

Prekomjerna ekspresija i biokemijska karakterizacija proteina dipeptidil-peptidaze III iz termofilne bakterije *Caldithrix abyssi*

Sučec, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:951364>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Iva Sučec

**Prekomjerna ekspresija i biokemijska
karakterizacija proteina dipeptidil-peptidaze III iz
termofilne bakterije *Caldithrix abyssi***

Diplomski rad

Predložen Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja magistre kemije

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Mihaele Matovina. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske Zaklade za Znanost pod nazivom „Povezanost fleksibilnosti, aktivnosti i strukture u porodici dipeptidil-peptidaza III“ (7235), voditelj projekta prof. dr. sc. Sanja Tomić.

Zahvale

Željela bih se zahvaliti svima koji su doprinjeli nastanku ovog rada, te svima koji su pomogli tijekom mog školovanja.

Na prvom mjestu, veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici dr. sc. Mihaeli Matovina, s Instituta Ruđer Bošković. Puno Vam hvala na usmjeravanju i podršci tijekom izrade i pisanja rada, ali najviše na poticanju i potpori tijekom mojih praksi i prijava na doktorski studij.

Puno hvala doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec, mojoj mentorici s Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta na savjetima tijekom pisanja ovog rada i podršci tijekom prijava na doktorski studij.

Posebno veliko hvala dugujem dr. sc. Zrinki Karačić, uz koju sam toliko zavoljela istraživanje. Hvala ti na savjetima i ukazanom povjerenju, na usmjeravanju i poticanju samostalnosti u mom radu i razmišljanju.

Želim se zahvaliti svim prijateljima i kolegama na potpori i uljepšavanju ovog dijela mog života.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na razumijevanju, ljubavi i velikoj podršci tijekom mog dosadašnjeg školovanja, tijekom svih praksi, prijava i svih dobrih i loših trenutaka. Hvala vam!

And I wish to say a special thanks to mi Uriel. Thank you for believing in me and pushing me to always do better and aim higher.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. <i>Caldithrix abyssi</i>	1
1.2. Peptidaze.....	3
1.3. Dipeptidil-peptidaze III.....	4
2. Materijali i metode	9
2.1. Metode rada s DNA.....	9
2.1.1. Umnažanje kodirajućih sljedova pomoću lančane reakcije polimerazom.....	12
2.1.2. Razgradnja PCR produkta i plazmida pGEX-6P1 restrikcijским enzimima	13
2.1.3. Reakcija ligacije	14
2.2. Metode rada s bakterijama.....	15
2.2.1. Transformacija bakterija elektroporacijom	15
2.2.2. Analiza transformiranih bakterija	15
2.2.3. Izolacija rekombinantnog plazmida	16
2.3. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje proteina	16
2.3.1. Postav noćne kulture i veliki uzgoj.....	16
2.3.2. Provjera ekspresije rekombinantnog proteina	17
2.3.3. Sonikacija stanica	18
2.3.4. Pročišćavanje afinitetnom kromatografijom	18
2.3.5. Pročišćavanje pomoću tekućinske kromatografije isključenja	20
2.3.6. Određivanje koncentracije proteina	21
2.4. Molekulska svojstva proteina CaDPPIII-His ₆	21
2.4.1. Izoelektrična točka proteina CaDPPIII-His ₆	22
2.5. Katalitička svojstva proteina CaDPPIII-His ₆	23
2.5.1. Određivanje peptidazne aktivnosti	23
2.5.2. Kinetika peptidazne reakcije	23
3. Rezultati i rasprava.....	25
3.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje rekombinantnog proteina CaDPPIII-His ₆	25
3.2. Kloniranje, prekomjerna ekspresija i pročišćavanje GST-CaDPPIII	35
3.3. Molekulska svojstva proteina CaDPPIII-His ₆	38
3.3.1. Izoelektrična točka	39
3.4. Katalitička svojstva enzima CaDPPIII-His ₆	40
3.4.1. Temperaturna stabilnost i utjecaj temperature na specifičnu aktivnost CaDPPIII	40
3.4.2. Ovisnost peptidazne aktivnosti proteina CaDPPIII o pH reakcijske smjese	42
3.4.3. Utjecaj različitih metalnih iona na peptidaznu aktivnost proteina CaDPPIII	42

3.4.4.	Supstratna specifičnost	44
3.4.5.	Utjecaj efektor peptidaza na aktivnost CaDPPIII	45
4.	Zaključci.....	49
5.	Literaturna vrela.....	51
6.	Dodatak.....	54



Sažetak

Prekomjerna ekspresija i biokemijska karakterizacija proteina dipeptidil-peptidaze III iz termofilne bakterije *Caldithrix abyssi*

Iva Sućec

Dipeptidil-peptidaze III (DPPIII) su egzopeptidaze koje prema MEROPS bazi podataka pripadaju obitelji metalopeptidaza M49. Kako bi se okarakterizirala porodica DPPIII i kod termofilnih organizmima, za ovaj rad odabran je član porodice DPPIII iz anaerobne, termofilne bakterije *Caldithrix abyssi* koja se može naći u morskim hidrotermalnim izvorima. Primijećeno je da prvi motiv aktivnog mjesta proteina CaDPPIII sadrži pentapeptidni motiv 'HEISH' umjesto karakterističnog heksapeptidnog motiva 'HEXXGH', dok je drugi motiv potpuno očuvan.

Provedena je heterologna ekspresija kodirajućeg slijeda proteina DPPIII s histidinskim i glutation-S-transferaznim privjeskom. Rekombinantni protein pročišćen je afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom. Proteinu CaDPPIII-His₆ određena je izoelektrična točka (pI = 6,12), te je nativnom gel-elektroforezom i izoelektričnim fokusiranjem pokazano postojanje dva različita strukturna oblika. Ispitivanje sintetskih supstrata peptidaza, pokazalo je značajnu hidrolitičku aktivnost enzima prema Arg-Arg-2-naftilamidu (Arg₂-2NA), Gly-Arg-2NA, Phe-Arg-2NA i Pro-Arg-2NA. Ioni metala nemaju značajan utjecaj na peptidaznu aktivnost prema supstratu Gly-Arg-2NA. Najveća peptidazna aktivnost pokazana je kod pH = 7,0 i kod temperatura od 55 °C do 65 °C. Potpunu inhibiciju enzimske aktivnosti uzrokovali su kelirajući agensi, dok je djelomična inhibicija pokazana sa sulfhidril-blokirajućim reagensima. Kinetička mjerenja pokazala su da CaDPPIII kao supstrat preferira Arg₂-2NA kao i drugi okarakterizirani enzimi ove porodice. U usporedbi s humanim, kvaščevim i enzimom iz *Bacteroides thetaiotaomicron*, K_m enzima CaDPPIII je znatno veći, dok je konstanta brzine reakcije prvog reda koja odgovara pretvorbi supstrata u produkt (k_{cat}) usporediva s istom konstantom enzima iz *B. thetaiotaomicron*.

Dobiveni rezultati potvrđuju da je protein CaDPPIII član porodice DPPIII.

(56 stranica, 32 slika, 10 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: *Caldithrix abyssi*, dipeptidil-peptidaza III, hidrolaza, metalopeptidaza

Mentor: dr. sc. Mihaela Matovina, znanstveni suradnik

Nastavnik: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
2. izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
3. prof. dr. sc. Nives Galić

Zamjena: doc. dr. sc. Marko Močibob

Datum diplomskog ispita: 17. srpnja 2018.



Abstract

Heterologous expression and biochemical characterization of dipeptidyl peptidase III from anaerobic, thermophilic bacteria *Caldithrix abyssi*

Iva Sućec

Dipeptidyl-peptidases III (DPPsIII) are exopeptidases that are classified as M49 family of metallopeptidases in MEROPS database. To better understand DPPsIII from thermophilic organisms, a protein from anaerobic, thermophilic bacteria *Caldithrix abyssi* was chosen for this thesis. These bacteria can be found in Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vents. Protein CaDPPIII has a modified pentapeptide 'HEISH' active site motif, instead of characteristic 'HEXXGH' while the second motif is conserved.

The gene for CaDPPIII with His-tag and GST-tag was heterologously expressed. The recombinant protein was purified with affinity and size exclusion chromatography. Isoelectric point ($pI = 6,12$) was determined and two structural forms were detected by native electrophoresis and isoelectric focusing. Among various synthetic peptidase substrates examined, CaDPPIII-His₆ preferred Arg-Arg-2-naphthylamide (Arg₂-2NA), Gly-Arg-2NA, Phe-Arg-2NA and Pro-Arg-2NA. No significant enhancement in peptidase activity was observed in the presence of metal ions. Its hydrolytic activity was highest at $pH = 7,0$, and at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chelating agents completely inhibited the enzyme, while the sulfhydryl reagents inhibited it partially. Kinetic measurements showed that preferred substrate is Arg₂-2NA, a characteristic DPPIII substrate. Constant K_m is substantially higher for this enzyme compared to human, yeast and bacterial enzyme. First-order rate constant (k_{cat}) is comparable with the same constant of the bacterial enzyme.

Obtained results confirm CaDPPIII as a member of DPPIII family.

(56 pages, 32 figures, 10 tables, 46 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: *Caldithrix abyssi*, dipeptidyl peptidase III, hydrolase, metallopeptidase

Mentor: Dr. Mihaela Matovina, Research Associate

Supervisor: Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
2. Dr. sc. Branimir Bertoša, Associate Professor
3. Prof. Dr. sc. Nives Galić

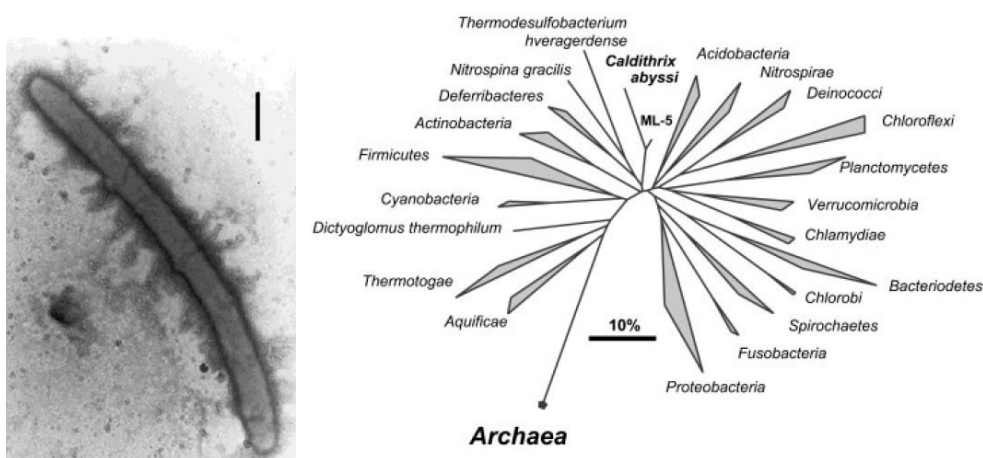
Substitute: Dr. sc. Marko Močibob, Assistant Professor

Date of exam: 17th July 2018

1. Uvod

1.1. *Caldithrix abyssi*

Caldithrix abyssi je umjereno termofilna, anaerobna bakterija pronađena u hidrotermalnim izvorima srednjoatlantskog grebena. Stanice ove bakterije su Gram-negativne, u obliku čvrstih štapića promjenjive duljine (Slika 1.1.).¹



Slika 1.1. Lijevo, stanica bakterije *Caldithrix abyssi* pod elektronskim mikroskopom. Crna linija označava duljinu od 0,5 μm. Desno, filogenetsko stablo na temelju usporedbe 16s rRNA sekvenci.¹

Optimalan rast stanica primijećen je kod pH 6,8 do 7,0 pri 60 °C u 2 do 5 % (w/v) natrijevom kloridu. Stanice koriste molekule vodika ili acetata kao donore elektrona i nitrata kao akceptore elektrona, te im je za povoljan rast potreban medij sa 100 mg l⁻¹ kvašćevog ekstrakta. Filogenetskom analizom i usporedbom 16S rDNA sljedova nije pronađena sličnost niti s jednom poznatom porodicom bakterija. Na temelju 16S rDNA sekvenci, fizioloških i morfoloških osobina ova bakterija ne može se pripisati niti jednoj poznatoj obitelji u domeni bakterija. Iz tog razloga predloženo je uvođenje nove obitelji nazvane *Caldithrix*.¹

Obitelji *Caldithrix* kasnije je pripisana nova vrsta bakterije *Caldithrix palaeochoryensis* koja prema 16s rRNA sekvenci najviše slični bakteriji *Caldithrix abyssi*. Proučavanjem katabolizma acetata i peptida, otkriveni su mehanizmi koji omogućuju ovoj bakteriji anaerobno disanje i život u uvjetima dubokih hidrotermalnih izvora.²

Analizom genoma bakterije *Caldithrix abyssi* otkriveni su geni (kodirajući sljedovi) enzima koji ovoj bakteriji omogućuju fermentiranje peptida i redukciju nitrata uz acetat ili molekularni vodik kao donore elektrona, kao i sintezu nukleotida i većine aminokiselina i vitamina.³ Filogenetskom analizom, na temelju 38 proteinskih sekvenci, potvrđeno je pripadanje bakterije *Caldithrix abyssi* novom redu *Calditrichaeota* u domeni bakterija.

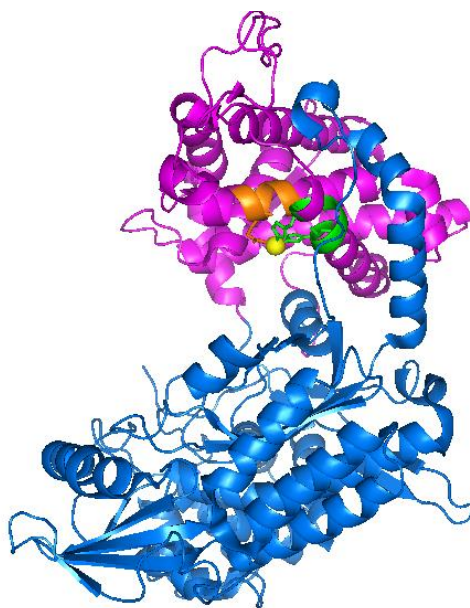
1.2. Peptidaze

Peptidaze su hidrolitički enzimi koji cijepaju peptidne veze u središnjem dijelu (endopeptidaze) ili na kraju (egzopeptidaze) polipeptidnih lanaca. Specifičnost peptidaze određena je strukturom katalitički aktivnog mjesta i veznim mjestima supstrata, a raznolikost struktura peptidaza odgovara njihovim raznolikim funkcijama. Peptidaze možemo podijeliti na aminopeptidaze koje cijepaju supstrat s njegova amino kraja i na karboksipeptidaze koje cijepaju s karboksilnog kraja. Ovisno o strukturi aktivnog mjesta, odnosno o kemijskoj skupini u aktivnom mjestu, peptidaze se dijele na serinske, cisteinske, treoninske, aspartatne, glutaminske, asparaginske i metalopeptidaze.⁴ Metalopeptidaze su najraznolikije peptidaze s više od 50 identificiranih porodica, te su klasificirane u MEROPS (*MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*) bazi podataka u obitelji i klanove na temelju sličnosti sekvenci i evolucijske udaljenosti.⁵ Metalopeptidaze možemo podijeliti s obzirom na strukturu aktivnog mjesta i sličnost tercijarne strukture i s obzirom na broj katalitičkih metalnih iona. Enzimi s dva metalna iona najčešće su egzopeptidaze. Kod enzima s jednim metalnim ionom, dvovalentni kation je najčešće cink koji djelujući kao opća baza aktivira molekulu vode za nukleofilni napad na peptidnu vezu. Metalni ion je u aktivnom mjestu stabiliziran najčešće s tri bočna ogranka aminokiselina poput histidina, glutamina, aspartata ili lizina iz očuvanog cink-veznog motiva koji je karakterističan za pojedinu obitelj metalopeptidaza.⁴ Također, jedan bočni ogranak veznog mjesta je uključen u elektrofilnu katalizu. Polovica poznatih metalopeptidaza sadrži 'HEXXH' motiv koji čini aktivno mjesto i vezno mjesto metala, gdje 'H' predstavlja histidine koji vežu cink, 'E' katalitički glutamat, a 'X' bilo koju aminokiselinu.

1.3. Dipeptidil-peptidaze III

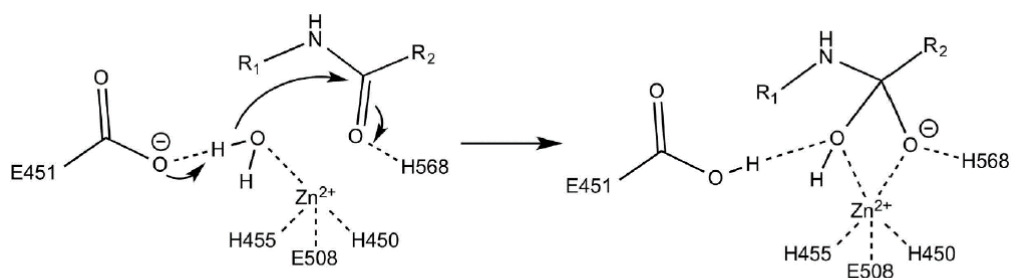
Dipeptidil-peptidaze III (DPPIII) pripadaju klanu gluzincinskih metalopeptidaza⁴, odnosno obitelji metalopeptidaza M49⁵ koje karakterizira dvostruki konsenzusni motiv 'HEXXH + EE(C,A,T)(R,K)A(E,D)'. DPPIII su egzopeptidaze koje vežu jedan cinkov kation (Zn^{2+}) pomoću dva histidinska bočna ogranka unutar 'HEXXGH' motiva i drugog glutamatnog bočnog ogranka iz 'EE(C,A,T)(R,K)A(E,D)' motiva. Ovakav motiv aktivnog mjesta, u kojem je udaljenost između dva histidina povećana za jednu aminokiselinu u usporedbi s drugim metalopeptidazama, jedinstven je za ovu obitelj peptidaza.⁶ Pokazano je da sve eukariotske M49 metalopeptidaze, sadrže 'EECRAE' kao drugi konsenzusni motiv.⁷ Zamjenom očuvanog glutamata iz 'HEXXGH' motiva kod štakorske DPPIII, pokazana je njegova katalitička uloga, odnosno njegova uloga opće baze u hidrolizi peptida. Također je pokazana uloga očuvanih histidina u pozicioniranju metalnog iona, gdje se njihovom zamjenom izgubila katalitička uloga enzima.⁸

Dipeptidil-peptidaze III cijepaju amino-terminalni dipeptid s kratkih peptida, dužine tri do deset aminokiselina. Od sintetskih supstrata najveću specifičnost imaju prema Arg-Arg-2-naftilamidu (Arg_2 -2NA), a sve se mogu inhibirati kelatorima metala te reaktivirati kobaltovim kationom (Co^{2+}).⁹ DPPIII je otkrivena 1960-ih u ekstraktima prednjeg režnja goveđe hipofize kao dipeptidil-arilamidaza III, kojoj je ispitana supstratna specifičnost te je pokazana najbolja aktivnost za supstrat Arg_2 -2NA pri pH 8,5 do pH 9.¹⁰ Povjerenstvo za nomenklaturu međunarodnog udruženja biokemije i molekularne biologije (IUBMB) 1992. godine predložilo je naziv dipeptidil-peptidaza III.



Slika 1.2. Prikaz kristalne strukture kvaščeve dipeptidil-peptidaze III. Ružičastom bojom je prikazana gornja cink vezujuća domena, ion cinka je prikazan kao žuta kuglica, a donja domena plavom bojom. Zelenom bojom prikazan je prvi očuvani motiv 'HELLGH', narančastom drugi 'EECRAE' motiv, dok su štapićastim prikazom označeni aminokiselinski ostaci koji koordiniraju ion cinka. Struktura preuzeta iz Protein Data Bank, ID: 3CSK. Za obradu korišten je program PyMol 1.3. Schrödinger, LLC.

Prvom kristalnom strukturom proteina DPP3 iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Slika 1.2.), koja je prototip ove obitelji, pokazano je da ova obitelj nema neke općenite strukturne sličnosti sa drugim metalopeptidazama, ali ima visoko očuvan koordiniran cink i katalitički važne aminokiselinske ostatke.¹¹ Rješavanjem kristalne strukture ljudske DPP3 (hDPP3) pokazana je sličnost u tercijarnoj strukturi s kvaščevim enzimom kao i entropijom navođeno vezanje supstrata, uslijed čega dolazi do savijanja gornje domene s mjestom vezanja cinka.¹² Enzim hDPP3 jednako zatvara gornju domenu, neovisno o tome koji se supstrat veže, a brzina cijepanja peptidne veze je određena interakcijom s cinkovim ionom. Naime, neki inhibitori, zapravo 'loši' supstrati DPP3, isključuju molekulu vode iz koordinacijske sfere cinka, te se cijepaju sporijim, anhidridnim mehanizmom, dok se 'pravi' supstrati cijepaju hidrolizom preko molekule vode (Slika 1.3.).¹³ Kod hDPP3 uloga iona metala je u pozicioniranju molekule vode ključne za hidrolizu supstrata¹³, kao i u vezanju supstrata i stabilizaciji prijelaznog stanja. Također je pokazana očuvanost aminokiselinskih ostataka u motivu cinkova veznog mjesta 'HEXXGH' kao i aminokiselinski ostaci u podmjestima koja vežu pojedine aminokiseline peptida.



Slika 1.3. Mehanizam cijepanja 'pravih' supstrata hDPPIII hidrolizom preko molekule vode. Na slici se vidi uloga očuvanih histidina iz motiva 'HEXXGH' u pozicioniranju kationa cinka (H455 i H450), te uloga glutamata iz istog motiva, kao opće baze u aktiviranju vode (E451). Slika preuzeta iz Kumar i sur. 2016.

Kod čovjeka, DPPIII (hDPPIII) je sveprisutan protein (u svim staničnim linijama)¹⁴ koji, *in vitro*, pokazuje afinitet prema različitim bioaktivnim peptidima uključujući angiotenzine i neuropeptide enkefaline i endomorfine^{15, 16}, zbog čega se smatra da bi protein hDPPIII mogao imati ulogu u regulaciji krvnog tlaka i boli.¹⁷ Također, pokazano je da hDPPIII stupa u interakciju s Kelch domenom ubikvitin ligaze Keap1, čime kompetira vezanju transkripcijskog faktora Nrf2, te sprječava njegovu ubikvitinaciju i razgradnju.¹⁸ Nakon translokacije Nrf2 u jezgru dolazi do ekspresije proteina uključenih u obranu od oksidacijskog stresa. Prekomjerna ekspresija i povećana aktivnost proteina DPPIII pokazana je kod karcinoma endometrija¹⁹, te kod stanica glioblastoma.²⁰

Analizom proteinskih sekvenci pokazano je da bakterijski proteini iz *Porphyromonas gingivalis* i *Bacteroides thetaiotaomicron* pokazuju malu sličnost s eukariotskim proteinima DPPIII. Katalitička aktivnost proteina iz *Bacteroides thetaiotaomicron*, prvog okarakteriziranog bakterijskog proteina porodice DPPIII, prema sintetskom supstratu Arg₂-2NA usporediva je s katalitičkom aktivnosti humanog enzima ($k_{\text{cat}} / K_m = 3\ 750\ \text{mmol}^{-1}\ \text{dm}^3\ \text{s}^{-1}$). Razlika u osjetljivosti na inhibitore serinskih proteaza bakterijskog i humanog enzima objašnjena je razlikom u strukturi, odnosno u prisutnosti serinskog aminokiselinskog ostatka u blizini aktivnog mjesta kod humanog proteina.²¹ Kod svih DPPIII uočena je osjetljivost na sulfhidrilne reagense, te je, za razliku od štakorskog i kvaščevog enzima, kod bakterijskog enzima pronađen cisteinski aminokiselinski ostatak u aktivnom mjestu, uključen u koordiniranje iona cinka koji se smatra ključnim za inaktivaciju enzima *p*-hidroksimerkuribenzoatom (pHMB).

Kod biljnih homologa DPPIII uočeno je da su to proteini koji uz domenu koja je slična DPPIII proteinima sadrže domenu koja pripada Nudix superobitelji (Nudix-DPPIII). Ispitivanja na proteinu Nudix-DPPIII iz mahovine *Physcomitrella patens* (PpND) pokazala su da protein ima hidrolaznu aktivnost prema sintetskom supstratu DPPIII hidrolaza, Arg₂-2NA, čime je svrstan u porodicu DPPIII metalopeptidaza. Aktivno mjesto DPPIII domene ovog enzima nije karakterističan heksapeptidni motiv 'HEXXXH', već pentapeptidni motiv 'HECCH'. PpND pokazuje znatno manju specifičnu aktivnosti prema Arg₂-2NA. Također, pokazana je fosfatazna aktivnost proteina PpND i homologa Nudix-DPPIII iz uročnjaka *Arabidopsis thaliana* na izopentenil-difosfatu (IPP), esencijalnom prekursoru svih izoprenoida.²² Time se ovaj protein smatra atipičnim Nudix i atipičnim DPPIII proteinom sa dvojnog hidrolaznom aktivnošću.

Poravnavanjem proteinskih sljedova (Slika 1.4.) proteina DPPIII iz termofilne bakterije *Caldithrix abyssi* (558 aminokiselina) s humanim proteinom (737 aminokiselina), proteinom iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron* (675 aminokiselina) i biljnim proteinom iz mahovine *Physcomitrella patens* (770 aminokiselina) primijećeno je da prvi konsenzusni slijed (prikazan crveno) proteina CaDPPIII sadrži pentapeptidni motiv ('HEISH'), čime pokazuje sličnost s proteinom PpND ('HECCH'), dok je drugi konsenzusni motiv ('EECKAD', prikazan žuto) očuvan i udaljen za 27 aminokiselinska ostatka od prvoga. Udaljenost od 28 aminokiselinska ostatka između dva konsenzusna motiva prisutna je kod biljnog proteina, kod bakterijskog proteina iz *B. thetaiotaomicron* ta udaljenost je 21 aminokiselinskih ostataka, dok kod humanog iznosi 51. Analizom kristalne strukture CaDPPIII (I. Sabljčić, publikacija slijedi) pokazano je da aminokiselinski ostaci His 379 i His 383 prvog konsenzusnog motiva, te Glu 412 drugog konsenzusnog motiva, uz jednu molekulu vode, sudjeluju u tetraedarskoj koordinaciji metalnog iona Zn²⁺.

```
Human LAVAYATQREK---LT--FLEEDD---KDLYILWKGPSFDVQVGLHELLLGHGSGKLFVQDE 465
Bt    TDAYNKA AHGNGFN EEFVCNDEE-RQRIDQYGDLTG---ELHTDLHECLGHGSGKLLPG-- 461
Ca    HEAKFDKLLKP---IAEKVLF AEQLPLVT FEGFF-----NHTLMHEIS-HGLGPGKIVL- 392
Pp    SQAKFDYILLP---IANVCVEASQRGA VDFDSFF-----THTICHECC-HGIGPHNIVTP 605
      .                               .                               :.  **  ** *:

Human --KGFNF DQETVINPETGEQIQSWYRSGETWDSKFSSTIASSYEECRAE SVGLYLCLHPQ 523
Bt    --V-----DPDALKAYGSTIEEARADLFGLYYVADPK 491
Ca    NGRQT-----EVKKE LKETYSSEECKADVLGMYNNL--F 425
Pp    DGRAS-----TVRLELQEVYS AIEAKADIVGLWALH--F 638
      :.  *:  **.:*:  .*.::
```

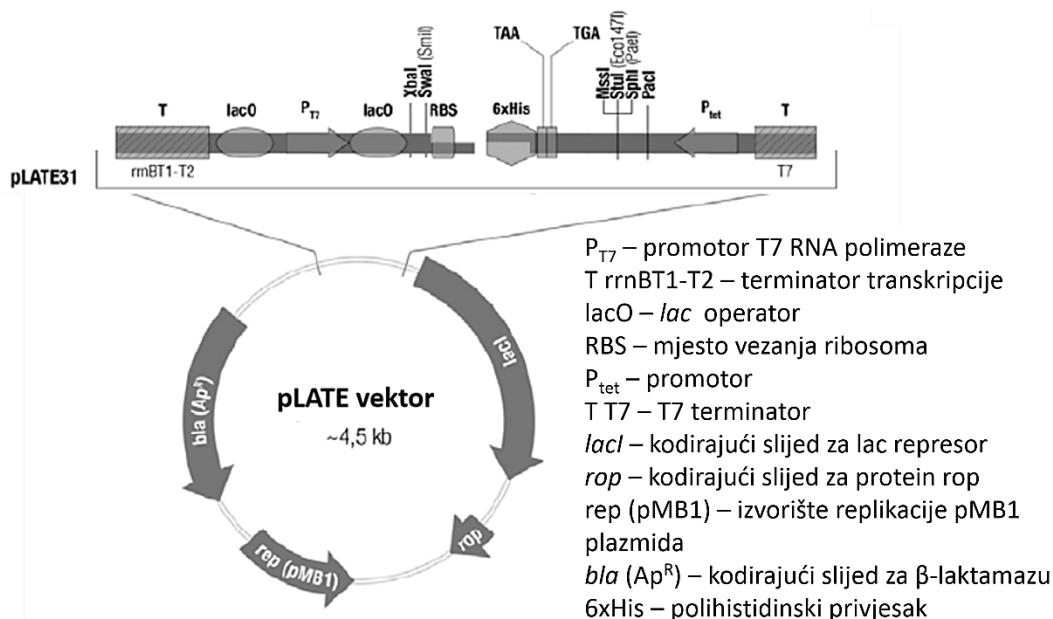
Slika 1.4. Poravnavanje proteinskih sljedova proteina DPPIII iz termofilne bakterije *Caldithrix abyssi* (Ca, UniProt ID: H1XW48) s humanim proteinom (UniProt ID: Q9NY33), proteinom iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt, UniProt ID: Q8A6N1) i biljnim proteinom iz mahovine *Physcomitrella patens* (Pp, UniProt ID: A9TLP4)

Da bismo potvrdili pripadnost proteina CaDPPIII porodici M49 metalopeptidaza, heterologno smo pročistili protein i biokemijski ga okarakterizirali. Ekspresijom u stanicama bakterije *Escherichia coli*, dobiveni su rekombinantni proteini s histidinskim i GST-privjeskom na C-, odnosno N-kraju ciljnog proteina. Protein je pročišćen tekućinskom afinitetnom kromatografijom i gel-filtracijom. Biokemijska karakterizacija proteina CaDPPIII obuhvaćala je određivanje molekulskih svojstava proteina poput postojanja različitih strukturnih oblika i izoelektrične točke proteina. Nakon što je ispitana supstratna specifičnost proteina CaDPPIII-His₆ prema određenim naftilamidima, ispitana je temperaturna stabilnost proteina, utjecaj temperature, pH, različitih metalnih iona te efektor peptidaza na specifičnu aktivnost proteina prema supstratu Gly-Arg-2NA. Provedena su kinetička mjerenja peptidazne aktivnosti pri 50 °C i određeni su kinetički parametri uz supstrate Arg₂-2NA i Gly-Arg-2NA.

2. Materijali i metode

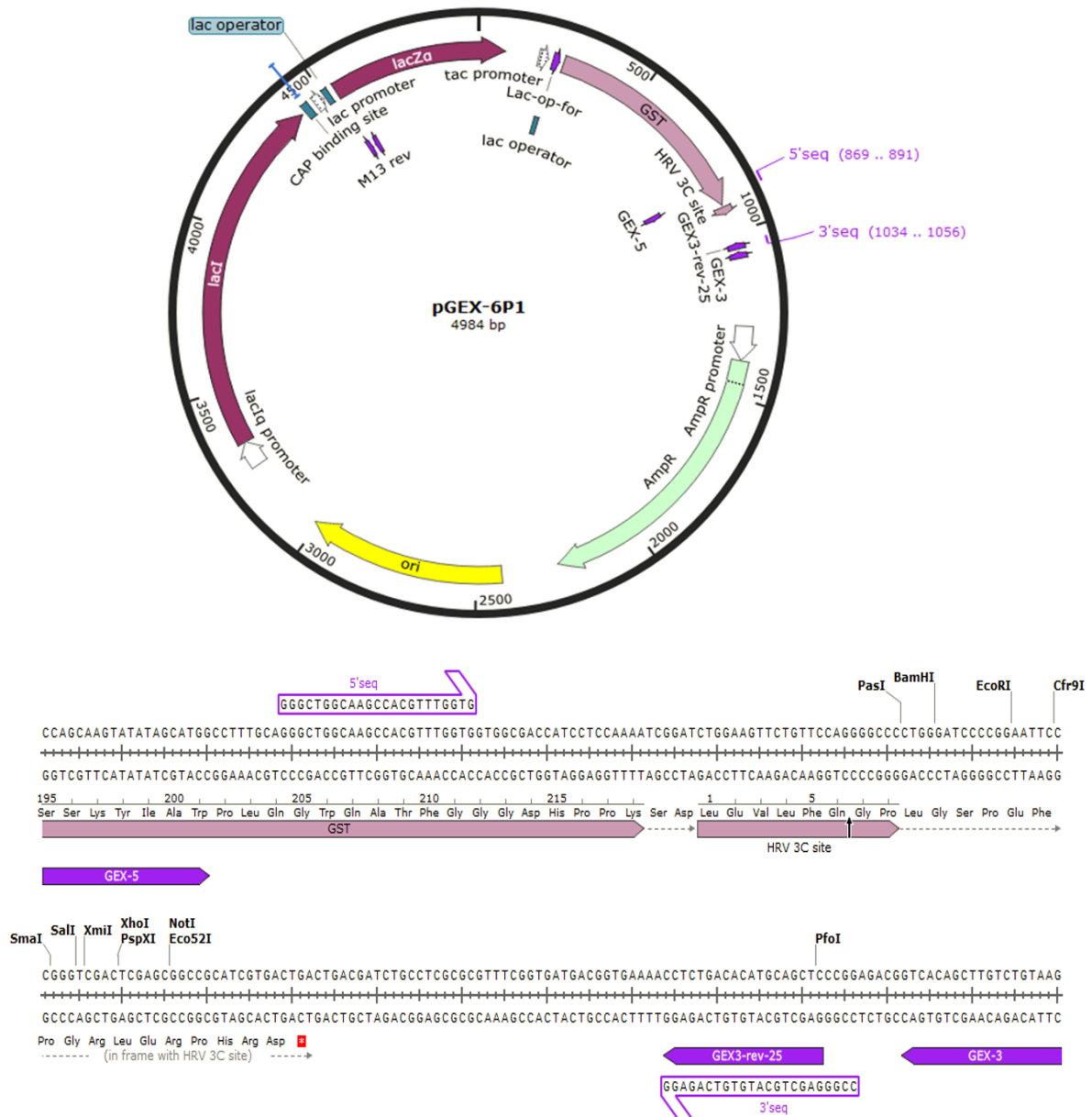
2.1. Metode rada s DNA

Sustav vektora pET je najčešće korišteni sustav za kloniranje i ekspresiju rekombinantnih proteina u bakteriji *E. coli*. Ciljni gen u pET plazmidu je pod kontrolom jake promotorske sekvence za RNA-polimerazu bakteriofaga T7. Ekspresija se inducira pojavom T7-RNA polimeraze koja specifično prepoznaje svoju promotorsku sekvencu.²³ T7-RNA polimeraza je monomerna, efikasna i procesivna polimeraza čija je kodirajuća regija, pod kontrolom *lac* operatora, ugrađena u kromosomsku DNA bakterije *E. coli* soja BL(DE3). Stanice ovog soja nose dio DNA bakteriofaga DE3, koji uključuje *lacI* (kodirajući slijed *lac* represora), *lac* promotor i kodirajući slijed T7-RNA polimeraze. Ovim sustavom ekspresija ciljnog proteina inducira se dodatkom izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG). Stanice bakterije *E. coli* soja BL21(DE3) su najčešće korištene u pET sustavu jer nemaju *lon* proteazu i *ompT* proteazu vanjske membrane koje bi mogle razgraditi ciljni protein tijekom pročišćavanja. Radi dodatne kontrole, većina ekspresijskih vektora pET ima ciljni gen pod kontrolom *lac* operatora, nizvodno od T7 promotora, čime se sprječava nespecifično vezanje bakterijske RNA-polimeraze na T7 promotor. Razni derivati pET vektora, dobiveni iz pBR322 plazmida, konstruirani su kako bi se olakšalo kloniranje, detekcija i pročišćavanje ciljnih proteina. Osim pomoću restrikcijskih enzima, ciljni gen je moguće ugraditi u pET vektor i ligacijom neovisnim kloniranjem (eng. *ligation-independent cloning*, LIC), na primjer pomoću aLICator™ sustava (Thermo Fisher Scientific, SAD). U ovom radu korišten je plazmid pLATE31 u koji je prethodno ugrađen kodirajući slijed proteina CaDPPIII kako bi se omogućila prekomjerna ekspresija ciljnog proteina s His-privjeskom na njegovom C-kraju (Slika 2.1.).



Slika 2.1. Shematski prikaz ekspresijskog vektora pLATE31. Slika preuzeta iz priručnika kompleta za kloniranje *aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System* (Thermo Fisher Scientific, SAD).

Ekspresijski vektori pGEX dizajnirani su kako bi se omogućila prekomjerna, unutarstanična ekspresija ciljnog proteina fuzioniranog s proteinom glutation-S-transferazom (GST) iz parazita *Schistosoma japonicum*. Ekspresijom u stanicama bakterije *E. coli*, soja BL21, dobivamo rekombinantni protein s GST-privjeskom na N-kraju ciljnog proteina. Protein GST ima molekulsku masu od 26 kDa i zadržava sposobnost vezanja glutationa i kada je fuzioniran s drugim proteinima. Kod vektora pGEX-6P1 (Slika 2.2.), između kodirajućeg slijeda proteina GST i ciljnog proteina postoji sekvenca koju specifično prepoznaje i cijepa proteaza iz ljudskog rinovirusa HRV 3C (*Human Rhinovirus 3C Protease*) kako bi se GST-privjesak uklonio nakon ekspresije i pročišćavanja.



Slika 2.2. Shematski prikaz ekspresijskog vektora pGEX-6P1 korištenog kako bi se dobio rekombinantni ciljni protein s GST-privjeskom na N-kraju. Prikaz dobiven pomoću programa *SnapGene* (GSL Biotech LLC, SAD). Slika gore prikazuje cirkularni vektor, slika dolje je linearni prikaz slijeda na vektoru od komplementarnog slijeda 5'seq početnice do slijeda 3'seq početnice koje su korištene za PCR na kolonijama i sekvenciranje plazmida. Na linearnom prikazu može se vidjeti slijed prepoznavanja i mjesto cijepanja HRV 3C proteaze kao i višestruko mjesto kloniranja sa mjestima cijepanja različitih restriksijskih endonukleaza.

2.1.1. Umnažanje kodirajućih sljedova pomoću lančane reakcije polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) je metoda umnažanja željenog fragmenta DNA pomoću DNA-polimeraze. Uz DNA-polimerazu nužne su i dvije oligonukleotidne početnice koje omeđuju DNA sekvencu koju želimo umnožiti.²⁴ Početnice se hibridiziraju na odgovarajuće komplementarne sljedove nakon što je DNA-kalup denaturiran zagrijavanjem. Reakcijska smjesa, uz termostabilnu DNA-polimerazu, par oligonukleotidnih početnica i DNA-kalup, mora sadržavati smjesu deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP) te optimalnu koncentraciju Mg^{2+} , u puferu pogodnom za rad polimeraze.

Phusion-DNA-polimeraza je oko 50 puta točnija i oko 2-4 puta brža od *Taq*-DNA-polimeraze, te za produljivanje lanaca DNA treba od 15 do 30 s/kb. Ova polimeraza dobivena je fuzijom DNA-polimeraze iz arheje *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-DNA-polimeraza), koja posjeduje 3'-5' egzonukleaznu aktivnost, s DNA-veznom domenom.²⁵

Kodirajući slijed proteina CaDPPIII umnožen je iz vektora pLATE31 kako bi se ugradio u ekspresijski vektor pGEX-6P1 čime dobivamo vektor za ekspresiju rekombinantnog, fuzijskog proteina CaDPPIII s glutation-S-transferazom na N-kraju. Kodirajući slijed iz vektora pLATE31 umnožen je lančanom reakcijom polimeraze pomoću početnica GSTCaDPP3_F i GSTCaDPP3_R (slijed početnica naveden u tablici 2.1.).

Tablica 2.1. Slijed i temperature mekšanja (T_m) početnica korištenih za kloniranje (GSTCaDPP3_F i GSTCaDPP3_R) te početnica korištenih tijekom PCR-a na kolonijama i za sekvenciranje (pGEX 5'-seq i pGEX 3'-seq).

Početnica	Slijed: 5' → 3'	T_m / °C
pGEX 5'-seq	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	65,2
pGEX 3'-seq	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG	65,2
GSTCaDPP3_F	GAG AGA GGA TCC ATG AAA CGA ATC TTG	69,6
GSTCaDPP3_R	GAG AGA CTC GAG CTA ATT GCT ATT TCC	66,3

Reakcijska smjesa (100 μ l) za PCR sastoji se od 0,157 ng μ l⁻¹ pLATE31 vektora s kodirajućim slijedom proteina CaDPPIII, 0,5 μ mol dm⁻³ početnica, 200 μ mol dm⁻³ dNTP, 1 μ l *Phusion*-DNA-polimeraze (2 U μ l⁻¹, jedna jedinica (U, eng. *Unit*) enzima definirana je kao količina enzima potrebna za ugradnju 10 nmol dNTP-a u polinukleotid pri 74°C u 30 minuta), 1×*Phusion HF* pufera (15 mmol dm⁻³ Tris-HCl, 20 mmol dm⁻³ (NH₄)₂SO₄, 1,5 mmol dm⁻³ MgCl₂ puferu). Program PCR-a naveden je u tablici 2.2.

Tablica 2.2. Program izvođenja PCR-a pomoću kojeg je umnožen kodirajući slijed proteina CaDPPIII iz vektora pLATE31.

	<i>T</i> / °C	Vrijeme	Broj ciklusa
početna denaturacija	98	30s	1
denaturacija	98	10s	30
sparivanje početnica	60	20s	
produljenje	72	30s	
završno produljenje	72	5min	1

Nakon PCR-a odvojeno je 5 μ l reakcijske smjese i pomiješano je s 1 μ l *6xLoadingDye* (10 mmol dm⁻³ Tris-HCl (pH 7,6) 0,03% bromofenol plavo, 0,03% ksilencijanoloformilformil, 60 % glicerol, 60 mmol dm⁻³ EDTA). Agarozni gel pripremljen je otapanjem 3 g agaroze u 300 ml TAE pufera sastava: 40 mmol dm⁻³ Tris, 20 mmol dm⁻³ CH₃COOH, 1 mmol dm⁻³ EDTA. Na 1%-tni agarozni gel nanesen je marker, standard veličine *MassRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific, SAD) te pripremljena smjesa PCR-produkta. Nakon provedene elektroforeze pri 120 V tijekom 20 min, procijenjena je veličina dobivenog PCR fragmenta na gelu i uspoređena je s očekivanom vrijednošću od 1701 parova baze.

Ostatak PCR-produkta je pročišćen pomoću *GeneJet Gel Extraction and DNA Cleanup Micro* kompleta (Thermo Scientific, SAD) kako bi se uklonila sol, preostale početnice i ostale nečistoće. Pročišćavanje je izvršeno prema uputama proizvođača.

2.1.2. Razgradnja PCR produkta i plazmida pGEX-6P1 restrikcijskim enzimima

Restrikcijsko-modifikacijski sustav omogućuje bakterijama razgradnju strane DNA, a čine ga restrikcijske endonukleaze i njima odgovarajuće DNA-metilaze. Određena restrikcijska endonukleaza prepoznaje specifičan slijed u stranoj, nemodificiranoj, dvolančanoj DNA. DNA domaćina je zaštićena od vlastitih restrikcijskih endonukleaza, jer je modificirana pomoću specifične DNA-metilaze koja metilira određene baze u mjestu prepoznavanja restrikcijske endonukleaze. Postoje različiti tipovi restrikcijsko-modifikacijskog sustava, a ključne odlike sustava tipa II čine ga pogodnim za uporabu u genetičkom inženjerstvu. Sustav tipa II čine dva različita enzima, endonukleaza i metilaza, koji prepoznaju identičan, ciljni, palindromski slijed.²⁴

Dobiveni pročišćeni PCR-produkt i ekspresijski vektor pGEX-6P1 razgrađeni su restrikcijskim enzimima, *BamHI* i *XhoI*. Restrikcijski enzimi izabrani su tako da cijepaju samo jednom oba vektora pLATE31 i pGEX-6P1 te da se, nakon ligacije, otvoreni okviri čitanja ciljnog proteina i GST-privjeska poklapaju. Analiza je provedena pomoću programa *SnapGene*. Reakcijska smjesa (40 μ l) za razgradnju

vektora sastoji se od 2 µg vektora pGEX-6P1, 40 U restrikcijskog enzima *FastDigest BamHI* (Thermo Scientific, SAD), 40 U restrikcijskog enzima *FastDigest XhoI* (Thermo Scientific, SAD) u 1× *FastDigest* puferu. Nakon 10 minuta pri 37°C, restrikcijskoj smjesi je dodano 2 U alkalne fosfataze *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Thermo Scientific, SAD) te se reakcija nastavila još 10 minuta pri 37°C nakon čega su enzimi inaktivirani inkubacijom pri 70°C, 5 minuta. Reakcijska smjesa (60 µl) za razgradnju PCR-produkta sastoji se od 200 ng pročišćenog PCR produkta, 40 U restrikcijskog enzima *FastDigest BamHI* (Thermo Scientific, SAD), 40 U restrikcijskog enzima *XhoI (FastDigest Thermo Scientific)*, 40 U restrikcijskog enzima *FastDigest DpnI* (Thermo Scientific, SAD) u 1 × *FastDigest* puferu. Restrikcijski enzim *DpnI* cijepa DNA u mjestu prepoznavanja 5'-GA¹TC-3' s metiliranim adeninima. Ovim korakom pocijepan je DNA kalup, koji je možda zaostao nakon pročišćavanja, te je spriječen njegov ulazak u bakterijske stanice transformacijom. Nakon 15 minuta pri 37°C restrikcijski enzimi su inaktivirani inkubacijom smjese na 5 minuta pri 70°C. Razgrađeni PCR-produkt i vektor pGEX-6P1 pročišćeni su pomoću *GeneJet Gel Extraction and DNA Cleanup Micro* kompleta (Thermo Scientific, SAD). Koncentracija dobivenog, razgrađenog i pročišćenog PCR-produkta i vektora određena je spektrofotometrijski na mikrovolumnom spektrofotometru BioDrop (BioDrop, UK).

2.1.3. Reakcija ligacije

Obitelj enzima DNA-ligaza kataliziraju nastanak fosfodiesterske veze između susjednog 5'-fosfatnog i 3'-hidroksilnog kraja dvolančane DNA čime se mogu popraviti urezi u DNA duplesu ili spojiti dva fragmenta DNA tupih ili ljepljivih krajeva. Iako se pojedini članovi ove obitelji razlikuju u potrebnim kofaktorima, supstratnoj specifičnosti i termostabilnosti, svi članovi ove porodice dijele strukturnu sličnost te mehanizam enzimске aktivnosti koji se odvija u tri koraka. Prvi korak uključuje nastanak kovalentnog intermedijera enzima i AMP-a pomoću kofaktora. Drugi korak je prijenos AMP-a na 5'-fosfatni DNA kraj iza kojeg slijedi spajanje 3'-hidroksilnog kraja s adeniliranim 5'-krajem uz otpuštanje AMP-a.²⁶ Ligaza iz bakteriofaga T4, za razliku od drugih enzima svoje obitelji, kao supstrat može imati hibridnu molekulu DNA-RNA te kod spajanja krajeva češće dopušta sparivanje pogrešnih baza (eng. *mismatch*). Ovoj ligazi je kao kofaktor potreban ATP.

Povezivanje vektora s PCR-produktom provedeno je u reakcijskoj smjesi koja se sastoji od 160 ng PCR-produkta (inserta), 100 ng vektora pGEX-6P1 (molarni omjer vektora pGEX-6P1 i inserta, 1:5), 1 U T4-DNA-ligaze u puferu konačne koncentracije Tris-HCl-a od 40 mmol dm⁻³, 10 mmol dm⁻³ MgCl₂, 10 mmol dm⁻³ DTT, 0,5 mmol dm⁻³ ATP pri pH 7,8. Ligacijska smjesa inkubirana je 10 minuta pri 22°C nakon čega je T4-DNA-ligaza inaktivirana inkubacijom 5 minuta na 70°C.

2.2. Metode rada s bakterijama

2.2.1. Transformacija bakterija elektroporacijom

Transformacija je jedan od procesa unosa strane molekule DNA u bakterijsku stanicu. Jedna od učinkovitijih fizikalnih metoda transformacije je elektroporacija. Elektroporacijom stanice su podvrgnute jakom, kratkotrajnom električnom šoku čime se otvaraju prolazne pore na membrani stanica kroz koje mogu proći molekule DNA.²⁴

Elektrokompetentne stanice (40 μ L) soja DH5 α bakterije *E.coli* transformirane su s 2 μ l ligacijske smjese. Elektrokompetentne stanice (50 μ L) soja BL21-CodonPlus (DE3)-RIL bakterije *E.coli* transformirane su s 1 μ l otopine pLATE31CaDPPIII plazmida. Elektroporacija je trajala oko 5 ms uz primijenjen napon od 2,50 kV. Odmah nakon elektroporacije stanice su prebačene u tubicu s 1 ml Lennox LB medija, te inkubirane sat vremena na 37°C i 300 rpm. Lennox LB medij sastoji se od 10 g l⁻¹ triptona, 5 g l⁻¹ NaCl-a te 5 g l⁻¹ ekstrakta kvasca u redestiliranoj vodi. Medij je steriliziran 20 minuta pri 121°C i tlaku od 1 bar, te ohlađen prije uporabe. Nakon inkubacije, stanice su nanosene na krute hranjive podloge s ampicilinom konačne koncentracije 100 μ g ml⁻¹. Na podloge je nanoseno 800 μ l otopine stanica. Hranjive podloge s nanesenim bakterijama inkubirane su preko noći na 37°C.

2.2.2. Analiza transformiranih bakterija

S hranjivih podloga na koje su nanosene bakterije soja DH5 α , transformirane ligacijskom smjesom pGEX-6P1 vektora i inserta s kodirajućim slijedom za protein CaDPPIII, izabrano je 8 kolonija na kojima se proveo PCR na kolonijama. Smjesa za PCR (9 μ l) na jednoj koloniji sadržavala je 5 μ l *DreamTaq Green PCR master mix*-a (Thermo Fisher Scientific, SAD), 0,5 μ M uzvodne pGEX 5'-seq i nizvodne pGEX 3'-seq početnice (slijed i temperature mekšanja navedene u tablici 2.1.) u vodi bez nukleaza (eng. *Nuclease free*). U PCR smjesu dodan je 1 μ l suspenzije jedne kolonije bakterijskih stanica resuspendirane u 50 μ l miliporirane vode. Program PCR-a naveden je u tablici 2.3. Radi provjere koje kolonije sadrže rekombinantni plazmid, reakcijske smjese PCR-a na kolonijama nanosene su u jažice 1%-tnog agaroznog gela. Na gel je nanosena i marker *MassRuler DNA Ladder Mix*. Elektroforeza se provodila 20 minuta pri naponu od 120 V. Kolonije u kojima je došlo do ugradnje rekombinantnog plazmida prenesene su na novu krutu hranjivu podlogu s ampicilinom s koje su inokulirane noćne kulture radi izolacije plazmida.

Tablica 2.3. Program izvođenja PCR-a na kolonijama pomoću kojeg je provjereno koje kolonije sadrže rekombinantni plazmid pGEX-6P1CaDPPIII

	<i>T</i> / °C	trajanje ciklusa / min	broj ciklusa
početna denaturacija	95	2	1
denaturacija	95	0,5	25
sparivanje početnica	59	0,5	
produljenje	72	2,5	
završno produljenje	72	5	1

2.2.3. Izolacija rekombinantnog plazmida

Iz 10 ml prekonoćne kulture pročišćeni su rekombinantni plazmidi pGEX-6P1CaDPPIII, na *QIAprep* kolonama (Qiagen, Germany) prema uputama proizvođača (*QIAprep Miniprep Handbook*). Pročišćenim rekombinantnim plazmidima izmjerena je koncentracija pomoću mikrovolumnog spektrofotometra *BioDrop*, te su uzorci plazmida pripremljeni prema uputama firme Macrogen (Južna Koreja) i poslani na sekvenciranje uz početnice pGEX 5'-seq i pGEX 3'-seq (Tablica 2.1.).

2.3. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje proteina

2.3.1. Postav noćne kulture i veliki uzgoj

Po 10 ml tekućeg Lennox LB medija s ampicilinom konačne koncentracije 100 µg ml⁻¹ inokulirano je kolonijama bakterija BL21-CodonPlus (DE3)-RIL transformiranim vektorom pLATE31CaDPPIII, tj. pGEX-6P1CaDPPIII. Kolonije s krute podloge prebačene su nastavkom pipete u medij u *Falcon* epruveti od 50 ml. Bakterije su inkubirane preko noći pri 37°C i 250 rpm.

Volumenu od 500 ml tekućeg Lennox LB medija, s ampicilinom končne koncentracije 100 µg ml⁻¹, dodano je 10 ml noćne kulture u tikvici širokog grla. Bakterije su inkubirane na 37°C pri 250 rpm. Rast bakterija praćen je mjerenjem optičke gustoće (OD, eng. *optical density*) pri 600 nm, te je nakon približno dva sata inkubacije izmjerena optička gustoća pogodna za početak indukcije ekspresije (OD oko 0,6). Uzeti su alikvoti bakterijskih kultura od 1 ml, stanice su oborene centrifugiranjem pri 4°C, 10 000 rpm na 10 minuta, te je talog sačuvan na -20°C radi provjere ekspresije. Indukcija ekspresije započeta je dodatkom izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozida (korištene su različite koncentracije IPTG-a; navedeno uz rezultate) u veliku bakterijsku kulturu. Inducirane kulture inkubirane su preko noći pri 18°C i 130 rpm. Ponovno je uzet alikvot od 1 ml radi provjere ekspresije. Stanice su istaložene centrifugiranjem 20 minuta pri 6 000 rpm. Talози su pohranjeni na -20°C.

2.3.2. Provjera ekspresije rekombinantnog proteina

Provjera ekspresije rekombinantnih proteina izvršena je elektroforezom uzoraka taloga stanica prije i poslije indukcije ekspresije na natrij-dodecilsulfat poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE).²⁷ Razdvajanje je moguće zbog gibanja električki nabijenih čestica kroz medij pod utjecajem električnog polja. Pri neutralnom pH uz dodatak SDS-a i 2-merkaptoetanolu sekundarna struktura proteina se gubi, te preostaju samo kompleksi polipeptidnih lanaca i molekula SDS koji zauzimaju konformaciju nasumičnog klupka. Proteini obrađeni na ovaj način imaju isti oblik i jednak omjer naboja i mase zato što je količina vezanog SDS po jedinici mase proteina konstantna. Naboj kompleksa protein-SDS određen je isključivo nabojem SDS, koji prekriva naboj bočnih lanaca proteina.²⁴

Gelovi su pripremljeni miješanjem otopina 30 %-tnog akrilamida/bisakrilamida (29 : 1), pufera za razdvajanje koji se sastoji od $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl, 4 g dm^{-3} SDS pri pH 8 ili pufera za sabijanje koji se sastoji od $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl, 4 g dm^{-1} SDS pri pH 6,8 s dodatkom APS-a i TEMED-a neposredno prije nanošenja gela u kalup. Reakciju polimerizacije katalizira TEMED (*N, N, N', N'*-tetrametilendiamid), dok je APS (amonijev persulfat) inicijator reakcije polimerizacije. U kalup za gel, prvo se nanosio gel za razdvajanje, nadslojen vodom, nakon čije polimerizacije se nanosio gel za sabijanje sa češljicom za formiranje jažica. Uzorci taloga stanica prije i poslije ekspresije resuspendirani su u $100 \mu\text{l}$ ReH_2O te je alikvotima od $3 \mu\text{l}$ dodano po $2 \mu\text{l}$ miliporirane vode i $5 \mu\text{l}$ 2xSDS pufera za nanošenje uzoraka. Pufer za nanošenje uzoraka na gel sastoji se od 50 g dm^{-3} SDS-a, 50 mmol dm^{-3} 2-merkaptoetanolu (2-ME), 25% glicerola, $0,1 \text{ g dm}^{-3}$ bromfenolskog plavila te $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl-a pri pH 6,8. Takvi uzorci zagrijani su 10 minuta na 97°C , a na gel je nanošeno po $10 \mu\text{l}$. U prvu jažicu gela nanesen je marker molekulske mase. Elektroforeza je provedena 15 minuta na 100 V i zatim još 50 minuta na 180 V. Gel je prebačen u posudicu za bojanje gdje je bojan 10 minuta pri 50°C otopinom boje Coomassie Brilliant Blue koja se sastoji od 25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v), 45 % etanola (v/v) i 10 % octene kiselina (v/v). Višak boje s gela uklonjen je ispiranjem kipućom vodom i odbojivačem sastava metanol : octena kiselina : voda = 3 : 1 : 6 (v/v/v). Provjerena je uspješnost ekspresije usporedbom pruga na gelu uzorka i markera, odnosno usporedbom molekulske mase ciljnog fuzijskog proteina s markerom molekulske mase.

2.3.3. Sonikacija stanica

Razaranje staničnih stjenki i oslobađanje unutarstaničnog sadržaja (liza stanica) izvršena je u 5 puta većem volumenu pufera za lizu od mase dobivenih stanica. Talog bakterijskih stanica resuspendiran je na ledu u puferu sastava: 10 mmol dm⁻³ imidazol, 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl, 300 mmol dm⁻³ NaCl pri pH 8,0. Suspenziji je dodan lizozim do konačne koncentracije od 100 µg ml⁻¹ te je ona sonicirana 10 puta po 15 sekundi uz minutu pauze između sonikacija. Nakon sonikacije uzet je alikvot sonicirane smjese od 100 µL te je centrifugiran 20 minuta na 11 000 rpm. Dobiveni supernatant i talog ispitani su SDS-PAGE-om kako bi se provjerilo zaostaje li rekombinantni protein u inkluzijskim tijelima, odnosno u talogu ili je u topivom obliku u supernatantu. Veći dijelovi stanica u velikoj sonikacijskoj smjesi oboreni su centrifugiranjem 45 minuta na 11 000 rpm u Sorval centrifugi RC-5B. Supernatant je prebačen u novu tubicu te je profiltriran kroz 0,22 µm filter.

2.3.4. Pročišćavanje rekombinantnog proteina afinitetnom kromatografijom

Kako ciljne rekombinantne proteine nije lako pročistiti klasičnim metodama pročišćavanja iz smjese bakterijskih proteina nakon lize stanica, koriste se fuzijski proteini ciljnog proteina i nekog afinitetnog privjeska. Fuzijski protein se tada može pročistiti afinitetnom kromatografijom. Jedan od afinitetnih privjeska je histidinski privjesak, koji se sastoji od šest uzastopnih histidinskih aminokiselinskih ostataka (His₆). Metoda afinitetnog pročišćavanja His-privjeska temelji se na selektivnosti i afinitetu Ni²⁺-nitrilotrioctene kiseline (eng. Ni²⁺-*nitrilotriacetic acid*, Ni-NTA) prema biomolekulama sa His-privjeskom. Ovakvo pročišćavanje omogućuje visoku reproducibilnost pročišćavanja u jednom koraku uz slabu (ili nikakvu) interferenciju His-privjeska na strukturu ili funkciju pročišćenog proteina.²⁸ Nitrilotrioctena kiselina (NTA) je tetradentatni kelirajući adsorbens koji zauzima četiri (od šest) ligandna mjesta iona nikla dok se preostala dva ligandna mjesta vežu za His-privjesak.

Za pročišćavanje na Ni-NTA agaroznoj koloni pripremljena je kolona s 0,5 ml Ni²⁺-NTA agaroze. Kolona je isprana s 5 ml ultra čiste vode, te ekvilibrirana s 5 ml pufera za lizu. Tijekom nanošenja proteinskog ekstrakta na kolonu sakupljana je nevezana frakcija uz protok od 0,5 ml min⁻¹. Kolona je isprana od nespecifično vezanih molekula tri puta s 2 ml pufera za ispiranje: 20 mmol dm⁻³ imidazol, 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl i 300 mmol dm⁻³ NaCl pri pH 8. Vezani ciljni protein je eluiran deset puta s 0,5 ml pufera za eluciju sastava: 300 mmol dm⁻³ imidazol, 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl i 300 mmol dm⁻³ NaCl pri pH 8. Kolona je isprana s 3 ml pufera za završno ispiranje (500 mmol dm⁻³ imidazol, 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl i 300 mmol dm⁻³ NaCl pri pH 8), zatim s 5 ml miliporirane vode te s 5 ml 20%-tnog etanola.

Afinitetna kromatografija na instrumentu ÄKTA korištena je kao jedan od koraka pročišćavanja rekombinantnog proteina s histidinskim privjeskom. Korištena je *HisTrap HP* kolona od 5 ml (GE

Healthcare) koja je punjena Ni-Sepharose punilom. Kolona je isprana s tri volumena kolone miliporiranom, odzračenom vodom te uravnotežena puferom za lizu. Nakon nanošenja profiltriranog lizata na kolonu, ispiranje je provedeno gradijentno od 100 % pufera za lizu (sa 10 mmol dm^{-3} imidazolom) do 100 % pufera za eluciju, unutar 40 ml. Sastav korištenog pufera za eluciju: 50 mmol dm^{-3} Tris, 300 mmol dm^{-3} NaCl, 400 mmol dm^{-3} imidazol, pH 8,0. Sakupljano je po 0,5 ml frakcija automatskim sakupljačem frakcija. Prilikom pokušaja optimizacije pročišćavanja korišteni su pufer za lizu sastava: 10 mmol dm^{-3} imidazol, 50 mmol dm^{-3} NaH_2PO_4 , 300 mmol dm^{-3} NaCl, 1% glicerol pri pH 8,0 te pufer za eluciju sastava: 300 mmol dm^{-3} imidazol, 50 mmol dm^{-3} NaH_2PO_4 , 300 mmol dm^{-3} NaCl, 1% glicerol pri pH 8,0.

Pročišćavanje GST-rekombinantnih fuzioniranih proteina temelji se na reverzibilnom, afinitetnom vezanju proteina GST i glutationa u blagim uvjetima. Rekombinantni protein ostaje vezan na koloni s imobiliziranim glutationom, a nečistoće se ispiru s kolone. Vezani rekombinantni protein se ispire s kolone puferom koji sadrži reducirani glutation. GST se često koristi kao afinitetni privjesak jer može olakšati pravilno smatanje proteina djelujući kao šaperon čime pospješuje topljivost rekombinantnog proteina.²⁹

Za afinitetno pročišćavanje pomoću GST-privjeska 1 ml glutation-agaroze resuspendiran je dva puta u 5 ml pufera za ispiranje i ekvibraciju sastava: 50 mmol dm^{-3} Tris, 150 mmol dm^{-3} NaCl, pH 8,0. Agarozu je istaložena centrifugiranjem, a supernatant je uklonjen. Liza stanica je izvršena prema ranije navedenom protokolu, ali u puferu za ispiranje i ekvibraciju. Profiltrirani supernatant (proteinski ekstrakt) nakon lize stanica pomiješan je s ispranom glutation-agarozom, te je smjesa inkubirana 1 sat pri 4°C uz stalno miješanje. Glutacion-agarozu je istaložena centrifugiranjem, a supernatant je sačuvan kao frakcija nevezanih proteina. Glutacion-agarozu je tri puta resuspendirana u 2 ml pufera za ispiranje i ekvibraciju, istaložena centrifugiranjem, a supernatant nakon svakog ispiranja pohranjen je kao frakcija ispiranja. Elucija vezanog proteina izvršena je resuspendiranjem glutacion-agaroze u svježe pripremljenom puferu sastava: 50 mmol dm^{-3} Tris, 150 mmol dm^{-3} NaCl, 10 mmol dm^{-3} reducirani glutation, pH 8,0. Elucija je ponovljena šest puta s 0,5 ml pufera, glutacion-agarozu je svaki put istaložena centrifugiranjem, a supernatant je pohranjen kao elucijska frakcija.

Uzorci stanica prije i nakon indukcije ekspresije, nakon sonikacije, talog stanica, uzorak proteinskog ekstrakta, nevezane frakcije i elucijske frakcije pripremljeni su za SDS-PAGE prema ranije navedenom postupku. Elektroforeza je provedena kao što je ranije navedeno.

2.3.5. Pročišćavanje rekombinantnog proteina pomoću tekućinske kromatografije isključenja

Razdvajanje molekula tekućinskom kromatografijom isključenja, odnosno gel-filtracijom, (SEC, eng. *size exclusion chromatography*) temelji se na razlikama u veličini i/ili obliku molekula ili njihovom naboju. Molekule veće od pora nepokretne faze ne mogu ući u pore i tako se odvajaju od manjih molekula. Sva kromatografska odjeljivanja temelje se na različitoj raspodjeli analiziranog sastojka između pokretne i nepokretne faze. Odnos koncentracija odjeljivanog sastojka u dvjema fazama određen je za ravnotežno stanje i određenu temperaturu konstantom razdijeljena: $K_C = \frac{c_S}{c_M}$, gdje je c_S – koncentracija otopljenog spoja u jedinici volumena nepokretne faze, a c_M – koncentracija otopljenog spoja u jedinici volumena pokretne faze. U uvjetima idealne kromatografije konstanta razdijeljena ne ovisi o koncentraciji analiziranog spoja, pa s porastom koncentracije spoja u pokretnoj fazi linearno raste i koncentracija spoja u nepokretnoj fazi. Zadržavanje određenog sastojka tijekom kromatografije na koloni može se izraziti prilagođenim volumenom zadržavanja: $V_R' = V_R - V_M = t_R' \times F_C$, gdje je F_C – protok pokretne faze, t_R' – prilagođeno vrijeme zadržavanja, odnosno ukupno vrijeme zadržavanja određenog sastojka umanjeno za vrijeme zadržavanja nezadržavanog sastojka, V_R - ukupni volumen zadržavanja, V_M – volumen zadržavanja sastojka koji prolazi kroz kolonu bez zadržavanja. Razlučivanje pikova, R_S , mjera je razdvajanja dvaju pikova koja uključuje i selektivnost i djelotvornost kolone $R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$, pri čemu je $t_{R2} > t_{R1}$. U jednadžbi, w_b predstavlja širinu osnovice pojedinog pika, a t_R je vrijeme zadržavanja pojedinog sastojka. Prema klasičnoj teoriji kromatografije, širina pika direktno je povezana s djelotvornošću kromatografske kolone, odnosno s brzinom i brojem prijelaza analita iz jedne u drugu fazu. Kolona je to selektivnija što su vremena (volumeni) zadržavanja odjeljivanih sastojaka različitija. Dobro razdvajanje podrazumijeva dovoljno veliku razliku između elucijskih volumena komponenata i što manju širinu osnovice vrha.³⁰

Metoda gel-filtracije kojom se razdvajaju proteini različitih molekularnih masa (kao i druge molekule male molekulske mase) korištena je kao slijedeći korak u pročišćavanju proteina nakon afinitetne kromatografije. Pročišćavanje je izvršeno brzom tekućinskom kromatografijom proteina (FPLC, eng. *Fast Protein Liquid Chromatography*), odnosno u potpuno zatvorenom sustavu koji je napravljen da može pročišćavati proteinske uzorke jako niskih koncentracija (od mikrograma do pikograma), a sastoji se od posebno dizajniranog instrumenta koji podnosi visoke protoke, softvera i već napunjenih kolona. Gel-filtracija provedena je pri 18 °C, na koloni punjenoj *Sephacryl* (poliakrilamidni gel) *S200 Superfine* gelom, koji je prikladan za razdvajanje proteina mase od 5 do 250 kDa. Kolona (1,6 x 60 cm) uravnotežena je puferom za lizu: 10 mmol dm⁻³ imidazol, 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl, 300 mmol dm⁻³ NaCl pri pH 8,0, a volumen nanesenog uzorka nije bio veći od 2 % volumena punila (2 ml). Peristaltička pumpa je regulirala i održavala stalan protok (0,5 ml min⁻¹) pufera kroz kolonu, dok

su frakcije volumena 1,5 ml sakupljane pomoću automatskog sakupljača frakcija. Elucija uzorka provodila se uz pufer sastava: 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl, 100 mmol dm⁻³ NaCl pri pH 7,4. Prilikom pokušaja optimizacije pročišćavanja korišteni su pufer za lizu: 10 mmol dm⁻³ imidazol, 50 mmol dm⁻³ NaH₂PO₄, 300 mmol dm⁻³ NaCl, 1% glicerol pri pH 8,0 te pufer za eluciju: 21,9 mmol dm⁻³ NaH₂PO₄, 50 mmol dm⁻³ NaCl, 5% glicerol, 2,2 mmol dm⁻³ glicin pri pH 7,0.

2.3.6. Određivanje koncentracije proteina

Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradfordu temelji se na vezanju Coomasie Brilliant Blue boje za proteine što uzrokuje pomak u apsorpcijskom maksimumu boje s 465 nm na 595 nm.³¹

Određenom volumenu uzorka dodana je destilirana voda do 0,1 ml te je otopini dodan 1 ml Bradfordovog reagensa. Nakon 45 minutne inkubacije očitana je apsorpcija pri 595 nm na UV/VIS spektrofotometru, a koncentracija proteina izračunata je pomoću koeficijenta određenog iz baždarnog pravca izrađenog mjerenjem poznatih koncentracija goveđeg serumskog albumina (BSA).

Određivanje koncentracije proteina metodom prema Warburg-Christian-u omogućeno je zbog apsorpcije aminokiselina triptofana i tirozina pri 280 nm. Kako uzorci proteina mogu biti onečišćeni nukleinskim kiselinama koje također apsorbiraju pri 280 nm potrebno je izmjeriti apsorpciju i pri 260 nm. Pri 260 nm apsorbiraju nukleinske kiseline, ali ne i aminokiseline. Mjerenjem apsorpcije pri 260 nm korigiramo vrijednosti dobivene pri 280 nm. Iz dobivenih vrijednosti omjera apsorpcija (A_{280}/A_{260}) pomoću Warburg-Christian-ove vrijednosti (korekcijskog faktora) može se izračunati koncentracija proteina. Masena koncentracija proteina se izračuna prema formuli: $\gamma(\text{mg ml}^{-1}) = [(1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})]$. Kako različiti proteini sadrže različite omjere aromatskih aminokiselina, ova metoda je osjetljiva na sastav aminokiselina i strukturu proteina pa zato bilo kakve promjene u pH, temperaturi, ionskoj jakosti ili prisutnost detergenata mogu utjecati na njihovu apsorpciju. Ukoliko je protein čist možemo odrediti koncentracije od 0,5 mg ml⁻¹.³²

Instrumentom *BioDrop* izmjerena je koncentracija proteina pomoću programa (Christian-Warburg) ugrađenog u instrument, bez prethodne pripreme uzorka.

2.4. Molekulska svojstva proteina CaDPPIII-His₆

Nativnom gel-elektroforezom ispitana su molekulska svojstva proteina CaDPPIII, odnosno ispitano je postojanje različitih strukturnih oblika proteina u pročišćenom uzorku. Prilikom elektroforeze, nabijena čestica će se gibati stalnom brzinom koju određuje ravnoteža između primijenjene električne

sile i trenja uslijed viskoznosti medija. Kako je medij koji se koristi za elektroforezu elektrolit, dolazi do vrlo složenih međudjelovanja između molekula analita i medija, zbog čega svi detalji teorije elektroforeze i dalje nisu poznati.²⁴ Primjenom gelova od škroba, poliakrilamida, agaroze i agaroze/poliakrilamida smanjena je difuzija uzorka u mreži gela i primjenjuje se učinak molekulskog sita kojeg čine pore gela čime se molekule analita odvajaju i po veličini. Prilikom nativne elektroforeze, nativna struktura makromolekula ostaje očuvana.

Elektroforeza nativnih uzoraka provedena je na aparaturi *PhastSystem* (Pharmacia, Švedska) i komercijalno dostupnim pločicama poliakrilamidnog gela s gradijentom gustoće od 8 do 25 %. Komercijalno dostupni pufer za elektroforezu je u obliku gela (*PhastGel Nat Buffer Strips*), kao 2%-tna agarosa s 0,88 mol dm⁻³ L-alaninom i 0,25 mol dm⁻³ Tris-om, pH 8,8. Elektroforeza je provedena prema uputama proizvođača (*PhastSystem Separation*). Uzorku proteina (1 μl) koncentracije 1,26 mg ml⁻¹ (Ca₁) i 1 mg ml⁻¹ (Ca₂) dodano je 3 μl miliporirane vode. Tako pripremljeni uzorci nanošeni su na površinu gela automatskim spuštanjem aplikatora. Elektroforeza je provedena uz programiranu jakost struje od 10 mA i napon od 400 V pri 15°C u trajanju od 60 minuta. Nakon završene elektroforeze, proteini u gelu su vizualizirani bojom *Coomasie Brilliant Blue*.

2.4.1. Izoelektrična točka proteina CaDPPIII-His₆

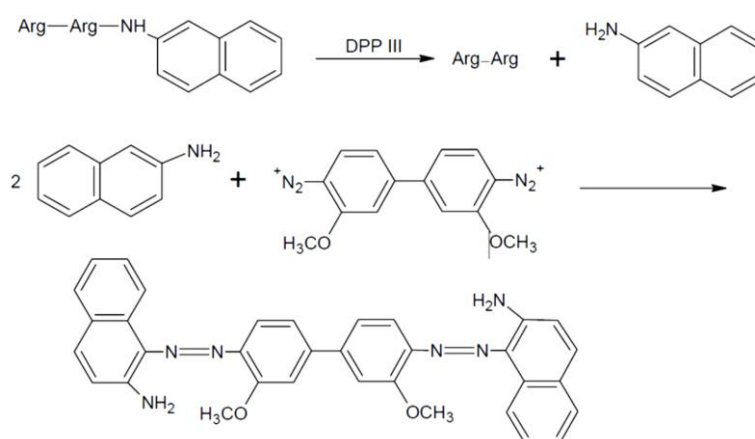
Kako bi se odredila izoelektrična točka proteina CaDPPIII-His₆ provedeno je izoelektrično fokusiranje (IEF) pročišćenog uzorka. Izoelektrično fokusiranje je metoda odjeljivanja proteina u gradijentu pH, na temelju njihove izoelektrične točke. Ova metoda je izvediva jer proteini su amfoliti, odnosno sadrže i pozitivno i negativno nabijene skupine. Vrijednost pH pri kojoj je ukupan naboj amfolita jednak nuli naziva se izoelektričnom točkom, te pri ovom pH molekula se neće gibati u električnom polju. Stavi li se protein u gradijent pH, on će se gibati do mjesta u gradijentu koje odgovara njegovoj izoelektričnoj točki. U gelu, gradijent pH postiže se elektroforezom smjese oligomera niske molekulske mase koji nose alifatske amino- i karboksilne skupine s nizom izoelektričnih točaka.

Izoelektrično fokusiranje provedeno je pomoću aparature *PhastSystem* (Pharmacia, Švedska) prema uputama proizvođača, na komercijalno dostupnim pločicama 5 %-tnog poliakrilamidnog gela, raspona pH od 4 do 6. Uzorci su nanoseni na gel pomoću automatskog aplikatora. Uz uzorke za elektroforezu na gel je nanosena i smjesa proteinskih standarada poznatih izoelektričnih točaka: humana anhidraza karbonatne kiseline B (pI 6,55), goveđa anhidraza karbonatne kiseline B (pI 5,85), β-laktoglobulin A (pI 5,20), inhibitor tripsina iz soje (pI 4,55) i amiloglukozidaza (pI 3,50). Izoelektrično fokusiranje provedeno je uz programiranu jakost struje od 2,5 mA i napon od 2000 V pri 15°C u trajanju od 30 minuta.

2.5. Katalitička svojstva proteina CaDPPIII-His₆

2.5.1. Određivanje peptidazne aktivnosti

Peptidazna aktivnost pročišćenog proteina CaDPPIII-His₆ određivana je standardnom kolorimetrijskom metodom.^{33, 34} Enzim DPP III hidrolizira dipeptidilnaftilamide na dipeptid i 2-naftilamin (npr. Arg₂-2NA → Arg₂ i 2-NA). Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom mjerenju intenziteta ružičaste boje pri 530 nm. Do razvijanja ružičaste boje dolazi zbog reakcije diazokopuliranja (Slika 2.3.) 2-naftilamina i tetrazonijeve soli *o*-dianisidina, Fast Blue BN (FBB).



Slika 2.3. Reakcija cijepanja peptidne veze na supstratu Arg₂-2NA, te reakcija diazokopuliranja produkta enzimske reakcije, 2-naftilamina, sa FBB soli.

Aktivnost je ispitana u 1 ml reakcijske smjese u otopini 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl-a, pH 7,0 uz 40 μmol dm⁻³ supstrat te dodatkom proteina do konačne koncentracije od 0,08 μmol dm⁻³. Reakcija je zaustavljena nakon 15 minuta dodatkom otopine FBB soli koncentracije 1,5 mg ml⁻¹ (u 2,1 mol dm⁻³ Na-acetatnom puferu s Tween 80, φ=0,10 pri pH 4,2) te je nakon 15 minuta očitana apsorbancija pri 530 nm.

2.5.2. Kinetika peptidazne reakcije

Za praćenje kinetike peptidazne reakcije korišteno je fluorescencijsko svojstvo produkta (2-naftilamina)³⁵ koji se pobudom pri 332 nm ekscitira u pobuđena elektronska stanja, a vraćanjem u osnovno elektronsko stanje dolazi do emisije u obliku fluorescencije pri 420 nm zbog njegove konjugirane, rigidne strukture. Proteini za kinetička mjerenja pripremljeni su razrjeđivanjem u puferu za test aktivnosti, odnosno otopini Tris-HCl, pH 7,0. Točna koncentracija otopine proteina određena je metodom po Bradfordu. Korišteno je 3 ml reakcijske smjese koja se sastoji od pufera za test aktivnosti,

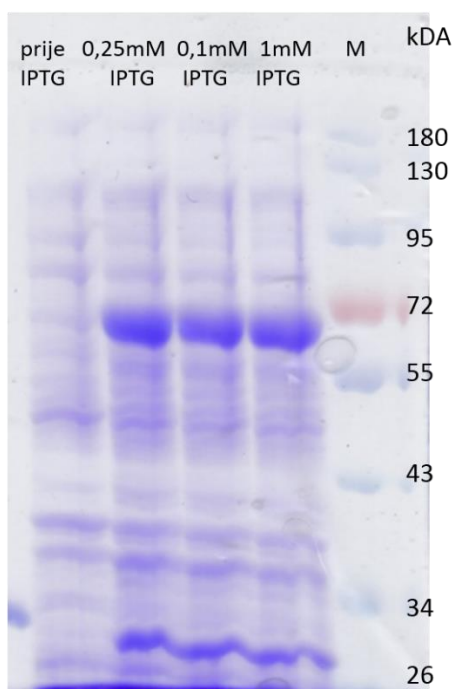
proteina konačne koncentracije od $11,2 \text{ nmol dm}^{-3}$ te od promjenjive koncentracije supstrata. Brzina enzimske reakcije praćena je kroz 60 sekundi. Kinetika je mjerena pri 10 razlićitih koncentracija supstrata u rasponu oko očekivane vrijednosti K_M , a mjerenja su izvedena tri puta u dva dana pri 50°C . Podaci mjerenja, nagibi dobivenih pravaca, pretvoreni su u početne brzine reakcije množenjem s faktorom pretvorbe iz baždarnog pravca 2-naftilamina. Baždarni pravac, ovisnost intenziteta fluorescencije 2-naftilamina o njegovoj koncentraciji, dobiven je mjerenjem intenziteta otopina razlićitih koncentracija 2-naftilamina u 50 mmol dm^{-3} Tris-HCl-u pH 7,0 pri 50°C . Intenzitet fluorescencije izmjeren je za otopine 2-naftilamina koncentracija: 0,001, 0,05, 0,1, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 i $1 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ te za otopinu bez dodatka 2-naftilamina. Intenzitetima fluorescencije oduzet je intenzitet otopine bez 2-naftilamida.

Da bi se osiguralo da izmjerene vrijednosti zadovoljavaju uvjete aproksimacije Michaelis-Mentenićine kinetike, da je koncentracija supstrata konstantna tijekom enzimske reakcije, koncentracija izreagiranoć supstrata, odnosno nastaloć produkta, ne smije biti viša od 5%. Iz tog razloga se u reakcijsku smjesu supstrat dodaje u velikom suvišku. Izraćunavanjem kolićine produkta nastaloć tijekom reakcije pomoću formule $P/\% = ((v/\mu\text{mol dm}^{-3} \text{ s}^{-1} \times 180 \text{ s})/S/\mu\text{mol dm}^{-3}) \times 100$. Eisenthal-Cornish-Bowden-ovim prikazom³⁶ provjerena je dosljednost mjerenja (grafovi nisu prikazani). Podaci su obraćeni nelinearnom regresijom programom *Graph Pad Prism 6 Demo* kojim su dobivene vrijednosti konstanta k_{cat} i K_M uz vrijednosti standardne devijacije za konstante.

3. Rezultati i rasprava

3.1. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje rekombinantnog proteina CaDPPIII-His₆

Promjenom koncentracije induktora pokušala se optimizirati ekspresija proteina CaDPPIII sa vektora pLATE31 u stanicama *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL. Na slici 3.1. prikazan je gel nakon SDS-PAGE-a uzoraka taloga stanica prije i poslije indukcije ekspresije 0,25, 0,1 i 1 mmol dm⁻³ IPTG-om.

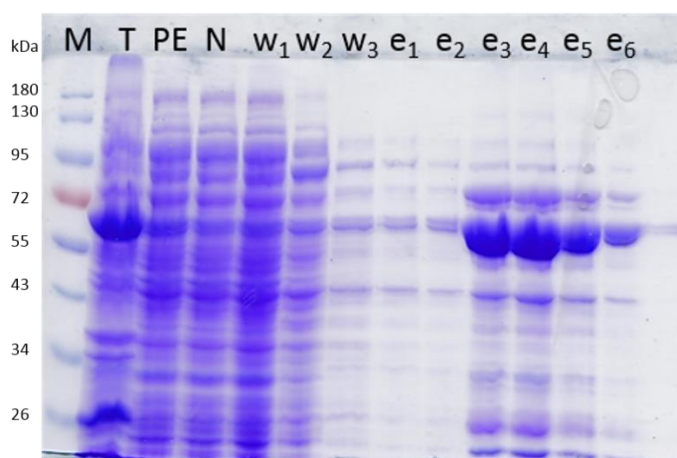


Slika 3.1. Slika 10%-tnog poliakrilamidnog gela nakon SDS-PAGE-a uzoraka taloga stanica prije i poslije indukcije ekspresije različitim koncentracijama IPTG-a. Na slici, M označava marker molekulskih masa *Page Ruler® Prestained Protein Ladder*.

Na slici 3.1. može se vidjeti da položaj najjače pruge na gelu, kod uzoraka taloga stanica nakon indukcije ekspresije, odgovara molekularnoj masi od oko 65 kDa. Ovaj položaj pruge odgovara teoretskoj molekularnoj masi rekombinantnog proteina CaDPPIII s histidinskim privjeskom. Veličina (debljina) pruga kod uzoraka nakon ekspresije različitom koncentracijom IPTG-a ne mijenja se značajno s promjenom koncentracije induktora, što dovodi do zaključka da promjena koncentracije induktora ne utječe značajno na količinu prekomjerno eksprimiranog rekombinantnog proteina CaDPPIII-His₆.

Koraci pročišćavanja uzoraka proteina iz supernatanta, nakon lize bakterijskih stanica, afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni prikazani su za sve korištene koncentracije induktora (Slika 3.2. i u dodatku slike D1. i D2.). Usporedbom linija uzoraka taloga i supernatanta nakon

indukcije ekspresije različitim koncentracijama IPTG-a (dodatak slika D1.) možemo vidjeti izrazite pruge kod uzoraka taloga koje veličinom odgovaraju ciljnom proteinu. Debljina pruga kod uzoraka taloga, u usporedbi s debljinom pruga kod uzoraka supernatanta, ukazuje da ciljni protein u velikoj količini zaostaje u talogu u netopljivom obliku. Uzrok tome može biti nepravilno smatanje ciljnog rekombinantnog proteina ili njegova djelomična ili potpuna denaturacija nakon ekspresije. Količina proteina zaostalog u inkluzijskim tijelima ne mijenja se značajno obzirom na količinu induktora. Indukcija ekspresije preko noći na 18°C smatrana je prikladnom za ovaj protein zbog njegove veličine, jer je omogućeno njegovo sporije smatanje pri nižoj temperaturi.



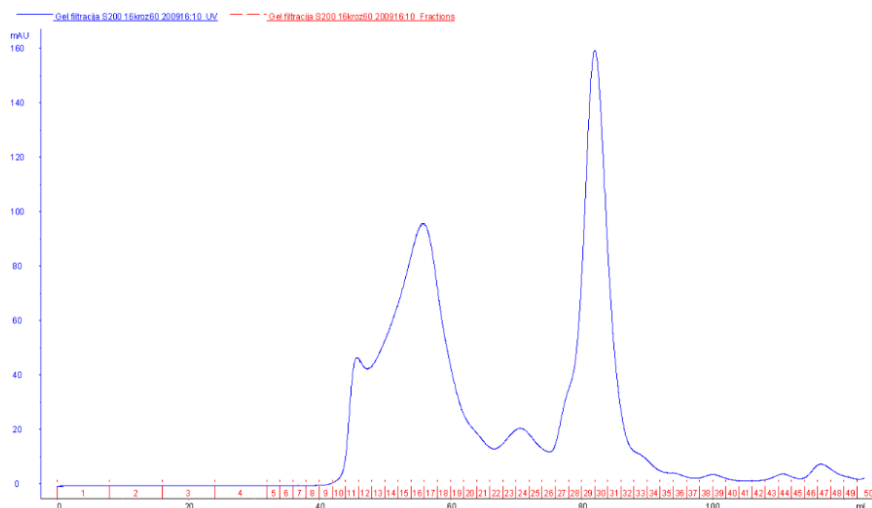
Slika 3.2. Gel (10%) nakon SDS-PAGE-a uzoraka taloga (T) i supernatanta (PE) nakon indukcije ekspresije 0,25 mmol dm⁻³ IPTG-om i lize stanica. Na gel su naneseni: uzorak frakcije koja se nije vezala na afinitetnu kolonu tijekom pročišćavanja (N), frakcije tijekom ispiranja nespecifično vezanih proteina (w) te elucijske frakcije (e). Na slici, M označava marker molekulskih masa *Page Ruler*[®] *Prestained Protein Ladder*.

Usporedbom slike 3.2. i slika D1. i D2. (dodatak) može se zaključiti da pročišćavanjem afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni ne dobivamo protein željene čistoće jer u uzorcima elucijskih frakcija (e), kod sva tri pokušaja pročišćavanja, uz prugu koja odgovara ciljnom proteinu pojavljuju se pruge pri drugim molekulskim masama. Dodatne pruge odgovaraju proteinskim onečišćenjima. Kako ciljni protein nije zadovoljavajuće čistoće, glavne elucijske frakcije dobivene prekomjernom ekspresijom uz 0,1 mmol dm⁻³ i 1 mmol dm⁻³ IPTG (koncentracija glavnih frakcija prikazane u Tablici 3.1.) ugušćene su Vivaspin sustavom (GE Healthcare, SAD) kako bi se provelo pročišćavanje tekućinskom kromatografijom isključenja (SEC, *size exclusion chromatography*) FPLC sustavom.

Tablica 3.1. Koncentracija proteina u glavnim elucijskim frakcijama nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agaroznoj koloni.

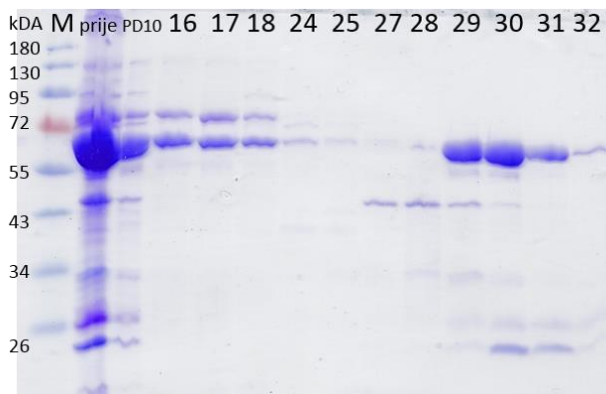
	Elucijske frakcije	$c / \text{mg ml}^{-1}$	
		Bradford	Christian-Warburg
0,1 mmol dm ⁻³ IPTG	e ₃	1,58	0,376
	e ₄	2,867	0,275
	e ₅	1,421	0,384
	e ₆	0,722	0,298
	e ₇	0,325	-
0,25 mmol dm ⁻³ IPTG	e ₃	3,145	2,379
	e ₄	4,708	3,789
	e ₅	2,003	1,206
1 mmol dm ⁻³ IPTG	e ₃	4,208	3,252
	e ₄	5,686	3,252
	e ₅	2,706	1,759

Tekućinska kromatografija isključenja (gel-filtracija) provedena je na ÅKTA instrumentu na koloni sa *Sephacryl S200* punilom. Na kolonu je nanoseno 1,5 ml uzorka s približno 3,5 mg proteina. Razdvajanje i elucija provedeni su uz pufer sastava: 100 mmol dm⁻³ NaCl i 50 mmol dm⁻³ Tris, pH 7,4 uz konstantni protok od 0,5 ml min⁻¹. Sakupljano je po 2 ml elucijskih frakcija, a kromatogram je prikazan na slici 3.3.



Slika 3.3. Kromatogram tijekom pročišćavanja na *Sephacryl S200* koloni uzoraka ugušćenih nakon afinitetnog pročišćavanja. Na apscisi je prikazan volumen pufera za ispiranje u ml te brojem označene frakcije. Na ordinati je apsorbancija u mAU (eng. *mili absorbance unit*) detektirana pri 280 nm.

Na slici kromatograma može se vidjeti da je veliki dio proteinskog uzorka eluiran pri malim volumenima pufera (prvi pik s lijeva), odnosno odmah nakon praznog volumena kolone. Sljedeća veća količina proteina je eluirana u tri glavne frakcije na oko 80. mililitru pufera za eluciju. Uzorci glavnih frakcija analizirani su SDS-PAGE-om (Slika 3.4.)



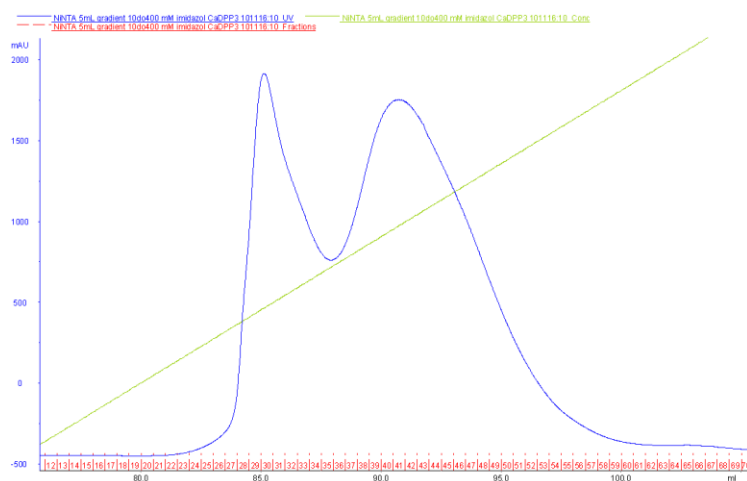
Slika 3.4. Gel (10%) nakon SDS-PAGE-a uzoraka frakcija tijekom pročišćavanja tekućinskom kromatografijom metodom odjeljivanja po veličini. Oznaka 'prije' označava uzorak pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni, 'PD10' označava uzorak pročišćen afinitetnom kromatografijom i pročišćen od soli gel-filtracijom na PD-10 koloni. Brojem su označene frakcije redom kojim su silazile tijekom pročišćavanja tekućinskom kromatografijom. Slovo M označava marker molekulskih masa *Page Ruler® Prestained Protein Ladder*.

Kod ranije eluiranih frakcija (16 do 18 na slici 3.6.), primijećena je pruga koja odgovara ciljnom proteinu, ali i dodatne pruge pri većim molekulskim masama. Kod glavnih elucijskih frakcija, od 29 do 31, uz prugu koja odgovara ciljnom proteinu također se mogu primijetiti dodatne pruge, ali pri manjim molekulskim masama. Analizom kromatograma i slike gela nakon SDS-PAGE-a može se zaključiti da je znatna količina ciljnog proteina eluirana s kolone u obliku agregata. Agregati silaze s kolone odmah nakon praznog volumena kolone zbog svoje veličine (frakcije 16 do 18).

Do nastanka agregata može doći iz više razloga. Jedan od mogućih uzroka nastanka agregata je tendencija nativnog proteina za stvaranjem reverzibilnih malih oligomera. Porastom koncentracije proteina sve je više malih oligomera koji međusobno agregiraju stvarajući veće agregate koji s vremenom postaju ireverzibilni. Drugi mehanizam uvjetovan je promjenom konformacije nativnog proteina koja može biti i djelomična denaturacija proteina. U tom slučaju promijenjen, ne-nativni protein ima tendenciju stvaranja agregata. Uzroci promjene konformacije proteina mogu biti različiti, poput temperaturnog stresa, oksidacije, deaminacije i drugih.³⁷

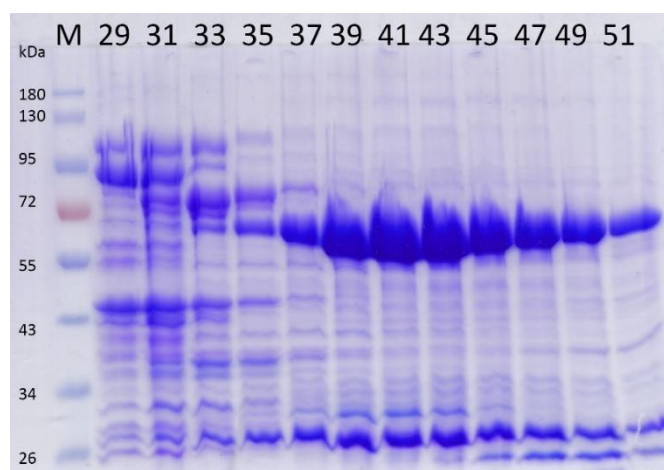
Glavne elucijske frakcije, od 29 do 31, ugušćene su i pročišćene od soli Vivaspin sustavom nakon čega je dobiveno 0,5 ml uzorka koncentracije $2,82 \text{ mg ml}^{-1}$ (koncentracija određena metodom prema Bradfordu). Iz 1 l medija za uzgoj stanica dobiveno je 1,4 mg pročišćenog proteina. Ispitane su specifične aktivnosti prema supstratu Arg₂-2NA ugušćenog, pročišćenog uzorka i glavne elucijske frakcije (frakcije 30) te je dobiveno da one iznose $83,78 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ i $134,23 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Prilikom pročišćavanja tekućinskom kromatografijom izgubljen je dio uzorka ciljnog proteina. Kako je dio proteina zaostao u netopljivom obliku već prilikom ekspresije, dobivena količina pročišćenog proteina nije bila dovoljna za sva biokemijska ispitivanja. Iz tog razloga krenulo se u novu ekspresiju induciranu 1 mmol dm^{-3} IPTG-om iz 3 l medija za uzgoj. Nakon lize bakterijskih stanica supernatant je profiltriran i nanesen na *HisTrap* kolonu te je pročišćen afinitetnom kromatografijom pomoću instrumenta ÅKTA. Pufer korišten tijekom pročišćavanja sastojao se od 50 mmol dm^{-3} Tris-a, 300 mmol dm^{-3} NaCl-a i 400 mmol dm^{-3} imidazola pH 8,0. Na slici 3.5. prikazan je kromatogram tijekom provedenog gradijentnog ispiranja s kolone.



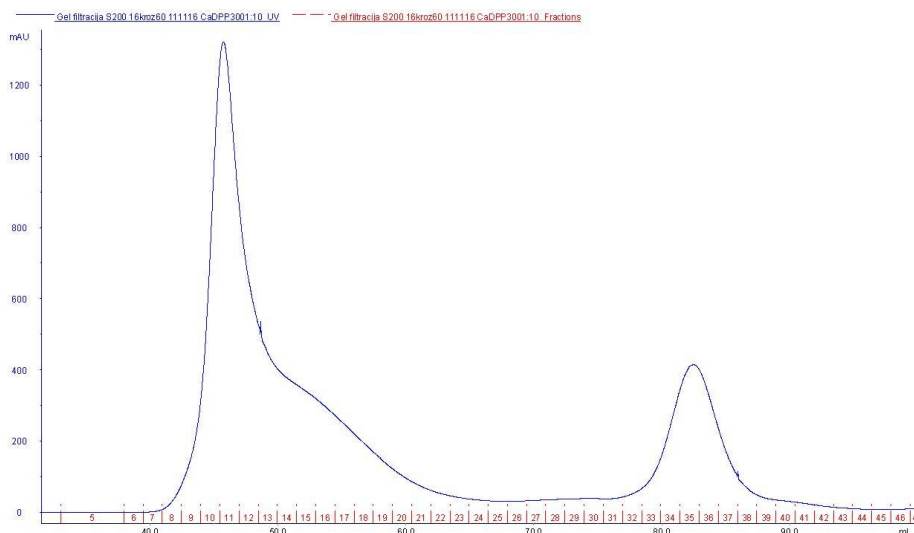
Slika 3.5. Kromatogram tijekom pročišćavanja na *HisTrap* koloni supernatanta nakon lize bakterijskih stanica. Na apscisi je prikazan volumen pufera za ispiranje u ml te su crvenim brojem označene frakcije. Na ordinati je apsorbancija u mAU (eng. *mili absorbance unit*) detektirana pri 280 nm. Zelenom linijom prikazan je gradijent imidazola od 10 mmol dm⁻³ (100% pufer za lizu) do 400 mmol dm⁻³ (100% pufer za eluciju).

Na kromatogramu se mogu vidjeti dva *pika* koja nisu dobro razdvojena. Nakon SDS-PAGE-a glavnih elucijskih frakcija (Slika 3.6.), možemo vidjeti da u prvim frakcijama, od 29 do 35, silaze onečišćenja uz malu količinu ciljnog proteina. Frakcije koje odgovaraju drugom *piku*, 37 do 51, uz najveći udio ciljnog proteina sadrže i nešto proteinskih onečišćenja pri malim molekulskim masama.



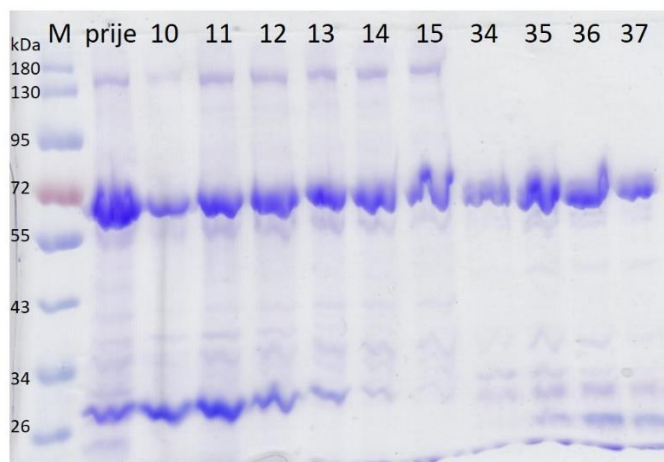
Slika 3.6. Gel (10%) nakon SDS-PAGE-a uzoraka frakcija dobivenih tijekom pročišćavanja tekućinskom, afinitetnom kromatografijom na *HisTrap* koloni. Brojem su označene frakcije, redom kojim su silazile tijekom pročišćavanja tekućinskom kromatografijom. Slovo M označava marker molekulskih masa *Page Ruler® Prestained Protein Ladder*.

Kako bi se dodatno pročišćio uzorak proteina, glavne elucijske frakcije (od 38 do 53), ugušćene su pomoću Vivaspin sustava do 2 ml. Sav uzorak, oko 28 mg proteina, nanesen je na *HiLoad 16/60 Sephadex S200* kolonu i pročišćen tekućinskom kromatografijom isključenja na instrumentu ÅKTA (Slika 3.7.).



Slika 3.7. Kromatogram tijekom pročišćavanja na *HiLoad 16/60 Sephadex S200* koloni uzoraka ugušćenih nakon afinitetnog pročišćavanja na *HisTrap* koloni. Na apscisi je prikazan volumen pufera za ispiranje u ml te brojem označene frakcije. Na ordinati je apsorbancija u mAU (eng. *mili absorbance unit*) detektirana pri 280 nm.

Na kromatogramu se može vidjeti da je više od pola proteinskog uzorka eluirano pri 45 ml pufera, odnosno neposredno nakon praznog volumena kolone. Sljedeća značajna količina proteina eluirana je u četiri glavne frakcije na oko 80. mililitru pufera za eluciju. Uzorci glavnih frakcija analizirani su SDS-PAGE-om na 10%-tnom gelu (Slika 3.8.)



Slika 3.8. Gel (10 %) nakon SDS-PAGE-a uzoraka frakcija tijekom pročišćavanja tekućinskom kromatografijom metodom odjeljivanja po veličini (isključenja). Brojem su označene frakcije, redom kojim su silazile tijekom pročišćavanja tekućinskom kromatografijom. Slovo M označava marker molekulske masa *Page Ruler® Prestained Protein Ladder*.

Na gelu se može vidjeti da je pruga koja veličinom odgovara ciljnom proteinu prisutna u svim frakcijama ispitanim SDS-PAGE-om. Koncentracija proteina izmjerena je metodom prema Christian-Warburgu i ispitana je specifična aktivnost frakcija 11 i 35 (Tablica 3.2.). Specifična aktivnost frakcije 35 je približno dva puta veća od specifične aktivnosti frakcije 11 što ukazuje da agregacijom ciljni protein je izgubio dio peptidazne aktivnosti. Specifična peptidazna aktivnost uzorka proteina prije pročišćavanja tekućinskom kromatografijom je približno 1,5 puta manja od specifične aktivnosti uzorka poslije pročišćavanja (frakcija 35) jer se u uzorku nakon pročišćavanja nalazi manje proteinskih onečišćenja. Frakcije 34, 35, 36 i 37 ugušćene su i odsoljene Vivaspin sustavom do 1 ml s ukupnom količinom proteina od 3,5 mg.

Tablica 3.2. Koncentracije uzoraka proteina prije nanošenja na *HiLoad 16/60 Sephadex S200* kolonu, glavne prerano eluirane frakcije (11) te glavne elucijske frakcije (35) određene instrumentom *BioDrop* programom prema Christian-Warburgu. U trećem stupcu prikazane su specifične peptidazna aktivnost istih uzoraka, pri 50°C prema supstratu Gly-Arg-2NA u 100 mmol dm⁻³ Tris-HCl puferu pH 7,0, bez dodatka metalnih iona.

Frakcija	c / mg ml ⁻¹	ΔA_{530} / nmol ⁻¹ mg min
prije	14,22	109,9
11	1,79	86,6
35	0,79	180,4

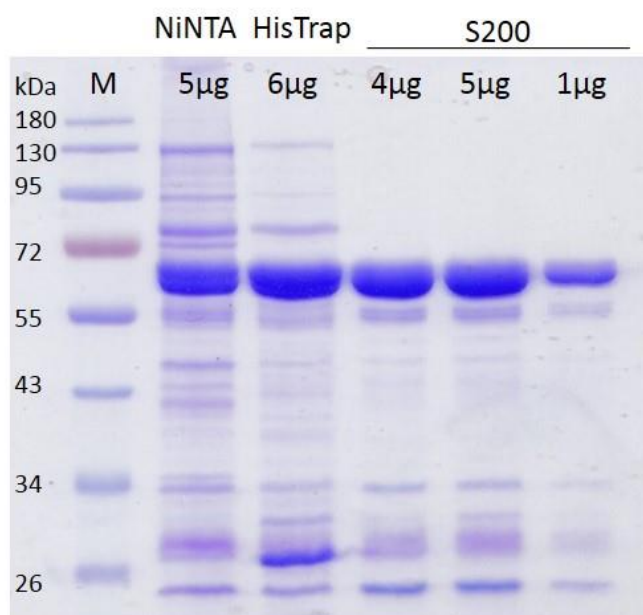
Velika količina ciljnog proteina je izgubljena jer je dio uzorka eluiran u obliku agregata pri malom volumenu pufera za eluciju tijekom gel-filtracije. Iz 3 l medija za uzgoj, nakon pročišćavanja na HisTrap i S200 koloni, dobiveno je 3,5 mg pročišćenog proteina CaDPPIII-His₆. Ponovljena je ekspresija proteina uz indukciju 0,5 mmol dm⁻³ IPTG-om iz 1,5 l medija za uzgoj. Ponovljeno je pročišćavanje tekućinskom, afinitetnom kromatografijom (Slika 3. u dodatku) i gel-filtracijom (Slika D5. u dodatku) na instrumentu ÅKTA, ali uz fosfatni pufera za eluciju i prethodnu lizu uz fosfatni pufer za lizu (sastav naveden u materijalima i metodama). Na kromatogramu tijekom afinitetne kromatografije ponovno se mogu vidjeti dva *pika* koja nisu dobro razdvojena. Nakon SDS-PAGE-a glavnih elucijskih frakcija (Slika D4. u dodatku), možemo vidjeti da u prvim frakcijama, od 29 do 39, silaze onečišćenja uz malu količinu ciljnog proteina. Frakcije koje odgovaraju drugom *piku*, 42 do 55, uz najveći udio ciljnog proteina sadrže i nešto proteinskih onečišćenja pri malim molekulskim masama.

Vivaspin sustavom ugušćene su frakcije od 42 do 60 do 4 ml uz ukupnu količinu proteina od 11,4 mg. Pola ugušćenog uzorka nanoseno je na *HiLoad 16/60 Sephadex S200* kolonu i pročišćeno tekućinskom kromatografijom metodom odjeljivanja po veličini na ÅKTA instrumentu. Ostatak ugušćenog uzorka istaložen je centrifugiranjem pri 13000 g tijekom dvije minute kako bi se ispitala prisutnost agregata prije pročišćavanja tekućinskom kromatografijom metodom odjeljivanja po veličini, no nije primijećena značajna količina proteinskog taloga. Na kromatogramu tijekom pročišćavanja gel-filtracijom (Slika D5. u dodatku) ponovno je primijećen veliki *pik* pri malim volumenima pufera za eluciju. Kada se uzorci frakcija ispituju SDS-PAGE-om (Slika 6. u dodatku) može se primijetiti da prerano eluirane frakcije (od 11 do 15) sadrže ciljni protein, ali i druga onečišćenja. Frakcije eluirane pri očekivanom volumenu pufera sadrže ciljni protein uz nešto onečišćenja malih molekulskih masa. Ciljni protein ponovno je agregirao prilikom gel-filtracije iako je korišten pufer za eluciju s 21,9 mmol dm⁻³ NaH₂PO₄, 50 mmol dm⁻³ NaCl, 5% glicerolom i 2,2 mmol dm⁻³ glicinom kako bi se pokušalo izbjeći agregiranje. Dodatkom kosmotropa (NaCl, MgSO₄), kaotropa (CaCl₂, urea), aminokiselina (glicin, L-arginin), šećera (glukoza, laktoza), alkohola (glicerol, sorbitol) ili detergenata (Tween) moguće je stabilizirati native intermolekularne veze, destabilizirati protein-protein interakcije ili inhibirati nastanak ne-nativnih disulfidnih mostova dodatkom reducirajućih sredstava.³⁸ Pročišćavanje proteina CaDPPIII gel-filtracijom potrebno je optimizirati dodatkom drugih molekula koje pospješuju topljivost proteina u pufer za lizu i eluciju. Usporedbom sva tri kromatograma tijekom gel-filtracije, te količine proteina nanosene na kolonu prilikom pojedinog pročišćavanja može se zaključiti da pri većim koncentracijama nanosenog uzorka veća količina proteina odlazi u agregate.

Izmjerena je koncentracija proteina u frakciji 12 (prerano eluirane frakcija), te frakciji 29 (glavna frakcija), te im je ispitana specifična aktivnost. Specifična peptidazna aktivnost prema supstratu Arg₂-2NA u prerano eluiranoj frakciji je oko 3 puta manja (104,7 nmol min⁻¹ mg⁻¹) od

specifične aktivnosti u glavnoj frakciji ($304,6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Agregacijom je ciljani protein izgubio dio peptidazne aktivnosti. Specifična aktivnost u glavnoj elucijskoj frakciji (frakcija 29) tijekom ovog pročišćavanja je najveća izmjerena specifična aktivnost ovog proteina ($304,6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Specifična aktivnost pročišćenog enzima CaDPPIII-His₆ znatno je niža od ostalih proteina DPPIII. Specifična aktivnost CaDPPIII je 20 puta niža od specifične aktivnosti DPPIII iz *B. thetaiotaomicron*, koja iznosi $7,2 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.²¹ Zanimljivo je da je specifična aktivnost proteina CaDPPIII samo 2,3 puta veća od specifične aktivnosti fuzijskog enzima Nudix-DPPIII iz mahovine *P. patens* (PpND), koja iznosi $131,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.²² Niske specifične aktivnosti CaDPPIII i PpND u skladu su s rezultatima na delecijskoj varijanti štakorskog enzima DPPIII koji umjesto HELLGH motiva aktivnog mjesta sadrži pentapeptid HELGH, koji pokazuje znatno nižu konstantu specifičnosti (za isti supstrat) od proteina divljeg tipa.⁸ Aktivno mjesto CaDPPIII je pentapeptid HEISH, čime pokazuje sličnost s biljnim proteinom PpND s HECCH motivom u aktivnom mjestu.

Glavne frakcije, od 28 do 31, ugušćene su i odsoljene Vivaspin sustavom do 3,5 ml uz ukupnu količinu proteina od 4,43 mg. Uzorci tijekom različitih koraka pročišćavanja ispitani su SDS-PAGE-om (Slika 3.9.).

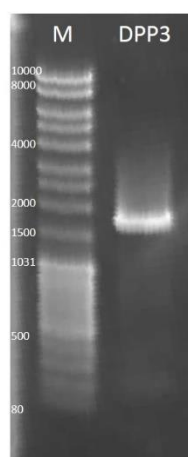


Slika 3.9. Gel nakon SDS-PAGE-a uzorka nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni (na gel nanoseno $5 \text{ } \mu\text{g}$ proteina), označeno s Ni-NTA. Uzorak nakon pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na HisTrap koloni na ÅKTA instrumentu (na gel nanoseno $6 \text{ } \mu\text{g}$ proteina) označen je s HisTrap. Uzorci nakon pročišćavanja tekućinskom kromatografijom metodom odjeljivanja po veličini na AKTA instrumentu (na gel nanoseno $4, 5$ i $1 \text{ } \mu\text{g}$ proteina) označeni su s S200. Slovo M označava marker molekularnih masa *Page Ruler® Prestained Protein Ladder*.

Iako je velika količina proteina izgubljena zbog agregacije tijekom gel-filtracije na instrumentu ÅKTA, ovaj korak pročišćavanja bio je neophodan kako bi se dobio protein prihvatljive čistoće za biokemijska ispitivanja.

3.2. Kloniranje, prekomjerna ekspresija i pročišćavanje rekombinantnog proteina GST-CaDPPIII

Kako bi se pokušala poboljšati topljivost proteina CaDPPIII prilikom ekspresije i učinkovitost pročišćavanja, kodirajući slijed proteina CaDPPIII prekloniran je iz plazmida pLATE31CaDPPIIIHis u plazmid pGEX-6P1 kako bi se dobio fuzijski, rekombinantni protein GST-CaDPPIII. Lančanom reakcijom polimeraze uz početnice GSTCaDPPIII_F i GSTCaDPPIII_R (nukleotidni slijed i temperature mekšanja navedeni u tablici 2.1.), umnožen je kodirajući slijed proteina CaDPPIII iz plazmida pLATE31CaDPPIIIHis. Nakon pročišćavanja, izmjerena je koncentracija dobivenog PCR produkta od 206,8 ng μl^{-1} . Kako bi se provjerila uspješnost PCR-a alikvot reakcijske smjese stavljen je na agarozni gel i provedena je elektroforeza (Slika 3.10.)

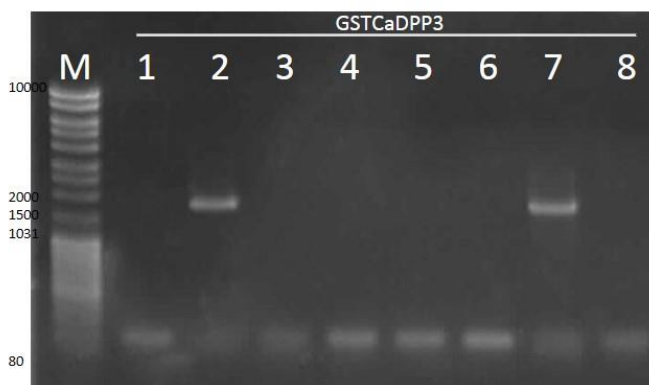


Slika 3.10. Agarozni gel (1%) nakon elektroforeze uzoraka produkta PCR reakcije (na slici označeno s DPP3) dobivenih umnažanjem kodirajućeg slijeda za protein CaDPPIII iz plazmida pLATE31CaDPPIIIHis. Slovo M označava DNA marker *MassRuler DNA Ladder Mix*.

Nakon elektroforeze (Slika 3.10.) na gelu je vidljiva pruga koja veličinom odgovara očekivanom fragmentu kodirajućeg slijeda proteina CaDPPIII od 1701 parova baza što ukazuje na uspješno umnažanje iz vektora pLATECaDPPIIIHis.

Produkt PCR reakcije i plazmid pGEX- 6P1 razgrađeni su restrikcijskim enzimima *BamHI* i *XhoI*, uz prisutnost restrikcijskog enzima *DpnI* u restrikcijskoj smjesi PCR produkta i alkalne fosfataze FastAP u restrikcijskoj smjesi plazmida. Nakon pročišćavanja restrikcijskih smjesa dobiveno je 49 ng μl^{-1} željenog inserta i 175 ng μl^{-1} razgrađenog plazmida. Nakon ligacije uz molarni omjer vektora i inserta

1:5 pri 22°C na 10 minuta, dobivenom ligacijskom smjesom transformirane su elektrokompetentne stanice bakterije *E. coli* DH5 α . S hranjivih podloga na kojima su nanese transformirane stanice izabrano je osam kolonija na kojima je proveden PCR na kolonijama. Lančanom reakcijom polimeraze na uzorku bakterijskih kolonija pomoću *DreamTaq Green PCR Master Mix*-a potvrđene su dvije kolonije u kojima je došlo do uspješne transformacije željenog plazmida (Slika 3.11., kolonije 2 i 7).



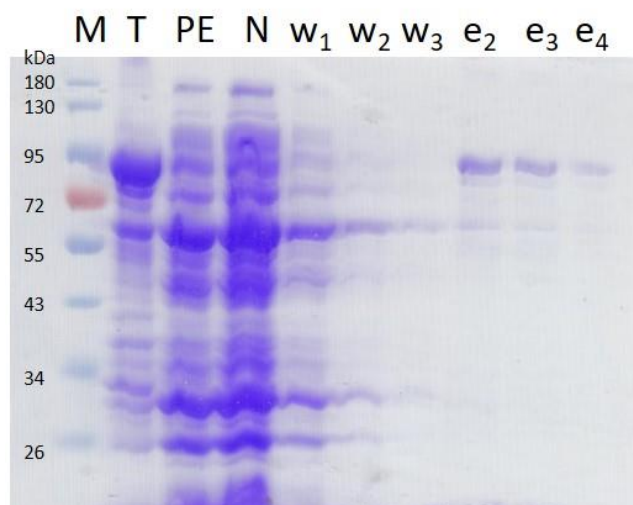
Slika 3.11. Agarozni gel (1%) nakon elektroforeze uzoraka PCR-a na kolonijama. Brojem su označene kolonije izabrane za PCR, a slovom M marker *MassRuler DNA Ladder Mix*.

Na slici gela nakon elektroforeze produkata kolonijskog PCR-a (slika 3.11.) kod kolonija 2 i 7 možemo vidjeti pruge koje odgovaraju očekivanom PCR produktu od 1847 parova baza. Kod PCR-a na kolonijama moguć je nastanak nespecifičnih PCR-produkata zbog mogućih kontaminacija, jer se kao kalup uzimaju kolonije stanica. Također, moguće objašnjenje pruga pri malim molekulskim masama je nastanak homodimera ili heterodimera početnica.

Od iste kolonije od koje je dio stanica uzet za kolonijski PCR, dio stanica je inokuliran u 10 ml medija za uzgoj i inkubiran preko noći na 37°C kako bi se izvršila izolacija plazmida. Ispravnost kodirajućeg slijeda i uspješnost kloniranja provjerena je sekvenciranjem dobivenog plazmida. Provjerom sekvence ustanovljeno je da plazmid izoliran iz kolonije 2 sadrži ispravan slijed nukleotida te je taj plazmid korišten za transformaciju elektrokompetentnih stanica bakterije *E. Coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL za ekspresiju proteina.

Nakon prekonoćne ekspresije ciljnog proteina s GST privjeskom, inducirane 0,25 mmol dm⁻³ IPTG-om, pri 18°C i lize stanica primijećeno je da GST-CaDPPIII zaostaje u inkluzijskim tijelima (Slika 3.12.). Na slici 3.18. može se vidjeti da je izražena pruga koja veličinom odgovara ciljnom proteinu s GST privjeskom (96,9 kDa), prisutna u uzorku taloga. Pruge koje odgovaraju ciljnom proteinu u uzorku

elucijskih frakcija tijekom pročišćavanja na glutation-agaroznoj koloni su dosta slabe, a uz njih su prisutne i pruge koje odgovaraju onečišćenjima.



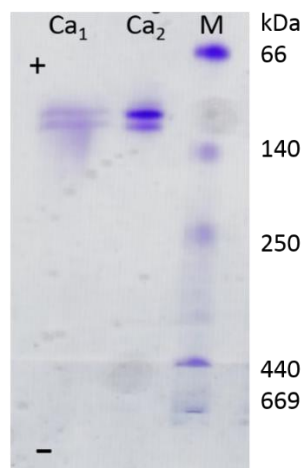
Slika 3.12. Poliakrilamidni gel (10%) nakon SDS-PAGE-a elucijskih uzoraka (e) nakon pročišćavanja na glutation-agaroznoj koloni. Slovom T je označen uzorak taloga nakon lize stanica, kraticom PE je označen supernatant nakon lize stanica, slovom N nevezana frakcija, te slovom w frakcije tijekom ispiranja nespecifično vezanih proteina. Slovo M označava marker molekulske masa *Page Ruler® Prestained Protein Ladder*.

Kako bi se pokušala optimizirati ekspresija rekombinantnog, fuzijskog proteina GST-CaDPPIII provedena je indukcija ekspresije iz malih kultura uz 0,1, 0,25, 0,50 i 1 mmol dm⁻³ IPTG pri 37°C na 4 sata no nije dobivena bolja topljivost proteina CaDPPIII (slika nije prikazana).

Izmjerena specifična peptidazna aktivnost proteina GST-CaDPPIII bila je tri puta manja od aktivnosti pročišćenog proteina CaDPPIII-His₆. Iz tog razloga, ali i zbog malog prinosa topljivog proteina GST-CaDPPIII svi testovi i biokemijska mjerenja provedeni su s uzorkom proteina s His₆-privjeskom.

3.3. Molekulska svojstva proteina CaDPPIII-His₆

Nativnom gel-elektroforezom ispitana su molekulska svojstva proteina CaDPPIII, odnosno ispitano je postojanje različitih strukturnih oblika i multimera proteina u pročišćenom uzorku.

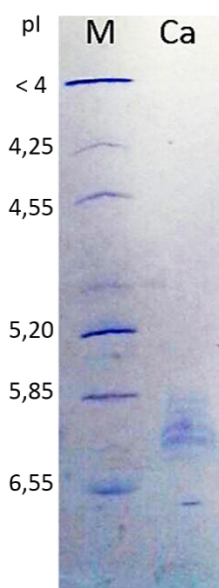


Slika 3.13. Nativna elektroforeza uzorka proteina CaDPPIII-His₆ u 8-25%-tnom poliakrilamidnom gelu uz visokomolekularni proteinski standard (HMW). Uzorak imenovan s Ca₁ je uzorak proteina ekspimiran i pročišćen tijekom eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada, dok je uzorak označen s Ca₂ uzorak istog proteina s His₆-privjeskom, ranije ekspimiran, pročišćen i korišten za kristalizaciju. Zbog znatno veće koncentracije uzorka Ca₂ pruge koje odgovaraju ovom uzorku su intenzivnije. Na slici, M označava visokomolekularni proteinski standard (HMW).

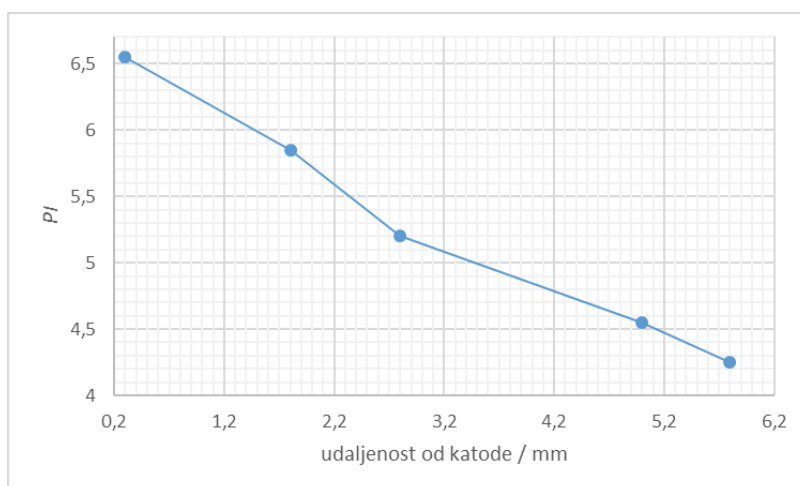
Na gelu nakon nativne elektroforeze (Slika 3.13.) mogu se primijetiti dvije bliske pruge kod uzorka proteina CaDPPIII. Izostanak drugih pruga na gelu potvrđuje da je ovaj protein monomer, kao i većina proteina ove porodice. Dimerizacija proteina porodice CaDPPIII je prvi put uočena kod kvašćevog proteina.⁴⁰ Dvije bliske pruge ukazuju na postojanje dva različita strukturna oblika, odnosno na postojanje dvije različite forme proteina koje se drugačije kreću kroz gel zbog male razlike u veličini ili konformaciji. Protein DPPIII iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron* također pokazuje dvije različite forme proteina prilikom nativne elektroforeze.⁴¹

3.3.1. Izoelektrična točka

Kako bi se odredila izoelektrična točka rekombinantnog proteina CaDPPIII-His₆ provedeno je izoelektrično fokusiranje na uređaju *PhastSystem* (*Pharmacia*, Švedska). Korišten je 5%-tni gel, gradijenta pH 4-6 uz standarde: humana anhidraza karbonatne kiseline B (pI 6,55), goveđa anhidraza karbonatne kiseline B (pI 5,85), β-laktoglobulin A (pI 5,20), inhibitor tripsina iz soje (pI 4,55) i amiloglukozidaza (pI 3,50).



Slika 3.14. Izoelektrično fokusiranje (IEF) uzorka proteina CaDPPIII-His₆ (Ca) u 5%-tnom gelu gradijenta pH 4-6 uz pI standarde od 2,5 do 6,5 (M).



Slika 3.15. Određivanje izoelektrične točke pročišćenog proteina CaDPPIII pomoću IEF u gelu gradijenta pH 4-6 uz standarde od 2,5 do 6,5.

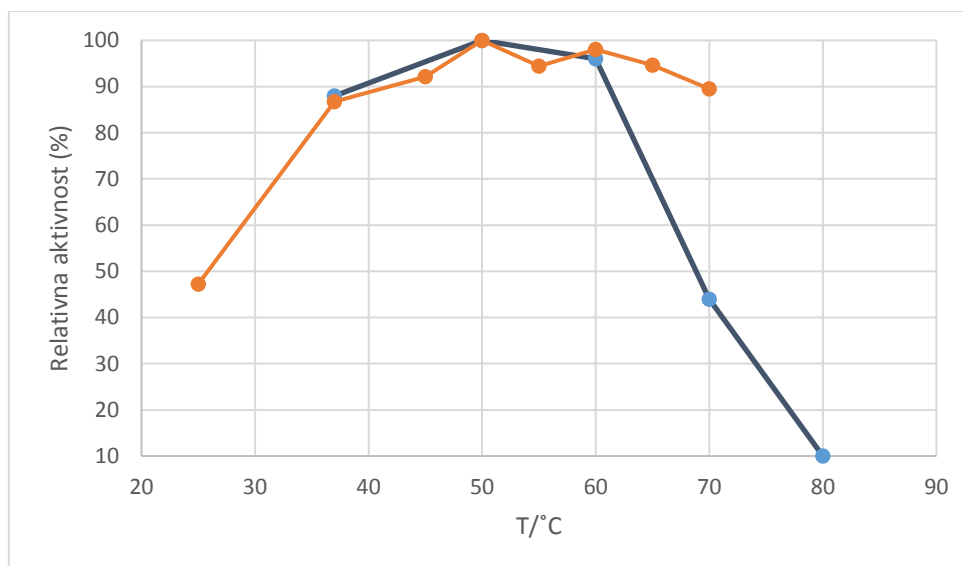
Na gelu nakon IEF (Slika 3.14.), dvije pruge ukazuju na postojanje dvije različite forme proteina koje se razlikuju u izoelektričnoj točki. Rezultati izračuna izoelektrične točke proteina CaDPPIII-His₆, pomoću IEF i konstrukcijom baždarnog dijagrama (Slika 3.15.), daju vrijednost od 6,12 za prugu bližu negativnoj elektrodi, te vrijednost od 6,04 za drugu prugu. Kako teorijska vrijednost izoelektrične točke proteina CaDPPIII-His₆ iznosi 6,12, pl vrijednost pruge bliže negativnoj elektrodi u boljem je slaganju s teorijskom vrijednošću. Protein DPPIII iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron* također pokazuje dvije različite forme proteina prilikom izoelektričnog fokusiranja.⁴¹

3.4. Katalitička svojstva enzima CaDPPIII-His₆

3.4.1. Temperaturna stabilnost i utjecaj temperature na specifičnu aktivnost proteina CaDPPIII-His₆

Ispitivanje temperaturne stabilnosti pročišćenog proteina CaDPPIII-His₆ provedeno je standardnim testom peptidazne aktivnosti pri pH 7,0 uz prethodnu predinkubaciju enzima i 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl pufera pri određenoj temperaturi na 30 minuta. Predinkubacijska smjesa je ohlađena na ledu tijekom 2 minute, nakon čega je dodan supstrat Arg₂-2NA do konačne koncentracije 40 μmol dm⁻³. Reakcija je prekinuta nakon 15 minuta dodatkom FBB soli.

Ispitivanje utjecaja temperature na specifičnu aktivnost proteina CaDPPIII-His₆ provedeno je standardnim kolorimetrijskim testom peptidazne aktivnosti uz inkubaciju enzima i 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl pufera pri određenoj temperaturi na 2 minute. Dodavanjem FBB soli nakon 15 minuta pri određenoj temperaturi prekinuta je reakcija.



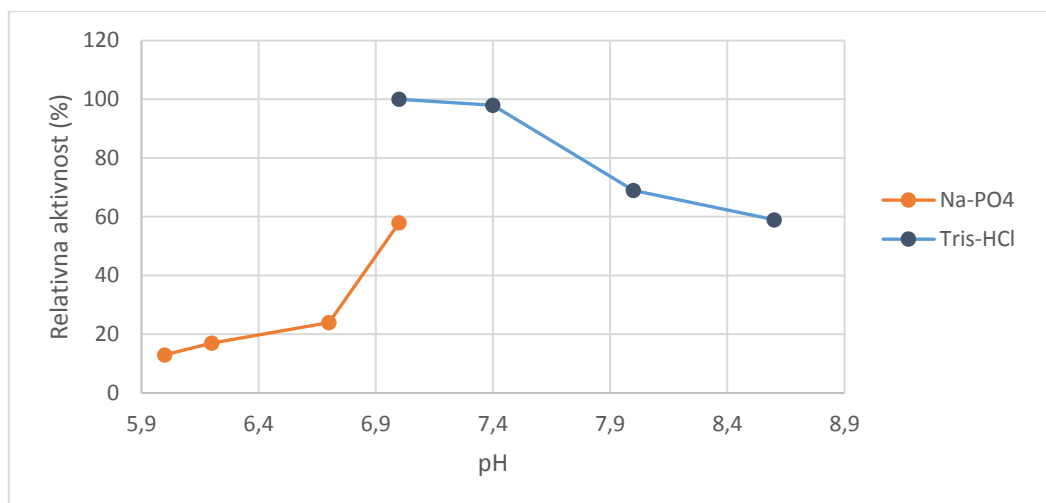
Slika 3.16. Utjecaj temperature na stabilnost (plava linija) i na specifičnu peptidaznu aktivnost (narančasta linija) enzima CaDPPIII-His₆.

Dobiveni rezultati (Slika 3.16.) temperaturne stabilnosti pokazuju da specifična aktivnost pročišćenog enzima CaDPPIII-His₆ naglo opada tek nakon 60°C, odnosno da je protein stabilan od 37 do 60°C. Prema temperaturnom rasponu u kojima je stabilan, ovaj protein se značajno razlikuje od drugih proteina DPPIII koji pokazuju značajan pad stabilnosti, odnosno peptidazne aktivnosti pri temperaturama većim od 40°C.^{39, 40, 41}

Rezultati utjecaja temperature na specifičnu aktivnost (Slika 3.16.) enzima CaDPPIII-His₆ pokazuju da peptidazna aktivnost ne ovisi značajno o temperaturi, u temperaturnom rasponu od 55 do 65°C. Enzim DPPIII iz ljudskih eritrocita⁴² pokazuje najveću aktivnost pri 40°C, bakterijska⁴¹ DPPIII pri 45°C, a enzim PpND iz mahovine³⁹ pri 55°C čime enzim CaDPPIII ponovno pokazuje sličnost sa proteinom iz mahovine. Ipak ovo je najviši izmjereni temperaturni optimum peptidazne aktivnosti enzima DPPIII. Temperaturni optimum aktivnosti nekog enzima je određen ravnotežom između utjecaja temperature na brzinu kemijske reakcije i utjecaja na brzinu raspada (denaturacije) enzima te iz tog razloga vrijednosti temperaturnog optimuma nemaju poseban značaj, posebno ako su mjereni u temperaturnom području u kojem enzim nije stabilan.⁴³ Kako se enzim CaDPPIII inaktivira (denaturira) na temperaturama višim od 60°C, nije potrebno ispitivati utjecaj temperature na peptidaznu aktivnost (temperaturni optimum) pri višim temperaturama. Temperaturna stabilnost proteina CaDPPIII puno je viša od drugih DPPIII.

3.4.2. Ovisnost peptidazne aktivnosti proteina CaDPPIII o pH reakcijske smjese

Ispitana je ovisnost peptidazne aktivnosti o pH reakcijske smjese u području od 6,0 do 7,0 u 50 mmol dm⁻³ fosfatnom puferu, te od 7,0 do 8,6 u 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl puferu pri 25°C standardnim kolorimetrijskim testom aktivnosti uz 40 μmol dm⁻³ supstrat Arg₂-2NA.



Slika 3.17.: Ovisnost peptidazne aktivnosti CaDPPIII-His₆ o pH reakcijske smjese. U reakcijskoj smjesi koncentracija enzima bila je 0,216 μmol dm⁻³. Plavo je označen Tris-HCl pufer, a narančasto fosfatni pufer. Najveća aktivnost (100 %) izmjerena je pri pH 7,0.

Dobiveni rezultati (Slika 3.17.) ukazuju na najveću specifičnu aktivnost enzima u 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl puferu pH 7,0 što je do sad najniži pH optimum neke DPPIII uz taj supstrat. Humana DPPIII postiže najveću aktivnost pri pH 8,5-9,0, bakterijska i kvaščeva DPPIII pri pH 8,0^{21, 40}, a PpND iz mahovine optimum katalitičke aktivnosti postiže pri najsličnijim uvjetima kao i CaDPPIII, odnosno pri pH 7,4³⁹.

3.4.3. Utjecaj različitih metalnih iona na peptidaznu aktivnost proteina CaDPPIII-His₆

Utjecaj različitih metalnih iona na peptidaznu aktivnost proteina CaDPPIII-His₆ ispitana je standardnim kolorimetrijskim testom aktivnosti uz ione kobalta (CoCl₂), mangana (MnCl₂), magnezija (MgAc₂) i cinka (ZnAc₂). Otopina određene soli dodana je otopini 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl pufera pH 7,0 do konačne koncentracije od 2, 5, 10, 20, 50, 100 ili 200 μmol dm⁻³ nakon čega je smjesi dodan uzorak pročišćenog enzima. Smjesa je inkubirana 2 minute pri 37°C nakon čega je dodan supstrat Arg₂-2NA do konačne koncentracije od 40 μM i proveden je standardni test aktivnosti pri 37°C.

Tablica 3.3. Utjecaj različitih metalnih iona na aktivnost CaDPPIII-His₆. Prikazana je relativna aktivnost u %, kao srednja vrijednost relativnih aktivnosti (%) dva neovisna mjerenja, u odnosu na specifičnu aktivnost enzima CaDPPIII bez dodatka metalnih iona.

Metalni ion	c(M ²⁺ , konačna) / μM	% aktivnosti
Co ²⁺ (CoCl ₂)	5	104,6
	10	117,6
	50	123,1
	100	127,3
	200	122,0
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	10	106,6
	100	106,9
	200	97,8
Mg ²⁺ (MgAc ₂)	10	103,1
	100	104,3
Zn ²⁺ (ZnAc ₂)	2	97,5
	10	105,1
	50	103,7
bez metalnih iona	-	100,0

Rezultati navedeni u tablici 3.3. pokazuju da dodatak metalnih iona ne utječe značajno na peptidaznu aktivnost enzima CaDPPIII kao što je to slučaj kod drugih proteina ove porodice. Pokazano je da ioni kobalta (Co²⁺) povoljno utječu na aktivnost DPPIII⁴², te da u prisutnosti iona kobalta u reakcijskoj smjesi dolazi do povećanja aktivnosti jedanaest puta kod kvaščeve DPPIII⁴⁴, do povećanja četiri puta bakterijskog enzima iz *B. thetaiotaomicron* (BtDPPIII)⁴¹, te do povećanja aktivnost sedam puta kod enzima PpND³⁹. Analizom kristalne strukture možda će se moći objasniti zašto dodatak metalnih iona ne utječe značajno na peptidaznu aktivnost enzima CaDPPIII.

3.4.4. Supstratna specifičnost

Ispitana je peptidazna aktivnost enzima CaDPPIII-His₆ uz sljedeće naftilamide: Arg-Arg-2NA, Ala-Arg-2NA, Gly-Arg-2NA, Pro-Arg-2NA, Phe-Arg-2NA, Arg-2NA, Ala-Ala-2NA, Gly-Pro-2NA, His-Phe-2NA, His-Ser-2NA, Lys-Ala-2NA, Glu-His-2NA, Gly-Phe-2NA i BANA standardnim kolorimetrijskim testom aktivnosti uz predinkubaciju enzima od 2 minute pri 50°C u 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl puferu pH 7,0.

Uz dodatak određenog supstrata, konačne koncentracije od 40 μmol dm⁻³, reakcija je provedena na 50°C, te prekinuta dodatkom FBB soli nakon 15 minuta.

Tablica 3.4. Ispitivanje peptidazne aktivnosti enzima CaDPPIII-His₆ prema različitim naftilamidima. U tablici '-' označava mjerenje koje nije provedeno. Specifična aktivnost uz Gly-Arg-2NA bila je 167,65 nmol min⁻¹ mg⁻¹. Rezultati su prikazani kao relativna aktivnost u % u odnosu na aktivnost uz Gly-Arg-2NA.

Supstrat	% aktivnosti		
	1. mjerenje	2. mjerenje	srednja vrijednost
Ala-Arg-2NA	38,3	35	36
Arg-Arg-2NA	63,7	56,1	59,9
Phe-Arg-2NA	75,5	79,1	77,3
Ala-Ala-2NA	67,4	56,5	61,9
Gly-Pro-2NA	1	-	-
Gly-Arg-2NA	100	100	100
Arg-2NA	1,6	-	-
BANA	0,1	-	-
Pro-Arg-2NA	89	83,2	86
His-Ser-2NA	17,1	-	-
His-Phe-2NA	24,1	-	-
Lys-Ala-2NA	38,9	42,7	40,8
Glu-His-2NA	9	-	-
Gly-Phe-2NA	5,4	-	-

Rezultati supstratne specifičnosti enzima CaDPPIII-His₆ (Tablica 3.4.) neočekivano pokazuju najbolju specifičnu peptidaznu aktivnost uz supstrat Gly-Arg-2NA. Dobiveni rezultat je neočekivan jer je pokazano da proteini porodice DPPIII najbolje hidroliziraju sintetski supstrat Arg-Arg-2NA.^{39, 40, 41} No i uz supstrate Arg-Arg-2NA, Phe-Arg-2NA i Pro-Arg-2NA specifična peptidazna aktivnost enzima CaDPPIII je značajna zbog čega se ne može reći da ovaj enzim pokazuje specifičnost prema samo jednom sintetskom supstratu. Enzim CaDPPIII u usporedbi s ljudskim i svim ostalim ispitanim enzimima je značajno nespecifičniji prema 2-naftilamidnim supstratima. Više informacija i mogući uzrok nespecifičnosti enzima CaDPPIII prema sintetskim DPPIII supstratima dobiti će se nakon rješavanja kristalne strukture ovog enzima.

3.4.5. Utjecaj efektor peptidaza na aktivnost CaDPPIII

Ispitivanje utjecaja efektor peptidaza na aktivnost enzima CaDPPIII-His₆ provedeno je predinkubacijom smjese enzima, 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl pufera (pH 7,0) i efektor, 20 minuta na sobnoj temperaturi (Tablica 3.5.). Nakon inkubacije od 2 minute na 50°C dodan je supstrat do konačne koncentracije od 40 μM i proveden je standardni kolorimetrijski test aktivnosti. Ispitan je utjecaj 4,4'-ditiopiridina (DTDP, konačne koncentracije u otopini 0,1 mmol dm⁻³), *p*-hidroksimerkuribenzoata (pHMB) (1 μmol dm⁻³), EDTA (10 mmol dm⁻³), *o*-fenantrolina (1 mmol dm⁻³), jodoacetamida (IAM) (10 mmol dm⁻³), ditioneitol (DTT) (0,035 mmol dm⁻³) i GSSH (reducirani glutation disulfid, 0,035 mmol dm⁻³). Veće koncentracije ditioneitol ometaju reakciju diazokopuliranja 2-naftilamina i soli FBB, iz tog razloga je ispitivanje njegova utjecaja na aktivnost enzima provedeno predinkubacijom efektor i enzima 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je uzet alikvot inkubacijske smjese i dodan u reakcijsku smjesu.

Tablica 3.5. Utjecaj efektor peptidaza na hidrolitičku aktivnost enzima CaDPPIII-His₆. Prikazana je relativna aktivnost u %, u odnosu na specifičnu aktivnost enzima CaDPPIII bez dodatka efektor.

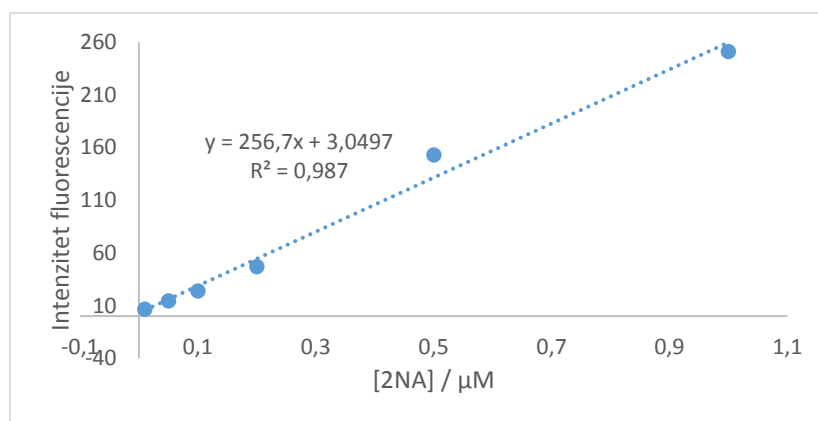
Efektor	% aktivnosti		
	1. mjerenje	2. mjerenje	srednja vrijednost
-	100	100	100
DTDP	44,5	41,9	43,2
pHMB	82,2	93,2	87,7
EDTA	0	0	0
<i>o</i> -phenantrolin	0	0	0
IAM	16,4	38,2	27,3
DTT	92,3	95,3	93,8

Ispitivanjem utjecaja kelatora metala EDTA i *o*-fenantrolina na katalitičku aktivnost CaDPPIII, potvrđeno je da se radi o metaloenzimu jer su ova dva kelatora potpuno inhibirala enzim CaDPPIII, kao i druge proteine ove porodice pošto se disocijacijom metalnog iona iz aktivnog mjesta potpuno gubi aktivnost enzima.^{9, 39, 41} Poznato je da tiolni reagensi, inhibitori cisteinskih proteaza, inhibiraju proteine porodice DPPIII⁹, te je pokazano da sulfhidril-blokirajući reagensi DTDP i IAM inhibiraju protein CaDPPIII jače od pHMB pri ispitanim koncentracijama. Stupanj inhibicije sulfhidril-blokirajućim reagensima reagensima ovisi o proteinu, a moguće objašnjenje inhibicije je u postojanju neke tiolne grupe koja je esencijalna za aktivnost preko vezanja supstrata, metala ili izravno u katalizi. Ovo objašnjenje nije najbolje u slučaju proteina CaDPPIII koji ima samo dva cisteinska aminokiselinska ostatka. Uz to, cisteini se ne nalaze u pentapeptidnom motivu aktivnog mjesta kao što je to slučaj kod biljnog proteina PpND za koji je pokazana inhibicija pHMB-om.³⁹ Međutim, i humani enzim DPPIII koji ima 6 cisteina, ali nijedan u motivu aktivnog mjesta, je također osjetljiv na sulfhidrilne reagense.⁴⁵

Tiolni spoj DTT je karakterističan inhibitor cink-ovisnih metalopeptidaza⁹ koji se najvjerojatnije veže na ione cinka i tako inhibira enzim. Za kvašćev enzim pokazano je da je aktiviran i do 3,5 puta uz 0,1 mmol dm⁻³ DTT, što je objašnjeno mogućom redukcijom disulfidnih mostova koji mogu biti odgovorni za dimerizaciju, a time i smanjenje aktivnosti ovog proteina. Pri koncentracijama DTT-a većim od 3,0 mmol dm⁻³ kvašćev enzim je inhibiran.⁴⁰ Pri koncentraciji DTT-a od 0,035 mmol dm⁻³ ne dolazi do značajne promjene peptidazne aktivnosti enzima CaDPPIII što nije neuobičajeno uzimajući u obzir postojanje svega dva cisteinska aminokiselinska ostatka u primarnoj strukturi proteina, te zanemariv učinak dodatka metalnih iona na peptidaznu aktivnost.

3.4.6. Kinetička mjerenja peptidazne aktivnosti enzima CaDPPIII-His₆

Kinetika peptidazne reakcije praćena je pomoću fluorescencijskog svojstva produkta (2-naftilamina) kao što je opisano u materijalima i metodama. Baždarni pravac (Slika 3.18.) dobiven je mjerenjem intenziteta otopina različitih koncentracija 2-naftilamina u 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl-u pH 7,0 pri 50°C. Intenzitet fluorescencije izmjeren je za otopine 2-naftilamina koncentracija: 0,001, 0,05, 0,1, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 i 1 μmol dm⁻³ te za otopinu bez dodatka 2-naftilamina. Iz jednadžbe baždarnog pravca, $y = 256,7x + 3,0497$, izračunat je koeficijent baždarnog pravca $f = 0,003896 \mu\text{mol dm}^{-3}$.



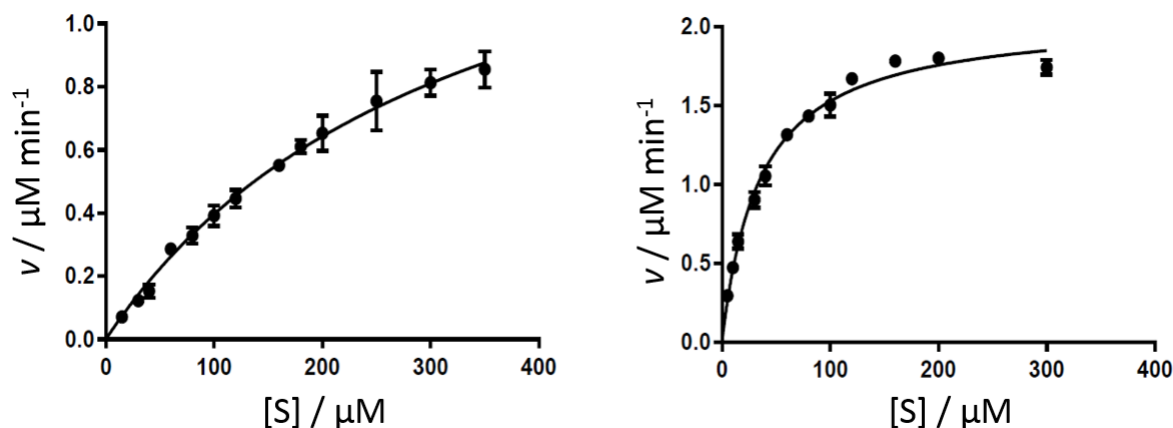
Slika 3.18. Prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji 2-naftilamina.

Kinetika peptidazne aktivnosti proteina CaDPPIII-His₆ mjerena je uz supstrate Gly-Arg-2NA i Arg₂-2NA. Za svaki supstrat provedena su tri nezavisna mjerenja intenziteta fluorescencije o vremenu pri različitim koncentracijama supstrata. Dobiveni nagibi pravaca pomnoženi su s koeficijentom baždarnog pravca kako bi se dobile početne brzine enzimske reakcije. Konstrukcijom Michaelis-Mentenićinih krivulja i Hanes-Wolfovih pravaca (rezultati nisu prikazani) provjereno je odstupanje rezultata. Nelinearnom regresijom programom *Graph Pad Prism Demo* određene su vrijednosti

konstanta V_{max} , k_{cat} , K_M i k_{cat}/K_M te su prikazani u Tablici 3.6. Prikazi Michaelis-Menteničinih krivulja dobiveni programom *Graph Pad Prism Demo* prikazani su na Slici 3.19.

Tablica 3.6. Vrijednosti kinetičkih parametara peptidazne aktivnosti proteina CaDPPIII-His₆ dobivenih nelinearnom regresijom svih kinetičkih rezultata pomoću *GraphPad Prism Demo* programa.

Supstrat	$K_M / \mu\text{M}$	$V_{max} / 10^{-2}\mu\text{M s}^{-1}$	k_{cat} / s^{-1}	$k_{cat}/K_M / 10^{-3} \text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$
Gly-Arg-2NA	$328,9 \pm 36,5$	$(2,83 \pm 0,19)$	$2,53 \pm 0,17$	7,6
Arg ₂ -2NA	$35,2 \pm 2,0$	$(3,44 \pm 0,05)$	$3,07 \pm 0,04$	87,3



Slika 3.19.: Prikaz Michaelis-Menteničinih krivulja dobivenih nelinearnom regresijom tri skupa rezultata pomoću *GraphPad Prism Demo* programa. Kinetika peptidazne aktivnosti proteina CaDPPIII-His₆ mjerena je uz supstrat Gly-Arg-2NA (lijevo) i Arg₂-2NA (desno).

Konstanta specifičnost (k_{cat}/K_M) peptidazne reakcije uz supstrat Gly-Arg-2NA je oko 10 puta manja nego uz supstrat Arg₂-2NA što ukazuje da enzim CaDPPIII kao supstrat preferira Arg₂-2NA. Također, usporedbom Michaelisove konstante (K_M) može se vidjeti da je potrebna približno 10 puta manja koncentracija supstrata Arg₂-2NA za postizanje polovice maksimalne brzine enzimske reakcije. Isti zaključak se može izvesti iz prikaza Michaelis-Menteničinih krivulja na kojima se može vidjeti da u istom rasponu koncentracija supstrata, uz Arg₂-2NA ne dolazi do zasićenja te da su brzine peptidazne reakcije približno dvostruko veće u usporedbi s krivuljom dobivenom uz Gly-Arg-2NA.

Tablica 3.7. Usporedba kinetičkih parametara peptidazne aktivnosti proteina porodice DPPIII prema supstratu Arg₂-2NA. Kinetički parametri humanog, kvaščevog, biljnog i proteina iz *B. thetaiotaomicron* dobiveni su mjerenjem pri sobnoj temperaturi.

enzim	$K_M / \mu\text{M}$	k_{cat} / s^{-1}	$k_{cat} / K_M / 10^{-6} \text{ sM}^{-1}$
hDPPIII ⁴⁶	2,2 ± 0,1	20,5 ± 1,2	9,3
γDPPIII ⁴⁶	12,01 ± 1,7	0,18 ± 0,06	0,015
BtDPPIII ²¹	2,5 ± 0,9	5,0 ± 2,9	2,0
PpND ²²	10,6 ± 1,7	0,82 ± 0,18	0,0012
CaDPPIII	35,2 ± 2,0	3,07 ± 0,04	0,0873

Iako kinetička mjerenja uz supstrat Arg₂-2NA prikazana u tablici 3.7. nisu izvedena pri istoj temperaturi, usporedbom kinetičkih parametara između proteina DPPIII iz različitih organizama možemo vidjeti da je proteinu CaDPPIII potrebna znatno veća koncentracija istog supstrata za postizanje polovice maksimalne brzine enzimske reakcije, ali da je konstanta brzine reakcije prvog reda koja odgovara pretvorbi supstrata u produkt (k_{cat}) usporediva s istom konstantom bakterijskog enzima iz *B. thetaiotaomicron*. Naravno, mjerenja je potrebno izvesti pri istoj temperaturi kako bi se kinetički parametri mogli usporediti.

4. Zaključci

1. Optimizacija heterologne ekspresije i pročišćavanja dipeptidil-peptidaze III iz termofilne bakterije *Caldithrix abyssi* (CaDPPIII)
 - a. Ispitane su različite koncentracije induktora na ekspresiju CaDPPIII i utvrđeno je da koncentracija induktora ne utječe značajno na količinu prekomjerno ekspimiranog rekombinantnog proteina, niti na količinu proteina zaostalog u inkluzijskim tijelima.
 - b. Kako pročišćavanjem afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni nije dobiven protein željene čistoće, protein je dodatno pročišćen tekućinskom kromatografijom isključenja na instrumentu ÅKTA čime je povećana njegova čistoća, a najčišći uzorak proteina je dobiven pročišćavanjem tekućinskom afinitetnom kromatografijom na instrumentu ÅKTA na HisTrap koloni i kromatografijom isključenja na S200 koloni, ali uz veliki gubitak proteina koji je agregirao i izgubio dio peptidazne aktivnosti.
 - c. Da bi se povećala topljivost proteina CaDPPIII kodirajući slijed proteina prekloniran je u plazmid za prekomjernu ekspresiju rekombinantnog proteina CaDPPIII s afinitetnim GST privjeskom, no topljivost i pročišćavanje proteina nisu poboljšani. Izmjerena specifična peptidazna aktivnost proteina GST-CaDPPIII bila je tri puta manja od aktivnosti pročišćenog proteina CaDPPIII-His₆. Promjena koncentracije induktora također nije značajno utjecala na količinu prekomjerno ekspimiranog rekombinantnog proteina GST-CaDPPIII, niti na količinu proteina zaostalog u inkluzijskim tijelima.

2. Biokemijska karakterizacija CaDPPIII
 - a. Najveća specifična aktivnost proteina CaDPPIII-His₆ izmjerena je u glavnoj elucijskoj frakciji nakon pročišćavanja na S200 koloni, te iznosi 304,6 nmol min⁻¹mg⁻¹, što je znatno niže od ostalih ispitanih proteina iz porodice DPPIII.
 - b. Nativnom elektroforezom i izoelektričnim fokusiranjem pokazano je da u dobivenom, pročišćenom uzorku proteina CaDPPIII-His₆ postoje dva različita strukturna oblika, odnosno dvije različite forme proteina koje se razlikuju u izoelektričnoj točki.
 - c. Protein CaDPPIII-His₆ je stabilan na temperaturama do 60°C, dok peptidazna aktivnost ne ovisi značajno o temperaturi u temperaturnom rasponu od 55 do 65°C.

- d. Najveća specifična aktivnost enzima izmjerena je u 50 mmol dm^{-3} Tris-HCl puferu pH 7,0, a dodatak metalnih iona ne utječe značajno na peptidaznu aktivnost enzima CaDPPIII-His₆ kao što je to slučaj kod drugih proteina ove porodice.
- e. Protein CaDPPIII-His₆ pokazuje značajnu aktivnost (jednaku ili veću nego prema Arg-Arg-2NA) prema još nekoliko 2-naftilamidnih supstrata (najveća aktivnost prema Gly-Arg-2NA) te se time razlikuje od ostalih enzima iz porodice DPPIII koji pokazuju najveću aktivnost prema Arg-Arg-2NA.
- f. Ispitivanjem utjecaja efektor peptidaza na aktivnost enzima CaDPPIII-His₆ pokazano je da kelatori metala EDTA (10 mmol dm^{-3}) i o-fenantrolin (1 mmol dm^{-3}) potpuno inhibiraju enzim. Sulfhidril-blokirajući reagensi DTDP ($0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$) i IAM (10 mmol dm^{-3}) inhibiraju protein CaDPPIII jače od pHMB ($1 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) pri ispitanim koncentracijama. Pri koncentraciji DTT-a od $0,035 \text{ mol dm}^{-3}$ ne dolazi do značajne promjene peptidazne aktivnosti enzima CaDPPIII.
- g. Mjerenjem kinetike peptidazne aktivnosti proteina CaDPPIII-His₆ i usporedbom konstante specifičnosti i Michaelis-Menteničinih krivulja pokazano je da enzim kao supstrat preferira Arg₂-2NA, no potrebna je znatno veća koncentracija supstrata za postizanje polovice maksimalne brzine enzimske reakcije u usporedbi s drugim DPPIII.
- h. Rezultati biokemijske karakterizacije CaDPPIII potvrđuju da se ovaj protein može svrstati u porodicu enzima DPPIII.

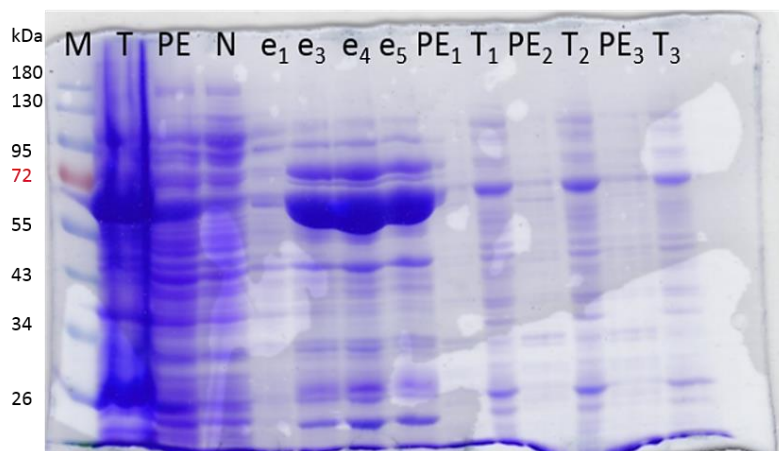
5. Literaturna vrela

- ¹ M. L. Miroshnichenko, N. A. Kostrikina, N. A. Chernyh, N. V Pimenov, T. P. Tourova, A. N. Antipov, S. Spring, E. Stackebrandt, E. A. Bonch-Osmolovskaya, *Caldithrix abyssi* gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53** (2003), 323–329
- ² M. L. Miroshnichenko, T. V. Kolganova, S. Spring, N. Chernyh, E. A. Bonch-Osmolovskaya, *Caldithrix palaeochoryensis* sp. nov., a thermophilic, anaerobic, chemo-organotrophic bacterium from a geothermally heated sediment, and emended description of the genus *Caldithrix*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **60** (2010), 2120–2123
- ³ I. V. Kublanov, O. M. Sigalova, S. N. Gavrillov, A. V. Lebedinsky, C. Rinke, O. Kovaleva, N. A. Chernyh, N. Ivanova, C. Daum, T.B.K. Reddy, HP Klenk, S. Spring, M. Göker, O. N. Reva, M. L. Miroshnichenko, N. C. Kyrpides, T. Woyke, M. S. Gelfand, E. A. Bonch-Osmolovskaya, Genomic Analysis of *Caldithrix abyssi*, the Thermophilic Anaerobic Bacterium of the Novel Bacterial Phylum *Calditrichaeota*, *Front Microbiol.*, **8** (2017), 195
- ⁴ N. Cerdá-Costa, F. X. Gomis-Rüth, Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains, *Protein Sci.*, **23** (2013,) 123–144
- ⁵ N. D. Rawlings, M. Waller, A.J. Barrett, A. Bateman, MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Res.*, **42** (2014), 503-509
- ⁶ K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, M. Kanai, S. Fujii, J. Hirose, M. Harada, Dipeptidyl peptidase III is a zinc metallo-exopeptidase, *Biochem. J.*, **329** (1998), 275-282.
- ⁷ M. Abramić, J. Špoljarić, Š. Šimaga, Prokaryotic homologs help to define consensus sequences in peptidase family M49, *Period Biol.*, **106** (2004), 161 – 168
- ⁸ K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, H. Iwamoto, J. Hirose, M. Harada, The HELLGH Motif of Rat Liver Dipeptidyl Peptidase III Is Involved in Zinc Coordination and the Catalytic Activity of the Enzyme, *Biochemistry*, **38** (1999), 8299-8303
- ⁹ A. J. Barrett, J. Chen, J. F. Woessner, N. D. Rawlings, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London, 2013, p.1285-1287
- ¹⁰ S. Ellis, J. M. Nuenke, Dipeptidyl Arylamidase III of the Pituitary, *J. Biol. Chem.*, **242** (1967), 4623-4629
- ¹¹ P. K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić i K. Gruber, The First Structure of Dipeptidyl-peptidase III Provides Insight into the Catalytic Mechanism and Mode of Substrate Binding, *J. Biol. Chem.*, **283** (2008), 22316-22324
- ¹² G. A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramić, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon i K. Gruber, Entropy-driven binding of opioid peptides induces a large domain motion in human dipeptidyl peptidase III, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109** (2012), 6525-6530

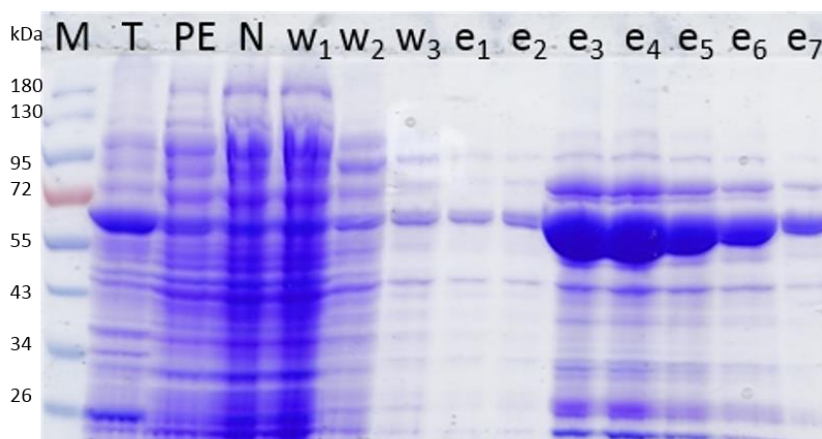
- ¹³ P. Kumar, V. Reithofer, M. Reisinger, S. Wallner, T. Pavkov-Keller, P. Macheroux i K. Gruber, Substrate complexes of human dipeptidyl peptidase III reveal the mechanism of enzyme inhibition, *Sci. Rep.*, **6** (2016): 23787
- ¹⁴ T. R. Burkard, M. Planyavsky, I. Kaupe, F. P. Breitwieser, T. Bürckstümmer, K. L. Bennett, G. Superti-Furga i J. Colinge, Initial characterization of the human central proteome, *BMC Syst. Biol.*, **5** (2011)
- ¹⁵ S. Dhanda, J. Singh i H. Singh, Hydrolysis of various bioactive peptides by goat brain dipeptidylpeptidase-III homologue. *Cell Biochem. Funct.*, **26** (2008), 339–345
- ¹⁶ M. Baršun, N. Jajčanin, B. Vukelić, J. Spoljarić i M. Abramić, Human dipeptidyl peptidase III acts as a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins. *Biol. Chem.*, **388** (2007), 343–348
- ¹⁷ J. Fichna, A. Janecka, J. Costentin i J.-C. Do Rego, The endomorphin system and its evolving neurophysiological role, *Pharmacol. Rev.*, **59** (2007), 88–123
- ¹⁸ B. E. Hast, D. Goldfarb, K. M. Mulvaney, M. A. Hast, P. F. Siesser, F. Yan, D. N. Hayes i M. B. Major, Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination, *Cancer Res.*, **73** (2013), 2199–2210
- ¹⁹ Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, J. Ilić-Forko, Lj. Vitale, D. Miličić i M. Abramić, Dipeptidyl peptidase III in malignant and non-malignant gynaecological tissue, *Eur. J. Cancer*, **34** (1998), 399–405
- ²⁰ A.A. Shukla, M. Jain i S.S. Chauhan, Ets-1/Elk-1 is a critical mediator of dipeptidyl-peptidase III transcription in human glioblastoma cells, *FEBS J.*, **277** (2010), 1861–1875
- ²¹ B. Vukelić, B. Salopek-Sondi, J. Špoljaric, I. Sabljic, N. Meštrovic, D. Agic i M. Abramic, Reactive cysteine in the active-site motif of *Bacteroides thetaiotaomicron* dipeptidyl peptidase III is a regulatory residue for enzyme activity, *Biol. Chem.* **393** (2012) 37–46
- ²² Z. Karačić, B. Vukelić, G. H. Ho, I. Jozić, I. Sućec, B. Salopek-Sondi, M. Kozlović, S. E. Brenner, J. Ludwig-Müller i M. Abramić, A novel plant enzyme with dual activity: an atypical Nudix hydrolase and a dipeptidyl peptidase III, *Biol. Chem.* **398** (2017), 101-112
- ²³ R. C. Mierendorf, B. B. Morris, B. Hammer i R. E. Novy, Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System, *Methods Mol. Med.*, **13** (1998), 257-292
- ²⁴ S.B. Primrose i R.M. Twyman, *Principles of gene manipulation and genomics*, Blackwell Publishing, United Kingdom, 7.izdanje, 2006, p. 25-27, 37-40, 462
- ²⁵ Priručnik Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase
- ²⁶ G. J.S. Lohman, S. Tabor i N. M. Nichols, DNA Ligases, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, **94** (2011) 3.14.1-3.14.7
- ²⁷ U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227** (1970), 680-685
- ²⁸ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, The QIAexpressionist™, 5th Edition (2003)
- ²⁹ S. Harper i D. W. Speicher, Purification of proteins fused to glutathione S-transferase, *Methods Mol Biol.*, **681** (2011), 259-280

- ³⁰ D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Philadelphia, 1998.
- ³¹ M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72** (1976), 248-254
- ³² O. Warburg i W. Christian, Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase, *Biochem. Z.*, **310** (1941), 384 – 421
- ³³ I. Nagatsu, T. Nagatsu, T. Yamamoto, G.G. Glenner i J.W. Mehl, Purification of aminopeptidase A in human serum and degradation of angiotensin II by the purified enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **198** (1970), 255-270
- ³⁴ M. Abramić, Š. Šimaga, M. Osmak, L. Čičin-Šain, B. Vukelić, K. Vlahoviček, i Lj. Dolovčak, Highly reactive cysteine residues are part of the substrate binding site of mammalian dipeptidyl peptidases III. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36** (2004), 434 – 446
- ³⁵ J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, J. Makarević, B. Vukelić, D. Agić, Š. Šimaga, N. Jajčanin-Jozić i M. Abramić, Absolutely conserved tryptophan in M49 family of peptidases contributes to catalysis and binding of competitive inhibitors, *Bioorg. Chem.*, **37** (2009), 70 – 76
- ³⁶ R. Eisenthal i A. Cornish-Bowden, The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters, *Biochem. J.*, **139** (1974), 715-720
- ³⁷ J. S. Philo i T. Arakawa, Mechanisms of Protein Aggregation, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **10** (2009), 348-351
- ³⁸ S.E. Bondos, A. Bicknell, Detection and prevention of protein aggregation before, during and after purification, *Analytical Biochemistry*, **316** (2003), 223–231
- ³⁹ I. Jozić, Heterologna ekspresija i biokemijska karakterizacija novog proteina pretpostavljene peptidazne aktivnosti iz mahovine *Physcomitrella patens*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2012
- ⁴⁰ N. Jajčanin-Jozić, Biokemijska i strukturna karakterizacija dipeptidil-peptidaze III iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2011
- ⁴¹ I. Sabljic, Dipeptidil-peptidaza III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*: izolacija i karakterizacija, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2010
- ⁴² M. Abramić, M. Zubanović i Lj. Vitale, Dipeptidyl peptidase III from human erythrocytes, *Biol Chem Hoppe Seyler.*, **369** (1988), 29-38
- ⁴³ M. Dixon i E. C. Webb, *Enzymes*, Academic Press Inc., New York, 1964, 146-147
- ⁴⁴ Y. Watanabe, Y. Kumagai, Y. Fujimoto, Presence of a dipeptidyl aminopeptidase III in *Saccharomyces cerevisiae*, *Chem. Pharm. Bull.*, **38** (1990), 246-248
- ⁴⁵ Z. Karačić, J. Špoljarić, M. Rožman, M. Abramić. Molecular determinants of human dipeptidyl peptidase III sensitivity to thiol modifying reagents, *Biol. Chem.*, **393** (2012), 1523–1532
- ⁴⁶ N. Jajčanin-Jozić i M. Abramić, Hydrolysis of dipeptide derivatives reveals the diversity in the M49 family, *Biol. Chem.*, **394** (2013), 767–771

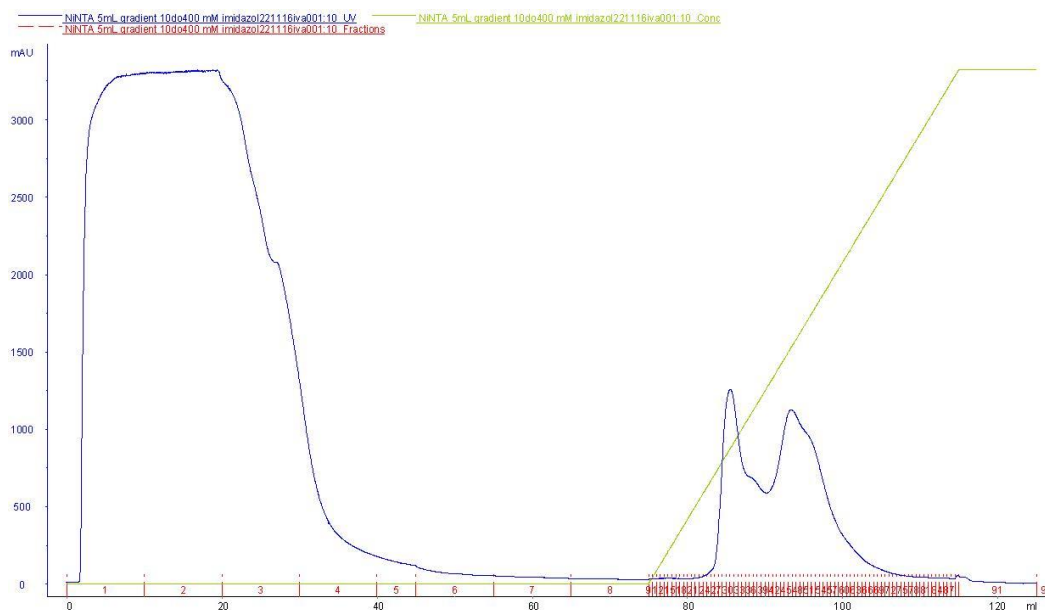
6. Dodatak



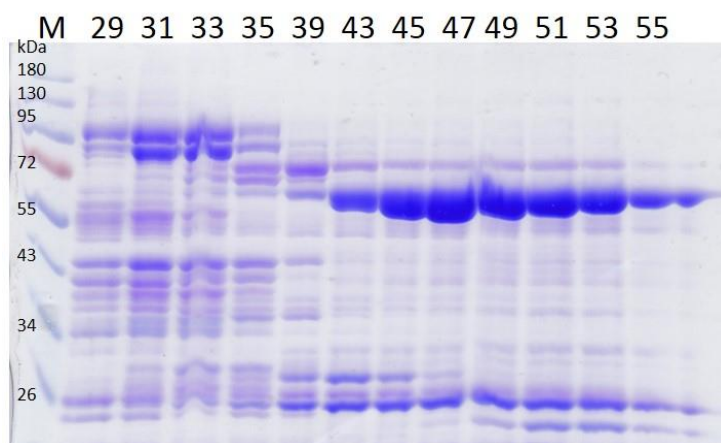
Slika D1. Gel (10%) nakon SDS-PAGE-a uzoraka taloga (T) i supernatanta (PE) nakon indukcije ekspresije $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ IPTG-om i lize stanica. Na gel su naneseni: uzorak frakcije koja se nije vezala na afinitetnu kolonu tijekom pročišćavanja (N), elucijske frakcije (e). Broj uzorke taloga i supernatanta označava uzorke nakon indukcije ekspresije $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ (1), $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ (2) i 1 mmol dm^{-3} (3) IPTG-om. Na slici, M označava marker molekulskih masa *Page Ruler® Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific, SAD).



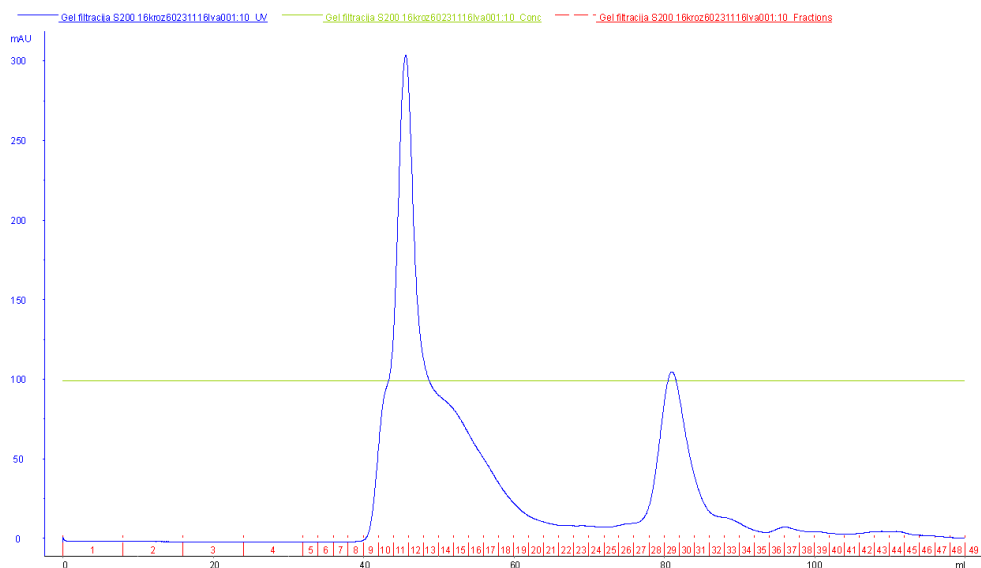
Slika D2. Gel (10%) nakon SDS-PAGE-a uzoraka taloga (T) i supernatanta (PE) nakon indukcije ekspresije 1 mmol dm^{-3} IPTG-om i lize stanica. Na gel su naneseni: uzorak frakcije koja se nije vezala na afinitetnu kolonu tijekom pročišćavanja (N), frakcije tijekom ispiranja nespecifično vezanih proteina (w) te elucijske frakcije (e). Na slici, M označava marker molekulskih masa *Page Ruler® Prestained Protein Ladder*.



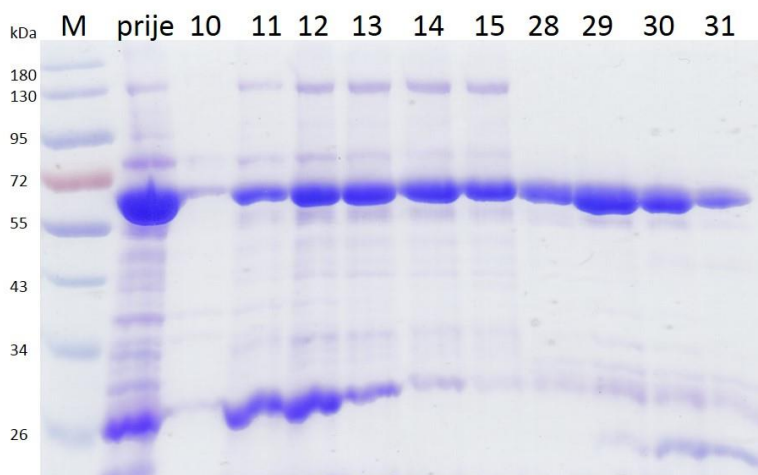
Slika D3. Kromatogram tijekom pročišćavanja na *HisTrap* koloni supernatanta nakon lize bakterijskih stanica. Na apscisi je prikazan volumen pufera za ispiranje u ml dok su crvenim brojem označene frakcije. Na ordinati je apsorbancija u mAU detektirana pri 280 nm. Zelenom linijom prikazan je gradijent imidazola od 10 mmol dm⁻³ (100 % pufer za lizu) do 400 mmol dm⁻³ (100 % pufer za ispiranje).



Slika D4. Gel (10%) nakon SDS-PAGE-a uzoraka frakcija tijekom pročišćavanja tekućinskom, afinitetnom kromatografijom na *HisTrap* koloni. Brojem su označene frakcije, redom kojim su silazile tijekom pročišćavanja tekućinskom kromatografijom. Slovo M označava marker molekulske mase *Page Ruler® Prestained Protein Ladder*.



Slika D5. Kromatogram tijekom pročišćavanja na *HiLoad 16/60 Sephadex S200* koloni uzoraka ugušćenih nakon afinitetnog pročišćavanja na *HisTrap* koloni. Na apscisi je prikazan volumen pufera za ispiranje u ml te brojem označene frakcije redosljedom kojim su silazile s kolone. Na ordinati je apsorbancija u mAU (eng. *mili absorbance unit*) detektirana pri 280 nm.



Slika D6. Gel nakon SDS-PAGE-a uzoraka frakcija tijekom pročišćavanja tekućinskom kromatografijom metodom odjeljivanja po veličini. Brojem su označene frakcije, redom kojim su silazile tijekom pročišćavanja tekućinskom kromatografijom, 'prije' označava ugušćeni uzorak proteina pročišćen tekućinskom, afinitetnom kromatografijom. Slovo M označava marker molekulske masa *Page Ruler® Prestained Protein Ladder*.