

# Interdisciplinarno istraživanje mutanata R620C, R623W i R623L ljudske dipeptidil-peptidaze III

---

Hanić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:139763>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Maja Hanić

**INTERDISCIPLINARNO ISTRAŽIVANJE  
MUTANATA R620C, R623W I R623L  
LJUDSKE  
DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE III**

**Diplomski rad**

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

Zagreb, 2020.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratorij za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Mihaele Matovina i prof. dr. sc. Sanje Tomić te neposrednim voditeljstvom mag. mol. biol., Sare Matić. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Morana Dulić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Biolška važnost dipeptidil peptidaze III i njezin utjecaj na zdravlje čovjeka“ (IP-2018-01-2936), voditeljice prof. dr. sc. Sanje Tomić.



## Zahvale

*Tokom studija čovjek brzo nauči da je od najveće važnosti naučiti djelovati neovisno, no naravno studij ne bi bio isti bez kolega. Lako je pisati zahvalu pri predaji diplomskog rada, no najviše želim zahvaliti kolegama koji nisu odustali kad im je bilo teško, jer su i meni dali time poticaj. Želim zahvaliti ženama bez kojih meni danas ne bi bilo dopušteno obrazovanje na fakultetu. Želim zahvaliti genima odgovornima za ljudsku radoznalost i intrigu, jer bez njih ne bi bilo niti znanosti.*

*Hvala kolegice i kolege, prijateljice i prijatelji svih generacija.*

*Hvala profesoricama i profesorima koji su svojim inspirativim predavanjima pokazali što je to prekrasno u kemijskoj znanosti.*

*Hvala mentoricama dr. sc. Mihaeli Matovini i prof. dr. sc. Sanji Tomić koje su me vodile kroz diplomski rad, a pogotovo veliko hvala Sari Matić koja je uvijek bila spremna pomoći.*

*Hvala roditeljima, Ivici i Jasni, koji su me poticali kroz cijeli studij. Posebno zahvaljujem ocu na svim vožnjama, a mami na svoj brizi.*

*Hvala sestrici Sanji na svim ispitivanjima (dan prije usmenog) iz gradiva o kojima nije ništa razumjela.*

*Hvala bratu Denisu na pomoći oko printanja i također vožnjama.*

*Hvala i bratu Zlatku koji je dokazao da se sve može s radom i upornošću.*

*Hvala mom dragom Domagoju što je imao vjere kad ja nisam. Ne znam kako bi uspjela bez toga.*

*Ovaj diplomski rad posvećujem svom dragom ocu.*

*"Ako sam i vidio dalje od drugih, to je zato što sam stajao na ramenima divova."*

*- Isaac Newton*



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>XIV</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Proteolitički enzimi .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Dipeptidil-peptidaza III.....</b>	<b>16</b>
2.2.1. Klasifikacija i struktura .....	16
2.2.2. Biološka uloga.....	17
2.2.3. Mehanizam katalize.....	19
2.2.4. Interakcija s proteinom Keap1.....	22
<b>2.3. Računalna kemija .....</b>	<b>23</b>
2.3.1. Metoda polja sila .....	23
2.3.2. Simulacije molekulske dinamike .....	24
2.3.3. AMBER polje sila.....	25
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1. Materijali .....</b>	<b>27</b>
3.1.1. Kemikalije .....	27
3.1.2. Marker i veličine i boje .....	27
3.1.3. Sojevi bakterija .....	27
3.1.4. Komercijalni kompleti Komercijalni kompleti.....	27
3.1.5. Sintetski supstrat .....	27
3.1.6. Enzimi .....	27
3.1.7. Uređaji .....	28
3.1.8. Kolone i punila za kolonu .....	28
<b>3.2. Metode rada s nukleinskim kiselinama.....</b>	<b>28</b>
3.2.1. Ciljana in vitro mutageneza.....	28
<b>3.3. Metode rada s bakterijama .....</b>	<b>32</b>
3.3.1. Kemijska transformacija bakterija za unos plazmida.....	32
3.3.2. Odabir kolonija s ploče i postav prekonoćnog uzgoja rekombinantnog plazmida .....	33
3.3.3. Izolacija rekombinantnog plazmida.....	34
3.3.4. Fizikalna transformacija bakterija .....	35
3.3.5. Uzgoj početne bakterijske kulture i kulture za ekspresiju proteina .....	36





---

3.3.6. Liza i sonikacija bakterijskih stanica.....	37
<b>3.4. Metode rada s proteinima .....</b>	<b>38</b>
3.4.1. Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom.....	38
3.4.2. Analiza SDS-gel-elektroforezom .....	39
3.4.3. Odsoljavanje na PD-10 koloni.....	41
3.4.4. Ukoncentriravanje proteina .....	41
<b>3.5. Biokemijska karakterizacija proteina.....</b>	<b>42</b>
3.5.1. Određivanje specifične aktivnosti .....	42
3.5.2. Mjerenje kinetike na fluorimetru.....	43
3.5.3. Termoforeza na mikroskali .....	43
<b>3.6. Računalne metode .....</b>	<b>45</b>
3.6.1. MD simulacije .....	45
<b>3.7. Analize promjene geometrije .....</b>	<b>46</b>
3.7.1. RMSD (engl. root mean square deviation) .....	46
3.7.2. RMSF (engl. root mean square fluctuations).....	46
3.7.3. Vodikove veze .....	47
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1. Analiza pročišćavanja mutanata proteina denaturirajućom gel elektroforezom .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2. Aktivnost mutanata.....</b>	<b>50</b>
4.2.1. Test specifične aktivnosti .....	50
4.2.2. Mjerenje kinetike enzimske reakcije na fluorimetru .....	51
<b>4.3. Termoforeza na mikroskali.....</b>	<b>52</b>
<b>4.4. Računalne metode .....</b>	<b>54</b>
4.4.1. Analize promjene geometrije.....	54
4.4.2. Vodikove veze .....	58
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>60</b>
<b>§ 6. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>61</b>
<b>§ 7. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>64</b>





## SAŽETAK

### Interdisciplinarno istraživanje mutanata R620C, R623W i R623L ljudske dipeptidil-peptidaze III

Maja Hanić

Ljudska dipeptidil-peptidaza III (hDPP III) uz katalitičku aktivnost cijepanja dipeptida s N-kraja oligopeptida ima ulogu regulacije Keap1–Nrf2 signalnog puta. Keap1 protein veže Nrf2, transkripcijski faktor ključan za antioksidativni odgovor stanice te ga usmjerava prema ubikvitinaciji. Interakcija između domene Kelch proteina Keap1 i faktora Nrf2 ostvaruje se preko ETGE motiva na Nrf2, a isti motiv sadrži hDPP III. Dokazano je da vezanje hDPP III za Keap1 sprječava deaktivaciju Nrf2 što rezultira pojačanom ekspresijom antioksidativnih gena. Nemogućnost deaktivacije faktora Nrf2 povećava otpornost prema antitumorskim terapijama. Na internetskom portalu za genomiku raka cBioPortal nalaze se genomske sekvence mutanata hDPP III pronađene u stanicama raka. U ovom radu, istraživana je utjecaj tri supstitucije iz navedene baze, R620C, R623L i R623W na peptidaznu aktivnost i interakciju hDPP III s proteinom Keap1. U istraživanjima su korištene biokemijske i biofizičke metode, te molekulske dinamičke simulacije divljeg tipa proteina i mutanta R623W.  
(65 stranica, 33 slika, 11 tablica, 48 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, fleksibilna petlja, termoforeza na mikroskali, molekulska dinamika, Keap1

Mentorice: dr. sc. Mihaela Matovina, znanstveni suradnik i doc.dr. sc. Sanja Tomić, znanstveni savjetnik

Neposredni voditelj: Sara Matić, mag. mol. biol.

Nastavnik: doc. dr. sc. Morana Dulić

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Morana Dulić
2. prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović
3. doc. dr. sc. Ivan Kodrin

Zamjena: doc.dr.sc. Ivica Đilović

Datum diplomskog ispita: 15. siječnja 2020.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

Interdisciplinary investigation of mutants of human dipeptidyl peptidase III, R620C, R623W and R623L  
Maja Hanić

Besides the catalytic activity of cleaving dipeptides from the N-terminus of oligopeptides, human dipeptidyl peptidase III (hDPP III) has a role in regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway which is a part of the cell's response to oxidative stress. Human DPP III competes with Nrf2 for binding to Keap1 through its ETGE motif. Keap1 directs Nrf2 to ubiquitination but binding of hDPP III to Keap1 hinders Nrf2 deactivation resulting in higher expression of antioxidative genes. A consequence of Nrf2 activation in tumor cells is the increased resistance to antitumor therapies. On the portal for cancer genomics (cBio Portal) genome sequences of the following hDPPP III mutants were found and chosen for further investigation: R620C, R623L and R623W. The influence of these mutations on both the peptidase activity and the interaction with Keap1 was investigated by biochemical and biophysical methods, as well as molecular dynamics simulations.

(65 pages, 33 figures, 11 tables, 48 references, original in Croatian)

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

Keywords: dipeptidyl peptidase III, kinetics, mutagenesis, flexible loop, microscale thermophoresis, molecular dynamics, Keap1

Mentors: Dr. Mihaela Matovina and Dr. Sanja Tomić, Professor

Assistant mentor: Sara Matić, mag. mol. biol.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Morana Dulić, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
  2. Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Professor
  3. Dr. Ivan Kodrin, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Ivica Đilović, Assistant Professor

Date of exam: 1/15/2020



## § 1. UVOD

Proteini mogu imati mnoge uloge u prirodi, od gradivnih do katalitičkih. Proteini koji kataliziraju biološke reakcije nazivaju se enzimima. Enzimi koji cijepaju druge enzime ili peptide nazivaju se proteolitički enzimi. Takav tip enzima je bitan jer onemogućava nakupljanje starih ili neispravnih proteina. Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je proteolitički enzim koji sa širokom specifičnošću cijepa peptide koji se sastoje od 4 do 8 aminokiselina.<sup>1</sup> Takav raspon dužine imaju mnogi peptidi u stanici koji su bitni za različite funkcije npr. enkefalin za regulaciju boli ili angiotenzin II za regulaciju krvnog tlaka.<sup>2</sup> Osim uloge koju DPP III ima zbog svoje proteolitičke aktivnosti, ovaj protein sudjeluje i u signalnom putu Keap1-Nrf2.<sup>3</sup> Keap1 je dimerni adapterski protein koji je zaslužan za ubikvitinaciju spomenutog faktora Nrf2. Nrf2 se u uvjetima oksidativnog stresa translocira u jezgru gdje aktivira gene bitne za antioksidativni odgovor stanice. Kada je protein Keap1 vezan za faktor Nrf2, tada Nrf2 ne može prijeći preko membrane jezgre, no kada se Nrf2 ne može vezati za Keap1 tada se on nakuplja u jezgri.<sup>4</sup> Keap1 veže Nrf2 protein preko motiva ETGE te je pokazano kako i drugi proteini koji sadrže isti motiv mogu sudjelovati u ovom signalnom putu. Na svojoj gornjoj domeni, na fleksibilnoj petlji DPP III sadrži motiv ETGE preko kojeg se može vezati na Keap1 te tako sudjeluje u spomenutom signalnom putu.<sup>5</sup>

Kako bi se istražio utjecaj mutacija dviju aminokiselina na pozicijama 620 i 623 na aktivnost enzima i na interakciju DPP III s Keap1 proizvedeni su odgovarajući mutanti. Spomenute mutacije pronađene su na internetskom portalu za genomiku raka cBioPortal.<sup>6</sup> Navedene mutacije udaljene su od aktivnog mjesta, a njihov utjecaj na katalitičku aktivnost enzima ispitan je pomoću testova specifične aktivnosti i mjerenja kinetike enzimske reakcije. Kako bi se ispitaio učinak mutacija na interakciju s domenom Kelch proteina Keap1 provedena su mjerenja termoforeze na mikroskali. U svrhu dodatnog pojašnjavanja kako navedene mutacije utječu na položaj fleksibilne petlje koja je bitna za interakciju s proteinom Keap1 provedene su simulacije molekulske dinamike.

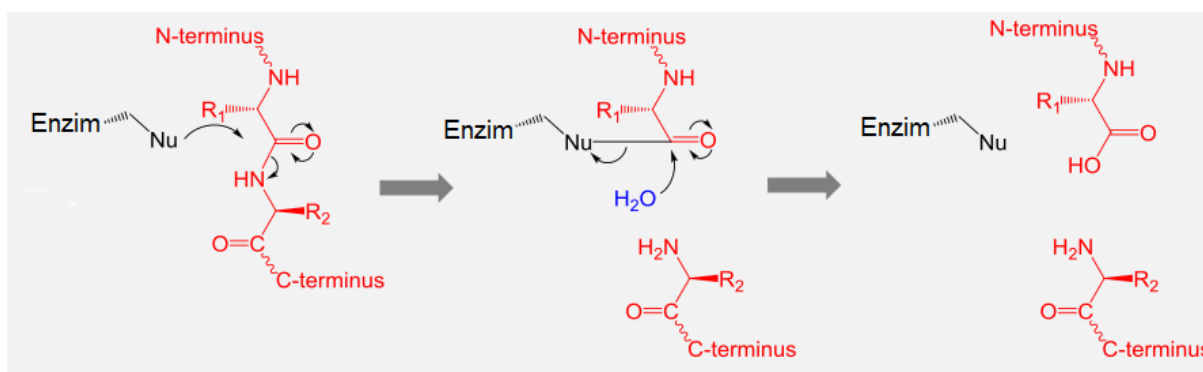


## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Proteolitički enzimi

Enzimi koji hidroliziraju peptidne veze nazivaju se proteolitičkim enzimima. S obzirom na to cijepaju li unutar polipeptidnog lanca ili na krajevima (N- ili C-terminusu) proteolitičke enzime dijelimo na endopeptidaze i egzopeptidaze. Egzopeptidaze koje odcjepljuju samo jednu aminokiselinu s N-terminusa lanca nazivaju se aminopeptidazama, a one koje odcjepljuju dvije ili tri nazivaju se dipeptidil-peptidazama odnosno tripeptidil-peptidazama. One egzopeptidaze koje djeluju na jednu aminokiselinu na C-terminusu nazivaju se karboksipeptidaze, a koje cijepaju više od jedne, odnosno dipeptide nazivaju se peptidil-dipeptidaze.

S obzirom na mehanizam katalize, endopeptidaze se dijele na aspartatske (A), cisteinske (C), metalopeptidaze (M), serinske (S) i treoninske endopeptidaze (T). Kod aspartatskih peptidaza i metalopeptidaza čest nukleofil u katalizi je aktivirana molekula vode, no kod ostalih tipova peptidaza to je atom kisika ili sumpora koji se nalazi u bočnom ogranku.



**Slika 1.** Prikaz cijepanja peptidne veze pomoću aktivirane molekule vode.<sup>7</sup>

S obzirom na homologiju peptidaze se grupiraju u klanove i obitelji. Klan sadrži jednu ili više obitelji koje imaju zajedničko jedinstveno porijeklo. Prikaz pripadnosti određenom klanu je sličnost u 3D strukturi. Ime klana daje se tako da je prvo slovo povezano s katalitičkim tipom peptidaze, a drugo slovo se daje proizvoljno. Homologija na razini obitelji peptidaza očituje se statistički značajnim sličnostima njihovih primarnih sljedova aminokiselina u dijelovima proteina odgovornim za peptidaznu aktivnost, odnosno u peptidaznoj podjedinici, jer mnoge peptidaze imaju i ne-peptidazne podjedinice čija sličnost nije vezana uz peptidaznu aktivnost.<sup>8</sup>

## 2.2. Dipeptidil-peptidaza III

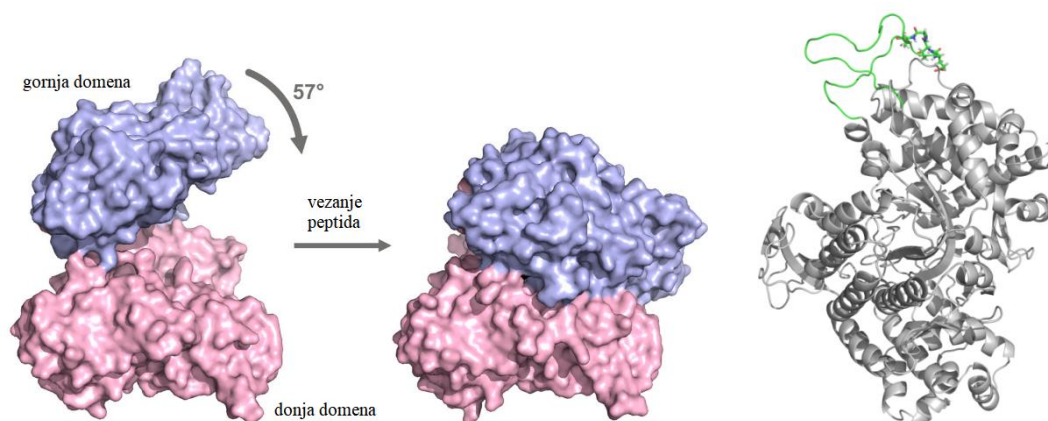
### 2.2.1. Klasifikacija i struktura

Prema MEROPS<sup>9</sup> bazi podataka DPP III pripada MA klanu, podklanu MA(E) te obitelji M49. Kod za DPP III je EC 3.4.14.4. Za proteine MA klana karakteristična je uloga vode u enzimskoj reakciji gdje ona služi kao nukleofil, a vezana je za kation cinka koji je dodatno koordiniran s dva histidina iz motiva HEXXH te glutamatom, histidinom ili aspartatom.<sup>10</sup> Obitelji u MA klanu ujedinjene su zbog postojanja HEXXH motiva u kojem su dva histidinska ogranka ligandi cinka, a glutamat ima katalitičku funkciju. DPP III ima jedinstveni HEXXGH motiv. (slika 2) Prema tipu peptidazne aktivnosti, DPP III spada u egzopeptidaze, odnosno obitelj M49 te spada u klasu hidrolaza koje djeluju na peptidne veze.

Tipični predstavnik MA klana proteina je protein termolizin. Protein termolizin pripada obitelji M4. U ovoj obitelji sve peptidaze vežu jedan katalitički aktivni ion cinka te sadrže HEXXH motiv u kojem su histidinski bočni ogranci ligandi cinka, a glutamat je u aktivnom mjestu. Većina članova ove obitelji su endopeptidaze koje su aktivne pri neutralnom pH. Termolizin ima strukturu od dvije domene, a aktivno mjesto nalazi se između domena. N-terminalnu domenu te obitelji karakterizira beta ploča koja se sastoji od šest lanaca s dvije alfa zavojnice, od kojih jedna sadrži HEXXH motiv koji veže cink. C-terminalna domena nije slična među članovima M4 obitelji. Zbog specifičnog HEXXGH motiva DPP III je jedina poznata peptidaza koja pripada obitelji M49. Enzim iz kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) dijeli tek 37% identiteta primarnog slijeda s enzimom sisavaca, no uzet je kao prototip za ovu obitelj, a s ljudskom DPP III (hDPP III) pokazuje sličnost u tercijarnoj strukturi.<sup>11</sup> hDPP III ima gornju i donju domenu. Konformacijska promjena do koje dolazi prilikom vezanja supstrata tinorfina prikazana je na slici 3. Pretpostavlja se da prvo dolazi do vezanja supstrata za donju domenu, potom do konformacijske promjene što utječe na pozicioniranje kationa cinka koji je ključan za provođenje katalize. Otpuštanje produkta događa se nakon otvaranja domena. Otpuštanje molekula vode koje su vezane u unutrašnjosti proteina dovoljno je da se ovaj proces pogoni entropijom. Ovako veliko pomicanje domena može objasniti zašto DPP III ima tako široku supstratnu specifičnost.<sup>12</sup>

1. <i>Aspergillus sclerotioniger</i>	RFKRVNHIIRFITTSTHELLLGHRTGKLLAESSPGVYNFDEACPPVNTLTGRPVEFSWYRPGQTWTS
2. <i>Coccidioides immitis</i>	RFKRVNHIIRFITTSTHELLLGHRTGKLLAESSPGVYNFDEACPPVNTLTGRPVEFSWYRPGQTWTS
3. <i>Homo sapiens (isoform 1)</i>	TFLKREFAFYLVVVEHELLLGHRTGKLLVENQSSGFNFDEKNAPIINELTGYPIIDSWYKHGQTWTS
4. <i>Homo sapiens (isoform 2)</i>	LYILWKGFSDVQVGIHELLLGHSSGKLFVQDEKGAFFNFQET-VINPETGEQIQSWYRSGETWDS
5. <i>Homo sapiens (isoform 1)</i>	LYILWKGFSDVQVGIHELLLGHSSGKLFVQDEKGAFFNFQET-VINPETGEQIQSWYRSGETWDS
6. <i>Rattus norvegicus</i>	LYILWKGFSDVQVGIHELLLGHSSGKLFVQDEKGAFFNFQET-VINPETGEQIQSWYRSGETWDS
7. <i>Mus musculus</i>	LYIRWKGFSDVQVGIHELLLGHSSGKLFVQDEKGAFFNFQET-VINPETGEQIQSWYRSGETWDS
8. <i>Drosophila melanogaster</i>	LYIRWKGFSDVQVGIHELLLGHSSGKLFVQDEKGAFFNFQET-VINPETGEQIQSWYRSGETWDS
9. <i>Bos taurus</i>	LYIRWKGFSDVQVGIHELLLGHSSGKLFVQDEKGAFFNFQET-VINPETGEQIQSWYRSGETWDS
10. <i>Trichinella spiralis</i>	LMKEYKVKAFEVQVGIHELLLGHSSGKLFQDEKGAFFNFQET-TKNIIVTGEPIITKWYLPGETYDI
11. <i>Necator americanus</i>	LMHKYHKDSFEVQVGIHELLLGHSSGKLFQFNKDGTFNFDK--TKDLITGERVSKWYEPGETWSS
12. <i>Sus scrofa</i>	LFRKYRDEAFEVQVGIHELLLGHSSGKLFQTAEGEFNFVSKPEPVSFIINKPIITWYKPGQTWSS
13. <i>Aspergillus sclerotioniger</i>	LYKTCSRALETQVAHELLLGHSSGKYLRCN-NGKKNFPEL--INPLNGKKMK-VYQDKMTYDI
14. <i>Hyaloscypha bicolor</i>	RIDQYGDITGELHTDIHECLGHSSGKLLPGVDE--DALKAYG-----
15. <i>Entamoeba dispar</i>	LEEEYGVQVADKLHTAIHEVIGHASGQLNPGVGETKETLKYA-----
16. <i>Cavendishia fasciculata</i>	MEKQYGTAFADNLATAIHEALGHASG--LCVVEDESACLQYY-----
17. <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	HIAKINVEVVFVFLINYLILLHASSVLAKRVSIFETITSPKC-----WTC
18. <i>Winogradskyella psychrotolerans</i>	LEEAELFEDLSWSTRVLOPPPOQDEHVQYAGLDFEAILLQESNSPEKTVEMVMMPHGGHSHSEVI

**Slika 2.** Poravnanje je napravljeno pomoću programa ClustalX.<sup>13</sup> Kazna za otvaranje praznine (engl. *gap opening*) je 10, kazna za produljenje praznine (engl. *gap extension*) je 0,2, odgoda divergentnih sekvenci (engl. *delay divergent sequences*) je 30%, a težina tranzicije (engl. *DNA transition weight*) je 0,5. Negativna matrica nije korištena, a matrica bodovanja (engl. *protein weight matrix*) je iz Gonnetove serije.



**Slika 3.** (Lijevo) Pomicanje domena uslijed vezanja tinorfina. Plava boja predstavlja gornju domenu, a roza donju domenu hDPP III enzima.<sup>12</sup> (Desno) Prikaz humanog DPP III enzima. Zelenom boja istaknuta je fleksibilna petlja na kojoj su aminokiseline motiva ETGE prikazane štapićima.

### 2.2.2. Biološka uloga

DPP III je prvi put izolirana 1967. godine iz goveđe hipofize te je prepoznata kao jedna od četiri peptidaze koje cijepaju dipeptidne derivate 2-naftilamina.<sup>14</sup> Postoje i druge dipeptidil-peptidaze, a DPP III je bila treća koja je identificirana. (Tablica 1). Nekada se DPP III zvala i

enkefalinaza B, odnosno angiotenzinaza crvenih krvnih stanica<sup>15,16</sup> što je bilo vezano uz pretpostavke o fiziološkoj ulozi proteina, a tek 1992. dodijeljeno je ime dipeptidil-peptidaza III.

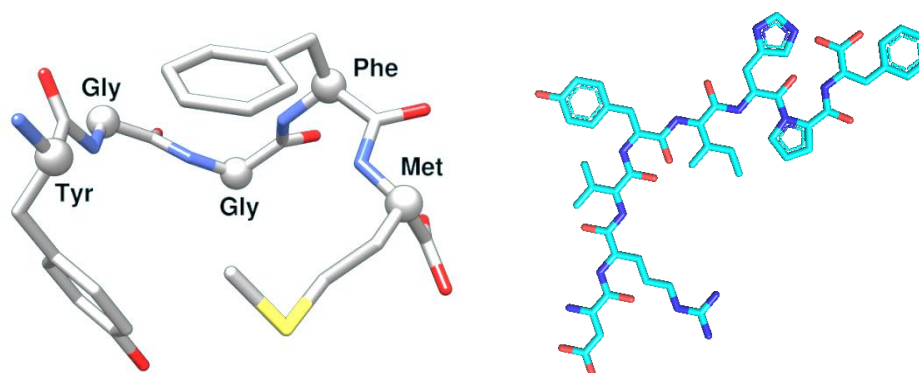
**Tablica 1.** Tablica ostalih poznatih dipeptidil-peptidaza te njihova stanična lokalizacija, aktivnost i pretpostavljena uloga. Preuzeto i prilagođeno iz reference 1. (KCND2 (engl. *potassium voltage-gated channel subfamily D member 2*))

Predloženo ime	Swiss-Prot kod	Klasa peptidaza	Lokacija unutar stanice	Aktivnost	Implikacije/ Fiziološka uloga(e)
Dipeptidil-peptidaza 1/ DPP I/ kathepsin C i J	P53634	Cisteinska peptidaza	Lizosom	Egzo/endopeptidaza	Serinska aktivacija peptidaze / Imunološki odgovor
Dipeptidil-peptidaza 2/ DPP II/ DPP VII/ QPP	Q9UHL4	Serinska peptidaza	Lizosom, citoplazmatske vezikule	Dipeptidil-aminopeptidaza, serinski tip	Hidroliza oligopeptida
Dipeptidil-peptidaza 3/ DPP III	Q9NY33	Metalopeptidaza	Citoplazma	Dipeptidil-aminopeptidaza	Razgradnja proteina, regulacija boli, oksidativnog stresa
Dipeptidil-peptidaza 4/ DPP IV/ CD26	P27487	Serinska peptidaza	Membrana	Dipeptidil-aminopeptidaza	T-stanice odgovor, izvanstanična razgradnja
Dipeptidil-aminopeptidaza-nalik 6 <sup>1</sup> , DPP VI	P42658	Serinska peptidaza	Citoplazma, membrana, jezgra	Dipeptidil-aminopeptidaza	Regulacija ekspresije i aktivacije KCND2
Dipeptidil-peptidaza 8/ DPP VIII	Q6V1X1	Serinska peptidaza	Citoplazma, membrana	Dipeptidil-aminopeptidaza	Imunološki odgovor
Dipeptidil-peptidaza 9/ DPP IX	Q96TI2	Serinska peptidaza	Citoplazma	Dipeptidil-aminopeptidaza	Hidroliza dipeptida proteina
Dipeptidil-peptidaza 10	B4DKB5	Serinska peptidaza	Membrana	Proteoliza	Nedefinirana

Fukasawa i sur. (1998) mapirali su DPP III gen na kromosom 11q12-q13.1. Gen se sastoji od 28 000 baza te sadrži 17 eksona. Biološka uloga DPP III nije točno određena.<sup>17</sup> DPP III je topljivi, citosolni protein te se nalazi u većini tkiva, a pojačano je eksprimiran u jetri, bubregu i nadbubrežnoj žlijezdi.<sup>18</sup> Općenito DPP III pridonosi unutarstaničnom katabolizmu peptida.<sup>2</sup> Lee i Snyder (1982.) analizirali su DPP III iz mozga štakora te zaključili da razgrađuje bioaktivne peptide s najvećim afinitetom za angiotenzine i neuropeptide enkefaline te se pretpostavlja da ima ulogu u regulaciji krvnog tlaka i boli.<sup>2</sup>

DPP III je pronađen u mnogo prokariotskih i eukariotskih vrsta tj. evolucijski je očuvan protein.<sup>1</sup> Pronađen je u ljudskim eritrocitima, neutrofilima, monocitima i limfocitima, posteljici, maternici, sjemenoj plazmi, mišićima, koži, likvoru, stanicama neuroblastoma, jetri štakora itd.

Zbog visokog afiniteta DPP III za angiotenzine, pretpostavlja se da ima i ulogu u regulaciji krvnog tlaka.<sup>19,20</sup> (slika 4) U navedenoj studiji otkriveno je da je DPP III prisutan u ljudskim stanicama neutrofilima te je potvrđeno da igra fiziološku ulogu u regulaciji enkefalina tj. u upalnom mehanizmu u perifernim tkivima. Postoji snažna korelacija između povećane aktivnosti DPP III i histološki agresivnog raka jajnika u čovjeka. Na uzorcima od 108 pacijenata ustanovljeno je da aktivnost DPP III 3,2 - 3,7 puta veća u tumorskom nego u normalnom tkivu jajnika.<sup>21</sup>



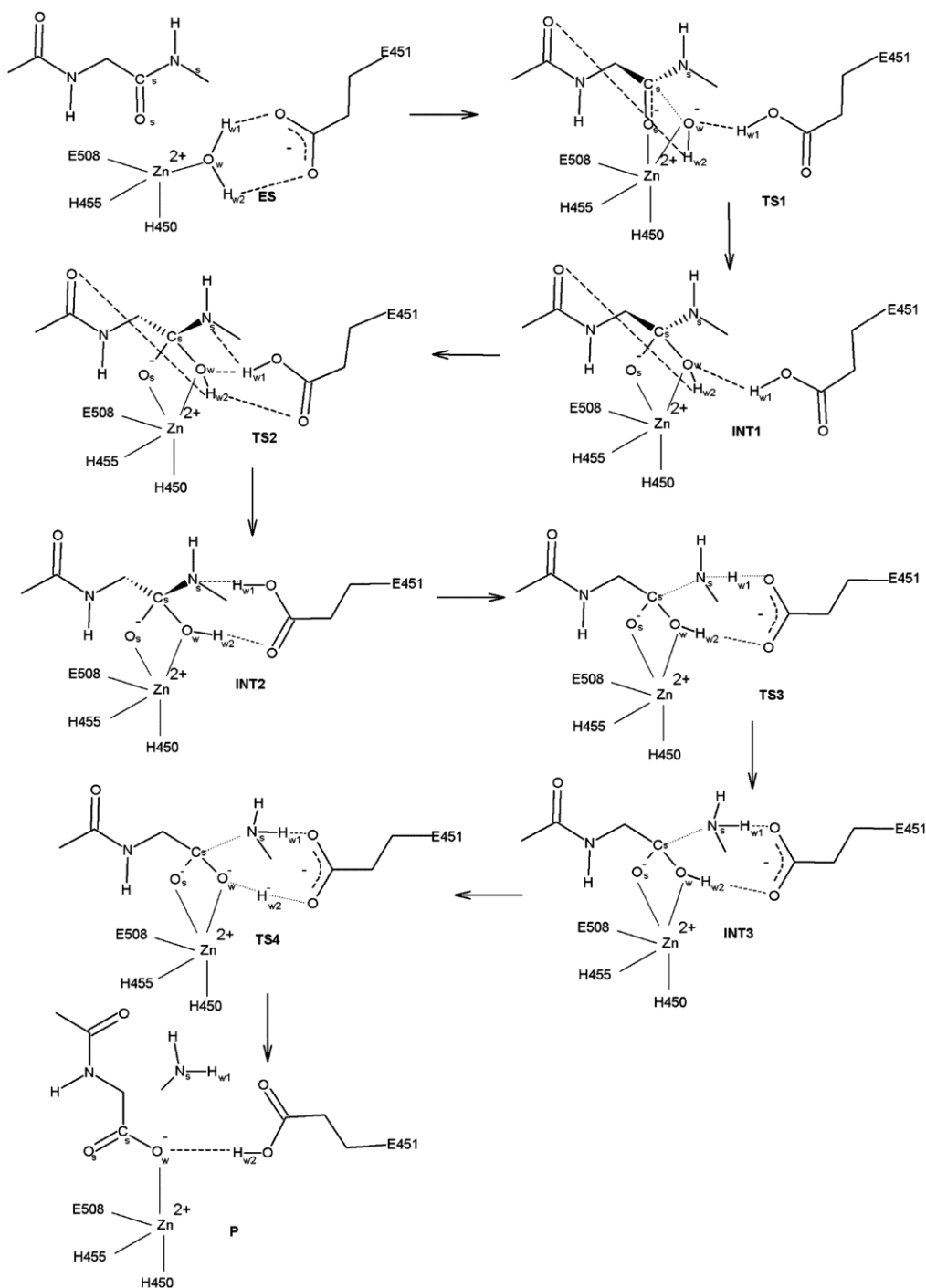
**Slika 4.** Struktura neuropeptida enkefalina (lijevo) i angiotenzina II (desno).<sup>22</sup>

### 2.2.3. Mehanizam katalize

Glutamat iz motiva HEXXGH se ponaša kao opća baza u katalitičkoj reakciji aktivacije vode deprotoniranjem i stoga ima najvažniju ulogu u regulaciji peptidazne aktivnosti ove obitelji. Mutagenезom je ustanovljeno da uklanjanje Glu iz motiva HEXXGH daje protein s 15 000 puta manjom katalitičkom moći, stoga se u zadnje vrijeme predlaže da se DPP III treba

svrstavati u podgrupu cinkovih metalopeptidaza koje koriste glutamat za katalizu.<sup>21</sup> Reakcijski mehanizam u kojem je His568 protoniran, započinje polarizacijom vode od strane negativno nabijenog glutamata na poziciji 451 i kationa cinka. Supstrat je stabiliziran kroz interakciju s cinkovim kationom i preko vodikovih veza koje stvara s glutamatom na poziciji 568 i tirozinom na poziciji 318. Glutamat 451 deprotonira vodu te takva aktivirana molekula vode može nukleofilno napasti amidni ugljik. Cink je pritom koordiniran tetraedarski i to s His450, His455, Glu508 i molekulom vode (slika 5).<sup>23</sup>

DPP III je oligopeptidaza s većim afinitetom djelovanja za one peptide koji se sastoje od četiri do osam aminokiselina.<sup>8</sup> Maksimalna aktivnost divljeg tipa proteina DPP III je između pH vrijednosti 8 i 9, a pri fiziološkom pH (7,4) tek je 45-60% aktivnosti zadržano. Aktivnost DPP III enzima je maksimalna pri pH 9,0 za Arg-ArgNH<sub>2</sub> supstrat, no Shimamori i sur. dokazali su da je raspon prema supstratu humanog DPP III iz posteljice širi pri nižem pH (7,5).<sup>24</sup> Iz još nerazjašnjenih razloga rekombinantni proteini DPP III iz čovjeka i štakora imaju maksimalnu aktivnost za Arg-ArgNH<sub>2</sub> supstrat pri pH 8,0.<sup>25</sup> Termalna inaktivacija DPP III događa se iznad 40–50°C. Pročišćeni DPP III osjetljiv je na smrzavanje, ali u 40–50% glicerolu i dubokom smrzavanju na –10°C može zadržati aktivnost bar godinu dana.<sup>19</sup> DPP III je metalopeptidaza koja sadrži cinkov kation stoga je očekivano da je metalni kelator poput EDTA inhibitor, no inhibicija nije trenutna te je potrebna visoka koncentracija i produžena inkubacija.<sup>25</sup>



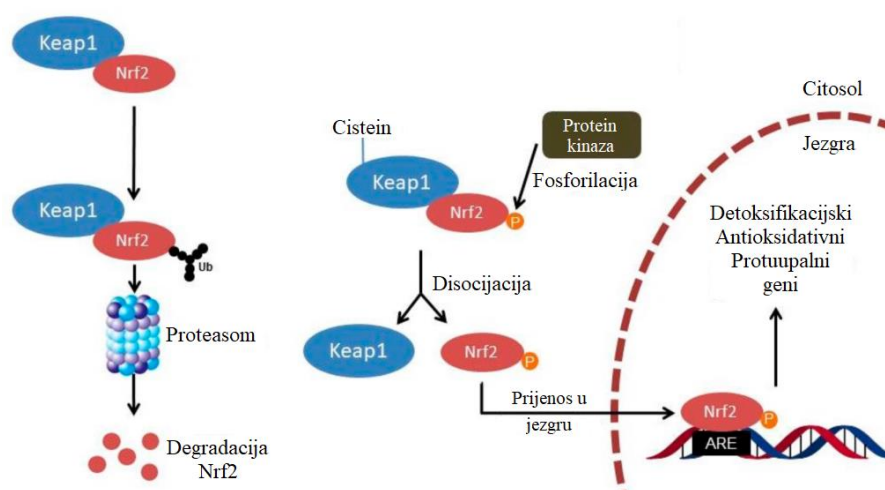
**Slika 5.** Mehanizam katalize kidanja amidne veze dipeptidil-peptidaze III. Izračun proveden na hidratiziranom kompleksu hDPP III s Leu-enkefalinom. Izračuni su provedeni QM/MM metodom, pri čemu je MM dio parametriziran AMBER poljem sila parm96, a QM dio razmatran je DFT metodom B97D na 6-31G(d)+LanL2DZ-ECP razini teorije. ES je oznaka za kompleks enzim-supstrat, TS za prijelazno stanje (engl. *transition state*), a INT za intermedijer.<sup>23</sup>

#### 2.2.4. Interakcija s proteinom Keap1

Odgovor stanice na oksidativni stres ili elektrofile posredovan je ekspresijom antioksidativnih gena koji kodiraju detoksifikacijske enzime. Ta ekspresija i indukcija gena regulirana je od strane antioksidativnog reagirajućeg elementa (engl. *antioxidant response element* - ARE). ARE je cis-djelujući regulatorni element (slijed: 5'-GTGACnnGC-3') koji se nalazi u promotorima mnogih gena koji kodiraju detoksifikacijske enzime te se aktivira uslijed djelovanja reaktivnih oksidativnih vrsta, ali i od strane elektrofilnih agenasa.<sup>26</sup> Nrf2 je antioksidativni transkripcijski faktor koji aktivira ARE, a protein Keap1 je negativni regulator transkripcijskog faktora Nrf2.<sup>4</sup> Kako bi se dokazalo da je Keap1 zaista regulator Nrf2 u eksperimentu je uklonjen gen za Keap1 te je primijećeno prekomjerno nakupljanje Nrf2 u jezgri što je dugoročno štetno za stanicu.<sup>27</sup> U istraživanjima koja se bave genomikom raka dokazano je da se u stanicama raka učestalo pojavljuju mutacije koje uzrokuju pretjeranu aktivaciju faktora Nrf2 te smanjenje aktivnosti proteina Keap1.<sup>28</sup> Većina pronađenih mutacija nalazi se u regiji ETGE ili DLG motiva proteina Nrf2 preko kojih se Keap1 i Nrf2 vežu. Pri normalnim uvjetima (kada nema oksidativnog stresa) dimer proteina Keap1 veže se na jednu molekulu Nrf2 te tako pozicionira Nrf2 za ubikvitinaciju.<sup>3</sup> Dokazano je da mutacije u faktoru Nrf2 dovode do slabije interakcije s proteinom Keap1.<sup>29</sup>

Pokazano da proteini koji sadrže isti ili sličan motiv također mogu vezati Keap1 i dovesti do deregulacije Keap1-Nrf2 signalnog puta (slika 6).<sup>5</sup> Vezanjem proteina Keap1 na druge proteine onemogućuje se njegovo vezanje s faktorom Nrf2 što znači da manji udio Nrf2 biva ubikvitiniran što rezultira povećanom koncentracijom Nrf2 u stanici. Jedan od proteina koji ima ETGE motiv i veže Keap1 je i protein DPP III.<sup>5</sup> U cBioPortal bazi podataka naveden je niz mutacija gena DPP III nađenih u uzorcima raka.<sup>30</sup> Odabrane su 3 mutacije koje se u trodimenzionalnoj strukturi proteina hDPP III nalaze blizu petlje koja sadrži ETGE motiv. Kako bi se istražio utjecaj mutacija R620, R623L i R623W na enzimsku aktivnost i interakciju s domenom Kelch proteina Keap1 pripremljeni su mutirani proteini te su analizirani biokemijskim, biofizičkim i metodama računalne kemije.





Slika 6. Interakcija proteina Keap1 i Nrf2. Preuzeto i prilagođeno iz reference 31.

### 2.3. Računalna kemija

Računalna kemija je podgrupa teorijske kemije u kojoj se matematičke metode kombiniraju s fundamentalnim zakonima fizike kako bi se proučavali kemijski procesi pri čemu se kao alat koristi računalo.<sup>32</sup> Računalna kemija koristi se za računanje i predviđanje strukturnih i elektronskih svojstava molekula, ali i za predviđanje konformacijskih promjena i mehanizama kemijskih reakcija. S obzirom na razinu teorije koju koriste metode u računalnoj kemiji mogu biti kvantno-mehaničke (lat. *ab initio* metode, te metode funkcionala gustoće), semiempirijske i empirijske. Kvantno-mehaničke metode omogućuju proučavanje elektronskih svojstva molekula, no primjenjive su samo za male molekule. Empirijskim metodama ne mogu se proučavati subatomska svojstva molekule, no zato su primjenjive za velike molekularne sustave i biološke makromolekule poput proteina.

#### 2.3.1. Metoda polja sila

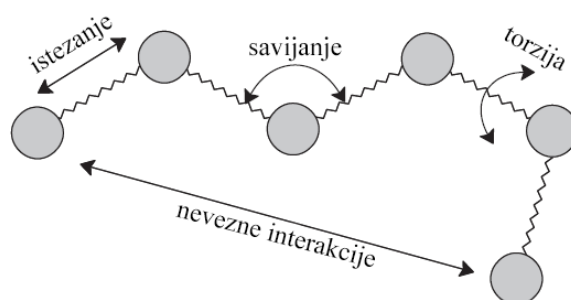
Jedan od glavnih izazova u računalnoj kemiji je izračun elektronske energije za danu konfiguraciju jezgri kako bi se dobila ploha potencijalne energije (engl. *potential energy surface* - PES). U metodama koje koriste polje sila (engl. *force field*) ovaj problem se zaobilazi uvođenjem odgovarajućih tipova atoma i parametara kojima se njihove interakcije u sustavu opisuju. U metodi polja sila osnovni gradivni elementi su atomi, tj. elektroni se ne gledaju kao zasebne čestice, a način međudjelovanja atoma odnosno njihova povezanost u sustavu eksplicitno se definira. Parametri polja sila mogu se odrediti eksperimentalno, primjerice spektroskopskim metodama, i/ili kvantno-mehaničkim računima. Kvantno-mehanički računi

provode se na manjim sustavima, nakon čega se dobiveni rezultati uz odgovarajuće aproksimacije i pretpostavke koriste za parametrizaciju većih sustava.<sup>32</sup>

Osnovna pretpostavka metode polja sila je da su molekule sastavljene od jedinica koje su strukturno slične u različitim molekulama. U metodama polja sila stoga postoje tipovi atoma koji ovise o atomskom broju i tipu kemijskih veza u kojima sudjeluju. Tip može biti označen brojem ili slovom. Na primjer, u polju sila MM2 postoji 71 različitih tipova atoma. Tip 1 predstavlja  $sp^3$  hibridizirani ugljik. Osnovni izraz za potencijalnu energiju sustava u aproksimaciji polja sila  $E_{PE}$  je suma energija za vezne i nevezne interakcije i može se napisati u obliku:

$$E_{PE} = E_{istezanje} + E_{savijanje} + E_{torzija} + E_{vdw} + E_{el}$$

$E_{istezanje}$  predstavlja funkciju koja opisuje promjenu energije sustava zbog odstupanja duljine kovalentne veze između dva atoma od ravnotežne vrijednosti,  $E_{savijanje}$  predstavlja funkciju koja opisuje promjenu energije sustava nastalu odstupanjem valentnog kuta od ravnotežne vrijednosti,  $E_{torzija}$  predstavlja energiju za rotaciju oko kovalentne veze, a  $E_{vdw}$  i  $E_{el}$  predstavljaju nevezne interakcije među atomima (slika 7).<sup>32</sup>



**Slika 7.** Prikaz osnovnih sila u izrazu za energiju.<sup>32</sup>

### 2.3.2. Simulacije molekulske dinamike

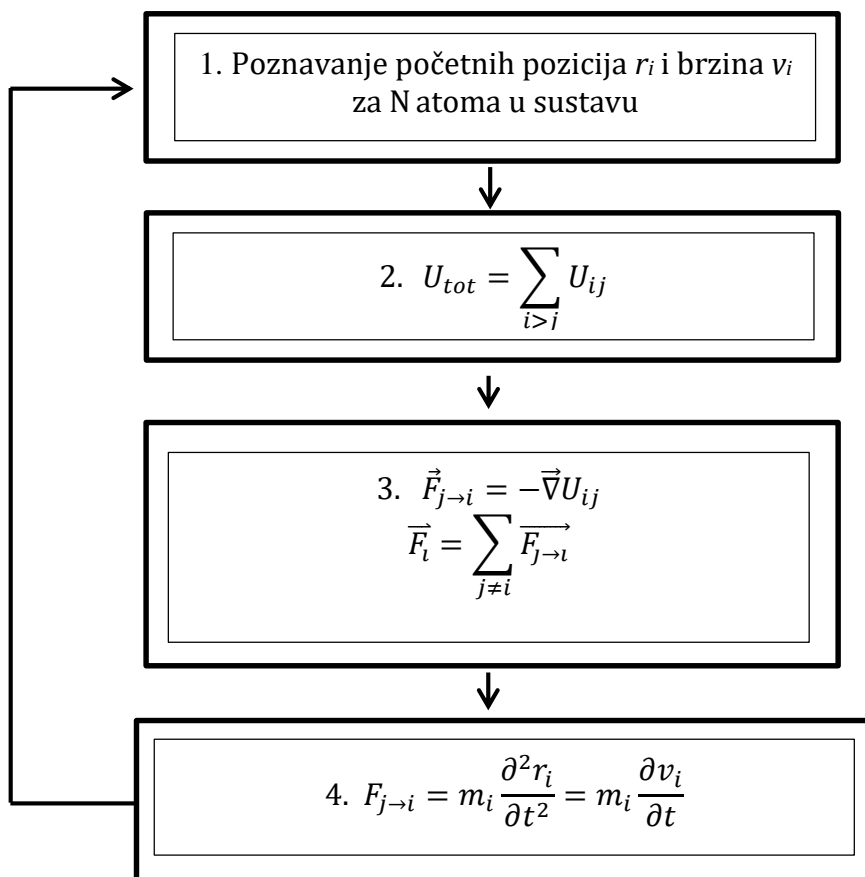
Molekulska dinamika (MD) je grana računalne kemije koja se zasniva na pretpostavci da se sva neelektronska svojstva nekog sustava mogu dobiti iz poznavanja početnih položaja, odnosno početne konfiguracije sustava i brzina atoma. Poznavajući te dvije osnovne veličine i polje sila koje opisuje međudjelovanje atoma, pomoću drugog Newtonovog zakona i korištenjem jednadžbi gibanja možemo pratiti evoluciju sustava u vremenu (slika 8), tj. odrediti njegovu trajektoriju.

1. Potrebno je poznavati početne položaje svih atoma (koordinate) te početne brzine atoma.
2. Poznavanje međusobnih položaja atoma omogućuje nam određivanje potencijalne energije sustava,  $U_{\text{tot}}$  odnosno sume energija između svih parova atoma u sustavu.
3. Iz poznate energije atoma koju oni imaju zbog svog međudjelovanja s ostatkom sustava možemo odrediti silu na svaki pojedini atom kao negativni gradijent njegove potencijalne energije, pri čemu je ona rezultat odstupanja sustava iz ravnotežnog položaja.
4. Pošto nam je poznata sila koja djeluje na  $i$ -ti atom mase  $m$ , možemo pomoću drugog Newtonovog zakona ( $F=ma$ ) odrediti njegovu akceleraciju, a zatim i brzinu i položaj koji će imati nakon vremenskog intervala  $dt$ .

U složenom sustavu bioloških makromolekula rješavanje velikog broja diferencijalnih jednadžbi gibanja, kao što je Newtonova jednadžba spomenuta u 4. koraku, analitičkim putem je neizvedivo te se one rješavaju različitim numeričkim metodama.<sup>33</sup>

### 2.3.3. AMBER polje sila

AMBER (engl. *Assisted Model Building with Energy Refinement*) označava programski paket za parametrizaciju, simulacije i analizu sustava bioloških molekula pri čemu se može koristiti niz različitih polja sila (povijesno AMBER polja sila). Program i polje sila razvila je grupa prof. Petera Kollmana na Sveučilištu u Kaliforniji u San Franciscu.



Slika 8. Dijagram koji prikazuje način generiranja podataka u MD simulacijama.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

20% glukoza,  $\beta$ -merkaptoetanol, HCl, magnezijev klorid ( $MgCl_2$ ), kobaltov (II) klorid ( $CoCl_2$ ), natrijev hidroksid (NaOH), natrijev klorid (NaCl), izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid (IPTG), ampicilin (Amp), *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin (TEMED), akrilamid/bisakrilamid, amonijev persulfat (APS), tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris), Fast Blue BN (FBB), Tween 80, imidazol, natrijev dodecilsulfat (SDS), trikloroetena kiselina (TCA)

#### 3.1.2. Markeri veličine i boje

*Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB)*, *PageRuler Prestained Protein Ladder*, *Toluidine Blue* boja.

#### 3.1.3. Sojevi bakterija

*BL21 Ril+*, *XL10-Gold*

#### 3.1.4. Komercijalni kompleti Komercijalni kompleti

*QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)* kit korišten je za ciljanu *in vitro* mutagenezu.

*GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific)* korišten je za izolaciju i pročišćavanje plazmida iz bakterija.

#### 3.1.5. Sintetski supstrat

Diarginil-2-naftilamid (Arg-Arg-2NA)

#### 3.1.6. Enzimi

Deoksiribonukleaza I (Dnaza I), restrikcijski enzim *DpnI* - NEB, *Pfu* DNA-polimeraza

### 3.1.7. Uređaji

Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuga, Monolith NT.115 (Nanotemper), Hettich Universal 320R centrifuga, Eppendorf 5415 R centrifuga, BioDrop (Isogen - Life sciences), fluorescentni spektrofotometar Cary Eclipse (Agilent)

### 3.1.8. Kolone i punila za kolonu

Punilo za kolonu za afinitetnu kromatografiju: Ni-NTA agarozna - Qiagen, kolona za odsoljavanje peptida PD-10 Desalting column (GE Healthcare); punilo Sephadex G-25.

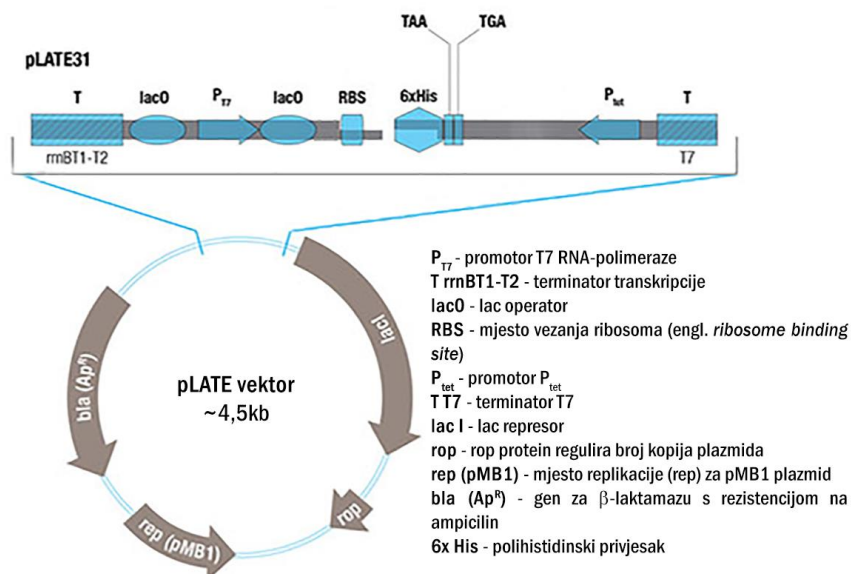
## 3.2. Metode rada s nukleinskim kiselinama

### 3.2.1. Ciljana *in vitro* mutageneza

Kako bi se dobile željene mutacije na hDPP III proteinu potrebno je mutirati gen na određenom mjestu u genomu. Za potrebe ciljane *in vitro* mutageneza naručene su sintetizirane početnice koje sadrže željenu mutaciju. Za mutaciju arginina na 620. poziciji u cistein kodon CGC mutiran je u TGC, za mutaciju arginina na 623. poziciji u leucin kodon CGG mutiran je u CTG, a za mutaciju arginina na 623. poziciji u triptofan kodon CGG mutiran je u TGG (tablica 2).

Vektor koji se koristio za prekomjernu ekspresiju proteina hDPP III jest pLATE31 koji je prikazan na slici 9. Na slici 10 prikazan je vektor pLATE31 s ugrađenim genom za hDPP III. pLATE31 ekspresijski vektor koristi elemente iz bakteriofaga T7 za kontrolu ekspresije gena iz *E. coli*. Pomoću snažnog T7 promotora kojeg specifično prepoznaje T7-RNA-polimeraza omogućuje se ekspresija gena od interesa, u ovom slučaju gena za hDPP III. Prilikom ekspresije mora se koristiti soj *E. coli* BL21 (DE3) u kojem je gen za ekspresiju T7-RNA-polimeraze pod kontrolom inducibilnog promotora poput *lacUV5*. Nakon indukcije izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozidom (IPTG-om) dolazi do ekspresije T7-RNA-polimeraze te tako može započeti transkripcija gena koji se nalaze iza T7 promotora. Kako bi se spriječila bazalna ekspresija T7-RNA-polimeraze ugrađeni su dodatni elementi poput dva *lac* operatora koji oslabljuju T7 promotor i služe kao vezno mjesto za *lac* represor (koji je kodiran *lacI* genom). Terminator *rrnBT1-T2* postavljen je uzvodno od klonirajućeg mjesta kako bi se dodatno spriječila bazalna ekspresija vektora. Dodatno, slabi Tet promotor ( $P_{tet}$ ) djeluje u smjeru suprotnom od T7 promotora, te se tako također smanjuje bazalna ekspresija. Ciljni gen je

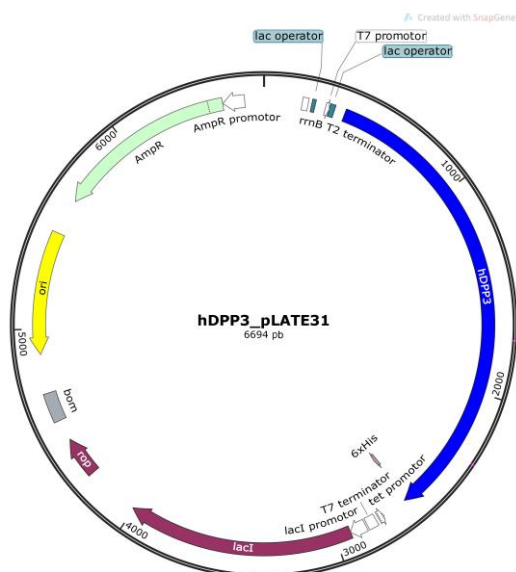
direktno kloniran u linearizirani pLATE vektor. Polihistidinski privjesak omogućuje pročišćavanje proteina pomoću afinitetne kromatografije te se također nalazi ukloniran u vektoru.<sup>34</sup>



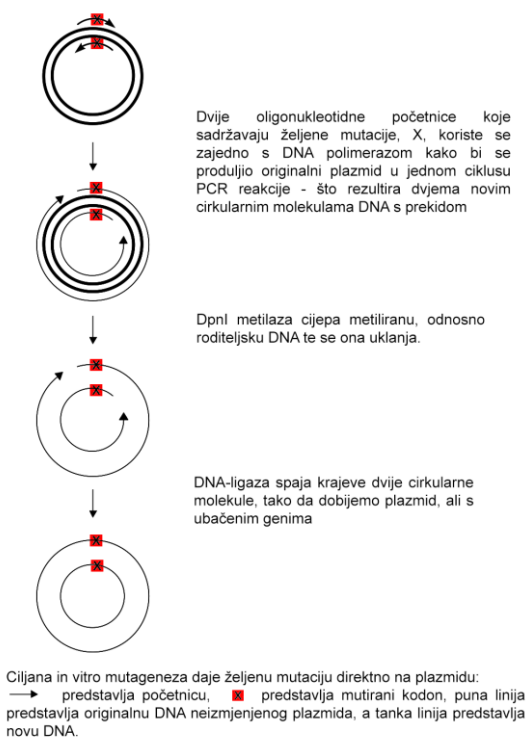
**Slika 9.** Konstrukcija vektora pLATE31. Preuzeto iz Thermo Fisher Scientific priručnika.<sup>34</sup>

Za ciljanu *in vitro* mutagenezu korišten je *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* od proizvođača *Agilent*. Metoda se bazira na dvjema sintetički pripremljenim mutagenim početnicama koje su komplementarne dijelu slijeda oko uvedenih mutacija (slika 11). Za replikaciju plazmida koristi se *PfuUltra HF* (engl. *high-fidelity*) DNA polimeraza jer ima visoku točnost sinteze odnosno posjeduje 3'→5' egzozonukleaznu aktivnost što znači da posjeduje mogućnost izrezivanja krivo ugrađenih nukleotida u lanac kćeri u 3'→5' smjeru tijekom izvođenja elongacije. Proces započinje s vektorom koji je superuvijena dvolančana molekula DNA koja sadrži insert od interesa i dvije oligonukleotidne mutirane početnice koje su komplementarne lancima vektora. Lanci se produljuju bez uklanjanja početnica. Umnažanje produkta koje se provodi izmjenom temperaturnih ciklusa nije eksponencijalno već linearno budući novosintetizirani lanci ne mogu poslužiti kao kalupi u sljedećem elongacijskom ciklusu, jer produljenje oligonukleotidnih početnica stvara mutirani plazmid koji sadrži ureze (engl. *nicks*). Nakon izmjene temperaturnih ciklusa smjesa se tretira s endonukleazom *DpnI* koja razgrađuje metiliranu roditeljsku DNA (ne sadrži mutaciju), a slijed koji prepoznaje je 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3'.<sup>35,36</sup> Korišten je vektor pLATE31. Mutirane početnice F/R (engl.

Forward/Reverse) posebno su dizajnirane prema preporukama iz kompleta te su naručene od proizvođača *Macrogen*.



**Slika 10.** Konstrukcija vektora pLATE31 s insertiranim genom za hDPP III. Slika je napravljena pomoću programa Snapgene.<sup>37</sup>



**Slika 11.** Prikaz ciljane *in vitro* mutagenaze.<sup>38</sup>



**Tablica 2.** Dizajnirane početnice korištene za provođenje mutacija te nemutirani sljedovi humane DPP III. Podcrtani su izmijenjeni kodoni, a masnije otisnute su one baze koje su izmijenjene. GC omjer i  $T_m$  podaci dobiveni su pomoću alata na <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>.

Mutacija	GC(%)	$T_m$ /°C	Nukleotidni slijed 5'→3'
nemutirani slijed	-		GGGCAAGCCTGCTCTAGAG <u>CG</u> CTTCCTGCGGAGACTTCAGGT
R620C	61,36	80,3	(F) GGGCAAGCCTGCTCTAGAG <u>TG</u> CTTCCTGCGGAGACTTCAGGTGC (R) GCACCTGAAGTCTCCGCAGGA <u>AG</u> CACTCTAGAGCAGGCTTGCCC
nemutirani slijed	-		GCTCTAGAGCGCTTCCTG <u>CG</u> GAGACTTCAGGTAAGCAAAGGC
R623L	57,14	77,1	(F) GCTCTAGAGCGCTTCCTG <u>CTG</u> AGACTTCAGGTGCTGAAGTCC (R) GGA <u>CTT</u> CAGCACCTGAAGTCTCAGCAGGAAGCGCTCTAGAGC
nemutirani slijed	-		GCTCTAGAGCGCTTCCTG <u>CG</u> GAGACTTCAGGTGCTGAAGTCC
R623W	57,14	77,0	(F) GCTCTAGAGCGCTTCCTG <u>TGG</u> AGACTTCAGGTGCTGAAGTCC (R) 5GGACTTCAGCACCTGAAGTCT <u>CC</u> ACAGGAAGCGCTCTAGAGC

Prema uputama proizvođača pripravljena je ishodna otopina tako da koncentracija početnica iznosi 100  $\mu\text{mol/L}$ . Nakon toga napravljeno je 100  $\mu\text{L}$  10x razrjeđenja te je razdijeljeno u 6 smjesa, od kojih svaka sadrži samo uzvodnu (R) ili nizvodnu (F) početnicu svakog mutanta. Potom je pripravljena smjesa po tablici 3, gdje je osnovni volumen množen s faktorom 3,1 jer su potrebne 3 smjese za 3 mutacije. U smjesu su prvo dodani svi sastojci iz tablice 2, osim početnica, plazmida i *Pfu* ultra te je smjesa centrifugirana. Potom se u svaku od smjesa dodaju odgovarajuće početnice, zatim plazmid i na kraju enzim *Pfu* ultra. Nakon toga prema programu iz tablice 3 provedena je linearna amplifikacija.

**Tablica 3.** Smjesa za provođenje kružne *in vitro* mutageneze

Reagens	Mutageneza / $\mu\text{L}$	Master Mix (x3,1) / $\mu\text{L}$
Mili-Q $\text{H}_2\text{O}$	14,1	43,71
10x rxn buffer	2,5	7,75
dNTP mix	0,5	1,55
Quik sol. reagens	1,5	4,65
10 $\mu\text{L}$ primer-F	0,7	-
10 $\mu\text{L}$ primer-R	0,7	-
10 ng/ $\mu\text{L}$ plazmid	5	15,5
<i>Pfu</i> ultra	0,5	-

**Tablica 4.** Tablica za provedbu linearne amplifikacije

$\theta/^\circ\text{C}$	$t/\text{min}$	Br. Ciklusa
95	1	1
95	50	18
60	50	
68	8	
68	7	1
6	$\infty$	-

Nakon što je linearna amplifikacija dovršena, potrebno je reakcijsku smjesu tretirati s *DpnI* restriksijskim enzimom i to tako da se reakcijska smjesa volumena 25  $\mu\text{L}$  prebaci u 1,5 mL tubice, doda 0,5  $\mu\text{l}$  restriksijskog enzima *DpnI* i inkubira 1 sat na 37°C na termobloku.

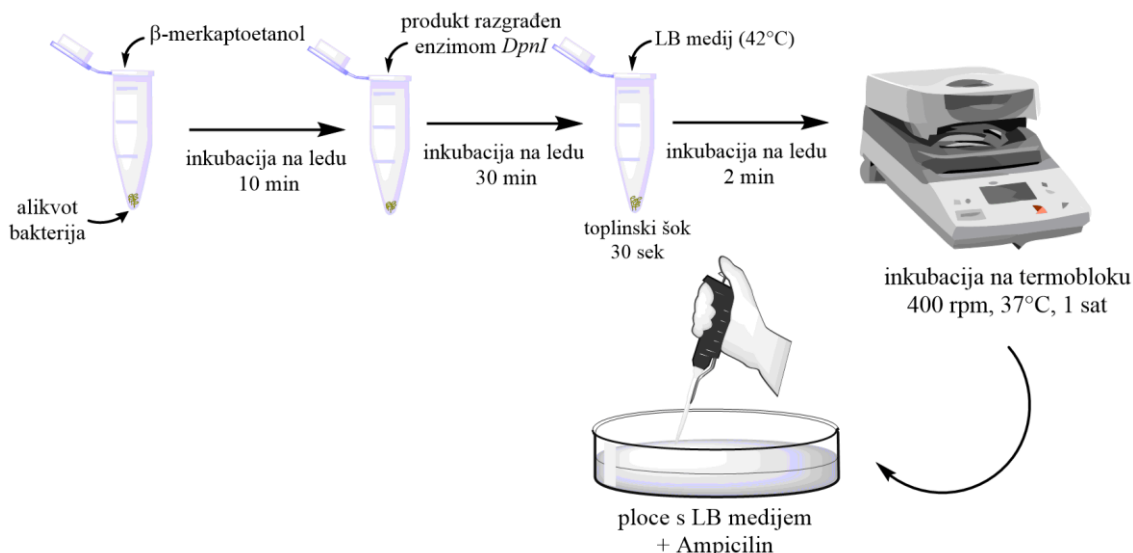
### 3.3. Metode rada s bakterijama

#### 3.3.1. Kemijska transformacija bakterija za unos plazmida

Nakon što je izvršena linearna amplifikacija plazmida, tj. nakon što je povećan broj rekombinantnih plazmida koji sadrže željenu mutaciju potrebno je transformirati bakterije nakon čega se može vršiti selekcija transformanata preko hranjivih *Luria Bertani* (LB) ploča s antibiotikom. Transformacija bakterija je proces kojim se plazmidna DNA unosi u bakteriju. Proces može biti kemijske i fizikalne prirode, a ovdje je korišten kemijski pristup. Bakterije u koje se transformirao plazmid jesu XL10-Gold ultrakompetentne stanice od proizvođača *Stratagene*. Navedene bakterije lišene su svih poznatih restriksijskih sustava [ $\Delta(mcrA)183$   $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ ]. Također ovaj soj lišen je enzima endonukleaza (*endA*) i rekombinantno je onesposobljen (*recA*) čime se povećava stabilnost inserta. Tip selekcije koji se ovdje koristi jest otpornost na antibiotik ampicilin. Gen za rezistenciju na ampicilin nalazi se u vektoru pLATE31 (slika 10).<sup>36</sup>

Pri postupku kemijske transformacije u 20  $\mu\text{L}$  alikvota bakterija dodano je 0,9  $\mu\text{L}$   $\beta$ -merkaptetoetanol a zatim je lagano promiješano i inkubirano na ledu 10 minuta. (slika 12)  $\beta$ -merkaptetoetanol se koristi jer se pokazalo da povećava efikasnost transformacije. Potom se u tu smjesu dodalo 0,9  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese prethodno inkubirane s enzimom *DpnI*, lagano se promiješalo i inkubiralo se na ledu 30 minuta. Prethodno pripremljen LB+ medij (0,5 mL LB medija, 10  $\mu\text{L}$  20% glukoze i 12,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  množinske koncentracije  $c(\text{MgCl}_2)=0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ) zagrijan je na 42°C kako bi se mogao pomiješati s bakterijskim stanicama koje se izlože

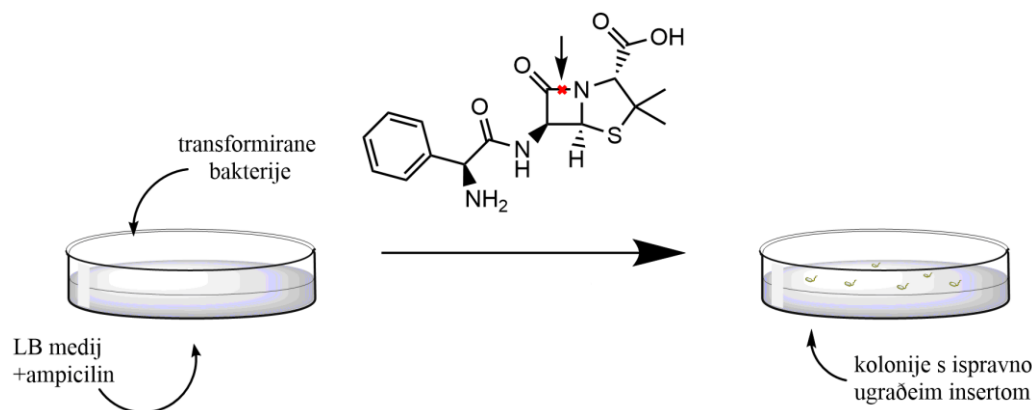
toplinskom šoku (engl. *heat-puls*) na 42°C u trajanju od 30 sekundi. Potom je smjesa prebačena na led u trajanju od 2 minute. Nakon dodatka pripremljenog LB+ medija smjesa je inkubirana na termobloku u trajanju jednog sata pri 400 rotacija po minuti (engl. *rotation per minute - rpm*) pri 37°C. Nakon procesa inkubacije 250 µL smjese nasadilo se na LB ploče koje sadrže antibiotik ampicilin. Ploče su potom ostavljene preko noći na 37°C kako bi bakterije mogle narasti.



**Slika 12.** Prikaz sheme pipetiranja i postupka kemijske transformacije. Slika je napravljena pomoću *ChemBio Draw* programa.<sup>39</sup>

### 3.3.2. Odabir kolonija s ploče i postav prekonoćnog uzgoja rekombinantnog plazmida

Na hranjivoj podlozi LB ploče izrasle su samo one kolonije koje sadržavaju gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin. Na taj način moguće je vršiti selekciju kolonija te one uspješne tj. transformirane plazmidom, odabrati za daljnji uzgoj. U hranjivi medij za uzgoj koji se sastoji od tekućeg LB potrebno je dodati antibiotik i transformirane kolonije u procesu koji se naziva inokulacija. Prenošenje u plastičnu epruvetu od 50 mL tj. inokulacija radila se u sterilnoj okolini tj. što bliže uz plamen. Uzgoj se vršio na tresilici pri 37°C na 200 rpm preko noći (slika 13).



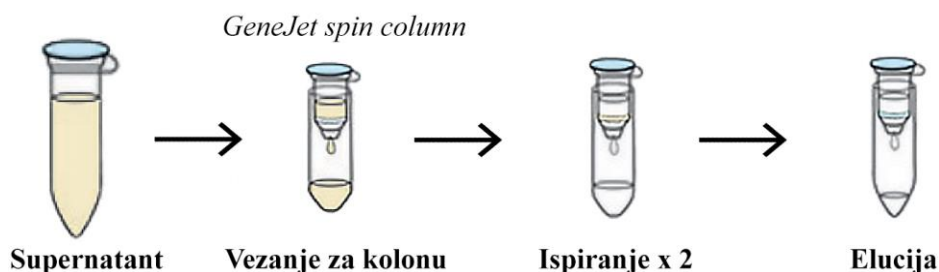
**Slika 13.** Nakon nanošenja transformiranih bakterija na hranjivu ploču s antibiotikom, mogu izrasti samo one kolonije koje imaju gen za resistenciju na ampicilin. Enzim  $\beta$ -laktamaza koji se nalazi na genu *bla* vektora pLATE31 može pocijepati označenu vezu u molekuli ampicilina. Slika je napravljena pomoću *ChemBio Draw* programa.<sup>39</sup>

### 3.3.3. Izolacija rekombinantnog plazmida

Uzgojene bakterijske kolonije centrifugirane su na  $6800\times g$  u trajanju od 2 minute. Supernatant je uklonjen. Iz taloga u kojem se nalaze bakterijske stanice, prema protokolu za izolaciju plazmida od proizvođača Thermo Scientific (GeneJET miniprep kit), izolirani su plazmidi.<sup>40</sup> Talog je resuspendiran u 250  $\mu\text{L}$  otopine za resuspendiranje (engl. *resuspension solution*) (slika 14). Ta suspenzija prebačena je u plastičnu epruvetu od 2mL. Potom je dodano 250  $\mu\text{L}$  otopine za lizu (engl. *Lysis solution*) te je epruveta okrenuta 6 puta kako bi se smjesa razbistrila. Uzorak je podvrgnut alkalnoj lizi. Alkalna liza je postupak u kojem se pomoću deterdženta SDS-a i NaOH izolira genomski materijal. SDS narušava strukturu membrane, a NaOH denaturira kromosome i DNA. Bitno je da niti jedan uzorak ne bude podvrgnut lizi duže od 5 minuta. Potom je dodano 350  $\mu\text{L}$  neutralizacijske otopine (engl. *Neutralization solution*) te je epruveta također okrenuta 6 puta. Neutralizirani bakterijski lizat je postao bijel i zamućen. Potom je centrifugiran 15 min na 16000 rpm.

Dobiveni supernatant dekantiran je u kolonice *GeneJET spin*. Centrifugirano je 1 min na 13 000 rpm. Potom je dodano 500  $\mu\text{L}$  otopine za ispiranje (engl. *Wash solution*) te je centrifugirano 1 min. Otopina koja je prošla kroz kolonice (engl. *Flowthrough*) bačena je te je ponovljen prethodni korak. Potom je još jednom centrifugiran precipitat bez dodatka otopine, 1 min na 13 000 rpm, kako bi se potpuno uklonila tekućina. Zatim je *GeneJET Spin kolonica* prebačena u novu plastičnu epruvetu od 1,5 mL i dodano je 50  $\mu\text{L}$  elucijskog pufera (engl. *Elution solution*) točno na sredinu kolonice, iznad membrane kolonice. Inkubirano je 2 min na sobnoj temperaturi te je potom centrifugirano 2 min na 13 000 rpm. Pročišćena plazmidna DNA

eluirana je u epruvetu. Nakon izolacije plazmida, njegova koncentracija određena je na mikrovolumnom spektrofotometru *BioDrop*, označena i pohranjena na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Svi izolirani plazmidi poslani su na sekvenciranje kako bi se provjerila uspješnost provedene mutageneze. Sekvenciranjem je potvrđeno da su mutacije uspješno uvedene.

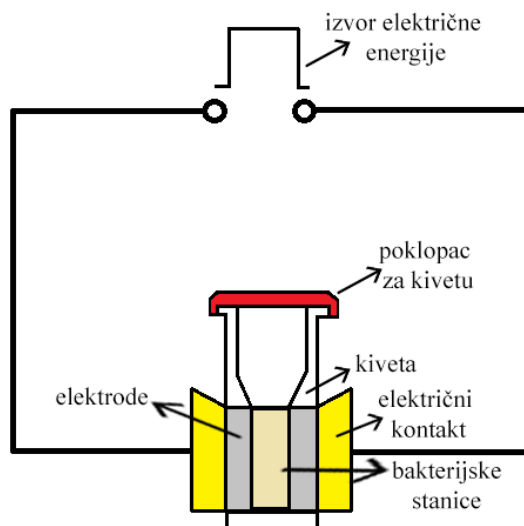


**Slika 14.** Shema za izolaciju rekombinantnog plazmida.<sup>40</sup>

#### 3.3.4. Fizikalna transformacija bakterija

Nakon provedene analize sekvenciranja, odabrani su oni uzorci u kojima je mutacija uspješno provedena te je potom te rekombinantne plazmide bilo potrebno ubaciti u soj bakterija za uzgoj kolonija za ekspresiju proteina. Metoda transformacije bila je fizikalna tj. vršila se elektroporacija *BL21 Ril+* bakterija plazmidom pLATE31 - mutant hDPP3.

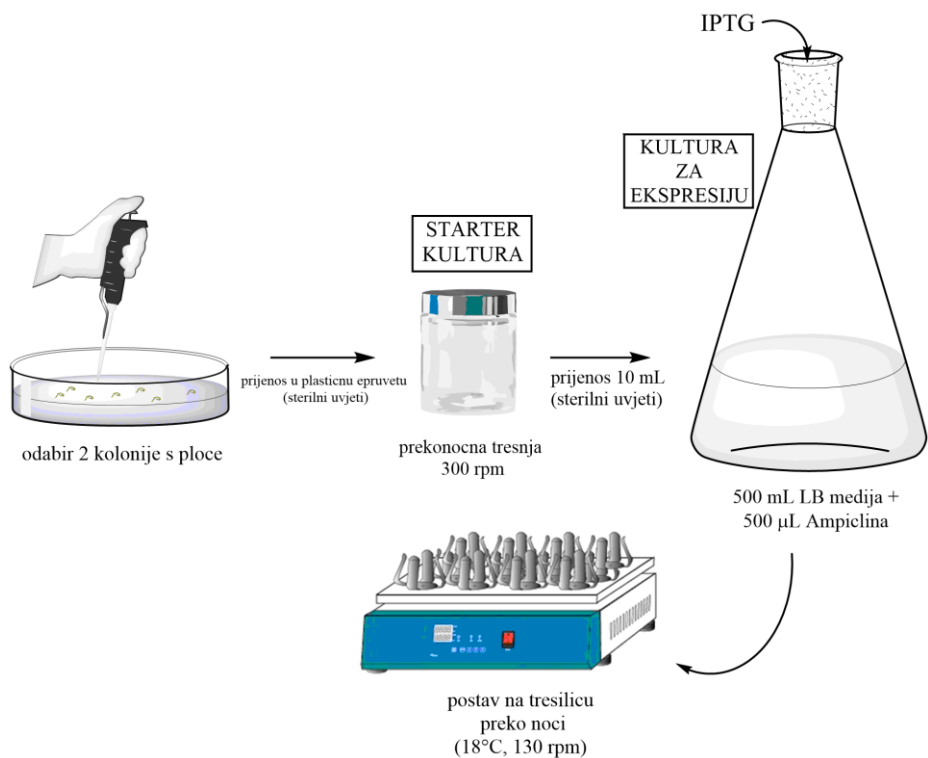
Postupak za transformaciju mora se raditi na ledu. U tri plastične tubice stavljeno je  $20\ \mu\text{L}$  alikvota *BL21 Ril+* stanica te  $0,5\ \mu\text{L}$  svakog od mutiranih plazmida. Smjesa je promiješana plastičnim nastavkom za automatsku pipetu te je potom prebačena u ledenu kvarcnu kivetu za elektroporaciju (slika 15). Ta kvarcna kiveta drži se u zamrzivaču jer je bitno da je ohlađena na nisku temperaturu. Elektroporacija se vrši tako da se šalje kratki elektrošok u kivetu sa stanicama i plazmidima preko metalnog kontakta. Nakon što se izvršila elektroporacija u ledenu kvarcnu kivetu dodano je  $1\ \text{mL}$  prethodno zagrijanog LB medija na  $37^{\circ}\text{C}$ . Potom se smjesa prebacila u plastičnu epruvetu, promiješala te se stavila na inkubaciju na  $37^{\circ}\text{C}$  uz trešnju od  $300\ \text{rpm}$  u trajanju od jednog sata. Nakon trešnje od 1 sata,  $100\ \mu\text{L}$  smjese nasadeno je na ploče s ampicilinom te su inkubirane preko noći na  $37^{\circ}\text{C}$ . Ovo se radi kako bi se osiguralo odabiranje samo onih kolonija u kojima se dogodila uspješna transformacija.



Slika 15. Presjek kivete za elektroporaciju.

### 3.3.5. Uzgoj početne bakterijske kulture i kulture za ekspresiju proteina

Postupak prijenosa transformiranih stanica u plastičnu epruvetu radi se u sterilnim uvjetima, odnosno uz plamen. U 12,5 mL LB medija dodano je 12,5  $\mu\text{L}$  antibiotika ampicilina množinske koncentracije  $c(\text{ampicilin})=100 \text{ mg mL}^{-1}$  te je izabrana jedna kolonija s ploča. (slika 17) i prebačena u medij u plastičnu epruvetu od 50 mL. Čep na epruveti nije prečvrsto zatvoren kako bi zrak mogao ulaziti tijekom prekončne trešnje na 300 rpm. Ovo je tzv. početna bakterijska kultura iz koje se onda sljedeći dan uzelo 10 mL te je dodano u Erlenmeyerovu tikvicu od 2 L gdje se nalazi 0,5 L LB medija s 500  $\mu\text{L}$  antibiotika ampicilina. Ta veća kultura naziva se kultura za ekspresiju proteina te se u njoj rast broja bakterija prati pomoću praćenja optičke gustoće suspenzije pri valnoj duljini 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) (engl. *optical density*) na spektrofotometru. Nakon otprilike 90 minuta  $\text{OD}_{600}$  dostigla je željenu vrijednost od 0,6 odnosno dostignuta je logaritamska faza rasta te se Erlenmeyerove tikve od 2 L hlade 30 min na 10°C. Potom se dodalo 125  $\mu\text{L}$  1M IPTG-a za indukciju te su bakterije stavljene na prekončnu ekspresiju na tresilicu na 18°C uz 130 rpm.



**Slika 16.** Postupak za uzgoj početne bakterijske kulture i kulture za ekspresiju bakterija. Slika je napravljena pomoću *ChemBio Draw* programa.<sup>39</sup>

### 3.3.6. Liza i sonikacija bakterijskih stanica

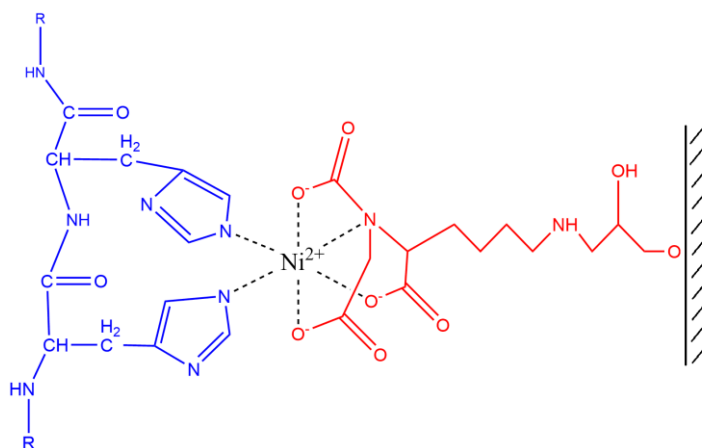
Prekonoćne ekspresijske kulture centrifugirane su na 6000 rpm u trajanju od 20 min. Centrifugirani talog resuspendira se i prebaci u plastičnu epruvetu od 50 mL te se zamrzne na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Kasnije se taj talog koristi za izolaciju proteina. Oko 3 g taloga pomiješamo s 15 mL pufera za lizu (engl. *Lysis buffer*) te 400  $\mu\text{L}$  enzima lizozima, a zatim je stavljeno na led 30 min. Zatim je izvršena sonikacija 2 puta po 2 minute s pulsevima od 2 sekunde s amplitudom 60%. Potom je dodano 10  $\mu\text{L}$  enzima *DNAzaI* i takva smjesa stavljena je 20 minuta na  $25^{\circ}\text{C}$ . Potom je centrifugirana 45 minuta na 11 000 rpm na  $4^{\circ}\text{C}$ , a nakon toga je supernatant profiltriran kroz filter od 0,45  $\mu\text{m}$  (promjer pore). Filter služi tome da se uklone stanični ostaci (membrane, DNA itd.). Filtrat koji je ostao nakon filtriranja nanesen je na kolonu za daljnje pročišćavanje.

### 3.4. Metode rada s proteinima

#### 3.4.1. Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom

Za daljnje pročišćavanje korištena je metoda afinitetne kromatografije s imobiliziranim metalnim ionom (engl. *immobilized metal-ion affinity chromatography*). Općenito afinitetna kromatografija je metoda odvajanja biomakromolekula koja se bazira na velikom afinitetu prema određenoj molekuli ili kompleksu koji je imobiliziran na koloni.

Kolone koje su se koristile ispunjene su agaroznim matriksom na koji je vezana  $\text{Ni}^{2+}$  - nitrilotrioctena kiselina (engl.  $\text{Ni}^{2+}$  - nitrilotriacetic acid, Ni-NTA). U ovom slučaju afinitet postoji između histidina i kompleksa  $\text{Ni}^{2+}$  s Ni-NTA kolone. Iza slijeda za mutirani hDPP III nalazi se šest uzastopnih histidina te oni zajedno s eksprimiranim proteinom stvaraju fuzijski protein. Tih šest histidina (slika 9) stvara afinitetni privjesak koji se preko funkcionalne skupine imidazola veže za niklov(II) kation te pritom nastaje kompleks. Nastali kompleks (slika 17) raspada se kada se kroz kolonu propusti elucijski pufer koji sadrži visoku koncentraciju imidazola koji se snažnije veže na niklov(II) kation. Ovakva metoda pročišćavanja dobra je, jer je vrlo specifična, brza te relativno neosjetljiva na pravilno smatanje proteina, ionsku jakost, kaotropne tvari te detergente, a osim toga jako koncentrira proteine. <sup>41</sup>



**Slika 17.** Kompleks nastao između dvije imidazolne skupine i niklovog(II) kationa. Plava boja označava peptid, a crvena boja označava nitrilotrioctenu kiselinu koja je vezana za kolonu. Slika je napravljena pomoću *ChemBio Draw* programa.<sup>39</sup>

Za pročišćavanje koristile su se kolone ukupnog volumena od 1 mL. Kolone su prvo isprane s 10 mL vode i potom s 10 mL pufera za lizu. Za regulaciju protoka u koloni koristi se peristaltička pumpa, a tijekom pročišćavanja koristi se protok od  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Bitno je paziti da



se pri dodavanju novih volumena ne uzburka matriks na površini. Prikupljanje uzorka izvodi se u četiri koraka: nanošenje, ispiranje, elucija i konačno ispiranje. Sastavi pufera su sljedeći: pufer za lizu sadrži 50 mM Tris HCl, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH=8,0; pufer za eluciju 50 mM Tris HCl, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, pH=8,0; pufer za konačno ispiranje 50 mM Tris HCl, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH=8,0. Nakon pročišćavanja kolone nanosio se uzorak (profiltrirani stanični lizat) tako da se zaustavi rad pumpe kada pufer za lizu bude blizu površine gela te se nanese uzorak za pročišćavanje. Pri nanošenju brzina protoka je  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  te se skuplja frakcija nevezanih proteina (engl. *flowthrough* - FT). Pri ispiranju kolone puferom za lizu (6 mL) brzina protoka je  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , a skuplja se 3 puta po 2 mL frakcije. Pri eluciji puferom brzina protoka ostaje ista, te se skupljalo sveukupno 5 mL elucijskih frakcija tj. dok sav protein ne bude eluiran s kolone. Skupljaju se frakcije po 0,5 mL. Pri konačnom ispiranju skupljeno je 2 mL, u jednu veliku plastičnu epruvetu i ispirano je pomoću pufera koji ima jako visoku koncentraciju imidazola. Nakon ovih postupaka kolona je isprana s 10 mL vode i 10 mL 20% etanola.

#### 3.4.2. Analiza SDS-gel-elektroforezom

Za analizu čistoće uzorka nakon pročišćavanja na Ni-NTA kolonama odnosno kako bi se procijenila unificiranost mase određenog uzorka potrebno je uzorke podvrgnuti procesu elektroforeze. Elektroforeza je proces migracije nabijenih proteina u električnom polju. S obzirom na položaj uzorka u gelu moguće je odrediti njegovu relativnu molekulsku masu. Poliakrilamidni gel služi kao molekularno sito tj. usporava migraciju proteina s obzirom na njihov odnos naboja prema masi. Migracija proteina kroz gel je funkcija veličine i oblika proteina. Sol natrijevog dodecil-sulfata (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*) veže se na proteine proporcionalno s njihovom relativnom molekulskom masom i to tako da jedna formulska jedinka SDS-a stvara elektrostatske interakcije sa svakim drugim aminokiselinskim ogrankom. Vezanje SDS soli ima dvije uloge: i) svi kompleksi proteina i SDS soli imaju naboj koji odgovara njihovoj masi ii) djelomično odmotavanje proteina osigurava da svi imaju sličan oblik. Ovo također omogućuje ujednačeniju migraciju proteina kroz poliakrilamidni gel.<sup>42</sup>

Gel kojim se analizira čistoća pročišćenih proteina sastoji se od dva dijela: gel za sabijanje (tablica 5) i gel za razdvajanje (tablica 6). Prilikom nanošenja uzorka na gel uzorci su denaturirani te im je dodana boja. Od svakog uzorka dobivenog kromatografskim pročišćavanjem uzeto je otprilike 1-2  $\mu\text{L}$  te je dodano po 5  $\mu\text{L}$  2x tretirajućeg pufera (engl.

*treatment buffer*) (0,125 Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 2%  $\beta$ -merkaptoetanol, 0,03 mM bromfenol plavo) te je zatim dodano onoliko vode koliko je potrebno da volumen smjese iznosi 10  $\mu$ L. Potom su uzorci postavljeni na termoblok na temperaturu od 97°C u trajanju od 15 minuta. Nakon što su se ohladili, cijeli volumen pripremljenog uzorka nanesen je na gel pomoću automatske pipete.

Sustav za elektroforezu spojen je na izvor struje što proteinima omogućuje migraciju unutar električnog polja. Početni napon iznosi 100V, a nakon što uzorci uđu u gel za razdvajanje napon je povećan na 180 V. Nakon što boja migrira do kraja gela, gel je prebačen u kadicu za bojenje. Gel je obojen bojom *Coomassie Brilliant Blue g-250* (CBB). Bojanje gela radi se tako da se ostavi u plastičnoj kadici s CBB bojom u vodenoj kupelji na 50°C 15 min, te je kasnije ispran vodom i stavljen u plastičnu kadicu s odbojivačem (MeOH ( $\varphi=30\%$ ), HAc ( $\varphi=10\%$ ), H<sub>2</sub>O ( $\varphi=60\%$ )). Odbojavanje se ponovilo nekoliko puta, prema potrebi. Nakon što je postignut željeni kontrast, vizualno je utvrđen položaj vrpce i određena je uspješnost pročišćavanja proteina.

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

10 % gel	V/mL
mQ H <sub>2</sub> O	2
Tris-HCl ( $c=1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH=8,8)	1,25
akrilamid/bisakrilamid, 30%	1,65
SDS, 100%	0,05
APS, 10%	0,05
TEMED	0,004

**Tablica 6.** Gel za sabijanje ( $w=5\%$ )

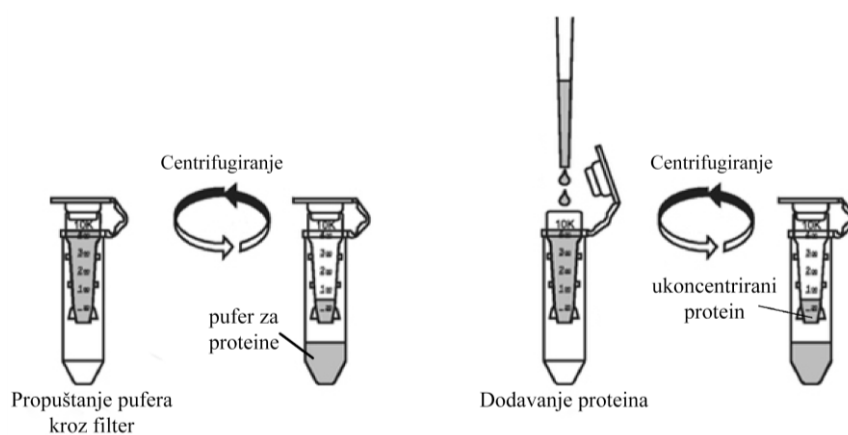
5 % gel	V/mL
mQ H <sub>2</sub> O	2,01
Tris-HCl ( $c=0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH=8,8)	0,375
akrilamid/bisakrilamid, 30%	0,503
SDS, 100%	0,03
APS, 10%	0,03
TEMED	0,001

### 3.4.3. Odsoljavanje na PD-10 koloni

Provodi se odsoljavanje proteina jer nije poželjno da pročišćeni protein bude u puferu s visokom koncentracijom imidazola. Koristile su se PD-10 kolone (GE Healthcare). Odsoljavanje se vršilo u pufer koji sadrži Tris-HCl ( $c=50\text{mmol dm}^{-3}$ ), NaCl ( $100\text{ mmol dm}^{-3}$ ) te koji ima pH vrijednost 8,2. Kolone su prvo isprane s 25 mL vode, a potom s 25 mL pufera u koji se odsoljava kako bi se uklonilo sve što je ostalo od prethodnog korištenja. Nakon što iz kolone izašao sav pufer (frakcija „prije“) nanosilo se 2,5 mL uzorka proteina, a s 3,5 mL pufera protein se eluira (frakcija „protein“). Zatim se kolona ispere s još 3,5 mL pufera (frakcija „poslije“). Na kraju procesa kolona je isprana s 10 mL vode i 10 mL etanola ( $w=20\%$ ). Također je provjereno da protein nije zaostao u frakciji „prije“ ili „poslije“ tako da se izmjerila koncentracija proteina svake frakcije na uređaju *BioDrop*.

### 3.4.4. Ukoncentriravanje proteina

U svrhu daljnjeg pročišćavanja proteina od makromolekularnih komponenti, a i kako bi se mogla raditi biofizička mjerenja potrebno je ukoncentrirati protein. Ovo se radilo u posebnim plastičnim *Amicon Ultra 15 Centrifugal Filters* (Merck Milipore) epruветama od 50 mL koje sadržavaju filter preko kojeg se omogućuje ukoncentriravanje željenog proteina (slika 18). Epruvete su prvo isprane puferom u kojem se proteini nalaze uz centrifugiranje 1 min na 500 rpm na 4°C. Potom su se epruvete ispraznile i u njih se dodalo 3-3,5 mL proteina te opet stavilo na centrifugiranje. Sve osim centrifugiranja potrebno je raditi na ledu.

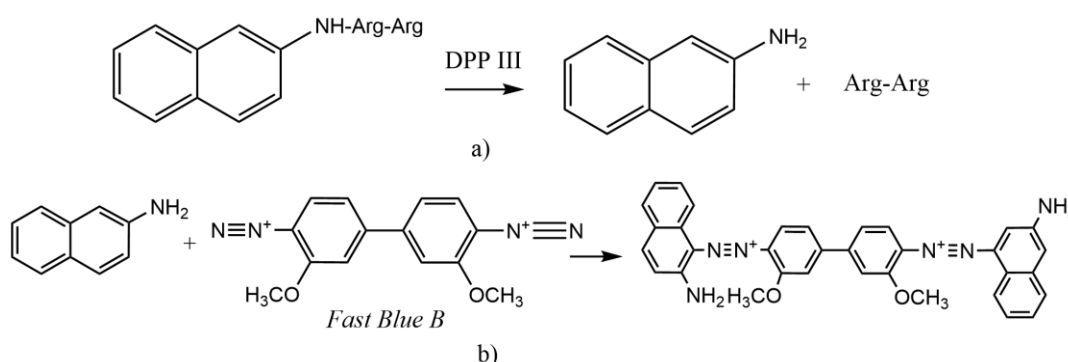


**Slika 18.** Provođenje postupka ukoncentriravanja proteina. Slika je preuzeta i prilagođena iz reference <sup>43</sup>.

### 3.5. Biokemijska karakterizacija proteina

#### 3.5.1. Određivanje specifične aktivnosti

Test specifične peptidazne aktivnosti DPP III provodi se kako bi se ustvrdilo da li uvedene mutacije utječu na aktivnost enzima. Test aktivnosti bazira se na nastanku 2-naftilamina (2NA) koji nastaje nakon što enzim DPP III pocijepa supstrat Arg<sub>2</sub>-2NA (slika 19, a)). Nastali produkt 2NA, poznati je humani kancerogen te ga je zato potrebno ukloniti reakcijom diazokopulacije. 2NA se detektira spektrofotometrijski nakon reakcije diazokopulacije sa soli FBB (engl. *Fast Blue B*) te tada dolazi do razvijanja ružičaste boje. Reakcija diazokopulacije (engl. *diazocoupling*) je reakcija elektrofilne supstitucije u kojoj se na atom dušika aromatskog diazo spoja veže jezgra drugog aromatskog spoja, najčešće fenola ili arilamina. Pri tome nastaje sustav konjugiranih veza, koji diazo spojevima daje obojenost (slika 19, b)).



**Slika 19.** a) Reakcija cijepanja Arg<sub>2</sub>-2NA supstrata djelovanjem enzima hDPP III te nastali produkt 2-naftilamin i dipeptid arginin-arginin.

b) Reakcija diazokopulacije 2-naftilamina i FBB soli te nastanak sustava konjugiranih veza.

Slika je napravljena pomoću *ChemBio Draw* programa.<sup>39</sup>

Sva mjerenja rađena su u triplikatima. U svaku od staklenih epruveta dodano je 500  $\mu\text{L}$  pufera za test aktivnosti (Tris-HCl,  $c=50\text{mM}$ ,  $\text{pH}=8,6$ ), 438  $\mu\text{L}$  vode, 15  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{CoCl}_2$  ( $c=5\text{ mmol dm}^{-3}$ ) i 2  $\mu\text{L}$  uzorka proteina. Potom je smjesa inkubirana 2 minute na  $37^\circ\text{C}$  u vodenoj kupki. Nakon toga dodano je 50  $\mu\text{L}$  Arg<sub>2</sub>-2NA supstrata te je tada reakcija započeta i zaustavila se nakon 15 minuta dodatkom 200  $\mu\text{L}$  FBB soli. Nakon 10 minuta očitana je  $\Delta A_{530}$  vrijednost na spektrofotometru. Slijepa proba s kojom se uspoređuju uzorci sadrži sve sastojke kao i uzorci osim enzima. Prema jednadžbi 1 određena je specifična aktivnost.

$$(1) \%[min^{-1}mg^{-1}mL] = \frac{A_{530} \times 1000}{t[min] \times \bar{v}[\frac{mg}{mL}] \times V[\mu L]}$$

### 3.5.2. Mjerenje kinetike na fluorimetru

Kako bi se dobili kinetički parametri provedena su mjerenja na fluorescentnom spektrofotometru pri temperaturi od 25°C. U mjerenjima se prati fluorescencija produkta 2-naftilamina (slika 19, pod a)). Preko Beer-Lambertova zakona moguće je povezati promjenu u intenzitetu fluorescencije s promjenom koncentracije produkta u vremenu.

Postavke uređaja su bile sljedeće: 420 nm je iznosila valna duljina pobude, a valna duljina emisije 332 nm. Otvor ekscitacijske pukotine iznosio je 10 nm, a otvor emisijske pukotine 5 nm. Pufer za test aktivnost sastoji se od Tris-HCl ( $c=0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $pH=8,6$ ). Množinska koncentracija otopine  $\text{CoCl}_2$  iznosi  $5 \text{ mol dm}^{-3}$ , množinska koncentracija  $\text{Arg}_2\text{-2NA}$  supstrata iznosi  $0,8 \text{ mmol dm}^{-3}$ , a množinske koncentracije enzima su  $0,3 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Prema tablici 7. pripravljena je smjesa koja se nalazila u svakoj kivetu, a tek nakon što je kiveta zagrijana na 25°C, dodan je supstrat te je tako reakcija započeta. Svako mjerenje trajalo je 1 minutu.

**Tablica 7.** Volumeni koji su korišteni u mjerenjima kinetike.

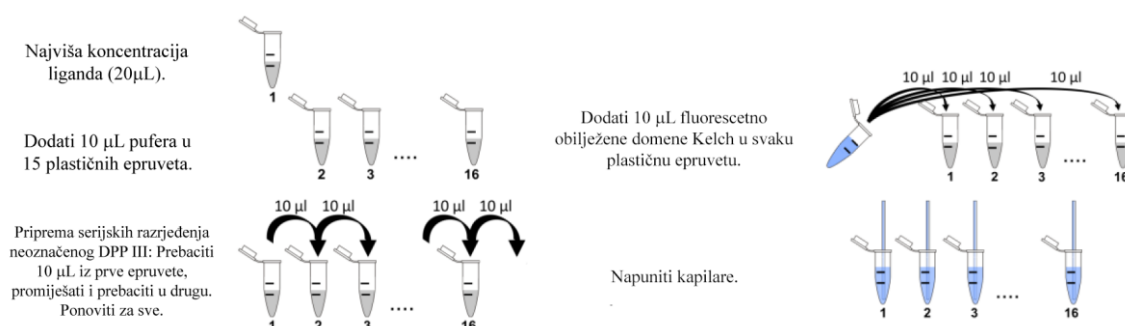
[S]/ $\mu\text{mol L}$	V(S)/ $\mu\text{L}$	V(mQ vode)/ $\mu\text{L}$	V(TA pufer)/ $\mu\text{L}$	V( $\text{CoCl}_2$ )/ $\mu\text{L}$	V(E)/ $\mu\text{L}$
2,5	9,4	1400,6	1500	30	10
5	18,75	1441,25	1500	30	10
10	37,5	1442,5	1500	30	10
15	56,25	1403,75	1500	30	10
20	75	1385	1500	30	10
25	93,75	1366,26	1500	30	10
30	112,5	1347,5	1500	30	10
35	131,25	1328,75	1500	30	10
40	150	1310	1500	30	10

### 3.5.3. Termoforeza na mikroskali

Termoforeza na mikroskali odnosno MST (engl. *microscale thermophoresis*) je metoda mjerenja kojom se određivala konstanta disocijacije ( $K_d$ ) između vezanja neobilježenog proteina hDPP III na bojom NT-495 fluorescentno obilježenu domenu Kelch. Prilikom vezanja hDPP III proteina za obilježenu Kelch domenu proteina Keap1 dolazi do promjene mikrookruženja fluorofora te se to očituje u ukupnoj promjeni fluorescencije. Promjena u

intenzitetu fluorescencije stoga se može upotrijebiti za određivanje  $K_d$ . Iz tog razloga nije potrebno raditi termalno pobuđivanje uzorka IR laserom jer se ne prati promjena gibanja kompleksa u temperaturnom gradijentu već se samo mjeri promjena u početnoj fluorescenciji. Mijenjanje fluorescencije može biti rezultat vezanja liganda u blizini fluorofora, ali može biti i rezultat strukturalne promjene molekule koja se događa uslijed vezanja liganda na nekom drugom dijelu molekule.

Domena Kelch obilježena je NT-495 bojom. NT-495 je reaktivna boja koja sadrži NHS-ester središte koje efektivno reagira s primarnim aminima proteina te stvara stabilan kompleks boja-protein. NT-495 boja obilježava protein i pokazuje ekscitacijski maksimum na 493 nm, a emisijski maksimum 521 nm. Koncentracija obilježene molekule tj. Kelch domene - NT495 kompleksa držala se konstantnom na 50 nM, a za neoznačene hDPP3 III mutante napravljeno je 16 serijskih razrjeđenja (90  $\mu$ M - 5 nM). Zatim je u sve uzorke dodana fluorescentno obilježena domena Kelch (slika 20). Uzorci su centrifugirani kako bi se uklonio uzorak koji je zaostao na stijenkama, a potom je smjesa unesena u kapilare. Mjerenja su se radila na 20% ekscitacijske snage, a MST snaga na 40%. Mjerenja su se izvodila na uređaju Monolith NT.115 tvrtke Nanotemper.



**Slika 20.** Postupak pipetiranja za pripremu uzorka u svrhu izvođenja MST mjerenja. Slika je napravljena pomoću *ChemBio Draw* programa.<sup>39</sup>

Kako bi se ustanovilo da promjena u fluorescenciji stvarno odgovara interakciji dva proteina, a da pritom ne dolazi do denaturacije napravljen je SDS denaturirajući (SD) test. Bitno je ustvrditi da ne dolazi do smanjenja fluorescencije zbog precipitacije proteina ili agregacije proteina tijekom mjerenja. Moguće je i da ligand (hDPP III) apsorbira fluorescenciju. Iz tog razloga se izvodi SD test s prva tri i zadnja tri od 16 uzoraka.

Za SD test koncentracija Kelch-a je bila je 50 nmol dm<sup>-3</sup>, a koncentracija liganda odnosno hDPP III-R623L je 170  $\mu$ mol dm<sup>-3</sup>. Koncentracija liganda u veznom obliku je 170 – 42,5  $\mu$ mol

$\text{dom}^{-3}$ , a u neveznom je  $0,0208 - 0,00519 \mu\text{mol dom}^{-3}$ . Pufer je MST pufer koji sadrži 0,005% Tween-a. Kapilare su *Monolith NT.115* kapilare, eksitacijska boja je *Nano - RED*, a eksitacijska snaga je 20%. Prije provođenja MST mjerenja uzorak je centrifugiran na 12 000 rpm u trajanju od 10 minuta kako bi se uklonilo sve što je precipitiralo.

### 3.6. Računalne metode

#### 3.6.1. MD simulacije

Za izvođenje svih simulacija koristio se programski paket AMBER16.<sup>44</sup> Struktura hDPP III proteina s kojom se radilo bila je poluotvorena konformacija koju su ranije, korištenjem različitih metoda molekuskog modeliranja, generirali članovi Laboratorija za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje s Instituta Ruđer Bošković, a u kojoj je fleksibilna petlja s motivom ETGE odmaknuta od ostatka proteina tako da s njim ne ostvaruje vodikove veze.<sup>45</sup> Takva struktura postavljena je u krnji oktaedar napunjen TIP3P molekulama vode čiji su rubovi udaljeni barem  $11 \text{ \AA}$  od bilo kojeg atoma proteina. Simulirani sustav koji se sastojao od proteina, iona  $\text{Na}^+$  i molekula vode imao je 103 345 atoma. Nevezne interakcije između atoma u sustavu opisane su van der Waalsovima i Coulombovim interakcijama i obuhvaćale su parove atoma do udaljenosti od  $10 \text{ \AA}$ . Parametrizacija je provedena u sklopu ffl4SB polja pri čemu je za kation cinka i aminokiseline koje ga koordiniraju korišten novi hibridni vezni/nevezni model.<sup>46</sup>

Minimizacija se provodila u 3 stupnja sa sveukupno 5000 iteracijskih koraka pomoću programa *sander*. Prvih 1500 koraka korištena je restrikcija od  $133,89 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^2$  na položaje svih atoma proteina, uključujući i cinkov kation što znači da su se pomicala samo molekule vode i ioni  $\text{Na}^+$  koji su korišteni za neutralizaciju sustava. Prvih 470 koraka minimizacija se izvodila metodom najstrmijeg spusta (engl. *steepest descent*), a zatim metodom konjugiranog gradijenta (engl. *conjugate gradient*). U drugom dijelu minimizacije od 2500 koraka korišteno je ograničenje od  $50,21 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^2$  na položaje atoma okosnice i ion cinka. Na kraju je provedeno 1500 koraka minimizacije bez ograničenja.

Uravnoteživanje sistema sastojalo se od dviju uzastopnih MD simulacija s korakom od 1 fs u trajanju od sveukupno 100 ps. Tijekom prvih 30 ps, sustav je zagrijavan od 0 K do 300 K pri čemu je korišten Langevinov termostat s frekvencijom sudara od  $1 \text{ ps}^{-1}$  (NVT ansambl). Volumen je držan konstantnim i korišten je SHAKE algoritam uz ograničavanje veza

s atomom vodika. Tijekom narednih 70 ps, korištenjem Berendsenovog barostata uravnoteženi su gustoća i tlak sustava. Te simulacije, kao i naredne, tzv. 'produktivne simulacije' provedene su na temperaturi od 300 K što je osigurano korištenjem Langevinog termostata i pri tlaku od oko 1 atm (NPT ansambl). Tijekom 'produktivnih simulacija' korišten je korak od 2 fs, a vrijeme simulacija bilo je 20 ns. Sve produktivne simulacije ponavljanje su tri puta za divlji tip i za mutant R623W. Minimizacija i ekvilibracija provodila se samo na početku, no ne i za svako ponavljanje.

### 3.7. Analize promjene geometrije

#### 3.7.1. RMSD (engl. root mean square deviation)

Kako bi se procijenilo odstupanje dobivene strukture od referentne koristi se veličina RMSD koja označava korijen srednjeg kvadrata odstupanja te se računa prema izrazu 2:

$$(2) \text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_i^N (r_{A,i} - r_{B,i})^2}{N}}$$

$N$  predstavlja broj atoma,  $r_{A,i}$  položaj  $i$ -tog atoma u strukturi proteina A, a  $r_{B,i}$  položaj istog atoma u referentnoj strukturi B, u našem slučaju to je bila početna struktura u produktivnim MD simulacijama. Analize struktura izvodile su se pomoću programa *cpptraj* koji je dio programskog paketa AMBER16.

#### 3.7.2. RMSF (engl. root mean square fluctuations)

Kako bi se procijenilo odstupanje pojedinog atoma, aminokiselinskog ostatka ili dijela proteina od referentnog položaja  $r_{i,ref}$  tijekom MD simulacija s vremenom trajanja  $T$ , koristi se veličina RMSF koja računa vremenski prosjek za pojedini atom, aminokiselinski ostatak ili dio proteina, te je zadana jednačinom 3:

$$(3) \text{RMSF} = \sqrt{\frac{\sum_{t_j}^T (r_i(t_j) - r_{i,ref})^2}{T}}$$

S obzirom da se radi o simulaciji proteina praktično je procijeniti prosječno odstupanje aminokiselinskog ostatka od neke referentne strukture u vremenu. RMSF analiza provedena je za ukupno vrijeme simulacije.



### 3.7.3. Vodikove veze

Jakost vodikove veze tijekom MD simulacija procijenjena je kao udio *struktura* u kojima se pojavljuje vodikova veza prema ukupnom broju struktura generiranih tijekom simulacije:

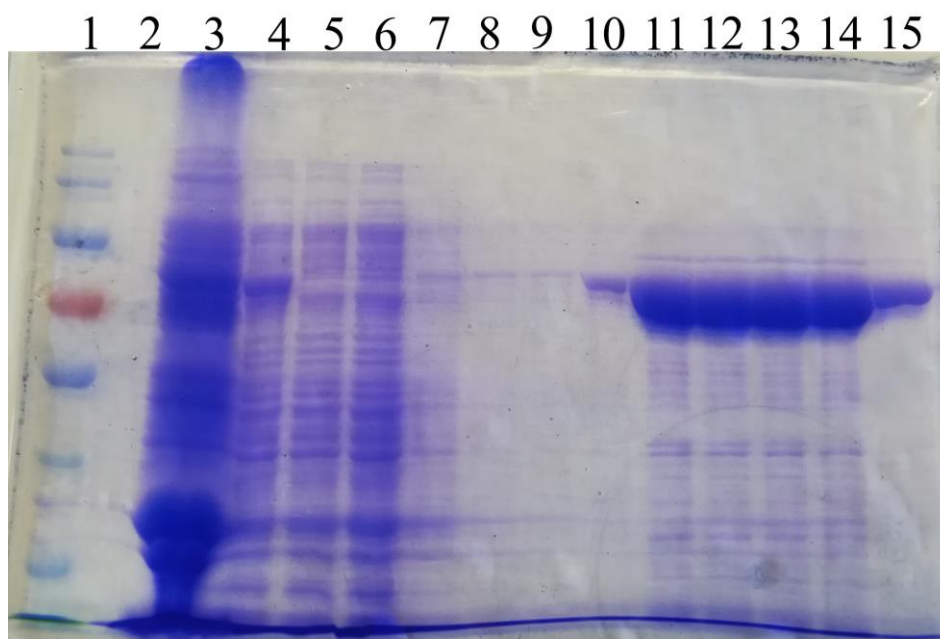
$$(4) H_{\text{bpop}} = \frac{N(\text{koraci s vod.vezom})}{N(\text{ukupan broj kroaka})}$$

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Analiza pročišćavanja mutanata proteina denaturirajućom gel elektroforezom

Na 21., 22. i 23. slici prikazani su rezultati analize mutanata proteina hDPP III. Na gelove su nanošeni uzorci taloga nakon sonikacije, stanični lizat, nevezana frakcija, uzorci ispiranja te uzorci elucija. U svim analizama koristio se marker *PageRuler Prestained Protein Ladder* s rasponom veličine fragmenta 25 - 180 kDa. Vrpca koja odgovara svim mutantima hDPP III je tek nešto iznad crvene vrpce markera (1. jažica, slika 21.) koja označava 75 kDa, pošto predviđena molekulska relativna masa hDPP III iznosi 83,5 kDa.<sup>11</sup>

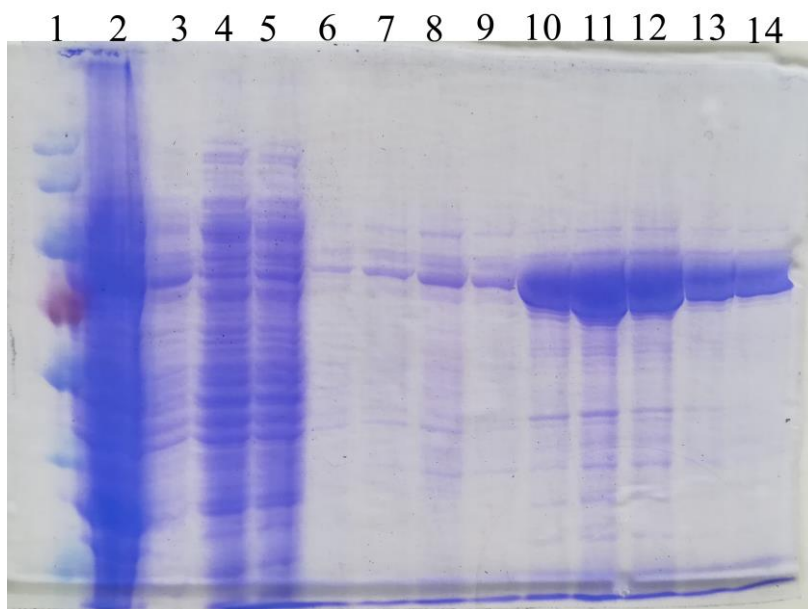
Na slici 21 koja predstavlja analizu mutanta R620C vidljivo je kako prije dodatka IPTG-a nema obojenih vrpca što bi značilo da ne dolazi do bazalne ekspresije proteina. Elucije E4-E8 koje su uzete za daljnje pročišćavanje uzorka nalaze se u jažicama od 11 do 15.



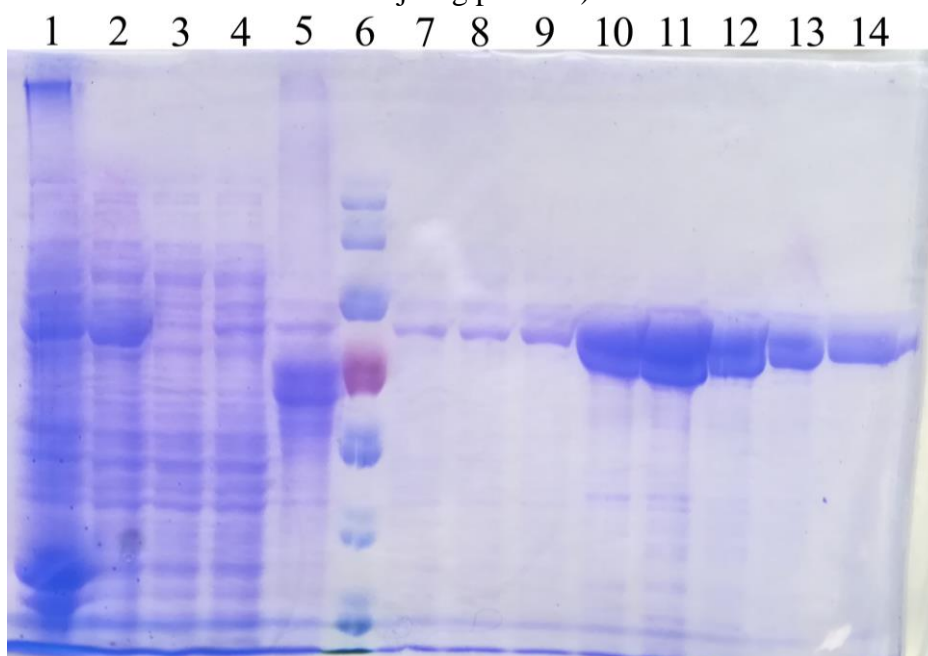
**Slika 21.:** Analiza mutanta R620C SDS-gel elektroforezom. Jažica: 1- PageRuler Prestained Protein Ladder (marker), 2 - prije dodatka IPTG, 3 - talog nakon sonikacije T, 4 - lizat, 5 - nevezana frakcija (engl. *Flow through* - FT), 6-7 - uzorci ispiranja W1 i W3, 8-15 uzorci eluiranja E1-E8 (frakcije fuzijskog proteina).

Na slici 22 nalazi se gel koji predstavlja analizu R623W mutanta. U drugoj jažici nanesen je talog nakon sonikacije, no u tom uzorku zaostalo je nešto netopljivo stoga cijela migracija smjese proizvela razmazani trag. Uzrok ovome može biti i neadekvatno resuspendiranje uzorka.

Elucije E4-E8 u jažicama 10-14 uzete su za daljnje pročišćavanje proteina jer sadržavaju značajnu količinu zadovoljavajuće pročišćenog proteina. Na slici 23 vidimo analizu pročišćavanja mutanta R623L. Elucije E1-E5 uzete su za daljnje pročišćavanje proteina, a nalaze se u jažicama 10-14.



**Slika 22.** Analiza mutanta R623W SDS-gel elektroforezom. Jažica: 1– PageRuler Prestained Protein Ladder (marker), 2 – talog nakon sonikacije T, 3 – lizat, 4 – nevezana frakcija (engl. *Flow through* – FT), 5–6 – uzorci ispiranja W1 i W3, 7–14 uzorci eluiranja E1–E8 (frakcije fuzijskog proteina).



**Slika 23.** Analiza mutanta R623L SDS-gel elektroforezom. Jažica: 1- talog nakon sonikacije, 2 - lizat, 3 - 4 uzorci ispiranja W1 i W3 T, 5 - nevezana frakcija, 6 - PageRuler Prestained Protein Ladder (marker), 7-14 uzorci eluiranja E1-E8 (frakcije fuzijskog proteina).

## 4.2. Aktivnost mutanata

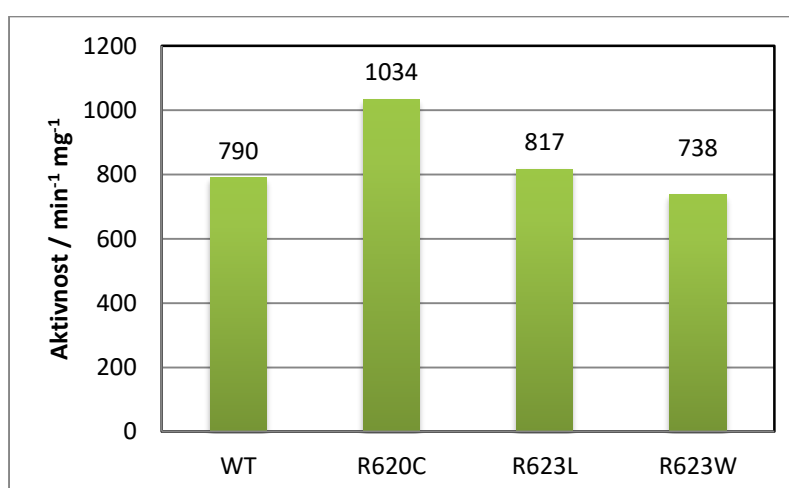
### 4.2.1. Test specifične aktivnosti

Nakon provođenja mjerenja specifične aktivnosti proteina prema sintetskom supstratu Arg-Arg-2NA koje je opisano u Materijalima i metodama ovog rada dobiveni rezultati uprosječeni su za svaki od uzoraka. Obrada podataka se radila u programu Microsoft Office Excel, a dobiveni graf prikazan je na slici 24.

Iz grafa i tablice 8 vidljivo je da je aktivnost mutanta R620C najviša, a mutanta R623W najniža. Aktivnosti divljeg tipa proteina i mutanta R623W su slične i približno odgovaraju u literaturi navedenoj vrijednosti,  $47\ 900\ \text{nmol}\ \text{mg}^{-1}\ \text{min}^{-1}$ .<sup>47</sup> Iako se uvedene mutacije nalaze daleko od aktivnog mjesta rezultiraju promjenom aktivnosti proteina koje se ipak ne smatraju značajnima. U literaturi još ne postoje mjerenja aktivnosti za odabrane mutante, no aktivnosti 1,4 do 1,5 puta veće od aktivnosti divljeg tipa ne predstavljaju značajnu promjenu.

**Tablica 8.** Aktivnost divljeg tipa hDPP III te mutanata prema sintetskom supstratu Arg<sub>2</sub>-NA.

Tip hDPP III proteina	WT	R620C	R623W	R623L
Aktivnost ( $\Delta A_{530}/\text{min}^{-1}\ \text{mg}^{-1}$ )	790	1034,3	737,90	817,01
Specifična aktivnost/ $\text{nmol}\ \text{mg}^{-1}\ \text{min}^{-1}$	49 232	35 124,12	38 889,44	33 102,71



**Slika 24.** Vrijednosti specifične aktivnosti divljeg tipa i mutanata hDPP III proteina otkrivaju da je mutant R620C najaktivniji, a mutant R623W najmanje aktivan.

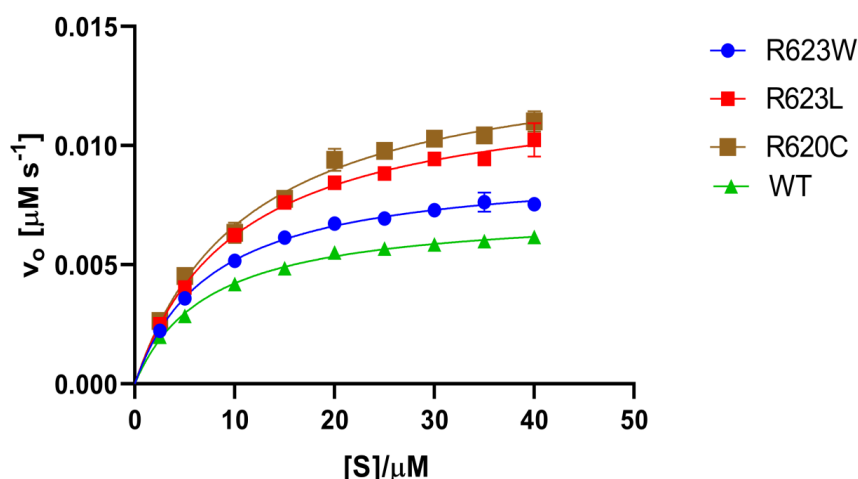
## 4.2.2. Mjerenje kinetike enzimske reakcije na fluorimetru

Mjerenjem kinetike enzimske reakcije na fluorimetru željelo se ustanoviti jesu li uvedene mutacije imale značajan utjecaj na tijek reakcije. Obrtni broj,  $k_{cat}$ , predstavlja konstantu brzine reakcije prvog reda koja odgovara pretvorbi supstrata u produkt kada je enzim zasićen supstratom. Konstanta specifičnosti ( $k_{cat}/K_M$ ) predstavlja konstantu konverzije supstrata. Michaelisova konstanta  $K_M$  označava onu koncentraciju supstrata kod koje je brzina konverzije pola maksimalne brzine.

Iz dobivenih rezultata prikazanih na slici 25 i u tablici 9, vidljivo je kako divlji tip hDPP III proteina ima najniži obrtni broj što bi značilo da najsporije pretvara supstrat u produkt. Najviši obrtni broj ima hDPP III mutant R620C, a taj mutant ujedno pokazuje i najvišu specifičnu aktivnost. Ovo pokazuje da mutacija R620C pogoduje bržoj i efektivnijoj pretvorbi supstrata u produkt. Michaelisova konstanta najviša je također za mutant R620C, a najniža za divlji tip proteina. Navedene razlike za  $K_M$  nisu velike te bi se moglo reći da je  $K_M$  vrlo sličan za sve mutante. Konstanta specifičnosti najniža je za divlji tip, a mutanti imaju 1,4 - 1,5 veće vrijednosti. Vrijednosti koje su dobivene za divlji tip bliske su onima koje su dobili Matovina i suradnici.<sup>47</sup>

**Tablica 9.** Kinetički parametri dobiveni provedenjem kinetičkih mjerenja. Analiza je napravljena nelinearnom regresijom pomoću programa GraphPad Prism 8.

	$k_{cat}/s^{-1}$	$K_M/\mu M$	$k_{cat}/K_M \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$
WT	$28,59 \pm 2,71$	$7,59 \pm 2,51$	$4,36 \pm 1,80$
R620C	$63,01 \pm 1,64$	$11,17 \pm 0,84$	$5,68 \pm 0,57$
R623L	$55,74 \pm 1,84$	$9,77 \pm 1,00$	$5,79 \pm 0,78$
R623W	$41,08 \pm 0,63$	$7,62 \pm 0,40$	$5,41 \pm 0,37$



**Slika 25.** Ovisnost početne brzine mutanata proteina hDPP III o koncentraciji supstrata. Analiza je napravljena nelinearnom regresijom pomoću programa GraphPad Prism 8.

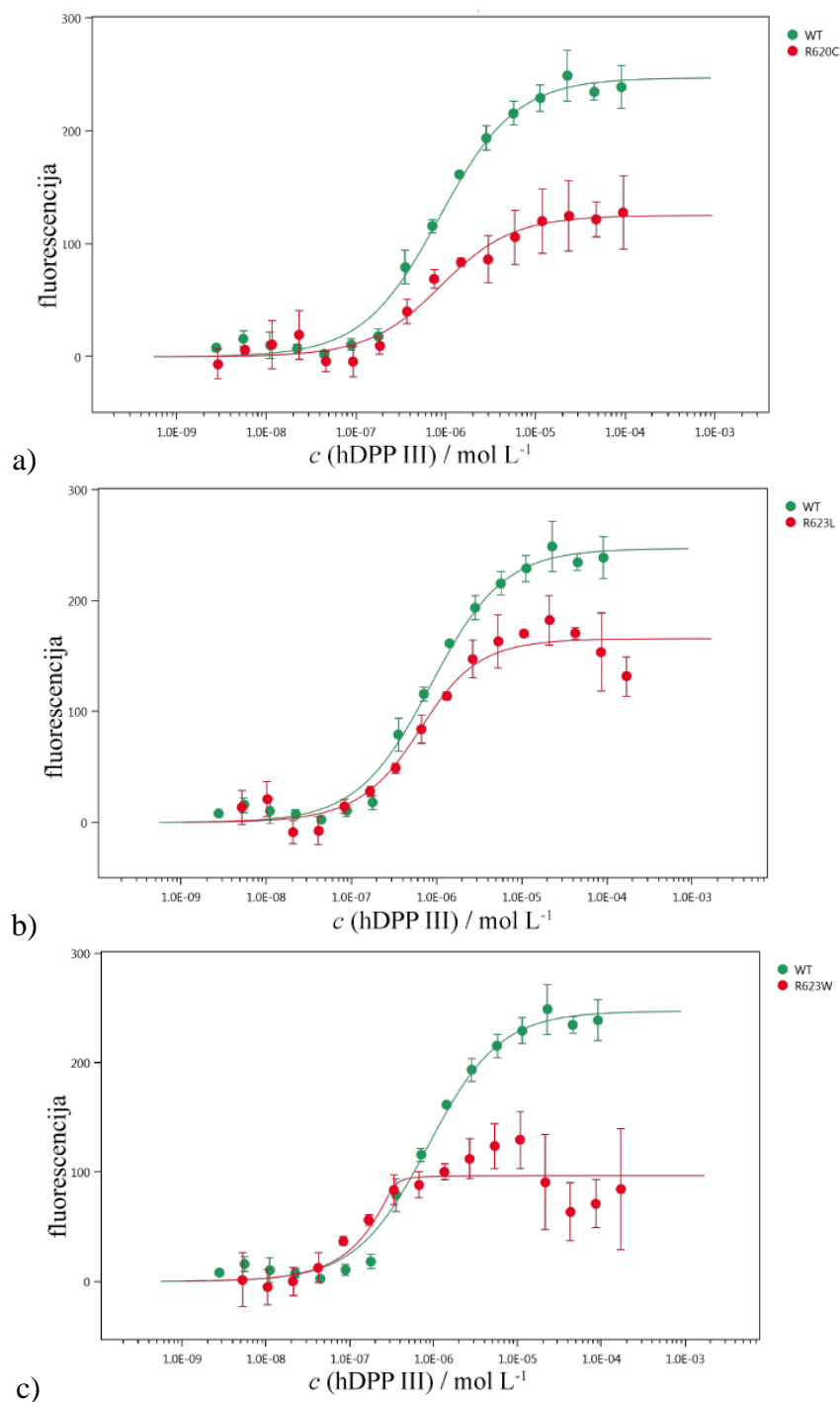
### 4.3. Termoforeza na mikroskali

Kako bi se izmjerio afinitet vezanja odnosno konstanta disocijacije  $K_d$  između mutiranog proteina hDPP III i Kelch domene proteina Keap1, provedena su mjerenja termoforeze na mikroskali.

Na slici 26 dane su krivulje ovisnosti fluorescencije o koncentraciji neobilježenog proteina hDPP III. Dobivena vrijednost za divlji tip proteina ponešto odstupa od vrijednosti iz literature koja iznosi oko 661 nM.<sup>48</sup> Najveće odstupanje od krivulje koja je tipična za divlji tip vidljivo je kod mutanta R623W.  $K_d$  za mutant R623W prema tablici 10 je oko 200 puta manji od  $K_d$  vrijednosti divljeg tipa proteina. Ovakva razlika je značajna pa se može zaključiti da mutant hDPP III R623W ostvaruje oko 200 puta jaču interakciju s domenom Kelch.

**Tablica 10.** Vrijednosti konstanti disocijacije dobivene MST mjerenjima.

hDPP III	$K_d$ / nM
WT	826,4 ± 108,1
R620C	746,2 ± 193,9
R623L	394,1 ± 137,8
R623W	4,7 ± 17,7



**Slika 26.** Prikaz krivulje ovisnosti fluorescencije obilježenog proteina Kelch o koncentraciji neobilježenog divljeg tipa i mutanata a) R620C, b) R623L i c) R623W proteina hDPP III.

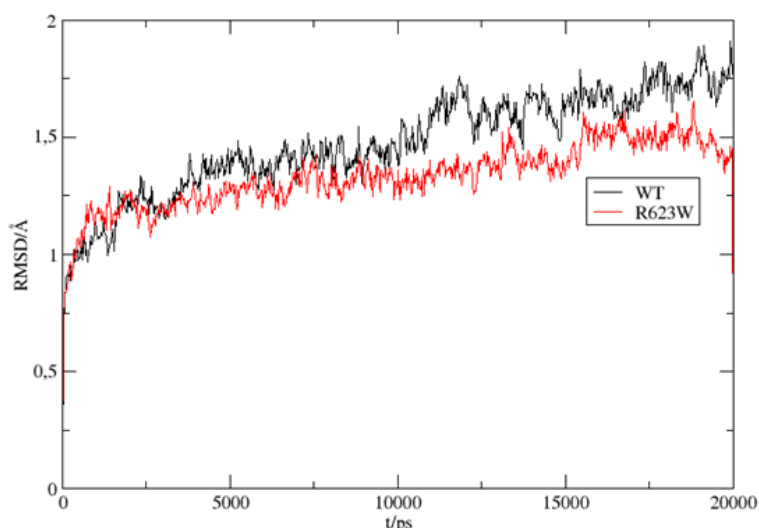
Podaci su analizirani pomoću programa MO.Affinity Analysis v2.3.

Iz provedenih MST mjerenja na mutantima (tablica 10) hDPP III utvrđeno je da postoje značajne promjene u interakciji s proteinom Keap1. Interakcija se ostvaruje preko motiva ETGE proteina hDPP III i domene Kelch proteina Keap1. Kao što je u uvodu već spomenuto, protein Keap1 je negativni regulator Nrf2 transkripcijskog faktora. Kada je interakcija s Nrf2 narušena dolazi do nakupljanja Nrf2 faktora u stanici. Povećana količina Nrf2 faktora u stanici dovodi do prekomjerne ekspresije antioksidativnih proteina što rezultira povećanom otpornošću na antitumorske terapije. Pošto mutacije istraživane u ovom radu povoljno utječu na interakciju s proteinom Keap1 moglo bi se zaključiti da su one također dio mehanizma odgovornog za povećanu otpornost na antitumorske terapije, no ove pretpostavke trebalo bi istražiti u humanoj stanici pošto je moguće da postoje dodatni regulatori ovog signalnog puta koji još nisu prepoznati.

#### 4.4. Računalne metode

##### 4.4.1. Analize promjene geometrije

Kako bi se procijenilo odstupanje od referentne strukture cijelog proteina hDPP III napravljena je RMSD analiza za atome koji čine okosnicu (C, C $\alpha$ , O i N) (slika 27). Iako dvije krivulje nisu identične ipak se ne razlikuju previše što znači da na globalnoj razini nema bitnih razlika između struktura divljeg tipa i mutanta R623W generiranih tijekom MD simulacija.

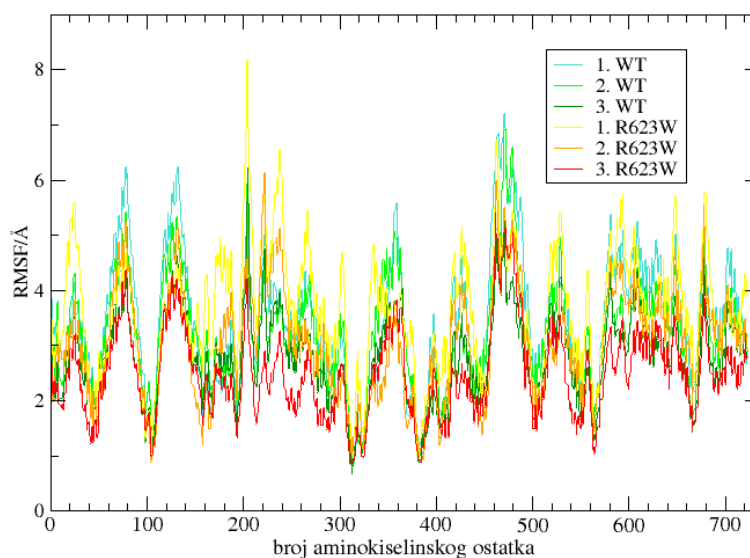


**Slika 27.** RMSD profili divljeg tipa proteina (crno) i mutanta R623W (crveno). Prikazani rezultati su prosjeci od tri simulacije za divlji tip i za mutant

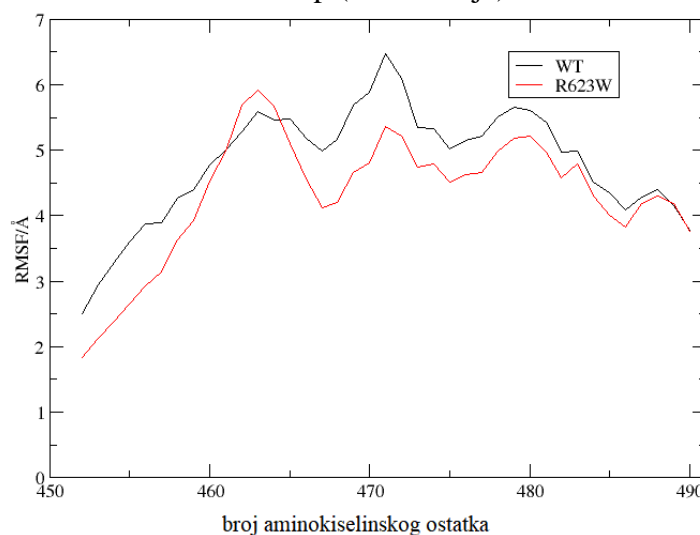
Na slici 28 nalazi se prikaz RMSF vrijednosti određene za C $\alpha$  atome svih aminokiselinskih ostataka u proteinu. Vidljivo je da su krivulje koje su prikazane toplijim bojama pozicionirane



niže od krivulja prikazanih hladnim bojama. Ovo upućuje na zaključak da aminokiselinski ostatci mutanta R623W manje fluktuiraju od ostataka divljeg tipa, no navedene razlike nisu signifikantne. Najzanimljivije razlike su u regiji od 450. do 490. aminokiselinskog ostatka budući da je to područje fleksibilne petlje koja sadrži motiv ETGE preko kojeg se hDPP III veže za Kelch domenu. Kako bi se točnije utvrdilo kako okosnice pojedinih aminokiselina iz područja od 452. do 490. ostatka fluktuiraju u navedenim homolozima, određena je srednja vrijednost njihovih fluktuacija  $\langle \text{RMSF} \rangle$  (slika 29). Može se uočiti kako je najveća razlika RMSF upravo za ostatke ETGE motiva i njihove susjede na N kraju.

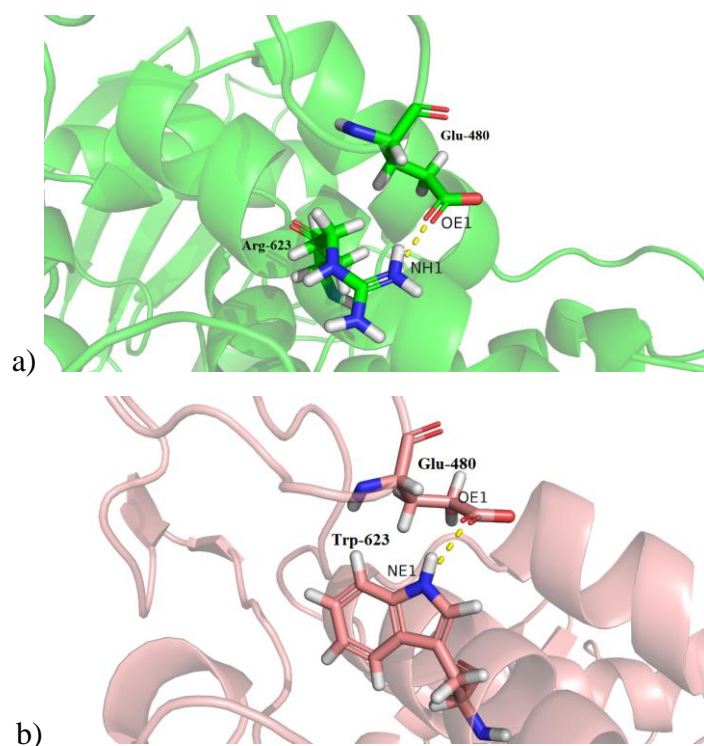


**Slika 28.** Prikaz RMSF vrijednosti za cijeli protein za  $C\alpha$  atome - mutant (tople boje) i divlji tip (hladne boje).



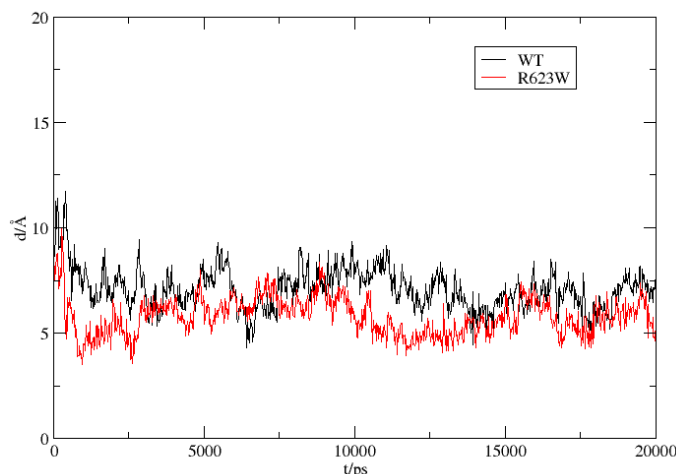
**Slika 29.** Prikaz uprosječenih RMSF vrijednosti za  $C\alpha$  atome od 452. do 490. ostatka.

Kako bi se procijenila udaljenost između fleksibilne petlje s centralnim motivom ETGE i ostatka proteina, prikazana na slici 30., napravljena je analiza udaljenosti između kisika karboksilne skupine glutamata na poziciji 480 i njemu najbližeg atoma bočnog ogranka aminokiseline na poziciji 623. U slučaju divljeg tipa proteina to je NH1 arginina, a u slučaju mutanta R623W to je NE1 triptofana (slika31).

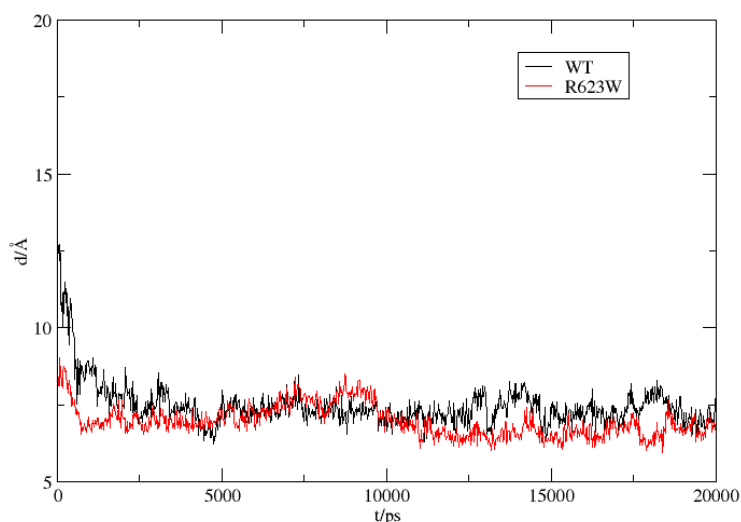


**Slika 30.** Prikaz udaljenosti koje su se mjerile. a) Udaljenosti između dušika NH1 Arg623 i OE1 atoma Glu480. b) Udaljenosti između dušika NE1 Trp623 i OE1 atoma Glu480.

Slika 32 prikazuje rezultate dobivene mjerenjem spomenutih udaljenosti tijekom MD simulacija. Vidljivo je da nema značajne razlike između navedenih udaljenosti kod divljeg tipa i mutanta. Na isti zaključak upućuje analiza udaljenosti C $\alpha$  atoma ostataka na pozicijama 480 i 623 (slika 32).

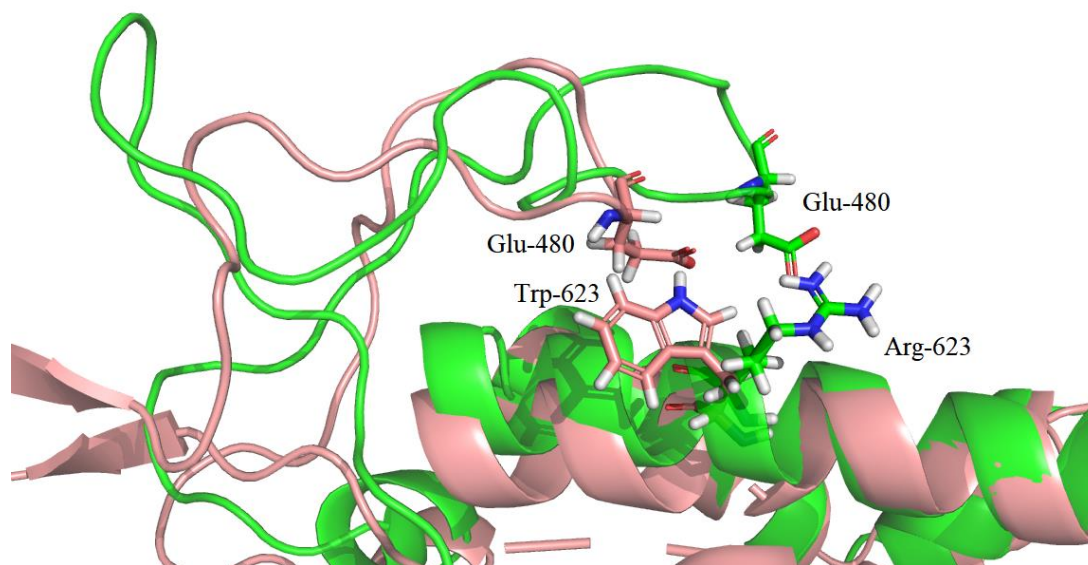


**Slika 31.** Udaljenost između atoma OE1 glutamata na poziciji 480 i NH1 atoma arginina na poziciji 623 divljeg tipa proteina (crno), odnosno NE1 atoma triptofana na poziciji 623 mutanta R623W (crveno). Prikazani rezultati su prosjeci triju simulacija za divlji tip i za mutant.



**Slika 32.** Udaljenost između  $C\alpha$  glutamata na 480. poziciji i  $C\alpha$  atoma arginina na 623. poziciji divljeg tipa proteina (crno) odnosno  $C\alpha$  atoma triptofana na 623. poziciji mutanta R623W (crveno). Prikazani rezultati su prosjeci od tri simulacije za divlji tip i za mutant.

Ovo nam govori da prilikom mutacije arginina u triptofan ne dolazi do narušavanja interakcije ostatka na poziciji 623 s glutamatom na poziciji 480, no ne govori nam o položaju petlje s obzirom na protein. Kako bi se procijenio položaj petlje s obzirom na uvedenu mutaciju napravljeno je više vizualnih prikaza pomoću programa *PyMol*, a jedan je prikazan na slici 33. Čini se da je fleksibilna petlja nešto bliža ostatku proteina kod divljeg tipa proteina nego kod R623W mutanta. Ovakav rezultat je uočen kod svih ponavljanja simulacija.



**Slika 33.** Prikaz položaja petlje divljeg tipa hDPP III (zeleno) i mutanta R623W (rozo) s obzirom na ostatak proteina. Slika je napravljena pomoću programa PyMol.

#### 4.4.2. Vodikove veze

Uvedena mutacija na poziciji 623 utjecala je na pozicioniranje fleksibilne petlje s obzirom na ostatak proteina, no nije došlo do narušavanja vodikove veze između aminokiseline na poziciji 623 i glutamata na poziciji 480. Kako bi procijenili jačinu interakcije ETGE motiva s 'tijelom proteina' napravljena je analiza vodikovih veza. Kao što se vidi iz tablice 11. najznačajnije vodikove veze kod divljeg tipa su između Asn478 i Gly482 i Glu480, te one između Glu480 i arginina na položajima 620, 623 i 624. Vodikove veze Asn478-Glu480 i Glu480-Arg624 prisutne su i kod mutanta, a umjesto vodikove veze Glu480-Arg623 mutant karakterizira veza Glu480-Trp623. Iz dane tablice moglo bi se zaključiti da je broj vodikovih veza u području koje je bitno za pozicioniranje fleksibilne petlje uz tijelo proteina kod mutanta manji nego kod divljeg tipa te da su te veze slabije što je u skladu sa slikom 33.

**Tablica 11.** Usporedba učestalosti pojavljivanja vodikovih veza između mutanta i divljeg tipa. Sve vrijednosti su uprosječene. Zelenom bojom označene su veće vrijednosti.

Akceptor - atom	Donor - atom	WT	R623W
478. ASN - O	482. GLY - H	20,2	-
478. ASN - OD1	480. GLU - H	49,3	36,8
480. GLU - OE1	624. ARG - HH21	72,1	86,2
480. GLU - OE2	620. ARG - HH11	22,5	-
480. GLU - OE1	623. ARG -HH11	17,9	-
480. GLU - OE2	623. TRP - HH11	-	34,5

Kao što je već spomenuto interakcija proteina hDPP III s domenom Kelch proteina Keap1 ostvaruje se preko motiva ETGE koji se nalazi na fleksibilnoj petlji, no točan mehanizam nije još poznat. U ovom radu provedeno istraživanje pomoću računalnih metoda upućuje na to da mutacija R263W na tijelu proteina mijenja položaj fleksibilne petlje tako da je ona odmaknutija od tijela proteina. Prethodno spomenutim biofizičkim mjerenjima ustvrđeno je da ovakav položaj petlje ojačava interakciju s proteinom Keap1. Iz toga bi se moglo pretpostaviti da ako odmicanje petlje pozitivno utječe na interakciju s proteinom Keap1 ono je također ključno u mehanizmu interakcije između ova dva proteina.

## § 5. ZAKLJUČAK

- Uspješno su pročišćeni mutanti R620C, R623L i R623W proteina hDPP III što je potvrđeno analizom denaturirajućom gel elektroforezom.
- Elektroforetskom metodom također je potvrđena masa proteina koja je prema literaturi između 80 i 85 kDa.
- Divlji tip proteina hDPP III pokazuje najniže vrijednosti obrtnog broja i Michaelisovu konstante u usporedbi s mutantima, no ne i specifičnu aktivnost.  $K_d$  za interakciju s proteinom Keap1 je najviša, što znači da je interakcija najslabija.
- Mutant R620C pokazuje najvišu specifičnu aktivnost, ali i najviši obrtni broj i najvišu vrijednost Michaelisove konstante.  $K_d$  vrijednost bliska je vrijednosti za divlji tip.
- Mutant R623L ima vrijednosti obrtnog broja, Michaelisove konstante i specifične aktivnosti između maksimalne i minimalne vrijednosti s obzirom na ostale mutante, no  $K_d$  je dva puta manji od vrijednosti za divlji tip hDPP III proteina.
- Mutant R623W pokazuje najnižu specifičnu aktivnost, vrijednosti obrtnog broja, a Michaelisove konstante su između maksimalne i minimalne vrijednosti s obzirom na ostale mutante, no  $K_d$  za interakciju s proteinom Keap1 je oko 200 puta manji od divljeg tipa proteina hDPP III što znači da taj mutant ima oko 200 puta veći afinitet za Keap1 od divljeg tipa
- Računalne simulacije molekulske dinamike, koje su rađene samo za mutant R623W, ukazuju na to da je u mutantu R623W petlja drugačije pozicionirana nego u divljem tipu.
- Uvedena mutacija također utječe na manji broj vodikovih veza koje su bitne za pozicioniranje petlje uz 'tijelo proteina' što upućuje na zaključak da je petlja kod mutiranog hDPP III u povoljnijem položaju za ostvarivanje interakcije s proteinom Keap1.
- R623W mutacija slabi interakciju ETGE motiva s ostatkom proteina i time pogoduje njegovoj interakciji s proteinom Keap1 što je u skladu s MST mjerenjima prema kojima je  $K_d$  mutanta 200 puta manji od  $K_d$  divljeg tipa hDPP III.

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. Prajapati, S. C. & Chauhan, S. S. , *FEBS J.* **278** (2011) 3256-3276.
2. Lee, C. M. & Snyder, S. H., *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 12043-12050.
3. Suzuki, T. & Yamamoto, M., *Free Radic. Biol. Med.* **88** (2015) 93-100.
4. Furukawa, M. & Xiong, Y. BTB, *Mol. Cell. Biol.* **25** (2005) 162–171.
5. B. Hast, Bridgid E. Goldfarb, Dennis Mulvaney, Kathleen M. Hast, Michael A. Siesser, Priscila F. Yan, Feng Hayes, D. Neil Major, Michael B., *Cancer Res.* **73** (2013) 2199–2210.
6. <https://www.cbioportal.org/> (Pristupljeno 20.4.2019.).
7. <https://en.wikipedia.org/wiki/Proteolysis> (Pristupljeno 22.11.2019.).
8. Rawlings, N. D. & Barrett, A., *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London, 2004., 3747–3749.
9. <https://www.ebi.ac.uk/merops/> (Pristupljeno 15.10.2019.).
10. Lewis, A. P. & Thomas, P. J, *Protein Sci.* **8** (2008) 439–442.
11. Baral, P. K., Jajčanin-Jozić N., Deller S., Macheroux P., Abramić M., Gruber K., *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 22316–22324.
12. Bezerra G. A., Dobrovetsky E., Viertlmayr R., Dong A., Binter A., Abramić M., Macheroux P., Dhe-Paganon S., Gruber K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109** (2012) 6525–6530.
13. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, H. D. Clustal X. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948 (2007).
14. Ellis, S. & Nuenke, J. M., *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 4623–4629.
15. Gorenstein, C. & Snyder, S. H. Enkephalinases. *Proc. R. Soc. London - Biol. Sci.* **210** (1980) 123–132.
16. Kokubu T., Akutsu H., Fujimoto S., Ueda E., Hiwada K., Yamamura Y., **191** (1969) 668–676.
17. Fukasawa, K. M., Fukasawa, K. & Harada, M., *Cytogenet. Cell Genet.* **88** (2000) 99–100.
18. Ohkubo I., Li Y.H., Maeda T., Yamamoto Y., Yamane T., Du P. G., Nishi K., *Forensic*

- Sci. Int.* **113** (2000) 147–151.
19. Abramić, M., Zubanović, M. & Vitale, L. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **369** (1988) 29–38.
  20. Hashimoto, J. I., Yamamoto, Y., Kurosawa, H., Nishimura, K. & Hazato, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273** (2000) 393–397.
  21. Šimaga, Š., Babić, D., Osmak, M., Šprem, M. & Abramić, M., *Gynecol. Oncol.* **91** (2003) 194–200.
  22. [https://en.wikipedia.org/wiki/Enkephalin#cite\\_note-pmid14990485-1](https://en.wikipedia.org/wiki/Enkephalin#cite_note-pmid14990485-1) (Pristupljeno 25.11.2019.).
  23. Tomić, A., Kovačević, B. & Tomić, S., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18** (2016) 27245–27256.
  24. Kumagai, Y., Watanabe, Y. & Fujimoto, Y., *Biochem. Med. Metab. Biol.* **46** (1991) 110–118.
  25. Fukasawa, Katsuhiko, Kayoko M. Fukasawa, Makoto Kanai, S. Fuji, J. H. and M. H. *Biochem. J.* **329**(1998) 275–282.
  26. Liu, Y. *i ostali*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (2007) 5205–5210.
  27. Wakabayashi N., Itoh K., Wakabayashi J., Motohashi H., Noda S., Takahashi S., Imakado S., Kotsuji T., Otsuka F., Roop D. R., Harada T., Engel J.D., Yamamoto M., *Nat. Genet.* **35** (2003) 238–245.
  28. Hammerman, P. S. *i ostali*, *Nature* **489** (2012) 519–525.
  29. Hayes, J. D. & McMahon, M., *Trends Biochem. Sci.* **34** (2009) 176–188.
  30. Dimitrova N., Zamudio J. R., Jong R. M., Soukup D., Resnick R., Sarma K., Ward A. J., Raj A., Lee J., Sharp P. A., Jacks T. *i ostali*, *PLoS One* **32** (2017) 736–740.
  31. Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Leinonen, H. & Levonenn, A. L., *Redox Biol.* **1** (2013) 45–49.
  32. Jensen, F. Introduction to Computational Chemistry Computational Chemistry. u *Introduction to Computational Chemistry* 50-157,469-502 (JohnWiley & Sons, 2017, 2017).
  33. Satoh, A. *Introduction to Practice of Molecular Simulation*, Elsevier Academic Press, London, 2011.,70-180 str.
  34. Upute iz priručnika: Cloning, L. I. C. & Kit, E. aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System.



35. Upute iz priručnika: Technologies Aglient. QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit - Instruction manual - Catalog #200523 and #200524.
36. Upute iz priručnika: Cells, *Transformation* 1–2
37. Računalni program *SnapGene*.
38. Davis, L. & Chin, J. W., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13** (2012) 168–182.
39. PerkinElmer Informatics. ChemBioDraw.
40. Thermo Scientific. Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit. 1–11 (2015).
41. Twyman, S. B. P. and R. M. *Principles of Gene Manipulation. Journal of Medical Genetics*, Blackwell publishing, Oxford, 2006., 350-390. str.
42. David, L. N. i M. Cox Michale, *Lehninger Principal of Biochemistry*, W.H. Freeman and company, New York, 2004., 1-1120 str.
43. <http://www.merckmillipore.com/INTL/en/life-science-research/protein-sample-preparation/dialysis/amicon-ultra-diafiltration/hIyb.qB.sacAAAFADHxwFMtG,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F&bd=1> (Datum pristupa 20.10.2019.).
44. D.A. Case, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. G., A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C., Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C.L. Simmerling, W.M. Botello-Smith, J. S. & R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, L. X. and P. A. K. (2016). AMBER 2016. *Univ. California, San Fr.* (2016).
45. Tomić, A., Berynskyy, M., Wade, R. C. i Tomić, S., *Mol. Biosyst.* **11** (2015) 3068–3080.
46. Tomić A., Horvat G., Ramek M., Agić D., Brkić H., Tomić S., *J. Chem. Inf. Model.* **59** (2019) 3437–3453.
47. Matovina M., Agić D., Abramić M., Matić S., Karačić Z., Tomić S., *RSC Adv.* **7** (2017) 36326–36334.
48. Gundić, M., Tomić A., Wade R. C., Matovina M., Karačić Z., Kazazić S., Tomić S., *Croat. Chem. Acta* **89** (2016) 217–228.

## § 7. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Maja Hanić

Datum rođenja: 25. listopada 1993.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

1999.–2003. Osnovna škola Mate Lovraka, Zagreb

2003.–2008. Osnovna škola Žuti brijeg, Zagreb

2008.–2012. Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, smjer prirodoslovna gimnazija

2012.–2017. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2006.-2008. Oboja, Glazbena škola Vatroslava Lisinskog

### Međunarodna studentska razmjena

2018. Erasmus+, Laboratorij koordinacijske kemije (LCC), Toulouse, Francuska

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015. Mentor na Ljetnoj Tvornici Znanosti

2013. - 2018. Dan i noć PMF-a, Otvoreni dan kemije

2015. - 2018. Udruga PRIMUS (Prirodoslovno-matematička udruga studenata)

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. M. Hanić, S. Matić, M. Tomin, M. Matovina i S. Tomić, *Utjecaj mutacija dipeptidil peptidaze III na interakcije s proteinom KEAP1*, 6. Simpozij studenata kemičara s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, 2019., Zbornik radova str. 54

### Publikacije

1. M. Hanić, *Dizajnerski proteini*, završni rad, 2017.