

Priprema, biokemijska i biofizička karakterizacija dviju prolinskih mutiranih varijanti ljudske dipeptidil-peptidaze III

Miočić-Stošić, Fran

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:918165>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Fran Miočić-Stošić

**Priprema, biokemijska i biofizička
karakterizacija dviju prolinskih mutiranih
varijanti ljudske dipeptidil-peptidaze III**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2022. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje pod mentorstvom dr.sc. Mihaele Matovine. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatska Zaklada za Znanost pod nazivom Interakcija dipeptidil peptidaze III s proteinom SH2 domain-containing protein 3C – moguća veza između odgovora na oksidativni stres i stanične migracije (IP-2020-02-6743).

Zahvale

Imenovati sve ljude koji su mi pomogli u životu je nemoguće.

Duboka zahvala svim ljudima koji pomažu drugima i trude se svijet učiniti boljim mjestom.

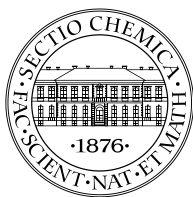
Hvala svim sadašnjim i bivšim članovima Laboratorija za Biokemiju Proteina i Molekulskog modeliranja, a posebno mentorici dr. sc. Mihaeli Matovini i prof. dr. sc. Sanji Tomić, na pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Ovaj i sav životni rad posvećujem svom bratu Luki.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Proteolitički enzimi	3
2.2. Dipeptidil-peptidaza III.....	4
2.2.1. <i>Struktura dipeptidil-peptidaze III.....</i>	<i>4</i>
2.2.2. <i>Mehanizam katalize.....</i>	<i>5</i>
2.2.3. <i>Biološka uloga dipeptidil-peptidaze III.....</i>	<i>6</i>
2.2.4. <i>Keap1-Nrf2 signalni put.....</i>	<i>7</i>
2.2.5. <i>Interakcija dipeptidil-peptidaze III sa Keap1</i>	<i>8</i>
2.3. Molekularno modeliranje proteina.....	10
2.3.1. <i>Metoda polja sila</i>	<i>10</i>
2.3.2. <i>Polja sila u AMBER paketu.....</i>	<i>12</i>
2.3.3. <i>Molekularna dinamika</i>	<i>13</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. <i>Kemikalije</i>	<i>15</i>
3.1.2. <i>Komercijalni kompleti.....</i>	<i>15</i>
3.1.3. <i>Sojevi bakterija</i>	<i>15</i>
3.1.4. <i>Markeri veličine i boje za SDS-PAGE</i>	<i>15</i>
3.1.5. <i>Uređaji</i>	<i>15</i>
3.1.6. <i>Kromatografske kolone i punila.....</i>	<i>16</i>
3.1.7. <i>Enzimi</i>	<i>16</i>
3.2. Modifikacija i priprema plazmida s mutiranim genom	17
3.2.1. <i>In vitro mutageniza.....</i>	<i>17</i>
3.2.2. <i>Kemijska transformacija bakterija za kloniranje plazmida</i>	<i>20</i>
3.2.3. <i>Izolacija rekombinantnog plazmida</i>	<i>21</i>
3.3. Prekomjerna ekspresija proteina	23
3.3.1. <i>Transformacija stanica elektroporacijom.....</i>	<i>23</i>
3.3.2. <i>Prekonoćna bakterijska kultura i kultura za prekomjernu ekspresiju proteina</i>	<i>23</i>
3.4. Pročišćavanje prekomjerno proizvedenog proteina	24

3.4.1. Liziranje bakterijskih stanica.....	24
3.4.2. Pročišćavanje rekombinantnog proteina afinitetnom kromatografijom.....	24
3.4.3. Analiza SDS gel-elektroforezom	25
3.4.4. Odsoljavanje rekombinantnog proteina.....	27
3.5. Biokemijska karakterizacija proteina.....	29
3.5.1. Specifična enzimska aktivnost.....	29
3.5.2. Fluorimetrijsko mjerenje enzimske kinetike.....	30
3.5.3. Izotermalna titracijska kalorimetrija.....	31
3.6. Računalne metode.....	33
3.6.1. Simulacije molekulske dinamike	33
3.6.2. Analiza geometrijskih parametara iz MD simulacija	34
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	35
4.1. Analiza ekspresije i pročišćavanja proteina	35
4.2. Aktivnost mutanata.....	37
4.2.1. Test specifične aktivnosti	37
4.2.2. Kinetika cijepanja sintetičkog supstrata	39
4.3. Interakcija DPP III sa Kelch domenom.....	40
4.3.1. Izotermalna kalorimetrija (ITC)	40
4.4. Računalne metode.....	43
4.4.1. Analiza geometrijskih parametara.....	43
4.4.2. Analiza vodikovih veza.....	45
§ 5. ZAKLJUČAK	46
§ 6. LITERATURNI IZVORI.....	47
§ 7. ŽIVOTOPIS	LI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Priprema, biokemijska i biofizička karakterizacija dviju prolinskih mutiranih varijanti ljudske dipeptidil-peptidaze III

Fran Miočić-Stošić

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) sudjeluje u sustavu razgradnje proteina u stanici, a vjerojatno i u regulaciji krvnog tlaka i boli. DPP III je također uključena u regulaciju signalnog puta Nrf2-Keap1 putem interakcije s proteinom Keap1. Vežanje DPP III na Keap1 onemogućava razgradnju transkripcijskog faktora Nrf2 i povećava njegovu razinu u stanici, što kod tumorskih stanica može povećati otpornost na kemoterapeutike. U bazi za genomiku raka cBioPortal odabrane su mutirane varijante DPP III, P358L i P360S, te je istražen utjecaj mutacija na peptidaznu aktivnost DPP III i interakciju s Keap1. Utvrđeno je da obje mutacije smanjuju konstantu specifičnosti DPP III te da mutacija P358L povećava afinitet DPP III za Keap1. Simulacije molekulske dinamike pokazale su da je petlja preko koje se DPP III veže na Keap1 fleksibilnija u mutantu P358L, što je vjerojatno uzrok većeg afiniteta za Keap1. Daljnjim istraživanjima će se pokušati utvrditi utjecaj mutacije P358L na biološku ulogu DPP III.

(50 stranica, 21 slika, 12 tablica, 64 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: AMBER, dipeptidil-peptidaza III, izotermalna kalorimetrija, kinetika, mutageneza, molekulska dinamika, proteinske interakcije

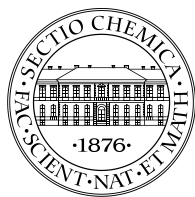
Mentorica: dr. sc. Mihaela Matovina, viši znanstveni suradnik

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
 2. prof. dr. sc. Ines Primožič
 3. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
- Zamjena: doc. dr. sc. Ivan Kodrin

Datum diplomskog ispita: 15. srpnja 2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Preparation, biochemical and biophysical characterization of two proline mutant variants of human dipeptidyl peptidase III

Fran Miočić-Stošić

Dipeptidyl peptidase III (DPP III) participates in the protein turnover, and probably in the regulation of blood pressure and pain. It is also involved in the regulation of Keap1-Nrf2 signaling pathway through interaction with Keap1. Binding of DPP III to Keap1 hinders the degradation of transcription factor Nrf2, and increases its cellular levels, which can cause the resistance of cancer cells to chemotherapeutics. Two mutated variants of DPP III, P358L and P360S were selected from cBioPortal for cancer genomics and the influence of these mutations on DPP III peptidase activity and interaction with Keap1 were investigated. It was found that both mutations lower the specificity constant of DPP III, while P358L mutation increases its affinity for Keap1. Molecular dynamic simulations showed that the loop through which DPP III binds Keap1 is more flexible in P358L mutant, which is a likely cause of the higher affinity for Keap1. Further investigations will try to elucidate the effect of P358L mutation on the biological role of DPP III.

(50 pages, 21 figures, 12 tables, 64 references, original in Croatian)

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

Keywords: AMBER, dipeptidyl peptidase III, isothermal calorimetry, kinetics, mutagenesis, molecular dynamics, protein interaction

Mentor: dr. sc. Mihaela Matovina, Senior Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Aleksandra Maršavelski, Assistant Professor
 2. Dr. Ines Primožić, Professor
 3. Dr. Branimir Bertoša, Professor
- Substitute: Dr. Ivan Kodrin, Assistant Professor

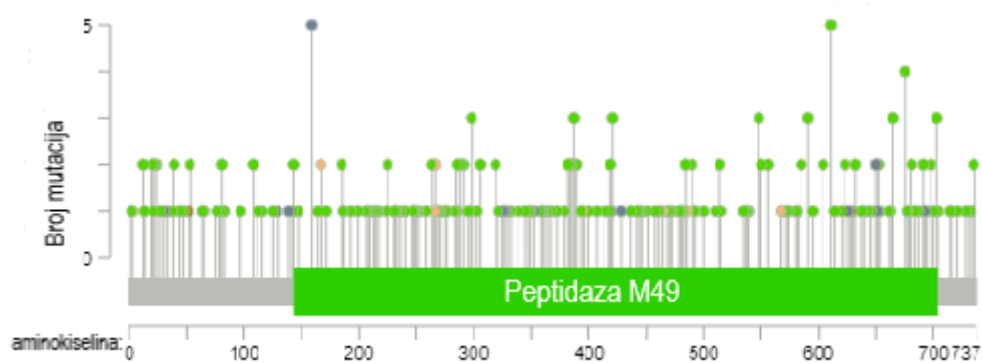
Date of exam: 15. July 2022.

§ 1. UVOD

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III, EC 3.4.14.4) je metalopeptidaza i jedini član obitelji enzima dipeptidil-peptidaze III (EC 3.4.14.4.).¹ Metalopeptidaze koriste metalne ione za katalizu reakcija. DPP III je metalopeptidaza ovisna o cinku koja cijepa dipeptide s N-kraja oligopeptida dugih 3 do 10 aminokiselina. Prvi put je izolirana iz prednjeg režnja goveđe hipofize, a naknadno je pronađena u različitim ljudskim tkivima, od eritrocita do mozga.² Zbog niske katalitičke specifičnosti DPP III za male peptidne supstrate, smatra se da je uključena u unutarstanični katabolizam proteina, regulaciju krvnog tlaka te modulacijski sustav endogene boli.^{2,3} Osim peptidazne aktivnosti, DPP III je uključen u regulaciju Keap1-Nrf2 signalnog puta, koji regulira odgovor na oksidacijski stres, kroz slabljenje interakcije proteina Nrf2 s proteinom Keap1.⁴

DPP III ima dvije domene, između kojih se nalazi široki rascjep u koji se veže supstrat.⁵ DPP III sadrži karakteristične motive HEXXGH i EEXR(K)AE(D). Ion cinka u aktivnom mjestu je koordiniran sa dva histidina iz motiva HEXXGH, a Glu451 sadržan u motivu je ključan za katalitičku aktivnost.⁶ EEXR(K)AE(D) motiv sadrži Glu508 koji je treća aminokiselina koja koordinira ion cinka u aktivnom mjestu.⁶

Nekoliko stotina mutacija u kodirajućem slijedu gena DPP III pronađeno je pretraživanjem *cBioPortal* baze za genomiku raka (slika 1).⁷⁻⁹ *cBioPortal* je online baza podataka koja sadrži informacije o mutacijama otkrivenim u uzorcima iz zloćudnih tumora. Za istraživanje su odabrane mutacije gena za DPP III, P360S i P358L, za koje se pretpostavlja da bi mogle imati utjecaj na interakciju DPP III s Kelch domenom proteina Keap1. Mutacija P360S pronađena je u sekvenci gena DPP III iz uzorka seroznog raka jajnika, dok je mutacija P358L otkrivena u uzorku kožnog melanoma. Istražen je utjecaj mutacija na biokemijska i biofizička svojstva DPP III te afinitet mutanata prema domeni Kelch proteina Keap1.



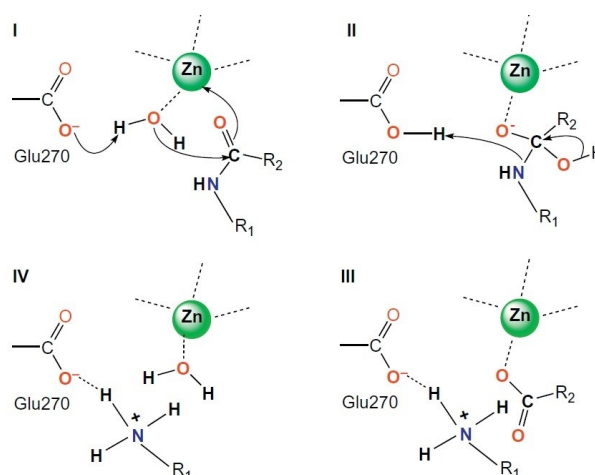
Slika 1. Prikaz mutacija nađenih u bazi za genomiku raka *cBioPortal* u kodirajućem slijedu DPP III u 90 354 uzoraka iz 202 studije⁹

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Proteolitički enzimi

Proteolitički enzimi (također zvani peptidaze) mogu se podijeliti na temelju različitih karakteristika. Jedna od podjela je prema mjestu cijepanja polipeptida. Peptidaze koje cijepaju peptidne veze unutar polipeptidnog lanca zovu se endopeptidaze, a enzimi koji cijepaju krajeve polipeptidnog lanca nazivaju se egzopeptidaze. Egzopeptidaze koje cijepaju aminokiseline s C-kraja se nazivaju karboksipeptidazama, a one koje cijepaju aminokiseline s N-kraja zovu se aminopeptidaze. Egzopeptidaze je također moguće podijeliti na temelju broja aminokiselina koje se odcjepljuju sa krajeva. Tako dipeptidil-peptidaze cijepaju dvije aminokiseline, dok tripeptidil-peptidaze cijepaju tri aminokiseline s N- ili C-kraja.¹⁰

Peptidaze je moguće podijeliti i prema katalitičkom mehanizmu. Peptidaze iz različitih katalitičkih skupina imaju različite aminokiseline unutar aktivnog mjesta enzima. Bočni ogranci aminokiselina u aktivnom mjestu uobičajeno mogu izvoditi nukleofilni napad ili aktivirati molekulu vode koja izvodi nukleofilni napad. Postoji osam katalitičkih skupina, kategoriziranih u bazi peptidaza MEROPS: serinske peptidaze (S), cisteinske peptidaze (C), treoninske peptidaze (T), asparaginske peptidaze (A), glutaminske peptidaze (G), metalopeptidaze (M), asparaginska peptidna lijaza (N) i peptidaze miješanog katalitičkog tipa (C, S, T).^{11,12}



Slika 2. Opći mehanizam katalize karboksipeptidaze i metalopeptidaza sličnih termolizinu. Predstavlja tipičan mehanizam katalize za peptidaze s HEXXH motivom i ionom cinka.¹³

Metalopeptidaze kataliziraju cijepanje peptidnih veza pomoću iona metala u aktivnom mjestu enzima (slika 2). Mnoge metalopeptidaze su prisutne kod eukariotskih i kod prokariotskih organizama, a također često imaju slična strukturalna i biokemijska svojstva. Metalopeptidaze su među najraznovrsnijim podtipovima peptidaza, s oko 30 obitelji.¹⁰

Baza podataka MEROPS dijeli peptidaze u obitelji, sabrane na temelju sličnosti primarnih sekvenci. Prvo slovo unutar imena obitelji označava mehanizam katalize. Nakon slova se nalazi broj koji označava određenu obitelj, npr. M17. Klan metalopeptidaza (M) je najraznovrsniji klan s više od 50 obitelji. DPP III je jedini član obitelji M49 koja je utemeljena 2000. godine.¹⁴

2.2. Dipeptidil-peptidaza III

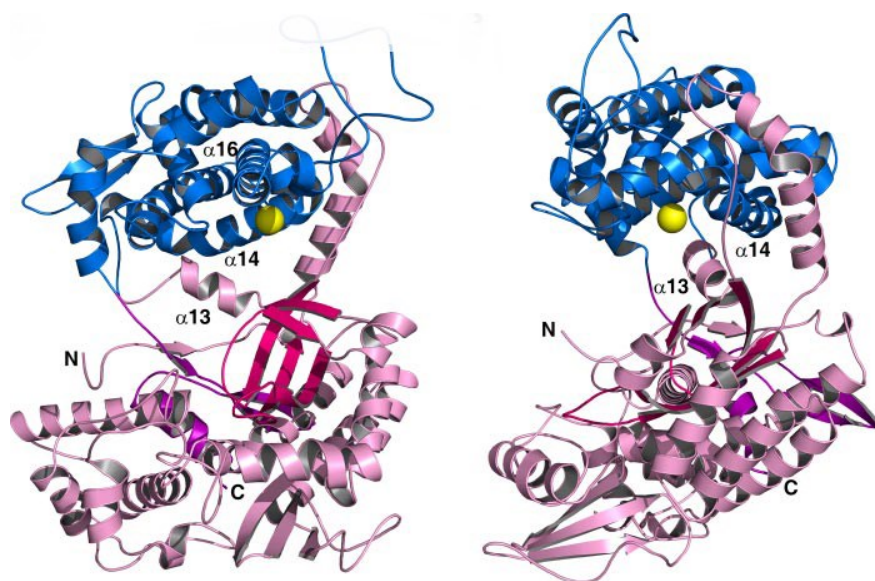
2.2.1. Struktura dipeptidil-peptidaze III

Molekulska masa pročišćenih homologa DPP III kreće se između 69 i 89 kDa.^{15,16} Sadrže motive s potpisom HEXXGH i EEXR(K)AE(D), koji koordiniraju kation cinka u aktivnom mjestu enzima.⁶ His450 i His455 iz HEXXGH i Glu508 iz EEXR(K)AE(D) motiva koordiniraju katalitički cink.⁶ Mutacijom koordinirajućih aminokiselina, DPP III potpuno gubi svoju aktivnost.¹⁷

Objavljene su kristalne strukture ljudske (hDPP III), kvaščeve (yDPP III) i nekoliko bakterijskih (BtDPP III, CaDPP III, PgDPP III) DPP III.^{5,18-21} Utvrđeno je da ljudska i kvaščeva DPP III imaju sličnu strukturu. DPP III, prikazan na slici 3, se sastoji od dvije domene povezane zglobnom regijom s dubokim rascjepom između dviju domena koji tvori aktivno mjesto. Gornja domena sastoji se uglavnom od α -zavojnica, dok donja domena sadrži mješavinu α -zavojnica i β -ploča. Aminokiseline na poziciji od 409 do 420 identificirane su kao mehanički zglob, koji je evolucijski očuvan.^{5,18,19}

Gornja i donja domena DPP III koordinirano vežu supstrat u aktivno mjesto. Računalne studije su pokazale da je supstrat vezan na β -ploču koja se nalazi na dnu rascjepa, nakon čega dolazi do konformacijske promjene koja postavlja supstrat u položaj pogodan za njegovu hidrolizu. Tijekom konformacijske promjene gornja se domena rotira za 60° u odnosu na donju domenu. Takvi veliki pomaci su neuobičajeni zbog visokih entropijskih troškova. I u slučaju DPP III pomak dovodi do porasta entropije sustava no konformacijska promjena je omogućena zbog oslobađanja svih ili većine od 60 molekula vode vezanih u rascjepu aktivnog

mjesta.^{18,22} Tako velika konformacijska promjena jedna je od značajki koje omogućuje cijepanje širokog spektra supstrata.^{5,23}



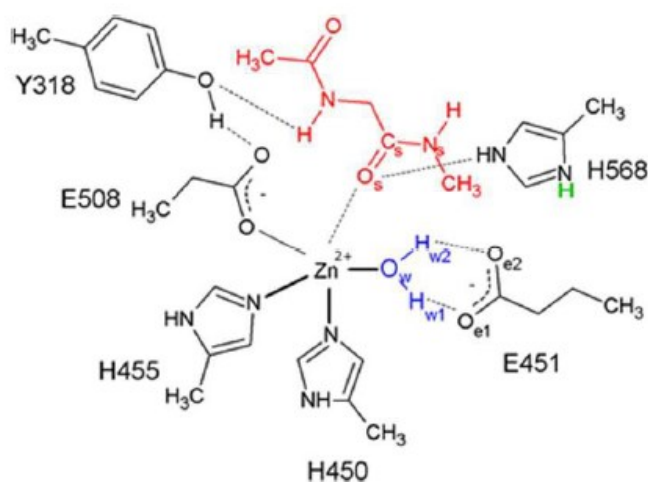
Slika 3. Shematski prikaz strukture DPP-a III s dvije različite strane. Gornja domena je prikazana plavom bojom, a donja je prikazana ružičastom. Zglobna regija je obojena svijetlo ljubičasto, katalitički cinkov ion prikazan je žutom bojom.⁵

2.2.2. Mehanizam katalize

Tijekom desetljeća istraživanja DPP III postojale su mnoge hipoteze o mehanizmu katalize. Aktivnost DPP III istraživana je s raznim inhibitorima peptidaza: inhibitorima cisteina, serina i aminopeptidaza, kelatorima metala, teškim metalima itd.² Konačno, nedavno provedene QM/MM studije dale su uvid u mehanizam reakcije.^{24,25} Aktivno mjesto sadrži ion cinka koordiniran bočnim lancima triju aminokiselina, His450 i His455 iz HEXXGH motiva i Glu508 iz EECRAE motiva (slika 4). Glu451 iz HEXXGH motiva djeluje kao opća baza u mehanizmu reakcije, tako što deprotonira (H_w) molekule vode u aktivnom mjestu. Nastali hidroksidni ion ($O_wH_w^-$) je dobar nukleofil koji može napasti amidni ugljikov atom druge peptidne veze. Prijelazno stanje stabilizirano je vodikovom vezom s bočnim ograncima aminokiselina His568 i Tyr318. Obje te aminokiseline su evolucijski očuvane.^{25,26}

Brzina reakcije određena je s dva uzastopna koraka, nukleofilnim napadom hidroksidnog iona i korakom N-inverzije odlazeće skupine. Nakon što sustav prođe korak inverzije dušika, nema energetske barijere na putu reakcije do produkta. Snažna stabilizacija prijelaznog stanja oksianiona sugerira čvršće vezanje međuprodukta od samog supstrata. Oksianion (O_s) koji

nastaje u prijelaznom stanju stabiliziran je jakim elektrostatskim interakcijama s ionom metala cinka i ostatkom His568. Pokazano je da cink tijekom reakcije mijenja koordinaciju te iz tetra- prelazi u penta-, a zatim ponovo u tetra- koordinacijsko stanje. Ujedno metalni ion polarizira amidnu vezu.²⁵



Slika 4. Model aktivnog mjesta DPP III-a s modelnim supstratom. Supstrat je prikazan crvenom bojom, a molekula vode je obojena plavom bojom. Isprekidane linije pokazuju elektrostatske interakcije.²⁵

2.2.3. Biološka uloga dipeptidil-peptidaze III

Biološka uloga proteina DPP III još nije u potpunosti istražena, ali je poznato da je uključen u nekoliko staničnih procesa. DPP III je citosolni protein pronađen u raznim tkivima ljudi i štakora koji ima široku supstratnu specifičnost. Pokazalo se da DPP III nije prisutan samo u stanicama, već i u krvožilnom sustavu.²⁷ Zbog sveprisutnosti u organizmima i zbog prirode supstrata smatra se da ima ulogu u unutarstaničnom katabolizmu peptida.² Stanične proteine prvo razgrađuje ubikvitin proteasomski sustav, što rezultira peptidima s manje od 25 aminokiselina. Nastali polipeptidni fragmenti se kataboliziraju nizom endo- i egzo-peptidaza. Hidroliza se nastavlja sve dok se polipeptidi ne razgrade do sastavnih aminokiselina. Smatra se da je DPP III, koji relativno nespecifično cijepa supstrate od 3 do 10 aminokiselina, dio sustava za obrt proteina. DPP III cijepa peptide nakon prolina (engl. *Post proline activity*) i ta aktivnost omogućuje razgradnju peptida koji sadrže prolin. Peptidi koji sadrže proline su otporni na razgradnju putem većine drugih aminopeptidaza.^{2,28}

Bioaktivni peptidi (angiotenzini, enkefalini, endomorfini i dinorfini) su uključeni u široku lepezu fizioloških funkcija, uključujući regulaciju krvnog tlaka i boli, prijenos signala i hormonsku regulaciju. Bioaktivni peptidi mogu djelovati lokalno ili biti otpušteni u krvotok i utjecati na udaljena tkiva. Angiotenzini su *in vitro* supstrati DPP III i dio renin-angiotenzinskog sustava (RAS). RAS igra ključnu ulogu u regulaciji nekoliko fizioloških procesa, uključujući krvni tlak i homeostazu elektrolita. Angiotenzini imaju vazoaktivna svojstva pa se pretpostavlja da povišene razine DPP III uzrokuju njihovu brzu razgradnju i time snižavaju krvni tlak. Specifičnost DPP III za angiotenzine naširoko je proučavana od 1980-ih potaknuta širom dostupnošću sintetskih supstrata.^{23,29}

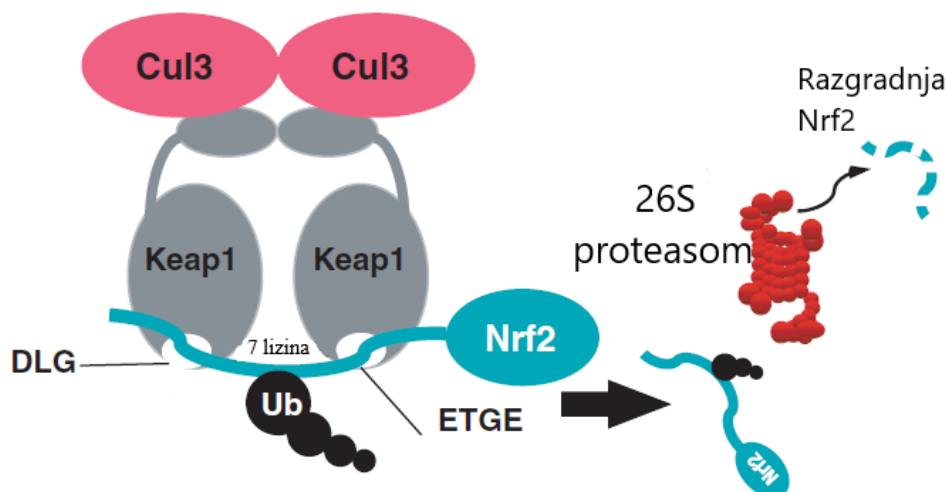
Povišene razine DPP III pronađene su kod raka maternice i jajnika, što pokazuje potencijal da se koristi kao molekularni marker za maligne bolesti endometrija i jajnika. Na uzorku od 108 bolesnica pokazalo se da je ukupna razina aktivnosti DPP III u malignom tkivu bila 3,2 - 3,7 puta veća nego u zdravom i tkivu benignih tumora jajnika. Iako je uloga DPP III u patofiziologiji jajnika i maternice vrlo spekulativna, pokazalo se da povišena aktivnost DPP III korelira s histološkim stupnjem agresivnosti raka jajnika.^{30,31}

2.2.4. Keap1-Nrf2 signalni put

Keap1-Nrf2 signalni put igra središnju ulogu u zaštiti stanica od oksidacijskog i ksenobiotskog oštećenja. Nrf2 (engl. *NF-E2-related factor 2*) je transkripcijski faktor, čiji su ciljni geni ključni za metabolizam reaktivnih kisikovih vrsta i ksenobiotika, te transport lijekova. Keap1 (engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*) regulira razgradnju Nrf2 putem ubikvitin-proteasomskog puta.³²

Jedan od važnih regulatornih mehanizama aktivnosti transkripcijskih faktora je kontrola njegove raspoloživosti. U bazalnim uvjetima, vrijeme polu-života Nrf2 je kraće od 20 minuta. Razina Nrf2 se održava niskom kroz vezanje s Keap1, koje rezultira ubikvitinacijom Nrf2 i razgradnjom. Ubikvitinacija, shematski prikazana na slici 5, se odvija u kompleksu Nrf2-Keap1-Cul3, u kojem dimer proteina Keap1 veže monomer Nrf2 preko 2 različita motiva, DLG i ETGE, i tvori tzv. „cherry-bob“ strukturu. Kada je Nrf2 vezan za dimer Keap1, tada se nalazi u pravilnoj konformaciji za ubikvitinaciju od strane kompleksa ubikvitin ligaze.³³ Motivi za vezanje smješteni su u N-terminalnoj domeni Neh2 proteina Nrf2. Motiv ETGE ima veći afinitet vezanja za protein Keap1 od motiva DLG.³⁴ Kada je Nrf2 vezan na Keap1-

Cul3 kompleks preko obaju motiva, njegovih 7 lizinskih aminokiselina smještenih na vanjskoj strani α -heliksa su u povoljnoj konformaciji za ubikvitinaciju.^{32,35}



Slika 5. Keap1-Cul3 kompleks koji veže Nrf2 transkripcijski faktor preko DLG i ETGE motiva. Sedam lizinskih aminokiselina su glavne mete za ubikvitinaciju, koja Nrf2 određuje za razgradnju.³³

Keap1 je protein s mnogo reaktivnih cisteina. S obzirom da su tioli izvrsne mete za elektrofilne reagense, protein može djelovati kao elektrofilni senzor.³⁶ Strukturne modifikacije zbog elektrofilne reakcije narušavaju stabilnost kompleksa Nrf2-Keap1-Cul3. Kompleks stoga nije u stanju razgraditi Nrf2, što posljedično povećava njegovu transkripcijsku aktivnost. Keap1 je vrlo osjetljiv, pa dolazi do njegove modifikacije pri vrlo niskim koncentracijama elektrofila.³³ *Missense* mutacije kodirajuće sekvence gena Keap1 pronađene su u stanicama raka pluća, a smatra se da takve mutacije također mogu poremetiti Nrf2-Keap1-Cul3 kompleks.^{37,38}

2.2.5. Interakcija dipeptidil-peptidaze III sa Keap1

Interakcija proteina Keap1 i Nrf2 odvija se pomoću motiva ETGE i DLG na proteinu Nrf2. Drugi proteini koji posjeduju motiv ETGE se također mogu vezati s Keap1 i kompetirati za vezanje s motivom DLG Nrf2.³⁸ DPP III je jedan od proteina koji se veže na Keap1 preko motiva ETGE koji se nalazi na fleksibilnoj petlji. Hast i sur. su pokazali da se DPP III bez motiva ETGE ne može vezati za Keap1. Čak i kada motiv ETGE nije u potpunosti uklonjen, već modificiran umetanjem točkastih mutacija u motiv, nema interakcije između DPP III i

Keap1.⁴ DPP III se natječe s Nrf2 za interakciju s Keap1. Kompeticija vezanja je praćena preko stope ubikvitinacije Nrf2 u stanicama s prekomjerno eksprimiranim DPP III. Kada je DPP III bio prekomjerno eksprimiran, zamijećene su smanjene razine ubikvitinacije Nrf2, međutim, samo kada je DPP III sadržavao motiv ETGE.⁴

Struktura kompleksa Keap1–DPP III određena je kombinacijom molekuskog modeliranja s difrakcijom X-zraka pod malim kutom (SAXS).³⁹ Pokazano je da interakcija DPP III s Kelch domenom Keap1 nije utjecala na strukturu katalitičkog mjesta DPP III.⁴⁰ Motiv ETGE se može naći na površini gornje domene DPP III, na području fleksibilne petlje koja je ujedno najfleksibilniji dio proteina. Simulacije pokazuju da je interakcija proteina DPP III i Keap1 proces koji se odvija u dva koraka. Prvi korak je odvajanje fleksibilne regije petlje s motivom ETGE od tijela proteina DPP III, taj korak također ograničava brzinu reakcije. Sljedeći korak je vezanje motiva ETGE na domenu Kelch, taj korak je također energetska barijera, ali termodinamički dostupniji od prvog koraka.⁴¹

2.3. Molekulsko modeliranje proteina

Primjena računala je otvorila mnoštvo novih mogućnosti u istraživanju proteina. Računalne tehnike poput molekuskog modeliranja omogućuju istraživačima da simuliraju razne eksperimente. Simulirani eksperimenti omogućuju učinkovitiju raspodjelu vremena i štede novac potrošen na eksperimente s manjom šansom za uspjeh.

Molekulsko modeliranje oslanja se na temeljne zakone fizike, te ih koristi za simulaciju ponašanja kemijskog i biokemijskog sustava. Ovisno o veličini sustava možemo odabrati kvantno mehaničke (*ab initio* metode koje se temelje na teoremu o funkcionalu gustoće, tzv. DFT „*Density Functional Theory*“), polu-empirijske i empirijske metode. Korištenjem višeslojnih modela, poput QM/MM, može se kombinirati nekoliko metoda modeliranja različitog stupnja složenosti. Višeslojni modeli su u posljednje vrijeme vrlo popularni zbog svoje efikasnosti. Naime, detaljniji kvantno mehanički izračuni koriste više računalnih resursa, što može značajno produžiti vrijeme simulacije. S druge strane, empirijske metode se lako mogu nositi sa sustavima od nekoliko tisuća atoma. Međutim empirijske metode ne daju uvid u subatomska svojstva i ne mogu se koristiti za proučavanje kemijskih reakcija. Višeslojni modeli omogućuju proučavanje kemijskih transformacija u velikim sustavima, poput kompleksa enzim-supstrat, s adekvatnim metodama u prihvatljivom vremenu.^{42,43}

2.3.1. Metoda polja sila

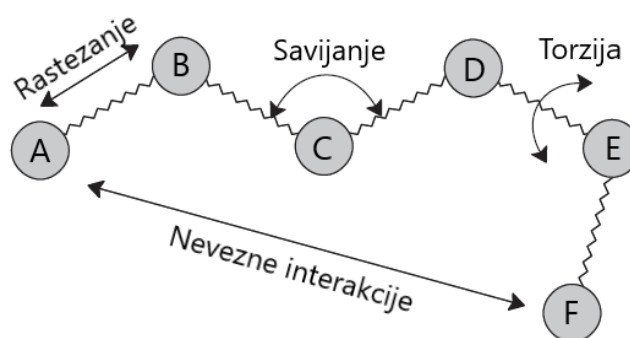
Većina empirijskih metoda molekuskog modeliranja temelji se na metodi polja sila, pri čemu su najraširenija tzv. „*all-atom*“ polja sila u kojima je najmanja eksplicitna jedinica atom, dok se elektroni ne simuliraju kao eksplicitne čestice. Stoga metoda polja sila ne daje uvid u svojstva koja ovise o eksplicitnim pozicijama elektrona. To omogućuje računalu da izostavi proračune preraspodjele i korelacije elektrona, koji zahtijevaju najveći utrošak računalnih resursa. Polje sila sadrži parametre za atome i parametre sila te odgovarajuću jednadžbu za potencijalnu (konformacijsku) energiju. Na primjer van der Waalove interakcije između atoma, čiji položaji odgovaraju položaju njihove jezgre, izračunavaju se pomoću Lennard-Jonesove jednadžbe potencijala. Parametri sila i tipovi atoma, korišteni u polju sila, dobiveni su iz eksperimentalnih podataka i/ili kvantno mehaničkih proračuna izvedenih na malim sustavima. Dobra parametrizacija u polju sila može dati izvrsne rezultate u djeliću vremena potrebnom za kvantno mehaničke izračune.⁴⁴

Potencijalna energija sustava je funkcija veznih interakcija i neveznih interakcija. Vezne interakcije su interakcije između kovalentno vezanih atoma. Neveznim interakcijama se smatraju elektrostatske i van der Waalsove interakcije između atoma koji nisu izravno kovalentno vezani.^{43,44}

Vezne interakcije mogu se dalje raščlaniti na vezne, kutne i torzijske. Na slici 6 su shematski prikazani oblici interakcija u formuli za izračun potencijalne energije. Osnovna formula za izračun ukupne potencijalne energije sustava E_{uk} je:

$$E_{uk} = E_{ras} + E_{kut} + E_{tor} + E_{vdW} + E_{el}$$

E_{ras} predstavlja energiju rastezanja veze (između atoma A i B), mjerenoje energije koja je rezultat odstupanja duljine veze od referentne vrijednosti. Najjednostavniji model za predstavljanje promjene energije veze zbog rastezanja je kvadratna funkcija. Energija odstupanja kuta E_{kut} , predstavlja energiju odstupanja kuta (između veza atoma C na atome B i D) od kuta minimalne energije, i obično je opisana kvadratnom funkcijom. Energija torzije, E_{tor} ovisi o kutu između ravnina na kojima leže C-D veza i E-F veza, često se opisuje sinusoidnom funkcijom. Van der Waalsove interakcije, E_{vdW} su nevezne interakcije između atoma najčešće modelirane s Lennard-Jonesovim potencijalom. One su rezultat nastanka induciranih dipola čija je privlačna interakcija proporcionalna s r^{-6} (disperzivni član), te činjenicom da dva atoma ne mogu zauzimati isti prostor (Paulijev princip) što se opisuje odbojnim članom proporcionalnim s r^{-12} . Energija elektrostatskih interakcija E_{el} se koristi za opis interakcija između dvije nabijene ili multipolarne čestice opisane Coulombovim zakonom.^{42,44}



Slika 6. Osnovni oblici interakcije u molekularnom modeliranju temeljenog na metodi polju sile.⁴²

Važno je napomenuti da izračunata ukupna energija sustava nije jednaka eksperimentalno izmjerenoj energiji. Zaključci o stvarnim sustavima mogu se izvesti samo iz relativnih energija, dobivenih korištenjem istog polja sila.

2.3.2. Polja sila u AMBER paketu

AMBER (*Assisted Model Building and Energy Refinement*) odnosi se i na skup polja sila i na paket programa za molekulske simulacije. Svako polje sile AMBER dizajnirano je za modeliranje određene vrste različitih biomolekula (tablica 1).^{45,46}

Tablica 1. Preporučena polja sila u programskom paketu AMBER21 za različite vrste molekula ili iona.⁴⁷

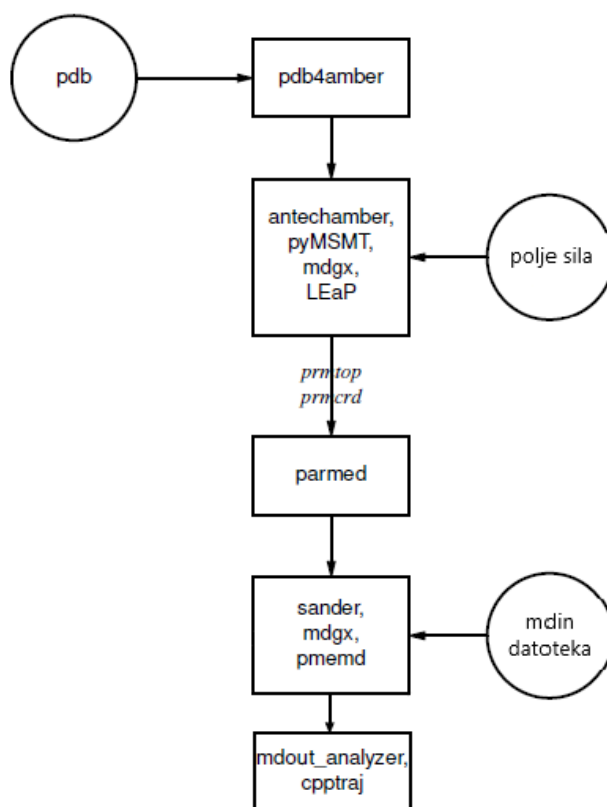
Vrsta molekula/ion	Preporučeno polje sila
Protein	ff19SB
DNA	OL15
RNA	OL3
Ugljikohidrati	GLYCAM_06j
Lipidi	Lipids17
Organske molekule	gaff2
Ioni	Uskladiti s modelom koji se koristi za reprezentaciju molekula vode (primjeri: frcmod.ionsjc_tip3p, frcmod.ionsjc_spce, frcmod.ionsjc_tip4pew itd.)
Voda	Uskladiti s ionima (primjeri: tip3p, spc/e, tip4pew, OPC itd.)

Točnost polja sila je nužna za uspješnu primjenu računalnih metoda. Korištenje empirijskih parametara u polju sila omogućuje precizno simuliranje konformacijskih promjena i nekovalentnih interakcija. Polja sila opisuju iste atome u “različitom” kemijskom okruženju kao različite vrste atoma, korištenje točnih definicija atoma omogućuje prijenos između sustava i uspješno modeliranje sustava. Računski trošak parametrizacije svake nove vrste atoma sprečava istraživače da naprave savršeno polje sile, stoga se nove vrste atoma dodaju samo kada značajno poboljšavaju učinkovitost polja sile i/ili točnost modeliranja.⁴⁸

Parametri neveznih interakcija su ključni za određivanje energije velikih sustava kao što su proteini te za pravilno određivanje globalne strukture proteina.⁴⁹ U modeliranju velikih sustava računski najzahtjevnije su elektrostatske interakcije velikog dometa.

2.3.3. Molekulska dinamika

Molekulska dinamika (MD) koristi Newtonove jednadžbe gibanja i trenutne koordinate za izračunavanje gibanja atoma u simuliranom sustavu. MD pretpostavlja da se sva svojstva sustava neovisna o elektronima mogu dobiti iz početnih položaja i brzina atoma s odgovarajućim poljem sile koje opisuje interakcije. Iz dobivenih novih položaja i interakcija atoma, koristeći Newtonov zakon, moguće je simulirati evoluciju sustava kroz vrijeme. Dobivena zbirka koordinata kao funkcija vremena naziva se trajektorija.⁴³



Slika 7. Osnovni tijek informacija tijekom simulacije molekulske dinamike proteina u AMBER paketu.⁴⁷

MD simulacije obično prate jednostavnu proceduru (slika 7). Početna konfiguracija sustava uglavnom se dobiva iz eksperimentalnih podataka, ali se može dobiti i iz teoretskog

modela ili kombinacije eksperimentalnih i teorijskih podataka. Početne brzine se mogu dodijeliti prema Maxwell-Boltzmannovoj raspodjeli. Prvi korak sustava izračunava se na temelju početno dodijeljenih brzina i vremenskog koraka Δt . Vremenski korak se određuje tako da je 10 puta kraći od najkraćeg simuliranog procesa. U svakom sljedećem koraku se ponovno izračunaju sile koje djeluju na svaki atom. Na temelju gradijenta energije dobije se sila koja djeluje na svaki atom i : $F_i = -\frac{\partial U}{\partial q_i}$. Ubrzanje za svaki atom i izračunava se iz Newtonove jednadžbe gibanja: $a_i = \frac{F_i}{m}$. Na temelju izračunatih ubrzanja možemo odrediti brzinu i promjenu položaja atoma i nakon Δt .^{43,44}

Biološki makromolekularni sustavi obično se sastoje od ogromnog broja atoma, analitički odrediti svojstva tako složenog sustava je nemoguće. Molekulska dinamika koristi numeričke metode kako bi zaobišla ovaj problem, no korištenje numeričkih metoda nužno dovodi do pogrešaka u proračunu. Međutim pogreške uvedene zbog korištenja numeričke integracije mogu se smanjiti pravilnim korištenjem parametara i algoritama.⁴²

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

20% glukoza, β -merkaptotanol, klorovodična kiselina (HCl), magnezijev klorid ($MgCl_2$), kobaltov (II) klorid ($CoCl_2$), natrijev hidroksid (NaOH), natrijev klorid (NaCl), izopropil- β -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. Komercijalni kompleti

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

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

Amicon Pro Purification System i *Amicon Ultra Device* sistem za koncentraciju proteina.

3.1.3. Sojevi bakteija

BL21-CodonPlus(DE3) RIL, XL10-Gold.

3.1.4. Markeri veličine i boje za SDS-PAGE

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

3.1.5. Uređaji

Centrifuge *Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed*, *Hettich Universal 320R*, *Eppendorf 5415 R*, mikrovolumni spektrofotometar *BioDrop (Isogen – Life sciences)*, fluorescentni spektrofotometar *Cary Eclipse (Agilent)*, uređaj za mikrokalorimetriju *Nano ITC low volume (TA instruments)*.

3.1.6. Kromatografske kolone i punila

Punilo za kolonu za afinitetnu kromatografiju: Ni²⁺-NTA agaroz (Qiagen), kolona za odsoljavanje proteina *PD-10 Desalting column* (GE Healthcare); punilo *Sephadex G-25*.

3.1.7. Enzimi

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

3.2. Modifikacija i priprema plazmida s mutiranim genom

3.2.1. In vitro mutageneza

Da bismo proizveli mutacije u proteinu DPP III, uveli smo točkaste mutacije u kodirajući slijed proteina. Sintetizirane početnice su dizajnirane i naručene od komercijalnog proizvođača (tablica 2). Za mutant P360S, aminokiselina na položaju 360 mutirana je iz prolina u serin promjenom CCC kodona u TCC kodon. Za mutant P358L, aminokiselina na položaju 358 mutirana je iz prolina u leucin, promjenom CCC kodona u CTC kodon.

Ekspresijski vektor pLATE31 s ugrađenim genom za hDPP III korišten je za prekomjernu ekspresiju proteina. U pLATE31 vektoru, za regulaciju ekspresije gena se koriste regulacijski elementi iz bakteriofaga T7. U vektor je ugrađen snažan T7 promotor kojeg specifično prepoznaje T7-RNA-polimeraza. Za ekspresiju proteina se koriste ekspresijski sojevi *E. coli*, kao što su BL21 (DE3) ili HMS 174 (DE3), koji sadrži gen za T7-RNA-polimerazu, pod kontrolom inducibilnog promotora (kao što je *lacUV5*). Promjenom koncentracije induktora može se regulirati proizvodnja T7-RNA-polimeraze. Nakon dodatka induktora, izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG), započinje ekspresija T7-RNA-polimeraze. Proizvedena T7-RNA-polimeraza započinje transkripciju ugrađenog gena od interesa, koji se nalazi pod kontrolom T7 promotora.⁵⁰

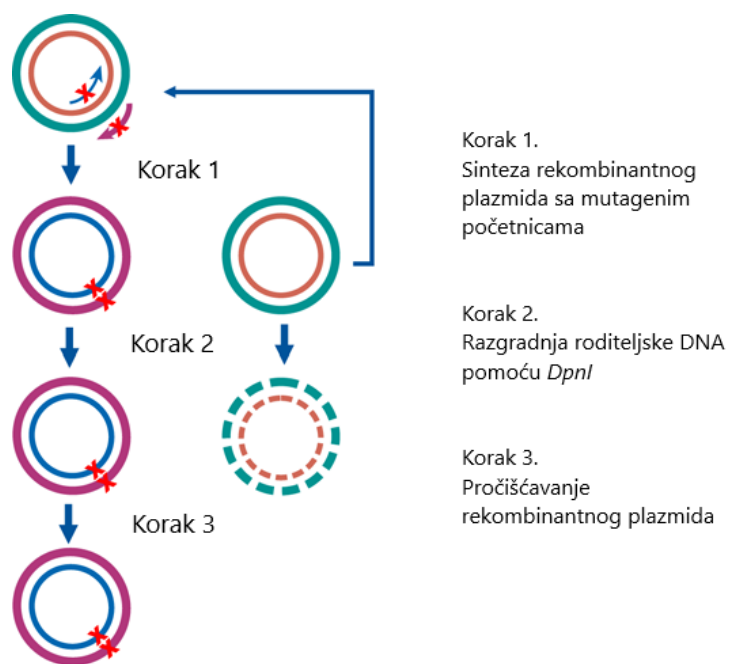
Tablica 2. Početnice dizajnirane za uvođenje mutacija u kodirajuću sekvencu hDPP III (crveno su označene baze koje su mutirane).⁵¹

Mutacija	GC (%)	$T_m/^\circ\text{C}$	Nukleotidni slijed (5'→3')
Nemutirani slijed	-		GAAGGAGCTGCCCTGGT <u>CCCC</u> AACCTTTGAG
P360S	61,3	81,6	(F) GAAGGAGCTGCCCTGGT <u>T</u> CCCCAACCTTTGAG
			(R) CTCAAAGGTTGGGG <u>A</u> CCAGGGCAGCTCCTTC
Nemutirani slijed	-		TGAAGGAGCTG <u>CC</u> CTGGCCCCAACCTTTG
P358L	62	81,5	(F) TGAAGGAGCTG <u>C</u> TCTGGCCCCAACCTTTG
			(R) CAAAGGTTGGGGG <u>C</u> CAG <u>A</u> GCAGCTCCTTCA

Čest problem kod proizvodnje proteina je bazalna ekspresija. Do bazalne ekspresije dolazi kada ekspresija proteina počinje bez indukcije. Ako je ciljani protein toksičan za *E. coli*, bazalna ekspresija može uzrokovati nestabilnost plazmida ili smrt stanice. Radi smanjenja bazalne ekspresije, pLATE vektori sadrže dodatne elemente. Regulacijski elementi poput dva

lac operatora koji okružuju T7 promotore. *Lac* operatori služe kao mjesta za vezanje *lac* represora. Ostali regulacijski elementi uključuju terminator *rrnBT1-BT2*, postavljen uzvodno od višestrukog mjesta kloniranja, i slab Tet promotor, koji djeluje u suprotnom smjeru od T7 promotora.⁵⁰

Vektori pLATE sadrže kodirajuću sekvencu za polihistidinski privjesak (engl. *His-tag*) uzvodno ili nizvodno od višestrukog mjesta za kloniranje (engl. *Multi Cloning Site*, MCS). Ovisno o položaju sekvence His-privjeska u odnosu na MCS proizvodi se protein s His-privjeskom na N- ili C-kraju. Ekspresija proteina s His-privjeskom omogućuje pročišćavanje proteina korištenjem afinitetne kromatografije. His-privjesak tvori specifične interakcije s Ni^{2+} -NTA agaroznim matriksom odvajajući protein od interesa od ostatka staničnih proteina.⁵⁰



Slika 8. Shema mutageneze pomoću kompleta za mutagenezu *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent). Crveni križić simbolizira unesenu mutaciju.⁵²

Ciljna *in vitro* mutageneza (slika 8) je izvedena korištenjem komercijalnog kompleta *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent). Za mutagenezu je potrebna DNA polimeraza visoke točnosti, kao što je *PfuUltra HF* (engl. *High Fidelity*) DNA polimeraza. *PfuUltra HF* ima 3'→5' egzonukleaznu aktivnost, koja omogućuje izrezivanje pogrešno ugrađenih nukleotida u lancu kćeri. Reakcijska smjesa za mutagenezu sadrži superzavijenu

dvolančanu DNA u koju je umetnut gen od interesa, i dvije komercijalne mutagene početnice. Umnažanje rekombinantnog plazmida je provedeno s ciklusima zagrijavanja i hlađenja prikazanim u tablici 3. Za razliku od PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) reakcije, mutageneza provodi linearno umnožavanje, odnosno tijekom svakog ciklusa se sintetizira isti broj novih lanaca. Nakon dovršetka mutageneze, smjesa mutiranog i nemutiranog plazmida je tretirana s *DpnI* endonukleazom, koja razgrađuje originalnu metiliranu DNA, te je dobivena mješavina originalnih pocijepanih plazmida i mutiranih plazmida.⁵²

Tablica 3. Program za provedbu mutageneze koristeći uređaj za PCR.

$T/^\circ\text{C}$	t/min	Broj ciklusa
95	1	1
95	0,5	18
85	0,5	
68	8	
68	7	1
4	∞	-

Tablica 4. Smjesa za provođenje *in vitro* mutageneze pomoću uređaja za PCR

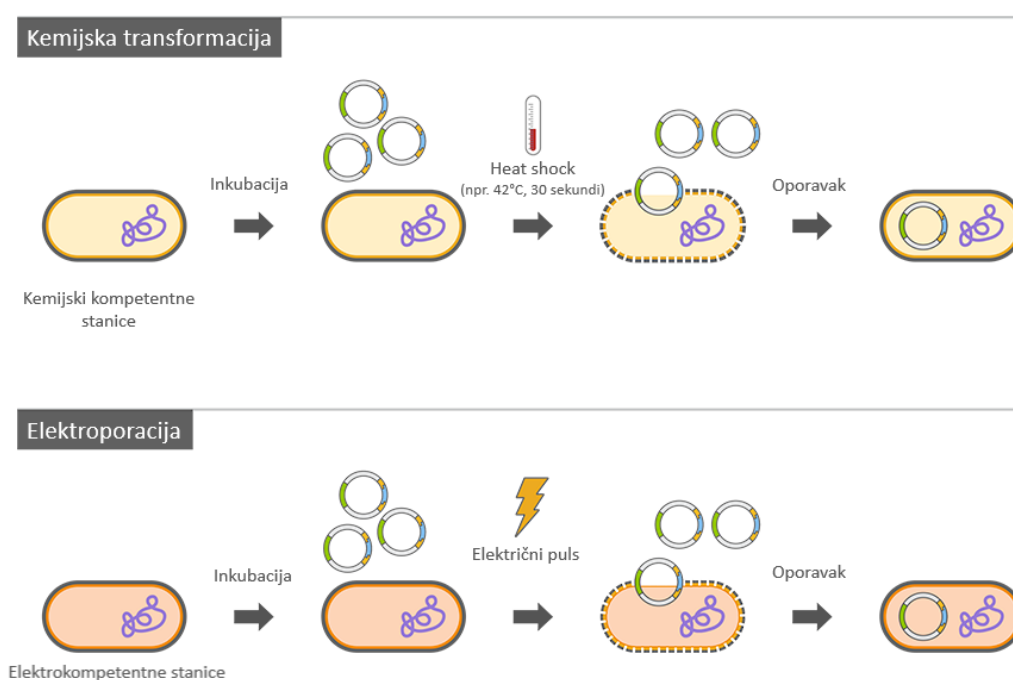
Reagens	Volumen / μL	Master smjesa (x2.1) / μL
H ₂ O	14,1	29,61
10x reakcijski pufer	2,5	5,25
Mješavina dNTP-ova	0,5	1,05
Quik. sol. Reagens	1,5	3,15
10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Uzvodna početnica	0,7	-
10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Nizvodna početnica	0,7	-
10 ng/ μL Plazmid	5	10,5
<i>PfuUltra</i> DNA polimeraza	0,5	-

U liofilizirane početnice je dodana voda tako da se dobije štok otopina koncentracije 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Štokovi početnica su razrijeđeni na 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da bi se dobile radne koncentracije. Ukupno je pripremljeno 4 otopine početnica, po 2 otopine (uzvodna i nizvodna početnica) za svaki od mutanata (P360S i P358L). Pripremljena je master smjesa koja je sadržavala sve

komponente (tablica 4) osim plazmida, uzvodnih i nizvodnih početnica i *PfuUltra* DNA polimeraze. Master smjesa je alikvotirana po 23,1 μL i u svaku otopinu dodane su odgovarajuće početnice i *PfuUltra* DNA polimeraza. Linearna amplifikacija je provedena na uređaju za PCR (engl. *thermocycler*) s programom prikazanim u tablici 3. Nakon provedene mutageneze sve smjese su tretirane s *DpnI* endonukleazom. Svaka smjesa je prebačena u epruvetu od 1,5 mL, tretirana s 0,5 μL *DpnI* i inkubirana pri 37 °C u trajanju od jedan sat u termobloku.

3.2.2. Kemijska transformacija bakterija za kloniranje plazmida

Da bismo povećali količinu rekombinantnog plazmida, plazmidni vektor je kemijski transformiran u soj za kloniranje bakterije *E. Coli*. Ultrakompetentne stanice *E. Coli* XL10-Gold stvorene su za kloniranje velikih DNA molekula s visokom učinkovitošću. Lišene su svih poznatih restrikcijskih sustava [$\Delta(mcrA)183$ $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$]. Modifikacije XL-10 Gold stanica osiguravaju stabilnost vektora osiguravajući kvalitetniju DNA za izolaciju. Vektor pLATE31 ima ugrađen gen za otpornost na ampicilin (amp), stoga će uspješno transformirane stanice biti otporne na ampicilin. Otpornost na ampicilin pruža jednostavan način selekcije uspješno transformiranih bakterija.⁵³



Slika 9. Principi transformacije stanice kemijskom ili fizikalnom (npr. elektroporacija) transformacijom.⁵⁴

Transformacija se može izvesti kemijskim ili fizikalnim metodama (slika 9). Metoda toplinskog šoka je kemijska metoda transformacije stanica, te je korištena za transformaciju bakterija prilikom kloniranja plazmida.

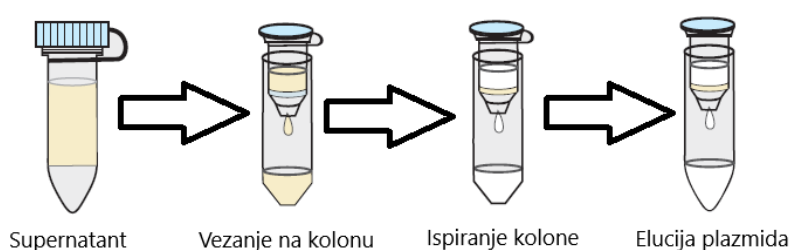
Transformacija je započeta pipetiranjem 0,9 μL β -merkaptoetanola u alikvot XL10-Gold bakterija od 20 μL , smjesa je lagano promiješana te inkubirana na ledu 10 minuta. Pokazalo se da dodatak β -merkaptoetanola povećava učinkovitost transformacije. Nakon 10 minuta, dodano je 0,9 μL produkta mutageneze tretiranog sa *DpnI*, zatim je smjesa lagano promiješana i inkubirana na ledu 30 minuta. U međuvremenu je pripremljeno 0,5 mL LB+ (Luria-Bertani plus) medija (0,5 mL LB [Luria-Bertani] medija, 10 μL 20% glukoze i 12,5 μL MgCl_2 [$c(\text{MgCl}_2) = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$]), medij je zagrijan u termobloku postavljenom na 42 °C. Nakon 30 minuta inkubacije na ledu, alikvot bakterija je prenesen u termoblok na 42 °C na 30 sekundi, a zatim prenesen natrag na led u trajanju od 2 minute. Potom je 500 μL toplog LB+ medija dodano transformiranim bakterijama te je smjesa inkubirana na termobloku 1 sat uz miješanje pri 250 rotacija po minuti (engl. *rotations per minute*, rpm). Nakon 1 sata inkubacije, 250 μL smjese nanoseno je na LB hranjivu ploču s 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ antibiotika ampicilina. Hranjiva ploča je ostavljena preko noći na 37 °C.

Nakon inkubacije preko noći na hranjivoj ploči, narasle su jedino kolonije uspješno transformiranih bakterija s rezistencijom na ampicilin. Rast na ploči pokazuje posjedovanje rezistencije na ampicilin, no valjanost vektora i inserta još nije zajamčena. Pripremljena je prekončna kultura, koja se sastoji od LB medija i 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilina. U sterilnim uvjetima, 4 mL LB medija u epruveti od 15 mL inokulirano je laganim dodirivanjem jedne od kolonija vrhom pipete i spuštanjem vrha u epruvetu s LB medijem. Dvije prekončne kulture su inokulirane za svaki mutant, različite kolonije su uzorkovane s hranjivih ploča. Inokulirane kulture uzgajane su u inkubatoru na 37 °C preko noći uz miješanje pri 200 okretaja u minuti.

3.2.3. Izolacija rekombinantnog plazmida

Nakon inkubacije preko noći, prekončna kultura je centrifugirana na 6800 x g u trajanju od 2 minute. Centrifugiranje je započeto prijenosom 2 mL kulture, centrifugiranjem, odstranjivanjem supernatanta, dodatkom preostalih 2 mL kulture i ponovnim centrifugiranjem bakterija. Sljedeći koraci izvedeni su prema protokolu *Thermo Scientific GeneJet miniprep kit* za izolaciju plazmida, sve otopine koje su korištene su dio komercijalnog kompleta.⁵⁵ Bakterijski talog je resuspendiran u 250 μL otopine za resuspendiranje (engl. *resuspension*

solution), zatim prebačen u tubicu od 2 mL. Dodano je 250 μ L otopine za lizu (engl. *lysis solution*), zatim je tubica okrenuta 6 do 7 puta, sve dok otopina nije postala viskozna i blago bistra. Važno je da trajanje lize stanica ne prelazi 5 minuta. *Thermo Scientific GeneJet miniprep kit* koristi alkalnu lizu za razbijanje bakterijske membrane. Otopina za lizu sadrži deterđent SDS i NaOH, SDS destabilizira staničnu membranu ometajući hidrofobne interakcije, dok NaOH denaturira DNA. Dodano je 350 μ L otopine za neutralizaciju, epruveta je odmah okrenuta 6 do 7 puta, u epruveti se pojavio bijeli talog. Smjesa je centrifugirana 15 minuta na 16 000 x g. Supernatant je pažljivo prebačen u *GeneJet spin* kolonu.



Slika 10. Koraci izolacije plazmida s kompletom *Thermo Scientific GeneJet miniprep kit*.⁵⁵

GeneJet spin kolona je umetnuta u plastičnu epruvetu koja je uključena u komplet (slika 10). Epruveta s kolonom je centrifugirana 1 minutu na 16 000 x g, nevezna frakcija (engl. *Flowthrough*) je odbačena.

Kolona je isprana sljedećim protokolom: 500 μ L otopine za ispiranje (engl. *Washing solution*) je dodano na kolonu, kolona je centrifugirana 1 minutu na 16 000 x g, nevezna frakcija je odbačena. Kolona je ispirana dva puta. Nakon drugog ispiranja, kolona je još jednom centrifugirana na 16 000 x g u trajanju od 1 minute, dok nije potpuno uklonjena preostala tekućina na koloni. Kolona je prenesena u novu epruvetu, pažljivo je dodano 50 μ L otopine za eluiranje na sredinu kolone, te je kolona inkubirana 2 minute na sobnoj temperaturi. Kolona i epruveta su centrifugirane 2 minute na 16 000 x g. Koncentracija eluiranog rekombinantnog plazmida određena je pomoću mikrovolumnog spektrofotometra *BioDrop* i plazmid je pohranjen na -20 °C. Kako bi se potvrdila uspješna mutageneza, izolirani plazmidi su poslani na sekvenciranje. Za oba mutanta, obje uzorkovane kolonije sadržavale su ciljne mutacije.

3.3. Prekomjerna ekspresija proteina

3.3.1. Transformacija stanica elektroporacijom

Rekombinantni plazmidi moraju se transformirati u bakterijski soj za ekspresiju proteina. Transformacija je izvedena elektroporacijom pLATE31 vektora s mutiranim hDPP III genom u *BL21-CodonPlus(DE3)RIL* bakterijski soj koji je pripremljen za elektroporaciju.

Svi daljnji koraci su izvedeni na ledu. Uzeto je 0,5 µL mutiranog plazmida i pomiješano s alikvotom od 20 µL *BL21-CodonPlus(DE3)RIL* elektrokompetentnih stanica. Smjesa je prenesena u ohlađenu kvarcnu kivetu za elektroporaciju. Kiveta je pažljivo stavljena u elektroporator, koji šalje kratki električni impuls kroz kivetu. Kratki impuls je poslan kroz smjesu koja sadrži stanice i mutirane molekule plazmida. Odmah nakon transformacije je dodano 0,5 mL LB medija, prethodno zagrijanog na 37 °C, i sadržaj kivete je prenesen u epruvetu od 1,5 mL. Epruveta je inkubirana u termobloku, temperatura je postavljena na 37 °C uz miješanje na 300 rpm tijekom jednog sata. Nakon inkubacije preneseno je 100 µL sadržaja epruvete na hranjivu ploču s ampicilinom. Ampicilin se koristi za provjeru uspješno transformiranih bakterija. Bakterijska suspenzija je ravnomjerno raspoređena po ploči koja se inkubira preko noći na 37 °C.

3.3.2. Prekonoćna bakterijska kultura i kultura za prekomjernu ekspresiju proteina

Nakon inkubacije na hranjivoj ploči, samo transformirane bakterijske kolonije su narasle. Kako bi se kultivirale veće količine bakterija u sterilnim uvjetima je pripremljena prekonoćna kultura. Pripremljeno je 15 mL LB medija s 15 µL ampicilina (početna koncentracija 100 mg mL⁻¹) u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL. Dodirnutu je kolonija na hranjivoj ploči vrhom pipete te je vrh pipete ubačen u LB medij s ampicilinom. Tikvici je osiguran pristup zraku te je inkubirana preko noći na 37 °C uz mućkanje na 300 rpm. Sljedeći dan je pripremljena kultura za ekspresiju proteina, 500 mL LB medija s 500 µL ampicilina (početna koncentracija 100 mg mL⁻¹) u tikvi od 2 L. U kulturu za ekspresiju je preneseno 10 mL prekonoćne kulture. Kultura za ekspresiju proteina je inkubirana na 37 °C uz mućkanje pri 250 rpm.

Rast bakterija je praćen uzimanjem 1 mL uzorka kulture i mjerenjem optičke gustoće pri valnoj duljini od 600 nm (OD_{600}). OD_{600} za induciranje je 0,5-0,6 pri kojem su stanice u eksponencijalnoj fazi rasta. Odgovarajući OD_{600} dosegnut je nakon otprilike jednog i pol sata inkubacije. Nakon postizanja optimalne optičke gustoće za indukciju, tikvica je ohlađena na 18 °C. Inkubator je postavljen na 18 °C uz miješanje na 130 rpm, dodano je 125 µL IPTG-a

($c = 1 \text{ mol L}^{-1}$) i tikve su vraćene u inkubator, protein je eksprimiran preko noći. Sljedeći dan je kultura centrifugirana na 6000 rpm u centrifugi *Sorvall RC-5B* tijekom 20 min. Istaložene bakterije su čuvane na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4. Pročišćavanje prekomjerno proizvedenog proteina

3.4.1. Liziranje bakterijskih stanica

Istaložene bakterije su prenesene u plastičnu epruvetu od 50 mL i resuspendirane, 2 g bakterija je resuspendirano u 10 mL pufera za lizu. Pufer za lizu stanica se sastoji od 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM imidazola, pH 8,0. U resuspendiranu smjesu je dodano 100 μL lizozima te je ostavljeno pola sata na ledu. Zatim je smjesa sonificirana dva puta po 2 minute uz trajanje pulsa od 2 sekunde s amplitudom 40 %. Sonifikacija značajno zagrijava uzorak, stoga je smjesa cijelo vrijeme tijekom sonifikacije držana na ledu. Dodano je 10 μL enzima *DNaseI*, smjesa je držana 20 minuta na $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Smjesa je centrifugirana 45 minuta na $16\,000 \times g$ na $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant je filtriran kroz filter sa porama veličine $0,45 \mu\text{m}$. Filtriranjem supernatanta je osigurano da ostaci stanica nisu bili nanoseni na kromatografsku kolonu, što bi moglo poremetiti čistoću uzorka.

3.4.2. Pročišćavanje rekombinantnog proteina afinitetnom kromatografijom

Pročišćavanje proteina je izvedeno afinitetnom kromatografijom s imobiliziranim metalnim ionom (engl. *immobilized metal-ion affinity chromatography*, IMAC). Afinitetna kromatografija je metoda koja odvaja ciljni protein od ostatka staničnog lizata na temelju specifičnih interakcija između kolone i biomakromolekule.

Kromatografska kolona je ispunjena matriksom nikal-nitrilotrioctene kiseline (Ni^{2+} -NTA), koja snažno veže biomakromolekule sa 4 ili više uzastopnih histidina (His-tag). Ion nikla je imobiliziran s 4 koordinacijske veze za nitrilooctenu kiselinu, dok su ostale 2 koordinacijske veze slobodne za vezanje. Histidini imaju visok afinitet vezanja na imobilizirani metalni ion. Protein sa polihistidinskim privjeskom ostaje vezan na kolonu tijekom ispiranja, dok se ostatak proteina iz staničnog lizata ispiri s kolone. Za oslobađanje proteina s kolone koristimo visoke koncentracije imidazola u puferu za eluiranje. Imidazol se natječe za mjesta vezanja na metalni ion s polihistidinskim privjeskom. Nizvodno od kodirajućeg slijeda za mutirani DPP III umetnuta je sekvenca koja kodira šest uzastopnih histidina. IMAC je vrlo specifična i brza metoda za pročišćavanje mutiranog DPP III s polihistidinskim privjeskom. IMAC uglavnom

ne ometa pravilno smatanje proteina i koristi relativno blage uvjete elucije koji ne narušavaju strukturu proteina.

Tablica 5. Sadržaj pufera za pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom

Pufer	Sadržaj
Pufer za lizu	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0
Pufer za ispiranje	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8,0
Pufer za eluciju	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 300 mM imidazol, pH 8,0
Pufer za završnu eluciju	50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8,0

Za pročišćavanje proteina korištene su kolone Ni²⁺-NTA volumena 1 mL. Da bi se ubrzalo pročišćavanje proteina, korištena je peristaltička pumpa. Tijekom pročišćavanja, osim ako nije drugačije navedeno, brzina protoka je bila 1,0 mL min⁻¹. Sastavi korištenih puferskih otopina navedeni su u tablici 5. Kolona je pripremljena nanošenjem 1 mL Ni²⁺-NTA punila na kolonu. Ni²⁺-NTA punilo isprano je prvo s 10 volumena kolone (engl. *column volume*, CV) pročišćene vode (mQH₂O), zatim s 10 CV pufera za lizu. Nakon ispiranja kolone, uzorak (filtrirani supernatant) je nanesen na kolonu, brzina protoka je smanjena na 0,5 mL min⁻¹. Nevezana frakcija je sakupljena u epruveti od 15 mL. Kolona je isprana tri puta s 2 mL pufera za ispiranje, eluat je sakupljen u tri epruvete od 2 mL s oznakom ispiranje 1 – 3. Brzina protoka je povećana na 1,0 mL min⁻¹. Samo protein s polihistidinskim privjeskom ostaje vezan za kolonu. Vezani protein je eluiran s 5 mL pufera za eluiranje. Za potpunu eluciju proteina, po potrebi se može koristiti više pufera za eluciju nego što je ovdje navedeno. Eluat je skupljan u frakcijama od 0,5 mL, nakon elucije mjerena je koncentracija proteina svake frakcije na mikrovolumnom spektrofotometru *BioDrop* (*Biochrom*). Preostale biomakromolekule vezane za kolonu su uklonjene s 2 mL pufera za završnu eluciju, frakcija je skupljena u epruvetu, u slučaju da ciljani protein nije uspješno eluiran. Prije skladištenja, kolona je isprana s 10 mL mQH₂O i 10 mL 20 % etanola te je pohranjena u 2 mL 20 % etanola.

3.4.3. Analiza SDS gel-elektroforezom

Natrijev dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza (engl. *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) je analitička metoda, koja omogućuje

odvajanje proteina na temelju njihove molekulske mase. Migracija nabijenih čestica u električnom polju naziva se elektroforeza, te je funkcija veličine i oblika. PAGE odvaja makromolekule na temelju omjera mase i naboja. SDS razmata i veže se na protein na proporcionalan način. U prosjeku, na svake dvije aminokiseline se veže jedna molekula SDS-a. Molekulska masa je općenito proporcionalna broju aminokiselina. SDS ima negativno nabijene skupine, s kojima zasjenjuje intrinzični naboj proteina. Zbog denaturacije proteina SDS-om, oblik nativnog proteina ne utječe na brzinu migracije. Također, SDS-PAGE omogućuje određivanje molekulske mase ciljnog proteina pomoću markera poznatih molekulskih masa.

SDS-PAGE gel se sastoji od dva dijela različitog sastava, gela za sabijanje i razdvajanje. Gel za sabijanje služi kao grubo sito kako bi svi uzorci zauzeli isti početni položaj. Gel za razdvajanje je fino sito koje odvaja različite proteine na temelju njihove molekulske mase. Sastavi gelova za sabijanje i razdvajanje navedeni su u tablici 6.

Tablica 6. Sastavi gelova za razdvajanje i sabijanje

	Gel za sabijanje ($\omega = 5\%$) / mL	Gel za razdvajanje ($\omega = 10\%$) / mL
mQH ₂ O	2,01	2
Tris-HCl ($c = 1,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,8)	\	1,25
Tris-HCl ($c = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,8)	0,375	\
Acrylamide/bisacrylamide, 30%	0,503	1,65
SDS, 100%	0,03	0,05
Ammonium persulfate, 10%	0,03	0,05
TEMED (N, N, N', N'- Tetramethylethane-1,2- diamine)	0,002	0,008

Prije nanošenja, uzorci su denaturirani i pomiješani s 2x tretirajućim puferom u volumnom omjeru 1:1. 2x tretirajući pufer sadrži: $0,125 \text{ mmol L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20%

glicerol, 2% β -merkaptoetanol, 0,03 mmol L⁻¹ bromofenol plavo. Za svaku elucijsku frakciju sa IMAC-a uzeto je 5 μ L uzorka i pomiješano s 5 μ L 2x tretirajućeg pufera. Nakon miješanja uzorci su zagrijani na 95 °C 10 minuta. Uzorci nevezne frakcije i frakcija završnog ispiranja pripremljeni su na isti način. Uzorak taloga lizata i stanični uzorci pripremljeni su centrifugiranjem, struganjem taloga i resuspendiranjem u 5 μ L, potom miješanjem s 2x tretirajućim puferom. Nakon zagrijavanja uzoraka na 95 °C te prije nanošenja na gel, uzorci su kratko centrifugirani u centrifugi *Eppendorf 5415 R*. Na gel je nanoseno 10 μ L svakog uzorka.

Sustav elektroforeze je spojen na izvor struje, elektroforeza započinje s naponom od 100 V migracijom kroz gel za sabijanje. Kada je boja dosegla gel za razdvajanje, napon je povećan na 150 V. Elektroforeza je provedena do trenutka kada je boja dostigla kraj gela. Gel je prenesen u kadicu za bojanje, te ostavljen da se inkubira u boji *Coomassie Brilliant Blue g-250* (CBB) 15 minuta na 50 °C. Nakon 15 minuta boja je uklonjena, te je dodan odbojivač (MeOH ($\varphi = 30\%$), octena kiselina ($\varphi = 10\%$), H₂O ($\varphi = 60\%$)). Gel je odbojavan na 50 °C, uz povremenu promjenu otopine za odbojavanje, kada je otopina poprimila plavu boju. Nakon postizanja zadovoljavajućeg kontrasta, gel je vizualno pregledan da bi se procijenila čistoća proteina.

3.4.4. Odsoljavanje rekombinantnog proteina

Kako bi se sačuvao strukturni integritet pročišćenog proteina tijekom dugoročnog skladištenja i zamrzavanja, nije preporučljivo držati protein u puferu s visokim sadržajem imidazola. PD-10 kolone (*GE Healthcare*) korištene su za odsoljavanje proteina. Pufer za odsoljavanje sadrži Tris-HCl ($c = 20$ mmol L⁻¹), pH 7,4.

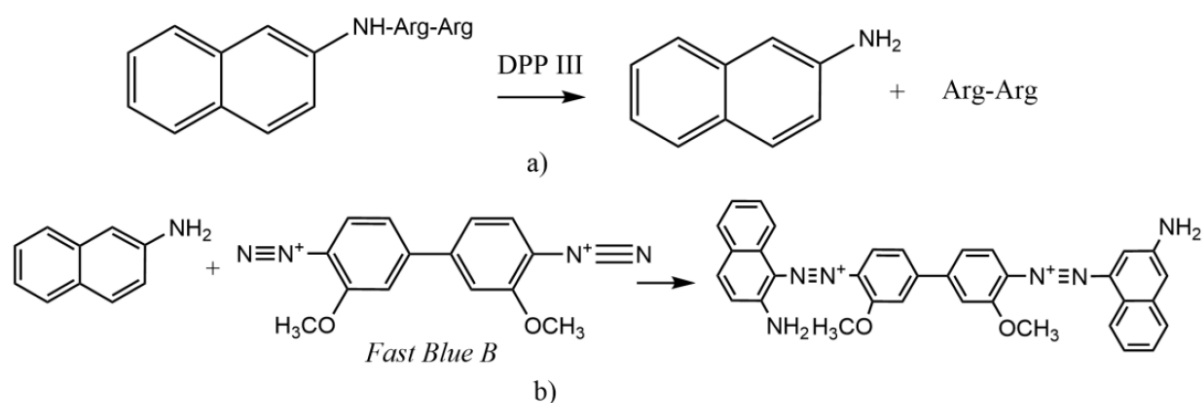
Kolona je isprana s 25 mL H₂O, a zatim ekvilibrirana s 25 mL pufera za odsoljavanje. Prije odsoljavanja proteina, odabirano je 5 frakcija pročišćenog proteina od 0,5 mL. Odabirane su frakcije s najvećom koncentracijom proteina i čistoćom. Frakcije su spojene te je izmjerena skupna koncentracija proteina na mikrovolumnom spektrofotometru *BioDrop*. 2,5 mL spojenog pročišćenog proteina je nanoseno na kolonu, eluat je skupljan kako bi se spriječio gubitak proteina. Protein je eluiran s 3,5 mL pufera za odsoljavanje, sakupljene su frakcije u epruvete od 5 mL, te je izmjerena koncentracija pročišćenog proteina u novom puferu. Kolona je isprana s dodatnih 3,5 mL pufera za odsoljavanje, eluat je skupljan, te je

provjereno ima li zaostalog proteina. Prije skladištenja kolona je prvo isprana s 10 mL H₂O, a zatim s 10 mL 20% etanola i pohranjena u 20 % etanolu.

3.5. Biokemijska karakterizacija proteina

3.5.1. Specifična enzimska aktivnost

Kako bi se utvrdilo utječu li mutacije na aktivnost DPP III, proveden je test specifične aktivnosti. DPP III katalizira odcjepljivanje 2 aminokiseline arginina iz sintetskog supstrata Arg-Arg- β -naftilamida (slika 11). Mjerenje aktivnosti temelji se na detekciji produkta reakcije: β -naftilamina (β -NA).



Slika 11. a) Reakcija cijepanja Arg-Arg- β -naftilamida djelovanjem enzima DPP III.

b) Reakcija diazokopulacije FBB sa β -naftilaminom, količina produkta se detektira spektrofotometrijski.

Reakcijskim produktom β -naftilaminom treba pažljivo rukovati, jer je poznata kancerogena tvar. Reakcija se zaustavlja dodatkom otopine *Fast Blue B* soli (FBB), otopina FBB se sastoji od: FBB ($\gamma = 1,5 \text{ mg mL}^{-1}$), natrijevog acetata ($c = 2,1 \text{ mol L}^{-1}$), Tween 80 ($\varphi = 0,10$), pH 4,2. FBB i produkt reakcije prolaze kroz reakciju diazokopulacije, produkt diazokopulacije može se detektirati pomoću spektrofotometra. Reakcija diazokopulacije je reakcija elektrofilne supstitucije, koja proizvodi konjugirani sustav π -veza koji emitira svjetlost u vidljivom spektru. Nakon dodatka FBB-a otopina postaje ružičasta, a da bi se odredila koncentracija produkta mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 530 nm. Koristeći izmjerenu apsorbanciju i Beer-Lambertov zakon izračunata je koncentracija produkta enzimske reakcije.

Sva mjerenja rađena su u duplikatima. Za određivanje specifične aktivnosti korišten je pufer za istraživanje aktivnosti. Pufer za istraživanje aktivnosti je Tris-HCl ($c = 100 \text{ mmol L}^{-1}$), pH 8,6. U staklenu epruvetu dodano je 500 μL pufera za istraživanje aktivnosti, 437 μL vode, 10 μL CoCl_2 ($c = 5 \text{ mmol L}^{-1}$) i 3 μL proteina. Smjesa je inkubirana 2 minute u vodenoj

kupelji na 37 °C. Nakon 2 minute dodano je 50 µL Arg-Arg-β-naftilamida ($c = 0,8 \text{ mmol L}^{-1}$), čime je započeta reakcija. Reakcija traje 15 minuta te je zaustavljena dodatkom 200 µL otopine FBB. Nakon 10 minuta inkubacije otopine FBB izmjerena je apsorpcija pri valnoj duljini od 530 nm. Spektrofotometar je kalibriran slijepom probom. Slijepa proba sadrži sve komponente koje ima svaki uzorak, osim enzima, te je također prošla sve korake inkubacije. Prilikom rukovanja s više uzoraka paženo je da vrijeme između dodatka supstrata i završetka reakcije (dodatkom FBB-a) bude ujednačeno. Specifična aktivnost je izračunata iz relativne apsorpcije ΔA_{530} prema jednadžbi 1.

$$(1) \% \left[\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{mmol} / \text{dm}^3 \right] = \frac{\Delta A_{530} \times 1000}{t[\text{min}] \times \gamma \left[\frac{\text{mg}}{\text{mmol} / \text{dm}^3} \right] \times V[\mu\text{L}]}$$

3.5.2. Fluorimetrijsko mjerenje enzimske kinetike

Kinetički parametri određivani su fluorescentnim spektrofotometrom, fluorescencija je mjerena pri 25 °C. Da bi se odredila brzina reakcije, praćena je koncentracija produkta mjerenjem fluorescencije β-naftilamina, produkta DPP III cijepanja Arg-Arg-β-naftilamida (slika 11a). Beer-Lambertov zakon omogućuje određivanje koncentracije β-naftilamina na temelju intenziteta fluorescencije.

Za mjerenja fluorescencije uzorak se mora prevesti u pobuđeno stanje, fluorescencijski spektrofotometar emitira ekscitacijske zrake valne duljine 420 nm. Apsorpcijom zračenja, β-naftilamin prelazi u pobuđeno metastabilno stanje koje kratko traje, produkt u pobuđenom stanju disperzira dio energije vibracijskom relaksacijom. Stoga produkt pri vraćanju u osnovno stanje emitira zračenje pri nižoj valnoj duljini. Produkt β-naftilamin emitira zračenje pri valnoj duljini od 332 nm.

Otvor ekscitacijske pukotine iznosio je 10 nm, a emisijske pukotine 5 nm. Reakcija smjesa je sadržavala: pufer za istraživanje aktivnosti (Tris-HCl [$c = 100 \text{ mmol L}^{-1}$], pH 8,6), otopinu kobalt klorida ($c(\text{CoCl}_2) = 5 \text{ mmol L}^{-1}$) i supstrat Arg-Arg-β-naftilamid ($c = 0,8 \text{ mmol L}^{-1}$). Koncentracija enzima je određena za svaki mutant zasebno, na temelju rezultata testova aktivnosti i kvalitete početnih podataka. Koncentracija enzima je mijenjana tako da bi se dobile adekvatne krivulje za sve koncentracije supstrata. Kod DPP III WT konačna koncentracija enzima bila je 1 nmol L^{-1} , za mutant P360S konačna koncentracija enzima bila

je 2 nmol L⁻¹ i konačna koncentracija mutanta DPP III P358L bila je 1,5 nmol L⁻¹. Tablica 7 prikazuje sastav otopina za različitu koncentraciju supstrata. Ukupni volumen svake reakcijske smjese je 3 mL. Supstrat je dodan zadnji, prije dodatka supstrata smjesa je inkubirana 2 minute na 25 °C. Odmah nakon dodatka supstrata smjesa je stavljena u spektrofotometar i započeto je mjerenje fluorescencije, svako mjerenje je trajalo 1 minutu. Sva mjerenja napravljena su u duplikatima.

Tablica 7. Sastav otopina korištenih za mjerenje kinetike pri različitim koncentracijama supstrata.

$c(S) / \mu\text{mol L}^{-1}$	$V(S) / \mu\text{L}$	$V(\text{H}_2\text{O}) / \mu\text{L}$	$V(\text{pufer}) / \mu\text{L}$	$V(\text{CoCl}_2) / \mu\text{L}$	$V(E) / \mu\text{L}$
0,5	1,88	1463	1500	30	5
1,25	4,7	1460	1500	30	5
2,5	9,4	1456	1500	30	5
5	18,75	1446	1500	30	5
10	37,5	1427,5	1500	30	5
20	75	1390	1500	30	5
40	150	1315	1500	30	5
60	225	1240	1500	30	5
80	300	1165	1500	30	5

3.5.3. Izotermalna titracijska kalorimetrija

Izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC) je moćna tehnika za karakterizaciju interakcija makromolekula. ITC mjeri promjenu topline koja nastaje vezanjem dviju molekula. Tijekom interakcije toplina se može apsorbirati (endotermna reakcija) ili osloboditi (egzotermna reakcija). ITC instrument sadrži dvije identične ćelije okružene adijabatskom okolinom. Referentna ćelija sadrži pufer ili vodu, dok ćelija uzorka sadrži otopinu makromolekule. Mjerljiva varijabla u ITC eksperimentu je snaga instrumenta potrebna za održavanje jednakih temperatura u uzorku i referentnoj ćeliji.^{56,57}

Mjerenja su provedena s uređajem *NanoITC Low volume (TA instruments)*.⁵⁸ ITC instrument sadrži referentnu i reakcijsku ćeliju volumena 170 μL, s volumenom štrcaljke od 50 μL. Eksperimenti su provedeni tako da je ćelija sadržavala protein DPP III, dok je štrcaljka sadržavala protein partner, domenu Kelch proteina Keap1. Otopine su miješane s diskretnim

injekcijama otopine iz štrcaljke u ćeliju. Svaki eksperiment imao je 21 injekciju štrcaljkom. Prva injekcija je prenijela 1 μL volumena, sljedećih 20 injekcija prenijelo je 2 μL otopine proteina partnera. Tijekom mjerenja sustav je održavan na 5 ili 25 $^{\circ}\text{C}$ uz brzinu miješanja reakcijske smjese od 300 rpm. Oba proteina su držana u istom puferu: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 7,5. Prije svakog mjerenja, otopine proteina su centrifugirane, kako bi se uklonio precipitirani protein. Koncentracije proteina u štrcaljki i u ćeliji varirane su za svaki eksperiment i izmjerene prije svakog mjerenja na uređaju *BioDrop*. Koncentracije proteina prikazane su u tablici 8.

Tablica 8. Koncentracije otopina proteina korištenih za mjerenja protein-protein interakcija sa ITC-om između DPP III mutanata i Kelch domene proteina Keap1.

	c (Kelch) / $\mu\text{mol L}^{-1}$	c (DPP III) / $\mu\text{mol L}^{-1}$
WT/Kelch	113	23
P358L/Kelch	112	20
P360S/Kelch	112	24

Izmjereni podaci analizirani su pomoću softvera *NanoAnalyze* koji je osigurao proizvođač ITC instrumenata (*TA instruments*). Bazalna linija titracije je podešena ručno. Posljednja titracija je uzeta kao titracija proteina iz štrcaljke sa puferom. Vrijednost promjene topline titracije proteina sa puferom je oduzeta od svakog *peak*-a. Promjena topline po injekciji, dobivena integriranjem površine za svaki *peak*, uklopljena je nelinearnom regresijom na sigmoidalnu funkciju. Na temelju dobivene krivulje program je izračunao konstantu disocijacije, reakcijsku entalpiju i stehiometriju.

Tijekom mjerenja ITC-a u ćeliji se formirao precipitat. Nastali precipitat je analiziran SDS-PAGE-om. Nakon mjerenja uzet je uzorak, centrifugiran na 16 000 x g u trajanju od 5 minuta i talog nanesen na SDS-PAGE.

3.6. Računalne metode

3.6.1. Simulacije molekulske dinamike

Za pripremu sustava i simulacije molekulske dinamike (MD) korišten je programski paket AMBER20.⁴⁷ Početna struktura DPP III je dobivena od članova Laboratorija za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje s Instituta Ruđer Bošković.

Za potrebe simulacije sustav je trebalo parametrizirati i u tu svrhu korišteno je ff19SB polje sila. Polja sila sadrže parametre koji opisuju interakcije atoma i funkcije koje opisuju potencijalnu energiju sustava. Polja sila koja se koriste za modeliranje velikih i složenih biokemijskih sustava relativno su jednostavna, kako bi omogućila efikasno (računski i vremenski prihvatljivo) modeliranje velikog broja interakcija koje u takvim sustavima postoje.

Sustav za MD simulaciju je konstruiran kao krnji oktaedar s eksplicitnim OPC molekulama vode. Simulacijska kutija je konstruirana tako da je svaka aminokiselina udaljena najmanje 11 Å od ruba oktaedra. Simulirani sustav sastoji se od promatranog mutanta DPP III, molekula vode koje ispunjavaju kutiju i Na⁺ iona. Na⁺ ioni su dodani radi neutralizacije naboja proteina. OPC molekule vode koriste model krutog naboja u 4 točke, u skladu sa C_{2v} simetrijom molekule vode.⁵⁹

OPC model voda je korišten budući da su testiranja pokazala da ff19SB polje sila, pokazuje najdosljednije rezultate upravo s OPC molekulama vode.⁶⁰

Prije produktivnih MD simulacija sustav je minimiziran i uravnotežen. Sustav je minimiziran u 3 ciklusa pomoću programa *sander* s različitim geometrijskim ograničenjima nametnutim sustavu tijekom svake optimizacije. Prvi ciklus minimizacije sadržavao je 1500 koraka, omogućeno je slobodno kretanje samo molekulama vode dok je kretanje proteina ograničeno. Drugi ciklus s 2500 koraka ograničava kretanje okosnice proteina, dok dopušta kretanje otapala i bočnih ogranaka aminokiselina. Treći, i posljednji, ciklus minimizacije uklanja sva ograničenja kretanja u sustavu te traje 1500 koraka.

Nakon simulacija zagrijavanja sustava od 0 do 300 K tijekom 50 ps s duljinom koraka od 1 fs provedene su simulacije uravnoteženja gustoće sustava. Tijekom simulacija je korišten SHAKE algoritam koji ograničava vibracije C-H veze.

Tijekom produktivnih MD simulacija ponovno je primijenjen SHAKE algoritam koji nam je omogućio povećanje duljine koraka na 2 fs, s 75 000 000 koraka, svaka simulacija je trajala 150 ns. Za svaki simulirani sustav produktivna MD simulacija je provedena na temperaturi od

300 K, koja je osigurana korištenjem Langevinog termostata pri tlaku oko 1 atm (NPT ansambl).

3.6.2. Analiza geometrijskih parametara iz MD simulacija

Nakon provedenih MD simulacija, trajektorija simulacija sadrži sve promjene položaja koja su se dogodila tijekom simulacije. Referentna struktura je izlazna struktura posljednje minimizacije za dani mutant. Za određivanje odstupanja strukture tijekom simulacija koristimo veličinu RMSD (engl. *root mean square deviation*).

$$(2) \text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - r_{i0})^2}$$

RMSD pokazuje uprosječeno odstupanje položaja atoma okosnice od referentne strukture u nekom trenutku. U jednadžbi 2 N predstavlja broj atoma u proteinu, r_i predstavlja koordinate atoma i , r_{i0} predstavlja koordinate atoma i u referentnoj strukturi.

$$(3) \text{RMSF} = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T (r_{i(t)} - r_{i0})^2}$$

RMSF (srednja kvadratna fluktuacija, engl. *Root Mean Square Fluctuation*) pokazuje vremenski uprosječeno odstupanje položaja za svaku pojedinačnu aminokiselinu. RMSF nam može dati uvid u proteinske regije koje pokazuju veću fleksibilnost tijekom simulacija.

$$(4) R_g = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - r_0)^2}$$

Radius giracije (R_g) izračunava kumulativnu udaljenost atoma okosnice proteina od njegovog središta mase. R_g nam daje uvid u kompaktnost proteina.

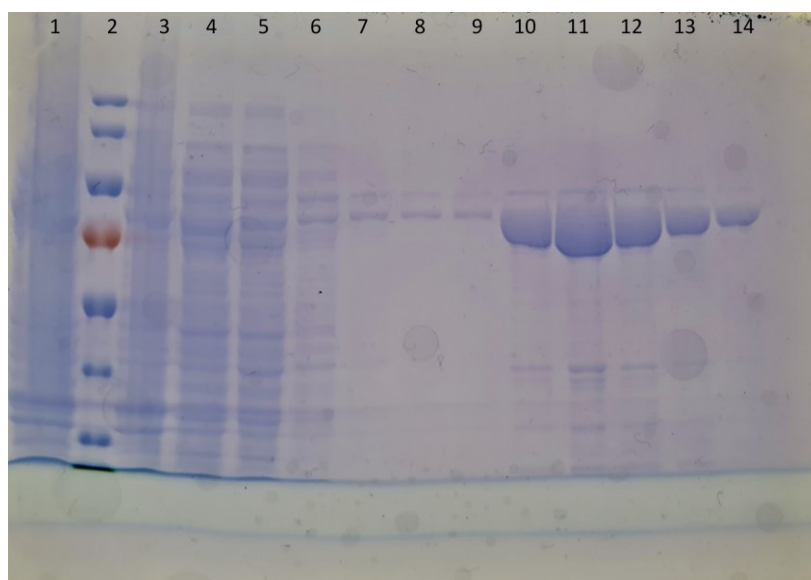
Kako bismo spriječili velika odstupanja zbog stohastičkog gibanja bočnih ogranaka, u analizi su promatrani samo atomi okosnice. Sve geometrijske analize simulacija rađene su s modulom *cpptraj* uključenim u programski paket AMBER20.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Analiza ekspresije i pročišćavanja proteina

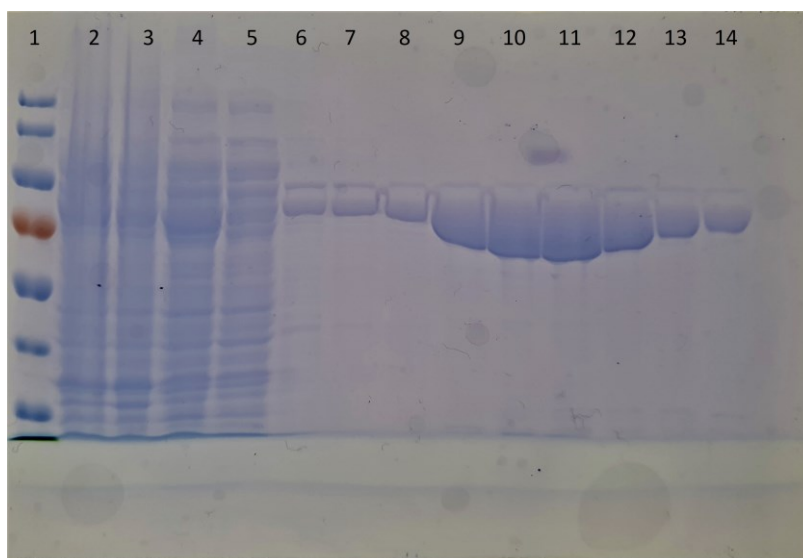
Uspješnost ekspresije i pročišćavanja proteina procijenjen je pomoću denaturirajuće gel elektroforeze (SDS-PAGE). Tijekom ekspresije proteina uzimani su uzorci iz bakterijskih kultura, kao i frakcije iz pročišćenog proteina. Frakcije za analizu su odabrane na temelju koncentracija proteina izmjerenih na spektrofotometru *BioDrop*. Koristio se marker *PageRuler Prestained Protein Ladder*, sa fragmentima molekulske mase u rasponu od 10 do 180 kDa.⁶¹ Molekulska masa divljeg tipa DPP III izračunata pomoću alata *ExPaSy ProtParam* je 83,5 kDa.⁶² Na slikama 12 - 14 je vidljivo da izolirani protein putuje sličnom brzinom kao i 75 kDa marker, što potvrđuje izračunatu molekulsku masu. Mutanti se ne razlikuju značajno u molekulskoj masi.

Slika 12 prikazuje gel koji predstavlja analizu proizvodnje i pročišćavanje P358L mutanta, ciljani protein ostaje u supernatantu nakon centrifugiranja, kao što je prikazano u jažicama 3 i 4. Pročišćene proteinske frakcije u jažicama 10 - 14 pokazuju zadovoljavajuću čistoću, frakcije E4 - E8 su spojene i odsoljene.



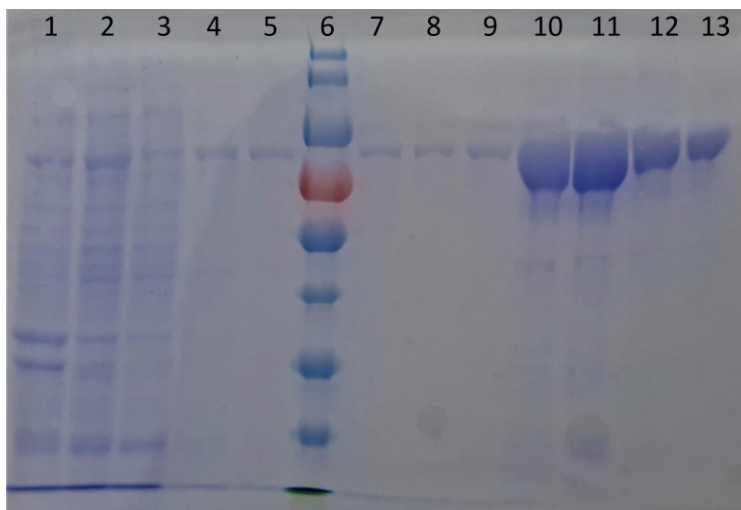
Slika 12. Analiza proizvodnje i pročišćavanja mutanta P358L pomoću SDS-PAGE. Sadržaj jažica: 1. Uzorak stanice nakon dodatka IPTG-a; 2. Marker; 3. Talog nakon centrifugiranja; 4. Supernatant nakon centrifugiranja; 5. Nevezna frakcija; 6.-8. Uzorci ispiranja 1-3; 9.-14. Frakcije E2-E7.

Slika 13 prikazuje gel koji predstavlja analizu proizvodnje i pročišćavanja P360S mutanta, u jažici 4 je vidljivo da ciljni protein ostaje u supernatantu. Jažica 5 pokazuje da ciljni protein nije eluirao s neveznom frakcijom u značajnim količinama. Frakcije za ispiranje sadrže određenu količinu ciljnog proteina, većina proteina eluirana je u frakcijama E3 - E7.



Slika 13. Analiza proizvodnje i pročišćavanja mutanta P360S pomoću SDS-PAGE-a. Sadržaj jažica: 1. Marker; 2. Uzorak stanice nakon dodatka IPTG-a; 3. Talog nakon centrifugiranja; 4. Supernatant nakon centrifugiranja; 5. Nevezna frakcija; 6.-8. Uzorci ispiranja 1-3; 9.-14. Frakcije E3-E8.

Radi usporedbe sa mutantima, proizveden je divlji tip (WT) DPP III protein. Analiza gela pokazuje da su neke nečistoće već odvojene u koracima stanične lize i centrifugiranja. Mala količina ciljnog proteina sadržana je u frakcijama W2, W3 i E1 - E3, međutim većina ciljnog proteina eluirana je u frakcijama E4 - E7. Eluirani protein pokazuje dobru čistoću, frakcije E4 - E8 su spojene i odsoljene (slika 14).



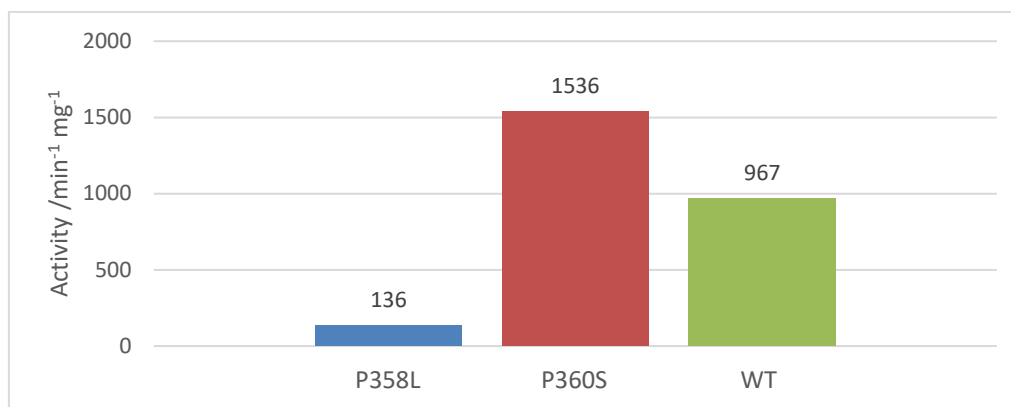
Slika 14. Analiza proizvodnje i pročišćavanja divljeg tipa (WT) proteina pomoću SDS-PAGE-a. Sadržaj jažica: 1. Talog nakon centrifugiranja; 2. Supernatant nakon centrifugiranja; 3. Nevezna frakcija; 4.-5. Uzorci ispiranja W2-W3; 6. Marker; 7.-13. Frakcije E1-E7.

4.2. Aktivnost mutanata

4.2.1. Test specifične aktivnosti

istraživanje specifične aktivnosti provedeno je na odsoljenim proteinima. Sva mjerenja su rađena u duplikatima, prikazani rezultat je prosjek rezultata za dva uzorka. Test specifične aktivnosti mjeri aktivnost sa sintetskim supstratom Arg-Arg- β -naftilamid. Analiza podataka provedena je programom *Microsoft Office Excel*.

U tablici 9 možemo vidjeti da je referentna aktivnost divljeg tipa hDPP III bliska literaturnoj vrijednosti koja iznosi $47\ 900\ \text{nmol}\ \text{mg}^{-1}\ \text{min}^{-1}$.⁶³ P358L mutant pokazuje značajno smanjenu aktivnost u usporedbi s WT hDPP III, pokazujući gotovo red veličine nižu aktivnost. P360S mutant pokazuje 1,5 puta veću aktivnost od enzima divljeg tipa. Inducirane mutacije nisu smještene u blizini aktivnog mjesta, te nije očekivana značajna promjena u peptidaznoj aktivnosti koja je vidljiva na slici 15.



Slika 15. Rezultati mjerenja peptidazne aktivnosti za mutante P358L i P360S i divlji tip (WT) hDPP III.

Test specifične aktivnosti je gruba metoda koja se uglavnom koristi za okvirnu procjenu aktivnosti enzima. Rezultati pomažu u određivanju početnih koncentracija enzima za mjerenja kinetike. Eksperimentalno je poznato da metoda pokazuje veliku varijaciju između mjerenja koja su rađena na isti način i u istim uvjetima. Pouzdanije metode, poput kinetike, pokazuju različite rezultate, te je preporučeno pridati više važnosti mjerenjima pouzdanijim metodama.

Tablica 9. Rezultati mjerenja specifične aktivnosti sa sintetičkim supstratom Arg-Arg- β -naftilamidom

hDPP III protein	WT	P360S	P358L
Aktivnost ($\Delta A_{530}/\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	967	1536	136
Specifična aktivnost ($\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	46013	73115	6483

4.2.2. Kinetika cijepanja sintetičkog supstrata

Za potpunu karakterizaciju peptidazne aktivnosti proizvedenih mutanata mjerena je kinetika reakcije s fluorescentnim spektrofotometrom. Mjerenja fluorescencije su izvršena *in situ* sa sintetskim supstratom Arg-Arg- β -naftilamid. Kinetički parametri dobiveni su nelinearnom regresijom u programu *GraphPad Prism 8*. Ovisnosti početnih brzina reakcije o koncentraciji supstrata regresirane su na Michaelis-Menteninu jednadžbu.

Izračunati kinetički parametri bili su: Obrtni broj (k_{cat}) predstavlja broj reakcija po vremenskoj jedinici pri zasićenju supstratom. Michaelisova konstanta (K_M) predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj je brzina reakcije polovica maksimalne brzine reakcije. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_M) je mjera koliko učinkovito enzim pretvara supstrat u proizvod.

Kinetički parametri prikazani su u tablici 10. WT hDPP III ima najveći obrtni broj, najnižu Michaelisovu konstantu i najveću konstantu specifičnosti. Dakle WT je najučinkovitiji u katalizi cijepanja peptidne veze. Mutanti P358L i P360S pokazuju manje učinkovitu katalizu s nižom konstantom specifičnosti, manjim brojem obrta i većim K_M . Sve izmjerene vrijednosti k_{cat} i K_M bile su relativno slične, jedino je konstanta specifičnosti pokazala značajniju razliku. Konstanta specifičnosti divljeg tipa hDPP III pokazala se gotovo 3 puta veća u usporedbi s mutantima, pokazujući veću učinkovitost katalize pri koncentracijama supstrata nižim od K_M . Izmjerena vrijednosti K_M za WT je u skladu sa literaturnom vrijednosti, no izmjerena vrijednost k_{cat} je trostruko manja i posljedično k_{cat}/K_M pokazuje trostruko manju vrijednost od literature.⁶³

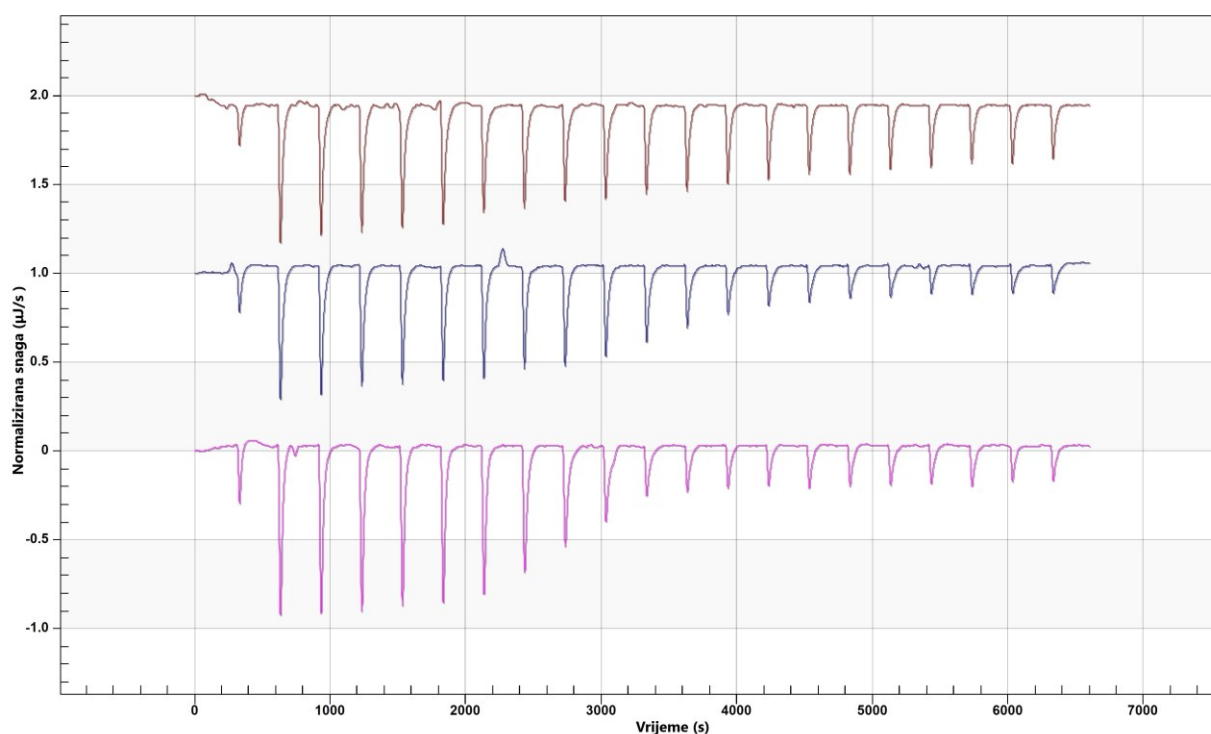
Tablica 10. Kinetički parametri aktivnost sa sintetskim supstratom za divlji tip (WT) hDPP III i mutante. Analiza podataka je napravljena nelinearnom regresijom pomoću programa *GraphPad Prism 8*.

	k_{cat} / s^{-1}	$K_M / \mu\text{mol L}^{-1}$	$k_{cat}/K_M / 10^6 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}$
WT	$13,09 \pm 1,19$	$6,26 \pm 2,94$	$2,09 \pm 1,02$
P360S	$9,12 \pm 0,24$	$13,11 \pm 1,22$	$0,70 \pm 0,05$
P358L	$7,12 \pm 0,21$	$8,61 \pm 2,20$	$0,83 \pm 0,27$

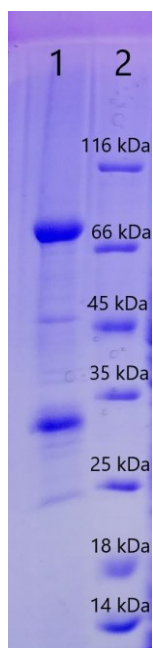
4.3. Interakcija DPP III sa Kelch domenom

4.3.1. Izotermalna kalorimetrija (ITC)

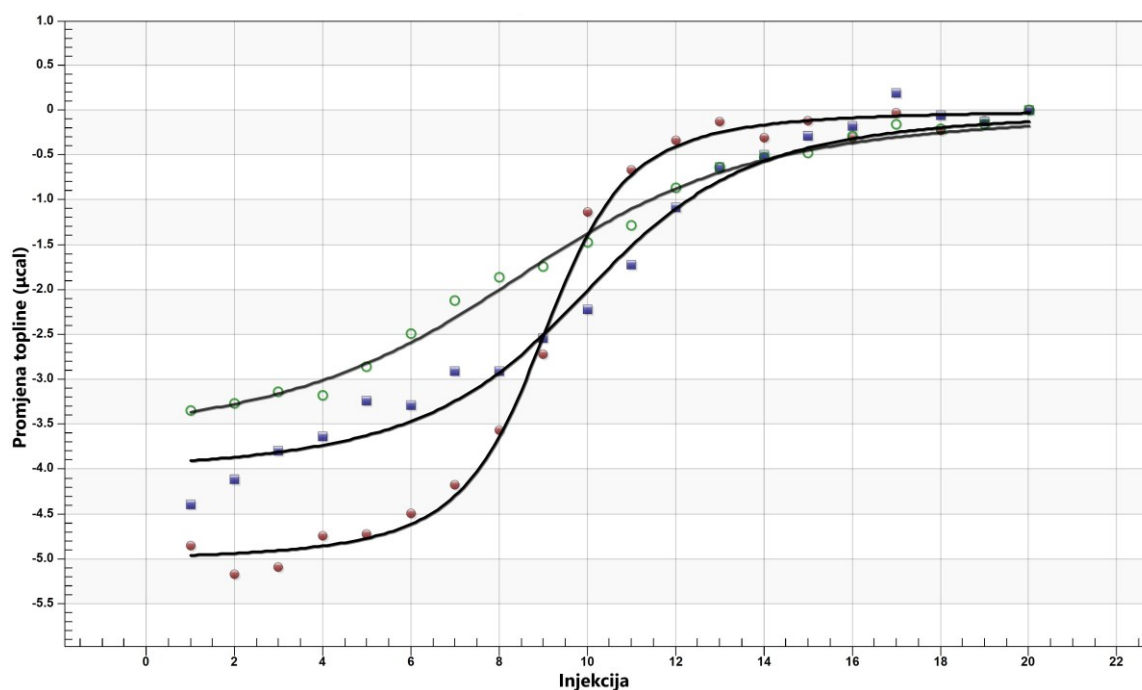
Da bi se odredio afinitet interakcije hDPP III i Kelch domene proteina Keap1, izvedena su mjerenja izotermalnom kalorimetrijom. ITC omogućava mjerenje konstante disocijacije (K_d) i termodinamičkih parametara. Prve titracije napravljene su na 25 °C što je dovelo do jake precipitacije proteina. Nakon optimizacije uvjeta (temperatura, brzina miješanja), sva mjerenja su napravljena na 5 °C (slika 16). Na kraju svakog mjerenja otopina je izvađena iz ćelije i centrifugirana. Nakon optimizacije lagani precipitat je još uvijek bio prisutan i analiziran je SDS-PAGE-om (slika 17).



Slika 16. Termogrami za ITC titracije hDPP III s Kelch domenom. Smeđa krivulja predstavlja hDPP III WT titraciju. Plava krivulja predstavlja mutanta P360S. Ružičasta krivulja predstavlja mutanta P358L.



Slika 17. Analiza precipitata nastalog tijekom ITC mjerenja. U jažici 1 se nalazi precipitat dok je u jažici 2 marker molekulske mase. Korišten je marker *PageRuler Unstained Protein Ladder*.⁶⁴



Slika 18. ITC krivulje titracije hDPP III konstrukta s Kelchom. Zelene točke predstavljaju WT krivulju titracije. Plavi kvadrati predstavljaju krivulju titracije mutanta P360S. Crveni krugovi predstavljaju krivulju titracije za P358L mutant.

Slika 16 prikazuje oslobođenu toplinu za svaku injekciju ovisno o broju injekcija Kelch. Svi parametri iz ITC mjerenja prikazani su u tablici 11. Konstanta disocijacije najniža je za mutant P358L, što ukazuje na najveći afinitet vezanja s Kelchom. Mjerenja WT i P360S pokazuju K_d u skladu s literaturnim vrijednostima mjerenim mikrotermoforezom (engl. *Microscale thermophoresis*, MST). Matić et al. su objavili vrijednosti K_d od 826 ± 108 nM za WT, vrijednost istog reda veličine kao rezultati mjerenja ITC-om.³⁹ Stehiometrijski omjer interakcije za sve konstrukte kreće se između 0,56 do 0,58. Ovaj rezultat nije biološki vjerojatan, očekivano vezanje je 1:1. Rezultati analize precipitata ukazuju na manju stvarnu koncentraciju hDPP III u ćeliji i konačnog stehiometrijskog omjera bližem 1 (slika 17).

Zbog taloženja proteina i/ili kompleksa termodinamički parametri ne mogu se u potpunosti pripisati samo interakciji proteina. Entalpija za WT je najveća među testiranim konstruktima i ima najveću entropiju. P360S i P358L pokazuju nižu entalpiju, međutim doprinos entropije je mnogo manji za oba mutanta. Termodinamičke razlike ukazuju na značajnu promjenu svojstava interakcije.

Tablica 11. Termodinamički parametri dobiveni iz krivulje nelinearne regresije dobivene iz ITC parametara

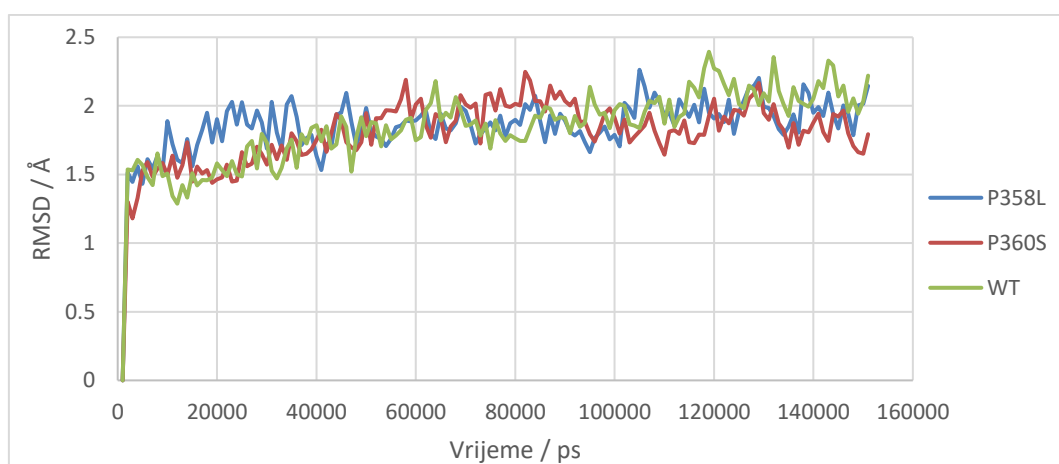
	K_d (nM)	n	ΔH (kcal / mol)	ΔS (cal / mol K)
WT/Kelch	693,1	0,587	-7,25	2,13
P360S/Kelch	553,8	0,567	-18,67	-38,27
P358L/Kelch	150,5	0,572	-22,92	-51,19

4.4. Računalne metode

4.4.1. Analiza geometrijskih parametara

Kako bismo odredili strukturne promjene mutiranih varijanti DPP III, istražujemo i uspoređujemo geometrijske parametre dobivene računalnim simulacijama. Prvi geometrijski parametar od interesa je RMSD (engl. *Root Mean Square Deviation*) za atome okosnice (C, C α , O i N). RMSD je posebno izračunat za područje fleksibilne petlje (aminokiselinski ostaci 460 - 486) za koje je poznato da pokazuje veću fleksibilnost od ostatka proteina. RMSD ostatka proteina je izračunat za ostatak proteina bez fleksibilne petlje.

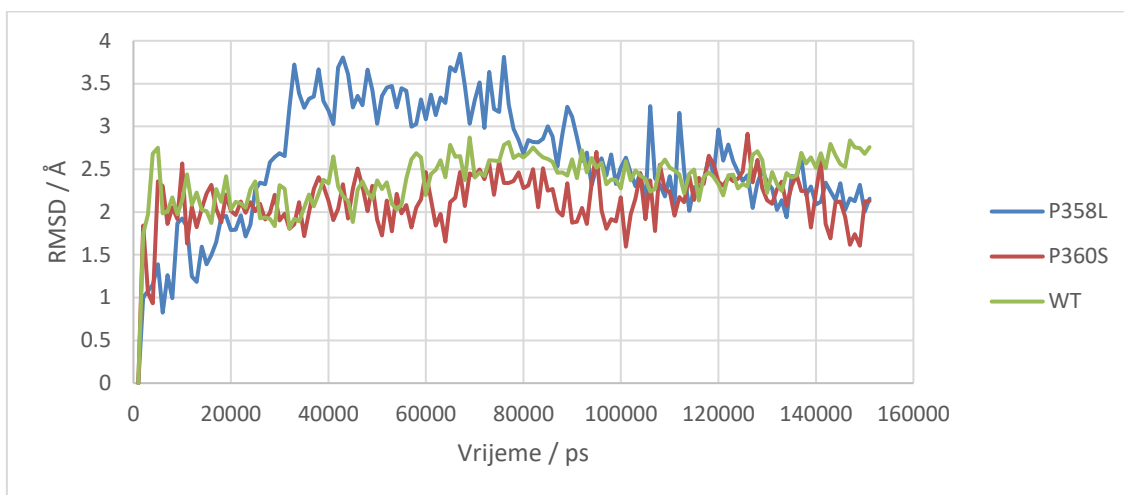
Podaci izračunati bez područja fleksibilne petlje prikazani su na slici 19. Prikupljeni podaci ne pokazuju značajnu razliku za RMSD vrijednosti za simulaciju mutiranih proteina u usporedbi s WT proteinom. Zaključujemo da globalna struktura proteina nije bila pod utjecajem mutacija koje smo uveli.



Slika 19. RMSD rezultati bez fleksibilne petlje (bez aminokiselinskih ostataka od 460 do 486). Rezultati ne pokazuju značajno odstupanje strukture za mutante hDPP III u usporedbi s divljim tipom (WT) hDPP III

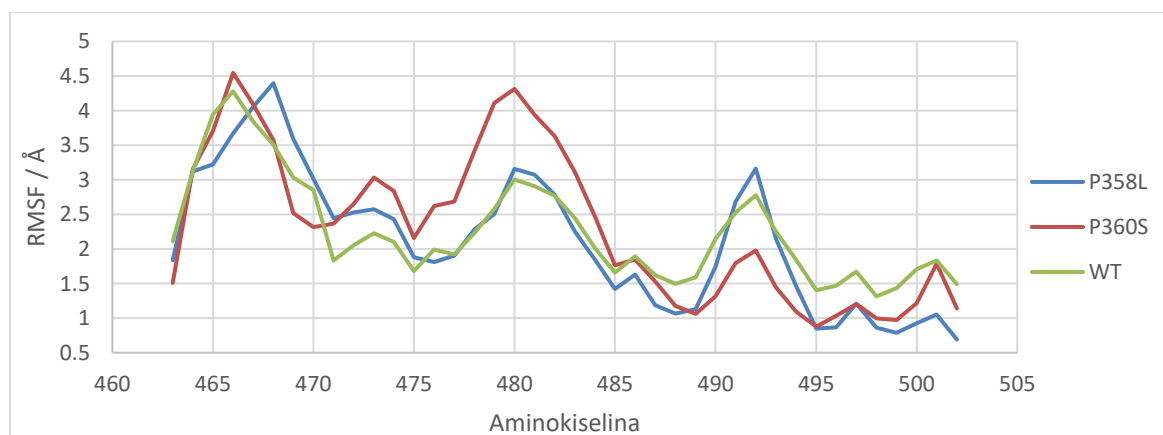
Gledajući graf RMSD-a koji prikazuje samo područje fleksibilne petlje (slika 20), uočavamo značajne promjene strukture petlje mutanta P358L tijekom simulacije. Odstupanja od početne strukture najizraženija su u vremenskom intervalu od 25 do 80 ns gdje je RMSD P358L mutanta značajno veći od RMSD divljeg tipa i P360S mutanta, što ukazuje na veću fleksibilnost petlje. Međutim, treba biti oprezan pri tumačenju rezultata kratkih simulacija poput ove. Naime, stohastičke metode mogu unijeti razlike između simulacija koje ne moraju odgovarati razlikama u biološkim sustavima. Potrebne su dulje ili još bolje, višestruke

simulacije kako bi se potvrdile ili opovrgnule promjene fleksibilnosti petlje mutanta P358L u usporedbi s WT.



Slika 20. RMSD rezultati za područje fleksibilne petlje (aminokiselinski ostaci od 460 do 486), pokazuju značajnu razliku u RMSD-a mutanta P358L u usporedbi s divljim tipom (WT), potrebno je više simulacija za potvrdu nalaza.

RMSF (engl. *Root Mean Square Fluctuation*) vrijednost korištena u ovom radu je srednja vrijednost fluktuacija $C\alpha$ atoma pojedine aminokiseline za ukupno vrijeme simulacije. Na slici 21 je vidljivo da aminokiseline ETGE motiva (aminokiseline od 480 do 483) mutanta P360S pokazuju veće vrijednosti s obzirom na vrijednosti WT i P358L. Razlike su dalje vidljive među vodikovim vezama koje tvori P360S mutant.



Slika 21. Vrijednosti RMSF za aminokiseline fleksibilne petlje u proteinu DPP III tijekom MD simulacija. Aminokiseline 480 - 483 tvore ETGE motiv te pokazuju najveće odstupanje.

4.4.2. Analiza vodikovih veza

Intramolekularne vodikove veze (H-veze) dobar su pokazatelj količine vremena u kojem su pojedini aminokiselinski ostatci iz područja fleksibilne petlje tvorili snažne interakcije s aminokiselinskim ostacima „tijela“ (strukturiranog dijela, konkretno α uzvojnice na vrhu gornje domene) DPP III.

Od 750 000 simuliranih koraka promatran je svaki 100. Analizirane su samo veze s aminokiselinama ETGE motiva ili njihovim neposrednim susjedima (do 3 aminokiseline sa svake strane). Od svih vodikovih veza zabilježenih tijekom simulacija samo su one koje su se pojavile u više od 5% analiziranih koraka smatrane značajnim, ostatak je radi jednostavnosti zanemaren.

Tablica 12 sadrži popis vodikovih veza koje tvore aminokiseline ETGE motiva i one uz njega. Na slici 20, RMSD vrijednosti za područje fleksibilne petlje P358L su pokazivale veću fleksibilnost. Najveće razlike u vodikovim vezama između mutanata i divljeg tipa su bile u vodikovoj vezi između Gln484 s Thr475. P358L mutant je pokazao značajno nižu stopu pojavljivanja ove H-veze, također je pokazao rjeđu pojavu H-veze Glu483 s Ile477. Slabije vezanje unutar same fleksibilne petlje može objasniti veću RMSD za P358L. P360S je pokazao najveću učestalost H-veze između Arg623 koji je dio proteinskog tijela i Ile477 ostatka koji se nalazi na području fleksibilne petlje. H-veza između Gln484 i Thr475 se predstavlja kao važna veza za stabilizaciju fleksibilne petlje

Tablica 12. Učestalost pojavljivanja pojedinih vodikovih veza u MD simulacijama divljeg tipa hDPP III i mutanata. Brojevi predstavljaju udio analiziranih okvira u kojima je nađena ta vodikova veza, podijeljen s ukupnim brojem analiziranih okvira.

Donorska aminokiselina	Akceptorska aminokiselina	WT / %	P360S / %	P358L / %
Glu483	Ile477	62,91	38,41	23,18
Gln484	Thr475	92,72	90,07	16,56
Ile477	Arg623	3,97	38,41	16,56

§ 5. ZAKLJUČAK

Uspješno su proizvedeni i pročišćeni WT, te P360S i P358L mutirane varijante proteina DPP III što je potvrđeno analizom denaturirajućom gel elektroforezom. Elektroforetski je potvrđena molekulska masa proteina, koja je u rasponu od 80 – 85 kDa.

Analiza kinetičkih parametara je pokazala da WT ima najveću konstantu specifičnosti, dok mutirane varijante P360S i P358L pokazuju veći K_M i niži obrtni broj.

Mjerenja afiniteta interakcije WT i mutiranih varijanti proteina DPP III, P358L i P360S, s domenom Kelch proteina Keap1 pokazala su da WT i mutant P360S imaju slične vrijednosti K_d . Mutant P358L pokazuje gotovo 5 puta manju vrijednost K_d od divljeg tipa i mutanta P360S. Veći afinitet vezanja mutanta P358L s domenom Kelch je u skladu s povećanom fleksibilnosti petlje sa ETGE motivom nađenom molekulskim simulacijama.

Simulacije molekulske dinamike pokazuju očuvanost globalne strukture proteina kod mutanata. Analiza vrijednosti RMSD za fleksibilnu petlju s ETGE motivom je pokazala veću fleksibilnost petlje kod P358L mutanta. Analiza vodikovih veza tijekom MD simulacija je pokazala znatno manju postojanost intramolekularne vodikove veze Gln484 s Thr475 kod mutanta P358L nego kod divljeg tipa proteina i mutanta P360S. WT pokazuje najmanju učestalost vodikove veze između Ile477 i Arg623, no pokazuje stabilizaciju fleksibilne petlje vodikovom vezom između Ile477 i Glu483.

Mutant P358L pokazuje nižu katalitičku aktivnost i veći afinitet vezanja za Kelch domenu, daljnja istraživanja su potrebna da bi odredili utjecaj mutacije na biološku ulogu DPP III.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. https://www.enzyme-database.org/class.php?c=3&sc=4&ssc=*&sh=14 (datum pristupa: 23. ožujka 2022.)
2. S. C. Prajapati, S. S. Chauhan, *FEBS Journal* **278** (2011) 3256–3276.
3. M. Abramić, M. Zubanović, L. Vitale, *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **369** (1988) 29–38.
4. B. E. Hast, D. Goldfarb, K. M. Mulvaney, M. A. Hast, P. F. Siesser, F. Yan, D. N. Hayes and M. B. Major, *Cancer Research* **73** (2013) 2199–2210.
5. P. K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić, K. Gruber, *Journal of Biological Chemistry* **283** (2008) 22316–22324.
6. K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, M. Kanai, S. Fujii, J. Hirose, M. Harada, *Biochemical Journal* **329** (1998) 275.
7. E. Cerami, J. Gao, U. Dogrusoz, B. E. Gross, S. O. Sumer, B. A. Aksoy, A. Jacobsen, C. J. Byrne, M. L. Heuer, E. Larsson, Y. Antipin, B. Reva, A. P. Goldberg, C. Sander, N. Schultz, *Cancer Discovery* **2** (2012) 401–404.
8. J. Gao, B. A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S. O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha, E. Larsson, E. Cerami, C. Sander, N. Schultz, *Science Signaling* **6** (2013) 1.
9. https://www.cbioportal.org/results/mutations?tab_index=tab_visualize&Action=Submit&session_id=62860b690934121b56df525e&plots_horz_selection=%7B%7D&plots_vert_selection=%7B%7D&plots_coloring_selection=%7B%7D (datum pristupa: 29. lipnja 2022.)
10. N. D. Rawlings i A. J. Barrett, u A. J. Barrett (ur.) *Methods in Enzymology*, Vol. 248, Academic Press, New York, 1995, 183–228.
11. N. D. Rawlings, M. Waller, A. J. Barrett, A. Bateman, *Nucleic Acids Research* **42** (2014) 503–509.
12. https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/clan_index?type=P (datum pristupa: 25. ožujka 2022.)
13. D. S. Auld, u N. D. Rawlings, G. Salvesen (ur.) *Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd edition*, vol. 1, Elsevier, New York, 2013, 370–396.
14. <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=M49>. (datum pristupa: 25. ožujka 2022.)

15. C. Mazzocco, J. Gillibert-Duplantier, V. Neaud, K. M. Fukasawa, S. Phane Claverol, M. Bonneu, J. Puiroux, *The Authors Journal compilation* **273** (2006) 1056–1064.
16. S. Dhanda, H. Singh, J. Singh, T. P. Singh, *Protein Expression and Purification* **52** (2007) 297–305.
17. K. M. Fukasawa, K. Fukasawa, H. Iwamoto, J. Hirose, M. Harada, *Biochemistry* **38** (1999) 8299–8303.
18. G. A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramić, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon, K. Gruber, *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** (2012) 6525–6530.
19. I. Sabljčić, N. Meštović, B. Vukelić, P. Macheroux, K. Gruber, M. Luić, M. Abramić, *PLOS ONE* **12** (2017)
20. I. Sabljčić, M. Tomin, M. Matovina, I. Sućec, A. T. Paić, A. Tomić, M. Abramić, S. Tomić, *PLOS ONE* **13** (2018)
21. A. Hromić-Jahjefendić, N. Jajčanin Jozić, S. Kazazić, M. Grabar Branilović, Z. Karačić, J. H. Schrittwieser, K. M. P. Das, M. Tomin, M. Oberer, K. Gruber, M. Abramić, S. Tomić, *PLOS ONE* **12** (2017)
22. J. Matić, F. Šupljika, N. Tir, P. Piotrowski, C. Schmuck, M. Abramić, I. Piantanida, S. Tomić, *RSC Advances* **6** (2016) 83044–83052.
23. G. Malovan, B. Hierzberger, S. Suraci, M. Schaefer, K. Santos, S. Jha, P. Macheroux, *The FEBS Journal* (2022) Doi:10.1111/febs.16429
24. A. Tomić, S. Tomić, *International Journal of Molecular Sciences* **23** (2022) 1858.
25. A. Tomić, B. Kovačević, S. Tomić, *Physical Chemistry Chemical Physics* **18** (2016) 27245–27256.
26. P. Kumar, V. Reithofer, M. Reisinger, S. Wallner, T. Pavkov-Keller, P. Macheroux, K. Gruber, *Scientific Reports* **6** (2016) 23787.
27. L. Rehfeld, E. Funk, S. Jha, P. Macheroux, O. Melander, A. Bergmann, *The Journal of Applied Laboratory Medicine* **3** (2019) 943–953.
28. M. Baršun, N. Jajčanin, B. Vukelić, J. Špoljarić, M. Abramić, *Biological Chemistry* **388** (2007) 343–348.
29. P. K. Mehta, K. K. Griendling, *Am J Physiol Cell Physiol* **292** (2007) 82–97.
30. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, M. Šprem, M. Abramić, *Gynecologic Oncology* **91** (2003) 194–200.
31. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, J. Ilić-Forko, L. Vitale, D. Miličić, M. Abramić, *European Journal of Cancer* **34** (1998) 399–405.
32. P. Canning, F. J. Sorrell, A. N. Bullock, *Free Radical Biology and Medicine* **88** (2015) 101–107.

33. K. Taguchi, H. Motohashi, M. Yamamoto, *Genes to Cells* **16** (2011) 123–140.
34. K. I. Tong, A. Kobayashi, F. Katsuoka, M. Yamamoto, *Biological Chemistry* **387** (2006) 1311–1320.
35. S. B. Cullinan, J. D. Gordan, J. Jin, J. W. Harper, J. A. Diehl, *Molecular and Cellular Biology* **24** (2004) 8477–8486.
36. A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, R. N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto, P. Talalay, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99** (2002) 11908–11913.
37. B. Padmanabhan, K. I. Tong, T. Ohta, Y. Nakamura, M. Scharlock, M. Ohtsuji, M. il Kang, A. Kobayashi, S. Yokoyama, M. Yamamoto, *Molecular Cell* **21** (2006) 689–700.
38. M. C. Jaramillo, D. D. Zhang, *Genes and Development* **27** (2013) 2179–2191.
39. S. Matić, I. Kekez, M. Tomin, F. Bogár, F. Šupljika, S. Kazazić, M. Hanić, S. Jha, H. Brkić, B. Bourgeois, T. Madl, K. Gruber, P. Macheroux, D. Matković-Čalogović, M. Matovina, S. Tomić, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **39** (2021) 6870–6881.
40. M. Gundić, A. Tomić, R. C. Wade, M. Matovina, Z. Karačić, S. Kazazić, S. Tomić, *Croatica Chemica Acta* **89** (2016) 217–228.
41. S. Matić, A. Tomašić Paić, S. Sobočanec, M. Pinterić, G. Pipalović, M. Martinčić, M. Matovina, S. Tomić, *International Journal of Molecular Sciences* **23** (2022) 1994.
42. F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry 3rd edition*, John Wiley & Sons, Oxford, 2017, str. 431-440, 469-472.
43. J. H. Jensen, *Molecular Modeling Basics*, CRC Press, Boca Raton, 2010, str. 14-18.
44. Andrew R. Leach, *Molecular modelling principles and applications*, Prentice Hall, Harlow, 2001, str. 365-375, 378--407.
45. D. A. Case, T. E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R. J. Woods, *Journal of Computational Chemistry* **26** (2005) 1668–1688.
46. R. Salomon-Ferrer, D. A. Case, R. C. Walker, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **3** (2013) 198–210.
47. D. A. Case Ross C Walker and A. M. Roitberg Kenneth Merz Pengfei Li, *Amber 2020 Reference Manual*
48. J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman and D. A. Case, *Development and Testing of a General Amber Force Field* **25** (2004) 1157-1174.
49. B. Kuhlman and P. Bradley, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20** (2019) 681–697.

50. Thermo Scientific, priručnik *Product Information: aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System*, #K1281
51. Thermo Fisher Scientific, *Tm Calculator*
<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>, (datum pristupa 25. travnja 2022).
52. Agilent, priručnik *QuikChange II-E Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual*, #200555
53. Stratagene, priručnik *XL10-Gold® Ultracompetent Cells*
54. Thermo Fisher Scientific, *Bacterial Transformation and Competent Cells—A Brief Introduction* <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-basics.html>, (datum pristupa 30. svibnja 2022).
55. Thermo Scientific, protokol *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*, K0502, K0503
56. TA instruments, priručnik *Quick Start: Isothermal Titration Calorimetry (ITC)*, MCAPN-2016-1
57. M. M. Pierce, C. S. Raman, B. T. Nall, *Methods* **19** (1999) 213–221.
58. *Nano ITC*, TA Instruments <https://www.tainstruments.com/nano-itc/>, (datum pristupa 31. svibnja 2022)
59. S. Izadi, R. Anandkrishnan, A. v. Onufriev, *Journal of Physical Chemistry Letters* **5** (2014) 3863–3871.
60. C. Tian, K. Kasavajhala, K. A. A. Belfon, L. Raguette, H. Huang, A. N. Migués, J. Bickel, Y. Wang, J. Pincay, Q. Wu, C. Simmerling, *Journal of Chemical Theory and Computation* **16** (2020) 528–552.
61. *PageRuler Prestained Protein Ladder*
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26617> (datum pristupa 31. svibnja 2022)
62. E. Gasteiger, *Nucleic Acids Research* **31** (2003) 3784–3788.
63. M. Matovina, D. Agić, M. Abramić, S. Matić, Z. Karačić, S. Tomić, *RSC Advances* **7** (2017) 36326–36334.
64. *PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder*
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26632?SID=srch-srp-26632> (datum pristupa 31. svibnja 2022)

§ 7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Fran Miočić-Stošić

Datum rođenja: 30. siječnja 1996.

Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska

Obrazovanje

2002.–2010. Osnovna škola Vjenceslava Novaka, Zagreb

2010.–2014. Srednja škola V. Gimnazija

2015.–2019. Preddiplomski studij Kemija, istraživački studij, Prirodoslovno-Matematički Fakultet

2021 Erasmus stručna praksa, AFMB (Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques), Marseille, Francuska

2022 Erasmus stručna praksa, Institute for Molecular Biosciences, Graz, Austrija

Nagrade i priznanja

2019. Rektorova nagrada

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015. Otvoreni dan kemijskog odsjeka

2016. – 2019. Predsjednik udruge PRIMUS