

Biokemijska karakterizacija hidrolaze s dvojnou enzimskom aktivnošću iz mahovine *Physcomitrella patens*

Karačić, Zrinka

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:805640>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Zrinka Karačić

**Biokemijska karakterizacija hidrolaze s dvojnou
enzimskom aktivnošću iz mahovine *Physcomitrella
patens***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Zrinka Karačić

**Biochemical characterization of a dual enzymatic
activity hydrolase from moss *Physcomitrella
patens***

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Zrinka Karačić

**Biokemijska karakterizacija hidrolaze s dvojnou
enzimskom aktivnošću iz mahovine *Physcomitrella*
*patens***

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Branka Salopek Sondi

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Zrinka Karačić

**Biochemical characterization of a dual enzymatic
activity hydrolase from moss *Physcomitrella patens***

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Branka Salopek Sondi

Zagreb, 2018

Ova disertacija izrađena je u Laboratoriju za celularnu biokemiju, od 2016. preustrojenog u Laboratorij za biokemiju proteina i molekulske modeliranje Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr. sc. Branke Salopek Sondi, u sklopu sveučilišnog poslijediplomskog (dokorskog) studija kemije pri Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dio eksperimentalnog rada izveden je u Laboratoriju za kemijsku biologiju Instituta Ruđer Bošković, a priprema *knock-out* mutanti mahovine u laboratoriju prof. dr. Ralfa Reskia na Biološkom fakultetu Sveučilišta u Freiburgu, Njemačka.

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Branki Salopek Sondi na strpljenju, vodstvu i podršci tijekom izrade ove doktorske disertacije. Također zahvaljujem dr. sc. Mariji Abramić, pod čijim sam mentorstvom započela rad, na pruženoj prilici da radim na ovoj temi, i na vodstvu tijekom mojih prvih triju godina rada.

Kolegama iz raznih sastava Laboratorija za biokemiju proteina i molekulsko modeliranje, Laboratorija za kemijsku biologiju i Laboratorija za kemijsku i biološku kristalografiju: hvala što ste me slušali, trpili i savjetovali. Bez vas, rad ne bi bio tako zabavan i uzbudljiv.

Konačno, mužu zahvaljujem na mlakoj potpori i toplim obrocima.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XV
ABSTRACT	XVII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Dipeptidil-peptidaza III.....	3
2.1.1. <i>Mehanizam peptidazne reakcije.....</i>	<i>4</i>
2.1.2. <i>Fiziološka uloga.....</i>	<i>6</i>
2.2. Nudix-hidrolaze.....	7
2.2.1. <i>Mehanizam fosfatazne reakcije.....</i>	<i>8</i>
2.2.2. <i>Supstrati Nudix-hidrolaza.....</i>	<i>10</i>
2.2.3. <i>Nudix-hidrolaze uročnjaka.....</i>	<i>12</i>
2.3. Izopentenil-difosfat-izomeraza.....	13
2.3.1. <i>Mehanizam izomerazne reakcije.....</i>	<i>14</i>
2.3.2. <i>Putevi biosinteze izoprenoida.....</i>	<i>15</i>
2.3.3. <i>Biosinteza izoprenoidnih citokinina.....</i>	<i>18</i>
2.4. Biljni modelni organizmi.....	19
2.4.1. <i>Uročnjak (Arabidopsis thaliana).....</i>	<i>19</i>
2.4.2. <i>Mahovina Physcomitrella patens.....</i>	<i>20</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. Materijali.....	24
3.1.1. <i>Kemikalije.....</i>	<i>24</i>
3.1.2. <i>Enzimi i drugi reagensi za molekularnu biologiju.....</i>	<i>24</i>
3.1.3. <i>Komercijalni setovi.....</i>	<i>25</i>
3.1.4. <i>Bakterijski sojevi.....</i>	<i>25</i>
3.1.5. <i>Biljni materijal.....</i>	<i>25</i>
3.1.6. <i>Instrumenti i aparature.....</i>	<i>25</i>
3.1.7. <i>Programi.....</i>	<i>26</i>
3.2. Bioinformatičke metode	26
3.2.1. <i>Pretraživanje baza podataka.....</i>	<i>26</i>
3.2.2. <i>Filogenetska analiza.....</i>	<i>26</i>
3.2.3. <i>Kreiranje modela strukture.....</i>	<i>27</i>
3.3. Biokemijske metode	27

3.3.1. Kloniranje gena u ekspresijske vektore i ekspresija proteina.....	27
3.3.2. Pročišćavanje proteina	29
3.3.3. Ciljana mutagenaza.....	30
3.3.4. Kristalizacija proteina	30
3.3.5. Priprema poliklonskog antitijela.....	31
3.3.6. Test peptidazne aktivnosti	32
3.3.7. Test fosfatazne aktivnosti	32
3.3.8. Test izomerazne aktivnosti	35
3.4. Metode rada s mahovinom <i>P. patens</i>	36
3.4.1. Uzgoj mahovine.....	36
3.4.2. Obrada tkiva prilikom izolacije makromolekula.....	38
3.4.3. Izolacija kloroplastnih proteina.....	38
3.5. Mjerenje razine transkripcije gena	39
3.5.1. Tretman mahovine.....	39
3.5.2. Izolacija RNA	39
3.5.3. Reverzna transkripcija RNA	40
3.5.4. Kvantitativni RT-PCR (<i>qRT-PCR</i>).....	40
3.6. Priprema i probir <i>knock-out</i> mutanti mahovine	41
3.6.1. Kreiranje genskog konstrukta	41
3.6.2. Transformacija protoplasta i selekcija	43
3.6.3. Probir <i>knock-out</i> linija na temelju analize DNA.....	44
3.6.4. Probir <i>knock-out</i> linija na temelju analize RNA	46
3.6.5. Probir <i>knock-out</i> linija na temelju analize proteina	46
3.7. Analiza <i>knock-out</i> mutanti mahovine.....	47
3.7.1. Analiza fenotipa <i>knock-out</i> linija	47
3.7.2. Analiza sadržaja citokinina.....	48
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	49
4.1. Identifikacija homolognih proteina	49
4.1.1. Filogenija biljnih Nudix-DPP III proteina	49
4.1.2. Homolozi DPP III i pojavnost DPP III u živom svijetu	55
4.1.3. Homolozi atipične Nudix domene	58
4.1.4. Model strukture.....	60
4.2. Ekspresija, pročišćavanje i strukturna analiza proteina.....	63
4.3. Peptidazna aktivnost.....	66
4.3.1. Peptidazna aktivnost varijanti pripremljenih ciljanom mutagenozom.....	68
4.4. Testiranje izomerazne aktivnosti.....	69

4.5. Fosfatazna aktivnost	72
4.5.1. Ispitivanje potencijalnih supstrata Nudix-DPP III	72
4.5.2. Testiranje drugih izoprenoid-difosfata kao supstrata.....	77
4.5.3. Fosfatazna aktivnost varijante Tyr123Ala.....	78
4.6. Međuovisnost peptidazne i fosfatazne aktivnosti.....	80
4.7. Promjena razine transkripcije u uvjetima stresa.....	82
4.8. Priprema i karakterizacija knock-out mahovine.....	84
4.8.1. Probir knock-out linija.....	84
4.8.2. Validacija anti-PpND antiseruma.....	86
4.8.3. Fenotip knock-out linija u standardnim uvjetima rasta.....	87
4.8.4. Fenotip knock-out linija u uvjetima stresa.....	87
4.8.5. Mjerenje razine citokinina u mutantama mahovine.....	88
4.9. Doprinos istraživanja.....	91
§ 5. ZAKLJUČAK	93
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ.....	95
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	100
§ 8. DODATAK.....	XIX
§ 9. ŽIVOTOPIS	XX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

Biokemijska karakterizacija hidrolaze s dvojnomo enzimskom aktivnošću iz mahovine
Physcomitrella patens

Zrinka Karačić
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Nudix-dipeptidil-peptidaza III je biljni enzim s dvojnomo hidrolaznom aktivnošću: dipeptidil-peptidaznom (DPP III) i fosfataznom (Nudix). Biokemijski su okarakterizirani homolozi iz mahovine (*Physcomitrella patens*) i uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*). C-terminalna domena oba homologa predstavlja atipičnu DPP III s obzirom na aktivno mjesto (pentapeptid HEXXH umjesto heksapeptida HEXXGH u tipičnim DPP III), te je slabije aktivna prema sintetskim supstratima u usporedbi s tipičnim, do sada istraženim DPP III. N-terminalna domena je član nadporodice Nudix proteina. Utvrđeno je da Nudix domena ima fosfataznu aktivnost prema supstratima izopentenil-difosfatu i dimetilalil-difosfatu, prekursorima u sintezi izoprenoida. Funkcionalnim istraživanjima na mutantama mahovine *P. patens* koje ne eksprimiraju ovaj enzim pokazano je da on sudjeluje u metabolizmu biljnih hormona citokinina. Preliminarni rezultati analize ekspresije gena u mahovini u prisutnosti stresora sugeriraju da enzim Nudix-DPP III sudjeluje u odgovoru biljaka na stres (sušu, solni i oksidacijski stres). Zaključno, predložen je naziv izopentenil-difosfat-fosfohidrolaza za novopronađenu enzimsku aktivnost.

(108 + xxii stranica, 55 slika, 15 tablica, 189 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: Nudix-hidrolaza/ dipeptidil-peptidaza III/ *Physcomitrella patens*/ izopentenil-difosfat

Mentor: dr. sc. Branka Salopek Sondi, zn. savj.

Rad prihvaćen: 6. lipnja 2018.

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
2. dr. sc. Ivana Lešćić Ašler, zn. sur.
3. izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

Biochemical characterization of a dual enzymatic activity hydrolase from moss
Physcomitrella patens

Zrinka Karačić

Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Nudix-dipeptidyl peptidase III is a plant enzyme with dual hydrolase activity: dipeptidyl-peptidase III (DPP III) and phosphatase (Nudix). Homologues from moss (*Physcomitrella patens*) and angiosperm (*Arabidopsis thaliana*) were biochemically characterized. C-terminal domain of both homologues represents an atypical DPP III considering the active site (pentapeptide HEXXH instead of hexapeptide HEXXGH in typical DPPs III), and it is less active towards synthetic substrates than typical, formerly characterized DPPs III. N-terminal domain is a member of Nudix superfamily. It was established that it has phosphatase activity towards isopentenyl-diphosphate and dimethylallyl-diphosphate, precursors in isoprenoid synthesis. Functional research on moss *P. patens* knock-out mutants showed that this enzyme is involved in cytokinin metabolism. Preliminary analysis of gene expression in the presence of stressors suggests that Nudix-DPP III enzyme is involved in plant response to stress (drought, salt and oxidative stress). Finally, the name isopentenyl diphosphate phosphohydrolase is suggested for the newly identified enzyme activity.

(108 + xxii pages, 55 figures, 15 tables, 189 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: Nudix hydrolase/ dipeptidyl-peptidase III/ *Physcomitrella patens*/ isopentenyl-diphosphate

Supervisor: Dr. Branka Salopek Sondi, Senior Scientist

Thesis accepted: June 6th 2018

Reviewers:

Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
Dr. Ivana Leščić Ašler, Research Associate
Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Associate Professor

§ 1. UVOD

Nudix-dipeptidil-peptidaza III je enzim prvi puta opisan 2013. godine u Laboratoriju za celularnu biokemiju Instituta Ruđer Bošković, kada je ispitana peptidazna aktivnost proteina iz mahovine *Physcomitrella patens*, te je pokazano da je riječ o dipeptidil-peptidazi III, iako atipičnoj¹. Naime, iako sličnost aminokiselinske sekvence i biokemijske karakteristike smještaju ovaj enzim u M49 porodicu peptidaza, to jest u porodicu dipeptidil-peptidaza III (DPP III), ovaj enzim ima atipični motiv aktivnog mjesta. Osim toga, znakovita je i prisutnost dodatne domene na N-kraju proteina, tzv. Nudix domene, koju se klasificira u nadporodicu Nudix proteina. Kao samostalni proteini, ti enzimi su najčešće fosfataze koje djeluju na derivate nukleozida (nukleozid-difosfate vezane na neku skupinu X)². Enzimsku aktivnost ove domene nije bila poznata niti ispitivana do izrade ove doktorske disertacije. Zbog atipičnosti aminokiselinske sekvence, nije bilo moguće pretpostaviti mogući supstrat ovog enzima isključivo bioinformatičkom analizom. Protein Nudix-DPP III je naknadno pronađen i u drugim biljnim genomima, na primjer u uročnjaku (*Arabidopsis thaliana*), ali nije nađen u organizmima izvan grupe kopnenih biljaka (*Embryophyta*). Činjenice da je riječ o proteinu specifičnom prema arhitekturi domena, da su i same domene atipične, te da je taksonomski ograničen samo na kopnene biljke, čine ovaj protein iznimno zanimljivim. Postoji mogućnost da enzim ima ulogu u biljno-specifičnom metabolizmu, te da je bitan za rast i razvoj biljaka kao i prilagodbu promjenjivim ekološkim uvjetima.

Cilj ovog rada bila je biokemijska i funkcionalna karakterizacija proteina Nudix-dipeptidil-peptidaza III iz mahovine *Physcomitrella patens* (*P. patens* Nudix-DPP III, PpND). Prethodno je napravljena analiza aminokiselinske sekvence proteina, iz čega je izvedeno nekoliko hipoteza. Prva hipoteza glasi da je Nudix domena u ovom proteinu nositelj fosfatazne aktivnosti prema novom, dosad nepoznatom supstratu. U tu svrhu pripremljen je heterologno eksprimiran protein u bakteriji *Escherichia coli*, obilježen histidinskim privjeskom za olakšano pročišćavanje. Ispitivanje aktivnosti supstrata provedeno je u suradnji s grupom prof. dr. sc. Stevena E. Brennera u Berkeleyu, Kalifornija (SAD). Nadalje, istražena je i peptidazna aktivnost enzima. Kako bi se pokazala relevantnost nalaza za sve homologe iz

biljnih organizama, biokemijski je okarakteriziran i homologni protein iz uročnjaka (*Arabidopsis thaliana* Nudix-DPP III, AtND).

Druga hipoteza glasila je da su peptidazna i fosfatazna aktivnost međusobno neovisne. Iako je ova hipoteza postavljena na početku rada na ovoj doktorskoj disertaciji, na tom dijelu istraživanja je pod mojim neposrednim vodstvom radila studentica Iva Sućec prilikom izrade rada za Rektorovu nagradu³ 2016. Rezultati će stoga biti samo diskutirani.

Konačno, treća hipoteza jest da enzim ima bitnu ulogu u biljnom rastu i razvitku te u prilagodbi na okolišne uvjete. Za ispitivanje te hipoteze provedena je analiza ekspresije gena koji kodira za enzim Nudix-DPP III u mahovini *P. patens* uslijed djelovanja različitih čimbenika stresa i biljnih regulatora rasta metodom kvantitativnog PCR-a (lančane reakcije polimeraze, engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Također, pripremljene su i *knock-out* mutante mahovine, u kojima nema ekspresije proteina Nudix-DPP III. Naime, mahovina *P. patens* ima iznimnu sposobnost homologne rekombinacije DNA, što se koristi u svrhu pripreme mutanti s izmijenjenim slijedom nukleotida, ili zamjenom dijela gena markerom za antibiotsku selekciju⁴, kao što je napravljeno u ovom radu. Priprema *knock-out* mahovine provedena je u laboratoriju prof. dr. sc. Ralfa Reskia u Freiburgu (Njemačka). Na mutantama je bilo moguće ispitivati ulogu proteina u rastu i razvoju organizma praćenjem fenotipa u usporedbi s divljim tipom, kao i funkciju enzima *in vivo* mjerenjem razine metabolita od interesa.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Dipeptidil-peptidaza III

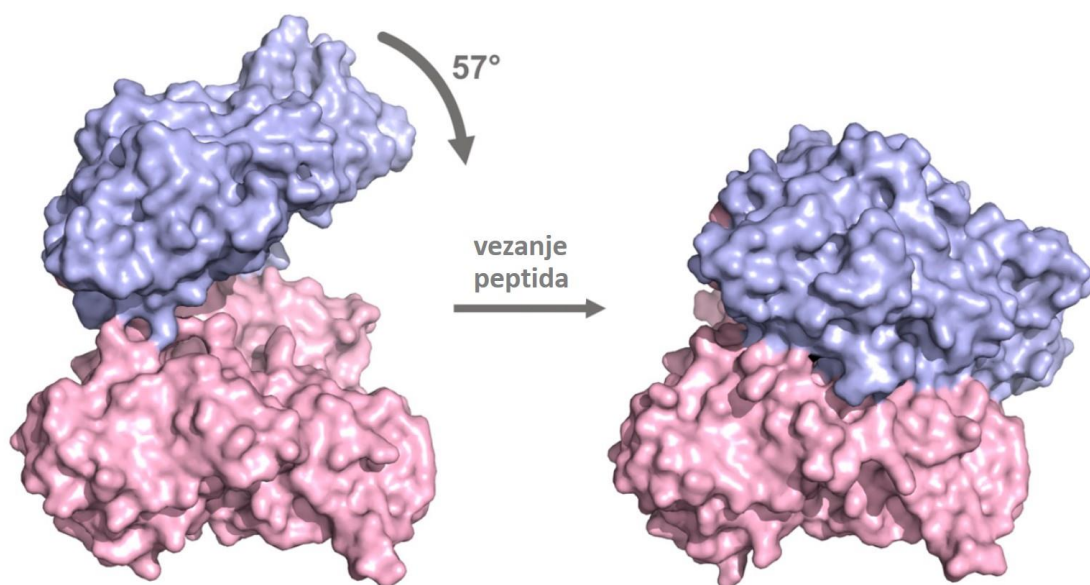
Dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je cink-ovisna metalopeptidaza, prepoznata kao specifičan enzim 60-ih godina 20. stoljeća⁵, kada su identificirane prve četiri DPP. Dipeptidil-peptidaze odcjepuju dipeptide sa slobodnog N-kraja peptida. DPP III je jedina metalopeptidaza među njima. Enzim je pročišćen iz raznih tkiva životinja i kao rekombinantni protein iz brojnih drugih organizama⁶. Riječ je o monomernom proteinu veličine oko 80 kDa u životinja⁶, a 60-75 kDa u bakterija⁷⁻⁹. U većini slučajeva je topljiv citoplazmatski protein⁶ bez signalnih peptida za unos u organele. Specifična reakcija za detekciju DPP III je hidroliza umjetnog supstrata⁶ diarginil-2-naftilamida (Arg₂-2NA) ili diarginil-4-metilkumarin-7-amida, što su preferirani supstrati za većinu DPP III. Ljudska DPP III kao supstrate prihvaća peptide dužine 4-10 aminokiselina. Optimalni pH za peptidaznu reakciju je blago bazičan⁶, oko 8,0. S obzirom da su metalopeptidaze, DPP III su inhibirane kelirajućim agensima, a sve se u nekoj mjeri aktiviraju u prisutnosti kobaltonih iona⁶, Co²⁺. Enzim također inhibiraju reducirajuća sredstva poput ditionitola, cisteina i β-merkaptetanola, što se objašnjava time da se slobodni tioli vežu na Zn²⁺. Zabilježena je također i inhibicija sulfhidril-blokirajućim spojevima kao što su *p*-merkuribenzoat, *N*-etilmaleimid i jodoacetamid. Na primjeru štakorske¹⁰, kvaščeve¹¹ i ljudske¹² DPP III istraživana je molekularna osnova takve reakcije, no nije bilo moguće identificirati samo jedan cistein koji bi bio nužan za enzimsku aktivnost – u svakom homologu najveći doprinos inaktivaciji davao je drugi cisteinski ostatak, a među DPP III ne postoji nijedan u potpunosti očuvan Cys.

DPP III su u enzimskoj nomenklaturi Međunarodne unije za biokemiju i molekularnu biologiju svrstane u hidrolaze koje djeluju na peptidne veze (peptidaze – preporučeni naziv za proteaze i proteinaze¹³) i pridružena im je oznaka EC 3.4.14.4. U MEROPS hijerarhijskom sustavu klasifikacije proteolitičkih enzima¹⁴ koji svrstava enzime prema srodnim sekvencama u porodice i prema srodnim strukturama u klanove, DPP III čine zasebnu porodicu metalopeptidaza M49. Porodica M49 je grupirana u klan MA, specifičnije u podklan MA(E), zbog strukturne sličnosti aktivnog mjesta s termolizinom¹⁵. Cerdà-Costa i Gomis-Rüth¹⁶ hijerarhijski klasificiraju metalopeptidaze prema arhitekturi aktivnog mjesta i sličnosti načina smatanja (engl. *fold*) u plemena, klanove i porodice. U plemenu zincina, s općenitim motivom

HEXXH, i klanu gluzincina s motivom HEXXH + E/HXXZ, DPP III su smještene u posebnu porodicu zbog proširenog motiva HEXXH+EER/KXAE/D – zeleno označeni ostaci kompleksiraju cink, ružičasti predstavljaju opću kiselinu ili bazu, Z mogu biti A, F, S, G, i T, a X je bilo koja aminokiselina. Gluzincini su tako nazvani zbog toga što je treći ligand cinka najčešće glutamat.

2.1.1. Mehanizam peptidazne reakcije

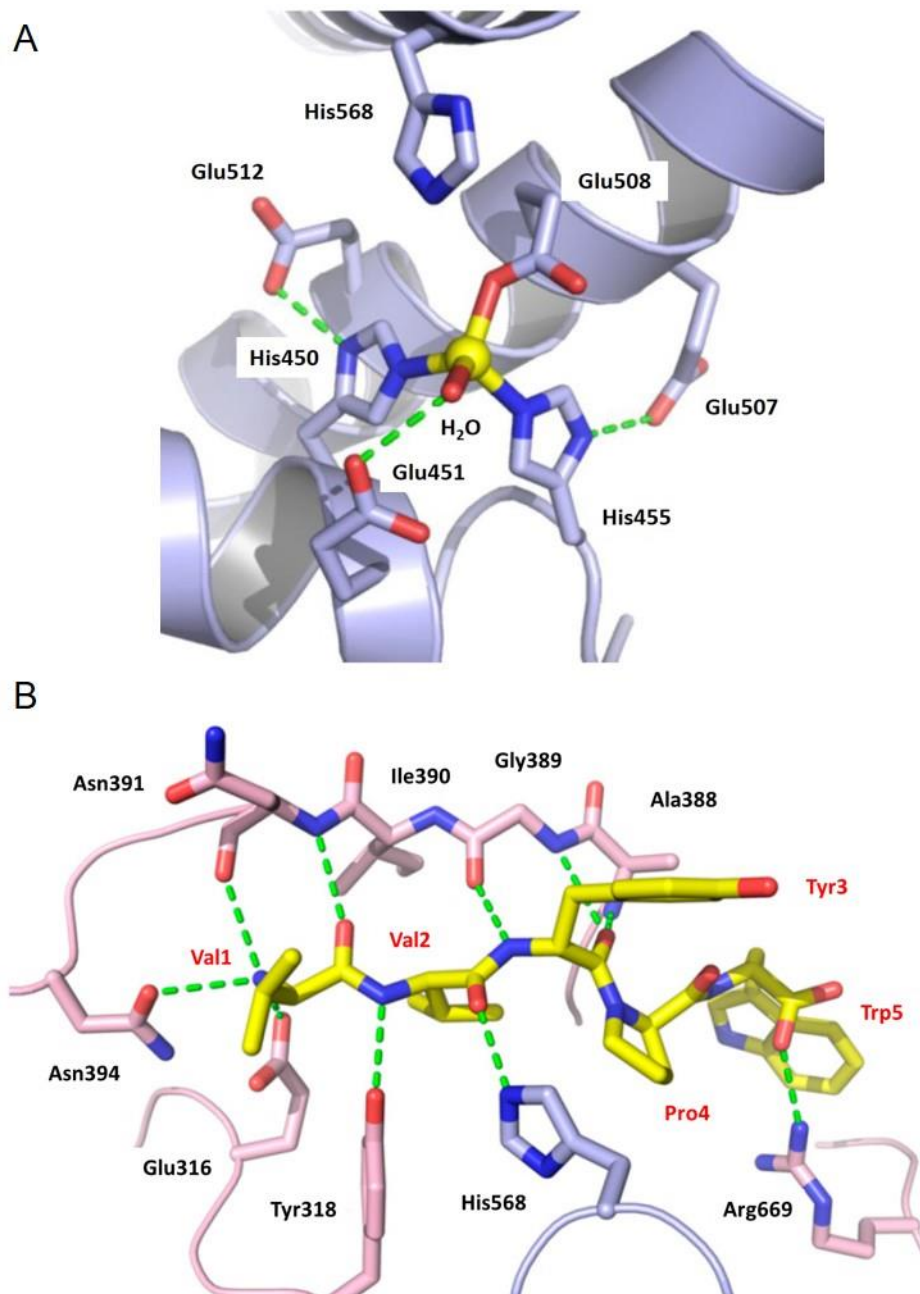
U bazi podataka *Protein Data Bank* (PDB, u ožujku 2018.) postoji 17 kristalografskih struktura 5 različitih DPP III – iz eukariota *Saccharomyces cerevisiae*¹⁵, *Homo sapiens*^{17,18} i *Armillariella tabescens*¹⁹, te prokariota *Bacteroides thetaiotaomicron*⁸ i *Caldithrix abyssi*⁹. DPP III kristalizira u dvije forme: otvorenoj, s velikim razmakom između dviju strukturnih domena, i zatvorenoj, gdje su domene u bliskom kontaktu, često s molekulom inhibitora ili supstrata vezanom u supstratnom mjestu (slika 1).



Slika 1. Prilikom vezanja molekule u procijep između dviju strukturnih domena DPP III dolazi do zatvaranja strukture i nastajanja aktivnog oblika enzima, prikazano na primjeru ljudskog homologa¹⁷.

Ljudska DPP III je najbolje istražena^{17,18}, pa je koristim kao primjer za opis mehanizma reakcije (slika 2, aminokiselinski ostaci označeni su kao u ljudskoj DPP III, UniProt: Q9NY33). Prema prikazu na slici 1, aktivno mjesto nalazi se na donjem dijelu gornje domene. (Taj je prikaz uvriježen za DPP III, iako je 2012. predložena obrnuta orijentacija domena kao standardni prikaz svih metalopeptidaza²⁰.) Vezno mjesto cinka grade dva motiva, HELLGH i

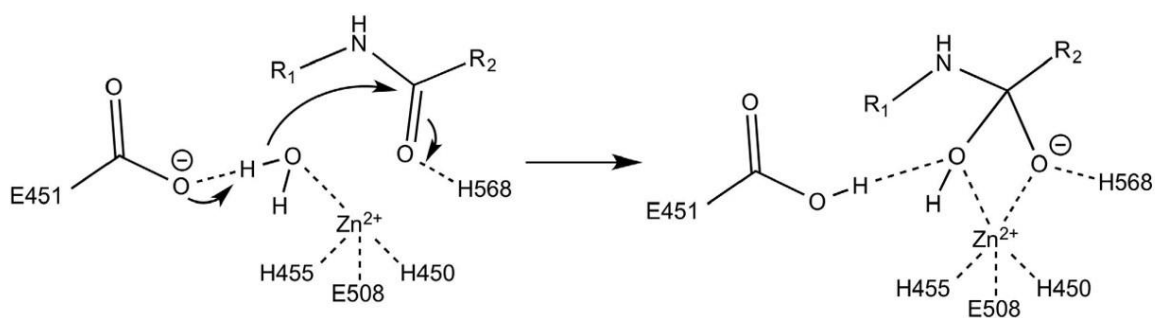
EECRAE, koji čine 3. i 4. očuvanu regiju²¹ DPP III. U aktivnom mjestu DPP III nužna je prisutnost iona cinka i katalitičkog glutamata (HE⁴⁵¹LLGH). Cink je koordiniran molekulom vode, dvama histidinima i glutamatom (H⁴⁵⁰ELLGH⁴⁵⁵ i EE⁵⁰⁸CRAE). Drugu koordinacijsku sferu cinka čine još dva glutamata, koji stvaraju vodikove veze s histidinima iz prve koordinacijske sfere (E⁵⁰⁷ECRAE⁵¹²).



Slika 2. Aktivno mjesto ljudske DPP III. A) Koordinirajuća sfera iona cinka (žuto), B) vezanje tinorfina (VVYPW, žuto, oznake crveno). Preuzeto uz izmjene od Bezerra i sur.¹⁷

Nasuprot aktivnog mjesta, u donjoj strukturnoj domeni nalazi se β -ploča građena od pet antiparalelnih niti, a peptidni supstrat se veže kao produžetak β -ploče. U vezanju slobodnog N-kraja supstrata sudjeluju glutamat na poziciji 316 i asparagin na poziciji 394, iz 1. i 2. očuvane regije, redom. Okosnica peptidnog lanca 2. regije ($A^{388}GI^{391}$) te tirozin na poziciji 318 (1. regija) i histidin na poziciji 568 (5. regija) interakcijama s okosnicom liganda sudjeluju u pozicioniranju peptidne veze za cijepanje.

Mehanizam reakcije sličan je onom termolizina¹⁵, a deduciran je iz struktura kompleksa proteina i liganda^{17,18} i kvantno-mehaničkih – molekulske-mehaničkih (engl. *quantum mechanics – molecular mechanics*, QM/MM) računa²² (slika 3). Katalitički glutamat E451 djeluje kao opća baza i aktivira molekulu vode, koja nukleofilnim napadom na karbonilni ugljik druge peptidne veze supstrata stvara C-O vezu. Tada dolazi do inverzije konfiguracije na dušikovom atomu peptidne veze, koju slijedi protonacija i odcjepljivanje amina.



Slika 3. Prikaz nukleofilnog napada i nastanka prvog prijelaznog stanja, s ostacima označenim kao u ljudskoj DPP III¹⁸.

2.1.2. Fiziološka uloga

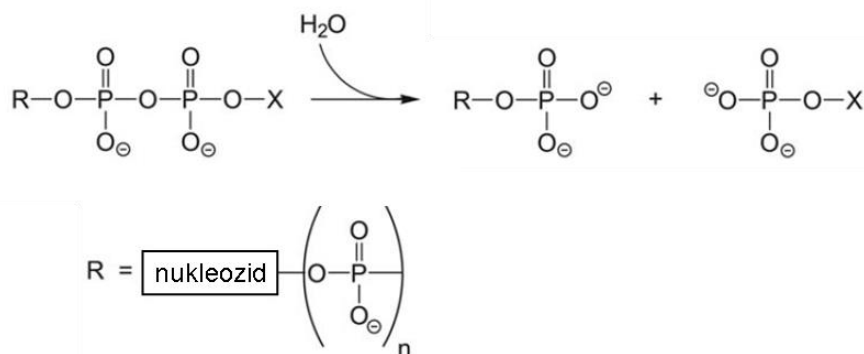
Fiziološka uloga DPP III nije poznata. Pretpostavlja se da ovaj enzim sudjeluje u unutarstaničnom katabolizmu peptida nakon razgradnje proteina u proteasomu, s obzirom da ima široku supstratnu specifičnost i da se nalazi u citoplazmi stanice, te da je široko rasprostranjen u živom svijetu, i prisutan u raznim tkivima. Jedino za ljudsku DPP III, koja je i najbolje istražena, postoje pretpostavke o specifičnim fiziološkim supstratima. Pokazano je da ovaj enzim cijepa endomorfine, hemorfine i egzorfine²³. Ti nalazi sugeriraju da je DPP III uključena u regulaciju boli. Dodatno, sugerirana je uloga DPP III u metabolizmu angiotenzina II²⁴, te se razmatra kao terapija u slučaju hipertenzije²⁵.

Povrh peptidazne aktivnosti, ljudska DPP III povezana je s reakcijom stanice na oksidacijski stres^{26,27}. Takvo djelovanje ograničeno je samo na kralježnjake, koji imaju vezni

motiv ETGE u petlji⁸ između 3. i 4. očuvane regije DPP III. Protein Keap1, koji prepoznaje taj vezni motiv, također je pronađen samo u kralježnjaka. U slučaju oksidacijskog stresa zabilježen je prijenos DPP III u jezgru stanice²⁸, zasad nepoznatim mehanizmom.

2.2. Nudix-hidrolaze

Akronim Nudix dolazi od opisa “nukleozid-difosfat vezan na neku skupinu X”, što je bio predloženi konsenzusni naziv za supstrate MutT-sličnih fosfataza 1996. godine, tada nazvanih Nudix-hidrolazama²⁹. Sam akronim može se odnositi na više različitih pojmova i potrebno je točno precizirati za što se upotrebljava. Nudix-hidrolazama nazivamo enzime koji djeluju kao fosfataze ili pirofosfohidrolaze² (slika 4). Iako je Nudix prvotno uveden kao zajednički naziv za supstrate, danas je poznato da je ovaj naziv zavaravajući te da je jedina zajednička karakteristika svih supstrata Nudix-hidrolaza difosfatna ili pirofosfatna skupina³⁰. Nudix-hidrolazama-slične proteine karakterizira istovjetni način smatanja, nazvan *Nudix fold* (SCOPE³¹ v2.07, nadporodica d.113.1) - sve proteine s takvim načinom smatanja svrstava se u Nudix nadporodicu, no nemaju svi fosfatnu aktivnost. Konačno, naziv *Nudix box* odnosi se na očuvani aminokiselinski slijed prisutan u Nudix-hidrolazama, GX₅EX₇REUXEEXGU, gdje je X bilo koja aminokiselina, a U izoleucin, leucin ili valin³².



Slika 4. Reakcija koju kataliziraju Nudix-hidrolaze. R mogu biti razne skupine, no kanonski su to nukleozidi s jednom do četiri fosfatne skupine. X skupina nije specificirana, i može biti fosfatni ion, ili skupina slična R, nukleozid-fosfat. Prikaz je modificiran prema Srouji i sur.³⁰

Članove Nudix nadporodice koji nisu Nudix-hidrolaze možemo podijeliti u tri bitne skupine³⁰: izopentenil-difosfat-izomeraze, MutY-slične adenin/gvanin-specifične adenin-glikozilaze, te neenzimske domene. Ove posljednje između ostalog imaju funkcije regulacije aktivnosti drugih proteina (npr. vezanjem nukleotidnih kofaktora³³), ADP-riboza-ovisne regulacije transkripcije³⁴ ili otvaranja kalcij-specifičnih membranskih kanala vezanjem ADP-

riboze³⁵. No, neki autori koriste naziv Nudix nadporodica samo za Nudix-hidrolaze, dok drugi tu uvrstavaju sve Nudix-slične proteine. Kako bi se izbjegle zabune, najnoviji je prijedlog koristiti naziv Nudix klan za sve proteine s Nudix načinom smatanja³⁰.

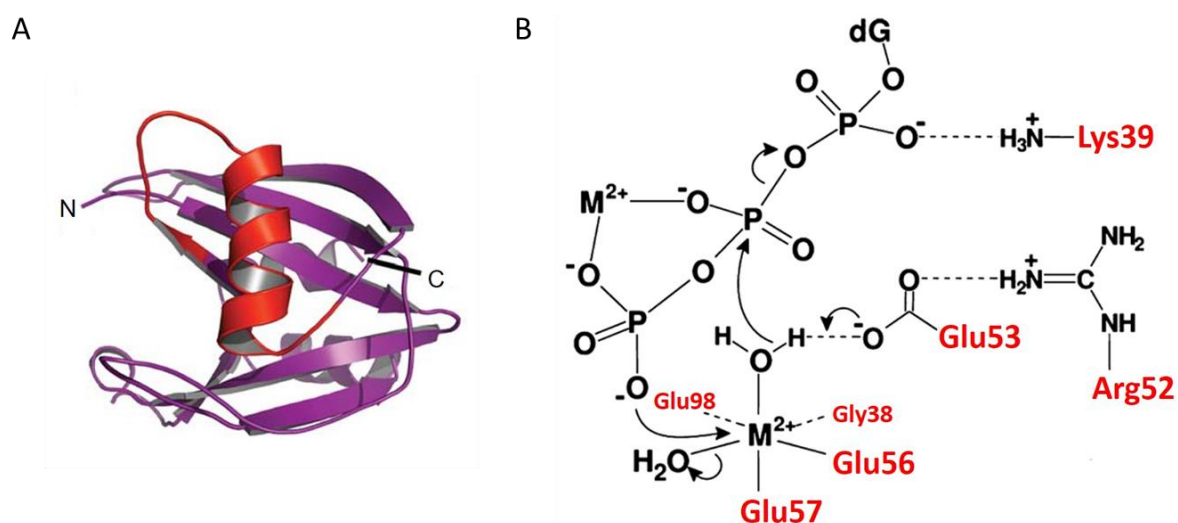
Nudix-hidrolaze su iznimno raznoliki proteini, prisutni u svim organizmima³⁰, a postoje i 262 riješene strukture (pristup bazi PDB 9.3.2018.). Većina je prema enzimskoj reakciji svrstana u kategoriju EC 3.6.1. – hidrolaze koje djeluju na fosfoanhidridnu vezu³⁰. Riječ je o malim proteinima, veličine 16-35 kDa. Ovi metaloenzimi mogu imati jedan do tri bivalentna kationa, najčešće Mg^{2+} ili Mn^{2+} , u aktivnom mjestu. Pri tome je magnezij vjerojatno fiziološki najrelevantniji kation³⁶. Katalitička baza je uglavnom glutamat, koji može biti očuvan u motivu *Nudix box*, ali može biti i drugdje u sekvenci³⁶.

U genomu *E. coli* pronađeno je 13 Nudix-hidrolaza³⁷, 18 u čovjeku³⁸, a čak 28 u uročnjaku³⁹. Prema prototipu porodice, proteinu MutT iz bakterije *E. coli*, bilo je pretpostavljeno da ovi enzimi imaju ulogu održavanja stanice uklanjanjem oštećenih metabolita (engl. *housecleaning enzymes*)²⁹, ali novija saznanja upućuju da imaju funkcije u raznim aspektima metaboličke regulacije⁴⁰. No, utvrđivanje njihove funkcije je zahtjevno, a nekima, npr. proteinu YfcD iz *E. coli*³⁷, unatoč tome što mu je poznata i struktura, nisu identificirani supstrati.

2.2.1. Mehanizam fosfatazne reakcije

Nudix-hidrolaze imaju arhitekturu β -hvata⁴¹ (engl. *β -grasp*), ponekad nazivanog i $\alpha/\beta/\alpha$ sendvičem³⁶. Očuvani motiv *Nudix box* čini strukturni motiv petlja-uzvojnica-petlja (engl. *loop-helix-loop*, slika 5A), koji veže jedan ili više metalnih kationa³⁰. Kationi orijentiraju difosfatnu skupinu u aktivnom mjestu.

Protein MutT iz *E. coli* (UniProt: P08337) je prvotno identificiran kao nužan u sprječavanju integracije mutagenog nukleotida 8-okso-2'-deoksigvanozin-5'-trifosfata (8-oxo-dGTP) u DNA²⁹, tako što cijepa α - β -fosfoanhidridnu vezu supstrata, dajući kao produkte difosfat i 8-oxo-dGMP. Time se sprječava štetna integracija oštećene baze u genom, i posljedične pogubne mutacije. MutT koristim kao primjer mehanizma djelovanja Nudix-hidrolaza (slika 5B). Mehanizam je postuliran na osnovi struktura proteina s analogom supstrata u otopini⁴².



Slika 5. Nudix-hidrolaze: struktura i mehanizam djelovanja. A) Primjer Nudix smatanja (*Nudix fold*), s crveno istaknutim očuvanim motivom hidrolaza, *Nudix box*, i označenim krajevima proteina, modificirano prema Srouji i sur.³⁰ B) Mehanizam reakcije na primjeru *E. coli* MutT, modificirano prema Mildvan i sur.⁴³, tako da su aminokiselinski ostaci obojani crveno, a pojedini su dio motiva *Nudix box*: **G³⁸X₅EX₇R⁵²E⁵³UXE⁵⁶E⁵⁷XGU**.

MutT za aktivnost treba dva bivalentna kationa – jedan je direktno koordiniran fosfatnim skupinama supstrata, a drugi je koordiniran s četiri aminokiselinska ostatka: glicinom G³⁸ s početka motiva *Nudix box* i s dva posljednja glutamata iz motiva REUXE⁵⁶E⁵⁷, te dodatno ili glutamatom s početka motiva RE⁵³UXEE ili glutamatom na poziciji 98, ovisno o tome da li je supstrat vezan ili ne. Glu53 i Glu98 reverzibilno ulaze u koordinacijsku sferu kationa tijekom reakcije. Osim toga, i dvije molekule vode koordiniraju drugi kation. Jedna od njih premošćuje interakciju kationa i supstrata, te djeluje kao nukleofil. Glutamat na poziciji 53 djeluje kao opća baza na molekulu vode, čineći je nukleofilnijom, te je esencijalna aminokiselina za fosfataznu aktivnost. Razni argininski i lizinski ostaci mogu sudjelovati u pozicioniranju di- ili tri- fosfata. Katalitička efikasnost (k_{cat}/K_M) ovog enzima u reakciji s 8-oxo-dGTP iznosi $10^7 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, što je vrlo blizu difuzijom-kontrolirane reakcije². No, ovaj enzim kao supstrat prihvaća i kanonski nukleotid dGTP, uz $10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ efikasnost reakcije. To se smatra nužnom kolateralnom štetom zbog nemogućnosti enzima da u potpunosti razlikuje ova dva supstrata³⁰. Ujedno, to pokazuje kako je teško razlikovati prave supstrate Nudix-hidrolaza od supstrata sporednih reakcija.

2.2.2. Supstrati Nudix-hidrolaza

Nudix-hidrolaze poznate su po vrlo širokoj supstratnoj specifičnosti. Dok je u nekim slučajevima moguće govoriti o supstratnoj dvoznačnosti⁴⁰, ponekad se radi i o tome da pravi supstrati enzima još nisu nađeni, već su zabilježene samo nespecifične, sporedne enzimske aktivnosti³⁰. Neki supstrati su češće testirani (npr. 8-oxo-dGTP), dok su drugi tek nedavno otkriveni (npr. dihidroneopterin-trifosfat, DHNTP) i nisu uvijek uključeni u testove potencijalnih supstrata ispitivanih Nudix-hidrolaza^{30,40}. Naravno, kako bi se utvrdio stvarni, fiziološki supstrat enzima, uz kinetičke parametre enzimske reakcije nužni su i drugi podaci, poput genetičkih dokaza ili genomskih indikacija o funkciji³⁰.

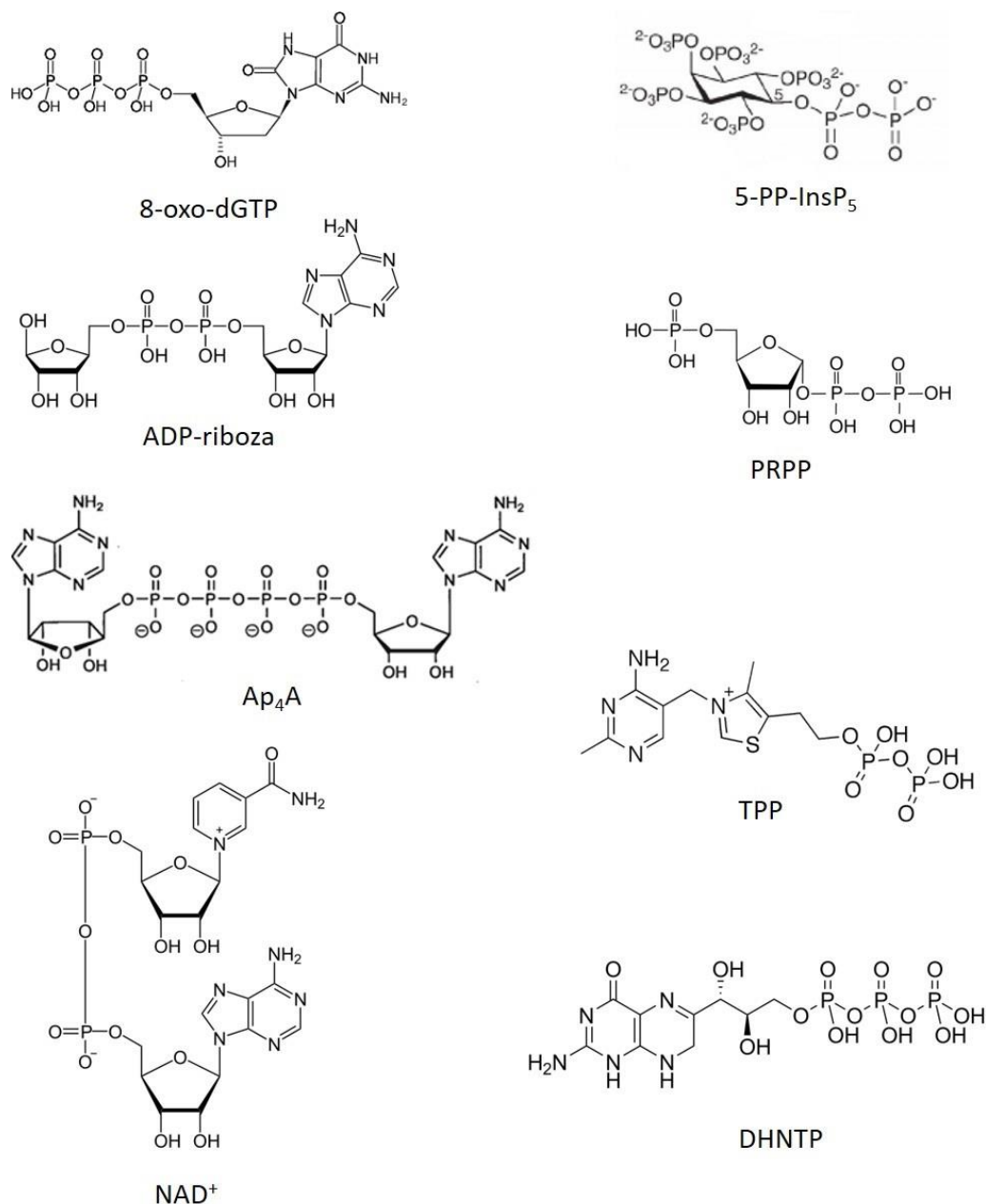
Supstrate Nudix-hidrolaza možemo podijeliti u dvije skupine prema građi³⁶ (slika 6): nukleotidni supstrati:

- (deoksi)nukleozid-trifosfati – kanonski i oksidirani derivati (npr. 8-oxo-dGTP)
- nukleotidni šećeri i alkoholi (npr. ADP-riboza, ali i GDP-manoza, koju na ugljikovom atomu cijepa GDP-manoza-manozil-glikozil-hidrolaza te nastaju manozila i GDP, za razliku od reakcije drugih nukleotidnih šećera koji se cijepaju nukleofilnim napadom na atom fosfora i daju fosforilirane šećere kao produkte)
- diadenozin-polifosfati, Ap_nA (npr. diadenozin-tetrafosfat Ap₄A)
- nukleotidni koenzimi (npr. nikotinamid-adenin-dinukleotid, NAD⁺)
- 5' zaštićene mRNA

nenukleotidni supstrati:

- difosfoinozitol-polifosfati, DIPP (npr. 5-difosfoinozitol-pentakisfosfat, 5-PP-InsP₅)
- 5-fosforibozil-1-pirofosfat, PRPP
- tiamin-pirofosfat, TPP
- dihidroneopterin-trifosfat, DHNTP.

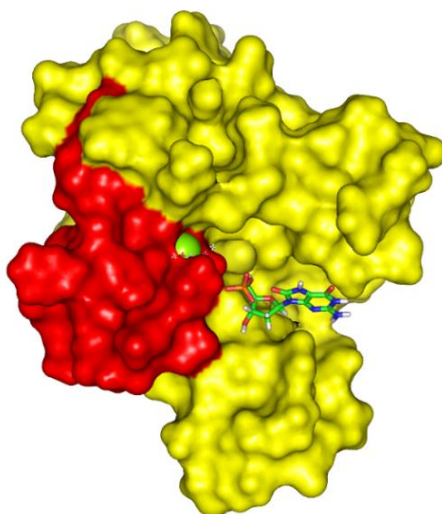
Predviđanje supstratne specifičnosti nije jednostavno. Za neke vrste Nudix-hidrolaza, poput ADP-riboza-difosfataze, NADH-difosfataze i Ap_nA-hidrolaze, poznate su odrednice specifičnosti u obliku aminokiselinskog slijeda. No, očuvani motiv *Nudix box* veže samo difosfatnu skupinu, dok je X skupina supstrata vezana na druge dijelove proteina (slika 7). Tek je nedavno prepoznato da bi regija proteina koja čini specifične kontakte s X skupinom supstrata mogla biti definirana tzv. X-petljom³⁰ (engl. *X-loop*). Srouji i sur. locirali su tu petlju na oko 17 aminokiselinskih ostataka prema C-kraju proteina od motiva *Nudix box*. Predloženo je da bi izmjene u ovoj regiji proteina mogle dozvoliti neofunkcionalizaciju enzima.



Slika 6. Neki od supstrata Nudix-hidrolaza: 8-okso-2'-deoksigvanozin-5'-trifosfat, 8-oxo-dGTP; adenzin-difosfat-riboza, ADP-riboza; diadenozin-tetrafosfat, Ap₄A; nikotinamid-adenin-dinukleotid, NAD⁺; 5-difosfoinozitol-pentakisfosfat, 5-PP-InsP₅; 5-fosforibozil-1-pirofosfat, PRPP; tiamin-pirofosfat, TPP; dihidroneopterin-trifosfat, DHNTP.

Nudix-hidrolaze djelovanjem na razne supstrate sudjeluju u brojnim važnim staničnim procesima. Osim antimutatorske aktivnosti prema oksidiranim ili modificiranim nukleotidima, tu je i uloga u metabolizmu RNA. ADP-riboza ima ulogu u remodeliranju kromatina i brojnim procesima koji su ovisni o ADP-ribozilaciji; diadenozin-polifosfati sudjeluju u

odgovoru na infekciju patogenom ili stanični stres; a difosfoinozitol-polifosfati su efektori stanične signalizacije³⁰.



Slika 7. Vezno mjesto MutT Nudix-hidrolaze. Magnezijev ion (zeleno) i motiv *Nudix box* (crveno) prepoznaju i vežu samo difosfatnu skupinu, pokazano ovdje na primjeru monofosfatnog produkta reakcije hidrolize 8-oxo-dGTP (PDB: 1ppx). Prikaz pripremljen u programu PyMol.

2.2.3. *Nudix*-hidrolaze uročnjaka

Uročnjak je vrlo popularan biljni modelni organizam, te je ujedno i biljka u kojoj su najbolje opisane *Nudix*-hidrolaze^{39,44–46}. Barem jedan supstrat identificiran je u *in vitro* reakcijama s rekombinantnim proteinima za 17 od 28 *Nudix*-hidrolaza iz uročnjaka³⁹. Proteinima su dane oznake AtNUDT s pridruženim rednim brojem. U novije vrijeme koriste se oznake AtNUDX s rednim brojem, kako bi se naglasilo da *Nudix*-hidrolaze s istim brojevima (oznake NUDT_) iz uročnjaka i čovjeka nisu ortolozi⁴⁴. AtNUDX1-11,-25 i AtDCP2 su citosolni, AtNUDX12-18 mitohondrijski, a AtNUDX19-24, -26 i -27 kloroplastni proteini. Bioinformatičkom analizom proteini su svrstani u nekoliko grupa prema sličnosti aminokiselinskog slijeda^{39,46}:

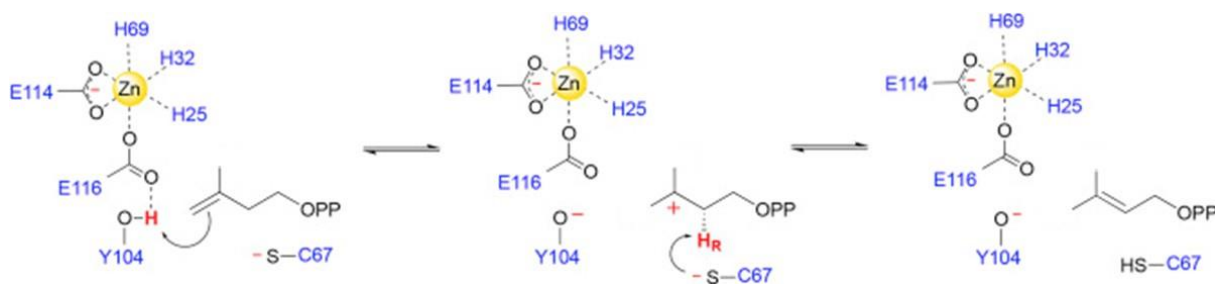
- AtNUDX2, -5, -6, -7, -8 i -10: grupa *Nudix* enzima sličnih faktoru rasta fibroblasta, (FGFTNE, engl. *Fibroblast growth factor type Nudix Enzyme*), s aktivnostima prema ADP-ribozi i NADH
- AtNUDX4, -12, -13, -16, -17, -18 i -21: grupa enzima sličnih difosfoinozitol-polifosfat-fosfatazama, DIPP, s aktivnostima prema DIPP, ali i Ap_nA
- AtNUDX11, -15 i -22: grupa koenzim A-fosfataza, CoA
- AtNUDX25, -26, -27: grupa diadenozin-polifosfat-fosfataza, Ap_nA.

IDI kontrolira dostupnost oba izomera i korak je koji ograničava brzinu sinteze⁶⁰ (engl. *rate-limiting step*). U literaturi je zabilježeno da aktivnost enzima ovisi o prisutnosti jednog ili više metalnih bivalentnih kationa⁶⁰, najčešće Mg^{2+} , Mn^{2+} ili Zn^{2+} . Mangan je najčešće dodavan u testove aktivnosti, no u nativnom proteinu nađen je cink^{61,62}.

2.3.1. Mehanizam izomerazne reakcije

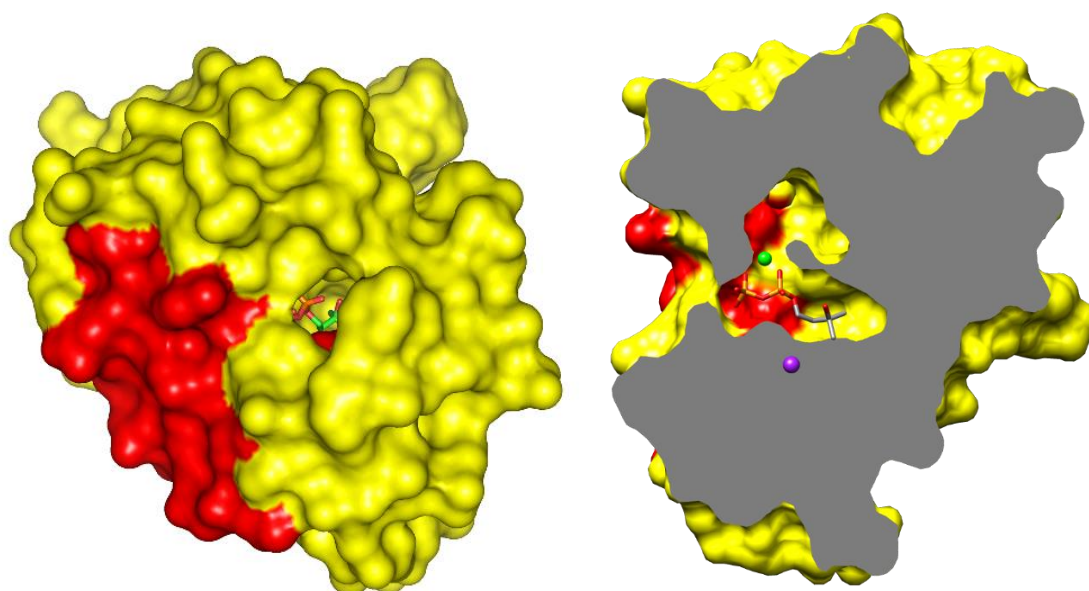
Iako IDI nema očuvani motiv *Nudix box*, arhitektura petlja-uzvojnica-petlja je očuvana. Površno, IDI-katalizirana reakcija se čini mehanistički nesrodna onoj Nudix-hidrolaza, no među njima postoje zajedničke karakteristike. Obje vrste enzima vežu difosfatnu skupinu supstrata ligacijom preko bivaletnog kationa, a kataliza uključuje uklanjanje protona posredovano općom bazom ili sa supstrata ili s molekule vode³⁰.

Mehanizam reakcije detaljno je istražen na primjeru IDI iz čovjeka^{63,64} i bakterije^{65–67} *E. coli*. Ovdje koristim IDI iz *E. coli* (Uniprot: Q46822) kao primjer. Za katalizu su nužna dva aminokiselinska ostatka^{65,67}: cistein iz motiva NXXC⁶⁷XHP, i drugi glutamat iz motiva EXE¹¹⁶. Također je predložena uloga tirozina na poziciji 104 kao donora protona^{65,68}. Osim toga, dva kationa su važna za katalizu⁶⁰. Prvi kation, Mg^{2+} , veže difosfatnu skupinu supstrata⁶⁰, a kompleksiran je s dvije molekule vode i ostacima Cys67 i Glu87. Drugi kation, Mn^{2+} ili Zn^{2+} , važan je za smatanje proteina⁶⁰. Cink je kompleksiran oktaedarski, s tri histidina (na pozicijama 25, 32 i 69), te s dva glutamata – jednim bidentatno (Glu114), drugim monodentatno (Glu116). Predloženi mehanizam, tzv. antarafacijalni (slika 9), kao prvi korak sadrži adiciju protona Glu116 ili Tyr104, koji su smješteni s jedne strane supstrata. Nije utvrđeno koja točno skupina djeluje kao proton-donor^{68,69}. Kao međuprodukt predložen je tercijarni karbokation, koji je stabiliziran pomoću Glu116 i kation- π interakcijom s Trp121. Eliminaciju protona s druge strane supstrata provodi Cys67, čime nastaje DMAPP.



Slika 9. Mehanizam reakcije izopentenil-difosfat-izomeraze na primjeru *E. coli* IDI, prilagođeno prema Thibodeaux i Liu⁷⁰.

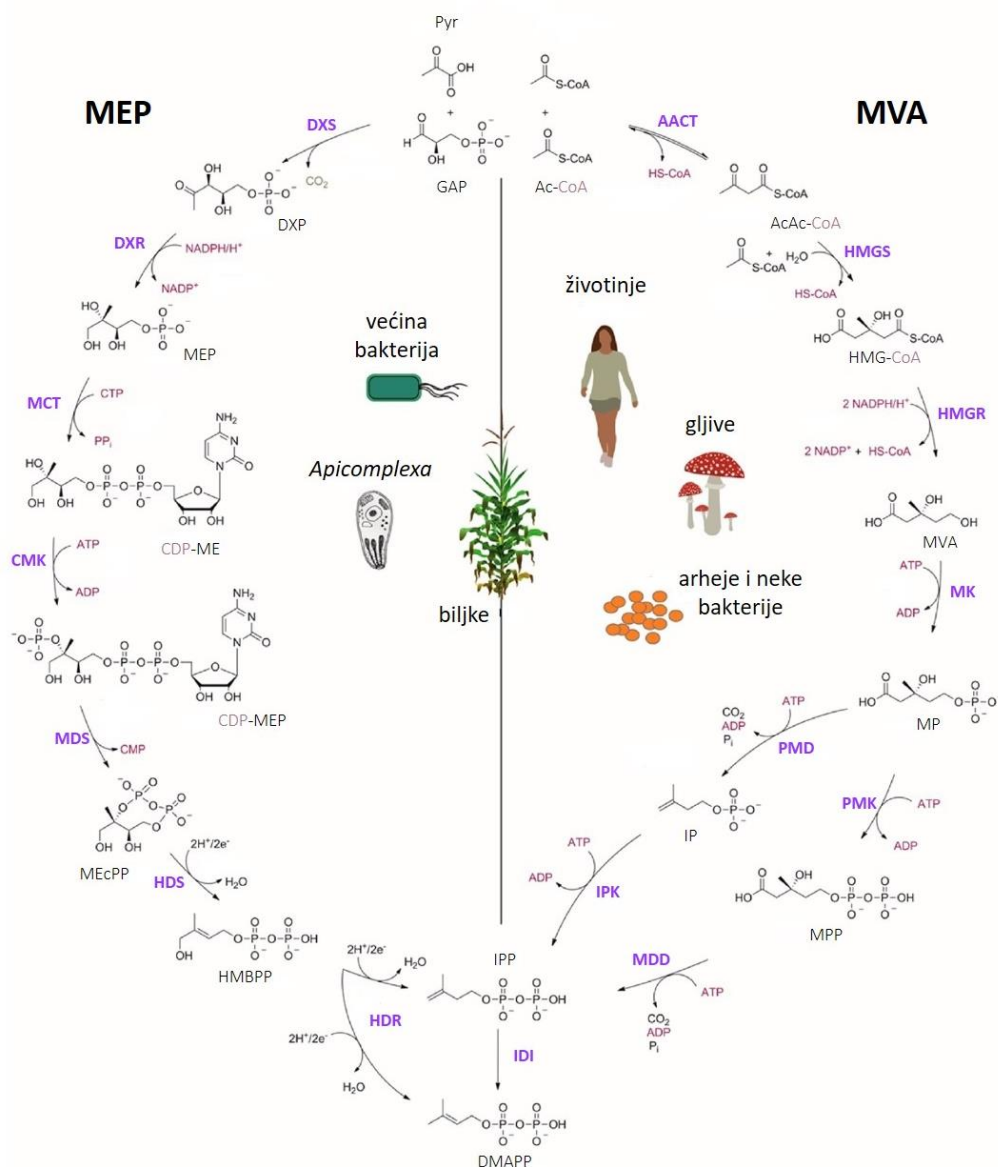
Protein ima vrlo usku selektivnost prema IPP. Za razliku od MutT, supstrat se veže u zaštićenu šupljinu, ne na površini enzima (usporedi slike 7 i 10). Općenito, od stotinjak kompleksa Nudix-hidrolaza u bazi podataka PDB, samo ljudske MTH1, NUDT9 i NUDT22 i bakterijske GDP-manoza-manozil-hidrolaza i ADP-riboza-pirofosfataza iz *E. coli* vežu supstrate u džep, a ne na površini enzima.



Slika 10. Vezno mjesto izopentenil-difosfata u *E. coli* IDI (PDB: 1ppv) nalazi se u zaštićenoj šupljini enzima: lijevo se vidi ulaz u džep, a desno na presjeku bočnog pregleda i položaj metala u veznom mjestu. Crveno je označen motiv *Nudix box*, zelenom sferom ion magnezija, a ljubičastom ion mangana. Prikaz pripremljen u programima PyMol i Chimera.

2.3.2. Putevi biosinteze izoprenoida

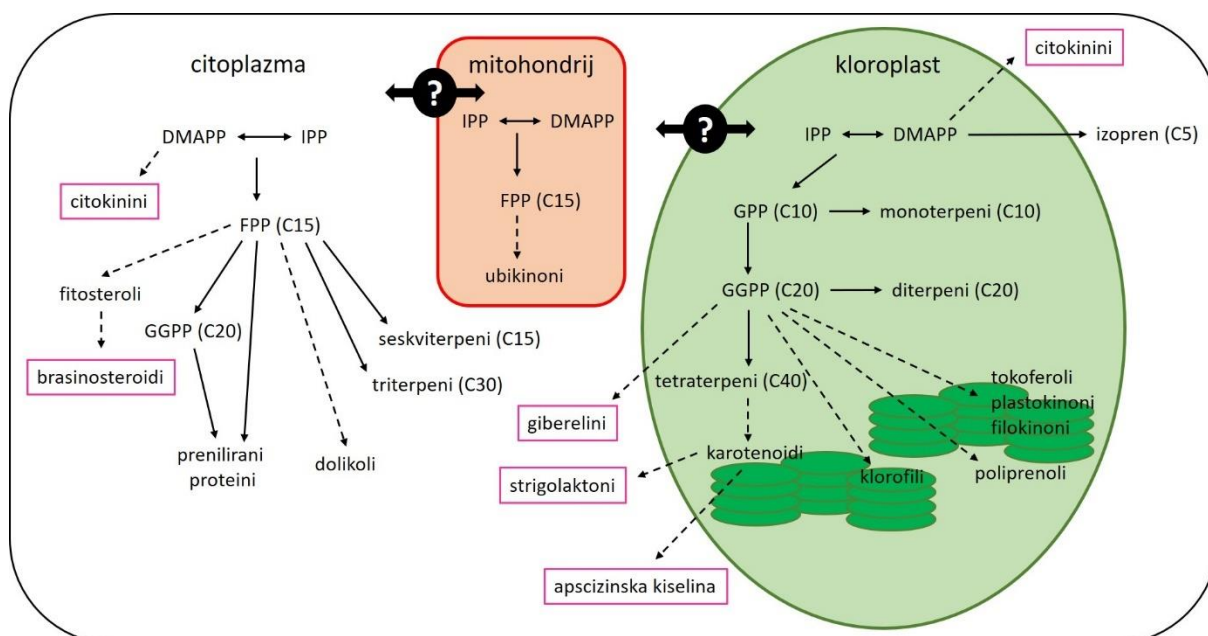
Izoprenoidi su spojevi koji nastaju kondenzacijom osnovnih C5 jedinica, IPP i DMAPP, kao što opisuje Ružičkino izoprensko pravilo⁷¹. To je najstarija i najveća klasa malih biomolekula, nazvanih i terpenoidima⁶⁰. Postoje dva različita puta⁷¹ biosinteze IPP (slika 11): eukariotski put, otkriven 1950-ih, nazvan putem sinteze mevalonata (engl. *mevalonate pathway*, MVA), i prokariotski, otkriven 1990-ih, nazvan putem metileritritol-fosfata (engl. *methylerythritol phosphate pathway*, MEP) ili putem 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfata (engl. *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway*, DOXP). Dodatno, ustanovljeno je kako u arheja postoji alternativni kraj MVA puta biosinteze⁷² (slika 11). MVA put nalazimo u eukariotima, arhejama i nekim bakterijama; MEP put nalazimo u većini bakterija i parazitskim eukariotima⁷¹ (*Apicomplexa*).



Slika 11. Putevi biosinteze izopentenil-difosfata, preko metileritritol-fosfata (MEP) i mevalonata (MVA), izvorni prikaz⁷¹ prilagođen prema drugim izvorima⁷³⁻⁷⁵. Dva enzima alternativnog arhejskog MVA puta su u unutrašnjosti kruga. Oznake spojeva: Pyr piruvat, GAP D-glicerinaldehid-3-fosfat, DXP 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat, MEP 2C-metil-D-eritritol-4-fosfat, CDP-ME 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol, CDP-MEP 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfat, MEcPP 2C-metil-D-eritritol-2,4-ciklodifosfat, HMBPP 1-hidroksi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfat, AcCoA acetil-koenzim A, AcAc-CoA acetilacetil-koenzim A, HMG-CoA 3-hidroksi-3metilglutaril-koenzim A, MVA mevalonat, MP mevalonat-5-fosfat, MPP mevalonat-5-difosfat, IP izopentenil-5-fosfat, IPP izopentenil-5-difosfat, DMAPP dimetilalil-5-difosfat. Oznake enzima (ljubičasto): DXS DXP-sintaza, DXR DXP-reduktoizomeraza, MCT MEP-citidil-transferaza, CMK CDP-ME-kinaza, MDS MEcPP-sintaza, HDS HMBPP-sintaza, HDR HMBPP-reduktaza, AACT AcAc-CoA-tiolaza, HMGS HMG-CoA-sintaza, HMGR HMG-CoA-reduktaza, MK mevalonat-kinaza, PMK fosfomevalonat-kinaza, MDD mevalonat-difosfat-dekarboksilaza, PMD fosfomevalonat-dekarboksilaza, IPK izopentenil-fosfat-kinaza, IDI izopentenil-difosfat-izomeraza.

Biljke, zbog endosimbiotskog porijekla kloroplasta od cijanobakterija, imaju oba puta sinteze, kompartmentalizirana tako da je MEP u kloroplastu, a MVA put u citosolu. Osim toga, pokazano je da u citoplazmi imaju i izopentenil-fosfat-kinazu iz arhejskog alternativnog MVA puta⁷⁶. Enzim IDI, koji regulira omjer IPP i DMAPP, nalazimo u biljaka u svim staničnim odjeljcima u kojima se odvija sinteza izoprenoida: citoplazmi, kloroplastima, mitohondrijima i peroksisomima⁷⁷. Dok u organizmima koji imaju MEP put biosinteze IDI nije esencijalan protein⁷⁸, jer na kraju sinteze nastaju i IPP i DMAPP, kod MVA puta nastaje isključivo IPP, i nužna je aktivnost IDI za nastanak DMAPP⁶⁰.

Pretpostavlja se da IPP ili neki drugi izoprenoidni metabolit može pomoću neidentificiranog transportera ili difuzijom prelaziti membrane između staničnih odjeljaka^{75,79–81}. Tako dolazi do komunikacije između različitih puteva sinteze (slika 12).



Slika 12. Sinteza izoprenoida u biljnoj stanici iz IPP i DMAPP kao osnovnih prekursora, prema izvorima^{73,75}. Na membranama organela crnom bojom je označen nepoznati transporter izoprenoid-difosfata, uglavnom se pretpostavlja da se prenosi IPP. GPP geranil-difosfat, FPP farnezil-difosfat, GGPP geranilgeranil-difosfat. Uokvireni su biljni regulatori rasta. Pune strelice označavaju reakcije u kojima sudjeluje samo jedan enzim, a crtkane više enzimskih reakcija.

Prenil-transferaze kataliziraju adiciju IPP na molekulu DMAPP ili drugog alila, najčešće, no ne isključivo, u obliku glava prema repu: 1' – 4 kondenzacijom⁶⁰. Tako nastali geranil- (GPP, C10), farnezil- (FPP, C15) i geranilgeranil- (GGPP, C20) difosfati su prekursori za kompleksnije izoprenoide, npr. karotenoide i klorofile, neophodne za proces fotosinteze, te biljne regulatore rasta gibereline, strigolaktone, citokinine, apscizinsku kiselinu i

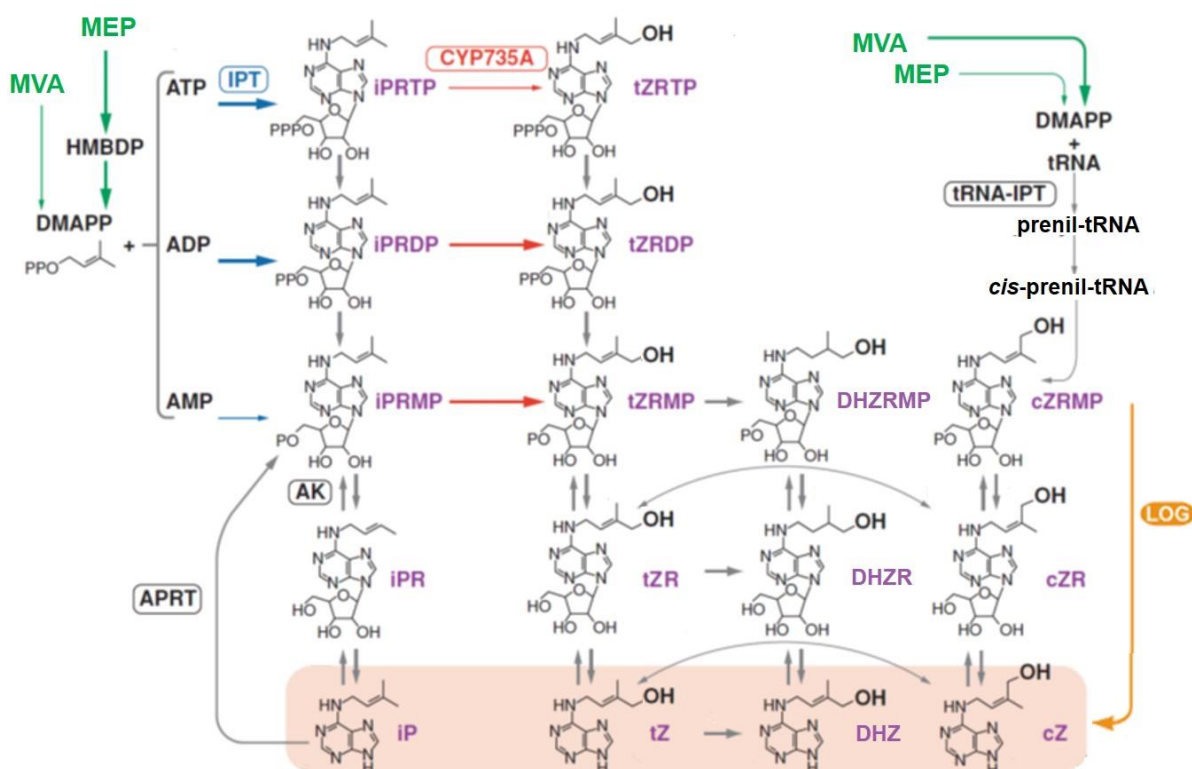
brasinosteroide, koji imaju bitne uloge u biljnom rastu, razvitku i prilagodbi na okolišne uvjete.

2.3.3. Biosinteza izoprenoidnih citokinina

Dok se ostali biljni regulatori rasta sintetiziraju iz kompleksnijih izoprenoidnih jedinica (giberelini iz C20, brasinosteroidi iz C30, strigolaktoni i apscizinska kiselina iz C40 spojeva), izoprenoidni citokinini nastaju prijenosom C5 jedinice na N⁶ atom molekule adenina⁸². (Postoje i aromatski citokinini, koje ovdje ne razmatram.) Aktivne forme su citokininske baze, N⁶-(Δ^2 -izopentenil)adenin ili izopentenil-adenin (iP), *trans*-zeatin (tZ), *cis*-zeatin (cZ) i dihidrozeatin (DHZ)⁸³. No, citokinini u stanicama, osim u aktivnoj formi, postoje i kao nukleozidi i nukleotidi koji predstavljaju biosintetske prekursore, te kao konjugati sa šećerima i aminokiselinama, koji su skladišne i kataboličke forme citokinina⁸⁴. C5 jedinice koje mogu sudjelovati u sintezi citokinina su DMAPP i HMBPP, a to mogu činiti na dva načina: djelovanjem adenzil-fosfat-izopenteniltransferaze (IPT) na ATP, ADP ili AMP, ili djelovanjem tRNA-izopenteniltransferaze (tRNA-IPT) i naknadnom degradacijom tRNA⁸² (slika 13). Izoprenoidni lanci iP i tZ uglavnom potječu iz MEP puta, dok bočni lanci u cZ imaju porijeklo u MVA putu sinteze izoprenoida⁸³. iP i tZ pokazuju znatno više aktivnosti od cZ, no cZ je dominantni tip citokinina u tkivima pod abiotskim ili biotskim stresom⁸². DHZ je u najvišim koncentracijama nađen u sjemenkama i vršnim pupovima, što su organi za pohranu, pa vjerojatno ima vrlo specifičnu ulogu.

Ove male molekule vežu se na specifične receptore i pokreću kaskadne reakcije koje dovode do regulacije rasta i razvitka. Citokinini u biljkama djeluju u sprezi s auksinima, i utječu na dijeljenje stanica (citokinezu), formiranje bočnih ogranaka, apikalnu dominaciju, diferencijaciju provodnih elemenata, starenje i druge procese⁸².

Zanimljivo je da, dok je u uročnjaku glavni izvor citokinina reakcija IPT, u mahovini *P. patens* nisu identificirani srodni enzimi, pa je pretpostavljeno da je moguća jedino sinteza putem tRNA-IPT⁸⁵. No, analiza *knock-out* mutanti mahovine ukazuje da u ovom organizmu postoji još neprepoznati način biosinteze citokinina⁸⁶. Svakako još uvijek postoji puno nepoznanica po pitanju enzima koji sudjeluju u sintezi, transformaciji i degradaciji raznih formi citokinina⁸³.



Slika 13. Pojednostavljeni prikaz sinteze citokinina u uročnjaku. Aktivne forme, citokininske baze, istaknute su drugom bojom pozadine. Izvori izopentenilne jedinice, MVA ili MEP putevi sinteze, označeni su zeleno. Okvirima su označeni enzimi: IPT adenzil-fosfat-izopenteniltransferaza, tRNA-IPT tRNA-izopenteniltransferaza, CYP735A citokrom P450 monooksigenaza, AK adenzin-kinaza, APRT adenin-fosforiboziltransferaza, LOG *LONELY GUY* citokinin-ribozid-monofosfat-fosforibohidrolaza. Ostale oznake: iP izopentenil-adenin, tZ *trans*-zeatin, DHZ dihidrozeatin, cZ *cis*-zeatin, -R -ribozid, -RMP, -RDP, -RTP, -ribonukleotidi. Preuzeto uz izmjene⁸³.

2.4. Biljni modelni organizmi

2.4.1. Uročnjak (*Arabidopsis thaliana*)

Arabidopsis thaliana ili uročnjak je član porodice kupusnjača (Brassicaceae). Riječ je o malenoj cvjetnici, korovu bez ekonomske važnosti, koja je postala najvažniji i najistraživaniji biljni modelni organizam⁸⁷. Cvjetovi su dugački 2 mm, sjeme 0,5 mm, a cijela potpuno razvijena biljka 15-20 cm. Korijenje je jednostavno i ne stvara simbiotske odnose s bakterijama koje fiksiraju dušik⁸⁷. Ekotipovi Columbia i Landsberg su standardi za genetičke i molekularne studije. Biljka prođe cijeli životni ciklus u samo 6 tjedana, uključujući klijanje sjemena, formiranje listova u obliku rozete, razvoj cvjetne stapke, cvjetanje i sazrijevanje prvog sjemena⁸⁷.

Zbog nedavne radijacije cvjetnica od zajedničkog pretka prije 150 milijuna godina, uročnjak je blisko srodan s nekoliko stotina tisuća biljnih vrsta i stoga se smatra izvrsnim biološkim modelom za razne aspekte biljne biologije⁸⁸. Uročnjak je prevladao kao jedan od glavnih modela u ranim 80-ima s objavom genetičke karte i brojnim publikacijama koje su naglasile vrijednost ove vrste u istraživanju biljne fiziologije, biokemije i razvoja⁸⁷. Veličina biljke i jednostavni uvjeti rasta omogućavaju laboratorijski uzgoj. Biljka je samo-oplodni diploid koji proizvodi tisuće sjemena od pojedine jedinke, što olakšava brzu proizvodnju potomstva iz mutanti ili transgeničnih biljaka⁸⁸. Ulogu glavnog modela pospješila su dva značajna napretka: definiranje protokola za transformaciju genoma uročnjaka upotrebom bakterije *Agrobacterium tumefaciens* i činjenica da ova biljka ima mali genom podložan detaljnoj molekularnoj analizi⁸⁷. Vizija o razvoju ovog biljnog modela 1990. godine uključivala je plan zasićenja genoma mutacijama, identifikacije svih esencijalnih gena i sekvenciranja genoma do kraja desetljeća⁸⁷. Kao prvi sekvencirani biljni genom, genom uročnjaka s nešto više od 25 tisuća gena objavljen je 2000. godine⁸⁹.

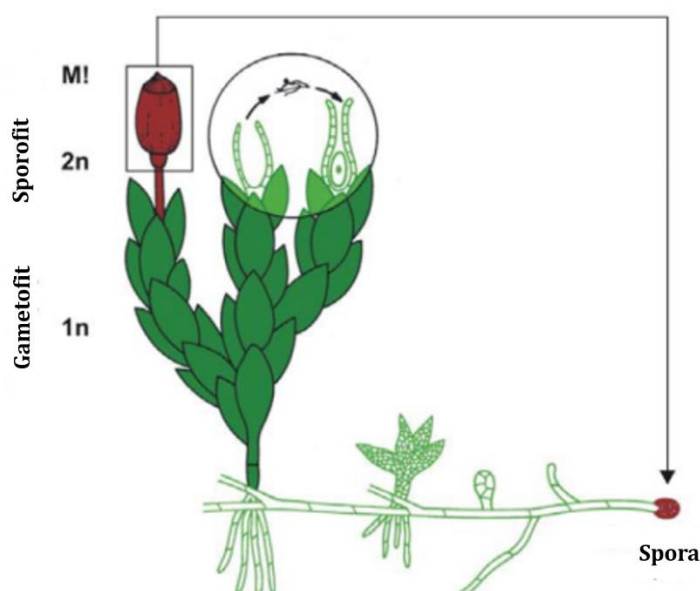
Funkcionalna anotacija gena zaostaje za sekvenciranjem genoma. Jedan projekt na *A. thaliana* je imao za cilj identificirati funkcije svih gena do 2010. godine, no 2015. čak 60% pretpostavljenih enzima i transporterskih proteina je imalo nejasnu ili nepoznatu funkciju⁹⁰. Ako se kao definicija funkcije traže poznata biokemijska aktivnost, lokalizacija proteina u stanicama i biološka uloga zasnovana na eksperimentalnim dokazima, samo 5% gena je prikladno karakterizirano. Kao što je već spomenuto, u bazama podataka nema puno podataka za AtND. Početkom izrade ove disertacije nisu postojale mutante *A. thaliana* s insercijom T-DNA (engl. *transfer-DNA*) u eksonima gena za protein Nudix-DPP III.

2.4.2. Mahovina *Physcomitrella patens*

Physcomitrella patens je nevaskularna kopnena biljka, modelni organizam za evolucijsku i funkcionalnu genomiku⁹¹. Evolucijski gledano, stara je oko 450 milijuna godina te se nalazi na pola puta između algi i cvjetnica⁹². Iako je prvotno korištena kao modelni organizam u bazičnom istraživanju razvojnih procesa u biljaka⁹³, sve više se koristi u istraživanju funkcije gena⁹⁴ i biotehnologiji⁹¹.

Mahovine prolaze heteromorfnu izmjenu generacija, u kojoj se smjenjuju haploidni gametofit i diploidni sporofit⁴ (slika 14). U glavnoj životnoj fazi, mahovina je haploidna, po čemu je sličnija algama nego papratima i sjemenjačama⁹⁴. Iz haploidne spore raste

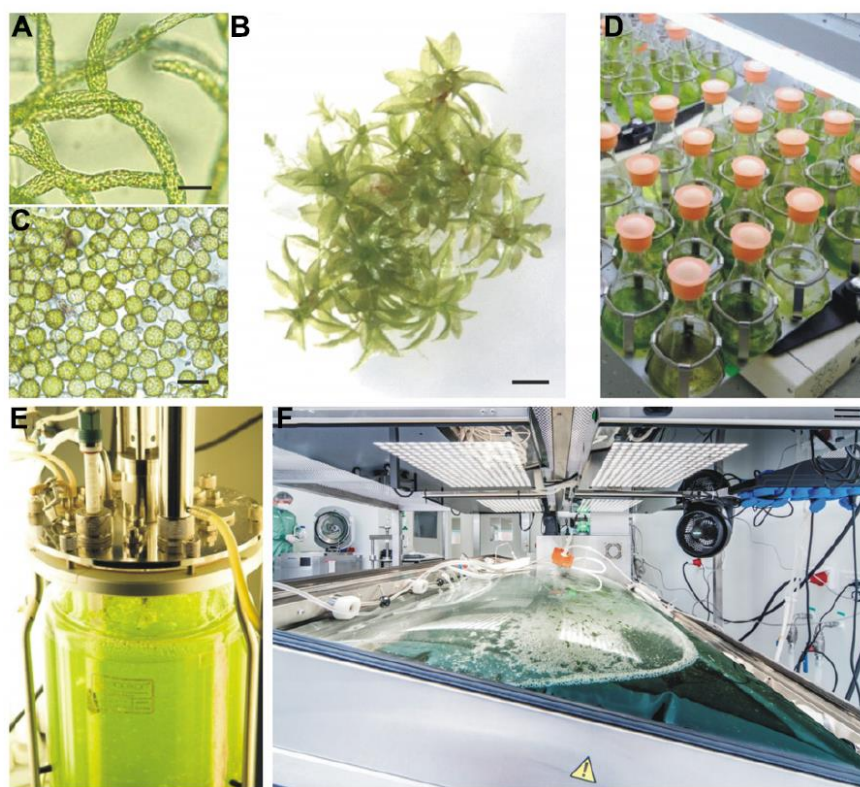
protonemalno tkivo koje se sastoji od dva tipa stanica: kloronemalne stanice nastaju prve i karakteristično su pune velikih kloroplasta, a iz apikalnih stanica nastaje kaulonemalno tkivo, koje daje filamente i listićave stabljike, gametofore. Oba spolna organa nalaze se na istoj biljci. Zigota daje sporofit koji raste na gametofori majčinske stanice. Spore nastaju mejozom u sporofitu. Rad s *Physcomitrelom* je zahvalan zbog jednostavnosti samog organizma⁹³: postoji samo nekoliko tipova stanica, tkiva su relativno jednostavna, kao i plan građe i razvoj. Nema vaskularno tkivo, pravo korijenje, stabljike, listove, cvjetove ni sjemenke, ali većina signalnih putova koje pronalazimo u cvjetajućih biljaka postoje i u ovoj mahovini⁹³ (auksini, citokinini, abscizinska kiselina, etilen, dok se za jasmonate i gibereline ne zna jesu li aktivni). Većina tkiva mahovine sastoji se samo od jednog sloja stanica⁹³, što olakšava detekciju i vizualizaciju promjena u fenotipu.



Slika 14. Izmjena generacija u mahovini *P. patens*⁴. Iz proklijane haploidne spore rastu filamenti protonemalnih stanica. Iz trostrane apikalne stanice nastaje pupoljak, a zatim lisnati odrasli gametofit, te rizoidi, tkivo slično korijenu. Oba spolna organa (anteridiji i arhegoniji, istaknuti krugom) nalaze se na istoj biljci. Oplodnja se događa u vodi. Diploidni sporofit (istaknut pravokutnikom) raste iz embrija na arhegoniju. U kapsuli dolazi do mejoze stanica i nastanka novih, haploidnih spora.

Physcomitrella je fotoautotrof, a kako većinu životnog ciklusa provodi u haploidnom stanju, moguća je primjena eksperimentalnih tehnika sličnih onima koje se koriste u mikrobiologiji za bakterije i kvasce. Najčešći je *in vitro* uzgoj biljnih tkiva pri akseničnim uvjetima na anorganskoj hranjivoj podlozi, bez fitohormona ili vitamina⁹¹. Koristi se anorganska Knopova

podloga⁹⁴, bez šećera ili drugih organskih izvora, a nitrat služi kao izvor dušika. Hranjive podloge mogu biti krute ili tekuće (slika 15). Ostali uvjeti uzgoja su izmjena dana i noći u režimu dugog dana⁹⁴ (16 sati svjetla i 8 sati mraka), a optimalna temperatura za rast je 25°C. *Physcomitrella* ima visok kapacitet za regeneraciju⁹⁴ – gametofitno ili sporofitno tkivo obnavlja se i daje protonemalno tkivo, koje se razvija slično kao klijajuće spore. Mehaničkim usitnjavanjem protonemalnog tkiva homogenizatorom može se mjesecima održavati kultura potpuno diferenciranih protonemalnih stanica, a fragmenti tkiva mogu poslužiti kao inokulum za iduću kulturu⁹⁴. Za razliku od ostalih biljnih kultura tkiva, gdje se koriste nediferencirane stanice, tekuća kultura mahovine *P. patens* sastoji se od diferenciranih stanica, gdje nema somaklonalne varijacije. To omogućuje dugotrajnu kultivaciju linija uz stabilnu genetičku pozadinu⁹¹. Kratkoročno, kultura se može održavati i redovitom subkulturom na agaru svakih nekoliko mjeseci. Za dugotrajnu pohranu, tkivo se može smrznuti u tekućem dušiku.



Slika 15. *In vitro* kultivacija mahovine *P. patens*⁹¹. A) mlado filamentozno (protonemalno) tkivo, idealno za kulture u suspenziji; B) odrasla lisnata biljka, gametofit; C) protoplasti, stanice korištene za modifikacije genoma; D) mala tekuća kultura mahovine u tikvici; E) tip bioreaktora za uzgoj uz miješanje; F) tip bioreaktora za uzgoj uz ljuljanje.

Najbitnija odlika ove mahovine je njena izuzetna sposobnost homologne rekombinacije. Prema efikasnosti homologne rekombinacije, *P. patens* je slična kvascu i daleko nadmašuje ostale biljke⁹⁵. Ta osobina može se iskoristiti za iznimno precizno modificiranje genoma mahovine⁴ i proizvodnju mutanti s prekinutim genima (*knock-out*) ili s ekspresijom heterolognih gena (*knock-in*). Zbog dominantnosti haploida u životnom ciklusu, ovaj organizam je idealan za genetičke studije jer je fenotip mutanata direktno uočljiv. Vegetativna propagacija haploidnog tkiva omogućava dobivanje i održavanje mutanata koji bi bili blokirani u ranom razvoju. Stabilne transformante dobivaju se integracijom kopija transgena s markerom za antibiotsku selekciju u genomsku DNA jednostavnim postupkom unosa linearizirane DNA u protoplaste pomoću tretmana polietilen-glikolom⁴. Nakon dva stupnja selekcije antibiotikom, željena genomska izmjena se potvrđuje genetičkom analizom transformanata. Zbog dominacije gametofita u izmjeni generacija, izolacija mutanata i genetička analiza su jednostavnije nego u vrsta s dominantnom diploidnom fazom, te pri modificiranju genoma ne treba provoditi križanja da bi se dobio homozigot⁹⁴. Osim toga, 2008. godine objavljena je genomska sekvenca⁹⁶, a 2017. konstruirane su sekvence 27 kromosoma⁹⁷, što olakšava ciljanu modifikaciju genoma.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

agar, agaroza, akrilamid-bisakrilamid smjesa (30:1), ampicilin, amonijev persulfat (APS), geneticin (G418), higromicin B, imidazol, izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG), kloramfenikol, LB podloga (Lennox), lizozim, D-manitol, 2-(*N*-morfolino)-etansulfonska kiselina (MES), mlijeko u prahu, octena kiselina, polietilen-glikol PEG 4000, natrijev dodecilsulfat (SDS), *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin (TEMED), Tris baza (Carl Roth); aceton, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , glicin, D-glukoza, heksan, KH_2PO_4 , KI, KCl, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, NaCl, Na-EDTA, NaH_2PO_4 , $\text{Na}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, D-sorbitol, H_2O_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (Kemika); etanol, glicerol, metanol (GramMol); kozje anti-kuniće antitijelo IgG konjugirano s hrenovom peroksidazom, amonijev tartarat, goveđi albumin iz seruma (BSA), DNazaI, driselaza, Fast Blue BN sol, izoprenoid-fosfati: IPP, IP, DMAPP, HMBPP, MVAPP, GPP, FPP, GGPP; β -merkaptioetanol, β -naftilamin, RNAzol, Tween 20, Tween 80 (Sigma); Ni-NTA punilo (Qiagen); Coomassie boja R-250, 2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]-etansulfonska kiselina (HEPES), polivinil-polipirolidon (PVPP), bromfenol-plavilo, amido-crnilo (Serva); dipeptidil-2-naftilamidni supstrati: Arg-Arg-, Ala-Arg-, Ala-Ala-, Gly-Arg-, Pro-Arg-, Phe-Arg- (Bachem); Asp-Arg-, Gly-Pro-, Gly-Phe-, Lys-Ala- (Serva); PVDF membrana, ECL Prime reagens za kemoluminiscencijsku detekciju (Thermo Scientific); trans-zeatin (tZ), indol-3-octena kiselina (IAA), salicilna kiselina (SA), apscizinska kiselina (ABA), citokininski standardi (OIChemIm)

3.1.2. Enzimi i drugi reagensi za molekularnu biologiju

Restriksijski enzimi: *Eco88I*, *HindIII*; FastDigest *BamHI*, *PstI*, *XbaI* (Thermo Scientific); DNA-polimeraze: Phusion, Phire, DreamTaq (Thermo Scientific), Q5 (NEB), peqGOLD Taq (Peqlab); T4 DNA-ligaza, reverzna transkriptaza RevertAid (Thermo Scientific); RNaza A (Peqlab)

3.1.3. Komercijalni setovi

Setovi za molekularnu biologiju: QuikChange II XL (Agilent); CloneJET PCR Cloning Kit, aLICator LIC Cloning and Expression Kit #3, GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit, GeneJET Plasmid MiniPrep Kit, DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific); Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, PureYield Plasmid Miniprep i Maxiprep System (Promega); Power Sybr Green PCR Kit (Applied Biosystems)

Setovi za kristalizaciju: Index, Crystal Screen, SaltRX (Hampton Research), JCSG+ (Qiagen), Morpheus HT-96, Clear Strategy I i II, MIDAS (Molecular Dimensions)

Set za detekciju fosfata: Malachite Green Phosphate Detection Kit (R&D Research)

3.1.4. Bakterijski sojevi

DH5 α i XL1Blue MSF' (Invitrogen), BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene), Lemo21(DE3) (NEB) i Rosetta 2(DE3) pLacI (Novagen)

3.1.5. Biljni materijal

Kao polazni materijal za *knock-out* mutante korištena je mahovina *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S. ekotip 'Gransden 2004', isti soj koji je korišten za sekvenciranje genoma mahovine. Taj divlji tip korišten je u svim drugim pokusima.

3.1.6. Instrumenti i aparature

aparature za elektroforezu: Mini Protean Tetra Cell i Mini Trans-Blot sustav (Bio-Rad), PhastSystem (Pharmacia); spektrofotometri: NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), BioDrop Duo (BioDrop); fluorimetri: Cary Eclipse Fluorescence (Agilent Technologies), FluoroMax-4 (Horiba Scientific), GENios (GENios); spektropolarimetar J-815 (JASCO); kristalizacijski roboti Oryx8 (Douglas Instruments) i Mosquito-LCP (TTP Labtech); sustav za kromatografiju proteina FPLC Åkta (Pharmacia); maseni spektrometri spregnuti s tekućinskom kromatografijom: 1290 Infinity LC System and Agilent Technologies 6460 Triple Quadrupole (Agilent) s kolonom Eclipse Plus C18 RRHD, Acquity UPLC® System s Xevo™ TQ-S MS (Waters); termomikser Eppendorf Thermomixer R (Thermo Scientific); centrifuge Sorvall RC-5B (Sorvall), Eppendorf 5415 R (Eppendorf), Hettich Universal 320 R (Hettich); sonikator Labsonic M (B. Braun Biotech International); mlin za miješanje Mixer Mill MM 400 (Retsch); sustav za vizualizaciju kemiluminiscencije i fluorescencije UviTec (Clever

Scientific); koncentratori Vivaspin II (Sartorius) i Amicon Ultra 15 (Merck Millipore Ltd.); filtri za šprice 0,22 i 0,45 μm (Carl Roth); PD-10 kolona (Pharmacia)

3.1.7. Programi

PyMol (www.pymol.org, Schrodinger), UCSF Chimera⁹⁸ (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>), SnapGene, Graph Pad Prism 5.0, Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>), MEGA7.

3.2. Bioinformatičke metode

3.2.1. Pretraživanje baza podataka

U pretragama za unaprijed generiranim podacima poslužila sam se bazama koje klasificiraju proteine prema homologiji s već opisanim domenama: *Conserved Domain Database*⁹⁹ (www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd) i InterPro¹⁰⁰ (www.ebi.ac.uk/interpro). Kao unos korištene su aminokiselinske sekvence proteina PpND i AtND (UniProt: A9TLP4, Q8L831).

U potrazi za drugim homolognim sekvencama, pretražene su baze NCBI GenBank (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), UniProtKB (www.uniprot.org) i 1KP (db.cngb.org/onekp). Bazama je posljedni put pristupljeno 4. veljače 2018. Korišteni su integrirani programi BLAST¹⁰¹ (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*, opcija BLASTP za usporedbu proteina). Za homologe enzima Nudix-DPP III kriterij za uključivanje je bio E-vrijednost = 0. Za pronalaženje homologa DPP III domene korištena je skraćena sekvenca AtND (ostaci 197-772), algoritam PSI-BLAST (engl. *Position-Specific Iterated BLAST*) bez promjene osnovnih parametara, a za uključivanje bilo je nužno sravnjivanje s više od 75% početne sekvence (engl. *query coverage* > 75%). Homolozi Nudix domena pretraživani su skraćenom sekvencom AtND (ostaci 1-200), uz kriterije E-vrijednost < 0,001 i > 50% duljine sravnjenih sekvenci.

3.2.2. Filogenetska analiza

Sve filogenetske analize provedene su u programu MEGA7¹⁰². Sravnjivanja su provedena algoritmom MUSCLE, a stabla su konstruirana pomoću metoda spajanja susjeda (engl. *Neighbor-Joining*) i najveće parsimonije (engl. *Maximum Parsimony*). Prikazano je samo jedno stablo, ali samo ako su sva stabla podržavala glavne zaključke.

Za filogeniju Nudix-DPP III korištene su sekvence iz baze NCBI GenBank i sekvence paražina iz baze 1KP. Sekvence su sravnjene i one kojima su nedostajali znatni dijelovi su eliminirane (npr. parcijalna sekvenca ili višestruki modeli istog gena). Sravnjenje 138 sekvenci koje su na kraju uključene u analizu dostupno je kao Dodatak 1.

Za identifikaciju očuvanih ostataka korišteno je 634 sekvenci proteina Nudix-DPP III, iz svih triju baza podataka. Eliminirane su pozicije koje su bile prisutne samo u nekolicini sekvenci i skraćeni su krajevi koji su bili duži u usporedbi s većinom. Svrnjenje je dostupno kao Dodatak 2.

Za filogeniju DPP III odabrano je 88 sekvenci. Odabrane su sekvence tako da predstavljaju sve veće taksonomske skupine. Dodatni kriterij bio je da je protein biokemijski karakteriziran. Također, iz organizama u kojima su nađena dva tipa DPP III uvrštene su obje sekvence. Svrnjenje je dostupno kao Dodatak 3.

Za filogeniju Nudix proteina iz *A. thaliana* sekvence su preuzete iz baze InterPro, postavljanjem filtra za domenu *Nudix hydrolase domain* IPR000086 i organizam, s tim da su u obzir uzete samo sekvence iz SwissProt baze.

3.2.3. Kreiranje modela strukture

Modeliranje strukture prema homologiji sa poznatim proteinskim strukturama izvedeno je pristupom alatu Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>). Za kreiranje strukture korišten je intenzivni način modeliranja¹⁰³, jer je riječ o proteinu s više domena. Kao unos korištene su aminokiselinske sekvence proteina PpND i AtND. Prikazi struktura kreirani su pomoću programa PyMol i Chimera.

3.3. Biokemijske metode

3.3.1. Kloniranje gena u ekspresijske vektore i ekspresija proteina

Plazmid za ekspresiju PpND, pET21a, naručen je od tvrtke GeneArt (Life Technologies). Slijed nukleotida optimiziran je za ekspresiju u *E. coli*. Aminokiselinski slijed eksprimiranog proteina odgovara onom u UniProt bazi podataka (A9TLP4), uz dodatak His-privjeska HHHHHH na C-kraju.

Gen za AtND umnožen je pomoću početnica navedenih u tablici 1 iz komplementarne DNA (cDNA klon U16680 naručen od *Arabidopsis Biological Resource Center*, Ohio State University) i kloniran u plazmid pLATE31. Kloniranje je izvedeno komercijalnim setom aLICator #3 (Thermo Scientific), a eksprimirani protein imao je aminokiselinski slijed identičan referentnom u bazi UniProt (Q8L831) s His-privjeskom GHHHHHHG na C-kraju.

Za potrebe validacije antiseruma koji specifično prepoznaje PpND, kloniran je i gen za rubisko-aktivazu *P. patens* (PpRCA), iz komplementarne DNA divljeg tipa pripremljene kao što je opisano u poglavljima 3.5.2 i 3.5.3. Kloniranje je također izvedeno komercijalnim

setom aLICator #3, tako da je GHHHHHHG His-privjesak slijedio sekvencu koja odgovara ostacima 59–445 UniProt unosa A9TBP0. Tako je eliminiran N-terminalni signalni peptid za unos u kloroplast, te je eksprimirana samo konačna, zrela forma proteina.

Za usporedbu aktivnosti enzima prema IPP, kloniran je protein NudB iz bakterije *E. coli*. Kloniranje je izvedeno setom aLICator #3, tako da je GHHHHHHG His-privjesak slijedio sekvencu UniProt unosa P0AFC0.

Za umožavanje i održavanje plazmida korišten je soj DH5 α *E. coli*.

Tablica 1. Početnice korištene prilikom kloniranja u ekspresijski vektor

oznaka	slijed početnice (5' → 3')
AtND_F	AGAAGGAGATATAACTATGGCGGAGGAGCACTTCGACG
AtND_R	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGTTTCATCAATGCTTCTGCTAATGGAAATGTCGG
PpRCA_LICF	AGAAGGAGATATAACTATGGAGGCTGAGGGCGAG
PpRCA_LICR	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCTGGGACGCTGGAGC
EcNudB_LICF	AGAAGGAGATATAACTATGAAGGATAAAGTGTATAAGCGTCC
EcNudB_LICR	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGGCAGCGTTAATTACAAACTGTTC

PpND i AtND eksprimirani su u BL21-CodonPlus(DE3)-RIL soju *E. coli* (Stratagene). Plazmid je u kompetentne stanice unesen elektroporacijom. Uzgojena je prekonoćna kultura stanica u LB tekućoj podlozi s dodatkom ampicilina (konačne koncentracije 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pri 37°C i 250 okretaja u minuti (rpm), te je alikvot korišten za inokulaciju ekspresijske kulture u razrjeđenju 1:50, u podlozi istog sastava i pri istim uvjetima. Kada je tekuća kultura dosegla optičku gustoću 0,6 na valnoj duljini 600 nm, kulture su hlađene 30 min na 4°C. Tekućoj kulturi je zatim dodan koktel Zn^{2+} i Mg^{2+} u obliku kloridnih soli, tako da je konačna koncentracija u kulturi iznosila 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Zn^{2+} i 1 mmol L^{-1} Mg^{2+} . Nakon 15 minuta, ekspresija proteina je inducirana IPTG-om u konačnoj koncentraciji 0,25 mmol L^{-1} . Kulture su zatim uzgajane 20 sati pri 18°C i 130 rpm. Bakterijske stanice su oborene centrifugiranjem pri 5000 g. Stanice su pohranjene na -20°C do izolacije proteina.

U sklopu radionice „Protein expression, purification, and characterization“ u SPC Facility u Hamburgu testirana je ekspresija u alternativnim sustavima. PpND i AtND klonirani su u nove vektore s namjerom ekspresije proteina s C-terminalnim His-privjeskom (plazmid pOPINE¹⁰⁴) i N-terminalnim His-SUMO-privjeskom na koji se nastavlja slijed koji prepoznaje HRV 3C proteaza, kako bi se afinitetni privjesak mogao ukloniti (plazmid pOPINS3C¹⁰⁵). Ekspresija je provedena u sojevima Lemo21(DE3) (NEB) i Rosetta 2(DE3)

pLacI (Novagen) na dva načina ekspresije: indukcijom IPTG-om u Power Broth podlozi (AthenaES), komercijalnoj pojačanoj podlozi za ekspresiju, te autoindukcijom u komercijalnoj podlozi Overnight Express Instant TB medium (Novagen). Ukupno je testirano 16 (2⁴) različitih kombinacija u kojima su varirani proteini, afinitetni privjesci, bakterijski soj i način ekspresije.

3.3.2. Pročišćavanje proteina

Pročišćavanje proteina je započeto lizom bakterijskih stanica. Stanice su resuspendirane u hladnom puferu za lizu (50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH = 8,0, 300 mmol L⁻¹ NaCl, 10 mmol L⁻¹ imidazol), te lizirane kombiniranim djelovanjem lizozima (konačne koncentracije 1 mg mL⁻¹, inkubirano 30 min na ledu) i ultrazvučnog razaranja sonikatorom (80% amplitude, 2 min s pauzom svake 2 s). DNA je razgrađena djelovanjem DNaze I (konačne koncentracije 5 µg mL⁻¹) tijekom 20 minuta. Lizat je razbistren centrifugiranjem 45 min pri 14500 g, te profiltriran preko 0,45 µm filtra, pa nanesen na Ni-NTA kolonu. Veličina kolone je prilagođena veličini ekspresijske kulture: za 3 L kulture korišteno je oko 2 mL Ni-NTA punila. Za manje ekspresije, npr. 0,5 L za izolaciju varijanti, korištena je kolona od 0,5 mL. Lizat je nanesen na kolonu (ekvilibriranu u puferu za lizu) uz protok 0,5 mL min⁻¹. Kolona je zatim uz protok 1,0 mL min⁻¹ isprana puferom za ispiranje (pufer za lizu uz dodatak 20 mmol L⁻¹ imidazola), pa je vezani protein eluiran puferom za eluciju (pufer za lizu uz dodatak 300 mmol L⁻¹ imidazola). Frakcije s najvećom koncentracijom proteina spojene su i ugušćene na Amicon Ultra-15 koncentratorima. U idućem koraku, proteini su pročišćavani gel-filtracijom na HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution koloni pomoću sustava FPLC Åkta (Pharmacia). Odabrane frakcije su ugušćene na isti način pa odsoljene na PD-10 koloni. Uzorci u puferu sastava 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH = 7,5 su alikvotirani i pohranjeni na -80°C do korištenja.

Čistoća frakcija provjeravana je SDS-poliakrilamidnom elektroforezom¹⁰⁶ (SDS-PAGE) na 10% gelu izvedenom na sustavu Mini Protean Tetra Cell. Nativna elektroforeza provedena je na PhastSystem sustavu za elektroforezu, na gradijentnim gelovima s 8-15% poliakrilamidom. Gelovi su bojani Coomassie bojom R-250.

Cirkularni dikroizam mjeren je na uzorcima koncentracije 0,35 mg mL⁻¹, u 10 mmol L⁻¹ natrijevom fosfatnom puferu pH = 7,4 i pri duljini puta 1 mm. Korišten je instrument Jasco J-815.

PpRCA i EcNudB su eksprimirani i pročišćeni slično kao PpND i AtND, uz manje preinake: nisu dodavane kloridne soli Mg i Zn, koncentracija IPTG za indukciju ekspresije iznosila je 0,5 mmol L⁻¹, a ekspresija je trajala 3 sata pri 37°C i 220 rpm. Proteini su pročišćeni samo afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA koloni i odsoljeni na PD-10 koloni.

Koncentracija proteina određena je mjerenjem apsorpcije pri 280 nm na mikrovolumnom spektrofotometru BioDrop.

3.3.3. Ciljana mutageneza

Za ciljanu mutagenezu korišten je komercijalni set QuikChange II XL (Agilent). Svi protokoli provedeni su prema uputama proizvođača. U tablici 2 navedeni su sljedovi početnica koje su primjenjene na ekspresijskim plazmidima (vidi poglavlje 3.3.1.). Početnice PpNDins595G korištene su za inserciju glicina u motiv aktivnog mjesta, što je dalo varijantu označenu HECCGH. Na toj varijanti izvedena je dodatna mutageneza s početnicama PpND_C594L, što je dalo varijantu označenu HECLGH. Svim varijantama je uspješnost mutageneze provjerena sekvenciranjem cijele dužine gena (Macrogen Europe, Nizozemska).

Tablica 2. Početnice korištene za ciljanu mutagenezu. Izmijenjeni kodon je podcrtan.

oznaka	sljed početnice (5' → 3')
PpNDins595G-F	CATCTGCCATGAATGCTGT <u>GGC</u> CATGGTATTGGTCCGC
PpNDins595G-R	GCGGACCAATACCATGGCCACAGCATTCATGGCAGATG
PpND_C594L_F	CCATGAATGCCTGGCCATGGTATTGG
PpND_C594L_R	CCAATACCATGGCC <u>CAG</u> GCATTCATGG
PpND_R613D_F	CGTGCAAGCACCGTTGATCTGGAAGTCAAGAGG
PpND_R613D_R	CCTCTTGCAGTTCCAGATCAACGGTGCCTGCACG
PpND_E592A_F	CCATACCATCTGCCATGCGTGCTGTCATGGTATTGG
PpND_E592A_R	CCAATACCATGACAGCACGCATGGCAGATGGTATGG
AtND_E594A_F	CTCACACCATTTGCCATGCGTGTTGCCATGGCATTGG
AtND_E594A_R	CCAATGCCATGGCAAC <u>CAG</u> CATGGCAAATGGTGTGAG
PpND_E92A_F	GACCGCACGTCGTGCGTGCAAGAAGAAGTGC
PpND_E92A_R	CAGTTCTTCTTGCAGCGCACGACGTGCGGTC
PpND_A76C_F	GGGATATTAGCAGTGCAGTGCATATTAGTGCC
PpND_A76C_R	GGCACTAATATGACCGCAGCTGCTAATATCCC
PpND_Y123A_F	GCGTGATCAACGGTGGCAAAGCGATCAACAACGAGTATAACGATG
PpND_Y123A_R	CATCGTTATACTCGTTGTTGATCGCTTTGCCACCGTTGATCACGC

3.3.4. Kristalizacija proteina

U svim eksperimentima korištena je metoda difuzije para sjedeće kapi na 18°C.

U prvom pokušaju postavljena je kristalizacija proteina PpND. Testirano je više različitih koncentracija proteina: 5, 10, i 15 mg mL⁻¹ u puferu sastava 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH = 7,5. Kapi su postavljane kristalizacijskim robotom Oryx8 (Douglas Instruments) na ploče s 96 rezervoara i tri kapi uz svaki rezervoar (za različite koncentracije proteina) tako da je pipetirano 0,5 µL uzorka proteina i 0,5 µL matičnice, uz ukupni volumen matičnice od 50 µL. Korišteni su komercijalni setovi uvjeta za kristalizaciju: Index (Hampton Research), Crystal Screen (Hampton Research) i JCSG+ (Qiagen).

U drugom pokušaju korišteni su resursi pogona za pripremu i karakterizaciju proteinskih uzoraka, SPC Facility¹⁰⁷ (EMBL Hamburg, Njemačka). Uzorak proteina PpND koncentracije 10 mg mL⁻¹ u puferu sastava 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH = 7,5 korišten je s komercijalnim setovima JCSG+ (Qiagen) i Morpheus HT-96 (Molecular Dimensions). Uzorci koncentracija 8 i 12 mg mL⁻¹ korišteni su s komercijalnim setovima Clear Strategy I i II (Molecular Dimensions). Za postavljanje kapi korišten je robot Mosquito-LCP (TTP Labtech), a pipetirano je 0,1 µL uzorka proteina i 0,1 µL matičnice na ploče s 96 rezervoara (s 50 µL matičnice) i po jednom kapi.

U trećem pokušaju korištene su DPP III-inaktivne varijante PpND E592A i AtND E594A koncentracije 15 mg mL⁻¹ u puferu sastava 100 mmol L⁻¹ NaCl, 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH = 7,5. Oba proteina korištena su s komercijalnim setovima JCSG+ (Qiagen), MIDAS (Molecular Dimensions) i SaltRX (Hampton Research). Kapi od 0,5 µL proteina i 0,5 µL matičnice (s 50 µL matičnice u rezervoaru) pipetirane su robotom Oryx8 (Douglas Instruments) na ploče s 96 rezervoara i tri kapi uz svaki rezervoar.

3.3.5. Priprema poliklonskog antitijela

Poliklonsko antitijelo koje specifično prepoznaje protein PpND pripremljeno je kao kunićji serum. Uzorak pročišćenog rekombinantnog proteina PpND poslan je tvrtki Abcore za imunizaciju kunića, prema njihovom standardnom protokolu, te je kao konačni proizvod primljen serum imuniziranih životinja. Kunićji serum korišten je bez pročišćavanja i preinaka u imunodetekcijskim metodama.

Za validaciju antitijela, ispitana je imunodetekcija rekombinantnih PpND, AtND i ljudske DPP III, kao i proteinski ekstrakti iz *E. coli* i *P. patens*. Ispostavilo se da protein rubisko-aktivaza iz mahovine (PpRCA) također reagira sa serumom. Identifikacija PpRCA provedena je u Laboratoriju za spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković. Taj protein je kloniran,

ekspimiran i pročišćen kako je već opisano. Zajedno s kloroplastima izoliranim iz mahovine (poglavlje 3.4.3), protein PpRCA korišten je u validaciji antiseruma.

3.3.6. Test peptidazne aktivnosti

Peptidazna aktivnost određena je standardnim testom s umjetnim supstratom Arg-Arg-2NA¹⁸. Kolorimetrijska metoda¹⁰⁸ za mjerenje specifične aktivnosti enzima provedena je u reakcijskoj smjesi od 1 mL uz 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ supstrat i 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CoCl_2 pri 37°C. Za ispitivanje supstratne specifičnosti korišteni su dipeptidil-2-naftilamidni supstrati s idućim dipeptidilnim skupinama: Arg-Arg-, Lys-Ala-, Ala-Arg-, Ala-Ala-, Gly-Arg-, Pro-Arg-, Phe-Arg-, Asp-Arg-, Gly-Pro-, Gly-Phe-. Za ispitivanje pH optimuma korišteni su Tris-HCl puferi u rasponu pH od 7 do 9 i natrijevi fosfatni puferi u rasponu pH od 6 do 8. Svi puferi imali su ionsku jakost $I = 0,01$. Svi idući testovi izvedeni su u Tris-HCl puferu pH = 7,4. Kinetička mjerenja izvedena su fluorimetrijskim¹⁸ testom u 3 mL reakcijske smjese na spektrofluorimetru Cary Eclipse ($\lambda_{\text{ex}} = 332$ nm, širina procijepa 10 nm, $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm, širina procijepa 5 nm) tijekom 1 minute reakcije pri 25°C, uz raspon koncentracija supstrata od 0,25 do 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Za baždarni pravac korištene su otopine 2-naftilamina (2-NA). Parametri su određeni nelinearnom regresijom u programskom paketu GraphPad Prism 5.

3.3.7. Test fosfatazne aktivnosti

Fosfatazna aktivnost prvotno je određena kontinuiranim fluorescentnim testom, koristeći fluorescentno obilježeni fosfat-vezni protein iz *E. coli* kao fosfatni senzor, kako je prethodno opisano². Vezanjem fosfata dolazi do povećanja fluorescencije senzora. Prvi test, u kojem je ispitana aktivnost u prisustvu 73 potencijalna supstrata Nudix-hidrolaza, proveden je u Berkeleyu, SAD, u suradnji s prof. Brennerom. Reakcijska smjesa sadržavala je 10 mmol L^{-1} Tris-HCl pH = 7,6, 10 mmol L^{-1} MgCl_2 i 5-10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ fosfatni senzor. U slučaju da je pirofosfat bio očekivani produkt reakcije, smjesa je sadržavala 0,05 U mL^{-1} anorganske pirofosfataze; ekvivalentno, ako je očekivani produkt bio nukleozid-monofosfat, dodano je 1 U mL^{-1} alkalne fosfataze. Koncentracije supstrata su iznosile 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a enzima (PpND i AtND) 50 nmol L^{-1} . Supstrati su bili grupirani u skupine prema strukturnoj sličnosti (tablica 3). Negrupirani supstrati su testirani individualno zbog visoke količine fosfata u uzorku ili jer je bila riječ o novom supstratu (IPP). Tijek reakcije praćen je na GENios čitaču mikrotitarskih pločica ($\lambda_{\text{ex}} = 425$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 465$ nm, 100 ciklusa) tijekom 25 minuta pri 37°C.

Tablica 3. Popis svih testiranih supstrata s kraticama. Kao dodatni enzimi u reakcijskoj smjesi korišteni su alkalna fosfataza (AP) i anorganska pirofosfataza (PP). Ako su pojedini supstrati testirani kao skupina, to je navedeno u prvom stupcu.

Skupina	Kratica	Ime supstrata	Dodatni enzim
1	ADP-riboza	adenozin-5'-difosforiboza	AP
1	ciklička ADP-riboza	ciklička adenozin-5'-difosforiboza	AP
1	GDP-glukoza	gvanozin-5'-difosfoglukoza	AP
1	GDP-manoza	gvanozin-5'-difosfo-D-manoza	AP
2	CDP-kolin	citidin-5'-difosfokolin	AP
2	CDP-glicerol	citidin-5'-difosfoglicerol	AP
2	TDP-glukoza	timidin-5'-difosfo- α -D-glukoza	AP
2	UDP-acetil-galaktozamin	uridin-5'-difosfo-N-acetil-galaktozamin	AP
2	UDP-acetil-glukozamin	uridin-5'-difosfo-N-acetil-glukozamin	AP
2	UDP-glukoza	uridin-5'-difosfoglukoza	AP
3	Ap3A	P ¹ ,P ³ -di(adenozin-5')-trifosfat	AP
3	Ap4A	P ¹ ,P ⁴ -di(adenozin-5')-tetrafosfat	AP
3	Ap5A	P ¹ ,P ⁵ -di(adenozin-5')-pentafosfat	AP
3	Ap4G	P ¹ (-5'-adenozil)-P ⁴ -(5'-gvanozil)-tetrafosfat	AP
4	Ap4U	P ¹ (-5'-adenozil)-P ⁴ -(5'-uridil)-tetrafosfat	AP
4	Ap5dT	P ¹ (-5'-adenozil)-P ⁵ -[5'-(2'-deoksi-timidil)]-pentafosfat	AP
4	Ap5G	P ¹ (-5'-adenozil)-P ⁵ -(5'-gvanozil)-pentafosfat	AP
4	Ap5U	P ¹ (-5'-adenozil)-P ⁵ -(5'-uridil)-pentafosfat	AP
5	Gp2G	P ¹ (-5'-gvanozil)-P ² -(5'-gvanozil)-difosfat	AP
5	Gp3G	P ¹ (-5'-gvanozil)-P ³ -(5'-gvanozil)-trifosfat	AP
5	Gp4G	P ¹ (-5'-gvanozil)-P ⁴ -(5'-gvanozil)-tetrafosfat	AP
5	Gp5G	P ¹ (-5'-gvanozil)-P ⁵ -(5'-gvanozil)-tetrafosfat	AP
5	m7Gp3C	P ¹ (-5'-7-metil-gvanozil)-P ³ -(5'-citidil)-trifosfat	AP
6	FAD	flavin-adenin-dinukleotid	AP
6	Deamino-NAD ⁺	nikotinamid-hipoksantin-dinukleotid	AP
6	NAD ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid	AP
6	NADH	reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid	AP
7	ADP	adenozin-5'-difosfat	PP
7	ATP	adenozin-5'-trifosfat	PP
7	dADP	2'-deoksiadenozin-5'-difosfat	PP
7	dATP	2'-deoksiadenozin-5'-trifosfat	PP
7	8-oxo-dATP	8-okso-2'-deoksiadenozin-5'-trifosfat	PP
7	2'-O-Me-ATP	2'-O-metiladenozin-5'-trifosfat	PP
7	N1-Me-ATP	N ¹ -metiladenozin-5'-trifosfat	PP
7	N6-Me-ATP	N ⁶ -metiladenozin-5'-trifosfat	PP
8	CDP	citidin-5'-difosfat	PP
8	5-Me-dCTP	5-metil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfat	PP
8	5-MeOH-dCTP	5-hidroksimetil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfat	PP
8	5-OH-dCTP	5-hidroksi-2'-deoksicitidin-5'-trifosfat	PP
8	N4-Me-dCTP	N ⁴ -metil-2'-deoksicitidin-5'-trifosfat	PP
8	2'-O-Me-CTP	2'-O-metilcitidin-5'-trifosfat	PP

9	dGDP	2'-deoksigvanozin-5'-difosfat	PP
9	dGTP	2'-deoksigvanozin-5'-trifosfat	PP
9	GDP	gvanozin-5'-difosfat	PP
9	GTP	gvanozin-5'-trifosfat	PP
9	p4G	gvanozin-5'-tetrafosfat	PP
9	3'-dGTP	3'-deoksigvanozin-5'-trifosfat	PP
9	8-oxo-dGTP	8-okso-2'-deoksigvanozin-5'-trifosfat	PP
9	2'-O-Me-GTP	2'-O-metilgvanozin-5'-trifosfat	PP
9	8-oxo-GTP	8-oksogvanozin-5'-trifosfat	PP
9	N1-Me-GTP	N ¹ -metilgvanozin-5'-trifosfat	PP
10	UDP	uridin-5'-difosfat	PP
10	UTP	uridin-5'-trifosfat	PP
10	5-MeOH-dUTP	5-hidroksimetil-2'-deoksiuridin-5'-trifosfat	PP
10	2'-O-Me-UTP	2'-O-metiluridin-5'-trifosfat	PP
10	5-Me-UTP	5-metiluridin-5'-trifosfat	PP
11	dITP	2'-deoksiinozin-5'-trifosfat	PP
11	ITP	inozin-5'-trifosfat	PP
11	TDP	timidin-5'-difosfat	PP
11	TTP	timidin-5'-trifosfat	PP
11	XTP	ksantozin-5'-trifosfat	PP
	ADP-glukoza	adenozin-5'-difosfoglukoza	AP
	GDP-fukoza	gvanozin-5'-difosfo-β-L-fukoza	AP
	UDP-galaktoza	uridin-5'-difosfogalaktoza	AP
	UDP-glukuronat	uridin-5'-difosfoglukuronat	AP
	m7GP5G	P ¹ -(5'-7-metil-gvanozil)-P ⁵ -(5'-gvanozil)-pentafosfat	AP
	Ap6A	P ¹ -(5'-adenozil)-P ⁶ -(5'-adenozil)-heksafosfat	AP
	CTP	citidin-5'-trifosfat	PP
	dCDP	2'-deoksicitidin-5'-difosfat	PP
	dCTP	2'-deoksicitidin-5'-trifosfat	PP
	dUTP	2'-deoksiuridin-5'-trifosfat	PP
	H2UTP	5,6-dihidrouridin-5'-trifosfat	PP
	IPP	izopentenil-difosfat	-

Inicijalni rezultati korišteni su za odabir pojedinih supstrata za kinetička mjerenja. Specifično, PpND je dodatno ispitan uz IPP, ADP, ATP, dADP, dATP, 8-oxo-dATP, 2'-O-Me-ATP, N1-Me-ATP, N6-Me-ATP, dGDP, dGTP, GDP, GTP, p4G, 3'-dGDP, 8-oxo-dGTP, 2'-O-Me-GTP, 8-oxo-GTP, i N1-Me-GTP (puna imena supstrata dana su u tablici 3). Kinetika reakcije određena je mjerenjem fluorescencije fosfatnog senzora na FluoroMax-4 spektrofluorimetru ($\lambda_{\text{ex}} = 430 \text{ nm}$, širina procijepa 1-2,5 nm, $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$, širina procijepa 1-5 nm) tijekom 5 minuta reakcije pri 37°C. Koncentracije enzima iznosile su 20-344 nmol L⁻¹, a mjerena je početna brzina reakcije. Michaelis-Mentenina jednadžba pojednostavljena je na linearni oblik:

$$\frac{v_0}{[E_0]} = \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} [S]$$

iz kojeg je parametar k_{cat}/K_M određen linearnom regresijom.

Naknadni testovi, u Zagrebu, provedeni su korištenjem komercijalnog seta Malachite Green Phosphate Detection Kit. Set je korišten prema uputama proizvođača.

Kako bi se potvrdilo da je izopentenil-fosfat (IP) produkt reakcije enzima Nudix-DPP III i IPP, koristila se metoda tekućinske kromatografije spregnute s tandemskom masenom spektrometrijom (engl. *liquid chromatography tandem-mass spectrometry*, LC-MS/MS). Metoda je provedena kao servisna usluga u BIOCentru u Zagrebu. Analizirane su reakcije u kojima je 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ IPP inkubiran 10 minuta pri 37°C s 60 i 600 nmol L^{-1} PpND ili bez enzima. Reakcije su prekinute dodatkom 5 mmol L^{-1} EDTA. Reakcijske smjese analizirane su na instrumentu 1290 Infinity LC System and Agilent Technologies 6460 Triple Quadrupole mass spectrometer (Agilent) s kolonom Eclipse Plus C18 RRHD (50 mm duljine, 2,1 mm unutarnji promjer i 1,8 μm veličina čestica). Sastojci reakcijske smjese su eluirani izokratično sa smjesom faze A (20 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 s 0,1% trietilamina) i faze B (80% acetonitril, v/v, s 0,1% trietilamina) u omjeru 70:30 uz protok 0,2 mL min^{-1} . Maseni spektri su snimljeni negativnom ionizacijom elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionisation*, ESI) pri naponu kapilare 3500 V, temperaturi ionizacije 300°C u struji dušika (5 l min^{-1}), u MRM (engl. *multiple reaction monitoring*) opciji.

3.3.8. Test izomerazne aktivnosti

Izopentenil-difosfat-izomerazna aktivnost ispitana je funkcionalnim testom komplementacije boje u bakteriji *E. coli*. Test se bazira na povećanoj proizvodnji β -karotena prilikom ekspresije IDI. Plazmidi pAC-BETA (nosi otpornost na kloramfenikol) i pTrcAtIDI (nosi otpornost na ampicilin) bili su velikodušan dar prof. Francisa X. Cunninghama. Prvo je pripremljen plazmid pTrc bez gena, koji je služio kao negativna kontrola. Plazmid pTrcAtIDI razgrađen je djelovanjem enzima *Pst*I i recirkulariziran T4 DNA-ligazom kako bi se dobio prazan plazmid pTrc. U tako dobiven plazmid djelovanjem restrikcijskih enzima *Bam*HI i *Xba*I uklonirani su geni za PpND i AtND, umnoženi početnicama iz tablice 4 pomoću Phusion DNA polimeraze. Naknadno je ustanovljeno da zbog greške u kreiranju početnica dolazi do pomaka čitajućeg okvira. Stoga je izvedena ciljane mutageneza na plazmidima pTrcPpND i pTrcAtND s početnicama pTrcORF, čime je eliminiran jedan nukleotid.

Eksprimirani proteini na N-kraju imali su dodatnu sekvencu MSRSAAGGS. Svi plazmidi su sekvencirani u punoj dužini gena (Macrogen Europe).

Tablica 4. Početnice korištene za kloniranje u pTrc vektor.

oznaka	slijed početnice (5' → 3')
pTrc PpND_F	GCCGGATCCATGGAAGGCTTTCAAGAGG
pTrcPpND_R	GCCTCTAGATTACAGTTTGATGTCGTCCAGCAG
pTrcAtND_F	GCCGGATCCATGGCGGAGGAGCACTTC
pTrcAtND_R	GCCTCTAGATTAGTTCATCAATGCTTCTGCTAATGG
pTrcORF_F	ATGTCGAGATCTGCAGCCGGGGGATCCATG
pTrcORF_R	CATGGATCCCCGGCTGCAGATCTCGACAT

Kompetentne stanice XL1Blue MSF⁺ soja *E. coli* transformirane su dvama plazmidima: pAC-BETA i jednim od pTrc, pTrcAtIDI, pTrcPpND i pTrcAtND, a uspješno transformirane kolonije odabrane su selekcijom kloramfenikolom (50 µg mL⁻¹) i ampicilinom (100 µg mL⁻¹) na pločama s krutom LB podlogom. Uzgojene su tekuće kulture, tako da je 10 mL podloge s antibioticima inokulirano 6 sati na 37°C, a zatim 16 sati na 30°C u mraku. Stanice su centrifugirane u alikvotima od 2 mL. Za ekstrakciju i kvantifikaciju¹⁰⁹ β-karotena, talozi stanica su liofilizirani i resuspendirani u 1 mL otopine heksana i acetona (v:v=6:4), zatim vorteksirani 10 s, homogenizirani 5 min pri 30 rpm na mlinu za miješanje i podvrgnuti ultrazvučnoj kupelji 8 min. Nakon centrifugiranja 10 min na 14000 g, supernatantu je izmjerena apsorpcija pri 453 nm, 505 nm, 645 nm i 663 nm. Masa β-karotena u µg po gramu suhe tvari izračunata je prema formuli:

$$m(\beta\text{-karoten}) = \frac{(0,216 \times A_{663} - 1,22 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}) \times 10 \mu\text{g}}{\text{masa suhe tvari (g)}}$$

gdje je masa suhe tvari masa liofiliziranog taloga stanica.

3.4. Metode rada s mahovinom *P. patens*

3.4.1. Uzgoj mahovine

Mahovina *P. patens* uzgajana je u standardnim uvjetima opisanima u literaturi^{110–113}. U komori za uzgoj temperatura je održavana na 22°C, a intenzitet svjetla iznosio je 55 µmol m⁻² s⁻¹ uz režim dugog dana, tj. izmjenu od 16 sati svjetla i 8 sati mraka. Osnovna Knopova podloga (KNOP) sadrži pet soli i dodatak mikroelemenata (ME), a za potrebe bržeg rasta podlozi se mogu dodati amonijev tartarat (AT, konačne koncentracije 5 mmol L⁻¹) i

glukoza (G, 1% w/v). Nakon otapanja svih sastojaka, pH otopine podešen je na 5,8 otopinom KOH (1 mol L⁻¹). Podloge su autoklavirane 20 min na 121°C. Sastav je dan u tablici 5. Za krute podloge, tekućoj podlozi je dodan agar (1,2% w/v). Krute podloge korištene su u plastičnim Petrijevim posudicama promjera 90 mm, koje su bile zatvorene parafilmom i kirurškom ljepljivom vrpcom Micropore. Za održavanje linija, protonemalno tkivo s ruba postojeće kolonije preneseno je na svježju krutu KNOP ME podlogu svakih tjedan dana, ili je preneseno gametofitno tkivo nakon dva mjeseca rasta.

U tekućim kulturama mahovina se uglavnom sastoji od protonemalnog tkiva. Inokulacija tekuće kulture započeta je dodatkom tkiva s krute podloge u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL s 30 mL podloge, te je tkivo perturbirano Ultra-Turrax homogenizatorom 1 min pri 18000 rpm. Tekuće kulture uzgajane su pri standardnim uvjetima uz potresanje 120-160 rpm. Za održavanje tekuće kulture, perturbacija tkiva je vršena jednom tjedno. Za povećanje volumena, postojeća kultura je filtrirana preko 100 µm filtra, a tkivo preneseno u novu tikvicu, npr. od 250 mL s 80 mL tekuće podloge, ili od 500 mL s 180 mL podloge. Sav rad s mahovinom vršen je u kabinetu s laminarnim protokom zraka kako bi se izbjeglo zagađenje akseničnih kultura.

Tablica 5. Sastav podloge za uzgoj mahovine, pH = 5,8. Mikroelementi su pripremljeni kao zajednička koncentrirana matična otopina.

komponenta	koncentracija
KH ₂ PO ₄	0,25 g L ⁻¹
KCl	0,25 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g L ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1,0 g L ⁻¹
FeSO ₄ ·7H ₂ O	12,5 mg L ⁻¹
mikroelementi:	
H ₃ BO ₃	0,7725 mg L ⁻¹
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,788 mg L ⁻¹
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,0775 mg L ⁻¹
KI	103,75 µg L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	30,25 µg L ⁻¹
CuSO ₄ ·5H ₂ O	3,125 µg L ⁻¹
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,985 µg L ⁻¹
amonijev tartarat	0,92 mg L ⁻¹
glukoza	0,01 g L ⁻¹

3.4.2. Obrada tkiva prilikom izolacije makromolekula

Za potrebe izolacije DNA, RNA i proteina potrebno je pripremiti odgovarajuće tkivo. Pokazalo se da je za kvalitetnu izolaciju makromolekula nužno koristiti svježe protonemalno tkivo¹¹⁴. Prilikom ekstrakcije iz gametofita ili starog tkiva dolazi do zagađenja nepoznatim tvarima (vjerojatno ugljikohidratima i fenolnim kiselinama), koje negativno utječu na enzimске reakcije, te su posebno problematične u izolatima nukleinskih kiselina. Dodatno, kako bi se uklonio dio spojeva koji se ko-ekstrahiraju, iz svježeg tkiva treba ukloniti što više tekućine¹¹⁴. Tkivo treba smjestiti između dva komada filter-papira i snažno pritisnuti rukom. Nakon toga tkivo treba premjestiti na suhi dio filter-papira i ponoviti. Postupak se ponavlja 3-5 puta, to jest dok više ne ostaje mokar trag na filter-papiru. Nakon toga tkivo treba izvagati i smrznuti u tekućem dušiku. Tkivo se jednostavno homogenizira tučkom u tekućim dušikom ohlađenom tarioniku. Homogenizacija je uspješna kada tamno-zeleno tkivo poprimi izgled svijetlo-zelenog praška. Prašak je hladnom spatulom prenesen u ohlađenu tubicu za centrifugiranje i procesiran prikladnim protokolom.

3.4.3. Izolacija kloroplastnih proteina

Protokol za izolaciju kloroplasta prilagođen je prema onome u literaturi¹¹⁵. S obzirom da je teško dobiti čiste kloroplastne frakcije, cilj je bio dobiti frakciju organela bez citoplazmatskih proteina. Svježe protonemalno tkivo iz 180 mL tri tjedna stare tekuće kulture filtrirano je na 45 μm filtru uz vakuum. Tkivo je resuspendirano u puferu za izolaciju organela (1% w/v PVPP, 300 mmol L⁻¹ D-sorbitol, 50 mmol L⁻¹ HEPES, 2 mmol L⁻¹ Na-EDTA, 1 mmol L⁻¹ MgCl₂ i 0,1% w/v BSA) i 100 puta kratko sjeckano kućanskim štapnim mikserom, zatim filtrirano preko tri sloja komprese kako bi se uklonili krupni ostaci tkiva. Filtrat je centrifugiran 10 min pri 1500 g, nakon čega su kloroplasti istaložili s netopljivim PVPP, koji je bio zeleno obojen. Većina supernatanta je uklonjena, a kloroplasti su nježno resuspendirani kistom. Izolirani kloroplasti su mješavina intaktnih i oštećenih, s nešto onečišćenja mitohondrijima¹¹⁵. Po 1 mL supernatanta je prebačeno u 1,5 mL tubice za centrifugiranje, i ponovno centrifugirano. Talogu je dodano 100 μL pufera za izolaciju proteina (125 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH = 6,8, 4% (w/v) SDS, 0,02% (w/v) bromfenol-plavilo, 20% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β -merkaptotanol) te je inkubiran 3 min pri 96°C i još jednom centrifugiran. Konačni supernatant pohranjen je na -20°C do analize.

3.5. Mjerenje razine transkripcije gena

3.5.1. *Tretman mahovine*

Četiri tjedna stara tekuća kultura protonemalnih stanica, tjedno homogenizirana, pripravljena je za tretman biljnim regulatorima rasta i stresorima (tablica 6). Eksperiment je proveden u mikrotitarskim pločicama sa 6 jažica, s dva puta po 10 mL kulture za svaki tretman. Nakon dodatka spoja, kulture su inkubirane u standardnim uvjetima 6 sati. Nakon 6 sati tkivo je odmah homogenizirano kako bi se izolirala RNA. Sakupljeno je 10-30 mg tkiva za analizu.

Tablica 6. Koncentracije biljnih regulatora rasta i stresora korištene u tretmanu mahovine.

spoj	konačna koncentracija
NaCl	300 mmol L ⁻¹
H ₂ O ₂	10 μmol L ⁻¹
<i>trans</i> -zeatin, tZ	25 μmol L ⁻¹
indol-3-octena kiselina, IAA	10 μmol L ⁻¹
salicilna kiselina, SA	2,5 μmol L ⁻¹
apscizinska kiselina, ABA	25 μmol L ⁻¹

3.5.2. *Izolacija RNA*

Tkivo je tretirano kako je već opisano (vidi. 3.4.2). Homogenatu mase manje od 50 mg je dodano 500 μL RNazol-a, komercijalnog reagensa za izolaciju RNA, te je temeljito promiješano okretanjem i vorteksiranjem. Takav uzorak je odmah procesiran ili pohranjen na -80°C do izolacije RNA. Idući koraci su provedeni prema uputama proizvođača za izolaciju ukupne RNA. U smjesu je dodano 0,2 mL redestilirane vode, dobro promiješano, te inkubirano 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja 15 min na 12000 g, odvojeno je 0,5 mL supernatanta u novu tubicu. Tome je dodano 0,5 mL izopropanola, smjesa je promiješana i inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. RNA je istaložena centrifugiranjem 10 min na 12000 g, te je dobiven gelu-sličan talog na stijenci tubice. Talog je dva puta ispran sa 75% (v/v) etanolom i centrifugiran 2 min na 8000 g. Talog je osušen na sobnoj temperaturi 30 min dok sav etanol nije ispario. RNA je resuspendirana u 20 μL sterilne redestilirane vode. Koncentracija i čistoća je mjerena mikrovolumnim spektrofotometrom BioDrop, tako da je čistim smatran uzorak RNA s iznosom omjera A₂₆₀/A₂₈₀ između 1,8 i 2,0. Alikvot RNA je pohranjen na -80°C, a ostatak je korišten u idućem protokolu.

3.5.3. Reverzna transkripcija RNA

Korištena je reverzna transkriptaza RevertAid prema uputama proizvođača (Thermo Scientific). Kako bi se uklonila kontaminirajuća DNA, 1 µg RNA tretiran je s 1 U DNaze I. Nakon inkubacije 30 min pri 37°C, DNaza I je inaktivirana s EDTA 10 min pri 65°C. U 11 µL tako dobivene reakcijske smjese dodane su početnice oligo(dT)₁₈ (Thermo Scientific) i smjesa je inkubirana 5 min na 65°C kako bi se denaturirala RNA. Konačno, dodana je reverzna transkriptaza (RTaza), odgovarajući pufer, oligonukleotidi i inhibitor RNaze. Reakcijska smjesa je inkubirana 60 min na 42°C i reakcija zaustavljena inaktivacijom RTaze 5 min na 70°C. Tako pripremljena cDNA je razrijeđena deset puta i u alikvotima pohranjena na -80°C.

3.5.4. Kvantitativni RT-PCR (qRT-PCR)

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *quantitative Real Time polymerase chain reaction*), qRT-PCR, mjerena je na instrumentu 7300 RealTime PCR System (Applied Biosystems). Korišten je Sybr Green reagens za detekciju dvolančane DNA. Po jedan biološki replikat mjerena je na jednoj mikrotitarskoj pločici s 96 jažica u tri tehnička replikata. Ukupno su pripremljena dva biološka replikata. Za normalizaciju korišteni su geni za α -tubulin 1 (TUA, COSMOSS unos Pp1s341_23V6.1) i „protein pigmentacije cvijeta“ (engl. „*flower pigmentation protein*“, LWD, COSMOSS unos Pp1s92_5V6.1)¹¹⁶ korištenjem početnica navedenih u tablici 7. U drugom eksperimentu mjerena je i promjena ekspresije gena dehidrina (engl. dehydrin, COSMOSS unos Pp1s442_22V6.1) Reakcijske smjese od ukupno 15 µL sadržavale su 100 nmol L⁻¹ početnice i 50 puta razrijeđenu cDNA. Za sve korištene početnice efikasnost umnažanja iznosila je između 90 i 110%. Relativna količina transkripta gena za PpND izračunata je metodom po Pfafflu¹¹⁷.

Tablica 7. Početnice korištene za qRT-PCR.

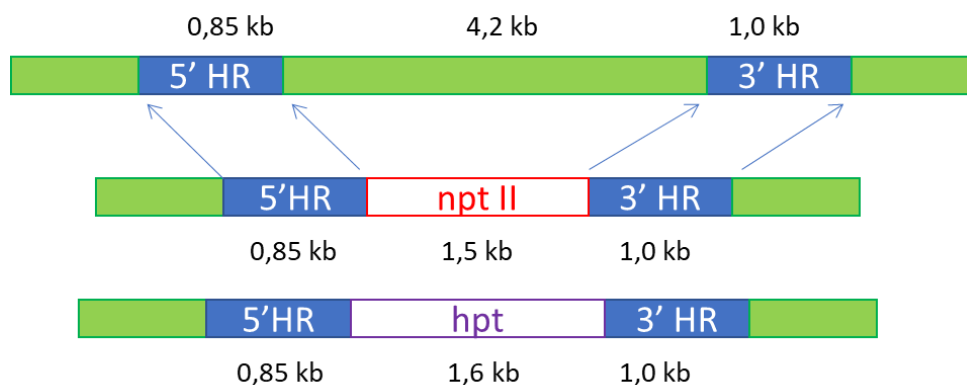
oznaka	sljed početnice (5' → 3')
qPpND_fwd	TCCCAAGCCAAGTTCGACTAC
qPpND_rev	CGACCATCGGGTGTCATATG
qTUA_fwd	CGTAGGAGGGACCAGTTTGG
qTUA_rev	TGCATTCATCCCCGAGTCA
qLWD_fwd	CACTGCAGGAGCTGAAATCAATC
qLWD_rev	CGTAGTATCTGGAGCTTGGTGGA
qDEHYDRIN_fwd	GGCTACGGCTATGATCAACAAACG
qDEHYDRIN_rev	TGTGCTGTGTTCCGGATTCCAAG

3.6. Priprema i probir *knock-out* mutanti mahovine

Knock-out mutante pripremljene su na Sveučilištu u Freiburgu, Njemačka, u laboratoriju koji vodi prof. Ralf Reski. Selekcija i probir mutanti završeni su u Zagrebu prema objavljenom protokolu¹¹¹.

3.6.1. Kreiranje genskog konstrukta

Konstrukti za transformaciju stanica mahovine pripremljeni su tako da se s obje strane kazete s antibiotskim markerom za selekciju nalaze regije homologne genomu u području gena za PpND (slika 16). Konkretno, START kodon i eksoni 1-12 zamijenjeni su kazetama nptII i hpt, koje nose gene za otpornost na antibiotike G418 (nptII) i higromicin B (hpt). 5' homologna regija je netranslatirani dio gena prije START kodona, a 3'-homologna regija područje od 13. do 16. eksona.



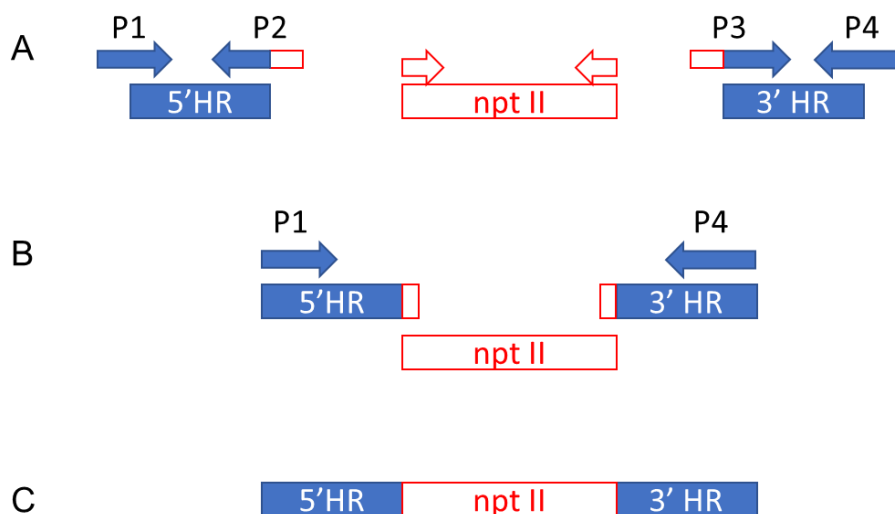
Slika 16. Shema konstrukata korištenih za transformaciju mahovine. Na vrhu je lokus u divljem tipu, niže su konstrukti s kazetama. Regija od 4,2 kilobaze (kb) u genu zamijenjena je kazetama duljine 1,5 i 1,6 kb homolognom rekombinacijom preko 5'- i 3'-homolognih regija (HR) duljine 0,85 i 1,0 kb.

Kazete i homologne regije klonirane su odvojeno koristeći početnice navedene u tablici 8. Kao kalupi korišteni su plazmidi s kazetama u upotrebi u laboratoriju prof. Reskia, a za homologne regije korištena je genomska DNA ustupljena ljubaznošću dr. sc. Stefanie Müller. Početnice P1 i P2 korištene su za umnožavanje 5'-homologne regije (HR), P3 i P4 za 3' HR, a nptII_F i nprII_R to jest hpt_F i hpt_R za umožavanje kazeta. Pojedinačni umoženi fragmenti su identificirani elektroforezom na agaroznom gelu, izrezani iz gela i pročišćeni komercijalnim setom za pročišćavanje DNA iz gela (Promega). Fragmenti su nakon toga korišteni u PCR reakciji s tri kalupa (engl. *triple-template PCR*, TTPCR) kako bi se dobio konačni konstrukt (slika 17). Reakcija je moguća jer rubni fragmenti imaju dio slijeda koji se

preklapa sa slijedom kazeta, što je posljedica konstrukcije početnica. Fragmenti su u PCR smjesi pomiješani u molarnom omjeru 1:1:1, tako da je množina sva tri fragmenta 0,1 pmol. PCR reakcije su provedene korištenjem komercijalne Q5 DNA-polimeraze, prema uputama proizvođača.

Tablica 8. Početnice korištene za pripremu konstrukta.

oznaka	slijed početnice (5' → 3')
P1_ND	TGCAAAGCTTTTAAAAGAGAGTTTT
P4_ND	CTGGCTCGGGTGTCACTATG
P2_ND_nptII	TTAAACTATCAGTGTTTGACAGGATCCGATGCAGGGAGAGAGTGGAAAGAC
P3_ND_nptII	CATCTATGTTACTAGATCGGGCCTCCTGTCTTTTTGCGCGCAGGCTA
P2_ND_hpt	GATCCCCTGCGCCATCAGATCCTTGCGGCGCAGGGAGAGAGTGGAAAGAC
P3_ND_npt	GCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGTTTTTTCGCGCAGGCTA
nptII_F	ATCGGATCCTGTCAAACACTG
nptII_R	GACAGGAGGCCCGATCTAG
hpt_F	GCCGCCAAGGATCTG
hpt_R	CGATCTAGTAACATAGATGACACCG



Slika 17. Shematski prikaz kloniranja pomoću PCR-a s tri kalupa (TTPCR): A) tri kalupa umnožena su PCR-om odvojeno tako da rubni kalupi imaju regiju preklapanja sa središnjom kazetom; B) uspješno izolirani kalupi korišteni su kao kalupi u istoj PCR reakciji samo s rubnim početnicama; C) konačni PCR produkt ima sve tri originalne komponente.

Uspješno klonirani konstrukti pročišćeni su iz gela kako je već opisano, i uklonirani u vektor pJET1.2 za umnožavanje. Kolonije koje su nosile konstrukt su identificirane PCR-om na bakterijskim kolonijama i potvrđene sekvenciranjem (GATC, Njemačka). Plazmid je pročišćen u velikim količinama korištenjem komercijalnog seta Maxi-prep (Promega).

DNA konstrukti su za transformaciju pripremljeni tako da je plazmid s konstruktom lineariziran restrikcijским enzimima *HindIII* i *Eco88I* (Thermo Scientific) u prekonocnoj razgradnji. DNA je istaložena i resuspendirana u sterilnoj 0,1 mol L⁻¹ otopini Ca(NO₃)₂, tako da je konačna koncentracija DNA iznosila oko 1 µg µL⁻¹. Koncentracija DNA mjerena je na mikrovolumnom spektrofotometru (NanoDrop). Linearizirani konstrukt nije odvojen od vektora, već je cijela smjesa korištena za transformaciju protoplasta. Za transformaciju protoplasta korišteno je 30-50 µg DNA u 100 µL 0,1 mol L⁻¹ otopine Ca(NO₃)₂.

3.6.2. Transformacija protoplasta i selekcija

Kultura za izolaciju protoplasta uzgajana je u bioreaktoru, kao što je prethodno opisano¹¹⁸. Sve otopine su sterilne, a pojedinima je manitolom podešena osmolarnost na naznačene vrijednosti. Korištene su staklene pipete sa širokim grlom kako bi se smanjio pritisak na protoplaste. Izolacija protoplasta započeta je djelovanjem 16 mL 1% (w/v) otopine driselaze u 0,5 mol L⁻¹ manitolu (pH = 5,6-5,8, 560 mOs) na materijal iz 0,5 L kulture iz bioreaktora. Otopina je s biljnim materijalom inkubirana dva sata na sobnoj temperaturi uz potresanje i zaštitu od svjetla. Driselaza je koktel enzima koji razgrađuju staničnu stijenu biljne stanice te daju protoplaste. Smjesa tkiva i driselaze je filtrirana preko 100 µm i 50 µm sita i centrifugirana 10 min pri 45 g. Supernatant je uklonjen a protoplasti resuspendirani u 10 mL 0,5 mol L⁻¹ manitola laganim kotrljanjem tube za centrifugiranje između dlanova. Centrifugiranje i resuspenzija protoplasta su ponovljeni dva puta. Na hemocitometru su prebrojani protoplasti iz 100 µL resuspenzije, a protoplasti su opet centrifugirani, pa nježno resuspendirani u 3M puferu (15 mmol L⁻¹ MgCl₂, 0,1% MES, 0,5 mol L⁻¹ manitol, pH = 5,6, 580 mOs) tako da je konačna koncentracija protoplasta u resuspenziji iznosila 1,2 · 10⁶ po mL.

U staklene tube za centrifugiranje pipetirano je 100 µL DNA za transformaciju i 250 µL resuspenzije protoplasta, to jest 300000 protoplasta je pomiješano s 30-50 µg DNA za transformaciju. Tome je dodano 350 µL 40% otopine polietilen-glikola PEG 4000 u 3M puferu i promiješano laganim kotrljanjem između dlanova. Protoplasti su inkubirani u transformacijskoj smjesi 30 minuta uz oprezno miješanje svakih 5 minuta. Zatim je smjesa razrijeđena 3M puferom svakih 5 minuta sa po (redom) 1, 2, 3 i 4 mL. Protoplasti su oboreni centrifugiranjem 10 min pri 45 g i resuspendirani u 3 mL podloge za regeneraciju (Knopova podloga, 5% (w/v) glukoza, 3% (w/v) manitol, pH = 5,8, 540 mOs). Po 1,5 mL resuspenzije protoplasta inkubirano je u jažici mikrotitarske pločice sa 6 jažica 24 sata u mraku, a zatim 9

dana u standardnim uvjetima rasta uz potresanje. Na kraju, po 1 mL resuspenzije protoplasta nanosen je na ploču s krutom KNOP ME podlogom nadslojenom celofanskom folijom (325 P). Ploče su inkubirane tri dana u standardnim uvjetima rasta.

Selekcija je započeta premještanjem celofanske folije s protoplastima na KNOP ME podlogu s antibiotikom za selekciju: G418 ($12,5 \mu\text{g L}^{-1}$) za nptII kasetu, higromicin B ($12,5 \mu\text{g L}^{-1}$) za hpt kasetu. Nakon dva tjedna selekcije, folije su premještene na KNOP ME podlogu na dva tjedna, a zatim opet na ploče s antibiotikom na dva tjedna. Preostale kolonije trebale bi biti trajno transformirane, s kasetom za antibiotsku selekciju ugrađenom u genomu biljke. Kolonije su pincetom prebačene na ploče s krutom KNOP ME podlogom i analizirane kada je naraslo dovoljno biljnog materijala.

3.6.3. *Probir knock-out linija na temelju analize DNA*

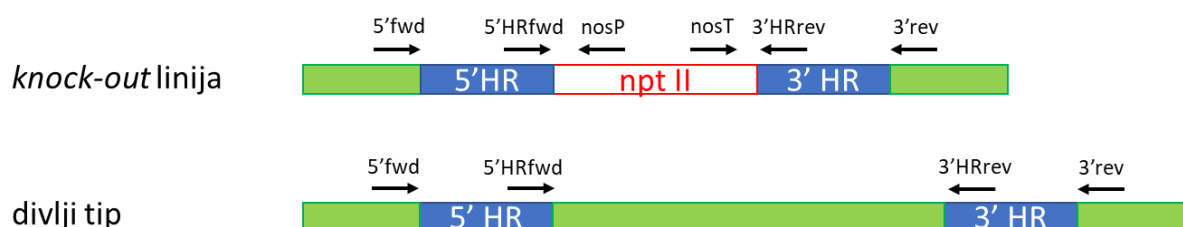
DNA iz biljnog materijala je analizirana takozvanim PCR-om na listiću (engl. *leaflet PCR*). Time se minimizira količina materijala potrebna za izolaciju DNA i ubrzava probir više desetaka biljaka. Tri do pet gametofita je ubrano s ploče i dodano u 1,5 mL tubicu za centrifugiranje s 200 μL toplog (50°C) pufera za ekstrakciju (200 mmol L^{-1} Tris-HCl, $\text{pH} = 7,5$, 250 mmol L^{-1} NaCl, 25 mmol L^{-1} EDTA, 0,5% (w/v) SDS) i s dvije staklene kuglice (promjera 2,85-3,3 mm). Tubice su u ohlađenom držaču (-20°C) postavljene na miješajući mlin za tkiva i miješane dva puta po 90 s pri 28 rpm. Sadržaj je centrifugiran 2 min pri 15000 g, a supernatant pipetom premješten u čistu tubicu. Za taloženje DNA, u tubicu je dodano 150 μL izopropanola, promiješano i ostavljeno 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja 10 min na 15000 g, talog DNA je ispran s 200 μL hladnog 75% (v/v) etanola i centrifugiran 5 min pri 15000 g. Supernatant je uklonjen a talog DNA osušen na sobnoj temperaturi. Talog je resuspendiran u 20 μL redestilirane vode sa 100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ RNaze, pa nakon sat vremena inkubiran 2 min na 60°C za inaktivaciju RNaze A. Uzorci DNA su pohranjeni na -20°C .

Kako bi se ustanovilo koje transformirane linije zaista imaju integriran konstrukt na ciljanom lokusu korištena je PCR analiza genomske DNA. Početnice su navedene u tablici 9, a shematski prikaz regija genomske DNA koje se umnožavaju u pojedinom koraku dan je na slici 18. Korištenjem početnica za gen *EFla* (COSMOSS unos Pp1s7_457V6.1) prvo je potvrđeno da je DNA uspješno izolirana i da nema metabolita koji bi ometali PCR reakciju. Uspješna je PCR reakcija u kojoj je dobiven produkt veličine 621 pb.

Tablica 9. Početnice korištene za probir *knock-out* linija.

oznaka	slijed početnice (5' → 3')
EF1a_fwd	AGCGTGGTATCACAATTGAC
EF1a_rev	GATCGCTCGATCATGTTATC
5'HRfwd	GATGAAATGGCATGGCGTC
3'HRrev	TTGGGTGGCTTCGTCATC
nosP	ATAGTGACCTTAGGCGAC
nosT	GTTGCCGGTCTTGCGAT
5'fwd	GTTTTGATGCAGCTCATGAC
3'rev	GGATTGTAAGCAACCATGGC

U idućem koraku upotrebom početnica 5'HRfwd i 3'HRrev provjerava se duljina DNA između homolognih regija. Očekivani PCR produkt je veličine 1,6 kb za *nptII* kazetu i 1,8 kb za *hpt* kazetu. U slučaju da nije došlo do narušavanja strukture gena, detektiran je PCR produkt duljine 4,2 kb, i te linije su eliminirane. Nadalje, provjerena je pravilna integracija 5'-i 3'-homolognih regija. Prilikom homologne rekombinacije mogući je ishod i nehomologno spajanje krajeva (engl. *non-homologous end-joining*, NHEJ). Početnice 5'fwd i nosP daju PCR produkt veličine 1,1 kb ako je 5'-homologna regija pravilno integrirana, a 3'rev i nosT daju PCR produkt veličine 1,3 kb ako je 3'-homologna regija pravilno integrirana. Zadržane su samo linije koje su imale pravilnu integraciju obiju homolognih regija.

Slika 18. Shematski prikaz genomske DNA *knock-out* linije i divljeg tipa.

PCR reakcije su provedene prema sastavu reakcijskih smjesa i protokolu navedenim u tablicama 10 i 11. Korištena je *peqGOLD Taq* DNA-polimeraza (Peqlab), osim u slučaju kada je bilo potrebno testirati prisutnost lokusa divljeg tipa (početnice 5'HRfwd i 3'HRrev, 4,2 kb dugačak PCR produkt), kada je korištena *Phire* DNA-polimeraza (Thermo Scientific) prema uputama proizvođača.

Tablica 10. Sastav PCR reakcijske smjese s genomskom DNA transformiranih linija.

sastojak	μL
10x koncentrirani pufer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5
25 mmol L^{-1} MgCl_2	3,0
10 mmol L^{-1} mješavina nukleotida	0,5
10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ početnica 1	1,0
10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ početnica 2	1,0
5 U μL^{-1} Taq DNA-polimeraza	0,25
3 mmol L^{-1} spermidin	2,0
DNA kalup	2,5
redistirana voda	12,25

Tablica 11. Protokol za umnažanje genomske DNA u reakciji s Taq DNA-polimerazom.

temperatura	trajanje	broj ciklusa
94°C	3 min	1
94°C	45 s	
56°C	45 s	35
72°C	1 min	
72°C	5 min	1

3.6.4. Probir knock-out linija na temelju analize RNA

Linije kojima je potvrđena pravilna integracija DNA testirane su na prisutnost transkripta gena za PpND. RNA je izolirana i prevedena u komplementarnu DNA kao što je već opisano (poglavlja 3.5.2 i 3.5.3). PCR reakcija je provedena korištenjem DreamTaq DNA-polimeraze prema uputama proizvođača. Uspješna izolacija RNA potvrđena je PCR-om s početnicama za gen *EF1a* (tablica 9). Očekivani PCR produkt je veličine 411 pb. Zatim su korištene početnice specifične za gen za PpND (qND_fwd GACTCTGGGCTTTGCATTTTC, qND_rev TTGAACTGTAGCGCTTGTC) koje se vežu na samom kraju gena, na eksonima 17 i 19.

3.6.5. Probir knock-out linija na temelju analize proteina

Na kraju, linije su analizirane imunodetekcijom, to jest *western*-analizom, na prisutnost proteina PpND. Tkivo je homogenizirano kao što je opisano u poglavlju 3.4.2. U tubicu za centrifugiranje sa 100 mg tkiva dodano je 200 μL pufera za izolaciju proteina (125 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH = 6,8, 4% (w/v) SDS, 0,02% (w/v) bromfenol-plavilo, 20% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β -merkaptotanol). Smjesa je dobro promiješana i inkubirana 3 min na 96°C u termobloku, zatim centrifugirana 10 min pri 15000 g. Supernatant je odvojen kao ekstrakt svih proteina stanice. Po 15 μL uzorka nanoseno je u pojedinu jažicu 10% poliakrilamidnog gela. Provedena je SDS-elektroforeza na gelu, a proteini su preneseni na PVDF membranu pomoću Mini Trans-Blot sustava (Bio-Rad) u puferu za prijenos (192 mmol L^{-1} glicin,

25 mmol L⁻¹ Tris, 10% metanol) tijekom 65 minuta pri 350 mA. Membrana je isprana uz ljuhanje 10 min u TBS puferu (20 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH = 7,5, 150 mmol L⁻¹ NaCl) pa bojana 1 min u otopini amido-crnila (0,1% (w/v) amido-crnilo, 10% (v/v) metanol, 2% (v/v) octena kiselina). Membrana je odbojavana dva puta po 30 min u otopini sastava 45% (v/v) metanol, 7% (v/v) octena kiselina. Zatim je osušena i fotografirana. Ispiranje je ponovljeno još jednom 30 minuta, zatim 4 puta po 1 min u destiliranoj vodi i 2 puta po 15 min u TBS-T puferu (TBS pufer s 0,1% (v/v) Tween 20). Membrana je blokirana u puferu za blokiranje (5% (w/v) mlijeko u prahu u TBS-T puferu) tijekom sat vremena na 37°C, pa inkubirana s razrjeđenjem primarnog antitijela (kunićji antiserum za PpND razrijeđen 5000 puta u puferu za blokiranje) preko noći na 4°C. Sljedeći dan membrana je isprana 3 puta po 10 min TBS-T puferom, inkubirana sat vremena na sobnoj temperaturi s otopinom sekundarnog antitijela (kozje anti-kunićje antitijelo IgG konjugirano s hrenovom peroksidazom, razrijeđeno 5000 puta u puferu za blokiranje), i opet isprana tri puta po 10 min u TBS-T puferu. Detekcija je provedena kemiluminiscencijom s ECL Prime reagensom na UviTec instrumentu uz ekspoziciju od 30 s do 5 min.

3.7. Analiza *knock-out* mutanti mahovine

3.7.1. Analiza fenotipa *knock-out* linija

Fenotip mutanti je analiziran u usporedbi s divljim tipom u standardnim uvjetima uzgoja. Kako bi se dobilo tkivo bogato kloronemalnim stanicama, mahovina je uzgajana na pločama s KNOP ME ATG podlogom, a jednom tjedno su protonemalne stanice s ruba kolonije korištene za inokulaciju nove kulture. Postupak je ponovljen četiri puta. Zatim je uzorak takve kulture (veličine oko 1 mm) korišten za inokulaciju ploča za praćenje fenotipa. Ista ploča inokulirana je kolonijama divljeg tipa i svih osam *knock-out* linija. Korištene su KNOP ME, KNOP ME AT i KNOP ME ATG podloge. Ploče su inkubirane u standardnim uvjetima i pregledavane svakog tjedna tijekom 7 tjedana. Eksperiment je ponovljen tri puta.

Dodatno, divlji tip i *knock-out* linije #2 i #20 ispitani su u uvjetima stresa identificiranim mjerenjem razine transkripcije gena. Prvo su uzgojene protonemalne kulture u tekućoj podlozi. Protonemalne stanice su za tretman inokulirane na standardnu krutu podlogu, i na podloge s 10 mmol L⁻¹ H₂O₂, 300 mmol L⁻¹ NaCl i 25 μmol L⁻¹ ABA. Rast i razvoj je praćen tijekom tjedan dana stereomikroskopom, eksperiment je proveden u triplicatu.

3.7.2. Analiza sadržaja citokinina

Analizu sadržaja citokinina provela je dr. sc. Iva Pavlović u suradnji s dr. Ondřejem Novákom u Olomoucu, Češka. Analiza je provedena prema objavljenom protokolu¹¹⁹. Uzorci protonemalnog tkiva stari tri tjedna (svježe mase 30 mg) su homogenizirani i ekstrahirani u 1 mL modificiranog Bieleski pufera (60% (v/v) metanol, 10% (v/v) octena kiselina) s koktelom internih standarda obilježenih stabilnih izotopima (0,25 pmol citokininskih baza, ribozida i N-glukozida i 0,5 pmol citokininskih O-glukozida po uzorku). Ekstrakti su pročišćeni na Oasis MCX koloni kondicioniranoj s po 1 mL metanola i vode, ekvilibriranoj sekvencijalno s po 1 mL 50% (v/v) dušične kiseline, vode i 1 mol L⁻¹ octene kiseline. Nakon nanošenja uzorka na kolonu, nevezani spojevi su uklonjeni ispiranjem s po 1 mL 1 mol L⁻¹ octene kiseline i metanola, predkoncentrirani analiti su eluirani u dva koraka s 1 mL 0,35 mol L⁻¹ vodene otopine amonijaka i 2 mL 0,35 mol L⁻¹ vodene otopine amonijaka u 60% (v/v) metanolu. Eluati su upareni i pohranjeni na -20°C.

Uzorci za analizu hormona su otopljeni u 40 µL mobilne faze prije određivanja korištenjem tekućinske kromatografije visoke efikasnosti spregnute s tandemskom masenom spektrometrijom (engl. *ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, UHPLC-MS/MS). Metaboliti su analizirani na sustavu Acquity UPLC® System (Waters) spregnutim s masenim spektrometrom Xevo™ TQ-S MS (Waters) uz preporučene postavke¹²⁰ koristeći interne standarde obilježene stabilnim izotopima kao referencama i račun razrjeđenja izotopa. Za svaku skupinu hormona analizirano je šest nezavisnih replikata.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati su grupirani prema eksperimentalnim metodama. Diskusija rezultata i komentari relevantnosti neposredno slijede grupe rezultata. Prvo su predstavljene analize aminokiselinskih sekvenci dobivenih pretraživanjem baza genomskih podataka. Zaključci o sličnosti Nudix domene proteina Nudix-DPP III s izopentenil-difosfat-izomerazom usmjeravali su biokemijsku analizu rekombinantnih proteina PpND i AtND. U ovom dijelu istaknuti rezultat je pronalazak izopentenil-difosfata, IPP, kao supstrata fosfatne reakcije proteina Nudix-DPP III, te je diskutiran u kontekstu drugih nedavnih istraživanja. Slijede rezultati ispitivanja ekspresije gena u uvjetima stresa na mahovini *P. patens*, i rezultati usporedbe *knock-out* mutanti mahovine s divljim tipom. Na kraju je ocjena ukupnog doprinosa istraživanja i procjena prikladnosti korištenih metoda.

Dio biokemijskih podataka određenih prilikom izrade ove doktorske disertacije je prethodno objavljen¹²¹.

4.1. Identifikacija homolognih proteina

4.1.1. Filogenija biljnih Nudix-DPP III proteina

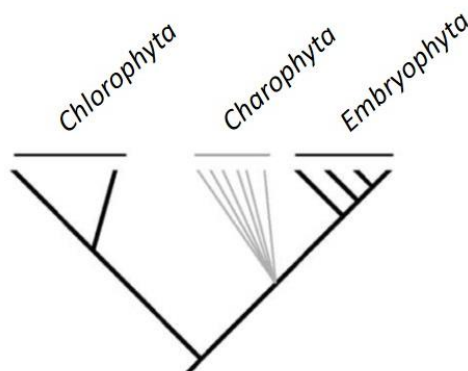
Prvi korak u bioinformatičkoj analizi bio je pronalaženje unaprijed generiranih unosa u bazama podataka. Kao referentni sljedovi korištene su aminokiselinske sekvence PpND i AtND. Pretraga u *Conserved Domain Database*¹²² (CDD), dala je informacije o očuvanim domenama i arhitekturi proteina (slika 19). N-terminalna Nudix domena je u ovoj bazi klasificirana u porodicu Nudix-hidrolaza 33, čiji nijedan član do sada nije okarakteriziran, i koja pripada nadporodici Nudix-hidrolaza. C-terminalna DPP III domena prepoznata je kao član porodice peptidaza M49, kako su DPP III klasificirane prema MEROPS bazi podataka¹⁴. Navedena arhitektura očuvana je u kopnenim biljkama (*Embryophyta*), te joj je dodijeljena oznaka očuvane porodice proteina PLN02791.



Slika 19. Rezultat pretrage aminokiselinskim slijedom PpND u CDD bazi podataka.

U InterPro¹⁰⁰ bazi podataka N-terminalna domena klasificirana je kao Nudix-hidrolaza (IPR000086), član istoimene nadporodice (IPR015797), a C-terminalna domena kao DPP III (IPR005317).

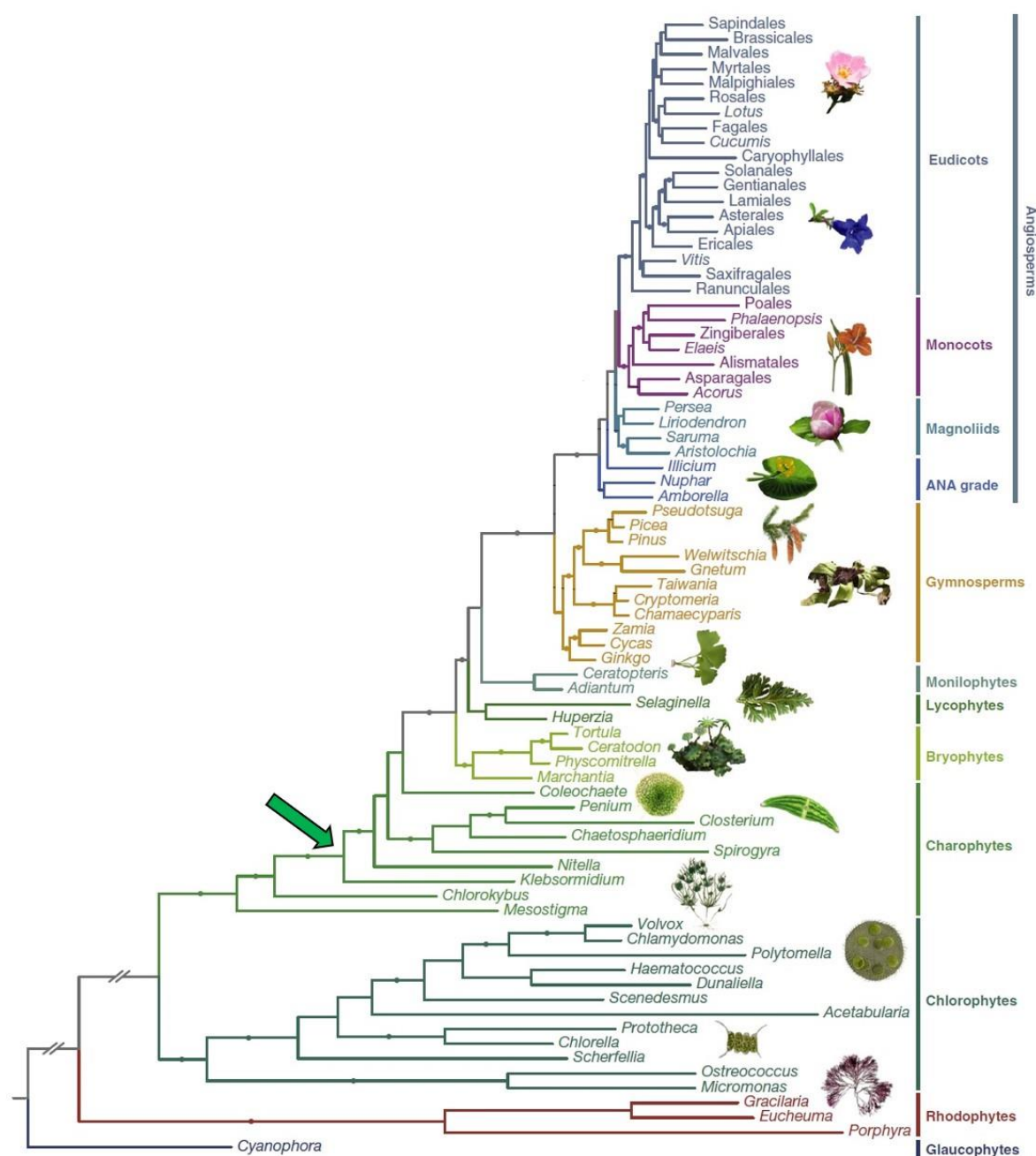
Direktnom pretragom baza podataka navedena arhitektura zaista nije pronađena izvan grupe kopnenih biljaka. No, zanimalo me kada se točno u evoluciji pojavljuju Nudix-DPP III. Zelene biljke (*Viridiplantae*) dijele se na koljeno *Chlorophyta* i infracarstvo *Streptophyta*, koje se sastoji od koljena *Embryophyta* (kopnene biljke) i *Charophyta* (parožine, slatkovodne alge) (slika 20).



Slika 20. Podjela zelenih biljaka¹²³

Do 2012. godine još uvijek nije bilo objavljenih genoma iz skupine parožina¹²³, stoga sam pretraživala bazu 1000 biljnih transkriptoma (1KP¹²⁴). Pronašla sam homologe u vrstama *Klebsormidium subtile*, *Chara vulgaris*, *Mesotaenium endlicherianum*, *Entransia fimbriat*, *Coleochaete scutata*, *Coleochaete irregularis*, *Cylindrocystis cushleckae* i *Cylindrocystis brebissoni*, čime je očuvanost Nudix-DPP III proteina proširena na dio koljena *Charophyta*. Nakon objave genoma parožine *Klebsormidium flaccidum*¹²⁵ 2014. godine, odgovarajuću sekvencu moguće je naći i u bazama podataka UniProt i GenBank (sada pod imenom *Klebsormidium nitens*). Znakovito, homolozi nisu nađeni u redovima *Mesostigmatales* i *Chlorokybales*, što je u skladu s nedavnim saznanjima o filogeniji kopnenih biljaka^{123,126,127}, koja naglašavaju da su ovi rodovi manje srodni kopnenim biljkama od drugih rodova *Charopyhta* (slika 21).

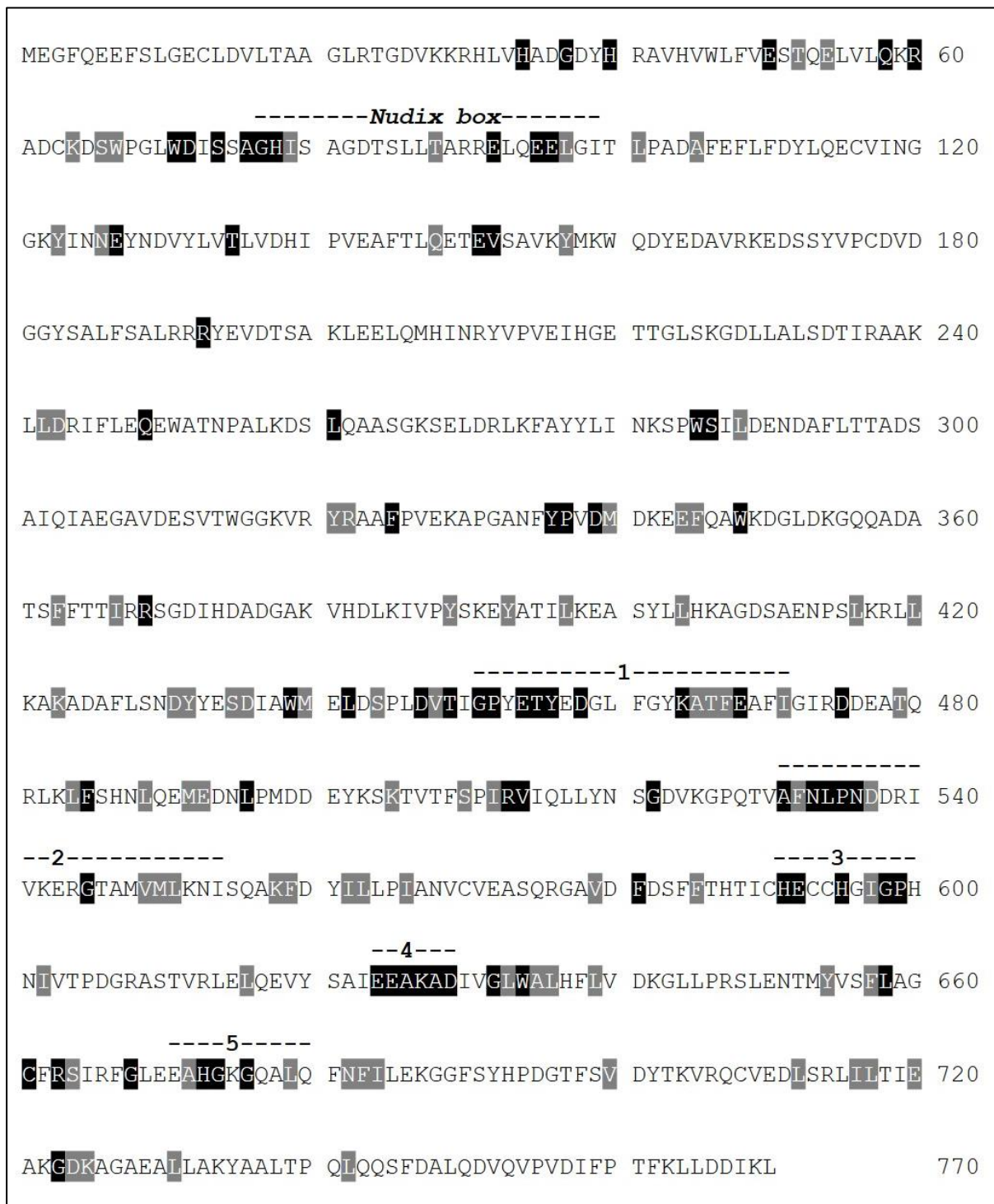
Sve pronađene sekvence su srađnjene na način da su eliminirane one kojima su nedostajali ključni dijelovi sekvence poput motiva *Nudix box* i motiva aktivnog mjesta DPP III. 10% ostataka je bilo identično u svim proteinima (slika 22), među njima i pretpostavljeni katalitički nužni ostaci za aktivnost Nudix-hidrolaza (glutamat u motivu RELQEE, prema slijedu u PpND) i DPP III (glutamat u motivu EEAKAD). Vrlo slični su ostaci na dodatnih 10% pozicija. Ostaci su definirani kao vrlo slični ako su pripadali idućim grupama: STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW, što odgovara bodovanju većem od 0,5 prema PAM250 matrici.



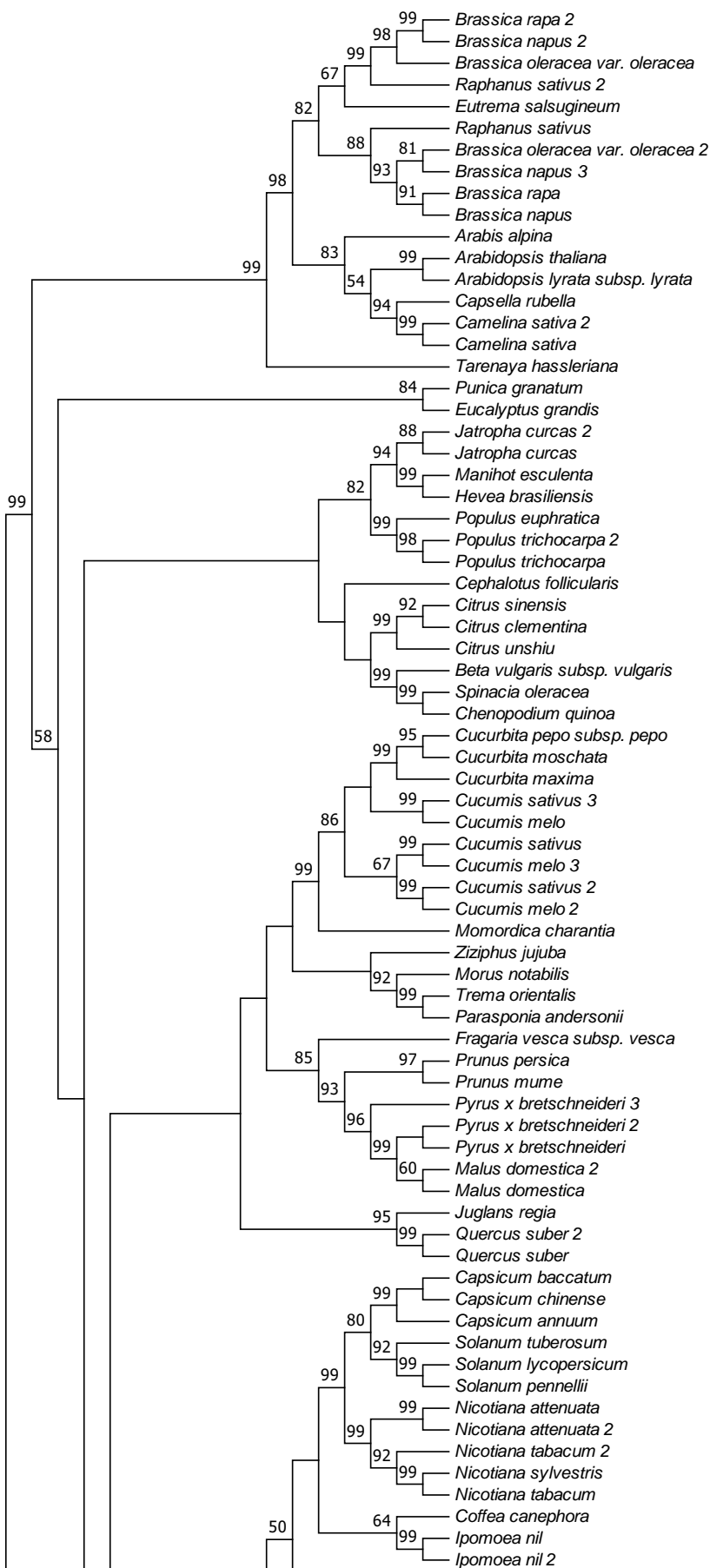
Slika 21. Filogenija zelenih biljaka, prilagođeno prema izvoru¹²⁸. Prva dokumentirana pojava proteina Nudix-DPP III označena je zelenom strelicom.

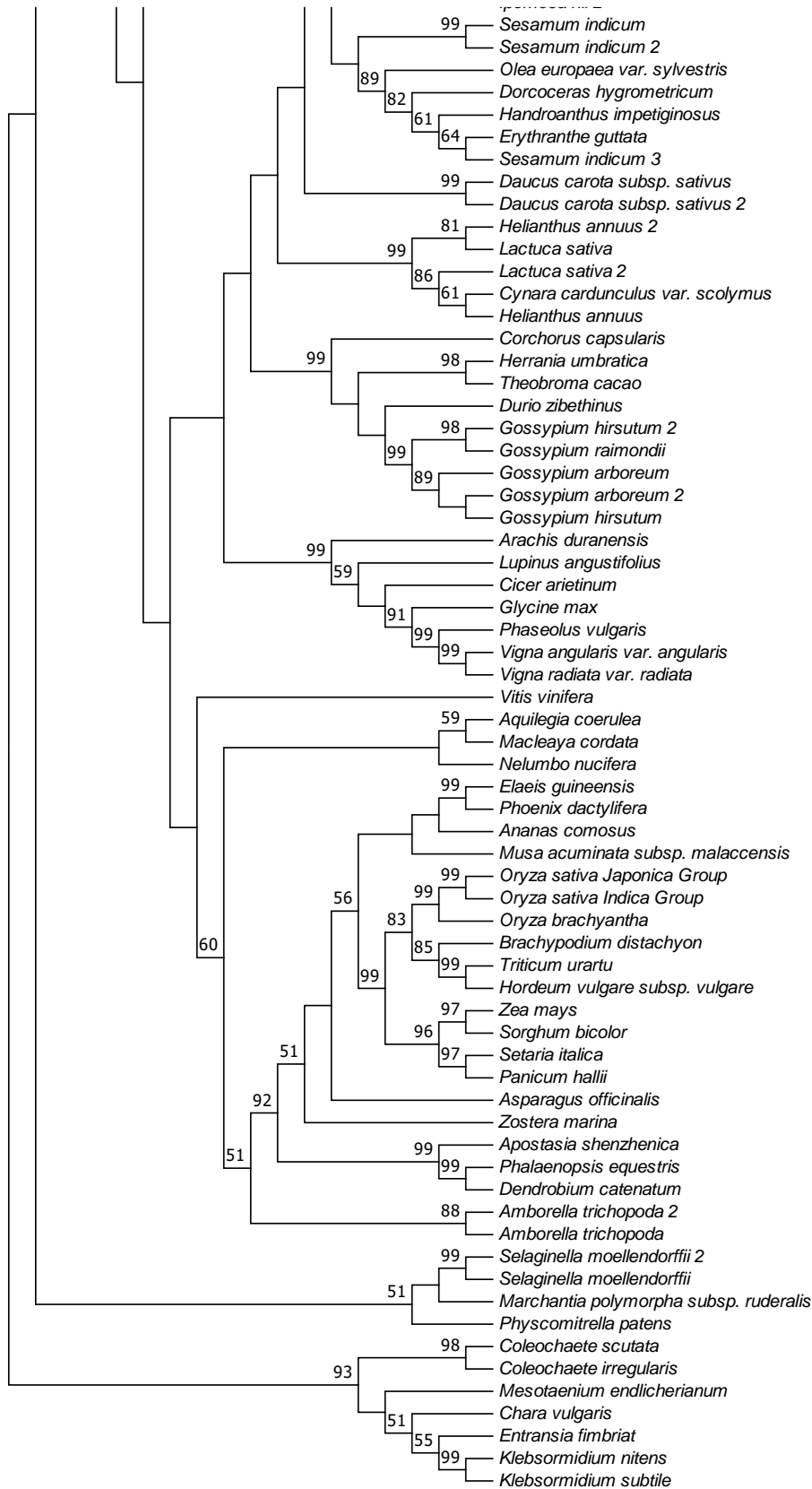
U modelnim organizmima *P. patens* i *A. thaliana* nađena je samo po jedna sekvenca za protein Nudix-DPP III, no primijećeni su i slučajevi više proteinskih sekvenci iz istog organizma. U takvim slučajevima riječ je o poliploidima, te je filogenetska analiza potvrdila da su višestruke kopije Nudix-DPP III posljedica takve nedavne duplikacije ili triplikacije genoma – višestruke kopije su bile grupirane na podstablu vrste ili reda (slika 23). Općenito,

filogenetsko stablo proteina Nudix-DPP III reproducira stablo vrsta, no uz lošu razlučenost među cvjetnicama. Vjerojatno je uzrok tome prevelika sličnost biljnih Nudix-DPP III proteina.



Slika 22. Sekvenca PpND s oznakama očuvanih regija: *Nudix box* i DPP III regije 1-5. Crno su istaknuti 100% očuvani aminokiselinski ostaci, a sivo očuvane grupe biokemijski sličnih svojstava.





Slika 23. Filogenetsko stablo proteina Nudix-DPP III. Stablo je generirano metodom maksimalne parsimonije, a na granama su vrijednosti podrške iz 100 replikata u postocima.

4.1.2. Homolozi DPP III i pojavnost DPP III u živom svijetu

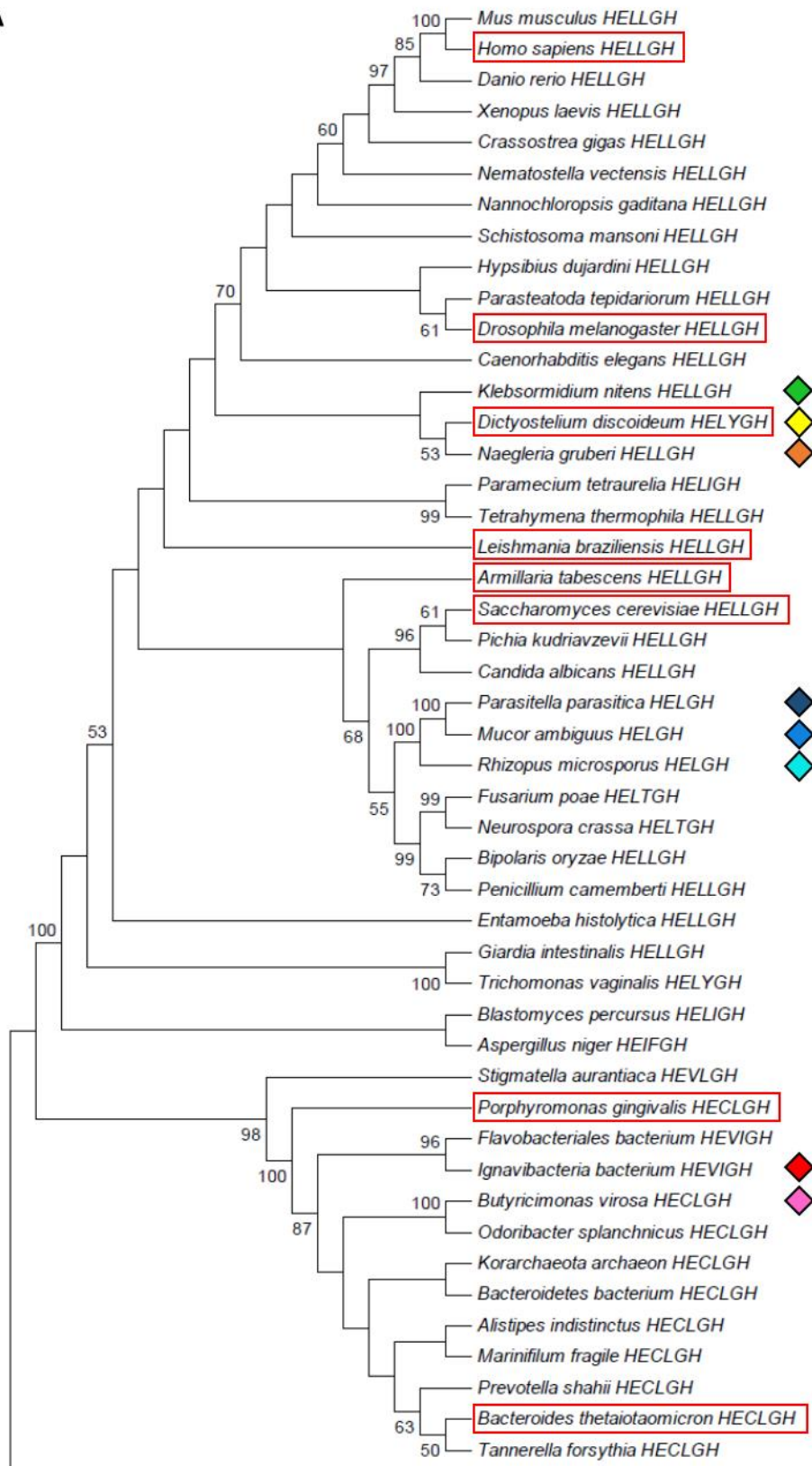
Biljne domene DPP III su atipične prema pentapeptidnom motivu aktivnog mjesta, HEXXH. Takav motiv nađen je i među bakterijskim DPP III⁹. Kako bi se ustanovio odnos atipičnih DPP III prema dosad opisanim tipičnima, pripremljeno je filogenetsko stablo DPP III proteina (slika 24). Uočljive su tri velike grupe: eukariotske tipične DPP III i bakterijske tipične DPP III (slika 24A), te atipične DPP III (slika 24B). Među atipičnim DPP III bakterijske se nisu odvojeno grupirale, što bi možda moglo ukazivati na slučajeve horizontalnog prijenosa gena među mikroorganizmima. S obzirom na topologiju stabla, držim da su atipične DPP III paralozi tipičnih DPP III. Svakako bi trebalo izbjegavati naziv ortolozi za usporedbu npr. biljne i ljudske DPP III, ili treba koristiti termin homolozi, koji obuhvaća i ortologe i paraloge^{129,130}. Preporučam klasifikaciju DPP III u tipove prema motivu aktivnog mjesta: tip I za proteine s HEXXGH motivom, i tip II za proteine s HEXXH motivom.

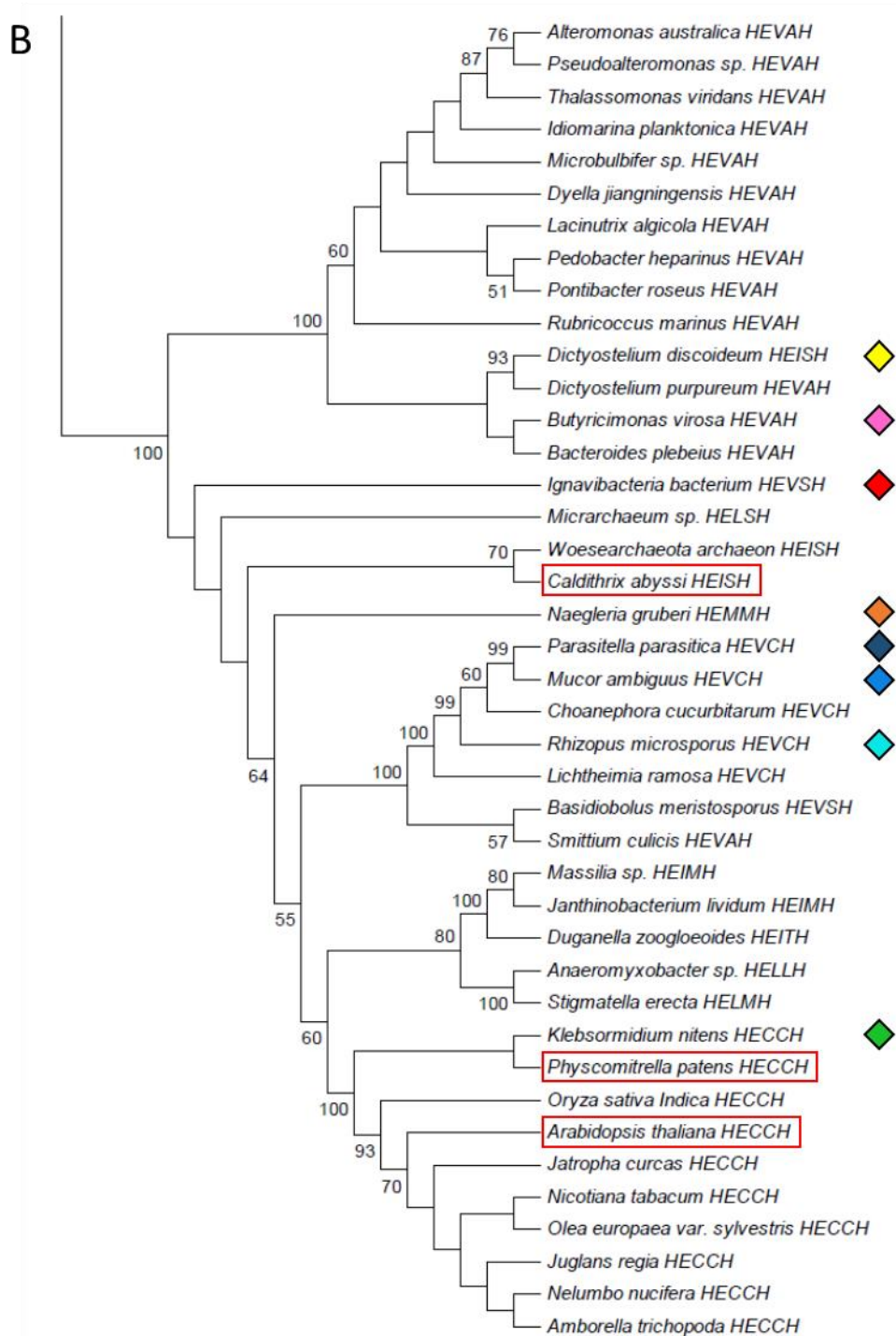
U mom setu sekvenci primijetila sam samo nekolicinu u potpunosti očuvanih aminokiselina, navedenih u tablici 12. Uloga svih ovih ostataka je već okarakterizirana^{17,131-136}.

Tablica 12. Aminokiselinski ostaci očuvani u porodici DPP III na primjeru ljudske DPP III i odgovarajuće aminokiseline u PpND i AtND

regija DPP III	ljudska DPP III	PpND	AtND
-	Trp300	Trp439	Trp441
1.	Glu316	Glu454	Glu456
	Tyr318	Tyr456	Tyr458
2.	Asn394	Asn536	Asn538
3.	His450	His591	His593
	Glu451	Glu592	Glu594
	His455	His595	His597
4.	Glu508	Glu625	Glu627
5.	His568	His673	His675

A



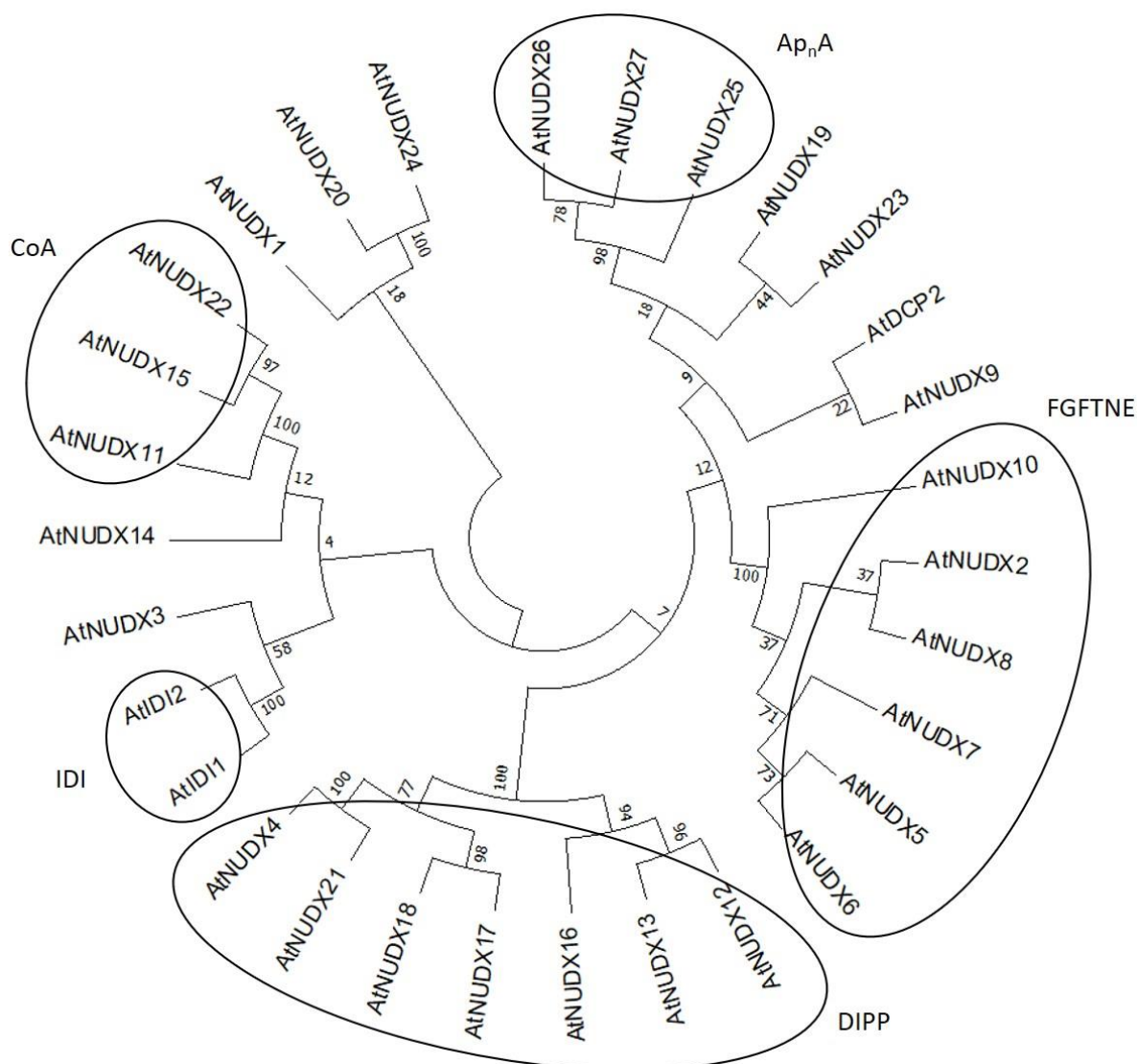


Slika 24. Filogenetsko stablo DPP III proteina: A) podstablo tipičnih DPP III ili tip I, s HEXXGH motivom aktivnog mjesta; B) podstablo atipičnih DPP III ili tip II, s HEXXH motivom aktivnog mjesta. Taksoni su označeni imenom organizma i motivom aktivnog mjesta. Biokemijski okarakterizirane DPP III označene su crvenim okvirom^{7,9,15,121,137-142}, a oznake u boji pored taksona označavaju istom bojom dvije DPP III iz istog organizma. Stablo je dobiveno metodom maksimalne parsimonije, a na granama su vrijednosti podrške iz 100 replikata u postocima.

Zanimljivo je da sam u nekoliko organizama identificirala oba tipa DPP III (slika 24). Konkretno, sekvence oba tipa DPP III nađene su u mahovinama i parožinama (*Physcomitrella patens*, *Klebsormidium nitens*), amebama (*Dictyostelium discoideum*, *Naegleria gruberi*), zigomicetama (*Parasitella parasitica*, *Mucor ambiguus*, *Rhizopus microsporus*), te bakterijama (*Ignavibacteria*, *Butyricimonas virosa*). Ovaj pregled nije iscrpan, pogotovo zato što nisam pronašla specifični dedicerani bioinformatički alat, već sam ručno pretraživala sekvence prema taksonomskoj klasifikaciji. Nijedna DPP III nije nađena u virusima, dok je u arheja metagenomskim pristupom sekvencirano samo 3: jedna tipa I i dvije tipa II, što je sumnjivo malen broj, s obzirom na više od 150 objavljenih arhejskih genoma¹⁴³, i veliku mogućnost kontaminacije drugim mikrobima kod metagenomskih sekvenciranja¹⁴⁴. Jako zanimljivim smatram nalaz da među zelenim algama nisam pronašla nijednu DPP III, osim kod parožina. To otežava tumačenje porijekla Nudix-DPP III proteina. Podaci da više različitih organizama imaju oba tipa DPP III sugeriraju vjerojatnu ancestralnu duplikaciju gena i naknadni gubitak gena u brojnim linijama, zbog čega je potrebno još jednom naglasiti da je preporuka koristiti izraz homolog za usporedbu bilo kojih dviju DPP III, pogotovo ako nije filogenetski ispitan njihov odnos.

4.1.3. Homolozi atipične Nudix domene

Nudix-hidrolaze iz uročnjaka su vrlo dobro opisane^{39,44}, no protein AtND, označen kao Nudix-hidrolaza 3, AtNUDX3, smatra se atipičnim, između ostalog i zbog postojanja dodatne domene. Unatoč postojanju očuvanog motiva aktivnog mjesta fosfataze, bioinformatička analiza sugerirala je da je AtND izopentenil-difosfat-izomeraza⁴⁶ (IDI). Moja filogenetska analiza (slika 25) s jakom podrškom reproducira već utvrđene skupine fosfataza^{39,46,145}, no sličnost s IDI nije snažno podržana. AtNUDX1, -3, -9, -14, -19, -23, te (grupirane) -20 i -24 su kod većine autora^{39,46,145} u odvojenim granama ili nasumično grupirane, vjerojatno zbog artefakta grupiranja dugih grana. Neki autori u analizu nisu uvrštavali IDI^{39,46}, a stablo koje su objavili Magnard i sur.¹⁴⁵ ne pronalazi sličnosti AtNUDX3 i IDI. Moguća objašnjenja za to su da prije analize nije uklonjena DPP III domena, što može dovesti do odvojenog grananja. Također, u svom radu primjetila sam da stablo jako ovisi o kvaliteti sravnjenja sekvenci. Idealno, svi sravnjeni ostaci bi trebali biti homologni. U mojoj analizi, zbog indicija navedenih niže (poglavlje 4.1.4), motiv aktivnog mjesta izomeraza WTNTCCSH je bio poravnat s konzerviranim motivom WDISSAGH iz Nudix-DPP III proteina.



Slika 25. Filogenetsko stablo proteina s Nudix domenom iz *A. thaliana*. Stablo je dobiveno metodom maksimalne parsimonije, a na granama su vrijednosti podrške iz 100 replikata u postocima. Grupe su označene prema tipu supstrata (koenzim A, CoA, difosfo-inozitol-polifosfati, DIPP, diadenozin-polifosfati, Ap_nA) ili po uvriježenim imenima (izopentenil-difosfat-izomeraze, IDI, faktoru rasta fibroblasta slični Nudix enzimi, engl. *Fibroblast growth factor type Nudix Enzyme*, FGFTNE), kao i drugdje u literaturi^{46,145}.

U potrazi za drugim srodnim Nudix sekvencama pronađene su eukariotske IDI, već spomenute arhejske atipične IDI¹⁴⁶ bez karakterističnog cisteinskog ostataka, te dva tipa zanimljivih sljedova u skupini *Chlorophyta*: neke alge imaju identičnu Nudix domenu kao kopnene biljke, ali bez DPP III domene; druge imaju vrlo sličnu sekvencu s inverzijom u motivu *Nudix box*. Odabrane sekvence su prikazane u sravnjenju na slici 26 za ilustraciju.

	* * * *	***
<i>Ostreococcus tauri</i> IDI1	LQQRAGNKITFPSVWNTCCSHQLTGQDPDETDDPVAIASGRCLGAKRAATRKLKHELGI	
<i>Ostreococcus tauri</i> IDI2	LQQRAGNKITFPSVWNTCCSHQLTGQDPDETDDPVAIASGRCLGAKRAATRKLKHELGI	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> IDI1	LQQRRAASKVTFPGVWNTCCSHPLAGQAPDEVDLPAAVASGQVPGIKAAAVRKLQHELGI	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> IDI2	LQQRRAASKVTFPGVWNTCCSHPLAGQAPDEVDLPAAVASGQVPGIKAAAVRKLQHELGI	
<i>Physcomitrella patens</i> IDI	LQKRSATKVTFPLVWNTCCSHPLYRES-----ELIEDKYLGVNRNAAQRKLYDELGI	
<i>Arabidopsis thaliana</i> IDI1	LQQRSKTKVTFPLVWNTCCSHPLYRES-----ELIEENVLGVNRNAAQRKLFDELGI	
<i>Arabidopsis thaliana</i> IDI2	LQQRSNTKVTFPLVWNTCCSHPLYRES-----ELIQDNALGVNRNAAQRKLLDELGI	
<i>Thaumarchaeota archaeon</i> aIDI	LTQRSMSKMLWPGDWDGTVASHPRQSET-----YVSSAERRLPEELGI	
<i>Nitrosopumilales archaeon</i> aIDI	LTRRSKEKMLWPNWDGTVASHPREGET-----YTSSAERRMPEELGV	
<i>Halobacterium salinarium</i> aIDI	LAQRADRKRLWDTHWDGTVASHPIEGQS-----QVDATERQLAEELGI	
<i>Haloarcula sp.</i> aIDI	LAQRASNKRLWDTHWDGTVASHPVEGQT-----QVEATEVRLEELGI	
<i>Ostreococcus tauri</i>	LQKRSMGKDTFPGMWDISAAGHVSARDD-----GDSLRAAAELEEELGV	
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	VQKRSAMKDTFPGAWDVGAAGHVGAEDE-----GSSRRTARHELEELGV	
<i>Micromonas commoda</i>	LQKRSPNKDTFPNRWDISAAGHIGSGDE-----SRPTAVRELEELGV	
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	LQLRSAAKDTPLCWDVSAAGHLHSGEH-----DLSTAARELEELGI	
<i>Tieghemostelium lacteum</i>	IQRSSNNKESFPGYWDNSSAGHIEAGQT-----SKDAAIRELNEELGI	
<i>Klebsormidium nitens</i>	LQKRSDDKDSWAGLWDISSAGHISAGDA-----SLNSARRELEELGV	
<i>Physcomitrella patens</i>	LQKRADCKDSWPGLWDISSAGHISAGDT-----SLLTARRELEELGI	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LQLRSDDKDSWPGQWDISSAGHISAGDT-----SLLSAQRELEELGV	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	IQRSPDKKVAPQWDLSSVAEHLSPGES-----YAEVARGLEELGV	
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	LQQRSLAKKMGPGQWDLSSVAEHLQPGEV-----YVEAAVRGLKEELGI	
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	LQRRSESKAIAPGCWDLSCAEHLRAGES-----FEGA AVRGLQEELGL	
<i>Nudix box</i> motiv:	GXXXXXEX-----XXXXXXREUXEEXGU	

Slika 26. Svrnjenje iz kojeg se vidi inverzija motiva *Nudix box* kod sekvenci iz algi. Iznad crte nalaze se proteini s izomeraznom aktivnošću, ispod oni s (vjerojatnom) hidrolaznom aktivnošću.

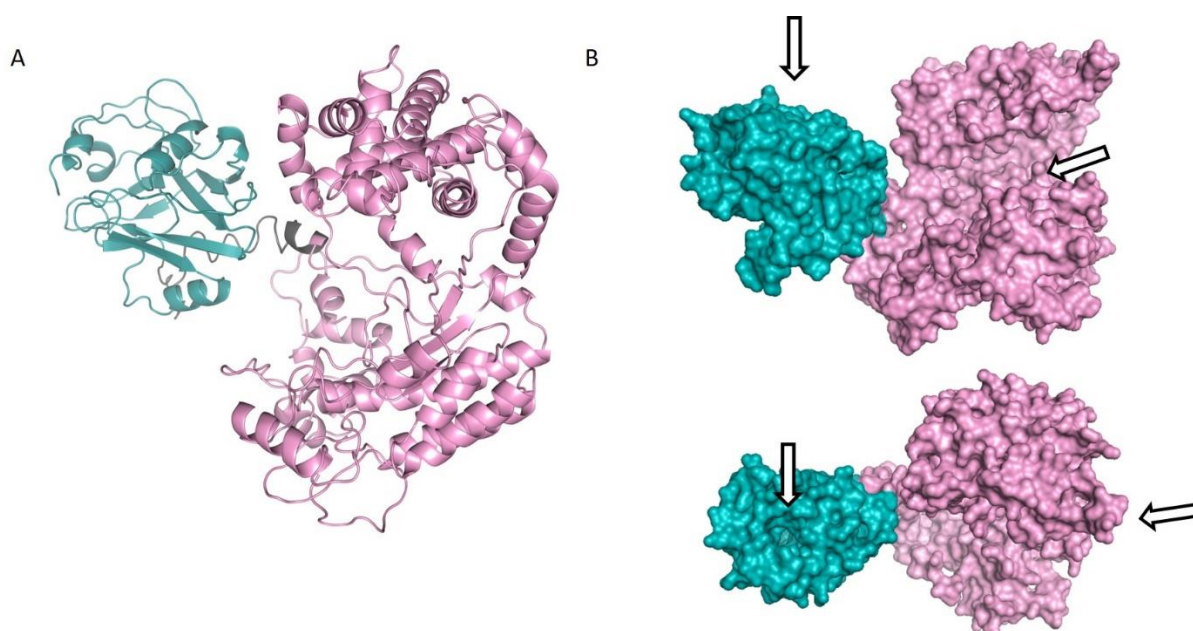
Inverzijom sam označila zamjenu dvaju ostataka (podebljano) iz kanonskog motiva GXXXXXEXXXXXXXREUXEEXGU - uvijek kada je na mjestu prvog glicina glutamat, glicinom je zamijenjen glutamat nužan za katalizu. Nije nužno da ova inverzija inaktivira enzim: zamijenjeni glicin i glutamat nalaze se u neposrednoj blizini kationa magnezija, točno nasuprot jedan drugom, a usklađenost supstitucije ukazuje na nužnost očuvanja funkcije *Nudix*-hidrolaze. E-vrijednost ($<10^{-15}$) i *bitscore* (>70) ukazuju da je riječ o vrlo srodnim sekvencama, vjerojatnim homolozima *Nudix* domene *Nudix*-DPP III proteina.

U bakterijama je nađen iznimno velik broj srodnih sekvenci, no osim oznaka da je riječ o vjerojatnim IDI i *Nudix*-hidrolazama, nema detaljnijih opisa. U skupini *Firmicutes* su uočene sekvence s očuvanim motivom WDISSAGH, i vjerojatno je da imaju enzimsku aktivnost sličnu N-terminalnoj domeni *Nudix*-DPP III proteina.

4.1.4. Model strukture

Model strukture priređen je na javno dostupnom serveru za predviđanje strukture proteina¹⁰³, *Phyre*² (slika 27). Među raznim opcijama, odabrala sam ovaj alat jer daje najviše informacija kako je kreiran model i omogućava odabir specifične strukture kao modela i pristup raznim drugim alatima. Jedna od prednosti je što se može jednostavno pregledati svrnjivanje prema

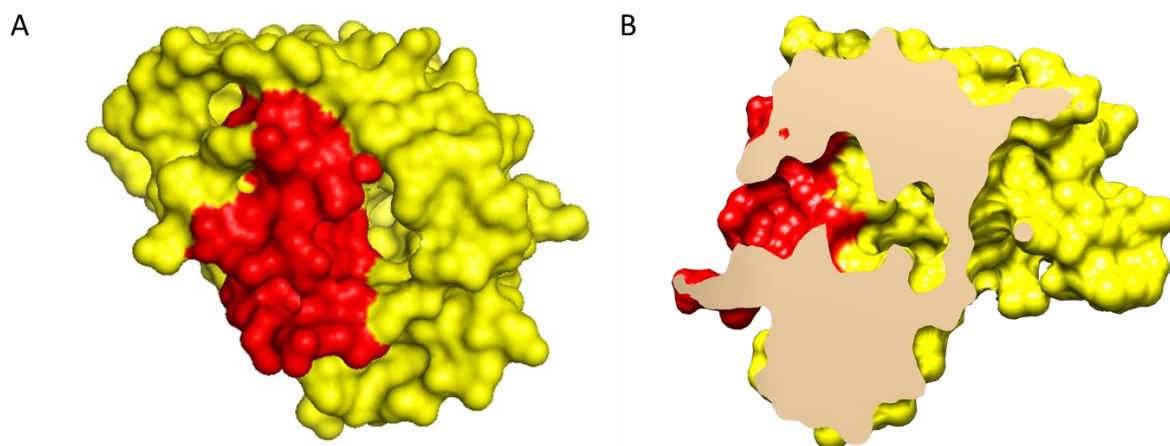
kojem je načinjen model, pa se tako mogu utvrditi homologni ostaci. Intenzivnom pretragom s PpND i AtND kao početnom sekvencom dobiveni su identični rezultati. C-terminalna domena modelirana je prema strukturama ljudske i kvašćeve DPP III (PDB: 3fvy, 3csk). (Struktura DPP III tipa II, iz bakterije *Caldithrix abyssi*, riješena je tek na kraju izrade ove disertacije.) N-terminalna domena modelirana je prema strukturama izopentenil-difosfat-izomeraza i Nudix-hidrolaza – kao najbolji kalupi odabrane su strukture ljudskih IDI 1 i 2, dvije strukture IDI iz *E. coli*, i biokemijski neokarakterizirana Nudix-hidrolaza YfcD iz *E. coli* (redom PDB šifre: 2i6k, 2pny, 1ppv, 1hzt, 2fkb).



Slika 27. Model strukture PpND izrađen na stranici Phyre². A) Vrpčasti model proteina gdje je tirkizno označena Nudix, a ružičasto DPP III domena, B) kalotni modeli proteina gledani s prijeda (gore) i odozgo (dolje). Streljci označavaju vezno mjesto supstrata.

Nesigurnost predviđanja u modelu vidljiva je iz velikog broja nestrukturiranih petlji. Najnepouzdaniji dio modela je međusobni odnos dviju katalitičkih domena, jer ne postoji struktura slične proteinske arhitekture domena – kao što je prije spomenuto, ove dvije domene prisutne su u istom proteinu samo u biljkama. Drugačijim pristupom, analizom konformacije proteina mjerenjem raspršenja rendgenskih zraka pod malim kutem (engl. *small angle X-ray scattering*, SAXS), pokazano je da ovaj model ipak dobro opisuje međuodnos domena kod proteina u otopini¹⁴⁷.

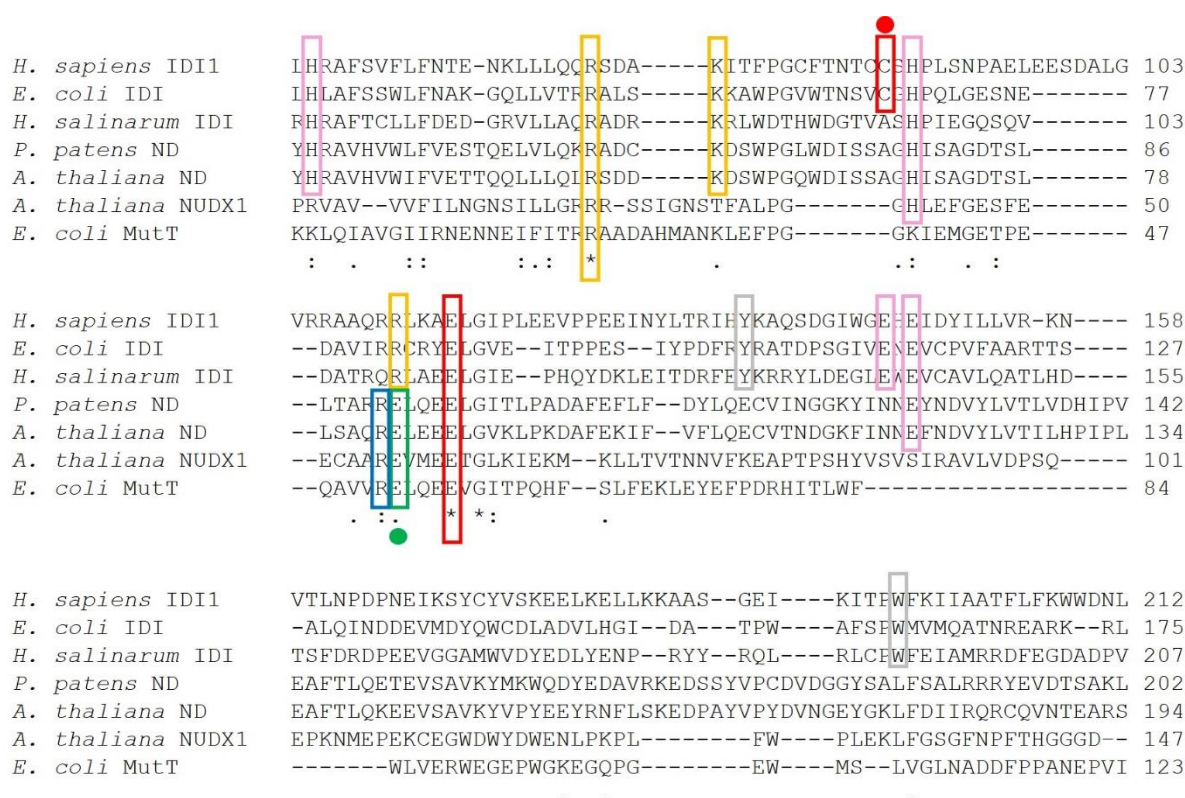
Zanimljivo je da Nudix domena, modelirana prema IDI, također ima zaštićenu šupljinu ili džep u koji bi se mogao vezati supstrat (slika 28). To može biti artefakt modela ili rezultat stvarne homologije proteina u građi.



Slika 28. Model koji prikazuje samo Nudix domenu Nudix-DPP III s motivom *Nudix box* u crvenom: A) kraj očuvanog motiva nalazi se džep, prikazan bočno u presjeku na slici B).

Detaljnim pregledom sravnjivanja, utvrđeno je da algoritam prepoznaje motiv WDISSAGH kao homologan motivu aktivnog mjesta IDI WTNCCSH, što čini Ala67 homologan katalitički nužnom cisteinu izomeraze. Štoviše, taj Ala je tada homologan i alaninu u atipičnim arhejskim IDI¹⁴⁶. Time je preciznije pokazano gdje je točno sličnost s izomerazama koja je spomenuta u literaturi⁴⁶ i koju se može naći i u bazama podataka. Pokazana je i očuvanost dvaju glutamata iz motiva *Nudix box* (REUXEE) koji su bitni za hidrolaznu (fosfataznu) aktivnost, te je pretpostavljeno da je vjerojatno da Nudix-DPP III proteini vežu ion magnezija. Osim toga, iznenađujuće, čini se da Nudix-DPP III mogu vezati ion cinka kao i IDI, a za razliku od drugih Nudix-hidrolaza. Ostaci His34, His40, His78, Asn125 i Glu127 u PpND homologni su trima histidinima i dvama glutamatima koji koordiniraju cink u izopentenil-difosfat-izomerazama. Svi ovi ostaci osim Asn su u potpunosti očuvani u proteinima Nudix-DPP III.

Na kraju, jasno je da Nudix-DPP III proteini u N-terminalnoj domeni pokazuju zanimljivu kombinaciju homologije i s izomerazama i s fosfatazama, te da bi trebalo ispitati ovaj enzim za obje aktivnosti. Kao sažetak, na slici 29 prikazano je sravnjenje s različitim proteinima ovih dviju grupa, s naznačenim bitnim ostacima.

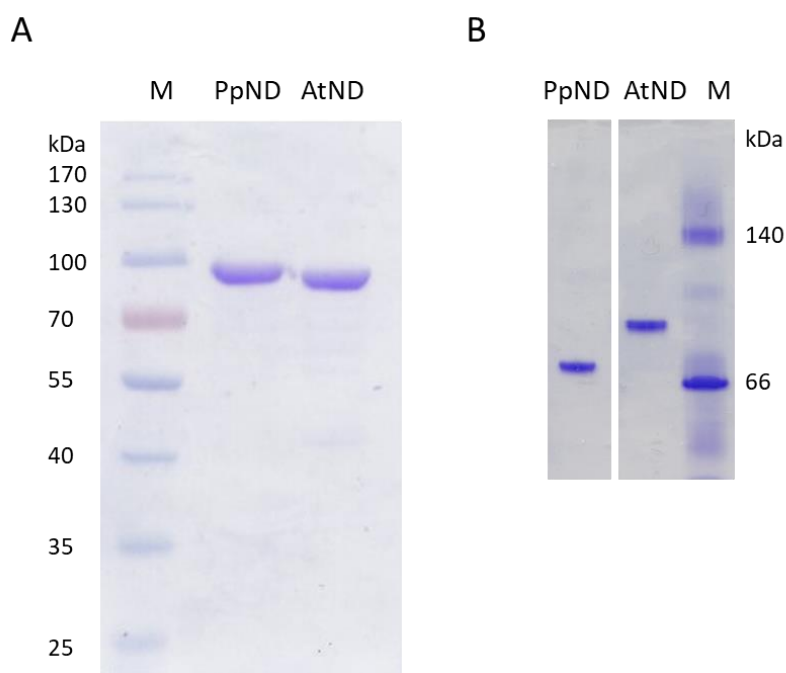


Slika 29. Svravnjenje PpND i AtND s IDI i Nudix proteinima. Okvirima u boji su označeni bitni ostaci: žuti vežu difosfatnu skupinu, ružičasti vežu cink, crveni vežu magenzij, sivi su bitni za stabilizaciju međuprodukta IDI, zeleni su katalitički nužni za Nudix-hidrolaze, a plavi koordiniraju katalitički Glu u Nudix-hidrolazama. Kružićima su dodatno označeni katalitički nužni ostaci: crveno za IDI, zeleno za Nudix. UniProt šifre sekvenci: *H. sapiens* IDI Q13907, *E. coli* IDI Q46822, *H. salinarum* IDI Q9HP40, *P. patens* ND A9TLP4, *A. thaliana* ND Q8L831, *A. thaliana* NUDX1 Q9CA40, *E. coli* MutT P08337.

4.2. Ekspresija, pročišćavanje i strukturna analiza proteina

Proteini PpND i AtND eksprimirani su u bakteriji *E. coli*. Pročišćavanje proteina je provedeno u dva koraka: afinitetnim pročišćavanjem pomoću His-privjeska i gel-filtracijom. S obzirom da je poznato da DPP III u aktivnom mjestu imaju jedan ion cinka, a proteini Nudix nadporodice mogu u aktivnom mjestu vezati jedan do tri metalna bivalentna kationa, najčešće magnezija i cinka, prilikom ekspresije su u kulturu dodane kloridne soli cinka i magnezija u konačnoj koncentraciji $10 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Zn}^{2+}$ i $1 \text{mmol L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$, kako bi se poboljšalo smatanje proteina. Ekspresija je modificirana snižavanjem koncentracije induktora IPTG-a ($0,25 \text{mmol L}^{-1}$), kao i produljenom inkubacijom kulture prilikom ekspresije na niskoj temperaturi (20 sati na 18°C). To je dovelo do boljih rezultata u usporedbi s prethodnim protokolom: sustavno je dobivana veća količina enzima, produljene stabilnosti. Nešto proteina

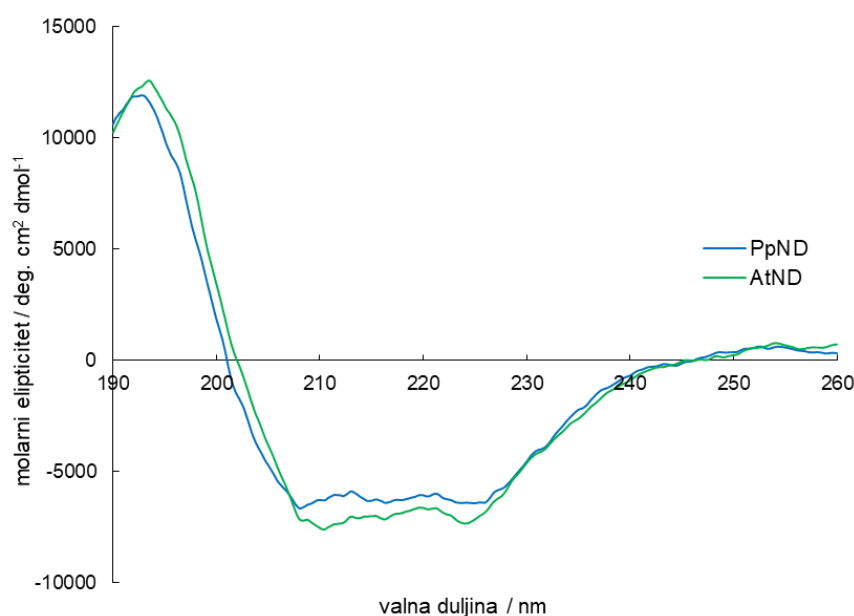
je ipak i dalje zaostajalo u inkluzijskim tijelima. Postupak pročišćavanja je bio reproducibilan i rezultirao je prinosom oko 10 mg proteina po litri ekspresijske kulture.



Slika 30. Elektroforetska analiza za procjenu čistoće proteina, nakon dva koraka pročišćavanja: A) elektroforeza u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE); B) nativna elektroforeza. M označava markere poznatih masa.

Konačni uzorci proteina pokazivali su da je riječ o čistom monomernom proteinu (slika 30). Ovi podaci pobijaju prethodno objavljene rezultate kako su biljne DPP III heterodimerni proteini¹⁴⁸. Konkretno, navedeno je da je DPP III izolirana iz sjemena zlatnog graha (*Vigna radiata*) heterodimer podjedinica veličine 32,8 i 27 kDa. U genomu zlatnog graha BLASTP pretragom pronašla sam samo gen za Nudix-DPP III, koji bi trebao imati 87 kDa. S obzirom da su uzorci proteina koje sam ja koristila rekombinantni, to jest pročišćeni su iz heterolognog organizma vrlo kratkim postupkom, mogu pretpostaviti da je moj uzorak bio zaštićen od djelovanja proteaza. To je teško postići kada se protein izolira iz biljnog tkiva i bez afinitetnog privjeska, kao što je bio slučaj u navedenoj publikaciji. Iz identifikacije proteina masenom spektrometrijom u istom radu slijedi da je uz fragment enzima Nudix-DPP III pročišćen i neki drugi protein. U drugim proteomskim istraživanjima^{47,48} pronašla sam slučajeve gdje je masenom spektrometrijom identificiran homolog Nudix-DPP III iz uzorka na gelu, no iz veličine identificirane točke na gelu jasno je da je riječ samo o dijelu proteina. Zaključujem stoga da je prethodni izvještaj o prvoj biljnoj DPP III iz zlatnog graha upitne vrijednosti.

Mjerenjem cirkularnog dikroizma ustanovljeno je da dva ispitivana proteina, PpND i AtND, imaju sličnu strukturu (slika 31). Sekundarna struktura sadrži velik udio α -uzvojnica, što slijedi iz minimuma na valnoj duljini 208 nm, dok je drugi minimum karakterističan za α uzvojnice¹⁴⁹ ovdje izmjeren na 225 nm, umjesto na 222 nm. Iz prethodno poznatih struktura Nudix i DPP III proteina^{15,17,43} slijedi da strukture sadrže i manji udio β -ploča. Preciznija procjena udjela različitih tipova sekundarnih struktura zahtijeva mjerenje cirkularnog dikroizma u dalekom dijelu UV spektra¹⁴⁹, to jest barem u rasponu 170 – 200 nm, no to nije bilo moguće zbog ograničenja instrumenta. Unatoč tome, zaključak da su Nudix-DPP III proteini građeni pretežno od α -uzvojnica i manjeg udjela β -ploča se slaže s predloženim modelom kreiranim pomoću programa Phyre² (slika 27).

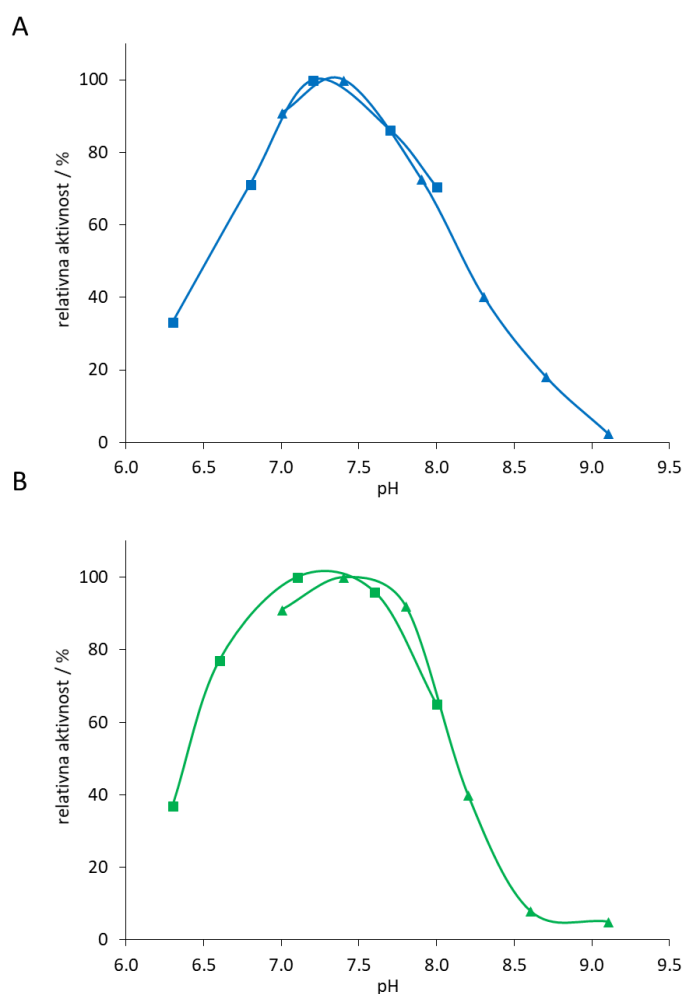


Slika 31. Usporedba spektara cirkularnog dikroizma proteina PpND i AtND.

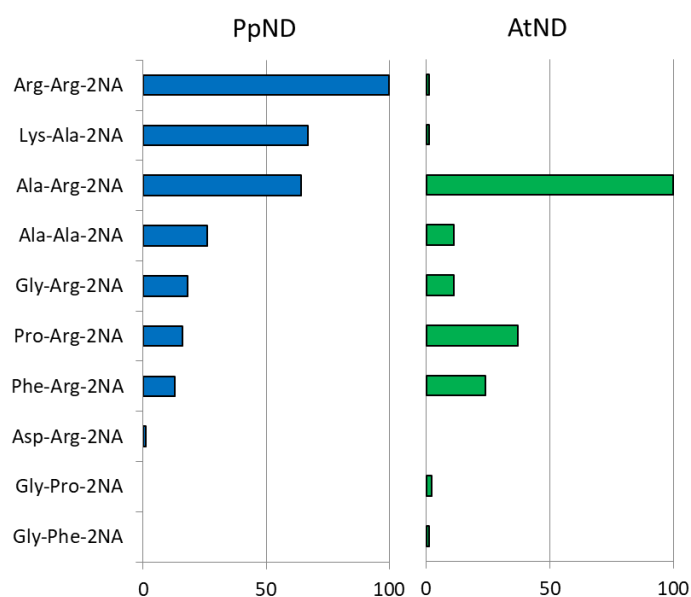
Svi pokušaji kristalizacije oba homologa Nudix-DPP III bili su neuspješni. Kristalizacijske kapi su postavljane s divljim tipom proteina i DPP III-inaktivnim varijantama, PpND E592A i AtND E594A. U sklopu radionice „Protein expression, purification, and characterization“ u SPC Facility u Hamburgu imala sam priliku pokušati optimizirati pripremu uzorka za kristalizaciju proteina. Alternativni ekspresijski konstrukti (dodatak His- i SUMO- privjeska na N-kraj proteina) i načini ekspresije (dva bakterijska soja, dva načina indukcije) nisu poboljšali ni prinos ni topljivost proteina u ekspresijskoj kulturi. Dodaci puferu nisu dodatno stabilizirali protein PpND. Pokazano je i da je protein u otopini monodisperzan. Sveukupno, ocijenjeno je da je kvaliteta uzorka za kristalizaciju odlična, no nije dobiven kristal.

4.3. Peptidazna aktivnost

Prethodna analiza¹ peptidazne aktivnosti prve biljne DPP III iz mahovine pokazala je da je ta aktivnost znatno manja od drugih prethodno karakteriziranih DPP III. No, druge karakteristike slagale su se s očekivanjem: na primjer, PpND je imala gotovo 7 puta veću aktivnost¹ u prisutnosti $50 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Co}^{2+}$, za kojeg je poznato da aktivira sve do sada okarakterizirane DPP III⁶. Kako bi se detaljnije karakterizirali enzimi od interesa, ispitani su pH optimum i supstratna specifičnost oba pročišćena proteina (PpND i AtND). Oba enzima bila su stabilna u ispitivanom rasponu pH. pH optimum oba enzima bio je pri 7,4 uz preferirani supstrat (slika 32). Enzimi su se razlikovali prema preferiranom supstratu: dok je najbolji supstrat za PpND bio Arg₂-2NA, kod AtND je to bio Ala-Arg-2NA (slika 33). Za oba enzima utvrđeno je da maksimalnu aktivnost postižu u prisutnosti $75 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Co}^{2+}$, pa su ostale enzimske reakcije provedene uz dodatak CoCl_2 .



Slika 32. pH optimum enzima Nudix-DPP III: A) PpND u reakciji s Arg₂-2NA; B) AtND u reakciji s Ala-Arg-2NA. Oznake pufera: ▲ Tris-HCl i ■ fosfatni.



Slika 33. Supstratna specifičnost PpND i AtND prema dipeptidil-2-naftilamidnim supstratima. 100% aktivnost odgovara specifičnoj aktivnosti $370 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za PpND i $480 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ za AtND.

Za najbolje supstrate izmjereni su i kinetički parametri, prikazani u usporedbi s podacima za druge DPP III u tablici 13.

Tablica 13. Usporedba kinetičkih parametara za razne DPP III pri 25°C , uz najbolji supstrat za pojedini enzim i pri navedenom pH. Podaci za DPP III iz organizama *Physcomitrella patens* i *Arabidopsis thaliana* izmjereni su prilikom izrade ove doktorske disertacije.

organizam	supstrat	$K_M / \mu\text{mol L}^{-1}$	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/K_M / \text{mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$	pH
<i>Physcomitrella patens</i>	Arg-Arg-2NA	11 ± 2	$0,021 \pm 0,001$	$1,8 \cdot 10^3$	7,4
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ala-Arg-2NA	$6,4 \pm 0,3$	$0,041 \pm 0,001$	$6,4 \cdot 10^3$	7,4
<i>Caldithrix abyssi</i> ⁹	Arg-Arg-2NA	30,5	0,2	$6,6 \cdot 10^3$	7,0
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ⁷	Arg-Arg-2NA	1,0	0,75	$7,5 \cdot 10^5$	8,0
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ⁸	Arg-Arg-2NA	0,36	0,38	$1,1 \cdot 10^6$	8,0
<i>Armillariella tabescens</i> ¹⁴¹	Arg-Arg-2NA	2,2	5,4	$2,4 \cdot 10^6$	8,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ¹³⁷	Arg-Arg-2NA	12,0	0,18	$8,2 \cdot 10^4$	8,0
<i>Homo sapiens</i> ¹³⁷	Arg-Arg-2NA	2,2	20,5	$9,3 \cdot 10^6$	8,0

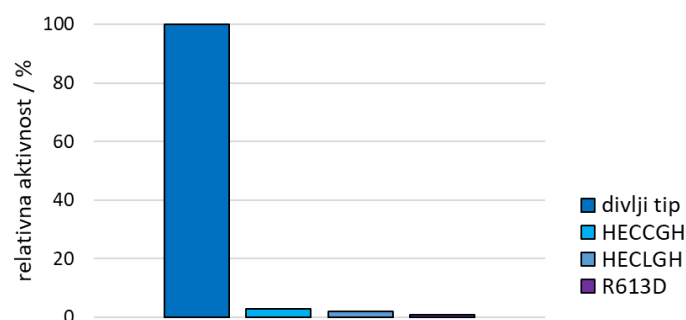
Biljne DPP III pokazuju za tri reda veličine manju katalitičku efikasnost (k_{cat}/K_M) u usporedbi s humanom DPP III. Općenito atipične DPP III, s pentapeptidnim motivom aktivnog mjesta HEXXH (takav motiv ima i DPP III iz bakterije *Caldithrix abyssi*), pokazuju manju aktivnost

od tipičnih DPP III, s HEXXGH motivom. Naravno, moguće je da bi uz fiziološki supstrat mjerena aktivnost bila veća. Nažalost, za DPP III nisu poznati fiziološki supstrati.

4.3.1. Peptidazna aktivnost varijanti pripremljenih ciljanom mutagenезom

S obzirom da atipične DPP III, među njima i biljni proteini Nudix-DPP III, imaju znatno nižu aktivnost od tipičnih, pretpostavljeno je da bi uzrok tomu moglo biti atipično aktivno mjesto. Naime, dok je HEXXH motiv aktivnog mjesta moguće naći i u drugim proteazama, do nedavno se smatralo kako su DPP III jedinstvene⁶ prema HEXXGH motivu. Ipak, opisana je arhejska proteaza¹⁵⁰ koja također ima HEXXGH motiv, ali nema glutamatnog ostatka izvan tog motiva koji u DPP III sudjeluje u kompleksiranju iona cinka, i nema drugih sličnosti s DPP III. Već je pokazano da izmjena heksapeptidnog motiva DPP III štakora u pentapeptidni HEXXH smanjuje katalitičku konstantu k_{cat} 10 puta¹³⁵. Bilo je stoga zanimljivo vidjeti da li bi insercija glicina u HECCH motiv PpND dovela do povećane aktivnosti enzima. Priredene su dvije varijante enzima: prva s insercijom glicina, označena HECCGH; druga s motivom aktivnog mjesta identičnom onom DPP III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*, HECLGH. No, obje mutante imale su specifičnu aktivnost koja je iznosila manje od 3% vrijednosti neizmijenjenog tzv. divljeg tipa enzima PpND (slika 34).

Osim toga, sravnjivanjima je pokazano da je jedna od značajnijih razlika u aminokiselinskim ostacima koji grade vezna mjesta supstrata zamjena Asp496 iz ljudske DPP III, to jest Asp465 iz *Bacteroides thetaiotaomicron* bakterijske DPP III, s Arg na pozicijama 613 u PpND, tj. 615 u AtND (M. Abramić, usmena komunikacija). Asp496 gradi S2 podmjesto i nužan je za supstratnu specifičnost ljudske DPP III¹⁵¹. Supstitucijom Arg613Asp (oznaka R613D) u proteinu PpND dobivena je varijanta koja je zadržavala samo 1% aktivnosti originalnog enzima PpND (slika 34). Supstratna specifičnost varijante R613D nije bila promijenjena: najbolja tri supstrata bila su Arg-Arg-2NA, Lys-Ala-2NA i Ala-Arg-2NA, kao i za divlji tip.



Slika 34. Peptidazna aktivnost varijanti proteina PpND s insercijama u motivu aktivnog mjesta (HECCGH, HECLGH) i izmijenjenom aminokiselinom u S2 podmjestu, R613D.

Varijantama nije bilo moguće izmjeriti katalitičke konstante. Ukratko, nije utvrđen razlog znatno niže aktivnosti biljnih DPP III u usporedbi s tipičnim DPP III. Možemo zaključiti da peptidazna aktivnost DPP III domene nije definirana samo s nekoliko aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu ili S2 podmjestu, već je rezultat složenijih interakcija unutar domene.

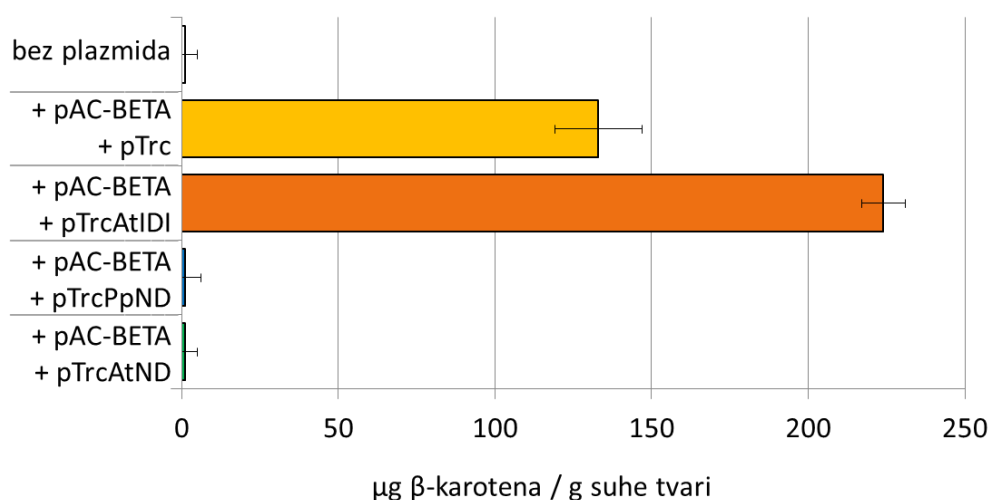
4.4. Testiranje izomerazne aktivnosti

S obzirom da je bioinformatičkim metodama (vidi poglavlja 4.1.3. i 4.1.4) ustanovljena sličnost Nudix domene biljnih Nudix-DPP III s izopentenil-difosfat-izomerazom, bilo je potrebno eksperimentalno testirati tu mogućnost. Kao što je već spomenuto, sve IDI tipa I, osim arhejskih, imaju cisteinski ostatak katalitički nužan za izomeraznu aktivnost⁶⁰, koji je zamijenjen alaninom u proteinima koje istražujem (slika 26). No, arhejske IDI na homolognom mjestu u slijedu imaju alanin – iako mehanizam djelovanja ovih atipičnih IDI nije opisan, izomerazna aktivnost je eksperimentalno utvrđena¹⁴⁶.

Preporučena metoda za detekciju reakcije izomerizacije IPP u DMAPP uključuje plinsku kromatografiju reakcijskih produkata u sprezi s masenom spektrometrijom⁶⁰. Kako takav instrument nije bio dostupan, upotrijebila sam test komplementacije boje¹⁵² u bakteriji *E. coli*. Test je zapravo proizvod istraživanja enzima biosinteze karotenoida, te su ga gotovo istovremeno uvele dvije grupe istraživača^{153–155}. Primijećeno je kako se količina β -karotena koje proizvodi bakterijska stanica značajno povećava u prisutnosti IDI, što se očituje u intenzivno narančastoj boji kolonija¹⁵⁶. Sličan eksperiment s detekcijom likopena se također koristi, no u tom slučaju kolonije se boje crveno, a razvijen je cijeli niz plazmida za testiranje aktivnosti pojedinih enzima puta biosinteze karotenoida¹⁵⁷ i drugih terpenoida¹⁵⁸. Princip je

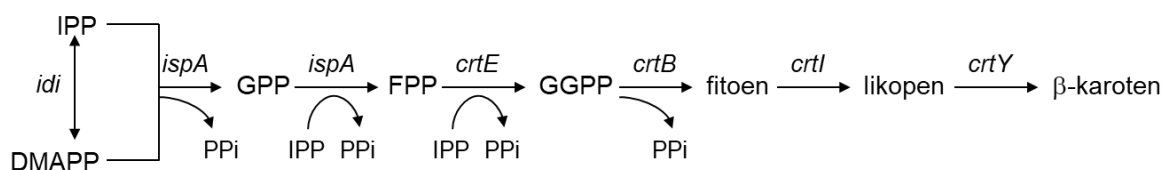
uvijek isti: za brzu identifikaciju kolonija s funkcionalnom cDNA prati se razvijanje boje bakterijskih kolonija na čvrstoj podlozi prilikom inkubacije stanica tijekom nekoliko dana, ili se iz tekuće kulture kvantificira količina karotenoida (npr. β -karotena). Plazmide sam dobila kao velikodušan dar od dr. Francisa X. Cunninghama. U mom testu, u XL1Blue soj *E. coli* unesena su dva plazmida: plazmid pAC-BETA s četiri gena (*crtE*, *crtB*, *crtI* i *crtY*), koji omogućavaju sintezu β -karotena u bakterijskoj stanici, i pTrc plazmid s genom čiji se proteinski produkt ispituje kao potencijalna izomeraza. Kao negativnu kontrolu koristila sam prazan pTrc plazmid, a kao pozitivnu pTrcAtIDI, s kojeg se eksprimira izopentenil-difosfat-izomeraza iz biljke *Arabidopsis thaliana*.

Količina β -karotena kvantificirana je u tekućim kulturama, te je pokazano da u testiranim kulturama s ekspresijom PpND i AtND nema traženog karotenoida (slika 35). Do sada u literaturi nije zabilježen takav slučaj, no svi testirani proteini su bili tipični predstavnici IDI^{152,159–167}. U slučaju izostanka izomerazne aktivnosti, očekivani rezultat eksperimenta bilo bi žuto obojenje – slabije nego u kulturama s pozitivnom kontrolom, a slično kulturi s negativnom kontrolom. Primijećeno je da bakterije s ekspresijom PpND i AtND u kulturi na kraju testa imaju manji broj stanica koje mogu formirati kolonije na bakterijskoj ploči nego kontrolna reakcija. Rezultati nisu kvantificirani iz razloga što je bilo teško regulirati ekspresiju Nudix-DPP III s pTrc plazmida. Naime, do ekspresije u testu dolazi i bez dodatka IPTG-a, što ukazuje da je riječ vjerojatno o nekom tipu autoindukcije ili nuspojave propusnog promotora. Takvi slučajevi su zabilježeni u literaturi s drugim plazmidima¹⁶⁸.



Slika 35. Količina β -karotena u bakterijskim kulturama starim 24 sata. U kulturama koje su ekspimirale PpND i AtND nije detektiran β -karoten.

Kada stanica *E. coli* sadrži plazmid pAC-BETA s genima koji iz farnezil-difosfata (FPP) sintetiziraju β -karoten, traženi spoj se sintetizira u malim količinama – shematski prikazano na slici 36. Dodatkom egzogene IDI udvostručuje se količina željenog produkta. Pretpostavlja se da endogena IDI iz *E. coli* nije dovoljno efikasna i da druge, pogotovo eukariotske IDI, daju više DMAPP, koji je nužan kao nukleacijska čestica za sintezu prvog prekursora β -karotena, geranil-difosfata (GPP). No, apsolutni nedostatak bilo kakvog obojenja sugerirao je da u testiranim kulturama dolazi do neočekivane reakcije.



Slika 36. Shema puta biosinteze β -karotena u *E. coli* s plazmidima pTrc i pAC-BETA: djelovanjem izopentenil-difosfat-izomeraze iz IPP nastaje DMAPP, a njihovom kombinacijom nastaje C10 jedinica, geranil-difosfat (GPP). U još dvije reakcije adicije IPP nastaju farnezil-difosfat (FPP) i geranilgeranil-difosfat (GGPP). Još tri enzimske reakcije potrebne su za nastanak fitoena, likopena i β -karotena, jedinica s 40 C atoma. Geni *crtE*, *crtB*, *crtI* i *crtY* nalaze se na plazmidu pAC-BETA, *idi* na plazmidu pTrc, a *ispA* je gen u *E. coli*.

S obzirom na sličnost Nudix-DPP III s IDI i očuvanost aminokiselinskih ostataka koji vežu IPP, te na prisutnost funkcionalnog aktivnog motiva Nudix-hidrolaza, pretpostavljeno je da Nudix domena proteina Nudix-DPP III djeluje kao IPP-fosfataza. Takva reakcija objasnila bi nedostatak obojenja, s obzirom da bi se iskoristivi oblik C5 jedinice, izopentenil-difosfat, prevodio u izopentenil-fosfat (IP) ili odgovarajući alkohol, koje idući enzimi u sintezi β -karotena ne mogu iskoristiti. Također, gubitak IPP mogao bi dovesti do otežanog preživljenja bakterijske stanice, što je primijećeno kao smanjenje broja bakterija koje mogu formirati kolonije, jer je IPP bitan metabolit i nužan za sintezu spojeva poput ubikinona, dolikola i preniliranih tRNA⁷⁸.

Iako u početnoj pretrazi literature nisam pronašla podatke o IPP kao supstratu Nudix-hidrolaza (vidi poglavlje 2.2.2.), u novoj, specifičnijoj pretrazi pronašla sam zanimljive rezultate u drugom polju istraživanja. U sintezi izoprenola kao potencijalnog biogoriva, pokazala se potreba za fosfatazom koja defosforilira IPP i DMAPP i producira 3-metil-3-butanol, to jest 3-metil-2-butanol. U tu svrhu korištene su Nudix-hidrolaze NudF iz bakterije *Bacillus cereus*¹⁶⁹ i NudB iz *E. coli*¹⁷⁰, pronađene u specifičnim potragama za takvim aktivnostima^{171,172}. Kao konačni produkti detektirani su traženi alkoholi, ali aktivnost enzima

nije detaljno ispitana. Pretpostavljeno je da je riječ o sporednoj reakciji promiskuitetnog enzima¹⁶⁹. Uz prethodno navedene rezultate, to je sugeriralo da bi bilo potrebno testirati IPP kao supstrat Nudix-DPP III.

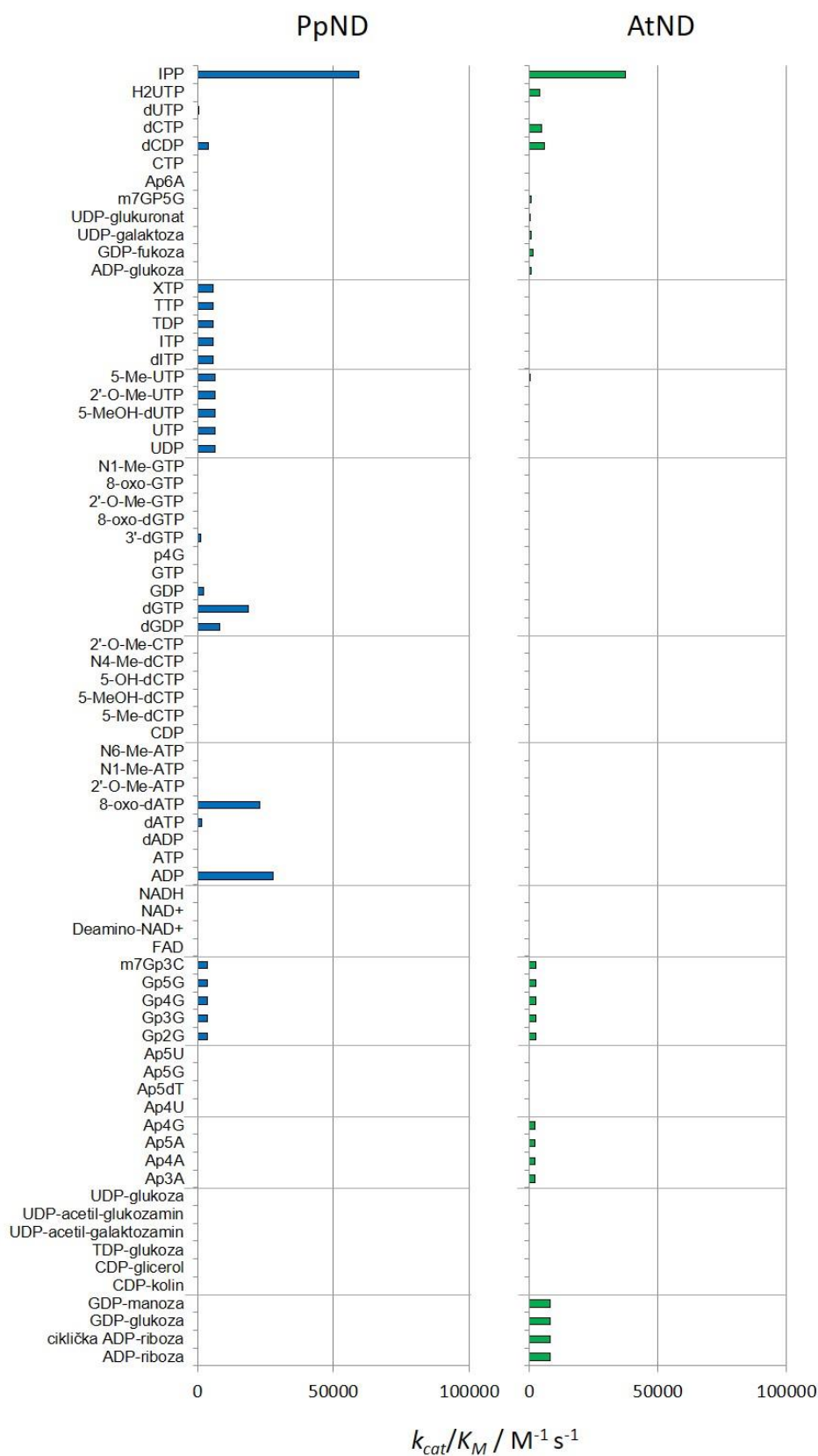
4.5. Fosfatazna aktivnost

4.5.1. Ispitivanje potencijalnih supstrata Nudix-DPP III

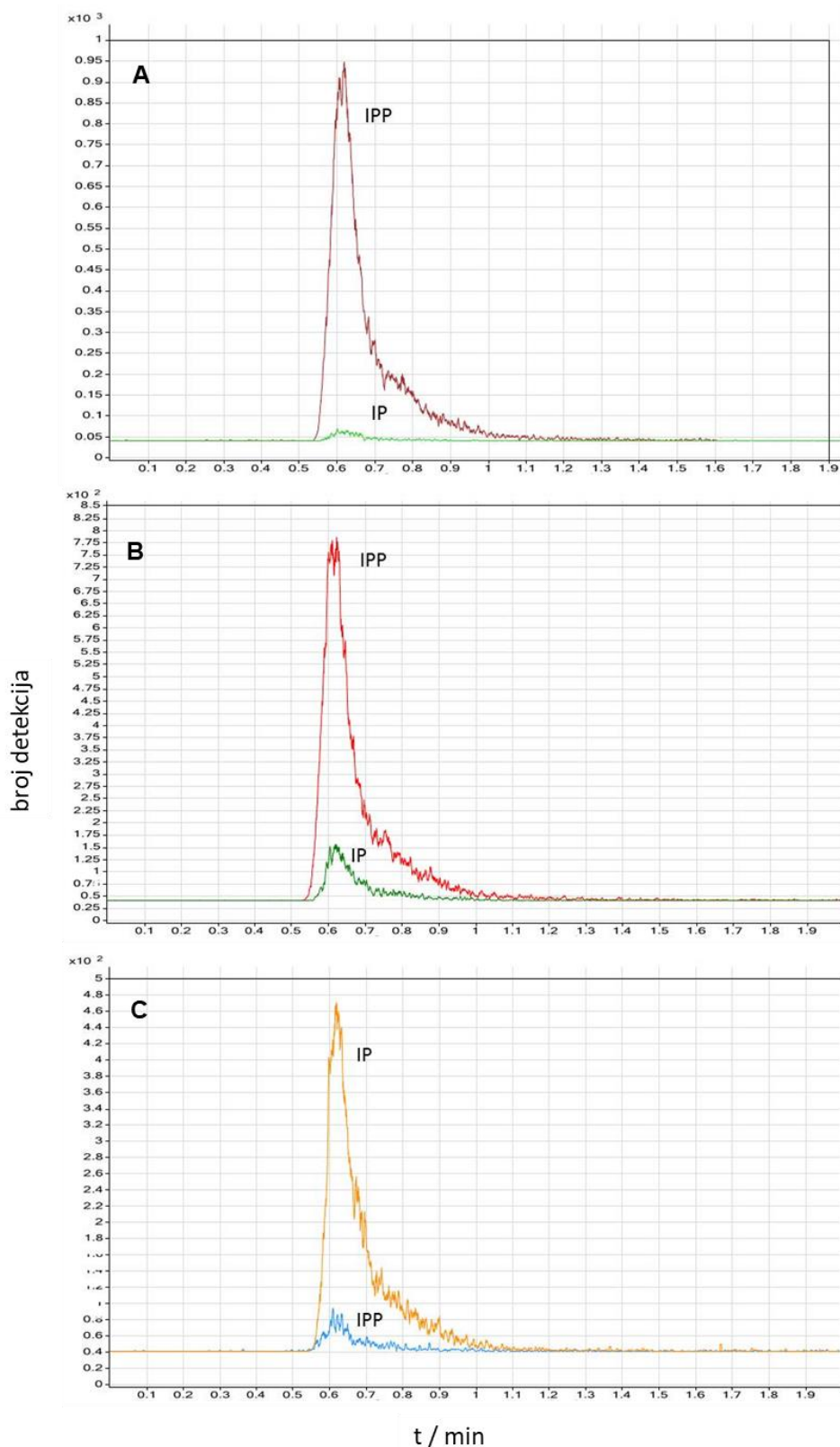
S obzirom da nije pokazana izomerazna aktivnost enzima, poželjno je bilo što prije testirati fosfataznu aktivnost. Nudix-hidrolaze pokazuju vrlo široku supstratnu specifičnost, pa potvrda aktivnosti na samo jednom ispitanom supstratu nije dovoljan dokaz o preferiranom supstratu. U suradnji s prof. Stevenom E. Brennerom iz Berkeleyja, Kalifornija, ispitan je niz od 73 spoja, uglavnom nukleotidnih supstrata Nudix-hidrolaza, grupiranih u 11 skupina, kojima je dodan IPP. Rezultati su prikazani na slici 37. Najbolji supstrat za oba enzima (PpND i AtND) je u ovom testu bio IPP. Uz njega, PpND je uz nešto nižu aktivnost hidrolizirao i derivate adenozijskih i gvaninskih nukleozida. Ti spojevi su testirani pojedinačno (tablica 14). U tom testu nije bilo moguće izmjeriti pojedinačne katalitičke parametre. Test je proveden i u prisutnosti alkalne fosfataze, pri čemu nije došlo do promjene količine nastalog fosfata, što je dovelo do zaključka kako je produkt reakcije izopentenil-fosfat (IP, ponekad u literaturi izopentenil-monofosfat). To je potvrđeno identifikacijom IP metodom tekućinske kromatografije spregnute s tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS, slika 38).

Tablica 14. Katalitička efikasnost PpND i AtND s pojedinačno ispitanim supstratima.

enzim	supstrat	$k_{cat}/K_M / \text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$
PpND	IPP	$(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^4$
	8-oxo-dATP	$(1,1 \pm 0,6) \cdot 10^4$
	ADP	280 ± 26
	dGDP	170 ± 18
	dGTP	185 ± 15
AtND	IPP	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^4$



Slika 37. Rezultati analize fosfatazne aktivnosti proteina Nudix-DPP III mahovine (PpND) i uročnjaka (AtND) na 73 potencijalna supstrata, kao omjer katalitičkih parametara k_{cat}/K_M .



Slika 38. LC-MS kromatogrami ionskog produkta ($m/z=79.00$) IPP-a ($m/z=244.70$) i IP-a ($m/z=164.90$) u reakcijskim smjesama: A) bez enzima; B) sa 60 nmol L^{-1} PpND; C) sa 600 nmol L^{-1} PpND.

Zbog velike sličnosti s izomerazama, bilo je zanimljivo ispitati da li bi eliminacijom hidrolazne funkcije i istovremenom supstitucijom alanina s cisteinom u motivu WDISSAGH bilo moguće pretvoriti Nudix-DPP III u IDI. No, varijanta PpND A76C E92A nije pokazivala izomeraznu aktivnost¹²¹, što je pokazano kolorimetrijskim testom na krutoj podlozi.

Rezultati su potakli raspravu o tome da li je IPP (ili njegov izomer DMAPP) zaista fiziološki supstrat ovog enzima, ili je rezultat jednostavno nuspojava promiskuitetnosti enzima. U tu svrhu ispitano je da li *E. coli* MutT, arhetip Nudix-hidrolaza, hidrolizira IPP, i rezultat je bio negativan¹²¹. Iako neki suradnici (S. E. Brenner) smatraju da katalitička efikasnost mora biti veća od $10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ kako bismo supstrat smatrali stvarnim fiziološkim supstratom enzima¹⁷³, izvjesni broj literaturnih podataka ne govori u prilog toj hipotezi (tablica 15). Više proteina okarakteriziranih kao IDI, za koje je neupitno dokazano da je riječ o fiziološkoj reakciji, ima katalitičku aktivnost ispod te granice, a izopentenil-fosfat-kinaza iz uročnjaka je na samoj granici.

Tablica 15. Katalitičke efikasnosti za reakcije pojedinih enzima s IPP: IDI su izopentenil-difosfat-izomerase, IPK izopentenil-fosfat-kinaza, a FPPS farnezil-difosfat-sintaza.

enzim	$k_{\text{cat}}/K_M / \text{mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$
<i>E. coli</i> IDI ¹⁶⁷	$7,9 \cdot 10^4$
<i>Streptomyces sp.</i> CL190 IDI (tip II) ¹⁷⁴	$1,6 \cdot 10^3$
<i>S. aureus</i> IDI (tip II) ¹⁷⁴	$6,8 \cdot 10^4$
<i>H. sapiens</i> IDI	$5,5 \cdot 10^4$
<i>H. brasiliensis</i> IDI ¹⁶⁷	$8,6 \cdot 10^4$
<i>S. lycopersicum</i> IDI ¹⁶⁷	$2,3 \cdot 10^5$
<i>A. thaliana</i> IPK (supstrat IP) ⁷⁶	$1,0 \cdot 10^5$
<i>H. sapiens</i> FPPS ¹⁷⁵	$8,1 \cdot 10^5$

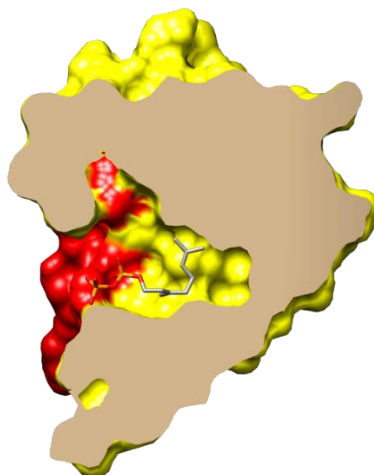
Smatram da je nužno imati u vidu tip supstrata i fiziološki učinak enzimske reakcije kada se eksperimentalni podaci procjenjuju prema takvim, pomalo arbitrarnim granicama. Dok je zahtjev $k_{\text{cat}}/K_M > 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ razuman prilikom istraživanja Nudix-hidrolaza koje hidroliziraju oksidirane i oštećene nukleotide, s promjenom konteksta nužno je prilagoditi kriterije. Oksidirani nukleotidi su vrlo slični neoštećenima, i kako bi se izbjegao nepotreban i štetan utrošak energije zbog hidrolize pogrešnog nukleotida, hidrolaze takve nukleotide moraju razlikovati s puno većom preciznošću¹⁷³. Vodikove veze s modificiranim i nemodificiranim bazama nukleotida enzimi mogu koristiti za diskriminaciju supstrata, što

smanjuje K_M , a povećava k_{cat}/K_M . U slučaju IPP to nije moguće jer on nema mogućnost stvaranja vodikovih veza, pa je eventualna diskriminacija moguća prema duljini izoprenoidne jedinice ili položaju dvostruke veze. K_M također ovisi o fiziološkoj koncentraciji supstrata, koja je veća za IPP nego za oštećene nukleotide, stoga ni K_M ne mora nužno biti malen. Osim toga, većina enzima ima katalitičku efikasnost u rasponu 10^3 - 10^6 mol⁻¹ L s⁻¹, daleko od savršenih, difuzijom kontroliranih reakcija¹⁷⁶. U tom vidu, korisno je napomenuti da je uočeno da u modelu Nudix-DPP III postoji zasebni džep sličan onom u IDI, a drugačiji od većine Nudix veznih mjesta, što bi sugeriralo da je vezanje IPP slično vezanju kod izomeraze.

Sumnje bi se mogle razriješiti kada bismo uspjeli izmjeriti katalitičke parametre. Do trenutka pisanja doktorske disertacije nisam uspjela uspostaviti eksperimentalni sustav za takav pokus. IPP bismo mogli smatrati fiziološkim supstratom ako bi izmjereni K_M iznosio 1-50 μmol L⁻¹, koliko iznose vrijednosti tog katalitičkog parametra izmjerene za rekombinantne biljne IDI i IPK^{76,167}.

Osim katalitičkih parametara, i druge dokaze treba uzeti u obzir prilikom razmatranja fiziološke relevantnosti *in vitro* ustanovljenih enzimskih aktivnosti. Tako je gotovo istovremeno kada su provedeni gore navedeni eksperimenti objavljeno nekoliko vrlo zanimljivih radova. Prvi je o aktivnosti izopentenil-fosfat-kinaze (IPK) u biljaka⁷⁶. Autori su ustanovili da IP i DMAP, supstrati IPK, u stanici vjerojatno ne nastaju spontanom defosforilacijom ili kao sporedna reakcija neke fosfataze, već da je njihova prisutnost u biljnoj stanici adaptivna osobina koja omogućava kontrolu toka ugljika među raznim izoprenoidnim produktima biljaka. Specifično, IP i DMAP inhibiraju citosolnu farnezil-difosfat-sintazu (FPPS), što blokira sintezu sterola¹⁷⁷. Postulirano je stoga postojanje biljno-specifičnog proteina koji defosforilira IPP, a taj zahtjev zadovoljava upravo Nudix-DPP III.

Nadalje, identificirana je još jedna biljna Nudix-hidrolaza s izoprenoid-difosfatom kao supstratom¹⁴⁵. Riječ je o proteinu RhNUDX1, homologu NUDX1 iz uročnjaka, za koju je pokazano da defosforilira GPP u laticama ruže, te da je taj enzim nužan za geraniolnu komponentu mirisa ruža. Iscrpni podaci govore da je zaista identificiran fiziološki supstrat enzima. Postaje stoga jasno da izoprenoide treba ozbiljno uzeti u razmatranje kao supstrate Nudix-hidrolaza, barem u biljkama, koje imaju velik dio specifičnog metabolizma baziranog na izoprenoidnim spojevima. Također i ovaj enzim ima džep u koji se veže supstrat, GPP (slika 39).

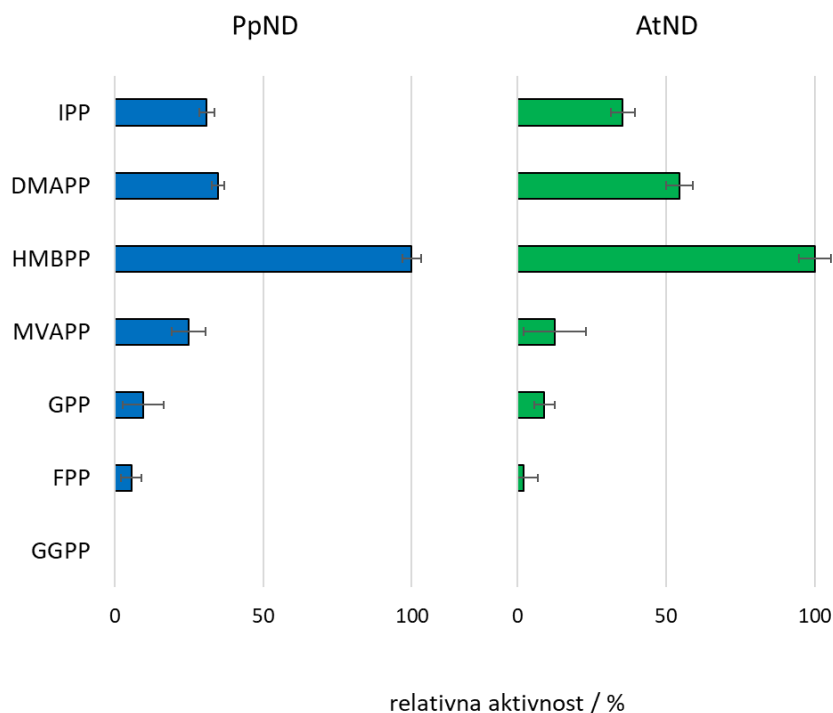


Slika 39. Struktura proteina AtNUDX1 u kompleksu sa supstratom GPP, prikazana u presjeku tako da je uočljiv džep u koji se veže supstrat.

Dodatno, na primjeru proteina iz bakterija utvrđeno je da postoji potreba za proizvodnjom DMAP u bakterijskim stanicama. Autori su pokazali da isključivo DMAP, a ne DMAPP, može biti supstrat flavinske preniltransferaze UbiX, koja je nužna za sintezu ubikinona¹⁷⁸. Tako je u vrlo kratkom vremenu ustanovljena biološka pojavnost IP i DMAP u biljkama i bakterijama, a istovremeno je identificiran enzim s traženom aktivnošću. Smatram da je akumulirano dovoljno indicija kako bi se Nudix-DPP III proteini smatrali potencijalnim izopentenil-difosfat-fosfohidrolazama.

4.5.2. Testiranje drugih izoprenoid-difosfata kao supstrata

S obzirom da izoprenoidi prethodno nisu smatrani supstratima Nudix-hidrolaza, smatrala sam nužnim testirati i druge izoprenoid-difosfate kao supstrate proteina Nudix-DPP III. Odabrani su DMAPP, izomer IPP, MVAPP i HMBPP, prekursori IPP u MVA i MEP putevima sinteze izoprenoida, te GPP, FPP i GGPP, kao primjeri dužih izoprenoidnih lanaca. Rezultati su prikazani na slici 40. PpND i AtND hidroliziraju DMAPP podjednako efikasnošću kao IPP, a nešto niža je aktivnost uz MVAPP. Najviša aktivnost izmjerena je uz HMBPP. No, bilo bi pogrešno smatrati da je to nužno fiziološki relevantniji supstrat u odnosu na IPP. Naime, HMBPP nalazi se samo u plastidima, dok bi se Nudix-DPP III proteini prema predikcijama zasnovanim na analizi N-kraja sekvence trebali nalaziti u citoplazmi. Stoga nije vjerojatno da u biljnoj stanici dolazi do interakcije ovih proteina i HMBPP. Naravno, idealno bi bilo kada bismo eksperimentalno potvrdili lokalizaciju proteina u stanici. Također, trebalo bi odrediti kinetičke parametre reakcije enzima s potencijalnim supstratima.



Slika 40. Aktivnost PpND i AtND prema izoprenoid-difosfatima.

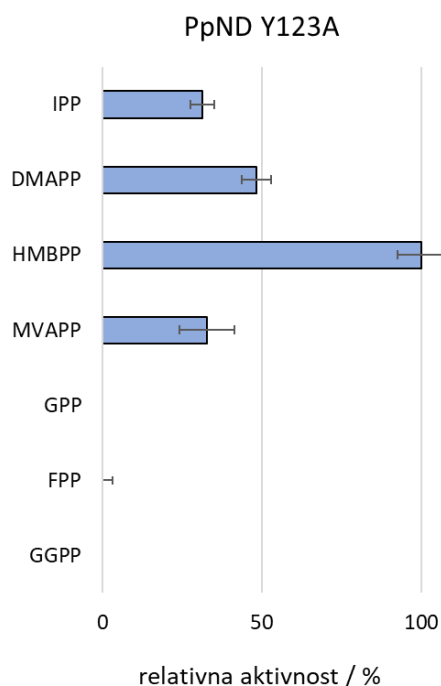
Nadalje, iako opširan, naš test potencijalnih supstrata Nudix-hidrolaza svakako nije bio sveobuhvatan, već fokusiran na nukleotidne spojeve. Neki od supstrata koji nisu bili testirani su koenzim A i njegovi derivati, te tiamin-difosfat. No, Shigeoka i suradnici već godinama objavljuju svoje rezultate na ispitivanjima Nudix-hidrolaza uročnjaka, i poznato je da su eksprimirali rekombinantni protein AtNUDX3¹⁷⁹ (to jest AtND). Zasad nisu identificirali potencijalne supstrate ovog proteina³⁹.

Konačno, kako je prethodno opisano da Nudix-hidrolaze NudF iz bakterije *B. cereus* i NudB iz *E. coli* mogu hidrolizirati IPP, a naknadno da mogu hidrolizirati i DMAPP¹⁸⁰, pročišćen je protein NudB iz *E. coli* kako bi se usporedila njegova aktivnost s onom Nudix-DPP III proteina. Izmjerena aktivnost prema IPP bila je 20 puta manja nego ona enzima PpND.

4.5.3. Fosfatazna aktivnost varijante Tyr123Ala

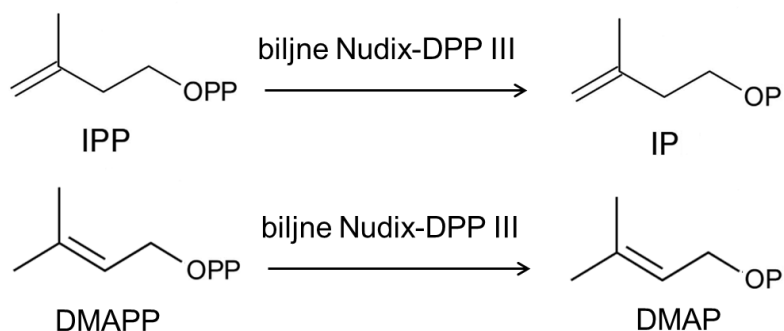
Usporedbom velikog broja riješenih struktura Nudix proteina, Brenner i sur.³⁰ došli su do zaključka da je dio sekvence koji oni nazivaju X-petljom (engl. *X-loop*) odgovoran za određivanje specifičnosti X, to jest nefosfatnog dijela Nudix supstrata. X-petlju smještaju na regiju 17-23 aminokiselinska ostatka prema C-kraju od motiva *Nudix box*. Na tom dijelu je i u mom modelu petlja, te sam identificirala Tyr123 kao poziciju na kojoj je očuvana aromatska

aminokiselina – u 800-tinjak sekvenci, na tom mjestu su uvijek isključivo Tyr ili Phe. Stoga je pripremljena varijanta PpND Y123A, koja je imala 18,6 puta manju enzimsku aktivnost od divljeg tipa. Varijanta nije pokazivala razlike u supstratnoj specifičnosti u odnosu na divlji tip enzima (slika 41 i slika 40 za usporedbu s divljim tipom PpND enzima). Pretpostavljam da bi aromatska aminokiselina mogla sudjelovati u kontaktu s dvostrukom vezom IPP, te tako utjecati na aktivnost enzima.



Slika 41. Aktivnost varijante PpND Y123A prema izoprenoid-difosfatima.

Zaključno, potvrđena je prva hipoteza da Nudix domena ima fosfataznu aktivnost. Kao najbolji potencijalni fiziološki supstrat proteina identificiran je izopentenil-difosfat, IPP, i njegov izomer dimetilalil-difosfat, DMAPP (slika 42).

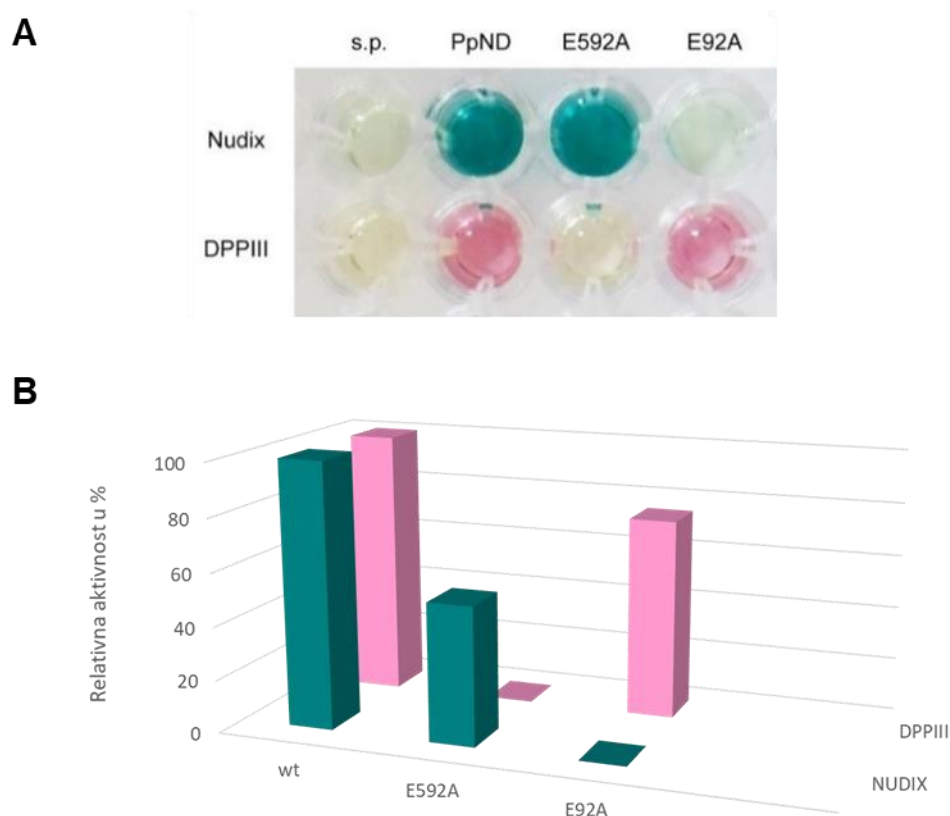


Slika 42. Pretpostavljene fiziološke reakcije enzima Nudix-DPP III u biljaka.

4.6. Međuovisnost peptidazne i fosfatazne aktivnosti

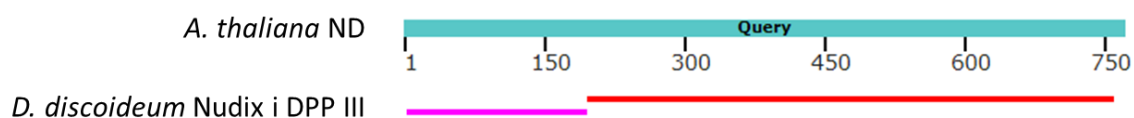
Druga hipoteza glasila je da su peptidazna i fosfatazna aktivnost međusobno neovisne, što nije ispitivano neposredno u ovoj disertaciji, već je istraživanja provela studentica Iva Sućec pod mojim neposrednim vodstvom³.

Priredene su dvije varijante koje su pojedinačno eliminirale fosfataznu (PpND E92A) i peptidaznu (PpND E592A) aktivnost. Glutamat na poziciji 92 nalazi se u motivu *Nudix box* (RE⁹²XUEE) i katalitički je ostatak u brojnim Nudix-hidrolazama. Na poziciji 592 je pak glutamat iz motiva aktivnog mjesta DPP III (HE⁵⁹²CCH), koji je homologan glutamatu 451 u ljudskoj DPP III i koji je također identificiran kao aminokiselinski ostatak nužan za katalizu peptidazne reakcije. Inaktivacija je bila potpuna u obje varijante – čak ni uz suvišak enzima nije detektiran produkt reakcije (slika 43A).



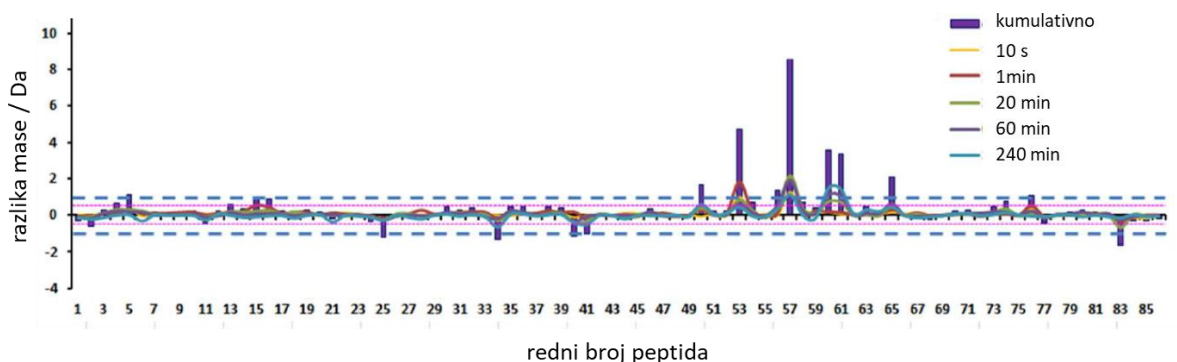
Slika 43. Aktivnosti varijanti PpND s pojedinačno inaktiviranim hidrolaznim funkcijama: supstitucija E592A poništila je peptidaznu, a E92A fosfataznu aktivnost. A) Jedna hidrolazna aktivnost izostaje u svakom mutantu čak i uz znatni suvišak enzima. B) Inaktivacija jedne hidrolazne aktivnosti djelomično narušava drugu. Oba prikaza preuzeta su bez izmjene iz prijave za Rektorovu nagradu³ Ive Sućec.

Unatoč višestrukim pokušajima, nije bilo moguće razdvojiti pojedinačne domene PpND proteina. Iako su u barem jednom organizmu – amebi *Dictyostelium discoideum* – pronađene obje homologne domene kao samostalni proteini (slika 44), Nudix-DPP III iz mahovine *P. patens* nije bilo moguće rastaviti na samostalne funkcionalne domene. Fragment koji se sastojao samo od Nudix domene nije davao topljive proteine, dok je DPP III fragment bio manje topljiv i pokazivao znatno manju aktivnost u odnosu na divlji tip³.



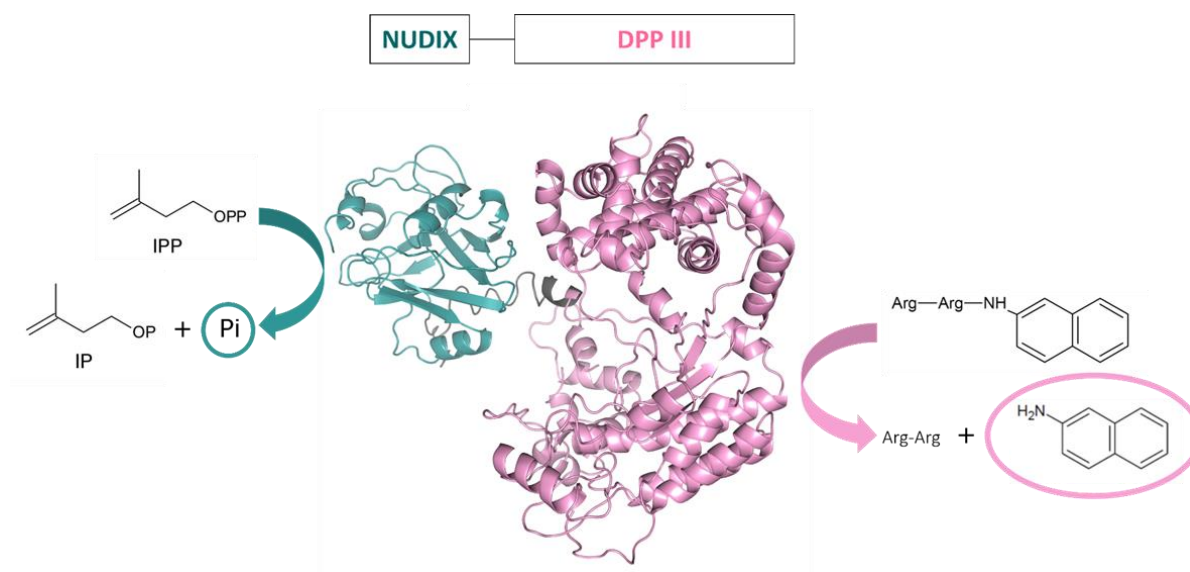
Slika 44. U amebi *Dictyostelium discoideum* (i drugim srodnim organizmima) pronađene su obje homologne domene, što je iskorišteno za planiranje odvajanja domena proteina PpND.

Nisu pronađeni dokazi da IPP inhibira peptidaznu reakciju, niti Arg₂-2NA fosfataznu. To je u skladu s eksperimentima izmjene vodika i deuterija¹⁸¹ (engl. *hydrogen-deuterium exchange*, HDX), gdje je pokazano da ne dolazi do promjene u strukturi Nudix domene prilikom reakcije DPP III domene i tinorfina (slika 45).



Slika 45. Rezultati HDX eksperimenta interakcije PpND i tinorfina, peptida koji djeluje kao inhibitor DPP III. Promjene u strukturi ograničene su na DPP III domenu¹⁸¹.

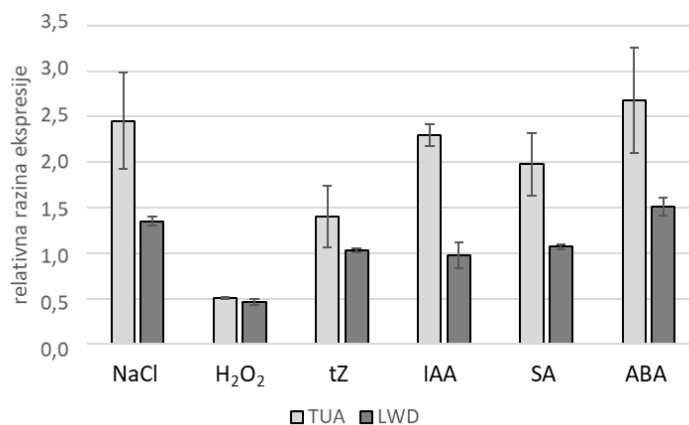
Zaključno, druga hipoteza nije jednoznačno dokazana. Dio podataka joj ide u prilog, dio ne. Potrebno je provesti još eksperimenata. No, pokazano je da je riječ o specifičnom i zanimljivom proteinu s dvojnou hidrolaznom aktivnošću (slika 46), koji je po prvi puta opisan u ovoj doktorskoj disertaciji.



Slika 46. U proteinima Nudix-DPP III pronađena je dvojna hidrolazna aktivnost: N-terminalna Nudix domena djeluje kao fosfataza na IPP, dok C-terminalna domena cijepa peptidnu vezu Arg₂-2NA, karakterističnog supstrata DPP III metalopeptidaza.

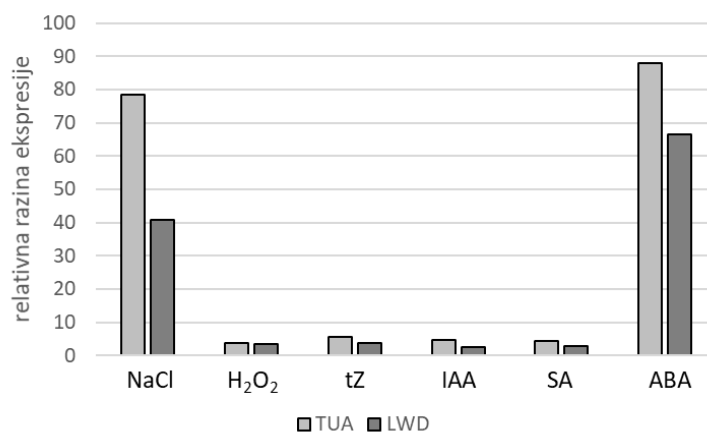
4.7. Promjena razine transkripcije u uvjetima stresa

U svrhu ispitivanja fiziološke funkcije PpND u rastu i razvitku mahovine kao i preživljavanju u nepovoljnim okolišnim uvjetima, ispitala sam razinu transkripta gena za PpND u tekućoj kulturi mahovine pod utjecajem nekoliko regulatora rasta i stresora. Na slici 47 su sažeto prikazani rezultati ovog eksperimenta. Najveće promjene u razini transkripta uočene su uslijed solnog stresa i tretmana apscizinskom kiselinom (ABA), što je rezultiralo udvostručenjem razine transkripta PpND u odnosu na kontrole. Oba tretmana predstavljaju dobro poznate vrste abiotskog stresa s kojima se biljke suočavaju u promjenjivom okolišu, solni stres i sušu, pa su bila zanimljiva za daljnje eksperimente. Značajno smanjenje razine transkripta PpND (50% u odnosu na kontrolu) bilo je uočeno uslijed oksidacijskog stresa, nakon tretmana s vodikovim peroksidom.



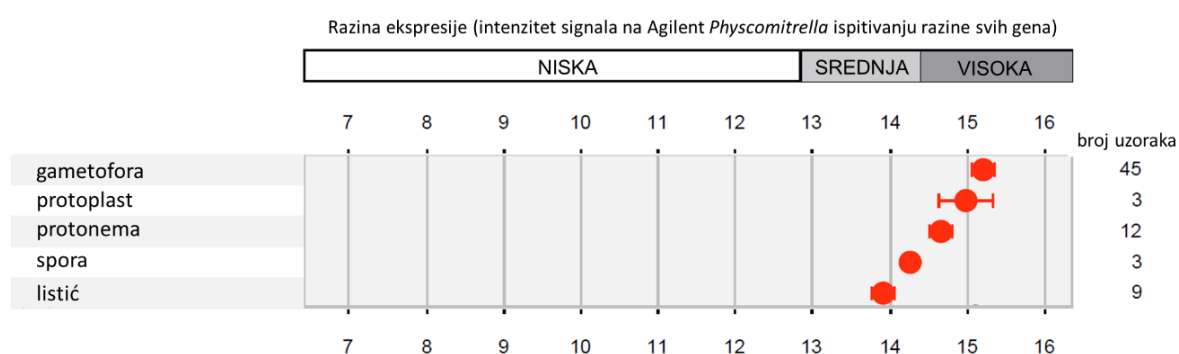
Slika 47. Relativna promjena razine transkripta gena PpND nakon 6h tretmana navedenim stresorima ili regulatorima rasta u tekućoj kulturi u odnosu na referentne gene TUA i LWD u kontrolnoj kulturi (vrijednost 1,0). Rezultati su srednja vrijednost dva biološka replikata s tehničkim triplikatima. Koncentracije stresora bile su: 300 mmol L⁻¹ NaCl, 10 μmol L⁻¹ H₂O₂, 25 μmol L⁻¹ trans-zeatin, tZ, 10 μmol L⁻¹ indol-3-octena kiselina, IAA, 2,5 μmol L⁻¹ salicilna kiselina, SA, 25 μmol L⁻¹ apscizinska kiselina, ABA.

Ovaj eksperiment je bio preliminarni i vrlo ograničen: mjerena je promjena ekspresije transkripta u samo jednoj vremenskoj točki i primijenjeno je samo 6 različitih tretmana. No poslužio je svrsi, te su identificirani uvjeti u kojima bi se mogao ispitivati efekt na fenotip mahovine. U drugom ponavljanju eksperimenta mjerena je i promjena razine transkripcije dehidrina koji je iz literature poznat kao marker stresa u uvjetima suše kod mahovine¹⁸², te se njegova transkripcija povisuje od 40 do 80 puta uslijed solnog tretmana i 65 do 90 puta uslijed tretmana ABA-om (slika 48).



Slika 48. Relativna promjena razine transkripta gena za dehidrin u istim uzorcima u kojima je mjerena promjena transkripcije PpND (slika 47) u odnosu na referentne gene TUA i LWD u kontrolnoj kulturi (vrijednost 1,0). Koncentracije stresora bile su: 300 mmol L⁻¹ NaCl, 10 μmol L⁻¹ H₂O₂, 25 μmol L⁻¹ trans-zeatin, tZ, 10 μmol L⁻¹ indol-3-octena kiselina, IAA, 2,5 μmol L⁻¹ salicilna kiselina, SA, 25 μmol L⁻¹ apscizinska kiselina, ABA.

Vidljivo je izuzetno povećanje u ekspresiji dehidrina što definitivno potvrđuje da je u eksperimentu izazvan stres kod mahovine, posebno stresorima NaCl i ABA. Promjena ekspresije gena PpND nije izražena u tolikoj mjeri kao u slučaju dehidrina. Jedan od mogućih razloga za malenu promjenu razine ekspresije jest i vrlo visoka, moglo bi se reći i konstitutivna, ekspresija PpND u svim tkivima mahovine¹⁸³ (slika 49). U uročnjaku je pak pokazana niža razina ekspresije AtND u listovima biljke u odnosu na korijen i stabljiku⁴⁴.



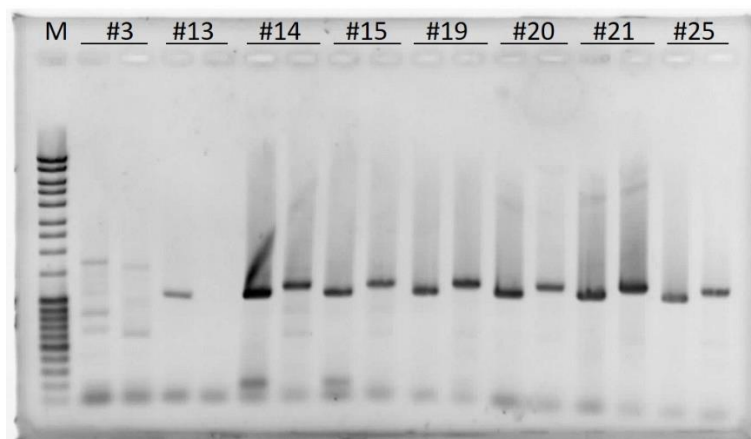
Slika 49. Razina ekspresije PpND u tkivima mahovine, preuzeto sa baze podataka Genevestigator (www.genevestigator.com).

4.8. Priprema i karakterizacija *knock-out* mahovine

Priprema *knock-out* linija odrađena je kako je opisano u poglavlju 3.6. Nakon drugog kruga selekcije, preostalo je 45 linija koje su testirane za pravilnu integraciju konstrukta u genomsku DNA.

4.8.1. Probir *knock-out* linija

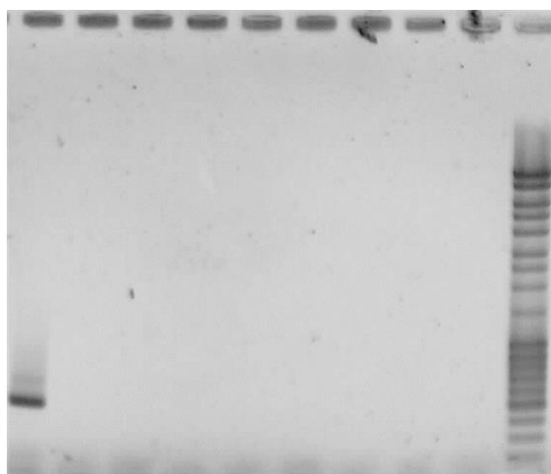
Sve linije u kojima je lančanom reakcijom polimeraze na genomskoj DNA utvrđeno da je prisutna sekvenca antibiotskog markera, da nema produkta koji bi se umnožio iz lokusa divljeg tipa, te da su i 5'- i 3'-homologe regije pravilno integrirane (slika 50), tretirane su kao potencijalne *knock-out* linije. Biljni materijal je umnožen te su izolirani RNA i proteini.



Slika 50. Primjer analize genomske DNA mahovine za pravilnu integraciju konstrukta. Brojevi označavaju broj linije, a na gel su nanoseni produkti lančane reakcije polimeraze za provjeru integracije 5'- pa 3'-homologne regije, tim redom.

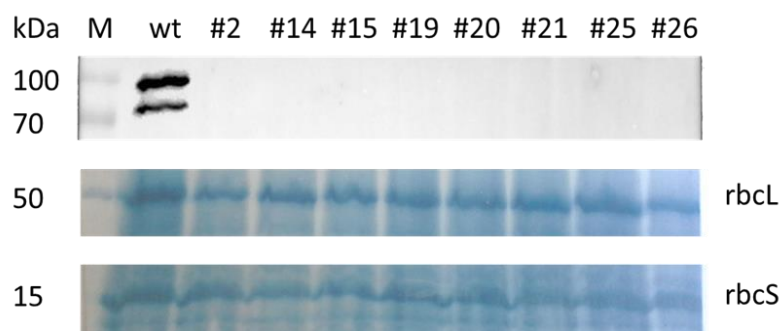
Izolirana RNA je reakcijom reverzne transkripcije prevedena u komplementarnu DNA, s kojom je izvedena lančana reakcija polimeraze s PpND-specifičnim početnicama, kako bi se utvrdilo dolazi li do transkripcije DNA u RNA. U svim testiranim linijama nije nađena glasnička RNA za PpND (slika 51).

wt #2 #14 #15 #19 #20 #21 #25 #26 M



Slika 51. U testiranim linijama nije prisutna glasnička RNA za Nudix-DPP III protein, što je pokazano posredno nedostatkom specifičnog PCR produkta koristeći komplementarnu DNA kao kalup. Divlji tip je označen s wt (engl. *wild-type*), *knock-out* linije brojevima.

Nakon izolacije proteina iz divljeg tipa mahovine i transformiranih linija, metodom *western*-analize linije su testirane na prisutnost proteina PpND. Sve potencijalne linije bile su potvrđene kao *knock-out* linije, te u njima nije pronađen funkcionalan protein PpND (slika 52).



Slika 52. *Western*-analiza PpND proteina u divljem tipu (wt) i *knock-out* linijama mahovine. Prikaz je kombinacija detektirane kemiluminiscencije membrane inkubirane s anti-PpND kunićjim serumom i anti-kunićjim sekundarnim antitijelom obilježenim peroksidazom iz hrena (gore) i fotografije membrane obojane amido-crnilom, kao kontrolom za količinu nanesenog proteina.

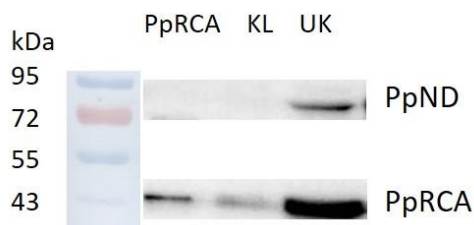
Iz 45 transformiranih linija izdvojeno je 8 potvrđenih *knock-out* linija. Efikasnost transformacije time je iznosila 18%, što je u skladu s objavljenim rezultatima o efikasnosti homologne transformacije⁹⁵. Tome je vjerojatno doprinijelo više otprije poznatih faktora – npr. kako bi transformacija bila što uspješnija, homologne regije trebaju biti duže od 400 parova baza, te moraju biti simetrično raspoređene, tako da se kazeta s antibiotskim markerom nalazi u sredini konstrukta⁹⁵.

Potvrđene *knock-out* linije zatim su okarakterizirane prema fenotipu i razini fitohormona citokinina u usporedbi s divljim tipom.

4.8.2. Validacija anti-PpND antiseruma

Za identifikaciju prisutnosti PpND u proteinskim ekstraktima mahovine korišteno je poliklonsko antitijelo, točnije antiserum. Antiserum sam validirala tako da su ispitane potencijalne reakcije s drugim DPP III, s proteinskim ekstraktom bakterije *E. coli* (jer je kao antigen služio rekombinantni protein proizveden u *E. coli*), te s proteinskim ekstraktom *P. patens*. Pokazano je da nema reakcije s drugim DPP III, čak ni s AtND, niti s ekstraktom *E. coli*. U ekstraktu mahovine identificirane su dvije vrpce s kojima reagira antiserum. Jedna vrpca je veličinom odgovarala Nudix-DPP III (87 kDa), dok je druga, znatno jačeg intenziteta, odgovarala proteinu veličine 45 kDa. Masenom spektrometrijom ustanovljeno je da je riječ o rubisko-aktivazi (RCA), koja s PpND dijeli slijed WGGK, ali nema drugih sličnosti. Pretpostavila sam da antiserum reagira na RCA zbog zajedničkog epitopa WGGK. RCA sam klonirala i eksprimirala kao rekombinantni protein, a kao dodatnu kontrolu iz stanica mahovine izdvojila sam djelomično pročišćene kloroplaste. *Western*-analizom

potvrđena je reakcija antiseruma s rekombinantnom RCA, koju nalazimo u kloroplastnoj proteinskoj frakciji (slika 53). Reakcija nije ometala detekciju PpND, te je mogla poslužiti uz amido-crnilo kao kontrola količine proteina nanešenih u jažicu gela.



Slika 53. Potvrda reakcije antiseruma specifičnog na PpND s rubisko-aktivazom (RCA), koja je pročišćena kao rekombinantni protein (prvi stupac). Ukupni ekstrakt proteina iz mahovine označen je UK, a kloroplastni ekstrakt KL.

4.8.3. Fenotip knock-out linija u standardnim uvjetima rasta

Divlji tip i *knock-out* linije uzgajani su na tri različite krute podloge: KNOP ME bez drugih dodataka, te uz dodatke amonijevog tartarata (KNOP ME AT) i glukoze (KNOP ME ATG). Nije uočena nikakva razlika u fenotipu (slika 54). Pokus je ponovljen tri puta.

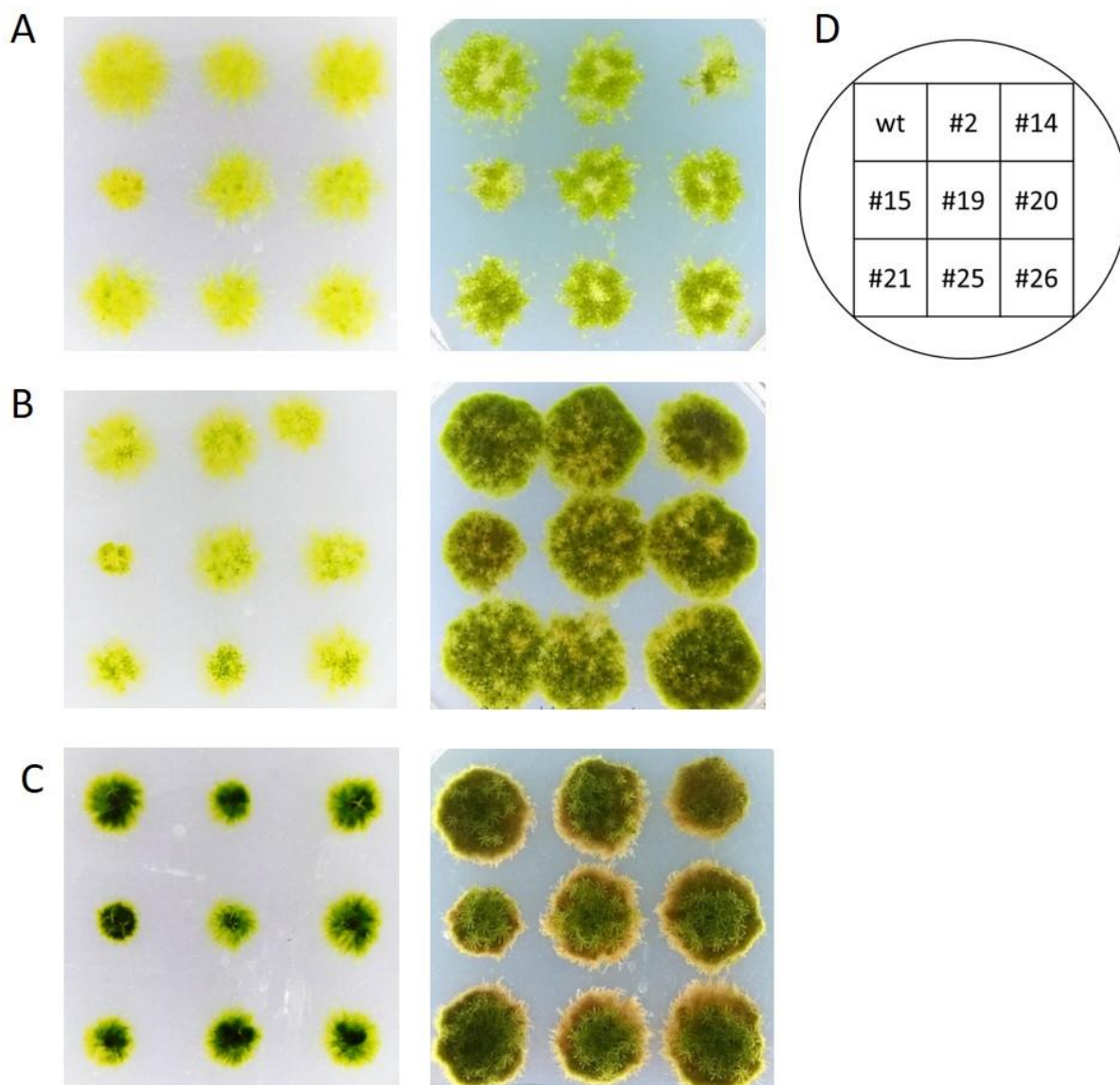
Rezultati ukazuju da Nudix-DPP III nije esencijalan protein za stanicu mahovine. Kako bi se to nedvojbeno potvrdilo, trebalo bi još *knock-out* linije provesti kroz cijeli životni ciklus mahovine, kako bi se isključila mogućnost da je protein vitalan u nekom procesu razvoja biljke, poput nastajanja sporofita ili klijanja spore.

Izostanak razlike u fenotipu pri standardnim uvjetima ne znači da uloga ovog proteina nije važna u funkcioniranju mahovine. Postoji mogućnost da je protein nužan u uvjetima stresa što potvrđuju promjene u razinama transkriptata uočene uslijed tretmana stresorima (NaCl) ili hormonima stresa (ABA).

4.8.4. Fenotip knock-out linija u uvjetima stresa

Kako bi se ispitalo da li dolazi do razlike u rastu i razvoju mutanti mahovine pri uvjetima stresa, divlji tip i *knock-out* linije #2 i #20 uzgojeni su kao protonemalna kultura u tekućoj podlozi. Protonemalne stanice su za tretman inokulirane na standardnu krutu podlogu, kao i na podlogu s 10 mmol L⁻¹ H₂O₂, 300 mmol L⁻¹ NaCl i 25 μmol L⁻¹ ABA. Naime, u tim su uvjetima uočene promjene ekspresije transkripta PpND. Nažalost, nije uočena nikakva razlika između divljeg tipa i mutanti – nijedna linija nije preživjela više od 48 sati pri navedenom oksidacijskom stresu, dok su pri tretmanu s NaCl i ABA i divlji tip i mutante rasle sporije

nego u kontroli, ali bez međusobnih razlika u preživljavanju i brzini rasta. Eksperiment je proveden u triplikatu.



Slika 54. *Knock-out* linije ne pokazuju razlike u fenotipu u odnosu na divlji tip u standardnim uvjetima rasta. Na panelima A-C lijeva fotografija prikazuje kolonije nakon 3 tjedna, a desna nakon 7 tjedana rasta. A) KNOP ME podloga, B) KNOP ME AT podloga, C) KNOP ME ATG podloga, D) shema s oznakama položaja pojedinih linija.

4.8.5. Mjerenje razine citokinina u mutantama mahovine

Citokinini su biljni regulatori rasta koji se sintetiziraju iz DMAPP. Izoprenoidni lanac modificira bazu adenzin- tri-, di- i mono- fosfata, ili se tRNA njime prenilira (slika 13). Ovi spojevi su se stoga činili kao dobra početna točka za ispitivanje fiziološkog utjecaja

eliminacije proteina Nudix-DPP III iz stanica mahovine. Osim toga, za AtND pokazana je interakcija s proteinom ARR7, regulatorom odgovora stanice na prisutnost citokinina⁵⁹.

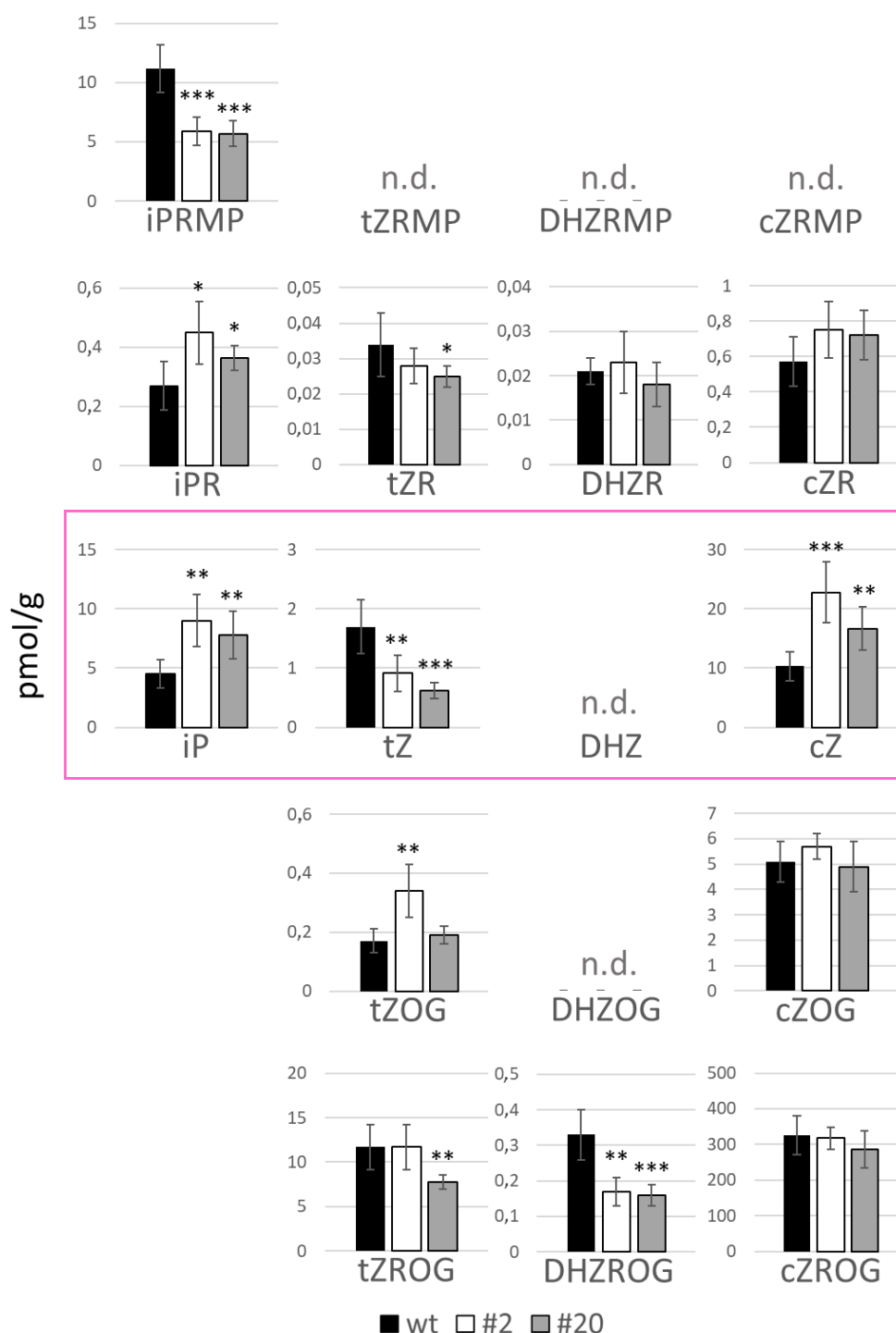
Za analizu su pripremljene kulture proteonemalnih stanica divljeg tipa i dviju *knock-out* linija (#2 i #20) na krutoj podlozi. Analize profila citokinina je provela dr. sc. Iva Pavlović u suradnji s dr. Ondřejem Novákom u Olomoucu, Češka. Izmjerene su razine citokininskih baza (aktivnih formi), ribozida (transportnih formi), te *O*-glikozida (reverzibilnih skladišnih formi). Razine *N*-glukozida (ireverzibilnih konjugata) bile su preniske za detekciju.

U mutantama bez ekspresije proteina PpND izmjerene su oko 2 puta više razine izopentenil-adenina (iP) i *cis*-zeatina (cZ), dok je razina *trans*-zeatina (tZ) bila upola manja nego u divljeg tipa (slika 55). Razine dihidrozeatina (DHZ) bile su preniske za detekciju u svim linijama. Iako je nezahvalno donositi zaključke o fiziološkoj ulozi Nudix-DPP III iz ovog eksperimenta, imajući u vidu velik broj enzima koji sudjeluje u sintezi aktivnih citokinina, od adicije DMAPP do samih citokininskih baza, rezultati podupiru moju tezu da je Nudix-DPP III u biljkama izopentenil-difosfat-fosfohidrolaza. Nakon eliminacije ovog enzima iz stanica mahovine, očekivala bih da se u stanicama poveća količina IPP i DMAPP u odnosu na IP i DMAP. Iz toga slijedi i povećanje količine iP i cZ. Literaturni podaci pokazuju da se cZ akumulira u posebnim okolnostima povezanima s ograničenim rastom koji je obično povezan sa stresom¹⁸⁴. Budući da je cZ poznat kao manje aktivan od tZ, pretpostavlja se da je funkcija cZ u biljkama održavanje minimalne citokininske aktivnosti pod nepovoljnim uvjetima rasta. Dalo bi se zaključiti da nedostatak enzima PpND u mahovina uzrokuje određeni stupanj stresa i promjene u profilu citokinina u usporedbi s divljim tipom mahovine. Idealno bi bilo izmjeriti razine samih DMAPP i IPP u stanicama mahovine.

Iako bi bilo za očekivati da će promijenjene razine citokinina, regulatora rasta, dovesti do razlike u fenotipu biljke, to nije nužno linearan odnos. Poznato je da djelovanje citokinina na formaciju pupoljka u kaulonemalnim stanicama mahovina ovisi i o razinama auksina¹⁸⁵.

U konačnici, treća hipoteza, da protein PpND ima ulogu u biljnom rastu i razvitku te u prilagodbi na okolišne uvjete, djelomično je potvrđena. Pokazano je da dolazi do promjene razine ekspresije gena pri oksidacijskom i solnom stresu te suši. Također, pokazano je da ovaj enzim utječe na sintezu biljnih regulatora rasta citokinina te njegov nedostatak u mutantama mahovine uzrokuje promjene u profilu citokinina. Citokinini se u evoluciji biljaka pojavljuju u poročinama (*Charophyta*)¹⁸⁶, što se slaže i s prvom identificiranom pojavom proteina

Nudix-DPP III (slika 21). Nažalost, do sada nije pokazana nikakva promjena fenotipa mutanti u odnosu na divlji tip mahovine u ispitivanim uvjetima uzgoja.



Slika 55. Promjene profila citokinina u mutantima mahovine koje ne ekspresiraju PpND, u odnosu na divlji tip. Oznake: DHZ dihidrozeatin, cZ *cis*-zeatin, iP izopentenil-adenin, n.d. nisu detektirani, -ROG i -OG *O*-glikozidi, -R ribozid, -RMP ribozid-monofosfat, tZ *trans*-zeatin, wt divlji tip mahovine, #20 i #2 *knock-out* linije bez ekspresije PpND.

4.9. Doprinos istraživanja

Ovaj rad je, uz onaj Magnarda i sur.¹⁴⁵, među prvima u kojima se izoprenoid-difosfati razmatraju kao supstrati Nudix-hidrolaza. Takav nalaz ima smisla uzmu li se u obzir proširenje članova porodice Nudix-hidrolaza u biljkama⁴⁴ i značajan udio izoprenoida u metabolizmu biljaka⁶⁰. U slučaju ovog rada, na to je navela bioinformatički identificirana sličnost proteina Nudix-DPP III i izopentenil-difosfat-izomeraze. Ispitan je niz izoprenoid-difosfata i pokazano je da su prema tom tipu supstrata prilično promiskuitetni i imaju širi raspon supstrata. No, smatram da je kombinacija dokaza koji su ovdje prezentirani i rezultata drugih istraživača dovoljna da opravda nazivanje proteina Nudix-DPP III izopentenil-difosfat-fosfohidrolazom. Ti dokazi su: homologija sekvenci Nudix domene i izopentenil-difosfat-izomeraze; *in vitro* aktivnost rekombinantnog enzima u reakciji s IPP i DMAPP; predloženo postojanje enzima s navedenom aktivnošću⁷⁶; te promjena razine metabolita (citokinina) u mutantama mahovine. Također, slična aktivnost enzima iz mahovine i uročnjaka dozvoljava generalizaciju na razini svih biljaka, te možemo zaključiti da je izopentenil-difosfat-fosfohidrolazna aktivnost očuvana u biljnom carstvu.

Jedan od odgovora koji nije ponuđen u ovoj disertaciji jest razlog za istodobnu prisutnost dviju enzimatskih aktivnosti, fosfataze i peptidaze, na istom proteinu. Nema nikakvih indicija da ovi proteini sudjeluju u istom metaboličkom putu ili da jedan drugome reguliraju aktivnost. Hipoteza kamena iz Rosette (engl. *Rosetta stone hypothesis*) pretpostavlja da povezanost dviju domena u fuzijskom proteinu u jednom organizmu može biti indicija za njihovu interakciju u drugom organizmu¹⁸⁷. To bi s proteinima Nudix-DPP III mogao biti slučaj u bakterijama ili nekim eukariotskim mikroorganizmima, koji imaju homologe obaju domena. No rezultati sugeriraju ipak da je riječ o biljno-specifičnim proteinima.

Priprava *knock-out* mahovine, to jest mutanti bez ekspresije Nudix-DPP III proteina, omogućila je istraživanje fiziološke uloge ovog proteina. To je bio efikasan izbor, što zbog brzine priprave mutanti, što zbog jednostavnosti rada s mahovinom, koja ima samo nekoliko tipova tkiva, za razliku od viših biljaka. Ipak, jedina do sada identificirana razlika u odnosu na divlji tip jest promjena razine citokinina. Zanimljivo bi bilo napraviti metabolomičko istraživanje u kojem bi se istovremeno ispitivao velik broj spojeva, a ne jedan po jedan suspektan spoj. Također, bilo bi moguće peptidomskim pristupom pokušati utvrditi fiziološki supstrat DPP III domene proteina. U biljkama postoje peptidne signalne molekule^{188,189}, no nisam testirala aktivnost enzima na takvim spojevima.

Zaključno, metode korištene u radu omogućile su sagledavanje problema – nepoznate aktivnosti novog proteina - iz više aspekata i u konačnici su se skladno nadopunjavale.

§ 5. ZAKLJUČAK

Nudix-DPP III proteini očuvani su u infracarstvu *Streptophyta*, te ih je moguće naći u kopnenim biljkama (*Embryophyta*) i njihovim najbližim srodnicima, zelenim algama iz redova *Zygnematophyceae*, *Coleochaetophyceae*, *Charophyceae* i *Klebsormidiophyceae*.

DPP III domena Nudix-DPP III proteina u mahovine i uročnjaka pripada atipičnom ili tipu II DPP III, prema pentapeptidnom motivu aktivnog mjesta HEXXH, za razliku od tipičnog HEXXGH. DPP III tipa II nađene su i u bakterijama. DPP III dvaju tipova su međusobni paralozi.

Nudix domena proteina Nudix-DPP III ima homologe i među Nudix-hidrolazama i među izopentenil-difosfat-izomerazama. U njoj su očuvani bitni funkcionalni ostaci iz obje vrste enzima.

Na rekombinantnim proteinima biljaka *Physcomitrella patens* i *Arabidopsis thaliana* utvrđeno je postojanje dvojne hidrolazne aktivnosti: oba enzima djeluju i kao fosfataze i kao peptidaze. Enzimi nemaju izomeraznu aktivnost prema izopentenil-difosfatu.

Kao potencijalni fiziološki supstrat biljnih proteina Nudix-DPP III identificiran je izopentenil-difosfat, kao i njegov izomer dimetil-alil-difosfat. Produkt fosfatazne reakcije je izopentenil-fosfat, to jest, dimetil-alil-fosfat.

Pokazano je da ostatak Tyr123 u proteinu iz *P. patens* sudjeluje u enzimskoj katalizi reakcije fosfataze, vjerojatno u prepoznavanju izoprenoidnog dijela supstrata.

Dvije hidrolazne aktivnosti imaju odvojena aktivna mjesta, no analiza inaktivnih mutanti ukazuje da bi mogla postojati međuovisnost domena.

Ustanovljeno je da dolazi do promjene razine transkripta gena za Nudix-DPP III u mahovini prilikom tretmana natrijevim kloridom, apscizinskom kiselinom i vodikovim peroksidom, što sugerira ulogu enzima u uvjetima abiotskog stresa.

Pripremljene su mutante mahovine koje ne ekspimiraju protein Nudix-DPP III. Nije pronađena razlika u fenotipu između mutanti i divljeg tipa u standardnim uvjetima rasta, kao ni u uvjetima stresa u prisutnosti H₂O₂, NaCl, i apscizinske kiseline.

U mutantama je izmjerena dva puta povećana razina aktivnih formi citokinina izopentenil-adenina i *cis*-zeatina. To pokazuje da je protein Nudix-DPP III uključen u metabolizam biljnih hormona citokinina.

Sveukupno, bioinformatička, biokemijska i fiziološka istraživanja, kao i literaturni podaci, ukazuju da protein Nudix-DPP III u biljnim stanicama djeluje kao izopentenil-difosfat-fosfohidrolaza, što je predloženo kao ime za novopronađenu enzimsku aktivnost.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

Osim navedenih, korištene su i standardne troslovne i jednoslovne kratice za označavanje proteinogenih aminokiselina, prema nomenklaturi Međunarodne unije za čistu i primjenjenu kemiju (IUPAC) i Međunarodne unije za biokemiju i molekularnu biologiju (IUBMB).

1KP	baza podataka 1000 biljnih transkriptoma
2-NA	2-naftilamid
AACT	AcAc-CoA-tiolaza
ABA	apscizinska kiselina
AcCoA	acetil-koenzim A
AcAc-CoA	acetilacetil-koenzim A
AK	adenozin-kinaza
Ap ₄ A	diadenozin-tetrafosfat
Ap _n A	diadenozin-polifosfat
APRT	adnozin-fosforiboziltransferaza
APS	amonijev persulfat
Arg ₂ -2NA	diarginil-2-naftilamid
AT	amonijev tartarat; oznaka i za hranjivu podlogu s amonijevim tartaratom
ATG	hranjiva podloga s dodatkom amonijevog tartarata i glukoze
AtND	<i>Arabidopsis thaliana</i> Nudix-DPP III
AtNUDT/X	oznake za Nudix-hidrolaze iz uročnjaka, <i>Arabidopsis thaliana</i>
BLAST	engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTP	BLAST proteinskih sekvenci
BSA	goveđi serumski albumin, engl. <i>bovine serum albumine</i>
CDD	baza podataka <i>Conserved Domain Database</i>
cDNA	komplementarna DNA, engl. <i>complementary DNA</i>
CDP-ME	4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol
CDP-MEP	4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfat
CMK	CDP-ME-kinaza
CoA	koenzim A

cZ	<i>cis</i> -zeatin
DHNTF	dihidroneopterin-trifosfat
DHZ	dihidrozeatin
DIPP	difosfoinozitol-polifosfat
DMAP	dimetilalil-fosfat
DMAPP	dimetilalil-difosfat
DNaza	deoksiribonukleaza
DOXP	put sinteze 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfata, engl. <i>1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway</i>
DXP	1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat
DXR	DXP-reduktoizomeraza
DXS	DXP-sintaza
DPP III	dipeptidil-peptidaza III
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ESI	engl. <i>electrospray ionisation</i>
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FGFTNE	faktoru rasta fibroblasta slični Nudix enzimi, engl. <i>Fibroblast growth factor type Nudix Enzyme</i>
FMN	flavin-monomukleotid
FPP	farnezil-difosfat
FPPS	farnezil-difosfat-sintaza
G418	geneticin
GAP	D-gliceraldehid-3-fosfat
GGPP	geranilgeranil-difosfat
GPP	geranil-difosfat
HDR	HMBPP-reduktaza
HDS	HMBPP-sintaza
HDX	izmjena vodika i deuterija, engl. <i>hydrogen-deuterium exchange</i>
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]-etansulfonska kiselina
HMBPP	1-hidroksi-2-metil-2-(<i>E</i>)-butenil-4-difosfat
HMG-CoA	3-hidroksi-3metilglutaril-koenzim A
HMGR	HMG-CoA-reduktaza

HMGS	HMG-CoA-sintaza
HR	homologna regija
IAA	indol-3-octena kiselina
IDI	izopentenil-difosfat-izomeraza
IP	izopentenil-fosfat
iP	izopentenil-adenin
IPK	izopentenil-fosfat-kinaza
IPP	izopentenil-difosfat
IPT	adenozil-fosfat-izopenteniltransferaza
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
kDa	kilodalton, jedinica koja odgovara 1000 g mol^{-1} , preporučena od IUPAC-a
<i>knock-out</i>	mutanta s prekinutim genom, ili bez ekspresije pojedinog gena
<i>knock-in</i>	mutanta s ekspresijom heterolognog gena
KNOP	osnovna podloga za uzgoj mahovine
LC-MS/MS	tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskom masenom spektrometrijom
LOG	engl. <i>LONELY GUY</i> , citokinin-ribozid-monofosfat-fosforibohidrolaza
LWD	protein pigmentacije cvijeta (engl. <i>flower pigmentation protein</i>)
MCT	MEP-citidil-transferaza
MDD	mevalonat-difosfat-dekarboksilaza
ME	mikroelementi
MEcPP	2C-metil-D-eritritol-2,4-ciklodifosfat
MEP	2C-metil-D-eritritol-4-fosfat, također put sinteze metileritritol-fosfata, engl. <i>methylerythritol phosphate pathway</i>
MES	2-(<i>N</i> -morfolino)-etansulfonska kiselina
MDS	MEcPP-sintaza
MK	mevalonat-kinaza
MP	mevalonat-5-fosfat
MPP	mevalonat-5-difosfat
MRM	engl. <i>multiple reaction monitoring</i>
MVA	mevalonat, također put sinteze mevalonata, engl. <i>mevalonate pathway</i>
MVAPP	mevalonat-difosfat
NAD ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADH	reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid
NHEJ	nehomologno spajanje krajeva, engl. <i>non-homologous end-joining</i>
Nudix	akronim od nukleozid-difosfat vezan na neku skupinu X
8-oxo-dGTP	8-okso-2'-deoksigvanozin-5'-trifosfat
PAGE	poliakrilamidna gel-elektroforeza
PCR	lančana reakcija polimeraze, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDB	baza podataka <i>Protein Data Bank</i>
PEG	polietilen-glikol
PMD	fosfomevalonat-dekarboksilaza,
PMK	fosfomevalonat-kinaza
5-PP-InsP ₅	5-difosfoinozitol-pentakisfosfat
PpND	<i>Physcomitrella patens</i> Nudix-DPP III
PRPP	5-fosforibozil-1-pirofosfat, PRPP
PSI-BLAST	engl. <i>Position-Specific Iterated BLAST</i>
PVDF	polivinilidenfluorid
PVPP	polivinil-polipirolidon
Pyr	piruvat
qRT-PCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu, engl. <i>quantitative Real Time polymerase chain reaction</i>
RCA	rubisko-aktivaza, engl. <i>rubisco activase</i>
RNaza	ribonukleaza
RTaza	reverzna transkriptaza
SA	salicilna kiselina
SAXS	raspršenje rendgenskih zraka pod malim kutem, engl. <i>small angle X-ray scattering</i>
SDS	natrijev dodecil-sulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>
T-DNA	DNA unesena u genom, engl. <i>transfer-DNA</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamin
TPP	tiamin pirofosfat
tRNA-IPT	tRNA-izopenteniltransferaza
TTPCR	PCR reakcija s tri kalupa, engl. <i>triple-template PCR</i>
TUA	α -tubulin 1

tZ *trans*-zeatin

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. I. Jozić, Heterologna ekspresija i biokemijska karakterizacija novog proteina pretpostavljene peptidazne aktivnosti iz mahovine *Physcomitrella patens*, diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2012.
2. A. Xu, A. M. Desai, S. E. Brenner i J. F. Kirsch, *Anal. Biochem.* **437** (2013) 178–184.
3. I. Sućec, Utjecaj Nudix domene na peptidaznu aktivnost dipeptidil-peptidaze III iz mahovine *Physcomitrella patens*, rad za Rektorovu nagradu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
4. W. Frank, E. L. Decker i R. Reski, *Plant Biol.* **7** (2005) 220–227.
5. S. Ellis i J. M. Nuenke, *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 4623–4629.
6. A. J. Barrett i J. M. Chen, u N. D. Rawlings i G. S. Salvesen (ur.), *Handbook of proteolytic enzymes*, 3. izd, Elsevier, Amsterdam, 2013., str. 1285–1289.
7. A. Hromić-Jahjefendić, N. Jajčanin Jozić, S. Kazazić, M. Grabar Branilović, Z. Karačić, J. H. Schrittwieser, K. M. P. Das, M. Tomin, M. Oberer, K. Gruber i sur., *PLoS One* **12** (2017) e0188915.
8. I. Sabljčić, N. Meštrović, B. Vukelić, P. Macheroux, K. Gruber, M. Luić i M. Abramić, *PLoS One* **12** (2017) e0187295.
9. I. Sabljčić, M. Tomin, M. Matovina, I. Sućec, A. Tomašić Paić, A. Tomić, M. Abramić i S. Tomić, *PLoS One* **13** (2018) e0192488.
10. Y.-H. Li, T. Maeda, T. Yamane i I. Ohkubo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276** (2000) 553–558.
11. N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, T. Pavkov, P. Macheroux i M. Abramić, *Biochimie* **92** (2010) 89–96.
12. Z. Karačić, J. Špoljarić, M. Rožman i M. Abramić, *Biol. Chem.* **393** (2012) 1523–1532.
13. N. D. Rawlings i A. J. Barrett, *Nucleic Acids Res.* **36** (2008) D320–D325.
14. N. D. Rawlings, M. Waller, A. J. Barrett i A. Bateman, *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) D503–D509.
15. P. K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić i K. Gruber, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 22316–22324.
16. N. Cerdà-Costa i F. X. Gomis-Rüth, *Protein Sci.* **23** (2014) 123–144.
17. G. A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramić, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon i K. Gruber, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** (2012) 6525–6530.

18. P. Kumar, V. Reithofer, M. Reisinger, S. Wallner, T. Pavkov-Keller, P. Macheroux i K. Gruber, *Sci. Rep.* **6** (2016) 23787.
19. T. Xu, C. Xie, D. Yao, C.-Z. Zhou i J. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **494** (2017) 621–625.
20. F. X. Gomis-Rüth, T. O. Botelho i W. Bode, *BBA - Proteins Proteomics* **1824** (2012) 157–163.
21. M. Abramić, J. Špoljarić i Š. Šimaga, *Period. Biol.* **106** (2004) 161–168.
22. A. Tomić, B. Kovačević i S. Tomić, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18** (2016) 27245–27256.
23. M. Baršun, N. Jajčanin, B. Vukelić, J. Špoljarić i M. Abramić, *Biol. Chem.* **388** (2007) 343–348.
24. N. Cruz-Diaz, B. A. Wilson, N. T. Pirro, K. B. Brosnihan, A. C. Marshall i M. C. Chappell, *Peptides* **83** (2016) 29–37.
25. X. Pang, A. Shimizu, S. Kurita, D. P. Zankov, K. Takeuchi, M. Yasuda-Yamahara, S. Kume, T. Ishida i H. Ogita, *Hypertension* **68** (2016) 630–641.
26. B. E. Hast, D. Goldfarb, K. M. Mulvaney, M. A. Hast, P. F. Siesser, F. Yan, D. N. Hayes i M. B. Major, *Cancer Res.* **73** (2013) 2199–2210.
27. K. Lu, A. L. Alcivar, J. Ma, T. K. Foo, S. Zywea, A. Mahdi, Y. Huo, T. W. Kensler, M. L. Gatzka i B. Xia, *Cancer Res.* **77** (2017) 2881–2892.
28. S. Sobočanec, V. Filić, M. Matovina, D. Majhen, Ž. Mačak Šafranko, M. Popović-Hadžija, Ž. Krsnik, A. Gudan Kurilj, A. Šarić, M. Abramić i sur., *Redox Biol.* **8** (2016) 149–159.
29. M. J. Bessman, D. N. Frick, S. F. O’Handley, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 25059–25062.
30. J. R. Srouji, A. Xu, A. Park, J. F. Kirsch i S. E. Brenner, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **85** (2017) 775–811.
31. N. K. Fox, S. E. Brenner i J.-M. Chandonia, *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) D304–D309.
32. E. V. Koonin, *Nucleic Acids Res.* **21** (1993) 4847.
33. V. Anantharaman i L. Aravind, *Cell Cycle* **7** (2008) 1467–1472.
34. D. A. Rodionov, J. De Ingeniis, C. Mancini, F. Cimadamore, H. Zhang, A. L. Osterman i N. Raffaelli, *Nucleic Acids Res.* **36** (2008) 2047–2059.
35. B. Tóth, I. Iordanov i L. Csanády, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111** (2014) 16949–16954.
36. A. G. McLennan, *Cell. Mol. Life Sci.* **63** (2006) 123–143.
37. W. Xu, C. A. Dunn, S. F. O’Handley, D. L. Smith i M. J. Bessman, *J. Biol. Chem.* **281** (2006) 22794–22798.
38. J. Carreras-Puigvert, M. Zitnik, A.-S. Jemth, M. Carter, J. E. Unterlass, B. Hallström, O. Loseva, Z. Karem, J. M. Calderón-Montaño, C. Lindskog i sur., *Nat. Commun.* **8** (2017) 1541.
39. K. Yoshimura i S. Shigeoka, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79** (2015) 354–366.
40. A. G. McLennan, *Cell. Mol. Life Sci.* **70** (2013) 373–385.

41. A. M. Burroughs, S. Balaji, L. M. Iyer i L. Aravind, *Biol. Direct* **2** (2007) 18.
42. M. A. Massiah, V. Saraswat, H. F. Azurmendi i A. S. Mildvan, *Biochemistry* **42** (2003) 10140–10154.
43. A. S. Mildvan, Z. Xia, H. F. Azurmendi, V. Saraswat, P. M. Legler, M. A. Massiah, S. B. Gabelli, M. A. Bianchet, L. W. Kang i L. M. Amzel, *Arch. Biochem. Biophys.* **433** (2005) 129–143.
44. T. Ogawa, Y. Ueda, K. Yoshimura i S. Shigeoka, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 25277–25283.
45. E. Kraszewska, *Acta Biochim. Pol.* **55** (2008) 663–671.
46. D. Gunawardana, V. A. Likic i K. R. Gayler, *Comp. Funct. Genomics* **2009** (2009) 820381.
47. K. Chibani, S. Ali-Rachedi, C. Job, D. Job, M. Jullien i P. Grappin, *Plant Physiol.* **142** (2006) 1493–1510.
48. M.-K. Lin, Y.-J. Lee, T. J. Lough, B. S. Phinney i W. J. Lucas, *Mol. Cell. Proteomics* **8** (2009) 343–356.
49. S. Chivasa, D. F. A. Tomé, J. M. Hamilton i A. R. Slabas, *Mol. Cell. Proteomics* **10** (2011) M110.003905.
50. J. J. Petricka, M. A. Schauer, M. Megraw, N. W. Breakfield, J. W. Thompson, S. Georgiev, E. J. Soderblom, U. Ohler, M. A. Moseley, U. Grossniklaus i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** (2012) 6811–6818.
51. J. Baldrianová, M. Černý, J. Novák, P. L. Jedelský, E. Divíšková i B. Brzobohatý, *J. Proteomics* **120** (2015) 7–20.
52. I. Mostafa, N. Zhu, M. J. Yoo, K. M. Balmant, B. B. Misra, C. Dufresne, M. Abou-Hashem, S. Chen i M. El-Domiaty, *J. Proteomics* **138** (2016) 1–19.
53. M. Pyc, Y. Cai, S. K. Gidda, O. Yurchenko, S. Park, F. K. Kretschmar, T. Ischebeck, O. Valerius, G. H. Braus, K. D. Chapman i sur., *Plant J.* **92** (2017) 1182–1201.
54. L. Pauwels, G. F. Barbero, J. Geerinck, S. Tilleman, W. Grunewald, A. C. Pérez, J. M. Chico, R. Vanden Bossche, J. Sewell, E. Gil i sur., *Nature* **464** (2010) 788–791.
55. M. Guan i X. Li, C. Guan, *Plant Cell Rep.* **31** (2012) 929–943.
56. S. N. Hashida, T. Itami, H. Takahashi, K. Takahara, M. Nagano, M. Kawai-Yamada, K. Shoji, F. Goto, T. Yoshihara i H. Uchimiya, *J. Exp. Bot.* **61** (2010) 3813–3825.
57. L. T. Yang, Y. P. Qi, Y.-B. Lu, P. Guo, W. Sang, H. Feng, H. X. Zhang i L. S. Chen, *J. Proteomics* **93** (2013) 179–206.
58. G. Yuan, Z. Zhang, K. Xiang, Y. Shen, J. Du, H. Lin, L. Liu, M. Zhao i G. Pan, *Plant Mol. Biol. Report.* **31** (2013) 925–935.
59. H. Dortay, N. Gruhn, A. Pfeifer, M. Schwerdtner, T. Schmülling i A. Heyl, *J. Proteome Res.* **7** (2008) 3649–3660.

60. K. Berthelot, Y. Estevez, A. Deffieux i F. Peruch, *Biochimie* **94** (2012) 1621–1634.
61. C. N. Carrigan i C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 9008–9009.
62. S. Lee i C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 11545–11550.
63. C. Zhang, L. Liu, H. Xu, Z. Wei, Y. Wang, Y. Lin i W. Gong, *J. Mol. Biol.* **366** (2007) 1437–1446.
64. W. Zheng, F. Sun, M. Bartlam, X. Li, R. Li i Z. Rao, *J. Mol. Biol.* **366** (2007) 1447–1458.
65. J. Wouters, Y. Oudjama, S. J. Barkley, C. Tricot, V. Stalon, L. Droogmans i C. D. Poulter, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 11903–11908.
66. J. Wouters, Y. Oudjama, S. Ghosh, V. Stalon, L. Droogmans i E. Oldfield, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 3198–3199.
67. J. Wouters, Y. Oudjama, V. Stalon, L. Droogmans i C. D. Poulter, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **54** (2004) 216–221.
68. J. De Ruyck, V. Durisotti, Y. Oudjama i J. Wouters, *J. Biol. Chem.* **281** (2006) 17864–17869.
69. N. Gresh, N. Audiffren, J. P. Piquemal, J. De Ruyck, M. Ledecq i J. Wouters, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010) 4884–4895.
70. C. J. Thibodeaux i H. Liu, *Arch. Biochem. Biophys.* **632** (2017) 47–58.
71. A. Frank i M. Groll, *Chem. Rev.* **117** (2017) 5675–5703.
72. J. C. VanNice, D. A. Skaff, A. Keightley, J. K. Addo, G. J. Wyckoff i H. M. Mizioro, *J. Bacteriol.* **196** (2014) 1055–1063.
73. D. Tholl, u J. Schrader i J. Bowman (ur.) *Biotechnology of isoprenoids: Advances in biochemical engineering/biotechnology*, Vol. 148, Springer, 2015., str. 63–106.
74. A. Hemmerlin, J. L. Harwood i T. J. Bach, *Prog. Lipid Res.* **51** (2012) 95–148.
75. E. Vranová, D. Coman i W. Gruissem, *Annu. Rev. Plant Biol.* **64** (2013) 665–700.
76. L. K. Henry, M. Gutensohn, S. T. Thomas, J. P. Noel i N. Dudareva, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112** (2015) 10050–10055.
77. A. Lipko i E. Swiezewska, *Prog. Lipid Res.* **63** (2016) 70–92.
78. F. M. Hahn, A. P. Hurlburt i C. D. Poulter, *J. Bacteriol.* **181** (1999) 4499–4504.
79. J. A. Bick i B. M. Lange, *Arch. Biochem. Biophys.* **415** (2003) 146–154.
80. O. Laule, A. Furholz, H.-S. Chang, T. Zhu, X. Wang, P. B. Heifetz, W. Gruissem i M. Lange, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100** (2003) 6866–6871.
81. U. I. Flügge i W. Gao, *Plant Biol.* **7** (2005) 91–97.
82. D. Tarkowská i M. Strnad, *Planta* **247** (2018) 1051–1066.
83. H. Sakakibara, *Annu. Rev. Plant Biol.* **57** (2006) 431–449.
84. A. Bajguz i A. Piotrowska, *Phytochemistry* **70** (2009) 957–969.
85. I. Frébort, M. Kowalska, T. Hluska, J. Frébortová i P. Galuszka, *J. Exp. Bot.* **62** (2011) 2431–

- 2452.
86. A.-C. Lindner, D. Lang, M. Seifert, K. Podlešáková, O. Novák, M. Strnad, R. Reski i K. Von Schwartzberg, *J. Exp. Bot.* **65** (2014) 2533–2543.
87. D. W. Meinke, J. M. Cherry, C. Dean, S. D. Rounsley i M. Koornneef, *Science* **282** (1998) 662, 679–682.
88. C. Somerville i M. Koornneef, *Nat. Rev. Genet.* **3** (2002) 883–889.
89. Arabidopsis Genome Initiative, *Nature* **408** (2000) 796–815.
90. T. D. Niehaus, A. M. Thamm, V. de Crécy-Lagard i A. D. Hanson, *Plant Physiol.* **169** (2015) 1436–1442.
91. E. L. Decker, J. Parsons i R. Reski, *Front. Plant Sci.* **5** (2014) 346.
92. D. Lang, A. D. Zimmer, S. A. Rensing i R. Reski, *Trends Plant Sci.* **13** (2008) 542–549.
93. M. J. Prigge i M. Bezanilla, *Development* **137** (2010) 3535–3543.
94. D. Cove, *Annu. Rev. Genet.* **39** (2005) 339–358.
95. Y. Kamisugi, A. C. Cuming i D. J. Cove, *Nucleic Acids Res.* **33** (2005) e173.
96. S. A. Rensing, D. Lang, A. D. Zimmer, A. Terry, A. Salamov, H. Shapiro, T. Nishiyama, P.-F. Perroud, E. A. Lindquist, Y. Kamisugi i sur., *Science* **319** (2008) 64–69.
97. D. Lang, K. K. Ullrich, F. Murat, J. Fuchs, J. Jenkins, F. B. Haas, M. Piednoel, H. Gundlach, M. Van Bel, R. Meyberg i sur., *Plant J.* **93** (2018) 515–533.
98. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng i T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **25** (2004) 1605–1612.
99. A. Marchler-Bauer, Y. Bo, L. Han, J. He, C. J. Lanczycki, S. Lu, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, R. C. Geer, N. R. Gonzales i sur., *Nucleic Acids Res.* **45** (2017) D200–D203.
100. A. Mitchell, H. Y. Chang, L. Daugherty, M. Fraser, S. Hunter, R. Lopez, C. McAnulla, C. McMenamin, G. Nuka, S. Pesseat i sur., *Nucleic Acids Res.* **43** (2015) D213–D221.
101. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers i D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **215** (1990) 403–410.
102. S. Kumar, G. Stecher i K. Tamura, *Mol Biol Evol* **33** (2016) 1870–1874.
103. L. A. Kelley, S. Mezulis, C. Yates, M. Wass i M. Sternberg, *Nat. Protoc.* **10** (2015) 845–858.
104. N. S. Berrow, D. Alderton, S. Sainsbury, J. Nettleship, R. Assenberg, N. Rahman, D. I. Stuart i R. J. Owens, *Nucleic Acids Res.* **35** (2007) e45.
105. J. M. Itkonen, A. Urtti, L. E. Bird i S. Sarkhel, *BMC Biotechnol.* **14** (2014) 92.
106. U. K. Laemmli, *Nature* **227** (1970) 680–685.
107. S. Boivin, S. Kozak, G. Rasmussen, I. M. Nemtanu, V. Vieira i R. Meijers, *Methods* **95** (2016) 70–77.
108. I. Nagatsu, T. Nagatsu, T. Yamamoto, G. G. Glenner i J. W. Mehl, *Biochim. Biophys. Acta* **198**

- (1970) 255–270.
109. M. Nagata i I. Yamashita, *Soc. Food Sci. Technol. (Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi)* **39** (1992) 925–928.
110. R. Reski i W. O. Abel, *Planta* **165** (1985) 354–358.
111. A. Hohe, T. Egner, J. M. Lucht, H. Holtorf, C. Reinhard, G. Schween i R. Reski, *Curr. Genet.* **44** (2004) 339–347.
112. D. J. Cove, P.-F. Perroud, A. J. Charron, S. F. McDaniel, A. Khandelwal i R. S. Quatrano, *Cold Spring Harb. Protoc.* **4** (2009) 5136.
113. C. Strotbek, S. Krininger i W. Frank, *Int. J. Dev. Biol.* **57** (2013) 553–564.
114. D. J. Cove, P.-F. Perroud, A. J. Charron, S. F. McDaniel, A. Khandelwal i R. S. Quatrano, *Cold Spring Harb. Protoc.* **4** (2009) 5146.
115. E. G. E. Lang, S. J. Mueller, S. N. W. Hoernstein, J. Porankiewicz-Asplund, M. Vervliet-Scheebaum i R. Reski, *Plant Cell Rep.* **30** (2011) 205–215.
116. C. Schuessele, S. N. W. Hoernstein, S. J. Mueller, M. Rodriguez-Franco, T. Lorenz, D. Lang, G. L. Igloi i R. Reski, *New Phytol.* **209** (2016) 1014–1027.
117. M. W. Pfaffl, *Nucleic Acids Res.* **29** (2001) e45.
118. A. Hohe i R. Reski, *Plant Sci.* **163** (2002) 69–74.
119. I. Antoniadi, L. Plačková, B. Simonovik, K. Doležal, C. Turnbull, K. Ljung i O. Novák, *Plant Cell* **27** (2015) 1955–1967.
120. J. Svačinová, O. Novák, L. Plačková, R. Lenobel, J. Holík, M. Strnad i K. Doležal, *Plant Methods* **8** (2012) 17.
121. Z. Karačić, B. Vukelić, G. H. Ho, I. Jozić, I. Sućec, B. Salopek-Sondi, M. Kozlović, S. E. Brenner, J. Ludwig-Müller i M. Abramić, *Biol. Chem.* **398** (2017) 101–112.
122. A. Marchler-Bauer, M. K. Derbyshire, N. R. Gonzales, S. Lu, F. Chitsaz, L. Y. Geer, R. C. Geer, J. He, M. Gwadz, D. I. Hurwitz i sur., *Nucleic Acids Res.* **43** (2015) D222–D226.
123. R. E. Timme, T. R. Bachvaroff i C. F. Delwiche, *PLoS One* **7** (2012) e29696.
124. N. Matasci, L.-H. Hung, Z. Yan, E. J. Carpenter, N. J. Wickett, S. Mirarab, N. Nguyen, T. Warnow, S. Ayyampalayam, M. Barker i sur., *Gigascience* **3** (2014) 17.
125. K. Hori, F. Maruyama, T. Fujisawa, T. Togashi, N. Yamamoto, M. Seo, S. Sato, T. Yamada, H. Mori, N. Tajima i sur., *Nat. Commun.* **5** (2014) 3978.
126. N. J. Wickett, S. Mirarab, N. Nguyen, T. Warnow, E. Carpenter, N. Matasci, S. Ayyampalayam, M. S. Barker, J. G. Burleigh, M. A. Gitzendanner i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111** (2014) E4859–E4868.
127. J. de Vries, A. Stanton, J. M. Archibald i S. B. Gould, *Trends Plant Sci.* **21** (2016) 467–476.
128. C. Finet, R. E. Timme, C. F. Delwiche i F. Marlétaz, *Curr. Biol.* **20** (2010) 2217–2222.

129. W. M. Fitch, *Syst. Zool.* **19** (1970) 99–113.
130. W. M. Fitch, *Trends Genet.* **16** (2000) 227–231.
131. J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, J. Makarević, B. Vukelić, D. Agić, Š. Šimaga, N. Jajčanin-Jozić i M. Abramić, *Bioorg. Chem.* **37** (2009) 70–76.
132. A. Tomić i S. Tomić, *Dalt. Trans.* **43** (2014) 15503–15514.
133. A. Tomić, M. Abramić, J. Špoljarić, D. Agić, D. M. Smith i S. Tomić, *J. Mol. Recognit.* **24** (2011) 804–814.
134. B. Salopek-Sondi, B. Vukelić, J. Špoljarić, Š. Šimaga, D. Vujaklija, J. Makarević, N. Jajčanin i M. Abramić, *Biol. Chem.* **389** (2008) 163–167.
135. K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, H. Iwamoto, J. Hirose i M. Harada, *Biochemistry* **38** (1999) 8299–8303.
136. K. M. Fukasawa, J. Hirose, T. Hata i Y. Ono, *Biochim. Biophys. Acta* **1804** (2010) 2063–2069.
137. N. Jajčanin-Jozić i M. Abramić, *Biol. Chem.* **394** (2013) 767–771.
138. C. Mazzocco, J. Gillibert-Duplantier, V. Neaud, K. M. Fukasawa, S. Claverol, M. Bonneu i J. Puiroux, *FEBS J.* **273** (2006) 1056–1064.
139. J. Huang, J. Kim, P. Ramamurthy i T. H. D. Jones, *Exp. Mycol.* **16** (1992) 102–109.
140. J. R. Diaz, C. A. Ramírez, P. A. Nocua, F. Guzman, J. M. Requena i C. J. Puerta, *PLoS One* **13** (2018) e0190618.
141. Z. Karačić, Ž. Ban i P. Macheroux, *Curr. Top. Pept. Protein Res.* **18** (2017) 41–48.
142. B. Vukelić, B. Salopek-Sondi, J. Špoljarić, I. Sabljčić, N. Meštrović, D. Agić i M. Abramić, *Biol. Chem.* **393** (2012) 37–46.
143. J. Chun i F. A. Rainey, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64** (2014) 316–324.
144. Q. Zhou, X. Su i K. Ning, *Sci. Rep.* **4** (2014) 6957.
145. J.-L. Magnard, A. Rocchia, J.-C. Caissard, P. Vergne, P. Sun, R. Hecquet, A. Dubois, L. Hibrand-Saint Oyant, F. Jullien, F. Nicole i sur., *Science* **349** (2015) 81–83.
146. T. Hoshino i T. Eguchi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71** (2007) 2588–2591.
147. S. Matic, Z. Karačić, K. Gruber i S. Tomić, Combination of SAXS and molecular modelling in structure-function characterization of the plant DPP III orthologue, Nove Hrade, Češka, 2017., str. P6.
148. D. Jodha, P. Attri, T. P. Khaket i J. Singh, *Process Biochem.* **48** (2013) 730–737.
149. S. M. Kelly, T. J. Jess i N. C. Price, *Biochim. Biophys. Acta* **1751** (2005) 119–139.
150. Y. Hu, N. Peng, W. Han, Y. Mei, Z. Chen, X. Feng, Y. X. Liang i Q. She, *Biosci. Rep.* **32** (2012) 609–618.
151. M. Abramić, Z. Karačić, M. Šemanjski, B. Vukelić i N. Jajčanin-Jozić, *Biol. Chem.* **396** (2015) 359–366.

152. Y. Wang, C. Qiu, F. Zhang, B. Guo, Z. Miao, X. Sun i K. Tang, *Biosci. Rep.* **29** (2009) 111.
153. Z. Sun, E. Gantt i F. X. Cunningham, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 24349–24352.
154. Z. Sun, F. X. Cunningham i E. Gantt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95** (1998) 11482–11488.
155. S. Kajiwara, P. D. Fraser, K. Kondo i N. Misawa, *Biochem. J.* **342** (1997) 421–426.
156. F. X. Cunningham i E. Gantt, *Plant Cell Physiol.* **41** (2000) 119–123.
157. F. X. Cunningham i E. Gantt, *Photosynth. Res.* **92** (2007) 245–259.
158. M. Furubayashi, M. Ikezumi, J. Kajiwara, M. Iwasaki, A. Fujii, N. Li, K. Saito i D. Umeno, *PLoS One* **9** (2014) e93317.
159. X. Pan, M. Chen, Y. Liu, Q. Wang, L. Zeng, L. Li i Z. Liao, *DNA Seq. - J. DNA Seq. Mapp.* **19** (2008) 98–105.
160. Z. Liao, M. Chen, Y. Yang, C. Yang, Y. Fu, Q. Zhang i Q. Wang, *Biologia (Bratisl.)* **63** (2008) 221–226.
161. J. Sun, Y.-Y. Zhang, H. Liu, Z. Zou, C.-J. Zhang, X.-H. Zhang, H.-X. Li i Z.-B. Ye, *Plant Mol. Biol. Report.* **28** (2010) 473–480.
162. J. Sun, X.-X. Sun, P.-W. Tang i Q.-P. Yuan, *Biotechnol. Lett.* **34** (2012) 2077–2082.
163. Y. Gao, Y. Wu, Y. Xu, Z. Chen, H. Li, H. Yin, Z. Zeng i R. Chen, *J. Med. Plants Res.* **6** (2012) 3148–3155.
164. X. Zhang, H. Guan, Z. Dai, J. Guo, Y. Shen, G. Cui, W. Gao i L. Huang, *Molecules* **20** (2015) 20206–20218.
165. Z. X. Cheng, H. T. Hu, L. P. Cheng, C. C. Wang, W. D. Guo i L. Yang, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **90** (2015) 635–642.
166. Z. Li, J. Ji, G. Wang, T. L. Josine, J. Wu, J. Diao, W. Wu i C. Guan, *J. Plant Biochem. Biotechnol.* **25** (2016) 40–48.
167. K. Berthelot, Y. Estevez, M. Quiliano, P. A. Baldera-Aguayo, M. Zimic, A. Pribat, M.-E. Bakleh, E. Teyssier, P. Gallusci, C. Gardrat i sur., *Biochimie* **127** (2016) 133–143.
168. S. Sarabipour, C. King i K. Hristova, *Anal. Biochem.* **449** (2014) 155–157.
169. K. W. George, M. G. Thompson, A. Kang, E. Baidoo, G. Wang, L. J. G. Chan, P. D. Adams, C. J. Petzold, J. D. Keasling i T. Soon Lee, *Sci. Rep.* **5** (2015) 11128.
170. H. Liu, Y. Wang, Q. Tang, W. Kong, W.-J. Chung i T. Lu, *Microb. Cell Fact.* **13** (2014) 135.
171. S. T. Withers, S. S. Gottlieb, B. Lieu, J. D. Newman i J. D. Keasling, *Appl. Environ. Microbiol.* **73** (2007) 6277–6283.
172. H. H. Chou i J. D. Keasling, *Appl. Environ. Microbiol.* **78** (2012) 7849–7855.
173. V. N. Nguyen, A. Park, A. Xu, J. R. Srouji, S. E. Brenner i J. F. Kirsch, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **84** (2016) 1810–1822.
174. K. Kaneda, T. Kuzuyama, M. Takagi, Y. Hayakawa i H. Seto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

- 98 (2001) 932–937.
175. J. Park, M. Zielinski, A. Magder, Y. S. Tsantrizos i A. M. Berghuis, *Nat. Commun.* **8** (2017) 14132.
176. A. Bar-Even, E. Noor, Y. Savir, W. Liebermeister, D. Davidi, D. S. Tawfik i R. Milo, *Biochemistry* **50** (2011) 4402–4410.
177. E. T. Adams, L. K. Henry i N. Dudareva, The effect of an enhanced isopentenyl monophosphate pool on terpenoid biosynthesis *in vivo*, West Lafayette, 2016.
178. M. D. White, K. A. P. Payne, K. Fisher, S. A. Marshall, D. Parker, N. J. W. Rattray, D. K. Trivedi, R. Goodacre, S. E. J. Rigby, N. S. Scrutton i sur., *Nature* **522** (2015) 502–506.
179. H. Tanaka, T. Maruta, T. Ogawa, N. Tanabe, M. Tamoi, K. Yoshimura i S. Shigeoka, *J. Exp. Bot.* **66** (2015) 5797–5808.
180. P. Wang, A. N. . Khusnutdinova, F. Luo, J. Xiao, K. Nemr, R. Flick, G. Brown, R. Mahadevan, E. A. Edwards i A. F. Yakunin, *Cell Chem. Biol.* **25** (2018) 1–11.
181. S. Kazazić, Z. Karačić, I. Sabljčić, D. Agić, M. Tomin, M. Abramić, M. Dadlez, A. Tomić i S. Tomić, *RSC Adv.* **8** (2018), DOI 10.1039/c7ra13059g.
182. L. Saavedra, J. Svensson, V. Carballo, D. Izemendi, B. Welin i S. Vidal, *Plant J.* **45** (2006) 237–249.
183. C. Ortiz-Ramírez, M. Hernandez-Coronado, A. Thamm, B. Catarino, M. Wang, L. Dolan, J. A. Feijó i J. D. Becker, *Mol. Plant* **9** (2016) 205–220.
184. M. Schäfer, C. Brütting, I. D. Meza-Canales, D. K. Großkinsky, R. Vankova, I. T. Baldwin i S. Meldau, *J. Exp. Bot.* **66** (2015) 4873–4884.
185. M. Sabovljević, M. Vujičići A. Sabovljević, *Bot. Serbica* **38** (2014) 99–107.
186. M. Kamínek, *J. Plant Growth Regul.* **34** (2015) 723–739.
187. E. M. Marcotte, *Science* **285** (1999) 751–753.
188. I. A. Fesenko, G. P. Arapidi, A. Skripnikov, D. G. Alexeev, E. S. Kostryukova, A. I. Manolov, I. A. Altukhov, R. A. Khazigaleeva, A. V. Seredina, S. I. Kovalchuk i sur., *BMC Plant Biol.* **15** (2015) 87.
189. H. Fukuda i T. Higashiyama, *Plant Cell Physiol.* **52** (2011) 1–4.

§ 8. DODATAK

Dodaci su zbog opsega pohranjeni na CD mediju.

Dodatak 1: Sravnjenje 138 sekvenci proteina Nudix-DPP III za filogenetsku analizu, dokument D1-Nudix-DPP III-138.fasta

Dodatak 2: Sravnjenje 634 sekvenci proteina Nudix-DPP III gena za identifikaciju očuvanih aminokiselinskih ostataka, dokument D2-Nudix-DPP III-634.fasta.

Dodatak 3: Sravnjenje 88 sekvenci proteina DPP III gena za filogenetsku analizu, dokument D3-DPP III-88.fasta

§ 9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 2. rujna 1986. godine. Maturirala sam u zagrebačkoj XV. gimnaziji 2005. godine, te sam iste godine upisala preddiplomski studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2008. upisala sam istraživački smjer diplomskog studija kemije na istom fakultetu. Diplomirala sam 2010. pod neposrednim vodstvom dr. sc. Marije Abramić s temom „Uloga Cys176 i Cys509 u inaktivaciji ljudske dipeptidil-peptidaze III tiolnim reagensima“. Od 2012. zaposlena sam na Institutu Ruđer Bošković kao asistentica.

Do sada sam provela 6 mjeseci na usavršavanjima u inozemstvu: u Grazu (Austrija) na Institutu za molekularne bioznanosti Karl Franzens sveučilišta (5 tjedana 2011. i 9 dana 2012.) i na Institutu za biokemiju Tehničkog sveučilišta u Grazu (1 mjesec, 2016.), u Dresdenu (Njemačka) na Institutu za botaniku Tehničkog sveučilišta u Dresdenu (6 tjedana, 2013.), te u Freiburgu (Njemačka) na Biološkom fakultetu Sveučilišta u Freiburgu provodeći projekt „Investigation of function of dipeptidyl peptidases III in moss *Physcomitrella patens* using targeted gene knock-outs“ financiran stipendijom „FEBS Short-Term Fellowship“ (2 mjeseca, 2015.). Sudjelovala sam na tri hrvatsko-austrijska bilateralna projekta („Odnos strukture i funkcije metalo-peptidaza porodice M49“, „Raznolikost metalopeptidaza porodice M49“, „Interdisciplinarni pristup proučavanju strukture i dinamike atipičnih dipeptidil peptidaza III“), na međunarodnom projektu „Study of plant metallopeptidase families M20 and M49“ koji je financirala zaklada Alexander von Humboldt, te na projektu „Povezanost fleksibilnosti, aktivnosti i strukture u porodici dipeptidil-peptidaza III“ financiranom od Hrvatske zaklade za znanost. Bila sam neposredna voditeljica studentici Ivi Sućec prilikom izrade rada „Utjecaj Nudix domene na peptidaznu aktivnost dipeptidil-peptidaze III iz mahovine *Physcomitrella patens*“ prijavljenog za Rektorovu nagradu 2016. godine.

Uključena sam u popularizaciju znanosti sudjelovanjem u organizaciji znanstvenog kviza, koji je prerastao u „Ruđerov znanstveni kviz“ na Otvorenim danima Instituta Ruđer Bošković. Također sam organizirala punkt „Razigrani proteini“ na Otvorenom danu Instituta 2016., kao i radionice zaklade „Znanje na djelu“ (od 2016. do 2018.) s temom purifikacije proteina za srednjoškolske nastavnike i učenike.

Znanstveni radovi u časopisima

1. T. Šmidlehner, Z. Karačić, S. Tomić, C. Schmuck, I. Piantanida, Fluorescent cyanine-guanidiniocarbonyl-pyrrole conjugate with pH-dependent DNA/RNA recognition and DPP III fluorescent labelling and inhibition properties. *Monatsh. Chem.* (2018) rad u postupku objavljivanja
2. S. Kazazić, Z. Karačić, I. Sabljčić, D. Agić, M. Tomin, M. Abramić, M. Dadlez, A. Tomić i S. Tomić, Conservation of the conformational dynamics and ligand binding within M49 enzyme family. *RSC Advances* **8** (2018) 13310-13322.
3. Z. Karačić, Ž. Ban i P. Macheroux, A novel member of the dipeptidyl peptidase III family from *Armillariella tabescens*. *Current Topics in Peptide & Protein Research* **18** (2017) 41-48.
4. A. Hromić-Jahjefendić, N. Jajčanin Jozić, S. Kazazić, M. Grabar Branilović, Z. Karačić, J. H. Schrittwieser, K. M. P. Das, M. Tomin, M. Oberer, K. Gruber, M. Abramić i S. Tomić, A novel *Porphyrromonas gingivalis* enzyme: An atypical dipeptidyl peptidase III with an ARM repeat domain. *PLoS One* **12** (2017) e0188915.
5. M. Matovina, D. Agić, M. Abramić, S. Matić, Z. Karačić i S. Tomić, New findings about human dipeptidyl peptidase III based on mutations found in cancer. *RSC Advances* **7** (2017) 36326-36334.
6. Z. Karačić, B. Vukelić, G. H. Ho, I. Jozić, I. Sućec, B. Salopek-Sondi, M. Kozlović, S. E. Brenner, J. Ludwig-Müller i M. Abramić, A novel plant enzyme with dual activity: an atypical Nudix hydrolase and a dipeptidyl peptidase III. *Biological chemistry* **398** (2017) 101-112.
7. D. Agić, H. Brkić, S. Tomić, Z. Karačić, M. Špoljarević, M. Lisjak, D. Bešlo i M. Abramić, Validation of flavonoids as potential dipeptidyl peptidase III inhibitors: experimental and computational approach. *Chemical biology & drug design* **89** (2017) 619-627.
8. M. Gundić, A. Tomić, R. C. Wade, M. Matovina, Z. Karačić, S. Kazazić i S. Tomić, Human DPP III – Keap1 Interactions: A Combined Experimental and Computational study. *Croatica chemica acta* **89** (2016) 217-228.
9. M. Abramić, Z. Karačić, M. Šemanjski, B. Vukelić i N. Jajčanin-Jozic, Aspartate 496 from the subsite S2 drives specificity of human dipeptidyl peptidase III. *Biological chemistry* **396** (2015) 359-366.
10. Z. Karačić, J. Špoljarić, M. Rožman i M. Abramić, Molecular determinants of human dipeptidyl peptidase III sensitivity to thiol modifying reagents. *Biological chemistry* **393** (2012) 1523-1532.

Priopćenja znanstvenim skupovima

1. Z. Karačić, I. Pavlović, O. Novák, B. Salopek Sondi, Izopentenil-difosfat-fosfohidrolaza: novi enzim metabolizma izoprenoida u biljaka?, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, 2018, Knjiga sažetaka str. 7.
2. S. Matic, Z. Karačić, K. Gruber, S. Tomić, Combination of SAXS and molecular modeling in structure-function characterization of the plant DPP III orthologue, 7th Visegrad symposium on structural systems biology, Nove Hrade, Češka, 2017, Program & abstracts str. P6.
3. S. Tomić, B. Kovačević, A. Tomić, M. Matovina, Z. Karačić, S. Matic, M. Abramić, D. Agić, Understanding h.DPP III mechanism – an aid in rationalization of the mutants (in)activity, 19th IUPAB and 11th EBSA Congress, Edinburgh, Škotska, 2017, European Biophysics Journal, Volume 46, Supplement 1, str. S179
4. S. Tomić, S. Kazazić, M. Abramić, M. Tomin, D. Agić, Z. Karačić, M. Grabar-Branilović, H/D exchange and MD simulation study of dipeptidyl peptidase III intrinsic dynamics and ligand binding, 19th IUPAB and 11th EBSA Congress, Edinburgh, Škotska, 2017, European Biophysics Journal 2017, Volume 46, Supplement 1, str. S179.
5. Z. Karačić, I. Jozić, B. Vukelić, M. Kozlović, B. Salopek Sondi, M. Abramić, Karakterizacija biljnih dipeptidil-peptidaza III s potencijalnom dualnom aktivnošću, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, 2016, Knjiga sažetaka str. 46-47.
6. Z. Karačić, B. Vukelić, G. H. Ho, I. Jozić, I. Sućec, B. Salopek-Sondi, M. Kozlović, S. E. Brenner, J. Ludwig-Müller, M. Abramić, A bifunctional plant enzyme: an isopentenyl diphosphate hydrolase fused to a dipeptidyl peptidase III, Novel enzymes, Groningen, Nizozemska, 2016, Book of abstracts str. 92.
7. Z. Karačić, M. Abramić, Characterization of plant dipeptidyl-peptidases III from *Physcomitrella patens* and *Arabidopsis thaliana*, FEBS3+ Meeting "Molecules of Life". Ljubljana, Slovenija, 2015, Book of abstracts str. 138.
8. Z. Karačić, J. Špoljarić, M. Rožman, M. Abramić, Molecular basis of human dipeptidyl peptidase III susceptibility to sulfhydryl reagents, 6th Central Europe Conference - Chemistry towards Biology, Trst, Italija, 2013, Book of abstracts str. P18.