NINA JAJČANIN JOZIĆ

BIOKEMIJSKA I STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE III IZ KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

DOKTORSKA DISERTACIJA

ZAGREB, 2011.

NINA JAJČANIN JOZIĆ

BIOKEMIJSKA I STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE III IZ KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

Doktorska disertacija

predložena Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja
doktora prirodnih znanosti (kemija)

Zagreb
2011.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za celularnu biokemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta "Ruđer Bošković", pod vodstvom dr. sc. Marije Abramić, znanstvene savjetnice Instituta "Ruđer Bošković". Eksperimentalni dio rada izrađen je djelomično na Institutu za biokemiju, Tehničkog Sveučilišta u Grazu, pod vodstvom prof. dr. Petera Macherouxa.

Za tatu...

Zahvala

Prije svega, želim se zahvaliti svojoj mentorici dr. sc. Mariji Abramić na ukazanom povjerenju, uloženom trudu, brojnim stručnim savjetima, diskusijama i pomoći koje mi je pružala tijekom izrade i pisanja ove doktorske disertacije. Veliko hvala i na tome što mi je dala slobodu u istraživačkom radu što je od iznimne važnosti za jednog mladog znanstvenika.

Prilika da neko vrijeme provedem "vani" za mene je bila od velikog značaja. Hvala prof. dr. sc. Peteru Macherouxu na gostoprimstvu, vrijednim diskusijama i savjetima, i svim članovima grupe koji su mi u svakom trenutku bili spremni pružiti pomoć i činili moj boravak u Grazu ugodnijim.

Hvala dr. sc. Branki Salopek Sondi na diskusijama i pomoći...i na tome što je pravo zadovoljstvo surađivati s njom.

Dr. sc. Iti Gruić Sovulj zahvaljujem na kritičkom čitanju disertacije i korisnim savjetima.

Veliko hvala kolegicama dr. sc. Bojani Vukelić i dr. sc. Jasminki Špoljarić na stručnoj pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi, ali i neizmjernoj prijateljskoj podršci i razumijevanju od trenutka kada sam postala članom ove grupe.

Zahvaljujem svim dragim ljudima i prijateljima koji su iskrenom vjerom i podrškom hranili moj entuzijazam za radom u znanosti.

Zahvaljujem mami koja je, i kad je bilo najteže, uvijek vjerovala u mene i dala sve od sebe da danas budem to što jesam.

I na kraju, ali nikako manje važno, od sveg srca zahvaljujem Gabrijelu na bezuvjetnoj ljubavi, vjeri, razumijevanju i podršci čime je uvelike olakšao moj put ka ostvarenju ovog cilja.
Uspjeli smo!

Nina Jajčanin Jozić,
Zagreb, 04. ožujka 2011.

Sadržaj

Sažetak.....**VIII**

Abstract.....**IX**

1. UVOD.....**1**

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Peptidaze.....**3**

2.1.1. Podjela peptidaza.....3

2.1.2. Fiziološke uloge peptidaza.....5

2.2. Proteolitički sustav kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.....7

2.2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*.....7

2.2.2. Proteolitički sustav.....8

2.3. Metalopeptidaze.....**9**

2.3.1. Opće karakteristike i podjela.....9

2.3.2. Fiziološke uloge metalopeptidaza.....10

2.3.3. Katalitički mehanizam metalopeptidaza.....14

2.3.3.1. Karboksipeptidaza A.....14

2.3.3.2. Leucil-aminopeptidaza.....17

2.4. Porodica metalopeptidaza M49.....**20**

2.4.1. Dipeptidil-peptidaza III.....20

2.4.1.1. Biokemijske značajke.....20

2.4.1.2. Supstratna specifičnost.....22

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali.....**24**

3.1.1. Kemikalije i oprema.....24

3.1.2. Sojevi bakterije *Escherichia coli*.....26

3.1.3. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.....26

3.1.4. Plazmidna DNA (vektori).....26

3.2. Metode rada s mikroorganizmima.....**29**

3.2.1. Uzgoj bakterijskih kultura.....29

3.2.2. Transformacija bakterija plazmidnom DNA.....29

3.2.3. Uzgoj kvaščevih kultura.....30

3.2.4. Tranformacija kvasca pomoću litijevog acetata.....31

3.3. Metode rada s DNA.....**32**

3.3.1. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu.....32

3.3.2. Kloniranje gena za kvaščevu DPP III u plazmidne vektore pET-21a i pYES2.....33

3.3.2.1. Umnažanje gena za DPP III pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR).....33
3.3.2.2. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama.....35
3.3.2.3. Spajanje (ligacija) odsječaka DNA i plazmidnih vektora.....36
3.3.2.4. Transformacija bakterijskih stanica i PCR na bakterijskim kolonijama.....36
3.3.2.5. Umnažanje i izolacija rekombinantne plazmidne DNA.....37
3.3.3. Usmjerena mutageneza kloniranog gena za DPP III.....38
3.4. Metode rada s proteinima.....41
3.4.1. Prekomjerna ekspresija rekombinantne DPP III.....41
3.4.1.1. Heterologna ekspresija.....41
3.4.1.2. Homologna ekspresija.....42
3.4.2. Liza stanica.....42
3.4.3. Određivanje aktivnosti kvaščeve DPP III.....43
3.4.4. Određivanje koncentracije proteina.....44
3.4.5. Kromatografske metode.....45
3.4.5.1. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozi.....45
3.4.5.2. Gel-filtracija.....46
3.4.5.3. Kromatografija na anionskom izmjenjivaču.....46
3.4.6. Elektroforetske metode.....47
3.4.6.1. Elektroforeza proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu.....47
3.4.6.2. Elektroforeza proteina u nativnim uvjetima.....49
3.4.6.3. Izoelektrično fokusiranje (IEF).....49
3.4.7. Ispitivanje optimalnih uvjeta za aktivnost kvaščeve DPP III.....49
3.4.8. Ispitivanje utjecaja efektora peptidaza.....50
3.4.9. Ispitivanje utjecaja tiolnih reagenasa na DPP III.....50
3.4.10. Temperaturna stabilnost.....51
3.4.11. Određivanje kinetičkih parametara.....52
3.4.12. Cirkularni dikroizam.....53
3.4.13. Bioinformatička analiza.....53

4. REZULTATI

4.1. Heterologna ekspresija kvaščeve DPP III.....55
4.1.1. Kloniranje DNA za kvaščevu DPP III u ekspresijski vektor pET-21a.....55
4.1.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje DPP III-His_6.....57
4.1.3. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje DPP III bez His_6 privjeska.....61
4.2. Homologna ekspresija kvaščeve DPP III.....64
4.2.1. Kloniranje DNA za kvaščevu DPP III u ekspresijski vektor pYES2.....64
4.2.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje DPP III-His_6.....65
4.3. Fizikalno - kemijske značajke kvaščeve DPP III.....66
4.4. Katalitička svojstva DPP III.....72
4.5. Identifikacija reaktivnih cisteina.....74
4.5.1. Priprema mutiranih oblika DPP III-His_6 usmjerenom mutagenezom.....74
4.5.2. Utjecaj sulfhidrilnih reagenasa na aktivnost "divljeg tipa" i mutiranih oblika DPP III.....77
4.5.3. Utjecaj vodikovog peroksida i glutationa.....81
4.6. Ispitivanje uloge sačuvanih aminokiselinskih ostataka.....82
4.6.1. Odabir kandidata za ciljanu mutagenezu.....82
4.6.2. Katalitička svojstva mutiranih oblika DPP III.....87
4.6.3. Ispitivanje uloge aminokiselinskih ostataka u vezanju liganda.....89

5. RASPRAVA.....93

6. ZAKLJUČCI.....114

7. LITERATURNA VRELA.....115

8. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....127

Životopis.....X

Popis radova autora.....XI

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

BIOKEMIJSKA I STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE III IZ KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*

NINA JAJČANIN JOZIĆ

Laboratorij za celularnu biokemiju
Zavod za organsku kemiju i biokemiju
Institut "Ruđer Bošković", Bijenička c. 54, Zagreb, Hrvatska

Dipeptidil-peptidaze III (DPP III) su enzimi uključeni u intracelularni katabolizam proteina, a čine zasebnu porodicu cink-metalopeptidaza (M49). Njihov katalitički mehanizam i strukturna svojstva još su nedovoljno istraženi. Sve DPP III inhibirane su tiolnim reagensima.

S ciljem doprinosa poznavanju katalitičkih svojstava i prostorne građe metalopeptidaza porodice M49, kloniran je i prekomjerno eksprimiran gen za DPP III kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, a protein pročišćen i biokemijski okarakteriziran. Nadalje, ciljanom mutagenezom pojedinačno je zamijenjeno svih 5 ostataka cisteina, te 7 evolucijski visoko očuvanih aminokiselinskih ostataka. Usporedbom katalitičkih svojstava "divljeg tipa" i mutiranih proteina ustanovljeno je da su Cys639 i Cys518 odgovorni za inhibiciju sulfhidrilnim reagensima, a Cys130 za dimerizaciju enzima. U vezanju peptidnog supstrata sudjeluju Glu461, Asp381 i Arg582, dok Tyr327 i His578 doprinose stabilizaciji prijelaznog stanja.

Najveći pad katalitičke efikasnosti (k_{cat}/K_m), od čak 25 000 puta, uočen je za mutant E461Q, što ukazuje na esencijalnu ulogu Glu461 u katalitičkom mehanizmu.

Kroz interdisciplinarnu suradnju, mutant C130S je kristaliziran i razjašnjena mu je 3-D struktura.

Ključne riječi: dipeptidil-peptidaza III; porodica M49; *Saccharomyces cerevisiae*; reaktivni cisteinski ostaci; usmjerena mutageneza.

(128 + XII stranica, 49 slika, 15 tablica, 162 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u knjižnici Instituta "Ruđer Bošković", Bijenička c. 54, Zagreb i u Centralnoj kemijskoj biblioteci, Horvatovac 102A, Zagreb.

Mentor: Dr. sc. Marija Abramić, zn. savj., Institut "Ruđer Bošković"

Ocjenitelji: Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, doc., Prirodoslovno-matematički fakultet
Dr. sc. Marija Abramić, zn. savj., Institut "Ruđer Bošković"
Dr. sc. Branka Salopek Sondi, v. zn. sur., Institut "Ruđer Bošković"

Rad prihvaćen: 02. ožujka 2011.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

BIOCHEMICAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF DIPEPTIDYL-PEPTIDASE III FROM YEAST *Saccharomyces cerevisiae*

NINA JAJČANIN JOZIĆ

Laboratory of Cellular Biochemistry
Division of Organic Chemistry and Biochemistry
Ruđer Bošković Institute, Bijenička c. 54, Zagreb, Croatia

Dipeptidyl-peptidases III (DPP III) are enzymes involved in intracellular protein catabolism, belonging to the zinc-metallopeptidase family M49. Data on their catalytic mechanism and structural properties are still missing. Inhibition by thiol reagents is a general feature of all DPPs III.

In order to provide insight into the catalytic mechanism and three-dimensional structure of M49 metallopeptidases, DPP III from yeast *Saccharomyces cerevisiae* was cloned, overexpressed, purified and biochemically characterized. Site-directed mutagenesis was undertaken to substitute all 5 cysteine residues, and 7 highly conserved amino acid residues. Comparative analysis of the ''wild-type'' and mutants' enzymatic properties showed that Cys639 and Cys518 were responsible for inactivation by sulfhydryl reagents, and Cys130 for dimerization of yeast DPP III. Residues Glu461, Asp381 and Arg582 were found to be involved in binding of peptide substrate, while Tyr327 and His578 contributed to the stabilization of transition state.

The lowest catalytic efficiency (25 000-fold decrease in k_{cat}/K_m) was observed for E461Q mutant, indicating essential role of Glu461 in DPP III catalytic mechanism.

Through interdisciplinary collaboration, C130S mutant was crystallized and its 3-D structure was solved.

Key words: dipeptidyl-peptidase III; M49 family; *Saccharomyces cerevisiae*; reactive cysteine residues; site-directed mutagenesis.

(128 + XII pages, 49 figures, 15 tables, 162 references, original in Croatian)

Thesis deposited in The Library of Ruđer Bošković Institute, Bijenička c. 54, Zagreb and in The Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb.

Supervisor: Dr. Marija Abramić, Sen. Scientist, Ruđer Bošković Institute

Reviewers: Dr. Ita Gruić Sovulj, Asst. Prof., Faculty of Science
Dr. Marija Abramić, Sen. Scientist, Ruđer Bošković Institute
Dr. Branka Salopek Sondi, Sen. Res. Assoc., Ruđer Bošković Institute

Thesis accepted: March 2nd, 2011.

1. UVOD

Proteolitička razgradnja proteina i peptida temeljni je biološki proces prisutan u svim oblicima života. Hidroliza peptidnih veza *in vivo* katalizirana je proteolitičkim enzimima (peptidaze, proteaze). Oko 2% svih poznatih genoma kodira za peptidaze[1,2]. Dosadašnja istraživanja ove raznolike grupe proteina, dovela su do saznanja o njihovim mnogobrojnim fiziološkim ulogama. Osim sudjelovanja u probavi proteina unesenih hranom i u intracelularnom katabolizmu proteina, peptidaze kontroliranom razgradnjom aktiviraju prekursore enzima, hormona i drugih proteina, čime sudjeluju u regulaciji brojnih procesa poput proliferacije, diferencijacije i apoptoze stanica, morfogeneze tkiva, zgrušavanja krvi, autofagije i imunoloških procesa[3]. Nekontrolirani proteolitički procesi za posljedicu imaju brojna patološka stanja, te su upravo brojne peptidaze prepoznate kao terapeutski ciljevi[4]. Obzirom na mehanizam katalize peptidaze dijelimo na: serinske (S), metalopeptidaze (M), cisteinske (C), treoninske (T), aspartatne (A) i glutamatne (G), dok ih na osnovi sličnosti primarne i trodimenzionalne strukture (evolucijska srodnost) svrstavamo u porodice i klanove[2].

Razred metalopeptidaza odlikuje najveća raznolikost primarnih struktura i čini ga više od 50 evolucijskih porodica. Porodica dipeptidil-peptidaza III (DPP III), nazvana još i porodicom M49, prepoznata je po jedinstvenom strukturnom motivu aktivnog mjesta "HEXXGH". Ova porodica peptidaza evolucijski je visoko sačuvana i njene predstavnike nalazimo kod čovjeka, životinja, biljaka, gljiva, protista i bakterija. Dipeptidil-peptidaza III (DPP III; 3.4.14.4) za sada je jedina poznata peptidaza porodice M49. Mnoge druge porodice metalopeptidaza okupljaju više enzima (npr. porodica M1 uključuje oko 20 različitih tipova aminopeptidaza[2]). Biokemijski su izolirani i okarakterizirani ortolozi porodice M49 iz ljudske placente i eritrocita, mozga i jetre štakora, mozga zamorca i koze, goveđe hipofize i leće, te iz nekoliko viših eukariota. Kod nižih eukariota, prisutnost DPP III je dokazana u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*, ali je kvaščev enzim tek djelomično pročišćen i okarakteriziran[5]. DPP III je citosolni enzim široke specifičnosti koji odcjepljuje dipeptide sa *N*-kraja peptidnih supstrata. Osim što sudjeluje u unutarstaničnom katabolizmu proteina, fiziološke uloge ove peptidaze još uvijek nisu razjašnjene. Visoki afinitet humane i štakorske DPP III prema biološki aktivnim peptidima *in vitro* ukazuje na moguću ulogu u regulaciji neuropeptida[6,7,8]. Unatoč brojnim biokemijskim studijama, nedostaju podaci o mehanizmu katalize kao i trodimenzionalnoj građi ovog tipa metalopeptidaza. Inhibicija tiolnim reagensima uočena je kod svih eksperimentalno

izučavanih DPP III, pa se pretpostavlja da se reaktivne SH-grupe nalaze vrlo blizu aktivnog mjesta[9].

Izrada ove doktorske disertacije bila je usmjerena na ostvarivanje nekoliko ciljeva. Po prvi puta se kloniralo gen i detaljno okarakteriziralo biokemijske i katalitičke značajke DPP III nižeg eukariota, kvasca *S. cerevisiae.* Prekomjerna ekspresija funkcionalne rekombinantne DPP III kvasca omogućila je nadalje pripravu veće količine pročišćenog proteina za potrebe njegove kristalizacije (interdisciplinarna suradnja). Time se doprinjelo rješavanju trodimenzionalne strukture DPP III kvasca koja predstavlja prototip za cijelu porodicu metalopeptidaza M49. Nadalje, mutacijom svakog od ukupno 5 ostataka cisteina u molekuli kvaščeve DPP III (711 aminokiselina), identificiralo se reaktivne ostatke cisteina, što je, zajedno s uvidom u kristalnu strukturu proteina, omogućilo razjašnjenje molekularne osnove osjetljivosti ove metalopeptidaze na tiolne reagense. Bioinformatičkom analizom primarnih struktura metalopeptidaza iz porodice M49, kao i analizom kristalne strukture kvaščeve DPP III odabrani su očuvani aminokiselinski ostaci koje se zamijenilo ciljanom mutagenezom. Usporednom analizom katalitičkih svojstava "divljeg tipa" i priređenih mutiranih oblika, omogućen je uvid u interakciju enzima s ligandom (supstrat ili inhibitor) i u katalitički mehanizam.

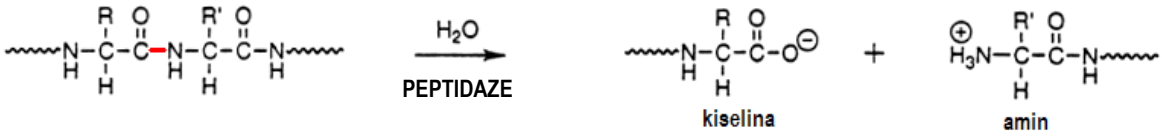
U radu su korištene metode molekularne biologije (kloniranje gena, rad s DNA, ciljana mutageneza, prekomjerna ekspresija u bakterijskom i kvaščevom sustavu), biokemijske metode (metode za pročišćavanje i analizu proteina), zatim biofizikalne metode (UV/VIS spektroskopija, cirkularni dikroizam, fluorimetrija), te bioinformatičke metode (za sravnjenje primarnih struktura proteina i analizu trodimenzionalne strukture).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Peptidaze

2.1.1. Podjela peptidaza

Peptidaze, poznate i kao proteolitički enzimi ili proteaze, zasigurno su jedna od najviše proučavanih skupina u području istraživanja proteina. Pripadaju u razred hidrolaza i imaju ulogu u gotovo svim važnim biološkim procesima stanice, a kataliziraju reakcije cijepanja peptidne veze kod peptidnih odnosno proteinskih supstrata (slika 2.1).



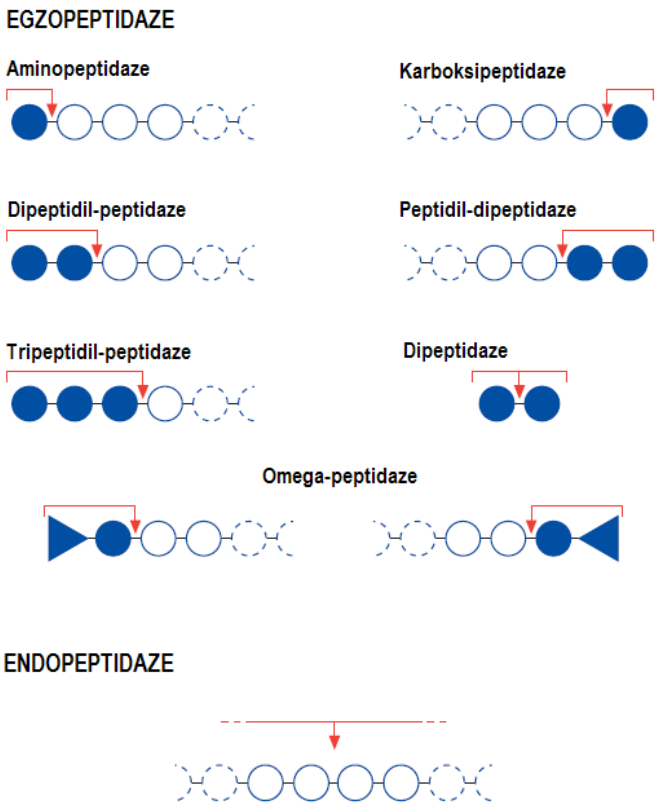
Slika 2.1. Shematski prikaz hidrolitičkog cijepanja peptidne veze (označena crvenom bojom).

Peptidaze danas dijelimo na tri osnovna načina, s obzirom na: funkcionalne grupe odgovorne za katalizu, položaj peptidne veze koju cijepaju, te na osnovi sličnosti primarnih struktura.

S obzirom na kemijsku prirodu katalitičkog mjesta peptidaze mogu biti: serinske (S), metalopeptidaze (M), cisteinske (C), treoninske (T), aspartatne (A) i glutamatne (G). Za metalopeptidaze, kao i aspartatne i glutamatne peptidaze, karakterističan je katalitički mehanizam u kojem se za nukleofilni napad koristi aktivirana molekula vode (nekovalentna kataliza), dok kod ostalih peptidaza ulogu nukleofila ima aminokiselinski ostatak (kovalentna kataliza).

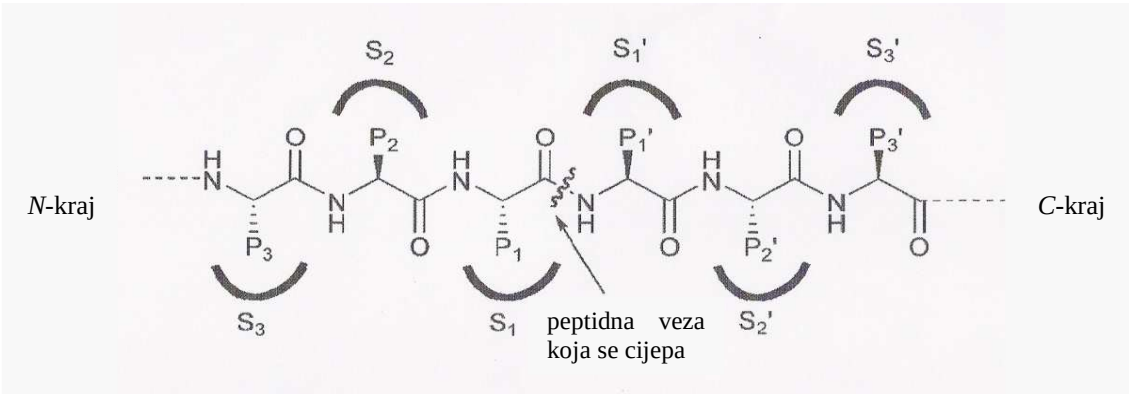
Klasifikacija peptidaza s obzirom na mjesto cijepanja prikazana je na slici 2.2. Endopeptidaze cijepaju peptidne veze u unutarnjim dijelovima peptidnih supstrata, dok egzopeptidaze cijepaju veze pri slobodnim *N*- i *C*-krajevima peptidnog supstrata.

Na osnovi sličnosti primarnih struktura peptidaze su svrstane u porodice, koje se dalje s obzirom na sličnost trodimenzionalnih struktura, svrstavaju u klanove. Ova klasifikacija osnova je baze podataka MEROPS[2] koja sistematski prikazuje sve poznate peptidaze, a omogućena je zahvaljujući sve većem broju sekvencioniranih genoma.



Slika 2.2. Klasifikacija peptidaza. Preuzeto iz (10) i prerađeno.

Specifičnost hidrolitičkog djelovanja peptidaza odnosi se na slijed aminokiselinskih ostataka supstrata kojeg cijepa. Kako bi se što jednostavnije prikazalo aktivno mjesto, te opisala supstratna specifičnost peptidaza, Schechter i Berger su 1967. god. predložili model i terminologiju (slika 2.3) koja je još i danas u upotrebi[11].



Slika 2.3. Shematski prikaz vezanja supstrata u aktivno mjesto peptidaze. Bočni aminokiselinski ostaci peptidnog supstrata označeni su kao P_1 do P_n (brojeći od veze koja se cijepa prema *N*-kraju peptida) odnosno P_1' do P_n' (prema *C*-kraju peptida). Analogno tome, podmjesta enzima u koja se smještaju bočni ostaci peptidnog supstrata označena su kao S_1 do S_n, odnosno S_1' do S_n'. Slika preuzeta iz (12).

2.1.2. Fiziološke uloge peptidaza

Iako su dugo istraživane prvenstveno zbog svoje opće uloge u probavi i intracelularnom katabolizmu proteina, danas se zna da je djelovanje peptidaza neophodno u regulaciji gotovo svih važnijih bioloških procesa. Uloge peptidaza su mnogobrojne. Aktivacija odnosno inaktivacija brojnih regulatornih proteina, enzima, hormona, faktora rasta ovisi o djelovanju peptidaza, koje time kontroliraju važne biološke procese poput staničnog ciklusa, stanične diferencijacije, morfogeneze tkiva, imunoloških i upalnih procesa, autofagije i apoptoze. No, pogrešno usmjereno ili nekontrolirano djelovanje peptidaza osnova je mnogih patoloških procesa poput nastanka tumora, neurodegenerativnih, upalnih i kardiovaskularnih bolesti. Nadalje, kod nekih oboljenja uzrokovanih virusima, bakterijama i parazitima, peptidaze djeluju kao faktori virulencije[3].

O fiziološkoj važnosti i ulogama peptidaza govori i činjenica da otprilike 2 % svih do sada sekvencioniranih genoma čine geni koji kodiraju za peptidaze[1,2]. Peptidaze nekog organizma, njihovi supstrati i inhibitori promatraju se u određenom periodu ili tijekom nekog procesa kao dio tzv. degradoma[13,14]. Najnoviji podaci baze *DEGRADOME* (http://degradome.uniovi.se) navode ukupni broj i raspodjelu peptidaza čovjeka, miša i štakora. Tako od 570 poznatih peptidaza čovjeka, čak 191 pripadaju nekoj od porodica metalopeptidaza, 178 je serinskih, 153 cisteinskih, 27 treoninskih i 21 aspartatnih peptidaza (http://degradome.uniovi.se)[14]. Page i sur. analizirali su poznate genome svih oblika staničnog života i u njima identificirali 16 sveprisutnih (eng. *ubiquitus*) porodica peptidaza (7 porodica metalopeptidaza, 6 porodica serinskih, 2 cisteinske i 1 treoninske) nazvavši ih "bazalnim degradomom"[15].

Glavnina razgradnje proteina u eukariotskoj stanici odvija se putem lizosoma/endosoma i proteasoma. Peptidaze koje su dio sustava lizosom/endosom sudjeluju u regulaciji velikog broja osnovnih fizioloških procesa. Razgradnjom i prezentacijom antigena, regulacijom citokina i razvoja NK T stanica (eng. *Natural Killer*), aktivacijom serinskih peptidaza i integrina, te indukcijom apoptoze i signalnog puta posredovanog TL receptorima (eng. *Toll-like*), peptidaze lizosoma/endosoma imaju glavnu ulogu u regulaciji procesa prirođene i stečene imunosti[16]. Tu spadaju primjerice aspartatna endopeptidaza, katepsin D, te endosomalne cisteinske peptidaze katepsini B, C, H, S i X, čija je ekspresija dokazana u svim antigen prezentirajućim stanicama imunološkog sustava[17].

Otkrićem i istraživanjem procesa razgradnje proteina putem ATP-ovisnog proteolitičkog kompleksa 26S-proteasoma, koja je posredovana modifikacijom supstrata/proteina ubikvitinom, postalo je jasno da je intracelularna razgradnja proteina iznimno složen, vremenski i prostorno reguliran proces[18]. Proteasomalna proteoliza obuvaća razgradnju proteina do peptida veličine 3-22 ostatka[19], koji se dalje cijepaju djelovanjem citosolnih endo- i aminopeptidaza poput timet-oligopeptidaze (TOP), tripeptidil-peptidaze II (TPP II), te leucin-aminopeptidaze (LAP) i puromicin osjetljive aminopeptidaze (PS-AP)[20]. Regulatori staničnog ciklusa - ciklini, inhibitori ciklin-ovisnih kinaza, proteini uključeni u razdvajanje sestrinskih kromatida, tumor supresori, transkripcijski aktivatori i njihovi inhibitori, stanični receptori, proteini endoplazmatskog retikuluma, samo su neki od mnogobrojnih supstrata proteasoma koji su ključni za temeljne stanične procese[21]. Osim toga nepravilno sintetizirani, proteini koji su nastali nepravilnim smatanjem (eng. *misfolding*), te proteini koji su modificirani uslijed patoloških stanja poput oksidativnog stresa, mogu biti toksični za stanicu, te je nužna njihova brza razgradnja kako bi se spriječila daljnja oštećenja staničnog sustava. Novija istraživanja upućuju da peptidi nastali djelovanjem proteasoma sudjeluju u regulaciji procesa poput staničnog signaliziranja, i to direktnim utjecajem na protein-protein interakcije, ili indirektno, reguliranjem aktivnosti enzima timet-oligopeptidaze[22]. Upravo citosolna oligopeptidaza TOP ima jednu od glavnih uloga u daljnoj hidrolizi unutarstaničnih peptida nastalih djelovanjem proteasoma[20].

Istraživanja mehanizama stanične regulacije i signalizacije otkrila su novi, evolucijski očuvan mehanizam intramembranske proteolize. Neke od membranskih peptidaza poput serinskih romboid peptidaza i metalopeptidaza S2P tipa (eng. *Site-2 protease*), imaju ključne uloge u staničnim procesima poput signalnog puta EGF (eng. *epidermal growth factor*), odnosno regulaciji biosinteze kolesterola i masnih kiselina kod životinja. Nadalje, aspartatne peptidaze iz grupe presenilina PS-1 i PS-2 odgovorne su za regulaciju iznimno važnog, evolucijski sačuvanog signalnog puta Notch[23,24], a njihova uloga u nastanku β-amiloidnih peptida (Aβ), svrstava ih u važne čimbenike patogeneze Alzheimerove bolesti[25].

Do danas je poznato oko 86 nasljednih bolesti čovjeka, koje su posljedica mutacije gena koji kodiraju za peptidaze[14]. Već iz navedenih primjera, koji tek daju uvid u složenost proteolitičkih procesa, jasno je da su istraživanja uloge i funkcije peptidaza, njihovih fizioloških supstrata i inhibitora te načina regulacije, od izuzetne važnosti za razumijevanje

brojnih fizioloških procesa, te su upravo peptidaze od velikog interesa kao ciljne terapeutske skupine enzima[4].

2.2. Proteolitički sustav kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *S. cerevisiae* prvi je eukariotski organizam čiji je genom potpuno sekvencioniran[26], a čini ga oko 6000 gena, koji su raspoređeni na 16 linearnih kromosoma. Jedna od mnogih prednosti kvasca kao modelnog organizma, osim izrazito jednostavnog načina uzgoja te brzine rasta, jest i relativno visoka gustoća gena u odnosu na njihov broj, što je posljedica jako malog broja introna. Klasifikacija kvasca u taksonomske skupine (prema NCBI Taxonomy) prikazana je u tablici 2.1.

Tablica 2.1. Klasifikacija kvasca *S. cerevisiae* u taksonomske skupine

Sistematska kategorija	Taksonomska skupina
Carstvo	*Fungi*
Koljeno	*Ascomycota*
Razred	*Saccharomycetes*
Red	*Saccharomycetales*
Porodica	*Saccharomycetaceae*
Rod	*Saccharomyces*
Vrsta	*Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac je odavno prepoznat kao najjednostavniji jednostanični eukariotski modelni organizam na kojem se provode istraživanja signalnih puteva, mehanizama regulacije staničnog ciklusa, transkripcije i transporta proteina, kao i ostalih temeljnih staničnih procesa koji su evolucijski očuvani u višim eukariotima. Vrlo često su usmjerena istraživanja funkcije samo jednog gena odnosno proteina kvasca, dovela do saznanja o mehanizmima regulacije viših eukariota. Tako je primjerice ispitivanje kvaščevog *SGS1* gena, homologa humanog *WRN* gena, čije mutacije uzrokuju bolest prijevremenog starenja, poznatu kao Wernerov sindrom, ukazalo na ulogu *SGS1* gena u staničnom mehanizmu starenja kvasca, povezanog sa strukturom jezgre[27].

2.2.2. Proteolitički sustav kvasca

Još 1917. god. Dernby je izučavao autolizu stanica kvasca, te je po prvi puta opisao dvije vrste peptidaza koje je nazvao "pepsin" i "triptaza"[28]. Proteolitički sustav, funkcija i regulacija peptidaza, te njihova uloga u regulaciji staničnih procesa, u novije vrijeme intezivno su proučavani upravo u kvascu. Prema posljednjim podacima baze podataka MEROPS (rujan 2010), broj poznatih i navodnih (eng. *putative*) peptidaza kvasca je 119, od kojih su 42 iz porodica metalopeptidaza (http://merops.sanger.ac.uk)[2]. S obzirom na lokalizaciju u stanici, peptidaze kvasca svrstavamo u vakuolarne, peptidaze sekretornog puta, mitohondrijske i citosolne peptidaze[29,30].

Proteolitički sustav kvasca, posebno je istraživan u uvjetima stresa uzrokovanog reaktivnim i toksičnim molekulama, nedovoljnim količinama hranjivih tvari, temperaturnim promjenama i sl.[31,32]. Marques i sur. analizirali su globalne promjene transkriptoma kvasca nakon oksidativnog stresa uzrokovanog sa H_2O_2. Rezultati pokazuju da su u fazi oporavka stanica najviše inducirani upravo geni koji kodiraju za peptidaze, točnije, podjedinice 20S proteasoma, te peptidaze vakuole, aspartatnu Pep4p (proteinaza A ili yscA) i leucin-aminopeptidazu Lap4[33].

Osim spomenutih, kvaščeve vakuole sadrže još nekoliko peptidaza, između ostalih i proteinazu B (yscB), karboksipeptidaze yscY i yscS, dipeptidil-aminopeptidazu V, te dvije aminopeptidaze yscI i yscCo[34]. Teichert i sur. pokazali su da u uvjetima stresa izazvanog nedostatkom hranjivih tvari, glavnu ulogu u razgradnji proteina, procesu oporavka i sporulacije stanice imaju upravo endopeptidaze yscA (Pep4p) i yscB, te da nedostatak gena (eng. *knock out*) za yscA dovodi do stanične smrti[35].

Peptidaze sekretornog puta: signalna peptidaza, Kex2 endopeptidaza, Kex1 karboksipeptidaza, dipeptidil aminopeptidaza A (DPAP-A), sudjeluju u postranslacijskoj modifikaciji odcjepljivanja signalnog peptida, odnosno procesiranja prekursora[29]. Tako djelovanjem Kex2 endopeptidaze nastaju dva biološki aktivna peptida: hormon *α*-faktor (važan za konjugaciju u α stanici i mejotičku sporulaciju) i toksin na koji su osjetljivi neki sojevi kvasca (eng. *killer toxin*)[36,37]. Signalna peptidaza SEC11, esencijalna je za vijabilnost stanica kvasca[38].

Mitohondrijske peptidaze uglavnom imaju uloge u procesiranju proteina, za koje kodiraju geni smješteni u jezgri, i koji su posttranslacijski transportirani u mitohondrij. Mitohondrijska procesirajuća peptidaza (MPP), koja odcjepljuje signalne sekvence

proteina matriksa[39], zajedno sa peptidazom unutrašnje membrane (IMP), te mitohondrijskom posredujućom (eng. *intermediate*) peptidazom (MIP), strukturno i funkcionalno su sačuvani proteini. Njihovi ljudski homolozi prepoznati su zbog potencijalne uloge u tzv. mitohondrijskim oboljenjima[30]. Membranska ATP-ovisna proteaza mAAA sudjeluje u razgradnji oštećenih proteina, a novija istraživanja su pokazala da zajedno sa romboid signalnom peptidazom Pcp1, sudjeluje u procesiranju citokrom *c* peroksidaze (Ccp1)[40].

Od citosolnih peptidaza, upravo je proteasom kvasca (yscE) jako dobro proučen sustav[34,41], dok su ostale peptidaze nešto manje istraživane. Izuzetak su metionil aminopeptidaze (MetAP ili MAP) koje sudjeluju u postranslacijskoj modifikaciji proteina. Kvasac posjeduje dvije vrste MetAP, te je postojanje obiju formi nužno za optimalni rast i vijabilnost kvasca[42,43].

Na osnovi *in vivo* studija, predložena je uloga u zadnjim stupnjevima razgradnje staničnih proteina za kvašćevu citosolnu metalopeptidazu - proteinazu yscD (oligopeptidaza) čiji je ljudski ortolog timet-oligopeptidaza[44]. Primjenom modernih pristupa, poput analize proteolitičke razgradnje proteina masenom spektrometrijom, Shen i sur. pokazali su da se razgradnja proteina (ribosomskih, regulatornih, enzima i proteina koji sudjeluju u odgovoru na stres) najvećim dijelom odvija upravo u citoplazmi stanice kvasca[45], što daje osnovu za detaljnije istraživanje uloge i regulacije citosolnih peptidaza.

2.3. Metalopeptidaze

2.3.1. Opće karakteristike i podjela

Metalopeptidaze su proteaze kojima je za aktivnost neophodan divalentni metalni ion. S obzirom na broj metalnih iona potrebnih za katalitičku aktivnost, metalopeptidaze dijelimo na dvije grupe. Aktivno mjesto većine metalopeptidaza sadrži samo jedan metalni ion i to najčešće cink (Zn^{2+}), rjeđe kobalt (Co^{2+}), mangan (Mn^{2+}), nikal (Ni^{2+}) ili bakar (Cu^{2+}). Ostale metalopeptidaze, najčešće one kojima je za aktivnost neophodan mangan ili kobalt, posjeduju dva metalna iona koja djeluju "ko-katalitički". Sve do sada opisane metalopeptidaze s "ko-katalitičkim" metalnim ionima su egzopeptidaze, dok u prvoj grupi nalazimo endo- i egzopeptidaze[46]. Ligandi metalnih iona u metalopeptidazama u pravilu su aminokiselinski ostaci (najčešće tri), i to His, Glu, Asp ili Lys. S obzirom na jakost

interakcije metalnog iona i proteina, metaloenzime dijelimo na one koji čvrsto vežu metalni ion, te je njihova konstanta disocijacije K_d manja od 10^{-8} mol L^{-1}, i one koji metalne ione vežu slabije, uz K_d od 10^{-3} do 10^{-8} mol L^{-1} [47].

U usporedbi s drugim klasama peptidaza, metalopeptidaze odlikuje najveća raznolikost primarnih struktura. Prema najnovijim podacima baze MEROPS, podijeljne su u 15 klanova, unutar kojih je raspoređeno 56 porodica[2]. One porodice metalopeptidaza koje posjeduju jedan katalitički metalni ion, najčešće Zn^{2+}, pripadaju klanovima MA, MC, MD, ME, MK, MM, MO i MP; "ko-katalitički" metalni ioni cinka karakteristični su za porodice koje pripadaju klanovima MF, MH, MJ i MN, dok su peptidazama porodica klanova MG i MQ potrebni "ko-katalitički" ioni Co^{2+} ili Mn^{2+}.

Većina metalopeptidaza sadrži karakteristični strukturni motiv aktivnog mjesta His-Glu-Xak-Xak-His (skraćeno "HEXXH"), gdje su dva ostatka histidina ligandi Zn^{2+}, dok glutaminska kiselina ima glavnu ulogu u katalitičkom mehanizmu[10]. Klan MA koji trenutno broji najviše porodica, s obzirom na prirodu trećeg liganda može se podijeliti na dva podklana; kod prvog podklana MA(E) (eng. *glu-zincins*) kao treći ligand iona cinka je glutaminska kiselina koja je smještena 18-72 ostatka nizvodno od "HEXXH" motiva ("HEXXH+E"). Metalopeptidaze koje pripadaju podklanu MA(M) (eng. *metzincins*), kao treći ligand metalnog iona posjeduju histidin ili asparaginsku kiselinu, koje su dio proširenog "HEXXHXXGXXH[D]" motiva[46].

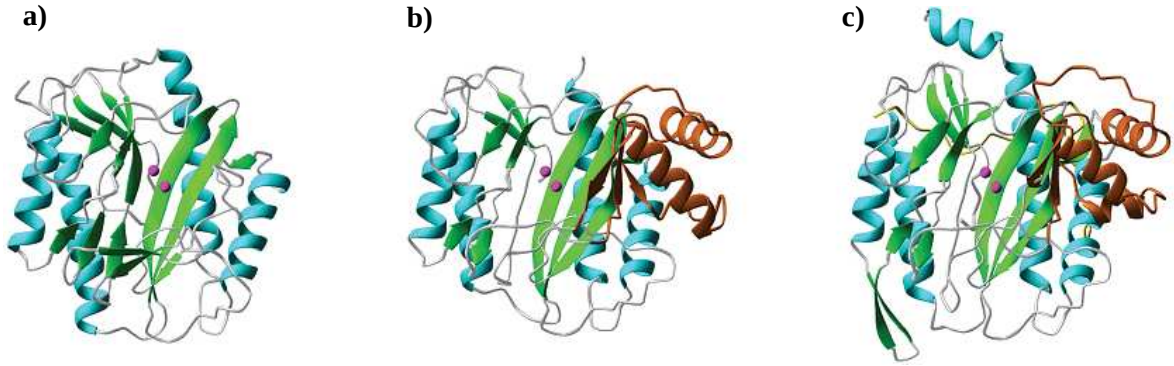
2.3.2. Fiziološke uloge metalopeptidaza

Jedan od ključnih procesa koji se odvija u stanici je sinteza proteina. Novosintetizirani proteini podložni su raznim modifikacijama koje se odvijaju kotranslacijski ili posttranslacijski. Ovakve promjene u strukturi proteina direktno utječu na smještaj proteina u stanici, aktivaciju, regulaciju, kao i na njegovu razgradnju.

Upravo je (slobodni) amino(*N*)-kraj proteina podložan modifikacijama poput odcjepljivanja jednog ili više aminokiselinskih ostataka. Glavnu ulogu u tim procesima imaju (metalo)aminopeptidaze poput metionil-aminopeptidaze (MetAP), leucil-aminopeptidaze (LAP), te aminopeptidaze N (AP N)[48].

Metionil-aminopeptidaza (EC 3.4.11.18; MetAP ili MAP) sveprisutna je peptidaza citoplazme, koja kotranslacijski odcjepljuje metionin sa *N*-kraja proteina (pozicija P_1) i to samo u slučaju kada se u poziciji P_1' nalazi manji, nenabijeni aminokiselinski ostatak[49]. Ovaj proces odvija se u svim staničnim oblicima života, te je neophodan za daljnje

modifikacije proteina. Prokarioti imaju samo jedan oblik MAP (MetAP1), koja je neophodna za život stanice[50], dok kod arheja pak nalazimo samo MetAP2. Kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, viših eukariota i čovjeka nalazimo obje forme MetAP. Gubitkom gena *map1* ili *map2* kvasac zadržava sposobnost rasta (nešto sporijeg u slučaju *map1*), dok gubitak oba gena za posljedicu ima smrt stanice[43]. Bakterijska MAP, monomerni je protein (29,3 kDa) čija je spljoštena struktura (eng. *pita-bread fold*) karakteristična za metalopeptidaze klana MG. Dva iona metala (Co^{2+}) koordinirana su s dva ostatka Asp i Glu, te jednim His, a aktivno mjesto smješteno je između dvije β-vrpce, koje su pak okružene sa četiri α-zavojnice (slika 2.4a)[51,52].



Slika 2.4. Kristalna struktura MetAP. a) *Escherichia coli* MetAP1 (PDB ID: 2mat). b) *Pyrococcus furiosis* MetAP2a (PDB ID: 1xgs). c) *Homo sapiens* MetAP2b (PDB ID: 1bn5). α-zavojnice prikazane su plavom, β-vrpce zelenom bojom, a metalni ioni ljubičastim kuglicama. Dodatna α-zavojnica MetAP 2 prikazana je narančasto, a dodatna domena na *N*-kraju MetAP2b žuto. Preuzeto iz (49).

MetAP tip 1 i 2 razlikuju se u dodatnoj α-zavojnici (oko 60 ostataka) koja je smještena unutar katalitičke domene, na površinskoj omči prema *C*-kraju MetAP2, što bi moglo imati utjecaja na supstratnu specifičnost enzima. Nadalje, eukariotske i prokariotske MetAP mogu posjedovati dodatnu domenu na *N*-kraju proteina (oko 120 ostataka). Kod kvasca (MetAP1b) ta domena sadrži vezna mjesta iona cinka karakteristična za tzv. *"zinc finger"*, te se pretpostavlja da sudjeluje u vezanju na ribosom, dok dodatnu domenu ljudske MetAP2b (slika 2.4c) koja ostvaruje interakcije sa translacijskim faktorom eIF-2α, čine kiseli i bazični ostaci[49].

Razvoj krvnih žila ili angiogeneza, ključan je proces u embriogenezi ali i razvoju patoloških stanja poput tumora. Zaustavljanje angiogeneze postalo je jedan od glavnih ciljeva u anti-tumorskoj terapiji[53]. Istraživanja su pokazala da bi upravo aminopeptidaze poput MetAP2, AP N i puromicin-neosjetljive leucil-specifične aminopeptidaze (eng.

puromycin insensitive leucyl-specific aminopeptidase; PILSAP), mogle imati značajnu ulogu u angiogenezi[54]. Ustanovljeno je da su fumagilin i ovalicin, inače poznati prirodni inhibitori angiogeneze, ireverzibilni inhibitori MetAP2[55], ali ne i MetAP1. Ispitivanje uloge i regulacije MetAP2 zanimljivo je zato i zbog primjene u terapiji tumora[56].

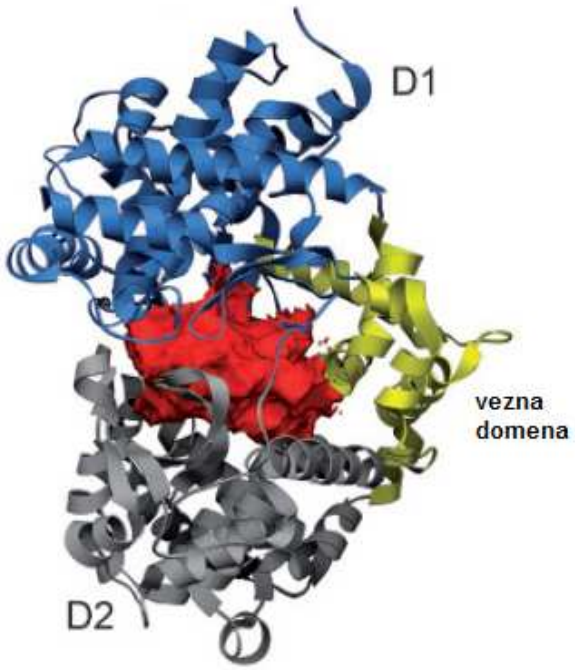
Jedna od najviše proučavanih grupa metalopeptidaza s ulogom u nastanku i razvoju tumora jesu i matriks metalopeptidaze (MMP). Ove cink-ovisne endopeptidaze odgovorne su za razgradnju proteina vanstaničnog matriksa (kolagen, elastin, fibronektin), i drugih molekula poput faktora rasta i staničnih receptora. Čak 23 tipa MMP nalazimo kod čovjeka, a imaju ključnu fiziološku ulogu u razvoju tkiva i organa, embriogenezi, te regulaciji upalnih procesa[57]. Osim već spomenute uloge u nastanku i razvoju tumora/raka, krivo usmjerno djelovanje MMP dovodi do oboljenja poput artritisa, osteoporoze, te kardiovaskularnih i neuroloških oboljenja[58].

Biološki aktivni peptidi, primjerice neuropeptidi, nastaju proteolitičkim cijepanjem visokomolekulskog (prekursora) proteina, često kaskadnim djelovanjem više peptidaza. Većina peptidaza koje sudjeluju u metabolizmu i/ili modifikaciji (neuro)peptida jesu cink ovisne metalopeptidaze karakterističnog "HEXXH" motiva poput neprilizina (NEP), njegovog homologa endotelin-konvertirajućeg enzima (eng. *endothelin-converting enzyme;* ECE), angiotenzin-konvertirajućeg enzima (eng. *angiotensin-converting enzyme;* ACE), neurolizina te timet-oligopeptidaze (TOP)[59,60]. Odavno je poznata uloga membranskih metalopeptidaza ACE, NEP i ECE u renin-angiotenzin sustavu za regulaciju krvnog tlaka. ACE koji ima ključnu ulogu u tom sustavu, pripada "gluzincin" porodici klana MA, a odcjepljuje dipeptide sa C-kraja peptidnih supstrata. Tako cijepanjem angiotenzina I, nastaje angiotenzin II koji uzorkuje suženje krvnih žila (vazokonstrikcija), dok se bradikinin, peptid koji uzokuje proširenje krvnih žila, djelovanjem ACE inaktivira. Inhibitori ACE koji se koriste već dugi niz godina u liječenju visokog krvnog tlaka, primjer su uspješnog razvoja ciljanih lijekova[61,62].

Nakupljanje β-amiloidnih peptida (Aβ), koji nastaju cijepanjem od amiloidnog prekursorskog proteina (APP), temeljni je proces u patogenezi Alzheimerove bolesti. Istraživanja u ovom području usmjerena su u dva pravca: nastanak Aβ-peptida i razgradnju njihovih nakupina. Čini se da glavnu ulogu u oba procesa imaju upravo metalopeptidaze. Istraživanja pokazuju da regulacija koncentracije, odnosno razgradnja Aβ-peptida ovisi o djelovanju NEP, ECE, ACE, zatim inzulizina (eng. *insulin degrading enzyme;* IDE), te matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9)[63]. Kristalne strukture NEP koja je član porodice M13, te IDE i mitohondrijske peptidaze PreP (eng. *presequence peptidase;* PreP)[64] koje

pripadaju M16 porodici metalopeptidaza, ukazale su na sličnost u strukturi njihovog aktivnog mjesta. Ove metalopeptidaze nazvane su još i kriptidaze (eng. *cryptidase-crypt containing peptidases*), jer posjeduju specifičnu katalitičku šupljinu u koju se selektivno smještaju, a potom cijepaju manji peptidi poput Aβ-peptida (Slika 2.5)[65]. Za sada je poznata samo struktura kompleksa IDE sa A$\beta_{1\text{-}40}$ peptidom[66]. Jedan od dokaza o ulozi NEP u razgradnji Aβ-peptida dali su Iwata i sur. koji su pokazali da se kod miševa koji nemaju NEP ($NEP^{-/-}$), povećavaju endogene koncentracije A$\beta_{1\text{-}40}$ i A$\beta_{1\text{-}42}$ peptida[67]. Najnovija istraživanja Wang-a i sur. idu u prilog tome da bi upravo NEP mogla imati ključnu ulogu u razgradnji Aβ plakova, a time biti i glavni cilj u terapiji Alzheimerove bolesti[68].

Neprilizin (EC 3.4.24.11; NEP) je cink-ovisna endopeptidaza sisavaca poznata još i kao neutralna endopeptidaza i enkefalinaza A. Ovaj membranski glikoprotein tipa II, monomer je veličine 90-110 kDa, koji se sastoji od kratkog citoplazmatskog *N*-terminalnog dijela, transmembranskog dijela te najvećeg, ekstracelularnog dijela (ostaci 52-749) kojeg čine dvije domene. U većoj domeni je smješteno aktivno mjesto koje sadrži jedan ion cinka. Na veću, katalitičku domenu se nastavlja manja domena. Domene su međusobno povezane sa četiri α-zavojnice (slika 2.5). NEP posjeduje 12 cisteina, koji tvore disulfidne mostove te su neophodni za aktivnost enzima[65,69].



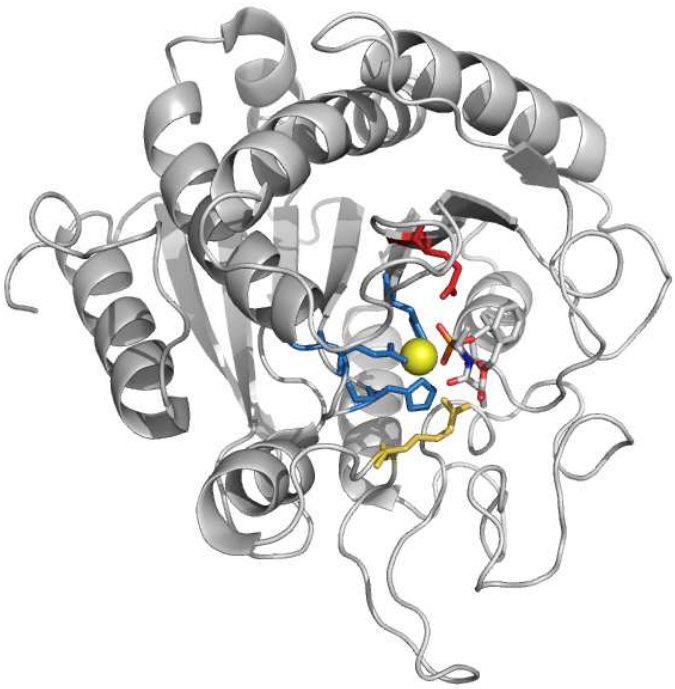
Slika 2.5. Kristalna struktura NEP. Prikazan je izvanstanični dio proteina. Katalitička šupljina ispunjena je crvenom bojom; katalitička domena (D1) obojana je plavom, manja domena (D2) sivom, te vezna domena žutom. Preuzeto iz (65) i prerađeno.

NEP hidrolizira unutrašnje veze u oligopeptidu, pri *N*-kraju hidrofobnog ostatka. Unatoč razlici primarnih struktura, u pogledu katalitičkog mehanizma najveću sličnost pokazuje s bakterijskom endopeptidazom iz porodice M4, termolizinom (TLN). Da NEP i TLN imaju slična katalitička svojstva, pokazala je i kristalna struktura kompleksa izvanstanične domene NEP i fosforamidona [N-(*α*-L-ramnopiranozil-oksihidroksifosfinil)-L-leucil-L-triptofan], poznatog inhibitora termolizina[70]. Inhibitor se veže u aktivno mjesto koje čine motivi "HEXXH" i "EXXXD" koji sadrže ligande cinka, a ion cinka vezan je u tetraedarskoj geometriji, kao i kod TLN. No, *in vivo* supstrati NEP za razliku od TLN manji su polipeptidi veličine do 3000 Da. Razlika u supstratnoj specifičnosti ova dva enzima, objašnjena je upravo na temelju strukture iz koje je vidljivo da domena 2 NEP, koju ne nalazimo kod TLN, ograničava ulaz u aktivno mjesto ove oligopeptidaze. NEP je u tkivima sisavaca široko rasprostranjena. Visoke koncentracije neprilizina nalazimo u membranama bubrega, crijeva, posteljice, te na retikularnim stanicama. U membrani bubrega primarna funkcija NEP je inaktivacija peptida iz porodice atrijskih natriuretika (vazodilatatora)[71]. U živčanom sustavu, NEP ima ulogu u inaktivaciji fiziološki aktivnih peptida kao enkefalina, neurotenzina, oksitocina i supstance P. Razgradnjom bradikinina i endotelina NEP utječe na regulaciju krvnog tlaka[69,72].

2.3.3. Katalitički mehanizam metalopeptidaza

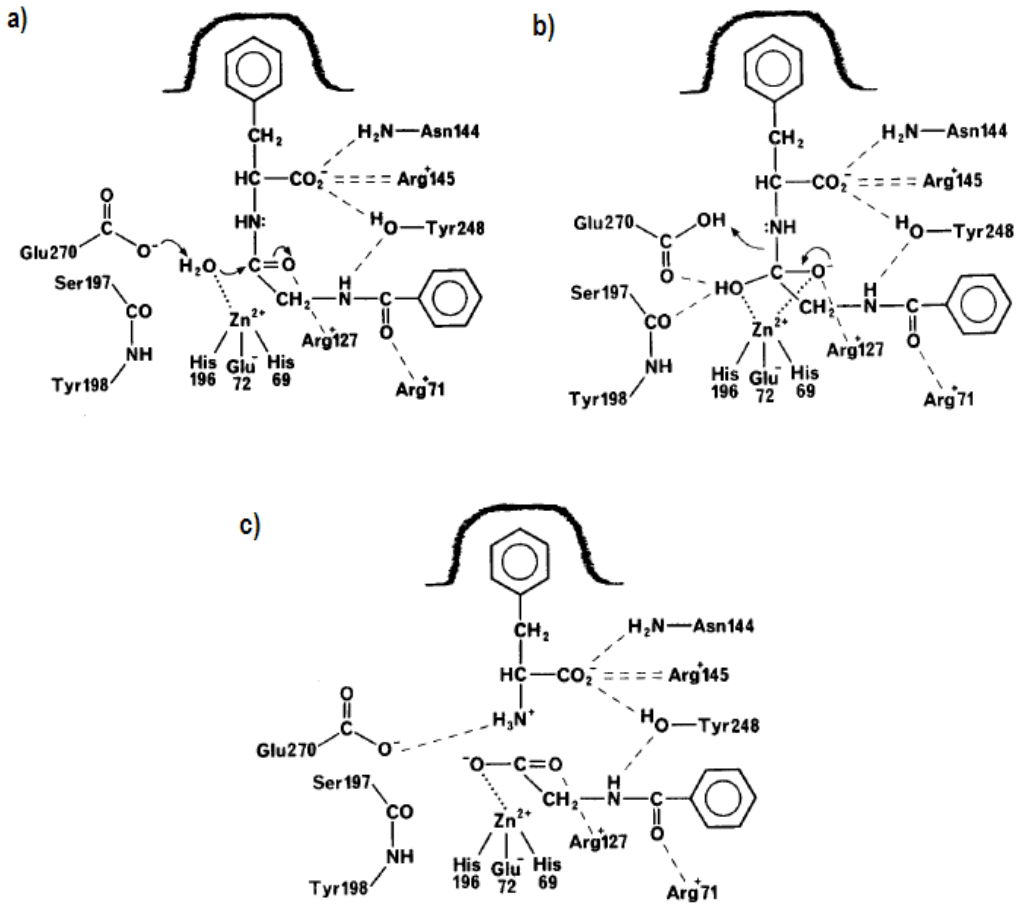
2.3.3.1. Karboksipeptidaza A

Cink-ovisne peptidaze najbrojnije su u grupi metalopeptidaza. Karboksipeptidaza A (EC 3.4.17.1; CPA1) iz gušterače goveda prva je okarakterizirana metalopeptidaza, odnosno cink-ovisna peptidaza[73]. Ova egzopeptidaza koja pripada porodici M14 (klan MC), molekulske mase 34,5 kDa, hidrolizira aminokiseline sa *C*-kraja polipeptida. Preferira supstrate koji posjeduju aromatske ili velike alifatske ogranke u poziciji P_1'. Izlučuje se u inaktivnoj formi proenzima. U kristalnoj strukturi prokarboksipeptidaze A zapažaju se 2 regije: *N*-terminalni polipeptid - aktivacijski segment (94 aminokiseline) i veća, enzimska, domena (308 aminokiselina). Aktivno mjesto enzima smješteno je u većoj domeni, dok je manja domena (aktivacijska) odgovorna za aktivaciju proenzima tripsinom i za smatanje (eng. *fold*) proteina. Veća, katalitička domena prikazana je na slici 2.6. Ion cinka vezan je u tetraedarskoj geometriji sa His69, His196 i Glu72, te vodom koja je s katalitičkim ostatkom Glu270 vezana vodikovom vezom.



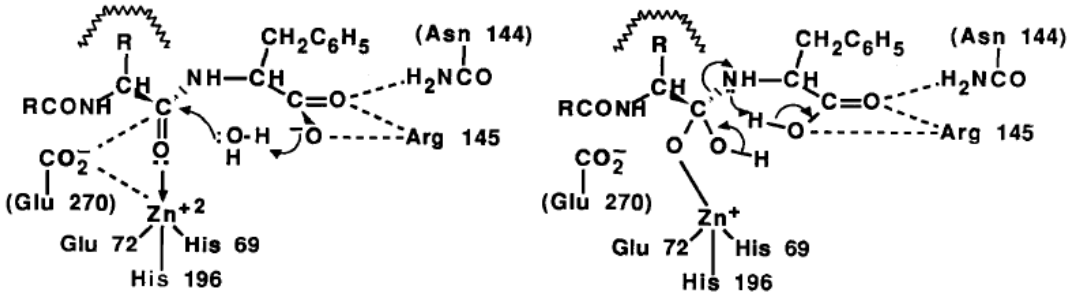
Slika 2.6. Kristalna struktura kompleksa karboksipeptidaze A iz pankreasa goveda i inhibitora *O*-[[(1R)-[[N-(fenilmetoksikarbonil)-L-alanil]amino]etil] hidroksifosfinil]-L-3-fenilacetat [ZAAP(O)F] (PDB ulaz: 6cpa). Ion cinka prikazan je žutom kuglom. Ligandi iona cinka prikazani su štapićastim modelima: His69, His196 i Glu72 plavom; Glu270 crvenom, a Arg127 žutom bojom. Inhibitor je prikazan također modelom štapića pri čemu je dušik označen plavom, kisik crvenom a fosfat narančastom bojom. Za prikaz strukture korišten je PyMOL program (www.pymol.org)[74].

Katalitički mehanizam ove metalopeptidaze do danas je jedan od najviše istraživanih. Na osnovi brojnih kristalografskih studija karboksipeptidaze A u kompleksu s fosfonatnim inhibitorima koji su analozi prijelaznog stanja[75] (slika 2.7) ili ketonskog analoga supstrata[76], predložen je katalitički mehanizam opće bazne katalize prikazan na slici 2.7. Fenilna grupa u poziciji P_1' peptidnog susptrata smješta se u nepolarni džep enzima, a Arg145, Asn144 i Tyr248 sudjeluju u vezanju karboksilne odnosno amidne grupe peptida, i na taj način pridonose pozicioniranju supstrata za katalizu. Glu270 djeluje kao opća baza aktivirajući molekulu vode vezanu na Zn^{2+}, pri čemu nastali hidroksidni ion vrši nukleofilni napad na karbonilni ugljik peptidne veze koja se cijepa (slika 2.7a). Arg127 polarizira karbonilni kisik peptidne veze, što olakšava nukleofilni napad aktiviranom molekulom vode. Negativni naboj prijelaznog stanja (tetraedarski intermedijer, oksianion) (slika 2.7b) stabiliziran je elektrostatskim interakcijama sa Zn^{2+}, no značajnoj stabilizaciji doprinosi i elektrostatska interakcija s Arg127. U nastavku reakcije (slika 2.7c), Glu270 djeluje kao opća kiselina pri čemu predaje proton odlazećoj amino grupi, a tetraedarski intermedijer prelazi u produkte[47,76-78].



Slika 2.7. Predloženi katalitički mehanizam karboksipeptidaze A. a) Michaelis-ov kompleks enzima i ketonskog analoga supstrata; b) stabilizirani tetraedarski intermedijer; c) produkt. Slika preuzeta iz (78).

Kao drugi mogući mehanizam spominje se obrnuta protonacija (slika 2.8). U odnosu na prethodno opisani mehanizam ("*re*" strana), nukleofilni napad u ovom slučaju odvija se sa suprotne, "*si"* strane peptidne veze koja se cijepa. Ion metala ima ulogu u polarizaciji karbonilne grupe supstrata, no ne sudjeluje u deprotonaciji nukleofila. Naime, molekula vode aktivirana je karboksilnom grupom na *C*-kraju supstrata (opća baza), koju pozicioniraju ostaci Arg145 i Asn144. Osim aktivacije nukleofila, pretpostavka je da karboksilna grupa ima ulogu proton donora tijekom raspada tetraedarskog intermedijera. Zanimljivo, uloga Glu270 u ovom mehanizmu je pasivna; ne sudjeluje u katalizi već samo u elektrostatskoj stabilizaciji metalnog iona i karbonila[47,79].

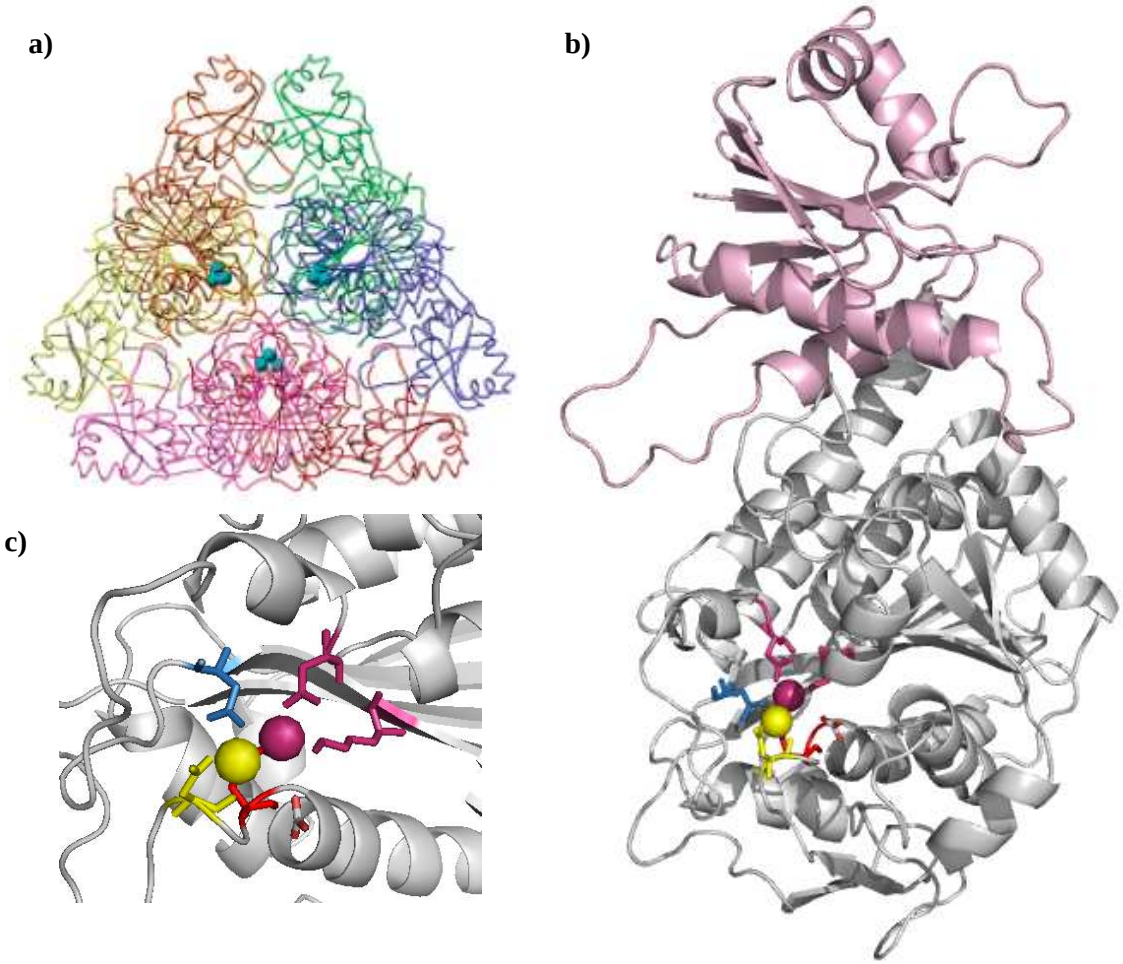


Slika 2.8. Drugi predloženi mehanizam obrnute protonacije karboksipeptidaze A. Preuzeto iz (79).

2.3.3.2. Leucil-aminopeptidaza

Leucil ili leucin-aminopeptidaze (LAP) široko su rasprostranjene u bakterijskim, biljnim i životinjskim organizimima. One kataliziraju hidrolizu aminokiselinskih ostatka s *N*-kraja peptidnog supstrata. Kod čovjeka LAP sudjeluje u odgradnji antigenskih peptida koji sudjeluju u imunološkom odgovoru, a pretpostavlja se i da ima ulogu u patofiziološkim stanjima poput infekcije virusom HIV-a, raka i kataraktogenezi[49,80].

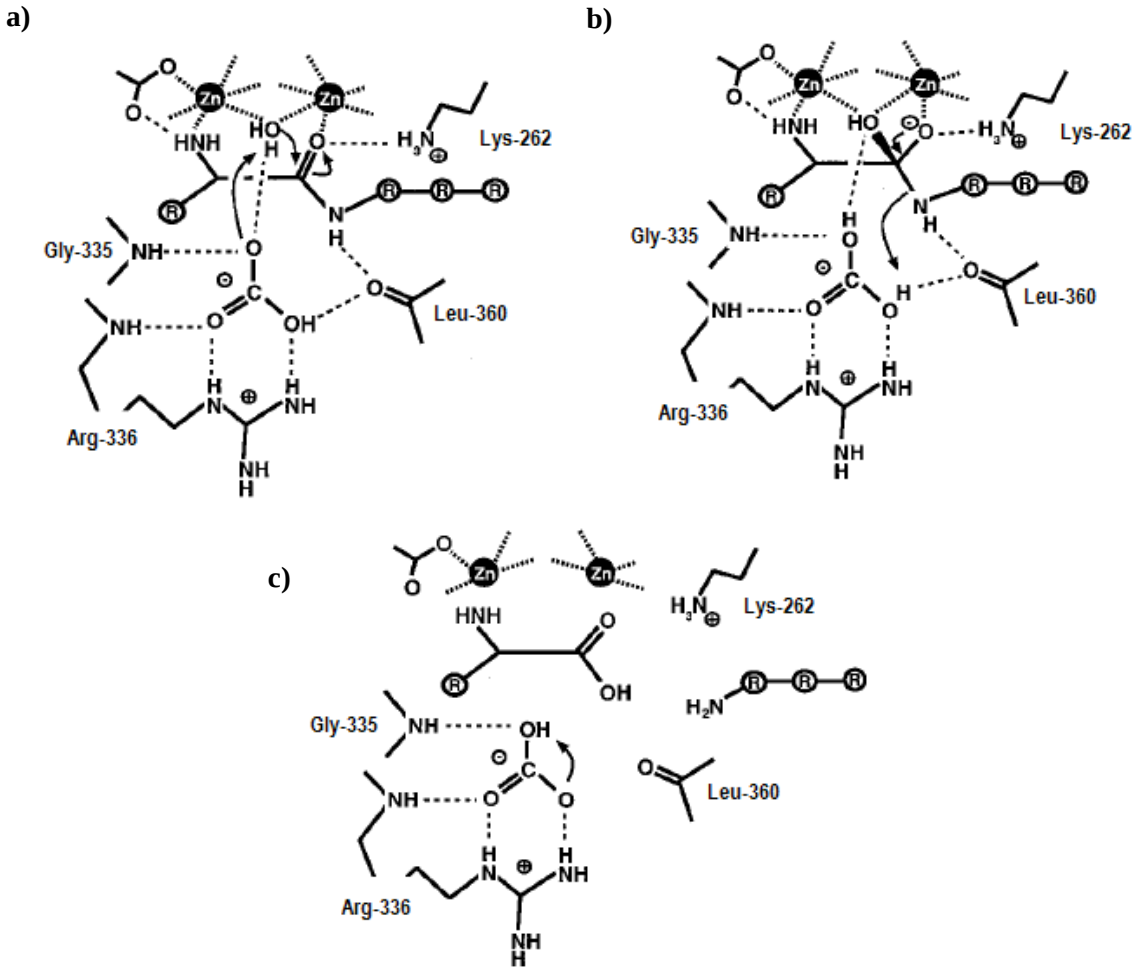
Leucil-aminopeptidaza (EC 3.4.11.1; LAP) iz leće goveda, heksamerni je enzim molekularne mase 324 kDa koji se sastoji od 6 identičnih podjedinica (slika 2.9a), i odcjepljuje L-aminokiselinske ostatke s *N*-kraja di- i tripeptidnih supstrata. Ovaj enzim preferira Leu ostatak u P_1 mjestu susptrata, dok peptide koji imaju Pro u P_1' mjestu ne cijepa[80]. Na slici 2.9b prikazana je kristalna struktura monomera LAP koja se sastoji od gornje, *N*-terminalne domene (160 aminokiselina) i katalitičke *C*-terminalne domene (327 aminokiselina). Aktivno mjesto svake od 6 podjedinica (monomera) heksamera LAP sadrži dva Zn^{2+}, što ovu aminopeptidazu porodice M17 svrstava u peptidaze s "ko-katalitičkim" metalnim ionima (klan MF). Geometrijska koordinacija metalnih iona opisana je kao nepravilna trigonalno-piramidalna[49]. Ioni cinka udaljeni su ~ 3,0 Å, međusobno su povezani molekulom vode te ostacima Glu334 i Asp255, dok u koordinaciji Zn1 (metalni ion u prvom mjestu) još sudjeluje i Asp332 (karbonilna i karboksilna grupa), a Zn2 je dodatno koordiniran s Lys250 i Asp273. Mjesto u kojem se nalazi Zn1, omogućava brzu izmjenu s nekim drugim ionom metala (Mn^{2+}, Co^{2+} i Mg^{2+}). Drugo mjesto, znatno jače veže ion metala, a zamjena je moguća samo s Co^{2+}. Monomeri LAP su raspoređeni (organizirani) u dva sloja trimera, a 6 aktivnih mjesta locirano je u unutrašnjosti heksamera.



Slika 2.9. Kristalna struktura leucil-aminopeptidaze (PDB ID: 1lam). a) heksamer LAP je sastavljen od dva sloja trimera. Preuzeto iz (49). **b) monomer LAP.** Gornja domena s *N*-krajem prikazana je svijetlo ružičastom bojom, dok je katalitička domena prikazana sivom bojom. **c) aktivno mjesto LAP**. Ioni cinka prikazani su kuglama: Zn1 žutom, a Zn2 ljubičastom bojom. Ligandi iona cinka prikazani su štapićastim modelima: Asp255 plavom; Asp332 žutom; Glu334 crvenom; Lys250 i Asp273 ljubičastom bojom. Molekula bikarbonata prikazana je modelom štapića gdje je kisik označen crvenom bojom. Za prikaz strukture korišten je PyMOL program (www.pymol.org)[74].

Kristalografske studije kompleksa LAP i liganda poput bestatina, amastatina, leucil-fosfonične kiseline i L-leucinala koji predstavljaju analoge prijelaznog stanja, omogućile su razumijevanje katalitičkog mehanizma ove, ali i drugih aminopeptidaza[49,81,82]. Slika 2.10 prikazuje predloženi katalitički mehanizam LAP. Pretpostavlja se da je vezanje susptrata u aktivno mjesto dvostepen proces; naime, tijekom ulaska u aktivno mjesto, supstrat se može na kratko vezati na Zn1, nakon čega se smješta u konačan položaj u kojem je terminalna amino-grupa supstrata vezana na Zn2, a karbonilna grupa peptidne veze na Zn1 (slika 2.10a). Ovakvim smještanjem supstrata, molekula vode

koja povezuje Zn1 i Zn2 u idealnom je položaju za nukleofilni napad na peptidnu vezu. Oba iona cinka, zajedno s Lys262 sudjeluju u polarizaciji peptidne veze koja se cijepa. Bikarbonatni ion koji je vezan na Arg336, ima ulogu opće baze poput glutaminske kiseline ostalih cink-peptidaza (s 1 ili 2 iona cinka), te vrši deprotonaciju molekule vode, koja zatim vrši nukleofilni napad. Nastali "gem-diolatni" intermedijer stabiliziran je elektrostatskim interakcijama s oba iona cinka te s ostatkom Lys262 (slika 2.10b). Prijenos protona na odlazeću amidnu skupinu odvija se preko molekule bikarbonata, što dovodi do stvaranja produkta (slika 2.10c). Važno je napomenuti da ion metala u prvom mjestu ima značajnu ulogu u vezanju supstrata i stabilizaciji prijelaznog stanja, a supstratna specifičnost ovisi, između ostalog, upravo o vrsti metalnog iona u ovom mjestu[82].



Slika 2.10. Predloženi katalitički mehanizam leucil-aminopeptidaze (LAP). a) Michaelis-ov kompleks enzima i supstrata; b) stabilizirani tetraedarski intermedijer; c) produkt. Preuzeto iz (82) i prerađeno.

2.4. Porodica metalopeptidaza M49

Nekoliko porodica metalopeptidaza, zbog nedovoljno istraženih ili pak specifičnih karakteristika poput mehanizma djelovanja, strukture i motiva aktivnog mjesta, svrstane su u klan M-[46]. Tom klanu pripada i porodica dipeptidil-peptidaze III (skraćeno: porodica DPP III ili porodica M49). Članovima ove porodice zajednički je jedinstveni strukturni motiv aktivnog mjesta "HEXXXH", odgovoran za vezanje iona cinka i katalitičku aktivnost, a izrazito nalikuje motivu "HEXXH" koji je karakterističan za peptidaze klana MA. Prema zadnjim podacima baze MEROPS (rujan 2010)[2], porodica M49 broji 173 metalopeptidaze, uz ljudsku DPP III uključuje predstavnike iz bakterija, protista, gljiva, biljaka i životinja.

2.4.1. Dipeptidil-peptidaza III

2.4.1.1. Biokemijske značajke

Dipeptidil-peptidaze spadaju u skupinu egzopeptidaza, koje odcjepljuju dipeptidne ostatke od amino-kraja peptidnih supstrata. Dipeptidil-peptidaza III (DPP III; EC 3.4.14.4) poznata je još i kao dipeptidil-arilamidaza III, dipeptidil-aminopeptidaza III, te kao enkefalinaza B i angiotenzinaza[9]. Ova peptidaza jedini je član porodice metalopeptidaza M49, a po prvi puta je otkrivena u ekstraktu prednjeg režnja hipofize goveda, kao enzim koji specifično cijepa sintetski supstrat Arg-Arg-2-naftilamid (Arg_2-2NA)[83]. DPP III je izolirana i biokemijski okarakterizirana kao citosolni protein najvećim dijelom iz tkiva sisavaca i to iz ljudske placente[84], eritrocita[7,85], dok je tek djelomično pročišćena iz ljudskih leća s kataraktom[86]. Nadalje, izolirana je iz već spomenute goveđe hipofize[83] i leće[87], štakorskog mozga[6] i jetre[88], svinjskih mišića[89], te mozga zamorca[90] i koze[91]. Analizom štakorskih tkiva, uočena je široka rasprostranjenost DPP III u nekoliko organa: jetri, bubrezima i nadbubrežnoj žlijezdi[88], dok su Abramić i sur. dokazali DPP III u mozgu, srcu, plućima, jetri, bubrezima i tankom crijevu štakora[85]. Mazzocco i sur. izolirali su dipeptidil-peptidazu III kao membranski protein žohara, dok je nešto kasnije DPP III vinske mušice opisana i kao membranski, i kao citosolni protein[92,93].

Biokemijskom karakterizacijom pokazano je da je dipeptidil-peptidaza III monomerni protein, s prosječnom molekulskom masom oko 80 kDa i pI kod pH ~ 4,5. Kloniranjem i sekvenciranjem gena za DPP III iz štakorske jetre, po prvi puta je određena

primarna struktura DPP III proteina 1998 god.[88,94], dok je potpuno sekvencirana kodirajuća DNA (cDNA) za ljudsku DPP III postala dostupna 2000. godine u bazi podataka NCBI (*"The National Center for Biotechnology Information"*).

Fukasawa i sur. atomskom apsorpcijom odredili su udio iona cinka (Zn^{2+}) za nativnu DPP III iz ljudske placente i rekombinantnu DPP III štakora, koji je iznosio jedan ion cinka po molekuli proteina[94]. Određivanjem konstante disocijacije cinka (K_d) od $2,5 \times 10^{-13}$ mol L^{-1}, nedvojbeno je dokazano da je dipeptidil-peptidaza III metaloprotein. Nadalje, opće značajke svih opisanih dipeptidil-peptidaza III jesu potpuna inhibicija kelirajućim agensima (reaktivacija apo-enzima ionima Zn^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+} te Co^{2+}) i aktivacija ionima Co^{2+} [9].

Usporedba primarnih struktura štakorske, ljudske i DPP III iz drugih izvora[85], otkrila je karakterističnu sačuvani motiv "HELLGH" (ostaci 450-455 u DPP III sisavaca) sličan "HEXXH" motivu većine poznatih metalopeptidaza. Studije usmjerene mutageneze koje su Fukasawa i sur. proveli na štakorskoj DPP III potvrdili su da ostaci His450 i His455 sudjeluju u koordinaciji iona cinka, dok je za ostatak Glu451 pretpostavljeno da ima glavnu ulogu u katalitičkom mehanizmu[95]. Ovi autori također su dokazali da je heksapeptid "HELLGH", a ne "HELGH" motiv neophodan za aktivnost DPP III. Dokazivanjem ostatka Glu508, koji je smješten nizvodno od "HELLGH" motiva i udaljen čak 52 ostatka, kao trećeg liganda cinka, DPP III je izdvojena kao zasebna porodica metalopeptidaza s novim "HEXXXH-52-E" motivom aktivnog mjesta. Hirose i sur. pokazali su da je koordinacija iona cinka DPP III slična tetraedarskoj geometriji cinka u termolizinu i karboksipeptidazi A, gdje je ion cinka vezan s dva histidina, glutaminskom kiselinom i molekulom vode[96].

Izraziti inhibitorni utjecaj na aktivnost DPP III imaju sulfhidrilni reagensi poput *p*-HMB-a, DTDP-a i NEM-a, što ukazuje na važnost SH-grupe enzima (ili više njih) za katalitički mehanizam DPP III. Li i sur. ciljanom mutagenezom zamijenili su svih sedam cisteinskih ostatka štakorske DPP III i pokazali da je ostatak Cys176 odgovoran za inaktivaciju sulfhidrilnim reagensima, ali i važan za regulaciju enzimske aktivnosti[97]. Usporedbom inaktivacije štakorske i ljudske DPP III sulfhidrilnim reagensom *p*-HMB-om, uočeno je da je štakorska DPP III znatno osjetljivija, te da posjeduje dvije vrste SH-grupa s obzirom na njihovu reaktivnost, dok je reaktivnost SH-grupa ljudske DPP III bila podjednaka[98]. Sravnjivanjem primarnih sekvenci eukariotskih DPP III, autori dolaze do zaključka da je samo jedan cisteinski ostatak potpuno sačuvan, i to Cys508, dok je za Cys176 pokazano da nije sačuvan. Nadalje, peptidni supstrati DPP III pokazali su značajnu

zaštitu oba enzima od inaktivacije navedenim reagensom, što ukazuje da su reaktivne SH-grupe dio, i/ili u blizini aktivnog, odnosno mjesta vezanja supstrata. Ispitivanje osjetljivosti štakorske i ljudske DPP III na neke fiziološke spojeve poput glutationa i H_2O_2, zajedno s prethodim saznanjima o reaktivnim SH-grupama, indicira da bi aktivnost DPP III mogla biti regulirana oksido-redukcijskim procesima u stanici[98].

Većina istraživanja do sada bila je usmjerena na dipeptidil-peptidaze III iz viših eukariota, pretežno sisavaca, dok su ispitivanja DPP III iz nižih eukariota znatno rjeđa. Chan i sur. prvi su djelomično pročistili i opisali DPP III iz sluzave plijesni *Dictyostelium discoideum*[99], dok Hunag i sur. detaljnije opisuju njenu supstratnu specifičnost[100]. Aktivnost DPP III dokazana je u ekstraktu stanica odraslih shizostoma *Schistosoma japonicum* i *S. mansoni*[101]. Watanabe i sur. jedini su do sada djelomično pročistili i biokemijski okarakterizirali DPP III iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*[5]. Kvaščeva DPP III hidrolizirala je Arg_2-2NA supstrat u nešto nižem pH području (pH 8,0) nego li ljudska DPP III, te je za razliku od DPP III sisavaca, imala manju specifičnu aktivnost prema naftilamidnim supstratima. Poput ostalih, i DPP III kvasca pokazala je visoku osjetljivost na EDTA i 1,10-fenantrolin, te tiolne reagense *p*-HMB i DTDP.

2.4.1.2. Supstratna specifičnost

Široka tkivna rasprostranjenost kod sisavaca, *in vitro* hidroliza oligopeptidnih supstrata, te prisutstvo u citosolu, ukazuju da DPP III ima opću ulogu u završnim stupnjevima katabolizma staničnih proteina. Iako su precizne fiziološke uloge dipeptidil-peptidaze III još uvijek nepoznate, istraživanja su pokazala da bi ovaj enzim mogao sudjelovati u odgradnji biološki aktivnih peptida *in vivo*, pogotovo neuropeptida, a time i regulaciji staničnih procesa. Najviša aktivnost DPP III prema njenom sintetskom supstratu Arg_2-2NA postiže se pri blago lužnatim uvjetima (pH 8,0-9,0) no to ujedno ovisi i o izvoru DPP III, dok pri fiziološkim uvjetima (pH 7,4) zadržava 46-60 % aktivnosti[9]. Shimamori i sur. pokazali su da je za DPP III iz ljudske placente optimalni pH za razgradnju Leu-enkefalina u neutralnom pH području (~ 7,5)[102].

Istraživanja štakorske DPP III izolirane iz mozga, pokazala su visoki afinitet DPP III prema enkefalinima i angiotenzinima, koje je DPP III hidrolizirala *in vitro*[6], dok je eritrocitna DPP III pokazala visoki afinitet za peptide renin-angiotenzin sustava, angiotenzin II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), angiotenzin III (Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), kao i Leu-enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)[7]. Za isti enzim, na osnovi ispitivanja većeg broja peptida, navodi se široka supstratna specifičnost, te hidrofobne aminokiseline

kao preferirani ostatak u poziciji P_1'. Ispitivanje DPP III iz mozga zamorca uz razne peptide, potvrdilo je afinitet i hidrolitičku aktivnost enzima prema peptidima od najmanje četiri i najviše osam aminokiselinskih ostataka, s najvećim afinitetom za enkefaline i angiotenzine[90]. Nadalje, za DPP III izoliranu iz mozga koze pokazano je da hidrolizira angiotenzin II i III, Leu-enkefalin, ali i adenokortikotropni hormon (ACTH)[103]. Jedan od zaključaka provedenih studija je i taj da DPP III ne hidrolizira one peptide koji na P_1 i P_1' pozicijama imaju ostatak prolina. No, novija *in vitro* istraživanja Baršun i sur. otkrivaju da eritrocitna DPP III ima izrazito visoki afinitet za opioidne peptide endomorfine, hemorfine i egzorfine, a detektiranjem produkata hidrolize, ustanovljeno je da DPP III hidrolizira endomorfin-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH_2) pritom oslobađajući dipeptid Tyr-Pro[8]. Time je po prvi puta dokazano da ljudska DPP III cijepa i peptidne supstrate koji u P_1 poziciji imaju ostatak prolina. Visoki nivo DPP III u mozgu štakora[98], kao i znatna prisutnost u površinskim slojevima neurona (eng. *superficial laminae*) kičmene moždine štakora ukazuju na potencijalnu ulogu ove metalopeptidaze u metabolizmu neuropeptida, odnosno u mehanizmu regulacije boli[104]. U prilog tome idu i rezultati *in vitro* istraživanja DPP III žohara i vinske mušice, kojima je dokazano da ovaj enzim sudjeluje u odgradnji miotropnog neuropeptida proktolina (Arg-Tyr-Leu-Pro-Thr)[93].

Potencijalna uloga DPP III opisana je i u patološkim stanjima. Tako je navedena moguća uloga DPP III u razgradnji proteina leće tijekom nastajanja očne mrene (kataraktogeneze)[105]. Ispitivanja na malignim tkivima endometrija i ovarija Šimage i sur. navode ljudsku DPP III kao mogući biomarker maligniteta[106,107].

Moderni pristupi istraživanju poput analize utjecaja ekspresije velikog broja gena (eng. *genome-wide screen*), dovela su do novih saznanja o mogućim ulogama dipeptidil-peptidaze III. Prekomjerna ekspresija DPP III gena u ljudskim stanicama neuroblastoma aktivirala je regulatorni pojačivački antioksidacijski element (eng. *antioxidant response element*; ARE), putem transkripcijskog faktora NRF2, čime je aktiviran endogeni sustav staničnog mehanizma obrane protiv oksidativnog stresa[108].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije i oprema

Standardne kemikalije korištene u izradi ovog rada: agaroza i agaroza niske točke taljenja (engl. *low-melting point agarose*) (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, SAD); akrilamid/bis-akrilamid (29:1), glicin i β-merkaptoetanol (2-ME) (*GE Healthcare, Amersham Biosciences AB*, Uppsala, Švedska); ampicilin, izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) i kloramfenikol (*Fermentas*, St. Leon-Rot, Njemačka); 1,4-ditiotreitol (DTT), 3,4-dikloroizokumarin (DCI), 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB), etidijev bromid, *N*-etilmaleimid (NEM), glicerol, imidazol, jodoacetamid (IAA), litijev acetat dihidrat (LiOAc), natrijev dodecilsulfat (SDS), fenilmetansulfonil fluorid (PMSF), polietilenglikol 3350 (PEG 3350), srebrov nitrat ($AgNO_3$), trikloroctena kiselina (TCA), Tris-baza, Tween 80 (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, SAD); amonijev persulfat (APS), 4,4'-ditiodipiridin (DTDP), 1,10-fenantrolin, reducirani glutation (GSH), oksidirani glutation (GSSG), *para*-hidroksi-merkuribenzoat (*p*-HMB), β-naftilamin (β-NA), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Serva*, Heidelberg, Njemačka); dinatrijeva sol etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA-Na_2), dimetilsulfoksid (DMSO), etanol, kalijev bikromat ($K_2Cr_2O_7$), natrijev karbonat ($Na_2CO_3xH_2O$), natrijeva lužina, klorovodična, fosfatna i octena kiselina, vodikov peroksid (H_2O_2), kobalt klorid ($CoCl_2$), cink klorid ($ZnCl_2$), natrij klorid, i druge korištene kemikalije bile su čistoće p.a. (*Kemika,* Zagreb, Hrvatska).

Supstrati: dipeptidil-2-naftilamidi (dipeptidil-2NA): Arg-Arg-2NA, Ala-Ala-2NA, Ala-Phe-2NA, Gly-Phe-2NA, His-Ser-2NA; peptidi: Gly-Gly-Phe-Leu, Tyr-Gly-Gly-Phe, Tyr-Pro-Phe-Phe-NH_2 (endomorfin-2), Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (Leu-enkefalin), Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (Met-enkefalin), Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln (valorfin) (*Bachem*, Bubendorf, Švicarska); Azocoll (*Sigma-Aldrich*).

Inhibitori: hidroksamske kiseline sintetizirala je dr. sc. Janja Makarević iz Laboratorija za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju, Instituta Ruđer Bošković. L-Tyr-L-Phe-NHOH•CF_3COOH sintetiziran je prema modificiranoj metodi Jones i sur.[109], a L-Tyr-Gly-NHOH•CF_3COOH prema modificiranoj metodi Odake i sur.[110].

Proteinski i DNA standardi: standardi proteina za određivanje molekularne mase i izoelektrične točke (*GE Healthcare*); biljezi molekularne mase za određivanje veličine odsječaka DNA u agaroznom gelu (100 bp DNA Ladder) (*Fermentas*).

Boje: Coomassie Brilliant Blue G-250 (*GE Healthcare*); Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Serva*); Fast Blue BN sol (FBB) (*Sigma-Aldrich*); 6× DNA Loading Dye (*Fermentas*).

Sastojci hranjivih podloga: agar (*Difco Laboratories*, Detroit, MI, SAD); bakto tripton, pepton i ekstrakt kvasca (*BD Becton, Dickinson and Co*., Sparks, MD, SAD); izvor dušika iz kvasca (bez aminokiselina) (eng. *Yeast nitrogen base*), aminokiseline, galaktoza i D-glukoza (*Sigma-Aldrich*).

Enzimi, proteini i DNA: lizozim iz bjelanjka jajeta (48 800 j mg^{-1} proteina) i DNAaza I (deoksiribonukleaza I iz goveđe gušterače tip IV, 2150 Kunitz-ovih j mg^{-1} proteina) (*Sigma-Aldrich*); Phusion High-Fidelity^{TM} DNA polimeraza (2 j μL^{-1}) s komponentama (*Finnzymes*, Espoo, Finska); T4 DNA ligaza s puferom (*Fermentas*); GoTaq® DNA polimeraza (2,5 j μL^{-1}) s puferom (*Promega*, Madison, WI, SAD); albumin iz goveđeg seruma (BSA) (*Serva*); jednolančana DNA iz sperme lososa (*ss*-DNA) (*Sigma-Aldrich*).

Restrikcijske endonukleaze s puferima: *Nde*I, *Xho*I, *Hind*III, *BamH*I (*Invitrogen*).

Tržišni kompleti: za lančanu reakciju polimerazom (PCR): *Phusion High-Fidelity^{TM} DNA Polymerase* (*Finnzymes*) i *GoTaq® DNA Polymerase* (*Promega*); za izolaciju DNA iz otopine i gela: *NucleoSpin Extract II*; za izolaciju plazimida: *NucleoBond plasmid purification Midi* (*Macherey-Nagel*, Düren, Njemačka) i *GenElute Plasmid Miniprep Kit* (*Sigma-Aldrich*); za usmjerenu mutagenezu: *QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Stratagene*, LaJolla, CA, SAD).

Kolone i punila za kromatografiju: Ni-NTA agaroza (*Qiagen*, Hilden, Njemačka); Sephacryl S-200 Superfine, Sephadex G-25 (PD-10) (*GE Healthcare*); anionski izmjenjivač Mono Q HR 5/5 (*Pharmacia*, Upssala, Švedska).

Oprema za ugušćivanje i filtriranje: centrifugalni sistemi za koncentriranje: CentriPrep YM-10 (*Amicon, Millipore Corporation*, Bedford, MA, SAD) i Vivaspin (*Sartorius Stedim Biotech*, Goettingen, Njemačka) s granicom prolaza Mr ~ 10 000 Da; nitrocelulozne membrane za filtriranje veličine pora 0,45 μm (*Schleicher & Schuell*, Dassel, Njemačka i *Whatman*, Maidstone, Engleska); filter papir (stupnja finoće F1) (*Pharmacia*); sterilni nastavci za filtriranje veličine pora 0,45 μm (*Millipore Corporation*).

3.1.2. Sojevi bakterije *Escherichia coli*

TOP10 (F^- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG). Bakterijski soj TOP10 (*Invitrogen*) omogućuje visoki stupanj transformacije stanica, kao i stabilno umnožavanje velikog broja kopija plazmida.

BL21-CodonPlus(*DE3*)RIL (F^-, ompT, hsdS(r_B^- m_B^-), dcm^+, Tet^r, gal λ(DE3), endA, Hte [argU ileY leuW Cam^r]). Bakterijski soj BL21-Codon Plus(*DE3*)RIL (*Stratagene*) omogućava ekspresiju gena koji kodiraju molekule tRNA za rijetke kodone za arginin AGA i AGG, kodon AUA za izoleucin i kodon CUA za leucin, te je prikladan za ekspresiju gena eukariotskih proteina.

XL10-Gold (Tet^R, Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac Hte [F' proAB $lacI^qZ$ΔM15Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]) (*Stratagene*).

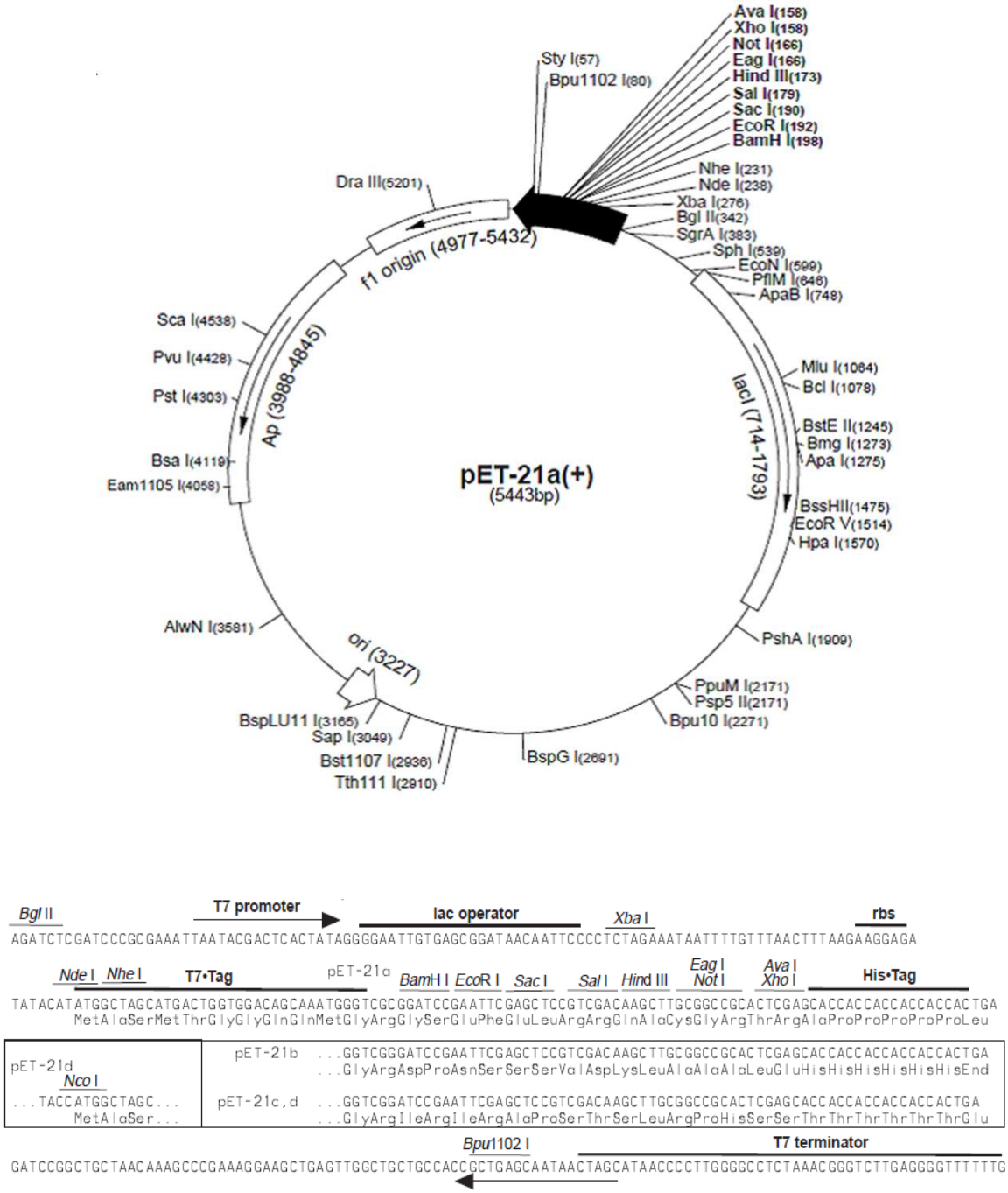
3.1.3. Sojevi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Y00000 BY4741 (MATa; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*), korišten u ovom radu nabavljen je od Euroscarf arhive (engl. ***EURO**pean **S**accharomyces **C**erevisiae **AR**chive for **F**unctional analysis*)[111].

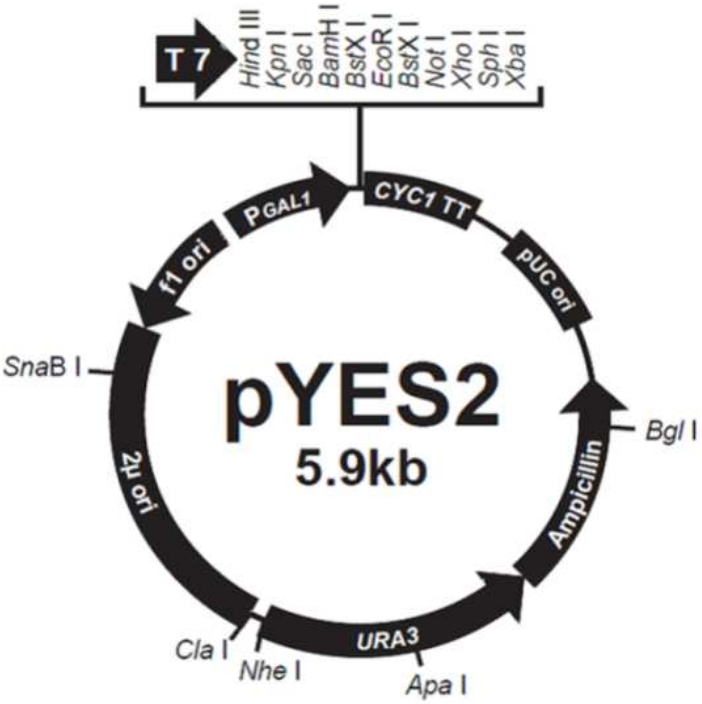
3.1.4. Plazmidna DNA (vektori)

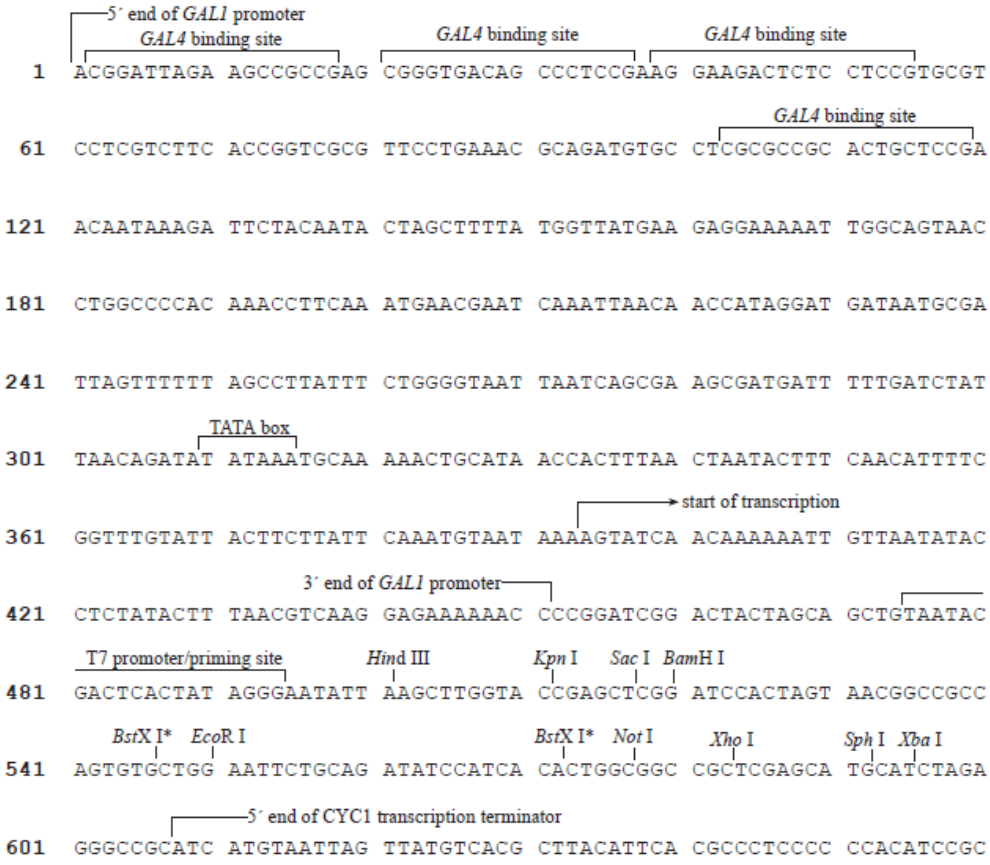
pET-21a(+) plazmidni vektor (*Novagen*, Darmstadt, Njemačka); glavne značajke ovog ekspresijskog vektora su jaki T7 promotor, T7 terminator, *lac*-represor, genetički biljeg za otpornost na antibiotik ampicilin, te nukleotidni slijed koji kodira za šest histidina na *C*-kraju proteina (eng. *His Tag;* His_6) (slika 3.1).

pYES2 (*Invitrogen*) nefuzijski je plazmidni vektor pogodan za ekspresiju gena za rekombinantne proteine u kvascu *S. cerevisiae*. Neke od osnovnih značajki ovog vektora jesu *GAL*1 promotor koji pod utjecajem galaktoze omogućava indukciju ekspresije gena, dok glukoza djeluje represivno. Genetički biljeg za rezistenciju na ampicilin omogućava umnožavanje vektora pYES2 u bakterijskim stanicama, dok *URA3* genetički biljeg omogućava selekciju transformiranih kvasaca genotipa *ura3Δ0* (slika 3.2).



Slika 3.1. Mapa ekspresijskog vektora pET-21a.





Slika 3.2. Mapa ekspresijskog vektora pYES2.

3.2. Metode rada s mikroorganizmima

3.2.1. Uzgoj bakterijskih kultura

Hranjive podloge

Tekuća hranjiva podloga LB (Luria-Bertani) sadrži baktotripton (10 g L^{-1}), ekstrakt kvasca (5 g L^{-1}) i NaCl (5 g L^{-1}). Za pripremanje krute hranjive podloge LB potrebno je dodati još i 15 g L^{-1} agara. Za pripremu podloga koristi se destilirana voda.

Priređenu hranjivu podlogu potrebno je sterilizirati autoklaviranjem 20 minuta pri 120 °C i 1,5 atm. Podloge za selekciju bakterija koje sadrže plazmidnu DNA s genetičkim biljegom za otpornost na antibiotike poput ampicilina (LB/Amp), pripremaju se na opisan način, a nakon autoklaviranja u ohlađenu podlogu dodaje se antibiotik ampicilin u konačnoj koncentraciji 100 μg mL^{-1}. Otopina antibiotika prethodno se sterilizira filtriranjem kroz filtar veličine pora 0,22 μm (*Millipore*). Sterilizirana otopina antibiotika čuva se na -20 °C.

Uzgoj

Uzgoj bakterijskih kultura na krutoj hranjivoj podlozi u Petrijevoj zdjelici izvodi se nacjepljivanjem bakterija iz smrznute ili tekuće kulture razmazivanjem sterilnim staklenim štapićem, nakon čega slijedi inkubacija preko noći na 37 °C u termostatu.

Uzgoj u tekućoj hranjivoj podlozi izvodi se nacjepljivanjem pojedinačne kolonije s krute podloge ili iz tekuće bakterijske kulture. Inkubacija se provodi na 37 °C na rotacijskoj platformi-tresilici, uz miješanje pri 250 okretaja po minuti, ili na 22 °C pri 160 okretaja po minuti, ovisno o svrsi uzgoja.

3.2.2. Transformacija bakterija plazmidnom DNA

Transformacija je postupak unošenja strane DNA (plazmidna DNA) u bakterijsku stanicu. Unos DNA u stanicu provodi se na dva načina: metodom temperaturnog šoka ili elektrotransformacijom.

Postupak transformacije temperaturnim šokom

Alikvotu od 40 do 100 μL odmrznute suspenzije prethodno priređenih kemijski kompetentnih stanica *E. coli*, soj TOP10 (čuvanih na -80 °C) dodano je 2 μL plazmidne DNA ili 10 μL ligacijske smjese, nakon čega je uslijedila inkubacija suspenzije stanica i DNA, 30 minuta na ledu. Nakon inkubacije, bakterijske stanice podvrgnute su temperaturnom šoku na 42 °C u trajanju od 2 minute, te je neposredno nakon toga dodano 0,9 ml tekuće LB podloge. Transformirana bakterijska kultura inkubirana je 30 minuta na 37 °C uz miješanje, nakon čega se 100 μL kulture nacijepilo na krutu LB/Amp podlogu, a uzgoj provodilo u standardnim uvjetima kako je opisano.

Postupak elektrotransformacije

Ova metoda korištena je za transformaciju prethodno priređenih elektrokompetentnih stanica *E. coli*, soj BL21-CodonPlus(*DE3*)RIL (čuvanih na -80 °C). Suspenziji stanica odmrznutih na ledu, volumena 40 μL, dodano je 1 μL plazmidne DNA, te je priređena smjesa pažljivo prenesena u prethodno ohlađenu kivetu za elektroporaciju (*Gene Pulser Cuvette* za *E. coli*) s razmakom elektroda od 0,2 cm. Postupak elektroporacije vrši se na aparturi *Gene Pulser Xcell* (*Bio-Rad*, Hercules, CA, SAD) pri naponu od 2500 V u trajanju do 5 ms. Neposredno nakon elektroporacije u kivetu je dodano 0,9 ml tekuće LB podloge, te je cijeli sadržaj kivete prebačen u sterilnu epruvetu i inkubiran 1 sat na 37 °C uz miješanje. Kao i kod prethodnog postupka 100 μL kulture nacijepilo se na LB/Amp krutu podlogu i uzgoj provodilo kako je opisano.

3.2.3. Uzgoj kvaščevih kultura

Hranjive podloge

Bogata hranjiva podloga (YPD) sadrži ekstrakt kvasca (10 g L^{-1}), pepton (20 g L^{-1}) i glukozu (20 g L^{-1}). Hranjiva podloga (bez glukoze) sterilizira se autoklaviranjem 20 minuta na 120 °C, nakon čega se dodaje glukoza prethodno sterilizirana filtriranjem kroz filtar veličine pora 0,22 μm, ili autoklaviranjem.

Minimalna hranjiva podloga (engl. *synthetic dropout;* SD) sadrži izvor dušika iz kvasca bez aminokiselina (6,7 g L^{-1}) (engl. *yeast nitrogen base*), glukozu (SD-glukoza) ili galaktozu (SD-galaktoza) (20 g L^{-1}). Za krutu YPD i SD podlogu potrebno je dodati 20 g L^{-1} agara. Glukoza i galaktoza posebno se steriliziraju filtriranjem ili autoklaviranjem.

Minimalna hranjiva podloga pored navedenih sastojaka sadrži i aminokiseline: arginin, cistein, leucin, lizin, treonin i triptofan (0,1 g L^{-1}); asparaginsku kiselinu, histidin, izoleucin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, tirozin i valin (0,05 g L^{-1}) i nukleinsku bazu adenin (0,1 g L^{-1}). Kod pripreme selektivne hranjive podloge za uzgoj kvasca koji sadrži plazmid pYES2 izostavlja se dodatak nukleinske baze uracila.

Uzgoj

Nacjepljivanje kvaščevih kultura izvodi se slično kao kod bakterijskih kultura, a osnovna razlika je u uvjetima uzgoja. Kulture kvasca bilo na YPD ili SD podlogama, uzgajaju se na 28 °C do 30 °C, uz intezivno miješanje pri 300 (veći volumen kulture) ili 350 (volumen kulture < 10 mL) okretaja po minuti. Vrijeme uzgoja, ovisno o vrsti hranjivog medija, je 24 do 96 sati.

3.2.4. Tranformacija kvasca pomoću litijevog acetata

Unos DNA u kvaščevu stanicu odnosno transformacija kvasca, provedena je pomoću litijevog acetata metodom Gietz-a i sur.[112]. Sve korištene otopine prethodno su sterilizirane. Pojedinačna kolonija s krute YPD podloge, nacjepljenja je u 50 mL tekuće YPD podloge te je inkubirana preko noći na 30 °C u tresilici. Gustoća kulture (stanica) određena je spektrofotometrijski pri 600 nm, te su pri apsorbanciji od 0,7 stanice sabrane centrifugiranjem 10 min na 4 °C i pri brzini od 4000 × g, potom isprane s 25 ml destilirane sterilne (ds) vode, te ponovno centrifugirane. Stanični talog resuspendiran je u 1 mL otopine LiOAc (100 mmol L^{-1}), potom centrifugiran 15 s pri maksimalnoj brzini (stolna centrifuga *Eppendorf AG*, Hamburg, Njemačka), te ponovno resuspendiran u 0,4 mL LiOAc (100 mmol L^{-1}) snažnim miješanjem, a suspenzija podijeljena u alikvote od 50 μL koji su stavljeni na led. U suspenzije stanica zatim je dodano: 240 μL PEG 3350 (φ = 0,5), 36 μL otopine LiOAc (1 mol L^{-1}), 25 μL otopine *ss*-DNA (10 mg mL^{-1}) (prethodno prokuhane 5 min, zatim naglo ohlađene) te 1 μg plazmidne DNA. Ovako priređene smjese snažno su miješane 1 min na vrtložnoj mješalici, te su potom inkubirane 30 min na 30 °C uz lagano miješanje. Nakon inkubacije, transformacijske smjese podvrgnute su temperaturnom šoku na 42 °C u trajanju od 20 min, zatim sabrane centrifugiranjem 15 s na 6000 × g. Supernatant je uklonjen pipetom, a zaostali talog resuspendiran u 100 μL ds vode, a suspenzija transformiranih stanica nacjepljena na selektivnu krutu podlogu i

uzgajana kako je opisano. Uzgojem na SD–Ura podlozi s glukozom ili galaktozom, rasti će samo oni kvasci koji su uspješno transformirani plazmidom pYES2.

3.3. Metode rada s DNA

3.3.1. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Molekule DNA razdvajane su i analizirane metodom elektroforeze u agaroznom gelu (γ = 0,01). Gelovi se pripremaju otapanjem (u mikrovalnoj pećnici) 1 g agaroze u 100 mL pufera 1× TAE sastava: 40 mmol L^{-1} Tris-acetat pH 8,5, 1 mmol L^{-1} EDTA, 0,5 mg L^{-1} etidijevog bromida. Uzorcima koji se nanose na ovako pripremljeni gel, prethodno se doda 1/6 volumena boje (6× DNA Loading Dye) kako bi se pratio tijek elektroforeze. Za usporedbu i određivanje veličine odsječaka DNA koristi se smjesa DNA standarda veličine 100-3000 parova baza (100 bp DNA Ladder). Elektroforeza se izvodi na uređaju za horizontalnu elektroforezu *Sub-Cell GT Cell* (*Bio-Rad*, Hercules, CA, USA), u 0,5× TAE puferu pri 120 V u trajanju do 30 minuta, nakon čega se odsječci DNA vizualiziraju pod UV svjetlom pomoću uređaja za snimanje gelova *Image Master*.

U svrhu izolacije i pročišćavanja DNA odsječaka i plazmidne DNA iz agaroznog gela, provodi se preparativna elektroforeza. Za pripremu gelova (γ = 0,01) koristi se agaroza niže točke taljenja (~ 65 °C), dok se elektroforeza provodi pri nižem naponu od 65 V, što osigurava bolje razdvajanje, kao i bolji prinos i oporavak DNA nakon pročišćavanja iz gela. Izolacija i pročišćavanje željenih odsječaka i plazmidne DNA, provodi se izrezivanjem trake DNA iz agaroznog gela, iz koje se zatim izolira DNA pomoću kompleta za pročišćavanje prema uputama proizvođača (*NucleoSpin Extract II*). Pročišćeni odsječci DNA i plazmidna DNA pohranjeni su u destiliranoj sterilnoj vodi na -20 °C.

Provjera veličine i koncentracije izoliranih produkata digestije, provodi se elektroforezom u agaroznom gelu (γ = 0,01) pomoću DNA standarda. Koncentracija DNA produkata određuje se mjerenjem apsorbancije pri 260 nm na spektrofotometru *UV/Visible Spectrophotometer* (*GE Healthcare*).

3.3.2. Kloniranje gena za kvaščevu DPP III u plazmidne vektore pET-21a i pYES2

3.3.2.1. Umnažanje gena za DPP III pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR)

Kromosomska DNA izolirana iz kvasca *S. cerevisiae* soja BY4741[111] korištena je kao kalup za lančanu reakciju polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction;* PCR), kojom se umnožio gen *YOL057W*, veličine 2136 pb (parova baza), koji kodira za DPP III. Umnoženi gen za DPP III ukloniran je u plazmidne vektore pET-21a i pYES2 s ciljem postizanja prekomjerne ekspresije proteina u bakterijskoj, odnosno stanici kvasca. Konstrukcijom početnica komplementarnih s 5' odnosno 3' krajem gena za DPP III, koje sadržavaju slijed za cijepanje restrikcijskim enzimima *Nde*I i *Hind*III, odnosno *Xho*I i *BamH*I i stop kodona na točno određenim mjestima, omogućena je ekspresija proteina sa i bez dodatnog privjeska od 6 histidinskih ostataka (engl. *hexa histidine tag*; His_6) na *C*-kraju proteina. Početnica DPP III-*Hind*III za umnažanje gena koji će se uklonirati u vektor pYES2, sadrži neposredno ispred start kodona Kozak sekvencu (ACC), koja će osigurati pravilan početak procesa translacije[113], dok početnica DPP III-*BamH*I sadrži dodatne kodone za His_6 (tablica 3.1). Sve početnice korištene u ovom radu servisno su sintetizirane *(MWG Biotech AG*, Ebersberg, Njemačka ili *Invitrogen*, Velika Britanija). Početnice su otopljene u sterilnoj destiliranoj vodi, te pohranjene na -20 °C.

Tablica 3.1. Početnice za umnažanje gena za DPP III.
Strelicom su naznačena mjesta cijepanja restrikcijskim enzimima. Stop kodon označen je crvenim, start kodon zelenim, Kozak slijed plavim, dok je crnim podebljanim slovima označen nukleotidni slijed koji kodira za His_6 privjesak.

Početnica	**Nukleotidni slijed početnice**
DPP III-*Nde*I	5'-GGAATTCCA↓T**ATG**AGCCACTTTTTCGCCGATCATG-3'
DPP III-*Xho*I	5'-CCGC↓TCGAGCGGTAATTCTCTATCAAGGAAAGATTGGAGCATAC-3'
DPP III-*Hind*III	5'-CCCA↓AGCTTGGG**ACCATG**AGCCACTTTTTCGCCGATCATG-3'
DPP III-*BamH*I	5'-CGG↓GATCCCG**TCA** **ATGATGATGATGATGATG**TAATTCTCTATCAAGG AAAGATTGGAGCATAC-3'

Umnažanje gena za DPP III lančanom reakcijom polimeraze provedeno je koristeći *Phusion High-Fidelity (PhuHF) DNA Polymerase* komplet za PCR. Reakcijska smjesa prikazana je u tablici 3.2. U slučaju umnažanja gena za DPP III, koji će se uklonirati u plazmid pYES2, reakcijska smjesa je istog sastava uz početnice DPP III-*Hind*III i DPP III-*BamH*I.

Tablica 3.2. Sastav reakcijske smjese za umnažanje DNA za DPP III lančanom reakcijom polimeraze.

Otopine	**Radna koncentracija**	**Volumen (μL)**
Destilirana sterilna H_20	-	29,5
PCR pufer	5×	10
dNTP	2 mmol L^{-1}	5
Početnica DPP III-*Nde*I	10 μmol L^{-1}	2
Početnica DPP III-*Xho*I	10 μmol L^{-1}	2
Kromosomska DNA kvasca	20 ng μL^{-1}	1
PhuHF DNA polimeraza	2 j μL^{-1}	0,5
∑		50

Reakcija je provedena na uređaju *PCR Applied Biosystem* (*Applied Biosystems Inc*, Carlsbad, CA, USA), koji je programiran na način da kontrolirano mijenja temperaturu kroz cikluse kako je navedeno u tablici 3.3. Produkt reakcije umnažanja gena provjeren je elektroforezom u agaroznom gelu, te izoliran na već opisan način (poglavlje 3.3.1).

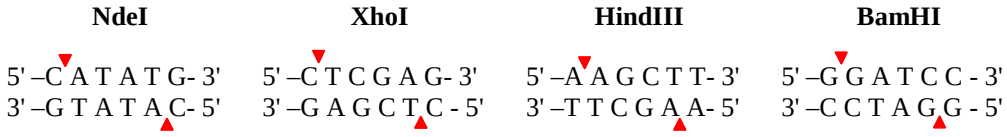
Tablica 3.3. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za umnažanje DNA za DPP III.

Stupanj reakcije	**Broj ciklusa**	**Temperatura**	**Vrijeme**
Početna denaturacija kalupa	1	98 °C	30 s
Denaturacija kalupa Sparivanje početnica i kalupa Produljivanje lanca DNA	30	98 °C 60 °C 72 °C	10 s 25 s 60 s*
Završno produljivanje lanca DNA	1	72 °C	7 min

* 30 s po kb odsječka DNA

3.3.2.2. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama

Pročišćeni produkti PCR (odsječci DNA koji nose gen za DPP III) i plazmidni vektori pET-21a i pYES2 obrađeni su restrikcijskim enzimima. Ove endonukleaze prepoznaju specifične nukleotidne slijedove dvolančane DNA molekule, koju zatim cijepaju na mjestima kako je navedeno:



Razgradnja odsječaka DNA enzimima *Nde*I i *Xho*I provedena je u reakcijskoj smjesi ukupnog volumena 20 µL sastava: 10 µL pročišćenog produkta PCR koncentracije 115 ng μL^{-1}, 2 µL 10× pufera za razgradnju (0,5 mol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mol L^{-1} NaCl, 100 mmol L^{-1} $MgCl_2$), 1 µL enzima *Nde*I (10 j μL^{-1}), 1 µL enzima *Xho*I (10 j μL^{-1}), 2 µL albumina iz goveđeg seruma (BSA) koncentracije 1 mg mL^{-1} i 4 µL sterilne destilirane vode. Priređena reakcijska smjesa inkubirana je preko noći na 37 °C.

Razgradnja plazmidnog vektora pET-21a restrikcijskim enzimima *Nde*I i *Xho*I provedena je na isti način, u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 14 µL plazmidne DNA koncentracije 77 ng μL^{-1}, bez dodatka vode.

Reakcijska smjesa u kojoj su odsječci DNA podvrgnuti razgradnji enzimima *Hind*III i *BamH*I sadržavala je: 16 µL pročišćenog produkta PCR koncentracije 100 ng μL^{-1}, 2 µL 10× pufera za razgradnju (0,5 mol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0, 1 mol L^{-1} NaCl, 100 mmol L^{-1} $MgCl_2$), 1 µL enzima *Hind*III (10 j μL^{-1}), 1 µL enzima *BamH*I (10 j μL^{-1}) i 2 µL BSA (1 mg mL^{-1}). Pripremljena reakcijska smjesa ukupnog volumena 22 µL inkubirana je preko noći na 37 °C.

Razgradnja plazmidnog vektora pYES2 restrikcijskim enzimima *Hind*III i *BamH*I provedena je na isti način, u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 3 µL plazmidne DNA koncentracije 300 ng μL^{-1}. Do konačnog volumena dodano je 11 µL sterilne destilirane vode.

Produkti digestije odsječaka DNA i plazmidnih vektora analizirani su i pročišćeni metodom preparativne elektroforeze, kao što je prethodno opisano. Veličina izoliranih produkata digestije DNA provjerena je elektroforezom u agaroznom gelu (γ = 0,01), dok je njihova koncentracija određena spektrofotometrijski.

3.3.2.3. Spajanje (ligacija) odsječaka DNA i plazmidnih vektora

T_4 DNA ligaza međusobno spaja ljepljive krajeve odsječaka DNA i plazmidne DNA koji su nastali djelovanjem restrikcijskih endonukleaza. Reakcija ugradnje DNA za DPP III u restrikcijsko mjesto *Xho*I/*Nde*I plazmida pET-21a ili u restrikcijsko mjesto *Hind*III/*BamH*I plazmida pYES2 provedena je u reakcijskoj smjesi, priređenoj miješanjem 2 µL pufera za reakciju ligacije i 1 µL otopine T_4 DNA ligaze. Do konačnog volumena reakcijske smjese od 20 µL dodano je: 4 µL otopine plazmida pET-21a (25 ng μL^{-1}), 5 µL otopine DNA (30 ng μL^{-1}) i 8 µL vode. Za ligaciju plazmida pYES2 i odsječka DNA dodano je 1 µL otopine plazmida pYES2 (90 ng μL^{-1}), 1 µL otopine DNA (30 ng μL^{-1}) i 15 µL vode. Priređena reakcijska smjesa za plazmid pET-21a inkubirana je 1 sat na 22 °C, dok je za plazmid pYES2 inkubirana preko noći na 16 °C.

3.3.2.4. Transformacija bakterijskih stanica i PCR na bakterijskim kolonijama

Transformacija stanica *E. coli*, soj TOP10 ligacijskom smjesom provodi se metodom transformacije temperaturnim šokom kako je opisano (poglavlje 3.2.2). Nakon što su bakterijske kulture uzgojene na krutoj LB/Amp podlozi, metodom lančane reakcije polimerazom na bakterijskim kolonijama ustanovit će se koje su kolonije transformirane rekombinantnim plazmidom, odnosno koje kolonije posjeduju plazmide pET-21a i pYES2 sa ukloniranom DNA za DPP III-His_6. Sterilnim nastavkom dotakne se željena kolonija, i potom resuspendira u 20 µL sterilne destilirane vode. Svaka suspenzija kulture nacjepljena je zatim na krutu LB/Amp podlogu i inkubirana nekoliko sati, kako bi kolonije narasle. Preostale suspenzije stanica inkubirane su 10 min na 95 °C u termobloku, nakon čega su kratko centrifugirane i potom stavljene na led. Reakcijska smjesa sadržavala je: 2 µL 5× *Green GoTaq* pufera, 2 µL dNTP (2 mmol L^{-1}), 2 µL početnice komplementarne 5' kraju (10 µmol L^{-1}), 2 µL početnice komplementarne 3' kraju (10 µmol L^{-1}) (odgovarajuće početnice za plazmid pET-21a i pYES2; vidi tablicu 3.1), 7,8 µL destilirane sterilne vode, 2 µL pojedinačne resuspendirane bakterijske kolonije kao kalup, te naposljetku 0,2 µL *GoTaq DNA* polimeraze. Kao pozitivna kontrola priređena je smjesa u koju je dodan 1 µL pročišćene umnožene DNA za DPP III (produkt PCR) kao kalup, dok je u negativnu kontrolu umjesto kalupa dodano 2 µL destilirane vode. Uvjeti PCR postavljeni su identično kao u slučaju već opisanog umnažanja DNA za DPP III (tablica 3.3). Produkti reakcije analizirani su elektroforezom u agaroznom gelu ($\gamma = 0,01$).

3.3.2.5. Umnažanje i izolacija rekombinantne plazmidne DNA

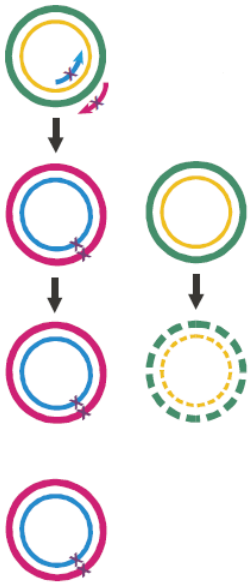
Bakterijske kolonije za koje se prethodno opisanom metodom pokazalo da sadrže rekombinantne plazmide od interesa pET-21a(DPPIIIHis$_6$) i pYES2(DPPIIIHis$_6$), nacijepljene su u 30 mL tekuće LB/Amp podloge i uzgajane pri standardnim uvjetima. Postupak izolacije plazmida iz prekonoćnih bakterijskih kultura provodi se upotrebom tržišnog kompleta za izolaciju DNA *NucleoBond plasmid purification Midi* i *GenElute Plasmid Miniprep Kit* prema uputama proizvođača. Postupak izolacije temelji se na modificiranoj alkalnoj lizi bakterijskih stanica pomoću pufera s jakim anionskim detergentom, nakon čega se plazmidna DNA veže na silicijsku membranu u prisustvu visoke koncentracije soli. Nakon ispiranja membrane, plazmidna DNA eluira se s 50 do 100 µL sterilne destilirane H_2O. Uspješnost izolacije plazmidne DNA analizira se elektroforezom u agaroznom gelu.

Rekombinantni plazmid pET-21a(DPPIII) koji će se upotrijebiti za ekspresiju DPP III bez His$_6$ privjeska, pripravila je Haidemarie Ehammer (Technical University, Graz, Austrija).

Kako bi se potvrdilo da je DNA ugrađena u plazmidni vektor u ispravnom okviru čitanja, proveden je postupak sekvencioniranja u *MWG Biotech AG* servisu (Ebersberg, Njemačka) ili servisu za sekvencioniranje Instituta Ruđer Bošković (Zagreb, Hrvatska). Za sekvencioniranje u MWG servisu priređeno je 1,5 µg liofiliziranog rekombinantnog pET-21a(DPPIIIHis$_6$) ili pYES2(DPPIIIHis$_6$) plazmida koji su otopljeni i pomiješani s odgovarajućim komercijalnim početnicama (napravljeno u servisu): T7 (5'→3') i T7 (3'→5') za plazmid pET-21a; te GAL1 (5'→3') i CYC1 (3'→5') za plazmid pYES2. Za sekvencioniranje u servisu Instituta priređene smjese ukupnog volumena 13 µL sadržavale su: 0,5-1 µg rekombinantnog plazmida i 8 pmol komercijalnih ili servisno sintetiziranih unutarnjih početnica za DNA za DPP III (*Invitrogene*). Unutarnje početnice za DPP III imaju slijedeći nukleotidni slijed: DPPIII 869: 5'-CATCAACCACTTTGTCACTGG-3'; DPPIII 890: 5'CCAGTGACAAAGTGGT TGATG-3'; DPPIII 1292: 5'-GCATCCGCCAAGTTTTATATCG-3'; DPPIII 1314: 5'-CGATATAAAACTTGGCGGATGC-3'.

3.3.3. Usmjerena mutageneza kloniranog gena za DPP III

Uvođenje točkaste mutacije u DNA za DPP III provedeno je metodom usmjerene mutageneze *in vitro*, koristeći komplet *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (slika 3.3). Ova metoda temelji se na lančanoj reakciji polimerazom, pri čemu je upotrijebljena termostabilna DNA polimeraza visoke točnosti replikacije te komplementarne početnice koje sadrže željenu mutaciju. Kao kalup za PCR korišten je pročišćeni plazmidni vektor s ukloniranom DNA za DPP III-His_6; pET-21a(DPPIIIHis$_6$).



1. Denaturacija plazmidne DNA (kalupa), nakon čega slijedi sparivanje početnica koje sadrže ciljanu mutaciju (oznaka x)
2. Sinteza komplementarnog lanca *PfuUltra* DNA polimerazom
3. Razgradnja metilirane i polumetilirane plazmidne DNA (kalupa) enzimom *Dpn*I, pri čemu novosintetizirani plazmid koji nije metiliran i koji sadrži ciljanu mutaciju ostaje nepocijepan.
4. Transformacija bakterijskih stanica novosintetiziranim plazmidom

Slika 3.3. Shematski prikaz metode ciljane mutageneze.

Sve početnice za reakciju usmjerene mutageneze servisno su sintetizirane *(MWG Biotech AG* ili *Invitrogen*), otopljene u sterilnoj destiliranoj vodi i pohranjene na -20 °C (tablica 3.4).

Tablica 3.4. Nukleotidni slijed početnica koje su upotrijebljene za uvođenje točkastih mutacija u DNA za DPP III usmjerenom mutagenezom *in vitro*.
Kodoni za mutirane aminokiselinske ostatke prikazani su crvenim slovima.

Mutirani oblik DPP III	**Nukleotidni slijed početnica**
C113S	5'-GACACTAAGTTTATTCCTCGTTCTGAGGTAAAATTCTTCAAACAG-3' 5'-CTGTTTGAAGAATTTTACCTCAGAACGAGGAATAAACTTAGTGTC-3'
C130S	5'-GGCCAAGATTAATCCGTCTTCTTCTCCGCTCAC-3' 5'-GTGAGCGGAGAAGAAGACGGATTAATCTTGGCC-3'
C518S	5'-TGGCCCATTTGAAGAATCTCGTGCGGAAGTAATTG-3' 5'-CAATTACTTCCGCACGAGATTCTTCAAATGGGCCA-3'
C626S	5'-TAAAACAGCGGGACATGAATCTGTGAAAGACTATTTAAAGC-3' 5'-GCTTTAAATAGTCTTTCACAGATTCATGTCCCGCTGTTTTA-3'
C639S	5'-CATTTGCATGTTTACAAATCTTCAGGCGATGTGGAACAG-3' 5'-CTGTTCCACATCGCCTGAAGATTTGTAAACATGCAAATG-3'
Y327A	5'-CGGTTTTATCGAAACAGCTAGAGAACCCTCGGGC-3' 5'-GCCCGAGGGTTCTCTAGCTGTTTCGATAAAACCG-3'
Y327F	5'-CGGTTTTATCGAAACATTTAGAGAACCCTCGGGC-3' 5'-GCCCGAGGGTTCTCTAAATGTTTCGATAAAACCG-3'
D381N	5'-CCGATTTTCAATCCACCAAATTCACCTCTCTAGAAG-3' 5'-CTTCTAGAGAGGTGAAATTTGGTGGATTGAAAATCGG-3'
E461Q	5'-CCAAGTAGGCATCCATCAATTATTAGGACATGGTTCAGG-3' 5'-CCTGAACCATGTCCTAATAATTGATGGATGCCTACTTGG-3'
H578N	5'-GGTAAGTGGGGACAACCAAACATGCAAGCAAGATTTTC-3' 5'-GAAAATCTTGCTTGCATGTTTGGTTGTCCCCACTTACC-3'
M579L	5'-GTGGGGACAACCACACCTGCAAGCAAGATTTTCTATC-3' 5'-GATAGAAAATCTTGCTTGCAGGTGTGGTTGTCCCCAC-3'
R582Q	5'-GGGGACAACCACACATGCAAGCACAATTTTCTATCATGAAAAC-3' 5'-GTTTTCATGATAGAAAATTGTGCTTGCATGTGTGGTTGTCCCC-3'
K638L	5'-GCATTTGCATGTTTACTTATGTTCAGGCGATGTGGAACAG-3' 5'-CTGTTCCACATCGCCTGAACATAAGTAAACATGCAAATGC-3'

U tablici 3.5 prikazan je sastav reakcijske smjese, dok tablica 3.6 prikazuje uvjete PCR za ciljanu mutagenezu *in vitro*.

Tablica 3.5. Sastav reakcijske smjese za provođenje ciljane mutageneze *in vitro* lančanom reakcijom polimeraze.

Otopine	Radna koncentracija	Volumen (µL)
Destilirana sterilna H_20	-	35,4
Reakcijski pufer	10×	5
Plazmid pET-21a(DPPIII-His_6)	5 ng μL^{-1}	2
Početnica I	0,1 µg μL^{-1}	1,3
Početnica II	0,1 µg μL^{-1}	1,3
Smjesa dNTP	10 mmol L^{-1}	1
QuikSolution	-	3
PfuTurbo DNA polimeraza	2,5 j μL^{-1}	1
∑		50

Tablica 3.6. Uvjeti lančane reakcije polimerazom za provođenje ciljane mutageneze *in vitro*.

Uvjeti reakcije	Broj ciklusa	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija plazmida	1	95 °C	60 s
Denaturacija plazmida Sparivanje početnica i plazmida Produljivanje lanca DNA	18	95 °C 60 °C 68 °C	50 s 50 s 8 min*
Završno produljivanje lanca DNA	1	68 °C	7 min

* 1 min po kb plazmida

Po završetku reakcije, u smjesu se doda 1 µL restrikcijske endonukleaze *Dpn*I (10 j μL^{-1}), nakon čega slijedi inkubacija 1 sat na 37 °C. Tijekom inkubacije, enzim *Dpn*I cijepa potpuno ili djelomično metilirane slijedove dvolančane DNA. Metilacija molekule DNA (5'-G^{m6}ATC-3') odvija se samo *in vivo*, dok je rezultat mutageneze *in vitro* novosintetizirana nemetilirana plazmidna DNA, pa se djelovanjem enzima *Dpn*I iz smjese PCR uklanja samo plazmid koji je poslužio kao kalup za reakciju mutageneze. *In vitro* sintetizirani plazmid koji nosi DNA sa željenom mutacijom nije razgrađen enzimom *Dpn*I, te se dalje koristi za transformaciju kompetentnih stanica *E. coli*. Kompetentne *XL10–Gold*

stanice transformirane su sa 2 µL PCR smjese tretirane enzimom *Dpn*I, prema uputama proizvođača. Pojedinačne kolonije transformanata sa krute LB/Amp podloge, nacijepljene su u 5 ili 100 mL tekuće LB/Amp podloge i uzgojene u standarnim uvjetima. Iz prekonoćnih kultura izolirani su rekombinantni plazmidi korištenjem tržišnih kompleta *NucleoBond plasmid purification Midi* i *GenElute Plasmid Miniprep Kit* prema uputama proizvođača. Uspješnost uvođenja ciljanih mutacija provjerena je sekvencioniranjem kako je opisano (poglavlje 3.3.2.5).

3.4. Metode rada s proteinima

3.4.1. Prekomjerna ekspresija rekombinantne DPP III

3.4.1.1. Heterologna ekspresija

Za prekomjernu heterolognu ekspresiju rekombinantne kvaščeve DPP III korištena je bakterija *E. coli*, soj BL21-CodonPlus(*DE3*)RIL. Ovaj soj u genomu sadrži gen za T7-RNA polimerazu, čija je ekspresija pod kontrolom inducibilnog *lac*-promotora. T7 RNA polimeraza specifično prepoznaje, te se veže na T7 promotor ekspresijskog vektora pET-21a što omogućuje ekspresiju gena od interesa ukloniranih u vektor. Umnoženi gen *YOL057W* koji kodira za DPP III ugrađen je između restrikcijskih mjesta *Nde*I/*Xho*I vektora pET-21a, što ekspresiju gena za DPP III stavlja pod kontrolu jakog T7 promotora.

Transformacija kompetentnih stanica rekombinantnim plazmidom pET-21a koji nosi gen za DPP III provedena je metodom temperaturnog šoka ili elektrotransformacije kako je opisano (poglavlje 3.2.2). Pojedinačna kolonija s krute LB/Amp podloge nacijepljena je u 100 mL tekuće LB/Amp podloge, i uzgajana preko noći u standardnim uvjetima. 10 mL prekonoćne kulture potom je nasađeno u 500 mL tekuće LB/Amp podloge, te je nastavljen uzgoj u standardnim uvjetima pri 37 °C. Tijekom uzgoja praćen je rast bakterijske kulture mjerenjem apsorbancije pri 600 nm. Ekspresija gena za rekombinantni protein započinje dodatkom 0,3 mmol L^{-1} IPTG-a u bakterijsku kulturu u trenutku kada je vrijednost apsorbancije kulture 0,6 do 0,8. Dodatak IPTG-a potiče ekspresiju T7 RNA polimeraze, koja pak potiče ekspresiju gena za DPP III. Inkubacija bakterijske kulture nakon dodatka IPTG-a odvija se preko noći, pri 19-20 °C i uz miješanje od 160 okretaja po minuti. Prekonoćna kultura centrifugirana je 10 min pri 4000 × g na 4

°C (centrifuga *Sorvall*, GLC-1, Norwalk, CT, SAD), nakon čega su talozi bakterijskih stanica pohranjeni na -20 °C.

3.4.1.2. Homologna ekspresija

Transformacija stanica kvasca *S. cerevisiae* soja BY4741 rekombinantnim plazmidom pYES2 u koji je ugrađen gen za DPP III, provedena je metodom pomoću litijevog acetata kako je opisano (poglavlje 3.2.4). Suspenzija transformiranih stanica nacjepljena je na SD-Ura krutu podlogu sa glukozom, i uzgajana 48-96 sati pri 30 °C, pri čemu rastu kvasci transformirani rekombinantnim plazmidom pYES2, a ekspresija gena DPP III plazmida je pod kontrolom GAL1 promotora, tj. supresirana glukozom. Nakon inkubacije, kolonije su presađene na način da se sterilnim nastavkom za pipetu povuče preko ploče sa kolonijama, koje se nasade na novu SD-Ura krutu podlogu s glukozom, i uzgajaju u istim uvjetima. Pojedinačna kolonija s ploče nacijepljena je u 100 mL SD-Ura podloge sa glukozom, te inkubirana 48 sati u standardnim uvjetima. Mjerenjem apsorbacije pri 600 nm, određena je gustoća kulture, na osnovu čega je izračunato koliki volumen kulture je potrebno alikvotirati, kako bi nakon inokulacije u podlogu sa galaktozom, gustoća stanica odgovarala apsorbanciji od 0,4. Tako izračunati volumen kulture centrifugiran je 5 min pri 1500 × g i 4 °C. Talog stanica potom je pažljivo resuspendiran u sterlinoj destiliranoj vodi i ponovno centrifugiran pri istim uvjetima. Sakupljene stanice resuspendirane su u određenom volumenu tekuće SD-Ura podloge s galaktozom, te je priređena suspenzija stanica inokulirana u preostali volumen iste tekuće podloge, čime je započela ekspresija gena za DPP III koja je pod kontrolom GAL1 promotora. Uzgoj je nastavljen preko noći na 30 °C i 300 okretaja po minuti. Prekonoćna kultura centrifugirana je 10 min pri 4000 × g i 4 °C. Talog je zatim ispran u destiliranoj sterlinoj vodi i ponovno centrifugiran. Sakupljeni talog stanica pohranjen je 2 sata na -80 °C, a zatim na -20 °C.

3.4.2. Liza stanica

Liza bakterijskih stanica

Talozi bakterijskih stanica postepeno su odmrznuti na ledu, zatim pažljivo resuspendirani u puferu za lizu (2-5 mL pufera po 1 g bakterijske biomase) sastava: 50 mmol L^{-1} NaH_2PO_4, 300 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} imidazol, pH 8,0. U priređenu suspenziju stanica dodano je 100 µg mL^{-1} lizozima, koja je zatim inkubirana 15 min na ledu uz lagano miješanje. Stanice su potom razorene pomoću ultrazvučnog dezintegratora

(sonda promjera 3 i 4 mm) i to u ciklusima od 5 × 1 min, sa prekidima od 1 min. Tijekom čitavog postupka stanice su držane u ledu. Suspenziji je zatim dodana DNAza I do konačne koncentracije od 10 μg mL^{-1}, nakon čega je smjesa inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi uz lagano ljuljanje. Stanični lizat centrifugiran je 20 min pri 14 000 × g i 4 °C, a dobiveni supernatant filtriran je kroz filtar papir. Ovako pripremljeni bakterijski lizat podvrgnut je pročišćavanju na afinitetnoj koloni Ni-NTA agaroze.

Bakterijski lizati iz kojih su pročišćavani prekomjerno eksprimirani proteini bez His_6 privjeska na *C*-kraju, obrađeni su na prethodno opisan način, uz modifikaciju resuspendiranja taloga. U tu svrhu, talozi su resuspendirani u puferu za lizu (10 mL pufera po 1 g bakterijske biomase) sastava: 10 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0, 1 mmol L^{-1} EDTA, kojemu je neposredno prije upotrebe dodano 100 μg mL^{-1} lizozima.

Liza kvaščevih stanica

Talozi kvaščevih stanica koji su postepeno odmrznuti na ledu, resuspendirani su u puferu za lizu (2 mL pufera po 1 g biomase kvasca) sastava: 50 mmol L^{-1} NaH_2PO_4, 300 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} imidazol, pH 8,0. U priređenu smjesu dodan je inhibitor PMSF u konačnoj koncentraciji od 1 mmol L^{-1}, te staklene kuglice promjera 0,4-0,6 mm (*Sigma-Aldrich*) volumena jednakog volumenu smjese. Kako bi se razorila stanična stijenka kvasca, sadržaj suspenzije i kuglica snažno je miješan u ciklusima od 6 × 1 min na vrtložnoj mješalici, sa prekidima od 1 min kako bi se sadržaj ohladio u ledu. Priređeni lizat potom je centrifugiran 3 min pri 1500 × g i 4 °C, nakon čega je odvojen supernatant (lizat), a sakupljene kuglice isprane su puferom za lizu i centrifugiranje je ponovljeno. Sakupljeni lizati spojeni su i izbistreni centrifugiranjem 25 min pri 17 000 × g i 4 °C, nakon čega je supernatant filtriran. Priređeni lizat pročišćen je na stupcu Ni-NTA agaroze.

3.4.3. Određivanje aktivnosti kvaščeve DPP III

Tijekom postupka pročišćavanja i izolacije DPP III, aktivnost enzima praćena je kolorimetrijskom metodom prema Nagatsu-u i sur.[114]. Kao supstrat za DPP III korišten je Arg_2-2NA, a metoda se zasniva na mjerenju intenziteta ružičasto-crvene boje, koja nastaje diazokopulacijom produkta hidrolize supstrata 2-naftilamina i tetrazonijeve soli *o*-dianisidina, Fast Blue sol BN (FBB).

Kvantitativno određivanje aktivnosti DPP III provodi se spektrofotometrijskim mjerenjem intenziteta razvijene boje reakcijske smjese pri 530 nm (*CamSpec M-501 Single*

Beam scanning UV/VIS Spectrophotometer, Cambridge, Engleska) uz dužinu puta svjetlosti od 1 cm. Reakcija smjesa volumena 1 mL sadrži: 17-20 mmol L^{-1} Tris-HCl pufer pH 8,0, 50-100 µmol L^{-1} $CoCl_2$ i enzim DPP III koji se u priređenoj smjesi predinkubira 2 min na 37 °C. Reakcija započinje dodatkom otopine suspstrata Arg_2-2NA konačne koncentracije 40 µmol L^{-1}, te se nastavlja inkubacija u trajanju od 15 min na 37 °C uz lagano miješanje u vodenoj kupelji. Reakcija se prekida dodatkom 0,2 mL svježe priređene otopine boje FBB (1,5 mg u 1 mL) u 2 mol L^{-1} Na-acetatnom puferu pH 4,2 s Tweenom 80 (φ = 0,10). Nakon prekida reakcije, boja se razvija 10 min nakon čega se mjeri intezitet kako je opisano.

Baždarni pravac konstruiran je na osnovi mjerenja provedenih u istim uvjetima s otopinama poznatih odvaga 2-naftilamina sušenog u eksikatoru uz natrijevu lužinu. Kao jedna enzimska jedinica (j) uzeta je ona količina enzima koja razgradi 1 µmol supstrata u minuti.

Određivanje susptratne specifičnosti za kvaščevu DPP III provodilo se na način prethodno opisan u istim uvjetima, uz razne dipeptidil-2-naftilamide: Ala_2-2NA, Ala-Phe-2NA i His-Ser-2NA koncentracije 100 µmol L^{-1}, i vrijeme reakcije do 2 sata.

Drugi način određivanja, semikvantitativni postupak, primjenjuje se kod praćenja aktivnosti DPP III u frakcijama nakon pročišćavanja na koloni. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 0,1 mL, priredi se u porculanskim jažicama, a intenzitet boje procjenjuje se vizualno i označava gradacijom od 1 do 4.

3.4.4. Određivanje koncentracije proteina

U ovom radu korištene su dvije metode za određivanje koncentracije proteina: mjerenje apsorbancije pri 280 nm, i metoda po Bradfordu.

Za izračun koncentracije proteina mjerenjem apsorbancije pri 280 nm koristi se ekstincijski koeficijent za kvaščevu DPP III-His_6 (71 740 M^{-1} cm^{-1}).

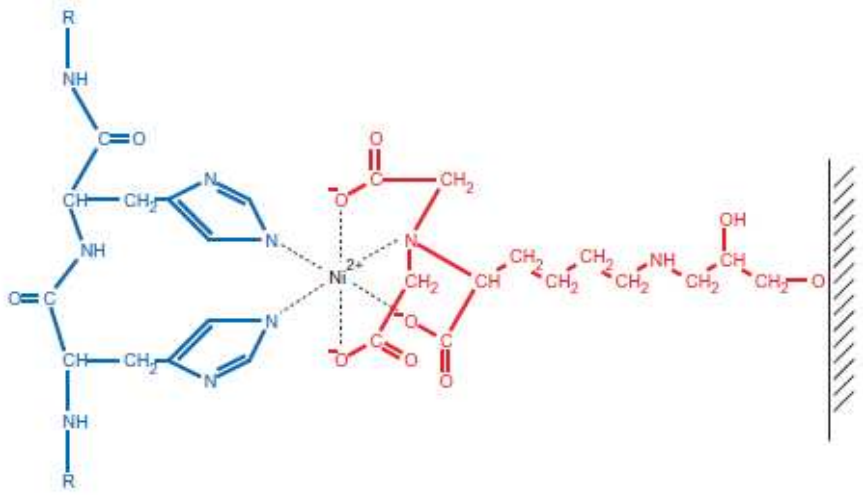
Metoda po Bradfordu[115] temelji se na promjeni maksimuma apsorbancije boje Coomassie Brilliant Blue G-250 sa 465 na 595 nm, do koje dolazi uslijed vezanja boje na protein u kiseloj otopini. Kako bi se odredila koncentracija proteina potrebno je načiniti baždarnu krivulju koristeći nekoliko koncentracija proteinskog standarda albumina iz goveđeg seruma. Pripremljenim uzorcima nepoznate koncentracije volumena 100 µL, standardima i slijepoj probi (uzorak bez proteina) dodaje se 1 mL Bradford reagensa sastava: Coomassie Brilliant Blue G-250 boja ($\gamma = 1 \times 10^{-4}$), etanol ($\varphi$ = 0,047) i fosfatna

kiselina (φ = 0,085). Nakon snažnog miješanja na vrtložnoj miješalici, priređene smjese inkubiraju se 45 min na sobnoj temperaturi, te se spektrofotometrijski očita intezitet razvijene boje pri 595 nm.

3.4.5. Kromatografske metode

3.4.5.1. Afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozi

Kloniranjem DPP III proteina u vektor pET-21a na opisani način omogućena je ekspresija rekombinantnog proteina s afinitetnim privjeskom od šest histidina (His_6) na *C*-kraju proteina. His_6 privjesak se veže reverzibilnim interakcijama na ligand afinitetnog kromatografskog nosača Ni-NTA agaroze, što omogućava izolaciju proteina iz staničnog lizata (slika 3.4)[116].



Slika 3.4. Shematski prikaz interakcija između susjednih ostataka u His_6-privjesku i Ni-NTA. Ni-NTA agaroza sastoji se od Sepharose CL-6B na koju je vezana nitrilotrioctena kiselina (NTA). NTA je tetradentatni kelirajući agens koji zauzima četiri od šest veznih mjesta u koordinacijskoj sferi niklovog(II)-iona (crveno), ostavljajući dva mjesta slobodna na koja se specifično veže imidazolni prsten histidinskog ostatka privjeska His_6 proteina (plavo). Preuzeto iz (116).

Kapacitet vezanja proteina sa His_6 privjeskom na Ni-NTA nosač je 5-10 mg proteina po mL nosača. Lizat koji je prethodno filtriran, nanešen je na Ni-NTA kolonu volumena 3 ili 15 mL, prethodno uravnoteženu puferom za lizu sastava: 50 mmol L^{-1} NaH_2PO_4, 300 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} imidazol, pH 8,0. Niska koncentracija imidazola u puferu za lizu spriječava nespecifične interakcije tijekom nanošenja uzorka na kolonu, ali ne utječe na vezanje proteina sa afinitetnim privjeskom. Nakon nanošenja staničnog lizata, kolona se ispire sa minimalno 3 volumena stupca, puferom za ispiranje sastava: 50 mmol L^{-1}

NaH_2PO_4, 300 mmol L^{-1} NaCl, 20 mmol L^{-1} imidazol, pH 8,0. Povećanje koncentracije imidazola u puferu za ispiranje omogućava eluiranje nespecifično vezanih proteina sa kolone. His_6-protein vezan na kolonu eluira se puferom koji sadrži znantno veću koncentraciju imidazola: 50 mmol L^{-1} NaH_2PO_4, 300 mmol L^{-1} NaCl, 150 mmol L^{-1} imidazol, pH 8,0, i sakuplja u frakcije volumena 1 ili 2,5 mL ovisno o volumenu stupca Ni-NTA agaroze. Postupak kromatografije izvodi se na sobnoj temperaturi, a eluirane frakcije pohranjuju se u led. Uspješnost pročišćavanja proteina provjerava se SDS-elektroforezom u denaturirajućim uvjetima, određivanjem koncentracije proteina i enzimske aktivnosti standardnim testom. Frakcije koje sadrže DPP III spojene su i prevedene u 20 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,4 pufer. Izmjena pufera u uzorcima provedena je gel-filtracijom na koloni PD-10 (Sephadex G-25), a postupak izmjene izveden je prema uputama proizvođača (*GE Healthcare*).

3.4.5.2. Gel-filtracija

Metoda gel-filtracije kojom se razdvajaju proteini na osnovi razlike u veličini odnosno molekularnoj masi, korištena je kao slijedeći korak u pročišćavanju proteina nakon kromatografije na Ni-NTA agarozi, te kao prvi korak u izolaciji proteina bez His_6 privjeska. Gel-filtracija izvođena je pri 4 °C, na koloni punjenoj Sephacryl S–200 Superfine nosačem, koji je prikladan za razdvajanje proteina mase od 5 do 250 kDa. Kolona ($1,5 \times 80$ cm) je uravnotežena puferom sastava: 50 mmol L^{-1} Tris-HCl, 0,2 mol L^{-1} NaCl, pH 7,4, a volumen uzorka nije bio veći od 2 % volumena stupca gela. Kako bi se regulirao i održao stalan protok (6 mL h^{-1}) pufera kroz kolonu, korištena je peristaltička pumpa P-1 (*Pharmacia*). Frakcije volumena 2,3 mL sakupljane su pomoću programiranog sakupljača frakcija (*LKB*, Bomma, Švedska). DPP III je u frakcijama detektirana odeđivanjem aktivnosti, nakon čega su aktivne frakcije sakupljene i pohranjene.

3.4.5.3. Kromatografija na anionskom izmjenjivaču

Pročišćavanje proteina na anionskom izmjenjivaču MonoQ provedeno je brzom tekućinskom kromatografijom proteina (engl. *Fast Protein Liquid Chromatography*; FPLC), na automatiziranom sustavu proizvođača *Pharmacia* pri sobnoj temperaturi (25 °C). Kolona anionskog izmjenjivača Mono Q HR 5/5 uravnotežena je 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,4 puferom koji sadrži 1 mmol L^{-1} NaCl. Prije nanošenja na kolonu bilo je potrebno odsoliti uzorak i prevesti ga u pufer za ekvilibraciju brzom gel-filtracijom na PD-10. Vezani proteini eluiraju se linearnim gradijentom NaCl koncentracije 1 do 1000 mmol

L^{-1} u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl puferu pH 7,4, te su sakupljani u frakcije volumena 0,5 mL. Tijekom cijelog postupka protok pufera iznosio je 0,5 mL min^{-1}.

Proteinske otopine su nakon provedene kromatografije, po potrebi ugušćivane u centrifugalnim sistemima za koncentriranje *Vivaspin* i *CentriPrep* s gornjom granicom prolaza molekula 10 000 Da. Ugušćivanje je provođeno centrifugiranjem uz ~ 6000 × g pri 4 °C. Svi pročišćeni uzorci DPP III pohranjeni su na -10 °C uz dodatak glicerola (φ = 0,22).

3.4.6. Elektroforetske metode

U svrhu analize proteinskih frakcija nakon pročišćavanja kromatografskim metodama, te provjere čistoće preparata DPP III, korištene su metode elektroforeze proteina u poliakrilamidnom gelu (PAGE) u nativnim i denaturirajućim uvjetima. Nakon provedene PAGE proteini su u gelovima vizualizirani bojanjem.

3.4.6.1. Elektroforeza proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu

Postupak pripreme gela i elektroforeze izveden je metodom po Laemmli-ju[117] na aparturi *Mini Protean II Electrophoresis Cell* (*Bio-Rad*). Gelovi dimenzija 80 × 70 × 0,75 mm, pripremljeni su između dviju staklenih ploča u uspravnom položaju, na način da se prvo izlije gel za razdjeljivanje sastava: akrilamid:bisakrilamid konačnog udjela φ = 0,075, 0,10 ili 0,12 (koncentrirana otopina φ = 0,30), 2,5 mL 1,5 mol L^{-1} Tris-HCl pH 8,8, 50 μL SDS (φ = 0,10), 50 μL APS (φ = 0,10), 2 μL TEMED (φ = 0,05) i deionizirane vode do konačnog volumena gela (5 mL). Pripremljeni gel nadsvodi se destiliranom vodom. Nakon što je gel polimeriziran (oko 30 min), voda se odlije, a povrh gela za razdvajanje izlije se gel za sabijanje sastava: akrilamid:bisakrilamid 0,500 mL 0,5 mol L^{-1} Tris-HCl pH 6,8 (φ = 0,04), 20 μL SDS (φ = 0,10), 10 μL APS (φ = 0,10), 1 μL TEMED (φ = 0,05) i deionizirana voda do konačnog volumena 2,0 mL. U izliveni gel postavlja se češalj za oblikovanje jažica.

Uzorci su prije nanošenja na gel obrađeni zagrijavanjem 5 min na 100 °C, u puferu sastava: SDS (γ = 0,10), 2-ME (φ = 0,05), glicerol (φ = 0,10), bromfenol modrilo (γ = 0,01), 0,5 mol L^{-1} Tris-HCl pufer pH 6,8. Nakon zagrijavanja uzorci su kratko centrifugirani pri maksimalnoj brzini (oko 30 s), te su nanešeni u jažice gela. Elektroforeza se provodi u puferu sastava: 0,025 mol L^{-1} Tris-HCl, 0,192 mol L^{-1} glicin, SDS (γ = 0,001),

pH 8,3, pri stalnom naponu struje od 130 V do 150 V, za sabijanje uzorka u gelu, dok je razdvajanje u gelu provođeno uz stalni napon od 180 V do 200 V.

Kako bi se detektirale vrpce proteina, gelovi su bojani u otopini sastava: boja Coomassie Brilliant Blue R-250 ($\gamma = 0{,}001$), metanol ($\varphi = 0{,}40$), octena kiselina ($\varphi = 0{,}10$), u trajanju do 10 min. Odbojavanje gelova vrši se u otopini sastava: metanol ($\varphi = 0{,}20$) i octena kiselina ($\varphi = 0{,}07$), ili u kipućoj destiliranoj vodi dok se višak boje potpuno ne ukloni.

Osim na opisani način, SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu izvođena je i na aparaturi *PhastSystem* na gotovim pločicama poliakrilamidnog gela gradijenta gustoće 8-25 %, dimenzija $5 \times 4{,}5$ cm i debljine 0,45 mm, prema uputama proizvođača (*PhastSystem Separation Technique* File No. 110). Uzorci su prije nanošenja također obrađeni kuhanjem 5 min na 100 °C u denaturirajućem puferu sastava: 10 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0, SDS ($\gamma = 0{,}125$), 2-ME ($\varphi = 0{,}05$), 1 mmol L^{-1} EDTA i bromfenol plavilo ($\varphi = 0{,}001$), nakon čega su kratko centrifugirani. Nanošenje uzoraka na površinu gela izvršeno je automatskim spuštanjem posebnih aplikatora. Elektroforeza je izvođena 30 min pri pH 8,5, uz jakost struje od 10 mA i napon 250 V, te pri stalnoj temperaturi od 15 °C.

Uzorci koje se analiziralo u denaturirajućim, ali ne i reducirajućim uvjetima SDS-elektroforeze, pripremljeni su na način kako je navedeno, ali korištenjem pufera za obradu uzorka koji ne sadrži 2-ME.

Po završetku elektroforeze, gelovi su bojani prema uputama proizvođača (*PhastSystem Development Technique* File No. 200) u otopini sastava: boja PhastGel Blue R ($\gamma = 0{,}001$), metanol ($\varphi = 0{,}30$), octena kiselina ($\varphi = 0{,}10$), u trajanju do 10 min. Odbojavanje gelova vrši se u otopini sastava: metanol ($\varphi = 0{,}30$) i octena kiselina ($\varphi = 0{,}10$).

Kako bi se detektirale vrpce s manjom količinom proteina (0,01-0,05 μg), gelovi su bojani srebrom metodom prema Hempelmann-u i Kaminsk-om[118]. Ovaj postupak bojanja obuhvaća: fiksiranje gela 30 min u TCA ($\varphi = 0{,}10$) a zatim 30 min u smjesi etanola ($\varphi = 0{,}20$) i octene kiseline ($\varphi = 0{,}05$) uz DTT ($\varphi = 0{,}00002$). Slijedi namakanje gela 5 min u 17 mmol L^{-1} $K_2Cr_2O_7$, nakon čega se gel ispire u deioniziranoj vodi 5 min uz nekoliko izmjena. Slijedeći korak je namakanje gela 10 min u 6 mmol L^{-1} $AgNO_3$ uz lagano potresivanje, nakon čega slijedi kratko ispiranje gela vodom. Razvijanje gela provodi se u vodenoj otopini Na_2CO_3 ($\varphi = 0{,}03$) koja sadrži formaldehid ($\varphi = 0{,}0002$). Nakon pojave proteinskih vrpci, reakcija se prekida ispiranjem gela u octenoj kiselini ($\varphi = 0{,}01$).

Kako bi se sačuvali, gelovi su namakani u otopini glicerola (φ = 0,05) i octene kiseline (φ = 0,10) preko noći, nakon čegu su sušeni na zraku pri sobnoj temperaturi.

3.4.6.2. Elektroforeza proteina u nativnim uvjetima

Elektroforeza u nativnim uvjetima izvođena je na aparaturi *PhastSystem*, na gotovim pločicama poliakrilamidnog gela gradijenta gustoće 8-25 %, također prema uputama proizvođača (*PhastSystem*, *Separation Technique*, File No. 120 i 121). Uzorci su bez prethodne obrade obojani bromfenol plavilom (φ = 0,01) kako bi se pratio tijek elektroforeze. Elektroforeza je provođena u trajanju od ~ 60 min uz jakost struje 10 mA i napon 400 V uz stalnu temperaturu od 15 °C. Nakon završetka, gelovi su bojani sa bojom PhastGel Blue R kako je opisano.

3.4.6.3. Izoelektrično fokusiranje (IEF)

Izoelektrično fokusiranje provedeno je na aparaturi *PhastSystem* prema propisu *PhastSystem Separation Technique* File No. 100. U tu svrhu upotrijebljene su gotove pločice s 5 %-tnim homogenim poliakrilamidinim gelom, dimenzija 5 × 4,3 cm i debljine 0,43 mm, raspona pH 3,0-9,0. Fokusiranje je provođeno pri 15 °C, uz struju od 2,5 mA i napon od 2000 V u trajanju od 30 min. Kao standard nanesena je smjesa proteina poznate izoelektrične točke. Nakon fokusiranja proteini su bojani bojom Phast Blue R po propisu *PhastSystem Separation Technique* File No. 100.

3.4.7. Ispitivanje optimalnih uvjeta za aktivnost kvaščeve DPP III

Optimalni pH djelovanja kvaščeve DPP III određen je opisanom (standardnom) kvantitativnom metodom spektrofotometrijskog određivanja enzimske aktivnosti pri čemu su ispitani puferi pH vrijednosti: 7,0, 7,4, 8,0, 8,6, 9, 10, i 11, ionskih jakosti: 0,01, 0,05 i 0,1. Puferi su priređeni prema Long-u[119].

Utjecaj iona metala na aktivnost DPP III ispitan je varirajući koncentracije $CoCl_2$ i $ZnCl_2$. Pročišćeni enzimski preparat koncentracije ~ 0,5 μg mL^{-1} je predinkubiran u smjesi sa $CoCl_2$ (10-1000 μmol L^{-1}) ili $ZnCl_2$ (0,01-500 μmol L^{-1}), te je nakon dodatka supstrata aktivnost određena standardnim testom kako je opisano.

3.4.8. Ispitivanje utjecaja efektora peptidaza

Ispitivanje efektora poput EDTA i 1,10-fenantrolina, provedeno je predinkubacijom enzima (~ 24 nmol L^{-1}) uz EDTA (1 i 5 mmol L^{-1}) ili 1,10-fenantrolina (0,1 mmol L^{-1}) pri pH 8,0 u trajanju od 5 min pri 37 °C. Preostala enzimska aktivnost određena je standardnim testom uz 40 μmol L^{-1} Arg_2-2NA, ali bez $CoCl_2$ u reakcijskoj smjesi.

Enzimski preparat koncentracije ~ 20 nmol L^{-1} predinkubiran je u 20 mmol L^{-1} Na-PO_4 pH 7,4 puferu uz DCI u rasponu koncentracija 5-200 μmol L^{-1}. Nakon predinkubacije u trajanju od 10 min pri sobnoj temperaturi (25 °C), određena je preostala enzimska aktivnost standardnim testom.

Predinkubacija enzima koncentracije 10 nmol L^{-1} provedena je u smjesi 20 mmol L^{-1} Tris HCl pH 7,4 pufera uz PMSF (2 mmol L^{-1}) u trajanju od 20 min pri sobnoj temperaturi (25 °C), nakon čega je određena preostala enzimska aktivnost standardnim testom.

3.4.9. Ispitivanje utjecaja tiolnih reagenasa na DPP III

Pročišćena DPP III, divlji tip ili mutirani oblici (u koncentraciji 18-25 nmol L^{-1}) dodani su u reakcijsku smjesu koja je sadržavala 20 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0 pufer, 50 μmol L^{-1} $CoCl_2$ i tiolni reagens *para*-hidroksi-merkuribenzoat (*p*-HMB) u rasponu koncentracija od 0,05 do 100 μmol L^{-1}, nakon čega je uslijedila predinkubacija 10 min na sobnoj temperaturi (25 °C). Standardnim testom aktivnosti zatim je određena preostala aktivnost DPP III pri 37 °C.

Ispitivanje utjecaja 4,4'-ditiodipiridina (DTDP) na aktivnost DPP III provedeno je inkubacijom DPP III u koncentraciji 3,0-4,0 μmol L^{-1} sa 0,9 mmol L^{-1} DTDP pri pH 8,0 i sobnoj temperaturi (25 °C) u kvarcnoj kiveti volumena 1 mL. Reakcijom DTDP-a sa tiolnom grupom cisteina dolazi do oslobađanja 4-tiopiridona, što se mjeri spektrofotometrijski pri 324 nm[120]. Ekstincijski koeficijent određen je mjerenjem apsorbancije navedenog produkta u reakcijskoj smjesi poznate koncentracije slobodnog cisteina i DTDP, te iznosi ε = 19 500 M^{-1} cm^{-1}. Broj modificiranih sulfhidrilnih grupa cisteina po molekuli proteina određen je mjerenjem oslobođenog 4-tiopiridona kroz određene vremenske periode. Paralelno sa tim, u istim vremenskim intervalima, iz

priređene smjese uzimani su alikvoti (5 μL) za određivanje preostale aktivnosti enzima standardnim testom.

Modifikacija sulfhidrilnih grupa cistena *N*-etilmaleimidom (NEM), određena je predinkubacijom DPP III (2,3 μmol L^{-1}) sa NEM-om koncentracije 1-20 mmol L^{-1}, u 100 mmol L^{-1} Na-PO_4 puferu pH 6,9, pri sobnoj temperaturi (25 °C). Nakon 10 min predinkubacije, alikvoti od 10 μL uzimani su za određivanje preostale aktivnosti enzima standardnim testom.

Predinkubacija DPP III (~ 1,2 μmol L^{-1}) provedena je u smjesi 17 mmol L^{-1} Tris HCl pH 8,0 pufera koji je sadržavao jodoacetamid (IAA) koncentracije 1-20 mmol L^{-1} odnosno 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojevu kiselinu) (DTNB) koncentracije 0,1-2 mmol L^{-1}. Predinkubacija s DTNB odvijala se 10 min na sobnoj temeperaturi (25 °C), dok je u slučaju IAA 30-minutna predinkubacija provedena u mraku (25 °C), nakon čega je određena preostala enzimska aktivnost.

Utjecaj vodikovog peroksida (H_2O_2) istraživan je predinkubacijom DPP III u koncentraciji 2,3-2,5 μmol L^{-1} uz 0,5 i 2 mmol L^{-1} H_2O_2, u određenom vremenskom periodu, tijekom kojega su uzimani alikvoti kako bi se standardnim testom odredila preostala aktivnost enzima. Predinkubacija s H_2O_2 odvijala se na sobnoj temperaturi (25 °C) u mraku.

Utjecaj glutationa (oksidirani i reducirani oblik; GSSG i GSH) te 1,4-ditiotreitola (DTT) određivan je mjerenjem početnih brzina enzimske hidrolize. Reakcijska smjesa sadržavala je 20 mmol L^{-1} Tris pH 7,4, 40 μmol L^{-1} Arg_2-2NA, te GSH ili GSSG ili DTT u koncentraciji od 0,01-3 mmol L^{-1}. Reakcija je započinjana dodatkom enzima u koncentraciji ~ 50 nmol L^{-1} u smjesu, nakon čega je mjerena početna brzina hidrolize Arg_2-2NA kako je opisano.

3.4.10. Temperaturna stabilnost

Kako bi se ispitao utjecaj temperature na stabilnost DPP III i mutiranih oblika ovoga enzima, pročišćeni preparati DPP III koncentracije 0,03 μmol L^{-1} inkubirani su 15 min u 20 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,4 puferu pri različitim temperaturama (4, 20, 35, 40, 45, 50 ili 55 °C) u termobloku. Nakon inkubacije, uslijedilo je temperiranje uzoraka 2 min na ledu, nakon čega je određena preostala aktivnost enzima standardnim testom na 37 °C, kako je opisano.

3.4.11. Određivanje kinetičkih parametara

Kinetički parametri k_{cat} i K_m za kvaščevu DPP III određeni su na osnovi mjerenja početne brzine hidrolize supstrata Arg_2-2NA, mjerenjem fluorescencije nastalog produkta 2-naftilamina[121]. U tu svrhu priređena je reakcijska smjesa volumena 2,5 mL sastava: 17 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0 ionske jakosti 0,01 i 100 µmol L^{-1} $CoCl_2$, u kojoj je enzim predinkubiran 2 min. Reakcija se odvijala na sobnoj temperaturi (25 °C), a započinjana je dodatkom supstrata u rasponu koncentracija od 0,625 do 150 µmol L^{-1}. Hidroliza Arg_2-2NA praćena je kontinuiranim mjerenjem fluorescencije nastalog produkta kroz 3 min ($\lambda_{pobuđenja}$ = 332 nm i $\lambda_{emisije}$ = 420 nm). U svrhu kvantitativnog određivanja, konstruiran je baždarni pravac mjerenjem fluorescencije otopina 2-naftilamina poznate koncentracije. Katalitički parametri K_m i k_{cat} određeni su iz vrijednosti početnih brzina hidrolize supstrata linearizacijom jednadžbe Michaelis-Menten prema Hanes-u (s/v prema s)[122].

Određivanje K_i provedeno je mjerenjem početne brzine hidrolize Arg_2-2NA fluorimetrijski kako je već opisano, u odsustvu ili prisustvu inhibitora. Reakcijska smjesa sadržavala je: 17 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0, 15 µmol L^{-1} Arg_2-2NA (posebno navedeno ako je korištena druga koncentracija) i različite koncentracije inhibitora, odnosno peptida. Priređena smjesa predinkubirana je 2 min na sobnoj temperaturi (25 °C), a reakcija započinjana dodatkom enzima. Izmjerena brzina uspoređena je sa brzinom hidrolize supstrata u istim uvjetima ali bez dodatka inhibitora ili peptida. K_i vrijednost izračunata je prema Chu-u i Orlowsk-om[123], koristeći slijedeću jednadžbu:

$$K_i = [I]/(v_o/v_i - 1) \times K_m/(K_m + [S]);$$

gdje su v_o i v_i početne brzine hidrolize supstrata u odsustvu, odnosno prisustvu inhibitora, K_m konstanta određena za enzim uz Arg_2-2NA, te [S] i [I] koncentracije supstrata i inhibitora.

Razlika u promjeni slobodne energije, ΔΔG, kao posljedica zamjene aminokiselinskih ostataka koji su utjecali na katalitičku efikasnost enzima, izračunata je prema izrazu:

$$\Delta\Delta G = - RT \times \ln \left[\frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right) \text{mutant}}{\left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right) \text{divlji tip}} \right],$$

gdje je ΔΔG – promjena Gibbsove slobodne energije, R – opća plinska konstanta i iznosi 1,987 cal K^{-1} mol^{-1}, T – temperatura 298,15 K (25 °C).

3.4.12. Cirkularni dikroizam

Snimanjem spektara cirkularnog dikroizma (CD) provedena je analiza sekundarne strukture divljeg tipa DPP III i mutiranih oblika. Snimanje CD spektara pročišćenih proteina provedeno je na spektropolarimetru *J-715* (*JASCO*, Tokyo, Japan), koristeći kvarcnu kivetu optičkog puta 0,02 cm. Pročišćeni enzimski preparati (u 20 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,4 puferu) bili su koncentracije 0,300-0,400 mg mL^{-1}. Uvjeti snimanja CD spektara za proteine u dalekom UV području (eng. *far UV*) (190-250 nm), pri sobnoj temperaturi (20-25 °C) bili su: rezolucija 0,2 nm, širina puta zrake 1,0 nm, vrijeme mjerenja u jednoj točci 1 s (eng. *response*), brzina snimanja 50 nm min^{-1}. Konačni spektri prosjek su minimalno 3 snimanja. Analiza sekundarne strukture proteina provedena je upotrebom programa CDSSTR servera DICHROWEB (http://public-1.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html)[124].

Termalna denaturacija DPP III proteina također je praćena mjerenjem cirkularnog dikroizma. Koristeći cilindričnu kivetu termostatiranu u vodenoj kupelji, denaturacija proteina praćena je u temperaturnom intervalu od 20-95 °C, na valnoj duljini (208 nm) koja je određena obzirom na udio elemenata sekundarne strukture proteina, pri čemu je brzina zagrijavanja bila 1 °C min^{-1} a rezolucija 0,2 °C. Obrada krivulja termalne denaturacije proteina izvršena je u programu Origin 6,1. Primjenom Boltzmanove jednadžbe, određena je srednja temperatura denaturacije proteina T_m (engl. *melting temperature*).

Tijekom izrade ovog rada CD mjerenja vršena su i na uređaju *J-815* (*JASCO*, Essex, UK). U slučaju mjerenja spektara u dalekom UV području, postavke mjerenja su bile nepromijenjene, osim što je korištena kiveta optičkog puta 0,01 cm. Za praćenje termalne denaturacije korištena je kiveta optičkog puta 0,01 cm i *Peltier* termostatirani držač za kivete, uz iste postavke mjerenja, osim rezolucije koja je u ovom slučaju bila 1 °C.

3.4.13. Bioinformatička analiza

Višestruko sravnjivanje (engl. *multiple sequence alignment*) aminokiselinskih slijedova DPP III iz raznih eukariotskih organizama, načinjeno je pomoću programa

ClustalW2[125]. Za sravnjivanje je korištena statistička matrica Pam250, uz parametre: kazna za otvaranje praznine 10 i kazna za proširivanje praznine 0,05. Za bioinformatičku analizu korištene su proteinske sekvencije dobivene pretraživanjem pomoću BLASTP programa[126], preuzete iz baze podataka UniProtKB (http://www.uniprot.org)[127]. Korištene su sekvencije DPP III iz slijedećih organizama (sa pripadajućom pristupnom oznakom u bazi UniProtKB): *Homo sapiens* (Q9NY33), *Danio rerio* (Q6DI20), *Xenopus laevis* (Q6PA12), *Drosophila melanogaster* (Q9VHR8), *Dictyostelium discoideum* (Q557H1), *Aspergillus orzyae* (Q2UG48)**,** *Saccharomyces cerevisiae* (Q08225), te sekvencije navodnih (eng. *putative*) DPP III iz organizama: *Leishmania major* (Q4QJA6), *Caenorhabditis elegans* (Q2XMY9) i *Neurospora crassa* (Q7SH28).

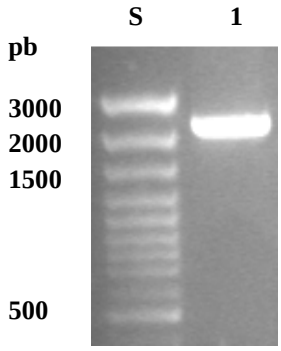
Za doređivanje sravnjivanja kao i grafički prikaz korišten je program BioEdit (http://www.mbio.nscu.edu/BioEdit/page2.html)[128].

4. REZULTATI

4.1. Heterologna ekspresija kvaščeve DPP III

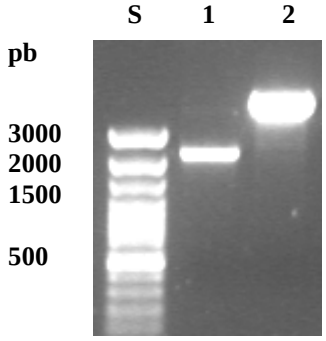
4.1.1. Kloniranje DNA za kvaščevu DPP III u ekspresijski vektor pET-21a

Gen YOL057W koji kodira za kvaščevu DPP III umnožen je metodom PCR na način da se na 5' i 3' kraju umnoženog gena nadodaju karakteristični nukleotidni slijedovi koje specifično cijepaju restrikcijske endonukleaze *Nde*I odnosno *Xho*I. Umnoženi PCR produkt (slika 4.1) pročišćen je metodom preparativne elektroforeze u gelu agaroze iz kojeg je izoliran pomoću kompleta za pročišćavanje DNA.



Slika 4.1. Elektroforeza DNA kvaščeve DPP III, umnožene metodom PCR, u gelu agaroze. S - standard za duljinu odsječaka DNA; 1 - gen za DPP III (2136 pb) nakon PCR. Gel je bojan u etidijevom bromidu, a vrpce DNA vizualizirane su pod UV svjetlom.

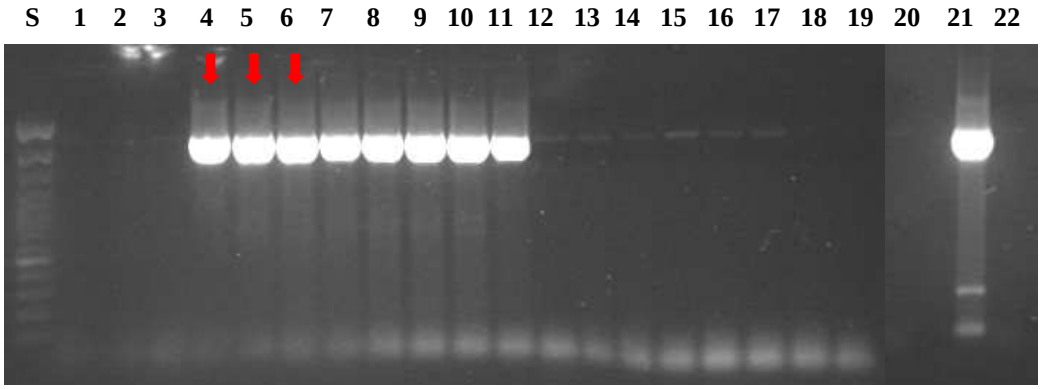
Izolirani PCR produkt kao i prethodno izolirani plazmidni vektor pET-21a, podvrgnuti su cijepanju restrikcijskim enzimima *Nde*I i *Xho*I, nakon čega su pročišćeni i izolirani iz gela (slika 4.2).



Slika 4.2. Elektroforeza pročišćenog odsječka DNA i plazmida pET21a u gelu agaroze, nakon cijepanja restrikcijskim endonukleazama *Nde*I i *Xho*I. S - standard za duljinu odsječaka DNA; 1 - umnoženi gen za kvaščevu DPP III; 2 - pET21a plazmid. Gel je bojan u etidijevom bromidu, a vrpce DNA vizualizirane su pod UV svjetlom.

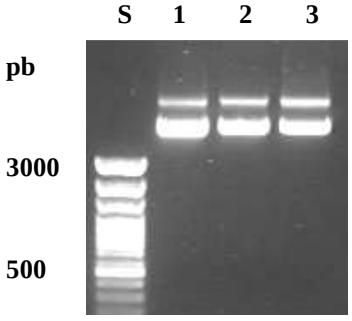
Ligacijom odsječka DNA za DPP III u restrikcijsko mjesto *Nde*I/*Xho*I vektora pET21a omogućena je ekspresija DPP III sa privjeskom od 6 histidinskih ostataka (eng. *hexa histidine-tag*, His_6) na *C*-kraju proteina (DPP III-His_6). Kao posljedica ugradnje gena za DPP III u navedeno restrikcijsko mjesto, eksprimirani protein osim His_6 privjeska ima još tri dodatne aminokiseline na *C*-kraju, prolin, leucin i glutaminsku kiselinu, koje u

aminokiselinskom slijedu proteina dolaze neposredno prije His_6. Metodom temperaturnog šoka, ligacijskom smjesom su transformirane bakterijske stanice *E. coli* soj TOP10. Metodom PCR na odabranim bakterijskim kolonijama s LB/Amp krute podloge nakon transformacije, provjereno je da li je gen za DPP III uspješno ukloniran u vektor pET-21a (slika 4.3).



Slika 4.3. **Elektroforeza produkata PCR na bakterijskim kolonijama u gelu agaroze.** S – standard za duljinu odsječaka DNA; 1-20 - produkti PCR na nasumično odabranim bakterijskim kolonijama; 21 - pozitivna kontrola (DNA za DPP III, umnožena s PCR); 22 - negativna kontrola (ds H_2O). Crvenim strelicama označeni su PCR produkti onih kolonija koje su korištene za izolaciju plazmida pET-21a sa ukloniranim genom za DPP III. Gel je bojan u etidijevom bromidu, a vrpce DNA vizualizirane su pod UV svjetlom.

Na osnovi rezultata dobivenih metodom PCR na bakterijskim kolonijama, odabrane su tri kolonije iz kojih je potom izoliran plazmid sa ukloniranim željenim genom za DPP III: pET21a(DPPIIIHis$_6$) (slika 4.4). Servisnim sekvenciranjem plazmida, potvrđeno je da je u sva tri izolirana plazmida ispravno ukloniran željeni gen za DPP III.



Slika 4.4. Elektroforeza pročišćenih i izoliranih plazmidnih vektora pET21a s ugrađenim genom za kvaščevu DPP III, u gelu agaroze. S – standard za duljinu DNA odsječaka; 1-3 – pročišćeni i izolirani plazmidi pET21a(DPPIIIHis$_6$) koncentracije 50 ng μL^{-1}. Gel je bojan u etidijevom bromidu, a vrpce DNA vizualizirane su pod UV svjetlom.

4.1.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje DPP III-His_6

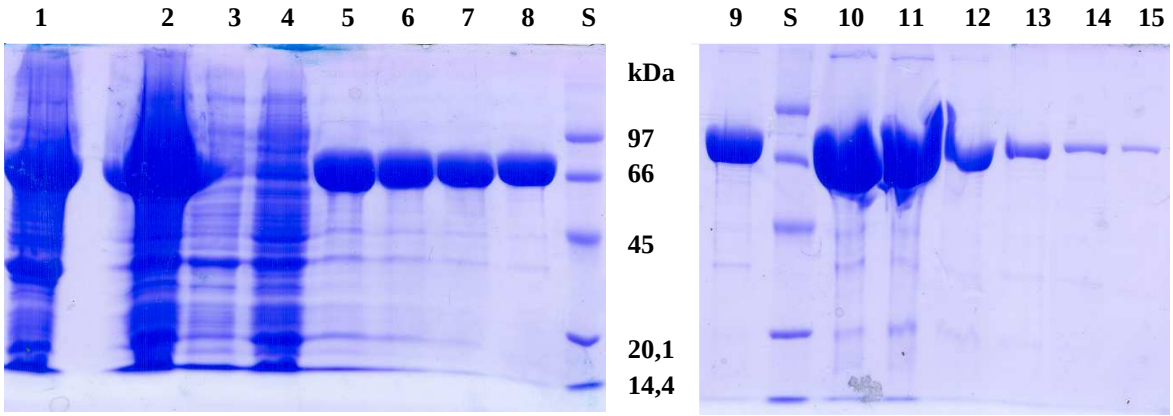
Kvaščeva DPP III-His_6 prekomjerno je eksprimirana u stanicama *E. coli*, soj BL21-CodonPlus(*DE3*)Ril. U svrhu transformacije stanica korišten je jedan od tri izolirana plazmida s ugrađenim genom za DPP III. Stanice su transformirane metodom temperaturnog šoka ili elektrotransformacijom. Prekomjerna ekspresija DPP III gena, inducirana je dodatkom IPTG-a pri točno određenoj gustoći stanica kako je opisano u Metodama.

Kako je u ovom radu po prvi puta provedena heterologna prekomjerna ekspresija DPP III nižeg eukariota, s ciljem maksimalnog prinosa proteina u topivoj frakciji stanica ispitani su optimalni uvjeti ekspresije. Najveći utjecaj na ukupni prinos proteina topive frakcije imala je temperatura. Ekspresija pri 37 °C već nakon 3 sata rezultirala je značajnim prinosom proteina, ali gotovo potpuno u netopivoj frakciji stanica (inkluzijska tijela). Međutim ekspresijom pri temperaturi od 20 °C postignuto je značajno povećanje prinosa proteina u topivoj frakciji, ~ 42 mg iz 1 L kulture. U oba slučaja ekspresija je bila inducirana dodatkom 0,5 mmol L^{-1} IPTG. Izvođenjem ekspresije pri 20 °C, ali uz nižu koncentraciju IPTG-a od 0,3 mmol L^{-1}, postignuto je povećanje prinosa proteina topive frakcije na čak ~ 100 mg iz 1 L kulture, dok nije bilo značajnijeg utjecaja na prinos proteina u netopivoj frakciji. Pri navedenim (standardnim) uvjetima provođena je ekspresija svih DPP III-His_6 proteina, kako "divljeg tipa" tako i mutantnih oblika. Nakon prekonoćne ekspresije, pri 20 °C uz 0,3 mmol L^{-1} IPTG, stanice su sakupljene centrifugiranjem kako je opisano i pohranjene na -20 °C.

Afinitetna kromatografija

Talozi bakterijskih stanica (~ 7 g biomase iz 1 L kulture) pohranjeni na -20 °C, postepeno su odmrznuti na ledu i potom pažljivo resuspendirani u puferu za lizu. Stanični lizat pripremljen je permeabilizacijom stanične stijenke djelovanjem lizozima i ultrazvuka, razgradnjom DNA, centrifugiranjem i naposljetku filtriranjem, te je pročišćen na stupcu Ni-NTA agaroze volumena 15 mL, prethodno uravnoteženog puferom za lizu. Priprema lizata detaljno je opisana u Metodama, kao i postupak nanošenja uzorka na stupac, ispiranja i elucije. Glavnina proteina DPP III-His_6 eluirana je puferom koji je sadržavao 15 puta veću koncentraciju imidazola od pufera za lizu, pri čemu su sakupljane frakcije volumena 3 mL. Uspješnost afinitetnog pročišćavanja DPP III iz staničnog lizata

transformiranih bakterija provjerena je SDS-elektroforezom, koja je potvrdila da je rekombinantna DPP III-His_6 kvasca *S. cerevisiae* izolirana u visokom stupnju čistoće (slika 4.5).



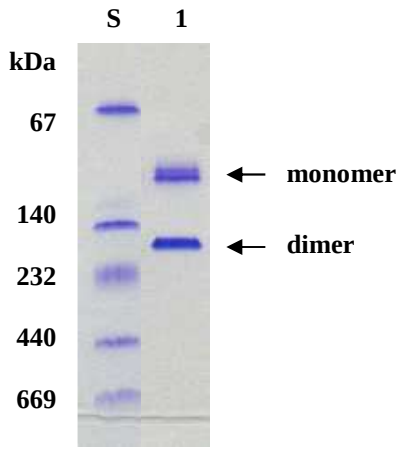
Slika 4.5. Tijek pročišćavanja kvaščeve DPP III-His_6 afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozi ilustriran sa SDS-PAGE u 10 % gelu. S – niskomolekularni proteinski standardi; 1 – stanični lizat-netopiva frakcija; 2 – stanični lizat-topiva frakcija, početni uzorak nanesen na kolonu Ni-NTA; 3 – nevezana frakcija; 4 i 5 – prva i treća frakcija ispiranja kolone; 6-15 – frakcije (1-10) eluirane s kolone puferom s 150 mmol L^{-1} imidazola. Proteinske vrpce detektirane su bojanjem Coomassie blue R-250.

Budući da je već treća frakcija ispiranja kolone sadržavala vrlo čistu DPP III-His_6, ta je frakcija pripojena frakcijama elucije 1-8 u kojima je bila prisutna većina pročišćenog DPP III proteina. Sakupljenim frakcijama (~ 39 mL) izmijenjen je pufer prekonoćnim dijaliziranjem na 4 °C prema 20 mmol L^{-1} Tris puferu pH 7,4, ili gel-filtracijom na koloni PD-10. Zatim je mjerenjem apsorbancije pri 280 nm i koristeći ekstinkcijski koeficijent za DPP III-His_6 koji iznosi 71 740 M^{-1} cm^{-1}, izračunata koncentracija proteina od 2,54 mg mL^{-1}, dok je metodom po Bradfordu izračunata koncentracija proteina u preparatu pročišćene DPP III-His_6 iznosila 2,63 mg mL^{-1}. Specifična aktivnost izolirane DPP III-His_6 određena standardnim testom iznosila je 1160,0 mj mg^{-1}. Pročišćena DPP III-His_6 pohranjena je na -10 °C uz prethodni dodatak glicerola ($\varphi = 0{,}22$).

Ako se uzme u obzir da je ukupna količina DPP III-His_6 proteina vezana na Ni-NTA nosač iznosila 103,4 mg, a teoretski kapacitet kolone (volumena 15 mL) 75-150 mg, te da je kolona više puta korištena za izolaciju proteina, može se pretpostaviti da je elucija DPP III-His_6 već u postupku ispiranja, posljedica zasićenja kolone.

Nakon određivanja aktivnosti i koncentracije proteina, pročišćeni uzorak DPP III-His_6 analiziran je elektroforezom u nativnim uvjetima, pri čemu je uočeno postojanje dvije proteinske vrpce (slika 4.6). Na osnovi usporedbe duljina putovanja proteinskih vrpci

standarda i uzorka, određena je približna molekularna masa DPP III-His_6. Za proteinsku vrpcu koja je putovala dalje, određena je približna masa od 83 200 Da, što je u jako dobrom slaganju s teoretskom masom kvaščeve DPP III-His_6 (81 673 Da). Izračunata molekulska masa od 158 500 Da za proteinsku vrpcu koja je prema anodi putovala sporije, odgovara dvostrukoj masi DPP III-His_6, što upućuje da kvaščeva DPP III-His_6 osim kao monomer dolazi i u dimernoj formi. Izrezivanjem proteinskih vrpci iz nativnog gela koje odgovaraju monomeru odnosno dimeru, te inkubacijom u reakcijskoj smjesi uz semikvantitativno određivanje aktivnosti pokazano je da obje forme proteina hidroliziraju standardni supstrat DPP III.



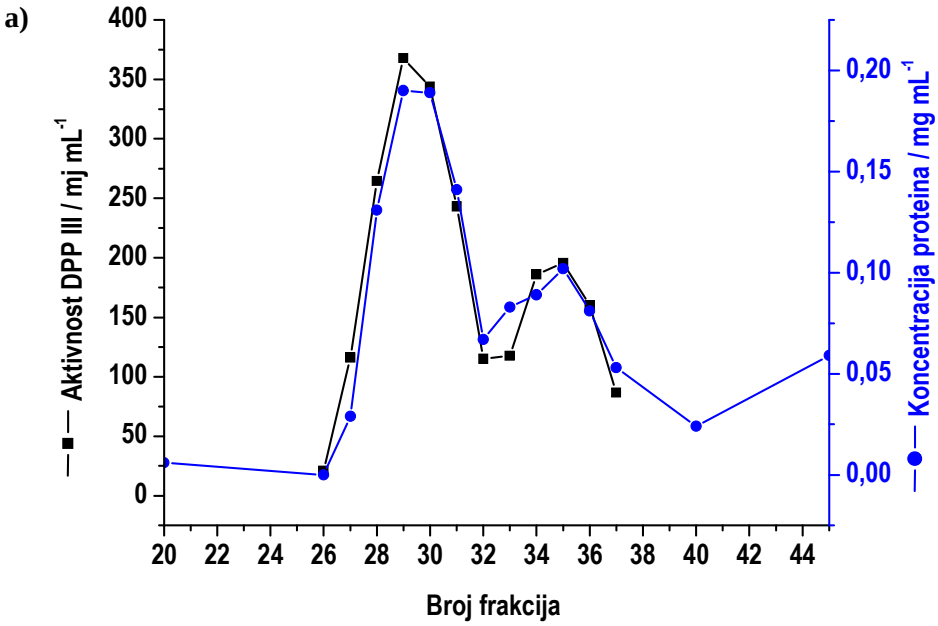
Slika 4.6. Nativna elektroforeza afinitetno pročišćene DPP III-His_6 u gradijentu gustoće polikrilamidnog gela od 8-25 % (PhastSystem). S – visokomolekularni proteinski standardi; 1 – DPP III-His_6 pročišćena na Ni-NTA agarozi (naneseno 1,3 μg proteina). Proteinske vrpce detektirane su bojanjem Coomassie blue R-250.

S ciljem detaljnijeg izučavanja biokemijskih svojstava DPP III-His_6 monomera i dimera, uzorak koji je pročišćen afinitetnom kromatografijom, iako gotovo u potpunosti čist (> 99 %), dodatno je podvrgnut gel-filtraciji kako bi se odvojili monomer i dimer DPP III-His_6.

Gel-filtracija

Razdvajanje smjese DPP III monomera i dimera provedeno je na stupcu Sephacryl-a S-200, a profil te gel-filtracije prikazan je na slici 4.7a. Gel-filtracijom je postignuto razdvajanje afinitetno pročišćene DPP III-His_6 u dva proteinska pika. Nakon analize uzoraka elektroforezom u nativnim uvjetima uočeno je da monomer u potpunosti nije

odvojen od dimera, što bi moglo upućivati na spontanu i brzu dimerizaciju monomera (slika 4.7b).



Slika 4.7. Gel-filtracija DPP III-His$_6$ nakon kromatografije na Ni-NTA agarozi. a) Profil gel-filtracije. Na stupac Sephacryl-a S-200 (1,5 × 90 cm), uravnoteženog s 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pufera s 0,2 mol L^{-1} NaCl pH 7,4, nanešeno je ukupno 4,3 mg proteina u 2 mL uzorka. Protok je bio 6 mL h^{-1}, a volumen frakcija 2,3 mL. **b) Nativna elektroforeza frakcija DPP III nakon gel-filtracije provedena u gradijentu gustoće poliakrilamidnog gela od 8-25% (PhastSystem).** S – visokomolekularni proteinski standardi; 1 – početni uzorak (naneseno ~ 1 μg proteina); 2 – ugušćene frakcije (28-30): dimer (naneseno 0,55 μg proteina); 3 – ugušćene frakcije (34-36): monomer (naneseno 0,41 μg proteina). Proteinske vrpce bojane su srebrom.

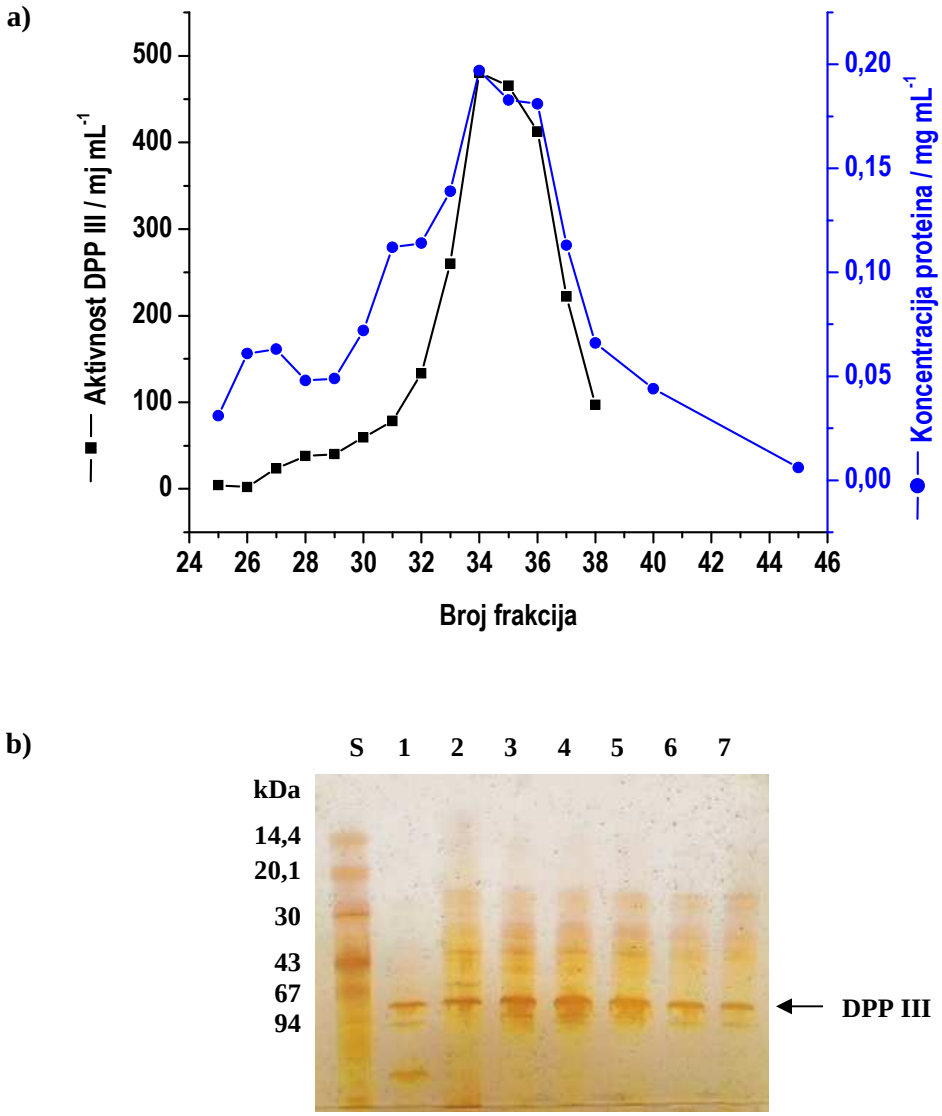
Frakcije 28-30 u kojima je eluiran dimer, i frakcije 34-36 u kojima je eluiran monomer, sakupljene su i ugušćene. O prirodi dimerizacije, kao i detaljnijem biokemijskom opisu monomera i dimera biti će više rečeno kasnije u rezultatima.

4.1.3. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje DPP III bez His_6 privjeska

Kako bi se ispitao utjecaj His_6 privjeska na aktivnost i strukturu DPP III proteina, eksprimiran je protein koji ne sadrži His_6 privjesak kao ni dodatne tri aminokiseline na svom *C*-kraju. Plazmidni vektor sa ukloniranim genom za DPP III: pET21a(DPPIII) koncentracije 100 ng μL^{-1}, priredila je Haidemarie Ehammer sa Instituta za biokemiju u Grazu (Austrija). Transformacija stanica *E. coli*, soj BL21-CodonPlus(*DE3*)Ril, provedena je metodom temperaturnog šoka. Ekspresija proteina, potaknuta dodatkom 0,2 mmol L^{-1} IPTG-a, provedena je pri 20 °C u trajanju od 4 sata. Nakon ekspresije, stanice su sakupljene centrifugiranjem i pohranjene na -20 °C.

Gel-filtracija

Talozi stanica ukupne biomase 3,4 g (iz 0,5 L kulture) resuspendirani su u puferu za lizu, a lizat pripremljen kako je opisano u Metodama. Od ukupnog volumena bakterijskog lizata (27 mL) specifične aktivnosti 966,3 mj mg^{-1}, na stupac Sephacryl-a S-200 nanešeno je 2 mL. Profil te gel-filtracije pokazuje da je DPP III najvećim dijelom eluirana u frakcijama 33-37, sa najvećom specifičnom aktivnošću u frakcijama 34 i 35 (2992,6 mj mg^{-1} odnosno 2927,1 mj mg^{-1}) (slika 4.8a). Elektroforezom u denaturirajućim, ali nereducirajućim uvjetima (bez 2-ME) je ustanovljeno da je DPP III eluirana u formi monomera molekularne mase ~ 82 000 Da (slika 4.8b), te da enzimske frakcije sadrže i više proteinskih traka manje molekularne mase.

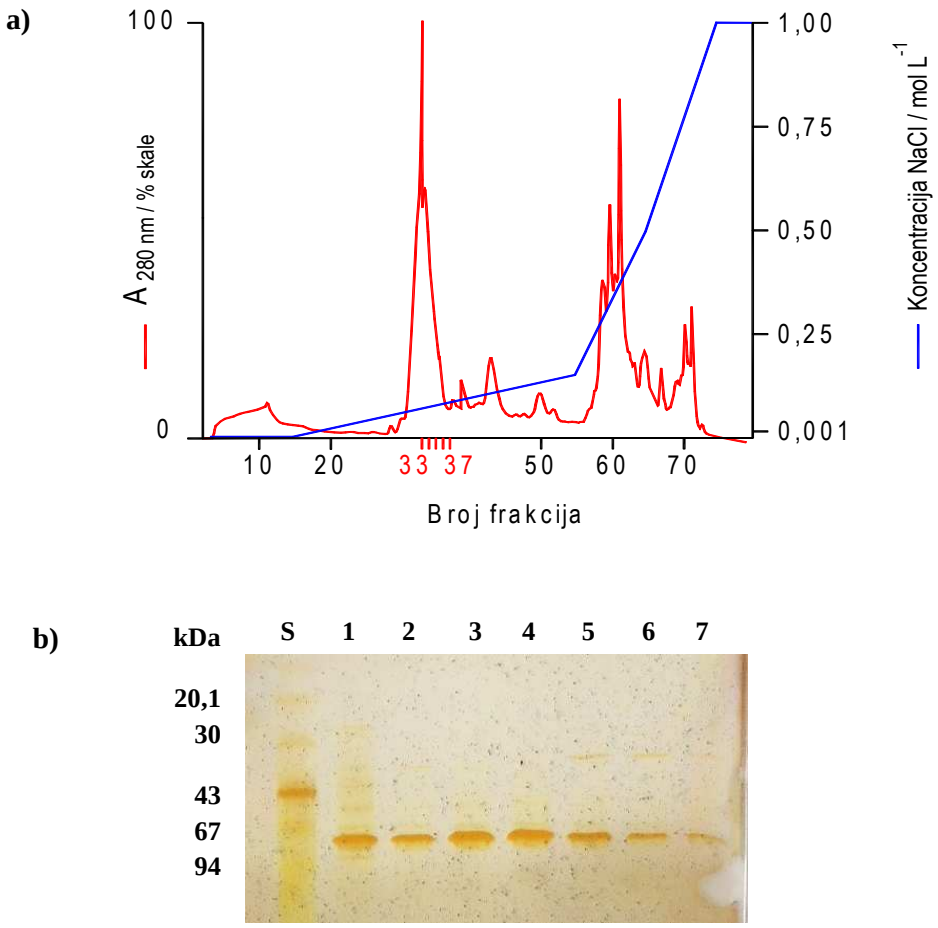


Slika 4.8. Gel-filtracija prekomjerno eksprimirane DPP III iz staničnog lizata bakterije *E.coli.* a) Profil gel-filtracije iz staničnog lizata *E. coli* s eksprimiranom kvaščevom DPP III. Na stupac Sephacryl-a S-200 (1,5 × 90 cm), uravnoteženog s 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pufera s 0,2 mol L^{-1} NaCl, pH 7,4, nanešeno je ~ 7,8 mg proteina iz staničnog lizata (2 mL). Protok je bio 6 mL h^{-1}, a volumen frakcija 2,3 mL. **b) SDS-elektroforeza (nereducirajući uvjeti) frakcija koje su sadržavale DPP III nakon gel-filtracije provedena u poliakrilamidnom gelu gradijenta gustoće 8-25 % (PhastSystem).** S – niskomolekularni proteinski standardi; 1 – DPP III-His_6 izolirana afinitetnom kromatografijom na koloni Ni-NTA; 2 – početni uzorak staničnog lizata; 3-7 – aktivne frakcije (33-37) iza gel-filtracije. Na gel je naneseno oko 100 ng proteina svakog uzorka. Proteini su detektirani bojanjem srebrom.

Kromatografija na stupcu Mono Q

Sakupljenim frakcijama (33-37) s glavninom aktivnosti DPP III (2364,2 mj mg^{-1}), izmijenjen je pufer gel-filtracijom na koloni PD-10, kako bi se uzorak pripremio za pročišćavanje ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom. Detalji kromatografije na koloni

anionskog izmjenjivača Mono Q HR 5/5 opisani su u Metodama. Vezana DPP III eluirana je linearnim gradijentom NaCl od 1 mmol L^{-1} do 150 mmol L^{-1} (slika 4.9a). Čistoća eluirane DPP III provjerena je SDS-elektroforezom (slika 4.9b) iz koje je vidljiva samo jedna proteinska vrpca molekularne mase ~ 82 000 Da.



Slika 4.9. Pročišćavanje preparata DPP III (0,67 mg mL^{-1}) dobivenog gel-filtracijom na Sephacryl-u S-200, brzom tekućinskom kromatografijom na stupcu MonoQ. a) Profil FPLC na stupcu Mono Q 5/5. Gradijent NaCl u puferu za eluciju (1-1000 mmol L^{-1} u 50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,4) označen je plavom linijom. Crvena linija odgovara A_{280} eluata. Na stupac je nanešeno ~ 2,2 mg odsoljenog proteina, volumen frakcija je bio 0,5 mL, a protok 0,5 mL min^{-1}. **b) SDS-elektroforeza pročišćene DPP III u poliakrilamidnom gelu gradijenta gustoće 8-25 % (PhastSystem).** S **–** niskomolekularni proteinski standardi; 1 – početni uzorak proteina pročišćen gel-filtracijom; 2-7 – aktivne frakcije DPP III (32-37) iza Mono Q. Na gel je naneseno oko 300 ng proteina (početni uzorak), 100 ng (frakcija 32), 200 ng (frakcija 33 i 34), 150 ng (frakcija 35) te 50 ng (frakcija 36 i 37) po traci. Proteinske vrpce bojane su srebrom.

Aktivne frakcije DPP III sa sličnom specifičnom aktivnošću spojene su i pohranjene s glicerolom (φ = 0,22) na -10 °C. Najaktivnije frakcije DPP III 33 i 34, imale su specifičnu aktivnost 3003,9 mj mg^{-1} odnosno 2600,7 mj mg^{-1}, i sadržavale su od 70 mmol L^{-1} do 90

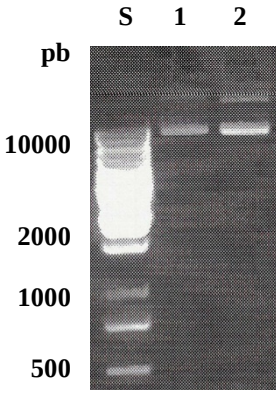
mmol L^{-1} NaCl, a spojenim frakcijama nakon dodatka glicerola određena je specifična aktivnost uz Co^{2+} (2266,7 mj mg^{-1}) i bez Co^{2+} (589,3 mj mg^{-1}). Tako je kombinacijom metoda gel-filtracije i ionsko-izmjenjivačke kromatografije DPP III bez His_6 privjeska pročišćena u potpunosti, a ukupni prinos rekombinantnog proteina bio je ~ 12,5 mg iz 0,5 L kulture.

Tijekom izrade ove radnje, prekomjerno eksprimirana DPP III, osim kako je opisano, pročišćena je i kombinacijom kromatografije na DEAE-celulozi i FPLC na Mono Q. Nakon prvog koraka izolacije na DEAE-celulozi, frakcije sa enzimom (visoki stupanj čistoće) pohranjene su na -10 °C na period od oko 40 dana. Kao što je kasnije navedeno, tijekom vremena, a uslijed oksidacije, dolazi do dimerizacije DPP III proteina. Kao posljedica dimerizacije naboji na površini proteina mogu biti zaklonjeni, što je omogućilo jako dobro odvajanje monomerne i dimerne forme DPP III. Uzorak je dalje pročišćen na Mono Q, te je analizom aktivnosti i SDS-elektroforezom u nereducirajućim uvjetima utvrđeno kako je DPP III eluirana u dva "pika". Rezultati nisu prikazani, no na ovaj način uspješno su izolirane čiste forme monomera i dimera, za koje su neposredno nakon izolacije određeni kinetički parametri.

4.2. Homologna ekspresija kvaščeve DPP III

4.2.1. Kloniranje DNA za kvaščevu DPP III u ekspresijski vektor pYES2

Umnažanje gena YOL057W za DPP III metodom PCR provedeno je koristeći početnice na čijem se 5' i 3' kraju nalaze karakteristični nukleotidni slijedovi koje specifično cijepaju restrikcijske endonukleaze *Hind*III odnosno *BamH*I. Produkti PCR pročišćeni su kako je opisano, te metodom ligacije ugrađeni u restrikcijsko mjesto *Hind*III/*BamH*I plazmida pYES2 koji je već pocijepan navedenim endonukleazama. Ligacijskim smjesama, metodom temperaturnog šoka, transformirane su stanice *E. coli* soj TOP10. U cilju detekcije kolonija koje sadrže plazmid s ukloniranim odsječkom DNA za DPP III, provedena je metoda PCR na bakterijskim kolonijama, te su tako odabrane kolonije iz kojih je potom izoliran plazmid s ugrađenim genom za DPP III: pYES2(DPPIIIHis$_6$) (slika 4.10). Servisnim sekvenciranjem plazmida, potvrđeno je da je u oba izolirana plazmida ispravno ukloniran gen za DPP III.



Slika 4.10. Elektroforeza pročišćenih i izoliranih plazmidnih vektora pYES2 s ugrađenim genom za kvaščevu DPP III, u gelu agaroze. S – standard za duljinu DNA odsječaka; 1-2 –pročišćeni i izolirani plazmidi pYES2(DPPIIIHis$_6$) koncentracije 115 (1) i 140 (2) ng μL^{-1}. Gel je bojan u etidijevom bromidu, a vrpce DNA vizualizirane su pod UV svjetlom.

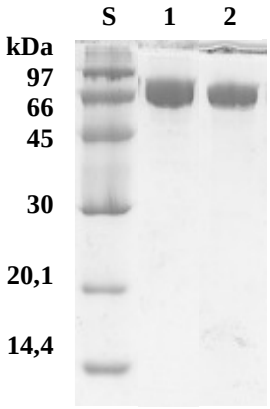
Kloniranjem gena za DPP III u vektor pYES2 koristeći početnicu koja sadrži dodatne kodone, homologno eksprimirana DPP III na svom *C*-kraju imati će His$_6$ privjesak, ali za razliku od DPP III uklonirane u bakterijski ekspresijski vektor pET-21a, neće sadržavati tri dodatne aminokiseline.

4.2.2. Prekomjerna ekspresija i pročišćavanje DPP III-His$_6$

Transformacija stanica kvasca *S. cerevisiae* soja BY4741 plazmidom pYES2(DPPIIIHis$_6$) provedena je pomoću litijevog acetata kako je opisano u Metodama. Kolonije s krute SD-Ura podloge s glukozom, nasađene su na tekuću podlogu istoga sastava i uzgajane 48 sati na 30 °C. Kada je optička gustoća stanica pri 600 nm iznosila 0,7, 80 mL kulture odvojeno je i centrifugirano, isprano u sterilnoj destiliranoj vodi i ponovno centrifugirano. Tako dobiveni talog resuspendiran je u 2 mL tekuće SD-Ura podloge s galaktozom, te je priređena suspenzija stanica nasađena na ostatak podloge volumena 500 mL. Na ovaj način priređena je kultura, čija gustoća stanica odgovara apsorbanciji od 0,4. Ekspresija DPP III proteina, potaknuta dodatkom galaktoze (20 g L^{-1}), odvijala se preko noći kako je opisano, u ukupnom volumenu kulture od 2 L.

Sabrani talozi kvaščevih stanica s prekomjerno eksprimiranom DPP III-His$_6$, ukupne biomase 9,2 g (iz 2 L kulture), pohranjeni su na -20 °C. Stanični lizat priređen je mehaničkim razbijanjem odmrznutih stanica staklenim kuglicama, u puferu za lizu uz inhibitor proteaza. Priređeni lizat je filtriran, a DPP III-His$_6$ pročišćena afinitetnom kromatografijom na koloni Ni-NTA, kako je opisano. Gel-filtracijom uzorak je zatim preveden u 20 mmol L^{-1} Tris pH 7,4 pufer, i pohranjen na -10 °C uz dodatak glicerola (φ = 0,22). Prinos pročišćenog proteina iz 2 L kulture iznosio je 1,9 mg, a specifična aktivnost je iznosila 1653,3 mj mg^{-1}.

DPP III-His_6 analizirana je SDS-elektroforezom; u reducirajućim uvjetima uočena je jedna proteinska vrpca molekulske mase ~ 82 000 Da, koja odgovara masi monomera DPP III-His_6 (slika 4.11), dok je u nereducirajućim uvjetima uočeno postojanje dviju proteinskih vrpci, monomerne i dimerne forme proteina, kao i kod heterologno eksprimirane DPP III-His_6 (nije pokazano).



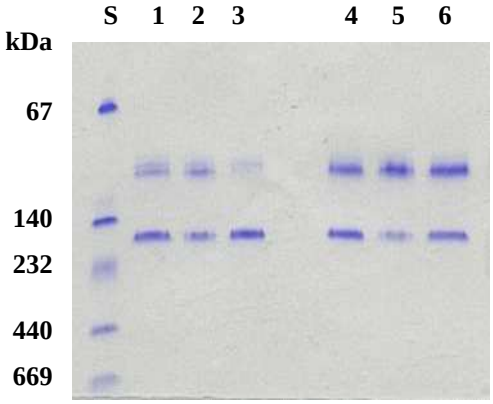
Slika 4.11. SDS-elektroforeza DPP III-His_6 nakon izolacije na koloni Ni-NTA u 12% poliakrilamidnom gelu. S – niskomolekularni proteinski standardi; 1 – DPP III-His_6 prekomjerno eksprimirana u bakterijskoj stanici (naneseno 3,75 μg proteina); 2 – DPP III-His_6 prekomjerno eksprimirana u kvaščevoj stanici (naneseno 2,8 μg proteina). Proteinske vrpce bojane su s Coomassie blue R-250.

4.3. Fizikalno - kemijske značajke kvaščeve DPP III

Dimerizacija kvaščeve DPP III

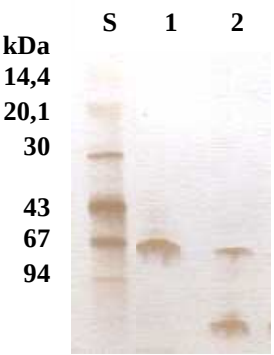
Elektroforezom u nativnim nereducirajućim uvjetima DPP III-His_6, heterologno eksprimirane i izolirane kromatografijom na koloni Ni-NTA, uočeno je postojanje dodatne proteinske vrpce, čija relativna masa odgovara masi dimerne forme DPP III (slika 4.6). Kao što je opisano (poglavlje 4.2), razdvajanje monomera i dimera provedeno je gel-filtracijom. Neposredno nakon odvajanja dviju formi DPP III-His_6, određena je hidrolitička aktivnost za oba uzorka. Na osnovi vrlo sličnih specifičnih aktivnosti monomera (1761,2 mj mg^{-1}) i dimera (1651,7 mj mg^{-1}) može se zaključiti kako dimerizacija DPP III ne utječe značajnije na enzimsku aktivnost proteina. Dodatnom analizom proteinskih uzoraka DPP III-His_6 elektroforezom u nativnim uvjetima, utvrđeno je kako način pohrane uzoraka bitno utječe na omjer dimera i monomera u proteinskoj otopini. Udio dimernog oblika DPP III-His_6 najveći je nakon pohrane na -20 °C, uz prethodno brzo smrzavanje u tekućem dušiku na -196 °C, dok je omjer monomera i dimera u uzorcima čuvanim na 4 °C, odnosno -10 °C (uz glicerol) podjednak (slika 4.12; linija 1,2,3).

Na osnovi zapažanja da se provodeći SDS-elektroforezu u reducirajućim uvjetima uočava proteinska vrpca monomera, ali ne i dimera, uzorci koji su pohranjeni kako je opisano, dodatno su inkubirani uz 4 mmol L^{-1} DTT, 10 min na sobnoj temperaturi. Kod sva tri uzorka, nakon obrade s DTT-om zapaženo je značajno povećanje udjela forme monomera kada ih se analiziralo nativnom elektroforezom (slika 4.12; linija 4,5,6).



Slika 4.12. Nativna elektroforeza u gradijentu gustoće poliakrilamidnog gela 8-25 % (PhastSystem) uzoraka DPP III pohranjenih pri raznim uvjetima. S – visokomolekularni proteinski standardi; uzorci DPP III pohranjeni: 1 – na 4 °C (naneseno 1,25 μg proteina); 2 – na -10 °C (naneseno 0,98 μg proteina); 3 – na -20 °C (naneseno 1,05 μg proteina). Na pozicijama 4, 5 i 6 naneseni su uzorci DPP III-His_6 reducirani DTT-om, a po načinu prikaza odgovaraju uzorcima na pozicijama 1, 2 i 3. Proteinske vrpce bojane su s Coomassie blue R-250.

Inkubacija DPP III proteina u denaturirajućim i nereducirajućim uvjetima (SDS i termička obrada na 100 °C, ali bez β-merkaptoetanola (2-ME)) nije utjecala na povećanje udjela monomera. Međutim, obrada uzorka u reducirajućim uvjetima (s 2-ME) imala je za posljedicu da je nakon SDS-elektroforeze vidljiva samo proteinska vrpca monomera, što govori u prilog tome da je dimerizacija DPP III proteina vjerovatno posljedica stvaranja intermolekularne disulfidne veze (slika 4.13).

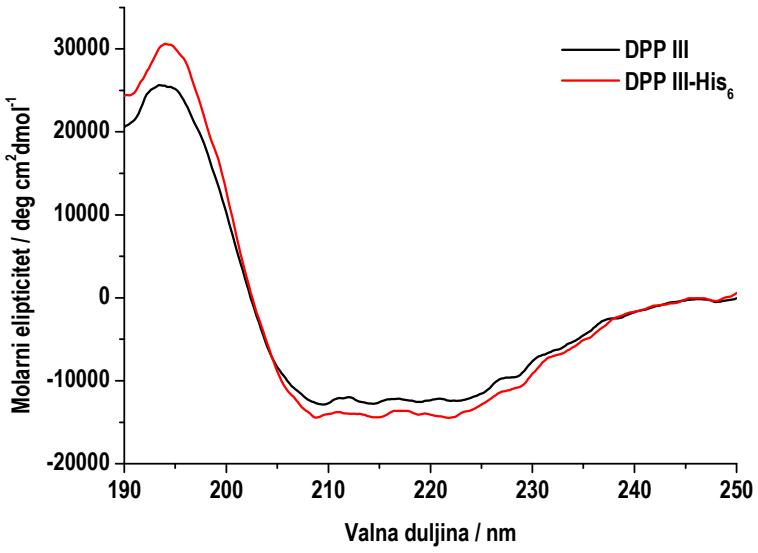


Slika 4.13. SDS-elektroforeza u gradijentu poliakrilamidnog gela gustoće 8-25 % (PhastSystem). S **–** niskomolekularni proteinski standardi; 1 – uzorak DPP III-His_6 obrađen sa SDS-om i 2-ME (nanesno 200 ng proteina); 2 – uzorak DPP III-His_6 obrađen samo SDS-om (naneseno 400 ng). Proteini su bojani srebrom.

Opisane forme monomera i dimera opisane su i kod homologno eksprimirane DPP III-His_6. Tijekom izolacije DPP III proteina bez His_6 privjeska, i neposredno nakon izolacije nije primjećena dodatna proteinska vrpca dimera. Analizom istog DPP III proteina koji je bio pohranjen 2 mjeseca na -10 °C, SDS-elektroforezom u nereducirajućim uvjetima, jasno su vidljive proteinske vrpce monomera i dimera (nije pokazano).

Sekundarna struktura

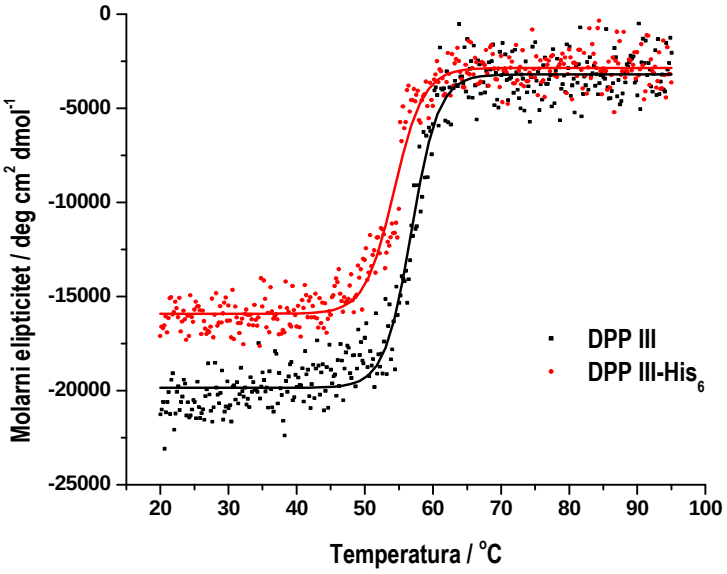
S ciljem određivanja elemenata sekundarne strukture DPP III proteina, kao i utjecaja His_6 privjeska, pročišćeni proteini analizirani su spektrometrijski cirkularnim dikroizmom (CD). Analiziranjem spektara proteina koji su snimani u dalekom UV području od 190-250 nm koristeći program CDSSTR, dostupan na internetskoj stranici navedenoj u Metodama, određeni su elementi sekundarne strukture DPP III i DPP III-His_6 proteina. Elemente sekundarne strukture kvaščeve DPP III bez His_6 privjeska pretežno čine α-zavojnice (~ 47 %), uz manji udio β-ploča (~ 13 %) i zavoja (~ 17 %). Kao što je vidljivo iz CD spektara (slika 4.14) dodatak His_6 privjeska nije značajnije utjecao na promjenu u sekundarnoj strukturi, te je udio α-zavojnica (~ 54 %), β-ploča (~ 10 %) i zavoja (~ 14 %) gotovo nepromijenjen.



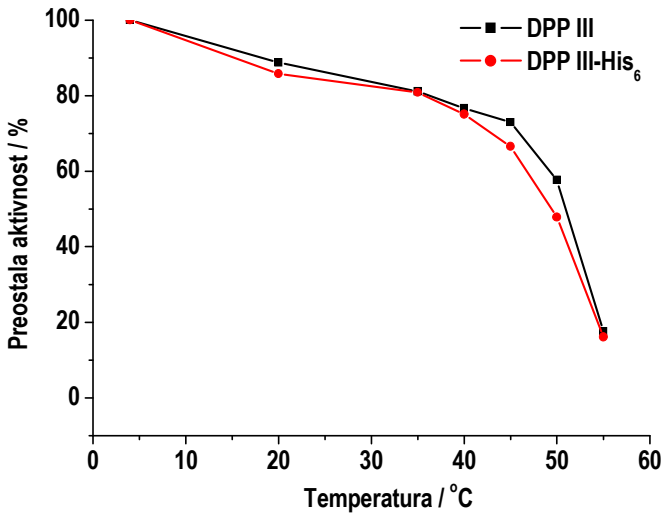
Slika 4.14. Usporedba CD spektara rekombinantne kvaščeve DPP III i DPP III-His_6. Koncentracija DPP III (pročišćene frakcije iza Mono Q) i DPP III-His_6 (pročišćene frakcije iza Ni-NTA) iznosila je ~ 0,320 mg mL^{-1}. CD spektar DPP III označen je crnom, a DPP III sa His_6 privjeskom crvenom bojom. Uvjeti snimanja CD spektara te postavke mjerenja opisani su u Metodama.

Termostabilnost

Termalna denaturacija proteina praćena je najprije mjerenjem cirkularnog dikroizma. Analizom sekundarne strukture određeno je da DPP III pretežno čine elementi α-zavojnice, pa je s obzirom na to promjena signala CD tijekom termalne denaturacije praćena na valnoj duljni od 208 nm karakterističnoj za α-zavojnicu. Obradom krivulja termalne denaturacije proteina, određeno je da temperatura mekšanja proteina T_m za DPP III iznosi 56,86 ± 0,12 °C, a za DPP III-His_6 54,29 ± 0,13 °C (slika 4.15). Nadalje, analizom denaturiranog proteina pomoću CD, prilikom snižavanja temperature sa 95 °C na 20 °C nije primijećen povrat nativne konformacije proteina. Iz slike 4.15 vidljivo je da se denaturacija DPP III i DPP III-His_6 odvija između 50 i 60 °C. To je potvrđeno i drugim načinom ispitivanja temperaturne stabilnosti koji je proveden mjerenjem preostale aktivnosti proteina nakon inkubacije pri različitim temperaturama. Preostala enzimska aktivnost DPP III pri 50 °C iznosila je 56,6 %, a za DPP III-His_6 47,8 %, što je u jako dobrom slaganju sa rezultatima mjerenja CD (slika 4.16 i 4.15).



Slika 4.15. Termalna denaturacija DPP III i DPP III-His_6. Točkama su prikazane vrijednosti signala CD snimljeni na valnoj duljini od 208 nm, a krivulje predstavljaju grafički prikaz Boltzmanove funkcije. Crno obojane točke i krivulja odnose se na DPP III, a crveno na DPP III sa His_6 privjeskom. Koncentracija DPP III (frakcije iza Mono Q) i DPP III-His_6 (frakcije iza Ni-NTA) iznosila je ~ 0,320 mg mL^{-1}. Uvjeti snimanja CD spektra te postavke mjerenja opisani su u Metodama.



Slika 4.16. Utjecaj temperature na stabilnost rekombinantnog proteina DPP III proteina sa i bez His_6 privjeska. Preparat DPP III (monomer iza MonoQ) i DPP III-His_6 (monomer iza gel-filtracije) koncentracije proteina ~ 0,003 mg mL^{-1} predinkubiran je 15 min pri različitim temperaturama pri pH 7,4. Određivanje preostale aktivnosti u alikvotima predinkubacijske smjese provedeno je uz Arg_2-2NA kako je opisano u Metodama.

Izoelektrična točka

Izoelektrična točka rekombinantne kvaščeve DPP III-His_6 određena je izoelektričnim fokusiranjem (IEF) na PhastGel pločicama raspona pH od 3,0 do 9,0. Bojanjem s Phast Blue R bojom, uočene su dvije bliske vrpce proteina (nije pokazano). Gradijent pH određen je istovremenim IEF standardnih proteina poznatih pI, a iz dobivene krivulje očitane su dvije vrijednosti pI za DPP III-His_6 kod pH 5,70 odnosno 5,75.

Optimalni uvjeti za aktivnost hidrolize Arg_2-2NA

Istraživanjem ovisnosti aktivnosti kvaščeve DPP III o pH ustanovljeno je da taj enzim hidrolizira supstrat Arg_2-2NA u području pH 7,0-8,6. Najveću aktivnost ispoljio je kod pH 8,0. Značajan utjecaj na enzimsku hidrolizu imala je i ionska jakost Tris-HCl pufera: povećanje ionske jakosti od optimalne I = 0,01 do I = 0,2, imalo je za posljedicu smanjenje hidrolize supstrata od oko 50 %. Utjecaj pH i ionske jakosti pufera ispitan je na DPP III (monomer iza MonoQ) i DPP III-His_6 (monomer iza gel-filtracije) pri čemu nisu uočene razlike.

Ispitivanjem utjecaja iona metala Co^{2+} i Zn^{2+}, pokazana je značajna aktivacija kvaščeve DPP III-His_6 Co^{2+} ionima. Aktivacija je postignuta u rasponu koncentracija 10-

500 μmol L^{-1} $CoCl_2$. Uz optimalnu koncentraciju $CoCl_2$ od 100 μmol L^{-1} enzim je bio aktiviran i do 5 puta. Nasuprot tome, $ZnCl_2$ je već u koncentraciji od 10 μmol L^{-1} značajno inhibirao DPP III-His_6 (~ 40 %), dok je uz 100 μmol L^{-1} inhibicija iznosila čak ~ 90 %.

Supstratna specifičnost kvaščeve DPP III

Supstratna specifičnost kvaščeve DPP III-His_6 određena je uz nekoliko sintetičkih supstrata, dipeptidil-naftilamida. Pri uvjetima koji su opisani u Metodama, dakle kod pH 8,0 i koncentracije supstrata 100 μmol L^{-1}, najveća specifična aktivnost postignuta je uz Arg_2-2NA i iznosila je 1485,1 mj mg^{-1}. Za Ala_2-2NA i Ala-Phe-2NA specifična aktivnost je bila manja i iznosila ~ 67 % odnosno 10,1 % u odnosu na aktivnost uz Arg_2-2NA. Znatno manja specifična aktivnost postignuta je uz supstrat His-Ser-2NA (1,2 % u odnosu na aktivnost uz Arg_2-2NA).

Utjecaj efektora peptidaza na aktivnost DPP III

Kelatori metala poput EDTA i 1,10-fenantrolina snažno inhibiraju DPP III-His_6 u kratkom vremenu predinkubacije. Predinkubacija enzima (24,2 nmol L^{-1}) uz 0,1 mmol L^{-1} 1,10-fenantrolin nakon 5 min pri 37 °C rezultira 70 %-tnom inhibicijom, dok EDTA u koncentraciji od 1 mmol L^{-1} gotovo u potpunosti inhibira enzim (~ 99 %).

Inhibitori serinskih peptidaza 3,4-dikloroizokumarin (DCI) i fenilmetansulfonil fluorid (PMSF) nisu imali značajniji utjecaj na aktivnost DPP III-His_6. Predinkubacija enzima (~ 20 nmol L^{-1}) 10 min pri pH 7,4 uz 200 μmol L^{-1} DCI uzrokovala je gubitak enzimske aktivnosti od 18,6 %. Čak 10 puta veća koncentracija PMSF (2 mmol L^{-1}) predinkubirana 20 min s DPP III-His_6 (9,8 nmol L^{-1}) pri pH 8,0, nije inhibirala enzim.

Ispitivanjem utjecaja tiolnih reagenasa na aktivnost DPP III-His_6 pokazana je brza inaktivacija enzima pri sobnoj temperaturi. Predinkubacijom enzima (3,2 μmol L^{-1}) uz 0,9 mmol L^{-1} 4,4'-ditiodipiridin (DTDP) 5 min, te zatim provođenjem standardnog testa, utvrđena je ~ 57 % manja aktivnost enzima, dok je nakon 15 min inaktivacija bila gotovo potpuna (~ 89 %). Osobito brza inaktivacija enzima zapažena je uz dodatak *para*-hidroksi-merkuribenzoata (*p*-HMB): 10-minutna predinkubacija DPP III-His_6 (19,6 nmol L^{-1}) s 0,1 μmol L^{-1} *p*-HMB rezultirala je inhibicijom od ~ 41 %, dok je 0,5 μmol L^{-1} *p*-HMB u istom vremenu potpuno inaktivirao enzim (~ 93 %). Zanimljivo, 10-minutna predinkubacija DPP III-His_6 (~ 1,2 μmol L^{-1}) s 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojevom kiselinom) (DTNB) koncentracije 2 mmol L^{-1}, nije imala utjecaj na enzimsku aktivnost. Nadalje, 30-minutna

predinkubacija DPP III-His_6 uz čak 20 mmol L^{-1} jodoacetamid (IAA), nije uzrokovala smanjenje aktivnosti enzima.

4.4. Katalitička svojstva DPP III

U cilju daljnje karakterizacije hidrolitičke aktivnosti kvaščeve DPP III, te ispitivanja utjecaja His_6 privjeska kao i dimerizacije na enzimsku aktivnost, određeni su kinetički parametri toga enzima za hidrolizu specifičnog supstrata Arg_2-2NA. Michaelisova konstanta K_m, i katalitička konstanta k_{cat} (obrtni broj), određene su mjerenjem početnih brzina reakcije hidrolize Arg_2-2NA u uvjetima kako je opisano u Metodama. Kao mjera enzimske efikasnosti izračunat je omjer navedenih konstanti k_{cat}/K_m.

Najprije smo provjerili da li postoje razlike u kinetičkim parametrima monomernog i dimernog oblika DPP III bez His_6 privjeska. U tu svrhu korišteni su uzorci DPP III izolirani kromatografijom na DEAE-celulozi te ionskom izmjenjivaču Mono Q. Kinetički parametri prikazani su u tablici 4.1.

Tablica 4.1. Rezultati kinetičke analize monomera i dimera DPP III uz Arg_2-2NA.

Oblik DPP III	K_m (μmol L^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mol L^{-1} s^{-1})
monomer	12,15	0,373	30 657,13
dimer	15,13	0,364	24 029,32

Reakcijska smjesa sadržavala je 17 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0, 100 μmol L^{-1} $CoCl_2$, te supstrat Arg_2-2NA u rasponu koncentracije 2,5-100 μmol L^{-1}. Koncentracija enzima u reakcijskoj smjesi bila je: 1,57 nmol L^{-1} za monomer te 1,32 nmol L^{-1} za dimer DPP III. Kinetički parametri određeni su iz vrijednosti početnih brzina hidrolize supstrata pri 25 °C, obradom podataka jedne serije mjerenja, kako je opisano u Metodama.

U tablici 4.2 prikazani su kinetički parametri određeni s ciljem da se ispita utjecaj His_6 privjeska, kao i mogućih posttranslacijskih modifikacija proteina na kinetička svojstva kvaščeve DPP III: K_m, brzinu katalize i katalitičku efikasnost.

Tablica 4.2. Rezultati kinetičke analize DPP III proteina sa i bez privjeska His_6, prekomjerno eksprimiranog u stanicama *E. coli* ili *S. cerevisiae*.

Tip enzima	K_m (μmol L^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mol L^{-1} s^{-1})
DPP III	10,42 ± 1,06	0,334 ± 0,022	32 583,86 ± 3320,32
DPP III-His_6 eksprimirana u *E. coli*	15,18 ± 3,03	0,249 ± 0,056	16 743,17 ± 3143,79
DPP III-His_6 eksprimirana u *S. cerevisiae*	18,54 ± 1,65	0,267 ± 0,014	14 471,69 ± 2029,63

Reakcijska smjesa sadržavala je 17 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0, 100 μmol L^{-1} $CoCl_2$, te supstrat Arg_2-2NA u rasponu koncentracije 2,5-100 μmol L^{-1}. Koncentracija enzima (monomerni oblik) u reakcijskoj smjesi bila je: 1,57 nmol L^{-1} za DPP III (frakcije iza MonoQ); 3,92 nmol L^{-1} za DPP III-His_6 *E. coli* (frakcije iza gel-filtracije); 1,72 nmol L^{-1} za DPP III-His_6 *S. cerevisiae* (frakcije iza gel-filtracije). Kinetički parametri određeni su iz vrijednosti početnih brzina hidrolize supstrata pri 25 °C, kako je opisano u Metodama. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška od najmanje dva određivanja.

Uvođenjem His_6 privjeska na *C*-kraj DPP III proteina, neznatno je povećana K_m i smanjena katalitička konstanta (k_{cat}), što rezultira smanjenjem katalitičke efikasnosti enzima za manje od 2 puta. Homologna ekspresija DPP III-His_6 nije rezultirala povećanjem katalitičke efikasnosti enzima. S obzirom na neznatne promjene u katalitičkoj efikasnosti, a izuzetno veliki prinos topive frakcije proteina sa His_6 privjeskom prilikom heterologne ekspresije te efikasno pročišćavanje na afnitetnoj koloni Ni-NTA, sva daljna ispitivanja provedena su na proteinu DPP III-His_6 heterologno eksprimiranom u *E. coli*, koji će od sada pa nadalje biti označen kao "divlji tip" DPP III enzima.

Iz vrijednosti početnih brzina hidrolize Arg_2-2NA u 17 mmol L^{-1} pH 8,0 puferu pri 25 °C ali bez prisustva $CoCl_2$, određeni su kinetički parametri za kvaščevu DPP III-His_6. K_m određena u uvjetima bez $CoCl_2$ gotovo je nepromijenjena (15,50 ± 1,26 μmol L^{-1}) u odnosu na K_m određenu u uvjetima sa $CoCl_2$ (tablica 4.2). Razlika je vidljiva u katalitičkoj konstanti koja je u uvjetima bez $CoCl_2$ manja oko 8,5 puta (0,028 ± 0,00095 s^{-1}) u odnosu na k_{cat} određenu uz $CoCl_2$.

4.5. Identifikacija reaktivnih cisteina

4.5.1. Priprema mutiranih oblika DPP III-His_6 usmjerenom mutagenezom

S ciljem razjašnjenja molekularne osnove dimerizacije DPP III i njene osjetljivosti na sulfhidrilne reagense, ispitivanje je nastavljeno u smjeru detekcije reaktivnih cisteinskih ostataka u DPP III proteinu. Usmjerenom mutagenezom priređeni su mutirani oblici kvaščeve DPP III-His_6 u kojoj je svih pet ostataka cisteina na pozicijama: 113, 130, 518, 626 i 639 bilo pojedinačno zamijenjeno aminokiselinom serin.

Prekomjerna heterologna ekpresija kao i afinitetno pročišćavanje mutiranih oblika proteina provedeni su kako je opisano za "divlji tip" DPP III. Tijek pročišćavanja bio je praćen SDS-elektroforezom kao i određivanjem aktivnosti standardnim testom. Frakcije s pročišćenim aktivnim proteinom, sakupljene su, te pohranjene u 20 mmol L^{-1} Tris puferu pH 7,4 uz dodatak glicerola (φ = 0,22) na -10 °C. U svrhu što preciznije kinetičke karakterizacije uzorci su dodatno pročišćeni gel-filtracijom na koloni Sephacryl-a S-200.

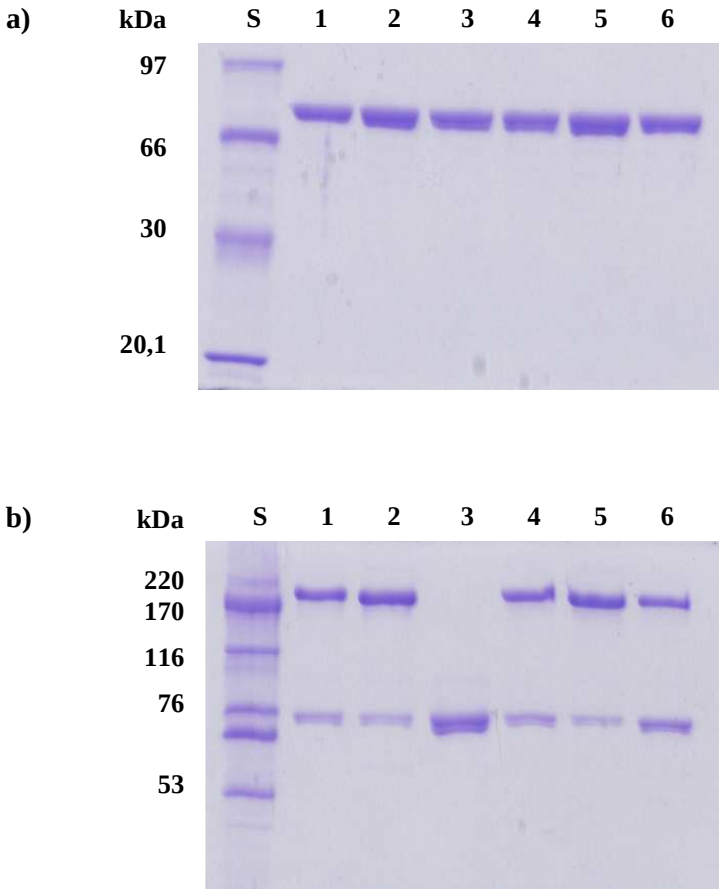
Zamjena cisteinskih ostataka DPP III enzima u serin, nije utjecala na aktivnost enzima, što je vidljivo iz usporedbe specifične aktivnosti "divljeg tipa" enzima i mutiranih oblika (tablica 4.3). Tako je specifična aktivnost "divljeg tipa" iznosila 1160,0 mj mg^{-1}, dok je aktivnost mutiranih oblika bila od 944,0-1176,2 mj mg^{-1}.

Tablica 4.3. Specifična aktivnost divljeg tipa DPP III i mutiranih oblika uz Arg_2-2NA.

Tip enzima	Aktivnost /mj mg^{-1}
''divlji tip'' DPP III	1160,0 ± 163,0
C113S	1176,2 ± 60,5
C130S	1112,4 ± 130,9
C518S	944,0 ± 36,2
C626S	1056,0 ± 216,6
C639S	1143,4 ± 87,1

Specifična aktivnost određena je standardnim testom kako je opisano, pri pH 8,0, uz 50 μmol L^{-1} $CoCl_2$, i koncentraciju supstrata 40 μmol L^{-1}. Koncentracija enzima u reakcijskoj smjesi bila je 2,5-6,0 nmol L^{-1}. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška od najmanje tri određivanja.

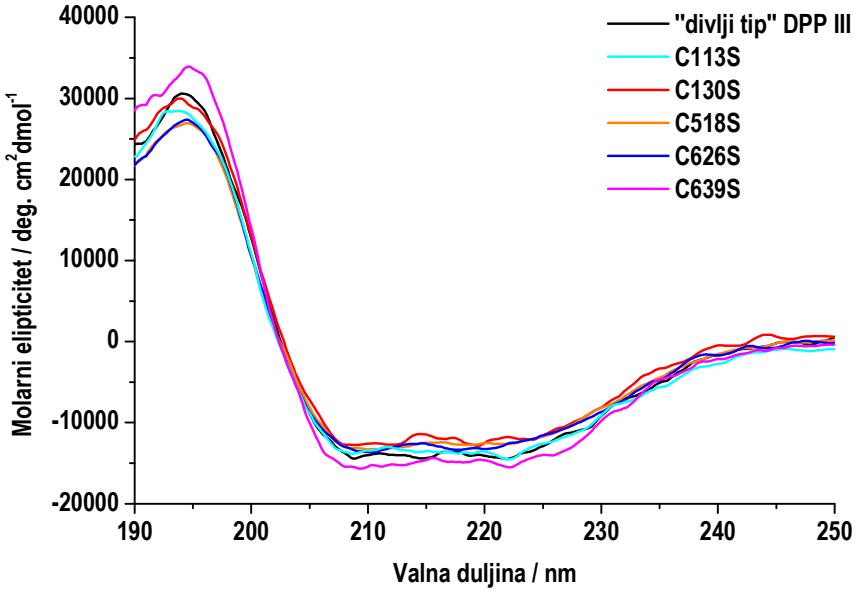
Nakon SDS-elektroforeze pročišćenih mutiranih oblika DPP III-His_6 proteina vidljiva je samo jedna proteinska vrpca koja odgovara monomeru (slika 4.17a). Analizom istih uzoraka nativnom elektroforezom ili pak SDS-elektroforezom u nereducirajućim uvjetima (slika 4.17b), ustanovljeno je da se svi mutirani oblici nalaze u formi monomera i dimera, osim jednog. Mutirani oblik DPP III proteina C130S u svim uvjetima postoji samo u obliku monomera, na osnovi čega zaključujemo kako je upravo cistein u poziciji 130 odgovoran za stvaranje intermolekularne disulfidne veze a time i dimerizacije kvaščeve DPP III.



Slika 4.17. SDS-elektroforeza afinitetno pročišćenog ''divljeg tipa'' DPP III i mutiranih oblika. a) reducirajući uvjeti, 12% poliakrilamidni gel. b) nereducirajući uvjeti (bez 2-ME), 7,5% gel. S – niskomolekularni odnosno visokomolekularni proteinski standardi; 1 – "divlji tip"; 2 – C113S; 3 – C130S; 4 – C518S; 5 – C626S; 6 – C639S. Na gel je naneseno 1 μg svakog uzorka. Proteinske vrpce bojane su s Coomassie blue R-250.

Usporedbom CD spektara svih mutiranih proteina s "divljim tipom" DPP III, nisu uočene razlike koje bi ukazivale na značajne promjene u sekundarnoj strukturi (slika 4.18). U prilog toga da dimerna struktura ne utječe na stabilnost DPP III proteina govore i

rezultati temperaturne stabilnosti "divljeg tipa" DPP III i C130S mutanta, dobiveni metodom cirkularnog dikroizma. Obradom krivulja termalne denaturacije proteina, određena je temperatura mekšanja proteina T_m koja je gotovo ista za "divlji tip" DPP III i C130S, te iznosi 54,29 ± 0,13 °C odnosno 54,51 ± 0,09 °C. Mjerenjem preostale aktivnosti proteina nakon inkubacije pri različitim temperaturama, pokazan je značajan gubitak aktivnosti za oba proteina pri temperaturi od 50 °C, pri čemu je preostala aktivnost "divljeg tipa" DPP III iznosila 47,8 %, a C130S mutiranog oblika 51,8 %.



Slika 4.18. CD spektri "divljeg tipa" i cisteinskih mutanata DPP III. Koncentracija proteina svih uzoraka (pročišćene frakcije iza Ni-NTA) iznosila je ~ 0,300 mg mL^{-1}. Uvjeti snimanja CD spektara i postavke mjerenja opisani su u Metodama.

U svrhu preciznijeg određivanja potencijalne važnosti ostataka cisteina u mehanizmu katalize kvaščeve DPP III, određeni su kinetički parametri mutiranih oblika i uspoređeni s vrijednostima za "divlji tip". "Divlji tip" DPP III i mutanti koji nakon afinitetnog pročišćavanja sadrže obje forme (monomer i dimer), dodatno su podvrgnuti gel-filtraciji na koloni Sephacryl-a S-200, kako bi se forma monomera odvojila od dimera. Mjerenje početnih brzina hidrolize supstrata rađeno je neposredno nakon izolacije, kako bi se izbjegla ponovna dimerizacija proteina zbog načina pohrane uzoraka. Iako samo u formi monomera, C130S DPP III također je podvrgnut gel-filtraciji.

Kinetički parametri ukazuju na neznatno smanjenje K_m C130S DPP III enzima u odnosu na "divlji tip", dok je katalitička konstanta (k_{cat}) mutiranog oblika bila manja 2,8 puta. Katalitička efikasnost C130S DPP III enzima (k_{cat}/K_m) smanjena je u odnosu na

"divlji tip" 1,7 puta. Niti zamjena ostalih cisteinskih ostataka nije značajnije utjecala na katalitičku efikasnost ostalih DPP III mutanata: katalitička konstanta (k_{cat}) C639S mutanta je nepromijenjenja u odnosu na "divlji tip", dok je za C518S mutant manja oko 1,9 puta (tablica 4.4).

Tablica 4.4. Rezultati kinetičke analize ''divljeg tipa'' DPP III i mutiranih oblika C130S, C518S i C639S uz Arg_2-2NA.

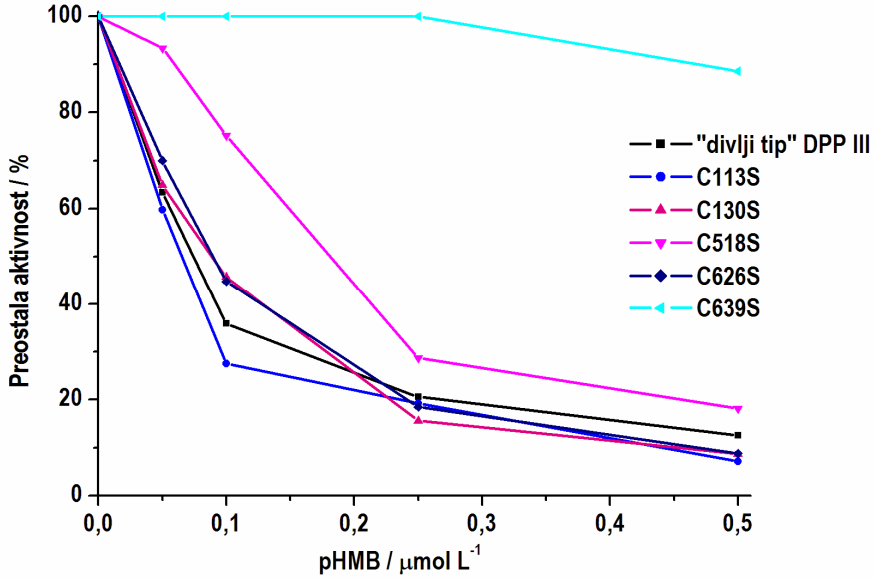
Tip enzima	K_m (μmol L^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mol L^{-1} s^{-1})
DPP III ''divlji tip''	15,18 ± 3,03	0,249 ± 0,056	16 743,17 ± 3143,79
C130S	8,89 ± 0,64	0,090 ± 0,004	10 213,10 ± 653,99
C518S	11,91 ± 1,41	0,131 ± 0,023	10 861,22 ± 728,98
C639S	10,97 ± 0,96	0,256 ± 0,022	23 878,98 ± 2576,25

Reakcijska smjesa sadržavala je 17 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8,0, 100 μmol L^{-1} $CoCl_2$, te supstrat Arg_2-2NA u rasponu koncentracije 2,5-100 μmol L^{-1}. Koncentracija enzima (monomerni oblici DPP III-His_6 nakon gel-filtracije) u reakcijskoj smjesi bila je: 3,9 nmol L^{-1} za "divlji tip"; 9,2 nmol L^{-1} za C130S; 6,0 nmol L^{-1} za C518S i 2,4 nmol L^{-1} za C639S DPP III. Kinetički parametri određeni su iz vrijednosti početnih brzina hidrolize supstrata pri 25 °C, kako je opisano u Metodama. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška od najmanje dva određivanja.

4.5.2. Utjecaj sulfhidrilnih reagenasa na aktivnost ''divljeg tipa'' i mutiranih oblika DPP III

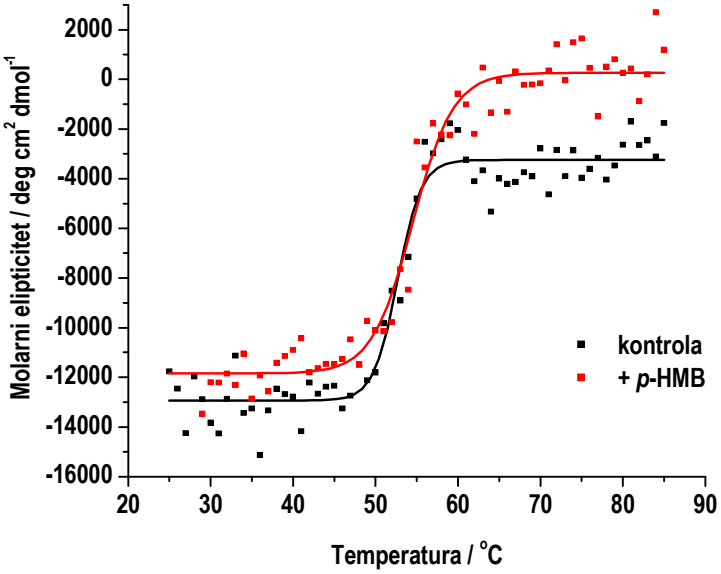
Predinkubacija sa sulfhidrilnim reagensom *para*-hidroksi-merkuribenzoatom (*p*-HMB) u koncentraciji 0,1 μmol L^{-1}, pri pH 8,0, već nakon 10 min uzrokovala 40 do 50 %-tnu inhibiciju "divljeg tipa" DPP III te C113S, C130S i C626S mutanta. Manja inhibicija (25 %) u navedenim uvjetima pokazana je za mutant C518S, dok je mutant C639S bio potpuno neosjetljiv. Povećanje koncentracije reagensa rezultiralo je znatno većom inhibicijom, pa je uz 0,5 μmol L^{-1} *p*-HMB preostala aktivnost "divljeg tipa", C113S, C130S i C626S DPP III bila ~ 10 %, C518S mutant zadržao je neznatno veću aktivnost (20 %), dok je mutant C639S i dalje pokazivao značajnu otpornost na inhibiciju (slika 4.19). Tek znatno veće koncentracije *p*-HMB-a od 10 μmol L^{-1} i 100 μmol L^{-1} uzrokovale su značajniji gubitak aktivnosti mutanta C639S koji je iznosio 50 % odnosno 80 % početne aktivnosti. Na temelju ovih rezultata možemo zaključiti kako je snažna inhibicija DPP III s

koncentracijom *p*-HMB reagensa manjom od 1 μmol L^{-1}, rezultat modifikacije cisteina na poziciji 639.



Slika 4.19. Inaktivacija "divljeg tipa" i cisteinskih mutanata DPP III-His_6 s *p*-HMB-om. Enzim (18-25 nmol L^{-1}) je predinkubiran 10 min s reagensom kod pH 8,0 i 25 °C, a zatim je određena preostala aktivnost kako je opisano u Metodama. Prikazane su srednje vrijednosti od najmanje dva mjerenja.

Rezultati ispitivanja utjecaja *p*-HMB na aktivnost "divljeg tipa" i mutiranih oblika DPP III-His_6 u kojima su pojedinačni ostaci cisteina zamijenjeni serinom, ukazivali su da bi inaktivacija DPP III ovim reagensom mogla biti posljedica strukturne nestabilnosti uzrokovane modifikacijom jednog ili više cisteinskih ostataka. Da bi se ispitalo tu pretpostavku, provedeno je mjerenje cirkularnog dikroizma. CD spektri "divljeg tipa" DPP III (4,4 μmol L^{-1}) u neutralnom puferu, i DPP III koja je bila predinkubirana 10 min sa čak 50 μmol L^{-1} *p*-HMB spojem (određena inhibicija ~ 96 %), bili su potpuno identični što ukazuje da nije došlo do značajnije promjene u sekundarnoj strukturi nakon modifikacije (nije pokazano). Praćenjem temperaturne stabilnosti pokazano je da do termalne denaturacije DPP III proteina modificiranog s *p*-HMB-om dolazi pri temperaturi 50-60 °C (slika 4.20). T_m vrijednost za kontrolni uzorak DPP III iznosi 52,68 ± 0,31 °C, dok je za DPP III koja je modificirana *p*-HMB-om T_m vrijednost kod 50,53 ± 0,36 °C. Kako je razlika u temperaturi mekšanja samo ~ 2 °C, čini se da inaktivacija DPP III proteina uslijed modifikacije cisteinskih ostataka (Cys639 i vjerovatno Cys518) nije posljedica značajnije konformacijske promjene proteina.

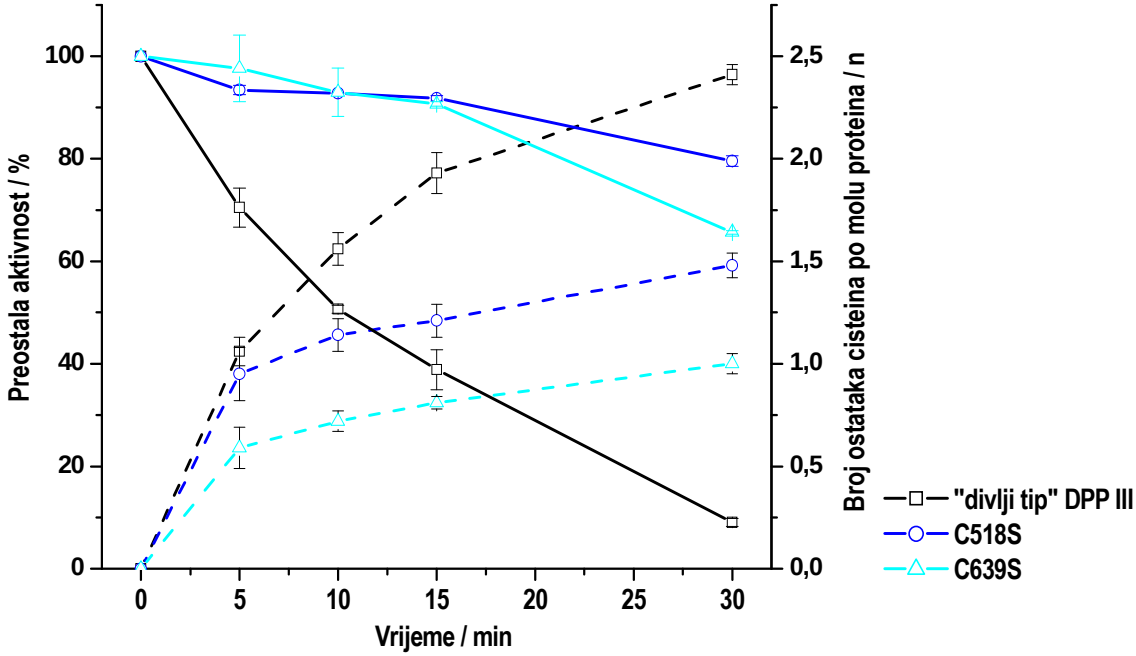


Slika 4.20. Termalna denaturacija ''divljeg tipa'' DPP III prije i nakon modifikacije sa *p*-HMB-om. Točkama su prikazane vrijednosti signala CD snimljeni na valnoj duljini od 208 nm, a krivulje predstavljaju grafički prikaz Boltzmanove funkcije. Crno obojane točke i krivulja odnose se na kontrolni uzorak, a crveno na modificirani uzorak "divljeg tipa" DPP III. Koncentracija proteina u uzorku iznosila je ~ 0,360 mg mL^{-1}. Uvjeti snimanja CD spektara i postavke mjerenja opisani su u Metodama.

Kako je *p*-HMB reagens velika molekula (eng. *bulky*) provjerili smo da li manji spojevi poput *N*-etilmaleimida (NEM) također imaju inhibitorno djelovanje na DPP III. U ovom slučaju ispitan je samo "divlji tip" te dva mutanta C518S i C639S. Za 50 %-tnu inaktivaciju "divljeg tipa" i C518S DPP III bila je potrebna znatno veća koncentracija NEM-a u odnosu na *p*-HMB, čak 10 mmol L^{-1}. Mutant C639S je pokazao otpornost na inhibiciju ovim reagensom (nije pokazano).

Nadalje je ispitan utjecaj aromatskog disulfida 4,4'-ditiodipiridina (DTDP). Ovaj je sulfhidrilni reagens također inhibirao "divlji tip" DPP III tek u znatno većim koncentracijama. 50 %-tna inhibicija enzima postignuta je predinkubacijom uz 0,9 mmol L^{-1} DTDP kod pH 8,0 nakon 10 min. DPP III oblici sa zamijenjenim ostacima cisteina na pozicijama 113, 130 i 626 pokazivali su sličnu osjetljivost na DTDP kao i "divlji tip" te su bili gotovo potpuno inhibirani nakon 30 min (~ 90 %). Istovremenim određivanjem broja modificiranih cisteinskih sulfhidrilnih grupa pokazano je da je 50 %-tna inhibicija "divljeg tipa" DPP III nakon 10 min posljedica modifikacije ~ 1,6 ostataka cisteina, dok je nakon 30 min modifikacija ukupno ~ 2,4 ostatka dovela do 90 %-tne inhibicije. Nasuprot tome, nakon 10 min, znatno manji gubitak aktivnosti ~ 7 % i ~ 3 % za C518S i C639S mutant, posljedica je manjeg broja modificiranih cisteina ~ 1,1 odnosno ~ 0,7. Nakon 30 min oba

mutanta i dalje pokazuju više od 60 % preostale aktivnosti, uz ~ 1,5 i ~ 1,0 ukupno modificiranih cisteina u C518S odnosno C639S mutantu DPP III (slika 4.21).

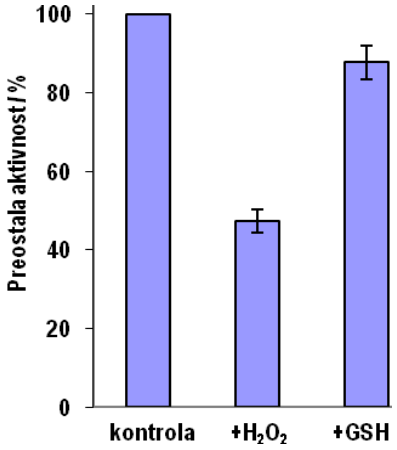


Slika 4.21. Vremenski tijek enzimske inaktivacije i modifikacije slobodnih cisteinskih ostataka "divljeg tipa" DPP III i cisteinskih mutanata C518S i C639S s DTDP-om. Enzim (3,6 μmol L^{-1}) je predinkubiran s 4,4'-ditiodipiridinom (0,9 mmol L^{-1}) pri pH 8,0 i 25 °C. Oslobođeni 4-tiopiridon praćen je spektrofotometrijski pri 324 nm. Udio modificiranih cisteina i određivanje preostale aktivnosti enzima opisano je u Metodama. Isprekidana linija označava broj modificiranih cisteina; puna linija preostalu aktivnost. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška od najmanje dva određivanja.

Tijekom izrade ove radnje uspješno je kristaliziran mutirani oblik C130S DPP III proteina, na temelju čega je razrješena 3D struktura (PDB ulaz: 3csk). To je omogućilo detaljniju analizu okoline cisteinskog ostatka u poziciji 639, s ciljem objašnjenja njegove visoke reaktivnosti. U tu svrhu pripremljen je mutirani oblik DPP III sa zamijenjenim ostatkom lizina na poziciji 638 u leucin (odabir Lys638 biti će objašnjen u poglavlju 4.6.1). Priprema mutanta K638L DPP III-His_6 provedena je kao i u slučaju "divljeg tipa" DPP III, a sama mutacija nije imala utjecaja na enzimsku hidrolizu Arg_2-2NA (vidi tablicu 4.5). Ispitivanjem inaktivacije K638L mutanta DPP III s *p*-HMB reagensom, uočena je znatno veća osjetljivost. Naime, već 0,05 μmol L^{-1} *p*-HMB inaktivirao je enzim čak 95 %, dok je "divlji tip" kod te koncentracije reagensa zadržao više od 60 % svoje aktivnosti (slika 4.19).

4.5.3. Utjecaj vodikovog peroksida i glutationa

S ciljem istraživanja potencijalne fiziološke uloge reaktivnih cisteinskih ostataka kvaščeve DPP III, ispitan je utjecaj nekoliko fiziološki značajnih spojeva. Predinkubacijom "divljeg tipa" DPP III uz 2 mmol L^{-1} vodikov peroksid (H_2O_2) nakon 30 min gubi se ~ 53 % enzimske aktivnosti. Dodatnom 10-minutnom inkubacijom uz 3 mmol L^{-1} reducirani glutation (GSH) primjećen je povrat aktivnosti do ~ 88 % (slika 4.22). GSH u ovoj koncentraciji ne utječe na aktivnost netretiranog enzima. Duljom inkubacijom DPP III uz istu koncentraciju H_2O_2 (16 sati) preostala aktivnost enzima iznosila je ~ 20 %, no u tom slučaju dodatkom GSH nije bilo moguće reaktivirati DPP III.

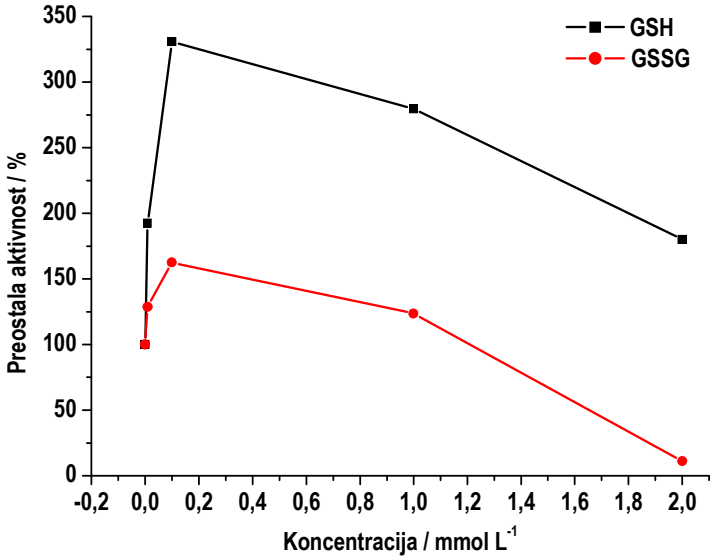


Slika 4.22. Inaktivacija ''divljeg tipa'' DPP III sa H_2O_2, te reaktivacija sa GSH. Predinkubacija enzima (2,5 μmol L^{-1}) uz 2 mmol L^{-1} H_2O_2 odvijala se 30 min (25 °C, u mraku), nakon čega je dodan GSH (3 mmol L^{-1}) a nakon 10 min određena preostala aktivnost kako je opisano u Metodama. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška od najmanje tri mjerenja.

Ispitivanjem utjecaja H_2O_2 na mutirane oblike DPP III, uočeno je da svi ispitani mutanti sa zamijenjenim cisteinom na pozicijama 113, 130, 518, 626 ili 639 pokazuju istu osjetljivost na H_2O_2: nakon 30 min predinkubacije preostala aktivnost iznosila od 41,3 do 50,7 % dok se dodatnom inkubacijom sa GSH postizala reaktivacija za sve mutirane forme od 83,6 do 93,4 % preostale aktivnosti.

Mjerenjem početnih brzina hidrolize Arg_2-2NA uz dodatak glutationa u reduciranom ili oksidiranom obliku u rasponu koncentracija od 0,1 do 2,0 mmol L^{-1}, ispitan je utjecaj na aktivnost DPP III. Iz grafičkog prikaza (slika 4.23) vidljivo je da već 0,1 mmol L^{-1} GSH aktivira "divlji tip" DPP III 3,3 puta, dok je uz istu koncentraciju GSSG postignuta aktivacija iznosila 1,6 puta. No, značajna razlika opažena je pri većim koncentracijama: 2 mmol L^{-1} GSH i dalje aktivira DPP III, dok 2 mmol L^{-1} GSSG inhibira

enzim ~ 90 %. Ispitani mutanti DPP III sa zamjenjenim cisteinskim ostacima, pokazivali su istu osjetljivost na GSH I GSSG kao i "divlji tip".



Slika 4.23. Utjecaj GSH i GSSG na aktivnost ''divljeg tipa'' DPP III. U reakcijsku smjesu koja je sadržavala 20 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,4, 40 μmol L^{-1} Arg_2-2NA, GSH ili GSSG (0,01-2 mmol L^{-1}) dodan je enzim (~ 50 nmol L^{-1}), nakon čega je izmjerena početna brzina hidrolize Arg_2-2NA kako je opisano u Metodama.

Gotovo jednaka aktivacija odnosno inaktivacija "divljeg tipa" i cisteinskh mutanata DPP III postignuta je uz 1,4-ditiotreitol (DTT): 0,1 mmol L^{-1} DTT u reakcijskoj smjesi aktivira "divlji tip" DPP III do 3,5 puta, a mutirane oblike do 3,8 puta, dok koncentracije DTT-a veće od 3,0 mmol L^{-1} inhibiraju enzimsku aktivnost.

4.6. Ispitivanje uloge sačuvanih aminokiselinskih ostataka

4.6.1. Odabir kandidata za ciljanu mutagenezu

Jedan od ciljeva ovog rada bio je i identificirati aminokiseline - nepoznate konstituente aktivnog mjesta DPP III, te utvrditi njihovu potencijalnu ulogu u katalitičkom mehanizmu. U početku izrade ovog rada, pristup odabiru potencijalnih kandidata temeljio se na bioinformatičkim analizama primarnih struktura, putem kojih se identificiralo visoko sačuvane aminokiselinske ostatke proteina porodice M49. Kako je već navedeno, tijekom izrade ovog rada i u vezi s njim, kristaliziran je mutant DPP III $C130S^{129}$. Kristalna

struktura proteina kvaščeve DPP III predstavlja prototip strukture za čitavu porodicu metalopeptidaza M49 (porodica DPP III). Razjašnjena kristalna struktura odnosi se na "prazni enzim", pa nedostaju podaci o načinu vezanja supstrata kao i katalitičkom mehanizmu. No, upravo je uvid u prvu poznatu trodimenzionalnu strukturu, s detaljno okarakteriziranim mjestom za vezanje cinka, zajedno s rezultatima bioinformatičke analize omogućio ciljani odabir onih aminokiselinskih ostataka za koje se pretpostavlja da bi mogli biti važni za supstratnu specifičnost (vezanje supstrata) ili stabilizaciju prijelaznog stanja.

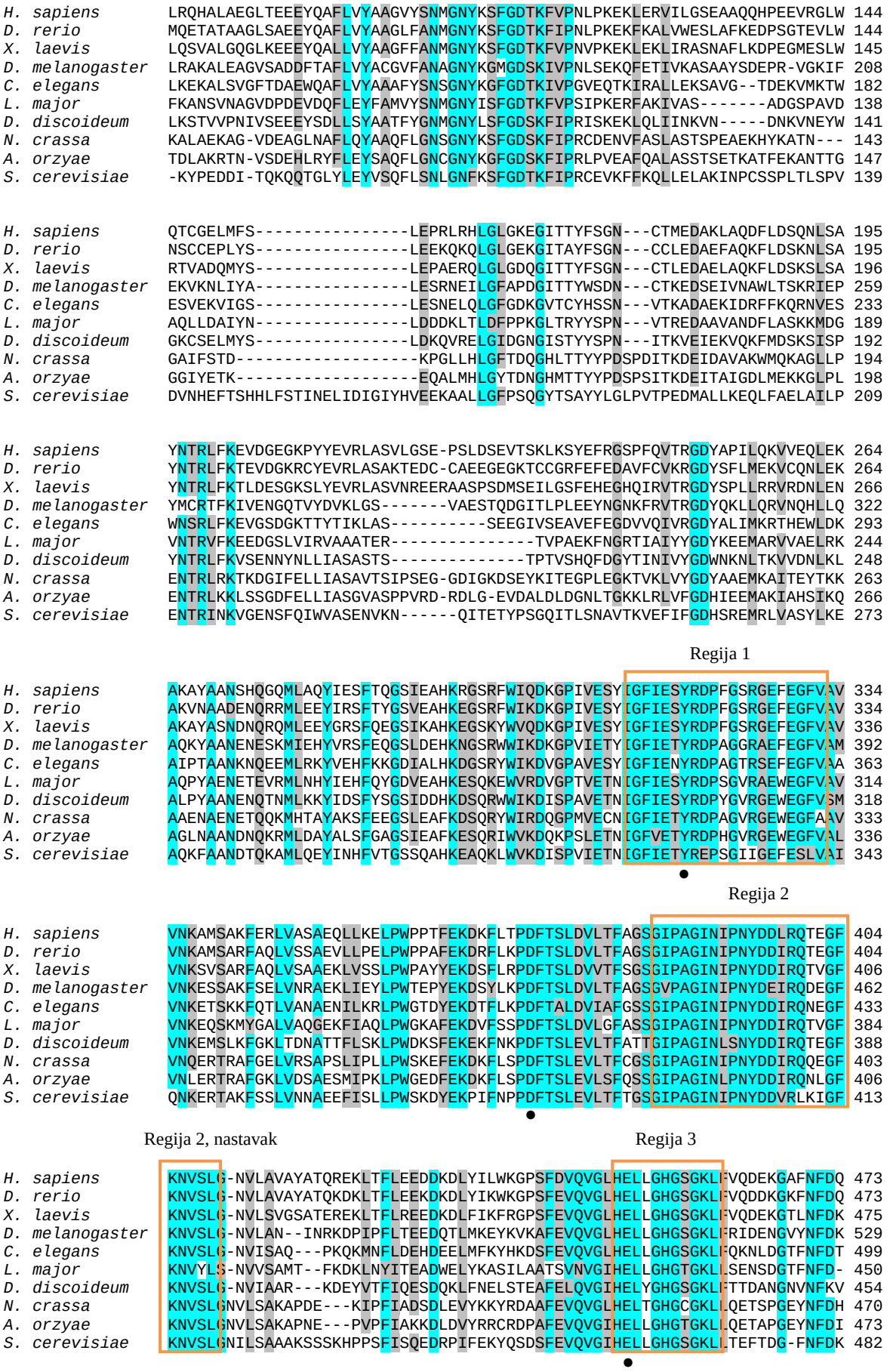
Odabrani aminokiselinski ostaci, bili su potpuno ili visoko sačuvani u porodici DPP III, a zamijenjeni su metodom ciljane mutageneze.

Abramić i sur. su 2004. god. sravnjivanjem 14 tada poznatih primarnih struktura proteina porodice M49 ustanovili 5 očuvanih regija[130]. Danas je broj članova porodice M49 (DPP III) znatno veći: 173 prema MEROPS bazi podataka[2]. To su proteinske sekvencije iz organizama koji pripadaju u 5 carstava života (*Eubacteria, Protista, Fungi, Plantae, Animalia*). Na slici 4.24 prikazan je rezultat sravnjivanja primarnih struktura odabranih eukariotskih predstavnika porodice M49.

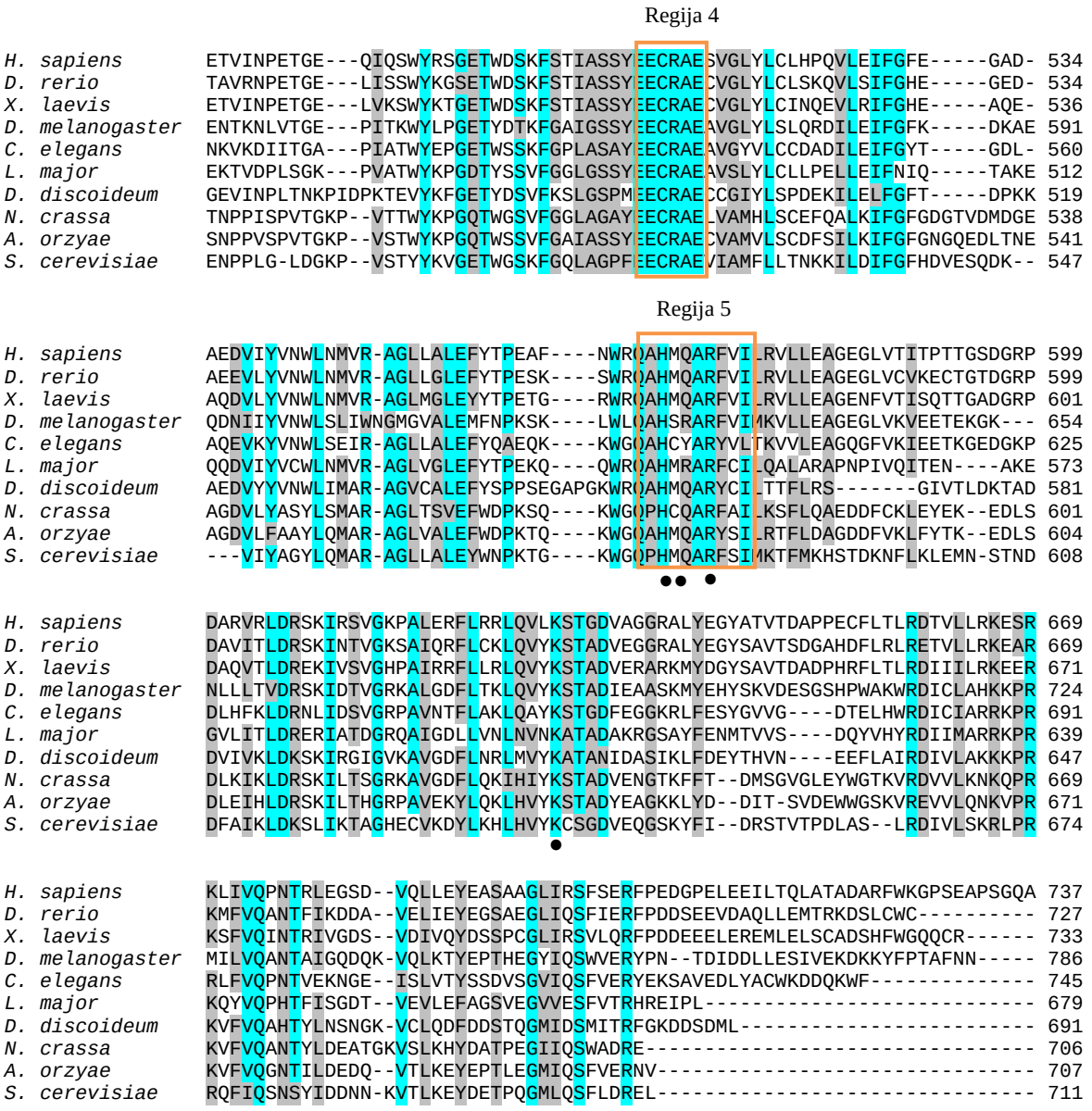
```
H. sapiens       ------------------------------------------------------------MADTQ 5
D. rerio         ------------------------------------------------------------MVDSQ 5
X. laevis        ------------------------------------------------------------MAAPSQ 6
D. melanogaster  MFWLRGLQRSRQQLNRLCHFRSRLNYGTSPSIRSVQPSISRSLGFCSSLVRYSCSTNLPQPAEMASKTAH 70
C. elegans       ------------------------MNGQVSLLLRRAISVKTFHLKRFVSTSTFSFSNSLPYKMPVDRSL 45
L. major         ------------------------------------------------------------MSHNTL 6
D. discoideum    ----------------------------------------------------------MSVPSSVIEN 10
N. crassa        ------------------------------------------------------------MDAQELSQ 8
A. orzyae        ------------------------------------------------------------MDEKVKQH 8
S. cerevisiae    ---------------------------------------------------------------MSH 3

H. sapiens       YILPNDIGVSSLDCREAFRLLSP-TERLYAYHLSRAAWYGGLAVLLQTSPEAPYIYALLSRLFRAQDPDQ 74
D. rerio         YYLPNDIGISALDCREAFKLLSP-KEKLYAHYLSRAAWYGGLVVLIQTSPESAKIYVLLQKMFRAQTPLQ 74
X. laevis        YVLPNDLPVALLDCSEAFLLLSA-EEKLYTHYLSRASFYGGLIVLFQTSPESPAIYILFNRLFRTQEPAE 75
D. melanogaster  FVLPNTQPIADLDCKSAFENLTE-KEKLYAHHFSQASWDGGLIALIQSSPEAPLIFSLLHRIFLAEKIPV 139
C. elegans       YIIPNETPVCQLDAADAFKTLSE-KEKKYSHYVAKASFDGALAVFLQVSPESAPIFYVLYRLFKSESVEQ 114
L. major         YITPRAVPYCILSIANAFKDLTP-KQRHYAHHMMAAGWCGAPVVAEQLSPESLPLLRLFFKVLSAQPLDT 75
D. discoideum    HLVPKEIPVYRLNARESFNLLTE-KEQLYAHHISVACWWGSKICLGQTSIESGPIFNLFQNLFSIQN--- 76
N. crassa        YLADAPPSVVRLEVEKHFDALTDKQKR-YAHFISKASFAGNRIVLRQVSPESESIYDFIIALHKASGGDW 77
A. orzyae        YLADSPPTVVRLEIKHHFDNLKDAKLRRYAHYISRAAFEGTRVTLRQVSPESEPIYDLIIALYHACDGNW 78
S. cerevisiae    FFADHDAPLSMLSVKTEYFPQLTDKEQKYAHFMSKASHAGSRVVMRQVSHESEPIFDLILAIHSKLNG-- 71
```

Slika 4.24. Rezultat sravnjivanja (eng. *multiple sequence alignment*) primarnih struktura proteina porodice M49.
Sravnjivanje je provedeno koristeći program ClustalW2 uz parametre kako je opisano u Metodama. Sravnjene su primarne strukture DPP III slijedećih vrsta: *Homo sapiens, Danio rerio, Xenopus laevis, Drosophila melanogaster, Caenorhabditis elegans, Leishmania major, Dictyostelium discoideum, Neurospora crassa, Aspergillus orzyae, Saccharomyces cerevisiae.* Aminokiselinski ostaci koji su sačuvani u barem 9 od 10 sravnjenih proteina označeni su plavom bojom, dok su slični ostaci osjenčani sivo. Karakteristične sačuvane regije u porodici M49 uokvirene su narančastom bojom, a aminokiselinski ostaci koji su odabrani za zamjenu usmjerenom mutagenezom označeni su crnom točkom ispod zadnje sekvencije (DPP III iz kvasca *S. cerevisiae*).



Slika 4.24. (nastavak s prethodne stranice)



Slika 4.24. (nastavak s prethodne stranice)

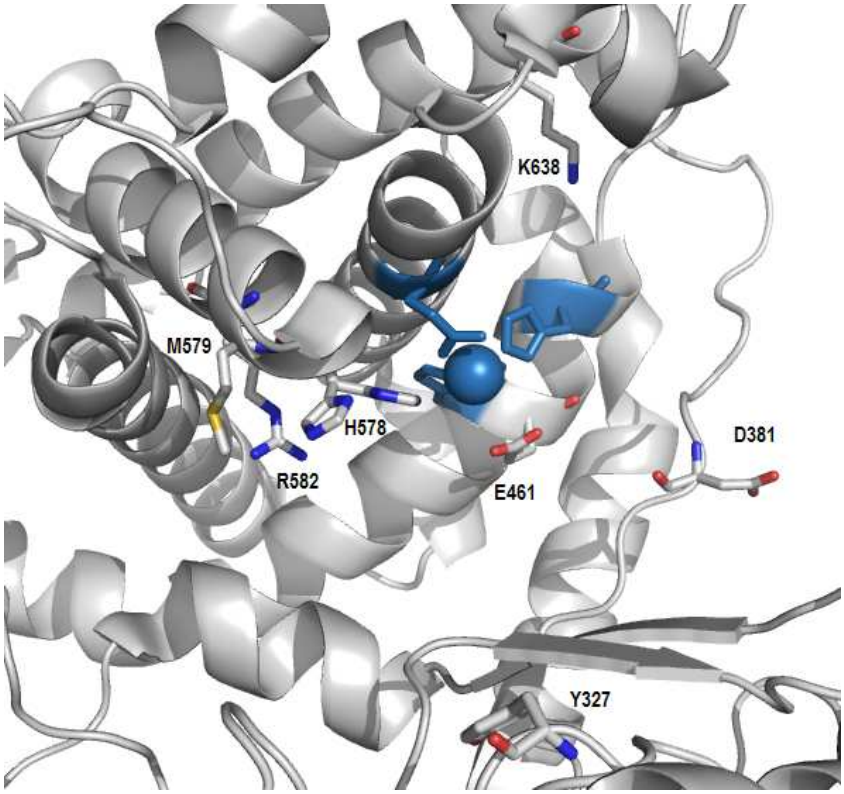
Uvidom u kristalnu strukturu kvaščeve DPP III utvrđeno je da su potpuno sačuvani ostaci glutaminske kiseline 461 (regija 3), histidina 578 te arginina 582 (oba u regiji 5) smješteni vrlo blizu metala aktivnog centra DPP III (slika 4.25). Kako bi se po prvi puta razjasnila njihova potencijalna uloga u katalitičkom mehanizmu DPP III, navedeni ostaci zamijenjeni su ciljanom mutagenezom kako bi se dobili mutirani oblici E461Q, H578N i R582Q.

Visoko sačuvani ostatak koji se također nalazi blizu aktivnog mjesta kvaščeve DPP III je metionin 579 (regija 5), koji je zamijenjen leucinom (mutant M579L). Na osnovi preliminarnih rezultata modeliranja vezanja supstrata[129] kao kandidat za

zamjenu odabrana je asparaginska kiselina 381 koja je zamijenjenja asparaginom (mutant D381N).

Iz rezultata sravnjenja sekvencija uočeno je da je lizin 638 visoko sačuvani ostatak van navedenih regija. Taj ostatak se u kristalnoj strukturi kvaščeve DPP III nalazi relativno blizu Cys639 za koji je u ovom radu pokazano da je odgovoran za brzu inaktivaciju enzima s *p*-HMB. Zato je odlučeno supstituirati i ovaj ostatak te ispitati mutant (K638L).

Ispitivanja na humanom DPP III proteinu dovela su do saznanja o ulozi tirozina 318 (regija 1) u stabilizaciji prijelaznog stanja[131]. Obzirom na visoku sačuvanost tog tirozinskog ostatka, a s ciljem ispitivanja usporedbe utjecaja zamjene identičnog ostatka na katalitički mehanizam kvaščeve i humane DPP III, ciljanom mutagenezom su priređena dva mutirana oblika kvaščeve DPP III (Y327A i Y327F).



Slika 4.25. Prikaz strukture aktivnog mjesta kvaščeve DPP III (PDB ulaz: 3csk). Ligandi iona cinka histidin 450 i 455, koji su dio motiva HELLGH, i glutaminska kiselina 517 koja je dio motiva EECRAE, prikazani su plavom bojom; ion cinka prikazan je plavom kuglom. Posebno su označeni oni ostaci koji su odabrani za zamjenu ciljanom mutagenezom. Za prikaz strukture korišten je PyMOL program (www.pymol.org)[74].

Mutageneza je provedena na način kako je opisano u Metodama, te su svi priređeni mutirani oblici DPP III eksprimirani sa His_6 privjeskom na *C*-kraju proteina. Metodom DNA sekvenciranja potvrđene su pravilno uvedene ciljane mutacije. Pročišćavanje i

izolacija priređenih mutanata provedena je afinitetnom kromatografijom na koloni Ni-NTA, te je elektroforezom u nativnim ili denaturirajućim uvjetima provjerena čistoća uzoraka. Pročišćavanjem mutiranih oblika DPP III u jednom koraku, izolirani su proteini u visokom stupnju čistoće. Cirkularnim dikroizmom potvrđeno je da nije došlo do promjena u sekundarnoj strukturi priređenih mutiranih oblika DPP III proteina.

4.6.2. Katalitička svojstva mutiranih oblika DPP III

Mjerenjem početnih brzina hidrolize Arg_2-2NA u standardnim uvjetima, kako je opisano, određeni su kinetički parametri K_m i k_{cat} za "divlji tip" te priređene mutirane oblike DPP III i uspoređeni s katalitičkim svojstvima "divljeg tipa". Rezultati su prikazani u tablici 4.5.

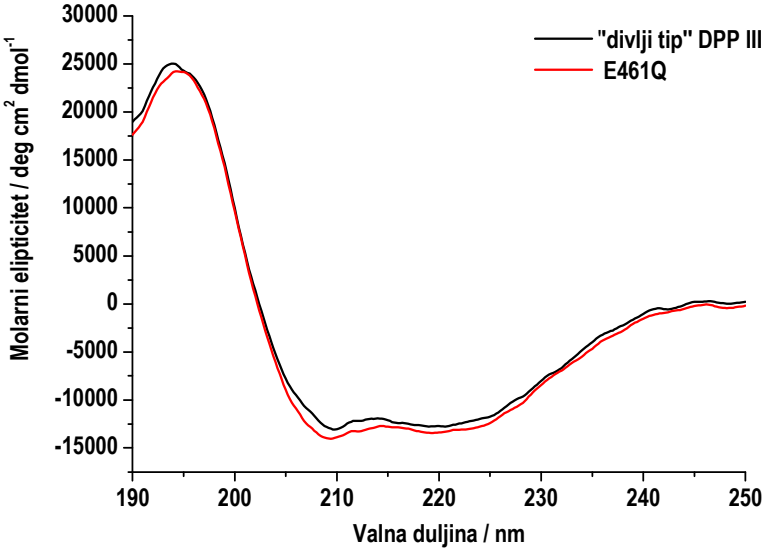
Tablica 4.5. Rezultati kinetičke analize ''divljeg tipa'' i mutiranih oblika DPP III uz Arg_2-2NA.

DPP III	K_m (μmol L^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mol L^{-1} s^{-1})
''divlji tip''	15,18 ± 3,03	0,2486 ± 0,056	16 403,16
Y327A	33,54 ± 2,25	0,0012 ± 0,0002	35,78
Y327F	19,23 ± 0,11	0,0018 ± 6,4×10^{-5}	93,60
D381N	17,77 ± 4,13	0,0102 ± 7,5×10^{-4}	574,00
E461Q	42,13 ± 4,05	0,000027 ± 6,9×10^{-6}	0,641
H578N	25,11 ± 2,54	0,0034 ± 0,0003	135,40
M579L	8,36 ± 0,45	0,0036 ± 0,0005	430,62
R582Q	2,55 ± 0,20	0,9540 ± 0,164	374 117,65
K638L	5,09 ± 0,44	0,1632 ± 0,005	32 062,87

Reakcijska smjesa sadržavala je 17 mmol Tris-HCl pH 8,0, 100 μmol L^{-1} $CoCl_2$ i supstrat Arg_2-2NA u rasponu koncentracije 0,625-150 μmol L^{-1}. Koncentracija enzima u reakcijskoj smjesi bila je za: "divlji tip" 3,9 nmol L^{-1}; Y327A 140 nmol L^{-1}; Y327F 96 nmol L^{-1}; D381N 66 nmol L^{-1}; E461Q 9 μmol L^{-1}; H578N 140 nmol L^{-1}; M579L 94 nmol L^{-1}; R582Q 0,6 nmol L^{-1}; K638L 2 nmol L^{-1}. Kinetički parametri određeni su iz vrijednosti početnih brzina hidrolize supstrata pri 25 °C, kako je opisano u Metodama. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška od najmanje dva određivanja.

Najveći utjecaj na katalitičku efikasnost imala je zamjena glutaminske kiseline na poziciji 461 u glutamin. Zbog izuzetno niske aktivnosti mutiranog oblika E461Q, za mjerenje početne brzine koncentracija mutanta je bila 2300 puta veća negoli u slučaju "divljeg tipa". Posljedica zamjene ovog ostatka očitovala se u povećanju K_m (oko 2,8 puta) u odnosu na "divlji tip". No, najveća razlika bila je u bitno smanjenoj k_{cat}, koja je bila čak oko 9200 puta manja, dok je katalitička efikasnost DPP III enzima ovom mutacijom smanjena za čak 25 000 puta u odnosu na "divlji tip".

Unatoč velikom utjecaju supstitucije Glu461 s Gln na enzimsku aktivnost, spektar cirkularnog dikroizma pokazuje da ovom zamjenom nije došlo do značajne promjene u sekundarnoj strukturi proteina (slika 4.26).



Slika 4.26. CD spektri "divljeg tipa" i E461Q mutanta DPP III-His$_6$ proteina. Koncentracija proteina uzoraka (pročišćene frakcije iza Ni-NTA) iznosila je ~ 0,300 mg mL^{-1}. Uvjeti snimanja CD spektara te postavke mjerenja opisani su u Metodama.

Zamjena tirozina na poziciji 327 u alanin povećala je K_m vrijednost za oko 2 puta. Međutim, zamjena ovog ostatka s Phe ili Ala znatno je umanjila katalitičku konstantu enzima: k_{cat} mutanta Y327F bila je manja oko 140, dok je za Y327A mutant bila manja oko 207 puta u odnosu na "divlji tip". Katalitička efikasnost Y327A mutanta bila je smanjena čak oko 458 puta, a Y327F oko 175 puta u odnosu na "divlji tip".

Značajan efekt na katalizu DPP III imala je i zamjena histidinskog ostatka 578 u asparagin. K_m vrijednost bila je nešto veća (oko 1,7 puta), no k_{cat} je u odnosu na "divlji tip"

bila umanjena oko 73 puta. Katalitička efikasnost bila je umanjena oko 120 puta u odnosu na "divlji tip" što također govori u prilog uloge H578 u katalitičkom mehanizmu DPP III.

Zamjena metionina 579 u leucin, imala je za posljedicu manju vrijednost k_{cat} od oko 70 puta, slično kao i zamjena susjednog histidina 578. Obzirom da je K_m vrijednost mutanta M579L smanjena 1,8 puta, i katalitička efikasnost mu je bila nešto veća u usporedbi s mutantom H578N, odnosno manja oko 38 puta u odnosu na "divlji tip".

Priređeni mutant R582Q pokazao je poboljšanje katalitičkih svojstava za hidrolizu Arg_2-2NA: K_m je bila manja gotovo 6 puta, dok se k_{cat} povećala oko 3,8 puta, čime je katalitička efikasnost ovog mutanta DPP III u odnosu na "divlji tip" povećana otprilike 23 puta.

4.6.3. Ispitivanje uloge aminokiselinskih ostataka u vezanju liganda

Značajno umanjena katalitička efikasnost mutanta E461Q od čak 25 000 puta, ukazuje na esencijalnu ulogu ovog ostatka u katalitičkom mehanizmu. S obzirom na nešto veću K_m vrijednost u slučaju supstrata Arg_2-2NA, kako bi podrobnije ispitali da li ova glutaminska kiselina sudjeluje u vezanju supstrata, odredili smo K_i vrijednost za heptapeptid valorfin (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln) na način kako je opisano u Metodama. Zbog jako niske aktivnosti mutanta E461Q, reakcijska smjesa je sadržavala i $CoCl_2$. Da bi glutaminska kiselina 461 mogla sudjelovati u vezanju supstrata potvrđuje povećanje vrijednosti K_i od 25 puta u odnosu na "divlji tip" (tablica 4.6).

Tablica 4.6. Inhibicija ''divljeg tipa'' i E461Q mutiranog oblika DPP III valorfinom.

DPP III	K_i (μmol L^{-1})
''divlji tip''	0,34 ± 0,03
E461Q	8,36 ± 1,52

Reakcijska smjesa sadržavala je 17 mmol Tris-HCl pH 8,0, 50 μmol L^{-1} Arg_2-2NA, valorfin u koncentraciji 2 μmol L^{-1} za "divlji tip" odnosno 20 μmol L^{-1} za mutant E461Q, te 100 μmol L^{-1} $CoCl_2$. Koncentracija "divljeg tipa" DPP III iznosila je 2,8 nmol L^{-1}, a mutanta E461Q 8,3 μmol L^{-1}. Određivanje K_i provedeno je kako je opisano u Metodama. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška od tri određivanja.

Kako bi se ispitala uloga u vezanju supstrata, te pokazali koji su aminokiselinski ostaci dio S_1 ili S_2 podmjesta DPP III enzima, priređeni mutanti kao i "divlji tip" ispitivani su uz analoge supstrata Tyr-Phe-NHOH i Tyr-Gly-NHOH. Derivati hidroksamske kiseline

su poznati kao snažni inhibitori metalopeptidaza jer hidroksamska kiselina tvori "dvozube" (eng. *bidentate*) komplekse sa metalnim ionom aktivnog mjesta enzima, dok se dipeptidni dio veže u S_1 i S_2 podmjesto enzima. Rezultati nedavnih ispitivanja navednih inhibitora na humanom ortolognom enzimu pokazali su da je inhibicija ovim spojevima kompetitivnog tipa[132]. Ispitivanjem utjecaja Tyr-Phe-NHOH na aktivnost "divljeg tipa" kvaščeve DPP III pri pH 8,0 ali bez prisutnosti $CoCl_2$, pokazano je snažno inhibitorno djelovanje (tablica 4.7) te je konstanta inhibicije (K_i) iznosila 0,04 μmol L^{-1}. Dodatak Tyr-Gly-NHOH imao je znatno slabiji efekt (K_i = 4,11 μmol L^{-1}).

Rezultati ispitivanja inhibicije priređenih mutanata DPP III sa Tyr-Phe-NHOH i Tyr-Gly-NHOH hidroksamatnim inhibitorima ukazuju na potencijalnu ulogu zamijenjenih aminokiselinskih ostataka u vezanju liganda (kompetitivnog inhibitora) (tablica 4.7).

Tablica 4.7. Inhibicija ''divljeg tipa'' i mutiranih oblika DPP III dipeptidil-hidroksamatnim inhibitorima.

DPP III	K_i (μmol L^{-1})	
	Tyr-Phe-NHOH	Tyr-Gly-NHOH
''divlji tip''	0,04 ± 0,00	4,11 ± 0,25
D381N	0,55 ± 0,01	n.o.
H578N	0,49 ± 0,03	n.o.
M579L	1,23 ± 0,19	n.o.
K638L	2,26 ± 0,20	191,50 ±17,92

Reakcijska smjesa sadržavala je 17 mmol Tris-HCl pH 8,0, 15 μmol L^{-1} Arg_2-2NA, inhibitor Tyr-Phe-NHOH u koncentraciji 0,1-15 μmol L^{-1}, odnosno Tyr-Gly-NHOH u koncentraciji 5-800 μmol L^{-1}, bez $CoCl_2$. Koncentracija "divljeg tipa" iznosila je 24 nmol L^{-1}; D381N 0,4 μmol L^{-1}; H578N 0,9 μmol L^{-1}; M579L 0,3 μmol L^{-1} i K638L 37 nmol L^{-1}. Određivanje K_i provedeno je kako je opisano u Metodama. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška od tri određivanja; n.o. nije određeno.

Zamjena asparaginske kiseline u asparagin na poziciji 381 rezultirala je smanjenim afinitetom za Tyr-Phe-NHOH (K_i = 0,55 μmol L^{-1}) i to za oko 14 puta u odnosu na "divlji tip". Slična vrijednost inhibicije (K_i = 0,49 μmol L^{-1}), tj. također smanjeni afinitet za navedeni inhibitor od oko 12 puta, dobivena je u slučaju zamjene histidina 578 u asparagin. Nešto veći utjecaj na afinitet prema hidroksamatnom inhibitoru imala je mutacija

metionina 579 u leucin, čime je vrijednost konstante inhibicije (K_i = 1,23 μmol L^{-1}) u odnosu na "divlji tip" povećana čak oko 30 puta. Najveći utjecaj na afinitet vezanja Tyr-Phe-NHOH inhibitora imala je zamjena visoko sačuvanog lizina 638 u leucin (tablica 4.7). Naime vrijednost konstante inhibicije (K_i = 2,26 μmol L^{-1}) povećana je čak 56 puta, što upućuje da ovaj lizinski ostatak, koji nije dio aktivnog mjesta enzima, ima direktnu ili indirektnu ulogu u vezanju liganda. Nadalje, inhibicija mutanta K638L hidroksamatnim inhibitorom Tyr-Gly-NHOH (K_i = 191,50 μmol L^{-1}) čak je 85 puta slabija nego uz Tyr-Phe-NHOH.

Dipeptidil-peptidaze tipa III pokazuju afinitet za peptide različite duljine, od najmanje tri do najviše deset aminokiselinskih ostataka. Kako bi ispitali da li visoko sačuvani aminokiselinski ostatak arginina 582, koji je dio aktivnog mjesta, sudjeluje u vezanju *C*-kraja peptidnog supstrata određena je konstanta inhibicije za mutant R582Q uz nekoliko peptida (tablica 4.8).

Tablica 4.8. Inhibicija ''divljeg tipa'' i R582Q mutiranog oblika DPP III hidroksamatnim inhibitorom i peptidima.

Inhibitor / peptid	K_i (μmol L^{-1}) za DPP III	
	''divlji tip''	R582Q
Tyr-Phe-NHOH	0,04 ± 0,00	0,10 ± 0,01
Leu-Trp-Met-Arg	5,96 ± 0,26	2,74 ± 0,45
Gly-Gly-Phe-Leu	187,51 ± 6,27	372,68 ± 2,52
Tyr-Pro-Phe-Phe-NH_2	4,96 ± 0,46	3,86 ± 0,43
Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	14,95 ± 1,04	128,12 ± 15,02
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	10,82 ± 0,94	> 113,52*

Reakcijska smjesa sadržavala je 17 mmol Tris-HCl pH 8,0, 15 μmol L^{-1} Arg_2-2NA, bez $CoCl_2$ i inhibitor tj. peptid. Koncentracija "divljeg tipa" iznosila je 24 nmol L^{-1} a mutanta R582Q 1,5 nmol L^{-1}. Određivanje K_i provedeno je kako je opisano u Metodama. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna pogreška od tri određivanja.
*K_i određena je za onu koncentraciju peptida koja je uzrokovala 30 %-tnu inhibiciju.

Inhibicija mutanta R582Q hidroksamatnim dipeptidnim inhibitorom Tyr-Phe-NHOH (K_i = 0,10 μmol L^{-1}) bila je neznatno slabija u odnosu na "divlji tip" (oko 2,4 puta). Razlika u

afinitetu "divljeg tipa" i mutanta R582Q nije uočena ni u slučaju dvaju ispitanih tetrapeptida Leu-Trp-Met-Arg i Gly-Gly-Phe-Leu, za koje je razlika u konstantama inhibicije bila manja od 2 puta. Isto tako, tetrapeptid endomorfin-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH_2) koji na *C*-kraju ne sadrži slobodnu COOH skupnu već NH_2, imao je gotovo jednak inhibitorni efekt na obje forme DPP III (K_i = 4,96 μmol L^{-1} za "divlji tip" odnosno K_i = 3,86 μmol L^{-1} za mutant R582Q). Međutim zamjena arginina u poziciji 582 s glutaminom, odrazila se na inhibitorni efekt dva pentapeptida koja na *C*-kraju imaju COOH skupinu. Tako je afinitet mutanta R582Q za Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (Met-enkefalin) (K_i = 128,12 μmol L^{-1}) u odnosu na "divlji tip" (K_i = 14,95 μmol L^{-1}) smanjen oko 8,5 puta. Utjecaj zamjene Arg582 na konstantu inhibicije bio je veći u slučaju Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (Leu-enkefalina): konstanta inhibicije za mutant R582Q (K_i > 113,52 μmol L^{-1}) u odnosu na "divlji tip" (K_i = 10,82 μmol L^{-1}) bila je povećana za najmanje 10,5 puta.

5. RASPRAVA

Prekomjerna ekspresija i značajke kvaščeve DPP III

Dipeptidil-peptidaze III do sada su izolirane i biokemijski okarakterizirane iz nekoliko prirodnih izvora, pretežno viših eukariota. No, iako porodica DPP III (porodica M49) ima predstavnike u nižim eukariotima kao i bakterijskim vrstama, gotovo ništa nije poznato upravo o značajkama njihovih predstavnika.

U ovom radu po prvi puta provedeno je kloniranje, te prekomjerna ekspresija gena za DPP III nižeg eukariota. DPP III kvasca *S. cerevisiae* heterologno je eksprimirana s privjeskom od 6 histidinskih ostataka na *C*-kraju proteina (His_6) ili bez njega. Postizanjem optimalnih uvjeta ekspresije (temperatura i konc. IPTG), postignut je prinos DPP III od 25 mg po 1 L bakterijske kulture, odnosno 100 mg proteina u slučaju DPP III-His_6. Usporedbom s podacima za rekombinantnu štakorsku DPP III, čiji je prinos 0,5 mg proteina iz 1 L kulture[97], te oko 3 mg za humanu DPP III odnosno 4 mg za DPP III-His_6[133], možemo zaključiti da je u slučaju rekombinantne DPP III kvasca postignut do sada najveći prinos prekomjerno eksprimiranog proteina DPP III u bakterijskom sustavu.

His_6 privjesak omogućava visoko specifično pročišćavanje proteina afinitetnom kromatografijom, a zbog svoje prirode uglavnom ne utječe na strukturu i funkciju proteina kojem je dodan. Obzirom da je katalitička efikasnost (k_{cat}/K_m) nekih metalopeptidaza dodatkom His_6 privjeska na *N*- ili *C*-kraju molekule, poput puromicin-osjetljive aminopeptidaze odnosno leukotrien A4 hidrolaze, bila znatno umanjena u odnosu na proteine bez privjeska (35 i 55 puta)[134,135], ispitan je utjecaj His_6 na hidrolitičku aktivnost kvaščeve DPP III. Prekomjernom ekspresijom DPP III s i bez His_6, pokazali smo da je uvođenje privjeska rezultiralo smanjenjem katalitičke efikasnosti u odnosu na nativni enzim za svega 1,9 puta (tablica 4.2), dok je usporedba sekundarnih struktura (slika 4.14) kao i temperaturne stabilnosti (slika 4.15 i 4.16) enzima, dokazala kako uvođenje privjeska od 6 ostataka histidina na *C*-kraj molekule ne dovodi do većih strukturalnih promjena i nema značajniji utjecaj na stabilnost kvaščeve DPP III, te smo daljnja istraživanja provodili upravo na DPP III-His_6.

Molekulska masa monomerne forme kvaščeve DPP III-His_6, slična je onim određenim za DPP III iz tkiva sisavaca (82-85 kDa)[7,84,89,90] od kojih je precizno određena masa za DPP III iz ljudskih eritrocita (82 500 ± 60 Da)[85] te za DPP III iz citosola štakorske jetre (82 845,6 Da)[88]. Vrijednost izoelektrične točke (pI) određene za DPP III-

His_6 je ~ 5,7, dok je teoretska ~ 6,0, što ukazuje da je kvaščev ortolog nešto bazičniji protein nego DPP III sisavaca, za koje su određene pI ~ 4,5[6,7,84,85,91]. Temperaturna stabilnost kvaščeve DPP III može se usporediti s vrijednostima dobivenim za rekombinantu ljudsku DPP III; denaturacija kvaščevog proteina započinje na 50 °C, pri čemu aktivnost enzima opada za ~ 52 %, dok je gubitak aktivnosti ljudskog enzima u istim uvjetima gotovo jednak (50 %)[132].

Optimalni uvjeti za aktivnost rekombinantne kvaščeve DPP III i DPP III-His_6 su pri pH 8,0 (kod niskih ionskih jakosti puferske smjese, I = 0,01) što je u skladu s ranije objavljenim radom Watanabe-a i sur.[5], koji su djelomično izolirali i biokemijski opisali nativnu DPP III iz kvasca *S. cerevisiae.* Dosadašnja istraživanja DPP III sisavaca pokazala su veću aktivnost u nešto lužnatijem području (pH 8,5-9)[7,84,88,90]. Kvaščeva DPP III-His_6 najbolje hidrolizira supstrat Arg_2-2NA kao i većina dosada ispitanih DPP III, a nešto slabije Ala_2-2NA (relativna aktivnost ~ 67 %) što je također u skladu s rezultatima Watanabe-a i sur.[5] Hidrolitička aktivnost kvaščeve DPP III-His_6 za Ala_2-2NA i Ala-Phe-2NA znatno je veća nego li u slučaju DPP III sisavaca[85].

Uspoređujući aktivnosti DPP III izoliranih iz prirodnih izvora i prekomjerno eksprimiranih, uočili smo da je specifična aktivnost kvaščeve rekombinantne DPP III (~ 2267 mj mg^{-1} uz Co^{2+}, te ~ 589 mj mg^{-1} bez Co^{2+}) u odnosu na DPP III iz humanih eritrocita manja za oko 9 puta[7], dok je za pročišćenu rekombinantnu humanu DPP III pokazana čak 20 puta veća specifična aktivnost (45,6 j mg^{-1})[133]. Aktivnost rekombinantne kvaščeve DPP III usporediva je s literaturnim podatkom za nativnu kvaščevu DPP III. U uvjetima bez iona kobalta specifična aktivnost DPP III veća je za oko 6 puta u odnosu na nativu DPP III (97 mj mg^{-1}), no valja napomenuti da manja aktivnost nativne DPP III može biti posljedica inhibcije supstratom (1 mmol L^{-1} u reakcijskoj smjesi), ali i nepotpunog pročišćavanja enzima[5]. Usporedbom kinetičkih parametara, K_m i k_{cat} za hidrolizu Arg_2-2NA pri optimalnim uvjetima, primjetili smo kako je K_m vrijednost kvaščeve DPP III bez His_6 (10,42 ± 1,06 μmol L^{-1}) jako slična K_m vrijednostima DPP III iz eritrocita (7,7 ± 0,53 μmol L^{-1})[7], rekombinantne humane DPP III (11,6 ± 1,4 μmol L^{-1})[132] te enzima iz hipofize goveda (8,3 μmol L^{-1})[83]. Nešto veća K_m opažena je za kvaščevu DPP III-His_6 (15,18 ± 3,03 μmol L^{-1}) u odnosu na rekombinantnu DPP III-His_6 čovjeka (6,51 ± 1,1 μmol L^{-1})[133]. Veće vrijednosti u odnosu na K_m kvaščeve DPP III opisane su za DPP III iz ljudske placente (38,2 μmol L^{-1})[84] i mozga koze (39 μmol L^{-1})[91], dok je značajno veća vrijednost objavljena

za DPP III iz jetre štakora (371 ± 56 μmol L^{-1})[95]. No, uspoređujući k_{cat} vrijednosti, uočavamo kako kvaščev enzim ima znatno slabiju katalitičku aktivnost od DPP III drugih izvora. Tako je k_{cat} za rekombinantnu DPP III čovjeka (21,8 ± 2,8 s^{-1})[132] čak ~ 65 puta veća u odnosu na DPP III kvasca (0,334 ± 0,022 s^{-1}), odnosno ~ 41 puta veća kada se uspoređuje humana i kvaščeva DPP III-His_6 (10,15 ± 1,2 s^{-1}, odnosno 0,249 ± 0,056 s^{-1})[133]. Budući da je aktivnost homologno eksprimirane DPP III-His_6 gotovo nepromijenjena u odnosu na heterologno eksprimirani enzim (tablica 4.2), možemo zaključiti da u slučaju kvaščeve DPP III uzrok slabije katalitičke aktivnosti ne dolazi zbog odsustva posttranslacijskih modifikacija proteina, koje su neophodne za pravilno funkcioniranje enzima.

Svojstvo svih metaloenzima, pa tako i DPP III, snažna je inhibicija spojevima koji kompleksiraju metalni ion aktivnog mjesta. Rezultati inhibicije DPP III-His_6 uz 1 mmol L^{-1} EDTA (~99 %) i 100 μmol L^{-1} 1,10-fenantrolin (~70 %) u jako dobrom su slaganju s literaturnim podacima inhibicije nativne DPP III kvasca (50 % inhibicije uz 28 μmol L^{-1} EDTA, odnosno uz 81 μmol L^{-1} 1,10-fenantrolin)[5]. Slične rezultate inhibicije s 1,10-fenantrolinom za DPP III čovjeka i štakora pokazali su Abramić i sur., no u slučaju EDTA čak ni veće koncentracije (10 mmol L^{-1}) nisu inhibirale oba enzima u potpunosti[85]. Zanimljivo je da inhibitori serinskih peptidaza nisu imali značajniji utjecaj na aktivnost kvaščeve DPP III. Iako su humana i štakorska DPP III inhibirane oko 40 % odnosno 30 % uz 1 mmol L^{-1} PMSF[85], kvaščeva DPP III nije bila inhibirana ni uz duplo veću koncentraciju ovog inhibitora serinskih proteaza.

Rekombinantna kvaščeva DPP III-His_6 značajno je aktivirana ionima kobalta. Naime, specifična aktivnost DPP III-His_6 uz prisustvo $CoCl_2$ (10-500 μmol L^{-1}) povećana je i do 5 puta, što je u skladu s rezultatima Watanabe-a i sur. za djelomično pročišćenu nativnu DPP III iz kvasca *S. cerevisiae* (4,3 puta veća aktivnost uz 500 μmol L^{-1} Co^{2+})[5]. Aktivacija ionima kobalta osim za kvaščevu DPP III, značajna je i za DPP III iz drugih izvora[85,89]. Poznato je da drugi metalni ioni poput cinka, nikla i kadmija snažno inhibiraju ove enzime. Za kvaščevu DPP III u ovom doktorskom radu pokazano da je 10 μmol L^{-1} $ZnCl_2$ inhibirao njenu aktivnost ~ 40 %, što je slično rezultatima inhibicije za ljudsku eritrocitnu DPP III (~ 30 μmol L^{-1} Zn-acetat uzrokuje 50 % inhibicije), dok se DPP III štakora pokazala znatno osjetljivijom, te je inhibicija od 50 % postignuta već uz 1,8 μmol L^{-1} Zn-acetata[85]. Holand i sur. na primjeru termolizina daju objašnjenje aktivacije, odnosno

inhibicije Zn-metalopeptidaza određenim metalnim ionima. Naime, povećana aktivnost termolizina kojemu je Zn^{2+} aktivnog mjesta zamijenjen s Co^{2+}, posljedica je pentaedarske koordinacije Co^{2+} što dovodi do povećane stabilizacije prijelaznog stanja[136]. Nadalje, u uvjetima suviška iona cinka, iz kristalne strukture uočili su da se cink veže na ostatak His231, koji je dio aktivnog mjesta, čime je narušena njegova struktura te onemogućeno pravilno pozicioniranje vode odnosno supstrata.

Zajednička karakteristika svih DPP III je snažna inhibicija tiolnim reagensima. Watanabe i sur.[5] pokazali su da je kvaščeva DPP III izuzetno osjetljiva na *para*-kloro-merkuribenzoat (*p*-CMB) koji već u submikromolarnim koncentracijama (0,32 μmol L^{-1}) uzrokuje 50 %-tnu inhibiciju. Rekombinantna kvaščeva DPP III-His_6 u istom iznosu inhibirana je uz 0,1 μmol L^{-1} *p*-HMB, što je u jako dobrom slaganju s navedenim literaturnim rezultatom. Zanimljiv je podatak da je ljudska eritrocitna DPP III u usporedbi s kvaščevom DPP-His_6 nešto manje osjetljiva (10 puta veća koncentracija potrebna za 50 % inhibicije), dok je štakorska DPP III inhibirana već nanomolarnim koncentracijama *p*-HMB-a[85]. Nasuprot tome, veća koncentracija DTDP reagensa (0,9 mmol L^{-1}) bila je potrebna za 50 %-tnu inhibiciju kvaščeve DPP III-His_6 u odnosu na ljudsku DPP III, dok se štakorska DPP III i u ovom slučaju pokazala znatno osjetljivijom. Za razliku od ljudske i štakorske DPP III, te nativne DPP III izolirane iz kvasca, DTNB i IAA nisu uopće inhibirali kvaščevu DPP III-His_6 čak ni u znatno većim koncentracijama[5,85]. Zanimljivo je da u porodici M49 ne nalazimo nijedan potpuno sačuvani ostatak cisteina da bi se njegovoj modifikaciji mogla pripisati inaktivacija ovih metalopeptidaza sulfhidrilnim reagensima.

Sve do sada opisane peptidaze porodice M49 isključivo su monomerni proteini. Analizom kvaščeve DPP sa i bez His_6 u nativnoj-PAGE kao i SDS-PAGE u nereducirajućim uvjetima, uočeno je postojanje dviju proteinskih vrpca koje odgovaraju monomernoj i dimernoj formi proteina (slika 4.6). Dimerni oblik kvaščeve DPP III-His_6 postojan je samo u nereducirajućim uvjetma, na temelju čega smo zaključili kako je intermolekularna veza između monomera DPP III disulfidne prirode. Pristupom usmjerene mutageneze, ustanovili smo da se dimerizacija kvaščeve DPP III-His_6 odvija stvaranjem disulfidnog mosta preko cisteinskog ostataka u poziciji 130 jer je elektroforetska analiza u nativnim uvjetima pokazala da mutant C130S postoji samo u monomernoj formi, a svi ostali mutanti sa pojedinačno zamijenjenim cisteinima na poziciji 113, 518, 626 i 639, postojali su u monomernom i dimernom obliku.

Cink-ovisna peptidaza, endotelin-konvertirajući enzim (ECE-1, α izoforma) štakora, također postoji u dimernoj formi koja je ostvarena disulfidnom vezom preko ostatka Cys412. Iako dimerizacija nije esencijalna za aktivnost, monomerni oblik ECE-1α C412S ima 8,3 puta manju katalitičku efikasnost od "divljeg tipa"[137]. Znatno manje razlike u katalitičkoj efikasnosti uočene su za kvaščev mutant C130S u odnosu na "divlji tip" (1,6 puta) (tablica 4.4). Ljudski ECE-1 postoji u 4 izoforme od kojih ECE-1a i 1b nalazimo na plazmatskoj membrani endotelijalnih stanica, a 1c i 1d u unutrašnjosti stanice. Dimerni oblik ECE-1 lokaliziran je samo na plazmatskoj membrani, no fiziološka uloga dimerizacije još uvijek nije potpuno jasna. Muller i sur. pretpostavili su da bi heterodimerizacija različitih izoformi mogla potaknuti translokaciju membranske izoforme u unutarstanične odjeljke, i time regulirati ekstracelularnu aktivnost ECE-1[138].

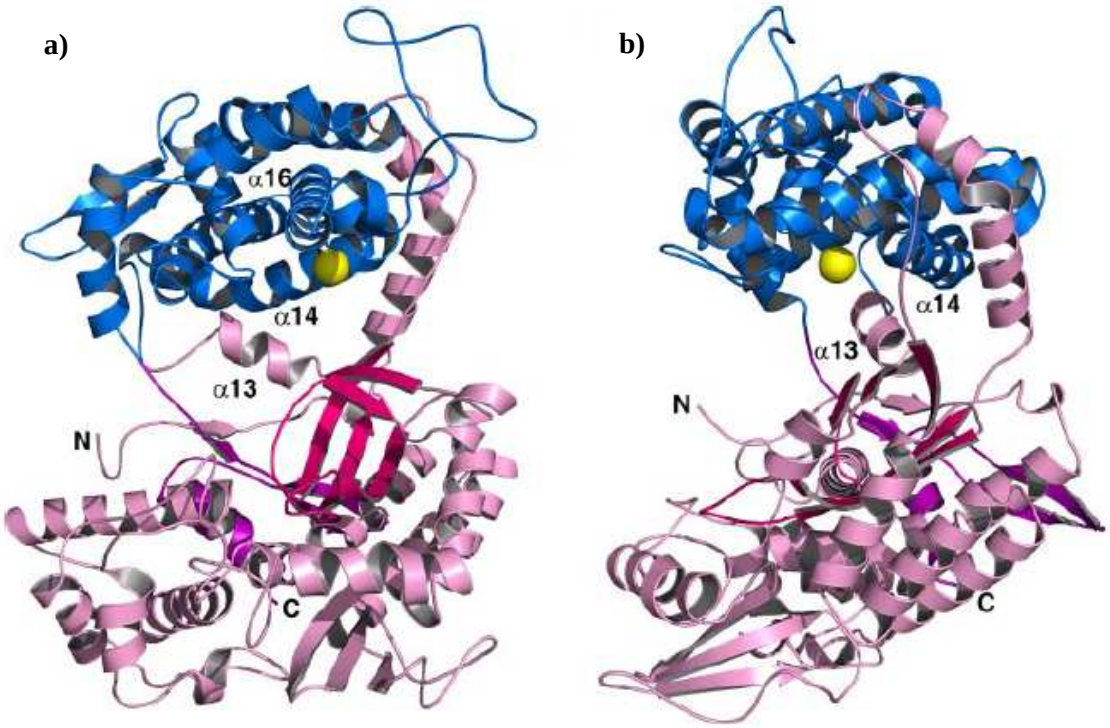
Poznato je da formiranje disulfidne veze, odnosno dimera može biti način regulacije fizioloških staničnih procesa kao i patoloških procesa uzrokovanih primjerice oksidativnim stresom. Dimerizacija DPP III (sa i bez His_6 privjeska) može biti posljedica oksidacije proteina tijekom procesa pročišćavanja enzima, kao i uvjeta pohranjivanja uzorka bez prisustva reducirajućeg sredstva, no ne utječe značajnije na aktivnost enzima što pokazuju i kinetički parametri određeni za monomerni i dimerni oblik (tablica 4.1). Osim toga, činjenica da je dimerni oblik za DPP III bez His_6 primjećen nešto kasnije nakon pročišćavanja, dok je dimer DPP III-His_6 utvrđen neposredno nakon postupka pročišćavanja govori u prilog tome da bi uvođenje His_6 privjeska moglo utjecati na proces dimerizacije. Iako dimerni oblik kvaščeve DPP III ne mora imati fiziološki značaj, potencijalnu *in vivo* ulogu dimerizacije kvaščevog enzima valja istražiti ispitivanjem oblika DPP III koji nalazimo u kvascu *S. cerevisiae* pri normalnim i primjerice uvjetima stresa, kao i provođenjem studija interakcije monomera i dimera DPP III.

Kristalna struktura kvaščeve DPP III

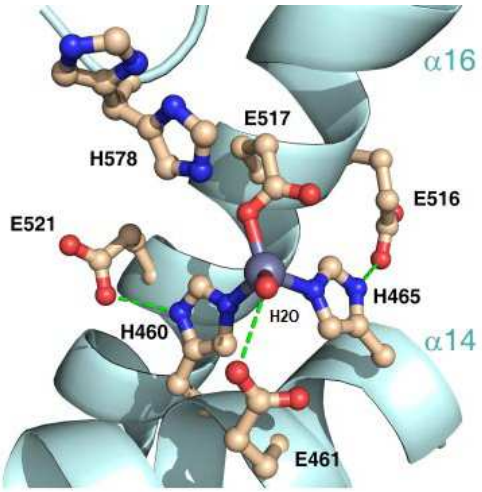
Prve poznate primarne strukture dipeptidil-peptidaza III bile su za enzime sisavaca. Studije Fukasawa-e i sur. pokazale su da konstituenti motiva HELLGH štakorske DPP III sudjeluju u koordinaciji iona cinka, odnosno da su nužni za katalitičku aktivnost enzima[95]. Abramić. i sur 2004 god. analizirali su primarne strukture tada poznatih članova porodice M49, te su uz HEXXGH uočili i sačuvani motiv EEXR(K)AE(D)[130]. Isti autori nešto kasnije studijama usmjerene mutageneze definiraju uloge dvaju visoko sačuvanih ostataka u katalitičkom mehanizmu humane DPP III[131,132]. No, o samoj prostornoj strukturi DPP III

nije bilo nikakvih saznanja. Osim toga, zbog izrazito male sličnosti primarne strukture DPP III s proteinima poznatih 3-D struktura, nije bilo moguće provesti homološko modeliranje. Nedostatak infomacije o strukturi proteina odnosno aktivnog mjesta, onemogućavalo je potpuno razumijevanje katalitičkog mehanizma ovih metalopeptidaza.

Jedan od glavnih ciljeva ove doktorske radnje, pripravom dovoljne količine aktivne kvaščeve DPP III, upravo je bilo omogućiti postavljanje kristalizacije. Tijekom izrade ove radnje kristaliziran je mutirani oblik C130S DPP III proteina, na temelju čega je po prvi puta razrješena 3-D struktura jedne metalopeptidaze porodice M49 (PDB ulaz: 3csk)[129]. Očekivano, prototipska struktura DPP III predstavljala je potpuno novi način smatanja proteina (eng. *fold*) odnosno trodimenzionalnu strukturu, te se nije uočila sličnost sa 3-D strukturom ni jedne do tada poznate (metalo)peptidaze. Kvaščeva DPP III je izdužena molekula dimenzija 75 × 60 × 50 Å koja se sastoji od dvije domene: gornje, većinom sastavljenje od α-zavojnica (ostaci 429-670), te donje domene koja je građena od α-zavojnica i β-ploča (slika 5.1). Donja domena ima produžetak u obliku α-zavojnice i duge petlje (ostaci 346-383) koji se nastavlja na gornju domenu. *C*-kraj proteina (ostaci 671-711) završava u donjoj domeni tvoreći dvije kratke β-ploče te α-zavojnicu. Domene su odvojene "rascijepom" u čijem je gornjem dijelu smješteno aktivno mjesto u kojem se nalazi ion cinka. Ligandi koji sudjeluju u koordinaciji metalnog iona su: His460, His465, Glu517 i molekula vode. Sačuvani motivi $H^{460}ELLGH^{465}$ i $E^{516}ECRAE^{521}$, dio su zavojnice α14 odnosno α16 (slika 5.2).



Slika 5.1. Kristalna struktura kvaščeve DPP III (PDB ulaz: 3csk). a) pogled na strukturu sprijeda. b) pogled na strukturu sa strane. Gornja domena DPP III koju pretežno čine α-zavojnice, obojana je plavom, dok je donja domena obojana ružičastom (α-zavojnice), odnosno ljubičastom bojom (β-ploče). Sa stražnje strane nalazi se zavojnica α13 koja povezuje gornju i donju domenu. S prednje strane, domene su razdvojene procjepom širine 40 Å i visine 25 Å. Katalitički ion cinka označen je žutom kuglom. Naznačeni su *N*- i *C*-kraj polipeptidnog lanca, kao i zavojnice sa sačuvanim motivima (α14 i α16). Preuzeto iz (129).



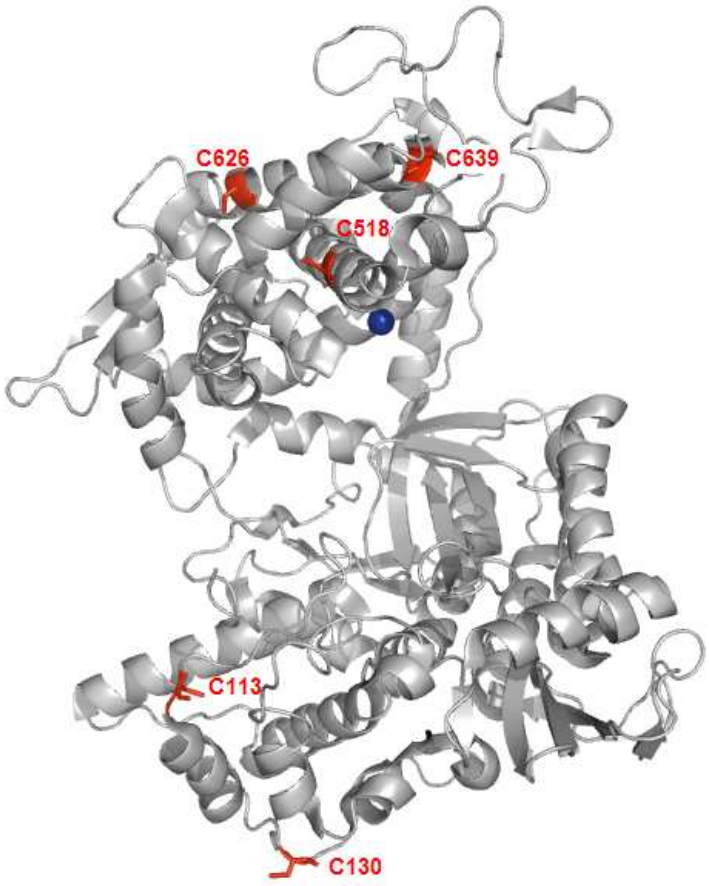
Slika 5.2. Koordinacija iona cinka aktivnog mjesta DPP III kvasca. Preuzeto iz (129).

Molekularna osnova tiolne osjetljivosti kvaščeve DPP III

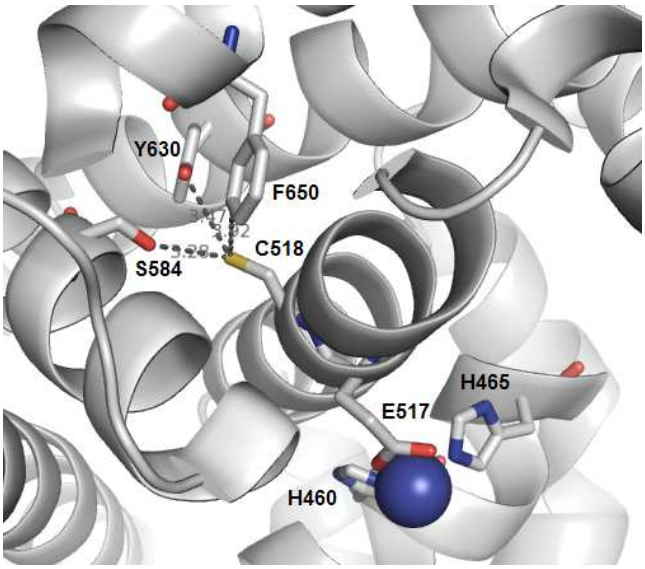
Ispitivanje utjecaja sulfhidrilnih reagenasa na aktivnost DPP III-His_6 dovelo je do zaključka da je modifikacija cisteinskog ostatka u poziciji 639 odgovorna za brzu inaktivaciju enzima niskim koncentracijama *p*-HMB (slika 4.19). Čak je 100 puta veća koncentracija reagensa u odnosu na "divlji tip" bila potrebna za inhibiciju mutanta C639S. No, opažanje da je mutant C518S nešto otporniji na inhibiciju *p*-HMB-om u odnosu na "divlji tip" i mutante C113S, C130S i C626S (slika 4.19) ukazuje da i modifkacija Cys518 također dopridonosi inaktivaciji kvaščevog enzima. Nadalje, rezultati ispitivanja aromatskog disulfida DTDP pokazali su da su ostaci cisteina u pozicijama 518 i 639 reaktivniji nego ostali, te da je njihova modifikacija odgovorna za inaktivaciju "divljeg tipa". Inhibicija "divljeg tipa" od 62 % nakon 15 min inkubacije s DTDP posljedica je modifikacije oko 2 SH-grupe (slika 4.21). U istim uvjetima, mutirani oblici C639S i C518S gube manje od 10 % aktivnosti, što je posljedica nedostatka reaktivnih cisteinskih ostataka u tim proteinima.

Ispitivanje brzine inaktivacije humane DPP III niskim koncentracijama *p*-HMB reagensa pokazalo je jednaku reaktivnost osjetljivih –SH skupina. Nasuprot tome, za štakorsku DPP III pokazano je da posjeduje dvije vrste –SH reaktivnih skupina: brže i sporije reagirajuće[98]. Zanimljivo, Li i sur. studijama usmjerene mutageneze pokazali su da je, od ukupno 7 cisteina štakorske DPP III, jedino cisteinski ostatak u poziciji 176 odgovoran za inhibiciju sa tiolnim reagensima *p*-CMB-om i NEM-om[97]. U strukturi kvaščeve DPP III ne nalazimo cisteinski ostatak koji bi odgovarao Cys176 u štakorskoj. Nadalje, iz kristalne strukture kvaščeve DPP III (slika 5.3) vidljivo je kako nijedan od 5 cisteinskih ostataka nije dio aktivnog mjesta, a kinetička karakterizacija mutiranih oblika za zamijenjenim reaktivnim cisteinima Cys518 i Cys639, potvdila je kako ova dva ostatka nemaju ulogu u katalitičkom mehanizmu (tablica 4.4).

Ipak, uvidom u kristalnu strukturu kvaščeve DPP III postalo je jasno kako modifikacija tiolnih grupa Cys518 i Cys639 može utjecati na aktivnost kvaščeve DPP III. Tako je Cys518 smješten u α-zavojnici odmah uz Glu517 (α16), ostatak koji direktno sudjeluje u koordinaciji iona cinka aktivnog mjesta (slika 5.4). Modifikacijom ovog cisteina može se narušiti sekundarna struktura α-zavojnice, a time i struktura aktivnog mjesta proteina.

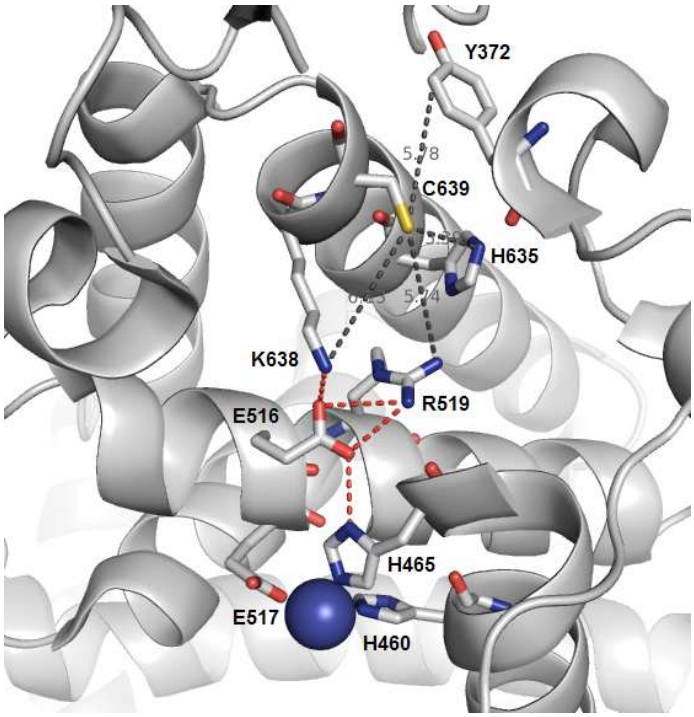


Slika 5.3. Kristalna struktura kvaščeve DPP III. Ion cinka je označen kao plava kugla, dok su cisteinski ostaci prikazani modelom crvenih štapića. Za prikaz strukture, kao i svih ostalih struktura u ovom dijelu radnje korišten je PyMOL program (www.pymol.org)[74].



Slika 5.4. Prikaz okoline Cys518 u kristalnoj strukturi kvaščeve DPP III. Ion cinka je označen kao plava kugla, dok su aminokiselinski ostaci prikazani modelom štapića. Crnim isprekidnim linijama označene su udaljenosti između ostataka.

Ostatak cisteina 639 smješten je u gornjoj domeni proteina, izvan aktivnog mjesta. Ovaj cistein udaljen je 5,7 Å od Arg519, visoko sačuvanog ostatka iz motiva $E^{516}ECRAE^{521}$ koji ostvaruje ionsku vezu sa Glu516. Iz kristalne strukture vidimo da Glu516 ostvaruje vodikovu vezu sa ligandom cinka His465, što vjerovatno stabilizira koordinaciju metalnog iona. Nadalje, Cys639 nalazi se na udaljenosti od 6,13 Å od Lys638, koji također ostvaruje ionsku vezu sa Glu516 (slika 5.5). Izrazito brza inaktivacija DPP III enzima uslijed modifikacije voluminoznim (eng. *bulky*) reagensom poput *p*-HMB-a može se objasniti narušavanjem veza kojima Arg519 i Lys638 stabiliziraju Glu516 čime je direktno narušena struktura aktivnog mjesta enzima. Da narušavanje strukture aktivnog mjesta modifikacijom Cys639 nije značajnije utjecalo na cjelokupnu strukturu proteina dokazano je i eksperimentalno mjerenjem CD spektara kao i temperaturne stabilnosti DPP III (slika 4.20).



Slika 5.5. Prikaz okoline Cys639 u kristalnoj strukturi kvaščeve DPP III. Ion cinka je označen kao plava kugla, dok su aminokiselinski ostaci prikazani modelom štapića. Crnim isprekidnim linijama označene su udaljenosti između ostataka, a crvenom isprekidanom linijom označene su ionske interakcije.

Veću reaktivnost Cys639 u odnosu na Cys518 objasnili smo analizirajući okolinu navedenih cisteinskih ostataka. Naime, jedan od glavnih faktora koji određuju reaktivnost cisteina je i disocijacija -SH grupe u tiolatni anion. Prema Britto-u i sur. disocijacija, kao i nastali reaktivniji tiolatni anion, stabilizirani su interakcijama s potpuno ili djelomično

pozitivno nabijenim ostacima koji se od cisteina nalaze na udaljenosti unutar 6,5 Å[139]. Iz slike 5.5 vidimo da je Cys639 unutar navedene udaljenosti okružen s Arg519, Lys638 i His635 čiji bi pozitivniji naboj mogao stabilizirati tiolatni anion. Nasuprot tome Cys518 okružen je ostacima Ser584, Tyr630 i Phe650 (slika 5.4). Zanimljivo, mutirani oblik K638L bio je osjetljiviji na inhibiciju *p*-HMB-om: već 50 nmol L^{-1} *p*-HMB inhibirao je enzim čak 95 %. Osim stabilizacije tiolatnog iona, na reaktivnost cisteinskih ostataka u proteinima općenito utječe i njihova izloženost otapalu. I u tom pogledu je Cys639 u povoljnijoj poziciji od Cys518 jer se nalazi jako blizu površine proteina, zaštićen samo ostatkom Tyr372 (slika 5.5).

Novija istraživanja pokazala su važnost modifikacija cisteina (eng. *thiol-based redox switch*) za reguliranje funkcija proteina uključenih u esencijalne biološke procese i signalne puteve. Reaktivni tiolatni anion (RS^-) podložan je brojnim oksidativnim modifikacijama pa tako mogu nastati sulfenična (SOH), sulfinična (SO_2H) i sulfonična kiselina (SO_3H), od kojih je samo prvi oblik moguće reducirati uz GSH ili DTT[140].

Ispitujući utjecaj DTT-a na aktivnost kvaščeve DPP III-His_6, pokazali smo da niske koncentracije aktiviraju "divlji tip" enzima, no zanimljivo je da smo istu razinu aktivacije primjetili i za sve cisteinske mutante DPP III. Poznato je da su neke metalopeptidaze poput timet-oligopeptidaze (TOP) aktivirane do 8 puta u prisutstvu reducirajućeg sredstva DTT-a ili 2-ME. Naime, cisteinski ostaci tvore intermolekularne disulfidne veze, a posljedica je nastajanje multimernih formi. Upravo suprotno nego kod većine proteina, redukcijom multimera u monomer postiže se aktivacija TOP[141]. Iako smo uvidom u strukturu kvaščeve DPP III zaključili da za to postoji mala vjerovatnost, ipak ne možemo potpuno isključiti mogućnost nastajanja intramolekularne disulfidne veze čijom bi se redukcijom povećala aktivnost enzima. Veće koncentracije DTT-a inaktivirale su "divlji tip" kao i mutirane cisteinske oblike DPP III vjerovatno zbog stvaranja slabog kompleksa DTT-a i Zn^{2+}, metalnog iona izrazito tiofilne prirode[142].

Ispitivanjem fizioloških tiolnih spojeva poput reduciranog (GSH) i oksidiranog glutationa (GSSG) nismo uočili razlike između "divljeg tipa" i mutiranih oblika DPP III: niže koncentracije GSH i GSSG aktivirale su enzim, dok je povećanje koncentracije GSSG dovelo do gotovo potpune inhibicije enzima (slika 4.23). GSH (γ-Glu-Cys-Gly) je glavni niskomolekularni reducens u citosolu eukariotskih organizama, čija je koncentracija (1-10 mmol L^{-1}) pri normalnim uvjetima gotovo oko 3000 puta veća u odnosu na GSSG[143].

Glavna uloga GSH je da tvori miješane disulfide sa tiolnim grupama proteina kako bi ih zaštitio od ireverzibilnih modifikacija. Obzirom na reaktivne cisteine kvaščeve DPP III, pretpostavljamo da bi aktivacija reducirajućim sredstvima DTT ili GSH mogla biti zbog redukcije reverzibilno oksidiranih cisteina. Reaktivni SOH oblik može reagirati dalje čime nastaju stabilne, također reverzibilne modifikacije poput S-glutationilacije djelovanjem GSSG ili S-nitrozilacije djelovanjem NO (SNO)[140], što bi moglo objasniti inaktivaciju DPP III. Ipak, potrebno je naglasiti da su koncentracije GSSG (2 mmol L^{-1}) korištene u ovom radu daleko veće nego fiziološke u *in vivo* sustavima. Vodikov peroksid također je gotovo jednako inhibirao "divlji tip" kao i mutirane oblike uključujući i C518S i C639S. Kao i u slučaju štakorske DPP III[98] reaktivacija kvaščeve DPP III do gotovo 90 % početne aktivnosti, postignuta je dodatkom GSH, međutim nakon dulje oksidacije sa H_2O_2 više nije bila moguća reaktivacija enzima. Moguće je da je upravo dulja oksidacija kvaščeve DPP III sa H_2O_2 uzrokovala ireverzibilne modifikacije cisteinskih oststaka u poziciji 518 i/ili 639.

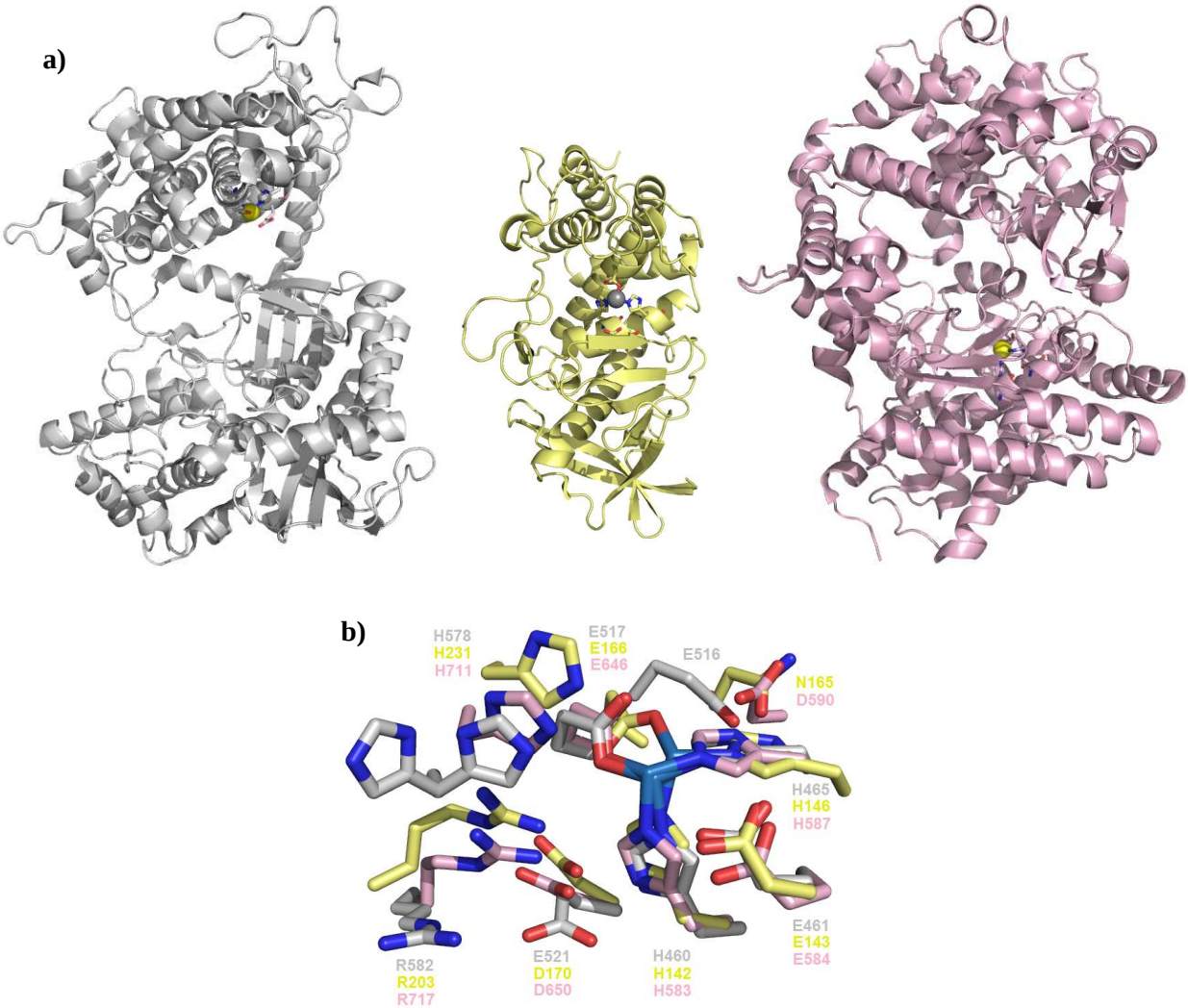
Opažanje da "divlji tip" DPP III-His_6 kao i pojedinačni cisteinski mutanti na pozicijama 113, 130, 518, 626 i 639 pokazuju gotovo istu osjetljivost na ispitane tiolne spojeve, upućuje da bi aktivacija odnosno inhibicija ispitanim spojevima mogla biti rezultat istovremene modifikacije dvaju ili više cisteinskih ostataka. U prilog tome idu i rezultati ispitivanja osjetljivosti DPP III na sulfhidrilne reagense *p*-HMB i DTDP, koji su jasno ukazali na uloge Cys518 i Cys639 u inaktivaciji enzima. Nadalje, primjer inzulin-degradirajućeg enzima (IDE), ubikvitarne cink-metalopeptidaze, pokazuje složenost regulacije aktivnosti (metalo)enzima putem modifikacije cisteinskih ostataka. Iako se prvobitno smatralo da je Cys178 odgovoran za inakivaciju tiolnim reagensima[144], pokazano je upravo suprotno: modifikacija ovog ostataka ima za cilj zaštitu Cys110, koji je ključan za inaktivaciju enzima[145]. U cilju razjašnjenja utjecaja fizioloških tiolnih spojeva na aktivnost, slijedeći korak svakako bi bio priprema dvostrukih cisteinskih mutanata kvaščeve DPP III.

Mutacijska analiza i mehanizam katalize kvaščeve DPP III

Kristalna struktura kvaščeve DPP III predstavlja prototipsku strukturu peptidaza porodice M49[129], no treba naglasiti da je razjašnjena struktura "praznog" enzima (eng. *ligand free*) (slika 5.1). U nedostatku strukturnih podataka o vezanju supstrata i/ili inhibitora, pristup odabira aminokiselinskih ostataka čiju smo ulogu u vezanju supstrata i

mehanizmu katalize htjeli ispitati, temeljili smo na rezultatima bioinformatičke analize (slika 4.24) i kristalne strukture kvaščeve DPP III (slika 4.25).

DPP III kvasca strukturno ne nalikuje ni jednoj poznatoj cink-peptidazi. No, superpozicijom aktivnog mjesta DPP III (slika 5.2) sa aktivnim mjestom termolizina (EC 3.4.24.27) i neprilizina (EC 3.4.24.11) koje odlikuje HEXXH motiv aktivnog mjesta (slika 5.6a), uočena je gotovo identična koordinacija iona cinka, kao i nekoliko dodatnih potpuno očuvanih aminokiselinskih ostataka: Glu461, His578 i Arg582 (slika 5.6b). Upravo sličnost u strukturi aktivnog mjesta ukazuje da bi mehanizam hidrolize peptida s DPP III mogao biti sličan mehanizmu opće bazne katalize cink-peptidaza poput termolizina, neprilizina i karboksipeptidaze A, za koju je detaljnije opisan mehanizam u Literaturnom pregledu ove radnje[146].



Slika 5.6. Kristalne strukture cink metalopeptidaza. a) kvaščeva DPP III (PDB ulaz: 3csk) prikazana sivo; **termolizin (PDB ulaz: 1tmn)** žuto; **neprilizin (PDB ulaz: 1dmt)** ružičasto**. b) Superpozicija ostataka aktivnog mjesta DPP III, termolizina i neprilizina.**

Kod kiselo-bazne (opće bazne) katalize primjerice termolizina[147], supstrat se smješta u aktivno mjesto enzima na način da istiskuje molekulu vode vezanu na ion cinka u smjeru Glu143. Pri tome se povećava nukleofilnost molekule vode, koja zatim napada karbonilni ugljik peptidne veze koja se cijepa. Iz kristalne strukture kvaščeve DPP III (slika 5.2) vidljivo je da je molekula vode vodikovom vezom povezana sa Glu461, koja upravo odgovara Glu143 termolizina odnosno Glu584 neprilizina (slika 5.6b). Kristalna struktura termolizina u kompleksu sa izuzetno snažnim fosfonamidatnim inhibitorom ZF^{P}LA (Z-Phe^{P}-L-Leu-L-Ala, K_i = 0,068 nmol L^{-1}) otkriva udaljenosti koje potkrijepljuju predloženi mehanizam u kojem Glu143 preuzima proton s molekule vode, te ga kasnije prenosi na odlazeću amino skupinu peptidne veze koja se cijepa[148]. Esencijalna uloga ostatka glutaminske kiseline u katalizi potvrđena je kod mnogih metalopeptidaza: tako zamjena glutaminske kiseline (Glu584) u valin ili asparaginsku kiselinu uzrokuje potpuni gubitak aktivnosti kod neprilizina[149], aminopeptidaze A (Glu386)[150] i astacina (Glu93)[151]. Posljedica zamjene Glu451 štakorske DPP III, također je bila potpuna inaktivacija enzima[95]. Iako je ovaj rezultat govorio u prilog tome da Glu ima esencijalnu ulogu u katalitičkom mehanizmu dipeptidil-peptidaza III (kao i kod ostalih navedenih enzima), nedostajali su podaci o iznosu preostale aktivnosti i kinetičkim parametrima mutanta sa zamijenjenim Glu iz HEXXGH motiva enzima porodice M49. Upravo su u ovom doktorskom radu, zahvaljujući visokim prinosima rekombinantnog proteina, po prvi puta određeni kinetički parametri za mutirani oblik kvaščeve DPP III sa zamijenjenim Glu u poziciji 461. Značajno smanjena katalitička efikasnost (k_{cat}/K_m) mutanta E461Q od čak 25 000 puta, prvenstveno zbog smanjenja k_{cat} (tablica 4.5), potvrđuje važnost ovog ostatka glutaminske kiseline za katalitički mehanizam. Nadalje, promjena slobodne energije ΔG uzrokovana mutacijom Glu 461 u Gln od 6,01 kcal mol^{-1} govori u prilog postojanja odnosno gubitka izrazito jake vodikove veze. Obzirom da nismo opazili značajnije promjene u sekundarnoj strukturi (slika 4.26), možemo zaključiti da dramatično smanjena hidrolitička aktivnost mutanta E461Q nije uzrokovana narušavanjem strukture aktivnog mjesta već važnom ulogom (nedostajaće) glutaminske kiseline iz HEXXGH motiva u mehanizmu enzimske katalize metalopeptidaza porodice M49. Pretpostavljamo da je Glu461 bitna za aktivaciju molekule vode za nukleofilni napad. Važno je napomenuti da karboksiamidna grupa Gln u koji je zamijenjena Glu, još uvijek može olakšati polarizaciju molekule vode, te se još veća razlika u katalitičkim parametrima može očekivati zamjenom Glu461 u pimjerice Ala, kako je to pokazano u slučaju puromicin-osjetljive aminopeptidaze[134].

Prijelazno stanje koje nastaje nakon nukleofilnog napada vode na karbonilni ugljik peptidne veze, karakterizira negativni naboj. Upravo je stabilizacija tog naboja jedan od ključnih faktora mehanizma katalize metalopeptidaza. U termolizinu, osim iona cinka, dva ostatka aktivnog mjesta His231 i Tyr157, imaju ulogu u stabilizaciji prijelaznog stanja[146]. Kod kvaščeve DPP III nalazimo His578, potpuno sačuvani ostatak porodice M49 (5 regija, slika 4.24), koji se nalazi vrlo blizu metalnog iona aktivnog centra. Iz usporedbe struktura (slika 5.6b) uočeno je da His231 termolizina, odnosno His711 neprilizina odgovara upravo His kvaščeve DPP III u poziciji 578. Zamjenom His578 u asparagin smanjena je katalitička efikasnost DPP III (oko 120 puta), što odgovara promjeni ΔG od 2,84 kcal mol^{-1} (tablica 4.5). Za termolizinu sličnu neutralnu proteazu iz *B. stearothermophilus* (NPr), pokazano je da mutirani oblici H231F i H231A imaju smanjenu katalitičku efikasnost od oko 420 puta odnosno 500 puta, što odgovara $\Delta\Delta G$ od 3,7-3,8 kcal mol^{-1} [152]. Zamjena His711 u neprilizinu (H711Q) uzrokovala je smanjenje katalitičke efikasnosti od oko 40 puta, te promjenu ΔG od 2,2 kcal mol^{-1} [153], a kristalna struktura neprilizina u kompleksu sa snažnim inhibitorom fosforamidonom pokazala je postojanje vodikove veze His711 sa kisikom inhibitora vezanim na cink[70]. Činjenica da su opažene promjene u katalitičkoj efikasnosti kvaščevog enzima prvenstveno posljedica smanjenja k_{cat}, te da je za strukturno ekvivalentni ostatak histidina u termolizinu i neprilizinu dokazana uloga u stabilizaciji prijelaznog stanja, navode nas na pretpostavku da i His578 u mehanizmu kvaščeve DPP III sudjeluje u stabilizaciji tetraedarskog prijelaznog stanja formiranjem vodikove veze. U prilog tome idu i tek nedavno objavljeni rezultati Fukasawa-e i sur. o utjecaju zamjene His568 u štakorskoj DPP III (H568Y), koja je za rezultat imala oko 245 puta manju katalitičku efikasnost ($\Delta\Delta G$ od 3,26 kcal mol^{-1})[154]. Najnovija istraživanja iz našeg laboratorija, koja su provedena na ljudskoj DPP III, pokazala su do sada najveći negativni utjecaj zamjene tog histidinskog ostatka - značajno smanjenje katalitičke moći u slučaju mutacije H568N (> 1900 puta) prvenstveno zbog promjene u k_{cat}, odgovaralo je gubitku vezne energije ΔG od 4,48 kcal mol^{-1} što bi moglo odražavati gubitak jake vodikove veze koja stabilizira prijelazno stanje[155].

Kako je već spomenuto, osim His231, u stabilizaciji prijelaznog stanja termolizina sudjeluje i Tyr157. Obzirom da još nije bila poznata 3-D struktura kvaščeve DPP III, a rezultati su govorili u prilog uloge Tyr318 u katalitičkom mehanizmu humane DPP III[131], zanimao nas je utjecaj zamjene tog evolucijski sačuvanog tirozinskog ostataka kod kvaščevog ortologa. Nešto veće smanjenje katalitičke efikasnosti Y327F kvaščeve DPP III

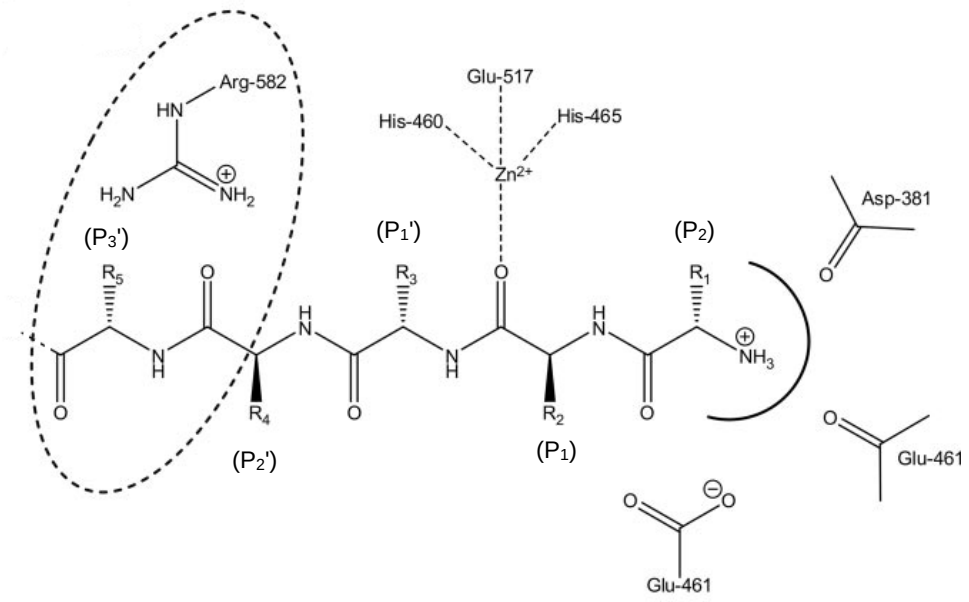
(oko 175 puta) opazili smo u odnosu na istovjetnu mutaciju kod humanog enzima (125 puta smanjena vrijednost k_{cat}/K_m). Još izraženiji negativni efekt (k_{cat}/K_m manja oko 460 puta) dobiven je potpunim uklanjanjem aromatskog aminokiselinskog ostatka u poziciji 327 kvaščevog enzima (Y327A), što je dovelo do promjene ΔG od 3,63 kcal mol^{-1}, dok je zamjena u fenilalanin rezultirala nešto manjom promjenom u iznosu od 3,06 kcal mol^{-1}. Naši rezultati u skladu su sa podacima autora koji su dokazali ili pretpostavili ulogu Tyr u stabilizaciji prijelaznog stanja nekih cink-peptidaza. Tako je utjecaj mutacije Y157F na k_{cat}/K_m (210 puta manja) i $\Delta\Delta G$ (3,17 kcal mol^{-1}) termolizina[156] gotovo jednak onome za Y327F kvaščeve DPP III.

Za razliku od termolizina, u neurolizinu i timet-oligopeptidazi ne nalazimo ostatak histidina koji bi odgovarao His231 termolizina. No, paralelna studija ova dva enzima, pokazala je da bi visoko sačuvani ostaci tirozina smješteni u blizini metalnog iona (odgovaraju poziciji His231 termolizina) mogli imati ulogu u stabilizaciji prijelaznog stanja[157]. Tako je zamjenom ostatka tirozina u fenilalanin na poziciji 613 odnosno 612, smanjenje katalitičke moći bilo slično kao u slučaju kvaščeve DPP III (oko 140 odnosno 170 puta). Zanimljivo, kada su ostaci tirozina zamijenjeni alaninom, katalitička efikasnost ovih dvaju enzima drastično je umanjena, čak do 10 000 puta[157]. Iako ne tako značajno, i kod kvaščeve DPP III smanjenje k_{cat}/K_m za Y327A mutirani oblik bilo je veće u odnosu na Y327F, što bi ukazivalo da je, osim hidroksilne grupe, za katalizu važna i aromatska skupina u toj poziciji primarne strukture. Također, aktivno mjesto aminopeptidaze A i leukotrien A_4 hidrolaze, karakterizira sačuvani ostatak tirozina koji je ekvivalent His231 termolizina, a njegovu ulogu u stabilizaciji prijelaznog stanja potvrđuje smanjenje katalitičke moći (850 odnosno 100 puta) kao i smanjeni afinitet vezanja mutiranih oblika ovih enzima za analoge prijelaznog stanja[135,158].

Iako iz ovih usporedbi možemo pretpostaviti da ostaci His578 i Tyr327 sudjeluju u stabilizaciji prijelaznog stanja kvaščeve DPP III, zanimljivo je da za razliku od strukturnog ekvivalenta histidinskog ostataka (His578) u strukturi aktivnog mjesta kvaščeve DPP III ne nalazimo ostatak koji bi odgovarao Tyr157 termolizina. Štoviše, iz kristalne strukture DPP III vidljivo je kako se ostatak Tyr327 nalazi na "dnu" donje domene proteina, udaljen čak 21,4 Å od iona cinka aktivnog mjesta. Ova udaljenost daleko je veća od udaljenosti kod nekih prethodno navedenih primjera u kojima je opisana uloga tirozina. No, već prvim promatranjem novootkrivene 3-D strukture DPP III došli smo do zaključka da se radi o

relativno otvorenoj strukturi enzima (slika 5.1). Nadalje, tzv. TLS analizom (eng. *Translation Libration Screw-motion; TLS)* predviđena je velika fleksibilnost gornje i donje domene proteina[129], koja bi mogla dovesti do otvaranja i zatvaranja aktivnog mjesta, a time i približavanja tirozina 327 aktivnom centru. Sličan primjer nalazimo i kod serinske peptidaze, prolil-endopeptidaze. Prilikom vezanja supstrata dolazi do značajne konformacijske promjene proteina iz "otvorene" u "zatvorenu" strukturu, što za posljedicu ima formiranje konačnog oblika aktivnog mjesta te hidrolizu supstrata[159]. Važno je napomenuti da bi tek ispitivanje inhibitora - analoga prijelaznog stanja, kao i kristalna struktura njihovog kompleksa s DPP III, uz navedene rezultate, nedvojbeno potvrdilo ulogu ispitanih ostataka u stabilizaciji prijelaznog stanja.

Sličnost strukture aktivnog mjesta kvaščeve DPP III s termolizinom i neprilizinom, omogućila je modeliranje vezanja peptidnog supstrata u aktivno mjesto (slika 5.7)[129]. U dobivenom modelu karbonilni kisik veze koja se cijepa vezan je za ion cinka, a pozitivno nabijena amino-grupa na *N*-kraju peptidnog supstrata stabilizirana je karbonilnim grupama Glu461 i Asp381 iz glavnog lanca, kao i negativno nabijenim bočnim lancem Glu461.



Slika 5.7. Shematski prikaz vezanja supstrata. Preuzeto iz (129) i modificirano.

Kinetičkim mjerenjima pokazali smo da Glu461 ima glavnu ulogu u katalitičkom mehanizmu kvaščevog, a pretpostavljamo i svih ostalih DPP III enzima. Osim drastične promjene katalitičke efikasnosti E461Q mutiranog oblika koja je prvenstveno posljedica smanjenja k_{cat} (tablica 4.5), zamijećeno je i povećanje K_m vrijednosti oko 2,8 puta što

upućuje na potencijalnu ulogu Glu461 u vezanju supstrata. Iako K_m ne možemo uzeti kao pravu mjeru afiniteta prema supstratu, smanjenje K_i mutiranog oblika E461Q za peptidni supstrat valorfin od oko 25 puta u odnosu na "divlji tip" DPP III (tablica 4.6), ipak govori u prilog tome da ova glutaminska kiselina sudjeluje i u vezanju supstrata.

Dipeptidni hidroksamatni inhibitori koji predstavljaju analoge supstrata, do sada su pokazali veliki afinitet kao i visoku selektivnost prema DPP III enzimima. Slobodna amino-grupa, interakcija bočnih aromatskih skupina sa pretpostavljenim hidrofobnim S_1 i S_2 veznim podmjestima enzima, kao i keliranje metalnog iona hidroksamatnom grupom, čine Tyr-Phe-NHOH jednim od najjačih do sada ispitanih inhibitora DPP III[132,160]. U slučaju kvaščeve DPP III, inhibitorni potencijal hidroksamatnih inhibitora Tyr-Phe-NHOH i Tyr-Gly-NHOH bio je nešto veći negoli za humani enzim[132]. Zamjenom Phe u Gly u P_1 poziciji inhibitora, konstanta inhibicije K_i za "divlji tip" kvaščeve DPP III povećana je za čak 103 puta, što kao i kod humane DPP III ukazuje na važnost aminokiselinskog ostatka u P_1 poziciji za vezanje ovog tipa inhibitora (tablica 4.7).

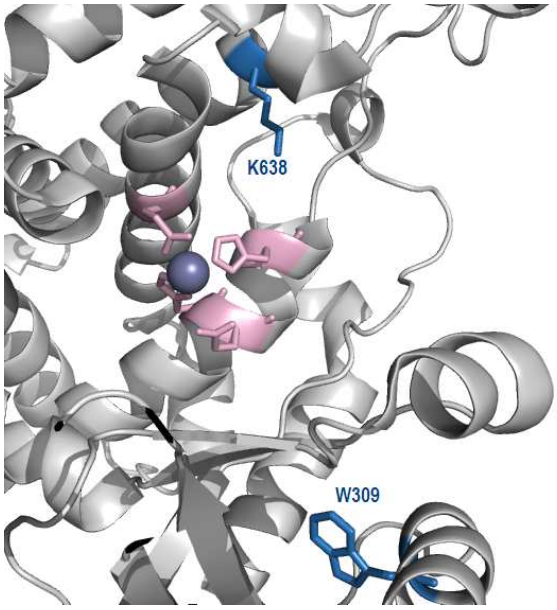
Zamjenom asparaginske kiseline u poziciji 381, za koju je modeliranje ukazalo da sudjeluje u vezanju *N*-kraja supstrata, u asparagin smanjena je katalitička moć enzima za oko 29 puta, s tim da nije uočena značajnija promjena konstante K_m (tablica 4.5). No, povećanje K_i vrijednosti za Tyr-Phe-NHOH od oko 14 puta u odnosu na "divlji tip", u slaganju je s rezultatom modeliranja koji upućuje da ovaj ostatak također sudjeluje u vezanju (amino-kraja) liganda (inhibitora, odnosno supstrata). Međutim, naši rezultati upućuju na važnost bočnog lanca, a ne karbonilne grupe iz glavnog lanca, Asp381 u ostvarivanju te interakcije.

Iz usporedbe aktivnih mjesta DPP III, termolizina i neprilizina (slika 5.6b), vidljivo je da Arg582 iz DPP III po poziciji najviše odgovara Arg203 termolizina odnosno Arg717 neprilizina, za koje je pretpostavljeno da sudjeluju u vezanju P_1' ostatka supstrata[161]. Međutim, modeliranje kompleksa kvaščeve DPP III i supstrata Ala_8 upućuje da ovaj visoko sačuvani ostatak arginina sudjeluje u vezanju karbonilne grupe četvrtog aminokiselinskog ostatka ili pak karboksilne grupe *C*-kraja tetrapeptidnog supstrata (pozicija P_2'), no nije isključena mogućnost da sudjeluje čak i u vezanju istih grupa pentapeptidnih supstrata (pozicija P_3') (slika 5.7)[129]. Obzirom na tu pretpostavku, iznenađujući je rezultat hidrolize sintetskog supstrata Arg_2-2NA mutiranim oblikom R582Q. Naime, afinitet za ovaj analog tripeptida povećan je oko 6 puta, a katalitička

efikasnost R582Q mutanta DPP III za oko 23 puta (tablica 4.5). Nasuprot tome, zamjena navedenih arginina u termolizinu i neprilizinu za posljedicu je imala znatno smanjenje katalitičke efikasnosti prvenstveno zbog promjene u k_{cat}[161], iz čega bi se dalo zaključiti kako ovi ostaci osim u vezanju, ulogu imaju i u stabilizaciji prijelaznog stanja. Osim toga, Arg717 neprilizina i Arg203 termolizina udaljeni su oko 6 Å od iona cinka, dok je udaljenost Arg582 DPP III nešto veća, skoro 11 Å. Iz dostupnih literaturnih podataka nismo pronašli primjer sličnog efekta, a jedno od mogućih objašnjenja je da se uklanjanjem pozitivno nabijene skupine arginina naprosto olakšava pristup aktivnom mjestu DPP III. Neznatne promjene afiniteta R582Q prema tetrapeptidima, navode nas na zaključak kako Arg582 ipak ne sudjeluje u vezanju P_2' ostatka peptida. No, značajno smanjenje afiniteta (K_i) mutanta R582Q za pentapeptide (najmanje 8 puta, tablica 4.8) u odnosu na "divlji tip", govori upravo u prilog tome da arginin 582 sudjeluje u vezanju karbonilne ili karboksilne grupe *C*-kraja pentapeptidnih supstrata, te je vrlo vjerovatno jedan od konstituenata S_3' veznog podmjesta DPP III kvasca. No, za razliku od neprilizina i termolizina Arg582 kvaščeve DPP III nema značajniju ulogu u samoj katalizi. Iz literaturnih podataka saznajemo za ostatak Arg102 neprilizina, za koji se pretpostavlja da zajedno s Asn542 čini veći dio S_2' veznog podmjesta[162]. Zanimljivo, ni u slučaju R102M mutacije nije zamijećeno smanjenje katalitičke efikasnosti neprilizina, već samo povećanje afiniteta prema dipeptidnim inhibitorima[162]. Nadalje, ovaj ostatak nalazi se na sličnoj udaljenosti od iona cinka kao i u slučaju DPP III (oko 12 Å). Obzirom na navedeno možemo zaključiti kako je uloga Arg582 bliža ulozi Arg102 nego Arg717 neprilizina, a to je da je jedan od ostataka koje tvore nešto "udaljenije" vezno podmjesto enzima DPP III, u ovom slučaju S_3'.

Najveći utjecaj na vezanje hidroksamatnog inhibitora imala je zamjena visoko sačuvanog ostatka lizina u poziciji 638, pri čemu je mutirani oblik K638L pokazao oko 56 puta manji afinitet prema Tyr-Phe-NHOH u usporedbi sa "divljim tipom" kvaščeve DPP III. Zanimljivo, zamjena aromatskog ostatka u P_1 poziciji ovog kompetitivnog inhibitora glicinom nije utjecala na smanjenje afiniteta mutanta K638L (oko 46 puta, tablica 4.7). Na osnovu zapaženog, kao i toga da zamjena Lys638 leucinom nije značajnije utjecala na katalitičku konstantu enzima (k_{cat}) već samo na vezanje inhibitora, zaključujemo kako bi ovaj visoko sačuvani lizin mogao biti dio S_2 veznog podmjesta u DPP III. U prilog tome, govore i rezultati ispitivanja molekularne osnove tiolne osjetljivosti kvaščeve DPP III, na osnovi kojih smo zaključili da se modifikacijom Cys639 vjerovatno narušava struktura aktivnog mjesta upravo zbog narušavanja lokalnih interakcija u kojima sudjeluje i Lys638

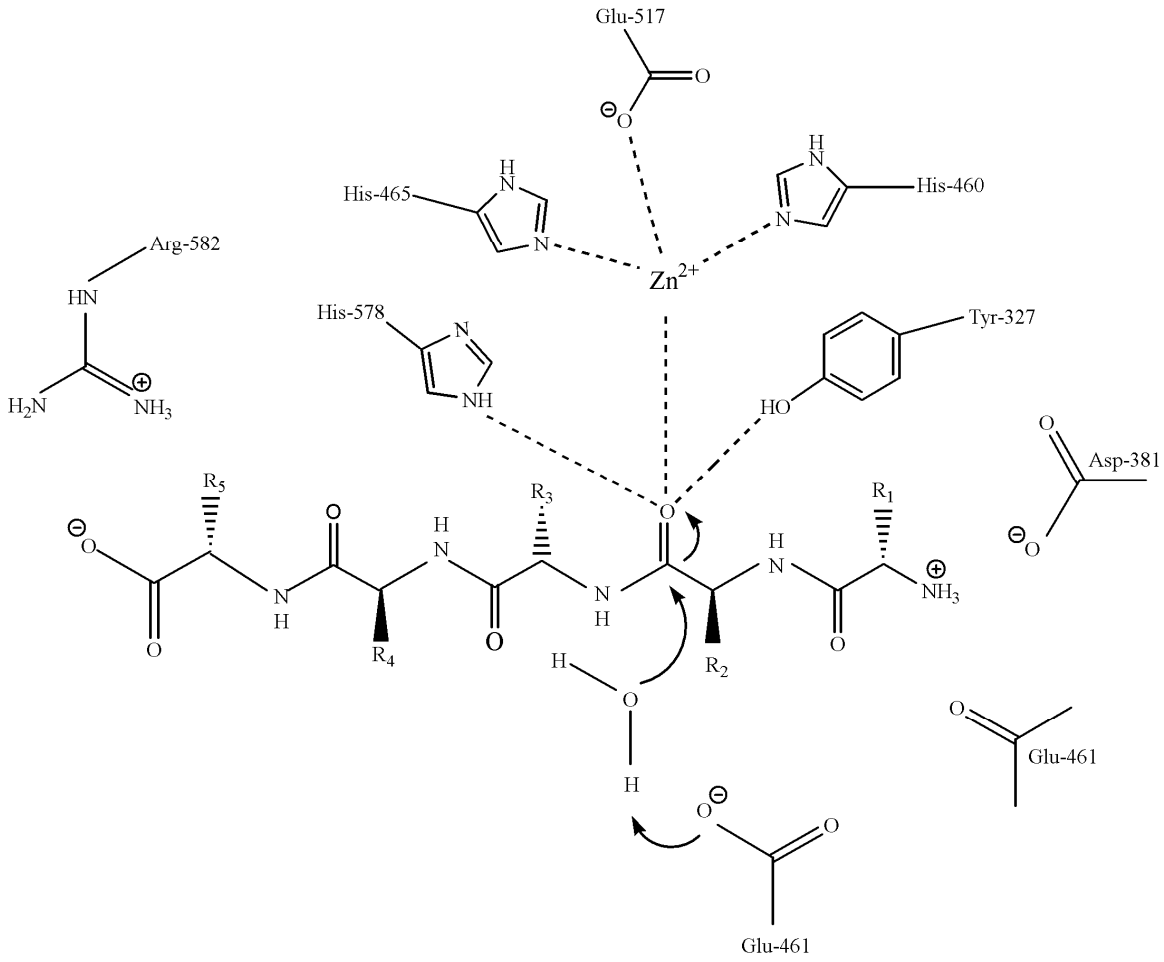
(slika 5.5). Zanimljivo je da su Špoljarić i sur.[132] pretpostavili da potpuno očuvani ostatak Trp300 humane DPP III sudjeluje u očuvanju integriteta S_2 veznog podmjesta enzima. Uvidom u kristalnu strukturu DPP III kvasca opažamo da se ostatak Trp309, ekvivalentan Trp300 humanom enzimu, nalazi na suprotnoj strani od Lys639 (slika 5.8). Kao što je već spomenuto, vrlo je vjerovatno da vezanje supstrata u aktivno mjesto dovodi do značajne promjene ili "zatvaranja" strukture enzima, što bi kao i u slučaju tirozinskog ostatka 327, dovelo do znatnog pomaka Trp309 koji bi zajedno sa Lys638 mogao biti dio veznog podmjesta S_2 kvaščeve DPP III.



Slika 5.8. Slika aktivnog mjesta kvaščeve DPP III sa ostacima K638 i W309 koji bi mogli biti konstituenti S_2 veznog podmjesta DPP III. Ion cinka prikazan je ljubičastom kuglom, njegovi ligandi ružičasto.

Na osnovi rezultata ovog doktorskog rada i postojećih literaturnih podataka moguće je predložiti mehanizam katalize DPP III (slika 5.9).

Peptidni supstrat smješta se u aktivno mjesto enzima pri čemu vezanje amino-kraja stabiliziraju Asp381 i Glu461. Pozicioniranjem supstrata u aktivno mjesto enzima pretpostavljamo da dolazi do pomicanja molekule vode koja je četvrti ligand cinka, prema ostatku Glu461. Na taj način, glutaminska kiselina aktivira molekulu vode koja vrši nukleofilni napad na karbonilni ugljik peptidne veze koja se cijepa. Negativni naboj nastalog tetraedarskog prijelaznog stanja, stabiliziran je elektrostatskim interakcijama s ionom cinka, i vrlo vjerovatno vodikovim vezama s Tyr327 i His578. Arginin u poziciji 582 sudjeluje u vezanju *C*-kraja pentapeptidnih supstrata.



Slika 5.9. Shematski prikaz katalitičkog mehanizma kvaščeve DPP III.

Ovaj doktorski rad doprinos je poznavanju mehanizma katalize i prostorne građe metalopeptidaza porodice M49 (porodica DPP III), te molekularne osnove njihove osjetljivosti na tiolne reagense. Po prvi puta je kloniran gen za dipeptidil-peptidazu III iz kvasca *S. cerevisiae*, a rekombinantni protein okarakteriziran. Istraživanje odnosa strukture i aktivnosti mutacijskom analizom, pružilo je eksperimentalni dokaz o, za katalizu važnim, ostacima glutaminske kiseline (Glu461), histidina (His578), tirozina (Tyr327) i asparaginske kiseline (Asp381), i identificiralo cisteine odgovorne za inaktivaciju enzima sulfhidrilnim reagensima (Cys 639 i Cys518), te za njegovu dimerizaciju (Cys130). Kroz interdisciplinarnu suradnju, rekombinantna kvaščeva DPP III je kristalizirana i razjašnjena joj je 3-D struktura, koja predstavlja prototip za cijelu porodicu metalopeptidaza M49 (DPP III).

6. ZAKLJUČCI

- Dipeptidil-peptidaza III kvasca *S. cerevisiae* prekomjerno je eksprimirana u stanicama bakterije *E. coli* s privjeskom His_6 ili bez njega. DPP III bez His_6 privjeska pročišćena je u dva koraka, dok je enzim s His_6 privjeskom pročišćen afinitetnom kromatografijom u jednom koraku.

- Pročišćenoj rekombinantnoj DPP III i DPP III-His_6 detaljno su ispitana fizikalno-kemijska i biokemijska svojstva, te je ustanovljeno da afinitetni privjesak nema značajniji utjecaj na strukturu i aktivnost enzima.

- Ciljanom mutagenezom priređeno je 13 mutiranih oblika kvaščeve DPP III-His_6. Mutirani oblici proteina prekomjerno su eksprimirani i pročišćeni, te su im određena katalitička svojstva.

- Pojedinačnom zamjenom 5 ostataka Cys u Ser pokazano je da Cys130 sudjeluje u nastajanju intermolekularne disulfidne veze i dimerizaciji proteina, a da su reaktivni ostaci Cys u pozicijama 639 i 518 odgovorni za inaktivaciju kvaščeve DPP III sulfhidrilnim reagensima.

- Zamjena Tyr327 s Ala uzrokovala je smanjenje katalitičke aktivnosti (k_{cat}) od 207 puta, u usporedbi s "divljim tipom" enzima, dok je za mutirani oblik H578N uočen pad ovog parametra od 73 puta, što ukazuje da bi oba ova, potpuno očuvana aminokiselinska ostatka u porodici DPP III, mogla imati ulogu u stabilizaciji prijelaznog stanja.

- Usporedbom katalitičkih svojstava "divljeg tipa" i mutiranih oblika proteina (E461Q, D381N i Arg582Q) ustanovljena je važnost vrlo očuvanih aminokiselinskih ostataka Glu461, Asp381 i Arg582 za vezanje peptidnog liganda (supstrat ili inhibitor).

- Mutacijska analiza upućuje na ulogu Met579 i Lys638 u katalizi, odnosno vezanju liganda na kvaščevu DPP III (70 puta smanjena k_{cat} mutanta M579L; 56 puta povećana K_i mutiranog oblika K638L za peptidni inhibitor).

- Najveći pad katalitičke efikasnosti (k_{cat}/K_m), od čak 25 000 puta, uočen je za mutant E461Q, što ukazuje na esencijalnu ulogu ovog potpuno očuvanog ostatka glutaminske kiseline, konstituenta motiva "HEXXGH", u katalitičkom mehanizmu peptidaza porodice M49.

7. LITERATURNA VRELA

1. C. Southan, Proteases: Evolution, *in: Encyclopedia of life sciences*, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net (2008) pp. 1-5.

2. N. D. Rawlings, A. J. Barrett and A. Bateman, MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Res.* **38** (2010) D227-D233.

3. C. López-Otin and J. S. Bond, Proteases: multifunctional enzymes in life and disease, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 30433-30437.

4. B. Turk, Targeting proteases: successes, failures and future prospects, *Nat. Rev. Drug Discov.* **5** (2006) 785-799.

5. Y. Watanabe, Y. Kumagai, and Y. Fujimoto, Presence of a dipeptidyl aminopeptidase III in *Saccharomyces cerevisiae*, *Chem. Pharm. Bull.* **38** (1990) 246-248.

6. C. M. Lee and S. H. Snyder, Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin, *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 12043-12050.

7. M. Abramić, M. Zubanović, and Lj. Vitale, Dipeptidyl peptidase III from human erythrocytes, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369** (1988) 29-38.

8. M. Baršun, N. Jajčanin, B. Vukelić, J. Špoljarić, and M. Abramić, Human dipeptidyl peptidase III acts as a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins, *Biol. Chem.* **388** (2007) 343-348.

9. J.-M. Chen and A. J. Barrett, *Dipeptidyl-peptidase III* in: *Handbook of Proteolytic Enzymes*: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.) (second edition), Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 809-812.

10. A. J. Barrett and N. D. Rawlings, Proteases, in: *Encyclopedia of life sciences*, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net (2007) pp. 1-8.

11. I. Schechter and A. Berger, On the size of the active site in proteases. I. Papain, *Biochem. Biophys. Res.* **27** (1967) 157-162.

12. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer *Biochemie*, 4. (2003) 3-8274-1303-6, Auflage. ed., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg- Berlin.

13. C. López-Otín and C. M. Overall, Protease degradomics: a new challenge for proteomics, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **3** (2002) 509-519.

14. V. Quesada, G. R. Ordóñez, L. M. Sánchez, X. S. Puente, and C. López-Otín, The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis, *Nucleic Acids Res.* **37** (2009) D239–D243.

15. M. J. Page, and E. Di Cera, Evolution of peptidase diversity, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 30010-30014.

16. J. F. Colbert, S. P. Matthews, G. Miller, and C. Watts, Diverse regulatory role for lysosomal proteases in the immune response, *Eur. J. Immunol.* **39** (2009) 2955-2965.

17. H. A. Chapman, Endosomal proteases in antigen presentation, *Curr. Opin. Immunol.* **18** (2006) 78-84.

18. A. Hershko and A. Ciechanover, The ubiquitin system, *Annu. Rev. Biochem.* **67** (1998) 425–79.

19. A. F. Kisselev, T. N. Akopian, K. M. Woo, and A. L. Goldberg, The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 3363-3371.

20. T. Saric, C. I. Graef, and A. L. Goldberg, Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 46723-46732.

21. M. H. Glickman, and A. Ciechanover, The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol. Rev.* **82** (2002) 373-428.

22. F. M. Cunha, D. A. Berti, Z. S. Ferreira, C. F. Klitzke, R. P. Markus, and E. S. Ferro, Intracellular peptides as a natural regulators of cell signaling, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 24448-24459.

23. M. S. Brown, J. Ye, R. B. Rawson, and J. L. Goldstein, Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to human, *Cell* **100** (2000) 391-398.

24. A. Weihofen, and B. Martoglio, Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides, *Trends Cell Biol.* **13** (2004) 71-78.

25. D. J. Selkoe, Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy, *Physiol. Rev.* **81** (2001) 741-766.

26. A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S. G. Oliver, Life with 6000 genes, *Science* **274** (1996) 563-567.

27. D. A. Sinclair, K. Mills, and L. Guarente, Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants, *Science* **277** (1997) 1313-1316.

28. K. G. Dernby, Studien fiber die proteolytischen Enzyme der Hefe und ihre Beziehung zu der Autolyse, *Biochem. Z.*, **81** (1917) 107-208.

29. E. W. Jones, Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 7963-7966.

30. O. Gakh, P. Cavadini, and G. Isaya, Mitohondrial processing peptidases, *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **1592** (2002) 63-67.

31. V. Costa, A. Quintanilha, and P. Moradas-Ferreira, Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*, *IUBMB Life* **59** (2007) 293-298.

32. W. Hilt and D. H. Wolf, Stress-induced proteolysis in yeast, *Mol. Microbiol.* **6** (1992) 2437-2442.

33. M. Marques, D. Mojzita, M. A. Amorim, T. Almeida, S. Hohmann, P. Moradas-Ferreira, and V. Costa, The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but *PEP4* overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology* **152** (2006) 3595-3605.

34. D. H. Wolf, From lysosome to proteasome: the power of yeast in the dissection of proteinase function in cellular regulation and waste disposal, *Cell. Mol. Life Sci.* **61** (2004) 1601-1614.

35. U. Teichert, B. Mechler, H. Müller, and D. H. Wolf, Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival, *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 16037-16045.

36. M. J. Leibowitz and R. B. Wickner, A chromosomal gene is required for killer plasmid expression, mating, and spore maturation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** (1976) 2061-2065.

37. D. Julius, A. Brake, L. Blair, R. Kunisawa, and J. Thorner, Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-α-factor, *Cell* **37** (1984) 1075-1089.

38. P. C. Böhni, R. J. Deshaies, and R. W. Schekman, SEC11 is required for signal peptide processing and yeast cell growth, *J. Cell. Biol.* **106** (1988) 1035-1042.

39. F. Kalousek, W. Neupert, T. Omura, G. Schatz, and U. K. Schmitz, Uniform nomenclature for the mitochondrial peptidases cleaving precursors of mitochondrial protiens, *Trends Biochem. Sci.* **18** (1993) 249.

40. K. Esser, B. Tursun, M. Ingenhoven, G. Michaelis, and E. Pratje, A Novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1, *J. Mol. Biol.* **323** (2002) 835-843.

41. W. Heinemeyer, J. A. Kleinschmidt, J. Saidowsky, C. Escher, and D. H. Wolf, Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival, *EMBO J.* **10** (1991) 555-562.

42. Y.-H. Chang, U. Teichert, and J. A. Smith, Purification and characterization of methionine aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 19892-19897.

43. X. Li and Y.-H. Chang, Amino-terminal protein processing in *Saccharomyces cerevisiae* is an essential function that requires two distinct methionine aminopeptidases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995) 12357-12361.

44. M. Büchler, U. Tisljar, and D. H. Wolf, Proteinase yscD (oligopeptidase yscD), Structure, function and relationship of the yeast enzyme with mammalian thimet oligopeptidase (metalloendopeptidase, EP 24.15), *Eur. J. Biochem.* **219** (1994) 627-639.

45. Y. Shen, K. K. Hixson, N. Tolić, D. G. Camp, S. O. Purvine, R. J. Moore, and R. D. Smith, Mass spectrometry analysis of proteome-wide proteolytic post-translational degradation of proteins, *Anal. Chem.* **80** (2008) 5819-5828.

46. N. D. Rawlings and A.J. Barrett, *Introduction: metallopeptidases and their clans* in: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 231-268.

47. W. N. Lipscomb and N. Sträter, Recent advances in zinc enzymology, *Chem. Rev.* **96** (1996) 2375-2433.

48. L. L. Walling, Recycling or regulation? The role of amino-terminal modifying enzymes, *Curr. Opin. Plant Biol.* **9** (2006) 227-233.

49. W. T. Lowther and B. W. Matthews, Metalloaminopeptidases: common functional themes in disparate structural surroundings, *Chem. Rev.* **102** (2002) 4581-4607.

50. S. Y. P. Chang, E. C. McGary, and S. Chang, Methionine aminopeptidase gene of *Escherichia coli* is essential for cell growth, *J. Bacteriol.* **171** (1989) 4071-4072.

51. S. L. Roderick and B. W. Matthews, Structure of the cobalt-dependent methionine aminopeptidase from *Escherichia coli*: a new type of proteolytic enzyme, *Biochemistry* **32** (1993) 3907-3912.

52. R. A. Bradshaw, E. Yi, and K. W. Walker, *Methionyl aminopeptidase type 1* in: *Handbook of Proteolytic Enzymes*: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.) (second edition), Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 911-917.

53. D. Hanahan and J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell* **86** (1996) 353-364.

54. Y. Sato, Role of aminopeptidase in angiogenesis, *Biol. Pharm. Bull.* **27** (2004) 772-776.

55. E. C. Griffith, Z. Su, B. E. Turk, S. Chen, Y. H. Chang, Z. Wu, K. Biemann, and J.O. Liu, Methionine aminopeptidase (type 2) is the common target for angiogenesis inhibitors AGM-1470 and ovalicin, *Chem. Biol.* **4** (1997) 461-471.

56. J. L. Mauriz, J. Martín-Renedo, A. García-Palomo, M. J. Tuñón, and J. Gonzáles-Gallego, Methionine aminopeptidases as potential targets for treatment of gastrointestinal cancers and other tumours, *Curr. Drug Targets* **11** (2010) 1439-57.

57. K. Kessenbrock, V. Plaks, and Z. Werb, Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment, *Cell* **141** (2010) 52-67.

58. O. Zitka, J. Kukacka, S. Krizkova, D. Huska, V. Adam, M. Masarik, R. Prusa, and R. Kizek, Matrix metalloproteinases, *Curr. Med. Chem.* **17** (2010) 3751-3768.

59. C. N. Shrimpton, A. I. Smith, and R. A. Lew, Soluble metalloendopeptidases and neuroendocrine signaling, *Endocr. Rev.* **23** (2002) 647-664.

60. R. E. Isaac, N. D. Bland, and A. D. Shirras, Neuropeptidases and the metabolic inactivation of insect peptides, *Gen. Comp. Endocr.* **162** (2009) 8-17.

61. P. Corvol, M. Eyries, and F. Soubrier, *Peptidyl-dipeptidase A/angiotensin I-converting enzyme* in: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 332-346.

62. G. A. Spyroulias and P. Codropatis, Current inhibition concepts of zinc metallopeptidases involved in blood pressure regulation, *Curr. Enz. Inhib.* **1** (2005) 29-42.

63. N. N. Nalivaeva, L. R. Fisk, N. D. Belyaev, A. J. Turner, Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease, *Curr. Alzheimer Res.* **5** (2008) 212-224.

64. A. Falkevall, N. Alikhani, S. Bhushan, P. F. Pavlov, K. Busch, K. A. Johnson, T. Eneqvist, L. Tjernberg, M. Ankarcrona, and E. Glaser, Degradation of the amyloid β-protein by the novel mitochondrial peptidasome, PreP, *J. Biol. Chem.* **281** (2006) 29096-29104.

65. E. Malito, R. E. Hulse, and W.-J. Tang, Amyloid β-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin, *Cell. Mol. Life Sci.* **65** (2008) 2574-2585.

66. Y. Shen, A. Joachimiak, M. R. Rosner, and W.-J. Tang, Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism, *Nature* **443** (2006) 870-874.

67. N. Iwata, S. Tsubuki, Y. Takaki, K. Shirotani, B. Lu, N. P. Gerard, C. Gerard, E. Hama, H.-J. Lee, and T. C. Saido, Metabolic regulation of brain Aβ by neprilysin, *Science*, **292** (2001) 1550-1552.

68. S. Wang, R. Wang, L. Chen, D. A. Bennett, D. W. Dickson, D. S. Wang, Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain, *J. Neurochem.* **115** (2010) 47-57.

69. A. J. Turner, *Neprilysin* in: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 419-426.

70. C. Oefner, A. D'Arcy, M. Hennig, and F. K. Winkler, Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon, *J. Mol. Biol.* **296** (2000) 341-349.

71. A. J. Kenny and S. L. Stephenson, Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide, *FEBS Lett.* **232** (1988) 1-8.

72. J. A. Carson and A. J. Turner, β-Amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases?, *J. Neurochem.* **81** (2002) 1-8.

73. D. A. Auld, *Carboxypeptidase A* in: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 812-821.

74. W. L. Delano, The PyMOL molecular graphics system (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.

75. H. Kim and W. N. Lipscomb, Crystal structure of the complex of carboxypeptidase A with a strongly bound phosphonate in a new crystalline form: comparison with structures of other complexes, *Biochemistry* **29** (1990) 5546-5555.

76. D. W. Christianson, P. R. David, and W. N. Lipscomb, Mechanism of carboxypeptidase A: Hydration of a ketonic substrate analogue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (1987) 1512-1515.

77. D. A. Auld, *Catalytic mechanism for metallopeptidases* in: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 268-288.

78. D. W. Christianson and W. N. Lipscomb, Carboxypeptidase A, *Acc. Chem. Res.* **22** (1989) 62-69.

79. W. L. Mock and J. Z. Zhang, Mechanistically significant diastereoselection in the sulfoximine inhibition of carboxypeptidase A, *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 6393-6400.

80. N. Sträter and W. N. Lipscomb, *Leucyl aminopeptidase (animal)* in: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 896-901.

81. N. Sträter and W. N. Lipscomb, Two-metal ion mechanism of bovine lens leucine aminopeptidase: active site solvent structure and binding mode of L-leucinal, a gem-diolate transition state analogue, by X-ray crystalography, *Biochemistry* **34** (1995) 14792-14800.

82. N. Sträter, L. Sun, E. R. Kantrowitz, and W. N. Lipscomb, A bicarbonate ion as a general base in the mechanism of peptide hydrolysis by dizinc leucine aminopeptidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999) 11151-11155.

83. S. Ellis and J. M. Nuenke, Dipeptidyl arylamidase III of the pituitary. Purification and characterization, *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 4623-4629.

84. Y. Shimamori, Y. Watanabe, and Y. Fujimoto, Purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase III from human placenta, *Chem. Pharm. Bull.* **34** (1986) 3333-3340.

85. M. Abramić, D. Schleuder, Lj. Dolovčak, W. Schröder, K. Strupat, D. Šagi, J. Peter-Katalinić, and Lj. Vitale, Human and rat dipeptidyl peptidase III: Biochemical and mass spectrometric arguments for similarities and differences, *Biol. Chem.* **381** (2000) 1233-1243.

86. A. A. Swanson, R. M. Davis, and J. K. McDonald, Dipeptidyl peptidase III from human cataractous lenses. Partial purification, *Curr.Eye Res.* **3** (1984) 287-291.

87. A. A. Swanson, B. Albers-Jackson, and J. K. McDonald, Mammalian lens dipeptidyl aminopeptidase III, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84** (1978) 1151-1159.

88. I. Ohkubo, Y.-H. Li, T. Maeda, Y. Yamamoto, T. Yamane, P.-G. Du, and K. Nishi, Dipeptidyl peptidase III from rat liver cytosol: Purification, molecular cloning and immunohistochemical localization, *Biol. Chem.* **380** (1999) 1421-1430.

89. M. A. Sentandreu and F. Toldrá, Biochemical properties of dipeptidyl peptidase III purified from porcine skeletal muscle, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 3977–3984.

90. M. Smyth and G. O'Cuinn, Dipeptidyl aminopeptidase III of guinea-pig brain: Specificity for short oligopeptide sequences, *J. Neurochem.* **63** (1994) 1439-1445.

91. S. Dhanda, H. Singh, J. Singh, and T. P. Singh, Isolation, purification and characterization of a DPP-III homologue from goat brain, *Protein Expres. Purif.* **52** (2007) 297-305.

92. C. Mazzocco, K. M. Fukasawa, A.-A. Raymond, and J. Puiroux, Purification, partial sequencing nad characterization of an insect membrane dipeptidyl aminopeptidase that degrades the insect neuropeptide proctolin, *Eur. J. Biochem.* **268** (2001) 4940-4949.

93. C. Mazzocco, K. M. Fukasawa, P. Auguste, and J. Puiroux, Characterization of a funtionally expressed dipeptidyl aminopeptidase III from *Drosophila melanogaster*, *Eur. J. Biochem.* **270** (2003) 3074-3082.

94. K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, M. Kanai, S. Fujii, J. Hirose, and M. Harada, Dipeptidyl peptidase III is a zinc metallo-exopeptidase. Molecular cloning and expression, *Biochem. J.* **329** (1998) 275-282.

95. K. Fukasawa, K. M. Fukasawa, H. Iwamoto, J. Hirose, and 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.

96. J. Hirose, H. Iwamoto, I. Nagao, K. Enmyo, H. Sugao, N. Kanemitu, K. Ikeda, M. Takeda, M. Inoue, T. Ikeda, F. Matsuura, K. M. Fukasawa, and K. Fukasawa, Characterization of the metal-substituted dipeptidyl peptidase III (rat liver), *Biochemistry* **40** (2001) 11860-11865.

97. Y. H. Li, T. Maeda, T. Yamane, and I. Ohkubo, Alteration of rat dipeptidyl peptidase III by site-directed mutagenesis: Cysteine 176 is a regulatory residue for the enzyme activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276** (2000) 553-558.

98. M. Abramić, Š. Šimaga, M. Osmak, L. Čičin-Šain, B. Vukelić, and K. Vlahoviček, Highly reactive cysteine residues are part of the substrate binding site of mammalian dipeptidyl peptidases III, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36** (2004) 434-446.

99. S. A. Chan, T. H. D. Jones, J. P. Sweeney, and K. Toursarkissian, Partial purification and characterization of dipeptidyl-aminopeptidase III from *Dictyostelium discoideum*, *Exp. Mycol.* **11** (1987) 27-35.

100. J. Huang, J. Kim, P. Ramamurthy, and T. H. D. Jones, The purification, specificity, and role of dipeptidyl peptidase III in *Dictyostelium discoideum*, *Exp. Mycol.* **16** (1992) 102-109.

101. L. Hola-Jamriska, J. P. Dalton, J. Aaskov, and P. J. Brindley, Dipeptidyl peptidase I and III activities of adult schistosomes, *Parasitology* **118** (1999) 275-282.

102. Y. Shimamori, Y. Watanabe, and Y. Fujimoto, Human placental dipeptidyl aminopeptidase III: hydrolysis of enkephalins and its stimulation by cobaltous ion, *Biochem. Med. Metab. Biol.* **40** (1988) 305-310.

103. S. Dhanda, J. Singh, and H. Singh, Hydrolysis of various bioactive peptides by goat brain dipeptidylpeptidase-III homologue, *Cell Biochem. Funct.* **26** (2008) 339-345.

104. T. Chiba, Y.-H. Li, T. Yamane, O. Ogikubo, M. Fukuoka, R. Arai, S. Takahashi, T. Ohtsuka, I. Ohkubo, and N. Matsui, Inhibition of recombinant dipeptidyl peptidase III by synthetic hemorphin-like peptides, *Peptides* **24** (2003) 773-778.

105. H. Zhang, Y. Yamamoto, S. Shumiya, M. Kunimatsu, K. Nishi, and I. Ohkubo, Peptidases play an important role in cataractogenesis: An immunohistochemical study on lenses derived from Shumiya cataract rats, *Histochem. J.* **33** (2001) 511-521.

106. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, J. Ilić-Forko, Lj. Vitale, D. Miličić, and M. Abramić, Dipeptidyl peptidase III in malignant and non-malignant gynaecological tissue, *Eur. J. Cancer* **34** (1998) 399–405.

107. Š. Šimaga, D. Babić, M. Osmak, M. Šprem, and M. Abramić, Tumor cytosol dipeptidyl peptidase III activity is increased with histological aggressiveness of ovarian primary carcinomas, *Gynecol. Oncol.* **91** (2003) 194-200.

108. Y. Liu, J. T. Kern, J. R. Walker, J. A. Johnson, P. G. Schultz, and H. Luesch, A genomic screen for activators of the antioxidant response element, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (2007) 5205-5210.

109. I. G. Jones, W. Jones, and M. North, The synthesis of conformationally constrained analogues of the ACE inhibitor idrapril, *Tetrahedron* **55** (1999) 279-290.

110. S. Odake, K. Nakahaski, T. Morikawa, S. Takebe, and K. Kobashi, Inhibition of urease activity by dipeptidyl hydroxamic acids, *Chem. Pharm. Bull.* **40** (1992) 2764-2768.

111. E. A. Winzeler, D. D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J. D. Boeke, H. Bussey, A. M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S. W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S. H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J. H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D. J. Lockhart, A. Lucau-Danila, M. Lussier, N. M'Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J. L. Revuelta, L. Riles, C. J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, S. Véronneau, M. Voet, G. Volckaert, T. R. Ward, R. Wysocki, G. S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippsen, M. Johnston, R. W. Davis, Functional characterization of the S. cerevisiae genome by gene deletion and parallel analysis, *Science* **285** (1999) 901-906.

112. D. Gietz, A. St. Jean, R. A. Woods, R. H. Schiestl, Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells, *Nucleic Acids Research* **20** (1992) 1425.

113. M. Kozak, An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs, *Nucleic Acids Research* **15** (1987) 8125 – 8148.

114. I. Nagatsu, T. Nagatsu, T. Yamamoto, G. G. Glennes, and J. W. Mehl, Purification of aminopeptidase A in human serum and degradation of angiotensin II by the purified enzyme, *Biochim. Biophys. Acta* **198** (1970) 255-270.

115. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248–254.

116. A handbook for high-level expression and purification of 6×His-tagged proteins, 5th ed. The QIAexpressionist^{TM}, 2001.

117. U. K. Laemlli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227** (1970) 680-685.

118. E. Hempelmann and R. Kaminsky, Long term stability of colors after silver staining, *Electrophoresis* **7** (1986) 481.

119. C. Long, *Biochemists' handbook,* izd. E. & F. N. Spon Ltd., London 1961.

120. Y. Gargouri, H. Moreau, G. Pieroni and R. Verger, Human gastric lypase: a sulfhydryl enzyme, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 2159-2162.

121. L. J. Greenberg, Fluorometric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10^{-14} mole, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9** (1962) 430-435.

122. C. S. Hanes, CLXVII. Studies on plant amylases. I. The effect of starch concrentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley, *Biochem. J.* **26** (1932) 1406-1421.

123. T. G. Chu, M. Orlowski, Soluble metalloendopeptidase from rat brain: action on enkephalin-containing peptides and other bioactive peptides, *Endocrinology* **116** (1985) 1418-1425.

124. L. Whitmore and B. A. Wallace, DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.* **32** (2004) W668–W673.

125. M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins, ClustalW and ClustalX version 2, *Bioinformatics* **23** (2007) 2947-2948.

126. S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* **25** (1997) 3389-3402.

127. Uniprot Consortium, The universal protein resource (UniProt), *Nucleic Acids Res.* **36** (2008) D190-D195.

128. T. A. Hall, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucl. Acids S.* **41** (1999) 95-98.

129. P. K. Baral, N. Jajčanin-Jozić, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić, and K. Gruber, The first structure of dipeptidyl-peptidase III provides insight into the catalytic mechanism and mode of substrate binding, *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 22316-22324.

130. M. Abramić, J. Špoljarić and Š. Šimaga, Prokaryotic homologs help to define consensus sequences in peptidase family M49, *Period. Biol.* **106** (2004) 161-168.

131. B. Salopek-Sondi, B. Vukelić, J. Špoljarić, Š. Šimaga, D. Vujaklija, J. Makarević, N. Jajčanin, and M. Abramić, Functional tyrosine residue in the active center of human dipeptidyl peptidase III, *Biol. Chem.* **389** (2008) 163-167.

132. J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, J. Makarević, B. Vukelić, D. Agić, Š. Šimaga, N. Jajčanin-Jozić and M. Abramić, Absolutely conserved tryptophan in M49 family of peptidases contributes to catalysis and binding of competitive inhibitors, *Bioorg. Chem.* **37** (2009) 70-76.

133. J. Špoljarić, *Metalopeptidaze porodice M49: heterologna ekspresija, pročišćavanje i karakterizacija ljudskog ortolognog enzima*, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 04.02. 2010.

134. M. W. Thompson, M. Govindaswami, and L.B. Hersh, Mutation of active site residues of the puromycin-sensitive aminopeptidase: conversion of the enzyme into a catalytically inactive binding protein, *Arch. Biochem. Biophys.* **413** (2003) 236-242.

135. M. W. Thompson, E. D. Archer, C. E. Romer, and R. L. Seipelt, A conserved tyrosine residue of *Saccharomyces cerevisiae* leukotriene A4 hydrolase stabilizes the transition state of the peptidase activity, *Peptides* **27** (2006) 1701–1709.

136. D. R. Holland, A. C. Hausrath, D. Juers, and B. W. Matthews, Structural analysis of zinc substitutions in the active site of thermolysin, *Protein Sci.* **4** (1995) 1955-1965.

137. K. Shimada, M. Takahashi, A. J. Turner, and K. Tanzawa, Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-21.11, *Biochem. J.* **315** (1996) 863-867.

138. L. Muller, A. Barret, E. Etienne, R. Meidan, O. Valdenaire, P. Corvol, and C. Tougard, Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 545-555.

139. P. J. Britto, L. Knipling, and J. Wolff, The local electrostatic environment determines cysteine reactivity of tubulin, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 29018-29027.

140. N. Brandes, S. Schmitt, and U. Jakob, Thiol-based redox switches in eukaryotic protiens, *Antioxid. Redox Signal.* **11** (2009) 997-1014.

141. J. A. Sigman, M. L. Sharky, S. T. Walsh, A. Pabon, M. J. Glucksman, and A. J. Wolfson, Involvement of surface cysteines in activity and multimer fomation of thimet oligopeptidase, *Protein Eng.* **16** (2003) 623-628.

142. A. J. Barrett and M. A. Brown, Chicken liver Pz-peptidase, a thiol-dependent metallo-endopeptidase, *Biochem. J.* **271** (1990) 701-706.

143. H. Østergaard, C. Tachibana, and J. R. Winther, Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol, *J. Cell Biol.* **166** (2004) 337-345.

144. M. Neant-Fery, R. D. Garcia-Ordoñez, T. P. Logan, D. J. Selkoe, L. Li, L. Reinstatler, and M. A. Leissring, Molecular basis for the thiol sensitivity of insulin-degrading enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** (2008) 9582-9587.

145. L. A. Ralat, M. Ren, A. B. Schilling, and W.-J. Tang, Protective role of Cys-178 against the inactivation and oligomerization of human insulin-degrading enzyme by oxidation and nitrosylation, *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 34005-34018.

146. B. W. Matthews, Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases, *Acc. Chem. Res.* **21** (1988) 333-340.

147. B. van den Burg and V. Eijsink, *Thermolysin and related* Bacillus *metallopeptidases* in: A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (second edition) Vol. 1, Elsevier, Academic Press, London, 2004, pp. 374-387.

148. H. M. Holden, D. E. Tronrud, A. F. Monzingo, L. H. Weaver, and B. W. Matthews, Slow- and fast-binding inhibitors of termolysin display different modes of binding: crystallographic analysis of extended phosphonamidate transition-state analogues, *Biochemistry* **26** (1987) 8542-8553.

149. A. Devault, C. Nault, M. Zollinger, M-C. Fournié-Zaluski, B. P. Roques, P. Crine, and G. Boileau, Expression of neutral endopeptidase (enkephalinase) in heterologous COS-1 cells, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 4033-4040.

150. G. Vazeux, J. Wang, P. Corvol, and C. Llorens-Cortès, Identification of glutamate residue essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 9069-9074.

151. I. Yiallouros, E. G. Berkhoff, and W. Stöcker, The roles of Glu93 and Tyr149 in astacin-like zinc peptidases, *FEBS Lett.* **484** (2000) 224-228.

152. A. Beaumont, M. J. O'Donohue, N. Paredes, N. Rousselet, M. Assicot, C. Bohuon, M-C. Fournié-Zaluski, and B. P. Roques, The role of histidine 231 in thermolysin-like enzymes: a site-directed mutagenesis study, *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 16803-16808.

153. N. Dion, H. Le Moual, P. Crine, and G. Boileau, Kinetic evidence that His-711 of neutral endopeptidase 24.11 is involved in stabilization of the transition state, *FEBS* **318** (1993) 301-304.

154. K. M. Fukasawa, J. Hirose, T. Hata, and Y. Ono, In rat dipeptidyl peptidase III, His^{568} is essential for catalysis, and Glu^{507} or Glu^{512} stabilizes the coordination bond between His^{455} or His^{450} and zinc ion, *Biochim. Biophys. Acta-Proteins and Proteomics* **10** (2010) 2063-2069.

155. A. Tomić, M. Abramić, J. Špoljarić, D. Agić, D. M. Smith, and S. Tomić, Human Dipeptidyl Peptidase III: Insights into Ligand Binding from a Combined Experimental and Computational Approach, *J. Mol. Recognit*. (2010) (u tisku).

156. C. Marie-Claire, E. Ruffet, G. Tiraboschi, and M.-C. Fournié-Zaluski, Differences in transition state stabilization between thermolysin (EC 3.4.24.27) and neprilysin (EC 3.4.24.11), *FEBS Lett.* **438** (1998) 215–219.

157. V. Oliveira, M. C. Araújo, V. Rioli, A. C. M. de Camargo, I. L. S. Tersariol, and M. A. Juliano, L. Juliano, and E. S. Ferro, A structure-based site-directed mutagenesis study on the neurolysin (EC 3.4.24.16) and thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) catalysis, *FEBS Lett.* **541** (2003) 89-92.

158. G. Vazeux, X. Iturrioz, P. Corvol and C. Llorens-Cortès, A tyrosine residue essential for catalytic activity in aminopeptidase A, *Biochem. J.* **327** (1997) 883-889.

159. M. Li, C. Chen, D. R. Davies, and T. K. Chiu, Induced-fit mechanism for prolyl endopeptidase, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 21487-21495.

160. P. Chérot, J. Devin, M. C. Fournié-Zaluski, and B. P. Roques, Enkephalin-degrading dipeptidylaminopeptidase: characterization of the active site and selective inhibition, *Molec. Pharmacol.* **30** (1986) 338-344.

161. C. Marie-Claire, E. Ruffet, S. Antonczak, A. Beaumont, M. O'Donohue, B. P. Roques, and M.-C. Fournié-Zaluski, Evidence by site-directed mutagenesis that arginine 203 of thermolysin and arginine 717 of neprilysin (neutral endopeptidase) play equivalent critical roles in substrate hydrolysis and inhibitor binding, *Biochemistry* **36** (1997) 13938-13945.

162. N. Dion, P. Cohen, P. Crine, and G. Boileau, Characterisation od neprilysin (EC 3.4.24.11) S_2' subsite, *FEBS Lett.* **411** (1997) 140-144.

8. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

2-ME	2-merkaptoetanol, *β*-merkaptoetanol
2NA	2-naftilamid (*β*-naftilamid)
AA	akrilamid
Amp	ampicilin
APS	amonijev persulfat
Bisakrilamid	N,N'-metilenbisakrilamid
BSA	albumin iz goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*)
CBB R-250	Coomassie Brilliant Blue R-250
DCI	3,4-dikloroizokumarin
DEAE-	dietilaminoetil-
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
*d*NTP	deoksinukleozidtrifosfat
ds H_2O	destilirana sterilna voda
DTDP	4,4'-ditiodipiridin
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina)
DTT	ditiotreitol
EDTA-Na_2	dinatrijeva sol etilendiaminotetraoctene kiseline
FBB	"Fast Blue B" sol – tetrazonijev *o*-dianisidin × $ZnCl_2$
FPLC	brza tekućinska kromatografija proteina (eng. *fast protein liquid chromatography*)
GSH, GSSG	glutation (reducirani, oksidirani)
IAA	jodoacetamid
IEF	izoelektrično fokusiranje
IPTG	izopropil-*β*-D-1-tiogalaktopiranozid
Mili Q	deionizirana voda niske vodljivosti (< 10 µS) proizvedena na sustavu za proizvodnju deionizirane vode Millipore
NEM	*N*-etilmaleimid
NTA	nitrilotrioctena kiselina (eng. *nitrilotriacetic acid*)
PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (eng. *polyacrylamide gel electrophoresis*)
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)
PEG	polietilenglikol

p-HMB	*p*-hidroksimerkuribenzoat
pI	izoelektrična točka
PMSF	fenilmetilsulfonil-fluorid
SDS	natrijev-dodecilsulfat (eng. *sodium dodecyl sulphate*)
TCA	trikloroctena kiselina (eng. *trichloroacetic acid*)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	tris-(hidroksimetil)-aminometan
Tween 80	polioksietilensorbitan monooleat – "Polysorbate 80 - Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate"

Aminokiseline i njihovi simboli

glicin	Gly (G)
alanin	Ala (A)
valin	Val (V)
leucin	Leu (L)
izoleucin	Ile (I)
metionin	Met (M)
prolin	Pro (P)
fenilalanin	Phe (F)
triptofan	Trp (W)
serin	Ser (S)
treonin	Thr (T)
asparagin	Asn (N)
glutamin	Gln (Q)
tirozin	Tyr (Y)
cistein	Cys (C)
lizin	Lys (K)
arginin	Arg (R)
histidin	His (H)
asparaginska kiselina (aspartat)	Asp (D)
glutaminska kiselina (glutamat)	Glu (E)

Životopis

Rođena sam 25. kolovoza 1979. godine u Splitu. Osnovnu školu pohađala sam u Kaštel Lukšiću, a Drugu gimnaziju (jezično usmjerenje) u Splitu. Studij biologije i kemije (profesorski smjer) na Fakultetu prirodoslovno-matematičkih znanosti i odgojnih područja Sveučilišta u Splitu upisala sam 1998. godine. Diplomski rad "Pročišćavanje i karakterizacija alkalne fosfataze iz bakterije *E. coli*" izradila sam pod vodstvom prof. dr. sc. Maje Pavele-Vrančić, koji sam obranila 10. studenog 2004. godine. Tijekom studija bila sam stipendirana od strane Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta (1999/2000), te Grada Splita u kategoriji nadarenih studenata (2002/2003).

Godine 2005. godine upisala sam poslijediplomski studij iz kemije, smjer biokemija, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. U travnju iste godine započinjem sa volonterskim radom, a od travnja 2006. godine zaposlena sam na mjestu znanstvenog novaka u Laboratoriju za celularnu biokemiju, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, kada i započinjem izradu doktorske radnje pod vodstvom dr. sc. Marije Abramić, znanstvene savjetnice Insituta Ruđer Bošković.

U okviru hrvatsko-austrijske bilateralne suradnje boravila sam ukupno 25 tjedana u grupi prof. dr. sc. Petera Macherouxa, na Institutu za biokemiju, Sveučilišta u Grazu, Austrija.

Do sada sam objavila šest znanstvenih radova u međunarodnim znanstvenim časopisima, sudjelovala na dva međunarodna i dva domaća znanstvena skupa, pohađala sam ukupno pet tečaja (dva međunarodna i tri domaća), te sudjelovala na međunarodnoj školi.

Popis radova autora

Znanstveni radovi u časopisima:

1. **N. Jajčanin-Jozić**, S. Deller, T. Pavkov, P. Macheroux, and M. Abramić, Identification of the reactive cysteine residues in yeast dipeptidyl peptidase III. *Biochimie* **92** (2010) 89-96.

2. J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, J. Makarević, B. Vukelić, D. Agić, Š. Šimaga, **N. Jajčanin-Jozić**, and M. Abramić, Absolutely conserved tryptophan in M49 family of peptidases contributes to catalysis and binding of competitive inhibitors, *Bioorg. Chem.* **37** (2009) 70-76.

3. P. K. Baral, **N. Jajčanin-Jozić**, S. Deller, P. Macheroux, M. Abramić, and K. Gruber, The first structure of dipeptidyl-peptidase III (DPP III) provides insight into the catalytic mechanism and the mode of substrate binding. *J. Biol. Chem.* **283** (2008) 22316-22324.

4. B. Salopek-Sondi, B. Vukelić, J. Špoljarić, Š. Šimaga, D. Vujaklija, J. Makarević, **N. Jajčanin,** and M. Abramić, Functional tyrosine residue in the active center of human dipeptidyl peptidase III. *Biol. Chem.* **389** (2008) 163-167.

5. M. Baršun, **N. Jajčanin**, B. Vukelić, J. Špoljarić, and M. Abramić, Human dipeptidyl peptidase III acts like a post-proline-cleaving enzyme on endomorphins. *Biol. Chem.* **388** (2007) 343-348.

6. D. Agić, M. Hranjec, N. **Jajčanin**, K. Starčević, G. Karminski-Zamola, and M. Abramić, Novel amidino-substituted benzimidazoles: Synthesis of compounds and inhibition of dipeptidyl peptidase III. *Bioorg. Chem.* **35** (2007) 153-169.

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. **N. Jajčanin-Jozić**, M. Abramić: Molecular basis for the thiol sensitivity of yeast dipeptidyl peptidase III, **35th FEBS Congress, Molecules of Life,** Göteborg, Švedska, 26. lipnja-1. srpnja 2010. (poster i kratko usmeno priopćenje)

2. A. Brcko, M. Brajlović, S. Kazazić, **N. Jajčanin Jozić**, B. Salopek-Sondi: A possible interplay between two conserved Cys residues of auxin-amidohydrolase BrILL2 from Brassica rapa L, **The 5th Central European Conference Chemistry towards Biology**, Primošten, Hrvatska, 8-11. rujna 2010. (poster).

3. M. Abramić, M. Baršun, **N. Jajčanin Jozić**, B. Vukelić, Š. Šimaga: Human dipeptidyl peptidase III: broadened repertoire of potential substrates, **Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and the Summer Neuropeptide Conference**, Salzburg, Austrija, 20-23. srpnja 2009. (poster).

4. **N. Jajčanin Jozić**, P. K. Baral, S. Deller, P. Macheroux, K. Gruber, M. Abramić: Yeast dipeptidyl peptidase III – insight into the structure of metallopeptidases of M49 family, **Tenth International Summer School on Biophysics ''Supramolecular Structure and Function''**, Rovinj, Hrvatska, 19. rujna-1. listopada 2009. (poster).

5. J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, B. Vukelić, **N. Jajčanin Jozić**, J. Makarević, D. Agić, Š. Šimaga, D. Vujaklija, M. Abramić: Analysis of conserved residues of the human dipeptidyl peptidase III, **VIII European Symposium of The Protein Society**, Zürich, Švicarska, 14-18. lipnja 2009. (poster).

6. **N. Jajčanin-Jozić**, B. Vukelić, J. Špoljarić, M. Baršun, M. Abramić: Human dipeptidyl peptidase III acts like a postproline-cleaving enzyme on endomorphins, **4th Central European Conference Chemistry towards Biology**, Budimpešta, Mađarska, 8-11. rujna 2008. (poster).

7. B. Salopek-Sondi, B. Vukelić, J. Špoljarić, Š. Šimaga, D. Vujaklija, J. Makarević, N. Jajčanin-Jozić, M. Abramić: **Functional tyrosine residue in the active center of human dipeptidyl peptidase III**, Budimpešta, Mađarska, 8-11. rujna 2008. (poster).

8. J. Špoljarić, B. Salopek-Sondi, B. Vukelić, Š. Šimaga, D. Vujaklija, J. Makarević, **N. Jajčanin Jozić,** M. Abramić: Uloga evolucijski sačuvanog ostatka tirozina u katalitičkom mehanizmu porodice metalopeptidaza M49, **50 godina molekularne biologije u Hrvatskoj**, Zagreb, Hrvatska, 20-21. studenog 2008. (poster).

9. D. Agić, M. Hranjec, **N. Jajčanin**, K. Starčević, B. Vukelić, G. Karminski-Zamola, M. Abramić: Progressive inhibition of human dipeptidyl peptidase III by new amidino-substituted-benzimidazoles, **Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology**, Vodice, Hrvatska, 3-7. listopada 2006. (poster).