

Prekomjerna ekspresija i biokemijska karakterizacija mutanata humane dipeptidil-peptidaze III iz zloćudnih tumora

Pipalović, Goran

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:217:896663>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Goran Pipalović

**PREKOMJERNA EKSPRESIJA I BIOKEMIJSKA
KARAKTERIZACIJA MUTANATA HUMANE DIPEPTIDIL-
PEPTIDAZE III IZ ZLOĆUDNIH TUMORA**

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 pod mentorstvom i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Mihaele Matovine. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta “Jedinstvo uz pomoć znanja” pod nazivom "Elucidation of the physiological roles of human dipeptidyl peptidase III" (UKF 21/15).
Ili "Razjašnjavanje fiziološke uloge dipeptidil-peptidaze III"

Zahvale

Od srca hvala...

...mojoj majci, ocu, sestri, bratu te cijeloj obitelji što ste cijeli život uz mene u svemu, što ste me odgojili, usmjerili u život te što ste bili podrška i u ovom kotačiću mog obrazovanja jer bez Vas ovo ne bi bilo moguće.. Volim Vas

...najboljim prijateljima Tinu i Šaksonu, na toni proživljenih trenutaka, smijehu do plakanja, na potpori koju se mi pružali tijekom cijelog života u teškim trenucima, razgovorima kad jednostavno nisam imao izlaz, savjetima, a najviše na miru i sreći koju sam našao u Vašem društvu..

...prijateljima Ivi A. i Milji (muško). Ljudi ne znam Vas dugo, a imam osjećaj da Vas znam cijeli život jer vaša potpora, briga, smijeh, veselje te druženja nikad nisu izostajala. Hvala Vam što ste mi olakšali najteže trenutke i što ste me trpili dok sam stalno kukao nešto. Ispričavam se što nekad nisam održao obećanje i što sam izostao s neke cuge ili nekog filma (Star Trek) „jer da to nisam napravio vjerojatno ne bih bio pravi prijatelj“ (Mario Miljanić)..

...Ivani Paradžik i obitelji Paradžik jer ste mi bili podrška u svemu te sam osjećao da imam drugu obitelj..

...prijateljima s faksa koji su uvijek bili tu kada je bilo najpotrebnije, bilo razgovorom, savjetom ili nekim drugim oblikom pomoći. Nadam se da ćemo ostati u kontaktu i nakon ovog putovanja..

...Žani, na pruženoj sreći, potpori te što si me motivirala po pitanju svega, iskreno mislim da si najzaslužnija što sam završio ovaj rad jer si pružila mir koji sam trebao u ključnim trenucima..

...mentorici Mihaeli na podršci, razgovorima, motivaciji, a najviše na strpljenju. Veliko hvala za svo preneseno znanje, a najviše što sam mogao gledati kako uživaš i voliš ono što radiš jer mi je to pružilo motivaciju i približilo me Biokemiji.. Hvala još jednom..

...ekipici iz labosa IRB-a na bezbroj savjeta i pomoći u radu te najbitnije na ugodnoj atmosferi koju ste stvorili..

...mentorici Maršavelski koja mi je olakšala i ubrzala završnicu ovog rada. Hvala od srca...

...ekipici iz Cinestara NZG jer sam bio zatočen s Vama :D

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| SAŽETAK | IX |
| ABSTRACT | XI |
| § 1. UVOD | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED | 3 |
| 2.1. Sustav razgradnje proteina | 3 |
| 2.2. Proteolitički enzimi (peptidaze) | 3 |
| 2.2.1. Uloga peptidaza | 3 |
| 2.2.2. Osnovna podjela | 4 |
| 2.2.3. Metalopeptidaze | 6 |
| 2.3. Dipeptidil-peptidaza III | 7 |
| 2.3.1. Strukturna obilježja i lokalizacija | 7 |
| 2.3.2. Katalitički mehanizam..... | 9 |
| 2.3.3. Aktivacija i inhibicija | 10 |
| 2.3.4. Patofiziološka uloga..... | 11 |
| § 3. MATERIJALI I METODE | 13 |
| 3.1. Materijali | 13 |
| 3.1.1. Kemikalije | 13 |
| 3.1.2. Marker veličine i boje | 13 |
| 3.1.3. Enzimi | 13 |
| 3.1.4. Sintetski supstrati | 13 |
| 3.1.5. Luria-Bertani (LB) hranjive podloge | 14 |
| 3.1.6. Komercijalni kompleti..... | 14 |
| 3.1.7. Sojevi bakterija <i>E. coli</i> | 14 |
| 3.1.8. Punila za kolonu..... | 14 |
| 3.2. Metode rada s nukleinskim kiselinama | 15 |
| 3.2.1. Ciljana <i>in vitro</i> mutageneza | 15 |
| 3.2.2. Kemijska transformacija bakterija XL10-Gold Ultrakompetentnih <i>E. coli</i> | 19 |
| 3.2.3. Izolacija i pročišćavanje plazmida koji sadrže mutaciju | 20 |
| 3.3. Metode rada s bakterijama | 21 |
| 3.3.1. Priprema Luria-Bertani hranjive podloge | 21 |
| 3.3.2. Fizikalna transformacija – elektroporacija | 21 |
| 3.3.3. Početna i glavna kultura za ekspresiju proteina | 22 |
| 3.3.4. Liza i sonikacija bakterijskih stanica..... | 23 |

| | |
|--|-------------|
| § Sadržaj | viii |
| 3.4. Metode rada s proteinima | 24 |
| 3.4.1. Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom | 24 |
| 3.4.2. Završna analiza SDS-gel-elektroforezom | 25 |
| 3.4.3. Odsoljavanje na PD-10 koloni | 27 |
| 3.4.4. Određivanje koncentracije proteina | 27 |
| 3.4.5. Nativna elektroforeza odsoljenog proteina | 28 |
| 3.5. Biokemijska karakterizacija proteina | 29 |
| 3.5.1. Određivanje izoelektrične točke pI | 29 |
| 3.5.2. Određivanje supstratne specifičnosti | 30 |
| 3.5.3. Određivanje specifične aktivnosti | 30 |
| 3.5.4. Određivanje optimalnog pH | 32 |
| 3.5.5. Mjerenje kinetike na fluorimetru | 32 |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 34 |
| 4.1. Mutanti hDPP III: E451K, R638L i R638W | 34 |
| 4.2. Bioinformatička analiza | 34 |
| 4.3. Ekspresija i afinitetno pročišćavanje | 37 |
| 4.4. Analiza mutanata na gelu | 39 |
| 4.4.1. Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE) | 39 |
| 4.4.2. Nativna gel-elektroforeza | 43 |
| 4.5. Koncentracija mutanata hDPP III | 44 |
| 4.6. Izoelektrična točka pI | 47 |
| 4.7. Aktivnost mutanata | 48 |
| 4.7.1. Određivanje supstratne specifičnosti | 48 |
| 4.7.2. Specifična aktivnost s Arg ₂ -2NA | 50 |
| 4.7.3. Optimalna pH vrijednost | 51 |
| 4.7.4. Kinetika na fluorimetru | 52 |
| § 5. ZAKLJUČAK | 58 |
| § 6. LITERATURNI IZVORI | 60 |
| § 7. DODATAK | XIV |
| § 8. ŽIVOTOPIS | XVI |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PREKOMJERNA EKSPRESIJA I BIOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA MUTANATA HUMANE DIPEPTIDIL PEPTIDAZE III IZ ZLOĆUDNIH TUMORA

Goran Pipalović

Dipeptidil-peptidaze III (DPP III) su metalopeptidaze iz porodice M49 koje hidroliziraju dipeptide s N-kraja peptidnih supstrata veličine 3 do 10 aminokiselina. Fiziološka funkcija ove peptidaze nije još do kraja razjašnjena, ali pretpostavlja se da ljudska DPP III osim uloge u završnim koracima razgradnje peptida u stanici ima ulogu i u nekoliko patofizioloških procesa, uključujući razvitak raka. U *cBioPortal* bazi podataka nalaze se sekvencirani uzorci DNA izolirane iz ljudskih tumora te su nađene mutacije u kodirajućoj regiji gena za humanu DPP III. Odabrane su tri mutacije kako bi se ispitaio učinak istih na biokemijska svojstva i aktivnost humane DPP III.

Istraživanje se provodilo na mutantima humane DPP III: E451K, R638L i R638W koji su dobiveni ciljanom *in vitro* mutagenезom ekspresijskih plazmida. Nakon tog slijedila je ekspresija mutanata u bakteriji *E. coli* te njihova izolacija i pročišćavanje afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni. Mutanti su podvrgnuti raznim testovima aktivnosti i mjerenju kinetike te su analizirani nativnom elektroforezom i izoelektričnim fokusiranjem na gelu. Dobiveni parametri za mutante uspoređeni su s onima „divljeg“ tipa.

(62 stranica, 26 slika, 13 tablica, 38 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: Dipeptidil-peptidaza III, kinetika, mutageneza, mutanti, razgradnja proteina, tumori

Mentori: dr. sc. Mihaela Matovina. i doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
 2. izv. prof. dr. sc. Željka Soldin
 3. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
- Zamjena: doc. dr. sc. Morana Dulić

Datum diplomskog ispita: 27. rujna 2018.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

OVEREXPRESSION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF HUMAN DIPEPTIDYL-PEPTIDASE III MUTANTS FOUND IN CANCER

Goran Pipalović

Dipeptidyl peptidases III (DPP III) are members of the M49 metallopeptidase family which hydrolyze dipeptides from the N-termini of 3 to 10 aminoacids long peptides. Their physiological function is not yet fully understood, but it is assumed that the human DPP III, apart from the role in the final steps of peptide degradation in the cell, has the role in several pathophysiological processes, including the development of cancer. The *cBioPortal* database contains sequenced DNA samples isolated from human cancers and mutations in the coding region of the human DPP III gene are found. Three mutations were selected to examine their effect on the biochemical properties and the activity of human DPP III.

The study was performed on human DPP III: E451K, R638L and R638W mutants obtained by site-directed *in vitro* mutagenesis of expression plasmids, followed by the expression of mutants in *E. coli*, and the isolation and purification by affinity chromatography on Ni-NTA column. The mutants were subjected to various activity assays, kinetics measurement, and they were also analysed by native and isoelectric focusing gel electrophoresis. The obtained mutant parameters were compared to those of the wild type.

(62 pages, 26 figures, 13 tables, 38 references, original in croatian language)

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: Degradation of proteins, dipeptidyl-peptidase III, kinetics, mutagenesis, mutants, tumor

Mentors: Dr. Mihaela Matovina, Senior Scientist and Professor, and Dr. Aleksandra Maršavelski, Associate Professor

Reviewers:

1. Dr. sc. Aleksandra Maršavelski, Assoc. Prof.
 2. Dr. sc. Željka Soldin, Assoc. Prof.
 3. Dr. sc. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.
- Substitute: dr. sc. Morana Dulić, Assoc. Prof.

Date of exam: September 27th, 2018.

§ 1. UVOD

Proteini kao biološke makromolekule odgovorne za brojne stanične procese i izgradnju samih stanica nakon određenog vremenskog perioda gube funkciju te ih je potrebno zamijeniti novima. Peptidaze su zaslužne za njihovu temeljitu razgradnju do osnovnih aminokiselina koje se kasnije koriste u translaciji za novu sintezu proteina.¹ Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je cink-ovisna metalopeptidaza iz obitelji M49. DPP III također pripada aminopeptidazama jer odcjepljuje dipeptide s N-kraja supstrata. Kao svaka metalopeptidaza, DPP III sadrži metalni ion, u ovom slučaju cink, koji zajedno s aminokiselinama iz očuvanog motiva HEXXGH čini aktivno mjesto enzima. Najveću aktivnost pokazuje prema supstratima veličine tri do deset aminokiselinskih ostataka.² Cinkov ion Zn^{2+} stvara interakcije s karbonilnim ugljikom supstrata dok glutaminska kiselina (E) iz motiva HEXXGH stvara vodikovu vezu s vodom te time povećava nukleofilnost kisika koji napada karbonilni ugljik supstrata te dolazi do pucanja peptidne veze. U istraživanjima se u reakciju dodaje kobalt Co^{2+} koji u 10-500 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ koncentracijama djeluje kao aktivator, dok neke studije prikazuju da ioni dodanih metala poništavaju djelovanje metalnih kelatora na enzim, međutim isti ioni dodani u većim koncentracijama djeluju inhibitorno.³ Uz vjerojatnu primarnu zadaću u završnoj fazi razgradnje peptida, smatra se da humana DPP III ima i patofiziološku ulogu u važnim biološkim procesima. Osim u neuroendokrinom sustavu te u regulaciji krvnog tlaka humanu DPP III povezuje se i s regulacijom odgovora na oksidativni stres putem Nrf2/Keap1 signalnog puta.^{4,5} Nrf2/Keap1 signalni put kontrolira ekspresiju niza gena koji kodiraju proteine uključene u obranu stanice od oksidativnog stresa čiju transkripciju aktivira Nrf2 transkripcijski faktor.⁶ Pojačana ekspresija humane DPP III zapažena je u tumorskim uzorcima endometrija i jajnika,⁷ a uloga DPP III u aktivaciji Nrf2/KEAP1 signalnog puta mogla bi biti povezana s tumorigenezom pošto je aberantna aktivacija ovog signalnog puta utvrđena u nekim tumorima.⁸ Hast i sur. (2014) su ispitivali učinak mutacija u Keap1 na interakciju s Nrf2 te utvrdili da neki mutanti Keap1 proteina jače vežu Nrf2 od „divljeg“ tipa proteina. Mutanti koje su ispitivali pronađeni su pretraživanjem *cBioPortal for Cancer Genomics* baze podataka gdje se nalaze podaci o mutacijama iz sekvenciranih uzoraka humanih zloćudnih tumora.⁹ U *cBioPortal* bazi se također može naći više od 100 mutacija u

kodirajućoj regiji za humanu DPP III (hDPP III) te je cilj našeg istraživanja bio ispitati biokemijska svojstva nekoliko mutanata da bismo utvrdili da li bi neke od tih mutacija mogle imati ulogu u nastanku raka.

Odabrane su tri mutacije od kojih je jedna u aktivnom mjestu enzima (E451K). Navedena mutacija nađena je u adenokarcinomu prostate, dok su druge dvije nađene u dva različita uzorka karcinoma, ali njima je zahvaćena ista aminokiselina, R638. U uzorku karcinoma pločastih stanica pluća nađena je mutacija R638L, a uzorku adrenkortikalnog karcinoma R638W.¹⁰ Vektor pLATE31 već je sadržavao gen za hDPP III i regiju koja kodira polihistidinski privjesak te su pomoću *in vitro* mutageneze i početnica s izmijenjenim bazama uvedene mutacije na mjestu 451 i 638 u aminokiselinskom slijedu. Vektor je elektroporacijom unesen u bakterijski soj *E. coli* pogodan za prekomjernu ekspresiju proteina odnosno željenih mutanata. Bakterije su zatim sonicirane kako bi se mogao izolirati proteinski sadržaj iz kojeg se kasnije odvaja željene mutante enzima s His-privjeskom afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni. Dobiveni mutanti analizirani su SDS-gel-elektroforezom te pročišćeni i odsoljeni na PD-10 koloni metodom gel-filtracije. Mutantima je određena koncentracija i supstratna specifičnost mjerenjem aktivnosti prema nekoliko različitih dipeptidil-2-naftilamidnih supstrata. Svi mutanti pokazali su najveću aktivnost prema Arg-Arg-2-naftilamidu, kao i „divlji“ tip, te je daljnja biokemijska karakterizacija, testovi aktivnosti, određivanje optimalnog pH, utjecaja metalnih iona i inhibitora na aktivnost te kinetička mjerenja, napravljena na tom supstratu. Kinetički parametri određeni su mjerenjem početne brzine reakcije u ovisnosti o koncentraciji supstrata na fluorimetru. Paralelno s mutantima, testovima aktivnosti bio je izložen i „divlji“ tip hDPP III kako bi izmjereni parametri mutanata mogli biti međusobno uspoređeni.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Sustav razgradnje proteina

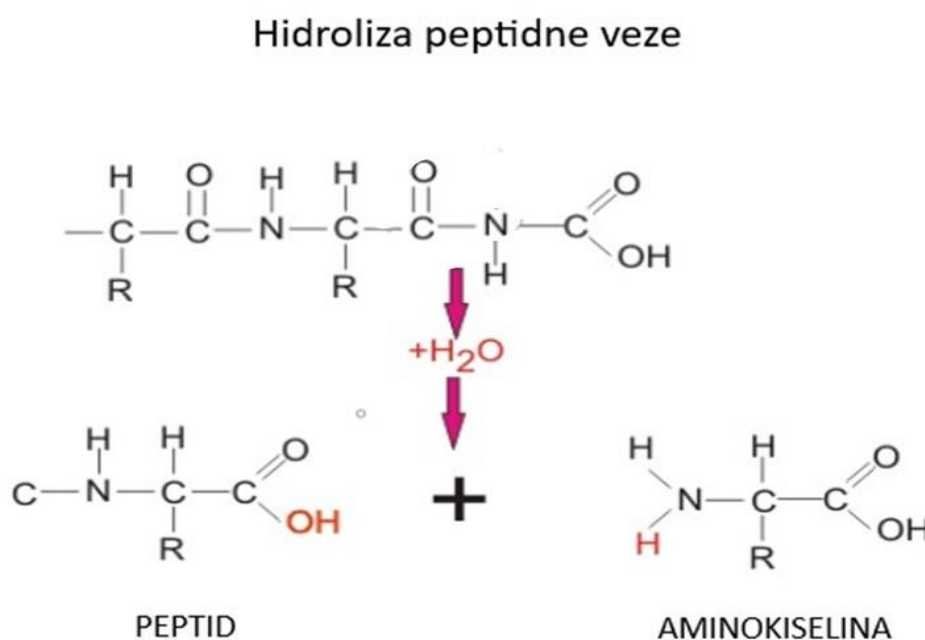
Proteini su organske biomakromolekule građene od aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama. Uključeni su u stanične procese gdje neki kontroliraju ili sudjeluju u metaboličkim putevima dok drugi imaju strukturne i mehaničke funkcije. Proteini se u stanici kontinuirano sintetiziraju i razgrađuju zbog gubitka funkcije ili oštećenja te zbog regulacije staničnih procesa. Unosom hrane u organizam također dolazi do enzimske razgradnje proteina. Razgradnja se odvija sve do osnovnih aminokiselina. Aminokiseline nastale probavom ili razgradnjom najprije se koriste za sintezu novih proteina i nukleotidnih baza, a ostatak aminokiselina koji je nepotreban koristi se kao metaboličko gorivo. Od proteina iz hrane najvažniji su oni koji sadrže esencijalne aminokiseline tj. one koje se ne mogu sintetizirati u organizmu. Početak razgradnje proteina iz hrane započinje u želudcu gdje dolazi do denaturacije proteina pomoću enzima pepsina koji ima mogućnost djelovanja u jako kiselom mediju pri pH 2. Daljnja razgradnja i raspadanje nastavlja se u lumenu crijeva. Enzimi u crijevima razgrađuju denaturirane proteine do manjih peptida ili aminokiselina. Peptide razgrađuju enzimi poput aminopeptidaza koje započinju razgradnju s N-kraja. Proteini koji su izgubili funkciju ili oni oštećeni obilježavaju se vezanjem malog proteina ubikvitina te ih kasnije prepoznaje i cijepa veliki proteazni o ATP-u ovisan kompleks. Taj kompleks naziva se proteasom. Proteasom cijepa proteine na peptide duljine od 3 do 24 aminokiseline.¹

2.2. Proteolitički enzimi (peptidaze)

2.2.1. Uloga peptidaza

Svi proteolitički enzimi koji hidroliziraju peptidnu vezu nazivaju se peptidazama. Oko 2 % od gena koji kodiraju proteine čovjeka, kodira 570 peptidaza i oko 156 inhibitora peptidaza.¹¹ Peptidaze i njihovi inhibitori uključeni su u brojne poznate fiziološke puteve. Međutim mnoge

njihove uloge još nisu razjašnjene te su ta područja još uvijek otvorena za istraživanje. Jedna od glavnih uloga je već navedena razgradnja proteina hidrolizom peptidne veze do osnovnih aminokiselina (slika 1).² Esencijalne aminokiseline unosimo u organizam hranom te se iste koriste u sintezi proteina, koji se kasnije opet razgrađuju te se tako iste zadržavaju u organizmu.¹ Eukariotske peptidaze imaju utjecaj na čitav niz procesa, uključujući replikaciju i transkripciju, odnosno samu ekspresiju proteina. Također sudjeluju u procesima kao što su zgrušavanje krvi, regulacija krvnog tlaka te razne upale. Peptidaze nađene u placenti ukazuju na njihov utjecaj kod ovulacije i razvitka embrija.¹² Brojni eksperimenti pokazali su njihov utjecaj u angiogenezi te u imunom odgovoru na stanični stres,¹³ stoga se na njima provode brojna medicinska i farmaceutska istraživanja.



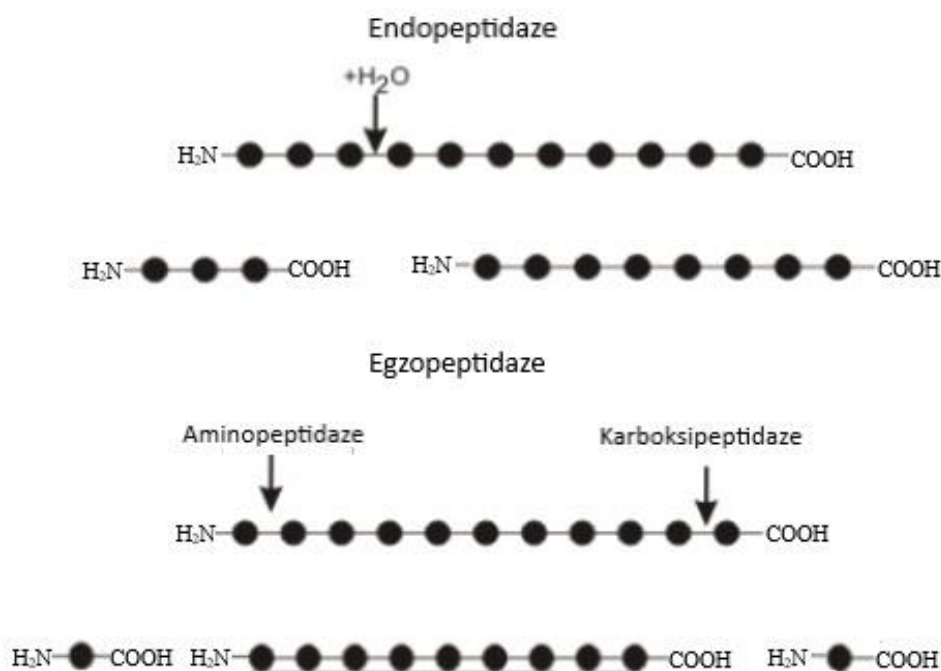
Slika 1. Hidroliza peptidne veze. Preuzeto i prilagođeno iz Biology Dictionary.¹⁴

2.2.2. Osnovna podjela

Peptidaze se klasificiraju prema prirodni aktivnog mjesta te mjestu cijepanja na proteinu. Aktivno mjesto peptidaze je glavni dio enzima gdje dolazi do hidrolize peptidne veze. Ovisno o aminokiselinskom ostatku u aktivnom mjestu, peptidaze dijelimo na cisteinske, treoninske, aspartatne, glutamatne, serinske te metalopeptidaze.² Takva podjela korištena je i u

internetskoj bazi podataka o peptidazama, *MEROPS* (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>). Pretraživanjem baze podataka vidljivo je da najviše ima cisteinskih i metalopeptidaza te nešto manje serinskih.

Prema mjestu cijepanja na proteinu, peptidaze se dijele na egzopeptidaze i endopeptidaze čija je podjela prikazana na slici 2., a ako se peptidna veza cijepa negdje unutar proteina govorimo o endopeptidazama. Peptidaze odgovorne za hidrolizu peptidne veze s kraja polipeptidnog lanca nazivamo egzopeptidazama. Ako se cijepanje događa s N-kraja govorimo o aminopeptidazama, dok karboksipeptidaze cijepaju s C-kraja. Ako aminopeptidaze odcjepljuju dipeptid, nazivaju se dipeptidil-peptidazama. A pri oslobođenju dipeptida s C-kraja riječ je o peptidil-dipeptidazama. Podjele peptidaza su isprepletene jer neke serinske, metalopeptidaze te ostale pronalaze mjesto i u endo- i u egzopeptidazama.²



Slika 2. Podjela peptidaza prema mjestu cijepanja. Preuzeto i prilagođeno iz Barrett A. J., Chen J., Woessner J. F. i Rawlings N. D. (2013).²

2.2.3. Metalopeptidaze

Neki proteini mogu vezati razne metale zbog svoje strukture i broja aminokiselina koje mogu tvoriti razna vezna mjesta za metal. Što je manji radijus iona metala to je jača veza odnosno kompleks protein-metal je stabilniji. Većinom su metalni ioni Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} i Mg^{2+} povezani s katalitičkim aktivnostima nekih proteina. Peptidaze koje u aktivnom mjestu imaju metalne ione nazivaju se metalopeptidazama. Divalentni metali u peptidazama pomažu kod orijentacije supstrata u aktivnom mjestu te mogu sudjelovati u reakcijama oksidacije i redukcije te tako stabilizirati kompleks enzim-supstrat. Također potiču nukleofilni napad molekule vode na peptidnu vezu. Metal unutar peptidazne strukture često je okružen ligandima tj. aminokiselinskim ostacima poput aspartata, glutamata i histidina. Najčešće je potreban jedan divalentni metal u aktivnom mjestu, dok neke peptidaze za aktivnost trebaju dva metala.^{3,6} *MEROPS* baza podataka neprestano raste i zasad je klasificirano oko 102 obitelji i 16 klanova metalopeptidaza. (datum pristupa 14. lipnja 2018.). Značajne su metalopeptidaze obitelji M49 tj. obitelji dipeptidil-peptidaza III čiji članovi sadrže očuvane regije HEXXGH u katalitičkom mjestu te drugu očuvanu regiju EEXRAE/D uključenu u koordinaciju cinka (slika 3).¹⁵

| | HEXXGH | EEXRAE/D |
|------------------------|-----------------------|----------------------|
| <i>H. sapiens</i> | IHELLGHGSGKLFVQDE 465 | YEECRAESVGLYLCLH 521 |
| <i>P. troglodytes</i> | IHELLGHGSGKLFVQDE 465 | YEECRAESVGLYLCLH 521 |
| <i>B. taurus</i> | IHELLGHGSGKLFVQDE 465 | YEECRAESVGLYLCLH 521 |
| <i>R. norvegicus</i> | IHELLGHGSGKLFVQDE 465 | YEECRAESVGLYLCLN 521 |
| <i>M. musculus</i> | IHELLGHGSGKLFVQDE 465 | YEECRAESVGLYLCLN 521 |
| <i>G. intestinalis</i> | IHELFGHETTKLLQESD 458 | EEECKAETTSLHLCTS 510 |
| <i>T. vaginalis</i> | AHELIGHGSGRLLKQKD 442 | YEECRAEETAVYLTFF 495 |
| <i>S. cerevisiae</i> | IHELLGHGSGKLLTEFT 475 | EEECRAEVIAMFLLTN 530 |
| <i>P. stipitis</i> | IHELLGHGSGKLLQETA 463 | EEECRAELVALYLILK 512 |
| <i>T. verrucosum</i> | IHELLGHGTGKLLQETS 529 | YEECRAECVAMALGCD 586 |
| <i>A. benhamiae</i> | IHELLGHGTGKLLQETS 540 | YEECRAECVAMALGCD 597 |
| <i>N. otae</i> | IHELLGHGTGKLLQETS 521 | YEECRAECVAMALGCD 578 |
| <i>A. dermatitidis</i> | IHELLGHGTGKLLQETA 464 | YEECRAECVAMVLGCD 521 |
| <i>A. oryzae</i> | IHELLGHGTGKLLQETA 465 | YEECRAECVAMVLSGD 522 |
| <i>P. graminis</i> | NHELLGHGSGKQLTENK 168 | MEECRAEAVALYLCSN 214 |
| <i>C. cinerea</i> | NHELLGHGSGKLFEEYA 448 | MEECRAEAVALYLVSN 504 |
| <i>S. salar</i> | IHELLGHGSGKLFVQDE 464 | YEECRAECVGLYLCLN 520 |
| <i>N. vectensis</i> | IHELLGHGSGKLFIKKP 474 | YEECRAECVGIYLCLN 530 |
| <i>D. melanogaster</i> | IHELLGHGSGKLFRIDE 521 | YEECRAEAVGLYLSLQ 577 |
| <i>G. morsitans</i> | IHELLGHGSGKLFRIE 459 | YEECRAEAVGLYLSLQ 515 |
| <i>A. aegypti</i> | IHELLGHGSGKLLRVNE 460 | YEECRAEAVGLYLSLN 516 |
| <i>H. saltator</i> | IHELLGHGTGKYFROMG 464 | YEECRAEAVGLYLSLE 520 |
| <i>C. floridanus</i> | IHELLGHGTGKYFKQID 467 | YEECRAEAVGLYLSLE 523 |
| <i>S. mansoni</i> | IHELLGHGSGKLFQMSG 452 | EEECRAECVGIYLCNL 508 |
| <i>D. discoideum</i> | IHELIGHGSGKLFPTDA 446 | MEECRAECCGIYLSPD 505 |
| <i>L. major</i> | IHELLGHGTGKLLSENS 443 | YEECRAEAVSLYLCLL 498 |
| <i>E. histolytica</i> | IHELLGHGSGKYLR-CD 426 | MEECRAEAVGLFLTYN 480 |
| <i>D. donghaensis</i> | IHEVVGHASGQINKGVG 465 | EEGRADLFGLYYLM 493 |
| <i>F. bacterium</i> | IHEVVGHASGQINEGVA 459 | EEGRADLFGLYYLM 487 |
| <i>P. ruminicola</i> | IHECLGHGSGQLLPVD 444 | EEARADLFGLYYIAD 470 |
| <i>S. aurantiaca</i> | IHEVLGHASGQVDRKLG 464 | EEARADLVALWHAFD 494 |

Slika 3. Aminokiselinski slijed humane DPP III poravnat s onima različitih sisavaca i drugih organizama. Preuzeto i prilagođeno iz Prajapati S. C. and Chauhan S. S. (2011).¹⁵

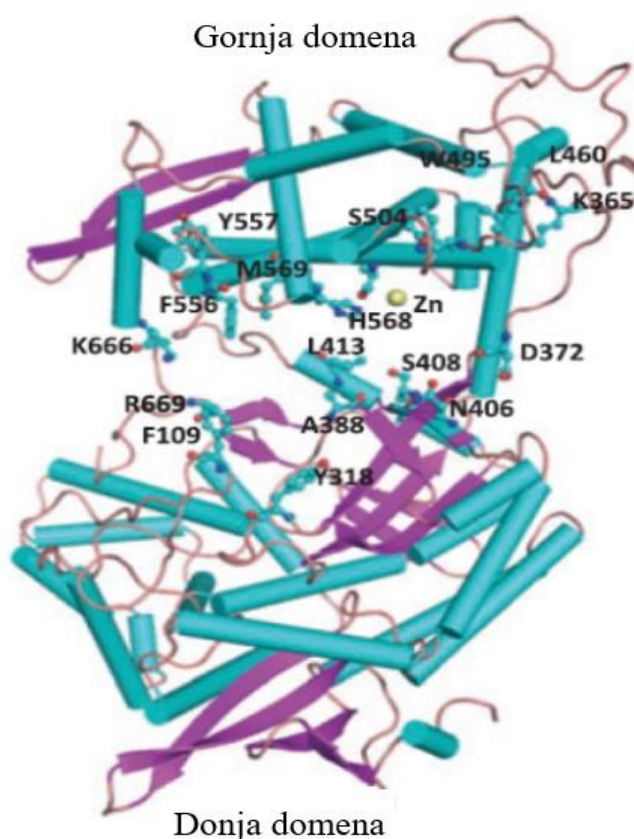
2.3. Dipeptidil-peptidaza III

2.3.1. Strukturna obilježja i lokalizacija

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) prvi put je izolirana i pročišćena iz goveđe hipofize.³ Kao treća pronađena dipeptidil-peptidaza dobila je broj tri u nazivu. Zbog afiniteta prema različitim peptidnim supstratima, naziva se još enkefalinaza B (engl. *enkephalinase B*), angiotenzinaza (engl. *red cell angiotensinase*), dipeptidil-arilamidaza III te dipeptidil-aminopeptidaza III.¹⁶⁻¹⁸ U osnovnoj građi je monomerni enzim molekulske mase od 69-89 kDa ovisno o organizmu, dok kod ljudi, ovisno da li je iz placente ili eritrocita, ona iznosi 82-84 kDa. Od svih dipeptidil-peptidaza koje su dosad otkrivene, jedino DPP III pripada obitelji metalopeptidaza M49, dok ostale dipeptidil-peptidaze uglavnom pripadaju serinskim i

cisteinskim peptidazama. Iz kristalne strukture ljudske DPP III (engl. *human dypeptidyl-peptidase III*, hDPPIII) vidljivo je da sadrži dvije domene, gornju i donju, između kojih se nalazi procijep. Donja domena sadrži α -uzvojnice i β -nabrane ploče, dok je gornja bogata α -uzvojnica (hDPP III, *PDB*: 3fvy; slika 4). U svom katalitičkom ili aktivnom mjestu sadrži dvovalentni kation cinka Zn^{2+} .¹⁹ Kristalna struktura inaktivne forme hDPP III-E451A u kompleksu s opioidnim peptidom tinorfinom pokazala je da se u procijep između domena veže supstrat te da vezanje supstrata uzrokuje zatvaranje enzima.²⁰ Najveći klan metalopeptidaza (MA) ima očuvan katalitički dio HEXXH, a DPP koja je član MA klana ima sličan katalitički motiv HEXXGH. Također očuvana regija kod dipeptidil-peptidaze III je EEXRAE/D gdje druga glutaminska kiselina (E) zajedno s histidinima iz prvog motiva veže cinkov kation. Oba prethodno navedena, očuvana motiva nalaze se u α -uzvojnica gornje domene. U velikom broju slučajeva uvođenjem mutacije unutar tih očuvanih regija gubila se aktivnost enzima. Poravnanjem sekvenci više organizama uključujući i čovjeka utvrđene su očuvane aminokiseline E316, E329, H568, W300, D320, K53, K405, R399, R572, R669 kojima se daljnjim istraživanjem odgonetnula uloga u vezanju i pozicioniranju supstrata za hidrolizu peptidne veze.²¹

Dipeptidil-peptidaza III dosad je pronađena kod mnogih eukariota u različitim tkivima. Unutar stanice prvo je otkrivena kao citosolni enzim, međutim kasnije je još nađena u membrani.^{16,22,23} Nekoliko istraživanja pokazalo je da se neki citosolni proteini kod post-translacijskog modificiranja šalju na membranu.²⁴ Prisutnost DPP III zapažena je i u izvanstaničnim tekućinama.²⁵

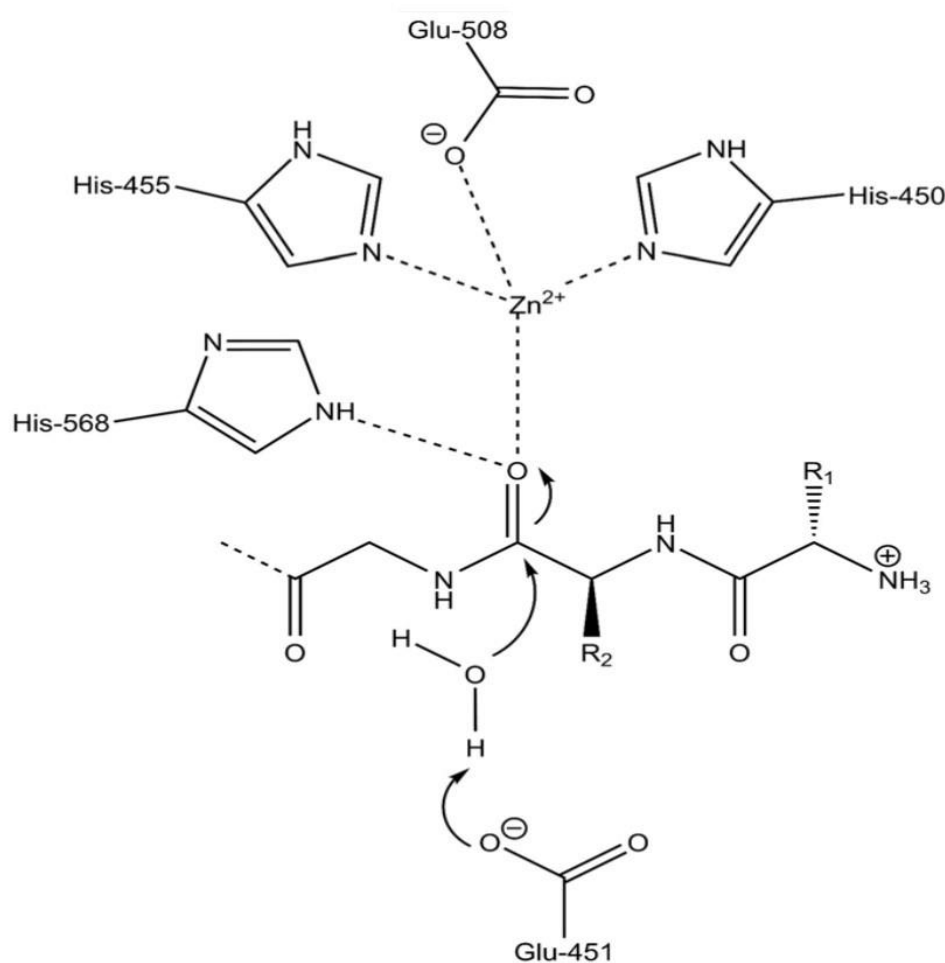


Slika 4. Struktura humane dipeptidil-peptidaze III. Preuzeto i prilagođeno iz Dobrovetsky E., Dong A., Seitova A., Duncan B., Crombet L., Sundstrom M., Arrowsmith C. H., Edwards A. M., Bountra C., Bochkarev A. (2009).¹⁹

2.3.2. Katalitički mehanizam

Dipeptidil-peptidaza III je aminopeptidaza koja odcjepljuje dipeptide s N-kraja supstrata. Najbolju aktivnost pokazuje prema supstratima veličine od tri do deset aminokiselinskih ostataka dok sve ispod ili iznad toga rezultira slabom ili gotovo nikakvom aktivnošću. Kao što je već opisano u prethodnom poglavlju, motiv HEXXGH jako je važan u katalizi enzima. Zn^{2+} ion koji je koordiniran s H460, H465 i E517 u DPP III iz kvasca *Sacharomyces cerevisiae* koja je prototip porodice, odnosno H450, H455 i E508 u hDPP III, stvara interakcije s karbonilnim ugljikom supstrata. U međuvremenu glutaminska kiselina E451 u hDPP III (kod yDPP III E461) stvara vodikovu vezu s vodom koja se nalazi blizu karbonilnog ugljika te se time pojačava nukleofilnost vode odnosno kisika. Povećana nukleofilnost vode uzrokuje nukleofilni napad kisika na karbonilni ugljik te dolazi do pucanja peptidne veze,

odnosno odcjepljenja dipeptida (slika 5). Tijekom nukleofilnog napada, karbonilni kisik stabiliziran je cinkom i histidinom H568, dok je dušik peptidne veze supstrata protoniran tj. stabiliziran istom glutaminskom kiselinom E451 zaslužnom za nukleofilni napad.²¹ Uz samu katalizu važno je pozicioniranje supstrata u aktivnom mjestu tj. važan doprinos imaju i aminokiseline u nastavku supstratnog lanca koje ulaze u interakciju s pojedinim aminokiselinskim ostacima enzima.



Slika 5. Katalitički mehanizam DPP III. Preuzeto i prilagođeno iz Baral P. K., Jajcanin-Jozic N., Deller S., Macheroux P., Abramic M. & Gruber K. (2009).²¹

2.3.3. Aktivacija i inhibicija

Pojedini dvovalentni metali poput Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} i Co^{2+} utječu na aktivnost DPP III. Smatra se da ioni metala uz već vezani cink u aktivnom mjestu reaktiviraju enzim odnosno mogu utjecati na konformaciju pojedinih aminokiselina unutar lanca enzima dovodeći ga u

povoljan položaj za katalizu. Također se pretpostavlja da navedeni ioni mogu zamijeniti cink u aktivnom mjestu. Istraživanja su pokazala da ioni metala mogu ublažiti ili poništiti djelovanje kelatora metalnih iona koji djeluju inhibitorno na enzim. Npr. Co^{2+} koji od navedenih ima najveću moć reaktivacije te Mg^{2+} i Ca^{2+} ioni ublažavaju djelovanje EDTA inhibitora.¹⁶

Ispitivanjem aktivnosti hDPP III prema nizu sintetskih supstrata, dipeptidil-naftilamida, utvrđeno je da pokazuje najveću aktivnost prema Arg-Arg-2-naftilamidu ($\text{Arg}_2\text{-2NA}$). U *in vitro* uvjetima hDPP III ima afinitet i pokazuje aktivnost prema bioaktivnim peptidima, angiotenzinima te opijatnim peptidima, enkefalinima i endrofinima,¹⁵ međutim još uvijek nije dokazano da su oni fiziološki supstrati hDPP III. Kao što je već ranije spomenuto, veličina supstrata odnosno peptida jako je važna te je optimalan broj aminokiselinskih ostataka tri do deset. Širok raspon supstrata također prati velik broj inhibitora za koje enzim ima veći afinitet pa je procesiranje peptida usporeno ili potpuno zaustavljeno. Također je utvrđeno da aktivatori u velikim koncentracijama inaktiviraju enzim. Brojni inhibitori serinskih i cisteinski peptidaza inhibiraju DPP III te se na početku mislilo da zbog toga pripada serinskim proteazama. Međutim dosta istraživanja s inhibitorima poput β -merkaptetoetanolom, EDTA ili 1,10-fenantrolinom (kelatori metala) ukazalo je na njihovo pripadanje metalopeptidazama.^{26,27}

2.3.4. Patofiziološka uloga

Smatra se da hDPP III, koja je pronađena u gotovo svim tkivima, osim uloge razgradnje proteina, ima i regulatornu ulogu u nekim važnim fiziološkim procesima poput regulacije krvnog tlaka te regulacije boli.^{4,5} Značajno povećanje srednje specifične aktivnosti DPP III zabilježeno je kod zloćudnih tumora jajnika (epitela i metastatskog podrijetla), ali ne u benignim tumorima jajnika, u usporedbi s aktivnošću u normalnom tkivu. Aktivnost hDPP III u zloćudnom tumorskom tkivu jajnika bila je tri puta, dok kod metastaza tri i pol puta veća u odnosu na aktivnost u zdravom tkivu.⁷ Novija istraživanja povezuju hDPP III i s obranom od oksidativnog stresa.

Prekomjerna ekspresija hDPP III ublažava štetni utjecaj vodikovog peroksida na stanicu preko aktivacije transkripcije gena kontroliranih Nrf2 transkripcijskim faktorom.⁶ Nrf2 je jedan od glavnih aktivatora ekspresije enzima koji sudjeluju u obrani od oksidativnog stresa.

Kad je aktivan kontrolira ekspresiju oko 200 gena. U normalnim uvjetima nalazi se u citosolu gdje je vezan na protein KEAP1, odnosno na njegovu Kelch domenu Nrf2 je vezan na 2 Keap1 proteina putem dva motiva, ETGE koji ima veći afinitet i DLG koji ima manji afinitet vezanja na Kelch domenu. U uvjetima oksidativnog stresa, Nrf2 se oslobađa iz kompleksa s KEAP1 te dolazi do njegove translokacije u jezgri gdje aktivira transkripciju niza gena koji kodiraju detoksifikacijske proteine uključene u obranu stanice od oksidativnog stresa. Otkriveno je da se na Kelch domenu KEAP1 proteina mogu vezati i drugi proteini koji, poput Nrf2 imaju ETGE motiv, a jedan od tih proteina je i hDPP III. Pomoću Western blotting-a dokazano je povezivanje hDPP III u kompleks sa KEAP, dok delecija ETGE motiva u DPP III uzrokuje gubitak interakcije s KEAP1. Pokusima je ustanovljeno da se Nrf2 i DPP III „natječu“ za vezanje na KEAP1 te da proteini poput DPP III vezanjem na KEAP1 doprinose povećanoj aktivnosti Nrf2 u tumorskim tkivima.⁸

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Etanol, klorovodična kiselina, kobaltov (II) klorid (CoCl_2), metanol, natrijev hidroksid (NaOH), natrijev klorid (NaCl), octena kiselina – *Kemika*; Izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG), ampicilin (Amp) – *Fermentas*; *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin (TEMED) – *Serva*; Akrilamid/bisakrilamid, β -merkaptetoetanol, amonijev persulfat (APS), glicin, agar, agaroz – *GE Healthcare Amersham Biosciences*; Fast Blue BN (FBB), natrijev dodecilsulfat (SDS), trikloroctena kiselina (TCA), Tween 80, imidazol, Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris), glicerol – *Sigma*.

3.1.2. Markeri veličine i boje

PageRuler Prestained Protein Ladder – *Bio Rad*; HMW (engl. *High Molecular Weight*) marker; marker za izoelektrično fokusiranje *Broad pI Kit pH 3-10* – *GE Healthcare Amersham Biosciences*; Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) – *GE Healthcare Amersham Biosciences*; Phast Gel Blue R – *Pharmacia*.

3.1.3. Enzimi

Lizozim, deoksiribonukleaza I (DNaza I) – *Sigma*; restrikcijski enzim *DpnI* – *NEB*; *Pfu* DNA-polimeraza – *Fermentas*.

3.1.4. Sintetski supstrati

Diarginil-2-naftilamid (Arg-Arg-2NA), alanil-arginil-2-naftilamid (Ala-Arg-2NA), glicil-arginil-2-naftilamid (Gly-Arg-2NA), fenilalanil-arginil-2-naftilamid (Phe-Arg-2NA), prolinil-arginil-2-naftilamid (Pro-Arg-2NA), alanil-alanil-2-naftilamid (Ala-Ala-2NA), glicil-fenilalanil-2-naftilamid (Gly-Phe-2NA), glicil-prolinil-2-naftilamid (Gly-Pro-2NA), histidil-

seril-2-naftilamid (His-Ser-2NA), histidil-fenilalanil-2-naftilamid (His-Phe-2NA), lizil-alanil-2-naftilamid (Lys-Ala-2NA) – *Bachem*.

3.1.5. *Luria-Bertani (LB) hranjive podloge*

Tekući LB medij: kvaščevo ekstrakt, natrijev klorid (NaCl), baktotripton

Kruti LB medij: kvaščevo ekstrakt, natrijev klorid (NaCl), baktotripton, agar.

3.1.6. *Komercijalni kompleti*

QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit – *Agilent* za ciljanu *in vitro* mutagenezu, *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* – *Qiagen* za izolaciju i pročišćavanje plazmida iz bakterija.

3.1.7. *Sojevi bakterija E. coli*

XL10-Gold – iz *QuikChange Kit*-a kemijski ultrakompetentne stanice za *in vitro* mutagenezu,

BL21-CodonPlus(DE3)RIL – elektrokompetentne stanice za prekomjernu ekspresiju proteina.

3.1.8. *Punila za kolonu*

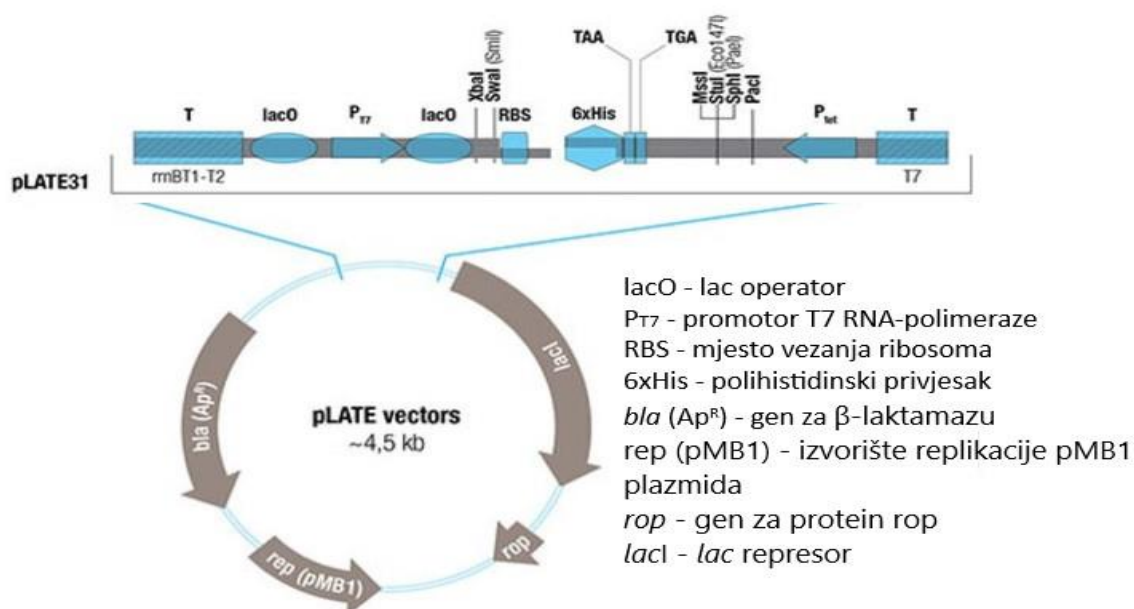
Kolona za afinitetnu kromatografiju: Ni-NTA agarozna – *Qiagen*; kolona za gel-filtraciju *PD-10 Desalting Column: Sephadex G-25* punilo – *GE Healthcare Amersham Biosciences*.

3.2. Metode rada s nukleinskim kiselinama

3.2.1. Ciljana in vitro mutageneza

Sekvenciranjem uzoraka zloćudnih tumora čovjeka nađeno je više od 100 mutacija u kodirajućim regijama proteina DPP III. Odabrali smo 3 mutacije od kojih je jedna na 451. mjestu gdje se glutaminska kiselina zamjenjuje lizinom (E451K). Ova mutacija je zanimljiva jer se nalazi u aktivnom mjestu hDPP III. Također su uvedene mutacije na 638. mjestu gdje je aminokiselina arginin zamijenjena leucinom (R638L) ili triptofanom (R638W).

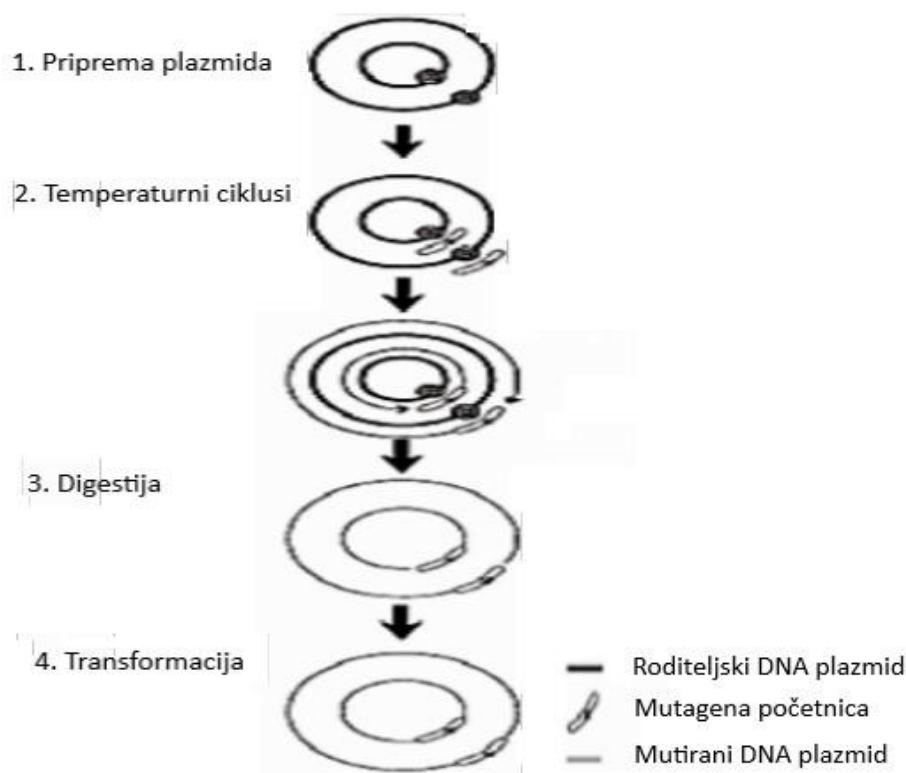
Korišten je pLATE31 vektor koji sadrži elemente T7 bakteriofaga za prekomjernu heterolognu ekspresiju proteina od interesa. Gen za humanu DPP III bio je ugrađen u vektor te je ekspresija pod kontrolom snažnog T7-promotora. Također u regulaciji sudjeluje *lacI* odnosno *lac* represor koji sprječava „cureću“ ekspresiju tako što se veže na *lac* operator te potiskuje transkripciju gena za T7 RNA-polimerazu u genomu domaćina (*E. coli* BL-21) te time i transkripciju gena našeg proteina. Međutim dodatkom izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG-a) inducira se ekspresija T7 RNA-polimeraze koja transkribira gen od interesa, koji se kasnije na ribosomu translata i dolazi do nastanka željenog proteina.²⁸ Također sadrži i regiju koja kodira polihistidinski privjesak na C-kraju (slika 6).



Slika 6. Komponente pLATE31 vektora. Preuzeto i prilagođeno iz Thermo Fisher Scientific: Cloning & Expression System.²⁹

Ciljana *in vitro* mutageneza je vrsta mutageneze kojom se mutacija uvodi na točno određeno mjesto u genu. Gen za protein je potrebno klonirati u vektor (pLATE31) te se pomoću početnica (oligonuklotida) koje sadrže mutaciju i DNA-polimeraze pokrene lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Međutim to nije pravi PCR jer je umnažanje u ovom slučaju linearno, a ne eksponencijalno kao kod pravog. Ovdje novosintetizirani lanci ne mogu poslužiti kao kalup u daljnjim elongacijskim ciklusima zbog ureza.³⁰

Zatim se provede digestija s restriktivnim enzimom *DpnI* te se pocijepa metilirana, nemutirana DNA (kalup). Ostaje samo DNA koja sadrži mutaciju te se ubacuje u bakterijske stanice gdje se replicira i popravlja urez (slika 7).



Slika 7. Ciljana *in vitro* mutageneza. Preuzeto i prilagođeno iz QuikChange® site-directed mutagenesis method.³⁰

Sva tri mutanta: hDPP III-E451K, hDPP III-R638L i hDPP III-R638W pripremljena su na isti način (u nastavku). U vektor pLATE31 već je bio ugrađen gen za humanu DPP III. Korištena je *Pfu* DNA-polimeraza koja ima visoku točnost sinteze jer posjeduje 3'→5' egzonukleaznu aktivnost tj. izrezuje krivo ugrađene nukleotide lanca kćeri u 3'→5' smjeru tijekom elongacije. Za mutagenezu korišten je *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* od *Agilent-a*. Početnice F/R (engl. *Forward/Reverse*) su konstruirane prema uputama iz kita i naručene od *Macrogena-a* (tablica 1). Pripremljen je 100 μmol dm⁻³ štok i napravljeno 10 μmol dm⁻³ razrijeđenje. Također uz vektor i DNA-polimerazu u reakcijsku smjesu dodana je mješavina svih deoksiribonukleotida (dNTP), pufer koji je pogodan za reakciju te mutirane početnice koje sadrže izmijenjenu bazu na odgovarajućem mjestu (tablica 2). Važno je da se napravi i negativna kontrola gdje se dodaje sve osim DNA-polimeraze. Volumen reakcijske smjese je 25 μL te smo u negativnoj kontroli umjesto DNA-polimeraze dodali taj volumen mQ H₂O. PCR je izveden prema programu iz tablice 3.

Tablica 1. Konstruirane početnice za mutagenezu (crvenom bojom su obilježene mutirane baze).

| Početnica | GC (%) | T _m / °C | Nukleotidni slijed 5'→3' |
|-------------------|--------|---------------------|---|
| DPP III-E451K (F) | 69,7 | 86,6 | CAGGTGGGCCTGCAC <u>A</u> AGCTGCTGGGCCATGGC |
| DPP III-E451K (R) | 69,7 | 86,6 | GCCATGGCCCAGCAGCT <u>T</u> GTGCAGGCCACCTG |
| DPP III-R638L (F) | 71 | 85,6 | GATGTGGCCGGAGGG <u>C</u> TGGCCCTGTACGAGG |
| DPP III-R638L (R) | 71 | 85,6 | CCTCGTACAGGG <u>C</u> <u>A</u> GCCCTCCGGCCACATC |
| DPP III-R638W (F) | 71 | 85,6 | GATGTGGCCGGAGGG <u>T</u> GGGCCCTGTACGAGG |
| DPP III-R638W (R) | 71 | 85,6 | CCTCGTACAGGG <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> CCCTCCGGCCACATC |

Tablica 2. Smjesa za mutagenezu i negativnu kontrolu.

| | Mutageneza | Neg. kont. |
|--|------------------|------------------|
| mQ H ₂ O | 14,1 | 14,6 |
| 10x rxn buffer | 2,5 | 2,5 |
| dNTP mix | 0,5 | 0,5 |
| Quik sol. Reagent | 1,5 | 1,5 |
| 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ primer-F | 0,7 | 0,7 |
| 10 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ primer-R | 0,7 | 0,7 |
| 10 ng μl^{-1} pLATE-hDPPIII | 5 | 5 |
| <i>Pfu</i> ultra | 0,5 | / |
| V_{uk} | 25 μL | 25 μL |

Tablica 3. PCR program.

| Temperatura | Vrijeme | Br. ciklusa |
|-------------|----------|-------------|
| 95 °C | 1 min | 1 |
| 95°C | 50 s | |
| 60 °C | 50 s | 18 |
| 68 °C | 8 min | |
| 68 °C | 7 min | 1 |
| 16 °C | ∞ | / |

Nakon PCR-a smjesa je tretirana s 0,5 μL *DpnI* restrikcijskog enzima koji cijepa metiliranu DNA (roditeljska DNA koja ne nosi mutaciju) te ostaje samo mutirana DNA koja sadrži urez. Reakcijska smjesa se inkubirala 60 minuta na 37 °C u termobloku.

3.2.2. Kemijska transformacija bakterija XL10-Gold Ultrakompetentnih *E. coli*

Bakterije *E. coli* XL10-Gold koje su kemijski kompetentne koriste se zbog povećane učinkovitosti transformacije ligiranih ili velikih DNA molekula. XL10-Gold stanicama nedostaju svi poznati restriksijski sustavi te nedostaju endonukleaze EndA i imaju manjak proteina RecA čime se osigurava stabilnost inserta.

Bakterije *E. coli* XL10-Gold čuvaju se u zamrzivaču na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. U alikvote po $25\text{ }\mu\text{L}$ XL10-Gold stanica dodali smo $0,9\text{ }\mu\text{L}$ β -merkaptoetanol (ME), lagano izmiješali i inkubirali na ledu 10 minuta. Zatim je nakon inkubacije u jedan alikvot dodano $0,9\text{ }\mu\text{L}$ *DpnI*-tretiranih PCR-reakcija, a u drugi alikvot $0,9\text{ }\mu\text{L}$ *DpnI*-tretirane negativne kontrole te se inkubiraju 30 minuta na ledu. Smjese s XL10-Gold stanicama i *DpnI*-tretiranim reakcijama izložene su toplinskom šoku 30 sekundi na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ i prebačene na led 2 minute. Zatim je na bakterijske stanice dodano $0,5\text{ mL}$ zagrijanog LB (*Luria Bertani*) medija ($0,5\text{ mL}$ LB + $10\text{ }\mu\text{L}$ glukoze ($w = 20\%$) + $12,5\text{ }\mu\text{L}$ $0,5\text{ mol dm}^{-3}$ MgCl_2) te je provedena inkubacija 60 minuta pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ na termobloku (400 rpm). Transformirane stanice su lagano centrifugirane nakon čega je uzeto po $250\text{ }\mu\text{L}$ suspenzije te se razmazano po LB medij s ampicilinom (LB + Amp) pločama. Na jednu ploču su nasadene bakterije koje bi trebale sadržavati plazmid s mutiranim genom i otpornošću na ampicilin dok su na drugu ploču nasadene bakterijske stanice koje su transformirane negativnom kontrolom (nema otpornosti na ampicilin jer *DpnI* je pocijepao svu roditeljsku DNA plazmida koja sadrži gen za otpornost *bla*). Dan kasnije na ampicilinskoj ploči narasle su kolonije bakterija dok na negativnoj kontroli nije došlo do bakterijskog rasta odnosno antibiotik je djelovao. U epruvete za uzgoj bakterija od 12 mL dodano je 4 mL LB medija s $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilina te je ezom po jedna kolonija prenesena u epruvete. Kulture su uzgajane na tresilici pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći.

3.2.3. Izolacija i pročišćavanje plazmida koji sadrže mutaciju

Za izolaciju i pročišćavanje se koristi komercijalno dostupni komplet *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* koji koristi visoku membransku tehnologiju na bazi silicijevog dioksida u obliku prikladne kolone za vezanje plazmidne DNA te omogućava brzo izoliranje plazmidne DNA visoke čistoće. Učinkovitost prinosa je i do 20 µg plazmidne DNA.

Izolaciju smo radili prema protokolu iz kompleta. Ukratko, iz epruveta su pipetom prebačene bakterije u tubicu i centrifugirane 2 minute na 8 000 rpm, supernatant se baca, a talog je resuspendiran u 250 µL pufera za resuspenziju (engl. *Resuspension Solution*). Dodano je 250 µL pufera za lizu (engl. *Lysis Solution*) te je otopina promiješana okretanjem tubice 6-8 puta. (Napomena: ne smije proći više od 5 minuta). Zatim je u svaku reakciju otpipetirano po 350 µL pufera za neutralizaciju (engl. *Neutralization Solution*) te centrifugirano 1 minutu na 13 000 rpm. Supernatant je prebačen u kolonicu za pročišćavanje (*GeneJet spin column*), centrifugiran 1 minutu na 13 000 rpm. Na kolonicu je dodano je 500 µL pufera za ispiranje (engl. *Wash Solution*). Centrifugirano je 1 minutu na 13 000 rpm. Pufer za ispiranje dodan je još jednom i centrifugiranje se ponovilo. I još jednom je ponovljeno centrifugiranje 1 minutu na 13 000 rpm na „suho“ bez pufera za ispiranje kako bi se otklonio etanol. Zatim je gornji dio *GeneJet spin* kolone prebačen na običnu tubicu i dodano je oprezno na membranu 50 µL pufera za eluciju (engl. *Elution Buffer*) kako bi eluirali plazmid. Kolonice smo inkubirali 2 minute na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirali 2 minute na 13 000 rpm. Nakon izolacije plazmida, odredili smo njegovu koncentraciju i čistoću na mikrovolumnom spektrofotometru BioDrop-u.

3.3. Metode rada s bakterijama

3.3.1. Priprema Luria-Bertani hranjive podloge

Kruta i tekuća, hranjiva podloga *Luria-Bertani* (LB) koristi se za transformaciju i uzgoj bakterijskih stanica. Pripremljeni medij steriliziran je u autoklavu pri tlaku od 1,5 atmosfera i temperaturi od 121 °C. Nakon sterilizacije dodan je antibiotik koji će ubiti bakterije koje nisu uspješno transformirane plazmidom koji uz gen za željeni protein sadrži i gen za otpornost na antibiotik. Kruta podloga, koja se izlijeva u petrijeve zdjelice, koristili smo za nasađivanje transformiranih bakterija, dok smo tekući medij koristili za uzgoj kulture za izolaciju plazmida te početne i glavne kulture bakterija za ekspresiju proteina. Kruta podloga sadrži i agar dok ta komponenta tekućem mediju nedostaje. Komponente su dodane prema tablici 4.

Tablica 4. Sastav *Luria-Bertani* hranjive podloge za volumen od jedne litre.

| | Kruta LB hranjiva podloga | Tekući LB medij |
|------------------|---------------------------|-----------------|
| Kvašćev ekstrakt | 5 g | 5 g |
| Natrijev klorid | 5 g | 5 g |
| Baktotripton | 10 g | 10 g |
| Agar | 15 g | - |

3.3.2. Fizikalna transformacija – elektroporacija

Elektroporacija je visoko učinkovita fizikalna metoda unosa strane DNA u stanice koje se izlože kratkom, jakom elektro-šoku koji traje do 5 ms. Elektro-šok izaziva otvaranje pora na membrani stanica, gdje prolazi DNA koja se želi ubaciti u stanice. Bitno je da se stanice ne izlože dužem elektro-šoku jer isti može ubiti bakterije.³¹ Transformiraju se BL21-CodonPlus(DE3)-RIL bakterijske stanice *E. coli*. Slično kao i kod XL10-Gold, BL21 ne sadrži gene *endA* koji kodiraju endonukleazu I koja može brzo degradirati ubačeni plazmid. Ne posjeduju proteaze OmpT i Lon te su manje osjetljive na degradaciju proteina.

Elektroporacijom smo krenuli u ekspresiju proteina koja se odvija u nekoliko koraka/dana. U tubicu smo otpipetirali 30 μL BL21-CodonPlus(DE3)-RIL stanica i 1 μL mutiranog plazmida. Smjesa je prebačena u kivetu za elektroporaciju (kiveta mora biti hladna, drži se u zamrzivaču). Kiveta je postavljena u elektroporator te je kratkim pritiskom tipke *Pulse* pokrenut kratki elektro-šok. Nakon elektroporacije transformirane stanice prebačene su u tubice od 1,5 mL, dodano im je 0,5 mL SOC medija koji je prethodno zagrijan na 37 °C jer je izrazito bitan za njihov oporavak od šoka. Tubice sa stanicama inkubirane su 60 minuta pri 37 °C na tresilici. Stanice su nakon sat vremena centrifugirane 2,5 minute na 4 000 rpm. Oprezno smo uklonili oko 300 μL supernatanta, a ostatak od oko 250 μL bakterijskih stanica nanoseno je na ampicilinsku ploču gdje ih se ravnomjerno razmaže.

3.3.3. Početna i glavna kultura za ekspresiju proteina

U Erlenmayerovu tikvicu koja je prethodno autoklavirana dodali smo 15 mL LB medija i 15 μL ampicilina (100 mg mL⁻¹) te je konačna koncentracija ampicilina u mediju bila 100 μg mL⁻¹. Potom je s petrijevke ezom prenesena jedna kolonija u tikvicu. Starter kultura u tikvici prebačena je na tresilicu pri 37 °C preko noći. U 500 mL autoklaviranog LB medija dodali smo 500 μL ampicilina i 10 mL starter kulture. Glavna kultura uzgajana je pri 37 °C u tresilici na 220 rpm. Tijekom uzgoja mjerena je optička gustoća stanica pri 600 nm (engl. *Optical density*, OD₆₀₀) tj. praćen je rast bakterija. Kako rastu bakterije tako će rasti i apsorbancija. Optimalna gustoća stanica za indukciju sinteze proteina je pri OD₆₀₀ od oko 0,6. Apsorbancija se mjeri na UV-VIS spektrofotometru. Kad je OD₆₀₀ postigao približnu vrijednost 0,6, kulture se ohlade oko pola sata u ledenici te je od svake otpipetiran alikvot od 1 mL za analizu na gelu. Alikvoti su centrifugirani 5 minuta na 10 000 rpm. Supernatant je bačen, a talog resuspendiran s 100 μL mQ H₂O i pohranjen na -20 °C. Nakon 30 minuta u ledenici u svaku kulturu dodali smo 125 μL 1 mol dm⁻³ IPTG-a (izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozida). Kulture su inkubirane na tresilici (130 rpm) na 18 °C preko noći. Nakon inkubacije te uzgoja, kulture su centrifugirane na 6 000 rpm 20 minuta, supernatant je uklonjen, a talozi zamrznuti na -20 °C.

3.3.4. Liza i sonikacija bakterijskih stanica

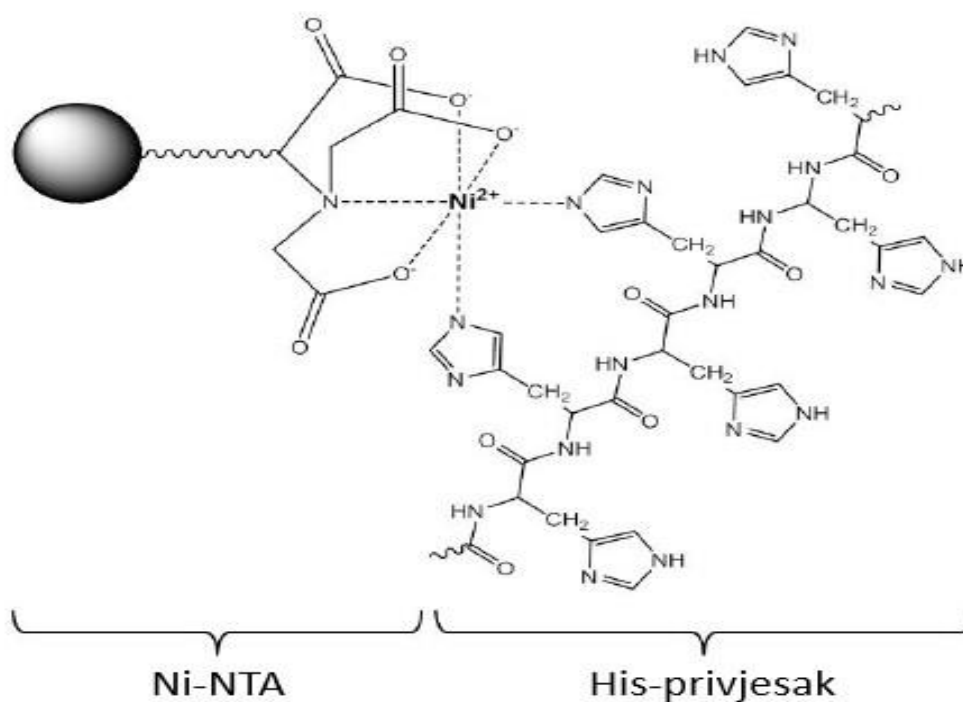
Liza stanica se odvijala dodatkom pufera za lizu (engl. *Lysis buffer*) koji se koristi za razbijanje bakterijskih stanica. Sadrži soli (npr. Tris HCl ili EDTA) za regulaciju kiselosti kako bi se razbila membranska struktura. Također, pufer se može koristiti za razbijanje životinjskih i biljnih stanica. Dodaje se i enzim lizozim koji pripada glikozid-hidrolazama. Lizozim djeluje napadajući peptidoglikan koji je jedna od glavnih komponenti u staničnom zidu bakterije te ga tako oštećuje.¹ Sonikacija je ultrazvučna metoda koja razbija citoplazmatske membrane i stanične stijenke djelovanjem zvučnih valova visoke frekvencije.

Na 1 gram bakterijskog taloga dodali smo 5 mL pufera za lizu. Otopili smo sav bakterijski talog i dobro resuspendirali smjesu, dodali 60 μL lizozima (100 mg mL^{-1}) te ih inkubirali na ledu 30 minuta. Nakon inkubacije stanice su podvrgnute sonikaciji na sonikatoru Ultrasonic processor (*Sigma*). Sonikacija se odvijala pri sljedećem programu: *Amplituda* 40, *Timer* 3 minute i *Pulser* 10 sekundi. Uzorci su dalje tretirani s 6 μL deoksiribonukleaze I 20 minuta na tresilici (300 rpm) pri sobnoj temperaturi. Od uzoraka je uzet volumen od 100 μL i centrifugiran 30 minuta na 13 000 rpm. Supernatant je odvojen i označen sa SL (stanični lizat), a talog resuspendiran s 90 μL mQ H₂O i označen s T (talog). SL i T su kasnije također analizirani na gelu. Ostatak sonicirane smjese prebačen je u plastične epruvete za centrifugiranje. Kada su svi uzorci uravnoteženi, stavljeni su u Sorval RC-5B centrifugu (rotor SS-34) 40 minuta na 11 000 rpm (oko 10 000 g). Supernatant je prebačen u špricu kojoj se na dnu pričvrsti okrugli, plastični filter te je filtrat sakupljen u epruvetu.

3.4. Metode rada s proteinima

3.4.1. Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom

Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom (engl. *Immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC) je metoda koja se koristi za izolaciju, pročišćavanje i analizu bioloških spojeva. Na pLATE31 vektoru kodirajuća regija za histidine nalazi se nizvodno od mjesta gdje se ugrađuje naš protein pa se nakon ekspresije fuzijskog proteina, polihistidinski (His₆) privjesak nalazi na C-kraju proteina. Kolona se napuni agaroznim matriksom na koji je vezana Ni²⁺- nitrilotrioctena kiselina (engl. Ni²⁺- *nitrilotriacetic acid*, Ni-NTA). U ovoj metodi nikel je imobilizirani metalni ion na kojeg su vezane četiri nitrilotrioctene kiseline (NTA), a na preostala dva ligandna mjesta veže se polihistidinski privjesak s fuzijskog proteina (slika 8). Kad je filtrirani stanični lizat dodan na kolonu, svi proteini prolaze kroz kolonu osim željenog fuzijskog proteina koji zaostaje na koloni jer se His-privjesak veže za Ni²⁺. Na kraju se pomoću pufera za eluiranje (engl. *Elution Buffer*) koji sadrži veću koncentraciju imidazola fuzijski protein otpušta s kolone. Imidazol se snažnije veže na nikel pa istiskuje histidin te se tako fuzijski protein odvaja s kolone.³²



Slika 8. Odvajanje fuzijskih proteina s His-privjeskom na Ni-NTA koloni. Preuzeto i prilagođeno iz Research Gate Affinity chromatography: Principles and applications.³³

Na dnu kolone dodano je malo staklene vune kako Ni-NTA agarozu ne bi prošla kroz kolonu. Za izolaciju proteina iz 500 mL kulture uzeli smo 1,8 mL Ni-NTA agaroze. Kad se kolona slegla dodano je više puta po 5 mL mQ H₂O (ukupno 20 mL), te je pumpa podešena da protok bude 1 mL min⁻¹. Nakon mQ H₂O dodano je ukupno 20 mL pufera za lizu. Kad je kolona spremna na nju je dodan filtrirani stanični lizat, pumpa je postavljena da protok bude 0,5 mL min⁻¹. Sakuplja se nevezana frakcija (engl. *Flow through*, FT). Kad je sakupljen sav FT, kolona je ispirana s 6x1 mL pufera za ispiranje, frakcije su sakupljane u tri tubice od 2 mL (W₁, W₂ i W₃). Za vrijeme ispiranja protok je bio 1 mL min⁻¹. Nakon ispiranja, eluiranje fuzijski protein sa 5x1 mL pufera za eluiranje (0,5 mL min⁻¹). Skupljene su eluirane frakcije po 0,5 mL u tubice od 1,5 mL (E₁-E₁₀). Na kraju je dodano još 2 mL pufera za završno ispiranje (engl. *End Wash*). Kolona je zatim isprana s 20 mL mQ H₂O i 20 mL etanola (*w* = 20 %) u kojem se ista čuva. Sakupljenim frakcijama određena je koncentracija na BioDrop-u.

3.4.2. Završna analiza SDS-gel-elektroforezom

SDS-gel-elektroforeza (engl. *Sodiumdodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) je vrsta poliakrilamidne gel elektroforeze. SDS-PAGE je najčešće korištena elektroforetska metoda za analizu proteina. Natrijev dodecilsulfat (SDS) denaturira i disocira proteine na pojedinačne lance polipeptida. 1 gram proteina može vezati oko 1,4 grama SDS-a te se tako prikriva naboj polipeptida. Tada naboj po jedinici mase postaje približno konstantan, te razdvajanje polipeptidnih lanaca ovisi samo o njihovoj molekularnoj masi.³⁴

Gel se sastoji od gela za razdvajanje, koji je prvi napravljen pa je zatim na njega izlivena smjesa gela za sabijanje (tablica 5 i 6). Uzorcima je prije nanošenja na gel dodan 2XTB pufer s β-merkaptioetanolom za nanošenje na gel (0,125 mol dm⁻³ Tris-HCl pH 6,8, 0,14 mol dm⁻³ SDS, glicerol (*w* = 20 %), β-merkaptioetanol (*w* = 2 %), 0,03 mol dm⁻³ bromfenol plavo) i zagrijani su na termobloku 10 minuta na 98 °C. Gel koji se sastoji od gela za sabijanje i gela za razdvajanje ostavljen je u staklu i postavljen u plastičnu kadu za gel-elektroforezu te je dodan pufer za elektroforezu. Na uređaju je podešena voltaža na 120 V i pokrenuta elektroforeza, kad uzorci iz jažica uđu u gel povećanje voltaža na 180 V. Kada linija uzoraka dođe skoro do kraja gela, završava elektroforeza. Gelovi su prebačeni u plastičnu kadicu u

kojoj se nalazi boja *Commassie Brilliant Blue G-250* (CBB) i ostavljeni 15 minuta u kupelji na 50 °C. Nakon 15 minuta obojani gel prebačen je u zagrijanu vodu kako bi se nevezana CBB uklonila. Nakon toga dodan je odbojivač (MeOH ($w = 30\%$), HAc ($w = 10\%$), H₂O ($w = 60\%$)) koji još detaljno uklanja ostatak CBB-a te je postupak ponovljen nekoliko puta, a odbojivač se filtrira preko aktivnog ugljena kako bi se ponovo mogao koristiti.

Tablica 5. Gel za razdvajanje ($w = 10\%$).

| | 10 %-tni gel |
|--|--------------|
| mQ H ₂ O | 3 mL |
| 1,5 mol dm ⁻³ TrisHCl, pH 8,8 | 1,88 mL |
| akrilamid / bisakrilamid (AA) ($w = 30\%$) | 2,475 mL |
| SDS ($w = 10\%$) | 75 μL |
| APS ($w = 10\%$) | 75 μL |
| TEMED | 6 μL |

Tablica 6. Gel za sabijanje ($w = 10\%$).

| | 5 %-tni gel |
|--|-------------|
| mQ H ₂ O | 2,7 mL |
| 0,5 mol dm ⁻³ TrisHCl, pH 6,8 | 0,5 mL |
| akrilamid/bisakrilamid (AA) ($w = 30\%$) | 670 μL |
| SDS ($w = 10\%$) | 40 μL |
| APS ($w = 10\%$) | 40 μL |
| TEMED | 8 μL |

3.4.3. Odsoljavanje na PD-10 koloni

Nakon lize i afinitetne kromatografije, proteini se nalaze u smjesi sa solima i imidazolom. Proteine je potrebno odvojiti i odsoliti u odgovarajući pufer. Kao metoda se koristiti kromatografska metoda zvana gel-filtracija gdje se na stacionarnoj fazi zadržavaju manje molekule, u ovom slučaju soli zato jer ulaze u pore punila, a velike molekule poput proteina brzo prolaze kroz kolonu.³²

Korištena je kolona *PD-10 Desalting Column* gdje je *Spehadex G-25* punilo stacionarna faza. Mogu se odvajati velike molekule visoke relativne molekulske mase ($M_r > 5000$) od manjih molekula ($M_r < 1000$). Propisano je da se nanosi 2,5 mL uzorka. Kolona je postavljena i isprana s 25 mL mQ H₂O. Zatim je ekvilibrirana s 25 mL pufera za odsoljavanje (20 mmol dm⁻³ Tris-HCl, 1 mmol dm⁻³ NaCl, pH 7,4). Najkoncentriranije frakcije fuzijskih proteina spojene su do volumena od 2,5 mL koji se nanosi na ekvilibriranu kolonu te je prva frakcija sakupljena u epruvetu da protein ne bi odmah prošao. Na kolonu je dodano 3,5 mL pufera za odsoljavanje i sakupljena je frakcija odsoljenog proteina. Zatim je dodano još 3,5 mL pufera za odsoljavanje i sakupljeno u epruvetu u slučaju da protein nije možda zaostao na koloni. Kolona je isprana s 25 mL etanola ($w = 20\%$) u kojem se i čuva.

3.4.4. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu. Metoda je karakteristična po tome što se boja *Commassie Brilliant Blue G-250* (CBB) veže ionskim vezama i hidrofobnim interakcijama na proteine. CBB reagira s bočnim ograncima aromatskih i bazičnih aminokiselina proteina. Boja prelazi iz kationskog oblika te se pri vezanju na protein stabilizira u anionskom obliku što je vidljivo iz promjene boje iz smeđe u plavu. Spektrofotometrijski se također prati pomak apsorpcijskog maksimuma boje s 465 na 595 nm. Vezanjem boje na protein raste i apsorbancija odnosno apsorbancija je proporcionalna koncentraciji proteina što metodu čini brzom, jednostavnom i često primjenjivom. Albumin iz govedeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) koristi se kod izrade baždarnog pravca gdje je standardnim koncentracijama tog proteina određena apsorbancija.

Kao slijepa proba korištena je mQ H₂O volumena 100 µL, a volumenu uzorka dodano je mQ H₂O da ukupni volumen bude 100 µL (na 2 µL proteina dodano je 98 µL mQ H₂O). Slijepa proba i uzorci tretirani su s 1 mL Bradfordovog reagensa (0,1 g dm⁻³ *Coomassie Brilliant Blue G-250*, etanol ($\varphi = 0,05$), H₃PO₄ ($\varphi = 0,085$)) i dobro izmješani na Vortex vibracijskom mješaču te su ostavljeni 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon pola sata određena je apsorbanacija slijepa probe i uzoraka na spektrofotometru pri 595 nm. Apсорbancija slijepa probe je oduzeta od apsorbanacije uzorka.

3.4.5. Nativna elektroforeza odsoljenog proteina

Nativna gel-elektroforeza služi za razdvajanje proteina u nativnoj konformaciji. Provodi se bez prisutnosti aditiva poput β-merkaptetanola i SDS-a koji doprinose denaturaciji proteina. Protein koji ima kvaternu nativnu strukturu odvaja se na temelju veličine i naboja. Nativna elektroforeza korisna je za detekciju dimerizacije ili trimerizacije koja se lako očita na gelu.

Nativna elektroforeza je provedena na PhastSystem uređaju te je korišten gradijentni *PhastGel* 10-15 %. Pritiskom aplikatora na parafilm ocrтана su mjesta na koja je nanošen marker, „divlji“ tip hDPP III te mutanti hDPP III-E451K, hDPP III-R638L i hDPP III-R638W. Kao marker je korišten HMW (engl. *High Molecular Weight*) s rasponom masa od 66 do 669 kDa. Na prvo ocrтano mjesto dodano je 1 µL markera te mu je dodano 4 µL mQ H₂O dok je na druga mjesta nanošeno po 5 µL navedenih proteina. Aplikator s parafilma kapilarno usiše 4 µL odnosno nešto manje od 2 µg proteina. Aplikator je postavljen u odgovarajući utor iznad pločice s gelom te je na aparatu pokrenut program pri 400 V i 130-140 AVh. Gel je ostavljen do 144 AVh te je aparat zaustavljen i gel je prenesen u petrijevku gdje se boja u CBB oko 8 minuta. Odbojavanje traje oko 1 sat u odbojivaču (otopina metanola, octena kiselina, voda u omjeru 3:1:6) u kupelji na 50 °C.

3.5. Biokemijska karakterizacija proteina

3.5.1. Određivanje izoelektrične točke pI

Izoelektrična točka je pH vrijednost pri kojoj su proteini električki neutralni. Metodom izoelektričnog fokusiranja odvajaju se proteini na temelju razlike u njihovim izoelektričnim točkama. Takva vrsta elektroforeze provodi se na poliakrilamidnom gelu, gdje je u fazi prefokusiranja uspostavljen pH gradijent između anode i katode. Koristi se marker koji zahvaća teoretsku pI proteina ili se odabere širi raspon pH. Nakon prefokusiranja započinje faza fokusiranja kada nanese proteini putuju prema katodi ili anodi ovisno o njihovom naboju. Zaustavljaju se tamo gdje su električki neutralni odnosno pri pH vrijednosti u kojoj postižu svoju izoelektričnu točku.

Izoelektrično fokusiranje provedeno je na uređaju PhastSystem te su korišteni komercijalni gelovi *PhastGel IEF 3-9 (Pharmacia)*. Na komadić parafilma su laganim pritiskom aplikatora otisnute jažice da te je time određen razmak između uzoraka. Ovisno o volumenu uzorka potrebnom da masa bude 2 μg , dodano je još pufera 20 mmol dm^{-3} Tris-HCl, pH 7,4 do ukupnog volumena 5 μL . Na formirane kapljice uzorka, lagano su prislonjene jažice aplikatora koje kapilarno unesu oko 4 μL uzorka. Ponovljen je postupak s još jednim aplikatorom koji je postavljen na uređaju u položaj iznad prvog. Na označeno područje na uređaju pipetom je naneseo 100 μL mQ H_2O da se gel lagano prilijepi. Postavljen je plastični okvir za izoelektrično fokusiranje, spuštene držač za aplikator na koji je isti s uzorcima postavljen. Nakon prefokusiranja koje traje 10 minuta i temperiranja na 15 °C, aplikator postavljen u držaču se spušta na gel te nekoliko minuta uzorci ulaze u gel nakon čega se aplikator podiže i pokreće se fokusiranje koje traje 15 do 20 minuta. Zatim, gel je prebačen u posudicu u kojoj se fiksira 5 minuta s 20 %-tnom trikloroocetnom kiselinom (TCA) te je dodan odbojivač (MeOH ($w = 30\%$), HAc ($w = 10\%$), H_2O ($w = 60\%$)) da se gel ispere. Bojanje se odvijalo pomoću smjese 1 mL boje Phast Gel Blue R ($w = 0,02\%$), 9 mL odbojivača i 100 μL CuSO_4 (100 μL otopine/10 mL) koja je izlivena na gel i boja se 15 minuta u kupelji na 50 °C. Poslije bojanja, nevezana boja je uklonjena dodatkom odbojivača te je postupak ponovljen tri puta gdje se svaki put ulijeva čisti odbojivač.

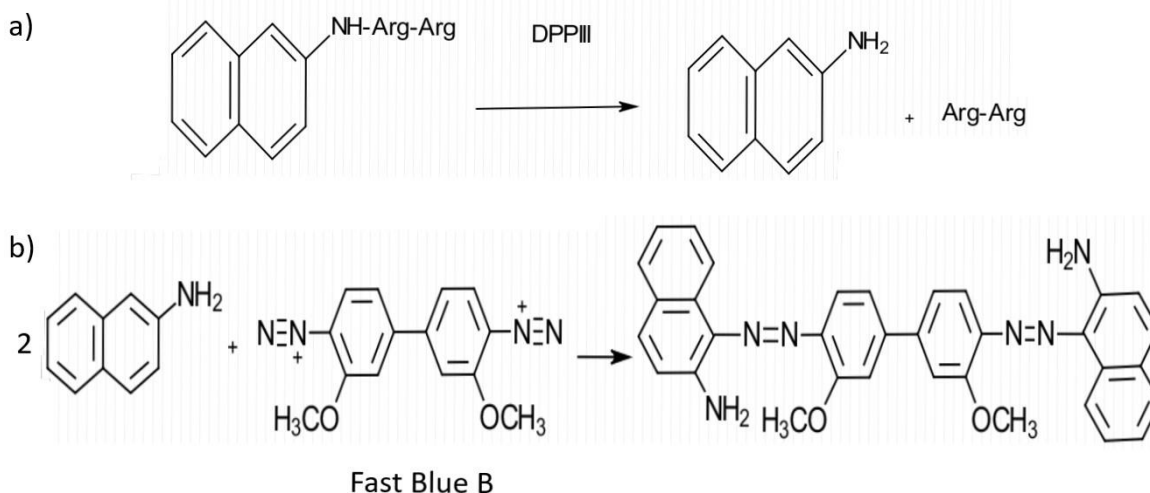
3.5.2. Određivanje supstratne specifičnosti

„Divlji“ tip hDPP III najbolju aktivnost pokazuje sa sintetskim supstratom Arg₂-2NA, dok za različite mutante to tek treba ispitati. Stoga supstratna specifičnost pokazuje afinitet nekog enzima za pojedini supstrat. U ovom testu pufer je bio 0,1 mol dm⁻³ Tris-HCl pH 8,6. Kao aktivator enzima korisiti se CoCl₂ jer ioni Co²⁺aktiviraju DPP III. Kod supstrata vezani su različiti dipeptidi na 2-naftilamin. Množinska koncentracija svih supstrata bila je 0,8 mmol dm⁻³, istog je dodano 50 μL te mu koncentracija u reakcijskoj smjesi iznosi 40 μmol dm⁻³. Apsorbancija je mjerena pri 530 nm. Ispitani su dipeptidni supstrati: Ala-Arg, Gly-Arg, Phe-Arg, Pro-Arg, Ala-Ala, Gly-Phe, Gly-Pro, His-Ser, His-Phe, Lys-Ala i Glu-His.

3.5.3. Određivanje specifične aktivnosti

U testovima je određena aktivnost enzima koji cijepa supstrat Arg₂-2NA (Arg-Arg-2-naftilamid). Aktivnost je mjerena u optimalnom 0,1 mol dm⁻³ Tris-HCl puferu pH 8,6. Kao aktivator enzima korišten je CoCl₂ jer ioni Co²⁺ aktiviraju DPP III. Peptidazna aktivnost prati se u puferima različitog pH, u slučaju da mutantima hDPP III odgovara više ili manje lužnat medij. Provjerava se aktivnost enzima prema različitim supstratima. Također mjeri se kinetika mutanata i “divljeg” tipa hDPP III na fluorimetru za supstrat Arg₂-2NA.

Peptidazna aktivnost mutanata određena je u reakciji gdje mutant hDPP III cijepa supstrat Arg-Arg-2-naftilamid te nastaje produkt 2-naftilamin (2NA) koji se detektira. Enzimaska reakcija zaustavljena je dodatkom FBB otopine (1,5 mg soli *Fast Blue B* u 1 mL 2,1 mol dm⁻³ Na-acetatnom puferu pH 4,2 s Tweenom 80 ($\phi = 0,10$) gdje su na FBB vezane odcijepljene molekule 2-naftilamina. Reakcija se zove diazokopuliranje jer dolazi do elektrofilne supstitucije pri kojoj se na atom dušika FBB-a veže dušik iz 2-naftilamina. Pošto FBB ima dva takva otvorena dušika, veže dvije molekule 2-naftilamina (slika 9). Nastaje niz konjugiranih veza koje spoju daju obojenost. FBB se lako oksidira i reducira pa se priprema neposredno prije izvođenja pokusa. Nakon dodatka FBB-a treba 10-15 minuta da se boja razvije iz smeđe u ružičastu ako aktivnost postoji.



Slika 9. Reakcije: a) cijepanje Arg₂-2-naftilamida na dipeptid Arg-Arg i 2-naftilamin, b) diazokopuliranje pri vezanju dva 2-naftilamina na sol *Fast Blue B*.

Volumen reakcije je 1 mL. U epruvetu je dodano 500 μL 0,1 mol dm^{-3} Tris-HCl, pH 8,6 pa zatim 10 μL 5 mmol dm^{-3} CoCl_2 , zatim određeni volumen enzima te mQ H_2O do volumena ukupne smjese 950 μL . U slijepu probu dodano je 500 μL 0,1 mol dm^{-3} Tris-HCl (pH 8,6), 440 μL mQ H_2O i 10 μL 5 mmol dm^{-3} CoCl_2 (slijepa proba je bez enzima). Slijepa proba i uzorci su inkubirani 2 minute na 37 °C. Nakon inkubacije u svaku reakciju dodano je 50 μL Arg₂-2NA supstrata. Reakcijske smjese su vraćene u kupelj 15 minuta na 37 °C. U međuvremenu je pripremljen svježi FBB reagens te ga je nakon 15 minuta dodano po 200 μL u svaku reakcijsku smjesu. Reakcijske smjese ostavljene su na sobnoj temperaturi 15 minuta. Ako se apsorbancija pri 530 nm podjeli s umnoškom masene koncentracije enzima, vremena reakcije (15 min) i volumena enzima određenog razrijeđenja u reakciji dobije se aktivnost u $\Delta A_{530} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ koja ako se pomnoži s 47,9 (određeno iz β -NA standardne krivulje) te se dobiva vrijednost specifične aktivnosti u $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

3.5.4. Određivanje optimalnog pH

Optimalna pH vrijednost je pH pri kojem određeni enzim ima najveću aktivnost. „Divlji“ tip hDPP III najveću aktivnost pokazuje pri pH 8,6. Mutanti hDPP III se podvrgavaju okolini različitog pH kako bi se našao njihov optimum. Shema je ista kao kod određivanja peptidazne aktivnosti samo što smo mijenjali pH vrijednost pufera. Korišteni su puferi 0,1 mol dm⁻³ Tris-HCl s pH 7,4 ; 8 ; 8,6 ; 9. Nakon završetka enzimske reakcije dodatkom FBB, izmjerena je apsorbancija na 530 nanometara. Najveća dobivena specifična aktivnost proglašena je 100 %-tnom, a ostale, manje vrijednosti specifičnih aktivnosti podjeljene su s tom najvećom vrijednosti te je tako dobivena relativna aktivnost u postotku za pojedinu pH vrijednost.

3.5.5. Mjerenje kinetike na fluorimetru

Kod ispitivanja brzine reakcije mjeri se koncentracija nastalog produkta u određenom vremenu. Kinetičke parametre enzima odredili smo mjerenjem početne brzine enzimske hidrolize Arg₂-2NA supstrata tj. mjerila se fluorescencija reakcijskog produkta 2-naftilamina. Produkt 2-naftilamin koji ima konjugirani sustav veza ako se pobudi pri 332 nm, emitira fluorescencijom pri 420 nm. Mjerenja se provode na spektrofluorimetru pri temperaturi 25 °C te se mjeri početna brzina reakcije. Enzim prati model Michaelis-Menten te se iz grafa ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata mogu odrediti kinetički parametri K_M i V_{max} . Povećanjem koncentracije supstrata brzina reakcije se približava maksimalnoj brzini V_{max} dok je K_M jednak koncentraciji supstrata u trenutku kad je brzina reakcije jednaka polovini maksimalne ($V_{max}/2$). Prije mjerenja kinetike prvo je potrebno napraviti baždarni pravac koji je dobiven mjerenjem intenziteta fluorescencije različitih koncentracija 2-naftilamina. Različite koncentracije: 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 i 1 μmol dm⁻³ dobivene su razrijeđenjem s puferom 0,1 mol dm⁻³ Tris-HCl, pH 8,6. Kod mjerenja kinetike u kivetu dodano je 1,5 mL 0,1 mol dm⁻³ Tris-HCl, pH 8,6, određeni volumen mQ H₂O (ovisno o volumenu supstrata), 30 μL 5 mmol dm⁻³ CoCl₂ te 5 μL mutanta hDPP III ili „divljeg“ tipa. Kiveta je bila začepljena te smo sadržaj lagano promiješali i ostavili 1 minutu u uređaju da se temperira na 25 °C. Nakon minute dodan je određeni volumen 0,8 mmol dm⁻³ Arg₂-2NA supstrata koji se u svakoj reakciji mijenja (tablica 7). Nakon dodatka supstrata ukupni volumen je 3 mL, mjerenje se provodilo 1 minutu. Podaci mjerenja su obrađeni u programu

Microsoft Excel i *Graph Pad Prism 7*. Osim Michaelis-Menten dijagrama u *Microsof Excel*-u napravljen je Hanes-Woolf-ov i Eisenthal-Cornish Bowden-ov graf kako bi se kasnije odredili kinetički parametri bitni za biokemijsku karakterizaciju enzima. Parametri su potvrđeni u *Excel*-u Hanes-Woolf-ovim dijagramima u ovisnosti količnika koncentracije supstrata i brzine reakcije o samoj koncentraciji supstrata. Iz jednadžbe pravca $y = ax + b$ moguće je odrediti V_{\max} ($1/a$) i K_M (b/a) te se k_{cat} dobije dijeljenjem maksimalne brzine V_{\max} s koncentracijom enzima u reakcijskoj smjesi.

Tablica 7. Sastav smjesa s različitom koncentracijom supstrata [S].

| [S] / $\mu\text{mol dm}^{-3}$ | V (Arg ₂ -2NA / μL | V (mQ H ₂ O)/ μL | V (Tris-HCl, pH 8,6)/ μL | V (CoCl ₂) / μL | V (enzima) / μL |
|-------------------------------|--|--|-------------------------------------|--|----------------------------|
| 0,5 | 1,88 | 1463,12 | 1500 | 30 | 5 |
| 1,25 | 4,69 | 1460,31 | 1500 | 30 | 5 |
| 2,5 | 9,38 | 1455,62 | 1500 | 30 | 5 |
| 5 | 18,75 | 1446,25 | 1500 | 30 | 5 |
| 10 | 37,50 | 1427,50 | 1500 | 30 | 5 |
| 15 | 56,25 | 1408,75 | 1500 | 30 | 5 |
| 20 | 75,00 | 1390,00 | 1500 | 30 | 5 |
| 25 | 93,75 | 1371,25 | 1500 | 30 | 5 |
| 30 | 112,50 | 1352,50 | 1500 | 30 | 5 |
| 40 | 150,00 | 1315,00 | 1500 | 30 | 5 |

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

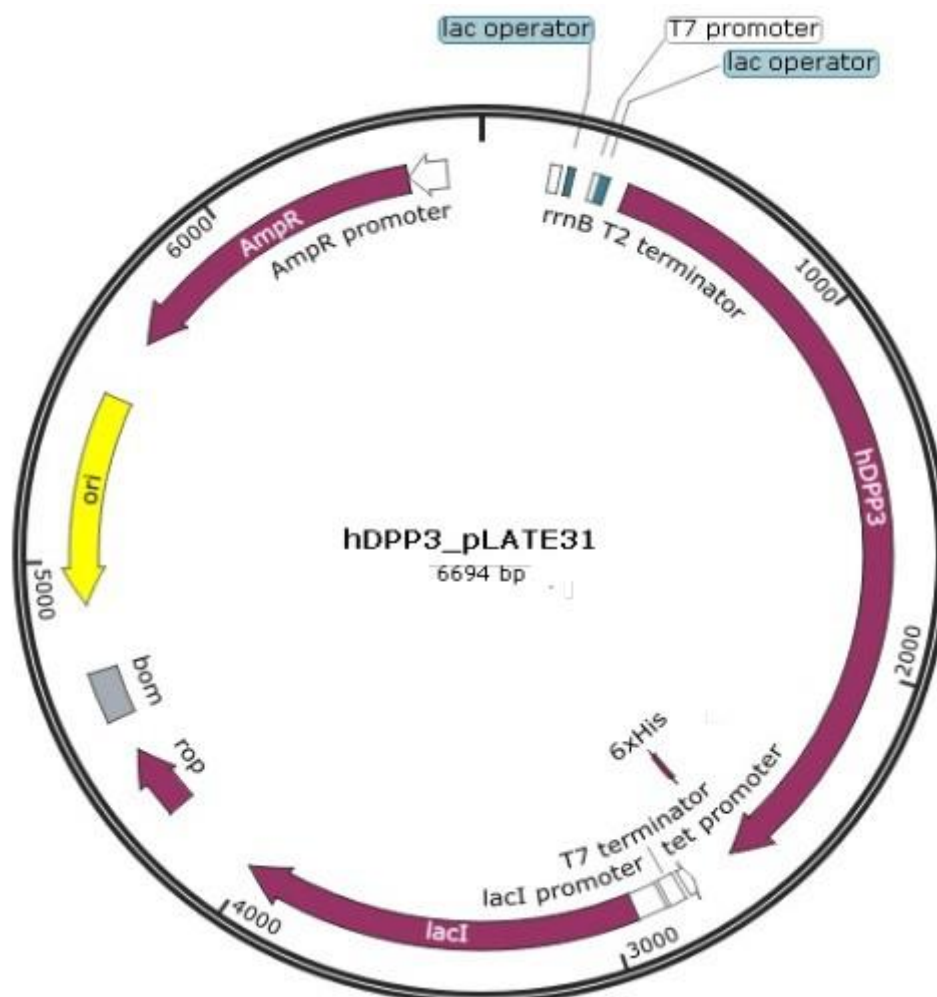
4.1. Mutanti hDPP III: E451K, R638L i R638W

Ciljanom *in vitro* mutagenезom uvedene su mutacije na točno određenim mjestima unutar gena, čijom translacijom se dobiju mutirani proteini. U vektor pLATE31 bio je ugrađen gen za hDPP III, a unutar sredine početnica izmijenjene su odgovarajuće nukleotidne baze da bismo dobili željenu mutaciju dok je ostatak početnice komplementaran dijelu kodirajuće sekvence. Promjena aminokiselina koje su direktno uključene u katalizu ili na neki drugi način doprinose reakciji uglavnom rezultira smanjenom aktivnošću enzima ili njegovom inaktivacijom. Glutaminsku kiselinu (E451) koja direktno sudjeluje u katalizi aktivirajući vodu za nukleofilni napad zamijenili smo lizinom (K). Dobiveni mutant hDPP III-E451K kasnije je podvrgnut različitim testovima. Uvedena je mutacija i izvan aktivnog mjesta gdje se na 638. mjestu arginin zamijenio s leucinom (R638L) i triptofanom (R638W). Nakon što je ispravnost i točnost uvedenih mutacija potvrđena sekvenciranjem, bakterije *E. coli* pogodne za ekspresiju proteina (BL-21) transformirane su pLATE31 vektorom koji sadrži gen s mutacijom te su izolirani plazmidi za ekspresiju mutiranih proteina.

4.2. Bioinformatička analiza

Protein humane dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) može se pronaći u bazi podataka NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) pod pristupnim brojem (engl. *Accession*) NP_005691. Sadrži 737 aminokiselina, za koje se u programu *ExPASy* uz upotrebu alata *Compute pI/Mw tool* dobiva molarna masa od 82 589,16 Da te pI od 5,18. Gen za hDPP III pronađen je na jedanaestom kromosomu. Kodirajuća regija hDPP III nalazi se na 18 eksona između kojih se nalazi 17 introna čijim se prekrajanjem ili izrezivanjem dobiva kodirajuća mRNA sekvenca te dolazi do translacije DPP III enzima. Kao što je već spomenuto u pLATE31 vektor već je ugrađena cDNA za DPP III. Prikaz vektora i rezultati sekvenciranja analizirani su u programu *SnapGene*. Program otvara širok spektar mogućnosti,

od traženja početnica, restrikcijskih mjesta, ubacivanja sekvenci pa sve do planiranja uvođenja mutacija i kloniranja. U program je unesen pLATE31 vektor s DPP III sekvencom, također prikazane su sve bitne stavke ovog vektora poput T7 promotora i terminatora, sekvence za His-privjesak koja se nalazi na C-kraju, regiju za otpornost na ampicilin te *lacI* koji je ključan za regulaciju ekspresije (slika 10).



Slika 10. Prikaz pLATE31 vektora unutar kojeg je ugrađena kodirajuća regija za humanu dipeptidil-peptidazu III (hDPP III) u programu SnapGene.

Vektori poput ovoga, dobiveni su genetičkim inženjerstvom. Transkripcijom s vektora, a kasnije translacijom dobiva se fuzijski protein s His-privjeskom (His₆) na C-kraju. Sekvenca DPP III-His₆ započinje kodonom ATG koji kodira metionin, a završava STOP kodonom TAA iza His-privjeska. pLATE31 ima 6 694 bazna para i sekvenca za fuzijski protein nalazi se od 391.-og do 2628.-og mjesta te ima 2 238 baznih parova s oko 60 % GC parova. 2 238 baznih parova kodira 737 aminokiselina i dva glicina koji omeđuju His-privjesak te je preko jednog

isti povezan na protein. Na aminokiselinskom slijedu hDPP III od 450-455 mjesta vidljiv je katalitički motiv HELLGH te je također prikazana i očuvana regija EECRAE. Ciljanom *in vitro* mutagenezom uvedena je mutacija tako što je jedna baza u kodonu izmijenjena odnosno translacijom je promijenjena aminokiselina. Prva mutacija je uvedena na 451.-om kodonu GAG koji kodira glutaminsku kiselinu (E) te je tom kodonu izmijenjena prva baza gvanin (G) u adenin (A). Novi kodon AAG kodira novu aminokiselinu lizin (K) i dobiven je mutant hDPP III-E451K. A druge dvije mutacije uvedene su na 638.-om kodonu CGG koji izvorno kodira arginin (R). Izmijenom druge nukleotidne baze gvanina (G) u timin (T) dobije se kodon CTG koji kodira leucin (L), a time i mutant hDPP III-R638L. Posljednja mutacija na istom kodonu CGG uzrokovana je promjenom prve nukleotidne baze citozina (C) u timin (T). Novonastalom mutantu hDPP III-R638W kodon TGG kodira triptofan (W) umjesto arginina.

4.3. Ekspresija i afinitetno pročišćavanje

Nakon izolacije i pročišćavanja plazmida, određena je njihova koncentracija i čistoća. Masena koncentracija i čistoća određena je na BioDrop-u (tablica 8).

Tablica 8. Koncentracija i čistoća vektora pLATE31 određena na BioDrop-u.

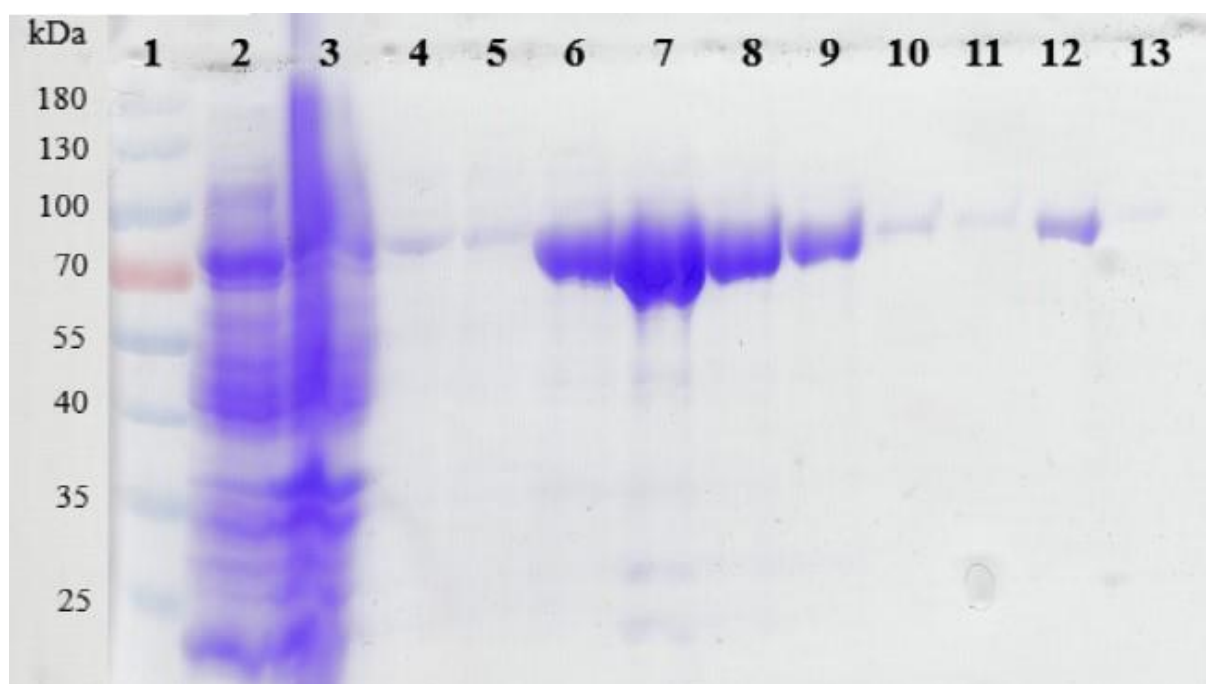
| | Masena koncentracija γ / ng μL^{-1} | Čistoća DNA / A260/A280 |
|------------------------------|--|----------------------------|
| pLATE31-hDPPIII-E451K (1) | 167 | 1,777 |
| pLATE31-hDPPIII-E451K (2) | 251,6 | 1,790 |
| pLATE31-hDPPIII-E451K (3) | 242,6 | 1,789 |
| pLATE31-hDPPIII-R638L (1) | 74,81 | 1,928 |
| pLATE31-hDPPIII-R638L (2) | 85,67 | 1,918 |
| pLATE31-hDPPIII-R638L (3) | 91,53 | 1,926 |
| pLATE31-hDPPIII-R638W (1) | 80,69 | 1,935 |
| pLATE31-hDPPIII-R638W (2) | 43,43 | 1,939 |
| pLATE31-hDPPIII-R638W (3) | 91,31 | 1,930 |

Dobivene su dobre koncentracije plazmida, a i njihova čistoća je zadovoljavajuća za daljnju uporabu. Sekvenciranje je potvrdilo da su mutacije na točno zadanim mjestima. Nekad rekombinantnim proteinima smeta His-privjesak što za njihovo smatanje što za aktivnost te ga je potrebno odcijepiti proteazom koja prepoznaje regiju između His-privjeska i proteina. Međutim prijašnjim istraživanjima otkriveno je da enzimu hDPP III ne smeta His-privjesak te se kao fuzijski protein koristi u istraživanjima. Mjerenjem kinetike hDPP III s privjeskom i bez, vidljivo je iz dobivenih rezultata (Špoljarić J., Doktorski rad) da šest histidina u privjesku nije imalo značajan utjecaj na katalitička svojstva enzima.³⁵ Uočen je mali pad k_{cat} (1,6 puta) enzima s His-privjeskom u odnosu na „divlji“ tip DPP III. Time je izbjegnuto kasnije odvajanje proteaze i daljnje pročišćavanje proteina. U ovom slučaju, dobiveni fuzijski mutanti nemaju aminokiselinsku regiju između mutanta i His-privjeska koju prepoznaje određena proteaza već je privjesak povezan samo preko jednog glicina. Takav raspored određuje vektor pLATE31 s kojeg se prepisuje produkt. Ako je potrebno dobiti fuzijski protein kojem se može odcijepiti His-privjesak, gen se ugrađuje u vektor koji posjeduje kodirajuću regiju za aminokiselinski slijed kojeg prepoznaje i cijepa odgovarajuća proteaza što je moguće s pLATE51 vektorom.

4.4. Analiza mutanata na gelu

4.4.1. Elektroforeza u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE)

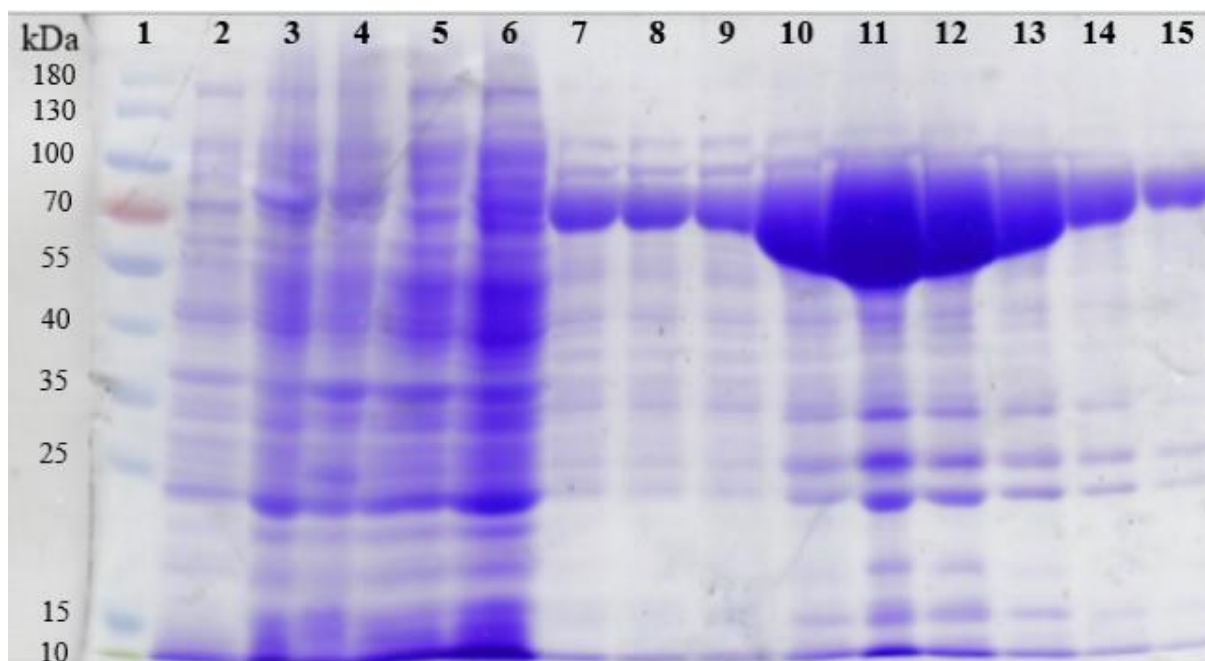
Na gelove su nanošeni: stanični lizat, bakterijski talog nakon lize, uzorak prije indukcije tj. prije dodatka IPTG-a te uzorci frakcija s kolone. Svaki mutant prikazan je na zasebnom gelu sa svojim uzorcima i frakcijama (slike 11-13).



Slika 11. SDS-gel elektroforeza uzoraka hDPP III-E451K. Jažica: 1- *PageRuler Prestained Protein Ladder* – marker, 2- Stanični lizat (SL), 3- Bakterijski talog (T), 4-13 uzorci E₁-E₁₀ (frakcije, eluati fuzijskog proteina).

U prvu jažicu nanesen je marker s rasponom veličine fragmenta od 25 do 180 kDa. Vidljivo je da stanični lizat i talog sadrže proteine u širokom rasponu masa, dok nakon afinitetne kromatografije više od 95 % proteina čini naš željeni protein što potvrđuje da je proces pročišćavanja uspješno proveden. Teoretska masa očekivanog mutanta hDPP III-E451K je oko 83,5 kDa. Vidljivo je da se vrpce od eluata dobivenog mutanta u usporedbi s markerom podudaraju s tom vrijednošću. Vrpce unutar jažica 6, 7 i 8 (E₃, E₄ i E₅) su najizraženije što znači da sadrže najveću koncentraciju proteina hDPP III-E451K. Unutar staničnog lizata pored mnogih vrpca drugih proteina, najintenzivnija je vrpca malo iznad 80 kDa koja također

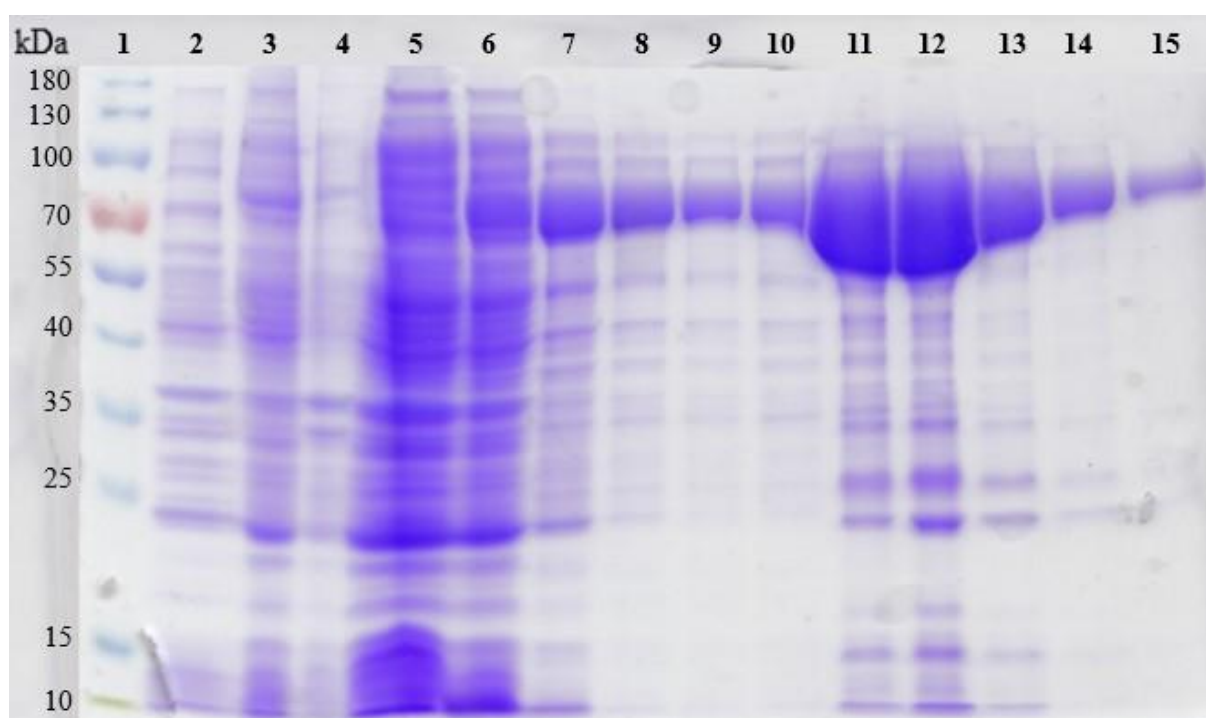
odgovara masi željenog mutanta što je u ovom slučaju pokazatelj da je došlo do prekomjerne ekspresije rekombinantnog proteina hDPP III-E451K. Usporedbom linija SL i T vidljivo je da se većina proteina nalazi u topljivoj frakciji lizata.



Slika 12. SDS-gel-elektroforeza uzoraka mutanta hDPP III-R638L. Jažica: 1- *PageRuler Prestained Protein Ladder* – marker, 2- uzorak IPTG- (prije dodatka IPTG-a), 3- Stanični lizat (SL), 4- Bakterijski talog T (nakon sonikacije), 5- nevezana frakcija (engl. *Flow through*, FT), 6- uzorak prvog ispiranja W_1 (engl. *Wash*, W), 7- uzorak trećeg ispiranja W_3 , 8-15 uzorci E_1 - E_8 (frakcije fuzijskog proteina).

Korišten je isti marker s masama od 25 do 180 kDa u prvoj jažici. Prije dodatka IPTG-a odnosno prije indukcije nije došlo do ekspresije proteina, nema izraženih vrpca u drugoj jažici. U trećoj jažici nalazi se stanični lizat te su vidljive lagane vrpce od koji je jedna u usporedbi s markerom iznad 80 kDa što bi odgovaralo mutantu. Očekivana teoretska masa hDPP III-R638L iznosi 83 483,09 Da što je približno 83,5 kDa te su najintenzivnije vrpce vidljive u ravnini s markerom u tom području. U petoj jažici (nevezana frakcija) nema izrazitih vrpca u tom području što znači da se naš protein zadržao na koloni, a neki proteini su samo prošli kroz kolonu. Kod prvog ispiranja (6.- jažica) vidljivo je puno intenzivnih vrpca pri različitim masama koje odgovaraju različitim staničnim proteinima koji su isprani s kolone. Međutim vidljive su vrpce u području našeg proteina te nam to govori da je ipak mali dio našeg

proteina ispran s kolone jer pufer za ispiranje ipak sadrži određenu koncentraciju imidazola. U trećem ispiranju W_3 (7.- jažica) nisu vidljive vrpce pri drugim masama osim vrpce koja odgovara masi našeg proteina te je širina vrpce ista kao kod eluiranja proteina E_1 i E_8 (jažice 8, 9). To upućuje na gubitak proteina prilikom ispiranja, možda zbog veće koncentracije imidazola u puferu za ispiranje, ali i dalje više od 95 % proteina čini naš željeni protein što potvrđuje da je proces pročišćavanja uspješno proveden. Frakcije mutanta E_3 , E_4 i E_5 (jažice 10, 11 i 12) sadrže najveću koncentraciju proteina što je vidljivo po proširenim, izduženim te intenzivnim vrpcama.



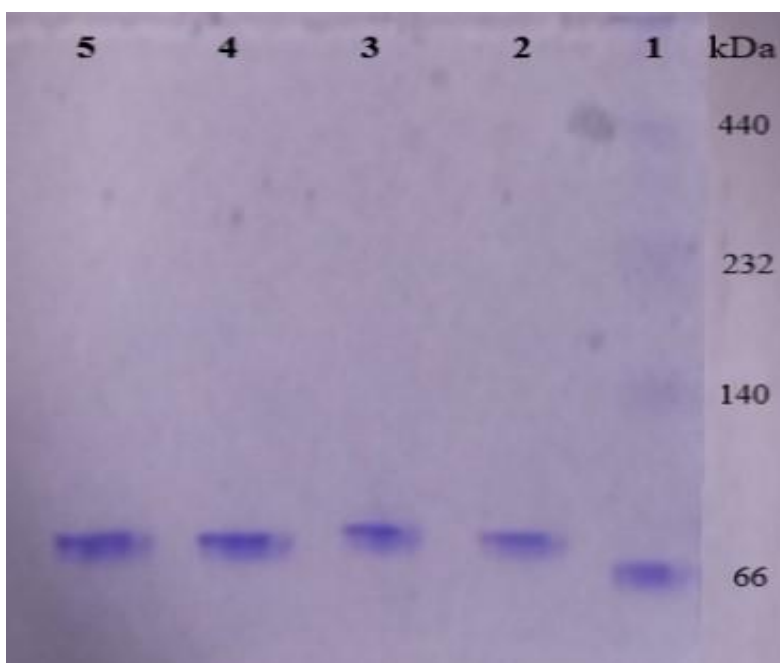
Slika 13. SDS-gel-elektroforeza uzoraka mutanta hDPP III-R638W. Jažica: 1- *PageRulerPrestained Protein Ladder* – marker, 2- uzorak IPTG- (prije dodatka IPTG-a), 3- Stanični lizat (SL), 4- Bakterijski talog T (nakon sonikacije), 5- nevezana frakcija (engl. *Flow through*, FT), 6-8 uzorci ispiranja W_1 - W_3 (engl. *Wash*, W), 9-15 uzorci eluiranja E_1 - E_7 (frakcije fuzijskog proteina).

Indukcija ekspresije i dalje zanemarivo vidljiva bez IPTG-a (jažica 2) dok kod staničnog lizata (jažica 3) s dodatkom IPTG-a izraženije vrpce ukazuje na ekspresiju proteina. Teoretska masa mutanta hDPP III-R638W iznosi 83 556,14 Da (~83,5 kDa) te u ravni s tom vrijednošću markera kod uzoraka su prisutne vrpce. Kod nevezane frakcije (5.- jažica)

intenzivne vrpce upućuju da je prošao velik broj drugih proteina, ali vrpce u području mase našeg mutanta upućuju na gubitak istog. Kod prvog ispiranja W_1 (6.- jažica) po vrpcama u širokom rasponu masa došlo je do ispiranja mnogih proteina, ali kao kod W_2 i W_3 zamijetan je gubitak željenog mutanta u području iznad 80 kDa. Frakcije E3, E4 i E5 (jažice 11, 12 i 13) prikazuju najveću koncentraciju proteina u području masa iznad 80 kDa što odgovara masi mutanta hDPP III-R638W. Vrpce koje ukazuju na veliku količinu proteina su intenzivne, izdužene te šire zbog nakupljanja proteina. Nakon provedene afinitetne kromatografije više od 95 % proteina čini naš željeni protein što potvrđuje da je proces pročišćavanja uspješno proveden.

4.4.2. Nativna gel-elektroforeza

Na pločice od poliakrilamidnog gela nanese su uzorci „divljeg“ tipa hDPP III te mutanti hDPP III-E451K, hDPP III-R638L i hDPP III-R638W (slika 14). Paralelno s uzorcima nanošen je marker HMW (engl. *High Molecular Weight*) s rasponom masa od 66 do 669 kDa.



Slika 14. Nativna gel-elektroforeza hDPP III i njenih mutanata. Jažica: 1- HMW (engl. *High Molecular Weight*) marker, 2- „divlji“ tip hDPP III, 3- mutant hDPP III-E451K, 4- mutant hDPP III-R638L i 5- mutant hDPP III-R638W.

Iz gela se ne može točno odrediti molekulska masa „divljeg“ tipa hDPP III i mutanata, ali se u usporedbi s markerom može zaključiti da je oko 80 kDa što odgovara teoretskoj masi. Špoljarić J. u svome Doktorskom radu dobila je masu „divljeg“ tipa enzima hDPP III koja je slična i usporediva s ovom.³⁵ Također usporedbom „divljeg“ tipa hDPP III (jažica 2) s mutantima E451K, R638L i R638W (jažice: 3,4 i 5) vidljivo je da nema neke veće promjene u masi odnosno da nije došlo do dimerizacije ili agregacije proteina.

4.5. Koncentracija mutanata hDPP III

Nakon afinitetne kromatografije i skupljanja svih frakcija, određena je masena koncentracija mutanata na BioDrop-u pri apsorbanciji od 280 nm. Određene su koncentracije staničnog lizata (SL), nevezane frakcije (engl. *Flow through*, FT), tri ispiranja (engl. *Wash*, W), deset frakcija eluiranih mutanata hDPP III (engl. *Elution*, E) te završnog ispiranja (engl. *End Wash*, END W). Masena koncentracija mutanata izražena je u mg mL^{-1} i prikazana u tablicama 9, 10 i 11.

Tablica 9. Masena koncentracija (γ) hDPP III-E451K određena na BioDrop-u.

| | SL | FT | W1 | W2 | W3 | E1 | E2 | E3 | E4 |
|------------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\gamma / \text{mg mL}^{-1}$ | 27,030 | 8,087 | 3,800 | 0,630 | 0,153 | 0,217 | 0,220 | 3,570 | 3,439 |

| | E5 | E6 | E7 | E8 | E9 | E10 |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\gamma / \text{mg mL}^{-1}$ | 1,284 | 0,533 | 0,204 | 0,079 | 0,032 | 0,016 |

Tablica 10. Masena koncentracija hDPP III-R638L određena na BioDrop-u.

| | SL | FT | W1 | W2 | W3 | E1 | E2 | E3 | E4 |
|------------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| $\gamma / \text{mg mL}^{-1}$ | 23,013 | 21,420 | 14,520 | 2,120 | 1,612 | 1,012 | 0,972 | 3,811 | 11,350 |

| | E5 | E6 | E7 | E8 | E9 | E10 | ENDW |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\gamma / \text{mg mL}^{-1}$ | 6,133 | 2,619 | 1,213 | 0,573 | 0,338 | 0,260 | 0,214 |

Tablica 11. Masena koncentracija hDPP III-R638W određena na BioDrop-u.

| | SL | FT | W1 | W2 | W3 | E1 | E2 | E3 | E4 |
|------------------------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\gamma / \text{mg mL}^{-1}$ | 31,810 | 11,630 | 7,251 | 3,678 | 0,784 | 0,758 | 0,784 | 3,873 | 8,001 |

| | E5 | E6 | E7 | E8 | E9 | E10 | ENDW |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\gamma / \text{mg mL}^{-1}$ | 2,504 | 1,066 | 0,518 | 0,285 | 0,111 | 0,110 | 0,091 |

Tablice koncentracija hDPP III-R638L i hDPP III-R638W prikazuju veću koncentraciju nego kod hDPP III-E451K jer se radilo s duplo većom količinom kulture odnosno medija kod ekspresije mutanata R638L i R638W. Koncentracije frakcija su usporedive s intenzitetom vrpca u gelovima s SDS-gel-elektroforeze. Kao što je i očekivano, najveću koncentraciju eluiranih mutanata pokazuju frakcije E₃ i E₄ dok kod završnog ispiranja (ENDW) nije primijećen značajan gubitak mutiranih fuzijskih proteina. Prije odsoljavanja mutanata, spojene su frakcije najviših koncentracija (E₃, E₄, E₅, E₆ i E₇) u volumen 2,5 mL te im je određena koncentracija na BioDrop-u:

$$\gamma (\text{hDPP III-E451K}) = 1,394 \text{ mg mL}^{-1}$$

$$\gamma (\text{hDPP III-R638L}) = 5,210 \text{ mg mL}^{-1}$$

$$\gamma (\text{hDPP III-R638W}) = 5,370 \text{ mg mL}^{-1}$$

Odsoljavanjem spojenih frakcija mutanti se pročiste od soli i razrijede u 20 mmol dm⁻³ Tris-HCl, pH 7,4 te im se masena koncentracija nakon gel filtracije očekivano smanjuje:

$$\gamma (\text{hDPP III-E451K}) = 1,157 \text{ mg mL}^{-1}$$

$$\gamma (\text{hDPP III-R638L}) = 3,156 \text{ mg mL}^{-1}$$

$$\gamma (\text{hDPP III-R638W}) = 3,280 \text{ mg mL}^{-1}$$

Zatim je koncentracija odsoljenih mutanta određena Bradfordovom metodom. Kao što je već ranije opisano, mQ H₂O s Bradfordovim reagensom je korištena kao slijepa proba koja se kasnije oduzimala od mjerenog uzorka mutanta. Masene koncentracije odsoljenih mutanata određene Bradfordovom metodom iznose:

$$\gamma (\text{hDPP III-E451K}) = 1,076 \text{ mg mL}^{-1}$$

$$\gamma (\text{hDPP III-R638L}) = 2,859 \text{ mg mL}^{-1}$$

$$\gamma (\text{hDPP III-R638W}) = 2,731 \text{ mg mL}^{-1}$$

Nakon napravljene glicerolske otopine, koncentracija im je također određena metodom po Bradfordu:

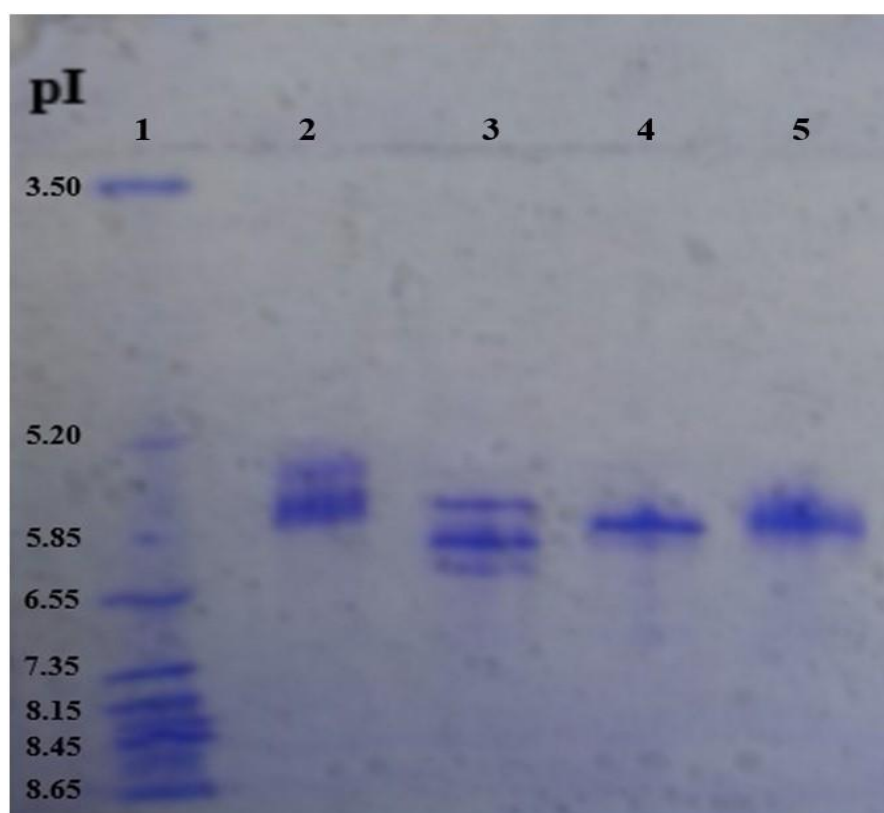
$$\gamma (\text{hDPP III-E451K}) = 0,885 \text{ mg mL}^{-1}$$

$$\gamma (\text{hDPP III-R638L}) = 1,863 \text{ mg mL}^{-1}$$

$$\gamma (\text{hDPP III-R638W}) = 1,457 \text{ mg mL}^{-1}$$

4.6. Izoelektrična točka pI

Teoretska izoelektrična točka pI „divljeg“ tipa hDPP III iznosi 5,18 dok se za mutante E451K (5,24), R638L (5,14) i R638W (5,14) ona malo razlikuje. Teoretska vrijednost dobivena je na *ExPASy* portalu pod alatom *Compute pI/Mw tool* gdje se ubaci cijela sekvenca te se dobije teoretska vrijednost pI i molarne mase u daltonima (Da). Na gel za izoelektrično fokusiranje (IEF) s pH rasponom 3-9 nanosi se marker koji nosi standarde s rasponom pI od 3-10 te je zbog teoretske izoelektrične točke pretpostavka da će pI hDPP III i mutanata biti unutar tog intervala (slika 15).



Slika 15. Izoelektrično fokusiranje (IEF) „divljeg“ tipa hDPP III i mutanata. 1- marker za IEF 3-9, 2- „divlji“ tip hDPP III, 3- mutant hDPP III-E451K, 4- mutant hDPP III-R638L i 5- mutant hDPP III-R638W.

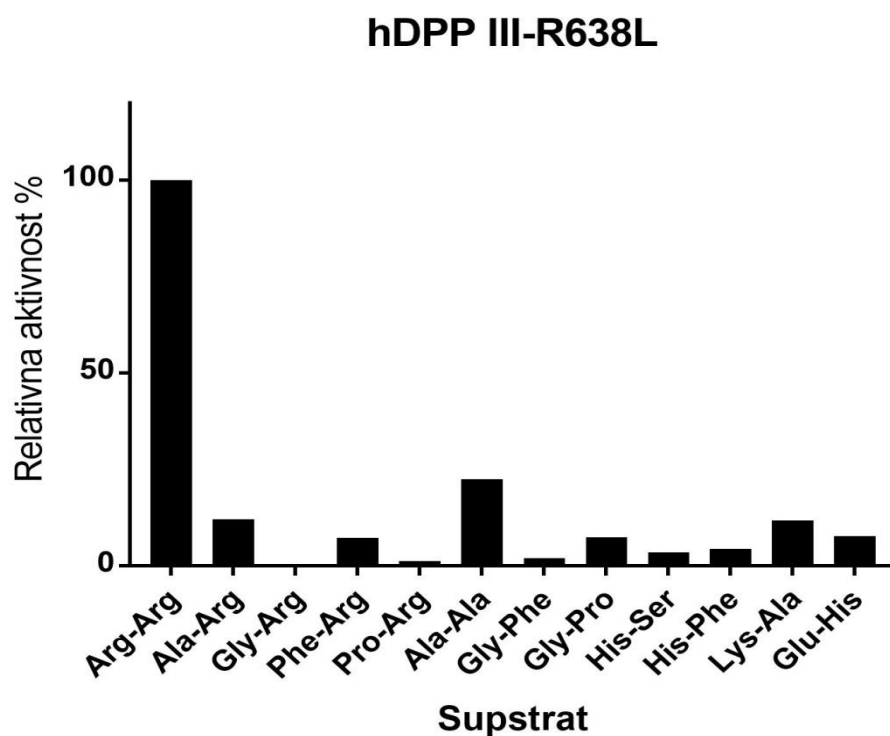
U usporedbi s pI standardima markera, pI “divljeg” tipa i mutanata E451K, R638L i R638W smjestio se između 5,20 i 5,85 te se za 0,50 – 0,60 razlikuje od njihove teoretske izoelektrične točke. Vrpca u drugoj jažici tj. ona u kojoj se nalazi “divlji” tip hDPP III je nešto izduženija te

možemo reći da joj je pI oko 5,50. U jažici broj 3 nalazi se mutant E451K kod kojeg su prikazane dvije vrpce od koji je jedna slična onoj “divljeg” tipa dok je druga oko 5,85 što nam ukazuje ne postojanje minimalno dvije izoforme enzima. Abramić i suradnici¹⁶ dobili su da pI hDPP III izoliranog iz eritrocita iznosi oko 4,5 - 4,6 što je manje od toetskog i ovdje dobivenog pI. Špoljarić u Doktorskom radu³⁵ dobila je pI 4,8 što je i dalje manje od teoretskog pI. Rezultati pI često variraju, ali ovdje usporedbom rezultata iz radova, teoretskih vrijednosti te naših rezultata možemo reći da je pI negdje između 4,6 i 5,6. Mutanti R638L i R638W (jažice 4 i 5) imaju isto pozicioniranu vrpcu oko 5,65 – 5,70. Gelom je prikazano da “divlji” tip ima najnižu pI, mutanti R638L i R638W imaju jednaku vrijednost, dok mutant E451K ima višu pI.

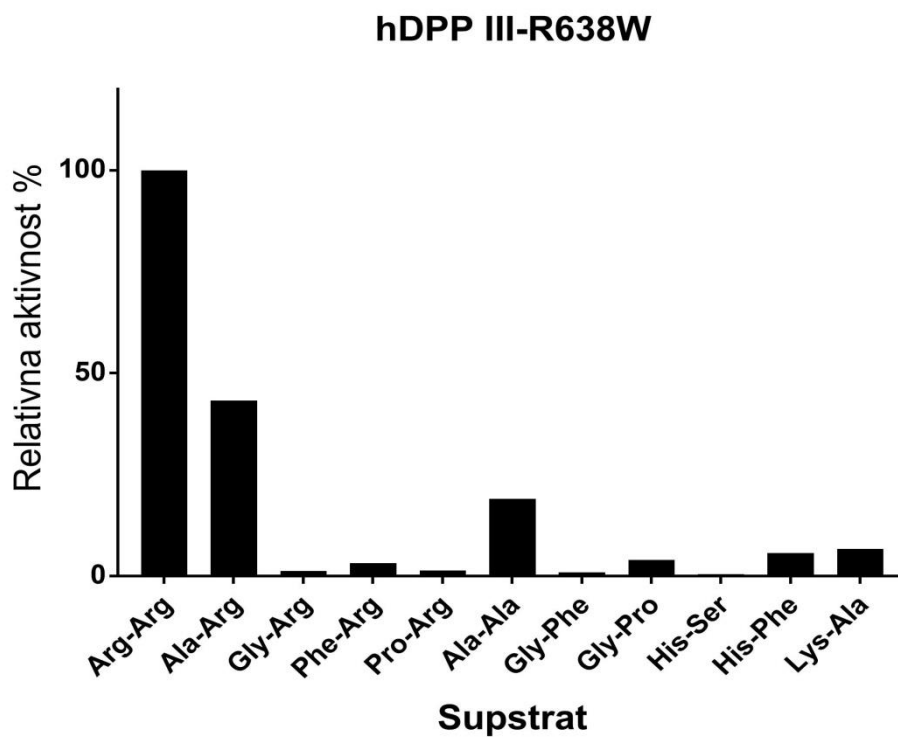
4.7. Aktivnost mutanata

4.7.1. Određivanje supstratne specifičnosti

Kao najbolji sintetski supstrat za „divlji“ tip hDPP III pokazao se diarginil-2-naftilamid (Arg₂-2NA). Postupak je isti kao kod prethodnih testova, samo je korišten različit dipeptid u supstratu s 2-naftilaminom. Analizom je ustanovljeno da mutanti hDPP III-R638L i hDPP III-R638W najveći afinitet također imaju za supstrat Arg₂-2NA te je ta vrijednost specifične aktivnosti proglašena 100 %. Donekle zamijećenu aktivnost, mutanti hDPP III su pokazali za supstrate alanil-arginil-2-naftilamid (Ala-Arg-2NA) i alanil-alanil-2-naftilamid (Ala-Ala-2NA) što je vidljivo u slikama 16 i 17. Abramić i suradnici²⁷ u svome radu su mjerili aktivnost hDPP III i nekih mutanata te je poslije Arg-Arg-2NA, za supstrat Ala-Ala-2NA enzim pokazao drugu najveću aktivnost dok su isti rezultat Špoljarić i suradnici³⁶ ponovili u svome radu. Rezultati navedenih radova usporedivi su s našim rezultatima, ali vrijednosti relativne aktivnosti njihovih rezultata su manje od naših. Mutanti R638L i R638W nisu analizirani u ovim radovima, ali njihov afinitet prema tim supstratima sličan je afinitetu drugih mutanata prema istim supstratima. U ovim radovima nije analiziran supstrat Ala-Arg-2NA tako da nije usporediv.



Slika 16. Relativna aktivnost hDPP III-R638L pri različitim supstratima (izrađeno u programu *Graph Pad Prism 7*).



Slika 17. Relativna aktivnost hDPP III-R638W pri različitim supstratima (izrađeno u programu *Graph Pad Prism 7*).

4.7.2. *Specifična aktivnost s Arg₂-2NA*

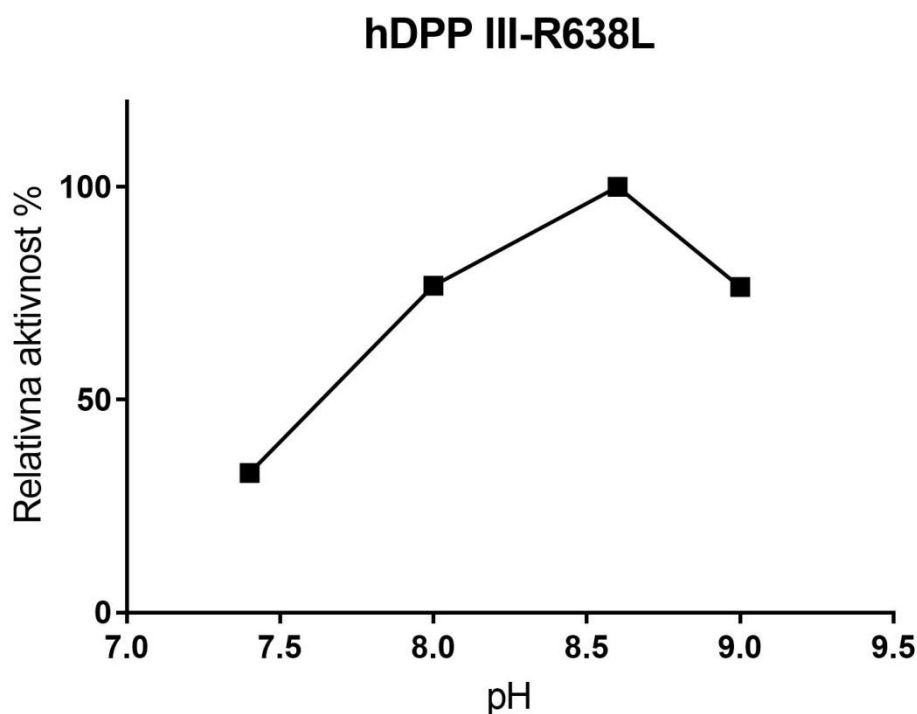
Kao što je opisano ranije, mutanti hDPP III podvrgnuti su različitim testovima kako bi se odredila aktivnost, afiniteti prema određenim supstratima te optimalan pH u kojem pokazuju najbolje djelovanje. Specifična aktivnost mutanata određena je s Arg-Arg-2-NA supstratom pri pH vrijednosti 8,6 u kojem „divlji“ tip hDPP III pokazuje najbolju aktivnost. Mutant hDPP III-E451K nije pokazivao nikakvu aktivnost ni sa čistom frakcijom što se i pretpostavljalo jer se mutacija nalazi unutar aktivnog mjesta. Upravo je glutaminska kiselina (E) na 451.-om mjestu odgovorna za iniciranje nukleofilnog napada vode. Glutaminska kiselina u svom ogranku sadrži karboksilnu skupinu (-COOH) čiji kisik može stvarati vodikovu vezu s vodikom iz vode te se time pojačava njena nukleofilnost.²¹ Uvođenjem lizina (K) koji na kraju svog ogranka ima amino skupinu (-NH₂) na to mjesto vjerojatno se gubi nukleofilnost vode te ne dolazi do cijepanja supstrata u aktivnom mjestu. Bezerra i suradnici²⁰ u svojim istraživanjima napravili su mutaciju također na 451.-om mjestu gdje su glutaminsku kiselinu zamjenili s alaninom te je enzim opet bio inaktivan što potvrđuje teoriju da mutacije u aktivnom mjestu enzima drastično utječu na njegovu funkciju. Mutanti sa mutacijom na 638.-om mjestu pokazivali su određenu aktivnost što se vizualno moglo zaključiti dodatkom FBB-a te promjenom boje iz smeđe u rozu. Iz rezultata je vidljivo da su aktivnost i specifična aktivnost „divljeg“ tipa proteina skoro dva puta veće od mutanta R638L, a skoro tri puta od mutanta R638W (tablica 12).

Tablica 12. Specifična aktivnost „divljeg“ tipa i mutanata hDPP III.

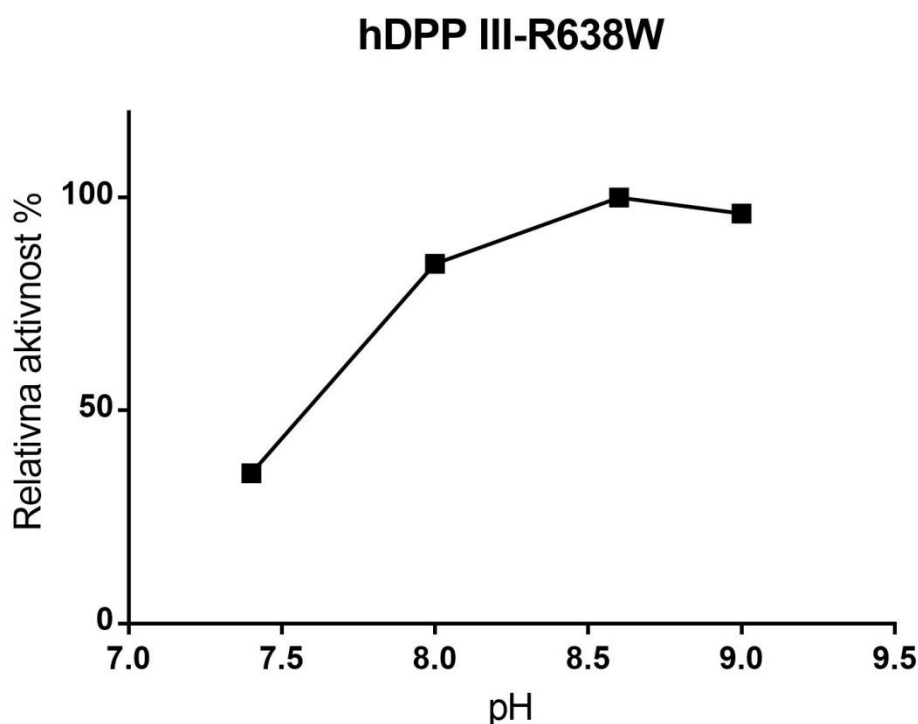
| | „divlji“ tip hDPP III | hDPP III-R638L | hDPP III-R638W |
|---|-----------------------|----------------|----------------|
| Aktivnost / $\Delta A_{530} \text{ min}^{-1}, \text{ mg}^{-1}$ | 1166,67 | 706,32 | 416,38 |
| Specifična aktivnost / $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ | 55 883 | 33 833 | 19 945 |

4.7.3. Optimalna pH vrijednost

Test kod određivanja optimalnog pH isti je kao kod određivanja specifične aktivnosti, samo što je u reakcijama korišten $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl pufer različitog pH. Korištena su četiri pufera pH 7,4, 8,0, 8,6 i 9,0. Ranijim istraživanja ustanovljeno je da „divlji“ tip hDPP III najveću aktivnost ima pri pH 8,6. Kad se odrede asporbancije pri 530 nm i kad se izračuna specifična aktivnost za pojedini mutant, odredi se relativna aktivnost (%). Uspoređivanjem izračunatih specifičnih aktivnosti pri različitim pH vrijednostima, mutanti hDPP III-R638L i hDPP III-R638W pokazali su najveću specifičnu aktivnost pri pH 8,6 (slika 18 i 19).



Slika 18. Relativna aktivnost hDPP III-R638L mjerena u puferima različite pH vrijednosti (izrađeno u programu *Graph Pad Prism 7*).



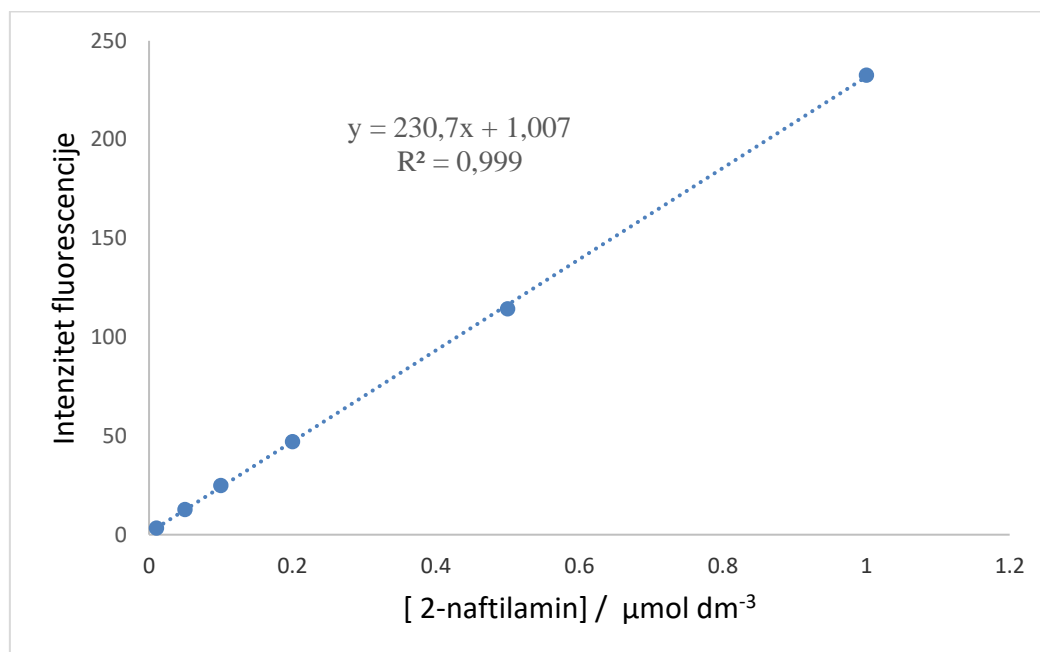
Slika 19. Relativna aktivnost hDPP III-R638W mjerena u puferima različite pH vrijednosti (izrađeno u program *Graph Pad Prism 7*).

Iz slika 18 i 19 može se vidjeti da mutanti kao i „divlji“ tip hDPP III najveću aktivnost imaju pri pH 8,6 te se vrijednost pri tom pH uzima kao 100 %. Slike grafova ukazuju na to da je najmanja aktivnost pri pH 7,4 ispod 50 % te u pola manja u odnosu na onu pri pH 8,6 (100 %).

4.7.4. Kinetika na fluorimetru

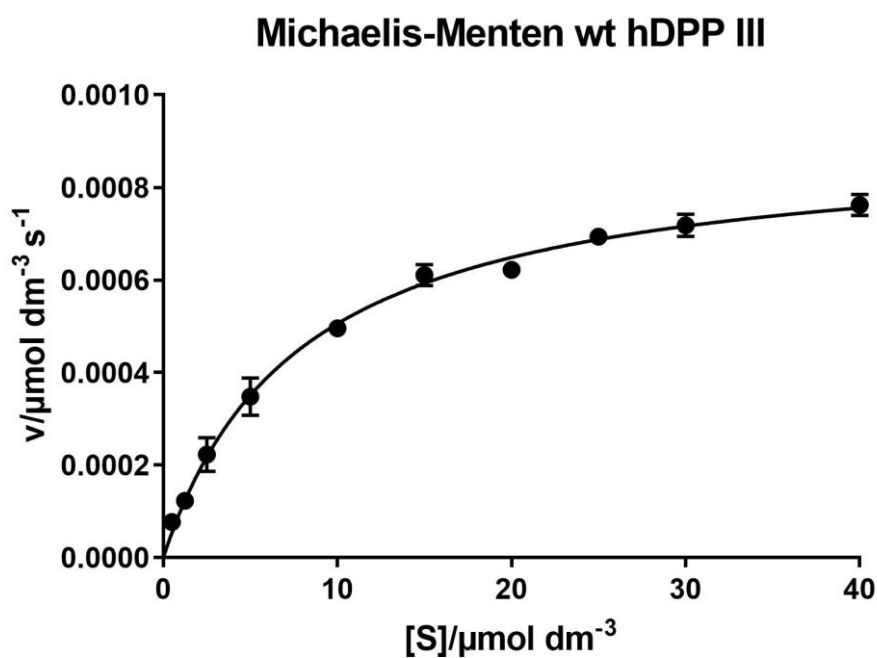
Kod mjerenja kinetike korišten je supstrat Arg₂-2NA jer je potvrđeno da oba mutanta koja pokazuju aktivnost imaju najveću aktivnost prema tom supstratu kao i „divlji“ tip hDPP III. Određivanjem optimalnog pH određeno je da i mutanti, kao i „divlji“ tip, pokazuju najveću aktivnost pri pH 8,6. Mutant hDPP III-E451K nije pokazivao aktivnost što se i pretpostavljalo jer je mutacija u aktivnom mjestu potpuno inaktivirala enzim te mu se nije određivala kinetika. Mutantima s mutacijom na 638.-om mjestu te očekivano manjom specifičnom aktivnošću od „divljeg“ tipa izmjerena je brzina reakcije pri različitim koncentracijama supstrata u smjesi. Također određena je i kinetika „divljeg“ tipa. Prije mjerenja napravljen je

baždarni pravac u grafu ovisnosti intenziteta fluorescencije o različitim koncentracijama 2-naftilamina i određen je koeficijent baždarnog pravca f po formuli $f = 1/a$ te f iznosi $0.004333882 \mu\text{mol dm}^{-3}$ (slika 20).

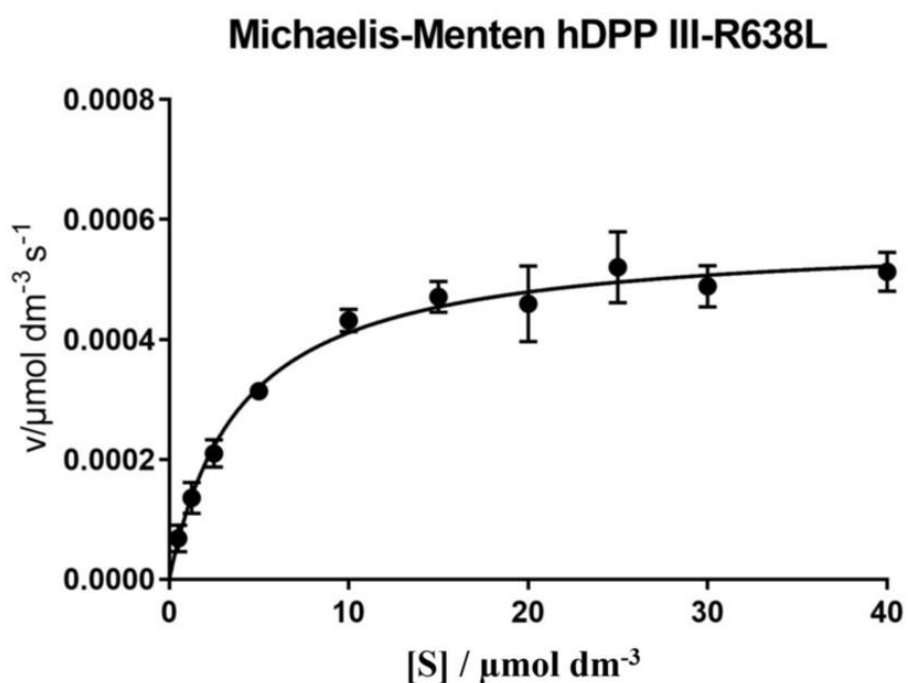


Slika 20. Graf ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji 2-naftilamina (izrađeno u programu *Microsoft Excel*).

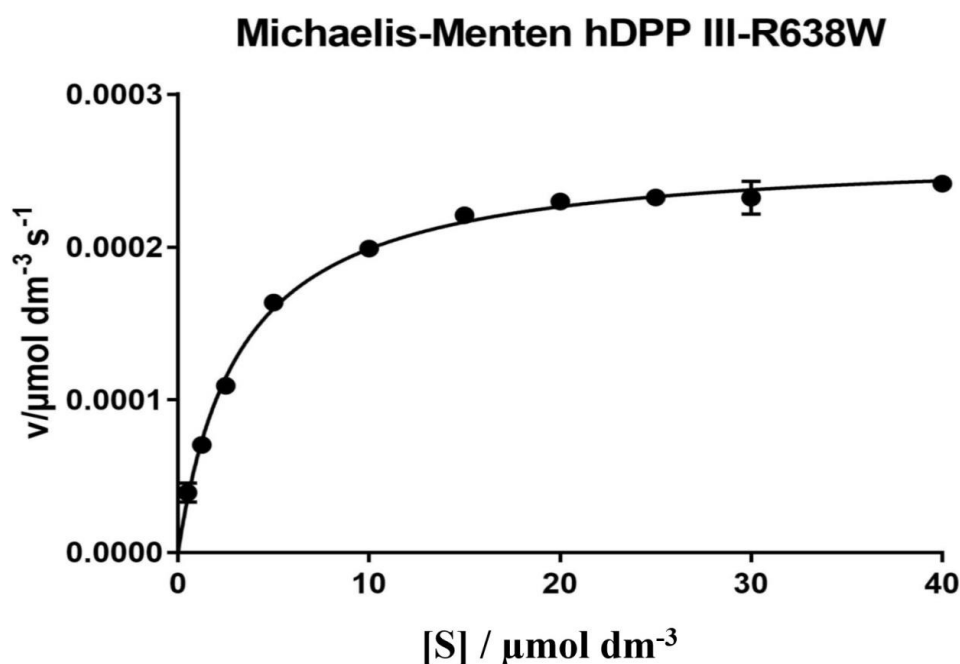
Kinetika za "divlji" tip hDPP III te mutante hDPP III-R638L, hDPP III-R638W prikazana je grafovima napravljenim u *Graph Pad Prism 7* (slike 21-23). Kinetički parametri za iste navedeni su tablicom 13.



Slika 21. Michaelis-Menten graf s nelinearnom regresijom tri mjerenja brzine reakcije za “divlji” tip hDPP III (izrađeno u programu *Graph Pad Prism 7*).



Slika 22. Michaelis-Menten graf s nelinearnom regresijom tri mjerenja brzine reakcije za mutant hDPP III-R638L (izrađeno u programu *Graph Pad Prism 7*).



Slika 23. Michaelis-Menten graf s nelinearnom regresijom dva mjerenja brzine reakcije za mutant hDPP III-R638W (izrađeno u programu *Graph Pad Prism 7*).

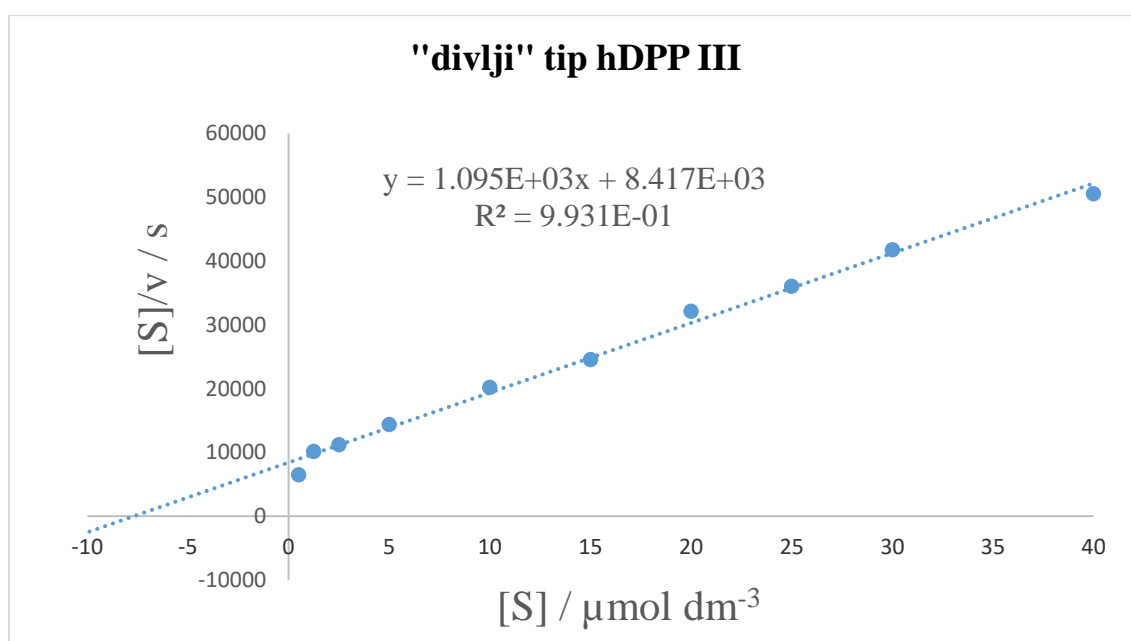
Tablica 13. Kinetički parametri za “divlji” tip i mutante hDPP III.

| Mutant | $K_M / \mu\text{mol dm}^{-3}$ | $V_{\text{max}} / 10^{-4} \mu\text{mol dm}^{-3} \text{s}^{-1}$ | $k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$ | $k_{\text{cat}}/K_M / 10^6 \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ |
|-----------------------|-------------------------------|--|----------------------------------|---|
| “divlji” tip hDPP III | $7,91 \pm 0,49$ | $9,10 \pm 0,18$ | 40,700 | 5,561 |
| hDPP III-R638L | $3,96 \pm 0,45$ | $5,74 \pm 0,16$ | 15,364 | 4,148 |
| hDPP III-R638W | $3,25 \pm 0,15$ | $2,63 \pm 0,03$ | 8,951 | 2,939 |

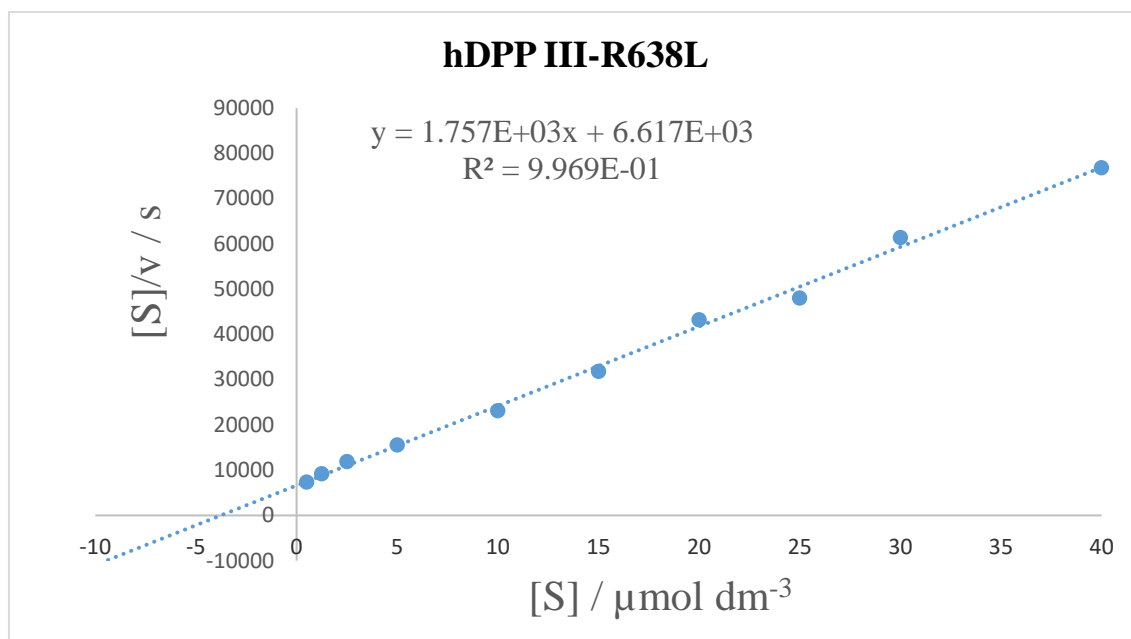
Iz Michaelis-Menten grafova i tablice vidljivo je da je “divlji” tip hDPP III ima veću katalitičku moć od svojih mutanata što je i očekivano. Brzina V_{max} i koncentracija K_M za “divlji” tip su skoro dva puta veće od mutanta hDPP III-R638L, a k_{cat} skoro tri puta. Mutant hDPP III-R638W pokazao je niže kinetičke parametre od R638L. hDPP III izolirana i pročišćena iz eritrocita (Abramić i sur.)²⁷ pri pH 7,4 imala je K_M oko 6,21 što je nešto manje od dobivenog rezultata. Dok je štakorska DPP III iz istog rada pri pH 8,0 imala K_M oko 7,88 što je skoro isto našem rezultatu što ne čudi jer štakorska DPP III ima 93 % identičnosti kao hDPP III.³⁷ U doktorskom radu J. Špoljarić³⁵ rezultati K_M za hDPP III su u rasponu od 8,7 – 8,9 što je nešto veće od K_M dobivenog ovdje. k_{cat} i k_{cat}/K_M dobivene u radovima su nešto niže nego naše konstante iz tablice 12. Rezultati među radovima se razlikuju međutim nisu to

velika odstupanja, ali dosta istraživanja treba još provesti kako bi se ta odstupanja još više smanjila.

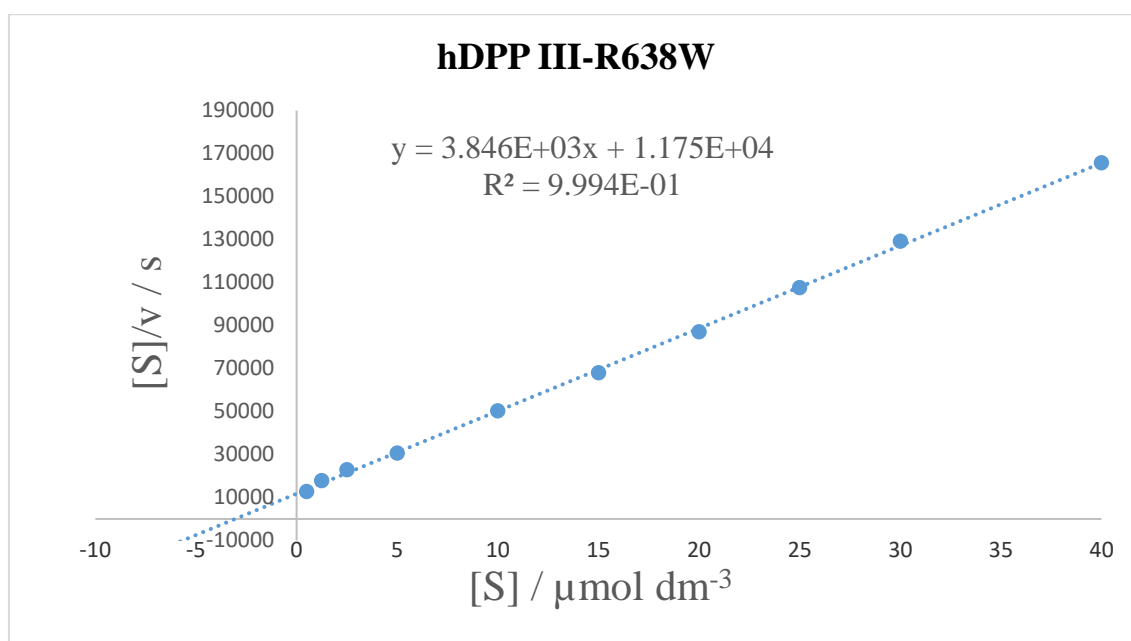
Time se postavlja pretpostavka da triptofan W (R638W) zbog svoje veličine nepovoljno utječe na samu konformaciju enzima te time smanjuje njegovu aktivnost. Matovina i suradnici³⁸ u istraživanjima mutacija pronađenih u karcinomu, napravili su i analizirali mutante hDPP III gdje su neke aminokiseline zamjenjene triptofanom koji je vjerojatno nepovoljno utjecao na smatanje samog enzima te time smanjio njegovu aktivnost. Dok leucin L (R638L) pokazuje bolje rezultate, ali i dalje slabije rezultate od izvornog arginina R. Parametri su potvrđeni u *Excel-u* Hanes-Woolf-ovim dijagramima u ovisnosti količnika koncentracije supstrata i brzine reakcije o samoj koncentraciji supstrata (slike 24-26).



Slika 24. Hanes-Woolf-ov dijagram ovisnosti količnika koncentracije supstrata i brzine reakcije o koncentraciji supstrata za „divlji“ tip hDPP III (izrađeno u programu *Microsoft Excel*).



Slika 25. Hanes-Woolf-ov dijagram ovisnosti količnika koncentracije supstrata i brzine reakcije o koncentraciji supstrata za mutant hDPP III-R638L (izrađeno u programu *Microsoft Excel*).



Slika 26. Hanes-Woolf-ov dijagram ovisnosti količnika koncentracije supstrata i brzine reakcije o koncentraciji supstrata za mutant hDPP III-R638W (izrađeno u programu *Microsoft Excel*).

§ 5. ZAKLJUČAK

- Dobar prinos i koncentracija mutiranih proteina kod sva tri mutanta ukazuju na dobro optimiziran postupak ekspresije i pročišćavanja proteina.
- Elektroforetskim metodama potvrđena je približna teoretska masa od 83,5 kDa „divljeg“ tipa hDPP III i mutanata te je dokazano da nije došlo do agregacije i dimerizacije istih.
- Izoelektrično fokusiranje je pokazalo da su izmjerene izoelektrične točke „divljeg“ tipa i mutanata (5,50 – 5,70) malo više od onih teoretskih (5,14 – 5,24) te je mutant hDPP III-E451K pokazao minimalno dvije izoforme.
- Arg₂-2NA koji je najbolji supstrat za „divlji“ tip hDPP III, također je najbolji supstrat za mutante R638L i R638W što je očekivano pošto se navedena aminokiselina ne nalazi u blizini veznih mjesta za supstrat.
- Optimalna pH sredina za oba mutanta koji pokazuju aktivnost bila je pri pH 8,6.
- Mutant hDPP III-E451K koji ima mutaciju u katalitičkom mjestu enzima nema enzimске aktivnosti.
- Mutant R638L ima 61 %, a mutant R638W 36 % aktivnosti u odnosu na „divlji“ tip hDPP III.
- Mutant hDPP III-R638L pokazuje veću aktivnost od mutanta R638W što se i pretpostavljalo zbog mogućeg steričkog smetanja velike aminokiseline kao što je triptofan (W).

- Naši rezultati ne ukazuju da bi ispitivani mutanti mogli imati ulogu u nastanku zloćudnih tumora, ali potrebno je provesti dodatna istraživanja potencijalne uloge mutanta u kontroli Nrf2/Keap1 signalnog puta da bi u potpunosti odbacili tu mogućnost.

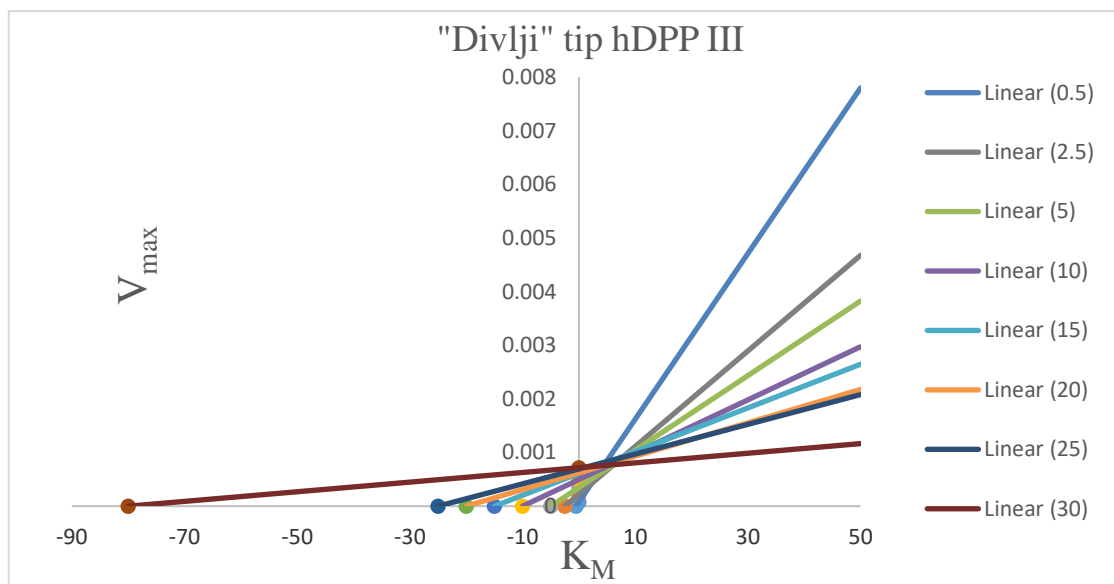
§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 205–222, 649–652.
2. A.J. Barrett, J. Chen, J. F. Woessner, N. D. Rawlings, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London, 2013, str. 1285–1287.
3. N. D. Rawlings, A. J. Barrett, *Introduction: metallopeptidases and their clans*, u A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner (ur.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, str. 231–268.
4. M. A. Sentandreu & Toldra F *Generation of ACE inhibitory peptides by pork muscle dipeptidyl peptidase I and III*, *Food Chem.* (2005).
5. J. Fichna, A. Janecka, J. Costentin, J. C. Do Rego, *Pharmacol. Rev.* **59** (2007) 88–123.
6. Y. Liu, J. T. Kern, J. R. Walker, J. A. Johnson, P. G. Schultz, H. Luesch, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104** (2007) 5205–5210.
7. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, J. Ilić-Forko, Lj. Vitale, D. Miličić, M. Abramić, *Eur. J. Cancer* **34** (1998) 399–405.
8. B. E. Hast, D. Goldfarb, K. M. Mulvaney, M. A. Hast, P. F. Siesser, F. Yan, D. N. Hayes, M. B. Major, *Cancer Res.* **73** (2013) 2199–2210.
9. E. Cerami, J. Gao, U. Dogrusoz, B. E. Gross, S. O. Sumer, B. A. Aksoy, A. Jacobsen, C. J. Byrne, M. L. Heuer, E. Larsson, Y. Antipin, B. Reva, A. P. Goldberg, C. Sander, N. Schultz, *Cancer Discover.* **2** (2012) 401–404.
10. <http://www.cbioportal.org/> (datum pristupa 11. lipnja 2018.).
11. X. S. Puente, L. M. Sanchez, A. Gutierrez-Fernandez, G. Velasco, C. Lopez-Otin, *Biochem. Soc. Trans.* **33** (2005) 331–334.
12. C. Lopez-Otin and J. S. Bond, *JBC* **283** (2008) 30433–30437.
13. V. T. Karamyan and R. C. Speth, *Regul. Peptides* **143** (2007) 15–27.
14. <https://biologydictionary.net/hydrolyze/#ftoc-heading-5> (datum pristupa 11. lipnja 2018.).
15. S. C. Prajapati and S. S. Chauhan, *FEBS J.*, **278** (2011) 3256–3276.

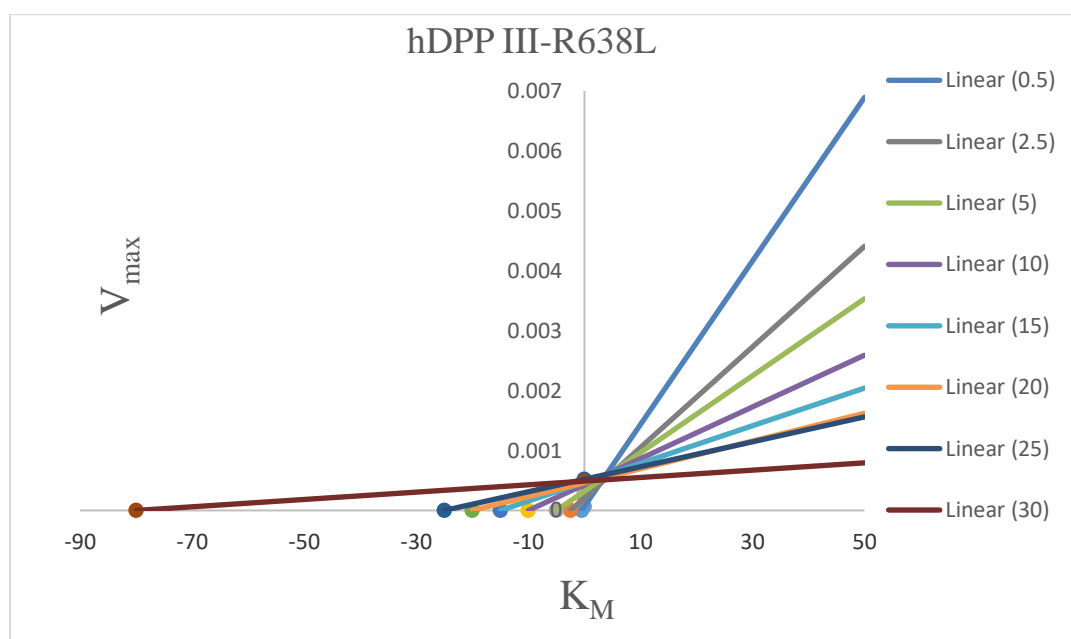
16. M. Abramić, M. Zubanović, Lj. Vitale, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369** (1988) 29–38.
17. A. C. Rosenzweig, *Chem. Biol.* **9** (2002) 673–677.
18. S. Ellis, J. M. Nuenke, *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 4623–4629.
19. E. Dobrovetsky, A. Dong, A. Seitova, B. Duncan, L. Crombet, M. Sundstrom, C. H. Arrowsmith, A. M. Edwards, C. Bountra, A. Bochkarev i dr., *Crystal structure of human dipeptidyl peptidase III*. Structural Genomics Consortium (SGC), (2009).
20. G. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramic, K. Gruber, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109** (2012) 6525–30.
21. P. K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić, K. Gruber, *J. Biol. Chem.* **283** (2009) 22316–22324.
22. W. Chadwick, R. Brenneman, B. Martin, S. Maudsley, *Int. J. Alzheimers Dis.* (2010) 1–56.
23. S. Sobočanec, V. Filić, M. Matovina, D. Majhen, Ž. Mačak Šafranko, M. Popović Hadžija, Ž. Krsnik, A. Gudan Kurilj, A. Šarić, M. Abramić, T. Balog, *Redox Biology* **8** (2016) 49–159
24. J. Blenis, M. D. Resh, *Curr. Opin. Cell Biol.* **5** (1993) 984–989.
25. H. Sato, K. Kimura, Y. Yamamoto, T. Hazato, *Masui* **52** (2003) 257–263.
26. V. K. Hopsu-Havu, C. T. Janse´n, *Arch. Klin. Exp. Dermatol.* **235** (1969) 53–62.
27. M. Abramić, D. Schleuder, L. Dolovčak, W. Schroder, K. Strupat, D. Sagi, J. Peter-Katalini, L. Vitale, *Biol. Chem.* **381** (2000) 1233–1243.
28. R. C. Mierendorf, B. B. Morris, B. Hammer, R. E. Novy, *Methods Mol. Med.* **13** (1998) 57–92.
29. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-biology-products/alicator-cloning-system.html> (datum pristupa 11. lipnja 2018.).
30. QuikChange® site-directed mutagenesis method – Agilent, <https://www.genomics.agilent.com/article.jsp%3FpageId%3D388> (datum pristupa 12. lipnja 2018.).
31. S. B. Primrose, R. M. Twyman, *Principles of gene manipulation and genomics*, Blackwell Publishing, UK, 2006, str. 25–27, 37–40, 462.

32. S. Magdeldin and A. Moser, *Affinity Chromatography: Principles and Applications* (2012).
33. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf (datum pristupa 12. lipnja 2018.).
34. http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/AMERSHAM_PD10Desalting.pdf (datum pristupa 12. lipnja 2018.).
35. J. Špoljarić, *Metalopeptidaze porodice M49: heterologna ekspresija, pročišćavanje i karakterizacija ljudskog ortolognog enzima*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2010,
36. J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, J. Makarević, B. Vukelić, D. Agić, Š. Šimaga, N. Jajčanin-Jozić, M. Abramić, *Bioorganic Chem.* **37** (2009) 70–76.
37. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> (datum pristupa 21. kolovoza 2018.).
38. M. Matovina, D. Agić, M. Abramić, S. Matić, Z. Karačić, S. Tomić *RSC Adv.* **7** (2017) 36326–36334.

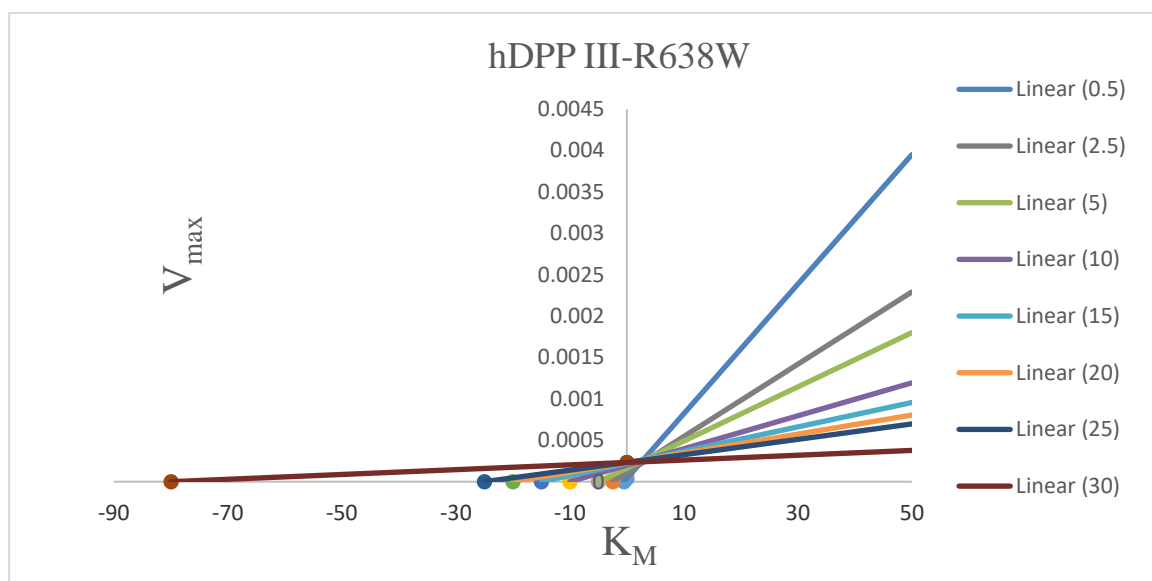
§ 7. DODATAK



Slika D1. Eisenthal-Cornish Bowden-ov graf u ovisnosti brzine V_{\max} o koncentraciji K_M za "divlji" tip hDPP III (izrađeno u programu *Microsoft Excel*).



Slika D2. Eisenthal-Cornish Bowden-ov graf u ovisnosti brzine V_{\max} o koncentraciji K_M za hDPP III-R638L (izrađeno u programu *Microsoft Excel*).



Slika D3. Eisenthal-Cornish Bowden-ov graf u ovisnosti brzine V_{max} o koncentraciji K_M za hDPP III-R638W (izrađeno u programu *Microsoft Excel*).

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Goran Pipalović

Datum rođenja: 30. 01. 1993.

Mjesto rođenja: Sisak

Obrazovanje:

1999.–2007. Prva osnovna škola, Petrinja

2007.–2011. Tehnička škola, Sisak

2011.–2014. Preddiplomski studij Odjel za kemiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

2014.–2018. Diplomski studij Analitičke kemije i biokemije, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu

Radno iskustvo:

2016. – 2018. – promocija i hostesiranje (MPG d.o.o.) u Zagrebu

2016. – 2018. – rad u kinu CineStar Novi Zagreb (Avenue Mall centar)

Strani jezici:

Engleski