH pri 340 nm pri različnih koncentracijah encima.



Slika 26: Časovni potek oksidacije NADH v prisotnosti različnih koncentracij encima D-aspartat ligaza pri 340 nm . Koncentracija reagentov NADH in ADP je 1 mM , koncentracija PEP je 2 mM , koncentracija MgCl_2 je 50 mM . Volumen mešanice encimov LDH in PK je $10 \mu\text{L}$. Koncentracije AsI_{fm} so bile: pri volumnu $20 \mu\text{L}$ $2,6 \mu\text{M}$, pri $40 \mu\text{L}$ $5,2 \mu\text{M}$, pri $80 \mu\text{L}$ $10,4 \mu\text{M}$ in pri $120 \mu\text{L}$ $15,6 \mu\text{M}$. Končni volumen je $300 \mu\text{L}$.

Na sliki 27 prikazujemo graf hitrosti encimske reakcije v odvisnosti od količine dodanega encima D-aspartat ligaza, pri čemer velja da, kadar temperatura, pH in koncentracija substrata ostanejo nespremenjeni, je začetna hitrost premo sorazmerna s koncentracijo encima.

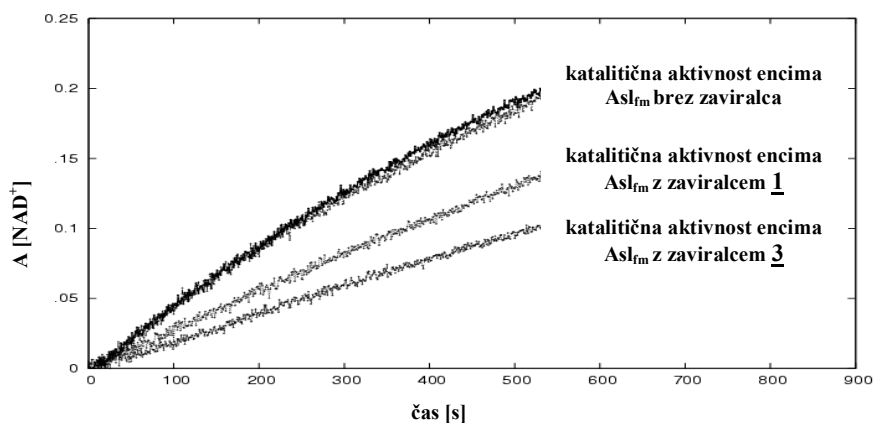


Slika 27: Odvisnost začetnih hitrosti oksidacije NADH v reakciji nastanka heksapeptida iz pentapeptida in D-asparaginske kisline pri različnih volumnih encima D-aspartat ligaza. Koncentracije AsI_{fm} so bile: pri volumnu $40 \mu\text{L}$ $5,2 \mu\text{M}$, pri $80 \mu\text{L}$ $10,4 \mu\text{M}$ in pri $120 \mu\text{L}$ $15,6 \mu\text{M}$.

Ko smo dokazali, da je izolirani encim D-aspartat ligaza katalitično aktiven, smo biološko ovrednotili pet izbranih ATP kompetitivnih zaviralcev DNA giraze B.

Uporabili smo encim D-aspartat ligaza s koncentracijo 87 μM , vsaka spojina pa je bila testirana pri 250 μM v končnem volumnu 150 μL . Preizkusili smo spojine **1**, **2**, **3**, **4**, **5**. Pri treh spojinah meritev nismo izvajali. Ob dodatku zaviralcev **2** in **4** se je reakcijska raztopina zamotnila, ob dodatku **5** v reakcijsko mešanico pa je prišlo do penjenja.

Na grafu slike 28 lahko vidimo, da sta encimski reakciji merjene katalitične aktivnosti encima D-aspartat ligaza zelo dobro primerljivi. Merilo za učinkovitost zaviralca prikazuje rezidualna aktivnost (RA), ki jo izražamo v odstotkih. Šibko zaviralno aktivnost sta izkazali le spojini **1** (RA = 65-odstotna) in **3** (RA = 46-odstotna). (tabela XVIII)



Slika 28: Katalitična aktivnost encima D-aspartat ligaza (kontrolna krivulja) in zaviralna aktivnost spojin **1** in **3** izmerjena pri 340 nm. Spojini sta bili testirani pri 250 μM , v reakcijski zmesi končnega volumna 150 μL . Reakcijska mešanica je sestavljena iz 198 mM Tris/HCl pufru, pH 8, 50 mM MgCl_2 , 1 mM PEP, 0,1 mM NADH, 1 mM ATP, 1 mM D-Asp, 0,5 mM UM5K, 5,2 μM Asl_{fm} in 10 μL zmesi encimov LDH in PK. Časovni potek oksidacije NADH je v intervalu 200–750 s.

Tabela XVIII: Rezidualna aktivnost (RA) zaviralcev encima D-aspartat ligaza.

Zap. št. spojine	Oznaka spojine	Struktura spojine	RA (250 μM) (odstotek)
1	THT-19		65
3	TCF-4b		46

5 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo preučevali bakterijski encim D-aspartat ligaza, ki sodeluje v zadnjih stopnjah biosinteze celične stene tako, da aktivira D-Asp in jo poveže z ϵ -amino skupino L-Lys³ UDP-MurNAc pentapeptida. D-aspartat ligaza je potrebna za preživetje bakterije in je torej ena od potencialnih tarč za razvoj novih protimikrobnih učinkovin. O D-aspartat ligazi je še zelo malo znanega. Prav tako je iz literature znanih le nekaj tipov zaviralcev encima. Ker encima D-aspartat ligaza v preteklosti še niso uspešno kristalizirali in njegova 3D struktura še ni znana, iskanje novih zaviralcev pa bi olajšal podatek o strukturi aktivnega mesta encima, smo si za prvi cilj magistrskega dela postavili prav to: pridobiti katalitično aktivni encim D-aspartat ligaza, ki bo primeren za nadaljnjo kristalizacijo.

Ključni koraki priprave encima so bili: optimizacija dializnega pufru, cepitev fuzijskega proteina z encimom peptidaza SUMO, koncentriranje proteina in gelska filtracija. Za izolacijo rekombinantnega encima D-aspartat ligaza iz bakterijskih celic *E. coli* sev BL21[DE3]pLysS smo uporabili že znani protokol, predstavljen v doktorskem delu Škedelj 2013 (27) in ga skušali modificirati tako, da bi pridobili večje količine čistega rekombinantnega encima, primerne za kristalizacijo in biokemijske ter biofizikalne teste. Iz doktorske naloge je znano, da je protein najbolj stabilen v puferskih pogojih 500 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8, 50-odstotnem glicerolu. Ker proteina nismo želeli izpostavljati večkratnim dializnim spremembam, navzočnost soli oz. glicerola pa je bila zelo pomembna pri posameznih korakih izolacije, smo skušali najti puferski sistem, ki bi ohranjal encim v stabilni in topni obliki skozi celoten proces. Po rezultatih sodeč, encimu D-aspartat ligaza najbolj ustreza dializni pufer 200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 8, 10-odstotni glicerol in dodatek 1 mM DTT. Za najprimernejše cepitvene pogoje fuzijskega proteina z encimom peptidaza SUMO, ki zagotavljajo tudi stabilnost encima D-aspartat ligaza in časovni prihranek, se je izkazala cepitev pri temperaturi 30 °C v dvehurnem intervalu.

Test stabilnosti encima D-aspartat ligaza smo izvajali z analizo NaDS PAGE. Ocenili smo kakovost cepitve fuzijskega proteina, kakovost izvedb kovinsko afinitetne kromatografije pred nanosom na sistem FPLC in po njem. Protein se je v postopkih čiščenja izgubljal, vendar ni fragmentiral na manjše peptidne enote.

Vzorec bi najuspešneje skoncentrirali pri pogojih 500 mM NaCl, ki bi preprečil vezavo encima na membrano ultrafiltra in z dodatkom 50-odstotnega glicerola. Takšna koncentracija soli ni primerna zaradi aktivnosti encima peptidaza SUMO, tolikšna viskoznost vzorca pa bi nas ovirala v zadnjem delu izolacije, tj. gelske filtracije in pozneje pri avtomatiziranem postopku kristalizacije. Da bi zadostili vsem zahtevam hkrati, smo protein v tretjem poskusu izolacije ohranjali v pufru s koncentracijo soli 200 mM in 10-odstotnem glicerolom. Koncentriranje se je v teh pogojih izboljšalo, kar nam je potrjevalo hipotezo, da protein za boljšo stabilnost potrebuje višjo koncentracijo soli in glicerola, prav tako pa je k povečanju izkoristka koncentriranja pripomogla uporaba enega ultrafiltra in tehnika postopnega dodajanja vzorca.

Postopek gelske filtracije ni bil uspešen, sklepali smo, da zaradi nastanka neznane strukture encima D-aspartat ligaza, ki je bila prevelika za ločbo v porah gelske kolone in se je izločila v praznem volumnu. Za identifikacijo neznanih proteinskih interakcij bi lahko uporabili metodo analize interakcij med proteini s prečnim povezovanjem (*angl. crosslinking protein interaction analysis*). (63)

Čeprav nam encima D-aspartat ligaza z gelsko filtracijo ni uspelo optimalno očistiti in določiti ali se nahaja v monomerni ali oligomerni obliki, smo se, glede na relativno dobre rezultate poliakrilamidne gelske elektroforeze, odločili, da bomo z njim izvedli encimske teste. Izkazalo se je, da je naš encim katalitično aktiven, zato smo z enakim testnim sistemom reševali majhno knjižnico izbranih potencialnih zaviralcev našega encima. Biološko smo ovrednotili pet izbranih ATP kompetitivnih zaviralcev DNA giraze B in dvema spojinama določili zaviralno aktivnost. Spojini **1** in **3** sta po pričakovanju izkazali šibek zaviralni učinek, z rezidualnima aktivnostma 65- oziroma 46-odstotni pri 250 μ M koncentraciji zaviralca.

Eden od ciljev naše naloge je bila kristalizacija D-aspartat ligaza, vendar pri tem nismo bili uspešni. Izbrani komercialni kompleti niso ustrezali pogojem, ki jih naš encim D-aspartat ligaza potrebuje za kristaliziranje, hkrati tudi koncentracija encima ni bila dovolj visoka.

Da med čiščenjem proteina ne bi prihajalo do volumskih izgub vzorca in da bi pridobili zadostno koncentracijo encima v topni obliki, bi lahko bila morebitna rešitev uporaba novejših tehnik dialize (npr. plastične dializne kasete) ter prilagajanje količine soli in glicerola pred vsakim korakom izolacije.

Rezultati te magistrske naloge pomenijo korak k razvoju novih zaviralcev bakterijskega encima D-aspartat ligaza. Uspelo nam je optimizirati izolacijo encima in preizkusiti več kristalizacijskih pogojev ter s tem narediti korak bližje k razrešitvi 3D strukture tega proteina. Identificirali smo nov strukturni tip zaviralcev encima D-aspartat ligaza, vendar bo treba rezultate v nadaljnjih raziskavah preveriti s podrobnejšimi biokemičnimi testi in izvesti reševanje večjega števila spojin, strukturno podobnih našim zaviralcem.

6 LITERATURA IN VIRI

1. Aminov RI: A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol* 2010; 1: 1–7.
2. Conly JM, Johnston BL: Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005; 16: 159–160.
3. Leekha S, Terrell CL, Edson RS: General Principles of Antimicrobial Therapy. *Mayo Clin Proc* 2011; 86: 156–167.
4. Rang HP, Dale MM, Ritter JM et al: Rang and Dale's pharmacology, 7. izdaja, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2012: 609–637.
5. Lemke TL, William DA: Foye's principles of medicinal chemistry, 7. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013: 1028–1082 str.
6. Kohanski AM, Dwyer JD, Collins JJ: How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 423–435.
7. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 4–5, 34–44, 429, 509–512.
8. Gold SH, Moellering CR: Antimicrobial drug resistance. *N Engl J Med* 1996; 335: 1445–1453.
9. Levy SB: The Challenge of Antibiotic Resistance. *Sci Am* 1998: 46–53.
10. Bratkovič T, Preželj A: Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi. *Farm vestn* 2008; 59: 129–134.
11. Neu CH, Gootz TD: Medical Microbiology (Antimicrobial Chemotherapy), 4. izdaja, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, 1996. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>; dostopano: 25. 12. 2016.
12. Alekshun MN, Levy SB: Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 2007; 128: 1037–1050.
13. Odpornost mikroorganizmov proti antibiotikom ogroža dosežke medicine. http://www.vzb.si/Odpornost_mikroorg.pdf; dostopano: 25. 12. 2016
14. Dragaš AZ, Škerl M: Higiena in obvladovanje okužb, Izbrana poglavja. ZRC, Ljubljana, 2004: 163 str.

15. Trampuž A, Muzlovič I, Tomič V et al: Kako izkoreniti MRSA v Sloveniji - iluzija ali realnost, Strategija preprečevanja pojava in širjenja odpornih mikroorganizmov v bolnišnicah, Isis, 2003; 12: 31–4.
16. Lee CR, Cho H, Jeong BC et al: Strategies to Minimize Antibiotic Resistance. Int J Environ Res Public Health 2013; 10: 4274–4305.
17. Silhavy JT, Kahne D, Walker S: The Bacterial Cell Envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2: 1–16.
18. The cell wall surrounds and holds in the microbe. http://www.microbiologytext.com/index.php?module=book&func=displayarticle&art_id=60; dostopano: 22. 11. 2016
19. Vadillo-Rodríguez V, Dutcher JR: Viscoelasticity of the bacterial cell envelope. Soft Matter 2011; 7: 4101-4110.
20. Van Heijenoort J: Formation of the glycan chain in the synthesis of bacterial peptidoglycan. Glycobiology 2001; 11: 25–36.
21. Vollmer W, Blanot D, Pedro MA: Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol Rev 2008; 32: 149–167.
22. Bouhss A, Josseaume N, Allanic D et al: Identification of the UDP-MurNAc-Pentapeptide:L-Alanine Ligase for Synthesis of Branched Peptidoglycan Precursors in *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol 2001; 183: 5122–5127.
23. Barreteau H, Kovac A, Boniface A et al: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbiol Rev 2008; 32: 168–207.
24. Fang X, Tianont K, Zhang Y et al: The mechanism of action of ramoplanin and enduracidin. Mol BioSyst 2006; 2: 69–76.
25. Bellais S, Arthur M, Dubost L et al: Asl_{fm}, the D-aspartate ligase responsible for the addition of D-aspartic acid onto the peptidoglycan precursor of *Enterococcus faecium*. J Biol Chem 2006; 281: 11586–11594.
26. Škedelj V, Tomašič T, Peterlin Mašič L et al: ATP-Binding Site of Bacterial Enzymes as a Target for Antibacterial Drug Design. J Med Chem 2010; 54: 915–929.
27. Škedelj V, Perdih A, Brvar M et al: Discovery of the first inhibitors of bacterial enzyme D-aspartate ligase from *Enterococcus faecium* (Asl_{fm}). Eur J Med Chem 2013; 67: 208–220.

28. Iyer LM, Abhiman S, Maxwell-Burroughs A et al: Amidoligases with ATP-grasp, glutamine synthetase-like and acetyltransferase-like domains: synthesis of novel metabolites and peptide modifications of proteins. *Mol Biosystems* 2009; 5: 1636–1660.
29. Fawaz MV, Topper M, Firestine SM: The ATP-Grasp Enzymes. *Bioorg Chem* 2011; 39: 185–19.
30. Boyer RF: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 634 str.
31. Introduction to Enzymes.
<http://www.worthington-biochem.com/introBiochem/factors.html>; dostopano: 22. 11. 2016
32. Sharma R: Enzyme Inhibition: Mechanisms and Scope. InTech, 2012: 1–37.
33. Wikipedia: Michaelis-Mentenina enačba.
https://sl.wikipedia.org/wiki/Michaelis-Mentenina_ena%C4%8Dba; dostopano: 25. 04. 2017
34. SUMOpro Gene Fusion Technology: LifeSensors, 7 str.
35. Marblestone JG, Edavettal SC, Lim Y et al: Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci* 2006; 15: 182–189.
36. Expressor SUMO T7 Cloning and Expression System.
<https://www.lucigen.com/docs/manuals/MA108-Expresso-T7-SUMO-Cloning-Expression-System.pdf>; dostopano: 16. 06. 2017
37. pET System Manual.
http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf; dostopano: 27. 04. 2017
38. SUMO protease.
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/sumo_protease_man.pdf; dostopano 14.06. 2017
39. Hickey CM, Wilson RN, Hochstrasser M: Function and Regulation of SUMO Proteases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 755–766.
40. Mossessova E, Lima CD: Ulp1-SUMO Crystal Structure and Genetic Analysis Reveal Conserved Interactions and a Regulatory Element Essential for Cell Growth in Yeast. *Mol Cell* 2000; 5: 865–876.

41. Flanagan L, Wheeler S, Koeff M et al: Master your PCR. Promega Notes, 91: 13–16.
42. GeneRuler 1 kb DNA Ladder. <http://www.gentechbio.com/blog/sm0311-generuler-1-kb-dna-ladder/>; dostopano: 27. 04. 2017
43. Unstained Protein MW Marker.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26610>; dostopano: 27. 04. 2017
44. Dogša I, Danevčič T, Stres B et al: Mikrobiološko-molekularni praktikum: Laboratorijske vaje za biotehnologe, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2008.
45. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika, 1 izdaja, Ljubljana, 2012, 157 str.
46. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH: Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J Vis Exp* 2012; 62: 1–5.
47. Froger A, Hall JE: Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method (Video Article), *J Vis Exp*, 2007.
<https://www.jove.com/science-education/5059/bacterial-transformation-the-heat-shock-method>; dostopano 23. 11. 2016
48. Studier FW: Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures. *Protein Expr Purif* 2005; 41: 207–234.
49. Amersham Biosciences: Affinity Chromatography, 2002, GE Healthcare. 121 str.
50. Recombinant Protein Purification Handbook. GE Healthcare Bio-Sciences AB, 302 str.
51. Amersham Biosciences: Protein purification handbook, 2002, 121 str.
52. Bornhorst JA, Falke JJ: Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol* 2000; 326: 245–254.
53. Goldring JP: Methods to Concentrate Proteins for Protein Isolation, Proteomic, and Peptidomic Evaluation. *Methods Mol Biol* 2015; 1314: 5–18.
54. Amersham Biosciences: Gel filtration, 2002: 121 str.
55. Schmid FX: Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. *Encyclopedia of life sciences* 2001: 1–4.
56. Menter P: Acrylamide Polymerization – A practical Approach. Bio-Rad Laboratories 2000: 1–8.

57. Pavšič M: Makromolekulska kristalografija (Navodila za vaje), UL FKKT, 2013: 1–26.
58. Bernhard R: Biomolecular Crystallography. Principles, Practice, and Application to Structural Biology (e-knjiga), Garland Science, 1. Izdaja, New York, 2010.
59. McPherson A, Gavira JA: Introduction to protein crystallization. *Acta Cryst* 2014; F70: 2–20.
60. Bisswanger H: Enzyme assays. *Perspectives in Science* 2014; 1: 41–55.
61. BitesizeBio: How to Design the Perfect Protein Purification Buffer. <http://bitesizebio.com/7893/how-to-design-the-perfect-protein-purification-buffer/>; dostopano: 17. 04. 2017.
62. Wang W: Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 1999, 185: 129–188.
63. Miernyk JA, Thelen JJ: Biochemical approaches for discovering protein–protein interactions. *The Plant Journal* 2008 53: 597–609.

7 PRILOGE

7.1 Priloga A: Sekvenca pE–SUMO Amp vektorja

```
AGATCTCGATCCC GCGAAAT TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCTCTA
GAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGTCATCACCATCATCACGGGTCCCT
GCAGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCA
CATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTTCAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAA
GAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCTTGTACGA
CGGTATTAGAATTCAAGCTGATCAGGCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAG
GCTCACCGCGAACAGATTGGAGGTATGAACAGTATTGAAAATGAAGAATTTATCCCTATATTATTAGGAA
GCGACATGAACGTTTATGGTATGGCACGTTCTTTTAAATGAAGCATACGGCAAAATCTGCCAAGCATATGCT
TCGGATCAGTTATCGCCCCTACCCGCTACAGTAAAATTGTCAATGTAGAAGTTATTCCAGGATTTGATAAAGA
CCCTGTATTTACGAGACGATGTTCCGTTTGGCAAAAGAAAGATATTCTGATAAGAGTAAAAAATATCTTTT
GATTGCTTGTGGTGATGGATATGCCAGAATTGATCTCCCAACATAAAACAAGAGCTGTCAGAATATTTTATCT
GTCCATATATTGATTATCTTTATTTGAAAGGCTGATCAATAAAGTAAGCTTTTATGAAGTTTGTGAAGAAT
ATGATCTTCCGTATCCTAAAACATTGATCGTCAGAGAAGAAATGTTAGTAAATGGACATTTGGAACAGGAA
TTGCCTTTTGAATCCCAGTTGCTTTGAAACCTGCAAACAGTGTGGAGTATCTTTCTGTCCAATTTGAAGGA
AGAAAAAAGCTTTTATTTTAGAGACTAGAGAAGAGTTGATTTAATTTTAGGCCGGATATACGAAGCCGG
TTATAAAAGTGAAATGATTGTACAAGATTTTATCCCGGTGATGATAGTAATATGCGTGTGCTAAATGCGT
ATGTGATGAAGATCATCAAGTTCGGATGATGTGCCCTTGTCATCCACTATTAGAAGATCCTACACCAGCA
TCGATTGGTAATTACGTTGTGATCATGCCAGATTATAACGAAAAAATCTATCAAACCATTAAGGCATTTTTG
GAAAAAATCGAATATACAGGCTTTGCCAATTTGATATGAAGTATGATCCTAGAGATGGAGAATATAAATT
ATTTGAAATCAATTTGAGACAAGGTCGTAGCAGTTCTTTGTGACATTGAACGGCTTGAATCTGGCTCGTTT
TGTCACAGAAGATCGAGTGTTCAACAAACCTTTGTTGAAACGACCTATGGAACGAATCAATCAGATAAAG
CAAGATTATGGATGGGTGTGCCAAAAAATCTTTTAGAATATGCTCGGGAAAATGAAGACAAAAAAT
AGCTGAGCAAATGATCAAAGAAAAATCGTTACGGTACTACTGTATTTTATGAAAAAGCCGATCAATCAAGC
GCTGGTTGATGAAATATATGTTCCATAACTATATTTCAAGATTCAAAAAGTATTTTCATGTGAAAGAAG
GCTAGCTAGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCAGCCGCACTCGAGCACCACCACCAC
CACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAAC
TAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACCGGTCTTGAGGGGTTTTTGTGCTGAAAGGAGGAATAATCCGGA
TTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGAC
CGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTTTCGCTTCTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGGC
TTTCCCCGTCAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCC
AAAAAATTGATTAGGGTATGGTTCACGTATGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGAC
GTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTA
TTCTTTTATTATAAGGGATTTTGGCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT
TAACGCGAATTTTAAACAAATATTAACGTTTACAATTTACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAA
CCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGC
TTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCCTTATCCCTTTTTTGGCG
CATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTG
CACGAGTGGTTATCATCGAACTGGATCTCAACAGCGTGAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAAGACG
TTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAG
CAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTACACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACT
TACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC
CGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTG
CAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTAGCTTCCCGGCAACAATTA
ATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGCTCGGCTGGTGGTTAT
TGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGTTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAAATAGACAGATCGCT
GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGAT
TTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCT
TAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTT
TTTCTGCGCGTAATCTGTCTGTTGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGGCCGATCA
AGAGCTACCAACTTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGACAGCGCAGATACCAAACTGTCTCTTAG
TGTAGCCGTATTAGGCCACCCTCAAGAACCTGTGAGACCCGCTACATACCTCGTCTGCTATCCTGT
TACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGAT
AAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG
AACTGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTA
TCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTT
```



```
TATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGC
CTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGTGTCCTTTTGTGCTCACATGTTT
TTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC
AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCC
TTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATA
GTTAAGCCAGTATACTACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACC
CGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGA
GCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCG
TGGTCGTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTTCTCCAGAAGCGTT
AATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTG
TAAGGGGGATTTCTGTTTATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTA
CTGATGATGAACATGCCCCGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACACTGGCGGTATGGATGCGGGCGGA
CCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCC
AGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTTCCAGACTTTAC
GAAACACGGAACCGAAGACCATTATGTTGTTGCTCAGGTGCGAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTCA
CGTTCGCTCGCGTATCGGTGATTATCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCTCTCA
ACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAA
ACGTTTTGGTGGCGGGACCAAGTACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGAC
AGCCGATCCTGCGCTCCAGCGAAAGCGGTTCTCGCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCGCGCCACT
GTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCGCGCCACCG
GAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
CTTACATTAATTGCGTTGCGCTACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGA
ATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGA
CGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGC
CCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTC
GTATCCCCTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCAGCG
CCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACAGCATTGTCATGGTTTTGTTGAA
AACCGGACATGGCACTCCAGTCGCTTCCCGTTCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTAT
GCCAGCCAGCCAGACGACGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGGATTTGCTGGTG
ACCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGG
GTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATT
CTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCCTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCCGCGCTT
TACAGCTTCGACGCGCTTCGTTCTACCATCACACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCCGAGAT
TTAATCGCCGAGCAATTTGCGACGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACG
ACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTT
TTTTCCCGGTTTTTTCGAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGAAACGGTCTGATAAGAGACCCG
GCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGC
TATCATGCCATACCGGAAAAGTTTTGCGCCATTGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGA
CTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCGGTTGAGCACCCGCGCCGCAAGGAATGGTGCAT
GCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGCCACGGGGCTGCCACCATACCCAGCCGAAACAAGCGCT
CATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTGCGGATATAGGCGCCAGCAACCCGAC
CTGTGGCGCCGGTGTATGCCGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCG
```

T7 promotor: **TAATACGACTCACTATAGGG**
T7 terminator: **CCGCTGAGCAATAACTAGC**
HIS tag: **CATCACCATCATCATCAC**

Zapis za SUMO protein:

```
ATGGGTCATCACCATCATCATCACGGGTCCCTGCAGGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAG
AGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCTTCAGAGAT
CTTCTTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCTAAAAGACAGGGT
AAGGAAATGGACTCCTTAAGATTCTGTACGACGGTATTAGAATTCAAGCTGATCAGCCCCCTGAAG
ATTTGGACATGGAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACCGCAACAGATT
```

Zapis za encim D-aspartat ligaza:

```
ATGAACAGTATTGAAAATGAAGAATTTATCCCTATATTATTAGGAAGCGACATGAACGTTTATGGTATGGC
ACGTTCTTTTAATGAAGCATAACGGCAAATCTGCCAAGCATATGCTTCGGATCAGTTAGCCCCTACCCGCTA
CAGTAAAATTGTCAATGTAGAAGTTATTCCAGGATTTGATAAAGACCCTGTATTTATCGAGACGATGCTTC
GTTTGGCAAAGAAAGATATTCTGATAAGAGTAAAAAATATCTTTTGATTGCTTGTGGTGATGGATATGCC
AGAATTGATCTCCCAACATAAACAAGAGCTGTCAGAATATTTTATCTGTCCATATATGATTATCTTTTATT
TGAAAGGCTGATCAATAAAGTAAGCTTTTATGAAGTTTGTGAAGAATATGATCTTCCGTATCCTAAAACAT
TGATCGTCAGAGAAGAAATGTTAGTAAATGGACATTTGGAACAGGAATTGCCTTTTGAATTCCCAGTTGCT
TTGAAACCTGCAAACAGTGTGGAGTATCTTTCTGTCCAATTTGAAGGAAGAAAAAAGCTTTTATTTTAGA
GACTAGAGAAGAGTTTGATTTAATTTTAGGCCGGATATACGAAGCCGGTTATAAAAGTGAATGATTGTAC
AAGATTTTATCCCGGGTGATGATAGTAATATGCGTGTGCTAAATGCGTATGTAGATGAAGATCATCAAGTT
CGGATGATGTGCCTTGGTCATCCACTATTAGAAGATCCTACACCAGCATCGATTGGTAATTACGTTGTGATC
ATGCCAGATTATAACGAAAAAATCTATCAAACCATTAAGGCATTTTTGGAAAAAATCGAATATACAGGCTT
TGCCAAATTCGATATGAAGTATGATCCTAGAGATGGAGAATATAAATTATTTGAAATCAATTTGAGACAAG
GTCGTAGCAGTTTCTTTGTGACATTGAACGGCTTGAATCTGGCTCGTTTTGTCACAGAAGATCGAGTGTTCA
ACAAACCCTTGTGAAACGACCTATGGAACGAATCAATCAGATAAAGCAAGATTATGGATGGGTGTGCC
AAAAAATCTTTTAGAATATGCTCGGGAAAAATGAAGACAAAAAAGTAGCTGAGCAAATGATCAAAGAAA
ATCGTTACGGTACTACTGTATTTTATGAAAAAGACCGATCAATCAAGCGCTGGTTGTTGATGAAATATATGT
TCCATAACTATATTCCAAGATTCAAAAAGTATTTTCATGTGAAAGAAGGCTAGCTAGAGGATCCGAATTTCG
AGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAA
AGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGC
```

7.2 Priloga B: Structure Screen 1 MD1-01 in Structure Screen MD1-02

Formulirano za kristalizacijo proteinov, peptidov, nukleinskih kislin in vodotopnih majhnih molekul.

WELL	CONC.	SALT	CONC.	BUFFER	pH	CONC.	PRECIPITANT
A1	0.02 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	Sodium acetate	4.6	30 % v/v	MPD
A2	0.2 M	Ammonium acetate	0.1 M	Sodium acetate	4.6	30 % w/v	PEG4000
A3	0.2 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium acetate	4.6	25 % w/v	PEG 4000
A4	2.0 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium acetate	4.6		
A5	2.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium acetate	4.6		
A6			0.1 M	Sodium acetate	4.6	8 % w/v	PEG 4000
A7	0.2 M	Ammonium acetate	0.1 M	Sodium citrate	5.6	30 % w/v	PEG 4000
A8	0.2 M	Ammonium acetate	0.1 M	Sodium citrate	5.6	30 % v/v	MPD
A9			0.1 M	Sodium citrate	5.6	20 % w/v	PEG 4000
						20% v/v	2-Propanol
A10	1.0 M	Ammonium phosphate monobasic	0.1 M	Sodium citrate	5.6		
A11	0.2 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	Sodium acetate	4.6	20 % v/v	2-Propanol
A12	1.4 M	Sodium acetate trihydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5		
B1	0.2 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	30 % v/v	2-Propanol
B2	0.2 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	30 % w/v	PEG 8000
B3	0.2 M	Magnesium acetate tetrahydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	20 % w/v	PEG 8000
B4	0.2 M	Magnesium acetate tetrahydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	30 % v/v	MPD
B5	1.0 M	Sodium acetate trihydrate	0.1 M	Imidazole	6.5		

B6	0.2 M	Sodium acetate trihydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	30 % w/v	PEG 8000
B7	0.2 M	Zinc acetate dihydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	18 % w/v	PEG 8000
B8	0.2 M	Calcium acetate hydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	18 % w/v	PEG 8000
B9	0.2 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5	30 % v/v	MPD
B10	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5	30 % v/v	2-Propanol
B11	0.2 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5	28 % v/v	PEG 400
B12	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5	30 % v/v	PEG 400
C1	0.2 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5	20 % v/v	2-Propanol
C2	0.8 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5		
C3	1.5 M	Lithium sulfate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5		
C4	0.8 M	Sodium phosphate monobasic	0.1 M	Sodium HEPES	7.5		
	0.8 M	Potassium phosphate monobasic					
C5	1.4 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5		
C6	2.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5	2 % v/v	PEG 400
C7			0.1 M	Sodium HEPES	7.5	20 % w/v	PEG 4000
C8	2.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Tris	8.5		
C9	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.5	30 % w/v	PEG 4000
C10	0.2 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M	Tris	8.5	30 % v/v	PEG 400
C11	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	Tris	8.5	30 % w/v	PEG 4000
C12	0.2 M	Ammonium acetate	0.1 M	Tris	8.5	30 % v/v	2-Propanol
D1	0.2 M	Sodium acetate trihydrate	0.1 M	Tris	8.5	30 % w/v	PEG 4000

D2			0.1 M	Tris	8.5	8 % w/v	PEG 8000
D3	2.0 M	Ammonium phosphate monobasic	0.1 M	Tris	8.5		
D4	0.4 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate					
D5	0.4 M	Ammonium phosphate monobasic					
D6	0.2 M	Ammonium sulfate				30 % w/v	PEG 8000
D7	0.2 M	Ammonium sulfate				30 % w/v	PEG4000
D8	2.0 M	Ammonium sulfate					
D9	4.0 M	Sodium formate					
D10	0.05 M	Potassium phosphate monobasic					
D11						30 % w/v	PEG 1500
D12	0.2 M	Magnesium formate dihydrate					
E1	0.1 M	Sodium chloride	0.1 M	BICINE	9.0	30 % v/v	PEG 500 MME
E2	2.0 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	BICINE	9.0		
E3			0.1 M	BICINE	9.0	10 % w/v	PEG 20000
E4	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.5	3.4 M	1,6-Hexanediol
E5			0.1 M	Tris	8.5	25 % v/v	tert-Butanol
E6	1.0 M	Lithium sulfate	0.01 M	Tris	8.5		
	0.01 M	Nickel(II) chloride hexahydrate					
E7	1.5 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Tris	8.5	12 % v/v	Glycerol
E8	0.2 M	Ammonium phosphate monobasic	0.1 M	Tris	8.5	50 % v/v	MPD
E9			0.1 M	Tris	8.5	20 % v/v	Ethanol

E10	0.01 M	Nickel(II) chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.5	20 % w/v	PEG 2000 MME
E11	0.5 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5	30 % v/v	MPD
E12			0.1 M	Sodium HEPES	7.5	10 % w/v	PEG 6000
F1			0,1 M	Sodium HEPES	7.5	20 % v/v	Jeffamine M-600
F2	1.6 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5		
	0.1 M	Sodium chloride					
F3	2.0 M	Ammonium formate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5		
F4	1.0 M	Sodium acetate trihydrate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5		
	0.05 M	Cadmium sulfate $\frac{8}{3}$ -hydrate					
F5			0.1 M	Sodium HEPES	7.5	70 % v/v	MPD
F6	4.3 M	Sodium chloride	0.1 M	Sodium HEPES	7.5		
F7			0.1 M	Sodium HEPES	7.5	10 % w/v	PEG 8000
F8	1.6 M	Magnesium sulfate heptahydrate	0.1 M	MES	6.5		
F9	2.0 M	Sodium chloride	0.1 M	MES	6.5		
	0.1 M	Potassium phosphate monobasic					
	0.1 M	Sodium phosphate monobasic					
F10			0.1 M	MES	6.5	12 % w/ v	PEG 20000
F11	1.6 M	Ammonium sulfate	0.1 M	MES	6.5	10 % v/ v	1,4-Dioxane
F12	0.05 M	Cesium chloride	0.1 M	MES	6.5	30 % v/v	Jeffamine M-600
G1	0.01 M	Cobalt(II) chloride hexahydrate	0.1 M	MES	6.5		
	1.8 M	Ammonium sulfate					
G2	0.2 M	Ammonium sulfate	0.1 M	MES	6.5	30 % w/v	PEG 5000 MME

G3	0.01 M	Zinc sulfate heptahydrate	0.1 M	MES	6.5	25 % v/v	PEG 500 MME
G4			0.1 M	Sodium HEPES	7.5	20 % w/v	PEG 10000
G5	2.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium citrate	5.6		
	0.2 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate					
G6	1.0 M	Lithium sulfate	0.1 M	Sodium citrate	5.6		
	0.5 M	Ammonium sulfate					
G7	0.5 M	Sodium chloride	0.1 M	Sodium citrate	5.6	4 % v/v	Polyethyleneimine
G8			0.1 M	Sodium citrate	5.6	35 % v/v	tert-Butanol
G9	0.01 M	Iron(III) chloride hexahydrate	0.1 M	Sodium citrate	5.6	10 % v/v	Jeffamine® M-600
G10	0.01 M	Manganese(II) chloride tetrahydrate	0.1 M	Sodium citrate	5.6		
	2.5 M	1,6-Hexanediol					
G11	2.0 M	Sodium chloride	0.1 M	Sodium acetate	4.6		
G12	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	Sodium acetate	4.6	30 % v/v	MPD
H1	0.01 M	Cobalt(II) chloride hexahydrate	0.1 M	Sodium acetate	4.6		
	1.0 M	1,6-Hexanediol					
H2	0.1 M	Cadmium chloride hemi (pentahydrate)	0.1 M	Sodium acetate	4.6	30 % v/v	PEG 400
H3	0.2 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium acetate	4.6	30 % w/v	PEG 2000 MME
H4	2.0 M	Sodium chloride				10 % w/v	PEG 6000
H5	0.5 M	Sodium chloride					
	0.1 M	Magnesium chloride hexahydrate					
	0.01 M	CTAB					
H6						25 % v/v	Ethylene glycol

Potarić N., Izolacija bakterijskega encima D-aspartat ligaza in biološko vrednotenje njegovih potencialnih zaviralcev. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, Laboratorijska biomedicina, 2017

H7						35 % v/v	1,4-Dioxane
H8	2.0 M	Ammonium sulfate				5 % v/v	2-Propanol
H9			1.0 M	Imidazole	7.0		
H10						10 % w/v	PEG 1000
H11	1.5 M	Sodium chloride				10 % v/v	Ethanol
H12			1.6 M	Sodium citrate	6.5		

7.3 Priloga B: PACT premier™ MD1-29

WELL	CONC.	SALT	CONC.	BUFFER	pH	CONC.	PRECIPITANT
A1			0.1 M	SPG	4.0	25 % w/v	PEG 1500
A2			0.1 M	SPG	5.0	25 % w/v	PEG 1500
A3			0.1 M	SPG	6.0	25 % w/v	PEG 1500
A4			0.1 M	SPG	7.0	25 % w/v	PEG 1500
A5			0.1 M	SPG	8.0	25 % w/v	PEG 1500
A6			0.1 M	SPG	9.0	25 % w/v	PEG 1500
A7	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	Sodium acetate	5.0	20 % w/v	PEG 6000
A8	0.2 M	Ammonium chloride	0.1 M	Sodium acetate	5.0	20 % w/v	PEG 6000
A9	0.2 M	Lithium chloride	0.1 M	Sodium acetate	5.0	20 % w/v	PEG 6000
A10	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	20 % w/v	PEG 6000
A11	0.2 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	Sodium acetate	5.0	20 % w/v	PEG 6000
A12	0.01 M	Zinc chloride	0.1 M	Sodium acetate	5.0	20 % w/v	PEG 6000
B1			0.1 M	MB	4.0	25 % w/v	PEG 1500
B2			0.1 M	MB	5.0	25 % w/v	PEG 1500

B3			0.1 M	MB	6.0	25 % w/v	PEG 1500
B4			0.1 M	MB	7.0	25 % w/v	PEG 1500
B5			0.1 M	MB	8.0	25 % w/v	PEG 1500
B6			0.1 M	MB	9.0	25 % w/v	PEG 1500
B7	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	MES	6.0	20 % w/v	PEG 6000
B8	0.2 M	Ammonium chloride	0.1 M	MES	6.0	20 % w/v	PEG 6000
B9	0.2 M	Lithium chloride	0.1 M	MES	6.0	20 % w/v	PEG 6000
B10	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	MES	6.0	20 % w/v	PEG 6000
B11	0.2 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	MES	6.0	20 % w/v	PEG 6000
B12	0.01 M	Zinc chloride	0.1 M	MES	6.0	20 % w/v	PEG 6000
C1			0.1 M	PCTP	4.0	25 % w/v	PEG 1500
C2			0.1 M	PCTP	5.0	25 % w/v	PEG 1500
C3			0.1 M	PCTP	6.0	25 % w/v	PEG 1500
C4			0.1 M	PCTP	7.0	25 % w/v	PEG 1500
C5			0.1 M	PCTP	8.0	25 % w/v	PEG 1500
C6			0.1 M	PCTP	9.0	25 % w/v	PEG 1500
C7	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	HEPES	7.0	20 % w/v	PEG 6000
C8	0.2 M	Ammonium chloride	0.1 M	HEPES	7.0	20 % w/v	PEG 6000
C9	0.2 M	Lithium chloride	0.1 M	HEPES	7.0	20 % w/v	PEG 6000
C10	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	HEPES	7.0	20 % w/v	PEG 6000
C11	0.2 M	Calcium chloride hexahydrate	0.1 M	HEPES	7.0	20 % w/v	PEG 6000
C12	0.01 M	Zinc chloride	0.1 M	HEPES	7.0	20 % w/v	PEG 6000
D1			0.1 M	MMT	4.0	25 % w/v	PEG 1500

D2			0.1 M	MMT	5.0	25 % w/v	PEG 1500
D3			0.1 M	MMT	6.0	25 % w/v	PEG 1500
D4			0.1 M	MMT	7.0	25 % w/v	PEG 1500
D5			0.1 M	MMT	8.0	25 % w/v	PEG 1500
D6			0.1 M	MMT	9.0	25 % w/v	PEG 1500
D7	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	Tris	8.0	20 % w/v	PEG 6000
D8	0.2 M	Ammonium chloride	0.1 M	Tris	8.0	20 % w/v	PEG 6000
D9	0.2 M	Lithium chloride	0.1 M	Tris	8.0	20 % w/v	PEG 6000
D10	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.0	20 % w/v	PEG 6000
D11	0.2 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	Tris	8.0	20 % w/v	PEG 6000
D12	0.01 M	Zinc chloride	0.1 M	Tris	8.0	20 % w/v	PEG 6000
E1	0.2 M	Sodium fluoride				20 % w/v	PEG 3350
E2	0.2 M	Sodium bromide				20 % w/v	PEG 3350
E3	0.2 M	Sodium iodide				20 % w/v	PEG 3350
E4	0.2 M	Potassium thiocyanate				20 % w/v	PEG 3350
E5	0.2 M	Sodium nitrate				20 % w/v	PEG 3350
E6	0.2 M	Sodium formate				20 % w/v	PEG 3350
E7	0.2 M	Sodium acetate trihydrate				20 % w/v	PEG 3350
E8	0.2 M	Sodium sulfate				20 % w/v	PEG 3350
E9	0.2 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate				20 % w/v	PEG 3350
E10	0.02 M	Sodium/potassium phosphate				20 % w/v	PEG 3350
E11	0.2 M	Sodium citrate tribasic dihydrate				20 % w/v	PEG 3350
E12	0.2 M	Sodium malonate dibasic monohydrate				20 % w/v	PEG 3350

F1	0.2 M	Sodium fluoride	0.1 M	Bis-Tris propane	6.5	20 % w/v	PEG 3350
F2	0.2 M	Sodium bromide	0.1 M	Bis-Tris propane	6.5	20 % w/v	PEG 3350
F3	0.2 M	Sodium iodide	0.1 M	Bis-Tris propane	6.5	20 % w/v	PEG 3350
F4	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Bis-Tris propane	6.5	20 % w/v	PEG 3350
F5	0.2 M	Sodium nitrate	0.1 M	Bis-Tris propane	6.5	20 % w/v	PEG 3350
F6	0.2 M	Sodium formate	0.1 M	Bis-Tris propane	6.5	20 % w/v	PEG 3350
F7	0.2 M	Sodium acetate trihydrate	0.1 M	Bis-Tris propane	6.5	20 % w/v	PEG 3350
F8	0.2 M	Sodium sulfate	0.1 M	Bis-Tris propane	6.5	20 % w/v	PEG 3350
F9	0.2 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0.1 M	Bis-Tris propane	6.5	20 % w/v	PEG 3350
F10	0.02 M	Sodium/potassium phosphate	0.1 M	Bis-Tris propane	6.5	20 % w/v	PEG 3350
F11	0.2 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M	Bis-Tris propane	6.5	20 % w/v	PEG 3350
F12	0.2 M	Sodium malonate dibasic monohydrate	0.1 M	Bis-Tris propane	6.5	20 % w/v	PEG 3350
G1	0.2 M	Sodium fluoride	0.1 M	Bis-Tris propane	7.5	20 % w/v	PEG 3350
G2	0.2 M	Sodium bromide	0.1 M	Bis-Tris propane	7.5	20 % w/v	PEG 3350
G3	0.2 M	Sodium iodide	0.1 M	Bis-Tris propane	7.5	20 % w/v	PEG 3350
G4	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Bis-Tris propane	7.5	20 % w/v	PEG 3350
G5	0.2 M	Sodium nitrate	0.1 M	Bis-Tris propane	7.5	20 % w/v	PEG 3350
G6	0.2 M	Sodium formate	0.1 M	Bis-Tris propane	7.5	20 % w/v	PEG 3350
G7	0.2 M	Sodium acetate trihydrate	0.1 M	Bis-Tris propane	7.5	20 % w/v	PEG 3350
G8	0.2 M	Sodium sulfate	0.1 M	Bis-Tris propane	7.5	20 % w/v	PEG 3350
G9	0.2 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0.1 M	Bis-Tris propane	7.5	20 % w/v	PEG 3350
G10	0.02 M	Sodium/potassium phosphate	0.1 M	Bis-Tris propane	7.5	20 % w/v	PEG 3350
G11	0.2 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M	Bis-Tris propane	7.5	20 % w/v	PEG 3350

Potarić N., Izolacija bakterijskega encima D-aspartat ligaza in biološko vrednotenje njegovih potencialnih zaviralcev. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, Laboratorijska biomedicina, 2017

G12	0.2 M	Sodium malonate dibasic monohydrate	0.1 M	Bis-Tris propane	7.5	20 % w/v	PEG 3350
H1	0.2 M	Sodium fluoride	0.1 M	Bis-Tris propane	8.5	20 % w/v	PEG 3350
H2	0.2 M	Sodium bromide	0.1 M	Bis-Tris propane	8.5	20 % w/v	PEG 3350
H3	0.2 M	Sodium iodide	0.1 M	Bis-Tris propane	8.5	20 % w/v	PEG 3350
H4	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Bis-Tris propane	8.5	20 % w/v	PEG 3350
H5	0.2 M	Sodium nitrate	0.1 M	Bis-Tris propane	8.5	20 % w/v	PEG 3350
H6	0.2 M	Sodium formate	0.1 M	Bis-Tris propane	8.5	20 % w/v	PEG 3350
H7	0.2 M	Sodium acetate trihydrate	0.1 M	Bis-Tris propane	8.5	20 % w/v	PEG 3350
H8	0.2 M	Sodium sulfate	0.1 M	Bis-Tris propane	8.5	20 % w/v	PEG 3350
H9	0.2 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	0.1 M	Bis-Tris propane	8.5	20 % w/v	PEG 3350
H10	0.02 M	Sodium/potassium phosphate	0.1 M	Bis-Tris propane	8.5	20 % w/v	PEG 3350
H11	0.2 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M	Bis-Tris propane	8.5	20 % w/v	PEG 3350
H12	0.2 M	Sodium malonate dibasic monohydrate	0.1 M	Bis-Tris propane	8.5	20 % w/v	PEG 3350