

Istraživanje biokemijskih osobina mutiranih inačica dipeptidil - peptidaze III, R510W i V514M te njihovog utjecaja na regulaciju signalnog puta Nrf2/Keap1 ; Enzimi - primjer dobre nastavne prakse

Kindl, Domagoj Christian

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:251991>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Domagoj Christian Kindl

**Istraživanje biokemijskih osobina mutiranih inačica
dipeptidil–peptidaze III, R510W i V514M te
njihovog utjecaja na regulaciju signalnog puta
Nrf2/Keap1**

Enzimi – primjer dobre nastavne prakse

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra edukacije kemije i biologije

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biokemiju proteina i molekularno modeliranje Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom mentorice nasl. doc. dr. sc. Mihaele Matovina i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Ane Tomašić Paić te mentorice metodičkog djela diplomskog rada izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek. Nastavnica imenovana od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Jasmina Rokov-Plavec.

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

Zahvale

Na prvom mjestu moram se zahvaliti svim profesorima i kolegama koji su mi tijekom stjecanja ovog akademskog zvanja proširili vidike i pomogli pri razvijanju logičnog razmišljanja koje je možda i najvažnija stvar koju jedan student treba za životni put koji ga čeka.

Nezaobilazni faktor u mom studiranju su svakako i ljudi koji me svakodnevno susreću uz moje bavljenje konjima, ti isti prijatelji i poznanici su utjecali na moj studij na različite načine i u ovom kontekstu im se zahvaljujem.

Ovim putem moram se zahvaliti i mom budućem kumu koji mi je najbolji prijatelj i suputnik od 2. godine studija. Marko velikim dijelom si zaslužan za završetak mog studija i hvala ti za svaku pomoć, savjet i lovoriku koju si mi često znao pružiti.

Dragoj mentorici Draginji Mrvoš-Sermek želim se zahvaliti za sve godine poticanja tijekom studija i savjete koje ste mi uputili, bili ste i ostali najbolji profesor na studiju.

Unutar moje obitelji morao bih ponaosob svakog člana istaknuti jer su svi na različite načine uveličali privođenje kraju ovog mog studija. Naravno moram ovdje staviti na prvo mjesto mog djeda koji nije više među živima, a toliko se veselio mojoj diplomu, nadam se da s ponosom i mirom pratiš ovaj događaj odozgo. Tvoja energija u radu i trudu tijekom života svakako me oblikovala u ovakvog čovjeka kakav sam danas, veliko hvala za to...

Najvažniji ljudi u mom životu su moji roditelji koji su svojim odgojem i pristupom omogućili slobodu u mom odrastanju i kreativnosti, dodali su puno odgovornosti koju sigurno ne bi imao da nije bilo vas dvoje. Najbolji ste roditelji u svemiru i hvala vam za sve.

Također moram spomenuti i mamine roditelje koji su svakodnevno tu za mene te su svojom pomoći olakšali moj život u barem 1000 situacija. Deda i baka sretan sam što vas još uvijek imam.

Teta Beti nikada se ne ljutiš na mene i uvijek mi dopuštaš sve što drugima prigovaraš, važno je imati osobu koja te voli sa svim nedostacima koje imam. Hvala ti.

Moje sestre, hvala vam što postojite i živcirate me svakodnevno bez obje život bi bio suviše lagan.

Također hvala burazu Pavloviću koji je u mom studiranju bio ogromna pomoć pri polaganju nekih kolegija.

Čitava ekipa s Ruđera koju sam imao priliku upoznati i raditi s njima hvala za sve naučeno i za svaku kavu i čaj što ste mi kuhali.

Moja neposredna voditeljica Ana je najveća duša od čovjeka koju znam, naučila si me toliko novih stvari i uistinu ti to nikada neću zaboraviti.

Mentorice Mihaela vaša predanost u radu i ljubav prema otkrivanju odgovora na nepoznata pitanja u znanosti krasi vas i pokazuju koliko ste velik znanstvenik. Sretan sam što ste mi baš Vi bili mentor i što ste me vodili do kraja mog studija.

Profesorice Getz Vi ste me toliko zadužili u životu da ne znam kada ću imati priliku vratiti vam za sve što ste me naučili te poticaj koji ste mi dali da privedem svoj studij kraju. Veliko HVALA.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	3
2.1. Peptidaze (proteolitički enzimi)	3
2.1.1. <i>Nomenklatura i podjela peptidaza</i>	<i>3</i>
2.1.2. <i>Metalopeptidaze</i>	<i>5</i>
2.2. Dipeptidil-peptidaza III.....	7
2.2.1. <i>Klasifikacija DPP</i>	<i>7</i>
2.2.2. <i>Patofiziološka uloga DPP III.....</i>	<i>7</i>
2.2.3. <i>Struktura i katalitički mehanizam DPP III.....</i>	<i>9</i>
2.3. Signalni put Nrf2-Keap1	11
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. <i>Kemikalije</i>	<i>16</i>
3.1.2. <i>Markeri veličine i boje</i>	<i>16</i>
3.1.3. <i>Enzimi</i>	<i>16</i>
3.1.4. <i>Sintetski supstrati.....</i>	<i>16</i>
3.1.5. <i>Luria-Bertani (LB) hranjive podloge.....</i>	<i>17</i>
3.1.6. <i>Komercijalni kompleti.....</i>	<i>17</i>
3.1.7. <i>Sojevi bakterija E. coli.....</i>	<i>17</i>
3.1.8. <i>Punila za kolonu.....</i>	<i>17</i>
3.1.9. <i>Humane embrionalne stanice.....</i>	<i>17</i>
3.2. Metode rada s vektorom pLATE31.....	18
3.2.1. <i>In vitro mutageneza.....</i>	<i>18</i>
3.2.2. <i>Transformacija E. coli soja XL10-Gold.....</i>	<i>21</i>
3.2.3. <i>Postupak izolacije i pročišćavanje plazmida koji sadrže mutaciju.....</i>	<i>21</i>
3.3. Uzgoj bakterijske kulture za prekomjernu ekspresiju mutiranih inačica hDPP III	22
3.3.1. <i>Fizikalna transformacija BL21-CodonPlus(DE3)-RIL bakterija E.Coli</i>	<i>22</i>
3.3.2. <i>Uzgoj bakterijske kulture za prekomjernu ekspresiju mutiranih inačica hDPP III</i>	<i>23</i>
3.3.3. <i>Liza i sonikacija bakterijskih stanica.....</i>	<i>24</i>
3.4. Metode rada s proteinima	25

3.4.1. Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom.....	25
3.4.2. SDS diskontinuirana elektroforeza na poliakrilamidnom gelu.....	27
3.4.3. Odsoljavanje na PD-10 koloni.....	29
3.4.4. Nativna gel-elektroforeza.....	29
3.4.5. Određivanje specifične aktivnosti enzima.....	30
3.4.6. Određivanje optimalnog pH i utjecaja kobaltovih iona na aktivnost enzima.....	31
3.4.7. Određivanje enzimske kinetike na fluorimetru.....	31
3.5. Rad sa humanim embrionalnim stanicama bubrega.....	32
3.5.1. Uzgoj i presađivanje HEK239T stanica u nove T75 i T25 flaskice.....	33
3.5.2. PCR test na prisutnost mikoplazmi.....	34
3.5.3. Nasađivanje pločica sa 6 jažica i transfekcija s pFLAG-CMV2 vektorom.....	36
3.5.4. Izolacija RNA iz staničnih linija primjenom RNazol [®] RT-a.....	37
3.5.5. Uklanjanje genomske DNA prije reverzibilne transkripcije.....	38
3.5.6. Reverzna transkripcija RNA u cDNA.....	38
3.5.7. Primjena qPCR metode za utvrđivanje ekspresije gena.....	39
3.5.8. Statistička analiza.....	40
3.5.9. Western blot analiza proteina.....	40
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	43
4.1. Bioinformatička analiza DPP III proteina.....	43
4.2. Priprema plazmida za ekspresiju mutiranih inačica hDPP III: R510W i V514M.....	44
4.3. Pročišćavanje mutiranih inačica hDPPIII afinitetnom kromatografijom.....	44
4.3.1. Određivanje koncentracija proteina u frakcijama dobivenim afinitetnom kromatografijom proteina hDPP III-R510W i V514M.....	45
4.3.2. Analiza mutiranih inačica proteina hDPP III R510W i V514M na gelu.....	46
4.4. Aktivnosti divljeg tipa i mutanata.....	49
4.4.1. Određivanje specifične i relativne aktivnosti uz prisutstvo CoCl ₂	49
4.4.2. Optimalna pH vrijednost.....	51
4.5. Fluorimetrijsko određivanje kinetičkih parametara.....	52
4.6. Provjera staničnih kultura na prisutnost mikoplazmi nakon PCR umnažanja.....	56
4.6.1. Provjera ekspresije mutanata u HEK293T humanim stanicama.....	56
4.6.2. Rezultati qPCR analize.....	57
§ 5. ZAKLJUČAK.....	59
§ 6. METODIČKI DIO DIPLOMSKOG RADA.....	60
6.1. Uvod.....	60
6.2. Kurikulumski okvir za uvođenje koncepta ENZIMI i pogled u udžbeničku literaturu.....	61

6.3. Pogrešna učenička shvaćanja i mogući uzroci njihova nastajanja tijekom poučavanja o pojmu <i>Enzimi</i>.....	70
6.4. Strategija učenja otkrivanjem	72
6.5. Priprema nastavnika za nastavni sat.....	73
<i>6.5.1. Metodičko-didaktička priprema nastavnog sata</i>	<i>80</i>
6.6. Zaključak metodičkog dijela.....	92
§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOL.....	93
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	95
§ 9. DODATAK.....	XV
§ 10. ŽIVOTOPIS	XIX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Istraživanje biokemijskih osobina mutiranih inačica dipeptidil-peptidaze III, R510W i V514M te njihovog utjecaja na regulaciju signalnog puta Nrf2/Keap1

Enzimi – primjer dobre nastavne prakse

Domagoj Christian Kindl

Diplomski rad sastoji se od eksperimentalnog i metodičkog dijela. U eksperimentalnom dijelu ispitane su biokemijske osobine mutiranih inačica R510W i V514M humane dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) čije su genomske sekvence nađene u uzorcima zloćudnih tumora, te je ispitan njihov utjecaj na regulaciju signalnog puta Nrf2/Keap1. Ciljanom mutagenezom napravljeni su vektori za ekspresiju mutiranih inačica proteina te su one eksprimirane u bakteriji *Escherichia coli* i pročišćene. Utvrđeno je da je aktivnost svih triju proteina viša u prisutnosti kobaltonih iona, a analizom kinetike reakcije je utvrđeno da R510W ima oko 1000 puta, a V514M oko 2 puta nižu katalitičku aktivnost od divljeg tipa. Određivanjem razine ekspresije gena utvrđeno je da prekomjerna ekspresija divljeg tipa i mutiranih inačica hDPP III nemaju utjecaj na ekspresiju gena kontroliranih s Nrf2 u HEK293T stanicama.

U sklopu metodičkog dijela rada osmišljeni su pokusi na temu enzima, temeljem kojih su oblikovani metodičko-didaktički materijali za jedan 90-minutni nastavni sat. Pri tome su postavljeni odgojno-obrazovni ciljevi temeljeni na prethodnim učeničkim znanjima, vještinama i sposobnostima.

(101 + xix stranica, 57 slika, 16 tablica, 69 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: enzim, humana dipeptidil-peptidaza III, ekspresija gena, Keap1, kinetika, mutageneza, mutirane inačice

Mentori: nasl. doc. dr. sc. Mihaela Matovina, viši znanstveni suradnik
izv. prof. dr. Draginja Mrvoš-Sermek

Neposredni voditelj: dr. sc. Ana Tomašić Paić, viši stručni suradnik

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Ocjenitelji:

1. Izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek
2. Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
3. Prof. dr. sc. Ines Radanović

Zamjena: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Datum diplomskog ispita: 28. rujna 2023.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Investigation of the biochemical properties of R510W and V514M mutant variants of dipeptidyl peptidase III and their impact on the regulation of Nrf2/Keap1 signalling pathway

Enzymes – an example of good teaching practice

Domagoj Christian Kindl

The thesis consists of an experimental and methodological part. In the experimental part, the biochemical properties of the mutant variants of human dipeptidyl peptidase III (hDPP III), whose genomic sequences were found in malignant tumors, R510W and V514M, and their influence on the regulation of the Nrf2/Keap1 signaling pathway were examined. The expression vectors for the mutants were constructed using site-directed mutagenesis and expressed in *E. coli* and purified. The activity of all three proteins was higher in the presence of cobalt ions, and the kinetic parameters analysis revealed that R510W has about 1000 times and V514M about 1 times lower catalytic activity than the wild type. Gene expression analysis detected that overexpression of the wild-type and mutants of hDPP III had no effect on the expression of genes controlled by Nrf2 in HEK293T cells.

In the methodological part of the thesis, experiments on the topic of enzymes as well as methodical-didactic materials related to 90-minute lesson were designed. At the same time, educational goals were set based on the students' previous knowledge, skills and competencies.

(101 + xix pages, 57 figures, 16 tables, 69 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: enzyme, human dipeptidyl peptidase III, gene expression, Keap1, kinetics, mutagenesis, mutant variants

Reviewers:

1. Dr. Draginja Mrvoš Sermek, Associate Professor
2. Dr. Jasmina Rokov- Plavec, Assistant Professor
3. Dr. Ines Radanović, Professor,

Substitute: Dr. Nada Oršolić, Professor

Mentor: Dr. Mihaela Matovina, Assistant Professor

Assistant mentor: Dr. Ana Tomašić Paić

Date of exam: September 28, 2023

§ 1. UVOD

Proteolitički enzmi ili peptidaze su enzmi koji hidroliziraju peptidnu vezu. Peptidaze su važni čimbenici zdravlja i održivosti stanica budući da reguliraju sudbinu, lokalizaciju i aktivnost mnogih bjelančevina. Sudjeluju u aktivnostima unutar i izvan stanica, kao što su replikacija i transkripcija DNA, stanična proliferacija i diferencijacija, angiogeneza, neurogeneza i drugo. Također sudjeluju u procesima zgrušavanja krvi, fibrinolize, ovulacije, oplodnje, embrionalnog razvoja, cijeljenja rana, upalnim procesima, u imunom odgovoru, kontroli krvnog tlaka, starenja, programirane smrti stanice (apoptoze) i nekroze. Zbog važne uloge peptidaza u funkcijama stanica, promjene u peptidaznim sustavima predstavljaju temelj mnogobrojnih patoloških stanja, kao što su rast i metastaze malignih tumora, upalne i kardiovaskularne bolesti, Alzheimerove bolesti, artritisa, poremećaja zgrušavanja krvi, alergije, infekcije i druge.¹ Dipeptidil peptidaza III (DPP III) je peptidaza ovisna o cinku koja odcjepljuje dipeptide s *N*-kraja peptida koji sadrže 3 do 10 aminokiselinskih ostataka. Patofiziološka funkcija DPP III još uvijek nije potpuno razjašnjena, a smatra se da je DPP III uključena u završne korake proteinske razgradnje u stanici te je važan čimbenik za obranu stanice od oksidacijskog stresa, također je moguće da sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka i osjeta boli.² DPP III sudjeluje u signalnom putu transkripcijskog faktora Nrf2 (nuklearni eritroidni faktor 2, engl. *Nuclear-factor Erythroid 2-Related Factor 2*) i proteina Keap1 (engl. *Kelch-Like ECH-Associated Protein 1*).³ U uvjetima oksidacijskog stresa Nrf2 se translocira u jezgru i aktivira gene bitne za antioksidacijsku obranu stanice. U normalnim uvjetima, kada je stanični stres nizak ili umjeren, Nrf2 se nalazi u citoplazmi vezan za represorski protein Keap1 koji potiče njegovu ubikvitinaciju i razgradnju.⁴ U zdravim stanicama Nrf2 ima zaštitnu ulogu te sprječava oksidacijski stres, nastanak i progresiju tumora. Međutim, mutacije unutar Keap1 mogu dovesti do pojačane aktivacije Nrf2 odgovora te pospješiti preživljavanje stanica tumora i stvoriti optimalno okruženje za staničnu proliferaciju i progresiju tumora.⁴ Dokazano je da vezanje DPP III za Keap1 sprječava deaktivaciju faktora Nrf2 što dovodi do pojačane ekspresije antioksidacijskih gena.⁵

Cilj rada je utvrditi utjecaj supstitucije dviju aminokiselina (R510W, V514M) u ljudskom proteinu hDPP III (ljudska dipeptidil peptidaza III), čije su genomske sekvence pronađene u uzorcima iz tkiva malignih tumora (cBioPortal)⁶, na peptidaznu aktivnost proteina te utvrditi je li navedeni mutanti imaju utjecaj na regulaciju Nrf2/Keap1 signalnog puta.

Metodama genetičkog inženjerstva provedena je ciljana *in vitro* mutageneza vektora s insertom koji kodira protein hDPP III. Nakon uzgoja transformiranih bakterija *Escherichia coli* te ekspresije i pročišćavanja divljeg tipa (WT) i mutiranih inačica, ispitana je specifična aktivnost hDPP III u različitim pH područjima kako bi se odredila područja najviše aktivnosti enzima. Dokazano je da divlji tip (WT) hDPP III u prisutnosti kobaltonih iona bolje cijepa supstrat diarginil-2-naftilamid (Arg₂-2NA) i u testu aktivnosti daje veće vrijednosti apsorbancija. Proveden je test aktivnosti mutiranih inačica: R510W i V514M sa i bez kobaltonih iona kako bi se usporedile vrijednosti s WT hDPP III. Zatim su određeni kinetički parametri peptidazne aktivnosti (K_M , k_{cat}) prema sintetskom Arg₂-2NA supstratu. Kako bismo mogli usporediti rezultate mjerenja, sva mjerenja napravljena su paralelno i za WT hDPP III kao i za mutirane inačice R510W i V514M.

Tijekom rada također su uzgojene i održavane kulture HEK293T humanih embrionalnih stanica bubrega *in vitro* pri kontroliranim uvjetima. Ove su stanice transfecirane praznim pFLAG-CMV2 vektorom te vektorima za ekspresiju WT hDPP III, odnosno mutiranih inačica R510W i V514M u svrhu utvrđivanja potencijalnog utjecaja prekomjerne ekspresije divljeg tipa i mutiranih inačica hDPP III na ekspresiju nekoliko gena koje kontrolira Nrf2. Metoda koja je primijenjena u tu svrhu je kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu spregnuta s reverznom transkripcijom (engl. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR).

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Peptidaze (proteolitički enzimi)

Peptidaze su enzimi koji hidroliziraju peptidne veze u peptidima i proteinima (proteolitički enzimi ili proteaze).¹ Peptidaze imaju ulogu bioloških katalizatora koji razgrađuju molekule proteina i peptida kako bi osigurali slobodne aminokiseline potrebne za sintezu novih proteina.² S obzirom na ovu važnu ulogu peptidaze sudjeluju u regulaciji velikog broja ključnih procesa u stanici specifičnim cijepanjem odabranih ciljnih proteina.

2.1.1. Nomenklatura i podjela peptidaza

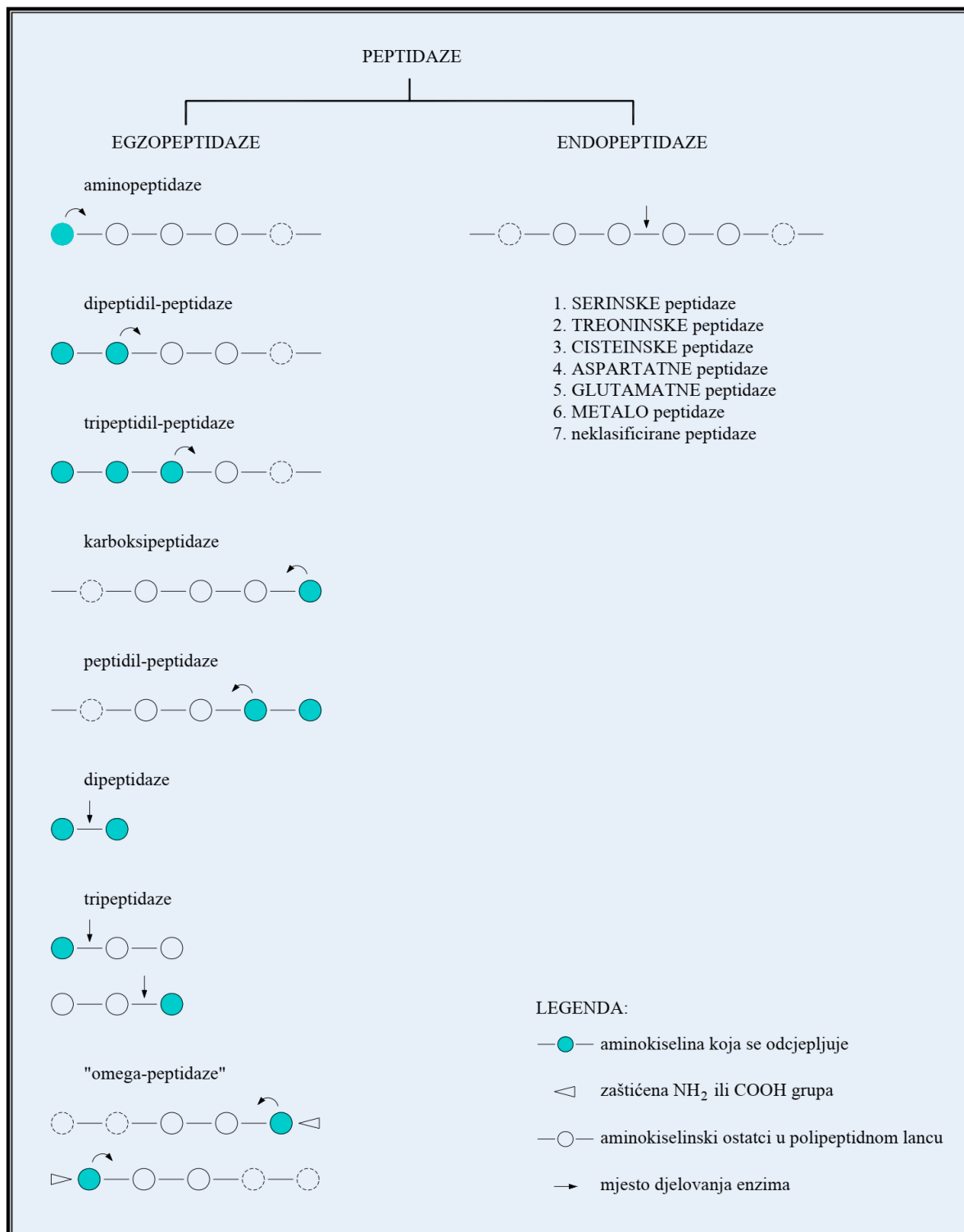
Enzimi se klasificiraju prema reakcijama koje kataliziraju koristeći sustav EC brojeva (eng. *Enzyme Commission Number*), koja se sastoji od četiri jedinstvena broja: prvi broj predstavlja glavnu skupinu enzima, drugi broj podskupinu, treći podpodskupinu, a četvrti serijski broj.⁷

Ukupno postoji 6 glavnih skupina u koje razvrstavamo enzime, prema funkciji koju vrše, a to su. 1. oksidoreduktaze, 2. transferaze, 3. hidrolaze, 4. liaze, 5. izomeraze i 6. ligaze.⁷ Enzimске skupine dalje se dijele na podskupine ovisno o vrsti veze na kojoj se odvija enzimска reakcija.

Peptidaze pripadaju trećoj (3.) skupini enzima – hidrolaze te četvrtoj (4.) podskupini enzima koji djeluju na peptidnu- vezu. Stoga, EC broj kod svih peptidaza započinje s 3.4., nakon čega slijede dva dodatna broja koja označuju poziciju veze koju peptidaza cijepa i tip supstrata.²

Prema funkcionalnoj grupi odgovornoj za katalizu razlikuje se 6 različitih tipova peptidaza: serinske (S), treoninske (T), cisteinske (C), aspartatne (A), glutamatne (G) i metalopeptidaze (M). Postoje još i peptidaze kod kojih je nepoznata grupa odgovorna za katalizu (U, engl. *unknown*) i pepetidaze miješanog katalitičkog tipa (P) (slika 1).⁸ Sadašnji oblik klasifikacije može se pronaći u bazi podataka MEROPS na internetskoj adresi <http://merops.sanger.ac.uk/>. Prema ovoj klasifikaciji peptidaze su podijeljene u porodice i klanove. Svakoј porodici je dodijeljen jednostavan identifikator koji započinje velikim slovom koje označava katalitički tip peptidaza (S, T, C, A, G, M, U i P), nakon čega slijedi sekvencijalno dodijeljen broj.⁹ Tako na primjer oznaka M49 označava 49. porodicu metalopeptidaza. Peptidaze su svrstane u jednu porodicu na temelju značajne sličnosti primarne strukture.

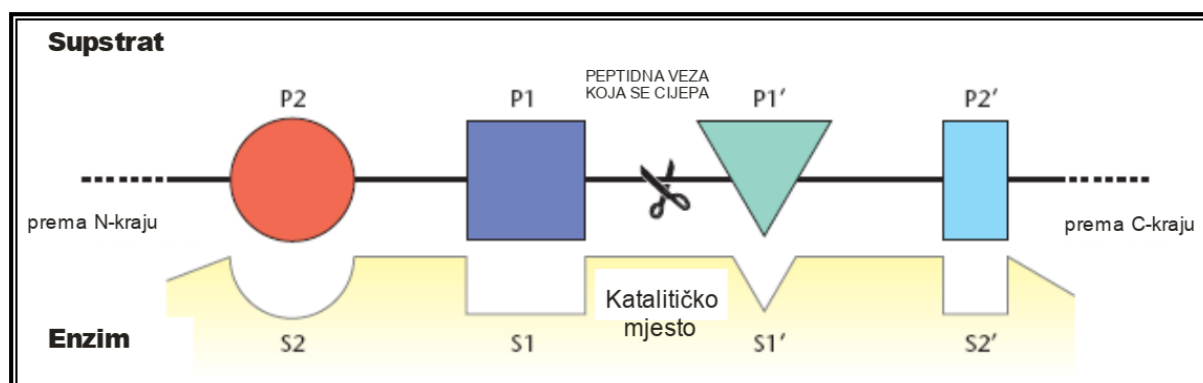
Ovisno o mjestu djelovanja razikujemo endopeptidaze i egzopeptidaze. Endopeptidaze cijepaju peptidnu vezu u unutrašnjosti peptidnog lanca, a egzopeptidaze peptidnu vezu pri kraju peptidnog lanca.



Slika 1: Klasifikacija peptidaza. (prema ref. 2 i ref. 10)

Kako je prikazano na slici 1 aminopeptidaze djeluju na slobodne NH_2 -krajeve oslobađajući jednu aminokiselinu, a ukoliko oslobađaju dipeptid ili tripeptid nazivaju se dipeptidil-peptidazama, odnosno tripeptidil-peptidazama. Karboksipeptidaze oslobađaju jednu aminokiselinu na slobodnim C-krajevima. Egzopeptidaze koje odcjepljuju dipeptid nazivaju se peptidil-dipeptidaze. Endopeptidaze se prema mehanizmu katalize, dijele na aspartatske (A), cisteinske (C), metalopeptidaze (M), serinske (S) i treoninske endopeptidaze (T). Podjela peptidaza je isprepletena jer se neke serinske, metalo i ostale peptidaze ubrajaju u endo- i u egzopeptidaze.²

Peptidaze pokazuju specifičnost prema slijedu aminokiselinskih ostataka peptidnog supstrata, tzv. supstratna specifičnost peptidaza.¹⁰ Priroda aminokiselinskih ostataka aktivnog mjesta peptidaze određuje koji se ostaci supstrata mogu vezati na specifična vezna mjesta enzima, kao što je prikazano na slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz vezanja supstrata na peptidazu. (prema ref. 10)

Aminokiselinski ostaci peptidnog supstrata označeni su kao P1 do Pn brojeći od veze koja se cijepa prema N-kraju peptida, a P1' do Pn' prema C-kraju peptida. Veza koja se cijepa označena je škarama, a odgovarajuća podmjesta na enzimu, u koja se smještaju postrani lanci aminokiselina peptidnog supstrata označena su S1 do Sn brojeći od katalitičkog mjesta prema N-kraju supstrata, a S1' do Sn' prema C-kraju supstrata.

2.1.2. Metalopeptidaze

Metalopeptidaze (MP) su proteolitički enzimi kojima je za katalitičku aktivnost neophodan dvovalentni kation metala, najčešće cinka (Zn^{2+}) ili pak ion kobalta (Co^{2+}), mangana (Mn^{2+}), nikla (Ni^{2+}) ili bakra (Cu^{2+}). Pronađene su kod svih prokariotskih i eukariotskih organizama, a odlikuje ih velika raznolikost primarnih struktura.¹¹ Metalopeptidaze se mogu podijeliti u

dvije osnovne skupine ovisno o broju metalnih iona potrebnih za katalizu: kod većine MP potreban je samo jedan cinkov ion, dok neke MP sadrže dva iona metala koji djeluju „ko-katalitički“.¹¹ Prema MEROPS bazi MP su podijeljene u 16 klanova: peptidaze iz klanova MA, MC, MD, ME, MJ, MM, MO, MP i MT imaju samo jedan katalitički ion metala, i to je obično cink (Zn^{2+}). Peptidaze iz obitelji M11 trebaju ion bakra za katalitičku aktivnost, dok peptidaze iz klanova MF, MG, MH, MN i MQ imaju ko-katalitičke ione metala, koji su u klanu MF cink ili mangan te u klanovima MG i MQ kobalt ili mangan.¹²

Za izradu ovog diplomskog rada važna je MP koja pripada prvom klanu MA, metalopeptidaze koje imaju karakteristični strukturni motiv, pentapeptid His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH), koji je dio veznog mjesta Zn^{2+} , pri čemu je ion vezan na histidinske ostatke. Sve peptidaze ovog klana sastoje se od dvije domene, s aktivnim mjestom između njih. N-terminalna domena nosi HEXXH motiv i uključuje α -spirale i šesterolančane β vrpce, te je dobro očuvana, ali C-terminalna domena varira od vrlo složene, kao npr. u termolizinu ili leishmanolizinu, do vrlo jednostavnih. Prema tome, N-terminalna domena predstavlja osnovu za klasifikaciju.¹¹

Ovaj klan MP dijeli se na 2 podklana, ovisno o prirodi trećeg aminokiselinskog liganda cinka.¹¹ U podklanu MA(E), koji se također naziva "Glu-zincini", treći ligand metala je glutaminska kiselina udaljena od HEXXH motiva 18-72 ostatka prema C-kraju ("HEXXH + E"). Ovaj podklan sadrži egzo- i endo-peptidaze. U podklanu MA(M), također poznatom kao 'Met-zincini', treći ligand je histidin ili aspartat unutar proširenog motiva His-Glu-Xaa-Xaa-His-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-His/Asp (HEXXHXXGXXH[D]).¹⁰ Ovaj podklan sadrži samo endopeptidaze.¹¹

MP imaju važnu ulogu u biosintezi i metaboličkoj inaktivaciji peptidnih neurotransmitera važnih za odvijanje neuroloških funkcija mozga. Također sudjeluju u procesu nastajanja toksičnih peptidnih fragmenata kod mnogih neurodegenerativnih bolesti (Alzheimer-ova, Huntington-ova i Parkinson-ova bolest).¹³ Unutar ovog klana metalopeptidaza postoji mnogo porodica, a u nastavku pregleda literature obradit će se porodica metalopeptidaza M49, koja sadrži samo dipeptidil-peptidazu III koja djeluje kao egzopeptidaza.

2.2. Dipeptidil-peptidaza III

2.2.1. Klasifikacija DPP

Dipeptidil peptidaze (DPP) su enzimi klasificirani kao EC 3.4.14.⁷ Ova porodica sadrži 8 članova utvrđenih kod sisavaca: DPP I (katepsin-C), DPP II (DPP VII), DPP III, DPP IV (CD26), DPP VI, DPP VIII, DPP IX i DPP X, a uz to i dva člana izolirana isključivo kod bakterija (DPP V i DPP XI). DPP su uključene u gotovo svaki aspekt života, od sinteze i razgradnje proteina, regulacije staničnog ciklusa, obrade i razgradnje bioaktivnih peptida kao i obranu od oksidacijskog stresa.¹⁴

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je otkrivena treća po redu, zbog čega i nosi broj III. (EC 3.4.14.4). DPP III je metalopeptidaza ovisna o cinku koja odcjepljuje dipeptide s amino krajeva peptidnih lanaca koji sadrže 3 do 10 aminokiselinskih ostataka. DPP III pokazuje izraženu specifičnost za arginil-arginin-2-naftilamid. U bazi podataka MEROPS svrstana je u obitelj M49, te je ujedno i njezin jedini član.⁹ Svrstana je u zasebnu porodicu zbog jedinstvenog strukturnog heksapeptidnog motiva, HEXXXH, odgovornog za vezanje cinkovog iona i katalitičku aktivnost enzima. U starijoj literaturi za DPP III koriste se nazivi enkefalinaza B i angiotenzinaza crvenih krvnih stanica, koji se odnose na pretpostavke o fiziološkoj ulozi proteina.¹¹ Lee i Snyder (1982.) utvrdili su da citosolni DPP III pročišćen iz mozga štakora pokazuje specifičnost za razgradnju biološki aktivnih neuropeptida, s najvećim afinitetom za enkefaline i angiotenzine te se pretpostavlja da imaju ulogu u regulaciji krvnog tlaka i boli.¹⁵

2.2.2. Patofiziološka uloga DPP III

DPP III prvi je puta nađena u hipofizi goveda¹⁶ te zatim i u koži štakora i čovjeka¹⁷, goveđoj i ljudskoj leći¹⁸, eritrocitima čovjeka¹⁹, posteljici kod žena²⁰ te mnogim drugim tkivima sisavaca i drugih organizama, od nižih do viših eukariota i prokariota, što pokazuje da je DPP III široko rasprostranjen, evolucijski očuvan protein, s velikim rasponom bioloških funkcija.²¹

Premda patofiziološke funkcije DPP III još uvijek nisu potpuno razjašnjene, smatra se da je DPP III uključena u završne korake proteinske razgradnje unutar stanice te da je važan čimbenik u obrani stanice od upale i oksidacijskog stresa te također sudjeluje i u regulaciji krvnog tlaka i osjeta boli.²¹ Utvrđena je jaka korelacija između povećanja aktivnosti DPP III i

malignih tumora jajnika i endometrija²², kao i korelacija između aktivnosti DPP III i agresivnosti primarnih karcinoma jajnika.²³ DPP III ima također važnu ulogu u nastanku katarakte, potičući zamućenje leće unutarstaničnim prometom proteina leće.²⁴ Abramić i sur. (1988.) utvrdili su da je DPP III pročišćena iz eritrocita ljudi pokazala posebno visoki afinitet za angiotenzin III te da bi mogla biti odgovorna za barem djelomičnu eliminaciju ovog vazoaktivnog peptida iz cirkulacije, što upućuje na njezinu ulogu u regulaciji krvnog tlaka.¹⁹ Novija su istraživanja pokazala da je DPP III značajno smanjila krvni tlak kod miševa s hipertenzijom induciranom pomoću angiotenzina II, što ukazuje na moguću primjenu DPP III u liječenju hipertenzije.^{25, 26}

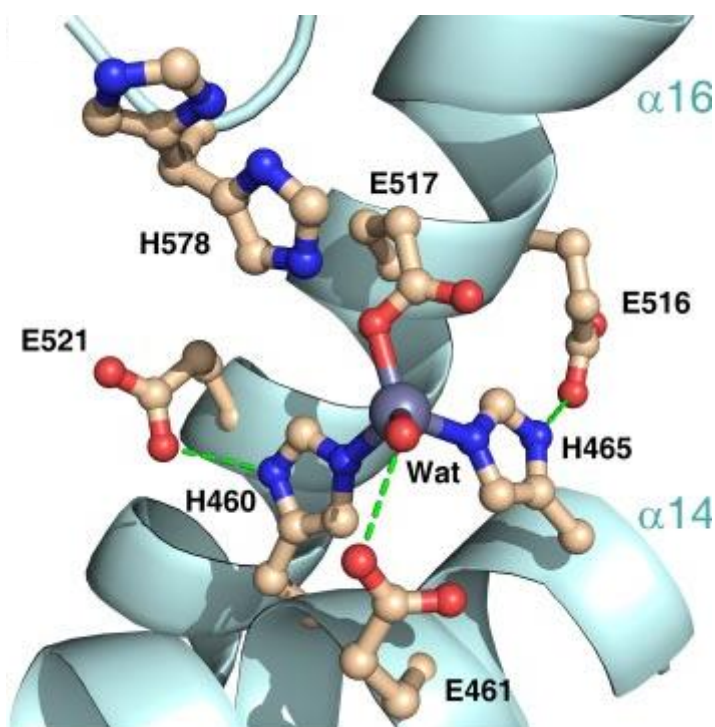
Bezerra i sur. (2012.) utvrdili su da je DPP III jedan od najvažnijih enzima koji odgrađuje enkefaline, prirodne tvari koje djeluju slično morfiju i ublažavaju bol, i sudjeluje u složenom mehanizmu modulacije osjeta boli kod sisavaca. Opisali su kristalnu strukturu ljudskog DPP III u interakciji s njegovim supstratom, opioidnim peptidom tinorfinom. U svojem istraživanju pokazali su kako ova peptidaza veže svoje supstrate u procesu kojim termodinamički dominira pozitivna promjena entropije te ukazali na mogućnosti alternativnih liječenja osjeta boli, budući da upotreba morfija i njegovih derivata imaju teške nuspojave.²⁷

Uloga DPP III u obrani stanica od oksidativnog stresa povezana je s kompetitivnim vezanjem DPP III i Nrf2 na Keap1 protein, koji je dio signalnog puta Nrf2-Keap1. Vezanje proteina DPP III na Keap1 dovodi do konformacijske promjene Keap1 proteina te dolazi do otpuštanja Nrf2 iz veznog mjesta na Keap1 proteinu i indukcije citoprotektivnog odgovora, a taj se proces vezanja sastoji od dva koraka.²⁸ Sobočanec i sur., 2016. istraživali su ulogu DPP III i njezin zaštitni učinak protiv hiperoksije, posredovan Nrf2/Keap1 signalnim putem, kod ovarioektomiranih mišica uz nadomjesnu terapiju estrogenih hormona. Utvrdili su da se DPP III nakuplja u jezgri kao odgovor na hiperoksiju te da kombinirana indukcija hiperoksije i davanje E2 imaju kumulativni učinak na akumulaciju DPP III unutar jezgre.²⁹ Također, neke mutacije DPP III proteina mogu utjecati na tumorsku funkcionalnost. Portal cBio genomike raka (<http://cbioportal.org>) je izvor otvorenog pristupa za interaktivno istraživanje podataka genomike raka, a u ovoj je bazi podataka naveden niz mutacija gena DPP III nađenih u uzorcima raka.⁶ Matovina i sur. (2017.) istražili su 5 različitih mutiranih inačica ljudskog DPP III proteina, među kojima G313W i R510W, utvrđene u uzorcima tumora adenokarcinoma pluća, odnosno kolorektalnog adenokarcinoma. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da

osim strukture enzima na njegovu aktivnost značajno utječu i njegova dinamička svojstva te ukazuju na važnost daljnjih istraživanja uloge hDPP III u signalnom putu Nrf2/Keap1 za detekciju biomarkera i istraživanja liječenja raka.³⁰ Lu i sur. (2017.) utvrdili su da je visoka ekspresija DPP III bila u pozitivnoj korelaciji s lošom prognozom za preživljavanje kod žena s tumorom dojke te da se stoga može koristiti kao potencijalni biomarker za prognozu i liječenja tumora dojke.⁵ Dokazano je da se Nrf2 i DPP III „natječu“ za vezanje na KEAP1 te da proteini poput DPP III vezanjem na KEAP1 doprinose povećanoj aktivnosti Nrf2 u tumorskim tkivima.³¹ Interdisciplinarno istraživanje hDPP III mutacija tumora, koje je uključivalo biokemijske, biofizičke i metode molekularne biologije s računalnim studijama, pokazalo je da neke mutacije imaju veći afinitet za vezanje na Keap1 i na ekspresiju gena kontroliranih signalnim putem Nrf2/Keap1.³²

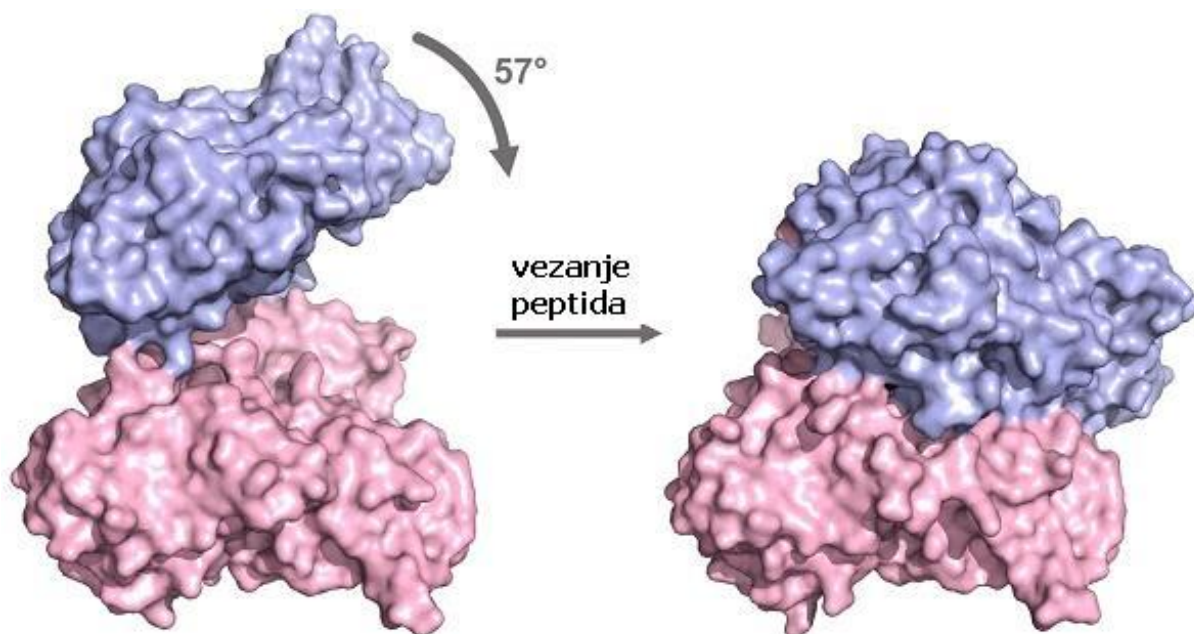
2.2.3. *Struktura i katalitički mehanizam DPP III*

Kristalna struktura DPP III je prvi put određena iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*: to je izdužena molekula koja se sastoji od dvije domene između kojih se nalazi velika pukotina. Donja domena sadrži α -uzvojnice i β -nabrane ploče, dok je gornja domena spiralne strukture, bogata α -uzvojnica. Jegru donje domene tvori β -struktura s 5 lanaca, te α -uzvojnica. Katalitički ion cinka vezan je za gornju domenu na "krovu" pukotine, a vezno se mjesto sastoji od His460, His465, Glu517 i jedne molekule vode. Oba histidinska liganda pripadaju spomenutom motivu HEXXGH metalopeptidaza porodice M49, dok je treći ligand, glutamat Glu517 iz drugog očuvanog motiva obitelji DPP III (⁵¹⁶EECRAE⁵²¹).¹⁴ Druga dva glutamatna ostatka u ovom motivu (Glu-516 i Glu-521) su vodikovom vezom vezani za histidinske ostatke koji koordiniraju cink (His-465 i His-460). Molekula vode dovršava tetraedarsku koordinaciju iona cinka. Ova molekula vode također je vodikovom vezom povezana s Glu-461.³³ Koordinacija vezanja katalitičkog iona cinka prikazana je na slici 3.



Slika 3: Koordinacija vezanja katalitičkog iona cinka za gornju domenu DPP III kvasca. Katalitički ion cinka prikazan je ljubičastom kuglicom u sredini. Koordiniran je pobočnim ostacima His460, His465, Glu517 i molekulom vode (prema ref. 33).

Struktura DPP III kvasca predstavlja prototip za ovu obitelj metalopeptidaza i premda s ljudskom hDPP III dijeli tek 36% identičnosti sekvence, pokazuju veliku sličnost u terciarnoj strukturi.²⁷ Istraživanja provedena računalnim simulacijama divljeg tipa i mutanta ljudske DPP III H568N pokazala su da vezanje supstrata Arg-Arg-2NA za protein inducira reorganizaciju veznog mjesta i njegovo djelomično zatvaranje.³⁴ Razlikuju se dvije konformacije proteina: "otvorena", bez vezanog supstrata i "zatvorena", što je prikazano na primjeru hDPP III, u interakciji s njegovim supstratom, opioidnim peptidom tinorfinom. Peptid se prvo veže na donji režanj, a njegovo vezanje izaziva konformacijske promjene u području aktivnog mjesta te uzrokuje značajno pomicanja domena čime kompleks poprima „zatvoreni“ oblik. Ovo kretanje uključuje rotaciju od približno 60° jedne domene u odnosu na drugu i prikazano je na slici 4.²⁷



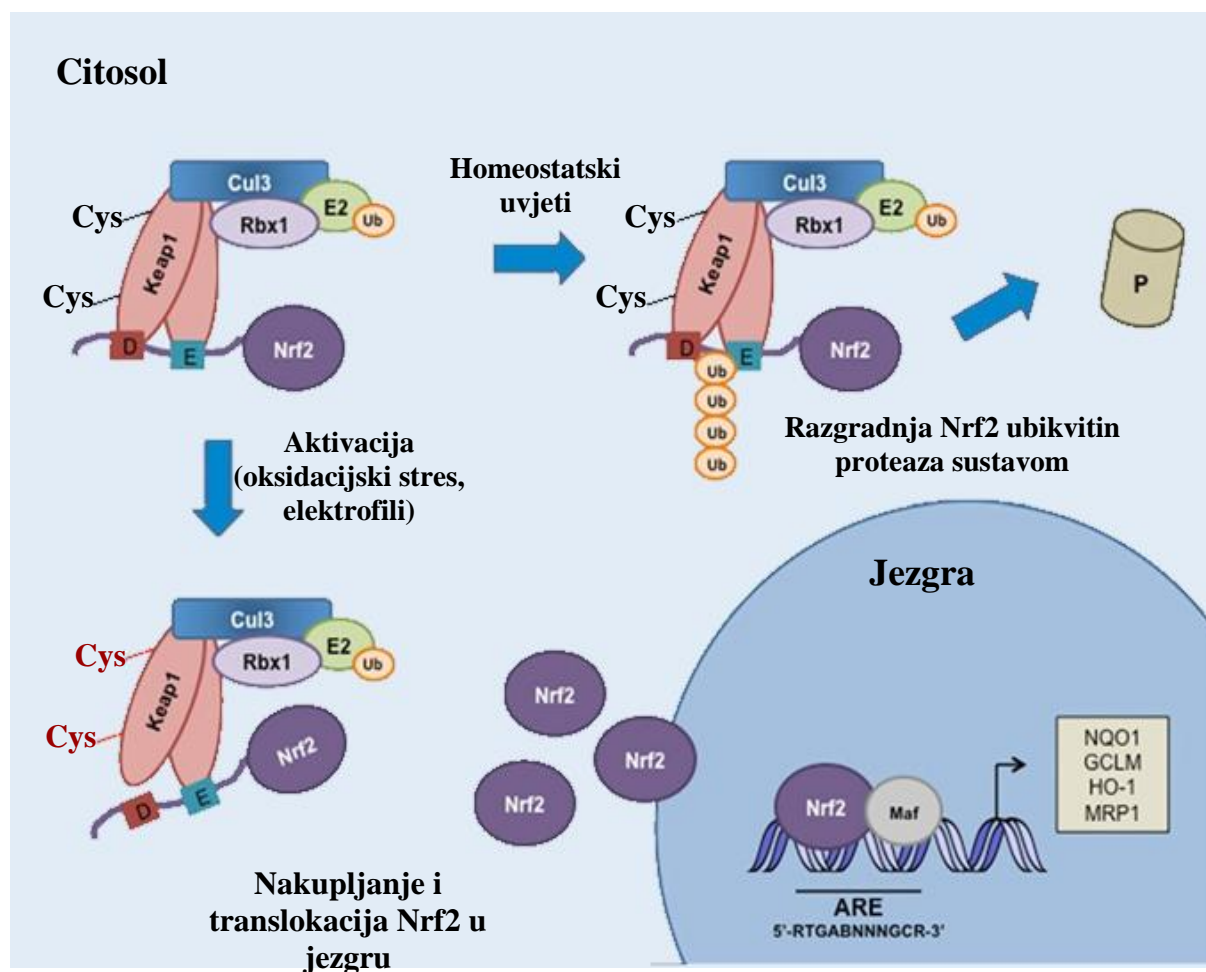
Slika 4: Kretanje i rotacija domena nakon vezanja tinorфина na hDPP III. Površinski prikaz nevezanog hDPP31-726 (lijevo) i peptidnog kompleksa (desno) (prema ref. 27).

2.3. Signalni put Nrf2-Keap1

Signalni put Nrf2 - Keap1 jedan je od najvažnijih puteva obrane i odgovora stanica na oksidacijski stres. Mehanizam zaštite stanica od oksidacijskih oštećenja zahtijeva koordiniranu aktivaciju citoprotektivnih gena, čiji produkti omogućuju stanicama neutralizaciju i detoksikaciju reaktivnih molekula i ponovno uspostavljanje stanične homeostaze. Ovakav citoprotektivni genski sustav reguliran je na razini transkripcije, preko transkripcijskog faktora Nrf2 koji se veže na tzv. elemente antioksidacijskog odgovora (engl. *antioxidant response elements*, ARE). Pri izlaganju oksidativnom stresu ili elektrofilima, Nrf2 se oslobađa od potiskivanja posredovanog Keap1 i premješta se u jezgru stanice.^{35,36}

Transkripcijski faktor Nrf2 pripada obitelji CNC (engl. Cap 'N' Collar) koja sadrži očuvanu strukturu osnovnog leucinskog zatvarača (bZIP, engl. basic leucine zipper) koji se kod kralješnjaka sastoji od NFE2 (nuklearnog faktora eritroidnog porijekla 2) i faktora Nrf1, Nrf2 i Nrf3 povezanih s NFE2.³⁷ Nrf2 sadrži sedam funkcionalnih domena, poznatih kao Neh1–Neh7. Neh2 domena, smještena na N kraju Nrf2-a, glavna je regulatorna domena, odgovorna za konjugaciju ubikvitina i regulaciju stabilnosti Nrf2. Neh2 sastoji se od dva degrona ETGE i DLG, važnih za regulaciju brzine razgradnje proteina. U fiziološkim uvjetima Nrf2 se nalazi u citosolu gdje je vezan na protein Keap1, odnosno na njegovu Kelch domenu. Nrf2 je

vezan na 2 Keap1 proteina putem dva motiva: ETGE koji ima veći afinitet i DLG koji ima manji afinitet vezanja na Kelch domenu. ETGE i DLG motivi stupaju u interakciju s Keap1, koji je supstratni adapterski protein za Cullin 3 (Cul3) te dovodi Nrf2 u kompleks Keap1–Cul3–E3 ubikvitin ligaze, što dovodi do ubikvitinacije i naknadne degradacije Nrf2. Na taj način Keap1–Cul3–E3 ubikvitin ligaza kompleks održava nisku razinu Nrf2 proteina, kako je prikazano u gornjoj polovici slike 5.³⁸



Slika 5: Shematski model signalnog puta Nrf2–Keap1 u homeostatskim uvjetima (gore) te nakon aktivacije zbog oksidacijskog stresa ili djelovanja elektrofila (dolje). Preuzeto i prilagođeno iz reference 38.

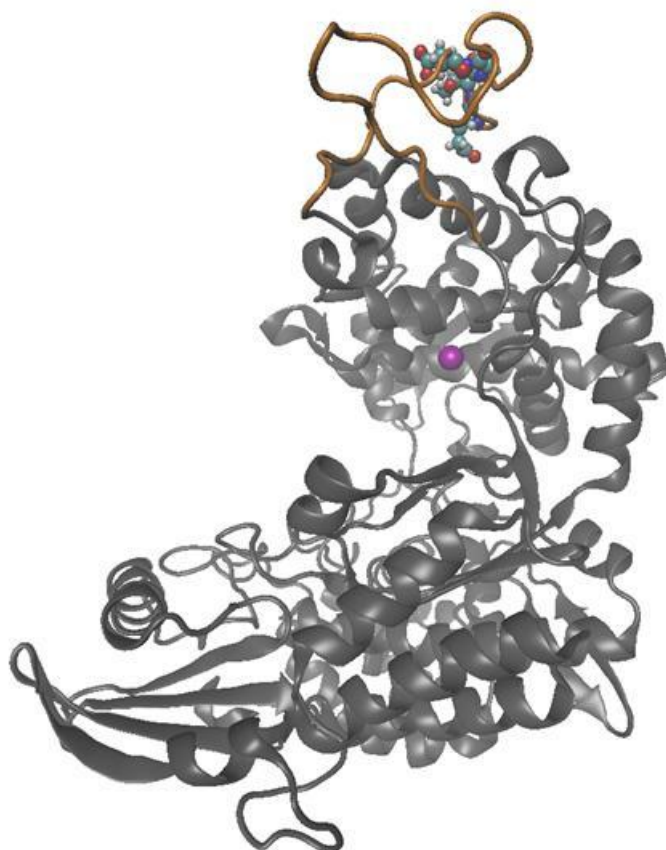
D DLG; **E** ETGE

U uvjetima oksidacijskog stresa, dolazi do konformacijske promjene u strukturi kompleksa Nrf2-Keap1-Cul3 uslijed koje je onemogućena ubikvitinacija Nrf2 te se novonastali Nrf2 translocira u jezgri gdje aktivira transkripciju niza gena koji kodiraju detoksifikacijske

proteine uključene u obranu stanice od oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres ili elektrofili uzrokuju konformacijsku promjenu u Keap1–Cul3–E3 ubikvitin ligazi djelovanjem na specifične ostatke cisteina u Keap1. Ove promjene ometaju Nrf2-Keap1 vezanje na DLG domeni. Nrf2 se stabilizira, a slobodni Nrf2 se translocira u jezgru, gdje se veže za ARE unutar regulatornih regija širokog spektra gena za obranu stanica, uključujući NQO1, GCLM, HO-1 i MRP1.³⁸ Aktivacija obrambenog odgovora Nrf2 štiti od neurodegenerativnih bolesti, starenja, dijabetesa, fotooksidativnog stresa, kardiovaskularnih bolesti, upala, plućne fibroze, akutne plućne ozljede i raka.^{39,40,41} Nedavne studije su pokazale da Nrf2 potiče preživljavanje ne samo normalnih stanica, već i stanica raka. Akumulacija Nrf2 u stanicama raka stvara okruženje pogodno za rast stanica i štiti od oksidacijskog stresa, kemoterapijskih sredstava i radioterapije. Ovaj fenomen nazvan je "tamna strana Nrf2-a".^{4,5,41} Mutacije unutar Keap1 mogu dovesti do pojačane aktivacije Nrf2 odgovora te pospješiti preživljavanje stanica tumora i stvoriti optimalno okruženje za staničnu proliferaciju i progresiju tumora, a njegova povećana ekspresija povezana je s lošom prognozom kod pacijenata te na moguću rezistenciju na uobičajenu kemoterapiju.^{37,41}

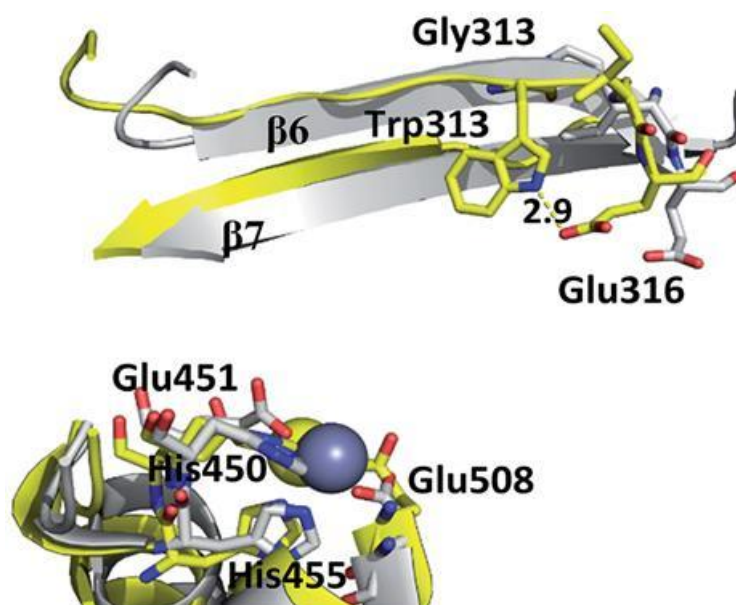
Na Kelch domenu KEAP1 proteina mogu se vezati i drugi proteini koji, poput Nrf2 imaju ETGE motiv, a jedan od tih proteina je i DPP III. Hast i sur. (2013.) su proteomskom analizom ubikvitin ligaze KEAP1 utvrdili proteine DPP3, FAM117B, MCM3, SLK i MAD2L1, koji inhibiraju ubikvitinaciju Nrf2. Od ovih proteina koji sadrže motiv aminokiselina ETGE, koji odgovara motivu interakcije KEAP1 pronađenom u Nrf2, DPP III je imao najveći utjecaj na transkripciju ovisnu o Nrf2 i bio je najzastupljeniji protein unutar KEAP1 interaktoma. Također je utvrđeno da je interakcija DPP III i Keap1 pojačana u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog pomoću H₂O₂ te da je povećana razina DPP3 mRNA u korelaciji s povećanom ekspresijom Nrf2-kontroliranih gena i lošijom prognozom u estrogen receptor-pozitivnim malignim tumorima dojke.³²

Kombinacijom eksperimentalnog i računalnog pristupa Gundić i sur. (2016.) napravili su modele kompleksa između hDPP III i Keap1 Kelch domene kako bi razjasnili molekularne detalje interakcije DPP III – Kelch.³⁶ Vezanje DPP III na Kelch domenu ne utječe na ukupnu strukturu DPP III, koordinaciju metalnih iona i lokalni obrazac fleksibilnosti. ETGE motiv DPP III nalazi se u petlji, na površini katalitičke domene, kako je prikazano na slici 6 te je ustanovljeno da je to najfleksibilniji dio ljudskog DPP III.³⁵



Slika 6: Na slici je 3D prikaz ljudske DPP III. ETGE motiv na fleksibilnoj petlji (obojena narančasto) 'gornje', katalitičke domene prikazan je u obliku kuglice i štapića, dok je ion cinka predstavljen kao ljubičasta kuglica (prema ref. 35).

Matovina i sur. (2017.) istražili su kako točkaste mutacije utječu na ukupnu fleksibilnost proteina divljeg tipa i mutanata ljudske DPP III. Ustanovili su da stabilizacija strukture proteina izazvana vezanjem supstrata nije ista u svim varijantama te da je kompleks s mutantom R510W znatno fleksibilniji od ostalih simuliranih kompleksa. Kombinacijom eksperimentalnih postupaka i računalnih simulacija ustanovili su da je Gly313 bitan za pravilno pozicioniranje supstrata Arg₂-2NA, iako među njima nema izravnog kontakta, no Gly313 diktira položaj Glu316, konzerviranog ostatka koji elektrostatski djeluje s N-terminalnom amino skupinom supstrata. Gly313 nalazi se na β6 vrpce donje domene hDPP III. Na kraju vrpce nalazi se ostatak Glu316, koji se nakon zatvaranja proteina približava supstratu i elektrostatski stupa u interakciju s N-terminalnom amino skupinom svog prvog aminokiselinskog ostatka kao što je prikazano na slici 7.³⁰



Slika 7: Prikazan je položaj ostataka 313 (Gly odnosno Trp) i Glu316 u beta-listovima $\beta 6$ – $\beta 7$ u divljem proteinu (sivo) i mutiranoj varijanti (žuto). Označena je udaljenost između Trp313 i Glu316 mutanta. Zn^{2+} je predstavljen kao plava kugla, a ostaci aktivnog mjesta prikazani su kao štapići (prema ref. 30).

Zatvaranje strukture proteina omogućuje pravilno pozicioniranje supstrata za enzimsku katalizu uz stvaranje vodikovih veza između supstrata i gornje domene proteina, čime nastaje aktivan kompleks enzima i supstrata.³⁴

Matić i sur. (2022) utvrdili su da različite mutacije (R623W i Pro479) utječu na različite faze vezanja DPP III za Keap1; mutacija R623W olakšava odvajanje petlje koja sadrži ETGE motiv, koji je ključan za vezanje DPP III na Keap1, od strukturiranog dijela gornje DPP III domene, dok mutacija P479S povećava snagu interakcije između DPP III petlje i Kelch domene Keap1 proteina.³² Sve navedene činjenice ukazuju na važnost istraživanja ljudske DPP III kao i uključenosti ove peptidaze u signalni put Nrf2/Keap1.⁴²

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Etanol, klorovodična kiselina (HCl), kobaltov(II) klorid (CoCl₂), metanol, natrijev hidroksid, natrijev klorid, octena kiselina – *Kemika*; izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid (IPTG), ampicilin (Amp) – *Fermentas*; *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin (TEMED) – *Serva*; Akrilamid/bisakrilamid, β-merkaptioetanol, amonijev persulfat (APS), glicin, agar, agaroz – *GE Healthcare Amersham Biosciences*; Fast Blue BN (FBB), natrijev dodecilsulfat (SDS), trikloroetena kiselina (TCA), Tween 80, imidazol, Tris(hidroksimetil)-aminometan (Tris), glicerol – *Sigma*.

Kemikalije korištene za rad s humanim stanicama: tripsin, fosfatno puferirana fiziološka otopina (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS), kloroform, TRIzolTM Reagent – *Invitrogen*, izopropanol, voda bez prisustva RNA-za (engl. *Nuclease Free Water* – *Ambion*).

3.1.2. Markeri veličine i boje

Marker s označenim veličinama standardnih proteina (PageRuler Perstained Protein Ladder – *Thermo Fischer Sci.*); nativni marker (Native MarkTM Unstained Protein Standard *Thermo Fischer Scientific*), Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) (*Sigma-Aldrich*); Phast Gel Blue R (*Sigma-AldrichI*).

3.1.3. Enzimi

Lizozim, deoksiribonukleaza I (DNaza I) (*Sigma-Aldrich*); restrikcijski enzim *DpnI* – *NEB*, *Pfu* DNA-polimeraza (PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μL), *Thermo Fischer Scientific*).

3.1.4. Sintetski supstrati

Diarginil-2-naftilamid (Arg-Arg-2NA). H-Arg-Arg-βNA 3 HCl (*Bachem Products*).

§ 3. Eksperimentalni dio

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

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

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

Medij za humane stanice: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (high glucose)* D6429 500 mL (DMEM), *Fetal Bovine Serum* (FBS) F7524-500 ml, , neesencijalne aminokiseline (NEEA; M7145-100 ml) i antibiotik gentamicin (*Gentamicin Sulfate*, 10 mg/ml; *Capricorn*).

3.1.6. *Komercijalni kompleti*

QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit – *Agilent* za ciljanu *in vitro* mutagenezu #200521 (10 reactions), *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* – *Thermo Scientific* za izolaciju i pročišćavanje plazmida iz bakterija (K0502).

3.1.7. *Sojevi bakterija E. coli*

XL10-Gold – iz *QuickChange Kit*-a kemijski ultrakompetentne stanice za *in vitro* mutagenezu, BL21-CodonPlus(DE3)RIL – elektrokompetentne stanice za prekomjernu ekspresiju proteina.

3.1.8. *Punila za kolonu*

Kolona za afinitetnu kromatografiju: Ni-NTA agarozna – *Qiagen* (ili ROTI®Garose-His/Ni NTA-Beads, 25 ml) ; kolona za gel-filtraciju *PD-10 Desalting Column: Sephadex G-25* punilo – *GE Healthcare Amersham Biosciences*.

3.1.9. *Humane embrionalne stanice*

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose* (D6429) with glutamine, *Sigma-Aldrich*), neesencijalne aminokiseline (NEEA, *Capricorn*), FBS (eng. *fetal bovine serum*) fetalni goveđi serum.

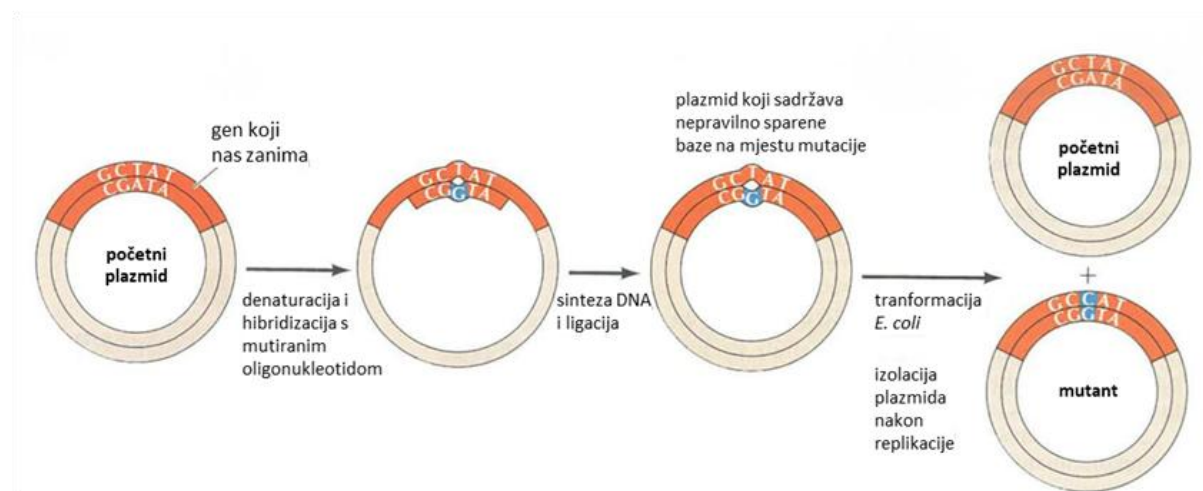
3.2. Metode rada s vektorom pLATE31

3.2.1. *In vitro* mutageneza

In vitro mutageneza je ciljani postupak uvođenja mutacije (npr. insercija, kratka delecija ili točkasta mutacija) unutar DNA slijeda. Kao kalup za uvođenje određene mutacije koriste se vektori koji u svojoj DNA sadrže genski slijed unutar kojeg želimo uvesti ciljanu mutaciju (slika 8).⁴³

Uvođenjem ovog postupka genetskog inženjerstva omogućeno je detaljno analizirati i usporediti razlike u funkcijama proteina koji su nastali promjenom jedne ili više aminokiselina u slijedu polipeptidnog lanca od interesa. Ovaj postupak se naziva obrnutom genetikom jer se prvo unosi određena mutacija *in vitro* mutagenезom u gen, a tek se nakon toga u fenotipu proteina razmatraju utjecaji te mutacije.⁴⁴

Kako bismo uveli ciljanu mutaciju u gen koji kodira hDPP III potrebne su dvije oligonukleotidne početnice sa željenom točkastom mutacijom. Ovim postupkom ciljane *in vitro* mutagenезe uvodi se točkasta mutacija kod prve mutirane inačice hDPP III na poziciji 510 (kodon CGG za arginin je promijenjen u kodon UGG za triptofan) ili skraćeno R510W, također druga mutacija je uvedena kod druge mutirane inačice hDPP III na 514 mjestu (kodon GUG za valin je promijenjen u kodon ATG za metionin) odnosno V514M. U tablici 1 se nalaze konstruirane početnice za mutagenезu. Mutacije su uvedene primjenom QuikChange II Site-Directed Mutagenesis kompleta (*Agilent*).



Slika 8: Prikaz mutagenезe pomoću sintetiziranih oligonukleotidnih početnica koje sadrže željenu mutaciju i vektora s ugrađenim genom od interesa kao kalupa. Slika je preuzeta iz reference 43. i prilagođena.

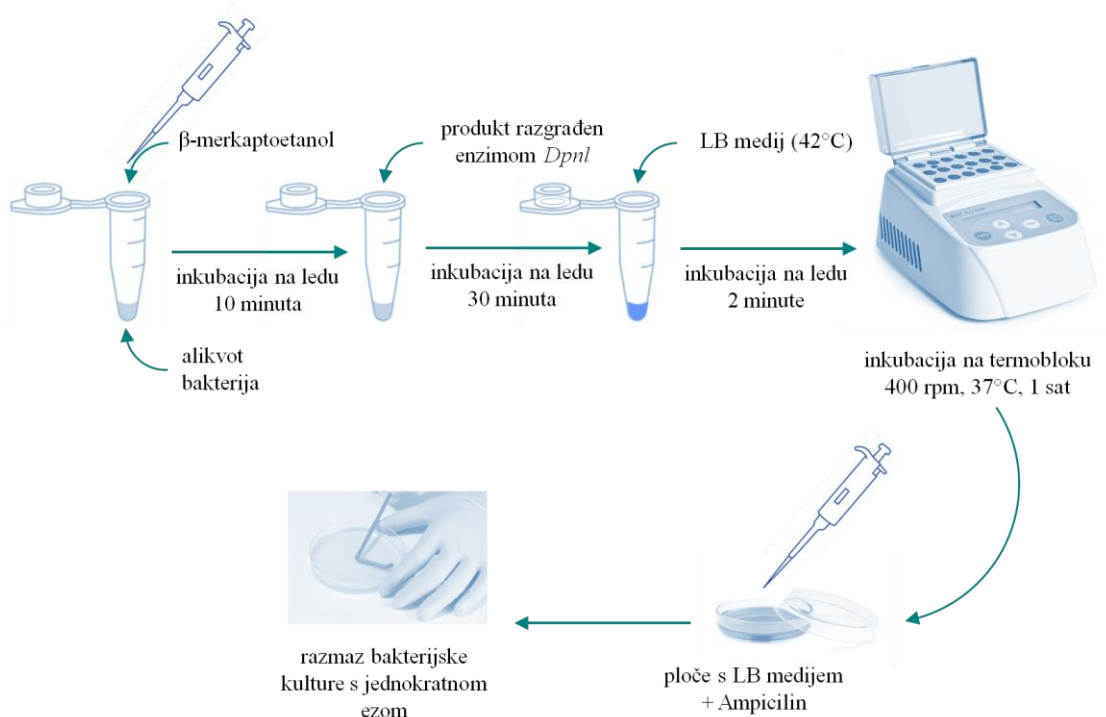
§ 3. Eksperimentalni dio

Kao kalup pri uvođenju željenih mutacija korišten je vektor pLATE31 (aLICator LIC Cloning and Expression Kit 3 (C-terminal His tag), #K1261, *Thermo Fischer scientific*) kojeg karakterizira ugrađen gen za hDPP III, snažni promotor T7 kojeg specifično prepoznaje T7 RNA-polimeraza, također sadrži dva *lac* operatora koja su ugrađena kako bi se spriječila bazalna ekspresija T7 RNA-polimeraze jer oslabljuju T7 promotor. *Lac* operatori služe za vezanje *lac* represora (koji je kodiran *lacI* genom). Uzvodno od klonirajućeg mjesta postavljen je terminator rrnBT1-T2 kako bi dodatno spriječio bazalnu ekspresiju. Također slabi Tet promotor (P_{ter}) djeluje u suprotnom smjeru od T7 promotora i time dodatno smanjuje bazalnu ekspresiju. Inert cDNA za ekspresiju hDPP III ukloniran je u pLATE31 sa polihistidinskim privjeskom kako bi se protein od interesa mogao pročitati pomoću afinitetne kromatografije.

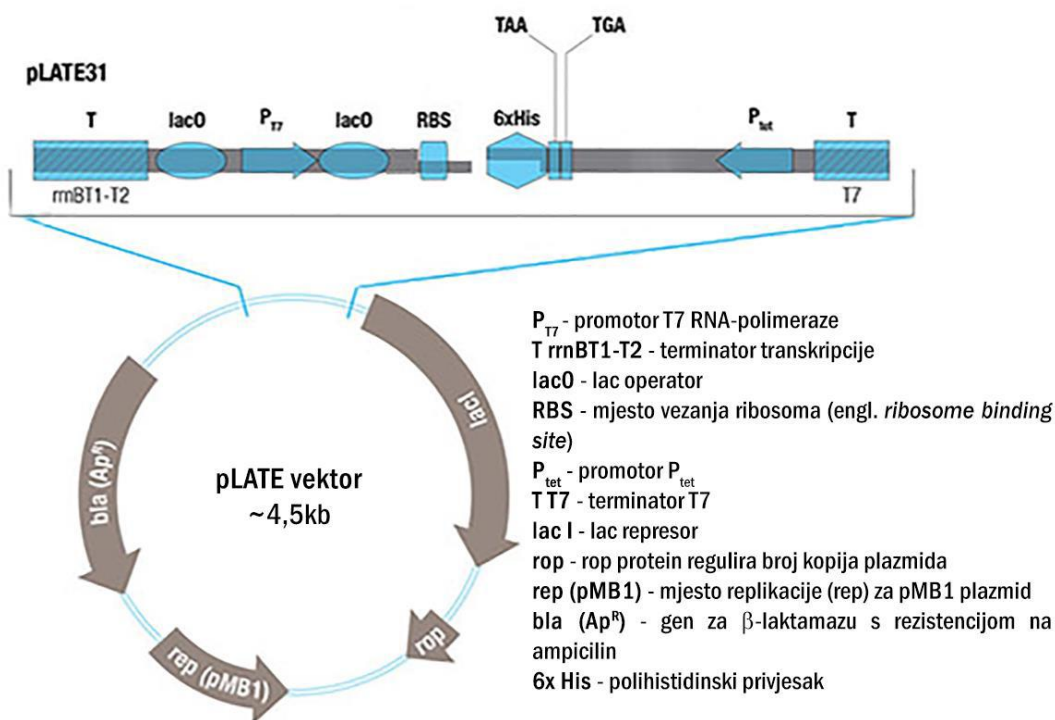
Pri replikaciji pLATE31 plazmida lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) korištena je DNA polimeraza (*Pfu Ultra HF*) koja posjeduje visoku točnost replikacije i 3'→5' egzonukleaznu aktivnost (mogućnost izrezivanja krivo sparenih nukleotida i ugradnju odgovarajućih) tijekom elongacije. Ovaj postupak nije pravi PCR jer produkt nije umnožen eksponencijalno nego linearno, a razlog tome je što novonastali plazmidni produkti imaju ureze te ne mogu služiti kao kalup za novi ciklus PCR-a.⁴⁵ Plazmidna DNA molekula koja je služila kao kalup u reakcijskoj smjesi, nakon PCR reakcije razgradi se dodatkom *DpnI* endonukleaze koja cijepa metiliranu i hemimetiliranu DNA. Nakon tretmana smjese s endonukleazom *DpnI* u smjesi ostaje novonastala plazmidna DNA sa urezima koja je spremna za transformaciju u bakterijske stanice (slika 9).

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

Početnica	GC (%)	T_m / °C	Nukleotidni slijed 5'→3'
DPP III-V514M (F)	69,7	86,6	CCGGGCTGAGAGC A TGGGTCTCTACCTC
DPP III- V514M (R)	69,7	86,6	GAGGTAGAGACCC A TGCTCTCAGCCCGG
DPP III-R510W (F)	71	85,6	CAGCTACGAAGAGTG C TGGGCTGAGAGCGTGG
DPP III- R510W (R)	71	85,6	CCACGCTCTCAGCCC A GCACTCTTCGTAGCTG



Slika 9. Prikaz kemijske ugradnje plazmida s ugrađenom mutacijom od interesa.



Slika 10. Konstrukcija vektora pLATE31. Preuzeto iz *Thermo Fisher Scientific* priručnika.⁴⁵

3.2.2. Transformacija *E. coli* soja XL10-Gold

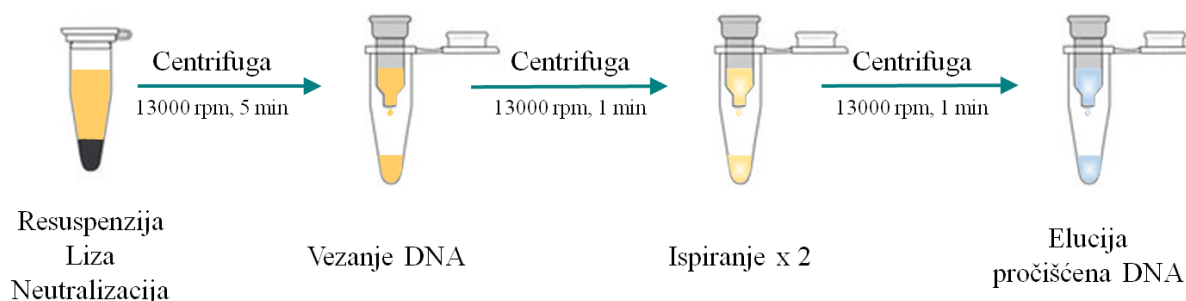
Za kemijsku transformaciju korištene su XL10-Gold ultrakompetente stanice (*Agilent*) unutar kojih su uklonjeni restriksijski enzimi i endonukleaza te se time povećava stabilnost ugradnje željenog plazmida. Na hranjivoj podlozi rastle su samo one kolonije koje sadrže gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin. Unutar vektora pLATE31 nalazi se gen za β -laktamazu s rezistencijom na ampicilin, kako je prikazano na slici 10.

Mutagenaza je izvedena prema modificiranom protokolu proizvođača. U 1,5 mL Eppendorf epruvetu je prebačen alikvot od 20 μ L XL-10-Gold bakterija i dodano je 0,9 μ L β -merkaptetoanola. Nakon 10 min inkubacije na ledu u smjesu je dodan nosintetizirani plazmid prethodno tretiran enzimom *DpnI* kako je opisano u prethodnom poglavlju. Nakon 30 min inkubacije na ledu bakterije su izložene toplinskom šoku zagrijavanjem na 42°C u termobloku u trajanju od 30 sekundi te su zatim prebačene 2 min na led, nakon čega je na njih dodano 500 μ L LB+ medija (LB medij sa 0,4 % glukoze i 12,5 mM $MgCl_2$) zagrijanog na 42°C te su zatim inkubirane na 37°C na termobloku uz trešnju od 400 g tijekom 60 minuta. Nakon završene inkubacije smo pomoću mikropipetora nanijeli 250 μ L bakterijskih stanica na LB ploču za uzgoj bakterija u koju je dodan antibiotik ampicilin (100 μ g mL⁻¹) kao selekcijski marker. Inokulacija se radila u aseptičnim uvjetima tj. što bliže plamenu plamenika. Smjesa je ravnomjerno raspoređena po LB podlozi pomoću jednokratnog sterilnog štapića u obliku slova L. Nakon nanošenja transformiranih bakterija na hranjivu podlogu, ploča je prenesena u inkubator na 37°C i postavljena naopako tijekom noći, da ne bi došlo do kontaminacije bakterijskih kolonija. Prekonoćnim uzgojem transformiranih bakterija na hranjivoj podlozi narasle su samo one kolonije koje sadrže plazmid koji nosi gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin. U Petrijevu zdjelicu za negativnu kontrolu bile su nasadene kolonije bakterija bez ugrađenog plazmida koje zbog djelovanja antibiotika nisu narasle. Za daljnji uzgoj odabrane su pojedinačne kolonije s LB ploče koje smo prenijeli u LB tekući medij sa ampicilinom na prekonoćni uzgoj pri 37°C u inkubatorsku tresilicu.

3.2.3. Postupak izolacije i pročišćavanje plazmida koji sadrže mutaciju

Za izoliranje plazmidne DNA koristili smo GeneJET Plasmid Miniprep Kit (*Thermo Scientific*).⁴⁵ Nakon prekonoćnog uzgoja prebacili smo alikvot bakterijske kulture u Eppendorf epruvete od 2 mL i centrifugirali ih 2 min na 6800 g. Nakon centrifugiranja odlili smo supernatant i talogu dodali 250 μ L pufera za resuspendiranje te smo nakon resuspendiranja

dodali 250 μL pufera za lizu (engl. *Lysis solution*) (slika 11). Ependorf epruvete smo zatvorili i 5-8 puta lagano okretali. Pufer za lizu se sastoji od SDS detergenta koji služi razaranju stanične membrane i NaOH koji denaturira kromosome i DNA. Da ne bi došlo do oštećenja plazmida u ovom koraku smo unutar 5 min dodali 350 μL pufera za neutralizaciju (engl. *Neutralization solution*) u reakcijsku smjesu te smo smjesu centrifugirali na 13000 g tijekom jedne minute. Supernatant smo prenijeli na kolonicu (engl. *GeneJet spin Column*) i centrifugirali na 13000 g tijekom 1 min te smo dodali 500 μL pufera za ispiranje (engl. *Wash solution*). Ponovili smo centrifugiranje 2 puta, drugi puta bez pufera za ispiranje kako bismo potpuno uklonili etanol s kolonice. Gornji dio *GeneJet spin* kolone za pročišćavanje prebačen je u sterilnu Ependorf epruvetu od 1,5 mL te je na membranu ispipetirano 50 μL pufera za eluciju (engl. *Elution solution*). Zatim smo inkubirali epruvete 2 min na sobnoj temperaturi te na kraju centrifugirali na 13000 g tijekom 2 min. Nakon završenog postupka izolacije plazmida pomoću mikrovolumnog spektrofotometra BioDrop (Biochrom) odredili smo koncentraciju i čistoću plazmida koji sadrže mutaciju. Nakon dobivenih zadovoljavajućih rezultata na mikrovolumnom spektrofotometru naše pročišćene plazmide poslali smo na postupak sekvenciranja u tvrtku Macrogen.



Slika 11. Prikaz izolacije plazmida i njegovog pročišćavanja

3.3. Uzgoj bakterijske kulture za prekomjernu ekspresiju mutiranih inačica hDPP III

3.3.1. Fizikalna transformacija BL21-CodonPlus(DE3)-RIL bakterija E.Coli

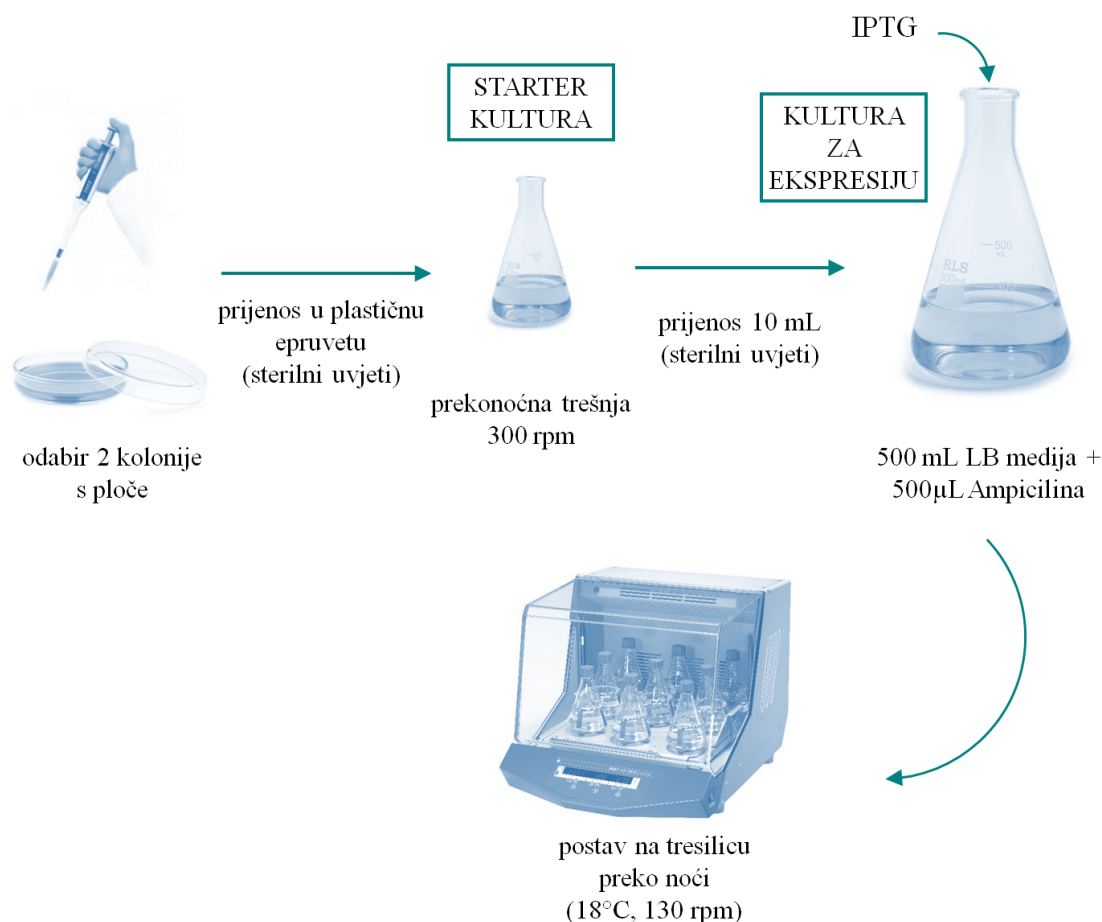
Za transformaciju i uzgoj *E. coli* bakterija koristili smo *Luria-Bertani* (LB) medij u Petrijevim zdjelicama kao krutu podlogu za nasađivanje transformiranih bakterija. Tekući oblik LB medija koristili smo za oporavak bakterija nakon elektrošoka, za starter kulturu i

glavnu prekonocnu kulturu za ekspresiju proteina. BL21-CodonPlus (DE3)-RIL bakterije *E. coli* transformiraju se fizikalnom metodom kratkog elektrošoka što se naziva elektroporacija. Elektrošokom se potiče otvaranje pora na membrani stanica te omogućuje unošenje strane DNA. Za taj postupak pripremili smo kutiju s ledom, ohlađenu kivetu za elektroporaciju pri -20°C te LB tekući medij zagrijan na 37°C da bi nakon elektrošoka u što kraćem vremenu počeli oporavak bakterija. U tubicu od 1,5 mL smo stavili 30 μL bakterijskih stanica i 1 μL mutiranog plazmida. Smjesu smo prebacili u ohlađenu kivetu za elektroporaciju te ju u elektroporatoru izložili kratkom elektrošoku u trajanju od 5 ms. Nakon elektroporacije u kivetu smo dodali 1 mL LB medija zagrijanog na 37°C . Zatim smo prebacili bakterijske stanice u Eppendorf epruvetu od 1,5 mL i inkubirali ih na tresilici 1 sat pri 37°C . Nakon toga smo smjesu centrifugirali 2,5 min pri 4000 g i oprezno uklonili mikropipetom 30 μL supernatanta. Talog preostalih bakterijskih stanica ravnomjerno smo uz plamenik nanijeli po podlozi Petrijeve zdjelice koja sadrži ampicilin te inkubirali preko noći u inubatoru na 37°C .

3.3.2. Uzgoj bakterijske kulture za prekomjernu ekspresiju mutiranih inačica hDPP III

Mikropipetom smo odabrali pojedine kulture sa ploče u sterilnim uvjetima uz plamen te ih prebacili u Erlenmayerovu tikvicu sa tekućim LB medijem i ampicilinom ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Starter kulturu smo prebacili u inkubator na 37°C te smo bakterije uzgajali tijekom noći na tresilici pri 220-250 rpm. Slijedećeg dana iz starter kulture smo prebacili 10 mL u Erlenmayerovu tikvicu od 2 L sa pola litre LB medija i 500 μL ampicilina (koncentracija štoka 100 mg mL^{-1}) da bi dobili kulturu za ekspresiju proteina (slika 12). Koncentraciju bakterija smo pratili spektrofotometrom pri valnoj duljini od 600 nm (engl. *Optical density*, OD_{600}). Bakterije se razmnožavaju eksponencijalnom brzinom te se praćenjem optičke gustoće određuje idealna koncentracija bakterijskih stanica u kulturi koja pri OD_{600} iznosi između 0,5-0,7 pri kojoj su bakterije u eksponencijalnoj fazi rasta. Kultura za ekspresiju proteina je ohlađena na 4°C tijekom 30 minuta u hladnoj sobi te je prije dodatka IPTG-a uzet alkvot od 1 mL za analizu na gelu. U kulturu je dodan 125 μL 1 M IPTG za indukciju ekspresije proteina te je nakon hlađenja kultura bakterija za ekspresiju proteina inkubirana preko noći na 18°C uz trešnju od 130 rpm. Slijedećeg dana ekspresijske kulture su centrifugirane u Sorvall RC-5B centrifugi u GSA rotoru na 5000 g tijekom 20 min, nakon čega je uklonjen supernatant te je talog smrznut u epruvetama od 50 mL na -20°C . Dobiveni

talog smo koristili za izolaciju željenog proteina hDPP III divljeg tipa (WT, engl. *wild type*) i njegovih inačica.

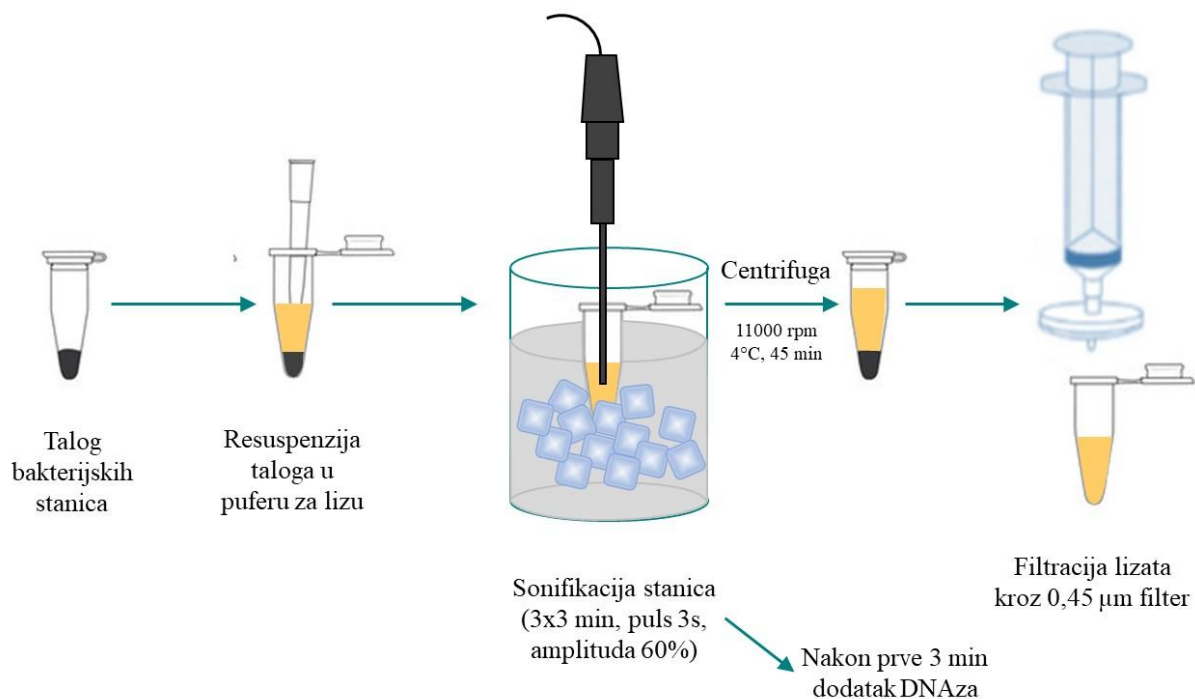


Slika 12. Uzgoj bakterijske kulture nakon ugradnje vektora elektroporacijom i indukcija ekspresije željenih proteina.

3.3.3. Liza i sonikacija bakterijskih stanica

Talog stanica smo izvagali kako bismo mogli izračunati sa koliko pufera za lizu ćemo ga resuspendirati budući da se na 1 gram taloga dodaje 5 mL pufera. Nakon resuspendiranja taloga dodali smo lizozim ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Za lizu stanica koristi se pufer koji sadrži soli Tris HCl ili EDTA i enzim lizozim kojim se narušava membranska struktura stanica. Za potpuno razaranje membrana i stijenki, stanice se podvrgavaju sonikaciji. Sonikacija je metoda kojom se ultrazvučnim valovima visoke frekvencije razaraju stanične membrane i stijenke. Smjesu smo inkubirali na ledu tijekom 30 minuta te smo zatim izvršili sonikaciju na sonikatoru Ultrasonic procesor (Sigma) 2 puta po 3 min s pulsevima od 2 sekunde i amplitudi 60. Nakon postupka sonikacije u smjesu je dodan $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ DNaze I i suspenzije su inkubirane 20 min

na sobnoj temperaturi te zatim centrifugirane 45 min na 14500 g pri 4°C u Sorvall RC-5B centrifugi u SS-34 rotoru. Zatim smo supernatant profiltrirali kroz filter promjera pora 0,45 µm kako bi se uklonili stanični ostaci. Dobiveni filtrat nanesen je na prethodno kalibriranu kromatografsku kolonu (Slika 13).



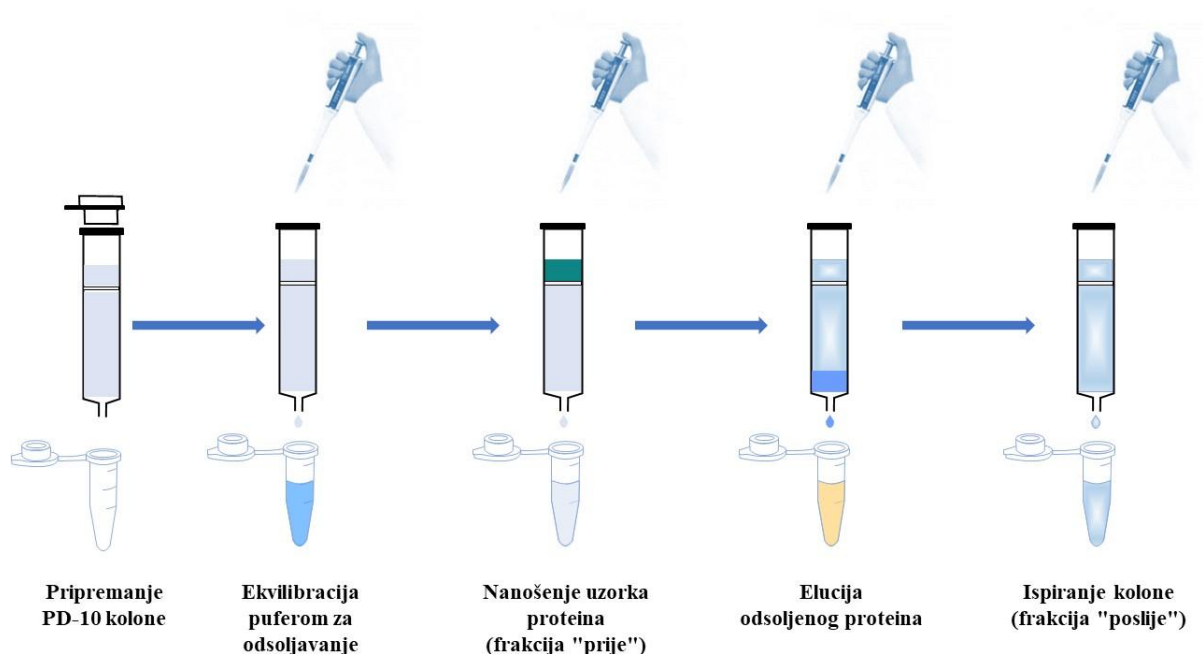
Slika 13. Postupak liziranja i sonikacije bakterijskih stanica potrebno za izolaciju proteina.

3.4. Metode rada s proteinima

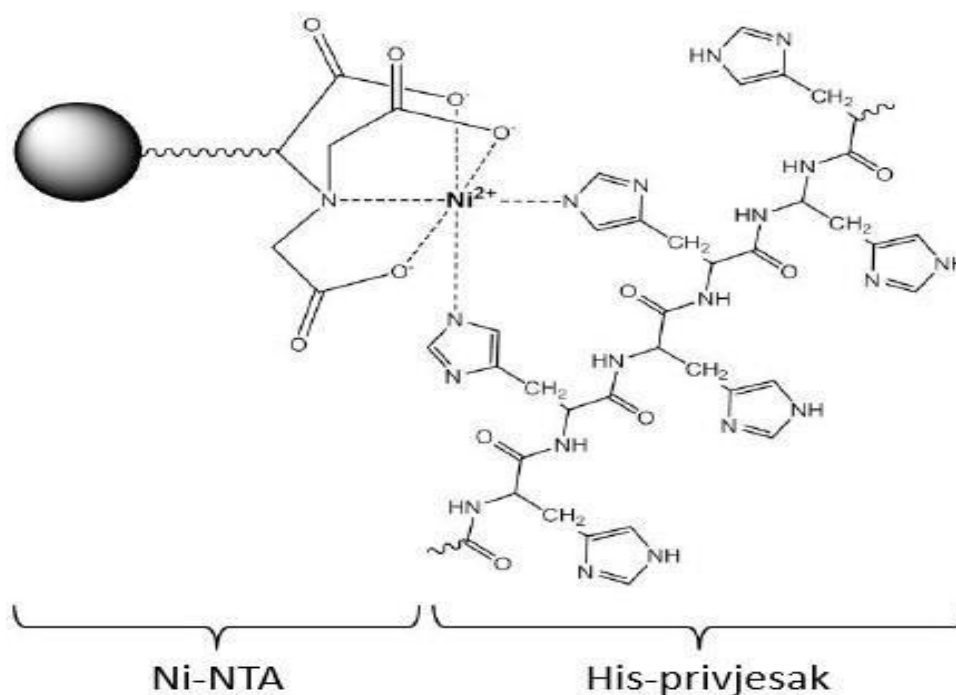
3.4.1. Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom

Afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom (engl. *Immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC) je metoda koja se koristi za izolaciju, pročišćavanje i analizu bioloških spojeva.⁴⁶ Kolonu za kromatografiju smo konstruirali na način da smo na dno prvo stavili vlakna staklene vune kako nam agarozni matriks ne bi prošao kroz kolonu. Zatim smo kolonu ispunili s agaroznim matriksom na koji je vezan Ni^{2+} sa 4 koordinacijska mjesta na nitrilotrioctenu kiselinu (engl. *Ni²⁺-nitrilotriacetic acid*, Ni-NTA) dok se na dva preostala ligandna mjesta veže polihistidinski privjesak s fuzijskog proteina (slika 15). Na kromatografsku kolonu smo priključili peristaltičku pumpu te smo podesili protok na 0,5 mL min^{-1} . Kolonu smo prvo isprali s 10 mL mQ H_2O te smo nakon toga nanijeli 10 mL pufera za lizu. Na tako pripremljenu kolonu nanesen je stanični lizat te je sakupljena frakcija nevezanih

proteina (engl. *Flow through*, FT). Nakon propuštanja staničnog lizata na kolonu smo nanijeli 5 mL pufera za ispiranje (engl. *Wash buffer*) te sakupili pet frakcija od po jedan mililitar u Eppendorf epruvete (W1-W5). Pri ispiranju kolone puferom za lizu brzina protoka je iznosila 1 mL min^{-1} . Nakon toga smo na kolonu nanosili pufer za eluiranje (engl. *Elution buffer*) dok nismo bili sigurni da je s kolone sišao sav protein što smo provjeravali mjerenjem koncentracije proteina na BioDrop uređaju. Brzina protoka kojim smo eluirali proteine je iznosila $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Frakcije smo sakupljali u Eppendorf epruvete od 1,5 mL po 0,5 mL uzorka u svaku. Nakon što smo prikupili sve eluate kroz kolonu je propušten pufer (engl. *End Wash buffer*) sa visokom koncentracijom imidazola kako bismo s kolone isprali zaostale proteine. Postupak je završen ispiranjem kolone sa 20 mL mQ H_2O i 20 mL 20% etanola (slika 14). Kolonu smo zaštitili parafilmom i spremili na $+4^\circ\text{C}$.



Slika 14. Shema pročišćavanja proteina metodom afinitetne kromatografije s imobiliziranim metalnim ionom.



Slika 15. Odvajanje fuzijskih proteina s His-privjeskom na Ni-NTA koloni. Preuzeto i prilagođeno iz *Affinity chromatography: Principles and applications*.⁴⁶

3.4.2. SDS diskontinuirana elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Za kontrolu provedenog postupka pročišćavanja proteina koristili smo SDS elektroforezu na poliakrilamidnom gelu (slika 16). U postupku elektroforeze pod utjecajem električnog polja dolazi do migracije molekula s nabojem. Nabijene molekule kreću se u električnom polju različitom brzinom zbog svoje molekulske mase i naboja. Poliakrilamidni gel tijekom elektroforeze ima ulogu molekularnog sita te usporava migraciju proteina s obzirom na veličinu i naboj molekula. Sol natrijevog dodecil-sulfata (SDS; engl. *Solidum dodecyl sulfate*) se veže na protein na način da se na 1 g proteina veže 1,4 g SDS-a te se tim vezanjem prikriva naboj polipeptida. Tada naboj po jedinici mase postaje proporcionalan relativnoj molekulskoj masi proteina. Zbog toga se proteini kroz poliakrilamidni gel kreću s obzirom na svoju molekulsku masu, a naboj je zbog natrijevog dodecil-sulfata svugdje jednak. Pri izradi gela prvo smo nanijeli gel za razdvajanje (tablica 2) te nakon polimerizacije na njega izlili gel za sabijanje (tablica 3) i postavili češalj za jažice na vrhu.⁴⁷

Pri pripremi uzoraka uzeli smo 1-2 μL željenog uzorka te je u smjesu dodano po 5 μL 2x tretirajućeg pufera (TB, engl. *treatment buffer*) (0,125 Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 2% β -merkaptotanol, 0,03 mM bromfenol plavo) te je do ukupnog volumena od 10

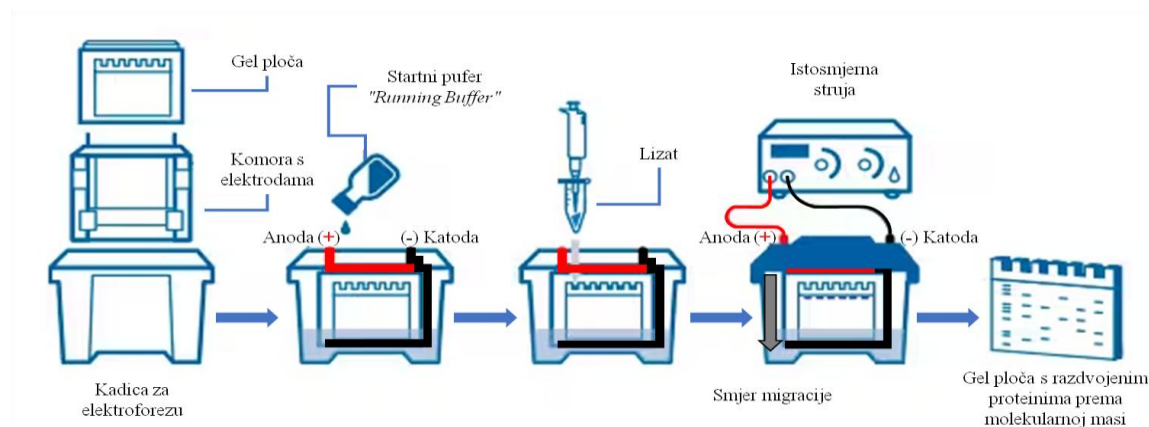
μL dodana voda. Potom smo uzorke stavili u termoblok u trajanju od 10 min na 98°C . Pripremljene uzorke nanosili smo na gel pomoću automatske pipete. Gel-elektroforezu započeli smo pri naponu od 120 V, a kada su uzorci ušli u pore gela za razdvajanje povećali smo napon na 180 V. Elektroforezu smo zaustavili kada je linija boje bromfenol plavo došla do kraja gela. Postupak elektroforeze i izgleda aparature prikazan je na slici 16. Gelove smo pažljivo prebacili u posude s bojom Commassie Brilliant Blue G-250 (CBB) te smo posude prebacili u vodenu kupelj na 50°C tijekom 10 min. Zatim smo izlili boju i gelove isprali vrelom vodom nekoliko puta da bi uklonili nevezanu boju. Zatim smo dodali odbojivač (MeOH ($w = 30\%$), HAc ($w = 10\%$), H_2O ($w = 60\%$)) te smo gelove odbojavali oko 1 sat i 30 min u vodenoj kupelji na 50°C , izmjenjujući odbojivač svakih pola sata te ih na kraju ostavili preko noći u digestoru.

Tablica 2. Gel za razdvajanje ($w=10\%$)

10 % gel	V/mL
mQ H_2O	2
Tris-HCl ($c=1,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}=8,8$)	1,25
akrilamid/bisakrilamid, 30%	1,65
SDS, 100%	0,05
APS, 10%	0,05
TEMED	0,004

Tablica 3. Gel za sabijanje ($w=5\%$)

5 % gel	V/mL
mQ H_2O	2,01
Tris-HCl ($c=0,5 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH}=8,8$)	0,375
akrilamid/bisakrilamid, 30%	0,503
SDS, 100%	0,03
APS, 10%	0,03
TEMED	0,001



Slika 16. Izgled pripremljene aparature i postupak za razdvajanje i vizualizaciju proteina SDS diskontinuiranom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu.

3.4.3. Odsoljavanje na PD-10 koloni

Postupkom odsoljavanja proteina na PD-10 koloni uklanja se visoka koncentracija imidazola iz uzorka proteina. Unutar ove kolone nalazi se G-25 Sephadex punilo koje je građeno od kuglica gela s porama te nam služi za razdvajanje tvari različitih molekularnih masa. Taj se postupak naziva gel-filtracija te se u stacionarnoj fazi zadržavaju manje molekule (soli) koje ulaze u pore punila, a velike molekule poput proteina brzo prolaze kroz kolonu. Odsoljavanje se može izvršiti pomoću gravitacijske sile vertikalno ili centrifugalnim postupkom filtracije.

Nakon postavljanja kolone smo isprali sa 25 mL mQ H₂O te smo ih ekvilibrirali dodatkom 25 mL pufera za odsoljavanje (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH=7,5). Za odsoljavanje kolone koristili smo gravitacijsku silu. Nakon što smo propustili pufer za odsoljavanje na kolonu smo nanjeli 2,5 mL proteinskih frakcija te smo sakupili u epruvetu frakciju "prije" (FT, engl. *Flow-through*). Nakon toga smo na kolonu nanijeli 3,5 mL pufera za odsoljavanje i sakupili frakciju odsoljenog proteina. Kolonu smo nakon toga isprali sa 3,5 mL pufera te sakupili frakciju poslije. Nakon odsoljavanja proteina kolone smo isprali sa 25 mL mQ H₂O i 10 mL 20 % etanola. Koncentraciju proteina smo izmjerili na uređaju *BioDrop*.

3.4.4. Nativna gel-elektroforeza

Nativna gel-elektroforeza služi za razdvajanje proteina ovisno o njihovom naboju, veličini i obliku njihove nativne strukture. Elektroforetska pokretljivost nastaje jer većina proteina nosi negativni naboj u alkalnim puferima tako da što je veći negativni naboj po jedinici mase to će protein brže migrirati kroz sito gela. Istovremeno sila trenja gela djeluje na proteine ovisno o

njihovoj veličini i trodimenzionalnom obliku. Ovom nativnom elektroforezom možemo iz gela lako uočiti je li došlo do dimerizacije ili trimerizacije. Koristili smo uređaj Pharmacia PhastSystem Separation and Control Unit (*Gene Healthcare*).

Na nativni (native PAGE 8-25%; Pharmacia) gel smo mikropipetom nanijeli prvo marker nativni marker (Native Mark™ Unstained Protein Standard *Thermo Fischer Scientific*) te uzorke proteina uz dodatak Brom fenol plave boje. Aplikator smo postavili u odgovarajući otvor iznad pločice s gelom i na aparatu smo pokrenuli program pri naponu od 400 V, snazi 2 W i temperaturi od 15°C. U prvom koraku pratili smo migraciju proteina kroz gel pri jakosti struje 10 mA dok pri drugom koraku započinje migracija uzoraka u gelu pri jakosti struje od 1 mA uz potrebno vrijeme 2 Vh. Za treći korak smo struju podesili na 10 mA i 170 Vh a na gelu se uočava odvajanje proteina s obzirom na veličinu i naboj. Nakon završene elektroforeze gel smo prenijeli u plastičnu posudu za bojanje i dodali CBB boju i postavili u kupelj pri 50°C u trajanju od 8 min. Nakon toga CBB boju smo odlili i dodali odbojivač (otopina metanola, octene kiseline i vode u omjeru 3:1:6) i postavili na kupelj pri 50°C u trajanju od 1 sat.

3.4.5. Određivanje specifične aktivnosti enzima

Test specifične aktivnosti enzima koristi se za utvrđivanje supstratne razgradnje s obzirom na uvedenu mutaciju unutar proteina hDPPIII koji pokazuje visoku specifičnost prema supstratu Arg₂-NA (*Bachem*). Aktivnost mutanata određuje se u reakciji cijepanja supstrata Arg₂-NA pri čemu nastaje 2-Naftilamin (2NA). Naftilamin reakcijom diazokopulacije sa soli FBB (engl. *Fast blue BB salt*) stvara aromatski azo spoj koji daje ružičastu boju koju možemo detektirati spektrofotometrijski.

Mjerenja smo izvodili u triplikatima za sva tri proteina (WT, V514M, R510W). Za test aktivnosti koristili smo pufer Tris-HCl (0,1 mM Tris-HCl; pH=8,6). U staklene epruvete dodali smo 500 µL pufera, 10 µL 5 mM CoCl₂ te određeni volumen enzima ovisan o koncentraciji i razrijeđenju te mQ H₂O do volumena od 1 mL. Nakon inkubacije reakcije u trajanju od dvije minute dodali smo 50 µL supstrata Arg₂-NA. Smjesu smo vratili na inkubaciju na 37°C u trajanju od 15 min. Unutar tih 15 min pripremili smo svježju otopinu FBB soli (1,5 mg/mL) u puferu za FBB. Nakon 15 min dodavali smo u svaku epruvetu 200 µL otopine FBB soli točnim redosljedom kako smo i započinjali reakcije. Reakcijsku smjesu smo ostavili na sobnoj temperaturi tijekom 15 min kako bi se razvila ružičasta boja ovisno o

stupnju aktivnosti enzima. Apsorbanciju smo mjerili pri valnoj duljini od 530 nm na BioDrop uređaju koji smo anulirali slijepom probom (reakcijska smjesa bez enzima). Aktivnost enzima izračunata je djeljenjem iznosa apsorbancije s umnoškom masene koncentracije enzima, vremena reakcije i volumena enzima određenog razrjeđenja i pomnoženo s 1000. Specifičnu aktivnost izračunali smo množenjem dobivene vrijednosti sa 47,9 (određeno iz β -NA standardne krivulje).

3.4.6. *Određivanje optimalnog pH i utjecaja kobaltonih iona na aktivnost enzima*

Aktivnost enzima mijenja se pri različitim pH vrijednostima, divlji tip hDPP III najveću aktivnost pokazuje pri pH 8,6 dok smo za mutirane inačice pri različitim pH vrijednostima provjeravali maksimalnu aktivnost. Za svaki protein mijenjali smo pH vrijednost medija te smo pokuse izvodili u triplikatima pri pH 7,4; 8; 8,6; 9. Apsorbanciju smo mjerili pri 530 nm. Rezultate specifične aktivnosti pri pojedinoj pH vrijednosti dijelili smo sa najvećom dobivenom vrijednošću i tako izračunali relativnu aktivnost za pojedinu pH vrijednost. Najveću dobivenu specifičnu aktivnost uzeli smo kao vrijednost od 100 %.

Osim u različitim pH vrijednostima aktivnost enzima i njegovih mutiranih inačica smo podvrgnuli testovima aktivnosti sa i bez kobaltonih iona pri pH 8,6.

3.4.7. *Određivanje enzimske kinetike na fluorimetru*

Djelovanjem hDPP III na supstrat Arg₂-NA nastaje produkt 2-naftilamin koji fluorescira. Intenzitet fluorescencije možemo pratiti s promjenom koncentracije produkta u vremenu (Beer- Lambertov zakon). Enzimsku kinetiku divljeg tipa (engl. *Wild type, WT*) i mutiranih inačica određivali smo pomoću fluorescentnog spektrofotometra Cary Eclipse (*Varian*) praćenjem promjena intenziteta fluorescencije s povećanjem koncentracije produkta 2-naftilamina u zadanom vremenu.

Koristili smo ekscitacijsku valnu duljinu 332 nm uz širinu otvora pukotine 10 nm dok je valna duljina emisije bila pri 420 nm uz širinu pukotine od 5 nm. Mjerenja smo izvodili pri 25°C, u trajanju od 1 minute za svaku reakciju. Prije mjerenja kinetike napravili smo baždarnu krivulju pomoću mjerenja intenziteta fluorescencije različitih koncentracija 2-naftilamina. Koristili smo koncentracije 0,01; 0,05; 0,01; 0,2; 0,5 i 1 mM dm⁻³ koje smo dobili razrjeđenjem supstrata 2NA s tris HCl puferom za test aktivnosti (c=0,1 mmol dm⁻³, pH=8,6).

Reakcijske smjese su bile pripremljene prema volumenima koji su navedeni u tablici 4, te je prije dodatka enzima reakcijska smjesa bila temperirana u uređaju tijekom 1 minute.

Tablica 4. Tablični prikaz smjesa za mjerenje kinetičkih parametara pri različitim koncentracijama supstrata [S]

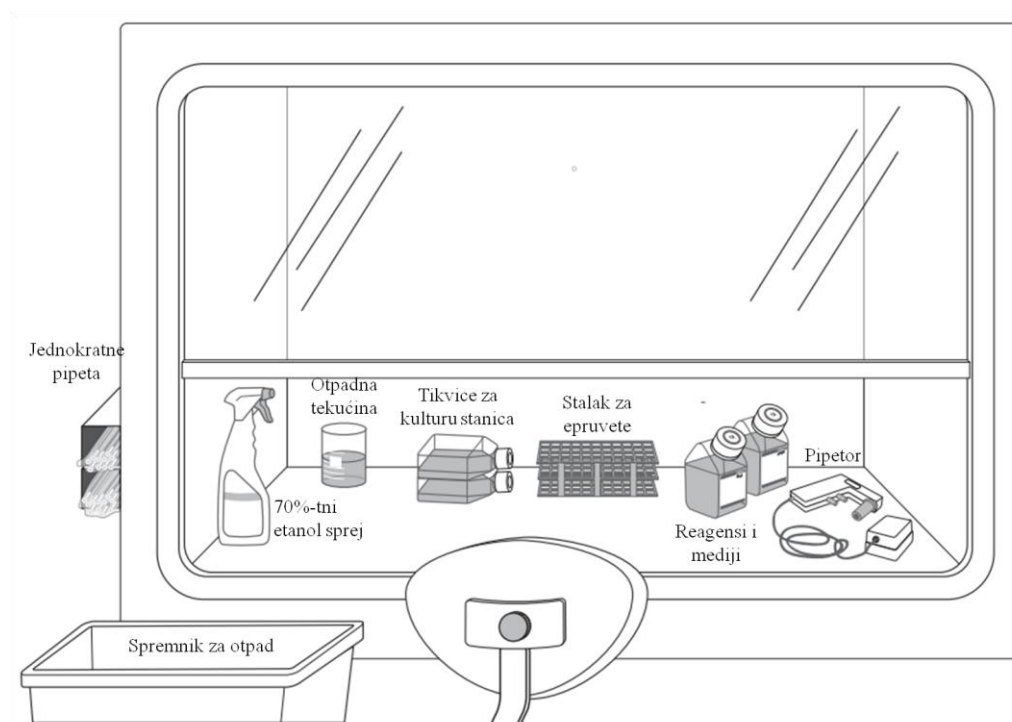
[S] u reakciji (μM)	c(S) – štok (mM)	V(S)/ μL	mQ/ μL	0,1 M Tris HCl, pH= 8,6/ μL	5 mM CoCl ₂ / μL
0,5	0,8	1,88	1463	1500	30
1,25	0,8	4,69	1460	1500	30
2,5	0,8	9,38	1456	1500	30
5	0,8	18,75	1446	1500	30
10	0,8	37,50	1427,5	1500	30
20	0,8	56,25	1390	1500	30
40	0,8	75,00	1315	1500	30
60	0,8	93,75	1240	1500	30
80	0,8	112,50	1165	1500	30

Pri mjerenju kinetike ukupan volumen reakcijske smjese u kiveti iznosio je 3 mL, od čega su se mijenjali volumeni mQ vode i supstrata (Arg₂-NA) dok su ostali reaktanti imali stalne volumene kako je navedeno u tablici 3. Dobiveni rezultati obrađeni su u Microsoft Excel programu. Za određivanje kinetičkih parametara koristili smo Michaelis-Menten, Hanes-Woolf-ov i Eisenthal-Cornish Bowden-ov diagram.

3.5. Rad sa humanim embrionalnim stanicama bubrega

Humane embrionalne stanice bubrega HEK293T koriste se u laboratorijima u različite svrhe od kojih su za istaknuti: dobivanje rekombinantnih proteina, monoklonskih protutijela i cjepiva te kao modeli za ispitivanje djelovanja lijekova, toksikološkim ispitivanjima te kao modeli u staničnoj i molekularnoj biologiji. Sa stanicama se radi u laminaru za sterilni rad (slika 17). Stanice HEK293T uzgajali smo u plastičnim T-bocama ravnih stijenki T25 (5 ml) i T75 (10 ml) u inkubatoru za uzgoj humanih stanica HERACELL VIOS 160i (Thermo Fisher Scientific) na 37°C. Stanice su održavane u eksponencijalnoj fazi rasta, a medij koji smo

koristili za uzgoj stanica je DMEM medij uz dodatak 10% FBS-a i 1% neesencijalnih aminokiselina (NEAA). U našem istraživanju koristili smo humane HEK293T stanice koje smo transfecirali s praznim pFLAGCMV2 vektorom (EV, engl. *empty vector*) te plazmidima za ekspresiju divljeg tipa hDPP III, odnosno mutiranih inačica R510W i V514M u svrhu utvrđivanja potencijalnog utjecaja prekomjerne ekspresije proteina na ekspresiju mRNA ispitivanih Nrf2-kontroliranih gena. Nakon 24 sata od transfekcije, stanice su analizirane pod invertnim mikroskopom Olympus IX50.

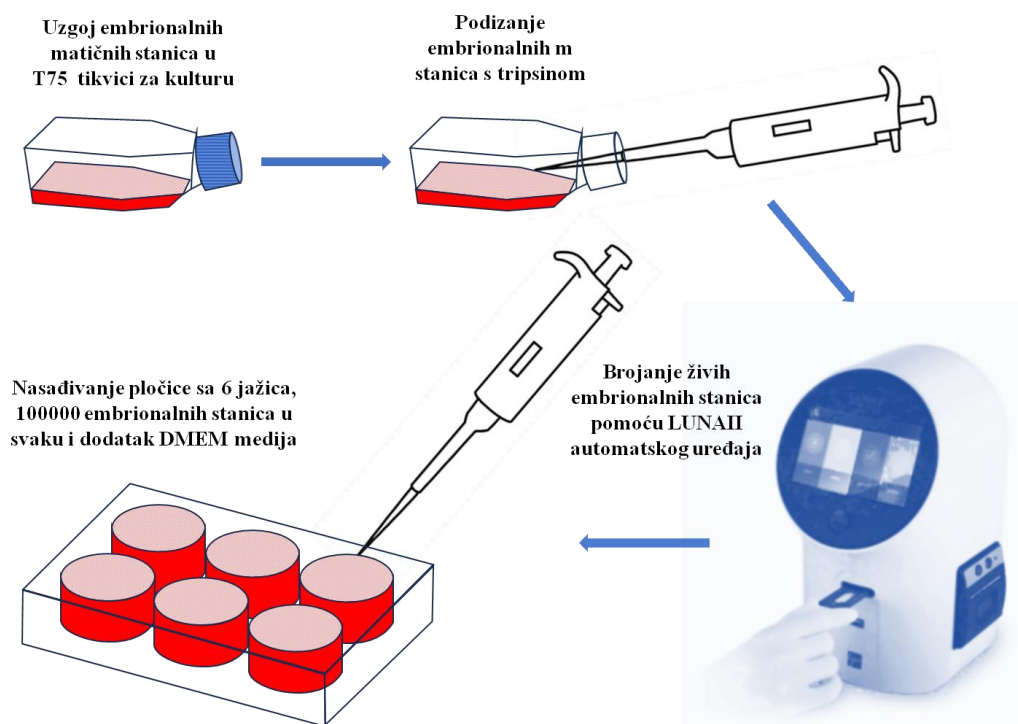


Slika 17. Izgled radnog mjesta pri radu sa embrionalnim stanicama, preuzeto i prilagođeno iz reference.⁴⁸

3.5.1. Uzgoj i presađivanje HEK239T stanica u nove T75 i T25 flaskice

Humane embrionalne stanice smo odledili sa -80°C i nacijepili u sterilnu T25 flaskicu te dodali medij DMEM s 10 % fetalnog goveđeg seruma i 1% NEAA uz dodatak antibiotika/antimikotika (gentamicin). Uzgajali smo ih kao adherentnu staničnu kulturu u inkubatoru pri sterilnim uvjetima u kontroliranoj atmosferi s 5% ugljikovog dioksida. Stanice su uzgajane do stvaranja jednoslojne stanične kulture gustoće 70-90%. Nakon porasta kulture stanica, kada je postignuta konfluentnost oko 80% stanice smo u laminaru podigli tripsinom u

svrhu brojanja stanica na uređaju Luna II Automated Cell Counter (*Logos Biosystems*) (slika 18). Dio uzorka HEK293T stanica koristili smo za utvrđivanje prisutnosti mikoplazmi. U novu flaskicu smo nasadili ostatak stanične kulture te im dodali DMEM medij i stavili u inkubator za daljnji uzgoj.



Slika 18. Podizanje stanične kulture s tripsinom i brojanje živih stanica pomoću LUNA II automatskog brojača

3.5.2. PCR test na prisutnost mikoplazmi

Za utvrđivanje prisutnosti mikoplazmi u uzgojenim stanicama, korištena je lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *Polymerase chain reaction*) koja detektira rRNA gene mikoplazmi i pokriva 13 najčešćih vrsta mikoplazmi koje potencijalno onečišćuju stanične kulture.⁴⁹ Metoda PCR temelji se na umnažanju određenog segmenta DNA u uvjetima *in vitro*. Za svako umnažanje odsječka DNA potrebno je prethodno optimizirati reakciju, odabrati početnice i odrediti broj ciklusa reakcije. Brzi i pouzdani probir stanične kulture na prisutnost mikoplazmi se radi kako bi se isključilo prisustvo mikoplazmi (ubikvitarni prokariotski mikroorganizmi koji nemaju staničnu stijenku) u kulturi koje mogu utjecati na rezultate daljnjih istraživanja. Najprije je izolirana genomska DNA iz stanica HEK293T te je oko

150000 stanica bilo dovoljno za izolaciju. Nakon dizanja stanica s tripsinom te naknadnog neutraliziranja s DMEM medijem, žive stanice su izbrojane na LUNA II uređaju. Ostatak inaktiviranih stanica se centrifugira na 100 g tijekom 5 min. Nakon što smo uklonili supernatant, talog smo resuspendirali s 500-1000 µL digestijskog pufera koji sadrži SDS i dodali 25 µL proteinaze K (visoko aktivna serinska proteaza, *Sigma-Aldrich*). Smjesu smo kratko vorteksirali na uređaju Electric vortex EV-100 (*Tehnica*) te inkubirali na 56°C u termomikseru uz povremeno miješanje Ependorf epruvete. Na smjesu smo nakon inkubacije dodali 1/3 od ukupnog volumena smjese 5M NaCl. Novonastalu smjesu smo promješali i centrifugirali na 16.000 g 5min. Supernatant smo prebacili u drugu epruvetu i ponovno centrifugirali na 16.000 g. Postupak smo ponavljali sve dok talog nije postao mali što je značilo da se smjesa očistila od proteina na koje su se vezale soli i da u supernatantu imamo samo čistu DNA. Na čisti supernatant dodali smo jednaki volumen hladnog izopropanola koji se čuva na -20°C. Okretanjem Ependorf epruvete vidi se taloženje DNA. Smjesu smo ponovno centrifugirali na 16.000 g te pažljivo uklonili supernatant, a talog s DNA smo isprali s 500 µL hladnog etanola da bismo uklonili eventualno zaostale soli. Ponovno smo centrifugirali Ependorf epruvetu s uzorkom na 16.000 g tijekom 2 minute, odpipetirali supernatant te talog kratko osušili na termomikseru. Talog smo otopili u TE puferu (50-100 µL) ovisno o veličini taloga te ostavili na 37°C na termobloku dok se talog nije otopio. Drugi dan smo izmjerili koncentraciju DNA te smo u svrhu detekcije mikoplazmi koristili PCR opisan u tablici 5 s visokospecifičnim primerima forward F1(ACACCATGGGAG(C/T)TGGTAAT) i reverse R1(CTTC(A/T)TCGACTT(C/T)CAGACCCAAGGCAT).

Tablica 5. Sastojci potrebni za provedbu PCR reakcije na mikoplazme

Sastav Master mix-a	
2 x Dream Taq PCR Master Mix	0,5 µL
Forward primer (10 uM)	0,5 µL
Reverse primer (10 uM)	0,5 µL
DNA (50 ng/ul)	1,0 µL
Mq voda	3,0 µL
Ukupni volumen:	10,0 µL

PCR program (Eppendorf):

95°C 3 min

95°C 30 sec

55°C 30 sec

72°C 30 sec 40x

72°C 10 min

3.5.3. Nasađivanje pločica sa 6 jažica i transfekcija s pFLAG-CMV2 vektorom

Iz početne kulture stanica nacijepili smo 100.000 stanica po jažici (engl. *well*) u pločice sa 6 jažica (engl. *6-well*). Dodali smo 2,5 ml medija DMEM i inkubirali u inkubatoru na 37 °C sa atmosferom u kojoj je 5% ugljikovog dioksida. Embrionalne stanice HEK293T transfecirali smo odgovarajućim plazmidnim vektorima (pFLAGCMV2 i pripadnih konstrukata pFLAGCMV2-DPP III-V514M i pFLAGCMV2-DPP III-R510W). Transfekcija je postupak unosa strane DNA u stanicu, koja omogućava proučavanje funkcije gena i ekspresije proteina u staničnom okruženju. Ekspresiju FLAG-obilježenih proteina (pFLAGCMV2, pFLAGCMV2-DPP III-R510W te pFLAGCMV2-DPP III-V514M) provjerili smo Western blot metodom. U tablici 6 je prikazan sastav transfekcijske smjese te omjeri DNA i lipofektamina. Odvojeno su priređene otopine Lipofektamina 2000 (*Thermo Fisher Scientific*) u mediju Opti-MEM te otopina plazmidne DNA također u mediju Opti-MEM. Obje otopine smo spojili i inkubirali 5 – 10 minuta prije nanošenja na stanice.

Tablica 6. Sastav transfekcijske smjese i omjeri DNA i lipofektamina za plazmidne vektore pFLAGCMV2, pFLAGCMV2-DPP3 (WT) i pFLAGCMV2-R623W, R510W, V514M.

Plazmid (konc ng/μl)	Omjer DNA:lipo	DNA	Optimem	Lipo	Optimem
pFLAG-CMV226/5/20 (548)	1:2,5	1,8	248	2,5	247,5
pFLAG-CMV2-DPP3 (WT) (665)	1:2,5	1,6	249	2,5	247,5
pFLAG-CMV2-R510W (387)	1:2,5	2,6	248	2,5	247,5
pFLAG-CMV2-V514M (355)	1:2,5	2,8	247	2,5	247,5

3.5.4. Izolacija RNA iz staničnih linija primjenom RNazol[®] RT-a

Protokol se sastoji od 5 koraka:

1. **Homogenizacija:** Za izolaciju RNA, iz transfeciranih stanica uklonili smo medij i stanice smo dva puta isprali sa 1 mL PBS-a po jažici te smo dodali 450 μ L Trizola (*Sigma-Aldrich*) u svaku jažicu te smo pipetom lizirali stanice. Stanice smo inkubirali na sobnoj temperaturi tijekom nekoliko minuta. Lizate stanica prebacili smo u sterilne tubice volumena 1,5 mL. Na lizat smo dodali 200 μ L kloroforma (*Sigma-Aldrich*) te smo tubice vorteksirali 15 sekundi na uređaju Electric vortex EV-100 (*Tehtnica*) te ponovo inkubirali 5 min na sobnoj temperaturi. Zatim smo suspenzije centrifugirali u centrifugi 5415R (*Eppendorf*) tijekom 15 min na 12.000 g pri +4°C. Centrifugiranjem stanica dobili smo tri faze; gornji bistri (vodeni sloj sadržavao je RNA), međusloj (DNA) te organski sloj (proteini). Gornju fazu smo sa mikropipetom izdvojili u novu epruvetu i zabilježili volumen odvojene faze.
2. **DNA/protein- precipitacija:** Ostatak iz epruveta smo ostavili za izolaciju proteina i DNA na temperaturi od +4°C.
3. **RNA precipitacija:** Gornji vodeni sloj koji sadrži RNA prebacili smo u nove epruve te smo na njega dodali jednaki volumen 100% izopropanola. Dobivenu smjesu smo promješali okretanjem 3 do 4 puta te smo ju inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga centrifugirali u centrifugi 5415R (*Eppendorf*) 10 minuta na 12.000 g na +4°C.
4. **RNA ispiranje:** Potom smo na talog dodali 450 μ L 75% etanola, nježno vorteksirali i ponovno centrifugirali tijekom 5 min na 7500 g pri +4°C te ponovili postupk ispiranja još jednom.
5. **RNA solubilizacija:** Pipetom smo pažljivo uklonili supernatant, a pelet (talog) smo osušili u sterilnom laminaru Aura-mini (*BioAir*). Talog se ne smije presušiti jer se time znatno smanjuje topljivost taloga. Osušeni talog smo otopili u 20 μ L mQ vode tretirane dietil pirokarbonatom (DEPC, engl. *diethyl pyrocarbonate*) vodi koja u sebi ne sadrži RNA-ze. Koncentraciju i čistoću dobivenih RNA smo izmjerili na *BioDrop* DUO mikrovolumnom spektrofotometru (*Biochrom*). Tijekom mjerenja koncentracije RNA pomoću spektrofotometra dobili smo i podatke o čistoći uzoraka mjerenjem omjera apsorbancije A_{260}/A_{280} kao i podatke o čistoći nukleinskih kiselina mjerenjem omjera apsorbancije A_{260}/A_{230} . Uzorke smo nanijeli na 1% agarozni gel u puferu 1XTE. Za

provjeru RNA elektroforezom, koristili smo napon od 55V da ne bi došlo do razgradnje RNA tijekom postupka elektroforeze.

3.5.5. Uklanjanje genomske DNA prije reverzibilne transkripcije

Prije prevođenja RNA u komplementarnu DNA (cDNA) potrebno je ukloniti genomsku DNA u svim uzorcima. U tu svrhu korišten je komplet *DNase I* (*Thermo Fischer Scientific*) koji služi za razgradnju jednolančane i dvolančane DNA. U *RNase-free* epruvetu dodali smo 1 µg uzorka RNA, 1 µL 10X reakcijskog pufera s MgCl₂, 1 µL *DNase I*, (*Thermo Fischer Scientific*) i DEPC vode do 10 µL. Tako dobvenu smjesu smo inkubirali tijekom 30 minuta na 37°C u termobloku. Potom smo u uzorke dodali 1 µL 50 mM EDTA te ih inkubirali tijekom 10 min na 65°C. RNA hidrolizira tijekom zagrijavanja s dvovalentnim kationima u odsutnosti kelatiranih skupina. Pripremljenu RNA koristili smo kao kalupe za reverznu transkripciju.

3.5.6. Reverzna transkripcija RNA u cDNA

Za reverznu transkripciju koristili smo komplet *RevertAid™ Reverse Transcriptase* (*Thermo Fischer Scientific*). Komplet sadrži rekombinantni enzim M-MuLV RT (engl. *Moloney Murine rLeukemia Virus reverse transcriptase*). To je genetski modificirani enzim koji služi za sintezu komplementarne DNA (cDNA) do 13 kb te ima najveću aktivnost pri 42°C. Ukupan volumen smjese za reverzibilnu transkripciju iznosio je 20 µL (tablica 7), smjesu smo lagano promješali i centrifugirali te ju inkubirali na 42°C tijekom 60 minuta. Da bismo zaustavili reakciju, smjesu smo zagrijali na 70°C tijekom 10 minuta kako bi izbjegli cjepanje dugačkog komplementarnog DNA. Produkti reverzne transkripcije se mogu direktno koristiti za PCR reakciju ili čuvati na temperaturi od -20°C. Dobivenu cDNA smo razrijedili i koristili za kvantitativni PCR (qPCR, engl. *quantitative PCR*).

Tablica 7. Komponente korištene u reakciji reverzne transkripcije.

Komponenta	Volumen (µL)
<i>Oligo(dT)18</i> (#SO131) (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	1
DEPC tretirana voda (#R0601) (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	do 12,5
<i>5XReaction buffer</i> (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	4
<i>RiboLock RNase Inhibitor</i> (#EO0381) (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	0,5
<i>dNTP Mix</i> (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	2
<i>RevertAid Reverse Transcriptase</i> (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	1

3.5.7. Primjena qPCR metode za utvrđivanje ekspresije gena

Metodom qPCR ispitali smo ekspresiju nekoliko NRF2 kontroliranih gena u stanicama koje prekomjerno ekspimiraju WT, odnosno mutirane inačice hDPP III korištenjem metode *SYBR Green*. QPCR je metoda pomoću koje se može odrediti količina PCR produkta u stvarnom vremenu. Metoda fluorescencijskog označavanja pomoću boje *SYBR Green* temelji se na vezanju boje *SYBR* za manji udio dvolančane DNA što se detektira mjerenjem intenziteta fluorescencije. Kada se *SYBR Green* boja veže na dvolančanu DNA, intenzitet fluorescencije se povećava (Applied Biosystems 2010). Utvrdili smo ekspresiju gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* u uzorcima cDNA dobivenim reverznom transkripcijom. Ekspresiju smo proveli kako bismo ustanovili utječe li pojačana ekspresija divljeg tipa hDPP III, odnosno dviju mutiranih inačica, R510W i V514M na ekspresiju gena reguliranih transkripcijskim čimbenikom *NRF2*. Za normalizaciju ekspresije korišten je referentni gen *TUBG1* (tubulin-gama 1). Prije postavljanja qPCR-a cDNA, čija je početna koncentracija procijenjena na 50 ng/μL, smo razrijedili 5X, do radne koncentracije 10 ng/μL tako da smo 20 μL svakog uzorka cDNA razrijedili s 80 μL mQ vode. Nakon toga smo napravili *Master Mix*-eve prema tablici 8.

Analizirana je ekspresija gena u četiri ispitivana uzorka stanica: HEK293 stanice (WT), HEK293 stanice transfecirane s praznim vektorom (pFLAGCMV2), HEK293 stanice transfecirane s pFLAGCMV2-hDPP3-V514M mutantom te s pFLAGCMV2-hDPP3-R510W.

Tablica 8. Komponente *Master Mix*a za *TUBG1*, *HMOX1*, *NQO1* i *NRF2*.

<i>Master Mix</i>	10 μM <i>TUBG1</i>	10 μM <i>HMOX1</i>	20 μM <i>NQO1</i>	20 μM <i>NRF2</i>
2X <i>SYBR Green</i> PCR <i>Master Mix</i>	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
<i>Primer - F</i>	0,1 μL	0,1 μL	0,2 μL	0,2 μL
<i>Primer - R</i>	0,1 μL	0,1 μL	0,2 μL	0,2 μL
H ₂ O	3,8 μL	3,8 μL	3,6 μL	3,6 μL

Master mix smjese su pripremljene u sterilnim uvjetima u laminaru (*Aura-Mini*) te su razdijeljene u mikrotitracijske ploče od 96 jažica. U svaku jažicu smo dodali 9 μL *Master mix*-a i 1 μL uzorka cDNA kako je prikazano u tablici 7. Pripremljene ploče smo kratko centrifugirali pri sobnoj temperaturi i postavili u uređaj 7300 Real Time PCR System (*Applied Biosystems*) te odabrali program *SYBR Green*.

Uzorke i *Master Mix*-eve smo zatim razdijelili u pločicu od 96 jažica. U svaku jažicu smo dodali 9 μL odgovarajućeg *Master Mix*-a i 1 μL uzorka cDNA. Tako pripremljenu pločicu kratko smo centrifugirali te smo ju zatim postavili na uređaj za qPCR modela *ABI 7300* (*Applied Biosystems*). Parametri qPCR programa prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Parametri qPCR programa.

Temperatura/ °C	Vrijeme	Broj ciklusa
95	10 min	1
95	15 s	40
60	1 min	

Završni dio programa qPCR uređaja je tzv. krivulja taljenja. U ovom dijelu programa temperatura raste od 65 °C do 95 °C te se svakih 5 sekundi temperatura povećava za 0,5 °C. Analizom krivulje taljenja se određuje T_m produkta te se povjerava da li u reakciji nastaje samo jedan produkt.

3.5.8. Statistička analiza

Ekspresiju gena analizirali smo metodom po Pfafflu (Pfaffl 2001). Rezultate smo obradili pomoću dvostranog, neuparenog t-testa i grafički prikazali pomoću računalnog programa GraphPad Prism 10.

3.5.9. Western blot analiza proteina

Western blot metoda jedna je od najboljih za detekciju malih količina proteina jer je prag detekcije 0,1 ng proteina. Temelji se na prepoznavanju kompleksa antigen-protutijelo, pri čemu se protutijelo veže na antigen koji je vezan na nitroceluloznu membranu. U ovom istraživanju Western blot analiza korištena je za utvrđivanje ekspresije pFLAG obilježenih proteina u HEK 293T humanim stanicama te za detekciju hDPPIII (WT, R510W, V514M) proteina i provjeru anti-FLAG protutijela.

Iz kulture stanica proteine smo izolirali korištenjem pufera RIPA (engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*). Stanice HEK293T smo nacijepili u pločicu sa šest jažica i transfecirali praznim vektorom pFLAGCMV2 i pripadnim konstruktima pFLAGCMV2-DPP III-V514M i pFLAGCMV2-DPP III-R510W. Transfecirane stanice smo isprali s 1 mL rashlađenog PBS-a (engl. *phosphate-buffered saline*). Nakon toga na stanice smo dodali 400 μ L pufera RIPA. Sastav korištenog pufera RIPA bio je 50 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS (engl. *sodium dodecyl sulfate*), 12 mM Na-deoksikolat, 1 % Triton X-100. Stanice smo inkubirali oko 10 minuta na ledu i zatim smo suspenziju prebacili u epruvete od 2 mL. Nakon toga stanice smo centrifugirali 30 minuta na 16.000 g pri 4°C, supernatant smo prebacili u nove epruvete od 1,5 mL. Uzeli smo 80 μ L svakog uzorka i u njega dodali 20 μ L pufera 5XTB (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,14 M SDS, 20 % glicerol, 2 % β -merkaptotanol, 0,03 M bromfenol plavo). Uzorke smo zatim zagrijali 7 minuta na uređaju *Thermomixer comfort* (Eppendorf). Pohranili smo ih na -20°C. Nakon toga smo odredili koncentraciju proteina u uzorcima pomoću metode po Bradfordu. Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradfordu temelji se na vezanju boje *Comassie Brilliant Blue G-250* na aminokiselinske ostatke arginina, triptofana, tirozina, histidina i fenilalanina na proteinima, što dovodi do pomaka maksimuma apsorbancije boje, od 470 nm do 595 nm. Svaki pripremljeni uzorak smo prebacili u staklenu kivetu te izmjerili njegovu apsorbanciju na *BioDrop* spektrofotometru (*Biochrom*). Izolirane proteine smo razdijelili na 10 % SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). SDS – PAGE odjeljuje polipeptidne lance proteina pri denaturirajućim uvjetima uglavnom po masi. Nakon elektroforeze gel sa proteinima smo pažljivo prebacili u kadicu za Western blot analizu.

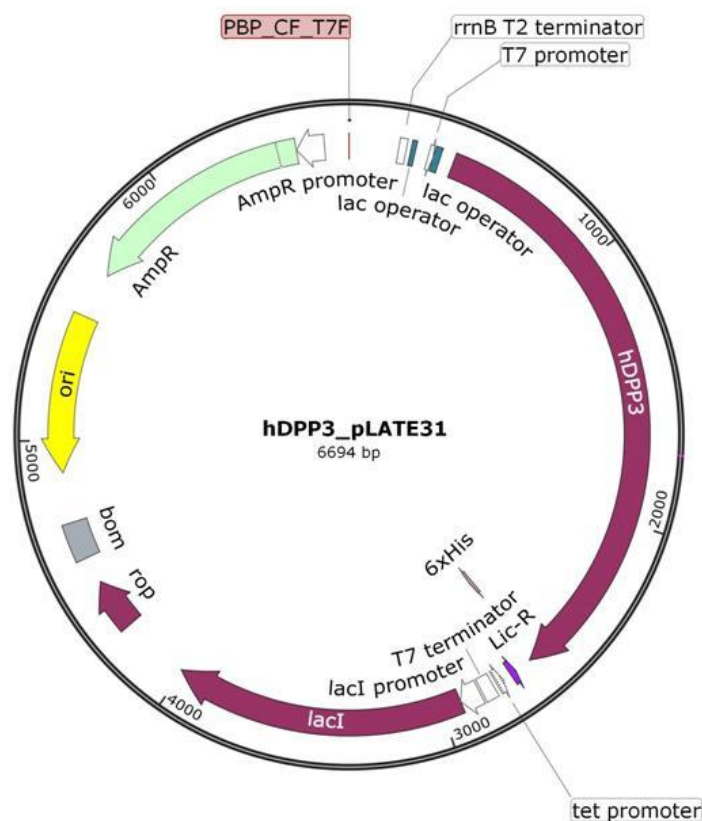
Nitroceluloznu membranu izrezali smo na 4 komada širine 9,5 x 5 cm te smo isto napravili sa filter papirom u 6 primjeraka te ih namočili u transfer puferu. Složili smo kazetu od spužve, filter papira, membrane, nitroceluloznog gela i ponovno filter papira i spužve. Kazeticu smo stavili u kadicu tako da je membrana bila okrenuta prema anodi. Prilikom slaganja kazete smo istisnuli zaostali zrak između slojeva pomoću epruvete. U kadicu smo na dno postavili magnet koji je služio za mješanje otopine pufera, a oko kazeta smo stavili dva ledena uloška za hlađenje smjese kako ne bi došlo do pregrijavanja. Mokri horizontalni transfer proteina na membranu (Wet blotting) trajao je 1 sat pri 350 mA. Nakon toga membrane smo inkubirali u boji Ponceau S tijekom 5 min te ju odbojali u mQ vodi 2 puta po 10 min. Nakon toga membrane smo inkubirali u 5% otopini nemasnog mlijeka u TBS-u (pufer za blokiranje) pri

37°C iznad kupelji. Nakon toga membrane smo inkubirali u primarnom antitijelu razrijeđenom u puferu za blokiranje preko noći pri 4°C. Slijedeći dan membrane smo isprali 3X po 10 min u TBS-T puferu te ih inkubirali sa sekundarnim antitjelom (obilježeno sa HRP-om) tijekom 1 sata pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije membrane su isprane 2X u TBS-T puferu tijekom 10 min. Nakon toga smo membrane isprali u TBS puferu 2X tijekom 10 min. Proteine na membrani na koje su vezana protutijela detektirali smo kemiluminiscencijom pomoću reagensa za detekciju ECL Western Blotting Substrate (*GE Healthcare*). Membrane smo cijedili na papiru i položili ih na prozirnu foliju pazeći na orijentaciju te nakapali 1 mL reagensa za detekciju te nakon jedne minute detektirali prisutnost kompleksa protein-antitijelo pomoću uređaja *Gel Imager Alliance Q9 Mini (Uvitec)*.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Bioinformatička analiza DPP III proteina

Aminokiselinski slijed humane dipeptidil-peptidaze III (hDPP III) dostupan je u NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) bazi podataka pod pristupnim brojem (engl. *Accession number*) NP_005691. hDPP III sadrži 737 aa te prema *Expasy tools* programu ima molarnu masu (Mw) 82 589,16 Da te izoelektričnu točku pI=5,18. Gen koji kodira hDPP3 se nalazi na 11. kromosomu, a kodirajuća regija sadrži 18 eksona čijim prekrajanjem dobivamo mRNA sekvencu čijom translacijom nastaje hDPP III protein. Kodirajuća regija gena (cDNA) za hDPP III ugrađena je u pLATE 31 vektor (slika 19).



Slika 19. Prikaz pLATE31 vektora unutar kojeg je ugrađena kodirajuća regija za humanu dipeptidil-peptidazu III (hDPP III) u programu SnapGene.

4.2. Priprema plazmida za ekspresiju mutiranih inačica hDPP III: R510W i V514M

Mutacije hDPP III proteina, R510W i V514M nađene su u cBioPortal bazi podataka za genomiku zloćudnih tumora te se u trodimenzionalnoj strukturi hDPP III nalaze blizu petlje koja sadrži ETGE motiv ili u blizini aktivnog mjesta hDPP III proteina, a izabrane su na temelju prethodno provedenih MD simulacijskih analiza. Mutacija V514M u kodirajućoj sekvenci hDPP III nađena je u uzorku adenokarcinoma pluća te u uzorku kronične limfocitne leukemije a mutacija R510W je nađena u uzorku mucinoznog karcinoma debelog crijeva. Metodama genetičkog inženjerstva provedena je ciljana *in vitro* mutageneza pLATE31 vektora s cDNA insertom koji kodira divlji tip proteina hDPP III u svrhu dobivanja mutiranih inačica proteina (R510W i V514M). U vektoru pLATE31 sa ugrađenim cDNA insertom za hDPP III su ciljanom mutagenезom unesene odgovarajuće promjene nukletotida za ekspresiju mutiranih inačica. Promjene su unesene pomoću oligonukleotidnih početnica u kojima su izmijenjene odgovarajuće nukleotidne baze da bismo dobili željenu mutaciju dok je ostatak početnice komplementaran kodirajućoj sekvenci divljeg tipa. Nakon izolacije pLATE31 plazmida za ekspresiju mutiranih inačica R510W i V514M, na Bio Drop uređaju je izmjerena masena koncentracija i čistoća plazmida kako je prikazano u tablici 10 te je sekvenciranjem plazmida potvrđeno da sadrže željene mutacije.

Tablica 10. Koncentracija i čistoća vektora pLATE31 određena na BioDrop-u

	Masena koncentracija $\gamma /$ $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$	Čistoća DNA /A260/A280
pLATE31-hDPP III-R510W	123	1,976
pLATE31-hDPP III-V514M	187	1,988

4.3. Pročišćavanje mutiranih inačica hDPPIII afinitetnom kromatografijom

Nakon ekspresije mutiranih inačica hDPP III sa pLATE31 vektora (C-term 6xHis) u BL21(DE3) CodonPlus RIL stanicama *E. coli* uslijedilo je pročišćavanje dobivenih proteina metodom afinitetne kromatografije s agaroznim matriksom na koji je vezana Ni²⁺-nitrilotriocetna kiselina.

4.3.1. Određivanje koncentracija proteina u frakcijama dobivenim afinitetnom kromatografijom proteina hDPP III-R510W i V514M

Pročišćavanjem mutiranih inačica R510W i V514M pomoću afinitetne kromatografije dobiven je niz frakcija u kojima je na uređaju BioDrop izmjerena koncentracija proteina. Tablica 11 se odnosi na mutiranu inačicu R510W te se može zaključiti da je većina proteina eluirana s kolone u frakcijama E2-E8. Najveće koncentracije proteina javljaju se od E3 do E7 što se može usporediti i s rezultatima SDS-gel-elektroforeze na kojima su te vrpce puno jačeg intenziteta (slika 20). Tablica 12 prikazuje koncentracije proteina mutirane inačice V514M kod koje se može zaključiti da se većina proteina eluirala u frakcijama od E4 do E10. Što je usporedivo s rezultatima SDS-gel-elektroforeze i intenzitetom vrpce u gelu (slika 21). Usporedbom dobivenih koncentracija proteina možemo zaključiti da se inačica R510W bolje eksprimira nego inačica V514M jer je prva izolirana iz pola litre bakterijske kulture dok je druga izolirana iz jedne litre bakterijske kulture. Mjerenjem koncentracija završnog ispiranja (*End Wash*) utvrđeno je da je sav fuzijski protein eluiran s kolone. Prije nego su odsoljeni proteini spojene su frakcije s najvećim koncentracijama.

Tablica 11. Masena koncentracija (γ) hDPP III-R510W određena na BioDrop-u.

	FT	W1	W2	W3	W4	W5	E1	E2	E3
$\gamma / \text{mg mL}^{-1}$	25,97	21,37	8,803	3,072	1,206	0,495	0,727	0,661	1,618

	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	EW1
$\gamma / \text{mg mL}^{-1}$	8,505	6,540	2,890	1,040	0,495	0,281	0,198	0,132	0,066

Tablica 12. Masena koncentracija (γ) hDPP III-V514M određena na BioDrop-u.

Frakcija	FT	W1	W2	W3	W4	W5	E1	E2	E3
$\gamma / \text{mg mL}^{-1}$	9,496	12,39	12,49	9,893	7,019	4,822	3,468	2,725	1,932

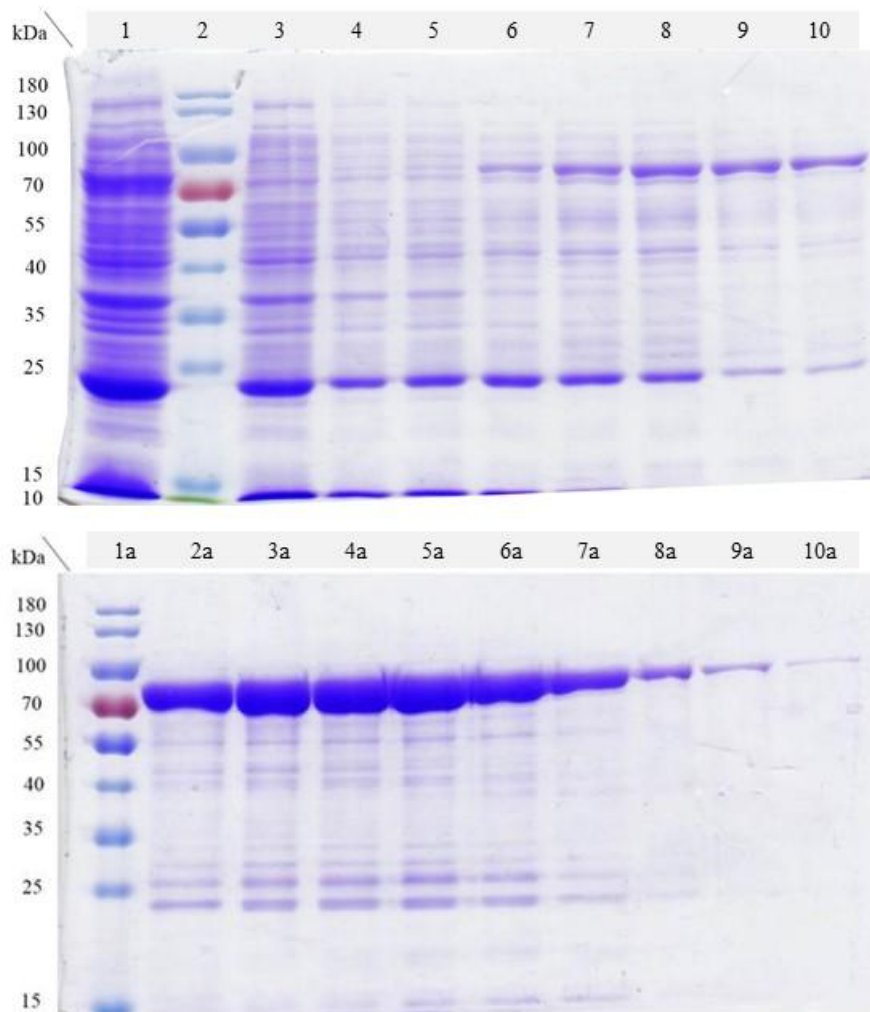
Frakcija	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
$\gamma / \text{mg mL}^{-1}$	1,552	1,453	2,329	3,402	3,865	2,312	1,173	0,578	0,248

Frakcija	E13	E14	EW1	EW2
$\gamma / \text{mg mL}^{-1}$	0,182	0,083	0,066	0,050

4.3.2. Analiza mutiranih inačica proteina hDPP III R510W i V514M na gelu

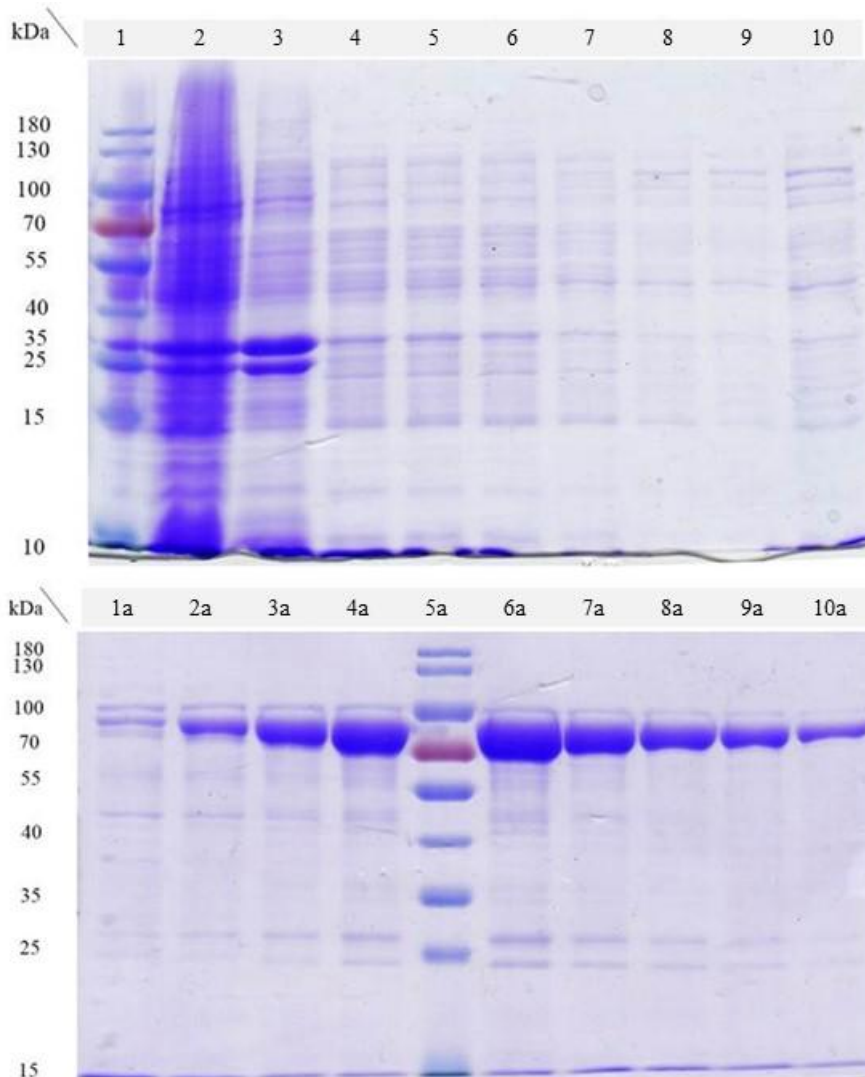
4.3.2.1. SDS-poliakrilamidna elektroforeza

Odabrane frakcije dobivene nakon pročišćavanja proteina R510W su analizirane na SDS-poliakrilamidnom gelu (slika 20).



Slika 20. Analiza frakcija dobivenih nakon pročišćavanja proteina hDPP III-R510W na 10 % SDS-poliakrilamidnom gelu. Jažica: 1 – stanični lizat, 2 – marker (*PageRuler Prestained Protein Ladder*), 3 – IPTG(-), 4 – IPTG(+), 5 – uzorak prvog ispiranja W_1 (engl. *Wash*), 6 – uzorak trećeg ispiranja W_3 , 7 – uzorak petog ispiranja W_5 , 8–10 – eluati proteina R510W E_1 – E_3 (engl. *elutions*), 1a marker (*PageRuler Prestained Protein Ladder*), 2a-10a preostali eluati proteina R510W.

Na slici 20. vidljive su proteinske vrpce DPP III-R510W (82 kDa) na poziciji 6 (W_3 , engl. *wash*) do 10 (E_1 ; eluat) te na slici niže preostali eluati od 2a do 9a.



Slika 21. Prikaz elektroforeze uzorka hDPP III-R510W. Jažica: 1 – marker (*PageRuler Prestained Protein Ladder*), 2 stanični lizat, 3 – IPTG(-), 4 – IPTG(+), 5 – 9 uzorci ispiranja W_1 (engl. *Wash*) do W_5 , 10 uzorak prvog ispiranja (engl. *Elutions*), 1a-4a uzorci ispiranja (2-5), 5a marker (*PageRuler Prestained Protein Ladder*), 6a-9a preostali uzorci ispiranja (engl. *Elutions*) eluati proteina R510W, 10a – engl. *End wash*.

Na slici 21. gela vidljive su proteinske vrpce DPP III-R510W (82 kDa) na poziciji 5-9 (W, engl. *wash*), od 10 do 4a i od 6a do 9a su uzorci ispiranja proteina (engl. *Elutions*)

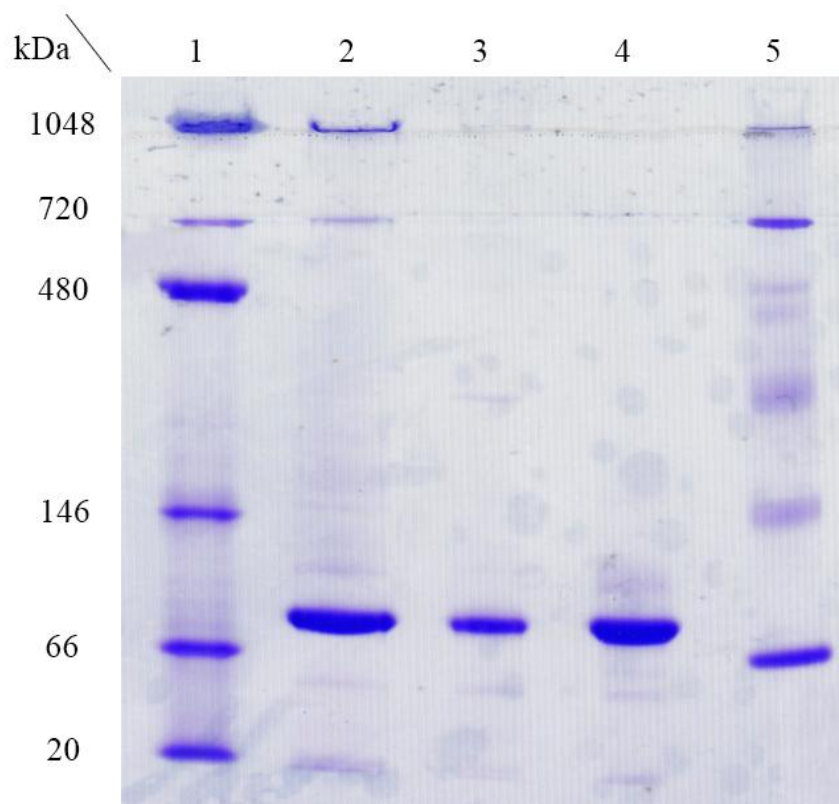
Nakon mjerenja koncentracije i analize frakcija na SDS-poliakrilamidnom gelu utvrđeno je da eluati E4-E9 proteina R510W imaju najveću koncentraciju i odgovarajuću čistoću te su navedeni eluati spojeni, ukoncentrirani na koloni *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter 30 kDa MWCO* (Millipore) te odsoljeni na koloni PD-10 (*Cytiva*).

Nakon mjerenja koncentracije i analize frakcija na SDS-poliakrilamidnom gelu utvrđeno je da eluati E3-E8 proteina V514M imaju najveću koncentraciju i odgovarajuću čistoću te su navedeni eluati spojeni, ukoncentrirani na koloni *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter 30 kDa MWCO* (Millipore) te odsoljeni na koloni PD-10 (*Cytiva*).

Pročišćavanjem R510W mutante nakon ekspresije iz 500 mL bakterijske kulture izolirali smo 7,28 g pročišćenog proteina, dok smo pri prvom pročišćavanju V514M iz 500 mL ekspresijske kulture izolirali 2,709 g proteina, što je puno slabija ekspresija od R510W. Zbog toga smo ponovili ekspresiju V514M u 1L bakterijske kulture te smo izolirali 7,1085 g proteina. Ostatak eksperimenata smo izvodili sa proteinima iz druge izolacije mutirane inačice V514M (određivanje enzimske aktivnosti, određivanje kinetičkih parametara na fluorescentnom spektrofotometru).

4.3.2.2. Nativna gel-elektroforeza

Da bismo utvrdili da li su navedeni proteini monomeri i da ih usporedimo s divljim tipom hDPP III provedena je nativna gel elektroforezom uzoraka hDPP III divljeg tipa (WT) te mutiranih inačica (hDPP III-V514M i hDPP III-R510W) (slika 21). Utvrđeno je kako su proteini prisutni kao monomeri te nema proteinskih agregata odnosno ne dolazi do dimerizacije ili multimerizacije proteina. Vidimo vrpce sva tri uzorka proteina koja su u odnosu na nativni marker prisutna u istoj liniji što nam govori kako su naboj i molekulska masa podjednaka za sve tri inačice proteina.

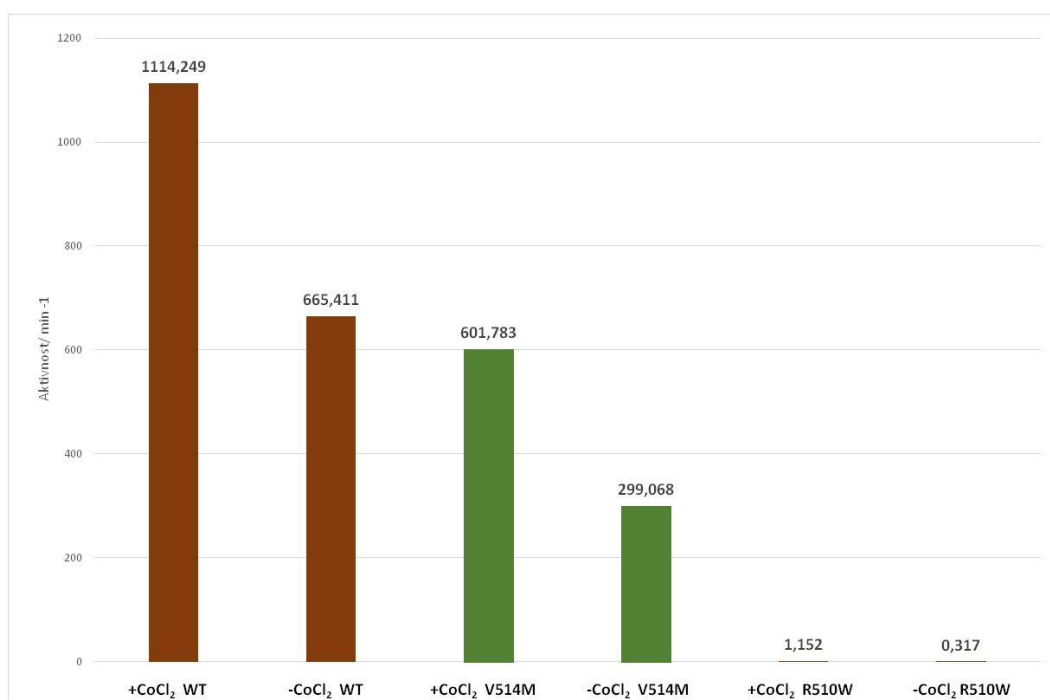


Slika 22. Prikaz native gel-elektroforeze hDPP III i njenih mutiranih inačica. Jažica: 1 – marker Native Marker, 2 – hDPP III-R510W, 3- hDPP III-V514M, 4 – hDPP III WT, 5 – HMW Native MarkTM Unstained Protein Standard.

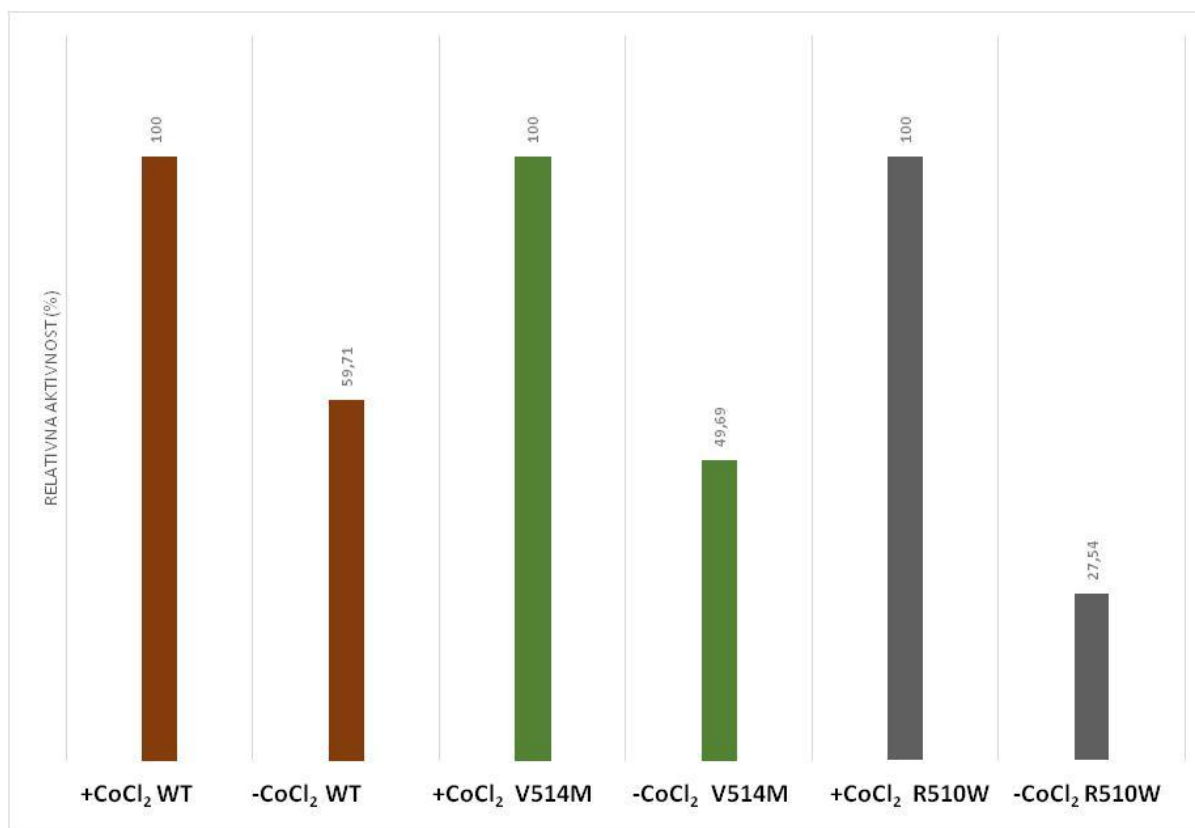
4.4. Aktivnosti divljeg tipa i mutanata

4.4.1. Određivanje specifične i relativne aktivnosti uz prisutstvo CoCl_2

Napravljen je test aktivnosti hDPP III WT i mutiranih inačica R510W i V514M bez CoCl_2 ili uz dodatak 50 mM CoCl_2 . Utvrđeno je da hDPP III WT ima najveću aktivnost sa i bez CoCl_2 . Mutirana inačica V514M pokazuje oko 50 % aktivnosti divljeg tipa, dok mutirana inačica R510W ima oko 1000 puta manju aktivnost od divljeg tipa (slika 23). Obje mutirane inačice, kao i hDPP III WT imaju manju aktivnost bez dodanih kobaltovih iona, odnosno dodatkom kobaltovih iona aktivnost enzima se povećava. Kod proteina hDPP III WT bez kobaltovih iona aktivnost je pala na 60 %, dok je kod mutiranih inačica bez kobaltovih iona aktivnost ispod 50 % (slika 24), što je u skladu s rezultatima ranijih istraživanja.⁵⁰



Slika 23. Prikaz specifičnih aktivnosti hDPP III WT, hDPP III V514M, hDPP III R510W.

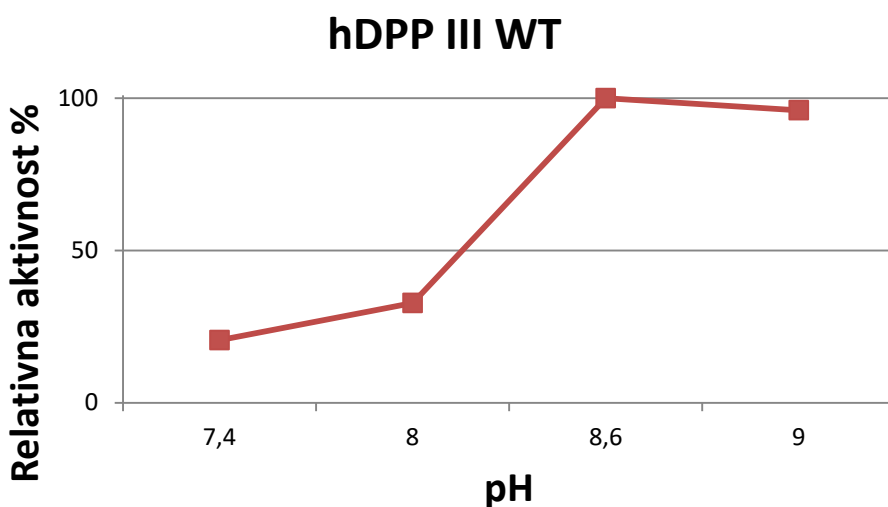


Slika 24. Prikaz relativnih aktivnosti u postotcima hDPP III WT, hDPP III V514M, hDPP III R510W.

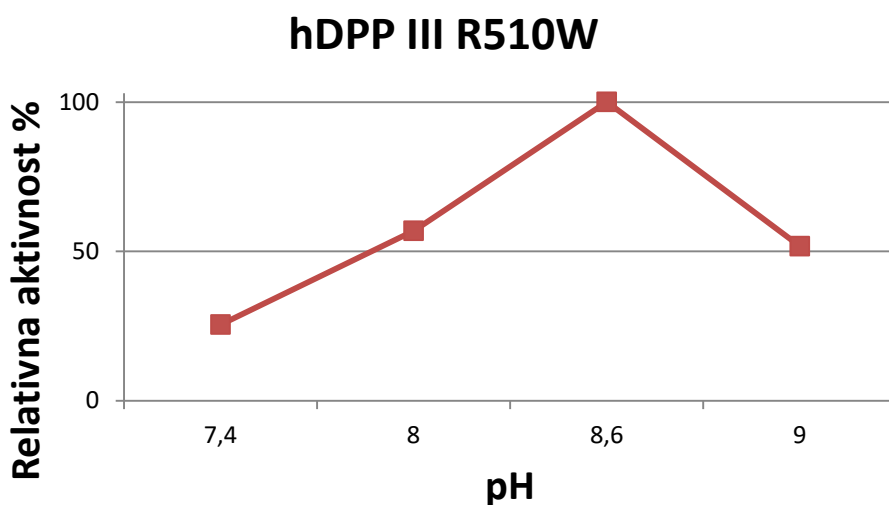
4.4.2. Optimalna pH vrijednost

Enzim hDPP III pri različitim pH vrijednostima razgrađuje supstrat različitim brzinama. Kako bismo ustanovili da li mutirane inačice R510W i V514M imaju isti pH-optimum kao i hDPP III WT, odredili smo aktivnost svih triju proteina u 50 mM Tris-HCl puferu pH vrijednosti 7,4; 8; 8,6 i 9.

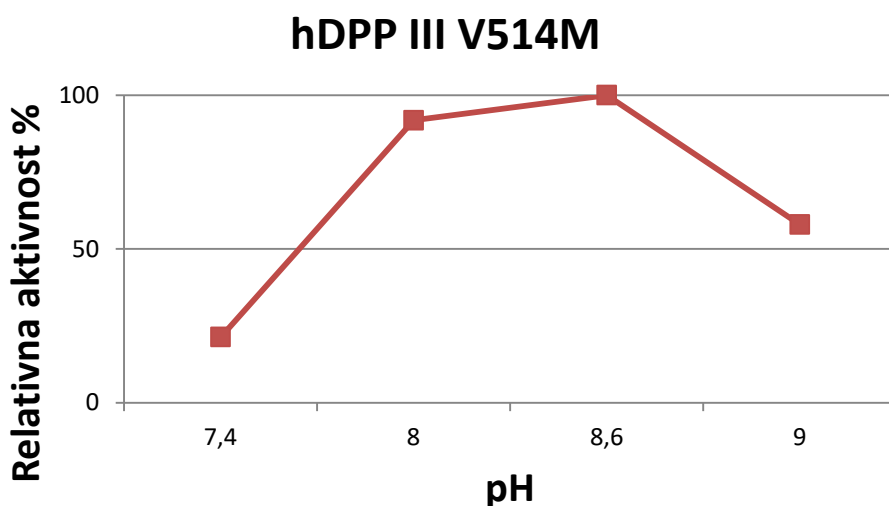
Na slikama 25-27 može se uočiti da je hDPP III WT imao najveću aktivnost između pH 8,6 i 9, R510W je imao izraziti optimum na pH 8,6, dok je V514M imao najveću aktivnost između pH 8 i 8,6, međutim najveća aktivnost kod svih inačica hDPP III (WT, R510W i V514M) bila je pri pH vrijednosti 8,6 te je enzimski kinetika također određena pri pH 8,6. Navedeni rezultati su u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja.⁵¹



Slika 25. Grafički prikaz relativne aktivnosti hDPP III WT mjerena pri različitim pH vrijednostima (izrađeno u programu *Microsoft Office Excel*).



Slika 26. Grafički prikaz relativne aktivnosti mutirane inačice hDPP III R510W mjerena pri različitim pH vrijednostima (izrađeno u programu *Microsoft Office Excel*).

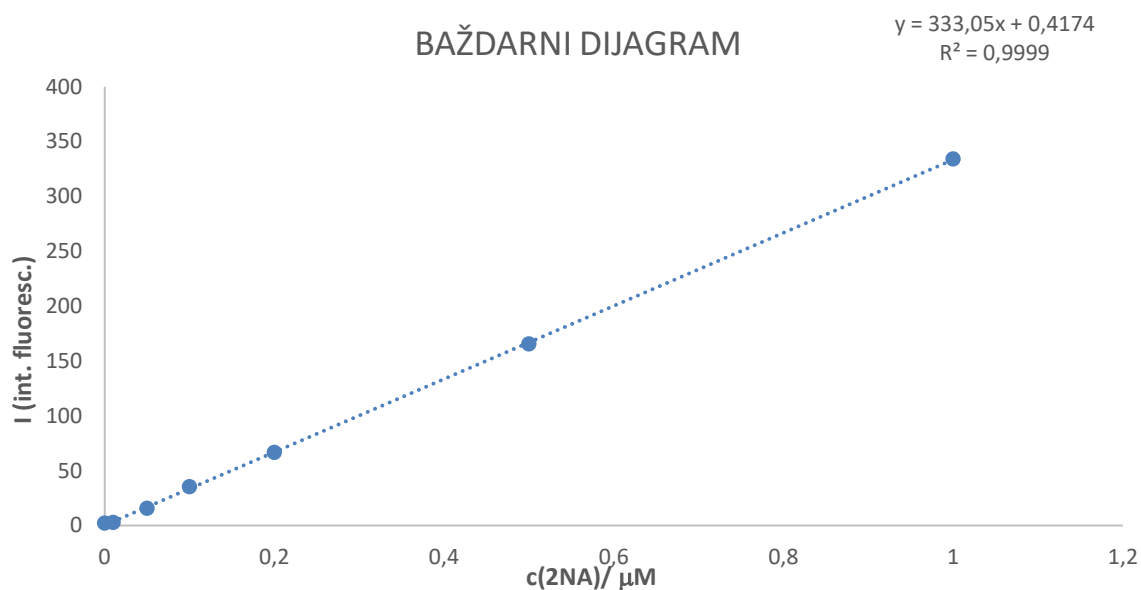


Slika 27. Grafički prikaz relativne aktivnosti mutante hDPP III V514M mjerena pri različitim pH vrijednostima (izrađeno u programu *Microsoft Office Excel*).

4.5. Fluorimetrijsko određivanje kinetičkih parametara

Testovima aktivnosti pokazano je da hDPP III ima najveću aktivnost pri pH 8,6 tako da su sva mjerenja na fluorescentnom spektrofotometru izvedena pri toj pH vrijednosti. Korišten je

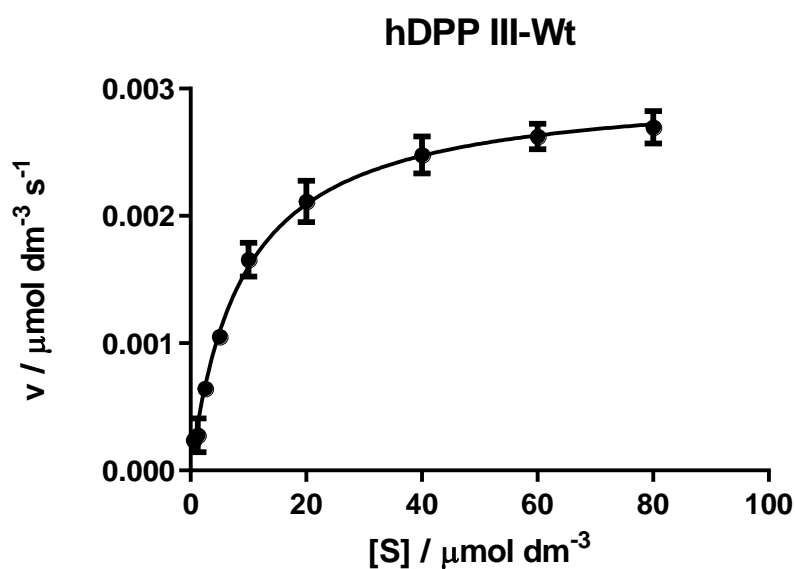
supstrat Arg2-2NA prema kojem enzim ima najbolju aktivnost. Prije određivanja kinetike napravljena je baždarna krivulja za produkt reakcije 2NA. Iz baždarne krivulje izračunat je faktor za pretvorbu intenziteta fluorescencije u koncentraciju produkta 2NA, koji iznosi 3×10^{-9} M (slika 28). Fluorescentnim spektrofotometrom praćena je fluorescencija produkta 2-naftilamina koji nastaje djelovanjem enzima na supstrat Arg₂-2NA. Mjerenja su izvođena pri temperaturi od 25°C na fluorescentnom spektrofotometru. Pomoću Beer-Lambertova zakona moguće je pratiti promjenu koncentracije nastalog produkta u ovisnosti fluorescencije kroz proteklo vrijeme. Svako mjerenje je trajalo jednu minuti nakon dodatka supstrata u smjesu.



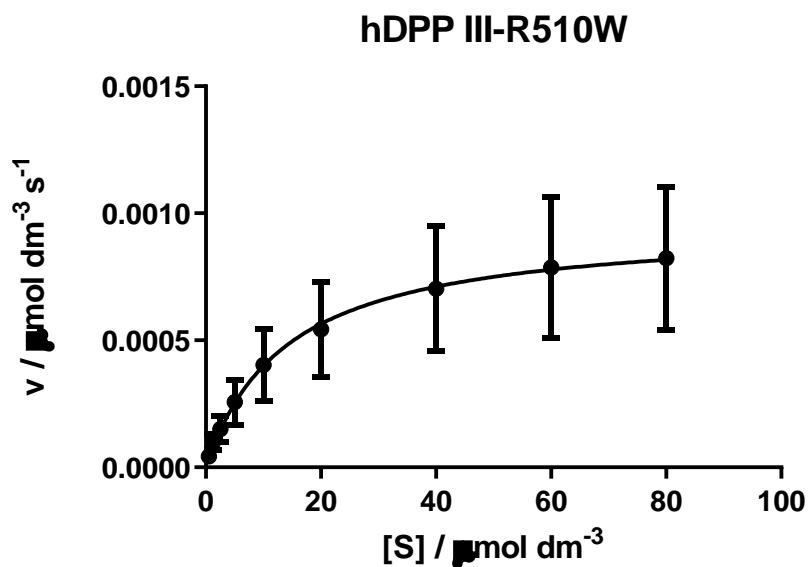
Slika 28. Grafički prikaz baždarne krivulje ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji 2-naftilamina (izrađeno u programu *Microsoft Office Excel*).

Tablica 13. Tablični prikaz kinetičkih parametara hDPP III (WT, R510W i V514M).

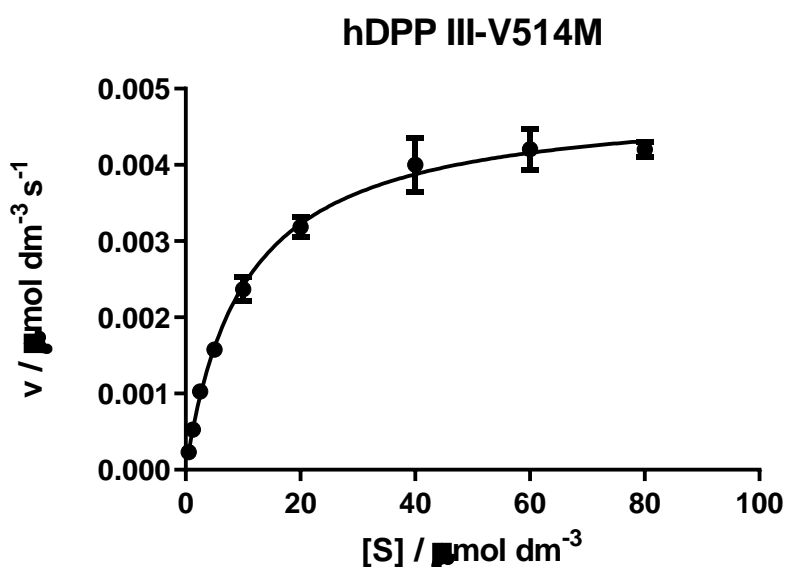
hDPP III	$K_M / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$V_{\text{max}} / 10^{-4} \mu\text{mol dm}^{-3}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/K_M/10^6 \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$
WT	$8,926 \pm 1,001$	0,003024	$25,84 \pm 0,8066$	2,6032
R510W	$13,81 \pm 2,097$	0,00026	$0,03642 \pm 0,007299$	0,0026
V514M	$10,15 \pm 1,097$	0,004861	$12,00 \pm 0,3736$	1,1822



Slika 29. Grafički prikaz Michaelis-Menten nelinearne regresije, hDPP III WT (izrađeno u programu *Graph Pad Prism 8*).



Slika 30. Grafički prikaz Michaelis-Menten nelinearne regresije mutirane inačice hDPP III R510W (izrađeno u programu *Graph Pad Prism 8*).

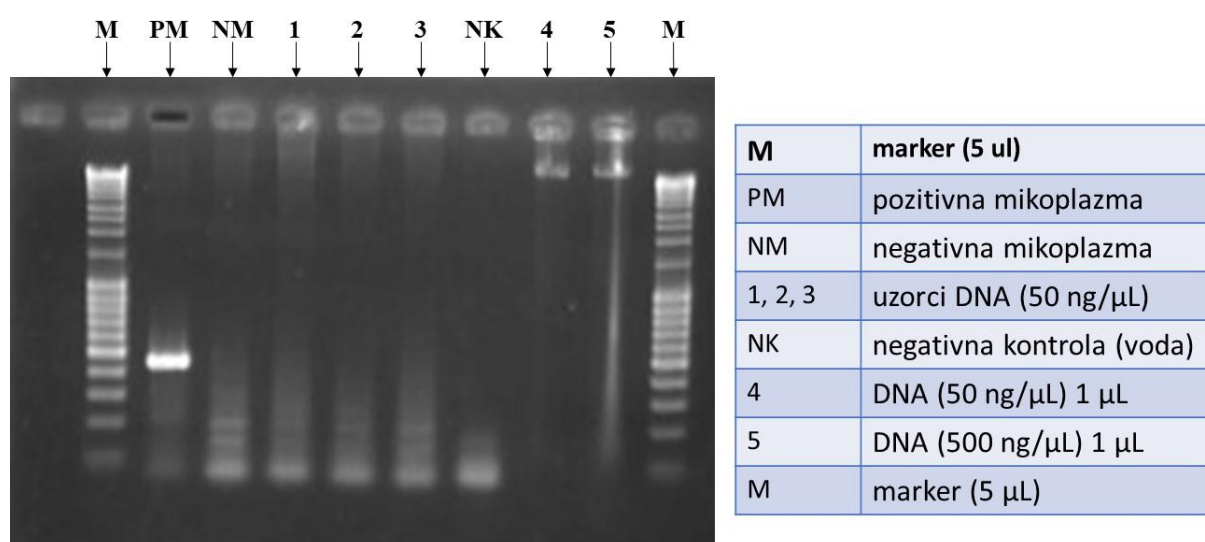


Slika 31. Grafički prikaz Michaelis-Menten nelinearne regresije mutirane inačice hDPP III-V514M (izrađeno u programu *Graph Pad Prism 8*).

Michaelis-Menten kinetika je analizirana nelinearnom regresijom (slike 29,30 i 31) te su određene vrijednosti kinetičkih parametara svih triju enzima (tablica 13). Može se zaključiti da hDPP III WT ima veću katalitičku moć razgradnje supstrata od svojih mutiranih inačica. Mutirana inačica V514M ima upola manju katalitičku konstantu (k_{cat}) od divljeg tipa proteina, a R510W inačica još slabiju katalitičku moć te je ta inačica gotovo inaktivna. Koncentracija K_M je za R510W najveća, a za divlji tip najmanja, međutim razlike su male. Rezultati su u skladu s rezultatima prijašnjih istraživanja mutirane inačice R510W³⁰ te s istraživanjima drugih mutiranih inačica nađenih u uzorcima raka po kojima su mutirane inačice proteina hDPP III imale sličnu ili manju aktivnost od hDPP III WT, dok nije bilo velike razlike u afinitetu prema Arg₂-2NA supstratu (K_M vrijednosti su slične).³²

4.6. Provjera staničnih kultura na prisutnost mikoplazmi nakon PCR umnažanja

Nakon umnažanja DNA staničnih uzoraka u PCR reakciji, elektroforezom smo u 1% agaroznom gelu uz prisutnost markera analizirali uzorke na uređaju za detekciju fluorescencije *GeneSnap* (Syngene). Koristili smo test PCR koji detektira gene mikoplazmi i pokriva 13 najčešćih mikoplazmi koje mogu utjecati na rezultate daljnjih istraživanja.



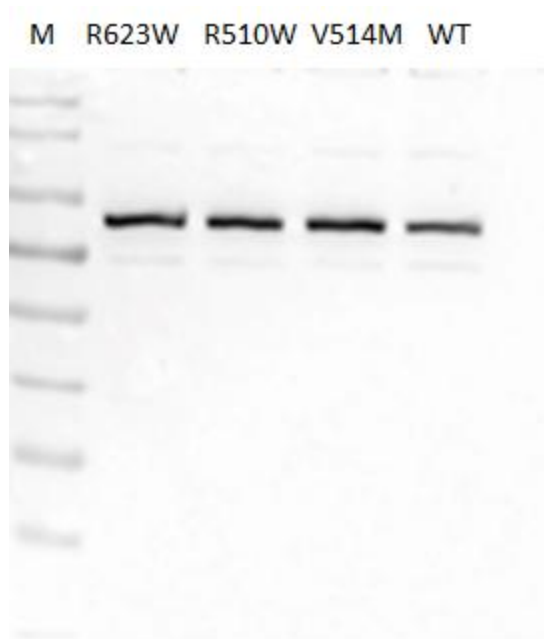
Slika 32. Raspored uzoraka na gelu: M(marker), PM (pozitivna kontrola – uzorak pozitivan na mikoplazme), NM (negativna kontrola – uzorak negativan na mikoplazme), 1,2,3(uzorci DNA), NK(negativna kontrola – MQ voda), 4(DNA (50 ng/ul)), 5(DNA (500 ng/ul)), M (marker)

Fluorescentinim bojanjem gela s etidij bromidom utvrdili smo pozitivan rezultat na mikoplazme u uzorku pozitivne kontrole (PM), dok u ostalim staničnim uzorcima nije utvrđena prisutnost mikoplazmi (slika 32).

4.6.1. Provjera ekspresije mutanata u HEK293T humanim stanicama

Ekspresiju FLAG-obilježenih mutanata provjerili smo western blot analizom nakon što smo izolirali proteine iz 6-well jažica primjenom RIPA pufera (engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*). Koncentracije proteina izmjerene su po metodi po Bradfordu.⁵² Za proteinsku

elektroforezu prethodno je izliven 10% akrilamidni gel i nanjeni su uzorci proteina obrađeni puferom 2xTB (engl. *treatment buffer*) do 10 µg u jažice gela. Proteini su preneseni s gela na nitroceluloznu membranu. Nitrocelulozna membrana je nakon prijenosa inkubirana s primarnim anti-FLAG antitijelom iz kunića (*Sigma*) te sekundarnim anti-kunićjim antitijelom iz koze (*Sigma*) na koje je vezana peroksidaza iz hrena. Nakon dodatka kemiluminiscencijskih reagensa (*GE Healthcare*) signali su vizualizirani na uređaju za detekciju kemiluminiscencije Alliance Q9 (*Uvitec*). Na slici 33 vidimo uspješno eksprimirane FLAG proteine u humanim stanicama.

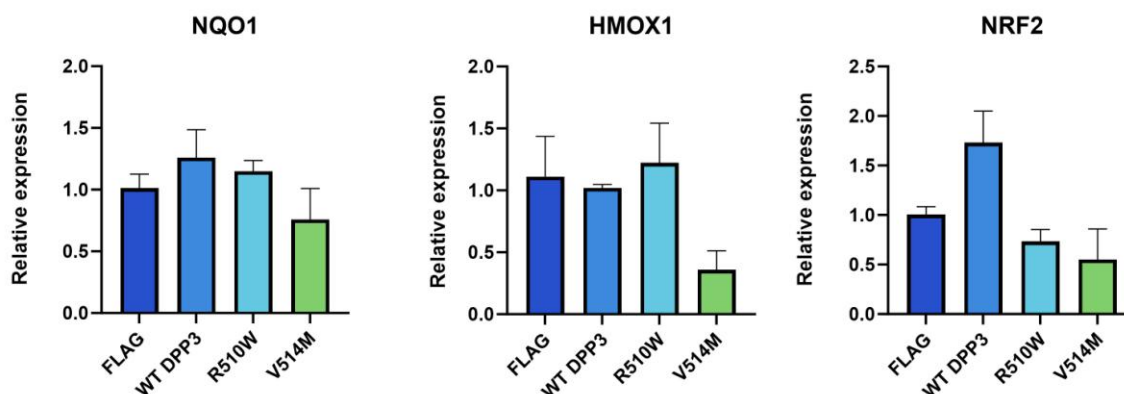


Slika 33. Prikaz nitrocelulozne membrane s FLAG-obilježenim proteinima. Raspored uzoraka: M (proteinski marker), mutirane inačice R623W (snimljeno u sklopu gela za drugi eksperiment), R510W, V514M i hDPP III WT.

4.6.2. Rezultati qPCR analize

Pomoću kvantitativnog PCR-a ispitana je genska ekspresija gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* da bi se ustanovilo utječe li pojačana ekspresija divljeg tipa hDPP III, odnosno dviju mutiranih inačica; R510W i V514M na ekspresiju gena reguliranih transkripcijskim faktorom *NRF2*. Napravljena su tri biološka replikata kvantitativnog PCR-a. Analiza ekspresije gena napravljena je pomoću metode po Pfafflu s *TUBG1* kao referentnim genom. Iz vrijednosti

relativnih ekspresija gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* u uzorcima iz svih replikata, izračunate su prosječne vrijednosti relativnih ekspresija i standardne greške. Grafički prikaz rezultata i statistička obrada pomoću Mann-Whitney testa napravljena je u programu GraphPad Prism 10.



Slika 34. Prikaz analize rezultata kvantitativnog PCR-a. Grafovi i statistička analiza su napravljeni u programu GraphPad Prism 10.

Analizom rezultata ekspresije utvrđeno je da nema statistički značajnih razlika u ekspresiji Nrf2-kontroliranih gena *NQO1*, *HMOX1* i *NRF2* u stanicama koje prekomjerno ekspimiraju divlji tip hDPP III, odnosno dvije mutirane inačice R510W i V514M u odnosu na stanice transfecirane praznim pFLAGCMV2 vektorom (slika 34). S obzirom na to, možemo zaključiti da mutirane inačice hDPP III R510W i V514M nemaju utjecaj na ekspresiju gena kontroliranih s Nrf2 u našim eksperimentalnim uvjetima. Zanimljivo je da smo, suprotno očekivanjima, utvrdili da ekspresija mutirane inačice hDPP III V514M, smanjuje ekspresiju Nrf2-kontroliranih gena, međutim to smanjenje nije statistički značajno zbog relativno velikih razlika u replikatima. Bilo bi zanimljivo ispitati potencijalni utjecaj mutacije V514M na ekspresiju Nrf2-kontroliranih gena u uvjetima oksidacijskog stresa te ustanoviti koji je mehanizam djelovanja tog proteina na smanjenje ekspresije Nrf2-kontroliranih gena, ukoliko se potvrdi da zaista dolazi do smanjenja ekspresije tih gena.

§ 5. ZAKLJUČAK

- Uspješno su uvedene točkaste mutacije za ekspresiju mutiranih inačica, R510W i V514M, u kodirajuću sekvencu hDPP III ugrađenu u vektor pLATE31, što je potvrđeno sekvenciranjem plazmidnih vektora.
- Ekspresijom mutiranih inačica hDPP III utvrđena je bolja ekspresija proteina R510W (7,28 g u 0,5 L stanične kulture), dok je kod V514M eksprimirana slična masa (7,1085 g) iz 1 L stanične kulture.
- Uspješno su pročišćene mutirane inačice proteina hDPP III očekivane molekulske mase proteina (oko 80 kDa) što je potvrđeno analizom denaturirajućom gel elektroforezom.
- Nativnom elektroforezom je ustanovljeno da mutirane inačice proteina kao i WT protein ne stvaraju agregate te se nalaze u monomernom obliku.
- Mjerenjem specifične aktivnosti mutiranih inačica s obzirom na WT ustanovljeno je da mutirana inačica R510W pokazuje najslabiju aktivnost pri razgradnji supstrata, da svi proteini imaju optimum na pH=8,6 te da ioni kobalta povećavaju aktivnost sva tri proteina.
- Analizom kinetičkih parametara cijepanja Arg₂-2NA utvrđeno je da mutirana inačica R510W ima oko 1000 puta, a V514M oko 2 puta nižu katalitičku aktivnost od divljeg tipa(WT) proteina.
- Utvrđeno je da mutirane inačice hDPP III R510W i V514M nemaju utjecaj na ekspresiju gena kontroliranih s Nrf2 u našim eksperimentalnim uvjetima.

§ 6. METODIČKI DIO DIPLOMSKOG RADA

6.1. Uvod

Učenje kemije u osnovnim i srednjim školama kod učenika može unaprijediti, između ostalog, način razmišljanja kroz nastavne strategije i metode kojima je u središtu eksperiment i učenik kao aktivni sudionik nastave. Takav pristup u poučavanju kemije učenicima će koristiti u svakodnevnom životu u različitim novim situacijama, gdje će lakše iznaći rješenja i odgovore na postavljene izazove. Cilj nastave nikako ne smije biti usmjeren na učenje mnogobrojnih činjenica jer su one danas dostupne uistinu na bilo kojem mjestu na internetu i oko nas. Danas, na pragu doba umjetne inteligencije nužno je razvijati kritičko mišljenje pri odabiru i uporabi informacija, što se istraživačkom nastavom kemije također potiče. Svaki nastavnik treba imati na umu da svojim radom ostavlja trag na mnoge generacije učenika. Taj trag treba biti prilagođen svakom djetetu bez obzira na kognitivne i druge sposobnosti i socijalne okolišne elemente. Suvremeno učenje i poučavanje kemije sastavni je dio općeg obrazovanja, a temelji se na stjecanju znanja i vještina putem percepcije (opažanja), znanstvene komunikacije (prikazivanje opaženoga i rasprava) te rasuđivanja (analiza rasprave, vrednovanje i donošenja zaključaka).⁵³ Stoga se stalno preispituje struktura predmeta, metodologija, kao i sam proces učenja, da bi se kod učenika potakla i razvila prirodoslovna pismenost i kako bi bili kadri usvojiti osnovne kemijske koncepte.^{54,55} Nastavnik kemije ima iznimnu mogućnost prilagoditi tijekom nastave potrebama učenika i pomoći im da u svim elementima izvuku najbolje od sebe. To traži promišljanje, stalno stručno usavršavanje i spremnost da se u pripremu nastave uloži puno vremena i truda. Na tom tragu je i cilj metodičkog dijela ovog diplomskog rada: predložiti pripremu za 90-minutni nastavni sat kemije utemeljenu na pokusu i učenju otkrivanjem, kroz istraživanje nastavnih metoda i postupaka za ciljane odgojno-obrazovne ishode unutar koncepta Enzimi, a u okviru novog gimnazijskog kurikulumuma iz kemije gdje je navedena tema izborni sadržaj.

6.2. Kurikulumski okvir za uvođenje koncepta *ENZIMI* i pogled u udžbeničku literaturu

Odgoj i obrazovanje u osnovnim i srednjim školama ostvaruje se na temelju Nacionalnog kurikulumu Republike Hrvatske za osnovnoškolski i srednjoškolski odgoj i obrazovanje, nastavnih planova i programa i školskog kurikulumu. Kurikulum svakog pojedinog predmeta određuje: svrhu i ciljeve učenja i poučavanja kao i strukturu predmeta, odgojno-obrazovne ishode i/ili sadržaje, pripadajuću razradu i razinu usvojenosti ishoda učenja, vrste i načine vrednovanja, a pozivajući se na druge akte i popis potrebnih kvalifikacija učitelja i nastavnika za izvođenje predmetnog kurikulumu. Nastavnim planom određuje se oblik izvođenja kurikulumu (obvezno, izborno, fakultativno, međupredmetno i/ili interdisciplinarno), godišnji broj nastavnih sati i njihov raspored po razredima.⁵⁶ Kurikulume nastavnih predmeta i nastavne planove donosi ministar nadležan za obrazovanje odlukom (<https://mzo.gov.hr/istaknute-teme/odgoj-i-obrazovanje/nacionalni-kurikulum/125>).

U osnovnim školama nastavni predmet Kemija uči se i poučava u okviru nastavnoga plana u 7. i 8. razredu, u trajanju od 70 sati po godini učenja, dok se u općim i jezičnim gimnazijama nastavni predmet Kemija poučava u okviru nastavnoga plana u trajanju od 70 sati po godini učenja. U prirodoslovnim gimnazijama predmet Kemija s vježbama poučava se u okviru nastavnoga plana u trajanju od 140 sati godišnje, od čega se 50 % sati realizira kroz laboratorijske vježbe u specijaliziranim učionicama (laboratorijima) (NN 10/2019).⁵⁷

Odgojno-obrazovni ciljevi učenja i poučavanja Kemije navedeni u važećem kurikulumu su sljedeći⁵³:

- stjecanje iskustava koja će pobuditi znatiželju, pozitivan stav i interes za kemiju i prirodoslovlje
- razumijevanje i komuniciranje o temeljnim konceptima kemije
- usvajanje i primjena kemijskog nazivlja i simbolike
- razumijevanje principa znanstvenoga i etičkoga pristupa istraživanju te rješavanju kemijskih problema
- stjecanje metakognitivnoga znanja kao preduvjeta za razvijanje samostalnosti, samopouzdanja, inovativnosti, odgovornosti i kreativnosti (MZO, 2018.)⁵³

Prema važećem kurikulumu (NN 10/2019) poučavanje i učenje kemije provodi se u 4 organizacijska područja, tabelarno prikazanih u kurikulumu i označenih kraticama kako je navedeno:

- Tvari (A)
- Promjene i procesi (B)
- Energija (C)
- Prirodnoznanstveni pristup (D).

Tablica M1. Objašnjenje navedenih oznaka koje se nalaze u Tablici M2 i M3.⁵⁷

Oznaka	Značenje
A.7.1. B.8.2.	Slova označuju koncept kojem ishod pripada (Npr. A- tvari, B- promjene i procesi). Prva brojka u nizu označava razred osnovne ili srednje škole. Druga brojka u nizu označava redni broj odgojno-obrazovnog ishoda koji se poučava unutar navedenog koncepta.
MPT	Kratice za označavanje međupredmetne teme.
OR III.C.1.	Kratice za održivi razvoj (odgojno obrazovni ciklus, domena, redni broj odgojno obrazovnog očekivanja).
IKT A.3.2	Informacijsko-komunikacijska tehnologija (domena, odgojno-obrazovni ciklus, redni broj odgojno obrazovnog očekivanja)

U tekstu kurikuluma nalazi se opis usvojenosti (ostvarenosti) odgojno-obrazovnih ishoda koji su iskazani tablično za 7. i 8. razred osnovne škole i sva četiri razreda gimnazije.

Nastavne teme kroz koje se tijekom osnovnoškolskog obrazovanja obrađuju proteini i enzimi učenici prema novom kurikulumu susreću u 8. razredu osnovne škole. U tablici M–1 navedene su nastavne teme direktno ili indirektno vezane uz obradu pojmova proteini i enzimi tijekom osnovnoškolskog (OŠ) obrazovanja te odgojno obrazovni ishodi navedeni u važećem kurikulumu.⁵³

Tablica M2. Nastavne teme i očekivani obrazovni ishodi iz kemije i biologije (ili prirode) kao okvir za poučavanje o proteinima i enzimima kroz 7. i 8. razred osnovne škole.⁵³

Predmet i razred (OS)	Cjelina / Nastavne teme	Odgojno obrazovni ishodi
KEMIJA, 8.	<p>Kemijske promjene i svojstva tvari</p> <p>Brzina kemijske reakcije – čimbenici koji utječu na brzinu kemijske reakcije</p>	<p>A.8.2. POVEZUJE GRAĐU TVARI S NJIHOVIM SVOJSTVIMA Opisuje građu iona, molekula elementarnih tvari i kemijskih spojeva. Povezuje čestičnu građu anorganskih tvari i organskih tvari s njihovim fizikalnim i kemijskim svojstvima. MPT IKT A.3.1.</p> <p>A.8.3. KRITIČKI RAZMATRA UPOTREBU TVARI I NJIHOV UTJECAJ NA ČOVJEKOVO ZDRAVLJE I OKOLIŠ Kritički razmatra upotrebu tvari i njihov utjecaj na čovjekovo zdravlje i okoliš. MPT OR III.A.3.; MPT Zdravlje A.3.2.A; MPT IKT C.3.4.</p> <p>B.8.1. PRIMJENJUJE KEMIJSKO NAZIVLJE I SIMBOLIKU ZA OPISIVANJE PROMJENA Razlikuje fizikalne i kemijske promjene opisane kemijskim nazivljem i simbolikom. Jednadžbama kemijske reakcije prikazuje kemijske promjene. Označava agregacijska stanja tvari u kemijskim jednadžbama. Iskazuje kvalitativno i kvantitativno značenje jednadžbe kemijskih reakcija - povezuje jednadžbu kemijske reakcije sa zakonom o očuvanju mase. Koristi se kemijskim nazivljem i simbolikom za objašnjavanje promjena na makroskopskoj i čestičnoj razini.</p> <p>B.8.2. ANALIZIRA VRSTE KEMIJSKIH REAKCIJA Objašnjava kemijske promjene na primjerima reakcija anorganskih tvari. Objašnjava kemijske promjene na primjerima reakcija organskih tvari. MPT OR III.C.2.</p> <p>B.8.3. ANALIZIRA BRZINE KEMIJSKIH PROMJENA Analizira brzine različitih kemijskih promjena. Analizira utjecaj različitih čimbenika na brzinu kemijske reakcije. Objašnjava ulogu enzima (biokatalizatori).</p> <p>C.8.1. ANALIZIRA IZMJENE ENERGIJE PRI FIZIKALNIM I KEMIJSKIM PROMJENAMA NA ČESTIČNOJ RAZINI Objašnjava pretvorbe i izmjene energije pri fizikalnim i kemijskim promjenama na primjerima iz svakodnevnoga života. Analizira pretvorbe i izmjene energije pri fizikalnim i kemijskim promjenama na čestičnoj razini.</p> <p>D.8.1. POVEZUJE REZULTATE I ZAKLJUČKE ISTRAŽIVANJA S KONCEPTUALNIM SPOZNAJAMA Izvodi pokuse u okviru koncepata Tvari, Promjene i procesi,</p>

		<p>Energija. MPT OR III.B.2. MPT IKT C.3.4.</p> <p>D.8.3. UOČAVA ZAKONITOSTI UOPĆAVANJEM PODATAKA PRIKAZANIH TEKSTOM, CRTEŽOM, MODELIMA, TABLICAMA I GRAFOVIMA Prikazuje podatke prikupljene pokusima i/ili radom na tekstu, novim tekstom, tablicama i grafovima. Interpretira različite vrste brojčanih, tabličnih i grafičkih podataka te prenosi jednu vrstu grafičkih prikaza u drugu. Prikazuje modelima čestičnu građu tvari. MPT IKT A.3.1.</p>
KEMIJA, 8.	<p>Kemija ugljikovih spojeva</p> <p>Biološki važni spojevi</p>	<p>A.8.1. PRIMJENJUJE KEMIJSKO NAZIVLJE I SIMBOLIKU ZA OPISIVANJE SASTAVA TVARI Prikazuje kemijskim formulama elementarne tvari i kemijske spojeve. Imenuje anorganske spojeve i organske spojeve na temelju kemijskih formula. Uočava različite strukture organskih i anorganskih spojeva i povezuje s makroskopskim svojstvima</p> <p>A.8.2. POVEZUJE GRAĐU TVARI S NJIHOVIM SVOJSTVIMA Opisuje građu iona, molekula elementarnih tvari i kemijskih spojeva. Povezuje čestičnu građu (molekule i formulske jedinice) anorganskih tvari i organskih tvari s njihovim fizikalnim i kemijskim svojstvima.</p> <p>A.8.3. KRITIČKI RAZMATRA UPOTREBU TVARI I NJIHOV UTJECAJ NA ČOVJEKOVO ZDRAVLJE I OKOLIŠ Kritički razmatra upotrebu tvari i njihov utjecaj na čovjekovo zdravlje i okoliš.</p> <p>B.8.1. PRIMJENJUJE KEMIJSKO NAZIVLJE I SIMBOLIKU ZA OPISIVANJE PROMJENA Razlikuje fizikalne i kemijske promjene opisane kemijskim nazivljem i simbolikom. Jednadžbama kemijske reakcije prikazuje kemijske promjene. Označava agregacijska stanja tvari u kemijskim jednadžbama. Iskazuje kvalitativno i kvantitativno značenje jednadžbe kemijskih reakcija. Povezuje jednadžbu kemijske reakcije sa zakonom o očuvanju mase. Koristi se kemijskim nazivljem i simbolikom za objašnjavanje promjena na makroskopskoj i čestičnoj razini.</p> <p>B.8.2. ANALIZIRA VRSTE KEMIJSKIH REAKCIJA Objašnjava kemijske promjene na primjerima reakcija organskih tvari.</p> <p>C.8.1. ANALIZIRA IZMJENE ENERGIJE PRI FIZIKALNIM I KEMIJSKIM PROMJENAMA NA ČESTIČNOJ RAZINI Objašnjava pretvorbe i izmjene energije pri fizikalnim i kemijskim promjenama na primjerima iz svakodnevnoga</p>

		<p>života. Analizira pretvorbe i izmjene energije pri fizikalnim i kemijskim promjenama na čestičnoj razini.</p> <p>C.8.2. PROCJENJUJE UČINKOVITOST I UTJECAJ RAZLIČITIH IZVORA ENERGIJE NA OKOLIŠ Navodi prednosti i nedostatke različitih izvora energije. Objašnjava utjecaj odgovorne i neodgovorne uporabe fosilnih goriva na okoliš. Analizira različite izvore energije na temelje njihove energijske učinkovitosti. Analizira utjecaj izvora energije na okoliš.</p> <p>D.8.1. POVEZUJE REZULTATE I ZAKLJUČKE ISTRAŽIVANJA S KONCEPTUALNIM SPOZNAJAMA Izvodi pokuse u okviru koncepta Tvari, Promjene i procesi, Energija.</p> <p>D.8.3. UOČAVA ZAKONITOSTI UOPĆAVANJEM PODATAKA PRIKAZANIH TEKSTOM, CRTEŽOM, MODELIMA, TABLICAMA I GRAFOVIMA Prikazuje podatke prikupljene pokusima i/ili radom na tekstu, novim tekstom, tablicama i grafovima. Interpretira različite vrste brojčanih, tabličnih i grafičkih podataka te prenosi jednu vrstu grafičkih prikaza u drugu. Prikazuje modelima čestičnu građu tvari.</p>
--	--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Nastavne teme i očekivani obrazovni ishodi iz kemije koji su neophodni za razumijevanje povezivanja atoma u organskim molekulama i razumijevanje nastavnih tema kao okvir za poučavanje o proteinima i enzimima kroz 4 razreda gimnazije prikazane su u tablici M3.

Tablica M3. Pregled temeljnih Nastavnih tema i očekivani obrazovni ishodi iz kemije kao okvir za poučavanje o proteinima i enzimima kroz 4 razreda gimnazije.⁵³

Predmet i razred (SŠ)	Cjelina / Nastavne teme	Odgojno obrazovni ishodi
KEMIJA, 1.	2. Kemijsko vezivanje i svojstva tvari Modeli kemijskog vezivanja Polarnost molekula i međumolekulske interakcije Vodikova veza Od metala do lužina, od nemetala do kiselina Svojstva tvari - posljedica međudjelovanja čestica Imenovanje i svojstva nekih organskih spojeva	<p>A.1.1. Analizira svojstva, sastav i vrstu tvari.</p> <p>A.1.2. Primjenjuje kemijsko nazivlje i simboliku za opisivanje sastava tvari. MPT IKT A.4.1.</p> <p>A.1.3. Povezuje građu tvari s njihovim svojstvima. MPT IKT A.4.1.</p> <p>A.1.4. Kritički razmatra upotrebu tvari i njihov utjecaj na okoliš. MPT OR IV.A.2. i IV.A.3. MPT Zdravlje A.4.2.A MPT IKT C.4.3.</p> <p>B.1.1. Objašnjava vrste i svojstva kemijskih veza - nabraja vrste kemijskih veza i njihova svojstva; prepoznaje vrste kemijskih veza na temelju razlike u relativnome koeficijentu elektronegativnosti elemenata; prepoznaje vrstu međučestičnih privlačnih sila.</p> <p>B.1.2. Analizira fizikalne i kemijske promjene. MPT IKT C.4.1.</p> <p>C.1.1. Povezuje potencijalnu energiju s kemijskim vezama između atoma unutar molekule te s međučestičnim djelovanjima- određuje polarnost, odnosno dipolni moment molekula.</p> <p>C.1.2. Povezuje kinetičku energiju s prosječnom brzinom gibanja atoma i molekula u sustavu te s temperaturom.</p> <p>C.1.3. Povezuje svojstva tvari s vrstom kemijske veze i međučestičnim djelovanjima.</p> <p>D.1.1. Povezuje rezultate pokusa s konceptualnim spoznajama. MPT IKT C.4.3.</p> <p>D.1.2. Primjenjuje matematička znanja i vještine. MPT IKT C.4.1.</p> <p>D.1.3. Uočava zakonitosti uopćavanjem podataka prikazanih tekstem, crtežom, modelima, tablicama i grafovima. MPT IKT C.4.1.</p>
KEMIJA, 2.	1. Tvari Organski spojevi Alkani Alkeni Alkini	<p>A.2.1. Analizira svojstva, sastav i vrstu tvari - navodi, opisuje i uspoređuje svojstva metala i nemetala; opisuje i uspoređuje kemijasku građu i svojstva ugljikovodika (alkana, alkena i alkina)</p> <p>A.2.2. Primjenjuje kemijsko nazivlje i simboliku za opisivanje sastava tvari - prikazuje čestičnu građu oksida, kiselina, baza, soli, ugljikovodika i halogenalkana. MPT IKT A.4.1.</p> <p>A.2.3. Kritički razmatra upotrebu tvari i njihov utjecaj na okoliš - kritički razmatra upotrebu kiselina, baza, oksida, soli, ugljikovodika i halogenalkana te njihov utjecaj na okoliš. MPT OR IV.A.2. i IV.A.3. MPT IKT C.4.3.</p>

		<p>B.2.2. Analizira kemijske promjene anorganskih i organskih tvari - objašnjava reaktivnost odabranih metala i nemetala; jednadžbama prikazuje kemijske promjene tvari, nastajanje hidrida, oksida, kiselina i baza te soli odabranih kemijskih elemenata; jednadžbama prikazuje kemijske promjene u reakcijama supstitucije i adicije na ugljikovodicima te eliminacije na halogenoalkanima; uočava periodičnost svojstava kemijskih elemenata i spojeva; kritički razmatra utjecaj sudionika kemijskih promjena na okoliš.</p> <p>D.2.1. Povezuje rezultate pokusa s konceptualnim spoznajama - izvodi pokuse i uspoređuje reaktivnost anorganskih i organskih tvari na temelju izvedenih pokusa. MPT IKT C.4.4.</p> <p>D.2.3. Uočava zakonitosti uopćavanjem podataka prikazanih tekstom, crtežom, modelima, tablicama i grafovima - modelima prikazuje čestičnu građu tvari uključenih u promjene i procese. MPT IKT C.4.1.</p>
2. Energija i kemijske promjene	<p>Egzotermne i endotermne reakcije</p> <p>Promjena energije u kemijskim reakcijama</p>	<p>C.2.1. Povezuje promjene s pretvorbom energije unutar sustava - opisuje i povezuje kemijske i fizičke promjene tvari s pretvorbama različitih oblika energije; opisuje pretvorbe energije iz jednog oblika u drugi: kemijska energija (potencijalna energija veza i međudjelovanja) u toplinsku (kinetičku energiju čestica), svjetlosnu i sl.; opisuje promjene energije prilikom raskidanja i nastajanja kemijskih veza i međučestičnih interakcija.</p> <p>C.2.2. Analizira izmjenu energije između sustava i okoline i povezuje ih s promjenama tijekom kemijske reakcije - razlikuje egzotermne od endotermnih procesa na osnovi promjene temperature sustava i okoline tijekom kemijske reakcije</p>
3. Kemijska kinetika	<p>Brzina kemijske reakcije</p> <p>Čimbenici koji utječu na brzinu kemijske reakcije</p> <p>Ujecaj katalizatora na brzinu kemijske reakcije</p> <p>Enzimi (biokatalizatori)</p>	<p>B.2.1. Analizira brzine različitih promjena - analizira ovisnost promjene koncentracije reaktanata i koncentracije produkata o vremenu; opisuje utjecaj različitih čimbenika na brzinu kemijske promjene: površine reaktanata, agregacijsko stanje, koncentraciju i temperaturu. MPT IKT A.4.1.</p> <p>B.2.2. Analizira kemijske promjene anorganskih i organskih tvari - opisuje i analizira brzinu kemijske reakcije kao promjenu koncentracije produkata u datom vremenu.</p> <p>D.2.1. Povezuje rezultate pokusa s konceptualnim s spoznajama - na temelju izvedenih pokusa uspoređuje brzine različitih kemijskih reakcija s obzirom na utjecaj različitih čimbenika. MPT IKT C.4.4.</p>
5. Kiseline, baze i soli		<p>A.2.1. Analizira svojstva, sastav i vrstu tvari - uspoređuje svojstva kiselina, baza i soli; uspoređuje jakost kiselina i baza; objašnjava što su kiselinsko-bazni indikatori i navodi</p>

		<p>primjere; na temelju promjene boje indikatora procjenjuje kiselost, lužnatost ili neutralnost vodene otopine.</p> <p>A.2.2. Primjenjuje kemijsko nazivlje i simboliku za opisivanje sastava tvari - prikazuje čestičnu građu kiselina, baza i soli; jednadžbama prikazuje reakcije dobivanja kiselina, baza i soli; jednadžbama prikazuje disocijaciju kiselina, baza i soli i imenuje nastale ione..</p> <p>MPT IKT A.4.1.</p> <p>D.2.3. Uočava zakonitosti uopćavanjem podataka prikazanih tekstom, crtežom, modelima, tablicama i grafovima - modelima prikazuje čestičnu građu kiselina, baza i soli.</p> <p>MPT IKT C.4.1.</p>
KEMIJA, 3.	1. Kemijska ravnoteža Utjecaj katalizatora na kemijsku ravnotežu	<p>B.3.1. Analizira brzine različitih promjena - uspoređuje promjene u reakcijskom sustavu na temelju podataka o utjecaju katalizatora (inhibitora).</p> <p>B.3.2. Procjenjuje utjecaj čimbenika na sastav reakcijske smjese u ravnotežnome sustavu - uspoređuje uvjete dinamičke ravnoteže sustava s obzirom na načine mijenjanja stanja ravnoteže; uspoređuje djelovanje čimbenika na ravnotežno stanje.</p>
	2. Kiseline, baze i soli Kiselinsko-bazna titracija Puferske otopine Regulacija kiselinsko-bazne ravnoteže u organizmu	<p>A.3.1. Analizira svojstva, sastav i vrstu tvari - navodi definicije kiselina i baza po Arrheniusu, Brønsted-Lowryju i Lewisu; navodi definiciju i svojstva pufera; uspoređuje kiseline, baze i puferne po sastavu, vrsti i svojstvima; na temelju promjene boje indikatora procjenjuje kiselost, lužnatost ili neutralnost vodene otopine.</p> <p>MPT IKT A.5.1.</p> <p>A.3.2. Primjenjuje kemijsko nazivlje i simboliku za opisivanje sastava tvari - jednadžbama prikazuje reakcije dobivanja kiselina, baza i soli i imenuje nastale ione.</p> <p>MPT IKT A.4.1..</p> <p>B.3.3. Analizira kemijske promjene na primjerima reakcija anorganskih i organskih tvari - određuje jakost kiselina i baza; objašnjava disocijaciju, ionizaciju i neutralizaciju opisuje djelovanje indikatora, opisuje kiselost otopine na temelju pH-vrijednosti; objašnjava hidrolizu soli s pomoću teorija o kiselinama i bazama.</p> <p>MPT OR V.B.1.</p> <p>MPT IKT C.5.3.</p> <p>D.3.3. Uočava zakonitosti uopćavanjem podataka prikazanih tekstom, crtežom, modelima, tablicama i grafovima - modelima prikazuje čestičnu građu kiselina, baza i soli.</p>
KEMIJA, 4.	3. Kemija odabranih biomolekula Podjela organskih spojeva Aminokiseline, peptidi	<p>A.4.4. Istražuje svojstva, sastav i vrstu odabranih biomolekula primjenjujući kemijsko nazivlje i simboliku u okviru koncepta - navodi svojstva, sastav i vrstu odabranih spojeva; povezuje strukturu odabranih biomolekula s njihovom funkcijom u organizmu (peptida, enzima, nukleinskih kiselina); istražuje ulogu odabranih spojeva.</p>

	<p>i proteini</p> <p>Struktura proteina</p> <p>Svojstva proteina</p> <p>Dokazivanje proteina</p> <p>Enzimi</p>	<p>MPT Zdravlje A.5.2. MPT IKT C.5.4. B.4.6. Istražuje kemijske promjene odabranih biomolekula - primjenjuje kemijsko nazivlje i simboliku te se koristi matematičkim vještinama u okviru koncepta. MPT IKT C.5.4.</p> <p>C.4.4. Istražuje energijske pretvorbe tijekom biokemijskih reakcija - istražuje djelovanje enzima u organizmu (energija aktivacije); istražuje energijske pretvorbe tijekom biokemijskih reakcija na odabranome primjeru. MPT IKT C.5.4.</p>
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Međutim, baš se na primjeru tematskih cjelina koje obrađuju enzime mogu uočiti nedostaci novog kurikulumu jer neke važne tematske cjeline u 4. razredu gimnazije postaju neobavezne, tj. izborne, a predznanje učenika usvojeno tijekom nastavnog procesa često nije dostatno za razumijevanje ove teme. Jedina obavezna tema u 4. razredu SŠ je elektromagnetsko zračenje, dok su ostale teme izborni sadržaj i obrađuju se dogovorom između nastavnika i učenika uz poštivanje školskog kurikulumu. "Kemija odabranih biomolekula" prema novom kurikulumu postaje izborni sadržaj koji nastavnik realizira ovisno o programu gimnazije i u dogovoru s učenicima (Nacionalni kurikulum kemija, MZO, 2018.).⁵³ Dijelovi organske kemije obrađuju se u nižim razredima: nomenklatura i svojstva nekih organskih spojeva u udžbeniku za 1. razred gimnazije prikazani su kao dodatak na kraju udžbenika⁵⁸, a u udžbeniku za 2. razred gimnazije u prvoj tematskoj jedinici, Tvari.⁵⁹ U udžbenicima istog izdavača, sukladno važećem kurikulumu, *Enzimi* (biokatalizatori) spominju se u nastavnoj cjelini *Kemijska kinetika* kao jedan od čimbenika koji utječe na brzinu kemijske reakcije⁵⁹, dok su u 3. razredu, pojam *kataliza* i *katalizator* obrađeni u nastavnoj cjelini *Kemijska ravnoteža*, ali se ovdje ne spominju biokatalizatori, odnosno enzimi.⁶⁰ Analizom i kritičkim osvrtom na važeću udžbeničku literaturu te odgojno-obrazovne ishode nastave u predmetnom kurikulumu, načinjen je pregled sadržaja na zadanu temu *Enzimi* za SŠ, prikazan u tablici M3. Tako se u gradivu Kemija 1 (SŠ) obrađuje cjelina *Kemijsko vezivanje i svojstva tvari*.⁵⁸ Modelima kemijskog vezivanja te kovalentno vezivanje, omogućeno je razumijevanje izgleda i sastava aminokiselina i njihovo međusobno povezivanje, tj. razumijevanje primarne strukture proteina. Međumolekulska djelovanja koja se javljaju unutar proteina i utječu na različita fizikalna svojstva nisu dostatno opisana u obradi nastavnog sadržaja. Međumolekulske interakcije bitne su za razumijevanje sekundarne,

tercijarne i kvaterne strukture proteina. Razumijevanjem kiselina i baza stječe se početno shvaćanje značaja amfoternosti aminokiselina. Nadalje, usput se spominju osnove organske kemije pa tako i karboksilne kiseline, što u tom kontekstu predznanja učenika može stvoriti konfuziju u kasnijem proučavanju proteina. U SŠ udžbeniku Kemija 2 se u nastavnoj temi *Utjecaj katalizatora na brzinu kemijske reakcije* spominju proteini (enzimi) kao biokatalizatori.⁵⁹ Također se opisuje primjer izgleda enzima pomoću kojeg se može shvatiti mehanizam djelovanja enzima. Nedostatak je što učenik ne povezuje da je enzim u biti protein ili polipeptid, što može dovesti kasnije do nerazumijevanja teme i stvaranja novih miskoncepcija. Srednjoškolski udžbenik Kemija 3 obrađuje nastavnu temu *Utjecaj katalizatora na kemijsku ravnotežu* i ne spominje enzime kao biokatalizatore, što može kod učenika stvoriti nerazumijevanje, odnosno zaboravljanje gradiva prethodno poučavanog u 2. razredu SŠ, a koji su bitni za razumijevanje funkcioniranja stanica koje se uči u biologiji.⁶⁰ Učenje o enzimima po predmetnom kurikulumu biologije navedeno je u 3. razredu gimnazije i samim time se gubi mogućnost interdisciplinarnog poučavanja ovog nastavnog koncepta.⁶² Svakako nastavnici biologije i kemije u dogovoru moraju ove koncepte poučavati interdisciplinarno kako bi se učvrstilo znanje o enzimima, a pogrešna shvaćanja koja se javljaju svela na minimum. Ponekad kurikulum treba uzeti kao smjernice, a ne držati ga se kao jedinog ispravnog puta ka ostvarivanju nastavnih ishoda. U ovakvim situacijama nastavnik mora preuzeti odgovornost i u dogovoru s kolegama srodnih predmeta prilagoditi vrijeme uvođenja ovog koncepta u nastavu.

6.3. Pogrešna učenička shvaćanja i mogući uzroci njihova nastajanja tijekom poučavanja o pojmu *Enzimi*

S pojmom enzima (biokatalizatora) učenici se tijekom učenja Kemije, prema važećem kurikulumu, susreću prvi put u 8. razredu osnovne škole te kasnije tijekom srednjoškolskog gimnazijskog obrazovanja, kao izborne teme u 4. razredu gimnazije.⁵³ Učenička pogrešna shvaćanja jednim dijelom su posljedica rascjepkanosti gradiva neophodnog za razumijevanje strukture i funkcije enzima, nejasne klasifikacija koje se navode u udžbeničkoj literaturi o enzimima prema vrsti reakcije koju kataliziraju te neadekvatnog opisivanja vezanja supstrata i djelovanja enzima. Do nerazumijevanja pojmova i pogrešnog učeničkog shvaćanja unutar nastavne jedinice *Enzimi* u 4. razredu SŠ⁶¹, često dolazi i zbog neusvojenosti prethodnog znanja i nepovezivanja gradiva, neophodnog za ovu tematsku jedinicu, kako je navedeno u

tablicama M2 i M3. Nedostatak vremena i materijalnih resursa za praktičnu nastavu i izvođenje pokusa također dijelom doprinose poteškoćama pri usvajanju ovih sadržaja. Najvažnije činjenice o enzimima koje učenici pogrešno usvoje navedeni su u tablici M4.

Tablica M4. Prikaz najvažnijih činjenica o enzimima koje učenici usvoje dobrom nastavnom praksom.⁶⁴

Biokatalizatori nisu izolirani samo iz životinjskih organizama.
Većina biokatalizatora po kemijskoj građi su proteini.
Aktivnost enzima ovisna je o strukturnom rasporedu i građi proteina (od primarne do tercijarne strukture).
Enzimski kataliza ovisi o pozicioniranju i vezanju supstrata unutar aktivnog mjesta enzima.
Enzimi gube svoju funkciju izlaganjem visokim temperaturama kroz duže vremensko razdoblje.
Enzimi smanjenjem energije aktivacije pogoduju da se reakcija odvija prema pogodnijem ravnotežnom stanju puno brže nego što bi to bio slučaj bez enzima (egzotermne i endotermne reakcije)
Enzimi ne uzrokuju kemijske reakcije, oni djeluju kao katalizatori i pri tome se kemijski ne mijenjaju.

Enzimi kao proteini izolirani su iz arhejskih bakterija, biljaka, gljiva i životinja.¹¹ Najčešće učenici enzimske proteine vežu uz životinjske i ljudski organizam i ne povezuju evolucijsku očuvanost i rasprostranjenost enzima. Struktura proteina se do 4. razreda SŠ uopće ne obrađuje, a u 4. razredu izborom nastavnika i učenika obrađuje se kao izborna tema.^{53,61} Samim time nerazumijevanjem strukture proteina, teško je kvalitetno i bez javljanja pogrešnih shvaćanja obraditi ovu nastavnu jedinicu. Ispitni katalog Kemija za državnu maturu pod ključne pojmove navodi proteine i enzime kao izborne obrazovne ishode, a pod primjerima pokusa prikazana je biuret reakcija kojom se dokazuju proteini. Također se gradivo vezano za proteine i enzime ispituje na prijemnim ispitima za pojedine fakultete. Interdisciplinarni pristup može upotpuniti obradu proteina i enzima s obzirom na nedostatnost kurikuluma u obradi ovih tema. Terrell i sur. (2021.) predlažu korištenje 3D modela za bolje razumijevanje strukture enzima i poboljšanja obrazovnih ishoda studenata preddiplomskog studija vezanih za poučavanje enzima. Odabir čestičnog prikaza pomaže u razumijevanju apstraktnih kemijskih pojmova i procesa.⁶⁴ Njihovom digitalnom primjenom učenici mogu dobiti jasniju vizualizaciju strukture spojeva na čestičnoj razini.^{32,64} Prema Bretz i Linenberger (2012.) najčešća pogrešna shvaćanja strukture i funkcije enzima kod studenata

su: uloga strukture na specifičnu aktivnost enzima, način vezanja enzima i supstrata, kompetitivna i nekompetitivna inhibicija, strukturne promjene prilikom stvaranja kompleksa enzim-supstrat i karakteristike enzima i supstrata.^{65,66} Možemo zaključiti da se slična pogrešna shvaćanja javljaju i kod učenika i studenata pri obradi tematske jedinice *Enzimi*. Najčešće učeničko pogrešno shvaćanje djelovanja enzima vezano je uz činjenicu da enzimski kataliza ovisi o pozicioniranju i vezanju supstrata unutar aktivnog mjesta enzima. Zastarjelim modelom "ključ i brava" učenici dobivaju dojam da su enzim i supstrat krute tvorbe koje moraju savršeno pristajati jedan u drugi. Novim modelima jasnije se učenicima prikazuju strukturne promjene do kojih dolazi prilikom vezanja supstrata u aktivno mjesto enzima.⁶⁶

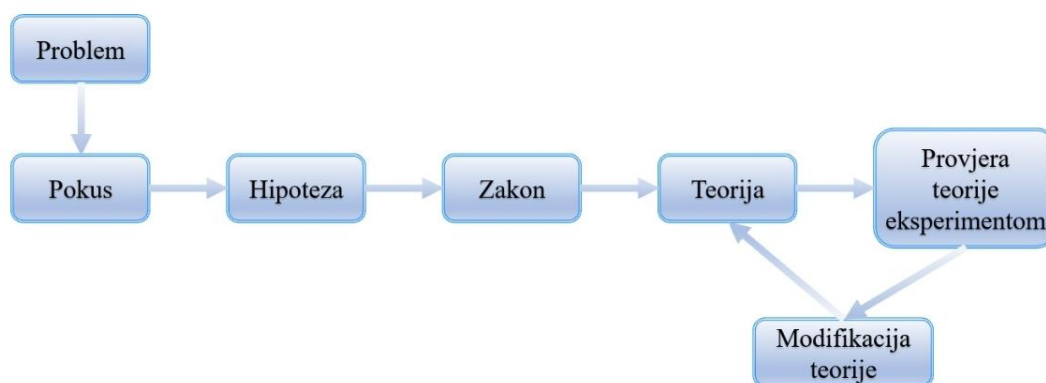
6.4. Strategija učenja otkrivanjem

Od svih strategija poučavanja za obradu ove nastavne teme najbolje je koristiti učenje otkrivanjem jer su priloženi pokusi laki za izvesti i zorni za uočiti promjene. Za obradu ove nastavne teme potrebna su mnoga predznanja i kompetencije jer su unutar obrade teme *Enzima* dodirnete mnoge nastavne cjeline bez kojih nije moguće objasniti sve eksperimentalne pojave. Za ovu temu nije dostatno poučavati enzime bez interdisciplinarnog pristupa nastavnika fizike, biologije i kemije. Osim grupnog rada učenika ovdje se treba predložiti timski rad nastavnika navedenih predmeta.

Pri obradi novih sadržaja u kemiji uvijek se kreće od definiranja problema, preko izvođenja eksperimenata i na kraju donošenja zaključaka. Za vrijeme izvođenja eksperimenata učenici na temelju opažanja donose zaključke o zakonitostima koje vrijede u kemiji. Na svoj način uz pomoć nastavnika definiraju teoriju na zadanu temu. Zato nastavu otkrivanjem još nazivamo i iskustvenim učenjem. Postoje tri metode kojima se koristi ova strategija poučavanja.⁶⁹ Prva od tih metoda je metoda istraživanja koja se sastoji od ovih etapa:

- uočavanje i definiranje problema,
- postavljanje hipoteze,
- prikupljanje podataka opažanjem i mjerenjima,
- prikupljenim opažanjima i/ili mjerenjima uočavanje zakonitosti koji proizlaze eksperimentom,
- na temelju suvremene teorije objasniti rezultate eksperimenta i donijeti zaključke s obzirom na postavljenu hipotezu,

- modificiranje teorije u slučaju da se rezultati eksperimenta ne mogu objasniti vladajućom teorijom

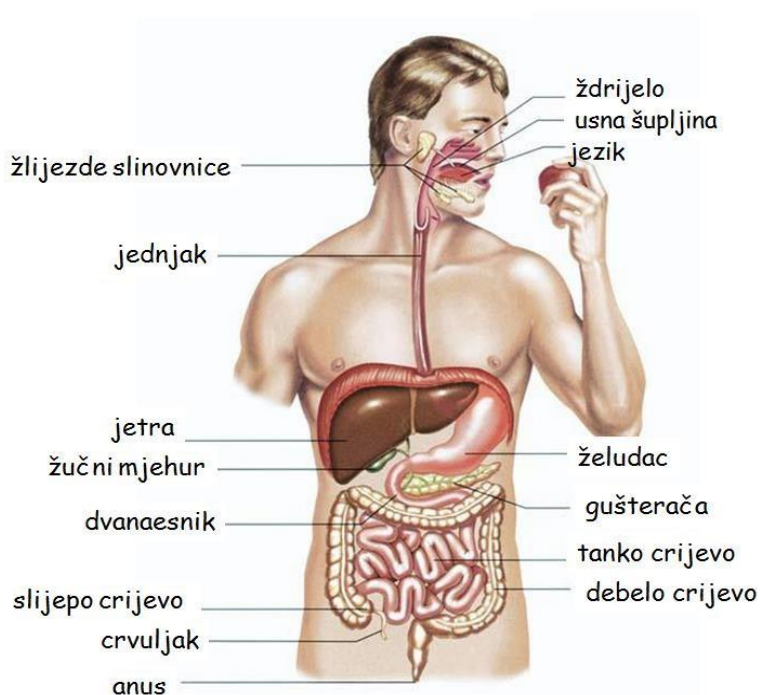


Slika M1. Shema znanstvenog istraživanja.⁶⁹

6.5. Priprema nastavnika za nastavni sat

Metodički dio diplomskog rada zamišljen je kao sat učenja otkrivanjem u grupama od po 5–6 učenika. Tijekom pripreme i provedbe određenog eksperimenta nastavnici moraju imati na umu sigurnost učenika i mogućnost izvedbe istog s dostupnim priborom i kemikalijama koji su potrebni unutar vremenskih okvira zadanih za obradu nastavne jedinice. Svaki eksperiment kojeg učenici izvode mora biti osmišljen na način da se promjene mogu uočiti brzo i zaključci donijeti jednoznačno s obzirom na postavljena pitanja unutar radnog lista. Predviđeno vrijeme za obradu nastavnog koncepta *Enzimi* u sklopu obrade jedne od izbornih jedinica unutar nastavne cjeline *Kemija odabranih biomolekula*, koja se obrađuje u 4. razredu gimnazije, je 90–minutni nastavni sat. Priprema nastavnih materijala i potrebnih kemikalija za rad u grupi ili paru iziskuje od nastavnika više vremena i angažmana kako bi eksperiment kvalitetno pripremili za ovakav oblik poučavanja otkrivanjem. Metodičko oblikovanje didaktičkih materijala za obradu nastavne jedinice treba temeljiti na obrazovnim ishodima koji se nalaze unutar predmetnog kurikulumu (naznačeni su u poglavlju 6.2.) i potrebnim predznanjima učenika. Tijekom obrade nastavne jedinice pojmovi koje će se koristiti su: *brzina kemijske reakcije, prijelazno stanje, supstrat, produkt, primarna, tercijarna i kvaterna struktura proteina, međumolekulske interakcije, enzim, kemijska ravnoteža, kemijske veze i dr.*

Uvijek je najbolje planirati obradu novog nastavnog sadržaja na način da se krene od učenicima poznatih pojmova koji će se tijekom nastave nadograditi novim pojmovima unutar ciljanog koncepta. U uvodnom dijelu sata treba učenike svakako pitati gdje se razgrađuju koje od složenih organskih molekula koje unosimo hranom. Tim ponavljanjem nastavnik može procijeniti usvojenost pojmova o probavnom sustavu u čovjeka poučavanih na nastavi biologije i po potrebi dopuniti i integrirati pojmove uz potrebna kemijska predznanja. Na slici M2 probavnog sustava čovjeka učenici mogu označiti strukture probavnog sustava i pripadajuće žlijezde te napisati koje važne enzime izlučuju. Na tom tragu ovaj nastavni sat treba nastaviti biuret reakcijom kojom se učenici lako prisjete dokazivanja proteina i pojave specifične ljubičaste boje pri samoj reakciji. Taj eksperiment traje kratko i zorno prikazuje kemijsku promjenu te ga se ovdje predlaže kao prvi pokus u *Radnom listu*. Biuret reakcijom se može pokazati da enzimi koji sudjeluju u razgradnji supstrata također pripadaju proteinima. Također je potrebno provjeriti usvojenost strukturne građe proteina. Zornim prikazom na slici M10 u *Radnom listu* treba ispitati poznavanje strukture proteina (primarne, sekundarne, tercijarne i kvaterne) te interakcije koje nastaju međudjelovanjem bočnih ogranaka aminokiselina u polipeptidnom nizu.



Slika M2. Prikaz probavnog sustava čovjeka i pripadnih probavnih žlijezda. Prezeto iz reference.⁶⁷

Zatim je nadalje predloženo izvesti pokus s amilazom i škrobom pri različitim

pH-vrijednostima puferских otopina. Učenici su sigurno na početku sata spomenuli žlijezde slinovnice i koji enzim luče. U *Radnom listu* priložena je tablica u koju će učenici pribilježiti vrijeme razgradnje škroba u različitim puferским otopinama. Nakon toga učenici će u treći stupac tablice M6 unijeti izračunate recipročne vrijednosti potrebnog vremena za pojedine reakcije. Nakon izračunate recipročne vrijednosti na priloženom milimetarskom papiru u *Radnom listu* učenici će ucrtati točke ovisnosti recipročne vrijednosti vremena o pH-vrijednosti otopine (Slika M12). Učenici iz izrađenog grafičkog prikaza sami su sposobni zaključiti pri kojoj pH-vrijednosti enzimi imaju najbolju aktivnost. No potrebno je provjeriti mogu li zaključiti što se događa sa strukturom enzima. Na ovom mjestu se treba vratiti na usporedbu svih struktura koje protein može imati. Ovdje se može uvesti pojam amfoternosti aminokiselina jer su učenici u 4. razredu gimnazije sposobni pojasniti na samim primjerima aminokiselina ovaj pojam. Za učenike boljih predznanja može se pripremiti zadatak povezivanja dviju aminokiselina u obliku jednadžbe. Također treba zadati zadatak sa polipeptidnim lancem i međumolekulskim interakcijama koje se javljaju u terciarnoj strukturi proteina (Slika M10). Ako se odluči naznačiti i veza između cisteinskih bočnih ogranaka treba s učenicima definirati koja je to kemijska veza. Nikako ne bi trebalo ostati obrađeno uz pojam međumolekulskih interakcija jer se ne radi o interakciji već o kemijskoj vezi.

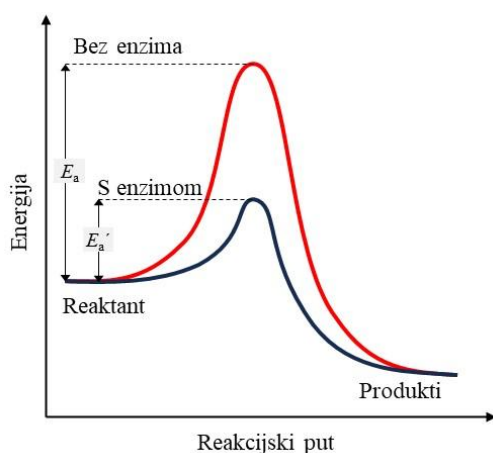


Slika M3. Prikaz razgradnje škroba amilazom na koji su vezane granule plave boje.

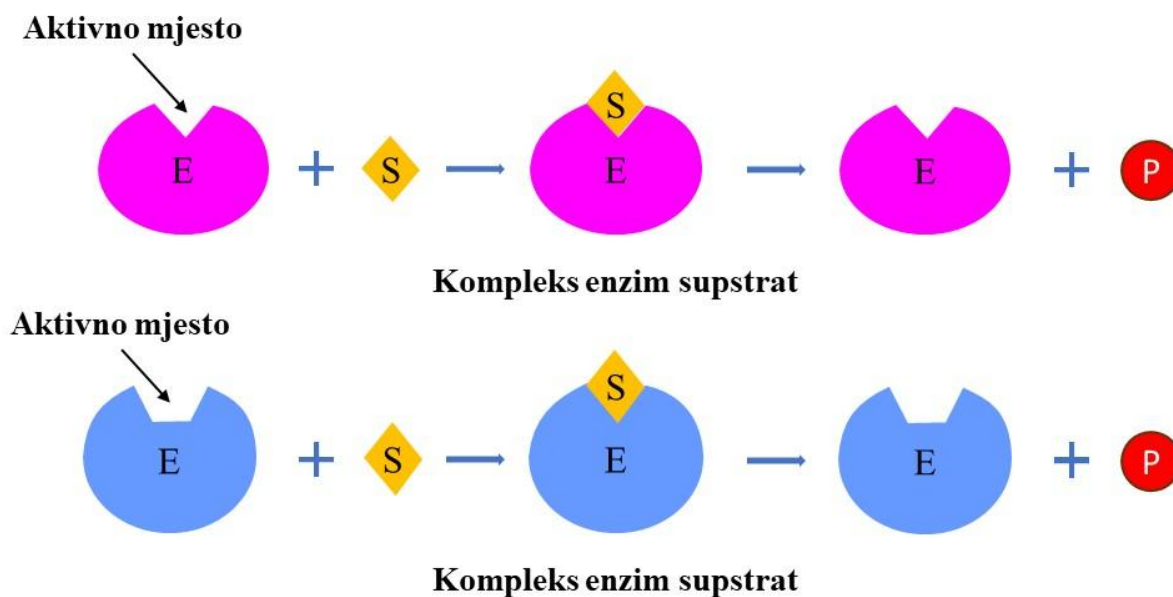
Nakon razgradnje škroba i detekcije završetka reakcije (pomoću Lugolove otopine) ovdje nastavnik može napraviti demonstracijski pokus za vrijeme dok učenici sređuju rezultate. Demonstracijski pokus se može raditi s Tolensovim ili Fehlingovim reagensom i

time se može potvrditi razgradnja škroba na još jedan od poznatih načina. Ponavljanjem ovih reakcija od učenika se očekuje i pisanje pripadnih jednadžbi kemijskih reakcija za ove demonstracijske eksperimente (Slika M13).

Nakon ovog pokusa u PowerPoint prezentaciji potrebno je prikazati energetski profil katalizirane i nekatalizirane reakcije (Slika M4). Potrebno je učenike podsjetiti na 2. razred gimnazije i izgled dijagrama katalizirane i nekatalizirane reakcije. Važno je prikazati jednadžbom reakcije prijelazno stanje i završetak reakcije (Slika M5). Ovaj dio treba s učenicima ponoviti temeljito kako bi zaključili da iz reakcije enzim izlazi nepromijenjen. Ovu reakciju je poželjno napisati na ploču da ostane do kraja sata. Izvedbom ovog pokusa i rješavanjem zadataka priloženih u *Radnom listu* učenici mogu zaključiti o **utjecaju pH-vrijednosti otopine na aktivnost enzima**.

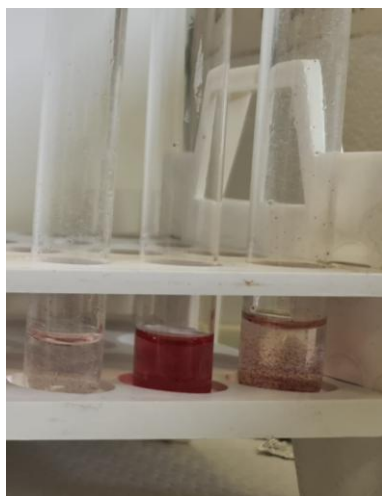


Slika M4. Energetski profil katalizirane i nekatalizirane reakcije te položaj reaktanata i produkata u reakcijskom putu.



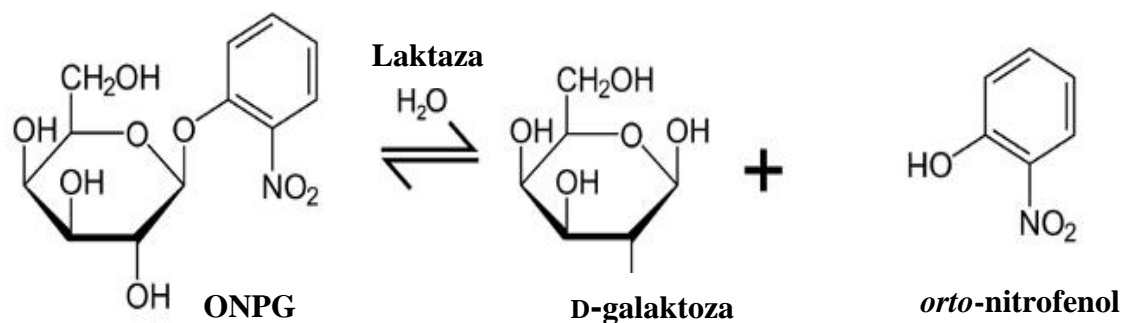
Slika M5. Dva modela djelovanja enzima na supstrat. A) Model ključ-brava i B) Model pobuđene prilagodbe

Nakon toga novim pokusom u *Radnom listu* uvodi se ekstrakt svježeg ananasa i ananasa iz konzerve kao izvor skupine enzima te kolagen na koji su vezane granule boje kao supstrat. Ekstrakt ananasa priredi se usitnjavanjem ananasa rezanjem na što manje dijelove i dodatno se izmacerira u tarioniku s tučkom. Ekstrakt se procijedi te ga kao takvog učenici koriste u pokusu. Na svakom radnom stolu mora postojati jedna velika čaša u koju nastavnik ulijeva zagrijanu vodu (100°C). Razgradnju kolagena učenici prate otpuštanjem boje kada se kolagen razgradi djelovanjem enzima. Zatim kada se izvede pokus i zabilježe opažanja treba učenike u *Radnom listu* tražiti da predlože rezultate istog pokusa sa ekstraktom ananasa iz konzerve. Potom je dobro pitati učenike da daju jedan primjer iz svakodnevnog života koji bi pojasnio ovakve rezultate eksperimenta. Denaturacija kod kuhanja jaja je jedan od primjera kojeg se svako dijete može prisjetiti. Svakako treba komentirati i reverzibilnost nekih proteina iz primarne u tercijarnu strukturu. Najbolje je tražiti učenike da to naznače na prikazu primarne u tercijarnu strukturu i obratno. Nakon izvedbe ovog pokusa učenici su sposobni zaključiti o **utjecaju temperature na brzinu kemijske reakcije**.



Slika M6. Prikaz djelovanja bromelaina na kolagen i otpuštanje boje; prva epruveta je bez enzima, u drugoj se nalazi enzim iz svježeg ananasa, a u trećoj ekstrakt ananasa iz konzerve.

U pokusu predloženom u *Radnom listu* (Pokus 4) koristi se laktaza kao enzim za razgradnju sintetskog spoja ONPG (*orto*-nitrofenol-*beta*-D-galaktopiranozid) koji se razgradnjom cijepa na *orto*-nitrofenol i D-galaktozu (Slika M7). Važno je napomenuti da je ONPG sintetički spoj (galaktozid) koji je strukturno sličan laktozi. Inače se koristi za dokazivanje enterobakterija koje fermentiraju laktozu isto kao što i razgrađuju sintetski spoj ONPG na *orto*-nitrofenol i D-galaktozu. Laktozu bi u eksperimentu koristili kao kompetitivni spoj koji se natječe s ONPG-om za laktazu. *Orto*-nitrofenol daje žutu boju otopini pomoću koje se detektira razgradnja ONPG supstrata laktazom (Slika M8). Laktazu se može jeftino nabaviti u bilo kojoj ljekarni u obliku tableta. Koristi se kao dodatak u prehrani ljudi koji su prestali sintetizirati taj enzim tijekom odrastanja. ONPG (*orto*-nitrofenol-*beta*-D-galaktopiranozid) sintetički spoj koristi se u medicinske svrhe te se može nabaviti u ljekarnama uz prethodnu narudžbu za potrebe edukacijskih svrha. Dolazi u obliku tableta koje se otope u određenom puferu što piše u uputama samog spoja.



Slika M7. Prikaz djelovanja laktaze na sintetski spoj ONPG.



Slika M8. Prikaz djelovanja laktaze na sintetski spoj ONPG i pojavu intenzivne žute boje.

Prva epruveta služi kao slijepa proba te u njoj nije dodan enzim laktaza. U drugoj epruveti dodan je sintetski spoj ONPG (kao i u prvoj epruveti) te je potom dodana laktaza što se detektira pojavom intenzivne i bistre žute boje (Slika M8). Ovim pokusom uvodi se pojam kompetitivnog inhibitora i inhibicije enzimske reakcije otopinom glukoze. Iako ovi pojmovi kompetitivnog inhibitora i inhibicija enzimske reakcije glukozom nisu obavezni pojmovi unutar kurikulumu poželjno ih je obraditi unutar ovog 90-minutnog nastavnog sata. Poželjno je načiniti pokus u kojem uvodimo laktozu kao drugi supstrat uz sintetski ONPG u reakciju te paralelno pratiti promjenu u intenzitetu pojave žute boje. Reakcijama laktaze s ONPG supstratom u jednoj epruveti te laktaze s dva supstrata (laktozom i ONPG-om) u drugoj epruveti. U *Radnom listu* uz pokus 4 priložene su slike M15 i M16 koje zorno prikazuju

kompetitivnu inhibiciju laktozom i inhibiciju enzimske reakcije glukozom, jednim od produkata razgradnje laktoze. Nakon izvedbe i analize rezultata ovog pokusa učenici su sposobni zaključiti o **utjecaju inhibitora na aktivnost enzima**.

6.5.1. Metodičko-didaktička priprema nastavnog sata

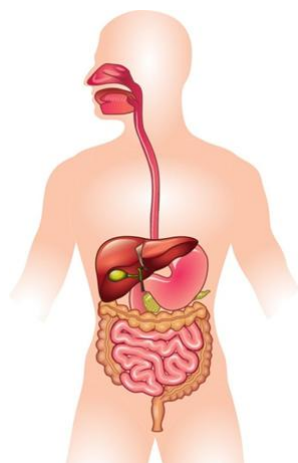
Tablica M5. Potrebni pribor, kemikalije i savjeti za nastavnike

	Pribori kemikalije	Savjeti za nastavnike
POKUS 1	3 epruvete 3 kapalice tarionik s tučkom žličica stalak za epruvete $w(\text{NaOH}) = 10\%$ $w(\text{CuSO}_4) = 1\%$ laktaza proteinaza amilaza	Kako bi biruet reakcija bila uspješna potrebno je provjeriti uvjete reakcijske smjese, jer ponekad s određenim deterdžentima kao izvorima proteaza biruet reakcija neće dati pozitivnu reakciju tj. specifičnu ljubičastu boju.
POKUS 2	stalak za epruvete 5 epruveta kapaljke puferi različitih pH-vrijednosti (3,5,7,8,10) otopina škroba Lugolova otopina destilira na voda otopina amilaze	Amilaza kao izvor enzima treba biti razrijeđena otopina jer pri dodatku u otopinu škroba želimo mjeriti brzinu reakcije u različitim pH-vrijednostima te je bitno podesiti reakciju da pri pH 7 reakcija traje barem pola minute. Lugolova otopina ne smije biti koncentrirana jer u koncentriranom obliku sa škrobom ne daje karakterističnu plavu već smeđu boju.
DEMONSTRACIJSKI POKUS	3 epruvete stalak za epruvete staklena čaša kuhalo za vodu Fehlingov reagens kapaljka otopina škroba Lugolova otopina otopina amilaze	Da bi se uštedjelo nastavno vrijeme, najavi se i postavi demonstracijski pokus tijekom završetka učeničkih mjerenja razgradnje škroba pri različitim pH-vrijednostima.

	Pribori kemikalije	Savjeti za nastavnike
POKUS 3	3 epruvete stalak za epruvete staklena čaša -led kuhalo za vodu kapaljke ekstrakt svježeg ananasa ekstrakt ananasa iz konzerve kolagen označen zncima crvene boje menzura od 5 mL	Umjesto kolagena s crvenim zncima, može se koristiti pripremljena želatina koja sa ekstraktom ananasa iz konzerve hlađenjem prelazi u gel stanje, dok želatina koja je bila u reakciji sa svježim ekstraktom ananasa hlađenjem više ne poprima gel stanje. Također kao izvor enzima može se koristiti suptilizin iz tableta koji se može nabaviti u ljekarni. Također se umjesto kolagena označenog zncima crvene boje može koristiti škrob označen plavom bojom (Slika M3) koji se koristi za amilaza test i dolazi u obliku tableta koje se lako nabavljaju u ljekarnama.
POKUS 4	pločica sa jažicama dvije epruvete laktaza laktoza glukoza ONPG sintentski spoj tri kapaljke	Učenici se prvi puta susreću sa inhibitorima reakcije. Laktoza se natječe sa ONPG-om za aktivno mjesto enzima, dok s druge strane glukoza kao produkt reakcije djeluje na enzim kao inhibitor. (Produkti reakcije u metabolizmu često su inhibitori te služe kao negativna kontrola metaboličkih reakcija).

Radni list

Uvodni dio nastavnog sata



ZADATAK 1 Označite dijelove probavnog sustava te pripadajuće žlijezde i njihove produkte.

Pokus 1

Pribor i kemikalije: 3 epruvete, stalak za epruvete, tarionik s tučom, žličica, $w(\text{NaOH}) = 10\%$, $w(\text{CuSO}_4) = 1\%$, laktaza, otopine proteinaze i amilaze, destilirana voda, 3 kapalice

Procjena opasnosti i rizika: Pojedine kemikalije su nadražujuće te ako dođu na kožu potrebno je poliveno mjesto obrisati ubrusom te isprati vodom.

KORAK 1 U tarioniku usitnite tabletu laktaze, zatim dio praha prenesite u epruvetu i dodajte 1 mL vode. Zabilježite opažanja.

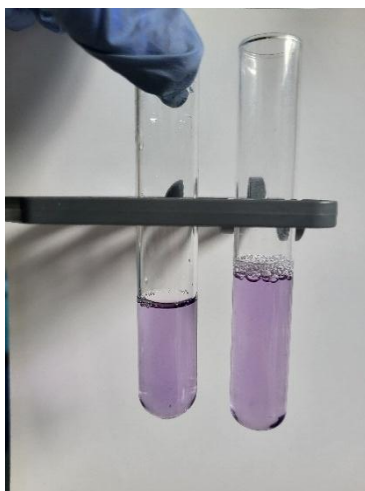
Bijeli prah laktaze se otopio u vodi i otopina je bezbojna.

KORAK 2 U drugu i treću epruvetu ulijte po 1 mL prethodno pripremljenih otopina proteinaze i amilaze. Zatim u svaku od epruveta ulijte po 1 mL otopine natrijeva hidroksida te svaku epruvetu lagano protresite.

PITANJE 1 Dolazi li do vidljivih promjena u epruvetama nakon dodatka natrijeve lužine?

U epruvetama ne dolazi do vidljivih promjena.

KORAK 3 Pažljivo dodajte u sadržaj svake epruvete jednu do dvije kapi otopine X i protresite. Zabilježite opažanja.



Nakon dodatka otopine X u epruvete, otopine su poprimile ljubičastu boju.

Slika M9. Prikaz biruet reakcije s laktazom i jednom proteazom.

PITANJE 2 Možete li pretpostaviti što je otopina X i koja je njena uloga u pokusu?

Radi se o modroj otopini bakrova (II) sulfata koja u lužnatom mediju služi kao reagens na proteine, a produkti te reakcije oboje otopinu karakteristično ljubičasto.

PITANJE 3 Kako nazivamo ovu reakciju?

Biuret reakcija.

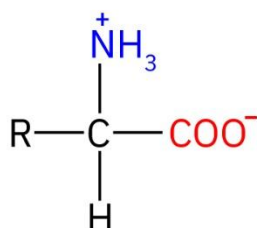
ZADATAK 2 Na temelju opažanja i odgovora na gore navedena pitanja izvedite zaključak o skupini spojeva kojoj pripadaju tva ri (enzimi) u epruветama.

Enzimi koji su nalazili u epruветama su proteini.

ZADATAK 3 Na slici M10 prikazana je shema prostorne građe vrste spojeva kojima pripadaju i enzimi. Što na temelju te sheme možete zaključiti o građi enzima?

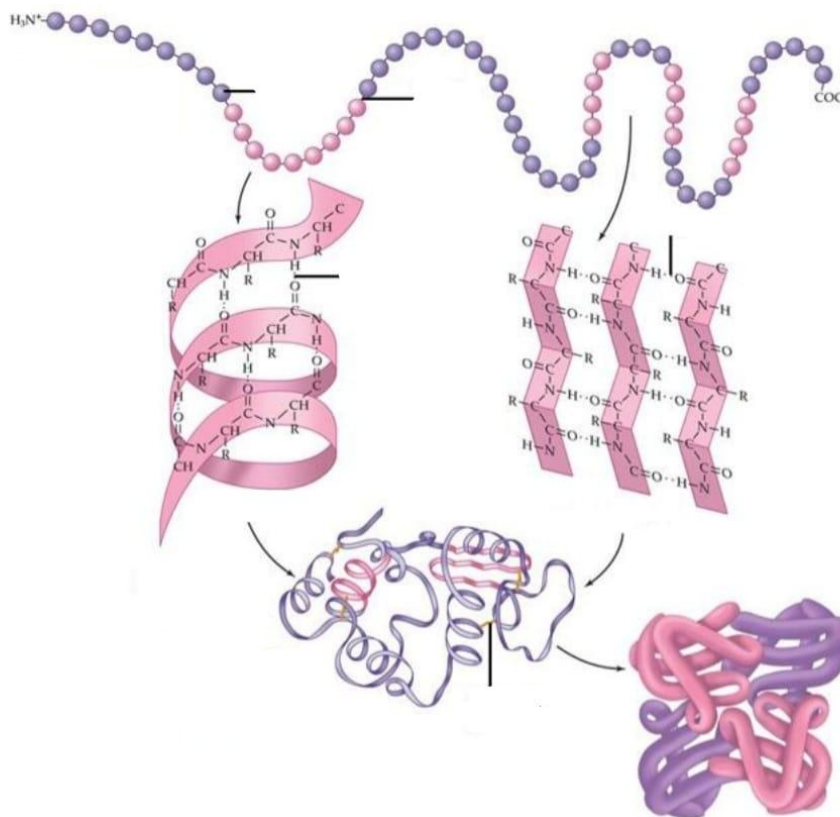
Primarna građa im je linearnog karaktera no interakcijama se smataju u sekundarne i tercijarne strukture.

ZADATAK 4 Općom strukturnom formulom prikažite jednu građevnu jedinku u ovoj polimernoj strukturi.



PITANJE 4 Obrazložite zašto se polimerni lanci smataju u sekundarne i tercijarne strukture?

Zbog interakcija koje nastaju između bočnih ogranaka u polimernom lancu dolazi do smatanja u sekundarne i tercijarne strukture.



Slika M10. Struktura polipeptidnog lanca i njegovo smatanje u tercijarnu strukturu proteina. Preuzeto iz Reference.⁶⁸

ZADATAK 5 Na slici M10, imenujte veze i interakcije na označena mjesta i definirajte pojedine strukture.

Pokus 2

Pribor i kemikalije: 5 epruveta, stalak za epruvete, otopina škroba, Lugolova otopina, destilirana voda, otopina amilaze, puferi različitih pH-vrijednosti (3, 5, 7, 8, 10)

KORAK 1 U epruvetu ulijte 7 mL otopine škroba i dodajte 1 kap Lugolove otopine, protresite sadržaj epruveta. Zabilježite opažanja.

Dodatkom Lugolove otopine u otopinu škroba pojavljuje se karakteristično tamnoplavo obojenje.



Slika M11. Otopina škroba s dodanom Lugolovom otopinom.

PITANJE 5 Što se dokazuje Lugolovom otopinom? Obrazložite pojavu.

Lugolovom otopinom dokazuju se složeni šećeri, u ovom slučaju škrob. Trijodidni ion (I_3^-) iz Lugolove otopine smješta se u unutrašnjost uzvojnice linearnog polimera (amiloze) prisutnog u građi molekule škroba, te uzrokuje pojavu karakteristične plave boje.

KORAK 2 Zatim kapaljkom razdijelite otopinu na 5 epruveta tako da se u svakoj nalazi podjednak volumen. Nakon toga redom u svaku epruvetu s otopinom škroba dodajte 2 mL odgovarajućeg pufera različitih pH-vrijednosti koje su vam na raspolaganju. Načinite skicu pokusa s epruvetama u stalku.

KORAK 3 Pripremite zaporni sat i odredite unutar grupe osobu koja će mjeriti vrijeme. U prvu epruvetu dodajte 2 kapi enzima amilaze i odmah započnite mjerenje vremena. Vrijeme reakcije mjerite do promjene boje u otopini. Zapišite u tablicu vrijeme trajanja reakcije. Ponovite postupak s preostalim epruvetama. Za izmjerene vrijednosti izračunajte recipročne vrijednosti i unesite ih u tablicu.

Skica pokusa:

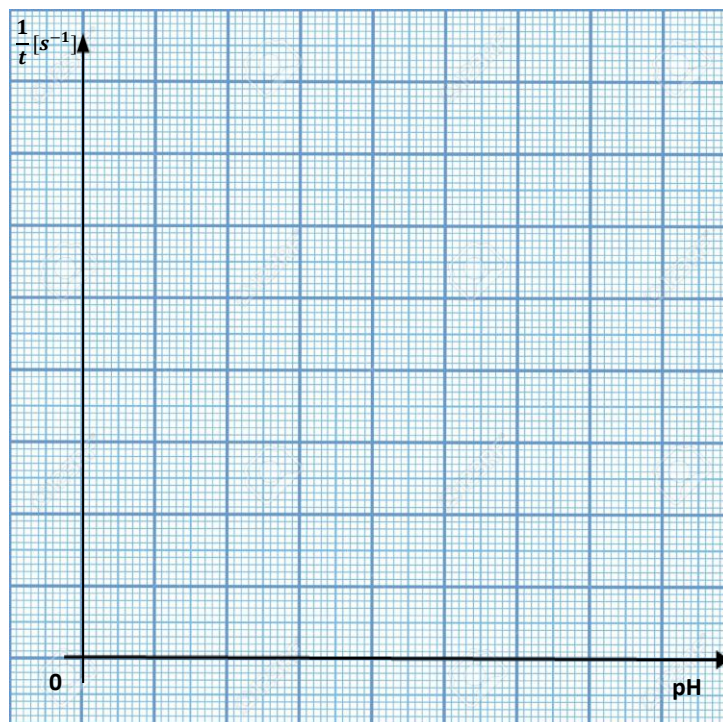
Tablica M6. Tablični prikaz potrebnog vremena trajanja reakcije u različitim pH puferima.

pH – vrijednost	Vrijeme trajanja reakcije $t [s^{-1}]$	Recipročna vrijednost trajanja reakcije $\frac{1}{t} [s^{-1}]$
3		
5		
7		
8		
10		

ZADATAK 6 Opišite promjene do kojih dolazi u epruветama i na temelju njih izvedite zaključak.

U epruветama dolazi do gubitka karakteristične plave boje jer dolazi do razgradnje škroba. Vrijeme u kojem se promjena dogodi razlikuje se za reakcije u svakoj pojedinoj epruветi.

ZADATAK 7 Grafički prikazite ovisnost recipročne vrijednosti potrebnog vremena o pH-vrijednosti pojedinih reakcijskih smjesa.



Slika M12. Priloženi milimetarski papir s naznačenim osima

ZADATAK 8 Na temelju grafičkog prikaza zabilježite opažanja i izvedite zaključke.

Iz grafičkog prikaza možemo zaključiti da se promjenom pH-vrijednosti reakcijskog sustava mijenja brzina enzimske reakcije.

PITANJE 6 Koje svojstvo proteina ste potvrdili ovim pokusom?

Aktivnost proteina ovisi o pH-vrijednosti medija u kojem se nalaze.

DEMONSTRACIJSKI POKUS

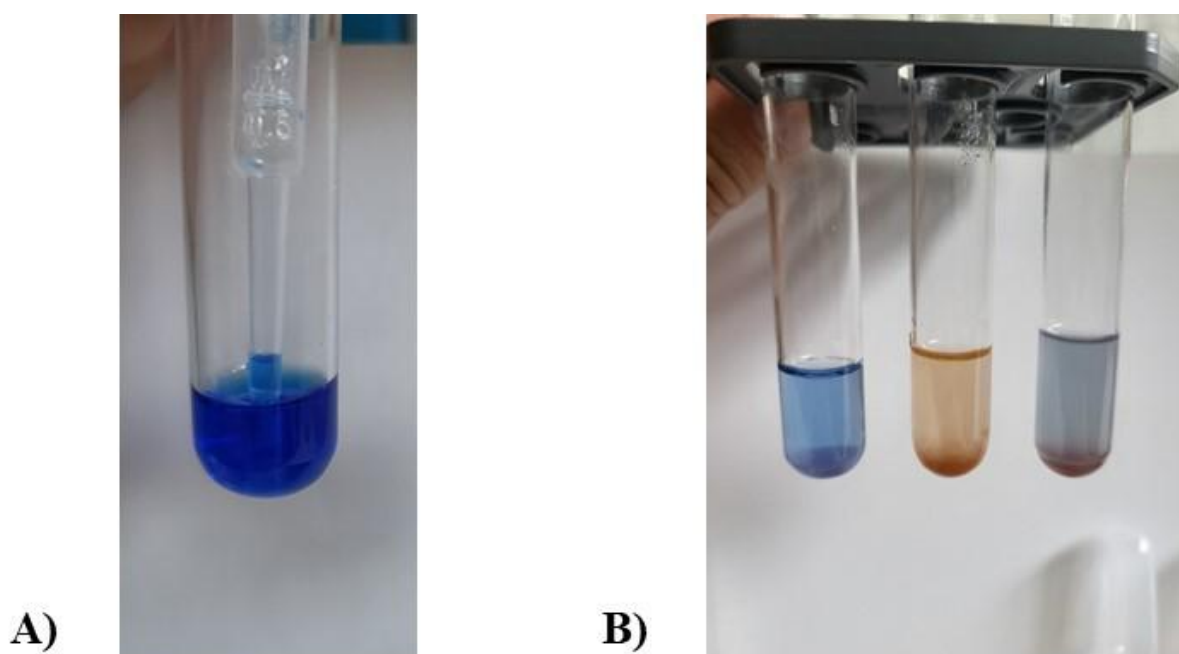
Pribor i kemikalije: 3 epruvete, stalak za epruvete, čaša, kuhalo za vodu, Fehlingov reagens, kapaljka, otopina škroba, Lugolova otopina, otopina amilaze.

Nastavnik postavlja demonstracijski pokus na način da u 2 epruvete identičnog sadržaja (amilaza, škrob i Lugolova otopina) dodaje Fehlingov reagens. U trećoj epruveti se nalaze

škrob, Lugolova otopina i Fehlingov reagens bez amilaze. Jednu od prve dvije epruvete i treću epruvetu nastavnik stavlja u zagrijanu kupelj pri 40°C, dok preostala epruveta ostaje na stalku pri sobnoj temperaturi. Nastavnik nakon 4 minute stavlja epruvete na stalak te pokazuje rezultate pokusa svim radnim skupinama.

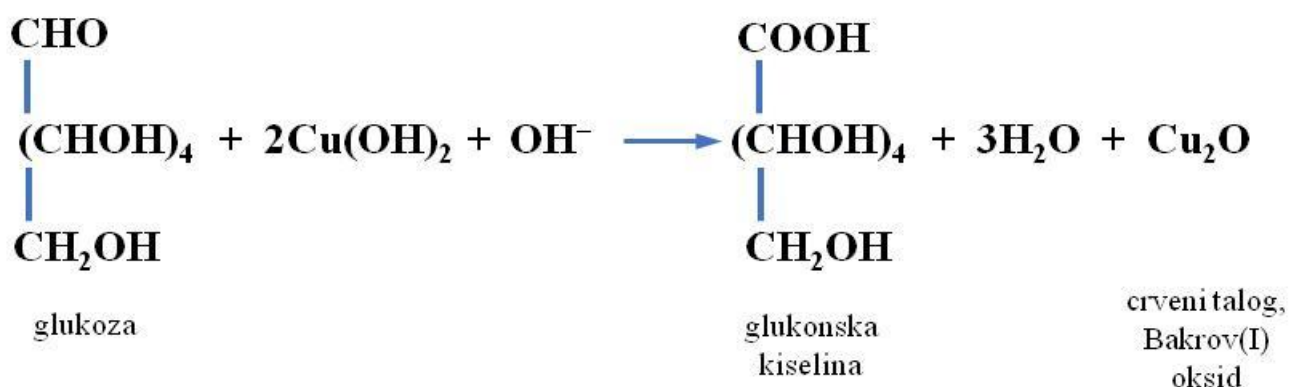
ZADATAK 9 Skicirajte epruvete i zabilježite opažanja.

U epruveti u koju nije dodana amilaza nakon inkubacije u zagrijanoj kupelji nije došlo do vidljive promjene tj. otopina je bistra i plavo obojena. Epruveta koja se nalazila u vrućoj kupelji s amilazom promijenila je boju iz plave u crvenu i na dnu epruvete se nalazi crveni talog. U trećoj epruveti koja je stajala na stalku za epruvete na dnu se istaložio crveni talog, dok je otopina iznad i dalje bila plave boje.



Slika M13. A) Fehlingov reagens, B) Prikaz Fehlingove reakcije u otopinama škroba s amilazom u drugoj i trećoj epruveti pri različitim vrijednostima temperature.

ZADATAK 10 Prisjetite se od koje dvije otopine se sastoji Fehlingov reagens te prikažite jednadžbom kemijske reakcije reakciju Fehlingovog reagensa i jedne molekule glukoze.



PITANJE 7 Promatrajući epruvete u koje je bila dodana amilaza, što možete zaključiti o brzinama kemijskih reakcije koje su se odvijale unutar ta dva sustava?

U epruveti kojoj je dovedena toplina reakcija je tekla brže, što se može zaključiti na temelju dosega reakcije (više taloga u epruveti, nema plavog obojenja). U epruveti koja je stajala na sobnim uvjetima nije došlo do potpunog gubitka plave boje, a količina jednog od produkata (crvenog taloga) bila je manja.

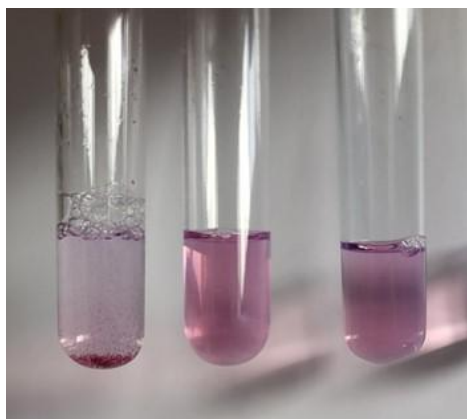
Pokus 3

Pribor i kemikalije: Izvor proteaza (ananasov ekstrakt), kolagen na koji su vezana zrnca crvene boje, 3 epruvete, stalak za epruvete, kuhalo za vodu, led, staklena čaša, menzura od 5 mL

KORAK 1 U prvu, drugu i treću epruvetu ulijte 1 mL kolagena označenog sa zrcima crvene boje. Zatim prvu epruvetu stavite u čašu sa kipućom vodom, drugu epruvetu u čašu s usitnjenim ledom, a treću epruvetu na stalak za epruvete. U sve tri epruvete dodajte tri kapi ekstrakta svježeg ananasa te protresite epruvete. Nakon 1,5 min stavite sve epruvete na stalak za epruvete i promotrite promjene.

ZADATAK 11 Ekstrakt ananasa sadrži skupinu proteolitičkih enzima koji razgrađuju proteine. Opišite opažanja te zaključite u kojoj epruveti se kemijska reakcija najslabije odvila.

U prvoj epruveti crvena zrnca s kolagenom pala su na dno i do reakcije nije došlo. U drugoj i trećoj epruveti crvena zrnca su se razgradila te su otopine poprimile ružičastu boju.



Slika M14. Reakcija kolagena s ekstraktom svježeg ananasa u različitim uvjetima temperature (Epruveta 1 vruća kupelj, epruveta 2 sobna temperatura, epruveta 3 ledena kupelj).

ZADATAK 12 Razmislite i pretpostavite kako bi ekstrakt konzerviranog ananasa utjecao na kolagen označen crvenim zncima.

Do razgradnje kolagena i otpuštanja boje ne bi došlo jer je pasterizirani ananas prošao termičku obradu i enzim više nije aktivan.

PITANJE 8 Navedite moguće uzroke različitog djelovanja enzima iz ekstrakta svježeg ananasa i iz ekstrakta ananasa iz konzerve?

Za aktivnost enzima odgovorna je njegova terciarna struktura koja se narušava termičkom obradom te enzim gubi svoju terciarnu strukturu i specifičnu aktivnost.

KORAK 2 Predložite postupak kojim biste potvrdili svoju hipotezu i pomoću pribora na stolu načinite pokus te provjerite točnost hipoteze.

U jednu epruvetu ulili bi 1 mL kolagena označenog crvenom bojom i dodali ekstrakt ananasa iz konzerve. Protresli bi epruvetu i promatrali promjene.

Pokus 4

Pribor i kemikalije: 2 epruvete, laktaza, laktoza, glukoza, ONPG sintetski spoj, 3 kapaljke, pločica s jažicama

KORAK 1 U jednu epruvetu ulijte 1 mL ONPG sintetskog spoja te kapaljkom dodajte jednu kap laktaze. Zabilježite opažanja.

Bistra bezbojna otopina dodatkom laktaze poprima bistru žutu boju.

KORAK 2 U dvije epruvete ulijte 1 mL ONPG sintetskog spoja te nakon toga u prvu epruvetu dodajte ½ mL destilirane vode, a u drugu ½ mL glukoze. Zatim u obje epruvete dodajte kap laktaze te pažljivo pratite do kakvih promjena dolazi u obje epruvete. Zabilježite opažanja.

U obje epruvete dolazi do promjene boje iz bezbojne u žutu, no u jednoj od epruveta intenzitet žute boje se brže razvija s obzirom na drugu. Epruveta u kojoj je žuta boja jačeg intenziteta sadrži ONPG sintetski spoj, destiliranu vodu i kap laktaze.



Slika M15. Djelovanje laktaze na razgradnju ONPG sintetskog spoja.

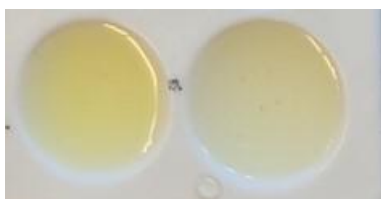
PITANJE 9 Što možete zaključiti o utjecaju glukoze na reakciju u epruveti unutar koje je dodana?

Glukoza usporava razgradnju sintetskog spoja, što smo zaključili na temelju slabijeg intenziteta žute boje u epruveti s glukozom kroz jednako vrijeme.

KORAK 3 U pločicu s jažicama nakapajte 6 kapi ONPG sintetskog spoja u dvije jažice, zatim u prvu jažicu nakapajte 4 kapi destilirane vode, a u drugu 4 kapi laktoze. Na kraju u obe jažice kapnite jednu kap laktaze. Promatrajte promjene.

ZADATAK 13 Opišite pokus i zabilježite opažanja.

U jažici s destiliranom vodom intenzitet žute boje je bio veći za razliku od jažice u kojoj se nalazila laktoza.



Slika M16. Prikaz razgradnje ONPG sintetskog supstrata u uvjetima sa i bez laktoze.

ZADATAK 14 Uspoređujući opažanja iz koraka 2 i 3 donesite zaključak o utjecaju glukoze i laktoze na brzinu razgradnje ONPG supstrata.

Glukoza i laktoza su u oba slučaja usporile brzinu nastanka produkta koji boji otopinu žuto.

PITANJE 10. Kako nazivamo spojeve koji usporavaju ili zaustavljaju kemijske reakcije?

Inhibitori.

6.6. Zaključak metodičkog dijela

Analizom i kritičkim osvrtom na službenu udžbeničku i stručnu literaturu te odgojno-obrazovne ishode nastave u predmetnom kurikulumu načinjen je pregled sadržaja na zadanu temu. Za obradu ove nastavne teme potrebna su mnoga predznanja i već usvojene kompetencije bez kojih nije moguće objasniti sve eksperimentalne pojave. Pregledom srednjoškolske udžbeničke literature klasifikacija enzima je nepotpuno navedena što također može kod učenicima uzrokovati nepotpuna shvaćanja. Ovim pregledom načina obrade koncepta *Enzimi* nije se htjelo pokazati kako je to jedini i najprihvatljiviji način već se pokušalo predočiti koliko je važno promišljati o nastavi interdisciplinarnog pristupa, praćenja pogrešnih shvaćanja kroz učenički rad i kasnije kroz obradu novog i ponavljanje naučenog sadržaja.

U sklopu metodičkog dijela rada osmišljeni su pokusi na temu enzima, temeljem kojih su oblikovani metodičko-didaktički materijali za jedan 90-minutni nastavni sat. Pri tome su postavljeni odgojno-obrazovni ciljevi temeljeni na prethodnim učeničkim znanjima, vještinama i sposobnostima. Prikazani pokusi mogu poslužiti kao nadopuna već postojećim pokusima u službenoj udžbeničkoj literaturi, a interdisciplinarni pristup može upotpuniti obradu proteina i enzima s obzirom na nedostatnost predmetnog kurikuluma u obradi ovih tema.

Nastavnici bi se svakodnevno trebali usavršavati osluškajući potrebe novih generacija i struke kako bi se mogli prilagoditi novom ponašanju, načinu razmišljanja te potrebama učenika. Takvim pristupom nastavnici omogućuju lakše savladavanje potrebnih znanja i usvajanje kompetencija koji su potrebni za ono što ih čeka na državnoj maturi i kasnije u studentskim ili radnim danima.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOL

- ARE - elementi antioksidacijskog odgovora (engl. *antioxidant response elements*)
- Arg₂-2NA - diarginil-2-naftilamid
- CBB - Coomassie Brilliant Blue G-250
- CoCl₂ - kobaltov (II) klorid
- cDNA - komplementarna DNA (engl. *Complementary DNA*)
- DMEM - engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)
- DPP III - dipeptidil-peptidaza III (engl. *dipeptidyl-peptidase III*)
- EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)
- FBS - fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum*)
- pFLAG-CMV2
- HEK293T - humane embrionalne bubrežne stanice (engl. *human embryonic kidney cells*)
- HMOX1 - engl. *Heme Oxygenase 1*
- Keap1 - engl. *Kelch like ECH-associated protein 1*
- LB medij - *Luria-Betrani* medij
- M - marker
- mRNA - glasnička RNA (engl. *Messenger RNA*)
- mQ – miliporirana voda
- Ni-NAT - nitrilotrioctena kiselina (engl. *Ni²⁺-nitrilotriacetic acid*)
- NK - negativna kontrola
- NQO1-engl. *NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1*
- Nrf2- engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
- PBS - fosfatno puferirana fiziološka otopina (engl. *phosphate-buffered saline*)
- PCR-lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)
- PK - pozitivna kontrola
- qPCR - kvantitativni PCR (engl. *quantitative polymerase chain reaction*)
- RIPA - engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*
- RNA - ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)
- ROS - reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*)

rRNA - ribosomska RNA (engl. *ribosomal RNA*)

RT - reverzna transkripcija (engl. *reverse transcription*)

SDS - natrijev dodecil sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE - SDS–poliakrilamidna gel – elektroforeza proteina (SDS – PAGE, engl. *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*)

WT - "divlji tip" (engl. *Wild type*)

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. J. S. Bond, Proteases: History, discovery, and roles in health and disease, *J Biol Chem.* **294** (2019) 1643–1651.
2. A. J. Barrett, J. Chen, J. F. Woessner, N. D. Rawlings. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London (2013), 1285 – 1287.
3. 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 i S. Tomić, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2020), 1–12.
4. S. Emanuele, A. Celesia, A. D’Anneo, M. Lauricella, D. Carlisi, A. De Blasio, M. Giuliano. The Good and Bad of Nrf2: An Update in Cancer and New Perspectives in COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021), 7964.
5. K. Lu, A. L. Alcivar, J. Ma, T. Keong Foo, S. Zywea, A. Mahdi, Y. Huo, T. W. Kensler, M. L. Gatzka, B. Xia. NRF2 Induction Supporting Breast Cancer Cell Survival Is Enabled by Oxidative Stress–Induced DPP3–KEAP1 Interaction. *Cancer Res.* **77** (2017); 2881–92.
6. 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. *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data.* (2012) 401 – 404.
7. A. J. Barrett, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992 Supplement 4 : corrections and additions. *Eur. J. Biochem.*, 250 (1997.), 1–6.
8. N. D. Rawlings i A. J. Barrett: Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* (1993) 290, 205-218.
9. <https://www.sanger.ac.uk/tool/merops/> (pristupljeno 22. ožujak 2022.).
10. J. Špoljarić; *Metalopeptidaze porodice M49: heterologna ekspresija, pročišćavanje i karakterizacija ljudskog ortolognog enzima.* Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2001, str. 10.

11. N. D. Rawlings and A.J. Barrett, *Introduction: metallopeptidases and their clans* in: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 231-268.
12. Rawlings, Neil D. Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, (2020), 1868 (2).
13. Y. H. Hook, Protease pathways in peptide neurotransmission and neurodegenerative diseases, *Cell. Mol. Neurobiol.* **26** (2006) 4-6.
14. G. Malovan, B. Hierzberger, S. Suraci, M. Schaefer, K. Santos, S. Jha, P. Macheroux. The emerging role of dipeptidyl peptidase 3 in pathophysiology. *The FEBS Journal* (2022), John Wiley & Sons Ltd on behalf of Federation of European Biochemical Societies.
15. C.M. Lee i S. H. Snyder, Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 12043-12050.
16. S. Ellis i J.M. Nuenke Dipeptidyl arylamidase III of pituitary: purification and characterization. *J Biol Chem* **242** (1967), 4623–4629.
17. V.K Hopsu-Havu, C.T. Jansen. Peptidases in the skin. II Demonstration and partial separation of several specific dipeptide naphthylamidase in the rat and human skin. *Arch. Klin. Exp. Dermatol.* **235** (1969), 53-62.
18. A.A. Swanson, R.M.Davis, B. Albers-Jackson B, J.K McDonald. Lens exopeptidases. *Exp Eye Res* **32** (1981), 163–173.
19. M. Abramić, M. Zubanović, Lj. Vitale. Dipeptidyl Peptidase III from Human Erythrocytes. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369** (1988), 29-38,
20. Y. Shimamori, Y. Watanabe, Y. Fujimoto. Purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase III from human placenta. *Chem Pharm Bull* **34** (1986), 3333–3340.
21. Prajapati, S. C. & Chauhan, S. S. Dipeptidyl peptidase III: A multifaceted oligopeptide N-end cutter. *FEBS J.* **278** (2011), 3256–3276.
22. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, J. Ilić-Forko, Lj. Vitale, D. Miličić, M. Abramić. Dipeptidyl Peptidase III in Malignant and Non-malignant Gynaecological Tissue. *European Journal of Cancer*, **34** (1998), 399-405.
23. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, M. Šprem, M. Abramić. Tumor cytosol dipeptidyl peptidase III activity is increased with histological aggressiveness of ovarian primary carcinomas. *Gynecol. Oncol.* **19** (2003), 194-200.

24. H. Zhang, Y. Yamamoto, S. Shumiya, M. Kunimatsu, K. Nishi, I. Ohkubo, K. Kani. Peptidases Play an Important Role in Cataractogenesis: An Immunohistochemical Study on Lenses Derived from Shumiya Cataract Rats *Histochem. J.* **33** (2001) , 511.
25. X. Pang, A. Shimizu, S. Kurita, D. P. Zankov, K. Takeuchi, M. Yasuda-Yamahara, S. Kume, T. Ishida, H. Ogita. Novel Therapeutic Role for Dipeptidyl Peptidase III in the Treatment of Hypertension. *Hypertension* **68** (2016); 630-641.
26. Ye P, Duan W, Leng Y-Q, Wang Y-K, Tan X and Wang W-Z DPP3: From biomarker to therapeutic target of cardiovascular diseases. *Front. Cardiovasc. Med* **9** (2022):974035. doi: 10.3389/fcvm.2022.974035.
27. G, A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramić, P. Macheroux, S. Dhe-Paganonb, K. Gruber. Entropy-driven binding of opioid peptides induces a large domain motion in human dipeptidyl peptidase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109** (2012), 6525–6530.
28. 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. Binding of dipeptidyl peptidase III to the oxidative stress cell sensor Kelch-like ECH-associated protein 1 is a two-step process. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **39** (2020), 18; 6870-6881 doi:10.1080/07391102.2020.1804455.
29. S. Sobočanec, V. Filić, M. Matovina, D. Majhen, Ž. Mačak Šafranko, M. Popović Hadžija, Ž. Krsnik, A. Gudan Kurilj, A. Šarić, M. Abramić, T. Balog. Prominent role of exopeptidase DPP III in estrogen-mediated protection against hyperoxia *in vivo*. *Redox Biology* **8** (2016), 149–159.
30. M. Matovina, D. Agic, M. Abramic, S. Matic, Z. Karačić, S. Tomic. New findings about human dipeptidyl peptidase III based on mutations found in cancer. *RSC Adv.* **7** (2017), 36326–36334.
31. B. E. Hast, D. Goldfarb, K. M. Mulvaney, M. A. Hast, P. F. Siesser, F. Yan, D. N. Hayes, M. B. Major. Proteomic analysis of ubiquitin ligase KEAP1 reveals associated proteins that inhibit NRF2 ubiquitination. *Cancer Res.* **73** (2013) 2199–2210.
32. S. Matić, A.Tomašić Paić, S. Sobočanec, M. Pinterić, G. Pipalović, M. Martinčić, M. Matovina, S. Tomić. Interdisciplinary Study of the Effects of Dipeptidyl-Peptidase III Cancer Mutations on the KEAP1- NRF2 Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (2022), 1994. <https://doi.org/10.3390/ijms23041994>.

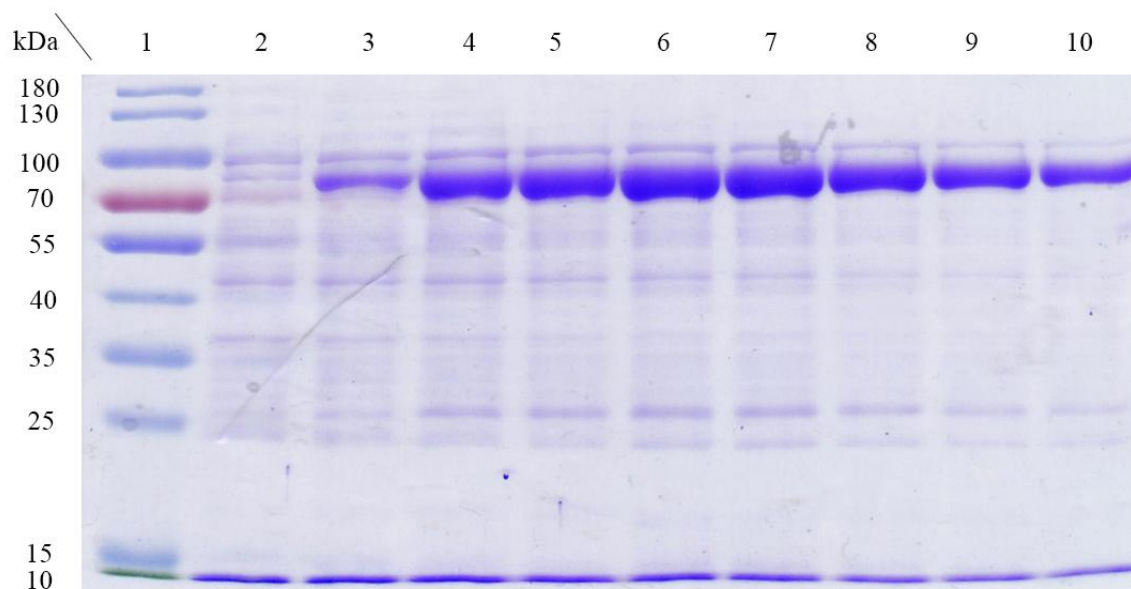
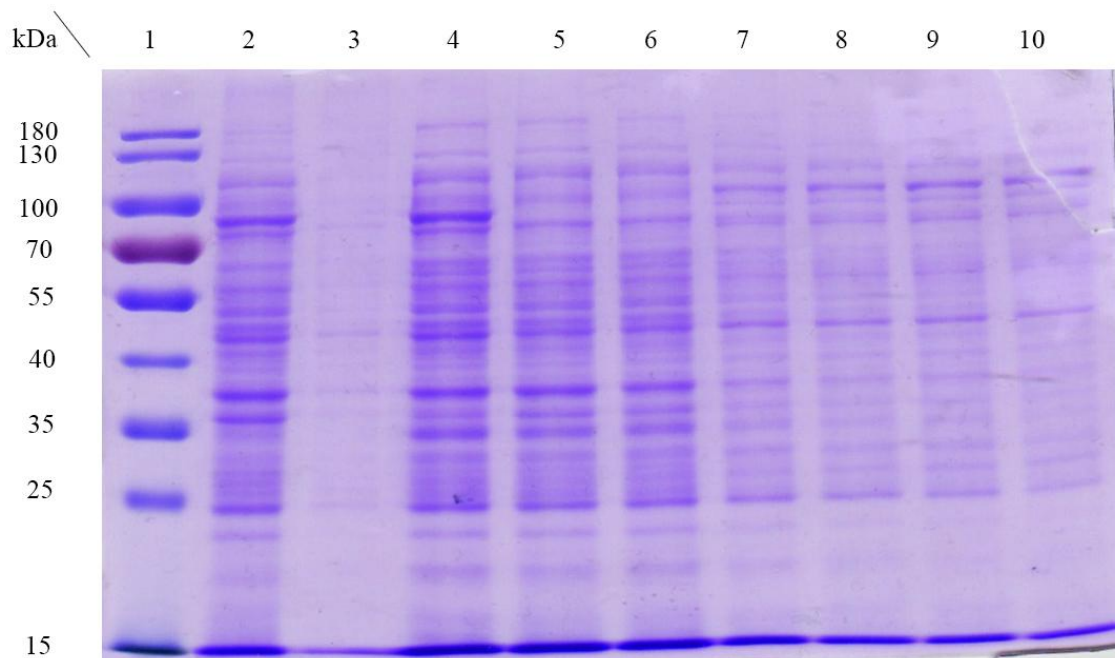
33. P. K. Baral, N. Jajčanin Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić, and K. Gruber, The first structure of dipeptidyl-peptidase III provides insight into the catalytic mechanism and mode of substrate binding, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 22316-22324.
34. A. Tomić, M. Abramić, J. Špoljarić, D. Agić, D. M. Smith, and S. Tomić, Human dipeptidyl peptidase III: Insights into ligand binding from a combined experimental and computational approach, *J. Mol. Recognit.* **24** (2011) 804-814.
35. M. Gundić, A. Tomić, R. C. Wade, M. Matovina, Z. Karačić, S. Kazazić, S. Tomić. Human DPP III – Keap1 Interactions: a Combined Experimental and Computational Study. *Croat. Chem. Acta* **89** (2016), 217–228.
36. K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel, M. Yamamoto: Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & Development* **13** (1999) 76-86.
37. G.P. Sykiotis, D. Bohmann: Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease, *Sci. Signaling* **3** (2010), 1-22.
38. M.C. Jaramillo, D.D. Zhang: The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer, *Genes Dev.* **27** (2013), 2179-2191.
39. Motohashi H, Yamamoto M.. Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* **10** (2004), 549–557.
40. Zhang Y, Gordon GB. 2004. A strategy for cancer prevention: Stimulation of the Nrf2–ARE signaling pathway. *Mol Cancer Ther* **3** (2004), 885–893.
41. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD; Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* **58** (2008), 262–270.
42. P. Canning, F. J. Sorrell, A. N. Bullock: Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radical Biology and Medicine* **88** (2015), 101–107.
43. G. M. Cooper, R. E. Hausman *Stanica Molekularni pristup: Medicinska naklada, Zagreb 2010. Str. 140-143.*
44. Ambriović Ristov i suradnici; Metode u molekularnoj biologiji, 11. Analiza proteina stanice 553-644.
45. Thermo Fisher Scientific, aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System, <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-biology-products/alicator-cloning-system.html> (datum pristupa: 15. 11. 2022.).

46. S. Magdeldin, A. Moser: Affinity chromatography: Principles and applications. ISBN 978-953-51-0457-5. IntechOpen; 2012.
47. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf (datum pristupa 9. 2. 2023.).
48. Gibco® Cell Culture Basics handbook, [Thermo Fisher Scientific](https://www.thermofisher.com), str. 8, www.invitrogen.com/cellculturebasics (pristupljeno 1. 6. 2023.)
49. Sung et al, 2006, PCR based detection of mycoplasma species, Vol 44, No1.
50. Abramić, M.; Schleuder, D.; Dolovčak, L.; Schröder, W.; Strupat, K.; Šagi, D.; Peter-Katalinić, J.; Vitale, L. Human and rat dipeptidyl peptidase III: Biochemical and mass spectrometric arguments for similarities and differences. *Biol. Chem.* 2000, 381, 1233–1243, doi:10.1515/BC.2000.151).
51. G. Pipalović: Prekomjerna ekspresija i biokemijska karakterizacija mutanata humane dipeptidil- peptidaze III iz zloćudnih tumora. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Kemijsko odsjek, 2018.
52. Olson, B. J. S. C., Markwell, J. (2007): Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science* 48: 3.4.1 – 3.4.29.
53. Kurikulum nastavnog predmeta kemija za osnovne škole i gimnazije, Ministarstvo znanosti i obrazovanja, Zagreb, 2019.
54. A. H. Johnstone, *J. Chem. Educ.* **70** (1993) 701–705.
55. V. Talanquer, *Int. J. Sci. Educ.* **33** (2011) 179–195.
56. Okvir nacionalnog kurikuluma. Ministarstvo znanosti i obrazovanja. Zagreb, 2017.
57. Ministarstvo znanosti i obrazovanja: Odluka o donošenju kurikuluma za nastavni predmet Kemije za osnovne škole i gimnazije u Republici Hrvatskoj. NN 10/2019.
58. M. Barić Tominac, A. Habuš, S. Liber, R. Vladušić: *Kemija 1*, Udžbenik iz kemije za prvi razred gimnazije, Profil Klett d.o.o., Zagreb, 2019.
59. Z. Popović, Lj. Kovačević, *Kemija 2*, Udžbenik iz kemije za drugi razred gimnazije, Alfa, Zagreb, 2019.
60. Z. Popović, Lj. Kovačević, N. Ribarić, *Kemija 3*, Udžbenik iz kemije za treći razred gimnazije Alfa, Zagreb, 2020.
61. Z. Popović, Lj. Kovačević, I. Futivić: *Kemija 4*, Udžbenik iz kemije za četvrti razred gimnazije Alfa, Zagreb, 2021.
62. Odluka o donošenju kurikuluma za nastavni predmet Biologije za osnovne škole i

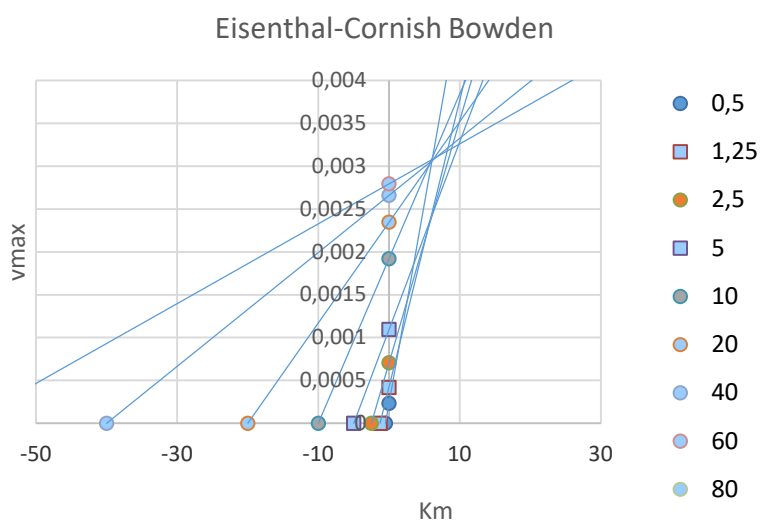
gimnazije u Republici Hrvatskoj. NN 7/2019.

63. Nacionalni centar za vanjsko vrednovanje obrazovanja: Kemija. Ispitni katalog za državnu maturu u školskoj godini 2022./2023. Zagreb, 2022.
64. C.R. Terrell, T Ekstrom, B. Nguyen, K. Nickodem, *Biochem Mol. Biol. Educ.* (2021) 1–13.
65. S..L. Bretz, K. J. Linenberger, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **40** (2012) 229–233.
66. K. J. Linenberger, S. L. Bretz, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **43** (2015) 213–222.
67. A. Jurković, *Kristalizacija derivata inzulina uz dodatak halogenida ; Integrirani pristup poučavanju probavnih enzima*. Diplomski rad. Prirodoslovno- matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Kemijski odsjek, 2018.
68. B. Bogović, *Mimetici sekundarnih struktura proteina*. Kemijski seminar 1. Prirodoslovno- matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Kemijski odsjek, 2022.
69. M. Sikirica, *Metodika nastave kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 2003., str. 1–50.

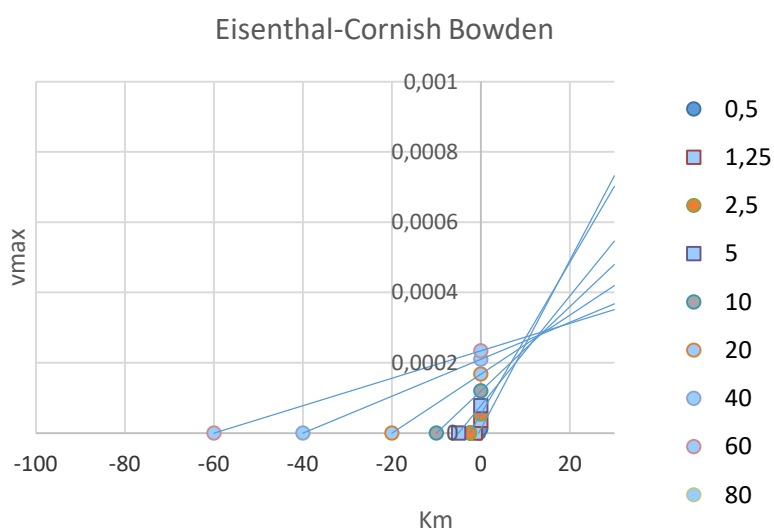
§ 9. DODATAK



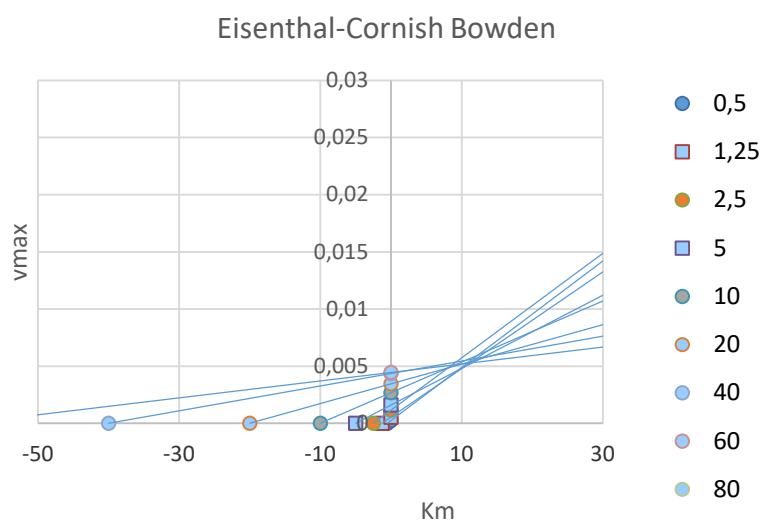
Slika D1. Prikaz elektroforeze uzorka hDPP III- V514M nakon prve ekspresije.



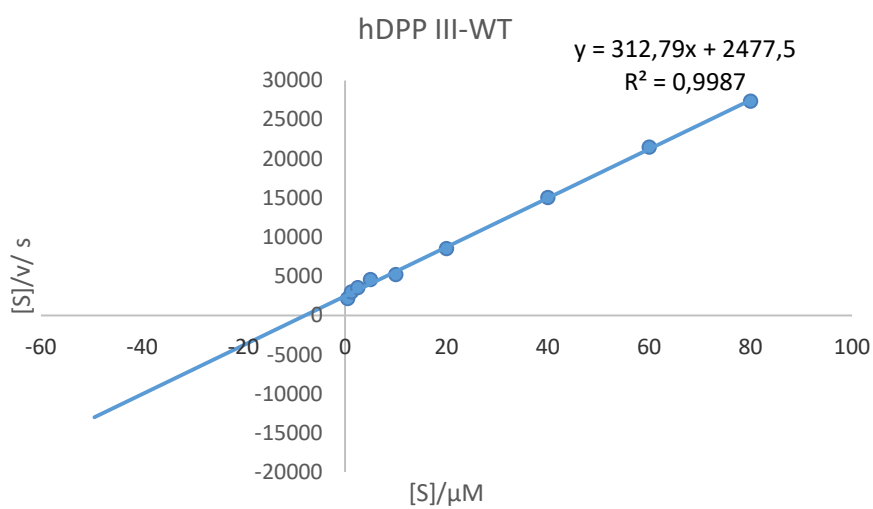
Slika D2. Grafički prikaz ovisnosti parametara KM i Vmax za „divlji“ tip WT.



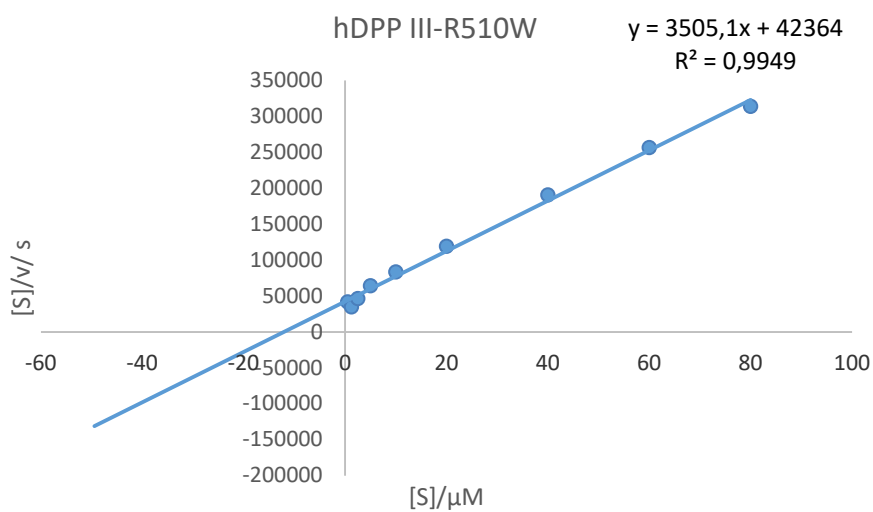
Slika D3. Grafički prikaz ovisnosti parametara KM i Vmax za mutiranu inačicu R510W.



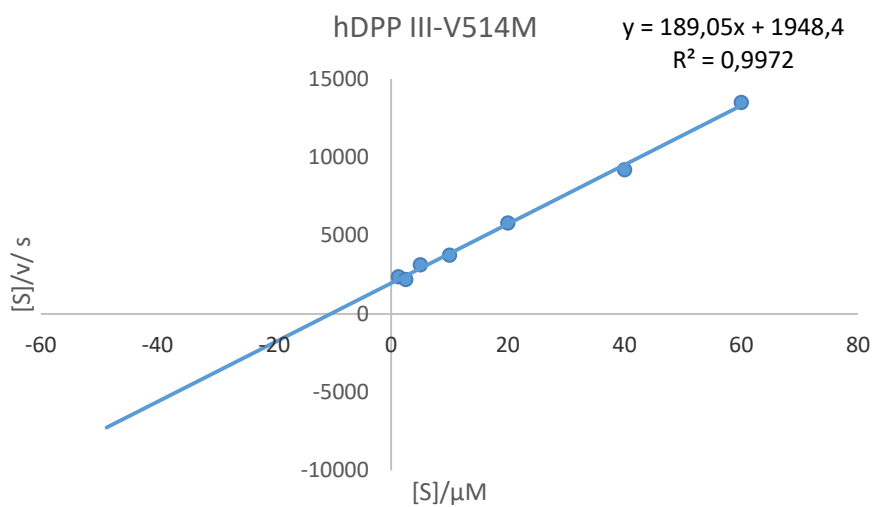
Slika D4. Grafički prikaz ovisnosti parametara KM i V_{max} za mutiranu inačicu V514M.



Slika D5. Grafički prikaz Hanes-Woolf dijagrama (izrađeno u programu *Microsoft Office Excel*).



Slika D6. Grafički prikaz Hanes-Woolf dijagrama (izrađeno u programu *Microsoft Office Excel*).



Slika D7. Grafički prikaz Hanes-Woolf dijagrama (izrađeno u programu *Microsoft Office Excel*).

§ 10. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Domagoj Christian Kindl

Datum rođenja: 15. prosinca 1992.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

1999. – 2007. Osnovna škola braće Radić, Botinec

2007. – 2011. Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb

2011. – 2023. Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije - smjer nastavnički, Prirodoslovno-matematički fakultet sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015.-2017. Dan i noć PMF-a, Otvoreni dani kemije