

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno - matematički fakultet**  
**Kemijski odsjek**

**MAJA ŠEMANJSKI**

**Aspartat 496 u podmjestu S2 određuje supstratnu  
specifičnost ljudske dipeptidil-peptidaze III**

*Zagreb, 2013.*

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za celularnu biokemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta „Ruđer Bošković“ pod vodstvom dr. sc. Marije Abramić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2012. / 2013. (komentorica: dr. sc. Ita Gruić-Sovulj).

## Popis kratica

amp	ampicilin
APS	amonijev persulfat
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CD	cirkularni dikroizam
cDNA	komplementarna DNA
DNaza I	deoksiribonukleaza I
DPP III	dipeptidil-peptidaza III
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
FBB	Fast Blue BN sol
hDPP III	ljudska dipeptidil-peptidaza III
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid
LB	Lauria-Bertani
NA	naftilamid
NTA	nitrilotrioctena kiselina
PCR	lančana reakcija polimeraze (eng. <i>polymerase chain reaction</i> )
PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (eng. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SDS	natrijev dodecilsulfat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamin
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
yDPP III	kvaščeva dipeptidil-peptidaza III

# SADRŽAJ RADA

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Cilj istraživanja.....	1
<b>2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>3</b>
2.1. Peptidaze.....	3
2.2. Metalopeptidaze .....	4
2.3. Dipeptidil-peptidaza III .....	4
2.3.1. Otkriće i fiziološki značaj .....	4
2.3.2. Biokemijska svojstva .....	6
2.3.3. Strukturna obilježja.....	7
2.4. Podmjesti enzima u veznom mjestu supstrata .....	14
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>15</b>
3.1. Materijali .....	15
3.1.1. Standardne kemikalije.....	15
3.1.2. Boje.....	15
3.1.3. Enzimi .....	15
3.1.4. Sastojci hranjivih podloga i medija.....	15
3.1.5. Punilo za kromatografsku kolonu .....	15
3.1.6. Komercijalni kompleti .....	16
3.1.7. Bakterijski sojevi .....	16
3.1.8. Plazmidi .....	16
3.1.9. Hranjive podloge i mediji .....	17
3.1.10. Oprema i uređaji .....	17
3.2. Metode rekombinantne DNA .....	18
3.2.1. Ciljana mutageneza.....	18
3.2.2. Uzgoj bakterijskih kultura .....	19
3.2.3. Izolacija plazmida .....	20
3.2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu .....	20
3.2.5. Transformacija kompetentnih stanica BL21-CodonPlus(DE3)RIL elektroporacijom .....	20
3.3. Metode rada s proteinima .....	21
3.3.1. Indukcija prekomjerne ekspresije proteina .....	21
3.3.2. Priprema lizata bakterijskih stanica .....	21
3.3.3. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na Ni <sup>2+</sup> -NTA agarozu .....	22
3.3.4. Odsoljavanje proteina gel-filtracijom .....	23
3.3.5. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	24
3.3.6. Određivanje peptidazne aktivnosti.....	24

3.3.7. Elektroforeza proteina u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE) .....	25
3.3.8. Određivanje kinetičkih parametara (kinetika ustaljenog stanja).....	26
3.3.9. Cirkularni dikroizam.....	27
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>28</b>
4.1. Priprema mutiranih oblika D496G i S504G hDPP III.....	28
4.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje rekombinantnih proteina .....	29
4.3. Specifična aktivnost divljeg tipa i mutanata hDPP III-His <sub>6</sub> .....	31
4.4. Utjecaj pH i koncentracije iona Co <sup>2+</sup> na aktivnost .....	32
4.5. Kinetička karakterizacija mutanata i divljeg tipa hDPP III.....	33
4.6. Usporedba sekundarne strukture mutanata i divljeg tipa hDPP III .....	36
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>37</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>42</b>
<b>7. ZAHVALE.....</b>	<b>43</b>
<b>8. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>44</b>
<b>9. SAŽETAK .....</b>	<b>47</b>
<b>10. SUMMARY .....</b>	<b>49</b>
<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>51</b>

# 1. Uvod

Ljudska dipeptidil-peptidaza III (DPP III) je cink-ovisna egzopeptidaza, član obitelji M49 metalopeptidaza, koja hidrolizira dipeptide s N-kraja peptida duljine 3 do 10 aminokiselina. Ovaj proteolitički enzim uključen je u unutarstaničnu razgradnju proteina i obranu od oksidativnog stresa. Primarna struktura DPP III sadrži jedinstven heksapeptidni motiv <sup>450</sup>HEXXGH<sup>455</sup> čiji su aminokiselinski ostaci dio katalitički aktivnog mjesta i sudjeluju u koordinaciji iona Zn<sup>2+</sup>. U trodimenzionalnoj strukturi DPP III uočavaju se dvije domene i velik procijep između njih u kojem se nalazi vezno mjesto supstrata u blizini katalitičkog iona Zn<sup>2+</sup>. Iako je DPP III relativno nespecifična obzirom na duljinu i aminokiselinski slijed peptidnih supstrata, ona odcjepljuje točno dva aminokiselinska ostatka s N-kraja peptida. Takva specifičnost ovog enzima najvjerojatnije proizlazi iz karakterističnog načina vezanja supstrata što može utjecati i na brzinu hidrolize. Općenito je supstratna specifičnost peptidaza određena oblikom i svojstvima odgovarajućih podmjesta u veznom mjestu supstrata u koje se smještaju bočni ogranci aminokiselina peptidnog supstrata. Pretpostavlja se da najveći utjecaj na dipeptidil-peptidaznu aktivnost DPP III ima vezanje N-kraja peptida na određenu udaljenost od iona Zn<sup>2+</sup>, koji mora pozicionirati kisik karbonilne skupine peptidne veze sljedeće aminokiseline peptida da bi se dogodila hidroliza. Budući da aminokiselini na N-kraju supstrata odgovara S2 podmjesto ovog enzima, ono bi moglo imati vrlo važnu ulogu u supstratnoj specifičnosti DPP III.

## 1.1. Cilj istraživanja

Kinetičkim ispitivanjima pripadnika iste porodice enzima (M49) uočena je značajna razlika u selektivnosti prema dipeptidil-arilamidnim supstratima i u katalitičkoj efikasnosti između ljudske i kvaščeve DPP III, sa 620 puta većom konstantom specifičnosti ( $k_{cat}/K_m$ ) ljudskog ortologa u reakciji hidrolize Arg-Arg-2-naftilamida. Znatno veća efikasnost ljudske DPP III vidljiva je i na razini specifične aktivnosti, međutim, strukturna podloga ovakve razlike još uvijek nije poznata. Iz tog se razloga pristupilo utvrđivanju strukturne osnove uočene selektivnosti i razlike u aktivnosti, a istraživanje je bilo usmjereno na ljudsku DPP III. Nedavno objavljena kristalna struktura kompleksa ljudske DPP III s ligandom pentapeptidom otkrila je aminokiseline koje grade S2-S3' podmjesto enzima. Koristeći se ovim rezultatom, one su uspoređene s odgovarajućim aminokiselinskim ostacima u kvaščevom enzimu putem sravnjenja aminokiselinskih sljedova ljudske i kvaščeve DPP III. Time je ustanovljena

značajna očuvanost aminokiselina koje čine vezno mjesto supstrata i uočena razlika od samo dvije aminokiseline od ukupno 13 aminokiselinskih ostataka u podmjestu S2. Riječ je o Asp496 i Ser504 u ljudskoj DPP III, odnosno Gly505 i Gly513 u kvašćevom enzimu. Opći cilj ovog rada bio je odrediti ulogu dviju navedenih aminokiselina u vezanju supstrata te u supstratnoj specifičnosti i aktivnosti DPP III. U tu svrhu priređeni su mutanti Asp496Gly (D496G) i Ser504Gly (S504G) ljudske DPP III uz pretpostavku da će se zamjenom odgovarajućih aminokiselina u ljudskom enzimu postići značajna promjena u selektivnosti i aktivnosti (katalitičkoj efikasnosti) po iznosu slična kvašćevom homologu. Pročišćenim mutiranim oblicima ljudske DPP III određena su katalitička svojstva i uspoređena s divljim tipom enzima. Korištene metode uključuju ciljanu mutagenezu, heterolognu inducibilnu prekomjernu ekspresiju proteina, pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom, elektroforezu na agaroznom i poliakrilamidnom gelu, spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina i peptidazne aktivnosti, fluorimetrijsko određivanje početnih brzina (kinetičkih parametara) enzimski katalizirane reakcije te mjerenje cirkularnog dikroizma proteina.

## 2. Literaturni pregled

### 2.1. Peptidaze

Peptidaze su skupina hidrolitičkih enzima koji hidroliziraju peptidne veze peptida i proteina. Nazivaju se još i proteazama ili proteolitičkim enzimima<sup>1</sup>. Ovi enzimi sudjeluju u mnogim važnim fiziološkim procesima poput probave, razgradnje oštećenih proteina u stanici, diferencijacije stanica, upalnih procesa, zgrušavanja krvi, regulacije imunog odgovora i razine peptidnih hormona.

U klasifikaciji enzima prema Međunarodnoj uniji za biokemiju i molekularnu biologiju (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB*) peptidaze se nalaze u klasi hidrolaza. Pridružena im je oznaka EC 3.4. gdje EC stoji za *Enzyme Commission*, 3 za klasu hidrolaza, a 4 za podklasu peptidaza. Treći broj predstavlja podpodklasu, a četvrti serijski broj pojedinog enzima.

Obzirom na mjesto hidrolize, razlikuju se egzopeptidaze, koje odcjepljuju jednu ili nekoliko aminokiselina s N- ili C-kraja polipeptidnog lanca, i endopeptidaze koje cijepaju unutar lanca. Egzopeptidaze koje djeluju na slobodni N-kraj oslobađaju jedan aminokiselinski ostatak (aminopeptidaze), dipeptid ili tripeptid (dipeptidil-peptidaze i tripeptidil-peptidaze). One koje djeluju na C-kraj oslobađaju jedan ostatak (karboksipeptidaze) ili dipeptid (peptidil-dipeptidaze). Peptidaze su klasificirane prema katalitičkom tipu kojeg čine kemijske skupine odgovorne za katalizu. Razlikujemo sedam katalitičkih tipova peptidaza: aspartatne (A), cisteinske (C), glutamatne (G), metalo (M), serinske (S), treoninske (T) i još uvijek neklasificirane peptidaze (U)<sup>1</sup>. Unutar katalitičkog tipa peptidaze se dijele na klanove i obitelji. Klan sadrži obitelji koje potječu od istog pretka na temelju homologije na razini trodimenzionalne strukture. Obitelj čine peptidaze sa statistički značajno sličnim primarnim strukturama. Ovaj hijerarhijski sustav podijele primijenjen je u bazi podataka peptidaza *MEROPS* (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Svaka peptidaza u toj bazi ima jedinstvenu oznaku koja se sastoji od dva dijela odvojena zarezom. Prvi dio označava ime obitelji (npr. „M10“), a drugo serijski broj (npr. M10.001).



## 2.2. Metalopeptidaze

Metalopeptidaze čine skupinu proteolitičkih enzima koji u katalitički aktivnom mjestu imaju dvovalentni metalni ion. Sekvenciranjem ljudskog genoma ustanovljeno je da 194 gena kodira metalopeptidaze i da su one najveća skupina enzima proteolitičkog sustava<sup>2</sup>. Metalopeptidaze su svrstane u 67 obitelji i 16 klanova. Strukture metalopeptidaza su vrlo raznolike.

Najčešći metalni ion u aktivnom mjestu metalopeptidaza je ion cinka, no ponekad to može biti i ion kobalta, mangana, nikla ili bakra. Prema broju iona metala potrebnih za katalizu, metalopeptidaze možemo podijeliti u dvije velike skupine: prvu, koja zahtijeva jedan ion cinka i drugu, koju čine metalopeptidaze u kojima dva iona metala djeluju zajedno kokatalitički. Metalni ion obično je koordiniran bočnim ograncima tri aminokiseline i molekulom vode. Najčešći bočni ogranci koji koordiniraju metalni ion su His, Glu, Asp i Lys. Osim iona metala i ostataka koji ga vežu, za katalitičku aktivnost metalopeptidaza je potreban barem još jedan aminokiselinski ostatak, a najčešće je riječ o bočnom ogranku Glu. Velik broj poznatih metalopeptidaza sadrži motiv His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH) koji čini dio veznog mjesta metalnog iona. Ovaj motiv osigurava dvije (dva ostatka histidina) od tri aminokiseline koje služe kao ligandi u koordinaciji metalnog iona, najčešće cinka<sup>3</sup>.

Obitelj dipeptidil-peptidaze III je obitelj metalopeptidaza koju odlikuje, uz sličnost primarnih struktura njezinih članova, i jedinstven motiv aktivnog mjesta HEXXXH<sup>3</sup>. U bazi podataka *MEROPS* obitelj dipeptil-peptidaze III imenovana je također i kao „obitelj peptidaza M49“.

## 2.3. Dipeptidil-peptidaza III

### 2.3.1. Otkriće i fiziološki značaj

Dipeptidil-peptidaza III (DPP III; EC 3.4.14.4; M49.001.) je proteolitički enzim čija je aktivnost ovisna o ionu cinka, a hidrolizira dipeptide s N-kraja peptida duljine 3 do 10 aminokiselina<sup>2</sup>. Prvi je put izolirana iz prednjeg režnja goveđe hipofize 1967. godine i identificirana pomoću reakcije hidrolize nesupstituiranih dipeptidil-2-naftilamida kao treća po redu od dipeptidil-arilamidaza<sup>4</sup>. Ustanovljeno je da od velikog raspona dipeptil-2-naftilamidnih supstrata značajno hidrolizira samo Arg-Arg-2-naftilamid. 1992. godine ime joj je promijenjeno u *dipeptidil-peptidaza III*. Zbog sklonosti da *in vitro* hidrolizira različite

bioaktivne peptide, DPP III je u literaturi nazivana različitim imenima: *enkefalinaza B*, *angiotenzinaza* i *dipeptidil-aminopeptidaza III*.

DPP III je pročišćena i biokemijski okarakterizirana iz ljudske posteljice, leće i eritrocita i nekih drugih tkiva sisavaca poput mozga zamorca, svinjskih skeletnih mišića te iz mozga, jetre i eritrocita štakora<sup>2</sup>. Ovaj enzim izoliran je iz nekih nižih eukariota poput pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, vinske mušice *Drosophila melanogaster* i sluzave plijesni *Dictyostelium discoideum*, a u najnovije vrijeme opisana su svojstva DPP III iz bakterije *Bacteroides thetaiotaomicron*. Višestruko sravnjenje aminokiselinskih sljedova eukariotskih DPP III pokazuje veliku sličnost (identičnost veća od 90 %) između ljudske, štakorske i mišje DPP III, dok ovi enzimi dijele samo ~40 % identičnosti sljedova s kvaščevom DPP III<sup>3</sup>.

Na temelju pročišćavanja i karakterizacije DPP III iz topljivih frakcija homogenata tkiva sisavaca, DPP III je opisana kao citosolna peptidaza što je potvrđeno odsutnošću signalnog peptida u primarnoj strukturi ljudske DPP III. Međutim, nekoliko je studija ukazalo na asocijaciju DPP III s membranom stanica sisavaca. Nedavno je DPP III izolirana iz membranskih struktura mišjeg mozga tzv. lipidnih splavi (eng. *lipid rafts*) i to kod normalnih (kontrolnih) miševa i kod mišjeg modela Alzheimerove bolesti, što upućuje na lokalizaciju ovog enzima u membrani. Mehanizam usmjeravanja ove citosolne peptidaze u membranu još uvijek nije poznat<sup>5</sup>.

Obzirom na širok raspon organizama i tkiva u kojima se nalazi, DPP III je sveprisutna peptidaza od velikog biološkog značaja, ne samo u unutarstaničnom katabolizmu proteina već i u regulatornim procesima. Široka rasprostranjenost u različitim tkivima i potencijal odgradnje raznolikih oligopeptida potvrđuje sudjelovanje DPP III u katabolizmu unutarstaničnih peptida. Stanični proteini predviđeni za eliminaciju razgrađuju se pomoću ubikvitin-proteasomskog puta na peptide duljine 3 do 24 aminokiseline, koji se oslobađaju u citosol gdje na njih može djelovati niz citosolnih peptidaza. Peptidi veći od 16 aminokiselina razgrađuju se tripeptidil-peptidazom II (TPP II), a za peptide veličine 6 do 17 ostataka pretpostavlja se da su supstrati timet-oligopeptidaze (TOP). Tako nastali kraći peptidi potpuno se hidroliziraju različitim aminopeptidazama u čemu sudjeluje i DPP III<sup>2</sup>. Suprotno od ograničenog djelovanja na dipeptidil-arilamidne supstrate, DPP III pokazuje široku specifičnost prema oligopeptidima sekvencijalno uklanjajući dipetide. Tetrapeptidi su znatno bolji supstrati od tripeptida. Primjeri oligopeptida s manje od 10 ostataka koje DPP III uspješno hidrolizira su angiotenzin II i III, Leu-enkefalin, Met-enkefalin, proktolin,

endomorfina-1. DPP III se, dakle, može opisati kao oligopeptidaza koja preferira supstrate veličine 4 do 8 aminokiselina.

Osim kratkih peptida nastalih razgradnjom proteina, u stanicama i vanstaničnim tekućinama postoje brojni bioaktivni peptidi koji sadrže manje od 10 aminokiselinskih ostataka, a uključeni su u različite funkcije poput prijenosa signala, regulacije boli, regulacije krvnog tlaka, reprodukcije i sl. U takve se peptide ubrajaju opioidni peptidi (enkefalini, endorfini, dinorfini i endomorfini) i angiotenzini. Budući da su neki od ovih opioidnih neuropeptida kolokalizirani s DPP III, te da je povećana koncentracija ovog enzima nađena u strukturi leđne moždine uključenoj u procesiranje signala boli, smatra se da DPP III ima ulogu u sustavu regulacije boli u sisavaca<sup>6</sup>.

DPP III je prekomjerno eksprimirana u tumorima jajnika čija je agresivnost povezana s povećanom aktivnosti ovog enzima<sup>7</sup>. Ovo svojstvo može se iskoristiti u pronalasku tumorskih stanica pomoću DPP III kao tumorskog biomarkera. Nadalje, otkrivena je uloga DPP III kod sisavaca u endogenom mehanizmu obrane organizma od oksidativnog stresa<sup>2</sup>. Oksidativni stres povezan je s translokacijom nuklearnog faktora Nrf2 što rezultira aktivacijom gena koji kodiraju antioksidacijske enzime. Ti enzimi sudjeluju u obrani organizma protiv oksidacijskog stresa. Povišena količina DPP III pospješuje otpuštanje faktora Nrf2 iz kompleksa s proteinom Keap 1 i migraciju gdje se ovaj faktor veže na regulatorni element ARE (eng. *antioxidant response elements*) na promotoru potičući ekspresiju antioksidacijskih enzima. Sva navedena saznanja čine DPP III potencijalnom metom u dizajnu lijekova, odnosno u sintezi inhibitora.

### 2.3.2. Biokemijska svojstva

Biokemijska svojstva DPP III iz viših organizama dobro su proučena. DPP III iz tkiva sisavaca monomerni je protein veličine 82-84 kDa s izoelektričnom točkom blizu pH 4,5. Pokazano je da sadrži 1 mol iona cinka po molu proteina pri fiziološkom pH (7,4), te da ioni kobalta značajno povećavaju njegovu aktivnost. Osim  $\text{Co}^{2+}$  i drugi dvovalentni metalni ioni doprinose aktivnosti DPP III redom  $\text{Co}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ . Svi ovi metalni kationi osim  $\text{Sr}^{2+}$  i  $\text{Ba}^{2+}$  mogu povratiti aktivnost enzima inhibiranog s EDTA pri čemu je  $\text{Co}^{2+}$  najefikasniji. Stimulacija aktivnosti metalnim ionima proizlazi iz interakcije s aminokiselinskim ostacima uključenim u postizanje aktivne konformacije enzima. Uz to, dodani metalni ion može zauzeti mjesto iona  $\text{Zn}^{2+}$  u aktivnom mjestu enzima. Budući da je DPP III metalopeptidaza, ona je snažno inhibirana kelirajućim reagensima (EDTA, EGTA,

1,10-fenantrolin) koji vežu  $Zn^{2+}$  iz aktivnog mjesta. Visoke koncentracije metalnih kationa  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  i  $Hg^{2+}$ , koji reagiraju sa sulfhidrilnim skupinama cisteina ili hidroksilnim skupinama drugih aminokiselina, također djeluju inhibitorno.

Karakteristična za DPP III je i inhibicija inhibitorima cisteinskih proteaza poput tiolnih reagenasa (*p*-kloromerkuribenzojeve kiseline, pCMB; *p*-kloromerkurifenilsulfata, pCMS), N-etilmaleimida (NEM), Ellmanovog reagensa (5,5'-ditiobis-(2-nitroenzojeva kiselina)), koja je upućivala je na važnu ulogu cisteinskih ostataka u katalizi<sup>2</sup>. Naknadno je potvrđena važnost cisteina za vezanje supstrata<sup>8</sup>.

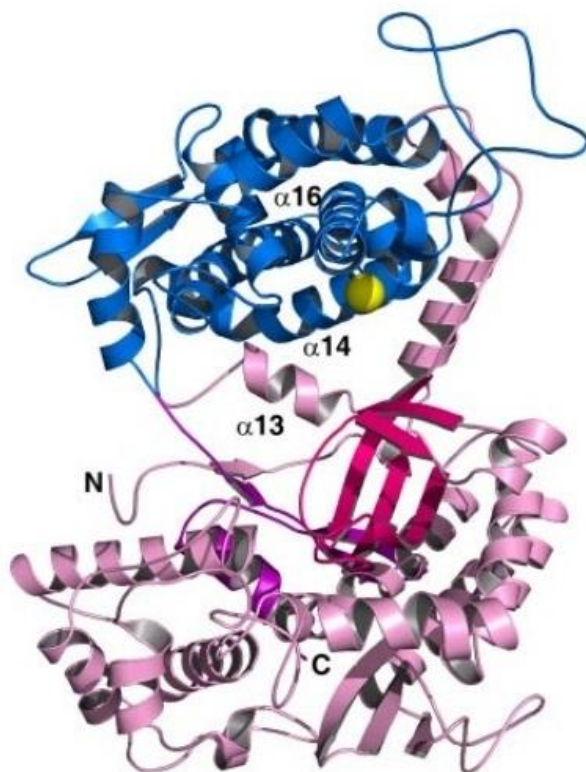
Zanimljivo je da je, na temelju uočene značajne inhibicije inhibitorima serinskih proteaza poput fenilmetansulfenilfluorida (PMSF), diizopropilfluorofosfata (DFP) i 3,4-dikloroizokumarina (DCI), DPP III prvotno klasificirana kao serinska proteaza<sup>11</sup>, sve dok nije bila određena prva sekvenca DPP III u kojoj je uočen motiv karakterističan za cink-metalopeptidaze<sup>9</sup>. Premda je DPP III svrstavana u serinske proteaze, nije pronađen niti jedan ostatak serina koji sudjeluje u katalizi.

Enzimska aktivnost DPP III najčešće je proučavana pri temperaturi od 37 °C i uz sintetski supstrat Arg-Arg-2NA (skraćeno Arg<sub>2</sub>-2NA), premda DPP III iz ljudskih eritrocita i svinjskog skeletnog mišića pokazuje optimalnu aktivnost pri 40 °C<sup>11</sup>. Iznad ove temperature dolazi do linearnog gubitka enzimske aktivnosti. Zanimljivo je da je većina DPP III osjetljiva na uvjete niskih temperatura, odnosno smrzavanje, što uzrokuje 40-60 %-tni gubitak aktivnosti, stoga je za spremanje na -20 °C potrebno dodati krioprotektante poput glicerola. Istraživanja utjecaja pH na aktivnost pročišćene DPP III pokazala su da najveću katalitičku aktivnost prema Arg<sub>2</sub>-2NA postiže pri bazičnim uvjetima u rasponu pH 8,0-9,0 ovisno o organizmu i tkivu iz kojeg potječe. Pri fiziološkom pH od 7,4 očuvano je 45-60 % maksimalne aktivnosti<sup>10</sup>. Ljudska DPP III hidrolizira Arg<sub>2</sub>-2NA *in vitro* pri pH 8,5-9,0, dok je hidroliza bioaktivnih peptida Leu-enkefalina i angiotenzin-2-amida optimalna pri fiziološkom pH što ide u prilog naznakama da bi DPP III sisavaca mogla sudjelovati u regulaciji boli i krvnog tlaka.

### 2.3.3. Strukturna obilježja

Najprije su bile određene primarne strukture štakorske i ljudske DPP III<sup>9,12</sup>. Prva kristalna struktura DPP III objavljena je 2008. godine<sup>13</sup>, a radi se o mutantu kvaščeve DPP III (yDPP III, PDB: 3CSK) koji je dobiven heterolognom ekspresijom u *Escherichia coli*. Metodama rendgenske strukturne analize riješena je kristalna struktura C130S mutanta DPP

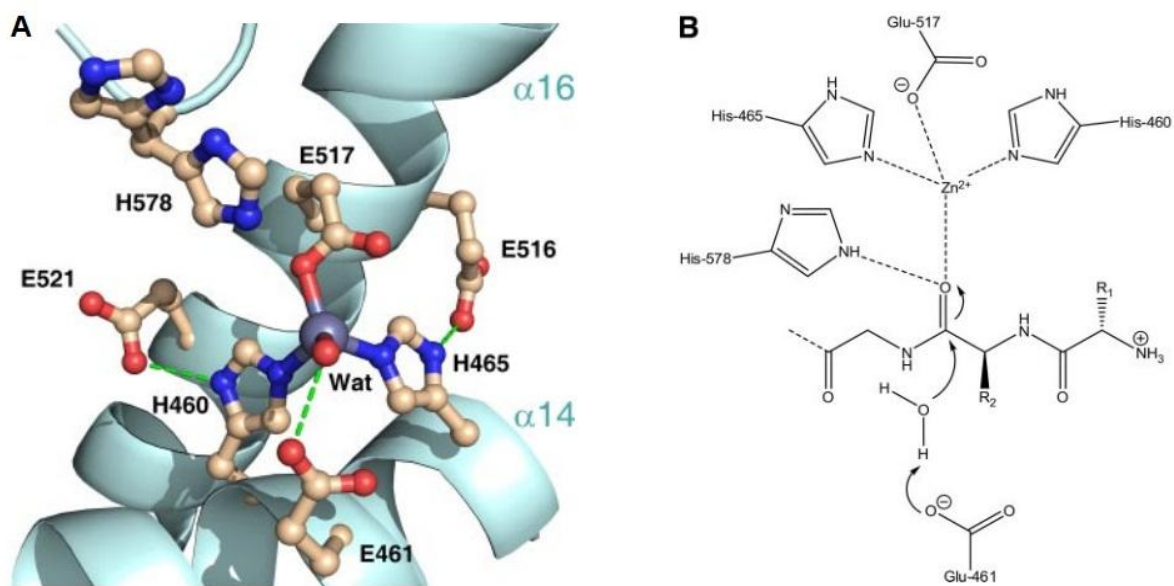
III iz *Saccharomyces cerevisiae* pri rezoluciji od 1,95 Å (Slika 1.) koja predstavlja prototip za cijelu M49 obitelj metalopeptidaza. Navedena se mutacija nalazi daleko od aktivnog mjesta enzima pa nema utjecaj na katalitičku aktivnost. DPP III je izdužena molekula dimenzija  $75 \times 60 \times 50$  Å, duljine 711 aminokiselina s velikim udjelom  $\alpha$ -zavojnica. Sastoji se od dvije domene odvojene velikim procijepom širine  $\sim 40$  Å i visine  $\sim 25$  Å za koji se pretpostavlja da sadrži mjesto vezanja supstrata. Gornja se domena sastoji uglavnom od  $\alpha$ -zavojnica, a donja od  $\alpha$ -zavojnica i  $\beta$ -ploča. Dvije domene su međusobno povezane produžetkom donje domene koji tvori  $\alpha$ -zavojnicu s dugom petljom koja obuhvaća gornju domenu. Jezgru donje domene čini  $\beta$ -ploča sastavljena od 5  $\beta$ -vrpca s donje strane okružena s 5  $\alpha$ -zavojnica, dok je gornja strana izložena procijepu. Ion  $Zn^{2+}$  i aktivno mjesto enzima nalaze se na dnu gornje domene izloženi procijepu. Katalitički motiv HEXXGH i očuvani motiv EEXR(K)AE(D) dio su gornje domene i nalaze se na zavojnicama  $\alpha$ -14 i  $\alpha$ -16.



**Slika 1.** Prikaz strukture kvaščeve DPP III (yDPP III). Gornja je domena obojana plavo, a donja ružičasto s  $\beta$ -pločama i C-krajem istaknutim tamnijom nijansom ružičaste. Ion  $Zn^{2+}$  prikazan je žutom kuglicom. Preuzeto iz literaturnog izvora<sup>13</sup>.

Vezno mjesto iona  $Zn^{2+}$  građeno je od His460, His465 i Glu517 koji koordiniraju ion  $Zn^{2+}$  pomoću N- $\epsilon$  atoma imidazola i O atoma karboksilne skupine (Slika 2. A). Dva histidina pripadaju očuvanom motivu HEXXGH u zavojnici  $\alpha$ -14, dok je Glu517 dio drugog očuvanog motiva, <sup>516</sup>EECRAE<sup>521</sup>, iz zavojnice  $\alpha$ -16. Druga dva ostatka Glu ovog motiva, Glu516 i

Glu521, vezani su vodikovim vezama za histidine koji koordiniraju  $Zn^{2+}$ . Četvrto mjesto u tetraedarskoj koordinaciji cinka zauzima molekula vode koja je vodikovom vezom vezana za Glu461. Način vezanja iona  $Zn^{2+}$  sličan je onome u druge dvije udaljene metalopeptidaze, neprilizinu i termolizinu, u kojima je metalni ion također koordiniran dvama His i Glu. Geometrija koordinacije slična je unatoč tome što DPP III, za razliku od njih, sadrži i dodatni aminokiselinski ostatak u motivu karakterističnim za vezanje  $Zn^{2+}$  (HEXX(G)H). Tome u prilog ide podatak da delecijom jednog Leu iz očuvanog motiva štakorske DPP III (HELLGH) ne dolazi do potpunog gubitka aktivnosti enzima jer takav narušen motiv može koordinirati ion cinka<sup>14</sup>.



**Slika 2.** **A** Koordinacija iona cinka u aktivnom mjestu yDPP III. Ion  $Zn^{2+}$  obojen je plavo, Wat označava molekulu vode, a zelenim crticama prikazane su vodikove veze. **B** Predloženi mehanizam katalize yDPP III. Preuzeto iz literaturnog izvora<sup>13</sup>.

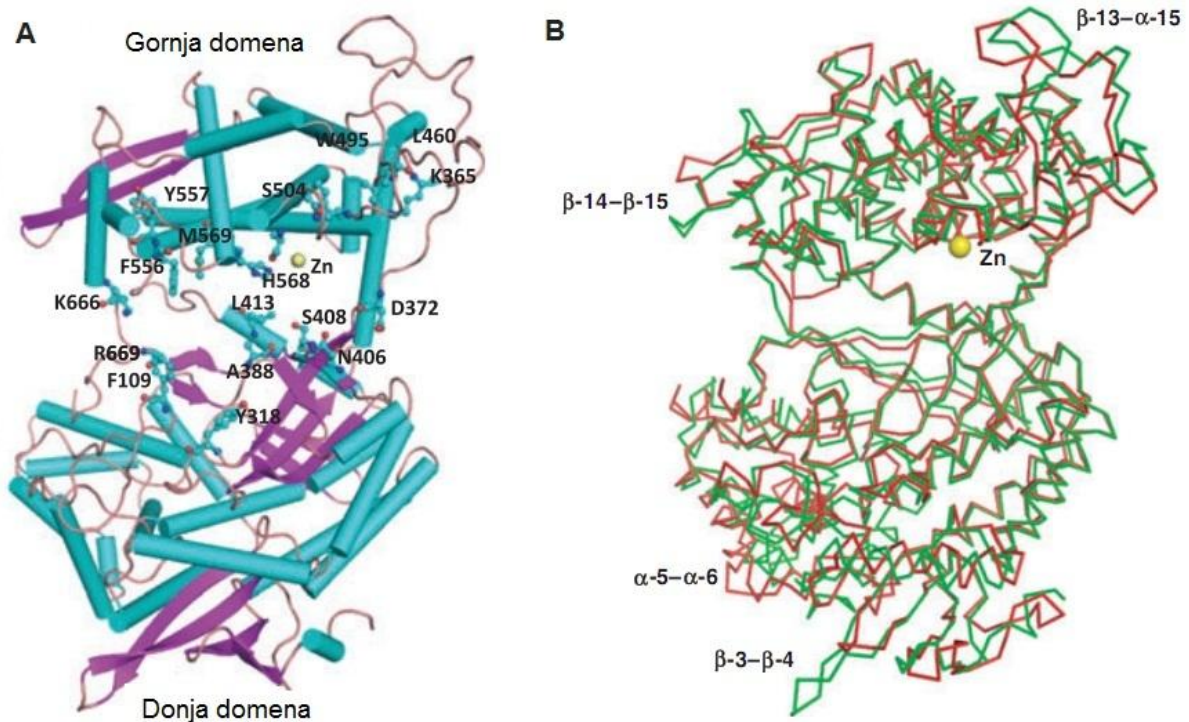
Neobična osobina strukture yDPP III je novi način smatanja molekule proteina i velik procijep oko katalitički aktivnog mjesta s ionom  $Zn^{2+}$  za koji se odmah pretpostavilo da predstavlja mjesto vezanja supstrata zbog otvorenosti i dostupnosti. Također je predviđena određena fleksibilnost obje domene proteina na temelju visokih temperaturnih faktora u dijelu gdje se domene spajaju, što je upućivalo na mogućnost otvaranja i zatvaranja veznog mjesta supstrata<sup>13</sup>. Kako nije bila poznata kristalna struktura kompleksa yDPP III sa supstratom, orijentacija vezanog peptida predviđena je usporedbom s kompleksima termolizina i neprilizina s njihovim inhibitorima. Unatoč velikim razlikama u cjelokupnim strukturama ovih enzima, zbog sličnosti u regiji aktivnog mjesta, pretpostavljeno je da su način i orijentacija vezanja supstrata jednaki, i da se C-kraj supstrata veže u uski unutarnji dio

procijepa, a N-kraj se nalazi okrenut prema otvorenoj regiji. Optimizacijom kompleksa yDPP III s oktapeptidom Ala<sub>8</sub> molekulskom mehanikom ustanovljeno je da se amino-skupina N-kraja supstrata nalazi na udaljenosti ~6-7 Å od metalnog centra prema desnom, otvorenijem dijelu procijepa. Pozitivno nabijena protonirana amino-skupina supstrata stabilizirana je karbonilnim skupinama peptidne veze Glu461 i Asp381 te karboksilnom skupinom bočnog ogranka Glu461, koji zajedno čine regiju negativnog elektrostatskog potencijala. Osim toga, postoji i serija arginina u šupljini kod aktivnog mjesta, za koju se pretpostavilo da sudjeluje u vezanju karboksilata na C-kraju peptida različite duljine lanca.

Zbog sličnosti u građi aktivnog centra, pretpostavlja se da DPP III katalizira hidrolizu peptidne veze mehanizmom analognom termolizinu i neprilizinu s aktiviranom molekulom vode u ulozi nukleofila, bez prethodnog nastajanja kovalentnog intermedijera. Pretpostavlja se da mjesto molekule vode vezane na ion cinka u kristalnoj strukturi yDPP III zauzima karbonilna skupina druge aminokiseline dolazećeg supstrata (Slika 2. B). Na taj način ion Zn<sup>2+</sup> sudjeluje u pozicioniranju supstrata i povećava elektrofilnost C atoma peptidne veze koja se cijepa, što pogoduje napadu nukleofila i ubrzava reakciju hidrolize. U pretpostavljenom kiselinsko-baznom mehanizmu hidrolize, Glu461 djeluje kao opća baza koja deprotonira molekulu vode povećavajući njenu nukleofilnost. Aktivirana molekula vode potom vrši nukleofilni napad na karbonilnu skupinu peptidne veze u blizini, a nastali oksoanionski međuprodukt biva stabiliziran vodikovom vezom s His578 i koordinacijom s metalnim ionom. Glu461 potom djeluje kao opća kiselina dajući proton odlazećoj amino skupini supstrata i vraća se u prvotni neprotonirani oblik.

Prva riješena kristalna struktura ljudske DPP III (hDPP III) objavljena je 2009. godine<sup>15</sup> u bazi podataka Protein Dana Bank (PDB: 3FVY), a radi se o strukturi hDPP III bez liganda pri rezoluciji od 1,9 Å (Slika 3. A). Ljudska DPP III je monomerni protein molekulske mase oko 82500 kDa koji se sastoji od 737 aminokiselina (UniProt: Q9NY33), a kristalizirana je struktura skraćenog proteina od 728 ak. Prostorne građe hDPP III i yDPP III su vrlo slične. Kao i kvaščeva, ljudska DPP III se sastoji većinom od α-zavojnica, te od gornje i donje domene odvojene procijepom, a ion Zn<sup>2+</sup> nalazi se u očuvanom aktivnom mjestu u gornjoj domeni. Katalitički motiv <sup>450</sup>HEXXGH<sup>455</sup> sadrži Glu451 koji vodikovom vezom veže vjerojatno katalitičku molekulu vode, te His450 i His455 koji zajedno s Glu508 sudjeluju u koordinaciji iona Zn<sup>2+</sup>. Gornja domena sadrži i sekundarni očuvani motiv <sup>507</sup>EECRAE<sup>512</sup>. Iako identičnost primarnih sljedova ljudskog i kvaščevog enzima nije velika (36 %), superpozicija okosnica (Cα atoma) dviju struktura pokazuje rmsd (eng. *root mean square deviation*) od

samo 1,8 Å (Slika 3. B)<sup>2</sup> što govori o značajnoj sličnosti ova dva enzima na razini 3D-strukture. Najveće odstupanje vidljivo je u petljama i okretima prisutnim na površini proteina. Glavna razlika dviju struktura je prisutnost dodatnih 16 aminokiselinskih ostataka (od Thr134 do Leu150), koji čine zavijenu petlju (eng. *coiled loop*) u yDPP III između zavojnica  $\alpha$ -5 i  $\alpha$ -6. Nasuprot tome, hDPP III sadrži zavojnicu dugu 21 aminokiselinu na C-kraju proteina koja zauzima isti prostor kao i dodatna petlja kod yDPP III. Okolina veznog mjesta iona  $Zn^{2+}$  predstavlja područje u koje se veže supstrat u hDPP III<sup>13</sup>.

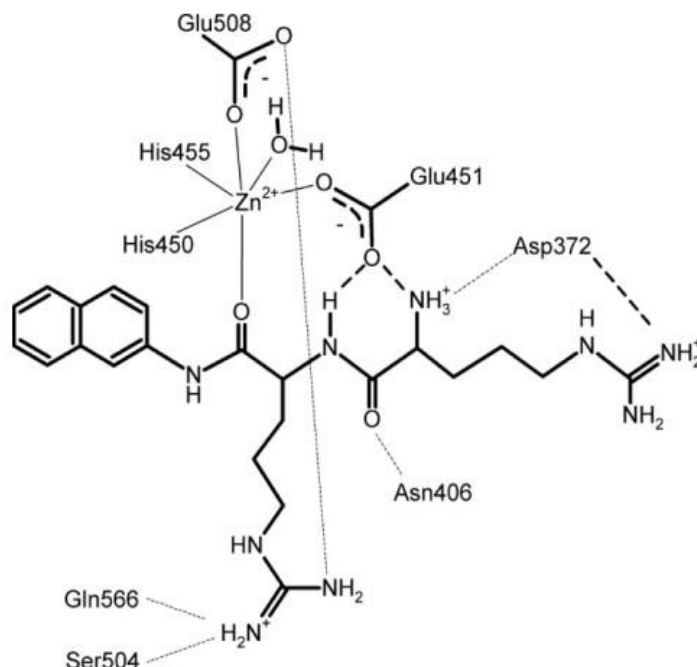


**Slika 3. A** Prikaz strukture ljudske DPP III (hDPP III).  $\alpha$ -zavojnice su prikazane kao cijevi obojane plavo, a  $\beta$ -ploče ljubičasto. Ion  $Zn^{2+}$  prikazan je žutom kuglicom. Jednoslovnom oznakom i brojem označene su aminokiseline u regiji za vezanje supstrata. **B** Superpozicija okosnica ( $C\alpha$  atoma) ljudske (zeleno) i kvaščeve (crveno) DPP III. Ion  $Zn^{2+}$  prikazan je žutom kuglicom. Označeni su dijelovi s najvećom vrijednosti rmsd. Preuzeto iz literaturnog izvora<sup>2</sup>.

Premda su 3D-strukture kvaščeve i ljudske DPP III bez liganada omogućile uvid u mogući katalitički mehanizam ovog enzima, detalji o načinu prepoznavanju supstrata i njegovoj stabilizaciji, kao i o samoj katalitičkoj reakciji, mogli su biti poznati samo iz strukture s ligandima. Iz tog se razloga pristupilo računalnim metodama simulacije kompleksa proteina i liganada molekulskim modeliranjem<sup>16</sup>. Simulacijom molekulske dinamike hDPP III otkrivena je oktaedarska koordinacija iona  $Zn^{2+}$ . U slobodnom proteinu 6 elektron-donora su dvije molekule vode te 4 aminokiselinska ostatka His450, His455, Glu451 i Glu508. Također je uočeno da se najfleksibilnija regija proteina sastoji uglavnom od okreta i petlji koji pripadaju gornjoj domeni. Kombinacijom molekulskog uklapanja (eng. *molecular docking*) i



molekulske dinamike ustanovljen je način vezanja supstrata i promjene konformacije proteina uzrokovane njegovim vezanjem. Simulacije molekulske dinamike izvedene su na divljem tipu hDPP III i mutantu H568N bez i sa supstratom Arg<sub>2</sub>-2NA ili inhibitorom Tyr-Phe-NHOH. U kompleksu hDPP III sa supstratom Arg<sub>2</sub>-2NA, u oktaedarskoj koordinaciji iona Zn<sup>2+</sup> umjesto jedne molekule vode sudjeluje karbonilna skupina druge peptidne veze od N-kraja supstrata (Slika 4.). Osim interakcije s metalnim ionom, supstrat je dodatno stabiliziran vodikovim vezama i hidrofobnim interakcijama s aminokiselinama proteina. N-kraj i amidna skupina prve peptidne veze vezane su vodikovim vezama s Glu451 i Asp372, dok prvi argininski ostatak stvara interakciju s Asp372, Asn406 i Phe404. Gvanidinska skupina drugog arginina vodikovom se vezom veže na Glu508 i Ser504. Naftilamidna skupina smještena je u hidrofobnom džepu koji sadrži nepolarne aminokiseline ostatke, te osim hidrofobnim interakcijama stabilizira se NH-π i CH-π interakcijama. Usporedbom strukture i dinamike slobodnog proteina i proteina u kompleksu sa supstratom ustanovljeno je da je protein u kompleksu neznatno raširen, no manje fleksibilan pri čemu je najveća promjena u fleksibilnosti uočena oko aktivnog mjesta i duge zavojnice koja spaja dvije domene. Vezanje supstrata uzrokuje reorganizaciju aktivnog mjesta i njegovo zatvaranje pomoću fleksibilne petlje na dnu procijepa.



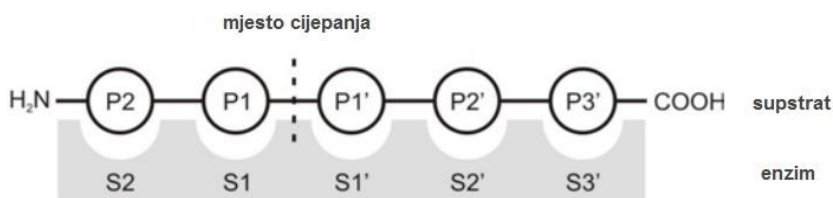
**Slika 4.** Shematski prikaz aktivnog mjesta hDPP III s vezanim supstratom Arg-Arg-2-naftilamidom. Preuzeto iz literaturnog izvora<sup>16</sup>.

Nadalje, na osnovi rezultata molekulske-dinamičke simulacije<sup>16</sup> pretpostavljena su dva moguća mehanizma katalize s molekulom vode u ulozi nukleofila. Prvi korak u oba mehanizma je nukleofilni napad molekule vode na peptidnu vezu, a drugi prijenos protona odlazećoj amino skupini. U prvom mehanizmu Glu451 ima ulogu opće baze i aktivatora vode te opće kiseline i prenositelja protona. Takav je mehanizam predložen i za  $\gamma$ DPP III na temelju sličnosti s termolizinom<sup>13</sup>. Alternativni mehanizam, temeljen na molekulske-dinamičkim simulacijama hDPP III, pretpostavlja da bi Glu508 mogao biti opća baza koja aktivira molekulu vode vezanu na ion  $Zn^{2+}$ . U ovom slučaju potreban je dodatni aminokiselinski ostatak za prijenos protona u drugom koraku katalitičke reakcije, a najvjerojatnije u tome sudjeluje His450.

2012. godine objavljena je kristalna struktura kompleksa hDPP III i opioidnog pentapeptida tinorfina<sup>17</sup> koja objašnjava vezanje supstrata na ljudski enzim i otkriva veliki pomak domena tijekom vezanja liganda. Da bi se poboljšala kvaliteta kristala, dizajniran je krnji oblik proteina kojem nedostaje 11 aminokiselina s C-kraja. Za kokristalizaciju hDPP III s tinorfinom uvedena je supstitucija Glu451 s Ala kojom je enzim inaktiviran i spriječena hidroliza peptidne veze. Dobivene su dvije monokristalne forme koje su difraktirale pri rezoluciji od 2,4 i 3,0 Å (PDB: 3T6B i 3T6J). Način vezanja liganda je sličan u objema strukturama. N-kraj vezanog peptida u potpunosti je okupiran enzimom i usidren polarnim interakcijama s Glu316, Asn394 i karbonilnom skupinom Asn391. Ove interakcije potvrđuju činjenicu da peptidi modificirani na N-kraju nisu prihvatljivi supstrati za DPP III. Pored toga, uočen je značajan pomak dviju domena enzima kojim se potpuno zatvara procijep u kojem je vezan supstrat. Uslijed vezanja supstrata dvije domene rotiraju jedna prema drugoj za otprilike 60°, a takvu rotaciju uzrokuju većinom hidrofobne aminokiseline zglobne regije (ostaci 409-420), čije se slabe interakcije mogu lako razoriti. Na osnovi riješene kristalne strukture kompleksa s tinorfinom, predložen je i mehanizam vezanja supstrata u DPP III. Prvo se peptid veže za donju domenu uglavnom interakcijama s  $\beta$ -pločom, a potom C-kraj vezanog peptida inducira konformacijsku promjenu u zglobnoj regiji uzrokujući približavanje domena što ion  $Zn^{2+}$  dovodi nasuprot karbonilne skupine peptidne veze koja će se pocijepati. Otpuštanje produkta odvija se vjerojatno nakon ponovnog otvaranja procijepa. Za vezanje peptida u hDPP III odgovoran je entropijski doprinos uzrokovan izlaskom uređenih molekula vode iz šupljine, odnosno iz veznog mjesta supstrata. Ovi podaci ukazuju na moguću važnu ulogu zatvaranja veznog mjesta u supstratnoj specifičnosti DPP III. To također mijenja i koncepciju sinteze inhibitora čiji bi dizajn, umjesto na ion  $Zn^{2+}$ , bio usmjeren na konformacijsku promjenu, odnosno približavanje domena.

## 2.4. Podmjesto enzima u veznom mjestu supstrata

Supstratna specifičnost peptidaza određena je oblikom i svojstvima veznog mjesta supstrata, a opisana je konceptualnim modelom u kojem svako specifično podmjesto enzima može smjestiti bočni ogranak jedne aminokiseline supstrata (Slika 5.). Ovu terminologiju su uveli Schechter i Berger<sup>18</sup> opisujući specifičnost papaina. Podmjesto se broje od katalitički aktivnog mjesta, S1, S2,...Sn prema N-kraju te S1', S2',...Sn' prema C-kraju supstrata. Aminokiselinski ostaci peptidnog supstrata označavaju se analogno tome s P1, P2,...Pn te P1', P2',...Pn'. Pojedina podmjesto enzima (S) najčešće sadrže nekoliko aminokiselina, dok se mjesta u peptidu (P) odnose na pojedinačne aminokiseline.



**Slika 5.** Vežanje pentapeptidnog supstrata u vezno mjesto DPP III. Preuzeto iz literaturnog izvora<sup>17</sup>.

Općenito, specifičnost peptidaza određena je s 4-5 ostataka oko peptidne veze koja se cijepa. Na temelju sekvenci poznatih peptidnih supstrata nije ustanovljeno postojanje određenog uzorka sekvence peptida kojeg prepoznaje DPP III. U blizini peptidne veze koja se cijepa u peptidnom supstratu mogu se nalaziti hidrofobne, aromatske i bazične aminokiseline. Čini se da je orijentacija i vežanje supstrata određeno elektrostatskim potencijalom procijepa u kojem se nalazi aktivno mjesto DPP III. Vežanje amino-skupine N-kraja peptida u ispravan položaj, tj. na određenu udaljenost od iona  $Zn^{2+}$ , koji se mora vezati na kisik karbonilne skupine peptidne veze sljedeće aminokiseline peptida da bi se dogodila hidroliza, ima najveći utjecaj na specifičnost DPP III<sup>13</sup>.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Standardne kemikalije

Ampicilin (amp), izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid, IPTG (*Fermentas*); etanol, etilendiaminotetraoctena kiselina, EDTA, klorovodična kiselina, kobaltov (II) klorid, metanol, natrijeva lužina, natrijev klorid, octena kiselina, (*Kemika*); agarozna (*Invitrogen*), akrilamid/bisakrilamid (29:1), amonijev persulfat, APS, glicin,  $\beta$ -merkaptetoetanol, (*GE Healthcare Amersham Biosciences*); etidijev bromid, Fast Blue BN sol, FBB, glicerol, imidazol, natrijev dodecilsulfat, SDS, trikloroctena kiselina, TCA, Tris-baza, Tween 80 (*Sigma*); alanil-arginil-2-naftilamid, Ala-Arg-2NA, diarginil-2-naftilamid, Arg<sub>2</sub>-2NA, fenilalanil-arginil-2-naftilamid, Phe-Arg-2NA (*Bachem*); natrijev dihidrogenfosfat, natrijev hidrogenfosfat (*Merck*); *N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamin, TEMED (*Serva*)

##### 3.1.2. Boje

Boja za praćenje elektroforeze DNA (*Loading Dye, Fermentas*), *Coomassie Brilliant Blue G-250*, CBB (*Amersham Biosciences*), *Coomassie Brilliant Blue R-250* (*Serva*)

##### 3.1.3. Enzimi

Lizozim iz bjelanjka jajeta 48800 j mg<sup>-1</sup> proteina, deoksiribonukleaza I iz govede gušterače tip IV (DNaza I) 2150 j mg<sup>-1</sup> proteina (*Sigma-Aldrich*)

##### 3.1.4. Sastojci hranjivih podloga i medija

Baktotripton (BactoTryptone), ekstrakt kvasca (BBL Yeast Extract) (*BD Becton*), agar (BactoAgar) (*Difco Laboratories*)

##### 3.1.5. Punilo za kromatografsku kolonu

Ni<sup>2+</sup>-NTA agarozna (*Qiagen GmhH*)

### 3.1.6. Komercijalni kompleti

*QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) za ciljanu mutagenezu, *GenEluate Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich) za izolaciju plazmidne DNA, *PD-10 Desalting Columns* (GE Healthcare AB) za odsoljavanje proteina

### 3.1.7. Bakterijski sojevi

Soj XL10-Gold ultrakompetentnih stanica *Escherichia coli* (Stratagene) korišten je za transformaciju plazmidnih DNA nakon mutageneze i za umnožavanje plazmida. Ove su stanice pogodne za transformaciju velikim molekulama DNA jer posjeduju Hte fenotip koji povećava efikasnost transformacije. Deficijentne su u endonukleazama (*endAI*) i rekombinazama (*recA*).

Soj BL21-CodonPlus(DE3)RIL kompetentnih stanica *E. coli* (Stratagene) korišten je za heterolognu ekspresiju rekombinantnih proteina. Bakterijski soj BL21(DE3) sadrži lizogen bakteriofaga  $\lambda$ (DE3) koji nosi gen za T7 RNA-polimerazu pod kontrolom *lacUV5* promotora i operatora. Ekspresija T7 RNA-polimeraze i ciljnog proteina pod kontrolom T7*lac* promotora u plazmidu inducira se dodatkom izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozida (IPTG-a), analoga alolaktoze koji se veže na *lac* represor i uzrokuje njegovu disocijaciju s *lac* operatora omogućujući transkripciju gena za T7 RNA-polimerazu. T7 RNA-polimeraza prepoznaje T7-promotor na plazmidu i omogućava transkripciju ciljnog gena. Soj BL21(DE3) je deficijentan u proteazama *OmpT* i *Lon* koje bi mogle odgraditi ciljni protein<sup>19</sup>.

### 3.1.8. Plazmidi

Komplementarna DNA (cDNA) za ljudsku DPP III iz stanica adenokarcinoma bubrega ugrađena je u plazmid pET21a(+) (*Novogene*) između restrikcijskih mjesta *NdeI* i *XhoI*. Plazmid pET21a(+) veličine 5443 pb sadrži ishodište replikacije *f1* za proizvodnju jednolančane DNA, *ColE1* ishodište replikacije i gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin (*amp*). Nadalje, važan dio sustava pET za ekspresiju proteina je *lac* promotor specifičan za T7 RNA-polimerazu (T7*lac* promotor), *lac* operator koji regulira transkripciju, *lacI* gen koji kodira *lac* represor, višestruko mjesto za kloniranje (eng. *Multiple cloning site*, MCS) te sljedovi nukleotida koji kodiraju za N-terminalni T7 i C-terminalni His<sub>6</sub>-privjesak. Ciljni proteini će se eksprimirati kao fuzijski proteini s His<sub>6</sub>-privjeskom na C-kraju.

### 3.1.9. Hranjive podloge i mediji

Za uzgoj transformiranih bakterijskih stanica korištene su tekuća i kruta LB (Luria-Bertani) hranjiva podloga. Hranjivi medij sastava navedenog u Tablici 1 steriliziran je u autoklavu 20 min pri temperaturi od 120 °C i tlaku od 1,5 atm. Ohlađenom steriliziranom mediju dodan je antibiotik ampicilin do konačne koncentracije 100 µg mL<sup>-1</sup>, a on je zatim korišten za selekciju bakterija koje sadrže plazmid pET21a(+). Obzirom da plazmid sadrži gen za otpornost na antibiotik, u mediju mogu preživjeti samo bakterije transformirane plazmidom. Hranjive podloge s antibiotikom izlivenne su u Petrijeve posude i čuvane pri temperaturi od 4 °C.

**Tablica 1.** Sastav LB hranjivih podloga za uzgoj i transformaciju bakterijskih stanica. Navedene su količine za pripremu 1 L podloge.

Sastav	Tekući LB medij	Kruta LB podloga
Baktotripton	10,0 g	10,0 g
Ekstrakt kvasca	5,0 g	5,0 g
NaCl	5,0 g	5,0 g
Agar	-	15,0 g
Destilirana voda	do 1 L	do 1 L

### 3.1.10. Oprema i uređaji

Uređaj za lančanu reakciju polimeraze (PCR) *Gene AMP PCR System 2700 (Applied Biosystem)*, termoblok *Thermomixer comfort (Eppendorf)*, aparatura za elektroforezu na agaroznom gelu *RunOne Electrophoresis Cell (Embi Tec)*, ultrazvučni dezintegrator *Labsonic M (B. Braun Biotech)*, tresilica za inkubaciju *SL Shaking incubator (Shell Lab)*, tresilica za inkubaciju *Innova 4300 Incubator Shaker (New Brunswick)*, stolna centrifuga 5415 R (*Eppendorf*), centrifuga *Sorvall RC-5B* i rotor *GSA* i *SS-34 (Sorvall)*, termostat (*Instrumentaria*), komora za termostatanje *Jasco Peltier (Jasco)*, pH metar *827 pH lab (Metrohm)*, aparatura za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu *Mini-PROTEAN Tetra System* i izvor struje *Power Pac 1000 (Bio-Rad)*, spektrofotometar *M-501 Single Beam scanning UV/Visible Spectrophotometer (CamSpec)*, spektrofluorimetar *Perkin Elmer Luminiscence Spectrometer LS 50 (Perkin Elmer)*, spektropolarimetar *Jasco J-815 CD Spectrophotometer (Jasco)*, vodena kupelj (*Köttermann*), vibracijski mješač *Mini Shaker (Fischer)*, platforma za ljuljanje (*Cole Parmer*), *BioSpec-nano Micro-volume UV-VIS Spectrophotometer (Shimatzu)*, membrana za filtriranje *Westran PVDF membrane (Whatman)*

## 3.2. Metode rekombinantne DNA

Sve navedene metode rada s DNA i proteinima u sljedećim su odlomcima opisivane za pojedinačan enzim, a odnose se na oba mutanta ljudske DPP III, D496G i S504G.

### 3.2.1. Ciljana mutageneza

Lančana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, skraćeno PCR), metoda umnažanja željenog odsječka DNA u uvjetima *in vitro*, upotrijebljena je za uvođenje željenih mutacija u cDNA za ljudsku DPP III ugrađen u plazmid pET21-a(+) te za njegovo umnažanje. Oligonukleotidne početnice za ciljanu mutagenezu kreirane su u računalnom programu OligoAnalyser3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Sintetske početnice duljine 35, odnosno 37 nukleotida sadrže odgovarajuću mutaciju u sredini oligonukleotida i s obje su strane komplementarne kalupu u duljini od 15-ak nukleotida. Pri tome je za supstituciju Asp u Gly promijenjen 1 (GAT→GGT), a za supstituciju Ser u Gly 3 nukleotida (TCC→GGT):

D496G početnica F: 5'-GGAGCGGGGAGACCTGGGGTAGCAAGTTCAGCACC-3'

D496G početnica R: 5'-GGTGCTGAACTTGCTACCCCAGGTCTCCCCGCTCC-3'

S504G početnica F: 5'-G TTCAGCACCATCGCCGGTAGCTACGAAGAGTGCCGG-3'

S504G početnica R: 5'-CCGGCACTCTTCGTAGCTACCGGCGATGGTGCTGAAC-3'

Oligonukleotidne početnice se u PCR reakciji sparuju s komplementarnom regijom u plazmidu i produžuju djelovanjem *Pfu* DNA-polimeraze, koja posjeduje 3'→5' egzonukleaznu aktivnost čime se smanjuje vjerojatnost uvođenja slučajnih mutacija. Ciljana mutageneza provedena je korištenjem komercijalnog kompleta *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)*. Kao kalup je korišten plazmid pET21a(+) s ugrađenom cDNA za hDPP III s His<sub>6</sub>-privjeskom na C-kraju. PCR se odvijao u 51 μL reakcijske smjese sastava: 5 μL 10x reakcijskog pufera, 1,6 ng dm<sup>-3</sup> kalupa, 1 μL smjese deoksiribonukleotid-trifosfata (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), 2,6 ng dm<sup>-3</sup> svake od dviju početnica, 3,0 μL QuickSolution reagensa i 2,5 j μL<sup>-1</sup> *PfuUltra HF* DNA-polimeraze. Reakcijski uvjeti navedeni su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Uvjeti PCR reakcije ciljane mutageneze.

<b>Korak</b>	<b>Temperatura / °C</b>	<b>Trajanje ciklusa</b>	<b>Broj ciklusa</b>
Početna denaturacija	95	1 min	1
Denaturacija	95	50 s	18
Vežanje početnica na kalup	60	50 s	18
Produljenje lanca	68	8 min	18
Završno produljenje lanca	68	7 min	1

Potom je iz smjese s produktom PCR odvojen alikvot od 10  $\mu\text{L}$  za analizu elektroforezom na agaroznom gelu, a ostatku dodan 1  $\mu\text{L}$  restrikcijskog enzima *DpnI* (10 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Smjesa je inkubirana 2 h na 37 °C u termobloku. *DpnI*, restrikcijska endonukleaza koja prepoznaje slijed 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3' metilirane DNA, razgrađuje djelomično metiliranu roditeljsku (plazmidnu) DNA dok u smjesi ostavlja samo nosintetiziranu DNA sa željenom mutacijom. Nakon razgradnje transformiraju se kompetentne stanice XL10-Gold s 2  $\mu\text{L}$  smjese prema uputama proizvođača dodavanjem  $\beta$ -merkaptoetanolu i temperaturnim šokom na 42 °C u trajanju od 30 s. Bakterijske stanice se zatim, nakon inkubacije od 1 h na 37 °C, nasade na krutu LB/amp hranjivu podlogu na način objašnjen u sljedećem odlomku.

### **3.2.2. Uzgoj bakterijskih kultura**

Bakterije se danas najčešće upotrebljavaju kao sustavi za umnažanje genetičkog materijala i za prekomjernu ekspresiju rekombinantnih proteina. Rad s bakterijama zahtijeva sterilne uvjete uz plamen. Za uzgoj bakterija na krutoj LB/amp hranjivoj podlozi nanese se po 200 i 300  $\mu\text{L}$  suspenzije stanica, razmaže staklenim štapićem steriliziranim u etanolu i plamenu, te se nakon upijanja Petrijeve posude inkubiraju 16 h u termostatu na 37 °C.

Potom je potrebno pripremiti prekončne bakterijske kulture za izolaciju plazmida. S ploče s kolonijama odabrano je 5 pojedinačnih kolonija koje su ezom unesene u 5 ml tekućeg LB/amp medija. Bakterije se uzgajaju 16 h uz protresanje od 250 okretaja u minuti u termostatiranoj rotacijskoj tresilici na 37 °C.

Za dugoročno pohranjivanje transformiranih bakterijskih stanica pripravlja se trajne kulture dodatkom 300  $\mu\text{L}$  50 %-tnog glicerola u 700  $\mu\text{L}$  prekončne bakterijske kulture i čuvaju na -80 °C.



### 3.2.3. Izolacija plazmida

Izolacija plazmida iz prekonocnih kultura provedena je korištenjem komercijalnog kompleta *GenEluate Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)* prema uputama proizvođača. Stanice su podvrgnute alkalnoj lizi uz prisutnost natrijevog dodecilsulfata (SDS-a), a postupak izolacije temelji se na adsorpciji DNA na silikatnu membranu uz visoku koncentraciju soli. Nečistoće se postepeno uklanjaju ispiranjem kolone puferima sve niže ionske jakosti i centrifugiranjem, a plazmidna DNA eluira se redestiliranom vodom. Izolirani i pročišćeni rekombinantni plazmidi čuvaju se na -20 °C do uporabe. Uspješnost mutageneze provjerena je sekvenciranjem izolirane plazmidne DNA. Sekvenciranje je provedeno u servisu za sekvenciranje MacroGen, Amsterdam, Nizozemska.

### 3.2.4. Elektroforeza u agaroznom gelu

Elektroforeza u agaroznom gelu se upotrebljava za razdvajanje nukleinskih kiselina u električnom polju, a detekcija se vrši upotrebom interkalirajućih reagensa, najčešće etidijevog bromida. 1 %-tni agarozni gel pripremljen je otapanjem agaroze u TAE puferu sastava: 89 mmol dm<sup>-3</sup> Tris, 89 mmol dm<sup>-3</sup> borna kiselina i 2 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA, pH 8,0. Uzorcima za elektroforezu, kojima je prethodno određena koncentracija, dodana je boja za nanošenje uzoraka (*Loading Dye, Fermentas*) sastava: bromfenol plavilo (0,4 %), ksilencijanol FF (0,4 %) i 50 %-tni glicerol. Kao marker molekulskih masa korišten je DNA standard sa smjesom molekula DNA veličine 250 do 10000 pb (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Fermentas*). Postupak elektroforeze proveden je u *RunOne Electrophoresis Cell (Embi Tec)* aparaturi za horizontalnu elektroforezu u TAE puferu pri naponu od 50 V u trajanju od 35 min. Gel je potom uronjen 5 min u otopinu etidijevog bromida ( $c = 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), a višak etidijevog bromida uklonjen je ispranjem u vodi. DNA je vizualizirana pod UV svjetlom u transiluminatoru *GeneSnap (Syngene)*.

### 3.2.5. Transformacija kompetentnih stanica BL21-CodonPlus(DE3)RIL elektroporacijom

Elektroporacija je jedna od metoda unošenja strane DNA u bakterijsku stanicu. Primjenom električnog pulsa dolazi do slabljenja interakcija u staničnoj membrani i povećanja njene propusnosti. Za elektroporaciju je korišten uređaj *Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad)*. U 40  $\mu\text{L}$  elektrokompetentnih stanica unesen je 1  $\mu\text{L}$

plazmida koji nosi gen za mutirani oblik DPP III. Stanice su prenesene u ohlađenu kivetu za elektroporaciju te je primijenjen puls od  $2500 \text{ V cm}^{-1}$  u trajanju od 5 ms. Odmah zatim stanice su resuspendirane s 1 mL tekućeg LB medija i inkubirane 50 min na tresilici pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  radi oporavka. Stanice su potom nasađene na krutu LB/amp hranjivu podlogu i inkubirane 16 h na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.3. Metode rada s proteinima**

#### **3.3.1. Indukcija prekomjerne ekspresije proteina**

Najprije je pripravljena mala prekončna kultura. U 10 ml tekućeg LB/amp medija dodana je, s krute LB/amp podloge odabrana bakterijska kolonija, koja sadrži plazmid s mutantom te inkubirana u tresilici na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  uz protresanje od 250 okretaja u minuti. Potom je u tikvice koje sadrže 500 mL steriliziranog LB hranjivog medija dodan ampicilin do konačne koncentracije  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  te inokulirano s 10 ml bakterijskih stanica iz prekončne kulture. Za svaku ekspresiju pripravljena je 1 L kulture. Kulture se inkubiraju u tresilici na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  uz protresanje od 220 okretaja u minuti. Rast bakterijskih stanica provjerava se spektrofotometrijskim mjerenjem optičke gustoće pri valnoj duljini od 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) u odnosu na čisti LB medij. Kada je vrijednost  $\text{OD}_{600}$  između 0,6 i 0,8, bakterije se nalaze u tzv. logaritamskoj fazi rasta kada se najbrže dijele i tada je potrebno dodati IPTG za indukciju prekomjerne ekspresije heterolognog proteina. Nakon 2,5 h inkubacije vrijednost  $\text{OD}_{600}$  dosegla je iznos veći od 0,6. U kulturu je tada bio dodan IPTG do konačne koncentracije  $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , a uzgoj nastavljen 19 h u tresilici na  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  uz protresanje od 130 okretaja u minuti. Stanice su potom oborene centrifugiranjem 20 min na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  pri 5000 g, uklonjen je supernatant, a talog pohranjen na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Prije indukcije IPTG-om i po završetku ekspresije iz kulture su izdvojeni alikvoti od 1 mL za provjeru sinteze proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu. Stanice su i u alikvotima oborene centrifugiranjem.

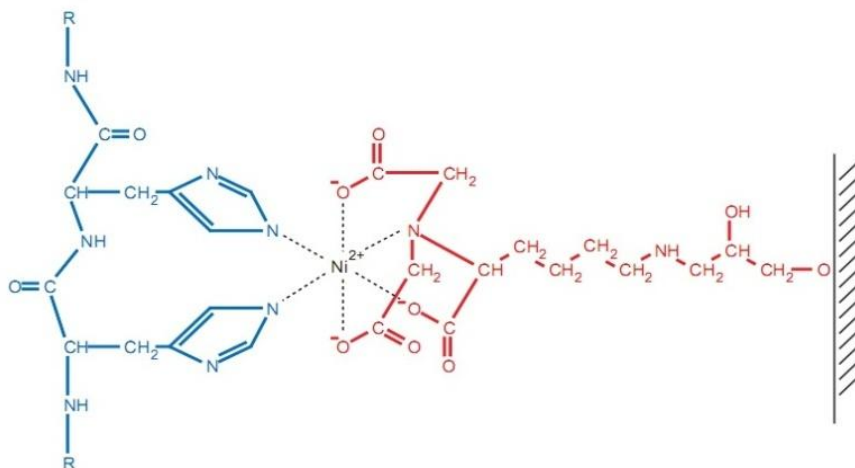
#### **3.3.2. Priprema lizata bakterijskih stanica**

Liza stanica je postupak kojim se oslobađa unutarstanični sadržaj razaranjem staničnih stijenki. Prethodno izvagan talog bakterijskih stanica iz 0,5 L kulture resuspendiran je u puferu za lizu sastava:  $50 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $300 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ ,  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  imidazol; pH 8,0 (omjer: 5 mL pufera na 1 g taloga stanica). Suspenziji je dodan lizozim do konačne koncentracije  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nakon 30 min stajanja na ledu stanice su dodatno

razorene ultrazvukom u ultrazvučnom dezintegratoru, izlaganjem 7 puta po 30 s sa stankama od 1 min. Pri tome su stanice držane na ledu jer uslijed izlaganja ultrazvuku dolazi do značajnog zagrijavanja uzorka. U suspenziju razorenih stanica dodana je DNaza I do konačne koncentracije  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  radi razgradnje genomske DNA i suspenzija je inkubirana 20 min na sobnoj temperaturi uz lagano ljuljanje, a potom centrifugirana 45 min na  $4^\circ\text{C}$  pri 10500 g. Supernatant je stanični lizat koji sadrži topljive stanične proteine među kojima je i protein od interesa. Lizat je potrebno filtrirati preko naboranog filter papira radi uklanjanja fragmenata genomske DNA. Alikvoti suspenzija razorenih stanica i staničnog lizata su centrifugirani, a talozi su resuspendirani u destiliranoj vodi i pohranjeni na  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3.3.3. Pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom na $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarozima

Budući da su ciljni proteini eksprimirani kao fuzijski proteini s  $\text{His}_6$ -privjeskom na C-kraju, za njihovo pročišćavanje i izolaciju može se koristiti afinitetna kromatografija s imobiliziranim metalnim ionom (engl. *immobilized metal-ion affinity chromatography*, IMAC). Ta se metoda temelji na specifičnoj reverzibilnoj interakciji histidinskih bočnih ograna s metalnim ionima imobiliziranim na stacionarnoj fazi. Najčešće je to dvovalentni metalni ion  $\text{Ni}^{2+}$  keliran nitrilotriocetnom kiselinom (NTA) na agaroznom nosaču ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agaroz). NTA okupira 4 od 6 koordinacijskih mjesta iona  $\text{Ni}^{2+}$ , a slobodna vezna mjesta zauzimaju bočni ogranci histidina proteina koji se veže (Slika 6.)<sup>20,21</sup>. Protein s  $\text{His}_6$ -privjeskom vezanim na nosač eluira se otopinom imidazola visoke koncentracije pri čemu imidazol zauzima vezna mjesta proteina i istiskuje ga s kolone. Niske koncentracije imidazola u puferu za lizu i puferu za ispiranje umanjuje nespecifično vezanje drugih proteina.  $\text{His}_6$ -privjesak uglavnom ne utječe na strukturu i funkciju proteina, no po potrebi se može ukloniti proteazama čiji je slijed prepoznavanja ugrađen između rekombinantnog proteina i  $\text{His}_6$ -privjeska.



**Slika 6.** Shematski prikaz vezanja proteina s His-privjeskom na Ni<sup>2+</sup>-NTA agarozu. Preuzeto iz literaturnog izvora<sup>20</sup>.

U ovom radu provedena je afinitetna kromatografija na koloni punjenoj Ni<sup>2+</sup>-NTA agarozom. Prije nanošenja uzorka stupac Ni<sup>2+</sup>-NTA agaroze volumena 3,5 mL uravnotežen je puferom za lizu. Profiltrirani stanični lizat volumena 4,5 mL nanesen je na kolonu uz protok od 0,6 mL min<sup>-1</sup>, a nevezana frakcija skupljena u epruvetu. Sve su frakcije skupljane u epruvete uronjene u led. Zatim je kolona isprana puferom za ispiranje sastava: 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 20 mmol dm<sup>-3</sup> imidazol; pH 8,0 pri čemu su skupljene 3 frakcije po 1,9 mL (označene w<sub>1</sub>-w<sub>3</sub>). Vezani protein eluiran je puferom za eluciju sastava: 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 150 mmol dm<sup>-3</sup> imidazol; pH 8,0 pri čemu je prikupljeno 7 frakcija po 0,5 mL (označeno e<sub>1</sub>-e<sub>7</sub>). Kolona je isprana puferom za eluciju, redistiranom vodom i etanolom te čuvana na 4 °C. Uspješnost pročišćavanja provjerena je testom enzimske aktivnosti i elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE).

### 3.3.4. Odsoljavanje proteina gel-filtracijom

Proteini pročišćeni afinitetnom kromatografijom na Ni<sup>2+</sup>-NTA agarozu nalaze se u puferu za eluciju i potrebno ih je odvojiti od zaostalih soli i imidazola te prebaciti u odgovarajući pufer u kojem su stabilni. U tu se svrhu upotrebljava gel-filtracija kao jednostavna kromatografska metoda u kojoj se molekule prolazeći kroz pore stacionarne faze razdvajaju prema veličini. Pri tome se prvo eluiraju veće molekule poput proteina, dok se manje molekule poput imidazola i soli dulje zadržavaju u koloni. Za odsoljavanje preparata DPP III korištena je komercijalno dostupna kolona *PD-10 Desalting Column* dimenzija 1,45 × 5 cm sa *Sphadexom G-25* kao punilom. Nosač je ekvilibrirana puferom sastava: 20 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, 1 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl; pH 7,4. Nakon provjere čistoće frakcija SDS-gel

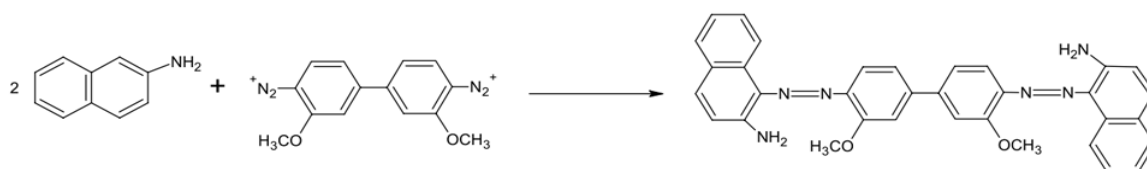
elektroforezom, na koloni PD-10 su odsoljene spojene frakcije 3 i 4. Frakciji odsoljenog proteina volumena 3,5 mL dodan je glicerol do konačnog volumnog udjela  $\varphi = 0,22$ . Homogenizirani uzorak je pohranjen na  $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.5. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Za određivanje koncentracije proteina korištena je kolorimetrijska metoda po Bradfordu koja se temelji na interakciji bočnih ogranaka bazičnih i aromatskih aminokiselina proteina i boje *Coomassie Brilliant blue G-250* u kiselom mediju<sup>21</sup>. Pri tome se apsorpcijski maksimum boje pomiče s valne duljine 465 nm na 595 nm što je vidljivo promjenom boje iz smeđe u plavu, što odgovara prijelazu slobodnog, kationskog oblika boje u anionski oblik vezan na protein. Povećanje apsorbanције pri 595 nm linearno je proporcionalno količini vezane boje, te u skladu s tim i koncentraciji proteina u uzorku. Sastav Bradfordovog reagensa je sljedeći:  $0,1\text{ g dm}^{-3}$  *Coomassie Brilliant blue G-250*, etanol ( $\varphi = 0,05$ ),  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $\varphi = 0,085$ ). Najprije je potrebno izraditi baždarni pravac s poznatim koncentracijama standardnog proteina, albumina iz goveđeg seruma (BSA), u rasponu unutar kojeg se nalaze očekivane vrijednosti koncentracije proteina. Uzorak određenog volumena se razrijedi destiliranom vodom do volumena  $100\text{ }\mu\text{L}$  i tome doda 1 mL Bradfordovog reagensa, dok se slijepa proba priređuje sa  $100\text{ }\mu\text{L}$  destilirane vode. Smjese se promiješaju na vibracijskom mješaču i inkubiraju 45 min na sobnoj temperaturi, nakon čega se na spektrofotometru mjeri apsorbanција uzoraka pri 595 nm u odnosu na slijepu probu. Koncentracija proteina odredi se očitavanjem iz jednadžbe baždarnog pravca pri vrijednostima izmjerene apsorbancije.

### 3.3.6. Određivanje peptidazne aktivnosti

Aktivnost hDPP III (divljeg tipa i mutanata) određena je kolorimetrijskom metodom po Nagatsuu i suradnicima<sup>22</sup> izlaganjem tri različita sintetska dipeptidil-arilamidna supstrata: Arg<sub>2</sub>-2NA, Phe-Arg-2NA i Ala-Arg-2NA djelovanju enzima. Metoda se temelji na detekciji produkta reakcije diazokopuliranja između 2-naftilamina, produkta enzimske reakcije, i tetrazonijeve soli *o*-dianisidina (*Fast Blue BN*, FBB) (Slika 7.). U reakciji elektrofilne supstitucije atom dušika aromatskog diazo spoja veže jezgru drugog aromatskog spoja, najčešće fenola ili arilamina. Pri tome žućkasta boja otopine FBB soli prelazi u ružičastu čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 530 nm 15 min nakon dodatka FBB reagensa. Otopine diazo soli su vrlo nestabilne jer podliježu oksidacijsko-redukcijskim reakcijama, stoga ih je potrebno prirediti neposredno prije upotrebe.



**Slika 7.** Diazokoplucija FBB soli i 2-naftilamina, produkta hidrolize sintetskih supstrata enzimom DPP III. Preuzeto iz literaturnog izvora<sup>23</sup>.

Test aktivnosti se provodi u reakcijskoj smjesi volumena 1 mL koja sadrži 50 mmol  $\text{dm}^{-3}$  Tris-HCl pufer pH 8,6, 50  $\mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{CoCl}_2$ , 40  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  supstrat i uzorak enzima određenog volumena (nekoliko  $\mu\text{L}$ ). Najprije se enzim predinkubira u smjesi bez supstrata 3 min na 37 °C, a potom se doda 50  $\mu\text{L}$  0,8 mmol  $\text{dm}^{-3}$  supstrata. Reakcija se odvija 15 min na 37 °C uz lagano potreskivanje. Reakcija se prekida dodatkom 200  $\mu\text{L}$  svježe pripremljene otopine FBB soli sastava: 1,5 mg  $\text{mL}^{-1}$  FBB, 2,1 mol  $\text{dm}^{-3}$  Na-acetatni pufer pH 4,2, Tween 80,  $\phi = 0,10$ . Nakon 15 min razvijanja boje na sobnoj temperaturi izmjeri se apsorbancija reakcijske smjese pri valnoj duljini od 530 nm u odnosu na smjesu bez enzima, koja služi kao kontrola mogućeg raspada supstrata i kontaminacije. Baždarni pravac izrađen je mjerenjem apsorbancije 2-naftilamina različitih (poznatih) koncentracija u istim uvjetima. Jedna enzimska jedinica (j) označava količinu enzima koja razgradi 1  $\mu\text{mol}$  supstrata u 1 minuti.

Nakon afinitetne kromatografije na  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarozu određena je aktivnost pojedinih frakcija semikvantitativnom metodom bez poznate koncentracije enzima. Test je proveden analogno prethodno opisanom kvantitativnom testu u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 100  $\mu\text{L}$ . Intenzitet boje, a time i aktivnost procjenjuje se vizualno.

### 3.3.7. Elektrofereza proteina u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)

Elektrofereza u denaturirajućim uvjetima upotrijebljena je za provjeru ekspresije i pročišćavanja proteina. Korištena je diskontinuirana elektrofereza u poliakrilamidnom gelu u vertikalnom sustavu za elektroferezu *Mini-PROTEAN Tetra System* uz prisutnost natrijevog dodecilsulfata (SDS), detergenta koji denaturira proteine. SDS se veže na proteine u stalnom omjeru na jedinicu mase, pa proteini tretirani ovim deterгентom imaju jednak omjer mase i naboja. U skladu s tim, proteini se elektroforetski odjeljuju prema masi zbog efekta molekuskog sita, jer se tada kroz gel najbrže gibaju molekule proteina najmanje mase. Između dviju staklenih ploča najprije je izliven 10 %-tni gel za razdvajanje sastava: 0,375 mol  $\text{dm}^{-3}$  Tris-HCl, pH 8,8, 10 % akrilamid/bisakrilamid, 0,1 % SDS, 0,05 % APS i 0,05 % TEMED. Polimerizacijska smjesa nadslojena je n-butanolom zasićenim vodom, koji je

uklonjen nakon 45 min. Na polimerizirani gel za razdvajanje izliven je gel za sabijanje sastava:  $0,125 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl, pH 6,8, 4 % akrilamid/bisakrilamid, 0,1 % SDS, 0,05 % APS i 0,05 % TEMED. U gel za sabijanje umetnut je češalj s 10 jažica. Prije nanošenja na gel uzorcima je u omjeru 1:1 dodan pufer za obradu sastava:  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl, pH 6,8,  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  SDS, glicerol ( $\varphi = 0,10$ ),  $\beta$ -merkaptetanol ( $\varphi = 0,05$ ),  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  bromfenol plavilo. Uzorci su zagrijani 5 min u kipućoj vodi radi denaturacije proteina. Nakon nanošenja uzoraka u jažice gela, gelovi su nadliveni puferom za elektroforezu sastava:  $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl,  $0,003 \text{ mg mL}^{-1}$  SDS,  $0,192 \text{ mol dm}^{-3}$  glicin, pH 8,3. Elektroforeza je provedena pri konstantnoj jakosti struje od 30 mA i naponu od oko 150 V u trajanju od 50 min. Tijek elektroforeze prati se pomakom linije bromfenol plavila. Nakon elektroforeze gelovi su bojani 10 min u otopini sastava:  $0,001 \text{ mg mL}^{-1}$  *Coomassie Brilliant Blue* R-250, metanol  $\varphi = 0,20$ , octena kiselina  $\varphi = 0,10$ . Suvišak boje otklonjen je u otopini za odbojavanje sastava: metanol  $\varphi = 0,20$ , octena kiselina  $\varphi = 0,10$ . Uz uzorke na gel je nanesa smjesa niskomolekulskih proteinskih standarda: fosforilaza B ( $M_r = 94 \text{ kDa}$ ), albumin iz goveđeg seruma ( $M_r = 67 \text{ kDa}$ ), jajni albumin ( $M_r = 43 \text{ kDa}$ ), ugljična anhidraza ( $M_r = 30 \text{ kDa}$ ), inhibitor tripsina iz soje ( $M_r = 21,1 \text{ kDa}$ ) i  $\alpha$ -laktoalbumin ( $M_r = 14,4 \text{ kDa}$ ).

### 3.3.8. Određivanje kinetičkih parametara (kinetika ustaljenog stanja)

Radi određivanja kinetičkih parametara praćena je kinetika hidrolize 2-naftilamidnih supstrata u ustaljenom stanju. Kinetika ustaljenog stanja opisana je Michaelis-Mentenim modelom, koji za jednosupstratnu reakciju pretpostavlja ravnotežu između enzima, supstrata i kompleksa enzim-supstrat, pri čemu je koncentracija kompleksa ES konstantna u uvjetima u kojim je koncentracija supstrata značajno veća od koncentracije enzima da bi se održala pretpostavka stalne koncentracije supstrata. Početna brzina reakcije  $v_0$  mjeri se praćenjem nastanka produkta u vremenu tek nakon što se uspostavi ustaljeno stanje u uvjetima kada se povratna reakcija može zanemariti, odnosno kada je koncentracija produkta zanemarivo mala. Direktno iz Michaelis-Mentenine jednadžbe određuju se kinetički parametri  $V_{\max}$  i  $K_m$  koji su korisni za opisivanje svojstava enzimski kataliziranih reakcija. Maksimalna brzina reakcije  $V_{\max}$  je ona brzina reakcije koja bi se postigla kada bi sav enzim bio u kompleksu sa supstratom. Michaelisova konstanta  $K_m$  predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj se postiže 50 % maksimalne brzine reakcije, a promatra se kao ukupna konstanta disocijacije svih intermedijera reakcije, odnosno svih mogućih kompleksa enzima sa supstratom ili produktom. Katalitička konstanta  $k_{\text{cat}}$  predstavlja donju granicu za bilo koju pojedinačnu konstantu brzine

reakcije prvog reda u pretvorbi supstrata u produkt. Često se naziva obrtnim brojem i opisuje brojem molekula supstrata prevedenih u produkt po molekuli enzima u jedinici vremena u uvjetima zasićenja enzima supstratom. Kao mjera katalitičke efikasnosti upotrebljava se konstanta specifičnosti  $k_{cat}/K_m$  koja predstavlja donju granicu za pravu reakciju drugog reda između enzima i supstrata.

Kinetički parametri  $K_m$  i  $k_{cat}$  divljeg tipa i mutanata hDPP III izračunati su iz koncentracijske ovisnosti hidrolize tri različita dipeptidil-arilamidna supstrata: Arg<sub>2</sub>-2NA, Phe-Arg-2NA i Ala-Arg-2NA linearizacijom prema Hanesu i nelinearnom regresijom Michaelis-Mentenine krivulje. Početna brzina hidrolize supstrata izmjerena je praćenjem porasta fluorescencije produkta enzimske reakcije 2-naftilamina. Reakcijska smjesa volumena 3 mL sadržavala je 17 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl pufer pH 8,0, 50 μmol dm<sup>-3</sup> CoCl<sub>2</sub> i mali alikvot prethodno razrijeđene otopine enzima u 10 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl puferu pH 7,4. Nakon 2 minute predinkubacije, reakcija je započeta dodatkom odgovarajućeg supstrata. Supstrat je dodavan u rasponu koncentracija 0,53 do 160 μmol dm<sup>-3</sup>, a koncentracije enzima kretale su se u rasponu od 0,0328 do 0,546 nmol dm<sup>-3</sup> u reakcijskoj smjesi. Intenzitet fluorescencije 2-naftilamina praćen je na spektrofluorimetru u kvarcnoj kivetu pri valnoj duljini od 420 nm u trajanju od 180 s. Valna duljina pobude fluorescentnog produkta reakcije 2-naftilamina bila je 332 nm. Reakcija se odvijala pri sobnoj temperaturi (25 °C). Baždarni dijagram izrađen je mjerenjem fluorescencije 2-naftilamina poznatih koncentracija u istim uvjetima pri pH 8,0 i uz prisutnost CoCl<sub>2</sub>.

### 3.3.9. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam (CD) je razlika u apsorpciji lijevo i desno polarizirane svjetlosti<sup>24</sup>. Taj se efekt uočava kod optički aktivnih kromofora. U proteinima kromoforne skupine su peptidne veze, bočni ogranci aromatskih aminokiselina i disulfidne veze. Za apsorpciju u području valnih duljina manjih od 240 nm (daleki UV) odgovorne su uglavnom peptidne veze. U tom području valnih duljina različiti tipovi sekundarnih struktura daju karakteristične CD spektre koji se mogu analizirati i uspoređivati.

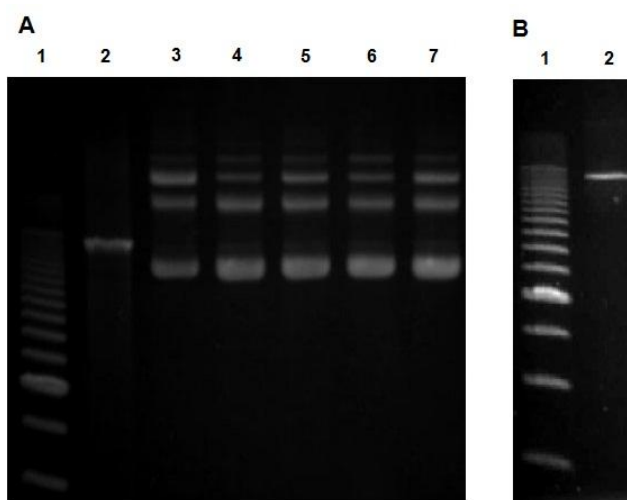
Karakteristike sekundarne strukture divljeg tipa i mutanata hDPP III uspoređene su mjerenjem cirkularnog dikroizma u rasponu valnih duljina od 190 do 260 nm. Prije mjerenja uzorci proteina su prebačeni u 20 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer, pH 7,4, a potom ugušćeni. CD je mjereno otopinama proteina koncentracija 0,3 do 0,5 mg mL<sup>-1</sup> u kvarcnim kivetama širine 0,1 mm. Podaci su obrađeni u programima *Microsoft Excel* i *OriginPro 7.5*.



## 4. Rezultati

### 4.1. Priprema mutiranih oblika D496G i S504G hDPP III

Ciljana mutageneza provedena je metodom produljenja početnica u PCR reakciji tzv. kružnom mutagenezom. Komplementarna DNA za ljudsku DPP III ugrađena u plazmidni vektor pET21a(+) služila je kao kalup početnicama koje su sadržavale mutaciju u odgovarajućem kodonu: GAT→GGT i TCC→GGT. Navedene mutacije odgovaraju supstituciji Asp496, odnosno Ser504 u Gly u aminokiselinskom slijedu ljudske DPP III. Nakon umnažanja kalupa, dvolančana DNA tretirana je restrikcijском endonukleazom *DpnI* čime su uklonjene molekule DNA koje ne sadrže mutaciju. Uspješnost PCR reakcije provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu (Slika 8.). Nakon transformacije XL10-Gold stanica *E. coli* smjesom tretiranom enzimom *DpnI*, razvijene kolonije na krutoj LB/amp podlozi potvrdile su uspješnost transformacije ovih stanica plazmidom koji sadrži sintetski biljeg za rezistenciju na antibiotik ampicilin. Za mutant D496G s podloge je odabrano 5 pojedinačnih kolonija, odnosno 3 za mutant S504G, koje su potom uzgojene preko noći, a zatim je iz svake izoliran plazmid. Uspješnost izolacije plazmida provjerena je elektroforezom na agaroznom gelu (Slika 8.). Vidljivo je da PCR reakcija uspješno provedena i da je plazmid iz svake kolonije izoliran i na gelu razdijeljen prema različitim oblicima, od superzavijenog do relaksiranog.

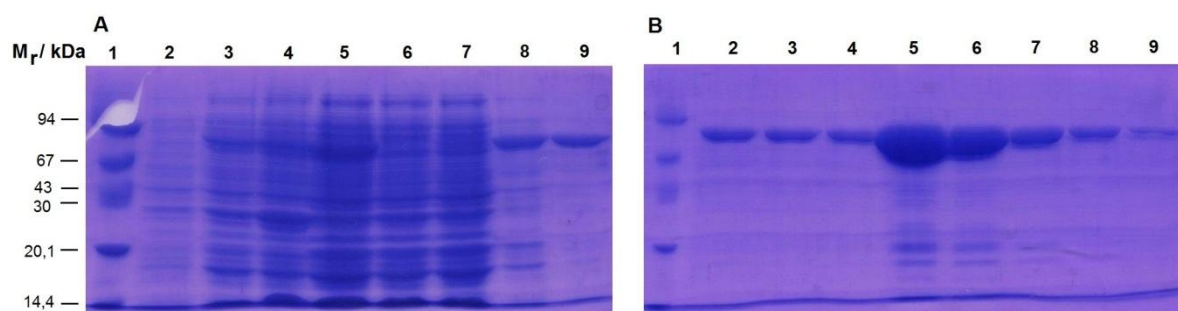


**Slika 8.** Agarozni gel bojan etidijevim bromidom nakon elektroforeze. **A** 1 – biljeg molekularnih masa, 2 – produkt PCR za ciljane mutageneze D496G prije razgradnje s *DpnI*, 3, 4, 5, 6, 7 – rekombinantni plazmidi s cDNA za mutant D496G izolirani iz 5 pojedinačnih kolonija. **B** 1 – biljeg molekularnih masa, 2 – produkt PCR za ciljane mutageneze S504G prije razgradnje s *DpnI*.

Radi potvrde uspješnosti ciljane mutageneze provedeno je sekvenciranje izoliranih plazmida čime je ustanovljena željena promjena kodona koji sada umjesto Asp, na poziciji 496 kodiraju Gly, odnosno umjesto Ser, na poziciji 504 kodiraju Gly. S plazmidom s ugrađenim mutantom D496G uspješno su transformirane 3 kolonije od 5, dok su u slučaju mutanta S504G sve 3 kolonije sadržavale rekombinantni plazmid. Za svaki je mutant odabran rekombinantni plazmid iz jedne kolonije bakterija kojim su transformirane elektrokompetentne stanice BL21-CodonPlus(DE3)RIL. Uspješnost transformacije potvrđena je nastankom bakterijskih kolonija na krutoj LB/amp podlozi.

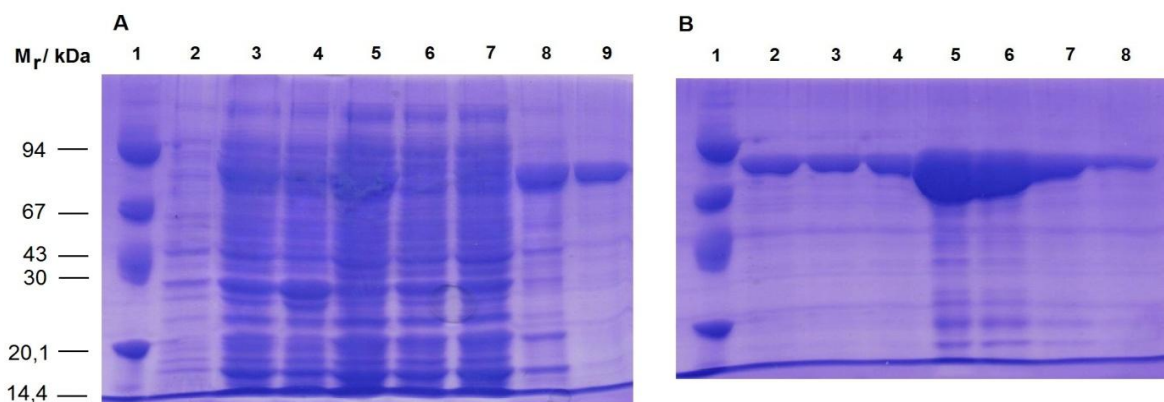
## 4.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje rekombinantnih proteina

Nakon uzgoja prekonoznih kultura transformiranih bakterijskih stanica BL21-CodonPlus(DE3)RIL uslijedila je prekomjerna ekspresija proteina od interesa u sustavu za ekspresiju pET. Induktor IPTG dodan je stanicama u logaritamskoj fazi rasta kada je vrijednost  $OD_{600}$  dosegla iznos od 0,6 do 0,8, jer se tada stanice najbrže dijele. Time je inducirana biosinteza RNA-polimeraze i proteina od interesa, mutanata DPP III. Kulture su uzgajane pri 18 °C kako bi se povećao udio topljivih rekombinantnih proteina. Uspješnost ekspresije rekombinantnih proteina provjerena je elektroforezom uzoraka prije i poslije indukcije (Slika 9. A). Pojava nove, intenzivno obojane vrpce, koja odgovara proteinu od interesa kod svakog od mutanata u uzorku nakon dodatka IPTG-a, ukazuje na prekomjernu ekspresiju ciljnog proteina tek nakon dodatka induktora. Prije dodatka IPTG-a postoji relativno niska bazalna ekspresija ciljnog proteina.



**Slika 9.** Ekspresija i tijek pročišćavanja mutanta D496G afinitetnom kromatografijom na Ni<sup>2+</sup>-NTA agarozu ilustrirani elektroforezom u denaturirajućim uvjetima u 10%-tnom poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). **A** 1 - niskomolekulski standardi, 2, 3 – ukupni proteini stanica bakterije *E. coli*, soj BL21-CodonPlus(DE3)RIL tijekom ekspresije rekombinantnog proteina prije (2) i nakon (3) dodatka IPTG-a, 4 - resuspendirani talog razorenih stanica, 5 – stanični lizat prije pročišćavanja, 6 – nevezana frakcija na Ni<sup>2+</sup>-NTA agarozu, 7 – 9 – frakcije tijekom ispiranja kolone puferom za ispiranje sastava: 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol dm<sup>-3</sup>, 20 mmol dm<sup>-3</sup> imidazol (w<sub>1</sub>-w<sub>3</sub>). **B** 1 - niskomolekulski standardi, 2 – frakcija w<sub>3</sub>, 3 - 9 – frakcije tijekom elucije puferom za eluciju sastava: 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol dm<sup>-3</sup>, 150 mmol dm<sup>-3</sup> imidazol (e<sub>1</sub>-e<sub>7</sub>), pH 8,0.

Mutanti hDPP III eksprimirani su kao fuzijski proteini s His<sub>6</sub>-privjeskom na C-kraju, veličine 743 aa i molekulske mase od ~83 kDa. His-privjesak omogućio je brzo i efikasno pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom u samo jednom koraku. Nakon razbijanja stanica sonikacijom, proteini DPP III-His<sub>6</sub> su pročišćeni iz topljive frakcije staničnog lizata na koloni Ni<sup>2+</sup>-NTA agaroze, a uspješnost pročišćavanja provjerena je pomoću SDS-PAGE (Slika 9. A, B). U stupcu 4 (Slika 9. A), u kojem se nalazi resuspendirani talog nakon razbijanja stanica, vidljivo je da se određena količina rekombinantnog proteina nalazi u netopljivom obliku, vjerojatno u inkluzijskim tijelima. Inkluzijska tijela nastaju uslijed agregacije krivo smotanih ili djelomično smotanih proteina, a takva je pojava najčešće nepoželjna jer dovodi do smanjenog prinosa rekombinantnog proteina. Smanjenjem temperature tijekom indukcije može se proteinu omogućiti ispravno smatanje i na taj način smanjiti količinu krivo smotanih proteina koji prelaze u inkluzijska tijela. Intenzivnija vrpca DPP III u proteinskom ekstraktu nakon lize stanica (uzorak u stupcu 5), ukazuje na činjenicu da se ovaj protein nalazi u značajno većoj količini u topljivom obliku u citosolu. Nevezana frakcija tijekom nanošenja uzorka i prva i druga frakcija tijekom ispiranja kolone sadrže proteine koji se nisu vezali na Ni<sup>2+</sup>-NTA agarozu ili su se nespecifično vezali slabim interakcijama. Određena količina ciljnog proteina isprana je s kolone i prije elucije puferom niske koncentracije imidazola, što može biti rezultat smanjenog kapaciteta kolone. Međutim, glavnina rekombinantnog proteina eluirana je niskom koncentracijom imidazola (frakcije e<sub>3</sub> i e<sub>4</sub>; Slika 9. B). U tim su frakcijama prisutne i male količine drugih proteina manje molekulske mase. Isti rezultat dobiven je i s drugim mutantom, S504G (Slika 10.).



**Slika 10.** Ekspresija i tijek pročišćavanja mutanta S504G afinitetnom kromatografijom na Ni<sup>2+</sup>-NTA agarozu ilustrirani elektroforezom u denaturirajućim uvjetima u 10%-tnom poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). **A** 1 - niskomolekulski standardi, 2, 3 – ukupni proteini stanica bakterije *E. coli*, soj BL21-CodonPlus(DE3)RIL tijekom ekspresije rekombinantnog proteina prije (2) i nakon (3) dodatka IPTG-a, 4 - resuspendirani talog razorenih stanica, 5 – stanični lizat prije pročišćavanja, 6 – nevezana frakcija na Ni<sup>2+</sup>-NTA agarozu, 7 – 9 – frakcije tijekom ispiranja kolone puferom za ispiranje sastava: 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol dm<sup>-3</sup>, 20 mmol dm<sup>-3</sup> imidazol (w<sub>1</sub>-w<sub>3</sub>). **B** 1 - niskomolekulski standardi, 2 – frakcija w<sub>3</sub>, 3 - 8 – frakcije tijekom elucije puferom za eluciju sastava: 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol dm<sup>-3</sup>, 150 mmol dm<sup>-3</sup> imidazol (e<sub>1</sub>-e<sub>6</sub>), pH 8,0.

Semikvantitativnim testom određena je relativna aktivnost pojedinih frakcija nakon pročišćavanja. Postupak je detaljno opisan u poglavlju 3.3.6. Najintenzivnije obojenje reakcijske smjese vidljivo je u frakcijama  $e_3$  i  $e_4$  te topljivoj frakciji staničnog lizata, što je očekivano jer je iz njega izoliran ciljni protein. Frakcijama je izmjerena i koncentracija proteina metodom po Bradfordu čime je potvrđena najveća koncentracija proteina u frakcijama  $e_3$  i  $e_4$  te iznosi 3,6 i 2,6 mg mL<sup>-1</sup> kod mutanta D496G, odnosno 4,55 i 2,31 mg mL<sup>-1</sup> kod S504G. Frakcije  $e_3$  i  $e_4$  su spojene, odsoljene, prebačene u pufer sastava: 20 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl, 1 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, pH 7,4 i pohranjene na -8 °C uz dodatak glicerola. U svim sljedećim eksperimentima, za određivanje aktivnosti, bilo je potrebno prirediti razrjeđenja pročišćenog enzimskog preparata spremljenog u glicerolu na -8 °C (s 10 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl puferom pH 7,4).

### 4.3. Specifična aktivnost divljeg tipa i mutanata hDPP III-His<sub>6</sub>

Najprije je počišćenim uzorcima enzima pohranjenih u glicerolu izmjerena koncentracija metodom po Bradfordu. Baždarni pravac izrađen je mjerenjem apsorbancije poznatih koncentracija BSA u rasponu od 0 do 81,5 µg mL<sup>-1</sup>. Koncentracije i molekulske mase enzima prikazane su u Tablici 3. Preparat divljeg tipa hDPP III-His<sub>6</sub> pripremila je dr. Nina Jajčanin-Jozić za potrebe produkcije antitijela.

**Tablica 3.** Masena i množinska koncentracija preparata divljeg tipa i mutanata hDPP III-His<sub>6</sub>. Masena koncentracija određena je metodom po Bradfordu kako je opisano u poglavlju 3.3.5.

hDPP III-His <sub>6</sub>	$\gamma$ (mg mL <sup>-1</sup> )	$c$ (µmol dm <sup>-3</sup> )	$M_r$ (Da)
Divlji tip	0,259	3,11	83412
D496G	0,617	7,40	83354
S504G	0,546	6,55	83382

Radi određivanja supstratne specifičnosti divljeg tipa i mutanata hDPP III određena je specifična aktivnost ovih triju enzima uz tri različita dipeptidil-2-naftilamidna supstrata: Arg<sub>2</sub>-2NA, Phe-Arg-2NA i Ala-Arg-2NA. Test je proveden pri pH 8,6 uz prisutnost iona Co<sup>2+</sup> na način opisan u poglavlju 3.3.6. Produkt hidrolize detektiran je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 530 nm. Da bi se ugrubo usporedila supstratna specifičnost divljeg tipa i mutanata hDPP III, izračunata je specifična aktivnost izražena u µmol supstrata hidroliziranog po minuti i miligramu enzima. U računanju su korištene prethodno izmjerene koncentracije enzima (Tablica 4.). Baždarni pravac izrađen je mjerenjem apsorbancije 2-naftilamina

poznatih koncentracija u rasponu od 1,0 do 60,0  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ . Molarni apsorpcijski koeficijent iznosi 25958  $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$ . Rezultati pokazuju da najveću aktivnost prema preferiranom supstratu Arg<sub>2</sub>-2NA ima divlji tip enzima, dok su mutanti nešto slabije aktivni. Prema Arg<sub>2</sub>-2NA zabilježeno je 26 %-tno (D496G) i 60 %-tno (S504G) očuvanje aktivnosti divljeg tipa. Phe-Arg-2NA je najmanje preferiran supstrat za sva tri enzima.

**Tablica 4.** Specifična aktivnost divljeg tipa i mutanata hDPP III-His<sub>6</sub> prema dipeptidil-2-naftilamidima. Enzimi su inkubirani pri temperaturi od 37 °C u 50  $\text{mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl puferu, pH 8,6 s 50  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  CoCl<sub>2</sub> i odgovarajućim supstratom konačne koncentracije 40  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ . Nakon 15 min reakcija je zaustavljena zakiseljavanjem uz dodatak FBB soli kako je opisano u poglavlju 3.3.6.

Supstrat	Specifična aktivnost ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )		
	Divlji tip	D496G	S504G
Arg-Arg-2NA	39,66	10,36	23,99
Phe-Arg-2NA	3,97	4,04	2,54
Ala-Arg-2NA	4,66	10,99	3,67

Zbog veće preglednosti, rezultati su izraženi kao relativne aktivnosti, uzimajući aktivnost uz Arg<sub>2</sub>-2NA kao 100 %-tnu (Tablica 5.). Rezultati pokazuju da divlji tip i mutant S504G preferiraju supstrat Arg<sub>2</sub>-2NA. Ostala dva supstrata hidrolizirana su znatno sporije, oko 10 puta s divljim tipom i mutantom S504G. Međutim, mutant D496G podjednako je hidrolizirao Arg<sub>2</sub>-2NA i Ala-Arg-2NA, a aktivnost uz Phe-Arg-2NA bila je oko 2,5 puta manja.

**Tablica 5.** Relativna aktivnost divljeg tipa i mutanata hDPP III-His<sub>6</sub> prema dipeptidil-2-naftilamidima. Enzimska reakcija je provedena na način opisan uz Tablicu 4.

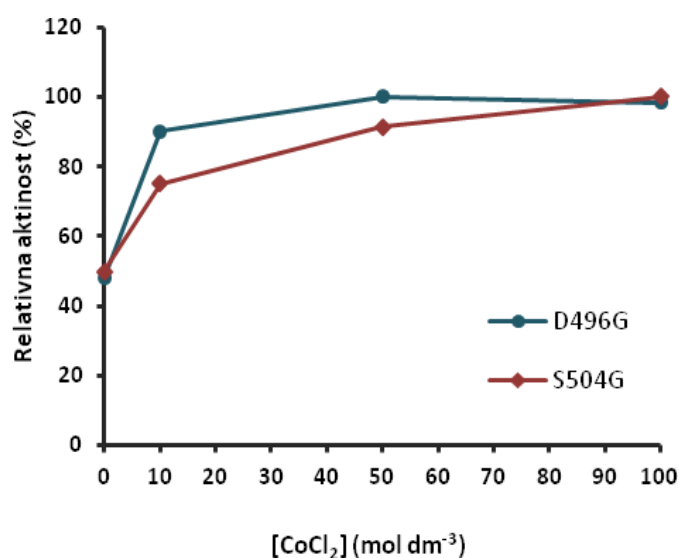
Supstrat	Relativna aktivnost (%)		
	Divlji tip	D496G	S504G
Arg-Arg-2NA	100	100	100
Phe-Arg-2NA	10	39	11
Ala-Arg-2NA	12	106	15

#### 4.4. Utjecaj pH i koncentracije iona Co<sup>2+</sup> na aktivnost

Prije određivanja kinetičkih parametara bilo je potrebno ustanoviti optimalne uvijete djelovanja enzima. Obzirom da aktivnost ljudske DPP III *in vitro* ovisi o pH otopine, a najveća je u rasponu od 8,0-9,0<sup>2</sup>, ispitana je ovisnost specifične aktivnosti mutanata pri pH 8,0 i 8,6 uz sva tri supstrata. Rezultati su pokazali da je aktivnost oba mutanta nešto veća pri pH

8,6 u odnosu na pH 8,0 za sve supstrate, osim Phe-Arg-2NA. Budući da su kinetička mjerenja analognih mutanata kvaščeve DPP III provedena pri pH 8,0<sup>25</sup>, radi usporedbe, s hDPP III kinetička mjerenja ću izvršiti pri istom pH. Manja aktivnost mutanata hDPP III pri pH 8,0 od samo ~20 % u odnosu na pH 8,6 ne bi trebao značajno utjecati na kinetička mjerenja.

Pokazano je da prisutnost iona  $\text{Co}^{2+}$  uzrokuje povećanje aktivnosti divljeg tipa rekombinantne hDPP III, stoga je ispitan utjecaj  $\text{Co}^{2+}$  na specifičnu aktivnost mutanata pri različitim koncentracijama  $\text{CoCl}_2$  pri pH 8,6 uz preferirani supstrat Arg<sub>2</sub>-2NA (Slika 11.). Vidljivo je da aktivnost mutanata raste s povećanjem koncentracije iona  $\text{Co}^{2+}$  čime je potvrđen aktivirajući utjecaj iona kobalta. Najveća aktivnost uočena je u rasponu koncentracija  $\text{CoCl}_2$  od 50 do 100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ .

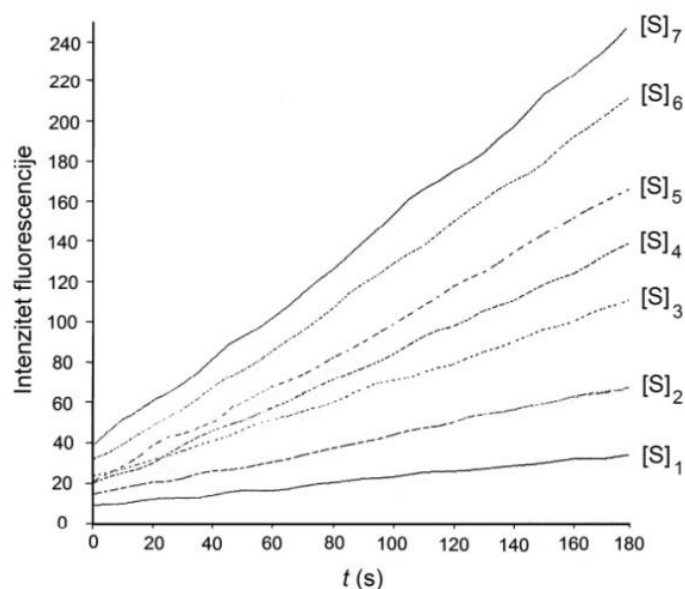


**Slika 11.** Utjecaj koncentracije iona  $\text{Co}^{2+}$  na aktivnost mutanata hDPP III. Enzimi su inkubirani pri temperaturi od 37 °C u 50  $\text{mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl puferu, pH 8,6 s koncentracijama  $\text{CoCl}_2$  0, 10, 50 i 100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  i s Arg<sub>2</sub>-2NA konačne koncentracije 40  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ . Nakon 15 min reakcija je zaustavljena zakiseljavanjem uz dodatak FBB soli.

#### 4.5. Kinetička karakterizacija mutanata i divljeg tipa hDPP III

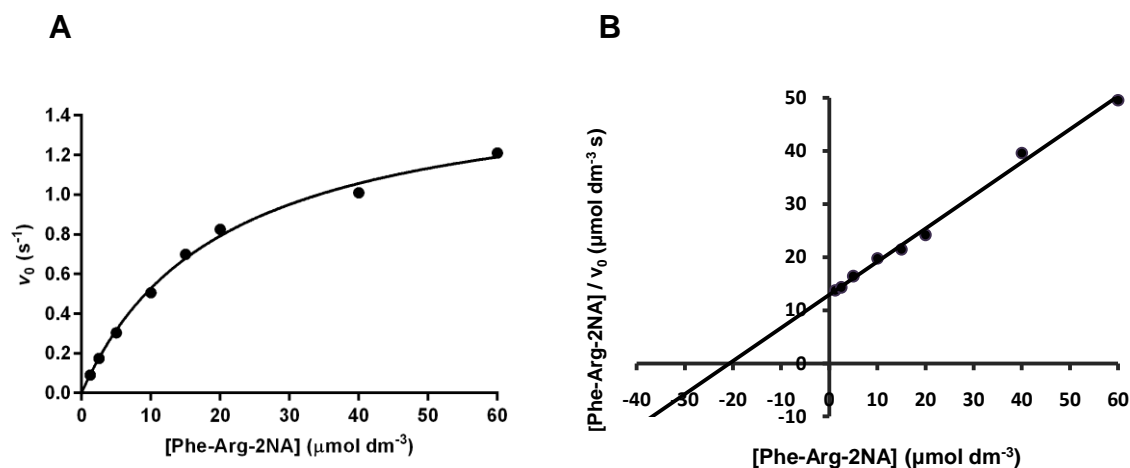
Kinetička mjerenja omogućuju bolju korelaciju s aktivnošću enzima i daju detaljan uvid u svojstva enzimski katalizirane reakcije. Poznavanjem kinetičkih parametara moguće je međusobno usporediti svojstva različitih enzimskih reakcija. U ovom ću slučaju uspoređivati svojstva reakcija mutanata i divljeg tipa hDPP III-His<sub>6</sub> s tri različita supstrata mjerenjem kinetike ustaljenog stanja. Reakcije su provedene pri pH 8,0 uz 50  $\mu\text{mol dm}^{-3}$   $\text{CoCl}_2$  pri sobnoj temperaturi (25 °C). Reakcijska smjesa sadržavala je veliki molarni suvišak supstrata u

odnosu na enzim prilikom čega se prati mnogo obrta enzima zbog zasićenja enzima supstratom. Praćen je porast intenziteta fluorescencije nastalog produkta 2-naftilamina u trajanju od 3 min pri različitim koncentracijama supstrata. Vremenski tijekovi za reakciju mutanta S504G (koncentracija u reakcijskoj smjesi iznosi  $0,546 \text{ nmol dm}^{-3}$ ) sa supstratom Phe-Arg-2NA u rasponu koncentracija od  $2,5$  do  $80 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  prikazani su na Slici 12.



**Slika 12.** Vremenski tijek za reakciju hidrolize supstrata Phe-Arg-2NA kataliziranu mutantom S504G hDPP III prikazan porastom koncentracije produkta s vremenom (kod rastućih koncentracija supstrata ( $[S]_1 \rightarrow [S]_7$ ) u rasponu od  $2,5$  do  $60 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ).

Iz vremenskih tijekova računaju se iznosi početnih brzina reakcije  $v_0$  uzimajući u obzir samo početni dio krivulje gdje je promjena koncentracije produkta u vremenu linearna. Ovisnost početnih brzina reakcije o koncentraciji supstrata prikazuje se grafički i naziva se Michaelis-Mentenina krivulja (Slika 13. A). Iz Michaelis-Mentenine jednadžbe pravokutne hiperbole određeni su kinetički parametri  $K_m$  i  $V_{max}$  nelinearnom regresijom u programu *GraphPad Prism 6*. Kinetički su parametri određeni i Hanes-Woolf linearizacijom Michaelis-Mentenine jednadžbe ( $[S]/v_0$  prema  $[S]$ ) u programu *Microsoft Excel* (Slika 13. B). Pri tome je nagib pravca jednak  $1/V_{max}$ , a odsječak na  $x$ -osi  $-K_m$ .



**Slika 13.** **A** Prikaz Michelis-Menteninog modela brzine hidrolize supstrata Phe-Arg-2NA s DPP III (izrađeno u programu *GraphPad Prism 6*). **B** Hanes-Woolf linearizacija Michaelis-Mentenine jednačbe (izrađeno u programu *Microsoft Excel*).

Za svaku kombinaciju supstrata i enzima izvedena su po 2 neovisna kinetička mjerenja, a rezultati su prikazani kao njihove srednje vrijednosti (Tablica 6.). Iz poznate koncentracije enzima i  $V_{\max}$  računa se kinetički parametar  $k_{\text{cat}}$  često opisan kao obrtni broj enzima. Konstanta specifičnosti  $k_{\text{cat}}/K_m$  odražava katalitičku efikasnost enzima. Supstitucija Asp496 s Gly rezultirala je povećanjem vrijednosti  $K_m$  10 puta uz preferirani supstrat divljeg tipa hDPP III, Arg<sub>2</sub>-2NA, dok je vrijednost  $k_{\text{cat}}$  gotovo podjednaka za sva tri enzima. Kao posljedica toga, katalitička efikasnost mutanta D496G uz Arg<sub>2</sub>-2NA je 8 puta manja, za razliku od mutanta S504G, koji pak pokazuje neznatno veću katalitičku efikasnost od divljeg tipa.

Uz supstrat Phe-Arg-2NA i mutant D496G uočeno je dvostruko smanjenje  $k_{\text{cat}}$  i  $K_m$  od 5 puta što donosi 2,5 puta povećanu katalitičku efikasnost. Supstitucija Ser504 u Gly uz isti supstrat nije dovela do značajne promjene kinetičkih parametara. U slučaju najlošijeg supstrata Ala-Arg-2NA ustanovljen je porast katalitičke efikasnosti 5 puta s mutantom D496G (6,5 puta smanjen  $K_m$ ), dok s mutantom S504G nema značajnije promjene. Iz rezultata je također vidljiva razlika u katalitičkoj efikasnosti divljeg tipa i mutanta S504G prema različitim supstratima. Naime, konstanta specifičnosti je 15, odnosno 20 puta manja uz Phe-Arg-2NA obzirom na preferirani supstrat, te 40, odnosno 35 puta manja uz Ala-Arg-2NA. Mutant D496G pokazuje podjednaku katalitičku efikasnost prema Arg<sub>2</sub>-2NA i Ala-Arg-2NA te nešto veću katalitičku efikasnost prema Phe-Arg-2NA.



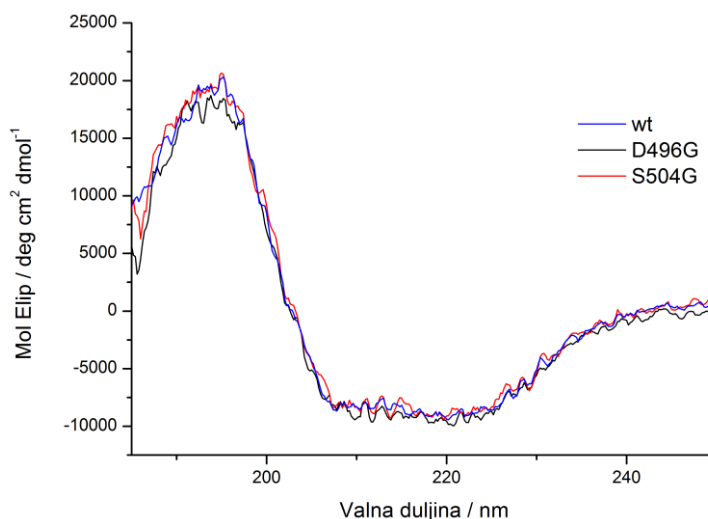
**Tablica 6.** Kinetički parametri reakcije hidrolize 2-naftilamidnih supstrata s divljim tipom i mutantima hDPP III izračunati iz ovisnosti početnih brzina reakcija o koncentraciji supstrata. Enzimi su predinkubirani u 17 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl puferu, pH 8,0 i 50 μmol dm<sup>-3</sup> CoCl<sub>2</sub> pri sobnoj temperaturi. Mjerenje fluorescencije produkta započeto je nakon dodatka supstrata pri valnoj duljini od 420 nm u trajanju od 180 s.

Supstrat	$K_m$ (μmol dm <sup>-3</sup> )			$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )			$k_{cat}/K_m$ (mmol <sup>-1</sup> dm <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> )		
	wt	D496G	S504G	wt	D496G	S504G	wt	D496G	S504G
Arg-Arg-2NA	3,8	40,7	3,9	21,6	30,3	33,5	5684,2	744,5	8589,7
Phe-Arg-2NA	20,3	3,9	18,6	8,0	4,1	8,2	394,1	1051,3	440,9
Ala-Arg-2NA	101,1	16,0	92,7	14,1	10,3	22,7	139,5	643,8	244,9

Prikazane su srednje vrijednosti dvaju mjerenja. Podaci su dobiveni nelinearnom regresijom u programu *GraphPad Prism 6*.

#### 4.6. Usporedba sekundarne strukture mutanata i divljeg tipa hDPP III

Mjerenje cirkularnog dikroizma korišteno je za provjeru utjecaja mutacija Asp496 → Gly i Ser504 → Gly na sekundarnu strukturu DPP III. Usporedbom CD spektara divljeg tipa i mutanata hDPP III-His<sub>6</sub> može se zaključiti da uvođenjem navedenih mutacija Asp496 i Ser504 nije značajno narušena niti promijenjena sekundarna struktura ljudske DPP III. Sva tri spektra prikazana su u superpoziciji na Slici 14.



**Slika 14.** Analiza cirkularnim dikroizmom. CD spektri divljeg tipa ljudske DPP III-His<sub>6</sub> (označeno s wt) i mutanata D496G i S504G. Mjerenje je izvedeno u 20 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatnom puferu, pH 7,4 uz duljinu puta svjetlosti 0,1 mm u rasponu valnih duljina od 190 do 260 nm pri temperaturi od 20 °C na instrumentu *BioSpec-nano Micro-volume UV-VIS Spectrophotometer*. Koncentracije enzima bile su između 0,3 i 0,5 mg mL<sup>-1</sup>.

## 5. Rasprava

Dipeptidil-peptidaza III je prvi puta identificirana po svojoj relativno specifičnoj aktivnosti odcjepljivanja dipeptida s Arg-Arg-2-naftilamida, supstrata koji se i danas preferentno upotrebljava u ispitivanjima aktivnosti ovog enzima<sup>2</sup>. Međutim, baš je s ovim supstratom ustanovljena značajna razlika u aktivnosti kvaščeve i ljudske DPP III, čije su kristalne strukture nedavno riješene<sup>13,15,17</sup>. Upravo objavljena usporedna kinetička analiza je otkrila da ljudska, ali ne i kvaščeve DPP III preferira Arg<sub>2</sub>-2NA, te da kvaščev enzim znatno sporije hidrolizira navedeni supstrat. Vrijednost  $k_{cat}/K_m$  enzima iz kvasca čak je 620 puta manja s naglaskom na katalitičku konstantu  $k_{cat}$  (Tablica 7.)<sup>25</sup>. Ljudski enzim izvede 20 transformacija supstrata u produkt u sekundi, za razliku od kvaščevog koji znatno sporije obrne supstrat s manje od 1 transformacije u sekundi. Osim toga, uočeno je da hDPP III ima znatno veću katalitičku efikasnost za sva tri dipeptidil-arilamidna supstrata koji imaju Arg na poziciji P1 (Tablica 7.). K tome, yDPP III nije pokazala značajnu sklonost prema jednome od njih. Uz to, ispitana je i aktivnost prema dva supstrata koji umjesto 2-naftilamidne skupine imaju 7-amino-4-metilkumarilamidnu (AMC) skupinu. Promjenom kemijske skupine u P1' mjestu supstrata dobiveni su slični odnosi kinetičkih parametara, pri čemu je yDPP III bila puno manje efikasna od hDPP III. Time je utvrđeno da velika razlika u aktivnosti ova dva enzima nije uzrokovana velikom hidrofobnom 2-naftilamidnom skupinom u P1' mjestu supstrata, odnosno razlikama u S1' podmjestu enzima.

**Tablica 7.** Kinetička analiza divljeg tipa ljudske i kvaščeve DPP III. Preuzeto iz literaturnog izvora<sup>25</sup>.

Supstrat	$K_m$ ( $\mu\text{mol dm}^{-3}$ )		$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )		$k_{cat}/K_m$ ( $\text{mmol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}$ )	
	hDPP III	yDPP III	hDPP III	yDPP III	hDPP III	yDPP III
Arg-Arg-2NA	2,2	12,0	20,5	0,18	9318,2	15,0
Phe-Arg-2NA	20,9	22,8	10,9	0,74	521,5	32,5
Ala-Arg-2NA	76,3	89,0	16,1	1,49	180,9	16,7

Da bi se utvrdili strukturni elementi koji utječu na razliku u aktivnosti i supstratnoj specifičnosti ovih dvaju enzima, uspoređene su njihove primarne strukture. Iako identičnost njihovih aminokiselinskih sljedova iznosi samo 36 %<sup>3</sup>, trodimenzionalne strukture bez liganada pokazuju značajnu homologiju, posebno u aktivnom mjestu<sup>2</sup>. Kristalna struktura kompleksa hDPP III s pentapeptidnim ligandom omogućila je uvid u interakcije enzima sa supstratom<sup>17</sup>. Iz podataka o ovoj kristalnoj strukturi utvrđen je aminokiselinski sastav

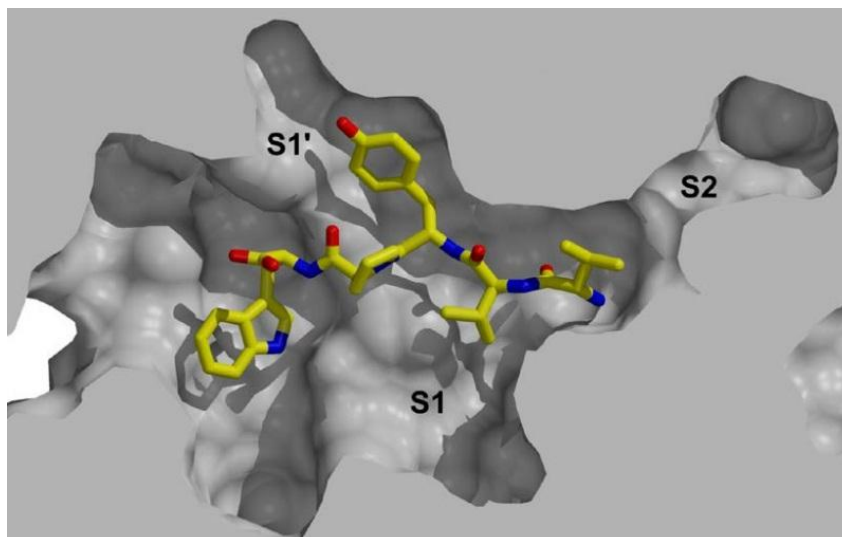
podmjesta S2-S3' u aktivnom mjestu enzima koja sudjeluju u vezanju odgovarajućih aminokiselina peptidnog supstrata. Aminokiseline podmjesta S2-S2' hDPP III uspoređene su sa strukturno ekvivalentnim aminokiselinskim ostacima u yDPP III na temelju sravnjenja primarnih sljedova ljudskog i kvašćevog enzima<sup>25,26</sup>. Sva su podmjesta sadržavala identične aminokiseline osim podmjesta S2, u kojem su ustanovljene samo 2 različite aminokiseline, od 13 aminokiselinskih ostataka koji grade ovo podmjesto u ljudskom enzimu (Asp496 i Ser504 u ljudskoj, odnosno Gly505 i Gly510 u kvašćevoj DPP III; Tablica 8.). Dva navedena aminokiselinska ostatka su općenito varijabilna u metalopeptidaznoj obitelji M49. Podmjesto S2 smješta aminokiselinu s N-kraja supstrata u aktivno mjesto enzima i ima značajnu ulogu u vezanju supstrata i hidrolizi (opisano u poglavlju 2.4.; Slika 15.).

**Tablica 8.** Aminokiselinski ostaci podmjesta S2 u veznom mjestu supstrata hDPP III i yDPP III. Podebljane su aminokiseline po kojima se razlikuju<sup>17</sup>.

Enzim	Aminokiselinski ostaci
hDPP III	Glu316, Ile390, Asn391, Ile392, Asn394, Asp396, Arg399, His455, Trp495, <b>Asp496</b> , <b>Ser504</b> , Glu507, Glu508
yDPP III	Glu324, Ile399, Asn400, Ile401, Asn403, Asp405, Arg408, His465, Trp504, <b>Gly505</b> , <b>Gly510</b> , Glu513, Glu514

Pretpostavili smo da povećana aktivnost ljudskog enzima u odnosu na kvašćev proizlazi iz razlike u strukturi podmjesta S2 (Slika 16., Tablica 8.). Iz tog smo razloga ciljanom mutagenezom priredili dva jednostruka mutanta hDPP III, Asp496Gly i Ser504Gly, i ispitali njihova svojstva.

Uspješnost ciljane mutageneze potvrđena je sekvenciranjem rekombinantne plazmidne DNA. Oba su mutanta ekspimirana kao fuzijski proteini s His-privjeskom na C-kraju proteina u soju BL21-CodonPlus(DE3)RIL kompetentnih stanica *E. coli*. Ekspresija je provedena pri temperaturi od 18 °C da bi se proteinima omogućilo pravilno smatanje i time povećao udio topljivog oblika. Zadovoljavajuća količina proteina nalazila se u lizatu stanica, iako je elektroforezom u poliakrilamidnom gelu uz prisutnost SDS-a uočeno i nastajanje inkluzijskih tijela, netopljivih agregata nepotpuno smotanih proteina. Oba mutirana oblika (Asp496Gly i Ser504Gly) uspješno su pročišćena afinitetnom kromatografijom na Ni<sup>2+</sup>-NTA agarozu. Otopine enzima pohranjene u glicerolu ( $\varphi = 0,22$ ) pri temperaturi -8 °C nisu izgubile aktivnost tijekom tri mjeseca ispitivanja.

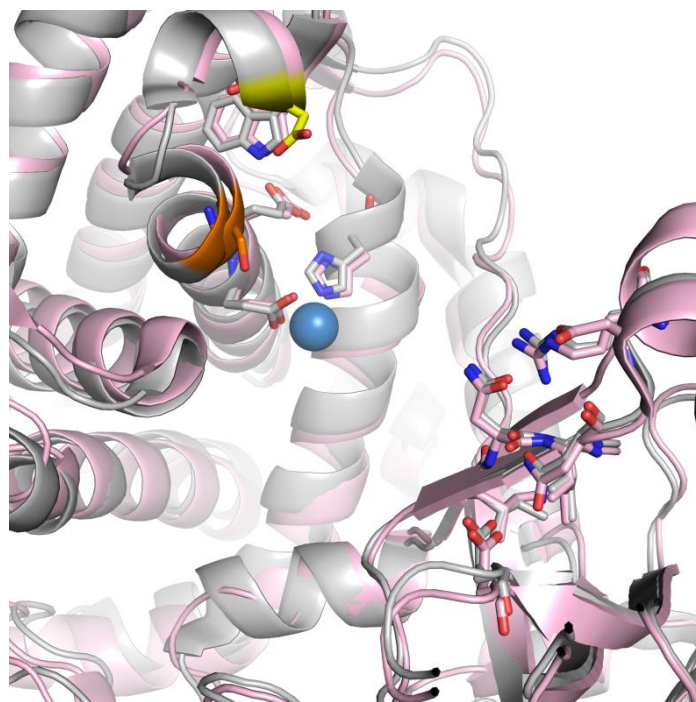


**Slika 15.** Prikaz površine veznog mjesta pentapeptidnog supstrata (VVYPW) u hDPP III. Vezani peptid prikazan je štapićastim modelom. Naznačena su podmjesta enzima S2, S1 i S1'. Preuzeto iz literaturnog izvora<sup>17</sup>.

Strukturne karakteristike pročišćenih mutanata ispitane su analizom cirkularnim dikroizmom (CD) i uspoređene s divljim tipom. U CD spektrima se ne uočavaju bitne razlike (Slika 14.). Iz toga se može zaključiti da supstitucija Asp496 i Ser504 s Gly nije uzrokovala promjenu sekundarne strukture proteina. Dakle, razlike u enzimskoj aktivnosti mutanata i divljeg tipa ne proizlaze iz pogrešaka u postizanju pravilne sekundarne strukture proteina.

Standardnim testom aktivnosti (opisano u poglavlju 3.3.6.) ispitana je aktivnost mutanata i divljeg tipa za hidrolizu tri različita dipeptidil-2-naftilamidna supstrata (Tablice 4. i 5.). Važno je naglasiti da su pripremljeni mutanti hDPP III imali specifičnu hidrolitičku aktivnost prema ovim supstratima usporedivu (istog reda veličine) s aktivnošću divljeg tipa. Nasuprot tome, mutanti kvaščeve DPP III, G505 i G413S, bili su značajno (5 do 200 puta) slabije aktivni prema dipeptidil-arilamidnim supstratima od divljeg tipa yDPP III<sup>25</sup>.

Rezultati ljudske DPP III u ovom radu pokazuju da divlji tip hDPP III preferira Arg<sub>2</sub>-2NA s 10 puta većom aktivnošću u odnosu na ostala 2 supstrata. Takva supstratna specifičnost divljeg tipa u skladu je s objavljenim podacima<sup>27</sup>, gdje je Ala<sub>2</sub>-2NA znatno sporije hidroliziran od Arg<sub>2</sub>-2NA (oko 60 puta). To potvrđuje činjenicu da je hDPP III specifična prema diarginilnom-naftilamidnom supstratu. Mutant S504G ponašao se vrlo slično divljem tipu što implicira da zamjenom Ser504 glicinom nije došlo do promjene u supstratnoj specifičnosti hDPP III. Za razliku od ljudskog, literaturni podaci ukazuju da je kvaščev enzim puno manje selektivan prema dipeptidil-arilamidnim supstratima<sup>28</sup>. Tako je npr. uz Ala<sub>2</sub>-2NA zadržano čak 60 % aktivnosti kvaščevog enzima prema Arg<sub>2</sub>-2NA. U ovom radu već je određivanje specifične aktivnosti ukazivalo da je zamjena Asp496 glicinom smanjila selektivnost ljudske DPP III prema dipeptidil-2-naftilamidnom supstratu.



**Slika 16.** Superpozicija kristalnih struktura yDPP III (sivo) i hDPP III (ružičasto) bez liganda u regiji aktivnog mjesta. Ion  $Zn^{2+}$  prikazan je plavom kuglicom, a aminokiselinski ostaci koji čine podmjesto S2 prikazani su štapićastim modelom. Asp496 (Gly505) obojen je žuto, a Ser504 (Gly513) narančasto. Preuzeto iz literaturnog izvora<sup>25</sup>.

Kako bismo kvantitativno izrazili katalitičku efikasnost enzima, pristupili smo kinetičkoj karakterizaciji mutanata i divljeg tipa hDPP III mjerenjem kinetike ustaljenog stanja. Prethodno smo utvrdili da prisutnost  $Co^{2+}$  (10 do 100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ) aktivira oba mutanta uz dvostruko povećanje aktivnosti. Ti su podaci u skladu s literaturom gdje je pokazano da je divlji tip hDPP III najaktivniji pri koncentraciji  $CoCl_2$  od 50  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ <sup>10</sup>. Odredili smo i optimalan pH za enzimsku aktivnost mutanata koji je jednak divljem tipu hDPP III iz eritrocita<sup>10</sup>. Sve tri enzimске forme bile su najaktivnije uz supstrat Arg<sub>2</sub>-2NA pri pH 8,6. Kinetička mjerenja izvedena su pri pH 8,0 i u prisutnosti 50  $\mu\text{mol dm}^{-3}$   $CoCl_2$  radi usporedbe s literaturnim podacima za kvaščeve mutanate<sup>25</sup>.

Katalitička svojstva enzima izražena su kinetičkim parametrima  $K_m$  i  $k_{cat}$  prikazanim u Tablici 6. Uz Arg<sub>2</sub>-2NA uočeno je deseterostruko povećanje Michaelisove konstante  $K_m$  uzrokujući smanjenje katalitičke efikasnosti mutanta D496G 7,5 puta u odnosu na divlji tip. Ova činjenica upućuje na moguću važnu ulogu Asp496 u vezanju supstrata. Supstitucijom negativno nabijenog aminokiselinskog ostatka u glicin, koji je malen i neutralan, došlo je do lokalne promjene strukture i svojstava u S2 podmjestu enzima. Negativan elektrostatski potencijal kojeg stvara Asp u divljem tipu smanjen je mutacijom u Gly, pa bi to mogao biti razlog slabijeg vezanja pozitivno nabijenog bočnog ostatka N-terminalnog Arg u podmjesto S2.

Budući da je ispitivan utjecaj dvaju konstituenata podmjesta S2 u vezanju supstrata, u kinetičkim eksperimentima upotrijebljeni su supstrati s različitim aminokiselinskim ostacima u ekvivalentnoj poziciji u supstratu, mjestu P2. U njima je pozitivno nabijen Arg zamijenjen neutralnim hidrofobnim aminokiselinama Phe i Ala. Divlji tip hDPP III je bio 15, odnosno 40 puta slabije aktivan uz ova dva supstrata sa značajnim povećanjem vrijednosti  $K_m$ . Sklonost hDPP III prema diarginilnom supstratu bila je vidljiva i na razini specifične aktivnosti.

Mutant S504G ponašao se gotovo identično divljem tipu hDPP III. Njegova selektivnost prema Arg<sub>2</sub>-2NA, pokazana već i na razini specifične aktivnosti, potvrđena je određivanjem hidrolitičke efikasnosti za ovaj supstrat koja je bila 20, odnosno 35 puta veća u odnosu na ostala dva supstrata (Tablica 6.). Aktivnost uz Arg<sub>2</sub>-2NA i Ala-Arg-2NA ovog mutanta bila je čak nešto veća u odnosu na divlji tip. Na to utječe veća konstanta  $k_{cat}$ , koja ukazuje na bržu pretvorbu ovih supstrata u produkt kod mutanta. Zamjenom drugog aminokiselinskog ostatka koji razlikuje podmjesto S2 ljudske i kvaščeve DPP III, Ser504, nije došlo do očekivane promjene u hidrolitičkim svojstvima enzima. Iz toga se može zaključiti da Ser504 nije bitan za enzimsku aktivnost hDPP III prema dipeptidil-arilamidnim supstratima. Međutim, ista tvrdnja ne vrijedi za strukturni ekvivalent kvaščevoeg enzima, iako je neselektivan kao i divlji tip. Naime, specifična aktivnost mutanta G513S yDPP III prema sva tri ispitana dipeptidil-arilamidna supstrata značajno je niža, kao i katalitička efikasnost za reakciju hidrolize Arg<sub>2</sub>-2NA<sup>25</sup>.

Najznačajniji rezultat ovog istraživanja je opažanje da zamjena Asp u poziciji 496 aminokiselinskog slijeda hDPP III glicinom uzrokuje gubitak selektivnosti enzima prema dipeptidil-arilamidnim supstratima i to uglavnom zbog promjene  $K_m$  vrijednosti. Ova točkasta mutacija ima za posljedicu 10 puta veću vrijednost  $K_m$  za preferirani supstrat ljudske DPP III, Arg<sub>2</sub>-2NA (Tablica 6.). Zanimljivo je da je isti parametar 5, odnosno 6 puta niži za druga dva supstrata: Phe-Arg-2NA i Ala-Arg-2NA. Budući da se  $k_{cat}$  u odnosu na divlji tip nije značajnije mijenjalo, katalitička efikasnost  $k_{cat}/K_m$  ovog mutanta za sva tri supstrata tipa X-Arg-2-naftilamid bila je podjednaka. Mutant kvaščeve DPP III, G505D, koji odgovara mutantu D496G ljudske, iako značajno manje aktivan od divljeg tipa, pokazivao je 8 puta povećanu vrijednost  $K_m$  za Arg<sub>2</sub>-2NA, tj. povećanu selektivnost za taj supstrat<sup>25</sup>. Ova činjenica govori u prilog važnosti ostatka Asp u poziciji 496 za postizanje selektivnosti divljeg tipa ljudske DPP III prema dipeptidil-arilamidnim supstratima.

## 6. Zaključci

1. Ciljanom mutagenезom priređeni su mutirani oblici D496G i S504G ljudske DPP III-His<sub>6</sub>.
2. Mutirani oblici su uklonirani u ekspresijski vektor pET21a(+) i eksprimirani u soju bakterije *Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)RIL uz dodatak IPTG-a.
3. Prekomjerno eksprimirani mutirani proteini D496G i S504G pročišćeni su iz topljivih frakcija lizata bakterijskih stanica afinitetnom kromatografijom na koloni Ni<sup>2+</sup>-NTA agaroze.
4. Mjerenjem cirkularnog dikroizma ustanovljeno je da uvođenjem mutacija nije došlo do promjene u strukturi DPP III.
5. Pročišćenim rekombinantnim proteinima određeni su kinetički parametri  $k_{cat}$  i  $K_m$  za hidrolizu tri dipeptidil-arilamidna supstrata: Arg-Arg-2-naftilamida (Arg<sub>2</sub>-2NA), Phe-Arg-2NA i Ala-Arg-2NA pri pH 8,0 i 25 °C uz prisutnost 50 μmol dm<sup>-3</sup> CoCl<sub>2</sub>, i uspoređeni s katalitičkim parametrima divljeg tipa ljudske DPP III-His<sub>6</sub>.
6. Supstitucijom ostatka Ser504 s Gly nije došlo do promjene katalitičkih svojstava enzima. Ovaj mutant preferirao je Arg-Arg-2NA kao supstrat, isto kao i divlji tip, i hidrolizirao ga čak s nešto većom katalitičkom efikasnošću ( $k_{cat}/K_m$ ).
7. Zamjena ostatka Asp496 s Gly uzrokovala je značajnu promjenu Michaelisove konstante za sva tri ispitana supstrata: povećanje od 10 puta za Arg<sub>2</sub>-2NA, a smanjenje od 5, odnosno 6 puta za Phe-Arg-2NA i Ala-Arg-2NA u odnosu na  $K_m$  divljeg tipa. Istovremeno, nije uočena značajna promjena  $k_{cat}$  niti za jedan supstrat u odnosu na divlji tip, pa je katalitička efikasnost mutanta D496G za sva tri supstrata bila podjednaka.
8. Dobiveni rezultati govore u prilog važnosti ostatka Asp u poziciji 496 za postizanje selektivnosti divljeg tipa ljudske DPP III prema dipeptidil-arilamidnim supstratima.

## **7. Zahvale**

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Mariji Abramić na stručnom vodstvu, korisnim savjetima i pruženom znanju, te na strpljenju, susretljivosti i poklonjenom vremenu tijekom izrade ovoga rada za Rektorovu nagradu.

Također se zahvaljujem Zrinki Karačić, mag. chem., na pruženoj pomoći i odvojenom vremenu pri radu s DNA, dr. sc. Bojani Vukelić na savjetima, strpljenju i pomoći prilikom pročišćavanja proteina, te dr. sc. Nini Jajčanin-Jozić na susretljivosti i pomoći pri snimanju cirkularnog dikroizma proteina te na ustupljenom uzorku divljeg tipa enzima.

Posebno se zahvaljujem obitelji i prijateljima na pruženoj podršci i razumijevanju zbog izbivanja iz svakodnevnog života.



## 8. Popis literature

1. J. M. Chen i A. J. Barrett, *Dipeptidyl-peptidase III* u: N. D. Rawlings, G. Salvesen (ured.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3. izd., Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2012, str. 1285-1289.
2. S. C. Prajapati, S. S. Chauhan, Dipeptidyl peptidase III: a multifaceted oligopeptide N-end cutter, *FEBS Journal* **278** (2011) 3256-3276.
3. M. Abramić, J. Špoljarić, Š. Šimaga, Prokaryotic homologs help to define consensus sequences in peptidase family M49, *Period. biol.* **106** (2004) 161-168.
4. S. Ellis, J. M. Nuenke, Dipeptidyl arylamidase III of the pituitary: purification and characterization, *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 4623-4629.
5. W. Chadwick, R. Brenneman, B. Martin, S. Maudsley, Complex and multidimensional lipid raft alterations in a murine model of Alzheimer's disease, *Int. J. Alzheimers Dis.* (2010) doi:10.4061/2010/604792.
6. H. Sato, K. Kimura, Y. Yamamoto, T. Hazato, Activity of DPP III in human cerebrospinal fluid derived from patients with pain, *Masui* **52** (2003) 257-263.
7. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, M. Šprem, M. Abramić, Tumor cytosol dipeptidyl peptidase III activity is increased with histological aggressiveness of ovarian primary carcinomas, *Gynecol. Oncol.* **91** (2003) 194-200.
8. M. Abramić, Š. Šimaga, M. Osmak, L. Čičin-Šain, B. Vukelić, K. Vlahoviček, Lj. Dolovčak, Highly reactive cysteine residues are part of the substrate binding site of mammalian dipeptidyl peptidase III, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36** (2004) 434-446.
9. K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, M. Kanai, S. Fuji, J. Hirose, M. Harada, Dipeptidyl peptidase III is a zinc metallo-exopeptidase: Molecular cloning and expression, *Biochem. J.* **329** (1998) 275-282.
10. C. M. Lee, S. H. Snyder, Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 12043-12050.
11. M. Abramić, M. Zubanović, L. Vitale, Dipeptidyl peptidase III from human erythrocytes, *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **369** (1988) 29-38.
12. R. L. Strausberg, E. A. Feingold, L. H. Grouse, J. G. Derge, R. D. Klausner *et al.* Generation and initial analysis of more than 15 000 full-length human and mouse cDNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (2002) 16899-16903.

13. P. K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić, K. Gruber, The first structure of dipeptidyl-peptidase III provides insight into the catalytic mechanism and mode of substrate binding, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 22316-22324.
14. K. Fukusawa, K. M. Fukusawa, H. Iwamoto, J. Hirose, M. Harada, The HELLGH motif of rat liver dipeptidyl peptidase III is involved in zinc coordination and the catalytic activity of the enzyme, *Biochemistry* **38** (1999) 8299-8303.
15. E. Dobrovetsky, A. Dong, A. Seitova, B. Duncan, L. Crombet, M. Sundstrom, C. H. Arrowsmith, A. M. Edwards, C. Bountra, A. Bochkarev, Crystal structure of human dipeptidyl peptidase III, Structural Genomics Consortium (SGC) 2009, to be published.
16. A. Tomić, M. Abramić, J. Špoljarić, D. Agić, D. M. Smith, S. Tomić, Human dipeptidyl peptidase III: insights into ligand binding from a combined experimental and computational approach, *J. Mol. Recognit.* **24** (2011) 804-814.
17. G. A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, A. Dong, A. Binter, M. Abramić, P. Macheroux, S. Dhe-Paganon, K. Gruber, Entropy-driven binding of opioid peptides induces a large domain motion in human dipeptidyl peptidase III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109** (2012) 6525-6530.
18. A. Berger, I. Schechter, Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci* **257** (1970) 249-264.
19. pET System Manual, 11. izd., Novagen, 2005
20. The QIAexpressionist, 5. izd., Qiagen, 2003
21. R. E. Burgess, M. P. Deutscher, *Guide to protein Purification*, 2. izd., Academic Press, 2009, str. 85-86, 245-246.
22. I. Nagatsu, T. Nagatsu, T. Yamamoto, G. G. Glenner, J. W. Mehl, Purification of aminopeptidase A in human serum and degradation of antigenosin II by the purified enzyme, *Biochim. Biophys. Acta* **198** (1970) 255-270.
23. Z. Karačić, diplomski rad, Uloga Cys176 i Cys509 u inaktivaciji ljudske dipeptidil-peptidaze III tiolnim reagensima, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2010.
24. S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochim. Biophys. Acta* **1751** (2005) 119-139.
25. N. Jajčanin-Jozić, M. Abramić, Hydrolysis of dipeptide derivatives reveals the diversity in M49 family, *Biol. Chem.* (2013) u tisku, DOI: 10.1515/hsz-2012-0347

26. J. Špoljarić, doktorska dizertacija, Metalopeptidaze porodice M49: heterologna ekspresija, pročišćavanje i karakterizacija ljudskog ortolognog enzima, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2010.
27. J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, J. Makarević, B. Vukelić, D. Agić, Š. Šimaga, N. Jajčanin-Jozić, M. Abramić, Absolutely conserved tryptophan in M49 family of peptidases contributes to catalysis of competitive inhibitors, *Bioorg. Chem.* **37** (2009) 70-76.
28. N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, T. Pavkov, P. Macheroux, M. Abramić, Identification of the reactive cysteine residues in yeast dipeptidyl peptidase III, *Biochimie* **92** (2010) 89-96.

## 9. Sažetak

### Aspartat 496 u podmjestu S2 određuje supstratnu specifičnost ljudske dipeptidil-peptidaze III

Maja Šemanjski

Ljudska dipeptidil-peptidaza III (DPP III), član obitelji M49 metalopeptidaza, hidrolizira dipeptide s N-kraja brojnih oligopeptida i uključena je u unutarstaničnu razgradnju proteina te obranu od oksidativnog stresa.

Unatoč velikoj sličnosti trodimenzionalne strukture ljudske i kvašćeve DPP III, postoje značajne razlike u njihovoj selektivnosti (supstratnoj specifičnosti) i u katalitičkoj efikasnosti. Općenito se smatra da je supstratna specifičnost peptidaza određena oblikom i svojstvima podmjesta u veznom mjestu supstrata. Kristalna struktura kompleksa ljudske DPP III s pentapeptidom otkrila je aminokiselinske ostatke koji čine pet podmjesta enzima (S2-S3'). Pretpostavlja se da najveći utjecaj na dipeptidil-peptidaznu aktivnost DPP III ima vezanje N-kraja peptida na određenu udaljenost od katalitičkog iona  $Zn^{2+}$ . Budući da aminokiselina s N-kraja supstrata ostvaruje interakcije s podmjestom S2, ono bi moglo imati važnu ulogu u selektivnosti DPP III.

Sravnjenjem proteinskih sekvenci ljudske i kvašćeve DPP III uočena je razlika u dvije od ukupno 13 aminokiselina podmjesta S2: Asp496 i Ser504 ljudskog enzima zamijenjeni su s Gly505 i Gly513 kod kvašćeve DPP III. Cilj ovog rada bio je odrediti kako pojedinačne mutacije Asp496 i Ser504 ljudske DPP III utječu na aktivnost i supstratnu specifičnost ovoga enzima. U tu svrhu, ciljanom mutagenезom pripremljeni su mutirani oblici enzima Asp496Gly i Ser504Gly, heterologno eksprimirani i pročišćeni afinitetnom kromatografijom. Mutantima su određeni kinetički parametri  $k_{cat}$  i  $K_m$  za hidrolizu tri dipeptidil-arilamidna supstrata: Arg-Arg-2-naftilamida (Arg-Arg-2NA), Phe-Arg-2NA i Ala-Arg-2NA, i uspoređeni s kinetičkim parametrima divljeg tipa ljudske DPP III-His<sub>6</sub>. Supstitucijom Ser504 glicinom nije došlo do promjene katalitičkih svojstava enzima. Taj mutant je preferirao, kao i divlji tip, Arg-Arg-2NA, i hidrolizirao ga čak s nešto većom katalitičkom efikasnošću ( $k_{cat}/K_m$ ). Međutim, zamjena Asp496 glicinom rezultirala je gubitkom selektivnosti. Mutant Asp496Gly pokazivao je značajno promijenjenu vrijednost Michaelisove konstante:

povećanje  $K_m$  od 10 puta za Arg-Arg-2NA, a smanjenje od 5 i 6 puta za Phe-Arg-2NA, odnosno Ala-Arg-2NA. Obrtni broj ( $k_{cat}$ ) enzima nije se znatnije mijenjao pa je katalitička efikasnost bila podjednaka za sve supstrate.

Rezultati po prvi puta ukazuju na važnost jednog aminokiselinskog ostatka, Asp496, u podmjestu S2 ljudske DPP III za specifičnost ovoga enzima prema diarginil-arilamidnom supstratu, po čemu je ovaj tip dipeptidil-peptidaze i bio identificiran. Također, rezultati daju smjernice za daljnje istraživanje raznolikosti supstratne specifičnosti u obitelji metalopeptidaza M49.

**Ključne riječi:** dipeptidil-peptidaza III / metalopeptidaza / ciljana mutageneza / arilamidni supstrat / supstratna specifičnost

## 10. Summary

### **Aspartate 496 from the subsite S2 determines the substrate specificity of human dipeptidyl peptidase III**

Maja Šemanjski

Human dipeptidyl peptidase III (DPP III), a member of the metallopeptidase family M49, removes N-terminal dipeptides from a number of oligopeptides, participating in intracellular protein catabolism and defense against oxidative stress.

In spite of the great similarity of their 3-D structures, human and yeast DPP III differ significantly in the selectivity (substrate specificity) and in the catalytic efficiency. In general, the substrate specificity of peptidases is determined by the shape and the properties of the subsites constituting the substrate binding site. The crystal structure of human DPP III complex with the pentapeptide has revealed the amino acid residues which form the five subsites (S2-S3'). It is assumed that the binding of the peptide N-terminus at an appropriate distance to the zinc ion is the most important factor for the dipeptidyl peptidase activity of the DPP III. Since the N-terminal amino acid residue of the substrate interacts with the subsite S2, this subsite could play an important role in DPP III selectivity.

The amino acid sequence alignment of yeast and human DPP III has shown the difference in two, out of 13 amino acid residues which constitute S2 subsite: Asp496 and Ser504 in the human DPP III were found replaced by Gly505 and Gly513 in the yeast DPP III. The aim of the present study was to determine the influence of the single mutations of the Asp496 and Ser504 from the human DPP III on this enzyme activity and substrate specificity. For that purpose, mutant forms Asp496Gly and Ser504Gly were prepared by site-directed mutagenesis, heterologously expressed and purified by affinity chromatography. Kinetic parameters  $k_{\text{cat}}$  and  $K_{\text{m}}$  were determined for the hydrolysis of the three dipeptidyl-arylamide substrates, Arg-Arg-2-naphthylamide (Arg-Arg-2NA), Ala-Arg-2NA and Phe-Arg-2NA, catalyzed by the mutants, and compared to the wild-type human DPP III-His<sub>6</sub>. The substitution of Ser504 with Gly, did not change the enzyme's catalytic properties. S504G preferred Arg-Arg-2NA, as the wild-type, and the catalytic efficiency ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ) of this mutant was slightly higher than that of the wild-type. However, the replacement of Asp496 with Gly

resulted in the loss of selectivity. The  $K_m$  value of Asp496Gly was changed: 10-fold increase for Arg-Arg-2NA, and 6-fold and 5-fold decrease of the  $K_m$  for Ala-Arg-2NA and Phe-Arg-2NA was observed. The  $k_{cat}$  value did not change significantly, and the catalytic efficiency was about the same for all substrates examined.

The results indicate for the first time the importance of the one amino acid residue, Asp496, from the S2 subsite of the human DPP III for this enzyme specificity towards diarginyl arylamide substrate. It is noteworthy that this type of dipeptidyl peptidase (DPP III) was identified through the hydrolytic action on this substrate. In addition, obtained results give the guidance for further investigation of the diversity in substrate specificity observed in the metallopeptidase family M49.

**Key words:** dipeptidyl peptidase III / metallopeptidase / site-directed mutagenesis / arylamide substrate / substrate specificity

## Životopis

Rođena sam 18. siječnja 1990. godine u Slavonskom Brodu gdje sam završila osnovnu školu i Prirodoslovno-matematičku gimnaziju „Matija Mesić“. Preddiplomski studij Kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završila sam 2011. godine s prosjekom ocjena 4,86 stekavši akademsku titulu prvostupnice kemije. Trenutačno sam studentica 2. godine diplomskog studija istraživačkog smjera kemije (grane Biokemija i Organska kemija). Za uspjeh na diplomskom studiju (prosjek ocjena 5,00) nagrađena sam Dekanovom nagradom, odnosno Pohvalnicom Fakultetskog vijeća za 2013. godinu. U razdoblju od 2008. do 2011. godine primala sam stipendiju Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH na temelju rezultata razredbenog ispita, a u akademskoj godini 2011./2012. stipendiju Sveučilišta u Zagrebu za izvrsnost. U akademskoj godini 2012./2013. dobitnica sam novčane potpore iz Fonda za stipendiranje darovitih studenata Sveučilišta u Zagrebu te Plivine stipendije, koju i primam. Trenutno izrađujem diplomski rad na Biokemijskom zavodu Kemijskog odsjeka PMF-a pod vodstvom dr. sc. Ivane Weygand-Đurašević.